

**Selektive Depletion von regulatorischen
T-Zellen zur Verstärkung der
CD8⁺ T-Zellantwort während einer Infektion
der Maus mit dem Friend Retrovirus**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Kirsten Katrin Dietze, geb. Esperstedt

aus Neuss
Dezember 2010

Für meinen Großvater Jakob Nietgen.

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulf Dittmer

2. Gutachter: Prof.'in Dr. Astrid Westendorf

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Daniel Hoffmann

Tag der Disputation: 24.02.2011

**Jede letzte Tatsache
ist nur die erste einer neuen Reihe.**

Ralph Waldo Emerson

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Retroviren	1
1.1.1	Struktur und Genom der Retroviren	1
1.1.2	Einfache und Komplexe Retroviren	3
1.1.3	Replikationszyklus von Retroviren	3
1.1.4	HIV	6
1.1.5	Tiermodelle für HIV	7
1.1.6	Der Friend Virus-Komplex als Modell für retrovirale Infektionen	8
1.1.6.1	Klassifizierung, Aufbau und Besonderheiten muriner Leukämie Viren	8
1.1.6.2	Pathogenese des Friend Virus-Komplexes	9
1.2	Das Immunsystem	10
1.2.1	Das angeborene Immunsystem	11
1.2.2	Das adaptive Immunsystem	12
1.2.3	Die zelluläre Immunantwort	14
1.2.3.1	T-Helferzellen	14
1.2.3.2	Zytotoxische T-Zellen (CTL)	15
1.2.3.3	Mechanismen der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität	16
1.2.3.4	Regulatorische T-Zellen	17
1.2.3.5	Natürliche regulatorische T-Zellen	18
1.2.3.6	Induzierte regulatorische T-Zellen	20
1.2.3.7	Regulatorische T-Zellen in Virusinfektionen	21
1.2.3.8	Regulatorische T-Zellen in retroviralen Infektionen	25
1.2.4	Immunreaktion auf eine Friend Virus-Infektion	27
1.2.4.1	Die Rolle von T-Helferzellen während einer Friend Virus-Infektion	27
1.2.4.2	Die Rolle von zytotoxischen T-Zellen während einer Friend Virus-Infektion	27
1.2.4.3	Die Rolle von regulatorischen T-Zellen während einer Friend Virus-Infektion	29
1.2.4.4	Die Kinetik der Immunantwort von CD8 ⁺ T-Zellen und regulatorischen CD4 ⁺ T-Zellen während der akuten Friend Virus-Infektion	30
1.3	Zielsetzung der Arbeit	32
2	MATERIAL	34
2.1	Geräte	34
2.2	Verbrauchsmaterial	35
2.3	Versuchstiere	36

2.3.1	Wildtyp Mäuse.....	36
2.3.2	Transgene Mäuse	36
2.4	Chemikalien und Medien	37
2.5	Antibiotika	37
2.6	Häufig verwendete Puffer und Medien	37
2.7	Antikörper	39
2.8	Tetramere und F-MuLV-spezifische Peptide	40
2.9	Kommerzielle Standardtests	40
2.10	Viren und Zelllinien	41
3	METHODEN.....	42
3.1	Tierversuche	42
3.1.1	Infektion.....	42
3.1.2	Intraperitoneale Injektion.....	42
3.1.3	Betäubung der Mäuse mit Isofluran®	42
3.1.4	Blutentnahme	42
3.1.5	Organentnahme	43
3.1.6	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Organen.....	43
3.2	Zellzahlbestimmung	44
3.3	<i>In vivo</i> Herstellung einer Friend Virus Präparation	44
3.4	Herstellung einer Friend Murine Leukemia Virus-Präparation <i>in vitro</i>.....	45
3.5	Zellkultur	45
3.5.1	Kultivierung von Zellen.....	45
3.5.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	46
3.6	Nachweis von infektiösen Zellen mittels <i>Infectious Center Assay</i>	46
3.7	Isolieren und Sortieren von Lymphozyten aus einer Gesamtzellsuspension mittels MACS	48
3.8	Durchflusszytometrie.....	49
3.8.1	Ausschluss toter Zellen in der Durchflusszytometrie	50
3.8.2	Färbung von Oberflächenproteinen	51

3.8.3	Intrazelluläre Färbungen von Granzym B	51
3.8.4	Intrazelluläre Färbung von IFN- γ , TNF- α und IL-2.....	51
3.8.5	Intrazelluläre Färbung von Foxp3	52
3.8.6	PKH26 Färbung	52
3.8.7	Tetramerfärbung	53
3.9	Depletion von CD8⁺ T-Zellen mittels Zell-spezifischer Antikörper	54
3.10	Depletion von CD4⁺Foxp3⁺GFP⁺ regulatorischen T-Zellen in DEREK Mäusen.....	55
3.11	<i>In vivo</i> CTL-Test.....	56
3.12	Bestimmung der Proliferation von bestimmten Zellpopulationen mit Hilfe von Bromodeoxyuridin (BrdU).....	57
3.13	Pathophysiologische Untersuchung exemplarischer Mäuse	58
4	ERGEBNISSE	60
4.1	Akute Infektion.....	60
4.1.1	FV-spezifische zytotoxische Aktivität von CD8 ⁺ T-Zellen im Verlauf einer FV-Infektion	60
4.1.2	Untersuchung der Mechanismen der Expansion von regulatorischen T-Zellen	63
4.1.3	Die Rolle von regulatorischen T-Zellen in der Kontrolle der Virus-spezifischen Effektor CD8 ⁺ T-Zellantwort während einer akuten FV-Infektion	72
4.1.3.1	Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die Zytokinproduktion von CD8 ⁺ T-Zellen während der akuten FV-Infektion.....	73
4.1.3.2	Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die FV-spezifische zytotoxische Aktivität von CD8 ⁺ T-Zellen	75
4.1.4	Zeitpunkt der Suppression während einer akuten FV-Infektion.....	76
4.1.5	Auswirkungen einer temporären Depletion von regulatorischen T-Zellen auf die Pathobiologie FV-infizierter Mäuse	80
4.2	Chronische Infektion.....	82
4.2.1	Vergleich der Viruslast in der chronischen Infektion nach Inokulation verschiedener Viruspräparationen	82
4.2.2	Unterschiede in der Viruslast in verschiedenen Organen FV-infizierter Mäuse	83
4.2.3	Depletion von regulatorischen T-Zellen in der chronischen FV-Infektion	85
4.2.3.1	Effekte der Depletion regulatorischer T-Zellen auf die Expansion von CD8 ⁺ Effektorzellen in der chronischen FV-Infektion	86
4.2.3.2	Proliferation von CD8 ⁺ Effektorzellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen während der chronischen FV-Infektion	89
4.2.3.3	Verbesserte Funktionalität von CD8 ⁺ Effektorzellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen in chronisch infizierten Mäusen	91

4.2.4	Effekte der Depletion regulatorischer T-Zellen auf die Viruslast in der chronischen FV-Infektion.....	99
4.2.5	CD8 ⁺ T-Zellen sind für die reduzierte Viruslast nach Depletion von regulatorischen T-Zellen in der chronischen Infektion verantwortlich.....	106
5	DISKUSSION	108
5.1	Akute FV-Infektion.....	108
5.2	Chronische FV-Infektion	112
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	117
7	LITERATURVERZEICHNIS	121
8	ANHANG	130
8.1	Abkürzungsverzeichnis	130
8.2	Abbildungsverzeichnis	135
8.3	Tabellenverzeichnis	137
8.4	Publikationen	138
8.5	Danksagung	139
8.6	Lebenslauf.....	141
8.7	Erklärungen.....	143

1 Einleitung

1.1 Retroviren

Anfang des letzten Jahrhunderts wurden die ersten Retroviren entdeckt und beschrieben. Ellerman und Bang studierten 1908 eine Leukämie in Hühnern und es gelang ihnen dabei erstmals, die Krankheit mittels zellfreien Filtraten von kranken auf gesunde Hühner zu übertragen. Drei Jahre später charakterisierten Rous et al. das *Rous sarcoma virus* (RSV), welches in Hühnern Sarkome induziert (109). Auch in den darauf folgenden Jahren wurden eine Vielzahl an Retroviren entdeckt, darunter z.B. das *Simian foamy virus* (SFV) (37), das *Friend murine leukemia virus* (F-MuLV) (43), das *Feline leukemia virus* (FeLV) (61), das *Simian immunodeficiency virus* (SIV) (73) und das *Feline immunodeficiency virus* (FIV) (100). Das *Human T-cell leukemia virus-1* (HTLV-1) wurde 1980 als erstes Retrovirus isoliert, das mit einer humanen Erkrankung assoziiert war (45). Etwa 2% der mit HTLV-1 infizierten Menschen entwickeln eine adulte T-Zell-Leukämie. 1983 wurde ein bis zu diesem Zeitpunkt unbekanntes Retrovirus beschrieben (9), das kurze Zeit später mit dem *acquired immunodeficiency syndrom* (AIDS) in Verbindung gebracht wurde (19). Bei dieser Erkrankung weisen die betroffenen Patienten einen schlechten Allgemeinzustand und verschiedene opportunistische Infektionen auf. Inzwischen ist HIV-1 weltweit verbreitet (130). Bei Wirbeltieren sind Retroviren für verschiedene Erkrankungen verantwortlich. Dazu gehören Tumorerkrankungen (z.B. HTLV-I), Immundefizienz (z.B. HIV) und neurologische Defekte.

1.1.1 Struktur und Genom der Retroviren

Die Familie der Retroviren (kurz für **R**everse **T**ranskriptase **O**nkoviren) ist eine divergente Familie von umhüllten RNA-Viren. Sie besitzen ein lineares, einzelsträngiges (*single-stranded*, ss) RNA-Genom mit positiver Polarität und einer Größe von 7-12 kb. Retroviren sind die einzigen ssRNA-Viren, die für die Infektion einer Zelle ihr Genom nicht sofort als Matrize einsetzen können. Die in die Zelle eingeschleuste RNA muss vorher mittels reverser Transkription in doppelsträngige (*double-stranded*, ds) DNA umgeschrieben werden.

Die Größe der Virionen beträgt etwa 80–100 nm. Die Hülle (*envelope*) besteht aus einer von der Wirtszelle stammenden Lipiddoppelschicht, welche virale Glykopeptide

enthält. Diese äußeren Glykoproteine der Hülle sind für die Rezeptorbindung verantwortlich und durch Disulfidbrücken mit viralen transmembran-Proteinen verbunden, die ihrerseits für die Membranfusion zuständig sind. Innerhalb der Hüllmembran befinden sich die Matrixproteine, die das ikosaedrische Kapsid umgeben. Dieses Nukleokapsid (*core*) besteht aus Nukleokapsidproteinen und beinhaltet die diploiden Einzelstrang RNA Moleküle, die Reverse Transkriptase und die Integrase (Abbildung 1.1).

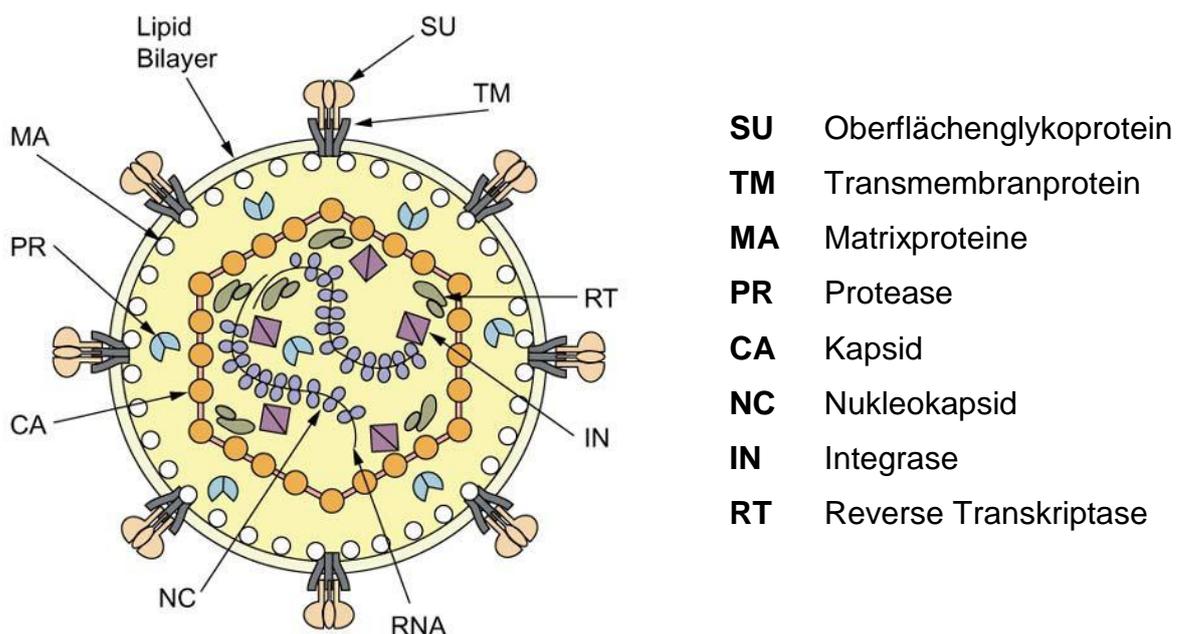


Abbildung 1.1 Schematischer Aufbau eines Retrovirus (131)

Alle Retroviren haben drei Hauptgene (*gag*, *pol*, *env*) gemeinsam. Das *gag*-Gen enthält Informationen für die Synthese interner Strukturproteine wie die Matrix-, die Kapsid- und die Nukleoproteinstruktur. Das *pol*-Gen kodiert für die Enzyme Integrase und Reverse Transkriptase und das *env*-Gen für die Oberflächen- und Transmembran-Komponenten des viralen Hüllproteins. Außerdem besitzen alle Retroviren eine kleine Domäne, das *pro*-Gen, welches die Virusprotease synthetisiert. Diese Gene befinden sich innerhalb einer 200-600 bp langen DNA-Wiederholungseinheit (*long terminal repeat*, LTR). Diese Einheiten flankieren die Gene und befähigen diese nach dem Herausschneiden zur Reintegration in das

Genom. Da die LTR alle Sequenzen enthält, die zur Regulierung der Genexpression notwendig sind, steuern bzw. terminieren sie die Transkription.

1.1.2 Einfache und Komplexe Retroviren

Innerhalb der Familie der Retroviren wird zwischen den einfachen und den komplexen Retroviren unterschieden, wobei die Unterteilung auf der Genomorganisation, bzw. der Translation von akzessorischen Proteinen beruht. Die einfachen Retroviren besitzen ausschließlich die oben erwähnten Gene *gag*, *pol* und *env*. Das murine Leukämievirus F-MuLV ist ein typischer Vertreter dieser Gruppe. Im Gegensatz dazu enthalten komplexe Retroviren, wie das zu den Deltaretroviren gehörende HTLV, das zu den Lentiviren gehörende HIV oder das zu den Spumaviren gehörende Foamyvirus weitere regulatorische und akzessorische Gene. Abbildung 1.2 zeigt den unterschiedlichen Genomaufbau beider Gruppen.

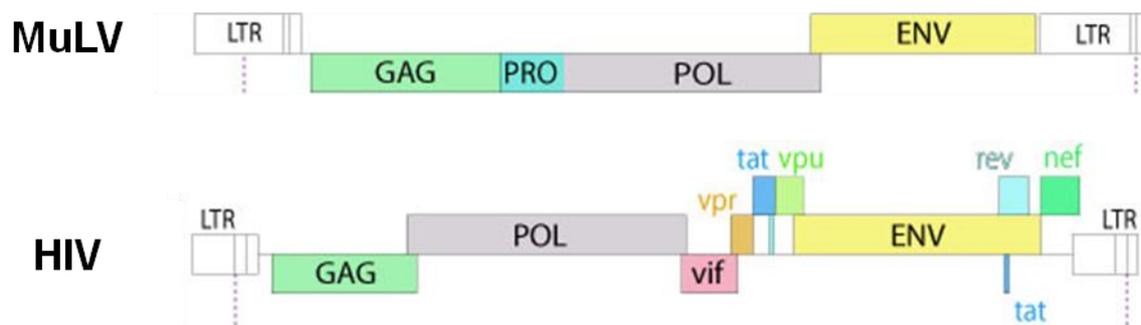


Abbildung 1.2 Repräsentative Genome einfacher (MuLV) und komplexer (HIV-1) Retroviren

(verändert nach: http://expasy.ch/viralzone/all_by_protein.html)

1.1.3 Replikationszyklus von Retroviren

Die Replikation von Retroviren lässt sich in mehrere Schritte unterteilen, wie in Abbildung 1.3 dargestellt ist. Zu Beginn findet die Infektion der Wirtszelle statt, indem das Glykoprotein der Virushülle an seinen Rezeptor an der Wirtszelloberfläche bindet (1.). Dann beginnt die virale Membran mit der Wirtszellmembran zu fusionieren, damit das Kapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangen kann (2.). Anschließend löst sich das Kapsid auf, und die RNA sowie verschiedene virale Proteine, wie z.B. die Reverse Transkriptase und Integrase werden freigesetzt. Nach Aktivierung der

Reversen Transkriptase wird die ssRNA im Zytoplasma in dsDNA umgeschrieben (3.). Dieser Prozess ist durch die fehlende Korrekturlese-Fähigkeit der Reversen Transkriptase allerdings relativ ungenau, was zu häufigen Virusmutationen führt. Nach der Transkription wird die dsDNA mit Hilfe sowohl zellulärer als auch viraler Proteine in den Zellkern transportiert und dort mit Hilfe der Integrase in das Wirtszellgenom eingebaut (5.). Dazu bindet diese die virale und die Wirts-DNA und bildet damit den Präintegrationskomplex. Nun schneidet die Integrase zuerst die Enden der viralen DNA und dann an einer beliebigen Stelle die Wirts-DNA und verbindet diese miteinander. Aus diesem Vorgang entsteht nach dem Auffüllen von entstandenen Lücken im Genom durch DNA-Reparaturenzyme und dem Schließen des Doppelstrangs durch Ligasen das sogenannte Provirus. Im Folgenden werden die RNA-Polymerase II und verschiedene andere Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle rekrutiert, um die DNA des Provirus zu transkribieren (6.). Die durch diesen Prozess entstandene mRNA wird ins Zytoplasma transportiert, in dem auch die Translation der verschiedenen viralen Vorläuferproteine stattfindet (7.). Im Anschluss daran werden die viralen Kapside durch Einstülpung der zellulären Plasmamembran zu einem unreifen Viruspartikel. Innerhalb dieses unreifen Partikels beginnt die virale Protease, sich autokatalytisch aus dem Vorläuferprotein herauszuschneiden und daraufhin die anderen Vorläuferproteine in seine Komponenten (Matrix, Kapsid, Nukleokapsid, Reverse Transkriptase, Integrase) zu spalten. Der nun folgende Abschnürungsprozess, in dem die neuen viralen Partikel freigesetzt werden, wird auch als „*Budding*“ bezeichnet (8.). Im letzten Schritt, der Reifung des neuen Viruspartikels, lagern sich die Kapsidproteine zu einem konischen Kapsid zusammen und die Spaltung der Vorläuferproteine in die jeweiligen Komponenten wird abgeschlossen (9.). Erst wenn dieser Reifungsprozess abgeschlossen ist, ist der freigesetzte Viruspartikel infektiös.

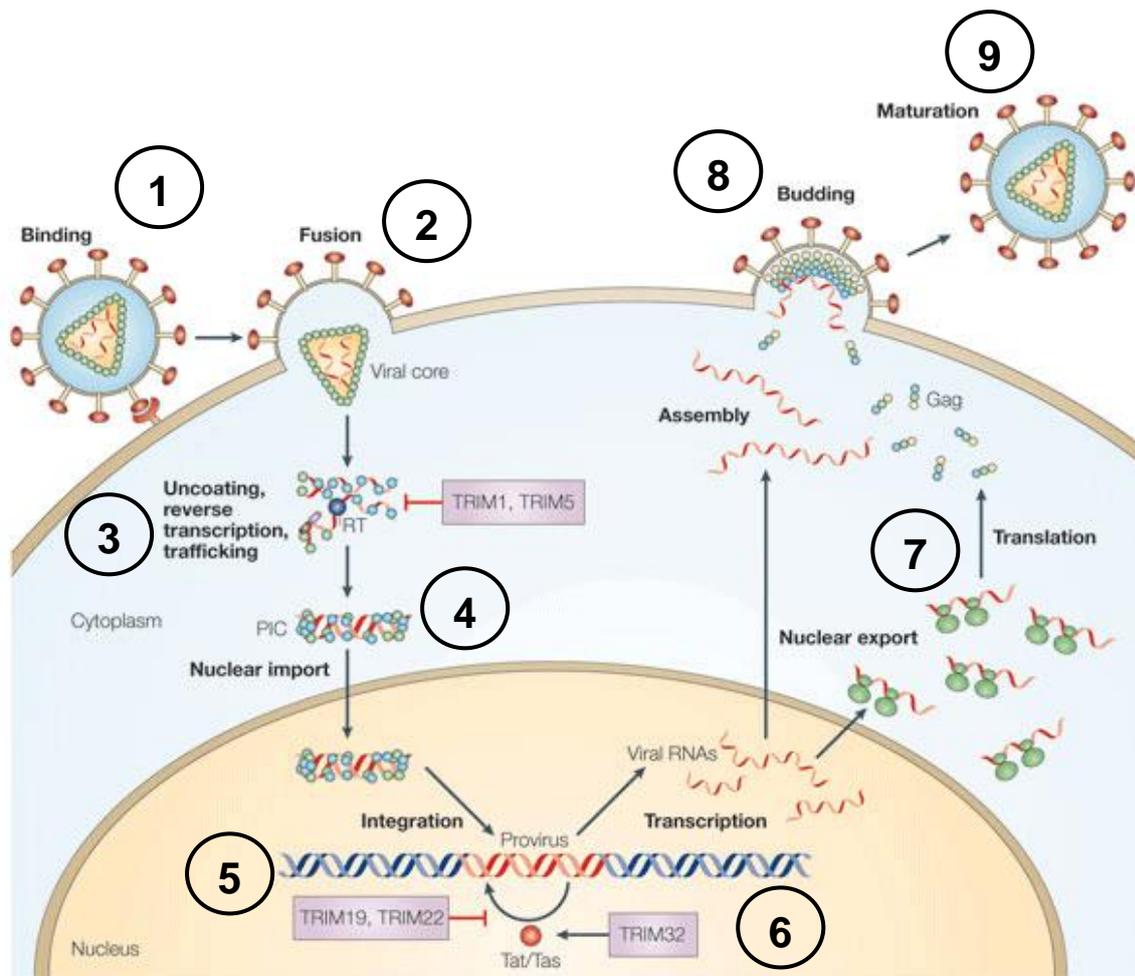


Abbildung 1.3 Replikationszyklus von Retroviren

verändert nach (96)

1. Bindung des Viruspartikels an einen spezifischen Rezeptor an der Oberfläche der Wirtszelle
2. Fusion des Viruspartikels mit der Zellmembran und Internalisierung des Viruskapsids ins Zytoplasma
3. Reverse Transkription
4. Transport der synthetisierten dsDNA in den Zellkern
5. Integration der viralen dsDNA ins Wirtsgenom (Provirus)
6. Transkription des Provirus
7. Transport viraler mRNA ins Zytoplasma und Translation dieser
8. Verpackung der viralen RNA und der viralen Proteine (*Assembly*) und anschließende Freisetzung von neuen Viruspartikeln (*Budding*)
9. Reifung der neuen Viruspartikel

1.1.4 HIV

Im Jahre 1981 wurde in einer amerikanischen Fachzeitschrift des CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) von 5 jungen Männern berichtet, welche an einer seltenen Lungenentzündung erkrankt waren (*Pneumocystis carinii*). Dies war die erste Berichterstattung über die kurze Zeit später als AIDS bezeichnete Erkrankung (erworbenes Immundefizienz Syndrom). 1983 beschrieben die Forscher Barre-Sinoussi, Chermann und Montagnier erstmals ein bis dahin unbekanntes humanes Retrovirus (9), welches ein Jahr später mit der AIDS-Erkrankung in Verbindung gebracht wurde (19). Das Isolat von Barre-Sinoussi (9), sowie weitere Isolate (74, 101) wurden später unter der Bezeichnung "Humanes Immundefizienzvirus Typ 1" (HIV-1) zusammengefasst. HIV-2, eine genetische Variante des HI-Virus wurde 1986 entdeckt und beschrieben (24). HIV-1, welches heutzutage HIV-2 weitestgehend verdrängt hat, und HIV-2 ähneln sich hinsichtlich des klinischen Verlaufs und der pathogenen Eigenschaften, wobei die Aminosäuresequenz-Homologie zwischen beiden Erregern nur etwa 50% beträgt. Inzwischen ist HIV global verbreitet und mehr als 33 Millionen Menschen sind derzeit weltweit mit dem Virus infiziert. Insgesamt haben sich seit den frühen achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts weltweit ca. 45-50 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Afrika südlich der Sahara trägt weiterhin die Hauptlast der weltweiten Epidemie. Zwei Drittel aller Menschen, die mit HIV infiziert sind, leben dort, und etwa drei Viertel aller AIDS Todesfälle werden in dieser Region verzeichnet (Stand November 2009 (130)). Nach der Entdeckung von HIV im Jahre 1983 begannen umgehend die ersten Studien zur Entwicklung eines Impfstoffes. Dennoch vermittelt keine der bis heute entwickelten Prototyp-Vakzinen einen Schutz vor der HIV-Infektion. Die Hochaktive Antiretrovirale Therapie (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*, HAART) welche zurzeit die einzig wirksame antiretrovirale Therapie dargestellt, ist außerdem nur einem geringen Teil der Weltbevölkerung zugänglich (ca. 5% der HIV-Infizierten). Bei dieser Therapie handelt es sich um eine Kombinationstherapie mit Arzneimitteln aus verschiedenen Wirkungsklassen wie z.B. nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Hemmer und Proteasehemmer. Die Nachteile dieser Therapie sind die hohen Kosten, die starken Nebenwirkungen der Präparate und die trotz Kombinationstherapie auftretende Resistenzbildung des HIV. Zudem kann durch diese Therapie nur die Entwicklung von AIDS verzögert werden, eine

vollständige Beseitigung des Virus und damit verbundene Heilung ist dagegen nicht möglich.

1.1.5 Tiermodelle für HIV

Ein Problem, das die HIV Forschung heutzutage immer noch sehr schwierig macht, ist die begrenzte Anzahl an aussagekräftigen Tiermodellen. Reproduzierbar lassen sich nur Schimpansen mit HIV-1 infizieren. Allerdings replizieren die meisten HIV-1 Isolate in Schimpansen sehr schlecht und eine AIDS-ähnliche Erkrankung entwickelt sich eher selten (97, 98). Außerdem sprechen ethische und finanzielle Gründe gegen Experimente mit Schimpansen. Daher wurden zahlreiche Studien zur Untersuchung der Immunantwort gegen Retroviren in Rhesusmakaken mit dem verwandten SIV durchgeführt. Probleme bei diesem Tiermodell sind die limitierte Anzahl an Affen, ihr heterologer genetischer Hintergrund, das geringe Wissen über die molekulare Immunologie von Affen und die stark limitierten Möglichkeiten, deren Immunsystem zu manipulieren. Daher sind Erkenntnisse über die Grundlagen der Retrovirusimmunologie im Mausmodell wesentlich einfacher zu erlangen. Ein Vorteil des Mausmodells ist der genetisch definierte immunologische Hintergrund der Tiere, wobei kongene, transgene und knockout Tiere von besonderer Bedeutung für aussagekräftige Experimente sind. Weil Mäuse nicht mit HIV oder SIV infiziert werden können, benötigt man jedoch murine Retroviren. Es gibt eine große Anzahl onkogener Retroviren in der Maus, jedoch induzieren sehr viele dieser Retroviren nur bei neugeborenen Mäusen eine Erkrankung, während sie bei erwachsenen Tieren apathogen sind. Das Friend Virus (FV) ist ein Retrovirus-Komplex, welcher in erwachsenen Mäusen eine letale Erythroleukämie verursacht. Die immunologischen und genetischen Merkmale des FV sind in den letzten 25 Jahren intensiv untersucht worden (54). Bedingt durch die unterschiedliche Pathogenese von FV in der Maus im Gegensatz zu HIV im Menschen ist die FV-Infektion als Modell für die Erforschung pathologischer Aspekte der Infektion nicht geeignet. Allerdings sind in der akuten Phase einer FV-Infektion und einer HIV- oder SIV-Infektion große Ähnlichkeiten in der Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem jeweiligen Virus zu beobachten (31). Daher lassen sich die immunologischen Merkmale einer retroviralen Infektion gut am FV-Modell untersuchen. Das Friend Virus Mausmodell wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Grundlagenmodell verwendet, um die Abläufe der

Immunantwort in der akuten und im Besonderen der chronischen retroviralen Infektion zu untersuchen und zu charakterisieren.

1.1.6 Der Friend Virus-Komplex als Modell für retrovirale Infektionen

1.1.6.1 Klassifizierung, Aufbau und Besonderheiten muriner Leukämie Viren

Die murinen Leukämieviren gehören zu den Gammaretroviren und besitzen ein einfach aufgebautes Genom. Ursprünglich wurden murine Leukämieviren aus Mäusestämmen isoliert, die eine hohe Anzahl von Leukämieerkrankungen aufwiesen. Das Isolat von Gross und Moloney (1960) führte in infizierten Mäusen zu einer T-Zell-Leukämie, während die Isolate von Rauscher (1962) und Friend (1957) zu einer Erythroleukämie führten. Weitere Erkrankungen, die durch MuLV verursacht werden, sind MAIDS (*murine acquired immunodeficiency syndrom*), sowie Sarkome und Thymome (56, 110, 118).

Die Viren, die ein solches Krankheitsbild verursachen, bilden zum überwiegenden Teil einen Komplex aus defekten und kompletten Viren. Bei Letzteren handelt es sich um nicht-pathogene aber replikationskompetente Viren, auch Helferviren genannt, wogegen die defekten Viren pathogen aber replikationsinkompetent sind. Bei einer Koinfektion einer Zelle mit beiden Viren können von dem pathogenen, replikationsinkompetenten Virus mit Hilfe der Helferviren neue infektiöse Partikel gebildet werden. Je nach Art ihres Rezeptors werden die murinen Leukämieviren eingeteilt in die Subklassen der ekotrophen Viren, die auf die Infektion von Maus- und Rattenzellen beschränkt sind; die xenotrophen Viren, die Zellen verschiedener Spezies, aber keine Mauszellen infizieren, sowie die amphotrophen und polytrophen Viren, welche Rezeptoren nutzen, die sowohl auf Zellen von Nagern als auch auf anderen Säugerzellen vorkommen. Innerhalb der Lipiddoppelschicht der murinen Leukämieviren befindet sich ein ikosaedrisches Kapsid, in dem sich wiederum die ssRNA befindet. In dem Kapsid befindet sich neben den drei Virus-kodierten Enzymen (Reverse Transkriptase, Integrase und Protease) zelluläre t-RNA als Primer für die virale DNA-Synthese. Das virale Genom setzt sich zusammen aus zwei identischen unsegmentierten ssRNA-Strängen mit einer Gesamtlänge von ca. 8,2 kb. Das *gag*-Gen, welches für die internen Strukturproteine des Virions kodiert, wird als Vorläuferprotein (Pr65Gag) gebildet, das dann in vier Untereinheiten gespalten wird (p30Gag, p15Gag, p12Gag und p10Gag). Das *pol*-Gen liefert die

Informationen für die Reverse Transkriptase und Integrase und ist durch ein Stopp-Codon vom *gag*-Gen getrennt. Durch das Überlesen des Stopp-Codons wird die mRNA in ein Gag-Pol-Polyprotein translatiert. Eine Besonderheit von MuLV ist, dass das glykosylierte Gag-Pol-Polyprotein (gGag) an die Zelloberfläche transportiert wird. Der Grund für diesen Transport könnte darin liegen, dass MuLV dadurch der antiviralen Funktion von APOBEC3 Proteinen entgeht, da gGag-defiziente Viren nur in APOBEC3-defizienten Mäusen replizieren können (69). Im Leseraster von *pol* befindet sich ein weiterer Genabschnitt *pro*, der für die Virionprotease kodiert. Die äußeren Hüll- und Transmembranproteine des Virus leiten sich vom *env*-Gen ab, das für die viralen Hüllproteine gp70 und p15E kodiert, welche von einem gemeinsamen Vorläuferprotein gebildet werden. Dieses Vorläuferprotein (85 kDa) wird am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) translatiert und im ER glykosyliert. Im Golgi-Apparat wird das Vorläuferprotein nach einer weiteren Glykosylierung in zwei Einheiten gespalten, dem Oberflächenprotein gp70 und dem nicht glykosylierten transmembranen Teil p15E. Das gp70 bildet die so genannten "knobs" auf der Oberfläche der Virushülle. Die beiden Proteine gp70 und p15E sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Durch die exponierte Stellung des gp70 auf dem Viruspartikel ist dieses Protein für viele biologische Eigenschaften von MuLV verantwortlich, z.B. Rezeptorerkennung, Wirtsspezifität, Rezeptor-Interferenz und Antigenität (58).

1.1.6.2 Pathogenese des Friend Virus-Komplexes

Der Friend Virus-Komplex (FV) besteht aus dem pathogenen replikationsunfähigen SFFV (*spleen focus forming virus*) und dem replikationskompetenten aber apathogenen F-MuLV. Das SFFV besitzt größere Deletionen im *gag*-Gen, womit es dem Virus nicht möglich ist, virale Partikel zu bilden. Erst eine Koinfektion der Wirtszellen durch beide Viren (F-MuLV und SFFV) führt zur Verpackung der RNA von SFFV in F-MuLV kodierte Viruspartikel und somit zur Verbreitung des SFFV. Durch diese Verbreitung des SFFV kann in den Mäusen eine Erythroleukämie verursacht werden. F-MuLV alleine ist in adulten Mäusen apathogen, kann aber in neugeborenen Mäusen, die noch kein voll ausgebildetes Immunsystem haben, eine Splenomegalie, Anämie und Erythroleukämie verursachen (43). Der Rezeptor für F-MuLV und andere ekotrophe murine Leukämieviren ist Pit-1/2 (*inorganic phosphate*

transporter) (30). Die Zielzellen sind Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Erythrozytenvorläuferzellen (34). Der Rezeptor für das SFFV ist unbekannt.

Der Ablauf der Pathogenese lässt sich in drei Stufen gliedern. Nachdem das SFFV Erythroblasten infiziert hat, wird ein defektes env kodiertes Glykoprotein gp55 an der Zelloberfläche exprimiert. Das Glykoprotein bindet an den Erythropoetin-Rezeptor von kernhaltigen Erythrozytenvorläuferzellen, wodurch es ein konstitutives Mitogen für diese Zellen darstellt und eine polyklonale Proliferation induziert (28, 65). Durch dieses falsche Proliferationssignal werden die Zielzellen für das FV, die Erythrozytenvorläuferzellen, zur Proliferation angeregt. Die zweite Stufe ist dadurch gekennzeichnet, dass das Provirus durch seinen zufälligen Einbau in das Wirtszellgenom ein zelluläres Onkogen der *ets*-Familie aktiviert. Im dritten Schritt wird das Tumorsuppressor-Gen p53 inaktiviert (65). Dies ermöglicht die Transformation und ungehinderte Proliferation der Zellen. Suszeptible Mäuse entwickeln daraufhin eine massive Splenomegalie, bei der das Milzgewicht auf das zehnfache bis zwanzigfache des Normalgewichts ansteigen kann. Das Immunsystem dieser Mäuse ist nicht in der Lage, eine schützende Immunantwort gegen das FV auszubilden, so dass die Tiere 3-4 Wochen nach Infektion eine maligne Erythroleukämie entwickeln (87). In den für die vorliegende Arbeit verwendeten resistenten Mäusen (C57BL/6) führt die FV-Infektion allerdings nicht zur Ausbildung einer malignen Erythroleukämie. Diese Mäuse sind in der Lage, das Virus durch eine starke Immunantwort zu kontrollieren. Sie entwickeln eine leichte Splenomegalie, die sich nach etwa zwei bis drei Wochen wieder zurückbildet. Allerdings sind sie nicht in der Lage, das Virus vollständig zu eliminieren und bleiben so persistierend infiziert. Trotz dieser chronischen Infektion haben diese Tiere eine normale Lebenserwartung.

1.2 Das Immunsystem

Der Schutz vor Infektionen spielt eine fundamentale Rolle für die körperliche Unversehrtheit aller Lebewesen. Dieser Schutz wird vom Immunsystem vermittelt. Es bekämpft in den Körper eingedrungene Fremdorganismen und kann körpereigene Zellen zerstören, welche sich fehlerhaft verändert haben. Im Laufe der Stammesgeschichte entwickelte sich das Immunsystem zu einem immer komplexeren System. Schon Wirbellose besitzen unspezifische Abwehrmechanismen, die so genannte angeborene Immunabwehr. Wirbeltiere

entwickelten zusätzlich einen komplexen spezifischen Mechanismus, die so genannte adaptive Immunabwehr, die einen spezifischen Schutz vor Krankheitserregern bietet und zusätzlich ein Gedächtnis für eine schnellere Abwehr bei späteren Infektionen mit dem gleichen Erreger vermittelt (89). Somit umfasst das Immunsystem zwei verschiedene Mechanismen, die angeborene und die spezifische Immunabwehr, um Pathogene zu bekämpfen.

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem dient der ersten Erkennung von Pathogenen und deren Abwehr. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen Makrophagen, Dendritische Zellen (DC), Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Neutrophile, Basophile und Eosinophile (39). Makrophagen dienen der Beseitigung von Mikroorganismen, die auf Grund von körperfremden Proteinen auf ihrer Oberfläche erkannt und anschließend phagozytiert werden. Danach werden sie intrazellulär abgebaut, und die entstandenen Epitope werden durch einen Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I (MHC-I) oder der Klasse II (MHC-II) an der Oberfläche der Makrophagen präsentiert (2).

Dendritische Zellen weisen eine ähnliche Funktionsweise auf. Sie sind vorwiegend in der Peripherie lokalisiert, erkennen eingedrungene Erreger und nehmen diese auf. Dann migrieren sie in den nächsten lokalen Lymphknoten um die Antigene der internalisierten Pathogene dort T- Lymphozyten zu präsentieren und fungieren so als Antigen-präsentierende Zelle (APC). Sie sind also ebenso wie die Makrophagen daran beteiligt, zusätzlich zu ihrer primären Funktion über eine Aktivierung der T-Zellen eine gezielte Immunantwort hervorzurufen, und vermitteln somit zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort (120).

NK-Zellen können Virus-infizierte Zellen oder Krebszellen erkennen und abtöten. Sie gehören zum angeborenen Immunsystem, weil sie keine Antigen-spezifischen Rezeptoren besitzen, sondern zu vernichtende Zellen daran erkennen, dass diese im Gegensatz zu gesunden naiven Zellen kaum MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren (20). Solche Zellen werden von NK-Zellen durch die Ausschüttung zytotoxischer Moleküle oder Interferon (IFN)- γ abgetötet.

Neutrophile und Eosinophile zirkulieren im Blut und wandern von bestimmten Stoffen angelockt zum Ort der Infektion. Sie besitzen in ihrem Inneren mit zytotoxischen

Stoffen gefüllte Granula, mit Hilfe derer sie infizierte Zellen vernichten können (113). Basophile enthalten unter anderem Histamin, welches als Gewebshormon und Neurotransmitter wirkt, aber vor allem im Immunsystem bei der Abwehr von Pathogenen eine Rolle spielt. Histamin kann aber beispielsweise auch bei allergischen Reaktionen von Bedeutung sein. Des Weiteren enthalten Basophile noch den plättchenaktivierenden Faktor (PAF), der bei Degranulation für eine Vernetzung von Thrombozyten sorgt.

Neben den zellulären Komponenten gehören zum angeborenen Immunsystem auch noch weitere Komponenten. Dazu zählt z.B. das Komplementsystem. Dabei handelt es sich um ein Zusammenspiel proteolytischer Enzyme, welche über drei verschiedene Wege Gram-negative Bakterien und Viren durch Lyse inaktivieren, lokale Entzündungsreaktionen hervorrufen und Erreger für eine Eliminierung durch Phagozytose opsonieren können (42). Weitere humorale Komponenten sind die antimikrobiellen Faktoren, von denen z.B. Lysozym ubiquitär verbreitet ist (62). Eine Voraussetzung für die Einleitung einer Immunreaktion ist eine spezifische Erkennung von eindringenden Pathogenen. Hierfür existieren bestimmte keimbahnkodierte Rezeptoren (*pattern recognition receptor*), die charakteristische pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP) erkennen (13, 60). Zu ihnen gehören die auf der Oberfläche und in den Endosomen lokalisierten Toll-ähnlichen Rezeptoren, im Zytosol vorkommende RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*)-ähnlichen RNA Helikasen und NOD (*nucleotide binding oligomerization domain*)-ähnlichen Rezeptoren (NLR). Durch die Bindung verschiedener PAMPs an ihre entsprechenden Rezeptoren kommt es zur Aktivierung verschiedener Signalwege, was zu einer Expression von IFN und proinflammatorischen Zytokinen wie Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-6 und IL-12 führt (14, 60).

1.2.2 Das adaptive Immunsystem

Die erworbene Immunität entwickelte sich im Laufe der Wirbeltierphylogese aus der angeborenen Immunabwehr. Sie passt sich spezifisch an die jeweilige Pathogene an und wird durch die Zellpopulation der Lymphozyten vermittelt. Diese sind in der Lage, spezifische Antigene der eingedrungenen Pathogene zu erkennen, und verschiedene Effektorfunktionen sowie ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Die Lymphozyten befinden sich in großer Anzahl im Blut, in der Lymphe

und in den lymphoiden Organen. Es werden zwei Gruppen von Lymphozyten unterschieden, die T-Zellen und die B-Zellen. Die B-Zellen entwickeln sich direkt aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, während die T-Zellen von der fötalen Leber bzw. vom Knochenmark in den Thymus wandern und dort ausreifen (48).

Die beiden unterschiedlichen Typen der Lymphozyten spiegeln zwei Hauptmechanismen der adaptiven Immunantwort wider, die humorale und die zelluläre Immunantwort. B-Zellen produzieren abhängig oder unabhängig von T-Zellen Antigen-spezifische Antikörper (Immunglobuline, Ig), die zur humoralen Immunantwort zählen. Menschen, die keine T-Zellen besitzen, weisen eine geringere Antikörperantwort auf (49). Dieses Phänomen beruht auf der Funktion einer Subpopulation von T-Zellen, die die Aktivität von Effektorzellen regulieren, z.B. von B-Zellen. Daher bezeichnet man diese als T-Helferzellen (Th-Zellen). Auf ihrer Oberfläche exprimieren T-Zellen bestimmte Oberflächenmoleküle. Diese zellulären Proteine werden mit der Abkürzung CD (*clusters of differentiation*) und einer entsprechenden Zahl bezeichnet. CD4- und CD8-Moleküle sind Glykoproteine, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören und als Ko-Rezeptoren des T-Zellrezeptors (TCR) fungieren. Das CD4-Molekül wurde in den siebziger Jahren entdeckt und findet sich üblicherweise auf Th-Zellen. Es stellt einen Ko-Rezeptor für MHC-II restringierte Antigen-induzierte T-Zellaktivierung dar. Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) hingegen sind durch die Bildung des CD8-Proteins charakterisiert (99). CD8 ist ein transmembranes Glykoprotein, welches spezifisch an das MHC-I-Protein bindet (144). Es wird von zytotoxischen T-Zellen exprimiert, nicht aber von Th-Zellen. Für die Charakterisierung von Effektor T-Zellen bedient man sich verschiedener Aktivierungsmarker, wie z.B. CD43, und CD62L. CD43 ist ein Membran-Sialoglykoprotein, das von allen Lymphozyten exprimiert wird und ein Teil eines Ligand-Rezeptorkomplexes ist, der bei der T-Zellaktivierung eine Rolle spielt. Somit dient CD43 als Aktivierungsmarker und lässt sich zur Identifikation von Effektorzellen einsetzen. CD62L (auch L-selectin) ist ein Zell-Adhäsionsmolekül, welches auf Leukozyten zu finden ist. Es dient als „*homing*“ Rezeptor für Leukozyten, da Endothelzellen die Liganden für CD62L exprimieren und Leukozyten so an diese binden können. Durch diesen Mechanismus werden die Leukozyten an einem Ort festgehalten. Die Oberflächenexpression von CD62L geht nach der Aktivierung verloren, so dass CD62L negative Zellpopulationen einen Effektorphänotyp

anzeigen. Ob zytotoxische T-Zellen funktionell aktiv sind, lässt sich mit dem Marker CD107a bestimmen. CD107a (auch *lysosome associated membrane protein 1*; LAMP-1) ist ein Membran-Glykoprotein, welches nach der Verschmelzung zytotoxischer Granula mit der Zellmembran auf der Oberfläche von CD8⁺ Zellen exprimiert wird. Aus diesem Grund ist die Expression von CD107a ein Indikator für die Degranulation zytotoxischer Moleküle und damit für die zytolytische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen (3).

Die meisten Viren sowie einige Bakterien und Parasiten vermehren sich im Zytoplasma infizierter Zellen. Diese intrazellulär lokalisierten Infektionserreger können vom Immunsystem eliminiert werden, indem die infizierten Zellen zerstört oder verändert werden (94). Diese Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene übernehmen die CTL und NK-Zellen. Im Zytoplasma der CTL und NK-Zellen befinden sich lytische Granula, welche aus modifizierten Lysosomen hervorgehen. Diese Granula enthalten verschiedene Effektorproteine, die durch die Freisetzung aktiviert werden und infizierte Zielzellen lysieren.

1.2.3 Die zelluläre Immunantwort

1.2.3.1 T-Helferzellen

Die Funktionen der T-Lymphozyten liegen in der Überwachung und Eliminierung infizierter Zellen, die fremde Peptidantigene mit Hilfe der MHC-Oberflächenproteine präsentieren. Dieser Komplex wird von aktivierten T-Lymphozyten über den TCR sowie verschiedene Ko-Rezeptoren, wie z.B. CD3 erkannt. CD4⁺ T-Zellen vom Helfertyp erkennen virale Peptide in Assoziation mit MHC-II-Molekülen (70). MHC-II-Moleküle werden ausschließlich von APC exprimiert. Dazu gehören in erster Linie DC, Makrophagen und B-Lymphozyten. Die wichtigste Aufgabe der Th-Zellen besteht in der Produktion verschiedenster Zytokine.

Die Antigen-spezifische Th-Zell-Antwort wird in Typ 1- (Th1) und Typ 2- (Th2) Reaktionen unterteilt. Die Th-Zell-Typen unterscheiden sich in ihrer Effektorfunktion und ihrer Sekretion von Zytokinen (115). Zytokine sind Signalmoleküle, welche von Zellen des Immunsystems sekretiert werden und das Verhalten anderer Zellen beeinflussen. Th1-Zellen sekretieren Zytokine wie IL-2 und IFN- γ . Letzteres aktiviert Makrophagen und verstärkt den Immunglobulin-Klassenwechsel (Immunglobulin-Switch) von IgM (unspezifische Immunabwehr) zu IgG2a bei B-Zellen (spezifische

Immunabwehr), ein Kennzeichen einer Th1-Immunität (40). Th2-Zellen produzieren IL-4, -5, -10 und -13 und hemmen so die Makrophagenaktivität. Kennzeichen einer Th2-assoziierten Immunantwort ist die hohe Konzentration an IL-4 und der Immunglobulin-Switch von IgM zu IgG1 (121). Eine Th1-dominierte Immunantwort wird vor allem bei einer Infektion mit Viren oder intrazellulären Bakterien beobachtet. Bei einer Infektion mit Parasiten oder extrazellulären Bakterien dominiert die Th2-Immunantwort (88).

1.2.3.2 Zytotoxische T-Zellen (CTL)

Eine wichtige Aufgabe aktivierter CD8⁺ T-Zellen besteht in der Erkennung und Eliminierung Virus-infizierter Zellen, die MHC-I-Moleküle, in Verbindung mit viralen Peptiden an ihrer Oberfläche präsentieren. Neben ihrer zytotoxischen Funktion haben CD8⁺ T-Zellen durch die Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine auch einen regulativen Charakter im Immunsystem. Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen sind in der Lage, IFN- γ und in geringerem Umfang auch TNF- α , sowie eine Reihe so genannter Chemokine zu synthetisieren, z.B. *Macrophage Inflammatory Protein-1* (MIP-1 α , MIP-1 β) oder *Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted* (RANTES) (104). Diese Chemokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Migration von Leukozyten zum Ort einer Infektion und der Induktion von Entzündungsprozessen in infizierten Organen (78).

Über einen indirekten Mechanismus kann IFN- γ die Vermehrung von Pathogenen hemmen, indem es eine gesteigerte MHC-I-Expression induziert (44), Makrophagen aktiviert (102) oder die Pathogenreplikation inhibiert (50). Außerdem erhöht IFN- γ die Fas-Expression und wirkt dadurch indirekt auf die Apoptose-Induktion (90). TNF- α besitzt eine starke proinflammatorische Wirkung und ein direktes lytisches Potential. Die Bindung von TNF- α an den TNF-Rezeptor 1 induziert den Zelltod der infizierten Zelle (132). Außerdem verfügen CTL über zwei unabhängige zytolytische Mechanismen: die Granula-Exozytose und die FasL/Fas vermittelte Zytotoxizität. Beide voneinander unabhängigen zytotoxischen Wege führen zur Apoptose der Zielzelle. Charakteristisch für die Apoptose ist die Fragmentierung der chromosomalen DNA in 180 bp lange Mono- und Multimere. Mit diesen Mechanismen werden in einem Wirtsorganismus infizierte Zellen eliminiert (51).

1.2.3.3 Mechanismen der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität

Im Zytoplasma aktivierter zytotoxischer T-Zellen befinden sich lytische Granula, die verschiedene zytotoxische Effektorproteine enthalten, durch deren Freisetzung Zielzellen apoptotisch werden. Dazu gehören lytische Moleküle (Perforin), Zytokine (z.B. IFN- γ , TNF- α , IL-2), Proteasen (Granzyme) und verschiedene Rezeptoren (Mannose-6-Phosphat-Rezeptor), sowie verschiedene Moleküle, die an der Aktivierung bzw. Inaktivierung und Stabilisierung von Perforin und den Granzymen (Gzm) beteiligt sind (138).

Der Granula-Exozytoseweg ist durch die Sekretion zytotoxischer Granula aus CTL oder NK-Zellen gekennzeichnet. Nach Interaktion des TCR mit dem Antigen-MHC-Komplex wandern die zytotoxischen Granula zielgerichtet zu der Kontaktstelle zwischen CTL und Zielzelle und fusionieren dort mit der Zellmembran der CTL. Dabei wird der Inhalt der Granula in den interzellulären Spalt entleert und so die Apoptose in der Zielzelle induziert. Für die durch die Granula-Exozytose induzierte Apoptose sind im wesentlichen Perforin sowie Granzym A (GzmA) und Granzym B (GzmB) verantwortlich. Die Endozytose von GzmB wird durch den kationenunabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor vermittelt, der Rezeptor für GzmA ist unbekannt. Nach Freisetzung von Perforin, das in der Nukleusmembran Poren bildet, gelangt GzmA nach der Freisetzung aus Endosomen in den Nukleus und induziert dort Apoptose. GzmB aktiviert hauptsächlich verschiedene Caspase-Kaskaden, was ebenfalls die Induktion der Apoptose zur Folge hat. Weitere Funktionen dieser beiden Granzyme sind unter anderem Destrukturierung der Nukleusmembran, Depolarisation der Mitochondrien, Beschädigung und Fragmentierung der DNA (138, 139).

Ein weiterer Mechanismus der T-Zell vermittelten Zytotoxizität wurde in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie in NK-Zellen gefunden. Hierbei vermitteln T- und NK-Zellen zytotoxische Aktivitäten auch über den Fas/Fas-Ligand (FasL)-Mechanismus (119). Beim Kontakt der CTL mit einer infizierten Zelle bindet der FasL auf der Oberfläche der CTL an den Fas Rezeptor, der sich auf der Zielzelle befindet. Durch diese Interaktion kommt es zur Aktivierung von Caspasen, was folglich zur Induktion der Apoptose in der infizierten Zelle führt (92). Die beschriebenen Abläufe sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

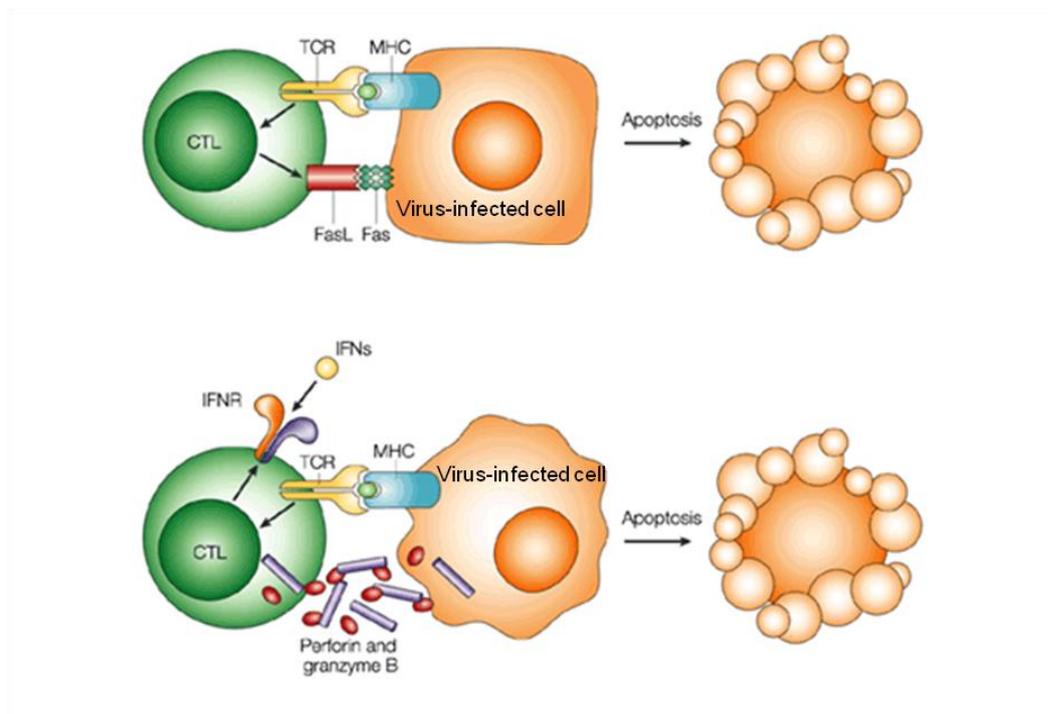


Abbildung 1.4 Mechanismen der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität

Oben abgebildet ist die Fas/FasL vermittelte Apoptoseinduktion in infizierten Zielzellen, die untere Abbildung zeigt den Perforin/Granzym vermittelten Weg. verändert nach (129)

1.2.3.4 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen sind eine spezialisierte Subpopulation der T-Zellen, welche die Aktivierung des Immunsystems supprimieren. So gewährleisten sie die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts und die Toleranz gegen Selbst-Antigene. Es existieren zwei verschiedene Populationen von regulatorischen T-Zellen: die natürlichen und die induzierten regulatorischen T-Zellen. Zusätzlich zu den im Folgenden beschriebenen CD4⁺ regulatorischen T-Zellen existiert auch noch eine Subpopulation von CD8⁺ T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften. Diese CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen weisen einen ähnlichen Phänotyp wie CD4⁺ regulatorische T-Zellen auf und sind genau wie diese maßgeblich an der Regulation des Immunsystems beteiligt (128). Die verschiedenen Arten von regulatorischen T-Zellen sind in Abbildung 1.5 dargestellt.

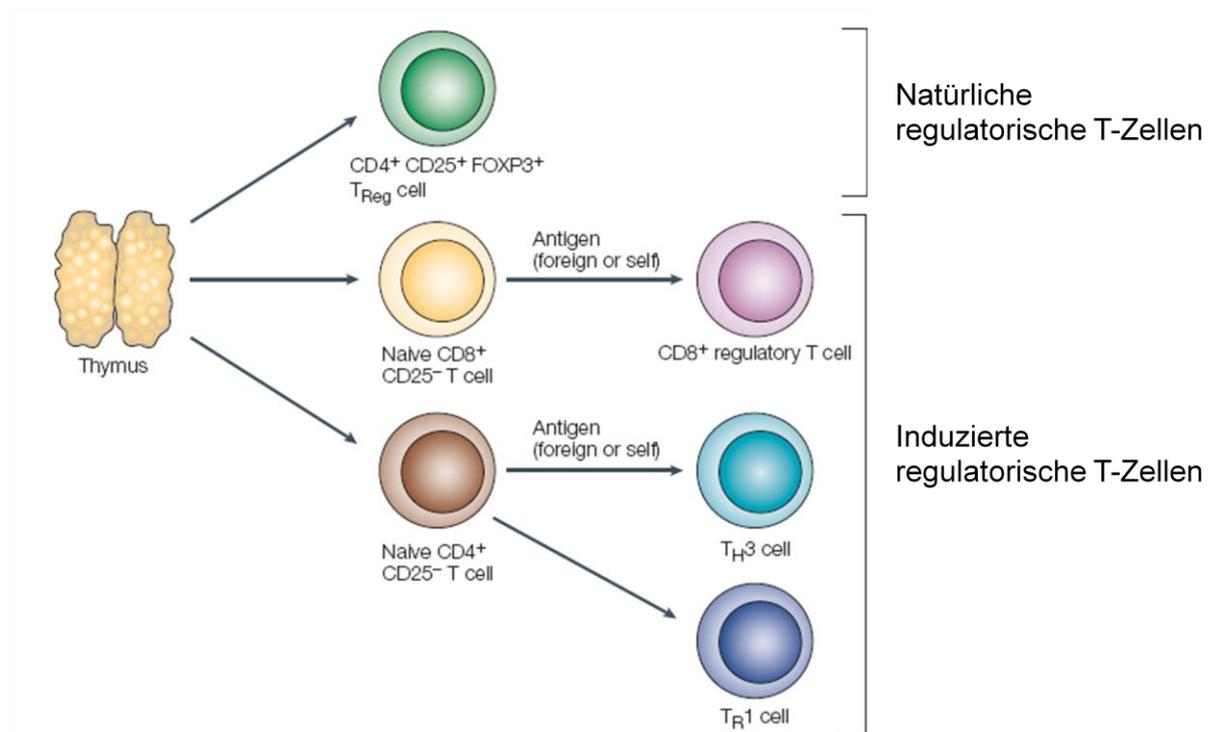


Abbildung 1.5 Natürliche und induzierte regulatorische T-Zellen

Natürliche regulatorische T-Zellen exprimieren CD25 und den Transkriptionsfaktor Foxp3. Diese Zellen reifen im Thymus machen etwa 5-10% der peripheren T-Zellen aus. Andere Populationen Antigen-spezifischer regulatorischer T-Zellen können aus naiven CD4⁺ CD25⁻ und CD8⁺ CD25⁻ T-Zellen generiert und daraufhin als induzierte regulatorische T-Zellen bezeichnet werden. verändert nach (84)

1.2.3.5 Natürliche regulatorische T-Zellen

1995 haben Sakaguchi und Kollegen die in den späten 70er Jahren beschriebenen Suppressor T-Zellen „wieder entdeckt“ und sie regulatorische T-Zellen genannt (7). Sie wiesen in verschiedenen Zell-Transfer-Experimenten im Mausmodell eine Population von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nach, die autoreaktive CD8⁺ T-Zellen und Th1-Zellen in ihrer Funktion inhibiert und damit vor allem gegen Autoimmunerkrankungen schützt. Diese Zellen werden als natürliche regulatorische T-Zellen bezeichnet (10). Sie reifen im Thymus und erkennen vor allem Selbst-Antigene. Der wichtigste Oberflächenmarker dieser T-Zell Population ist die alpha-Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) (112). CD25 wird jedoch auch von Effektor T-Zellen nach Aktivierung exprimiert und ist insofern kein spezifischer Marker für regulatorische T-Zellen. Andere Marker wie *glucocorticoid-induced TNFR-related protein* (GITR) (TNFRSF18), CD152 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*, CTLA-4), CD103 (alphaE-Integrin) und CD134 (OX40) werden ebenfalls zur Differenzierung von

regulatorischen T-Zellen herangezogen. Diese Marker werden allerdings nicht nur von regulatorischen T-Zellen exprimiert, weshalb auch sie keine spezifischen Marker darstellen. Natürliche regulatorische T-Zellen machen ca. 5-10% aller CD4⁺ T-Zellen aus und proliferieren *in vitro* nicht nach Stimulation über den TCR. Die Bedeutung der natürlichen regulatorischen T-Zellen *in vivo* wird dadurch deutlich, dass Mäuse, die diese Zellen nicht besitzen, eine Vielzahl von Autoimmunerkrankungen entwickeln (7).

Die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 wird als essentiell für natürliche regulatorische T-Zellen angesehen. Foxp3 ist ein zur Forkhead-Familie gehörender Transkriptionsrepressor und wird zumindest in der Maus nur in regulatorischen T-Zellen spezifisch gebildet. Retroviraler Gentransfer von Foxp3 führt zur Differenzierung von regulatorischen T-Zellen aus naiven T-Zellen (57) (siehe auch Abbildung 1.5). Deshalb ist Foxp3 ein regulatorisches Schlüsselprotein für die Entstehung von regulatorischen T-Zellen. Im murinen System wurde das letale Autoimmunsyndrom Scurfy, das in Mäusen mit einem Foxp3-Defekt beobachtet wurde und zu hyperproliferativen Lymphozyten führt, auf das Fehlen von regulatorischen T-Zellen zurückgeführt. Die Rekonstitution dieser Tiere mit regulatorischen T-Zellen hob das Krankheitsbild auf, und die Mäuse überlebten (41, 71). Die Scurfy-Mäuse zeigen ein Krankheitsbild, welches in etwa der beim Menschen durch das IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked Syndrome*)-Syndrom ausgelöste Immunpathologie entspricht. Im humanen System resultiert eine Mutation, die einen Foxp3-Defekt zur Folge hat, in IPEX. Diese seltene Autoimmunkrankheit wird durch autoaggressive T-Zellen verursacht (136). Sie zeichnet sich durch Autoimmunität gegenüber endokrinen Organen (Diabetes mellitus Typ I, Thyroiditis), Allergien (Nahrungsmittelallergie, Atopische Dermatitis), chronisch entzündliche Darmerkrankung und fatale Infektionen aus (103, 135). Um die Funktion und Bedeutung der regulatorischen T-Zellen *in vivo* besser zu charakterisieren, wurden im Jahr 2007 mit Hilfe der künstlichen bakteriellen Chromosomentechnologie (*bacterial artificial chromosome*, BAC) transgene DERE (*depletion of regulatory T cell*) Mäuse generiert, die ein Diphtherietoxinrezeptor/GFP (*green fluorescent protein*)-Fusionsprotein unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors bilden. BACs dienen als Vektoren, und es ist möglich, größere Genomabschnitte in diese hinein zu klonieren. Im Fall der DERE Mäuse wurde ein BAC, das das *Foxp3* Gen enthielt, so verändert, dass im ersten Exon des *Foxp3* Gens das Gen des

Diphtherietoxinrezeptor/GFP-Fusionsproteins eingefügt wurde. Dieses 150 kb große BAC wurde in befruchtete Oozyten von C57BL/6 Mäusen injiziert. Der resultierende transgene Mausstamm ermöglicht zum Einen eine Depletion und zum Anderen eine eindeutige Detektion von regulatorischen T-Zellen über das exprimierte GFP. In histologischen und durchflusszytometrischen Analysen konnte festgestellt werden, dass das BAC-Transgen, welches das Diphtherietoxinrezeptor/GFP-Fusionsprotein kodiert, nur in Foxp3⁺ CD4⁺ T Zellen exprimiert wird. Somit können regulatorische T-Zellen selektiv und effizient durch die Injektion von Diphtherietoxin (DT) depletiert werden. Da eine kontinuierliche Diphtherietoxinbehandlung neugeborener DEREK-Mäuse über sechs Tage zu einer der Scurfy-Mäuse ähnlichen Autoimmunerkrankung führte, konnte experimentell nachgewiesen werden, dass Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen maßgeblich an der Homöostase des Immunsystems beteiligt sind und den Organismus vor der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten bewahren (71).

Allerdings konnte ein universeller Mechanismus der Suppression durch regulatorische T-Zellen bisher nicht gefunden werden. Eine wichtige Rolle spielen vermutlich die immunsupprimierenden Zytokine IL-10 und *transforming growth factor* (TGF)- β , jedoch gibt es auch Infektionsmodelle und Autoimmunmodelle, in denen dies nicht der Fall ist (64). Natürliche regulatorische T-Zellen inhibieren beispielsweise meist über einen Zell-Zell-Kontakt, jedoch ist ihre suppressive Aktivität nicht ausschließlich davon abhängig. CD4⁺ CD25⁺-Zellen können ihre regulatorische Eigenschaft auf konventionelle CD4⁺ Zellen übertragen (64). Hierzu ist zwar Zell-Zell-Kontakt notwendig, aber lösliches TGF- β scheint ebenso eine Rolle zu spielen. Diese neu entstandenen „regulatorischen“ T-Zellen brauchen dann zur Ausübung ihrer suppressiven Aktivität keinen Zell-Zell-Kontakt mehr, und die Suppressoraktivität wird in diesem Fall dem löslichen TGF- β zugeschrieben (57, 63). Die genauen Mechanismen der Suppression durch regulatorische T-Zellen sind demzufolge noch nicht vollständig verstanden.

1.2.3.6 Induzierte regulatorische T-Zellen

In Tumor- und Infektionsmodellen ist inzwischen eine weitere Population von regulatorischen T-Zellen beschrieben worden, die so genannten induzierten regulatorischen T-Zellen (86). Diese CD4⁺ T-Zellen erlangen ihre suppressierenden Eigenschaften erst während ihrer Aktivierung *in vivo* oder *in vitro*, was allerdings

vermutlich auch für natürliche regulatorische T-Zellen gilt. Sie stammen vermutlich von naiven CD4⁺ T-Zellen ab, wie in Abbildung 1.5 gezeigt ist. Während einer Tumorentstehung oder Infektion, kommt es zu einer starken Vermehrung von spezifischen CTL. Diese müssen aber -im Idealfall nach Eliminierung des Tumors oder des Pathogens- durch Apoptose deletiert oder in ihrer Funktion supprimiert werden, um die Gefahr von Immunpathologien zu minimieren. Für diesen Funktionsverlust von CTL sind vermutlich regulatorische T-Zellen verantwortlich. Allerdings ist für eine solche Kontrolle die Anzahl der vorhandenen natürlichen regulatorischen T-Zellen nicht ausreichend, weswegen es zu einer Expansion von regulatorischen T-Zellen kommt. Dies geschieht im Falle von natürlichen regulatorischen T-Zellen durch Proliferation. Im Gegensatz dazu kommt es aber auch zu einer Konversion von Foxp3⁻ Th-Zellen in regulatorische T-Zellen. Diese werden als induzierte regulatorische T-Zellen bezeichnet. Nach der Aktivierung von induzierten regulatorischen T-Zellen durch von APC präsentierten Antigenen sekretieren diese beispielsweise je nach Subpopulation große Mengen an IL-10 oder TGF- β um CTL zu supprimieren. Auch in Falle von induzierten regulatorischen T-Zellen sind die genauen Mechanismen der Suppression nicht vollständig verstanden. Zusätzlich zu sekretierten Zytokinen und Zell-Zell-Kontakt können induzierte regulatorische T-Zellen CTL auch über den Einsatz von zytotoxischen Molekülen wie z.B. GzmB eliminieren (22). Offensichtlich können aber bestimmte Viren mit Hilfe von induzierten regulatorischen T-Zellen der antiviralen CTL Antwort entgehen und so chronische Infektionen verursachen. Bisher sind bei persistierenden Infektionen, wie etwa mit dem Hepatitis C Virus (HCV) (21) oder HIV (133) Interaktionen mit induzierten regulatorischen T-Zellen beschrieben worden. Im Friend Virus Maus-Modell ist der Zusammenhang zwischen der Expansion regulatorischer T-Zellen und der Persistenz von Viren am deutlichsten erkennbar (32). In diesem Fall handelt es sich aber nicht um induzierte regulatorische T-Zellen, sondern um eine Expansion von natürlichen regulatorischen T-Zellen.

1.2.3.7 Regulatorische T-Zellen in Virusinfektionen

Regulatorische T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei Autoimmunkrankheiten, Transplantatabstoßungen und Allergien, indem sie potentiell pathogene Immunantworten, die z.B. von Th1-Zellen, Th2-Zellen und vor allem CTL vermittelt

werden, unterdrücken. Während einer Infektion kann die Herunterregulation dieser sehr wichtigen Immunantwort jedoch verschiedene Konsequenzen haben.

Um zu verhindern, dass eine überschießende pro-inflammatorische Immunantwort dem Wirtsgewebe kollaterale Schäden zufügt, sind die durch regulatorische T-Zellen vermittelten immunomodulatorischen Mechanismen von großer Bedeutung (Abbildung 1.6). In der chronischen HCV-Infektion findet beispielsweise eine Inhibierung von HCV-spezifischen T-Zellen durch IL-10 produzierende CD4⁺ und CD8⁺ regulatorische T-Zellen statt, um die Entzündung der Leber zu vermindern. Untersuchungen haben gezeigt, dass chronisch HCV-infizierte Patienten mit einer hohen Anzahl an regulatorischen T-Zellen geringere Leberschäden aufwiesen als Patienten mit einer niedrigen Anzahl dieser Zellen (21). Dagegen entwickeln HCV-infizierte Patienten, die nur eine geringe Anzahl an CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen besitzen, häufig ein Autoimmunsyndrom namens „gemischte Kryoglobulinämie“, welches durch B-Zellproliferation und der Produktion von Autoantikörpern gekennzeichnet ist (16). In Tierexperimenten wurde gezeigt, dass eine Infektion von Mäusen mit dem Theiler's Virus, einem murinen Enzephalomyelitis Virus, eine Demyelinisation von Nervenzellen, bzw. derer Axone induziert, was zu einer Zerstörung der Marksubstanz führt. Dieser durch CD4⁺ T-Zellen vermittelte pathogene Mechanismus kann durch den Transfer von regulatorischen T-Zellen verhindert werden (55). Darüber hinaus ist beschrieben, dass es in Mäusen, bei denen die regulatorischen T-Zellen experimentell ausgeschaltet wurden, während einer genitalen Herpes Simplex Virus (HSV)-2-Infektion zu einer verstärkten Th-1 Antwort in den drainierenden Lymphknoten kam. Dadurch verzögerte sich der Eintritt dieser Immunzellen in die HSV-infizierten Gewebe, so dass diese Mäuse schwerere Läsionen bekamen, früher eine Paralyse der hinteren Extremitäten entwickelten und insgesamt eher an der Infektion verstarben als die nicht depletierten Kontrollgruppen. Die Autoren folgern daher, dass regulatorische T-Zellen im Verlauf einer akuten Infektion, in der die Replikation der Pathogene in nicht-lymphoiden Geweben stattfindet, auch eine begünstigende Rolle für die Immunantwort spielen können (76). Auch im Falle einer herpetischen Keratitis, bei der es durch eine HSV-1-Infektion zu einer Entzündung der Hornhaut des Auges kommt, ist der Mechanismus der protektiven Immunität durch regulatorische T-Zellen für den Wirt vorteilhaft. Im entsprechenden Mausmodell führte eine Depletion von regulatorischen T-Zellen zu

einem erhöhten Einwandern von $CD4^+$ T-Zellen in die Kornea, was zu einer gesteigerten Zerstörung des Wirtsgewebes führt. Regulatorische T-Zellen sorgen in diesen Modellen dementsprechend für eine Minimalisierung kollateraler Läsionen im Wirtsgewebe (125), indem sie die Virus-spezifische T-Zell Antwort supprimieren.

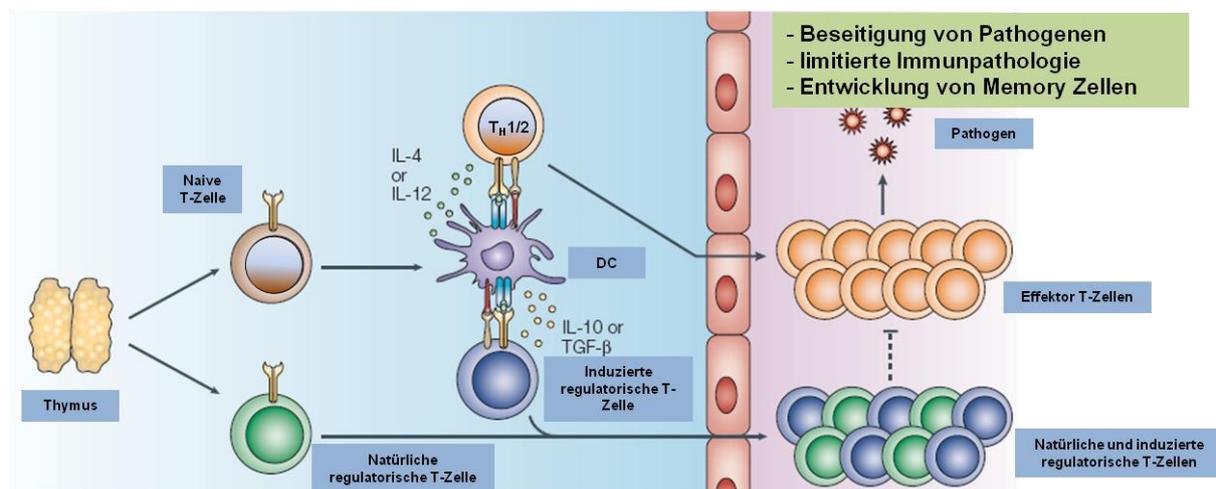


Abbildung 1.6 Protektive Immunität durch regulatorische T-Zellen

Die durch Pathogene induzierten regulatorischen T-Zellen und Effektor T-Zellen befinden sich in einer Balance, die eine Effektor T-Zell-vermittelte Beseitigung der Pathogene mit gleichzeitig limitierter Immunpathologie erlaubt. verändert nach (84)

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen, für den Wirt positiven, Effekten können die immunsupprimierenden Effekte von regulatorischen T-Zellen auf CTL auch direkte negative Auswirkungen für den Wirt haben. Zwar bedeutet eine supprimierte CTL Antwort weniger Immunpathologie für den Wirt auf der einen Seite, auf der anderen Seite ist dies aber auch mit einer schlechteren Pathogenkontrolle assoziiert. Damit wird eine Voraussetzung für eine chronische Infektion geschaffen. Viele Viren regen durch Induktion von immunsuppressiven Zytokinen, wie IL-10 oder TGF- β die Expansion von regulatorischen T-Zellen an. Diese können eine Dysfunktion von Effektorzellen verursachen, wie in Abbildung 1.7 gezeigt ist. Beispielsweise besitzen Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion im Körper zirkulierende induzierte $CD4^+$ und auch $CD8^+$ regulatorische T-Zellen (77). Wenn die anti-inflammatorische Aktivität von regulatorischen T-Zellen *in vitro* durch Zugabe von IL-10-spezifischen neutralisierenden Antikörpern blockiert wird, steigt die Produktion von IFN- γ durch HCV-spezifische CTL signifikant an (17). Ein weiteres Beispiel für diesen Effekt ist die Depletion von $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen in frischen Blutproben HIV-

infizierter Patienten. Dadurch erhöht sich die Anzahl von IFN- γ produzierenden CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen als Antwort auf die Stimulierung mit HIV Antigenen (68). Ebenso erhöht sich die Virus-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort in HSV-infizierten Mäusen, wenn die regulatorischen T-Zellen entfernt werden. Dies verbessert als Folge die Beseitigung des Virus (126). Bei Menschen, die mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) infiziert sind, sorgt die Induktion von regulatorischen T-Zellen, die spezifisch für ein bestimmtes EBV Membranprotein sind, für die Hemmung der Th1-T-Zellantwort und fördern dadurch die Persistenz des Virus und in Folge dessen auch die Induktion von EBV-assoziierten Tumoren (79).

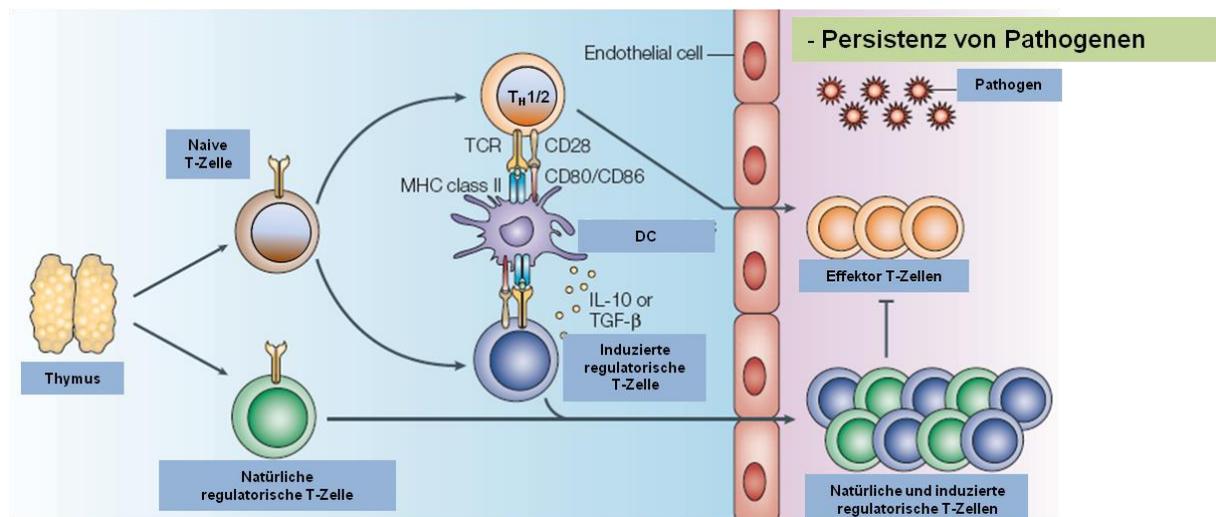


Abbildung 1.7 Regulatorische T-Zellen induzieren eine Immunpathologie

Pathogene stimulieren eine starke regulatorische T-Zellantwort, die sowohl natürliche, als auch induzierte regulatorische T-Zellen beinhaltet. Dies kann die Generierung und Funktion von Effektor T-Zellen soweit inhibieren, dass keine vollständige Eliminierung der Pathogene erreicht wird und zur Etablierung einer chronischen Infektion führen kann. verändert nach (84)

1.2.3.8 Regulatorische T-Zellen in retroviralen Infektionen

Retroviren, wie z.B. HIV, die normalerweise lebenslang im Wirt persistieren, sind potentiell gefährlich, da sie bei Menschen verstärkt aktiviert werden können, sobald eine anderweitige Beeinträchtigung des Immunsystems auftritt. Während einer HIV-Infektion befindet sich das Immunsystem in einem chronisch aktivierten Zustand. Im Verlauf einer akuten HIV-Infektion ist die Immunantwort bereits supprimiert, bevor ein Rückgang der CD4⁺ T-Zellen auftritt. Diese T-Zell Dysfunktion spielt eine große Rolle für die Progression der AIDS Erkrankung. Eine mögliche Erklärung für diese beeinträchtigte Funktion geht aus einer aktuellen Studie von regulatorischen T-Zellen in HIV-infizierten Patienten hervor. Immunsupprimierende CD4⁺ T-Zellen, die CD25 als bekannten Marker für regulatorische T-Zellen exprimieren und immunsuppressive Zytokine wie IL-10 und TGF- β sezernieren, inhibieren sowohl HIV-spezifische CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellantworten (68). In HIV-Patienten werden in der Regel die Proliferation von T-Zellen und deren Fähigkeit, IFN- γ zu sezernieren, von regulatorischen T-Zellen beeinträchtigt. Zusätzlich wurde in dieser Studie gezeigt, dass die zytotoxische Aktivität von Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ebenfalls negativ von regulatorischen T-Zellen beeinflusst wurde (68). Dieser negative Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die CTL Antwort hat also eine gesteigerte Viruslast zur Folge. Durch die anhaltend hohe Viruslast befindet sich das Immunsystem in einem ebenfalls anhaltend aktivierten Zustand, was mit der Progression der AIDS Erkrankung und dem Verlust von CD4⁺ T-Zellen in Verbindung gebracht wird. Dies begünstigt verschiedene immunologische Dysfunktionen wie z.B. den durch Hyperaktivierung induzierten Zelltod. Weitere Studien bestätigen einen Zusammenhang der Anzahl regulatorischer T-Zellen in HIV-Patienten und deren Krankheitsprogression. Patienten, die die Infektion kontrollierten (gemessen an der Anzahl CD4⁺ T-Zellen und der Höhe der Viruslast) besaßen ähnlich viele regulatorische T-Zellen wie nicht infizierte Menschen. Die Anzahl dieser Zellen war im Gegensatz dazu in Patienten, die sich in einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit befanden, deutlich geringer (66). In diesem fortgeschrittenen Stadium könnten regulatorische T-Zellen daher eine positive Rolle spielen, indem sie durch Suppression der CTL die chronische Aktivierung des Immunsystems des Wirtes eindämmen könnten.

Weitere Studien in HIV-positiven Patienten und SIV-infizierten Makaken belegten einen Zusammenhang von der Akkumulation von regulatorischen T-Zellen in

lymphoiden Geweben, der daraus folgenden reduzierten Aktivität von CTL und einer im weiteren Verlauf erhöhten Viruslast (5, 38). Es wird angenommen, dass virale Replikation und die folgende Effektorzellexpansion und Immunantwort die Expansion von regulatorischen T-Zellen in lymphoiden Organen begünstigt. Hierbei bleibt allerdings die Frage offen, ob es natürliche oder eine Population von induzierten regulatorischen T-Zellen sind, die die Hauptrolle in der HIV-Pathogenese und chronischen Infektion spielen. Die Ansammlung von regulatorischen T-Zellen in den Lymphknoten und der gastrointestinalen Mukosa HIV-infizierter Patienten spricht für eine Induktion oder Expansion dieser Zellen im Verlauf der Infektion. Darüber hinaus regen immunmodulatorische Proteine von HIV, wie z.B. *gp120*, *pol* und *gag*, die IL-10 und TGF- β Produktion von Makrophagen und DC an. Dies führt wiederum zu einer direkten Suppression von Th1-Zellen und schafft zusätzlich das adäquate Zytokinmilieu für eine Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (85).

Weiterhin wurde gezeigt, dass es eine erhöhte Anzahl und Aktivität von regulatorischen T-Zellen während einer FIV-Infektion in Katzen gibt. Diese Zellen inhibieren *in vitro* die IL-2 Produktion von CD4⁺ T-Zellen aus uninfizierten Katzen. Nach einer Depletion von CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen in diesen Tieren verbesserte sich deren Immunantwort gegen FIV (83). Des Weiteren wurde im Mausmodell bewiesen, dass die Entfernung von IL-10 sekretierenden regulatorischen T-Zellen die Progression der murinen AIDS Erkrankung unterdrückte (11). Insgesamt spielen regulatorische T-Zellen in retroviralen Infektionen eine sehr komplexe Rolle, die von vielen verschiedenen Variablen beeinflusst wird. Die Phänotypen, die Mechanismen der Induktion oder Expansion und die wechselseitige Beeinflussung von regulatorischen T-Zellen und Effektorzellen während einer retroviralen Infektion müssen daher weiterhin näher erforscht und charakterisiert werden, um daraus Wege für therapeutische Interventionen entwickeln zu können. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Aspekte der Interaktion von regulatorischen T-Zellen und Effektorzellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Modell der Infektion von Mäusen mit dem Friend Retrovirus untersucht.

1.2.4 Immunreaktion auf eine Friend Virus-Infektion

1.2.4.1 Die Rolle von T-Helferzellen während einer Friend Virus-Infektion

Im Falle der Infektion der Maus mit dem Friend Virus sind zwei CD4⁺ Epitope des F-MuLV *env* Protein bekannt, gegen die die CD4⁺ T-Zellantwort unter anderem gerichtet ist. Die Bindung dieser zwei Peptide schafft die Voraussetzung für eine erfolgreiche Erkennung durch CD4⁺ T-Zellen (116). Des Weiteren wurde auch noch ein *gag*-spezifisches Epitop entdeckt. *Gag*-spezifische CD4⁺ T-Zellen sind sehr effektiv in der Kontrolle von retroviralen Infektionen und bieten aus diesem Grunde ein potentiell Ziel für die Entwicklung von effizienten anti-retroviralen Impfstoffen (124). In persistierend infizierten Mäusen spielen CD4⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der FV Replikation und Verbreitung, was durch Depletionsexperimente bewiesen wurde. Hierbei zeigten Mäuse ohne CD4⁺ T-Zellen in der chronischen Infektion einen erneuten Krankheitsausbruch und bedingt dadurch eine Leukämieentwicklung. Die Viruslast in der Milz und im Blut war in diesen Mäusen verglichen mit nicht-depletierten, chronisch infizierten Mäusen, deutlich höher. Die Kontrolle der Virusreplikation durch CD4⁺ T-Zellen in der chronischen FV-Infektion erfolgt unabhängig von CD8⁺ T-Zellantworten und ebenso von Virus-neutralisierenden Antikörpern (53). Der Mechanismus des CD4⁺ T-Zell vermittelten antiviralen Effekts in der chronischen Infektion basiert hauptsächlich auf der Produktion von IFN- γ . *In vitro* Experimente bewiesen, dass FV-spezifische CD4⁺ T-Zellen zwei verschiedene antivirale Mechanismen besitzen. Sie können infizierte Zielzellen direkt lysieren, aber auch durch die Sekretion von IFN- γ die Virusreplikation hemmen. *In vivo* bewirkte die Neutralisation von IFN- γ durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern in der chronischen Infektion eine Steigerung der Virusreplikation. Außerdem war ein signifikanter Prozentsatz von IFN- γ -defizienten Mäusen nicht in der Lage, in der chronischen Infektion eine Kontrolle über die FV Replikation zu manifestieren (59).

1.2.4.2 Die Rolle von zytotoxischen T-Zellen während einer Friend Virus-Infektion

Der Genesungsprozess im Verlauf einer FV-Infektion erfordert die immunologische Hilfe vieler Teile des Immunsystems, eingeschlossen Antikörper, CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen. Ähnlich wie im Falle einer HIV-Infektion ist der Virustiter in der akuten

Phase der FV-Infektion ungefähr an Tag 7 nach Infektion am höchsten und fällt dann dank der Induktion einer adaptiven Immunantwort relativ schnell stark ab, was eine Kontrolle über die Infektion zur Folge hat. In dieser akuten Phase der Infektion spielen $CD8^+$ T-Zellen eine absolut entscheidende Rolle, denn sogar resistente C57BL/6 Mäuse können die Infektion in Abwesenheit von $CD8^+$ T-Zellen nicht kontrollieren (52). Das virale Epitop, welches hauptsächlich von CTL erkannt wird, ist das F-MuLV *env* Protein (26). Zusätzlich dazu wurden *in vitro* weitere CTL generiert, die spezifisch gegen das *gag* Polyprotein von F-MuLV gerichtet sind. Die Stärke der CTL Antwort korreliert mit dem Rückgang der Splenomegalie in infizierten Mäusen, wobei dieser von verschiedenen Mechanismen, wie z.B. der Sekretion von $IFN-\gamma$, der Fas/FasL Interaktion oder der Produktion und Ausschüttung von zytotoxischen Molekülen (Perforin, GzmA und GzmB) beeinflusst wird (139). Durch die Ausschüttung von zytotoxischen Molekülen kommt es zur Induktion der Apoptose in Virus-infizierten Zielzellen. Allerdings ist die Ausschüttung eines oder mehrerer dieser Moleküle abhängig vom Zeitpunkt der Infektion. Während der akuten Phase wird die virale Replikation vom Granula-Exozytoseweg kontrolliert. Hier wird die Bekämpfung der Virus-infizierten Zielzellen durch einen gezielt aufeinander abgestimmten Einsatz von Perforin, GzmA und GzmB vermittelt. Trotz der durch die CTL Antwort vermittelte Kontrolle der akuten Infektion kann das Virus auch in hoch resistenten Mausstämmen nicht vollständig beseitigt werden, weswegen sich nach der akuten Phase eine persistierende Infektion mit niedriger Viruslast etabliert. Im Unterschied zu der akuten Infektion, wo $CD8^+$ T-Zellen eine essentielle Rolle in der Bekämpfung der Infektion spielen, sind sie in der chronischen Phase nicht in der Lage, das chronische Virus zu kontrollieren oder zu eliminieren. Eine Depletion dieses Zelltyps im Verlauf der chronischen Phase hat aus diesem Grund keinerlei Effekt auf die Höhe der Viruslast (53). Es lassen sich zwar während der chronischen Infektion FV-spezifische $CD8^+$ T-Zellen, die verschiedene Marker von Effektorzellen exprimieren, nachweisen, diese sind jedoch in ihrer Funktion eingeschränkt. Dies betrifft sowohl ihre Fähigkeit, funktionsfähige lytische Granula mit Perforin, GzmA und GzmB zu produzieren, als auch verschiedenen Zytokinen wie z.B. $INF-\gamma$ zu sekretieren (143). Da die beschriebene $CD8^+$ T-Zell Dysfunktion bei vielen chronischen Infektionen eine Rolle spielt, könnte eine Reaktivierung dieser Zellen eine essentielle Komponente bei der Therapie solcher chronischen Infektionen darstellen.

1.2.4.3 Die Rolle von regulatorischen T-Zellen während einer Friend Virus-Infektion

Die in der akuten FV-Infektion so essentiell wichtigen $CD8^+$ T-Zellen verlieren in der chronischen Phase der Infektion ihre antivirale Funktion. Eine mögliche Erklärung dafür ist das Auftreten einer Immunevasion. Von anderen Infektionsmodellen ist bekannt, dass diese Immunevasion vielleicht durch eine minderwertige Erkennung der infizierten Zellen vermittelt werden kann. Im FV Modell konnten Virus-spezifische $CD8^+$ T-Zellen aus FV-spezifischen $CD8$ TCR-transgenen Mäusen, die in persistierend infizierte Mäuse transferiert wurden, das FV Antigen allerdings effizient erkennen und als Antwort darauf klonal expandieren. Jedoch waren diese transferierten Zellen nur in akut infizierten Mäusen in der Lage, die Viruslast zu senken. Trotz ihrer Aktivierung und klonalen Expansion hatten sie in chronischen Mäusen keine Auswirkungen auf die Viruslast. Ihre Funktionalität war in der chronischen FV-Infektion, gemessen an ihrer Fähigkeit, $IFN-\gamma$ zu produzieren, deutlich eingeschränkt. Dies zeigt deutlich die funktionelle Suppression der $CD8^+$ T-Zellen während der chronischen Phase. Weiterhin zeigt dies auch, dass es sich im Falle der FV-Infektion nicht, wie in vielen anderen Fällen, um eine Immunflucht durch Mutation der Epitope handelt, da das FV Antigen effizient erkannt wurde. Daher wurde vermutet, dass es sich bei der Ursache der Dysfunktion der CTL in der chronischen Infektion um eine Suppression durch regulatorische T-Zellen handelt. Um zu beweisen, dass diese Suppression tatsächlich von regulatorischen T-Zellen vermittelt wird, wurden FV-spezifische $CD8^+$ T-Zellen zusammen mit FV-induzierten regulatorischen T-Zellen aus einer chronisch infizierten Maus in akut infizierte Mäuse transferiert und dann die Fähigkeit der transferierten $CD8^+$ T-Zellen, $IFN-\gamma$ zu produzieren, bestimmt. Diese $IFN-\gamma$ Produktion nach akuter FV-Infektion war im Gegensatz zur $IFN-\gamma$ Produktion nach einem Ko-Transfer mit regulatorischen T-Zellen aus naiven Mäusen deutlich verringert. Außerdem fand sich in den akut infizierten Tieren, die die $CD8^+$ T-Zellen zusammen mit den regulatorischen T-Zellen chronisch infizierter Mäuse erhielten, eine gesteigerte Produktion von IL-10 durch $CD4^+$ T-Zellen der Rezipienten (32). Im FV Modell nutzt das Virus offensichtlich das System der regulatorischen T-Zellen, um der Immunantwort durch CTL zu entkommen und eine chronische Infektion im Wirt zu etablieren (32). Der Funktionsverlust der Effektor T-Zellen beginnt relativ früh während der akuten Infektion. In den ersten zwei Wochen der FV-Infektion ist die Aktivierung der CTL am

stärksten. In dieser Zeit produzieren diese vermehrt zytotoxische Moleküle und exprimieren den Degranulationsmarker CD107a auf ihrer Oberfläche. Danach beginnt eine Abnahme des prozentualen Anteils an aktivierten CD8⁺ T-Zellen, und ebenso lässt deren Fähigkeit zur Produktion zytotoxischer Moleküle und CD107a nach. Diese Dysfunktion tritt auf, wenn die Population von regulatorischen T-Zellen maximal expandiert. Der Beginn der Dysfunktion der CTL korreliert also mit dem Höhepunkt der Expansion regulatorischer T-Zellen, was sehr wahrscheinlich zu der Etablierung viraler Persistenz beiträgt (142).

1.2.4.4 Die Kinetik der Immunantwort von CD8⁺ T-Zellen und regulatorischen CD4⁺ T-Zellen während der akuten Friend Virus-Infektion

Im Falle der Infektion der Maus mit dem FV ist bekannt, dass zytotoxische CD8⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle für die Kontrolle der akuten Infektion spielen. Allerdings ist es ihnen nicht möglich, das Virus vollständig zu eliminieren, wodurch es zur Etablierung einer chronischen Infektion kommt. Anhand von Untersuchungen der Milz von FV-infizierten Mäusen wurde vermutet, dass diese Dysfunktion der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen durch regulatorische T-Zellen hervorgerufen wird (32). Die Kinetik der Virusreplikation, sowie der CD8⁺ T-Zellantworten und die Charakterisierung der nachfolgenden Expansion CD4⁺ regulatorischer T-Zellen in verschiedenen lymphatischen Organen (Milz, Knochenmark und Lymphknoten) der Maus während der akuten FV-Infektion wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit untersucht. Von den untersuchten Organen erwiesen sich die Lymphknoten als Organ mit der geringsten Viruslast, gefolgt von der Milz wobei sich die mit Abstand höchste Viruslast im Knochenmark fand. In allen drei Organen wurde der Höchstwert der Viruslast an Tag 7 nach Infektion nachgewiesen. Etwa zu diesem Zeitpunkt begannen die Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit Effektorphänotyp und zytolytischem Potential zu expandieren. Korrespondierend mit der abnehmenden Viruslast wurden die maximale Aktivierung von CD8⁺ Effektor T-Zellen und die maximale Produktion zytotoxischer Moleküle von CD8⁺ T-Zellen in allen untersuchten Organen etwa an Tag 10 gefunden, wobei die Stärke dieser Effektorzellantwort mit der Höhe der Viruslast der einzelnen Organe korrelierte. Am stärksten war diese demzufolge im Knochenmark, dem Organ mit der höchsten Viruslast, gefolgt von der Milz und den Lymphknoten. Die Aktivierung wurde in diesem Fall an verschiedenen

Aktivierungsmarkern, der Produktion von Granzymen und der Expression des Degranulationsmarkers CD107a gemessen. Nachdem die Viruslast nach rund 12 Tagen weiter sank, setzte auch die Kontraktion des CD8⁺ Effektor T-Zellpools ein. Dennoch war in der chronischen Phase noch eine Population von Virus-spezifischen Zellen mit Effektorphänotyp nachweisbar, die allerdings ihre Fähigkeit, Granzyme zu produzieren und zu degranulieren verloren hatte. Die Expansion von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen erfolgte in allen untersuchten Organen in der zweiten Woche der Infektion und korrelierte mit der Höhe der Viruslast und somit auch mit der Stärke der CD8⁺ T-Zellantwort in den verschiedenen Organen insofern, als dass in den Lymphknoten, dem Organ mit der geringsten Viruslast, die schwächste Expansion der regulatorischen T-Zellen vorlag, hingegen im Organ mit der höchsten Viruslast, dem Knochenmark, die stärkste Expansion nachgewiesen wurde. Dies belegt, dass die Suppression der CD8⁺ T-Zellen durch expandierende regulatorische T-Zellen lokal definiert ist. Um die Rolle von regulatorischen T-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden die CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen während der ersten 10 Tage der Infektion depletiert. Mit dem DEREK Mausmodell war diese spezifische *in vivo* Depletion von regulatorischen T-Zellen während einer Virusinfektion erstmalig möglich. Dieses transgene Mausmodell ermöglichte eine selektive Depletion von regulatorischen T-Zellen durch Injektion von Diphtherietoxin, um den Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die CD8⁺ Antwort in der FV-Infektion *in vivo* zu überprüfen. Die Depletion der regulatorischen T-Zellen in diesen Mäusen induzierte eine quantitativ und qualitativ verstärkte CD8⁺ Effektor T-Zellantwort und im Folgenden eine verbesserte Eliminierung des Virus. Diese Ergebnisse belegen, dass regulatorische T-Zellen die Expansion und Funktion von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen in der Phase der akuten retroviralen Infektion supprimieren. Anhand der Depletionsversuche konnte gezeigt werden, dass diese Suppression der CD8⁺ T-Zellantwort *in vivo* eine entscheidende Rolle für die Immunevasion des Virus spielt und in diesem Zusammenhang offenbar zur Manifestation einer chronischen Infektion beiträgt.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In Vorarbeiten in Form meiner Diplomarbeit wurden die Kinetiken der Virusreplikation, sowie der CD8⁺ T-Zellantwort und der regulatorischen CD4⁺ T-Zellantwort in der akuten Phase der FV-Infektion untersucht. Desweiteren wurden die regulatorischen T-Zellen in dieser Phase depletiert und im Folgenden eine Expansion von CD8⁺ Effektorzellen, die zytotoxische Moleküle exprimierten, nachgewiesen. Diese Analysen basierten ausschließlich auf der durchflusszytometrischen Bestimmung von absoluten Zellzahlen von Effektor T-Zellpopulationen.

Um die funktionelle Aktivität der expandierten CD8⁺ T-Zellen bestimmen zu können, sollte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit das zytotoxische Potential von CD8⁺ T-Zellen untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte nach der Etablierung eines *in vivo* CTL-Tests zum Einen eine Kinetik der CD8⁺ T-Zellzytotoxizität während der akuten FV-Infektion angefertigt werden und zum Anderen die *in vivo* Zytotoxizität nach Depletion von regulatorischen T-Zellen bestimmt werden. Desweiteren sollte die Zytokinproduktion von CD8⁺ Effektorzellen während der akuten Infektion und nach Depletion von regulatorischen T-Zellen untersucht werden. Darüber hinaus sollten die Mechanismen der Expansion von regulatorischen T-Zellen in der akuten Infektionsphase analysiert werden. Eine weitere wichtige Frage, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beantwortet werden sollte, war, ob die Depletion von regulatorischen T-Zellen eventuell negative Auswirkungen auf die Pathobiologie der FV-Infektion in der Maus hat, da regulatorische T-Zellen einen wichtigen Faktor für die Kontrolle von Autoimmunkrankheiten darstellen.

Alle beschriebenen Experimente sollten in infizierten DEREK Mäusen vorgenommen werden, in denen man durch DT-Gabe die regulatorischen T-Zellen spezifisch depletieren kann.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der chronischen FV-Infektion. In diesem zweiten Teil der Arbeit sollte zum Einen untersucht werden, in welchen lymphatischen Organen sich die chronische Infektion etabliert. Zum Anderen sollte der für den chronischen Infektionsverlauf typische Funktionsverlust der CD8⁺ T-Zellen, verursacht durch die supprimierende Aktivität von regulatorischen T-Zellen, detailliert charakterisiert werden. Das Hauptaugenmerk sollte dabei auf der Fragestellung liegen, ob es in der chronischen Phase der FV-Infektion möglich ist, durch Depletion von regulatorischen T-Zellen die Dysfunktionalität der CD8⁺ Effektor T-Zellen aufzuheben, diese Zellen wieder zu aktivieren und dadurch eine

Verringerung der Viruslast zu erreichen. Darüber hinaus war zu prüfen, ob weitere Depletionsstrategien, wie z.B. eine Mehrfachdepletion von regulatorischen T-Zellen positive Auswirkungen auf die Höhe der Viruslast haben könnten. Insgesamt sollte die Bearbeitung der Fragestellungen dieser Arbeit dazu dienen, neue Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob die Manipulation von regulatorischen T-Zellen eine erfolgversprechende Strategie für die Behandlung von chronischen Infektionskrankheiten darstellen kann.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 2.1 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Air Clean 600 PCR Workstation	STARLAB, Ahrensburg
Auflichtmikroskop CK2	Hund, Wetzlar
AutoMACS Pro	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CO ₂ Brutschrank	Thermo, Dreieich
Durchflusszytometer LSR II	Becton, Dickinson and Company (BD), Heidelberg
Gefrierschrank	LIEBHERR Comfort, Ochsenhausen
Heizblock	Grant, Cambridge (UK)
Kühlschrank	LIEBHERR Comfort, Ochsenhausen
Manuelle Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	BD, Heidelberg
Pipettierhilfe Accu-Jet Pro	Brand, Wertheim
Standgefrierschrank	SANYO, Wiesloch
Waage Scout Pro	Ohaus, Kirchheim
Wärmelampen	Philips, Amsterdam
Werkbank	KOJAIR® Meckenheim
Werkbank Herasafe	Heraeus, München
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Avanti J-26XPi	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, München
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, München
Zentrifuge Rotina, 420	Hettich, Mülheim a.d.Ruhr

2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.2 Verwendete Materialien

Material	Hersteller
2 ml Einmalspritzen	BD, Heidelberg
Bechergläser	Schott, Mainz
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
FACS-Röhrchen	BD, Heidelberg
Flachbodenplatte (96-well)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Kanülen (G23, G25)	BD, Heidelberg
Parafilm	American National Can, Chicago (USA)
Pinzetten	Braun, Tuttlingen
Pipetten, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, steril (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	STARLAB, Ahrensberg
PP-Schraubenverschlussröhrchen, steril (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäß (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Scheren	Braun, Tuttlingen
Zellkulturflaschen, steril (T25, T75, T175)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatte, steril (6-well, 12-well, 24-well)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsiebe	Falcon BD, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen	Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)

2.3 Versuchstiere

2.3.1 Wildtyp Mäuse

Balb/c :	Resistenzgene: H-2D ^{d/d} , Fv-2 ^{s/s} Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland
C57BL/6:	Resistenzgene H-2D ^{b/b} , Fv-2 ^{r/s} Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland
(C57BL/10AxA.BY), F1 (Y10A):	Resistenzgene: H-2D ^{a/b} , Fv-2 ^{r/s} eigene Zucht, Zentrales Tierlabor, Universitätsklinikum Essen

2.3.2 Transgene Mäuse

DEREG:	Resistenzgene H-2D ^{b/b} , Fv-1 ^{b/b} , Fv-2 ^{r/r} eigene Zucht, Zentrales Tierlabor, Universitätsklinikum Essen
---------------	---

DEREG Mäuse: Diese Mäuse wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Tim Sparwasser (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Technische Universität München, München, Deutschland) hergestellt und im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen gehalten und gezüchtet. Das DEREG (**Depletion of Regulatory T cells**) Mausmodell wurde mittels der BAC Technologie generiert und ermöglicht es, den Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die CD8⁺ T-Zellantwort in der akuten und chronischen FV-Infektion *in vivo* zu überprüfen. In diesem transgenen Mausmodell wird ein Diphtherietoxinrezeptor-GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des *Foxp3* Locus exprimiert. Durch Injektion von Diphtherietoxin können regulatorische T-Zellen auf diese Weise selektiv depletiert werden. Die Verwendung dieses Mausmodells erlaubt also einerseits die unkomplizierte Detektion regulatorischer T-Zellen mittels des exprimierten GFP als auch die selektive Depletion dieser Zellen.

Alle Tiere waren zum Versuchsbeginn mindestens acht Wochen alt. Alle Mäuse stammen aus einer speziell pathogenfreien (SPF) Tierzuchtanlage. Die Tiere wurden für die Dauer der Versuche unter SPF-Bedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter. Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien der „*Federation of European Laboratory Animal Science Association*“

Tabelle 2.3 Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
AEC-Gebrauchslösung	AEC-Stock-Lösung wurde 1:20 in 0,05 M Natriumacetat angesetzt und die Reaktion durch Zugabe von 0,5 µl 30% H ₂ O ₂ /ml Lösung gestartet
AEC-Stocklösung (4 mg/ml)	20 AEC-Tabletten in 100 ml N-N-Dimethylformamid gelöst
Bouin's Lösung	75ml gesättigte Pikrinsäure 25 ml 40% neutrales Formalin 5 ml Essigsäure
Beschichtungspuffer (<i>coating buffer</i>) für intrazelluläre Zytokinfärbungen	0,05 M Natriumcarbonat pH 9,6
Einfriermedium	20 ml FCS 10 ml Dimethylsulfoxid 20 ml RPMI 1640
FACS-Puffer	PBS 0,1 % BSA 0,02 % Natriumazid
MACS-Puffer	0,5% BSA 2 mM EDTA Σ 1l PBS
Medium für <i>Mus dunni</i> Zellen	RPMI 1640 10 % FCS 0,5 % Penicillin/Streptomycin
PBBS	1 l PBS 1 g Glukose

2.7 Antikörper

Die Antikörper (AK) wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von Becton, Dickinson and Company oder eBioscience bezogen.

Tabelle 2.4 Verwendete Antikörper

Antikörper	Klon
AK 34; monoklonaler Maus anti-MuLV p15 (Isotyp IgG _{2b})	
AK 720; monoklonaler Maus anti-MuLV env (Isotyp IgG _{2b})	
CD107a-FITC/APC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	1D4B
CD25-APC/PeCy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK	PC61
CD43-FITC/PE monoklonaler Ratte anti Maus AK	1B11
CD4-AF700; monoklonaler Ratte anti Maus AK	RM4-5
CD62L-PeCy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK	MEL-14
CD69-PE; monoklonaler Hamster anti Maus AK [Invitrogen]	H1.2F3
CD8a-eF450/FITC/PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	53-6.7
Foxp3- FITC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	FJK-16S
Foxp3- PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	NRRF30
GzmB-APC; monoklonaler Maus anti Human [Invitrogen]	GB12
IgG _{2b} -PE: monoklonaler Ziege anti Maus AK [Invitrogen]	
IFN- γ -FITC/APC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	XMG1.2
IL-2-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	JES6-5H4
Meerrettichperoxidase gekoppelter Ziege anti Maus Ig [Dako]	
Monoklonaler CD16/CD32 (Fc γ III/II) Ratte anti Maus AK	24G2
Ter119-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	Ter-119
TNF- α -PeCy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK	MP6-XT22

Tabelle 2.5 Charakterisierung der Fluorochrome

Bezeichnung	Abkürzung	Absorption (nm)	Emission (nm)
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	488	525
R-Phycoerythrin	PE	488	575
Propidiumiodid	PI	488	615
Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex	PerCP	488	670
Phycoerythrin-Cy7	PeCy7	488	785
Allophycocyanin	APC	633	660
Alexa Fluor 700	AF 700	635	723
eFluor 450	eF450	405	455
7-Aminoactinomycin D	7AAD	488	647

2.8 Tetramere und F-MuLV-spezifische Peptide

PE markierte MHC Klasse I H2-Db Tetramere spezifisch für FV GagL Peptid (Db-GagL tetramere) siehe auch (4).

Die Tetramere (FV gag CD8⁺ Epitop gPr80gag85-93 (23)) wurden von K. Schepers und T. N. M. Schuhmacher zur Verfügung gestellt (122)

Das verwendete MuLV-spezifische CD8 T-Zell-Peptid wurde von der Firma PAN Tecs (Tübingen) synthetisiert. Das Peptid wurde in 100% sterilem DMSO gelöst.

Peptidname: FMR -H-2D_b GagL CD8 epitope

Sequenz: AbuAbuLAbuLTVFL (114)

2.9 Kommerzielle Standardtests

Tabelle 2.6 Verwendete Standardtests

Standardtests	Bezugsquelle
<i>Cytofix/Cytoperm Intracellular staining kit</i>	BD Pharmingen, Heidelberg
<i>FITC BrdU Flow Kit</i>	BD Pharmingen, Heidelberg
<i>Foxp3 staining Set</i>	eBioscience, San Diego, USA
<i>CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell Isolation Kit</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit</i>	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA

2.10 Viren und Zelllinien

Friend Retrovirus Komplex: (33)

Die verwendeten FV-Präparationen wurden aus infizierten Mäusen gewonnen (siehe 3.3.). Es wurden zwei verschiedene FV-Präparationen verwendet. Für die akute Infektion wurde die Standard FV-Präparation eingesetzt. Für die chronische Infektion hingegen wurde eine FV-Präparation, welche zusätzlich noch das LDV (*Lactat dehydrogenase-elevating virus*) enthält, verwendet.

Friend Murine Leukämie Virus (Helfer-Virus): (33)

Die verwendete Helfer Virus Präparation wurde von *Mus dunni* Zellen produziert (siehe 3.4).

Tabelle 2.7 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle
<i>Mus dunni</i> 169.4	Murine Fibroblasten Zelllinie (72) Die Hybridomazelllinie 169.4 produziert den monoklonalen Ratten IgG _{2b} anti Maus anti CD8 Antikörper (25).

3 Methoden

3.1 Tierversuche

Alle Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien der „*Federation of European Laboratory Animal Science Association*“ durchgeführt.

3.1.1 Infektion

Die Infektion der Mäuse mit dem Friend Virus wurde mit einer G25-Kanüle intravenös (i.v.) in die laterale Schwanzvene durchgeführt. Dazu wurde der Virusstock mit sterilem PBS verdünnt und 500 µl dieser Verdünnung pro Maus injiziert. Für die Untersuchung der akuten FV-Infektion wurden den jeweiligen Mäusen, wenn nicht anders erwähnt, 20.000 SFFU (*Spleen Focus Forming Units*) pro Tier injiziert. Für chronische FV-Infektionen wurden 15.000 SFFU FV+LDV pro Maus injiziert.

3.1.2 Intraperitoneale Injektion

Für die Depletion der regulatorischen T-Zellen in DEREK-Mäusen wurde diesen Tieren das Diphtherietoxin jeweils in die Bauchhöhle (intraperitoneal, i.p.) injiziert. Bei der Injektion befand sich die Maus überspannt in Rückenlage. Das Bauchfell war dabei gespannt, wodurch bei der Injektion keine inneren Organe verletzt werden konnten. Diese Methode wurde ebenso für die Depletion von CD8⁺ T-Zellen angewandt.

3.1.3 Betäubung der Mäuse mit Isofluran[®]

Für die retroorbitale Blutentnahme wurden die Mäuse mit Isofluran[®] betäubt. Dazu wurden die Tiere in einen Glasbehälter gesetzt, in dem sich ein mit Isofluran[®] getränktes Tuch befand. Sobald die Tiere eine flache Atmung aufwiesen, wurden die Tiere aus dem Glasgefäß entnommen.

3.1.4 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte retroorbital mit einer 3 mm Glaskapillare. Zur Plasmagewinnung wurde eine mit Heparin beschichtete Glaskapillare verwendet und

das Blut in einem 1,3 ml Probengefäß mit 1,6 mg EDTA aufgefangen und auf Eis gestellt. Danach wurde das gewonnene Blut für 10 min bei 6000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Plasma wurde bei -80°C gelagert.

3.1.5 Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Bei den in Rückenlage an den Extremitäten aufgespannten Tieren wurde das Bauchfell mit einer stumpfen Schere geöffnet die zervikalen, axillären und inguinalen Lymphknoten entnommen und bis zur weiteren Verwendung in einer 6-well Platte mit 5 ml PBBS auf Eis gelagert. Zur Entnahme der Milz wurde die Peritonealhaut angehoben und an entsprechender Stelle geöffnet. Durch diese Öffnung wurde die Milz mit einer stumpfen Pinzette herausgehoben, beide Blutgefäße durchtrennt und diese dann entnommen. Anschließend wurde die Milz ebenfalls bis zur weiteren Verwendung in einer 6-well Platte mit 10 ml PBBS auf Eis gelagert. Zur Gewinnung von Knochenmark wurden beide Hinterbeine der Maus verwendet. Die Ober- und Unterschenkelknochen wurden von Muskeln und Sehnen befreit und ebenfalls in PBS auf Eis gelagert.

3.1.6 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Organen

Zur Herstellung von Milz- bzw. Lymphknotenzellsuspensionen wurden diese Organe durch ein auf einem 50 ml Schraubenschlösschen aufsitzenden Zellsieb gerieben und dieses Sieb anschließend mit 5 ml (Lymphknoten) oder 10 ml (Milz) sterilem PBBS gespült. Zur Gewinnung von Knochenmarkszellsuspensionen wurde das Knochenmark mit Hilfe einer 2 ml Einzelspritze und einer G23 Kanüle mit insgesamt 5 ml PBBS durch die eröffneten Epiphysen der entsprechenden Knochen heraus gespült und die Zellsuspension in einem 15 ml Schraubenschlösschen aufgefangen. Von allen Zellsuspensionen wurde ein Aliquot zum Bestimmen der Zellzahl entnommen und die Suspension anschließend mit 300 x g bei 10°C für 8 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit RPMI-Medium auf die jeweilige gewünschte Zellzahl eingestellt und die Zellsuspensionen zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und gab zusätzlich Auskunft über den Vitalitätszustand der Zellen. Hierzu wurde ein Vitalitätstest durchgeführt, der darauf beruht, dass tote Zellen eine veränderte Membrandurchlässigkeit aufweisen. Farbstoffe, wie z.B. Trypanblau, können die Membran lebender Zellen nicht passieren und gelangen nur in tote Zellen. Beim Auszählen war darauf zu achten, keine Zellaggregate auszuzählen, da dies die Genauigkeit der Zählung beeinflussen kann.

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde eine geeignete Verdünnung der Zellen (1:10) mit Trypanblau erstellt und mittels einer Neubauer-Zählkammer vier Großquadrate à 16 Kleinquadraten ausgezählt.

Da jedes Quadrat eine Fläche von $0,04 \text{ mm}^2$ besitzt und eine Tiefe von 1 mm aufweist, ergibt sich ein Volumen von $0,004 \mu\text{l}$. Die ermittelte Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$C = N \times 10^4$$

C = Zellen pro ml

N = Mittelwert der gezählten Zellen

10^4 = Volumenrechnungsfaktor für 1 mm^3

Die Gesamtzellzahl wurde berechnet, indem die Zellen pro ml mit dem Volumen der zu bestimmenden Probe multipliziert wurden.

3.3 *In vivo* Herstellung einer Friend Virus Präparation

Der FV-Komplex besteht aus zwei Viren, dem Spleen Focus Forming Virus (SFFV) und dem Friend Murine Leukemia Virus (F-MuLV) (siehe 1.1.6.2). Die FV-Präparation wurde aus infizierten Mäusen gewonnen. Dazu wurden Balb/c-Mäuse mit 3000 SFFU infiziert, nach neun Tagen getötet, die Milzen entnommen und ein Milzzellhomogenat (15%) in PBBS mit 2 mM EDTA hergestellt. Der Virusstock wurde bei -80°C gelagert. Zur Ermittlung der Viruskonzentration dieses Stocks wurden Y10A Mäuse mit verschiedenen Verdünnungen des Milzzellhomogenats infiziert, die Tiere nach 14 Tagen getötet und die Milzen entnommen. Mit Hilfe der sogenannten Bouin's Lösung wurden maligne Zellhaufen, die durch die FV-Infektion entstanden,

auf der Milz angefärbt. Die Anzahl dieser ausgezählten Foci ergab die Viruskonzentration in SFFU für den aktuell hergestellten Stock. Für die Infektion der Mäuse mit dem FV wurden Aliquots dieses Stocks mit sterilem PBS auf die gewünschte Viruskonzentration verdünnt und 500 µl davon pro Maus injiziert.

3.4 Herstellung einer Friend Murine Leukemia Virus-Präparation *in vitro*

Mus dunni Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen in 10 ml RPMI-Vollmedium ausgesät und anschließend 50 µl Polybren (0,8 µg/ml) zugegeben. Danach wurden die Zellen mit einem F-MuLV-Stock (MOI=1) infiziert. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C im Brutschrank inkubiert, nach drei Tagen mit Trypsin abgelöst und in RPMI Medium aufgenommen. Zur Überprüfung des Anteils infizierter *Mus dunni* Zellen wurden diese mit AK720 und PE-gekoppelten Ziege-anti-Maus anti-IgG2b Antikörper für jeweils 30 min inkubiert. Der prozentuale Anteil der infizierten Zellen wurde anschließend im Durchflusszytometer bestimmt. Wenn die Zellen zu 50-100% infiziert waren, wurden diese in 175 cm² Zellkulturflaschen in 50 ml RPMI-Vollmedium ausgesät. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert, bis diese ca. 50-75% konfluent waren. Dann wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand geerntet, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die weitere Verwendung wurde die Aktivität des F-MuLV bestimmt. Der Test zur Bestimmung der Aktivität des F-MuLV-Stocks beruht auf dem Prinzip des *Infectious Center Assays* (siehe 3.6).

3.5 Zellkultur

3.5.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellkultur erfolgte allgemein in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂/Luft-Gemisch. Adhärent wachsende Zelllinien wurden in liegenden Kulturflaschen inkubiert. Zum Ernten und Verdünnen dieser Zellen wurde das verbrauchte Medium dekantiert und die Zellen mit PBS für kurze Zeit überschichtet, um das restliche Medium zu entfernen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen mit 5% Trypsin-EDTA überschichtet und für 5 min im Brutschrank inkubiert bis sich die Zellen vom Boden ablösten. Dieser Prozess wurde anschließend mit 10 ml kaltem Vollmedium gestoppt und die Zellsuspension wurde

abzentrifugiert (300 x g; 5 min). Das so gewonnene Zellpellet wurde in Vollmedium gelöst und im Verhältnis 1:5 oder 1:10 in neue Kulturflaschen ausgesät.

3.5.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren

Für die längere Lagerung der Zellen in Stickstoff wurden diese in Medium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren. DMSO diffundiert durch die Zellmembran in die Zelle und ersetzt dort das Wasser. Es erhält somit die Löslichkeit in der Zelle und sorgt dafür, dass beim Einfriervorgang keine Eiskristalle gebildet werden, welche die Zellstruktur zerstören würden. Um die Zellen einzufrieren wurden diese auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt, anschließend 5 min bei 300 x g zentrifugiert und das Zellpellet nochmal in PBS gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet in dem zuvor angesetzten 10%igen DMSO-haltigen Medium resuspendiert und Aliquots eines entsprechenden Volumens für 2-3 h bei -20°C eingefroren, über Nacht bei -80°C gelagert und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen

Bevor die in Medium mit 10% DMSO eingefrorenen Zellen wieder in Kultur genommen werden können, muss zunächst das DMSO aus dem Medium entfernt werden. Hierfür wurden die Zellen schnell im Wasserbad (37°C) aufgetaut, da das DMSO für die Zellen toxisch ist. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 10 ml warmem Medium aufgenommen und zentrifugiert (300 x g, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut mit warmem Medium gewaschen, um das DMSO gänzlich zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert, verschiedene Mengen der Zellsuspension in eine sterile Zellkulturflasche überführt und diese auf das entsprechende Volumen mit Medium aufgefüllt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C .

3.6 Nachweis von infektiösen Zellen mittels *Infectious Center Assay*

Bei dem *Infectious Center Assay* wurde zur Bestimmung der Anzahl FV-infektiöser Zellen in der Milz, dem Knochenmark und den Lymphknoten eine Zellsuspension der entsprechenden Organe von FV-infizierten Mäusen hergestellt (107). Von den

jeweiligen Suspensionen wurde eine Verdünnungsreihe (10^7 - 10^2) mit *Mus dunni* Zellen als Indikatorzellen koinkubiert. Infektiöse Zellen infizieren durch Zell-Zell-Kontakt die *Mus dunni* Zellen. Diese teilen sich und geben das Friend Virus an ihre Tochterzellen weiter. Es entsteht ein Virus-Focus. Diese Foci wurden mittels Antikörperreaktion und Substratreaktion angefärbt. Als FV-spezifischer Antikörper wurde AK720 verwendet, welcher an das *env*-Protein von MuLV bindet. Der Zweitantikörper, welcher an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist (Ziege-Anti-Maus IgG2b-HRP), bindet kovalent an die Fc-Region des ersten Antikörpers. Das lösliche Substrat AEC wird von der Peroxidase umgesetzt und in ein unlösliches rotes Produkt umgewandelt. Die roten Punkte markieren auf dem Zellrasen die Virus-Foci. Anhand der Verdünnungsreihe und der Gesamtzellzahl konnte die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz bestimmt werden. Im Falle des Knochenmarks und der Lymphknoten wurden die infizierten Zellen in der 10^6 Verdünnung der entsprechenden Proben bestimmt, bzw. die Foci auf diese Verdünnung hochgerechnet.

Zunächst wurden in eine 6-well Gewebekulturplatte pro Vertiefung 2×10^4 *Mus dunni*-Zellen in 3 ml Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellsuspensionen der verschiedenen Gewebe auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellt. Von einer Verdünnungsreihe wurden jeweils 1×10^7 bis 1×10^2 Zellen auf die Indikatorzellen gegeben und drei Tage im Brutschrank bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten 5% CO_2 Atmosphäre inkubiert. Als Kontrolle des Tests wurden jeweils 3 Vertiefungen mit F-MuLV und 3 weitere ohne Virus bzw. infektiöse Zellen mitgeführt. Bei der Kontrolle mit freiem Virus musste Polybren A ($8 \mu\text{g/ml}$) hinzugegeben werden, damit das freie Virus besser an die Rezeptoren der Zelloberfläche binden konnte.

Nach der dreitägigen Inkubation wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden 5 min mit 95% Ethanol fixiert und zunächst einmal mit PBS und dann einmal mit PBS komplementiert mit 0,1% BSA gewaschen. Dann wurden pro Vertiefung 700 μl Hybridomaüberstand des ersten Antikörpers (AK720) zugegeben und 120 min bei RT inkubiert. Der Hybridomaüberstand wurde nach Ablauf der Inkubationszeit verworfen und die Platten wurden zweimal mit PBS (+ 0,1% BSA) gewaschen. Der zweite Antikörper (Ziege anti Maus IgG2b-HRP; 0,05 mol/l) wurde 1:500 in PBS (+ 0,1% BSA) verdünnt, und davon wurden jeweils 700 μl pro Vertiefung auf die Zellen gegeben und 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Dekantieren und zweimaligem Waschen mit PBS wurden jeweils 2 ml frisch angesetzte

Substratlösung AEC zugegeben und 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach dem Abschütten, Waschen mit H₂O und Trocknen der Platten über Nacht wurden die Foci gezählt. Anschließend wurde der Mittelwert der Anzahl an Foci in der 10⁶ Verdünnung ermittelt und so der Wert infektiöser Zellen pro Million Zellen des jeweiligen Organs bestimmt.

3.7 Isolieren und Sortieren von Lymphozyten aus einer Gesamtzellsuspension mittels MACS

Die MACS-Technologie (*Magnetic Cell Sorting*) ermöglicht die Isolierung von bestimmten Zellpopulationen aus einem Zellgemisch anhand ihrer Oberflächenmarker. Dafür werden zum Einen die MACS *MicroBeads* und zum Anderen eine ferromagnetische Säule benötigt. Bei den *Beads* handelt es sich um kleine magnetische Kügelchen, an welche monoklonale Antikörper gebunden sind. Inkubiert man nun eine Gesamtzellsuspension mit diesen *Beads*, binden die Antikörper spezifisch an die jeweiligen Oberflächenmoleküle der eingesetzten Zellen. Auf diese Weise werden diejenigen Zellen, die die entsprechenden Marker auf ihrer Oberfläche aufweisen, indirekt mit den magnetischen Kügelchen markiert. Darauffolgend wird das Gesamtzellgemisch auf die ferromagnetische Säule übertragen. Die markierten Zellen verbleiben auf Grund ihrer Eigenschaften in der Säule, während die unmarkierten Zellen die Säule ungehindert passieren. Indem nun die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt wird, erhält man die markierten, in der Säule zurückgehaltenen Zellen, die mittels MACS-Puffer eluiert werden. Mit dieser Methode ergeben sich zwei verschiedene Möglichkeiten der Auftrennung der Lymphozyten. Zum Einen ist dies die Positivselektion, bei der die Population von Interesse mit MACS-*MicroBeads* markiert und von den restlichen Zellpopulationen abgetrennt wird, und zum Anderen hat man die Möglichkeit einer Depletion. Hierfür werden die mit den MACS-*MicroBeads* gekoppelten Zellen in der Säule zurückgehalten, wobei sich die aufzureinigende Population im Durchfluss befindet. Die Qualität der Aufreinigung kann anschließend mit einer FACS-Analyse überprüft werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle MACS-Selektionen nach Herstellerangaben durchgeführt und mittels autoMACS[®] Pro Separator sortiert. Die

eluierten Zellen wurden mit MACS-Puffer gewaschen und anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

3.8 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich einzelne Zellen oder Zellpopulationen aus einer heterogenen Zellpopulation analysieren. Dabei können spezielle Oberflächenproteine und intrazelluläre Proteine der Zellen identifiziert, charakterisiert und quantifiziert werden. Die Zellen der Suspension werden einzeln durch einen Laserstrahl erfasst. Die Ablenkung der Strahlen beim Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle wird in zwei Kategorien aufgeteilt. Das Licht, welches die relative Größe der einzelnen Zellen detektiert, wird Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) genannt, und das Licht, das von den Zellen um 90° abgelenkt wird und somit Aussagen über die innere Granularität der Zellen erlaubt, wird Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) genannt.

Diese Methode ermöglicht unter anderem eine quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen. Die Grundlage dafür ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Die Zellen binden die monoklonalen Antikörper, die gegen bestimmte Oberflächenmoleküle gerichtet sind. Zur Analyse werden die Zellen in einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte durch einen Photonendetektor registrierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Die Lichtsignale werden proportional zur Lichtstärke in elektronische Signale umgewandelt (siehe Abbildung 3.1). Die gleichzeitige durchflusszytometrische (*Fluorescence activated cell sorting*, FACS) Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, da sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

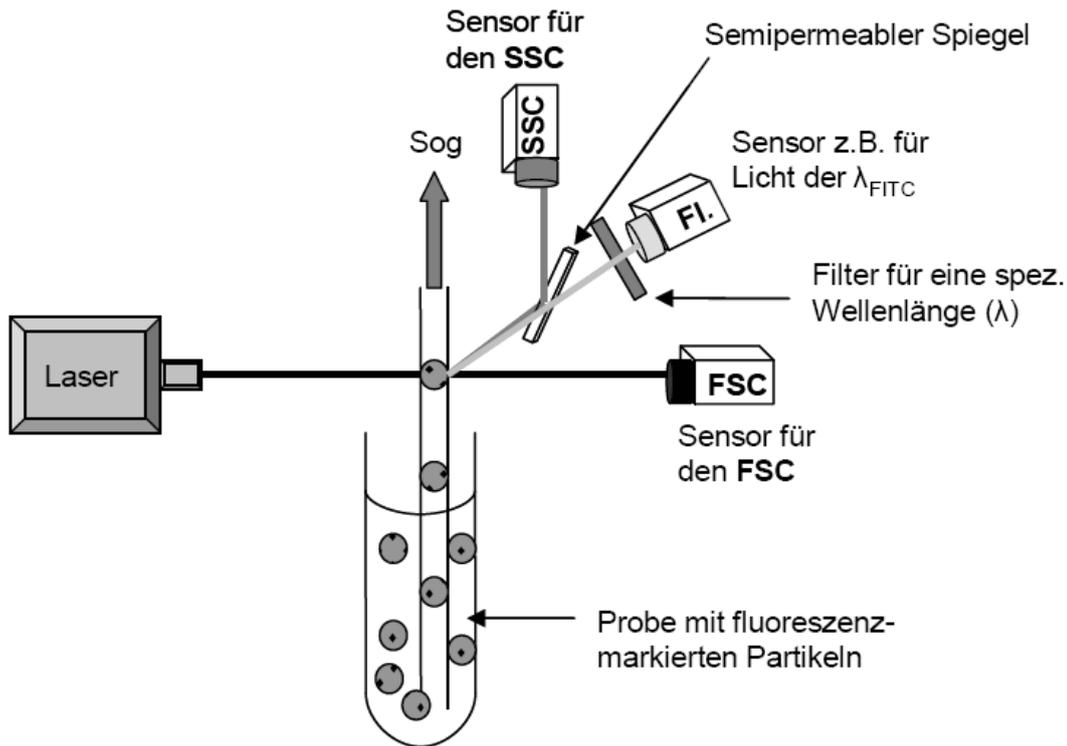


Abbildung 3.1 Funktionsweise eines Durchflusszytometers (verändert nach (105))

Für jede FACS-Färbung werden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen. Das in diesem Puffer enthaltene Natriumazid wirkt antibakteriell. EDTA verringert die Adhäsion der Zellen an die Gefäßwand und BSA das Ausmaß an unspezifischen Antikörperbindungen. Bei der Auswertung, z.B. mit dem FACS Diva Analyse Programm, wird meist ein Punktgraph (*Dot-Plot*) erstellt, in welchem jede Zelle als ein Punkt dargestellt ist. Die Position des Punktes im Graphen lässt Rückschlüsse auf die Zelleigenschaften zu. So können anhand der Größe und Granularität die Zellen im Punktgraphen aufgetrennt und unterschieden werden.

3.8.1 Ausschluss toter Zellen in der Durchflusszytometrie

Um tote Zellen und Zelltrümmer bei der Durchflusszytometrie auszuschließen, wurde kurz vor der Messung der Farbstoff 7AAD oder Propidiumiodid zu den Zellen gegeben. Diese sind von sich aus fluoreszierender DNA Farbstoffe, die selektiv in die DNA interkalieren und so mit dieser einen Komplex bilden. Bei gesunden Zellen verhindert die intakte Zellmembran die schnelle Diffusion dieser Farbstoffe, wodurch diese nur sehr langsam in lebende Zellen eindringt. Ist eine Zelle aber apoptotisch

oder wird sie während des Messvorgangs geschädigt, so verliert die Zellmembran ihre Funktion als Schutzbarriere und der entsprechend verwendete Farbstoff dringt schnell in die Zelle ein. Dort gelangt er schließlich in den Zellkern und an die DNA, in welche er interkaliert. Die Zelle wird somit als „tot“ markiert und kann vom Durchflusszytometer erfasst werden. Zu den gefärbten Zellen wurde 7AAD im Verhältnis 1:250, oder Propidiumiodid im Verhältnis 1:200 hinzugegeben und die Probe umgehend mit einem LSRII Durchflusszytometer gemessen.

3.8.2 Färbung von Oberflächenproteinen

Es wurden 1×10^6 Zellen in FACS-Puffer aufgenommen, für 5 min mit $300 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in $100 \mu\text{l}$ FACS-Puffer und $0,5 \mu\text{l}$ konjugiertem Antikörper gegen verschiedene Oberflächenmoleküle, z.B. CD8, CD4, CD43, etc. aufgenommen und 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden danach mit $200 \mu\text{l}$ FACS-Puffer gewaschen ($300 \times g$; 5 min) und anschließend in einem Volumen von $300 \mu\text{l}$ zur Messung resuspendiert.

3.8.3 Intrazelluläre Färbungen von Granzym B

Zum Nachweis von intrazellulärem GzmB wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung einmal in FACS-Puffer gewaschen ($300 \times g$; 5 min) und dann nach dem Protokoll des Herstellers des Cytofix/Cytoperm-Kits fixiert und permeabilisiert. Durch die Permeabilisierung können Antikörper, welche gegen intrazelluläre Proteine gerichtet sind, in die Zelle eindringen und diese binden. Nach einmaligem Waschen mit dem entsprechenden PermWash-Puffer wurden die Zellen mit $100 \mu\text{l}$ PermWash-Puffer mit $0,5 \mu\text{l}$ GzmB-Antikörper für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PermWash-Puffer und einmal mit FACS-Puffer gewaschen ($300 \times g$; 5 min), in einem Volumen von $300 \mu\text{l}$ FACS-Puffer resuspendiert und umgehend durchflusszytometrisch analysiert.

3.8.4 Intrazelluläre Färbung von IFN- γ , TNF- α und IL-2

Um die Produktion von Zytokinen wie z.B. IFN- γ , TNF- α und IL-2 in den Zellen zu untersuchen, müssen diese zunächst zur Zytokinproduktion angeregt und die Sekretion verhindert werden, so dass die Zytokine in der Zelle akkumulieren. Dazu

wurden die Zellen für 5 h mit 10 µg/ml immobilisiertem αCD3, 2 µg/ml αCD28 und 2 µg/ml Brefeldin A in RPMI-Medium (komplementiert mit 50 µM β-Mercaptoethanol) bei 37°C inkubiert. Durch die Antikörper kommt es zu einer unspezifischen Stimulation des T-Zellrezeptors und der damit verbundenen Zytokinsynthese. BFA blockiert den vesikulären Proteintransport vom rauen endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und führt so zu einer Akkumulation von Zytokinen in der Zelle. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und die Oberflächenmoleküle wurden wie bereits in 3.8.2 beschrieben gefärbt. Danach erfolgte die Fixierung, Permeabilisierung und die Färbung intrazellulärer Proteine wie in Abschnitt 3.8.3 beschrieben. Die Zellen wurden nach der Färbung in einem Volumen von 300 µl mit FACS-Puffer aufgenommen und umgehend mit Hilfe eines LSR II Durchflusszytometers analysiert.

3.8.5 Intrazelluläre Färbung von Foxp3

Zum Nachweis von intrazellulärem Foxp3 wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung einmal in FACS-Puffer gewaschen (300 x g; 5 min) und anschließend nach dem Protokoll des Herstellers des Foxp3-Staining Sets fixiert und permeabilisiert. Nach einmaligem Waschen mit dem entsprechenden PermWash-Puffer wurden die Zellen mit 100 µl PermWash-Puffer mit 0,5 µl Foxp3-Antikörper für etwa 45 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PermWash-Puffer und einmal mit FACS-Puffer gewaschen (300 x g; 5 min), in einem Volumen von 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und umgehend durchflusszytometrisch analysiert.

3.8.6 PKH26 Färbung

Um Zellen, die von einer Donormaus in weitere Mäuse transferiert werden sollten, zu markieren und so später von den Zellen der Empfängermäuse unterscheiden zu können, wurde der PKH26 Farbstoff verwendet. Bei PKH26 handelt es sich um einen rot fluoreszenzierenden Farbstoff, der unspezifisch in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran eingebaut wird. Dies ermöglicht die durchflusszytometrische Detektion der transferierten Donorzellen innerhalb der Zellpopulationen der Empfängermäuse ohne weitere Anfärbung mit Antikörpern. Die aus den 7 Tage infizierten Donormäusen isolierten CD4⁺ T-Zellen wurden hierfür nach den Angaben des

Herstellerprotokolls gefärbt und anschließend in 7 Tage infizierte Empfängermäuse transferiert. 3 Tage später wurden diese getötet und die Zellsuspensionen der entsprechenden Organe umgehend durchflusszytometrisch analysiert.

3.8.7 Tetramerfärbung

Eine Methode, um Antigen-spezifische T-Zellen in einer T-Zellpopulation zu identifizieren und quantifizieren, ist die Tetramerfärbung. MHC Klasse I-Tetramere bestehen aus vier Peptid-MHC Klasse I-Komplexen, die über eine Biotin-Streptavidin-Bindung kovalent miteinander verknüpft sind. Der Komplex wird über einen konjugierten Fluor Farbstoff im Durchflusszytometer visualisiert. Diese Methode beruht auf den Wechselwirkungen des Antigen-spezifischen T-Zellrezeptors mit den Peptid-bindenden MHC-I-Komplexen. Der Aufbau eines Tetramers ist in Abbildung 3.2 gezeigt.

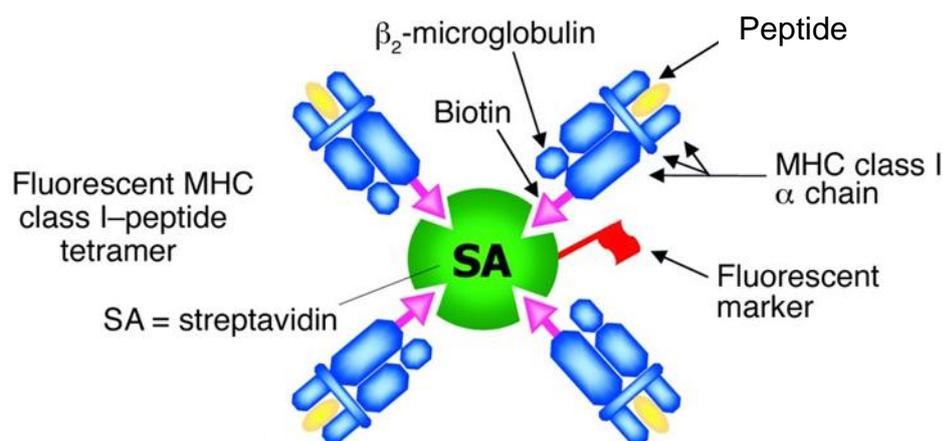


Abbildung 3.2 Aufbau eines MHC Klasse I-Tetramers (verändert nach (36))

Für die Tetramerfärbung wurden 5×10^5 Zellen eingesetzt. Diese Zellen wurden zweimal in FACS-Puffer gewaschen ($300 \times g$; 5 min) und in einem Volumen von 50 μ l für 15 min bei Raumtemperatur gefärbt. Für die Mehrfach-Färbungen wurden 2,5 μ l Tetramere mit den Antikörpern α CD8 (0,5 μ l), α CD43 (0,5 μ l) und α Gzmb (0,5 μ l) pro Probe eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit FACS Puffer gewaschen, in 300 μ l FACS-Puffer mit 7AAD oder Propidiumiodid aufgenommen und umgehend im Durchflusszytometer gemessen.

3.9 Depletion von CD8⁺ T-Zellen mittels Zell-spezifischer Antikörper

Zur Depletion von Lymphozyten in Mäusen wurden Zell-spezifische monoklonale Antikörper mittels Hybridomazelllinien hergestellt. Diese wurden bei der Kultivierung in den Überstand abgegeben. Zur Depletion von CD8⁺ T-Zellen wurde der Überstand der Hybridomazelllinie 169.4 verwendet. Für die Depletion in der akuten Phase der FV-Infektion wurden pro Injektion 500 µl Zellkulturüberstand i.p. mit einer G25-Kanüle inokuliert, beginnend mit dem Tag der Infektion. Es folgten vier weitere Injektionen im Abstand von 2 Tagen. Zwei Tage nach der fünften Injektion wurden die Tiere getötet und die Depletion der CD8⁺ T-Zellen im Durchflusszytometer mit einem T-Zell-spezifischen Marker überprüft. In Abbildung 3.3. sind exemplarische Dot Plots dieser Kontrolle gezeigt. Durch diese Behandlung wurden etwa 97% der CD8⁺ T-Zellen depletiert.

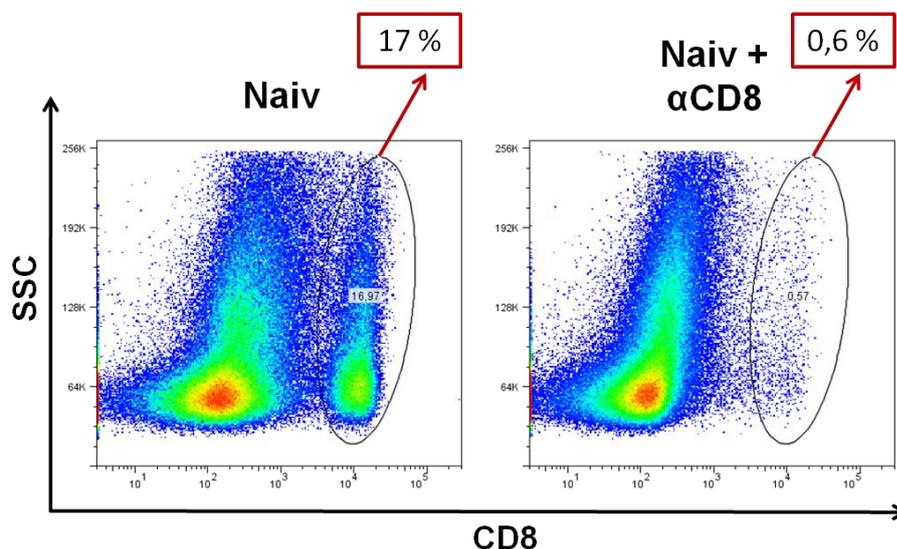


Abbildung 3.3 Depletion von CD8⁺ T-Zellen

Lymphknotenzellsuspensionen von naiven Mäusen (links) und nach Depletion von CD8⁺ T-Zellen (rechts) wurden durchflusszytometrisch untersucht. Die Zahlen in den roten Kästen stellen den prozentualen Anteil von CD8⁺ T-Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation dar.

Für die Depletion der CD8⁺ T-Zellen in der chronischen Phase der FV-Infektion erfolgten vier Injektionen des Zell-spezifischen Antikörpers. Die Tiere wurden am Tag nach der vierten Injektion getötet und die Depletion ebenfalls durchflusszytometrisch überprüft.

3.10 Depletion von CD4⁺Foxp3⁺GFP⁺ regulatorischen T-Zellen in DEREG Mäusen

Durch die Expression des Diptheritoxinrezeptor-GFP-Fusionsproteins unter der Kontrolle des Foxp3 Promoters ist es möglich, die regulatorischen T-Zellen in diesen Mäusen selektiv zu depletieren. Die Bindung des injizierten DT an den Rezeptor, der ausschließlich von Foxp3⁺ Zellen exprimiert wird, induziert in diesen Zellen die Apoptose (71). Es werden folglich nur Foxp3⁺ Zellen ausgeschaltet, ohne dass dabei auf andere Zelltypen Einfluss genommen wird. Durch die Expressierung des an den Diptheritoxinrezeptor gekoppelten GFP lässt sich die Depletion der Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen im Durchflusszytometer überprüfen. Für die Depletion dieser Zellen in der akuten FV-Infektion wurden den entsprechenden Tieren an Tag 0, 2, 4, 6 und 8 nach Infektion 0,5 µg DT pro Maus in 500 µl sterilem PBS i.p. injiziert. Die Depletion in der chronischen Phase der FV-Infektion erfolgte an Tag 60, 63 und 66 nach Infektion mit derselben Menge DT. Zur Überprüfung der Depletion wurden die Tiere ein Tag nach der letzten DT Injektion getötet und die Zellen aus Milz und Lymphknoten im Durchflusszytometer auf das Vorhandensein von GFP⁺ Zellen hin untersucht. In Abbildung 3.4 sind exemplarische Dot-Plots dieser Kontrolle gezeigt.

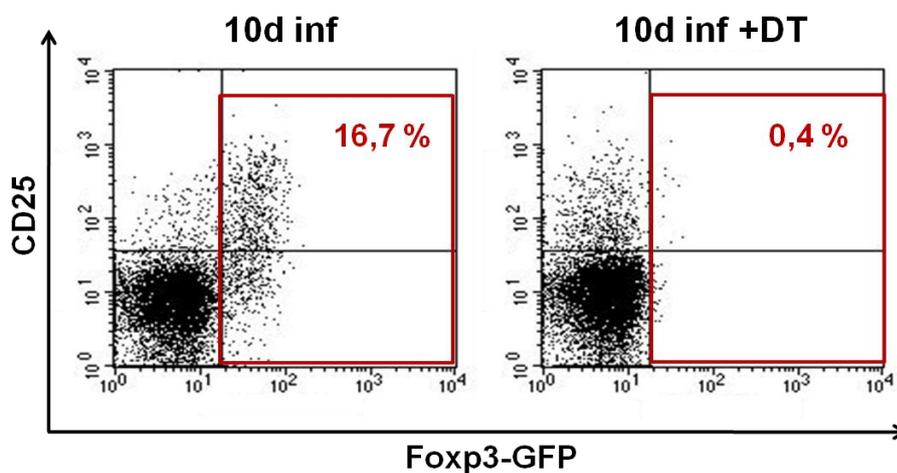


Abbildung 3.4 Depletion regulatorischer T-Zellen

Lymphknotenzellsuspensionen von infizierten, nicht depletierten DEREG Mäusen (links) und nach Depletion von regulatorischen T-Zellen (rechts) wurden durchflusszytometrisch auf die Anwesenheit von CD4⁺ GFP⁺ regulatorischen T-Zellen untersucht. Die Zahlen in den roten Kästen stellen den prozentualen Anteil an CD4⁺ GFP⁺ regulatorische T-Zellen an der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation dar.

3.11 *In vivo* CTL-Test

Der *in vivo* CTL-Test ermöglicht eine Untersuchung der spezifischen Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen in der Maus. In der FV-Infektion ist dieser Zelltyp hauptsächlich für die Eliminierung Virus-infizierter Zellen zuständig. Mit Hilfe dieses Tests kann dementsprechend die Eliminierung von Zielzellen, welche artifiziell mit einem Virusepitop beladen sind, analysiert werden, um so eine Aussage über die Funktionalität der CD8⁺ T-Zellen zu treffen. Zu diesem Zweck wurden von naiven C57BL/6 Mäusen Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten isoliert. Die Milzzellsuspension wurde zusätzlich über einen Dichtegradienten aufgetrennt, um die Lymphozyten von Erythrozyten und Granulozyten zu isolieren. Dazu wurde die Milzzellsuspension vorsichtig auf Percoll-Trennmedium pipettiert. Es erfolgte eine Zentrifugation (300 x g, 10 min) ohne Bremse, so dass sich die verschiedenen Zelltypen der Milz anhand ihrer Dichte auftrennten. Die Lymphozyten befinden sich nach der Zentrifugation in der mittleren Schicht. Diese Schicht wurde mit einer Pipette entnommen und einmal mit PBS gewaschen. Nach dem Waschschrift wurden die Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten vereinigt und auf zwei 50 ml Röhrchen aufgeteilt. Die Zellsuspension im ersten Röhrchen wurde mit 1 µM F-MuLV-spezifischem CTL-Peptid beladen, im zweiten Röhrchen wurden die Zellen nicht mit einem Peptid beladen. Beide Röhrchen wurden für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in beiden Röhrchen mit unterschiedlichen Konzentrationen CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) gefärbt. Die beladenen Zellen wurden mit 200 nM CFSE gefärbt. Als Kontrolle wurde die unbeladene Zellsuspension im zweiten Röhrchen mit 2 nM CFSE gefärbt. Durch die unterschiedlichen Konzentrationen an CFSE können beide Zellpopulationen später im Durchflusszytometer voneinander unterschieden werden. Nach der Inkubation für 10 min bei 37°C wurden die Röhrchen für 5 min auf Eis gelagert und dann einmal gewaschen. Als nächstes wurden die Zellen beider Populationen gezählt und im Verhältnis 1:1 zusammengeführt. Im Anschluss daran wurden insgesamt 4×10^7 Zellen in unbehandelte, FV-infizierte und DT-behandelte, FV-infizierte Mäuse i.v. injiziert (dies entspricht 2×10^7 Zellen jeder Population). Als Kontrollen wurden zusätzlich naive Mäuse als Rezipienten mitgeführt. Den so behandelten Mäusen wurde 2 h nach dem Transfer der Zellen Blut abgenommen und die Tiere dann durch zervikale Dislokation getötet. Nach Entnahme der Milz, des Knochenmarks und der Lymphknoten wurden die Einzelzellsuspensionen dieser Organe auf die injizierten

Zellpopulationen hin untersucht. Im Durchflusszytometer wurde die Zellzahl beider injizierter Populationen (Peptid-beladene Zellen und unbeladene Kontrollen) gemessen und das spezifische Töten von Zielzellen durch CD8⁺ T-Zellen wie folgt bestimmt:

$$\% \text{ Eliminierung} = 100 - \frac{\% \text{ peptidbeladene Lymphozyten in infizierten Mäusen}}{\% \text{ peptidbeladene Lymphozyten in naiven Mäusen}} \times 100$$

3.12 Bestimmung der Proliferation von bestimmten Zellpopulationen mit Hilfe von Bromodeoxyridin (BrdU)

Um die Proliferation von bestimmten Zellpopulationen zu bestimmen, wurde eine Methode verwendet, die auf dem Einbau von BrdU in neu synthetisierte DNA basiert. Bei BrdU handelt es sich um ein Thymidin-Analogon, das nach Aufnahme in den Körper der Maus über das Trinkwasser in die einzelnen Zellen dieser eindringt. Während der S-Phase des Zellzyklus wird dies in neu synthetisierte DNA eingebaut und befindet sich dadurch in neu gebildeten Zellen. Für die Analyse der Proliferation wurden die Mäuse ab den dritten Tag vor der Durchführung der Versuche mit einer BrdU-Lösung (0,8 mg/ml) getränkt. Zum Nachweis von intrazellulärem BrdU wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung einmal in FACS-Puffer gewaschen (300 x g; 5 min) und dann nach dem Protokoll des Herstellers des FITC BrdU Flow Kits fixiert und permeabilisiert. Durch die Permeabilisierung können die gegen intrazelluläre Proteine gerichteten Antikörper in Zellen eindringen und diese binden. Nach einmaligem Waschen mit dem entsprechenden Puffer wurden die Zellen mit 100 µl Puffer mit 0,5 µl BrdU-Antikörper für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit Waschpuffer und einmal mit FACS-Puffer gewaschen (300 x g; 5 min), in einem Volumen von 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und umgehend durchflusszytometrisch analysiert. In Abbildung 3.5 ist eine solche durchflusszytometrische Analyse am Beispiel von Milzzellen einer naiven Maus exemplarisch für alle durchgeführten Experimente gezeigt.

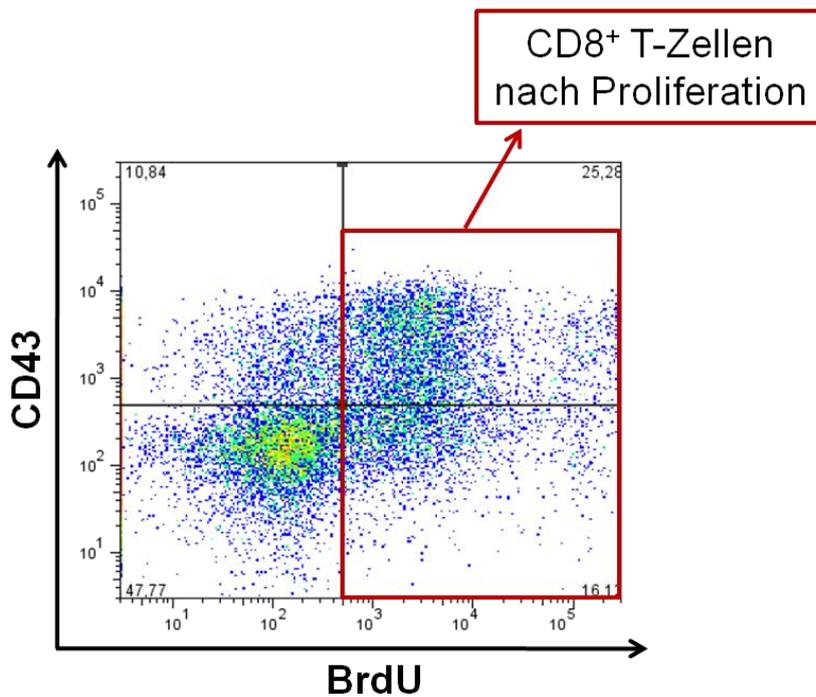


Abbildung 3.5 Nachweis von Zellen nach Proliferation

Milzzellsuspensionen von naiven Mäusen wurden durchflusszytometrisch untersucht. Im roten Kasten ist der Anteil an proliferierten $CD8^+$ T-Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation dargestellt.

3.13 Pathophysiologische Untersuchung exemplarischer Mäuse

Die Injektion von DT in DEREK Mäuse bewirkt eine Depletion der regulatorischen T-Zellen in diesen Tieren. Die Abwesenheit dieses Zelltyps kann bestimmte autoimmunologische Reaktionen hervorrufen (71). Um die Folgen der Behandlung der Mäuse mit DT zu charakterisieren und eventuelle autoimmunologische Symptome, die durch die Abwesenheit regulatorischer T-Zellen verursacht worden sein könnten, auszuschließen, wurden einige Mäuse exemplarisch einer pathophysiologischen Untersuchung durch Mitarbeiter des Instituts für Tierpathologie, Fachbereich Veterinärmedizin, der Freien Universität Berlin unterzogen. Für die Versendung und die pathologische Untersuchung der Tierkadaver mussten diese speziell vorbereitet und in Formalin fixiert werden. Nach der Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation wurden diese in Rückenlage an den Extremitäten aufgespannt und das Bauchfell mittels einer stumpfen Schere eröffnet. Anschließend wurde die Peritonealhaut geöffnet und das Zwerchfell von unten her aufgeschnitten, um eine hinreichende Verteilung der Formalinlösung im Brustkorb zu gewährleisten. Die so behandelten Mäuse wurden im Anschluss daran in je einem Liter einer 8%igen Formalinlösung über Nacht bei Raumtemperatur geschwenkt. Die

Versendung der so fixierten Tiere erfolgte in einem geeigneten Gefäß ebenfalls in einer 8%igen Formalinlösung. Es wurden Gewebeproben von Nieren, Leber, Milz, Lymphknoten, Dünndarm, Gelenken und Lunge untersucht.

4 Ergebnisse

4.1 Akute Infektion

4.1.1 FV-spezifische zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen im Verlauf einer FV-Infektion

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der akuten FV-Infektion zukommt. Ihre vermutlich durch regulatorische T-Zellen verursachte Dysfunktion ermöglicht allerdings im Verlauf der späten Phase der akuten Infektion die Etablierung einer chronischen Infektion (32). Eigene Vorarbeiten in Form einer Diplomarbeit zeigten, dass die Stärke der CD8⁺ Effektorzellexpansion von der Höhe der Viruslast in den verschiedenen lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz und Knochenmark) abhängt. Wie in 1.2.4.4 beschrieben, ist im Knochenmark, dem Organ mit der höchsten Viruslast, demzufolge die stärkste Effektorzellantwort zu finden, gefolgt von der Milz, in der sowohl Viruslast als auch die CD8⁺ Effektorzellexpansion geringer sind als im Knochenmark. Die geringste Viruslast und folglich auch schwächste CD8⁺ T-Zell-Antwort findet sich in den Lymphknoten. Diese Analysen basierten ausschließlich auf der durchflusszytometrischen Bestimmung von absoluten Zellzahlen von Effektor T-Zellpopulationen.

Um die funktionelle Aktivität der expandierenden CD8⁺ T-Zellen bestimmen zu können, sollte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit das zytotoxische Potential von CD8⁺ T-Zellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein *in vivo*-CTL Test, wie in 3.11 beschrieben, entwickelt. Für diesen Test wurden Lymphozyten von naiven Mäusen, welche mit einem FV-spezifischen CTL-Epitop beladen wurden, in 10 Tage FV-infizierte Mäuse injiziert. Die FV-spezifischen CTL erkennen dieses Peptid und eliminieren daraufhin die Zielzellen. Zwei Stunden nach Injektion der mit CFSE markierten Zellen wurden Lymphknoten, Milz und Knochenmark von naiven und 10 Tage infizierten Mäusen auf die FV-spezifische Eliminierung der Zielzellen hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 4.1 gezeigt. In den Lymphknoten der 10 Tage infizierten Mäuse, dem Organ mit der geringsten Viruslast und CD8⁺ Effektorzellantwort, wurden im Schnitt etwa 32% der Peptid-beladenen Zellen eliminiert. Eine etwa doppelt so hohe Eliminationsrate der Zielzellen lag in der Milz vor, in der auch die Viruslast und die Stärke der

Effektorzellantwort höher ist als in den Lymphknoten. Hier wurden durchschnittlich 61% der Peptid-beladenen Zellen abgetötet. Die effektivste Zielzell-spezifische Eliminierung fand im Knochenmark statt, wo etwa 76% der injizierten Zielzellen abgetötet wurden. Diese Resultate zeigen eine Korrelation der in 1.2.4.4 beschriebenen kinetischen Untersuchungen der Anzahl von Effektor CD8⁺ T-Zellen in Lymphknoten, Milz und Knochenmark mit der Stärke der detektierten Virus-spezifischen zytotoxischen Aktivität.

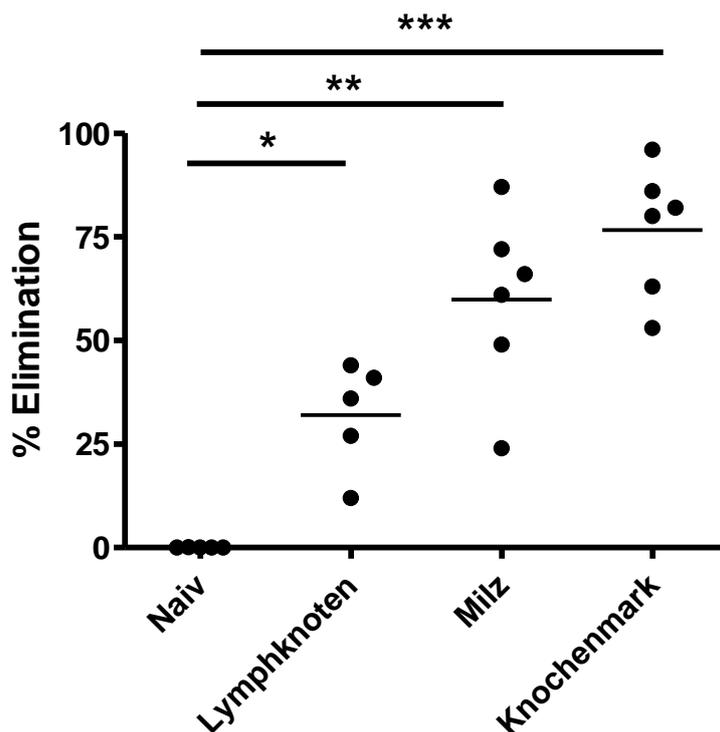


Abbildung 4.1 FV-spezifische zytotoxische Aktivität von CTL in verschiedenen Organen FV-infizierter Mäuse

Milz- und Lymphknotenzellsuspensionen von naiven Mäusen wurden mit dem FV-spezifischen DbGagL-Peptid beladen und mit CFSE markiert. Diese Zellen wurden in naive und FV-infizierte Mäuse an Tag 10 nach Infektion injiziert (i.v.). Als Kontrolle wurden unbeladene Milzzellen mit einer geringeren Konzentration an CFSE markiert und zusammen mit den beladenen Zellen in die Mäuse injiziert. Zwei Stunden nach dem Transfer wurden die Donorzellen in den Lymphknoten, der Milz und dem Knochenmark der Empfängertiere durchflusszytometrisch analysiert. Es ist der prozentuale Anteil an Zielzell-Elimination in den untersuchten Organen gezeigt. Zwei unabhängige Experimente mit jeweils 2-3 Mäusen pro Gruppe wurden durchgeführt. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Organen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

In 1.2.4.4 wurde beschrieben, dass die Anzahl der CD8⁺ Effektor T-Zellen von der Höhe der Viruslast in verschiedenen lymphatischen Organen FV-infizierter Mäuse

abhängig ist. Diese Effektor T-Zellen expandieren in der zweiten Infektionswoche, wenn die Viruslast ihren Höhepunkt erreicht hat, stark. Nach Tag 12, wenn die Viruslast schon signifikant abgenommen hat, beginnt auch die Kontraktion der CD8⁺ Effektor T-Zellpopulation (141). Um diese Kinetik der CD8⁺ Effektorzellzahl mit der Entwicklung der zytotoxischen Aktivität in der Milz und im Knochenmark während einer FV-Infektion vergleichen zu können, wurde eine kinetische Analyse mit Hilfe des *in vivo* CTL-Tests durchgeführt. Wie in Abbildung 4.2 zu sehen, stieg der Anteil an eliminierten Zielzellen im Verlauf der Infektion in beiden Organen an und erreichte mit etwa 65% in der Milz (Abbildung 4.2 A) und ca. 81% im Knochenmark (Abbildung 4.2 B) an Tag 15 seinen Höhepunkt. Danach war ein starkes Absinken des Anteils abgetöteter Zielzellen in beiden Organen zu finden. Schon an Tag 20 nach Infektion wurde ein deutlich vermindertes zytotoxisches Potential der CD8⁺ T-Zellen gemessen, was auf die Entwicklung einer Dysfunktion hindeutete. Dieses zytotoxische Potential nahm im Verlauf der Infektion bis zur Etablierung der chronischen Infektion nach Tag 60 noch weiter ab. Hier betrug der Anteil an eliminierten Zielzellen in der Milz nur noch etwa 5%, was mehr als 10-fache Reduktion gegenüber dem höchsten Messwert an Tag 15 nach Infektion darstellt. Im Knochenmark betrug dieser Anteil in der chronischen Phase der Infektion ca. 8%, was ebenfalls eine etwa 10-fache Abnahme gegenüber Tag 15 ausmacht. Sowohl in der Milz, als auch im Knochenmark korrelierte diese geringe zytotoxische Aktivität mit der geringen Anzahl an CD8⁺ T-Zellen, welche zytotoxische Moleküle produzieren und degranulieren, die zum Zeitpunkt 60 Tage nach Infektion vorhanden sind (141). Diese Kinetik belegt, dass die zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen mit der im Vorfeld beschriebenen CD8⁺ Effektorzellexpansion und der Höhe der Viruslast in verschiedenen Organen korreliert. Wie in 1.2.4.4 beschrieben, wurde nach FACS-Färbungen von zytotoxischen Molekülen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion ein Funktionsverlust von CD8⁺ Effektorzellen zwischen der zweiten und dritten Woche der Infektion vermutet. Mit den hier durchgeführten funktionellen Zytotoxizitätstests wurde dieser Funktionsverlust erstmals *in vivo* nachgewiesen.

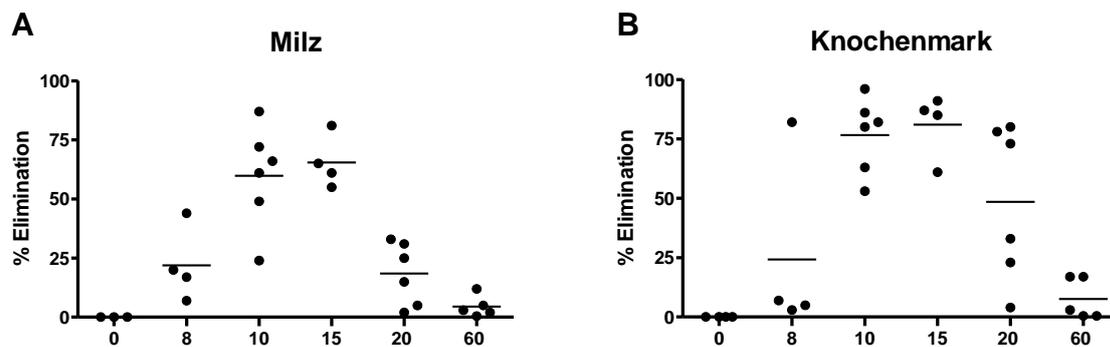


Abbildung 4.2 Kinetik der zytotoxischen Aktivität in der Milz und im Knochenmark FV-infizierter Mäuse

Milz- und Lymphknotenzellsuspensionen von naiven Mäusen wurden mit dem FV-spezifischen DbGagL-Peptid beladen und mit CFSE markiert. Diese Zellen wurden in naive und FV-infizierte Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion injiziert (i.v.). Als Kontrolle wurden unbeladene Milzzellen mit einer geringeren Konzentration an CFSE markiert und zusammen mit den beladenen Zellen in die Mäuse injiziert. Zwei Stunden nach dem Transfer wurden die Donorzellen in der Milz (**A**) und dem Knochenmark (**B**) der Empfängertiere durchflusszytometrisch analysiert. Es ist eine Kinetik des prozentualen Anteils an FV-spezifischer Elimination von Zielzellen im Verlauf einer FV-Infektion in der Milz und im Knochenmark gezeigt. Es wurden drei unabhängige Experimente mit je 1-3 Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion durchgeführt. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus.

4.1.2 Untersuchung der Mechanismen der Expansion von regulatorischen T-Zellen

Wie bereits in 1.2.4.4 beschrieben, ist nicht nur die $CD8^+$ Effektorzellantwort im Verlauf einer FV-Infektion lokal definiert. Ebenso ist die Suppression der $CD8^+$ T-Zellen durch regulatorische T-Zellen lokal begrenzt. Das bedeutet, dass in dem Organ mit der höchsten Viruslast und der stärksten $CD8^+$ Effektorzellantwort, dem Knochenmark, die größte Expansion von regulatorischen T-Zellen zu finden ist, dagegen expandieren regulatorische T-Zellen in den Lymphknoten kaum. Diese Tatsache warf die Frage auf, welche Faktoren genau die Expansion von regulatorischen T-Zellen beeinflussen. Um dies zu klären, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Zunächst sollte die Fragestellung bearbeitet werden, ob verschieden hohe Virustiter innerhalb desselben Organs die Expansion dieser Zellen beeinflussen. Dazu wurden Mäuse mit verschiedenen hohen Dosen FV infiziert (100, 1 000, 10 000 und 25 000 SFFU) und die Anzahl $CD4^+$ $Foxp3^+$ regulatorischer T-Zellen an Tag 10 nach Infektion in Lymphknoten, Milz und Knochenmark durchflusszytometrisch bestimmt. Wie erwartet, ist die Viruslast in den Organen der Mäuse höher, je höher die eingesetzte Infektionsdosis ist (140). Daher konnte untersucht werden, ob in den Tieren mit dem höchsten Infektionsgrad auch die

größte Expansion regulatorischer T-Zellen zu finden ist. Diese Hypothese wurde, wie die in Abbildung 4.3 präsentierten Resultate zeigen, größtenteils bestätigt. In der Milz und im Knochenmark korrelierte die Anzahl an regulatorischen T-Zellen mit der Höhe der Viruslast insofern, als dass die meisten regulatorischen T-Zellen in den Tieren mit der höchsten verabreichten Virusdosis nachgewiesen wurden.

In der Milz fanden sich in den Mäusen, die mit 25 000 SFFU infiziert wurden, an Tag 10 durchschnittlich etwa 1,5-fach so viele CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten im Vergleich mit einer naiven Maus (30 000). Im Knochenmark lag die maximale Anzahl an regulatorischen T-Zellen an Tag 10 in den Mäusen vor, die mit der zweithöchsten Dosis infiziert wurden. In den mit 25 000 SFFU infizierten Tieren war die Anzahl an regulatorischen T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten im Schnitt etwas geringer (14 000) als in den mit 10 000 SFFU infizierten Tieren (18 000). Dabei handelt es sich, verglichen mit der Anzahl dieser Zellen im naiven Tier, um eine Expansion um das etwa Fünffache. Im Gegensatz zu den beiden gerade beschriebenen Organen ließ sich in den Lymphknoten insgesamt keine ausgeprägte Expansion regulatorischer T-Zellen nachweisen. Die Anzahl dieser Zellen pro 10⁶ Lymphozyten schwankte in diesem Fall bei allen Infektionsdosen um den Wert 35 000. Diese Tatsache könnte mit der ohnehin schon relativ hohen Anzahl regulatorischer T-Zellen in den Lymphknoten naiver Tiere zusammenhängen. Zumindest in der Milz und im Knochenmark ließ sich eine deutliche Korrelation der eingesetzten Virusdosis und der Expansion von regulatorischen T-Zellen nachweisen. Zusätzlich bestätigten die Ergebnisse dieses Versuchs die in 4.1.1 beschriebene Feststellung einer lokal definierten, der Viruslast folgenden Immunantwort.

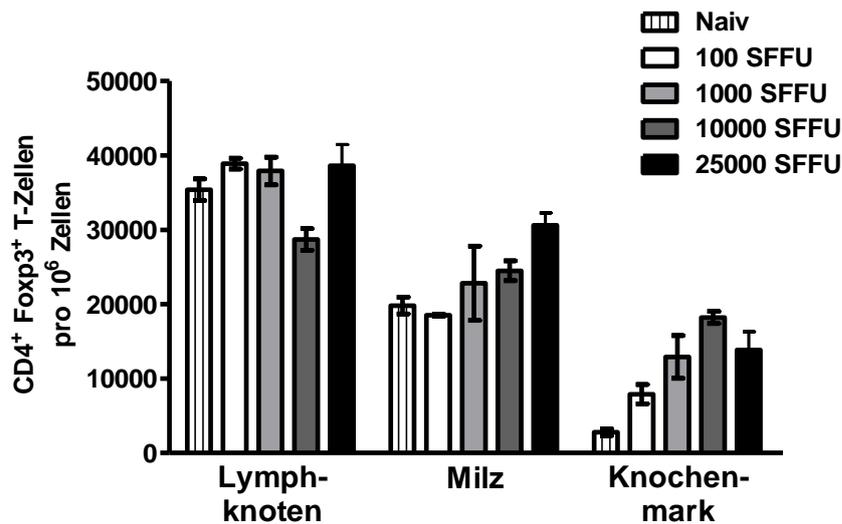


Abbildung 4.3 Anzahl regulatorischer T-Zellen in Mäusen 10 Tage nach Infektion mit verschiedenen hohen Dosen FV

Mäuse wurden mit vier verschiedenen hohen Dosen an FV infiziert (100, 1000, 10000 und 25000 SFFU). 10 Tage nach Infektion erfolgte die durchflusszytometrische Analyse von CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen in den Lymphknoten, der Milz und dem Knochenmark der naiven und der unterschiedlich stark infizierten Tiere. Die absolute Anzahl von CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Es sind die Mittelwerte von 6 Mäusen pro Gruppe mit Standardabweichung gezeigt. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob die Höhe der Viruslast allein oder die folgende CD8⁺ Effektorzellantwort die Expansion von regulatorischen T-Zellen beeinflusst. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Dazu wurden im Knochenmark von Mäusen, die mit verschiedenen hohen Virusdosen infiziert wurden, die Anzahl der CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen und die Anzahl der CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen durchflusszytometrisch bestimmt und diese dann miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieser Korrelationsanalyse sind in Abbildung 4.4 gezeigt. In den Tieren, die mit der geringsten Virusdosis von 100 SFFU infiziert wurden, fand sich im Mittel sowohl die niedrigste Anzahl an CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen (10 000), als auch durchschnittlich die niedrigste Anzahl CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen (6 000) pro 10⁶ Lymphozyten. Im Gegensatz dazu wurden in den mit 1 000 SFFU infizierten Tieren im Durchschnitt etwa 23 000 CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen und 13 000 CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten nachgewiesen. Die Anzahl beider Populationen verdoppelte sich also durch die 10-fach höhere Virusdosis. Die höchste Anzahl an CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen (53 000) lag in den mit 10 000 SFFU infizierten

Tieren vor. Diese wiesen zugleich die höchste Anzahl an CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen (17 000) auf. Das sind etwa fünfmal so viele Effektorzellen und etwa dreimal so viele regulatorische T-Zellen wie in den Tieren, die die geringste Virusdosis erhielten. Diese deutliche Korrelation zwischen der Anzahl an CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen und der Anzahl an CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen deutet darauf hin, dass die Expansion der regulatorischen T-Zellen von der Stärke der CD8⁺ Effektorzellantwort abhängig ist.

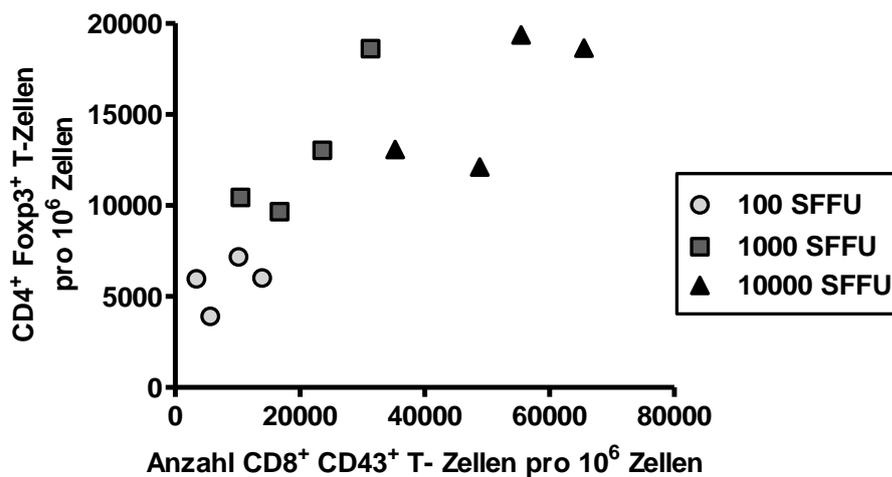


Abbildung 4.4 Korrelation von Effektorzellanzahl und der Anzahl an regulatorischen T-Zellen in FV-infizierten Mäusen

Je vier Mäuse wurden mit unterschiedlich hohen Dosen FV infiziert (100, 1000, 10000 SFFU) und die Anzahl von CD4⁺ Foxp3⁺ und CD8⁺ CD43⁺ T-Zellen im Knochenmark der Tiere 10 Tage nach Infektion durchflusszytometrisch bestimmt. CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen sind gegen CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen aufgetragen. Jedes Symbol repräsentiert eine individuelle Maus. Für die Berechnung der Anzahl CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen und CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen pro Maus ($r = 0,7886$; $P = 0,0039$) wurde die „Pearson 1-grouping variable tables“ Korrelationsanalyse eingesetzt.

Um zu überprüfen, ob die Expansion von CD8⁺ Effektorzellen tatsächlich essentiell für die Expansion von regulatorischen T-Zellen in infizierten Mäusen ist, wurde, wie in Abbildung 4.5 gezeigt, ein CD8⁺ T-Zell-Depletionsexperiment durchgeführt. Wie in 3.9 beschrieben, ließen sich durch die fünfmalige Injektion von CD8-spezifischen monoklonalen Antikörpern etwa 97% der CD8⁺ T-Zellen depletieren. Die Quantifizierung der CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen erfolgte an Tag 10 der Infektion, zwei Tage nach der letzten Injektion des depletierenden Antikörpers.

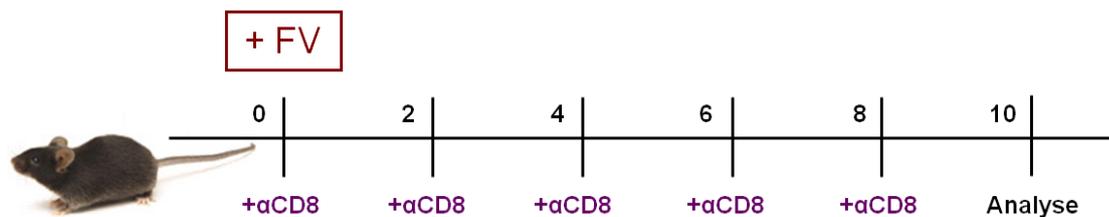


Abbildung 4.5 Versuchsschema zur Depletion von CD8⁺ T-Zellen in der akuten FV-Infektion

Für die Depletion von CD8⁺ T-Zellen wurde den Mäusen, beginnend mit dem Tag der FV-Infektion fünfmal mit jeweils einem Tag Abstand der monoklonale Antikörper gegen CD8 injiziert. Die Quantifizierung der CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen wurde an Tag 10 nach Infektion durchgeführt.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Sowohl in der Milz, als auch im Knochenmark wurde an Tag 10 nach Infektion eine signifikante Expansion der regulatorischen T-Zellen festgestellt. In der Milz zeigte sich, wie oben bereits beschrieben, eine signifikant erhöhte Anzahl an CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in den infizierten Tieren im Vergleich zu den naiven Tieren. Im Falle einer Depletion von CD8⁺ T-Zellen erfolgte dagegen keine signifikante Expansion von regulatorischen T-Zellen. Auch im Knochenmark expandierte die Population CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in den infizierten Tieren verglichen mit den naiven Tieren. Ebenso wie in der Milz wiesen die infizierten, CD8⁺ T-Zell-depletierten Tiere im Knochenmark keine Expansion von CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten auf. Dies belegt die essentielle Rolle, die die antivirale CD8⁺ Effektorzellantwort für die Expansion von regulatorischen T-Zellen im Verlauf der FV-Infektion spielt, denn bei Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen wurde keine Expansion regulatorischer T-Zellen festgestellt. Durch frühere Arbeiten war bekannt, dass die Viruslast in akut infizierten Mäusen nach Depletion von CD8⁺ T-Zellen signifikant höher ist, als in nicht-depletierten Tieren (140). Dass trotz höherer Viruslast keine Expansion regulatorischer T-Zellen stattgefunden hatte, bestätigte die Hypothese, dass die Expansion von regulatorischen T-Zellen von der Stärke der CD8⁺ Effektorzellantwort und nicht von der Höhe der Viruslast abhängig war.

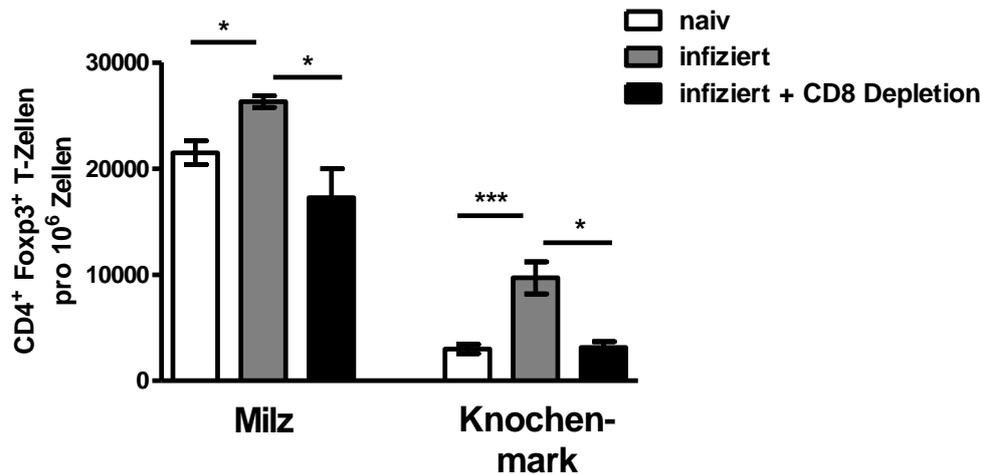


Abbildung 4.6 Anzahl regulatorischer T-Zellen in FV-infizierten Mäusen nach Depletion von CD8⁺ T-Zellen

Milz- und Knochenmarkszellsuspensionen von naiven Mäusen, infizierten Mäusen und infizierten Mäusen nach CD8⁺ T-Zelldepletion wurden 10 Tage nach Infektion durchflusszytometrisch auf die Anzahl von CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen hin untersucht. Die absolute Anzahl von CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Es sind die Mittelwerte von 6-8 Mäusen pro Gruppe mit Standardabweichung gezeigt. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des „Mann-Whitney Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Nach diesen Ergebnissen stellte sich im Folgenden die Frage, ob die Expansion CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen durch Rekrutierung regulatorischer T-Zellen aus anderen Organen oder durch Proliferation dieser Zellen vermittelt wurde. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurde die Proliferationsrate regulatorischer T-Zellen in den drei untersuchten Organen analysiert. Dazu wurden naive und akut infizierte (10 Tage nach Infektion) Tiere wie in Abbildung 4.7 beschrieben drei Tage vor der Analyse mit einer BrdU-Lösung getränkt. BrdU wird während der DNA-Synthese in neue DNA-Stränge eingebaut und lässt sich später mit speziellen Antikörpern intrazellulär anfärben, um neu gebildete Zellen im Durchflusszytometer von nicht-proliferierten Zellen unterscheiden zu können.



Abbildung 4.7 Versuchsschema zur Behandlung naiver und akut infizierter Mäuse mit BrdU

Für die *in vivo*-Markierung von Zellen, die eine Proliferation durchlaufen haben, wurden die Tiere an Tag 7, 8 und 9 nach Infektion wie in 3.12 beschrieben mit der BrdU-Lösung getränkt. Die Untersuchung der Zellsuspensionen von Lymphknoten, Milz und Knochenmark erfolgte an Tag 10 nach Infektion.

In Abbildung 4.8 ist die Anzahl von BrdU⁺, also proliferierenden, CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten dargestellt. In den naiven Tieren war ein deutlicher Unterschied der homöostatischen Proliferation der regulatorischen T-Zellen in den drei untersuchten Organen zu erkennen. Dies korrelierte mit der zuvor schon gezeigten unterschiedlichen Anzahl regulatorischer T-Zellen in naiven Tieren, die in den Lymphknoten am höchsten und im Knochenmark am niedrigsten war. Somit fand sich die höchste Anzahl an BrdU⁺ regulatorischen T-Zellen mit etwa 4 000 pro 10⁶ Lymphozyten in den Lymphknoten naiver Tiere. In der Milz dieser Tiere betrug diese Anzahl durchschnittlich ca. 1 300. Die niedrigste Anzahl an proliferierten regulatorischen T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten lag mit nur 300 im Knochenmark der naiven Tiere vor. An Tag 10 nach Infektion war in den Lymphknoten kein signifikanter Anstieg der Proliferation regulatorischer T-Zellen festzustellen. Im Gegensatz dazu wurde in der Milz und im Knochenmark eine deutliche Zunahme der BrdU⁺ regulatorischen T-Zellen nach Infektion nachgewiesen. In der Milz wurden durchschnittlich etwa 4 500 BrdU⁺ regulatorische T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten detektiert, was eine etwa 3,5-fache Steigerung verglichen mit naiven Tieren darstellt. Eine etwa dreifache Erhöhung der Anzahl war mit etwa 950 BrdU⁺ regulatorischen T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten im Knochenmark der 10 Tage infizierten Tiere zu finden. Somit korrelierte auch die Proliferationsrate der regulatorischen T-Zellen nach FV-Infektion mit der Expansionsrate dieser Zellen in den untersuchten Organen. Demzufolge trägt die Proliferation der regulatorischen T-Zellen in den einzelnen Organen erheblich zur Expansion dieser Population bei.

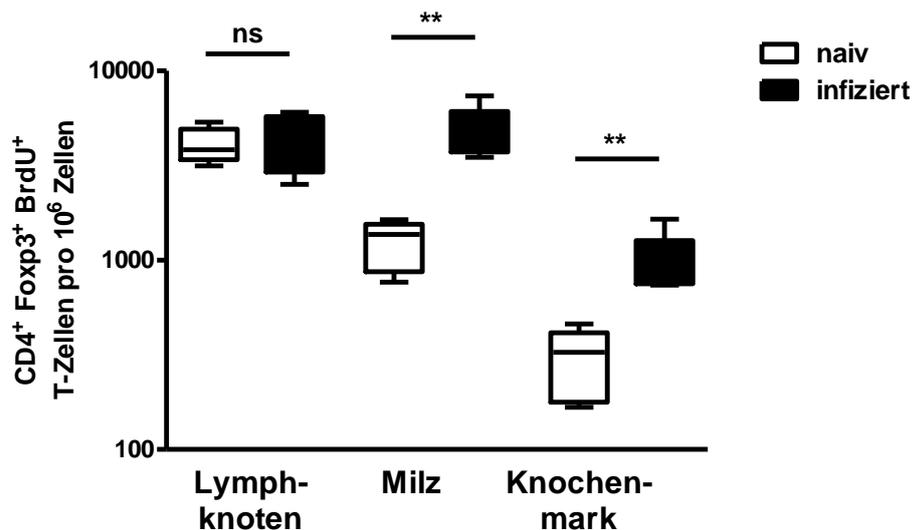


Abbildung 4.8 Proliferation von regulatorischen T-Zellen nach FV-Infektion

Naive Mäuse und 7 Tage infizierte Mäuse wurden drei Tage lang mit BrdU versetztem Trinkwasser getränkt. 10 Tage nach Infektion wurden die Zellsuspensionen von Lymphknoten, Milz und Knochenmark der so behandelten Tiere durchflusszytometrisch auf proliferierende regulatorische T-Zellen hin untersucht ($CD4^+ Foxp3^+ BrdU^+$). Die absolute Anzahl von $CD4^+ Foxp3^+ BrdU^+$ T-Zellen pro 10^6 Lymphozyten ist dargestellt. Es sind die Mittelwerte von 6 Mäusen pro Gruppe mit Standardabweichung gezeigt. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * $< 0,05$; ** $< 0,005$; *** $< 0,0005$.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob zur Expansion regulatorischer T-Zellen während der FV-Infektion nicht nur eine Proliferation dieser Zellen beiträgt, oder ob zusätzlich eine *de novo*-Induktion regulatorischer T-Zellen aus $Foxp3^- CD4^+$ T-Zellen stattfindet. Um zu überprüfen, ob eine solche Konversion stattgefunden hat, wurde ein Experiment durchgeführt, in dem $CD4^+ CD25^- GFP^-$ T-Zellen aus 7 Tage infizierten DEREK Mäusen in ebenfalls 7 Tage infizierte C57BL/6 Mäuse transferiert wurden. In dem transgenen DEREK Mausmodell wird ein Diphtherietoxinrezeptor-GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des *Foxp3* Promoters exprimiert. Die Verwendung dieses Mausmodells erlaubt somit die unkomplizierte Detektion *Foxp3*-exprimierender regulatorischer T-Zellen anhand der exprimierten GFP-Expression. Mittels der MACS-Methode wurden $CD4^+ CD25^-$ T-Zellen aus den Milzen der akut infizierten DEREK Mäuse isoliert und die Abwesenheit von GFP in dieser Zellsuspension durchflusszytometrisch überprüft. Im Folgenden wurden diese Zellen mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff PKH26 markiert, um sie in den Empfängermäusen später eindeutig identifizieren zu können. 5×10^6 dieser so markierten Zellen wurden anschließend in 7 Tage infizierte C57BL/6 Mäuse

transferiert. 3 Tage später, also an Tag 10 nach FV-Infektion, wurden die Empfängertiere getötet und deren Lymphknoten, Milz und Knochenmark durchflusszytometrisch auf die transferierten Zellen untersucht. Wie in Abbildung 4.9 zu erkennen ist, wurden diese transferierten, PKH26-positiven Zellen (Abbildung 4.9, linker Dot Plot) auf die Expression der Marker CD4, CD25 und auf die Expression von GFP hin analysiert (Abbildung 4.9, rechter Dot Plot). Dabei konnte in der Milz keine Konversion von $CD4^+ CD25^- GFP^-$ T-Zellen in regulatorische $CD4^+ CD25^+ GFP^+$ T-Zellen nachgewiesen werden. Dies galt auch für die Untersuchungen von Zellen aus Lymphknoten und dem Knochenmark. Diese Ergebnisse zeigen, dass für die Expansion von regulatorischen T-Zellen während der FV-Infektion eine Proliferation dieser Zellen wichtig war, aber keine Konversion von $Foxp3^-$ T-Zellen in $Foxp3^+$ regulatorische T-Zellen.

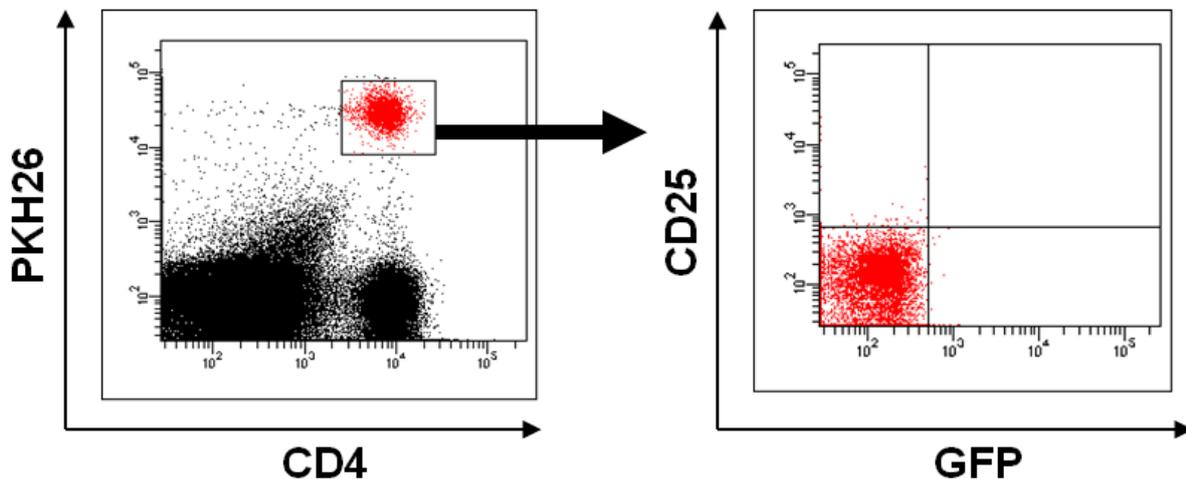


Abbildung 4.9 Untersuchung zur *in vivo* Konversion von $Foxp3^-$ T-Zellen zu $Foxp3^+$ regulatorischen T-Zellen während einer FV-Infektion

Mittels der MACS Methode wurden $CD4^+ CD25^- GFP^-$ T-Zellen aus Milz- und Lymphknotenzellsuspensionen 7 Tage infizierter DREG Mäuse isoliert. Diese wurden anschließend mit dem Farbstoff PKH26 markiert und in 7 Tage infizierte C57BL/6 Mäuse injiziert. Diese wurden 10 Tage nach Infektion getötet und die Zellsuspensionen von Lymphknoten, Milz und Knochenmark durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurden PKH26⁺ Zellen (linker Dot Plot) auf die Expression von CD25 und GFP hin analysiert (rechter Dot Plot). Es sind repräsentativ für alle Organe Dot Plots von Milzzellen gezeigt. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

4.1.3 Die Rolle von regulatorischen T-Zellen in der Kontrolle der Virus-spezifischen Effektor CD8⁺ T-Zellantwort während einer akuten FV-Infektion

In 1.2.4.4 wurde beschrieben, dass regulatorische T-Zellen einen starken Einfluss auf die CD8⁺ T-Zellantwort während einer akuten FV-Infektion haben. Durch Verwendung des DEREK Mausmodells, in dem regulatorische T-Zellen selektiv durch Injektion von DT depletiert werden können, wurde gezeigt, dass diese Zellen die Expansion und Funktion von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen in der Phase der akuten Infektion supprimieren. Die Depletion von regulatorischen T-Zellen hatte eine quantitativ und qualitativ gesteigerte CD8⁺ Effektor T-Zellantwort und im Folgenden eine verbesserte Eliminierung des FV in DEREK Mäusen zur Folge (141).

In der in 1.2.4.4 beschriebenen Diplomarbeit wurden nur Marker für zytotoxische Moleküle und zur Degranulation untersucht. Eine Depletion von regulatorischen T-Zellen hatte eine gesteigerte Anzahl an Zellen, die diese Marker exprimierten und daraus folgend eine geringere Viruslast in den untersuchten Organen zur Folge. Daraus ergab sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Fragestellung, welche weiteren funktionelle Komponenten der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, wie z.B. die Zytokinproduktion, von regulatorischen T-Zellen beeinflusst werden. Da die bisherigen Untersuchungen der nach Depletion von regulatorischen T-Zellen verbesserten Effektorfunktionen von CD8⁺ T-Zellen ausschließlich die durchflusszytometrische Bestimmung von Zellzahlen beinhalteten, sollte des Weiteren die Effizienz der zytotoxischen Aktivität von CD8⁺ T-Zellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen *in vivo* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde der schon beschriebene *in vivo* CTL-Test eingesetzt. Die für diese Versuche verwendeten DEREK Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.10 beschrieben, mit DT behandelt und an Tag 10 der Infektion zur Durchführung der Analysen getötet.

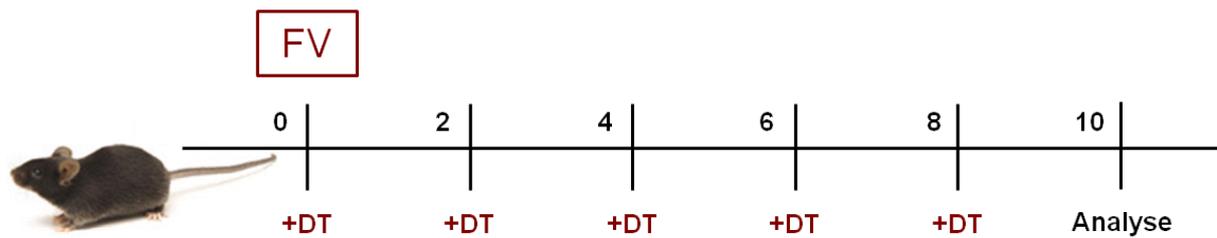


Abbildung 4.10 Versuchsschema zur Depletion von regulatorischen T-Zellen in der akuten Infektion

Für die Depletion der regulatorischen T-Zellen in DREG Mäusen wurde den Tieren fünfmal im Abstand von zwei Tagen DT i.p. injiziert, beginnend mit dem Tag der FV-Infektion. Die Analysen der verschiedenen Zellsuspensionen wurden jeweils an Tag 10 nach Infektion durchgeführt.

4.1.3.1 Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die Zytokinproduktion von CD8⁺ T-Zellen während der akuten FV-Infektion

Um den Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die Zytokinproduktion von CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden die Milzen naiver Mäuse, FV-infizierter Mäuse und FV-infizierter Mäuse nach Depletion von regulatorischen T-Zellen auf den Anteil IFN- γ -, TNF- α - und IL-2-produzierender CD8⁺ T-Zellen hin analysiert. IFN- γ wirkt auf verschiedene Weisen antimikrobiell. Beispielweise induziert es eine gesteigerte Makrophagenaktivierung und erhöht die Fas-Expression, was indirekt die Apoptose in Virus-infizierten Zellen induziert. TNF- α hat eine starke proinflammatorische Wirkung und besitzt somit ein direktes lytisches Potential. IL-2 regt im Gegensatz dazu die Proliferation von T- und B-Zellen an, stimuliert die Zytotoxizität in aktivierten Makrophagen und induziert die Produktion weiterer Zytokine. Wie in Abbildung 4.11 gezeigt ist, wurden prozentual mehr Zytokin-produzierende CD8⁺ T-Zellen, gemessen an der Gesamtzahl von CD8⁺ T-Zellen, nach Depletion regulatorischer T-Zellen nachgewiesen. Wie erwartet, stieg der prozentuale Anteil an Zytokin-produzierenden Zellen an der Gesamtzahl von CD8⁺ T-Zellen nach Infektion an. Nach Depletion von regulatorischen T-Zellen erhöhte sich dieser prozentuale Anteil im Vergleich zum infizierten Tier um das etwa 1,5-fache (von 4,2% auf 6,1%). Im Falle von TNF- α stieg der Anteil der für diesen Marker positiven Zellen an der Gesamtzahl von CD8⁺ T-Zellen im infizierten, depletierten Tier verglichen mit dem infizierten Tier ebenfalls um das 1,5-fache an (von 4,7% auf 7,6%). Genauso wie bei IFN- γ und TNF- α lag im Fall von IL-2 ein signifikanter Anstieg des Anteils der für diesen Marker positiven CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl von CD8⁺ T-Zellen im infizierten, depletierten Tier, verglichen mit dem infizierten Tier, vor. Mit einer Steigerung von 1,3% auf 3,9% verdreifachte sich der Anteil CD8⁺ IL-2⁺ T-Zellen im

infizierten, depletierten Tier. Diese Resultate belegen den Einfluss von regulatorischen T-Zellen auch auf die Funktion der Zytokinproduktion von CD8⁺ T-Zellen, da alle untersuchten Zytokine in Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen vermehrt von CD8⁺ T-Zellen produziert wurden.

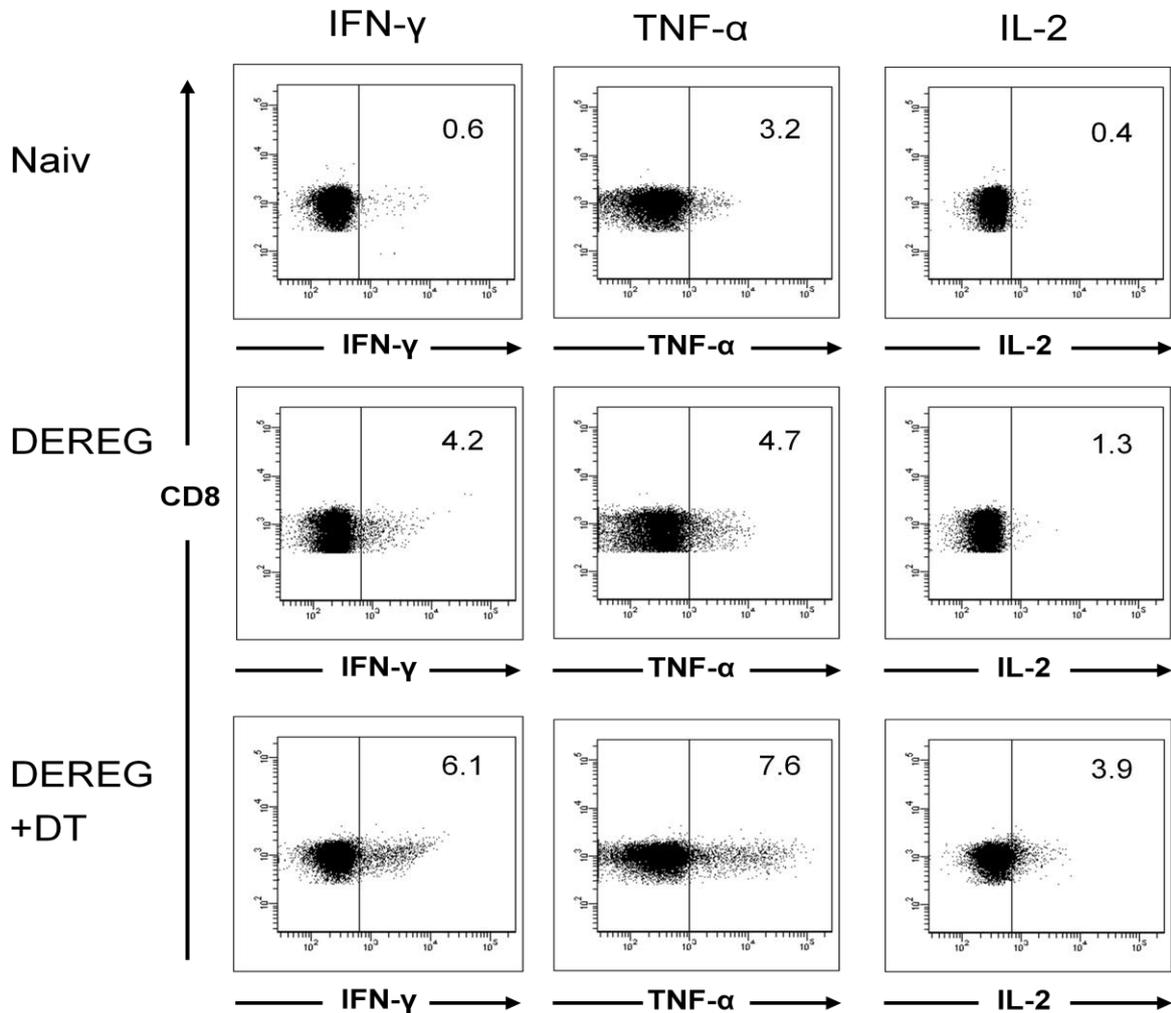


Abbildung 4.11 Zytokinproduktion von CD8⁺ T-Zellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen in FV-infizierten Mäusen

Milzellsuspensionen von naiven Mäusen, infizierten Mäusen und infizierten Mäusen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen wurden 10 Tage nach Infektion durchflusszytometrisch analysiert. Gemessen wurde die intrazelluläre Expression von IFN-γ, TNF-α und IL-2 in CD8⁺ T-Zellen. Es sind repräsentative Dot Plots für die jeweilige Gruppe dargestellt, analysiert wurden 5 Tiere pro Gruppe. Die Zahlen in der rechten oberen Ecke des Dot Plots stellen den Mittelwert des prozentualen Anteils der für das jeweilige Zytokin positiven Zellen an der Gesamt CD8⁺ T-Zellpopulation dar.

4.1.3.2 Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die FV-spezifische zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen

Die Daten der oben untersuchten Zytokinproduktion zusammen mit den in 1.2.4.4 beschriebenen Ergebnissen zeigen, dass nach Depletion von regulatorischen T-Zellen eine erhöhte Anzahl an CD8⁺ Effektorzellen, die zytotoxische Moleküle oder Zytokine produzieren und degranulieren, vorhanden war. Diese durch Zellzahlbestimmungen beobachteten Resultate warfen nun die Frage auf, ob sich auch *in vivo* nach Depletion von regulatorischen T-Zellen verbesserte zytotoxische Eigenschaften von CD8⁺ Effektorzellen nachweisen lassen. Zu diesem Zweck wurde ein *in vivo* CTL-Test, wie in 3.11 beschrieben, durchgeführt. Die unbeladenen und die mit dem FV-spezifischen Peptid beladenen Zielzellen wurden wie beschrieben mit verschiedenen hohen Konzentrationen CFSE markiert. Im Anschluss daran wurden diese Zellen in naive Mäuse, 10 Tage infizierte Mäuse und in 10 Tage infizierte, depletierte Mäuse injiziert (Abbildung 4.10). Zwei Stunden später wurden die Tiere getötet und deren Lymphknoten, Milz und Knochenmark auf die Elimination der markierten Zielzellen hin durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 4.12). Die Lymphknoten waren, wie schon in 4.1.1 beschrieben, 10 Tage nach Infektion das Organ mit der niedrigsten Eliminationsrate der markierten Zielzellen. Durch die Depletion von regulatorischen T-Zellen erhöhte sich der Anteil an eliminierten Zielzellen im Vergleich zu nicht depletierten Mäusen allerdings von 32% auf etwa 84%. Die Abwesenheit der regulatorischen T-Zellen verbesserte die Eliminationsrate also um fast das Dreifache. In der Milz wurde nach Depletion von regulatorischen T-Zellen ebenfalls eine verbesserte Elimination der Zielzellen festgestellt. Hier erhöhte sich der Anteil an eliminierten Zielzellen in den depletierten Tieren verglichen mit infizierten, nicht depletierten Tieren von durchschnittlich ca. 61% auf 87%, was eine etwa 1,5-fache Steigerung darstellt. Obwohl im Knochenmark infizierter Tiere, wie schon in 4.1.1 gezeigt, generell schon ein relativ hoher Anteil von Zielzellen abgetötet wurde, erhöhte sich dieser Anteil in infizierten, depletierten Tieren nochmal von im Schnitt 76% in nicht depletierten auf etwa 95% in depletierten Tieren. In allen drei Organen wurde also eine signifikant erhöhte Virus-spezifische Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen nachgewiesen. Damit korrelierte diese gesteigerte, *in vivo* nachgewiesene Zytotoxizität der CD8⁺ Effektorzellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen mit der vorher schon beschriebenen erhöhten Anzahl von CD8⁺ Effektorzellen. Zusätzlich korrelierte diese

verbesserte Zytotoxizität auch mit der in $CD8^+$ T-Zellen gefundenen, vermehrten Expression und Degranulation von zytotoxischen Molekülen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen.

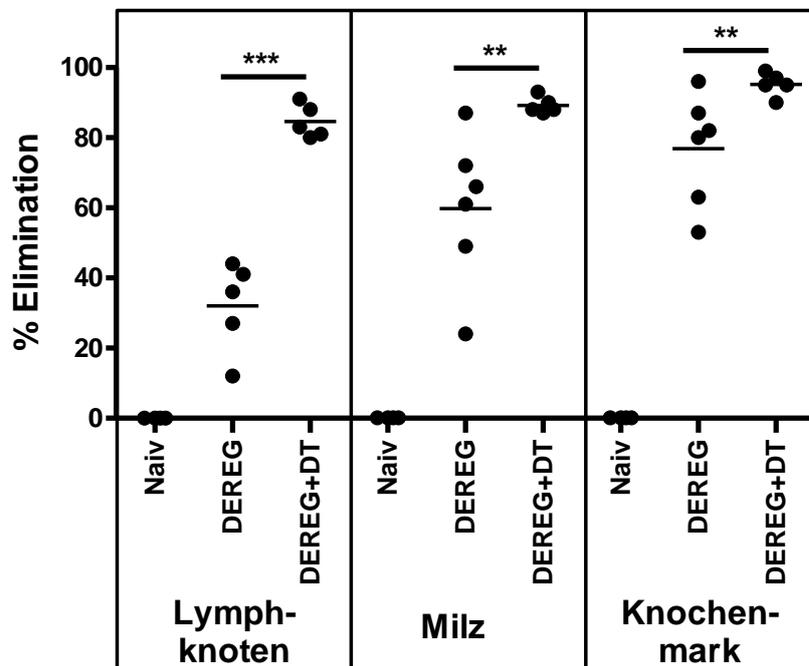


Abbildung 4.12 Verbesserte Zytotoxizität von $CD8^+$ T-Zellen in FV-infizierten Mäusen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen 10 Tage nach Infektion

Milz- und Lymphknotenzellsuspensionen von naiven Mäusen wurden mit dem FV-spezifischen DbGagL-Peptid beladen und mit CFSE markiert. Diese Zellen wurden an Tag 10 nach Infektion in naive, FV-infizierte und FV-infizierte, depletierte Mäuse injiziert (i.v.). Als Kontrolle wurden unbeladene Milzzellen mit einer geringeren Konzentration an CFSE markiert und zusammen mit den beladenen Zellen in die Mäuse injiziert. Zwei Stunden nach dem Transfer wurde die Anzahl der Donorzellen in den Lymphknoten, der Milz und dem Knochenmark der Empfängertiere durchflusszytometrisch analysiert. Es ist der prozentuale Anteil an Zielzell-spezifischer Elimination in den untersuchten Organen gezeigt. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * $< 0,05$; ** $< 0,005$; *** $< 0,0005$.

4.1.4 Zeitpunkt der Suppression während einer akuten FV-Infektion

Aus den bereits gezeigten Ergebnissen geht hervor, dass regulatorische T-Zellen einen Einfluss auf die $CD8^+$ Effektorzellantwort hatten. Die Expansion dieser Zellen beginnt in der zweiten Woche der Infektion, wenn die Viruslast in allen Organen am höchsten ist (141). Allerdings war nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt der FV-Infektion die regulatorischen T-Zellen die $CD8^+$ Effektor T-Zellen supprimieren. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden Dereg Mäuse infiziert und die

regulatorischen T-Zellen anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten im Infektionsverlauf durch die Injektion von DT depletiert. Um den Einfluss der verschiedenen Depletionszeitpunkte auf die CD8⁺ Effektorzellantwort zu bestimmen, wurden die funktionellen Eigenschaften dieser Zellen an Tag 12 nach Infektion analysiert. Dazu wurde die Anzahl an Granzym B-produzierenden CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die infizierten Mäuse wurden entweder von Tag 0-4, Tag 4-8 oder Tag 8-12 nach Infektion täglich mit DT behandelt, um so die regulatorischen T-Zellen zu depletieren. Eine Kontrollgruppe wurde infiziert, aber nicht mit DT behandelt. Alle infizierten Mäuse wurden an Tag 12 nach Infektion getötet und die Zellen von Lymphknoten, Milz und Knochenmark durchflusszytometrisch analysiert. In Abbildung 4.13 sind die Ergebnisse dieses Versuchs dargestellt. Die Depletion in der initialen Phase der akuten Infektion, also von Tag 0-4, resultierte nur in den Lymphknoten (Abbildung 4.13 A) und in der Milz (Abbildung 4.13 B) in einer signifikant gesteigerten Anzahl von CD8⁺ GzmB⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten. In den Lymphknoten erhöhte sich die Anzahl dieser Zellen in den in dieser frühen Phase depletierten Tieren verglichen mit den nicht depletierten Tieren etwa um das Dreifache (von durchschnittlich 1 000 auf 3 000). In der Milz stieg diese Anzahl etwa um das Vierfache an (von ca. 6 000 in nicht depletierten Tieren auf etwa 26 000 in den in der frühen Phase der Infektion depletierten Tieren). In diesen beiden Organen ist allerdings auch, wie in 4.1.2 bereits gezeigt, schon eine detektierbare Population regulatorischer T-Zellen in naiven Mäusen vorhanden. Im Knochenmark (Abbildung 4.13 C) dagegen, dem Organ mit der geringsten Anzahl regulatorischer T-Zellen in naivem Zustand (siehe 4.1.2), hatte die Depletion in dieser initialen akuten Infektionsphase keine signifikanten Auswirkungen auf die Anzahl der CD8⁺ GzmB⁺ T-Zellen.

Die Depletion von regulatorischen T-Zellen in der mittleren Phase der akuten Infektion (Tag 4-8) hatte in den Lymphknoten eine vierfache Steigerung der Anzahl CD8⁺ GzmB⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten zur Folge (von etwa 3 000 auf 13 000). In der Milz und im Knochenmark wurde nach der Depletion von regulatorischen T-Zellen in dieser mittleren Phase der akuten Infektion der stärkste Effekt nachgewiesen. In der Milz lagen in diesem Fall im Schnitt etwa Doppelt so viele CD8⁺ GzmB⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten vor, wie nach Depletion in der frühen Infektionsphase (ca. 50 000). Ebenso wie in der Milz wurde im Knochenmark eine Verdopplung der CD8⁺ GzmB⁺ T-Zellen (auf ca. 42 000) nachgewiesen.

Nach Depletion in der späten Phase der akuten Infektion (Tag 8-12) erhöhte sich die Anzahl an CD8⁺ GzmB⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in den Lymphknoten, im Vergleich zu der mittleren Depletionsphase, nochmal um fast das Doppelte (auf etwa 22 000). Im Gegensatz dazu hatte diese späte Depletion keine signifikante Auswirkung auf die Expansion der CD8⁺ GzmB⁺ T-Zellen in der Milz. Hier lagen ähnlich viele dieser Zellen vor, wie in den nicht depletierten Kontrolltieren (etwa 7 000). Im Knochenmark war zwar verglichen mit den nicht depletierten Tieren noch eine signifikant höhere der Anzahl CD8⁺ GzmB⁺ T-Zellen (etwa 33 000) zu finden, diese lag aber unter dem Wert aus der mittleren Depletionsphase.

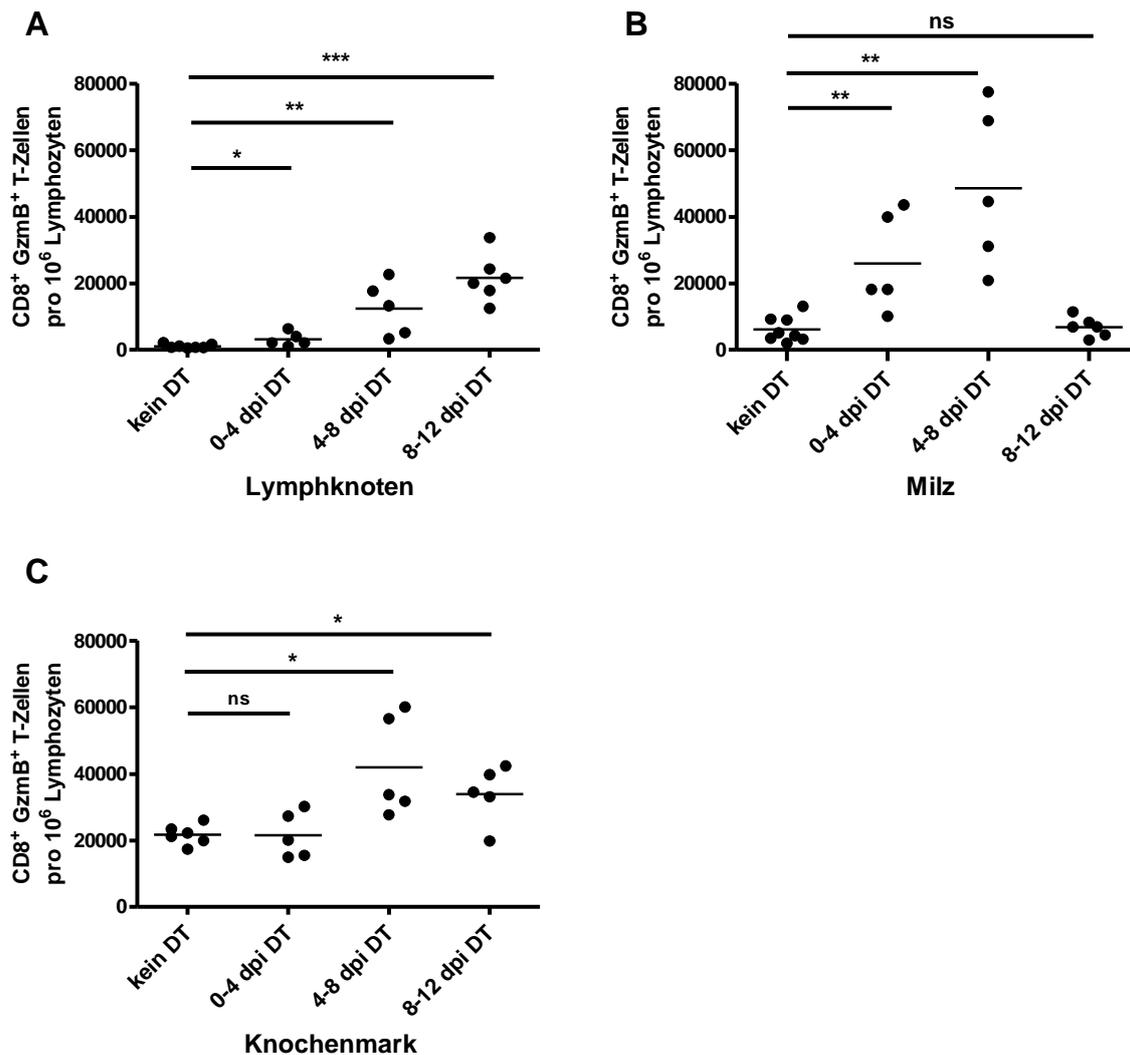


Abbildung 4.13 CD8⁺ Effektorzellantwort in DEREK Mäusen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion

Lymphknoten-(A), Milz-(B) und Knochenmarkszellsuspensionen (C) von 12 Tage infizierten Mäusen, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (Tag 0-4, 4-8 oder 8-12) für regulatorische T-Zellen depletiert wurden, wurden durchflusszytometrisch analysiert. Untersucht wurde die intrazelluläre Expression von GzmB in CD8⁺ T-Zellen. Die absolute Anzahl von GzmB⁺ CD8⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Es wurden zwei unabhängige Experimente mit jeweils 2-3 Tieren pro Gruppe durchgeführt. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Zusammenfassend hatte die Depletion der regulatorischen T-Zellen in der Milz und im Knochenmark in der mittleren Infektionsphase (Tag 4-8) den deutlichsten Effekt auf die CD8⁺ GzmB⁺ T-Zellen. Dies korreliert mit den Befunden, dass die Expansion regulatorischer T-Zellen in der zweiten Infektionswoche beginnt und auch in diesen beiden Organen am stärksten ist (141). Die regulatorische T-Zellantwort kontrolliert

also zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion die Stärke der Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort. Offen bleibt allerdings, warum die späte Depletion keinerlei Einfluss auf die CD8⁺ T-Zellantwort in der Milz hatte, dagegen im Knochenmark und in den Lymphknoten deutliche Effekte nachgewiesen wurden.

4.1.5 Auswirkungen einer temporären Depletion von regulatorischen T-Zellen auf die Pathobiologie FV-infizierter Mäuse

Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle während einer Immunantwort auf Pathogene. Sie haben unter anderem die Aufgabe, die Stärke der Immunantwort dann zu limitieren, wenn die Gefahr einer autoimmunologischen Reaktion besteht, um eine durch eine überschießende Immunantwort verursachte kollaterale Schädigung des Wirtsgewebes zu verhindern. Daher lag die Vermutung nahe, dass eine Depletion von regulatorischen T-Zellen während einer FV-Infektion autoimmunologische Schäden hervorrufen könnte. Wie bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit gezeigt wurde, weisen Mäuse nach Depletion von regulatorischen T-Zellen eine deutliche Hyperplasie der Lymphknoten auf. Dieser Umstand begründete zusätzlich die Vermutung einer negativen Auswirkung der Depletion auf die Pathobiologie der FV-Infektion in der Maus. Um diese wichtige Fragestellung zu beantworten, wurden naive, akut und chronisch infizierte, sowie akut und chronisch infizierte, depletierte Mäuse, wie in 3.13 beschrieben, präpariert und pathophysiologisch untersucht. Die durchgeführten Untersuchungen erbrachten in allen untersuchten Organen keinerlei Hinweise auf eventuelle autoimmunologische Schäden. Die Hyperplasie der Lymphknoten wurde durch einen massiven Influx von B- (Abbildung 4.14 obere Reihe) und T-Zellen (Abbildung 4.14 untere Reihe) in die Lymphknoten verursacht. Die zeitlich begrenzt verstärkte CD8⁺ Effektor T-Zellantwort nach Depletion von regulatorischen T-Zellen hatte demnach keine immunpathologischen Auswirkungen im Verlauf der FV-Infektion.

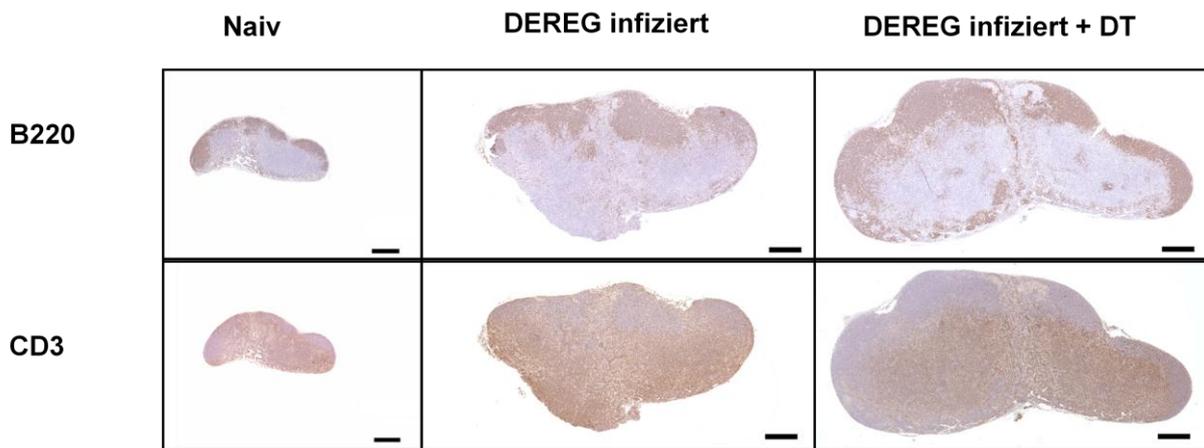


Abbildung 4.14 Histologie von exemplarisch untersuchten Lymphknoten einer naiven, einer 10 Tage infizierten, und einer 10 Tage infizierten Maus nach Depletion von regulatorischen T-Zellen.

Lymphknoten einer naiven, einer infizierten und einer infizierten Maus nach Depletion von regulatorischen T-Zellen wurden in Formalin fixiert. Anschließend folgte eine Einbettung in Paraffin und eine Sektion in Schnitte mit einem Durchmesser von 5 μm . B-Zellen (B220, obere Reihe) und T-Zellen (CD3, untere Reihe) wurden mit den entsprechenden Antikörpern angefärbt und diese Antikörperbindung durch ein Chromogen sichtbar gemacht. Die Einbettung in Paraffin und Herstellung und Färbung der Schnitte wurden durch Mitarbeiter des Instituts für Tierpathologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin durchgeführt. Es ist jeweils eine von 5 analysierten Mäusen pro Gruppe gezeigt. Die Balken in der rechten unteren Bildecke stellen eine Länge von 100 μm dar.

4.2 Chronische Infektion

Die Etablierung chronischer Virusinfektionen, wie z.B. einer HIV- oder HCV-Infektion, wird zwar mit der durch regulatorische T-Zellen vermittelten Suppression der Virus-spezifischen CD8⁺ Effektorzellantwort in Verbindung gebracht, dennoch konnte diese Hypothese experimentell bisher nicht belegt werden. Für die akute FV-Infektion wurde in 4.1 gezeigt, dass regulatorische T-Zellen einen starken Einfluss auf die CD8⁺ Effektorzellantwort hatten und für deren Dysfunktion in der chronischen Infektion verantwortlich waren. Die zeitlich begrenzte Depletion von regulatorischen T-Zellen hatte eine quantitativ und qualitativ gesteigerte Effektorzellantwort und folglich eine signifikant niedrigere Viruslast zur Folge (141). Für die Entwicklung neuer Immuntherapien bei chronischen Virusinfektionen ist es also von größter Wichtigkeit, zu untersuchen, ob eine Manipulation von regulatorischen T-Zellen auch in der chronischen Phase einer Infektion möglich ist und damit die Dysfunktionalität der CD8⁺ Effektorzellen aufgehoben werden kann. Dies könnte zu einer Senkung oder gänzlichen Eliminierung der Viruslast führen. Hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit die Merkmale und der Verlauf der chronischen FV-Infektion in den Lymphknoten, der Milz und dem Knochenmark nach Depletion von regulatorischen T-Zellen analysiert.

4.2.1 Vergleich der Viruslast in der chronischen Infektion nach Inokulation verschiedener Viruspräparationen

Um die chronische FV-Infektion zu untersuchen und den Erfolg von Immuntherapien überprüfen zu können, ist es Voraussetzung, in dieser Phase noch ausreichend viele infizierte Zellen nachweisen zu können. Dazu wurden Mäuse mit 15 000 SFFU der auch in den Experimenten zur akuten Infektion verwendeten FV-Präparation infiziert und die Viruslast in der chronischen Infektion mittels *Infectious Center Assay* analysiert. Nach dieser Infektion lag die Viruslast in den untersuchten Organen zum Zeitpunkt der chronischen Infektion (> 6 Wochen nach Infektion), wie in Abbildung 4.15 gezeigt, bei durchschnittlich 2-5 infizierten Zellen pro 10⁶ Zellen. Damit war die Viruslast für Therapieexperimente nicht ausreichend hoch. Aus der Literatur war bekannt, dass in Mäusen, die mit FV und LDV koinfiziert wurden, die Viruslast in der chronischen Infektion signifikant höher liegt. Dabei induziert LDV alleine keine Expansion von regulatorischen T-Zellen, sondern von B-Zellen, die dem Virus als

zusätzliche Wirtszellen dienen (108). Dadurch wird die Viruslast in den Tieren erhöht, ohne die regulatorische T-Zellantwort zu beeinflussen. Aus diesem Grund wurden Mäuse mit FV und LDV koinfiziert und die Viruslast in der chronischen Phase bestimmt. Wie in Abbildung 4.15 zu sehen ist, führte die Koinfektion mit diesen Viren im Vergleich zu einer Infektion mit dem FV ohne LDV in allen Organen zu einer signifikant höheren FV-Last in der chronischen Infektion. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Experimente in der chronischen Infektion eine FV/LDV Koinfektion durchgeführt.

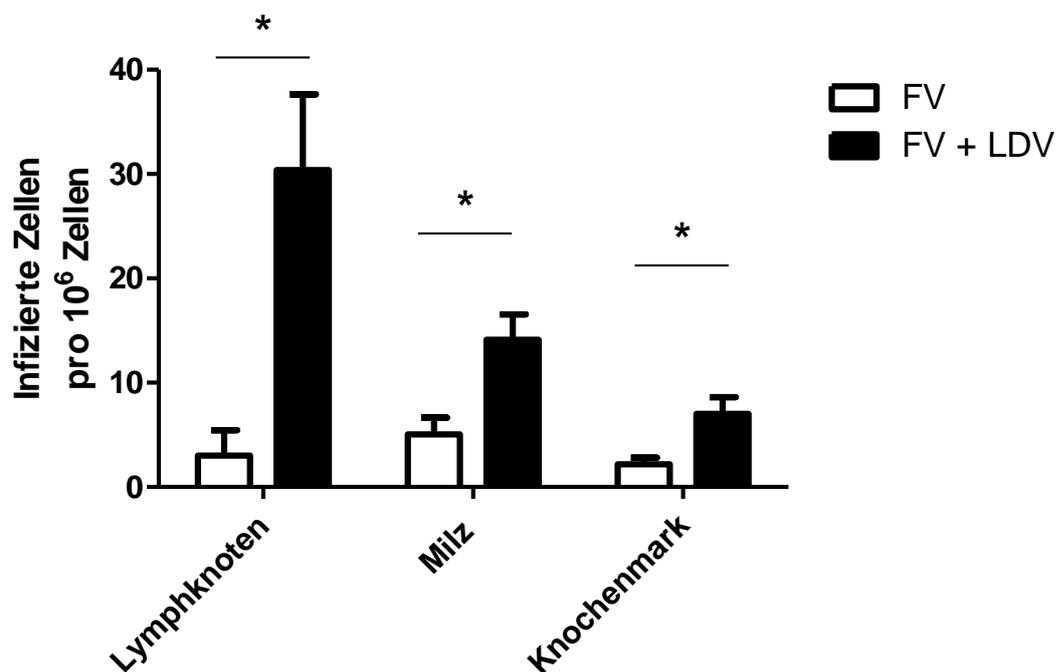


Abbildung 4.15 Vergleich der Viruslast in der chronischen Phase nach Infektion mit FV oder FV+LDV

Mäuse wurden mit FV oder FV+LDV infiziert (siehe 2.10). 60 Tage nach Infektion wurde die Viruslast in den Lymphknoten, der Milz und dem Knochenmark mittels *Infectious Center Assay* analysiert. Die absolute Anzahl von Virus-infizierten Zellen pro 10⁶ Zellen ist dargestellt. Es sind die Mittelwerte von 15-17 Mäusen (FV), bzw. 26-31 Mäusen (FV+LDV) pro Gruppe mit Standardabweichung gezeigt. Die Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

4.2.2 Unterschiede in der Viruslast in verschiedenen Organen FV-infizierter Mäuse

In der akuten Infektion repliziert das meiste Virus im Knochenmark, die Milz liegt im mittleren Bereich und die geringste Viruslast ist in den Lymphknoten zu finden (141).

Dies kann dadurch erklärt werden, dass in der akuten Infektion hauptsächlich erythropoetische Vorläuferzellen infiziert werden, die wiederum überwiegend im Knochenmark und der Milz vorkommen. Zu einem geringeren Prozentsatz werden in dieser Phase Dendritische Zellen, Monozyten und B-Zellen infiziert (108). Nach Analyse der Viruslast in den drei untersuchten Organen mittels *Infectious Center Assays* zeigte sich ein anderes Bild als in der akuten Infektion. In der chronischen Infektion trugen nun die Lymphknoten, wie in Abbildung 4.16 dargestellt, die Hauptviruslast. Hier wurden im Schnitt etwa 30 infizierte Zellen pro 10^6 Zellen nachgewiesen. Die zweithöchste Viruslast wurde mit durchschnittlich 15 infizierten Zellen pro 10^6 Zellen in der Milz festgestellt. Im Knochenmark fanden sich in der chronischen Infektion im Mittel nur etwa 7 infizierte Zellen pro 10^6 Zellen. Auf Grund der niedrigen Viruslast im Knochenmark wurden für die weiteren Analysen nur die Lymphknoten und die Milz verwendet. Die im Gegensatz zur akuten Infektion unterschiedliche Verteilung des Virus in der chronischen Infektion ist durch die Tatsache erklärbar, dass das FV hauptsächlich in B-Zellen persistiert (53), welche zu einem großen Anteil in den Lymphknoten zu finden sind und nur sehr wenige dieser Zellen im Knochenmark vorkommen.

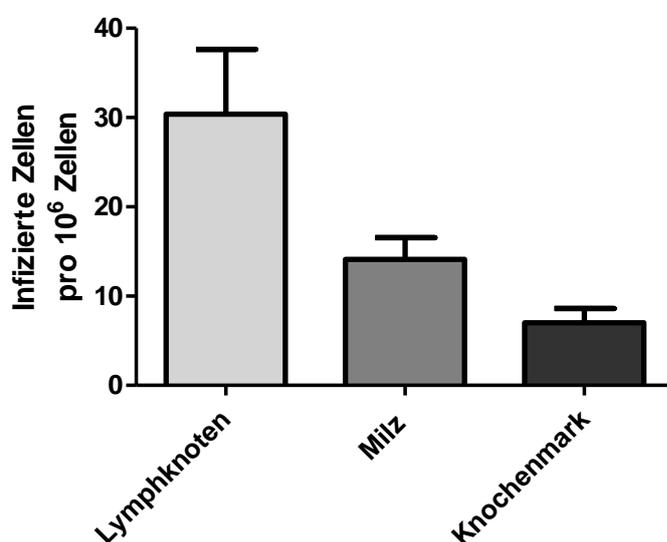


Abbildung 4.16 Viruslast in verschiedenen Lymphatischen Organen während der chronischen Infektion

Mäuse wurden dem FV+LDV Stock infiziert (siehe 2.10). 60 Tage nach Infektion wurde die Viruslast in den Lymphknoten, der Milz und dem Knochenmark mittels *Infectious Center Assay* analysiert. Die absolute Anzahl von Virus-infizierten Zellen pro 10^6 Zellen ist dargestellt. Es sind die Mittelwerte von 26-31 Mäusen pro Gruppe mit Standardabweichung gezeigt.

4.2.3 Depletion von regulatorischen T-Zellen in der chronischen FV-Infektion

Für die akute FV-Infektion wurde in 4.1 gezeigt, dass regulatorische T-Zellen einen starken Einfluss auf die CD8⁺ Effektorzellantwort hatten und für deren Dysfunktion gegen Ende der akuten Infektion verantwortlich waren. Die zeitlich begrenzte Depletion von regulatorischen T-Zellen während der akuten Infektion verursachte folgerichtig eine Expansion und verbesserte Funktion von CD8⁺ Effektorzellen. Aus diesem Grund sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit überprüft werden, ob eine Depletion von regulatorischen T-Zellen auch während der chronischen FV-Infektion einen positiven Effekt auf die Funktionalität von CD8⁺ Effektorzellen haben und deren Dysfunktionalität möglicherweise aufgehoben werden kann. Zu diesem Zweck wurden DEREK Mäuse mit FV+LDV infiziert. 60 Tage später wurden die Mäuse wie in Abbildung 4.17 gezeigt, mit DT behandelt, um die regulatorischen T-Zellen in dieser Phase der Infektion zu depletieren.

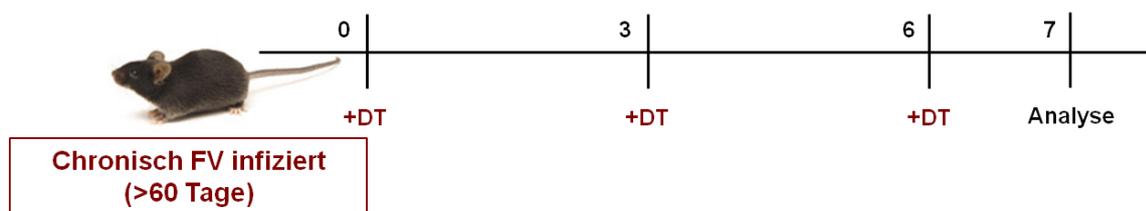


Abbildung 4.17 Versuchsschema zur Depletion von regulatorischen T-Zellen während der chronischen Infektion

Für die Depletion der regulatorischen T-Zellen in chronisch infizierten DEREK Mäusen wurde den Tieren dreimal im Abstand von 3 Tagen DT i.p. injiziert. Die Analysen der Viruslast und den verschiedenen Zellsuspensionen wurden, wenn nicht anders erwähnt, jeweils an Tag 7 nach der ersten DT Injektion durchgeführt.

Nach drei DT-Injektionen im Abstand von jeweils 3 Tagen wurden die Mäuse an Tag 7 nach der ersten Injektion getötet und die im Folgenden beschriebenen Analysen von Milz- und Lymphknotenzellen durchgeführt. Um die Effizienz der Depletion zu bestätigen, wurden Kontrollfärbungen angefertigt. Abbildung 4.18 zeigt repräsentative Dot Plots dieser Kontrollfärbungen. In den Lymphknoten der undepletierten chronisch infizierten DEREK Maus (Abbildung 4.18 linker Dot Plot) betrug der prozentuale Anteil an GFP⁺ CD4⁺ regulatorischen T-Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten 14,2%. Nach entsprechender Behandlung mit DT wies die chronisch infizierte DEREK Maus (Abbildung 4.18) nur noch einen Anteil von 0,5% GFP⁺ CD4⁺ regulatorischen T-Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten auf.

Die regulatorischen T-Zellen wurden also durch die DT-Behandlung in den Lymphknoten zu etwa 97% depletiert. In der Milz wurden die regulatorischen T-Zellen durch die Behandlung ebenso effizient depletiert (Daten nicht gezeigt).

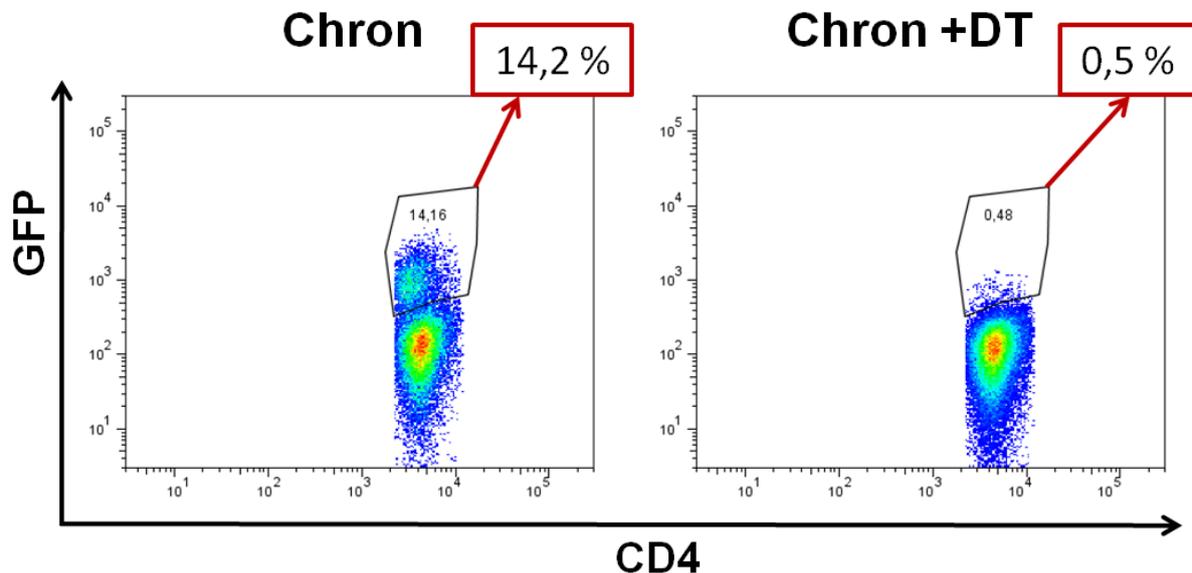


Abbildung 4.18 Depletion regulatorischer T-Zellen in chronische infizierten DEREK Mäusen

Lymphknotenzellsuspensionen von chronisch infizierten, nicht depletierten DEREK Mäusen (links) und nach Depletion von regulatorischen T-Zellen (rechts) wurden durchflusszytometrisch auf die Anwesenheit von CD4⁺ GFP⁺ regulatorischen T-Zellen untersucht. Die Depletion erfolgte wie in Abbildung 4.17 beschrieben. Die Zahlen in den roten Kästen stellen den prozentualen Anteil an CD4⁺ GFP⁺ regulatorische T-Zellen dar. Es sind repräsentative Dot Plots für alle Depletionsexperimente in der chronischen Infektion gezeigt.

4.2.3.1 Effekte der Depletion regulatorischer T-Zellen auf die Expansion von CD8⁺ Effektorzellen in der chronischen FV-Infektion

Um die Effekte der Abwesenheit regulatorischer T-Zellen im Verlauf der chronischen FV-Infektion zu bestimmen, wurden DEREK Mäuse infiziert und, wie in 4.2.3 beschrieben, depletiert. Wie in 4.1.1 gezeigt, sind die CD8⁺ Effektorzellen in der chronischen Phase der FV-Infektion weitestgehend dysfunktional. Um die Auswirkungen der Depletion auf diese dysfunktionalen CD8⁺ Effektorzellen zu untersuchen, wurden die chronisch infizierten Tiere an Tag 7 nach der ersten DT Injektion getötet und die Anzahl an aktivierten CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen durchflusszytometrisch bestimmt. In Abbildung 4.19 sind die Ergebnisse dieser Analyse gezeigt. Sowohl in den Lymphknoten als auch in der Milz chronisch

infizierter Tiere lag eine signifikant erhöhte Anzahl an CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen pro 10⁶ Lymphozyten im Vergleich zu den naiven Tieren vor.

In den Lymphknoten wurden nach Depletion von regulatorischen T-Zellen mehr als doppelt so viele CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen pro 10⁶ Lymphozyten (28 000) nachgewiesen, als in den nicht depletierten Tieren (12 000) . Ähnliches war in der Milz zu beobachten. Ebenso wie in den Lymphknoten stieg die Anzahl an CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen pro 10⁶ Lymphozyten nach Depletion regulatorischer T-Zellen im Vergleich zu den nicht depletierten Tieren um mehr als das Doppelte an (von etwa 14 000 auf 32 000) an. Insofern hatte die Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen in beiden untersuchten Organen, einen positiven Einfluss auf die Expansion von CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen.

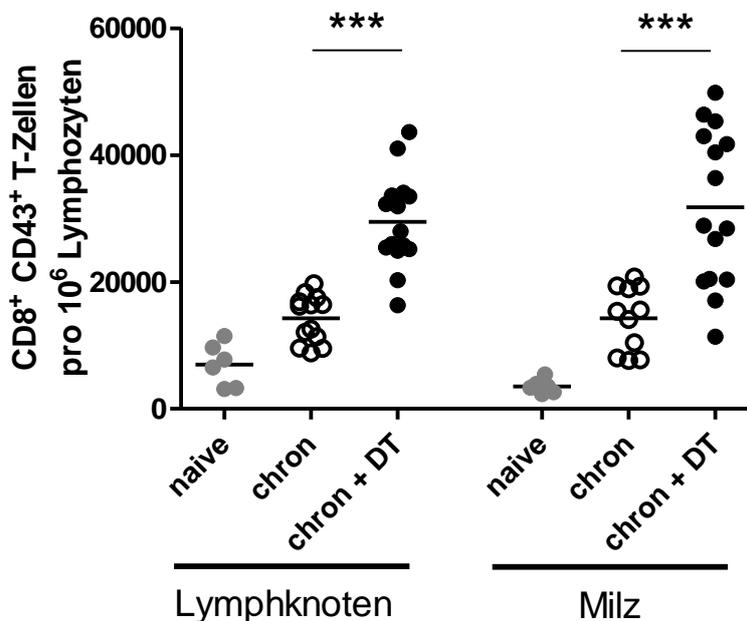


Abbildung 4.19 Anzahl CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen in der chronischen FV-Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen

Lymphknoten- und Milzzellsuspensionen von naiven Mäusen, chronisch infizierten Mäusen und chronisch infizierten Mäusen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen wurden durchflusszytometrisch durch Anfärben der aktivierungsinduzierten CD43 Isoform auf die Anzahl aktivierter CD8⁺ T-Zellen untersucht. Die absolute Anzahl von CD8⁺ CD43⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Fünf unabhängige Experimente mit jeweils 1-4 Mäusen pro Gruppe wurden durchgeführt. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Um festzustellen, inwiefern es sich bei den expandierenden Effektorzellen um Virus-spezifische Zellen handelte, wurden über Tetramerfärbungen, wie in 3.8.7 beschrieben, die FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen quantifiziert. Wie in Abbildung 4.20 gezeigt, wurden in den Lymphknoten chronisch infizierter Mäuse durchschnittlich etwa 650 Virus-spezifische CD8⁺ CD43⁺ Tetramer⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten nachgewiesen. Diese Anzahl erhöhte sich nach Depletion von regulatorischen T-Zellen auf mehr als das Doppelte (1 500). Auch in der Milz wurde ein Anstieg der Anzahl an Virus-spezifischen CD8⁺ CD43⁺ Tetramer⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten nach Depletion detektiert (von ca. 3 000 auf ca. 7 000), was ebenso wie in den Lymphknoten einen Anstieg auf mehr als das Doppelte darstellte. Ebenso wie für die Gesamtpopulation der CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen zeigte sich also auch für die Virus-spezifischen CD8⁺ CD43⁺ Tetramer⁺ T-Zellen eine positive Auswirkung der Depletion von regulatorischen T-Zellen auf die Expansion dieser Zellen.

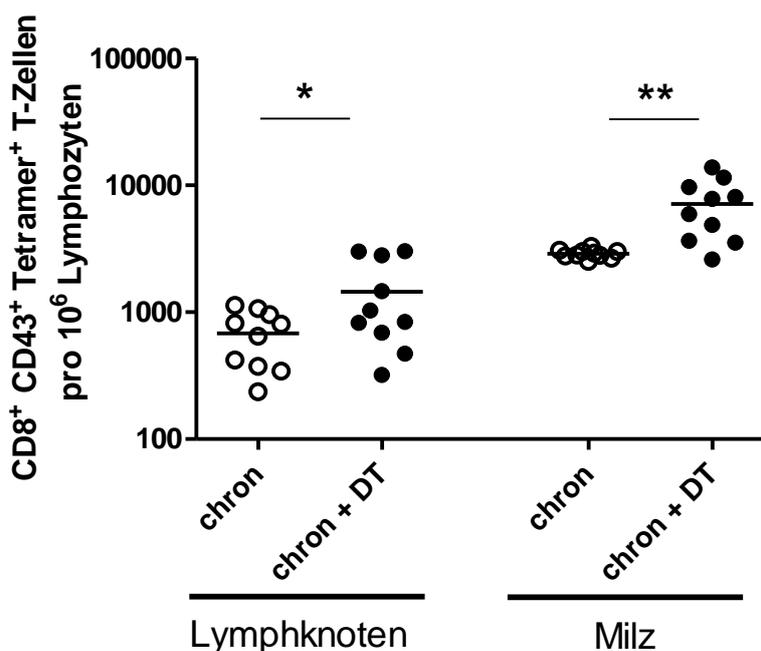


Abbildung 4.20 Anzahl FV-spezifischer CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen in der chronischen Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen

Lymphknoten- und Milzzellsuspensionen von chronisch infizierten Mäusen und chronisch infizierten Mäusen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen wurden durchflusszytometrisch auf die Anzahl FV-spezifischer (positiv für Tetramer I), aktivierter (positiv für die aktivierungsinduzierte Isoform von CD43) CD8⁺ T-Zellen untersucht. Die absolute Anzahl von CD8⁺ CD43⁺ Tetramer I⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Drei unabhängige Experimente mit jeweils 2-4 Mäusen pro Gruppe wurden durchgeführt. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

4.2.3.2 Proliferation von CD8⁺ Effektorzellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen während der chronischen FV-Infektion

Nachdem nachgewiesen wurde, dass die Depletion von regulatorischen T-Zellen in chronisch infizierten Mäusen eine Expansion von CD8⁺ Effektorzellen verursachte, stellte sich im Folgenden die Frage, ob diese Expansion auf eine gesteigerte Proliferation dieser Zellen zurückzuführen war. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurden die Proliferationsrate der CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen und die der Virus-spezifischen CD8⁺ Tetramer⁺ T-Zellen in den drei untersuchten Organen analysiert. Dazu wurden chronisch infizierte Tiere mit und ohne Depletion von regulatorischen T-Zellen, wie in Abbildung 4.21 beschrieben, drei Tage vor der Analyse mit einer BrdU-Lösung getränkt. Anschließend wurde die BrdU-Inkorporation in CD8⁺ T-Zellen im Durchflusszytometer untersucht.

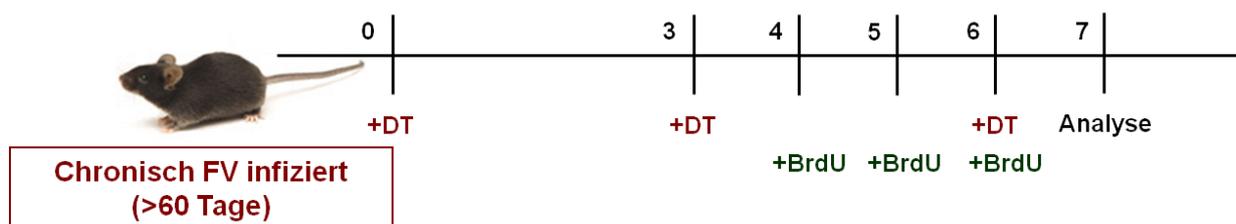


Abbildung 4.21 Versuchsschema zur Depletion von regulatorischen T-Zellen in der chronischen Infektion bei gleichzeitiger Behandlung mit BrdU

Für die Depletion der regulatorischen T-Zellen in chronisch infizierten DEREK Mäusen wurde den Tieren dreimal mit jeweils 2 Tagen Abstand DT i.p. injiziert. Das Tränken der Tiere mit der BrdU-Lösung erfolgte an Tag 4, 5 und 6 nach der ersten DT Injektion. Die Untersuchung der Zellsuspensionen von Milz und Lymphknoten erfolgte an Tag 7 nach der ersten Injektion.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind Abbildung 4.22 gezeigt. Wie in den repräsentativen Dot Plots von Milzzellen (Abbildung 4.22 A) zu sehen ist, verursachte die Depletion von regulatorischen T-Zellen in chronisch infizierten Mäusen eine signifikant gesteigerte Proliferation von CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen und FV-spezifischen CD8⁺ Tetramer⁺ T-Zellen. Bei den CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen (Abbildung 4.22 A, obere Reihe) stieg der Anteil an proliferierenden Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten von 5,2% im chronischen Tier um das etwa Vierfache auf 20,7% im depletierten Tier an. Eine Erhöhung des Anteils proliferierender Zellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen um fast das Fünffache wurde bei den Virus-spezifischen CD8⁺ Tetramer⁺ T-Zellen nachgewiesen (von 1% der

Gesamtlymphozyten auf 4,7% nach Depletion). Diese Ergebnisse wurden durch statistische Auswertungen der Daten für absolute Zellzahlen von 7 Tieren pro Gruppe bestätigt (Abbildung 4.22 B). Eine signifikant verstärkte Proliferation von CD8⁺ Tetramer⁺ T-Zellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen wurde sowohl in der Milz als auch in den Lymphknoten nachgewiesen. Diese Resultate zeigen, dass die in 4.2.3.1 gezeigte Expansion sowohl der CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen, als auch der FV-spezifischen CD8⁺ Tetramer⁺ T-Zellen zumindest teilweise auf eine signifikant gesteigerte Proliferationsrate dieser beiden Zelltypen zurückzuführen war.

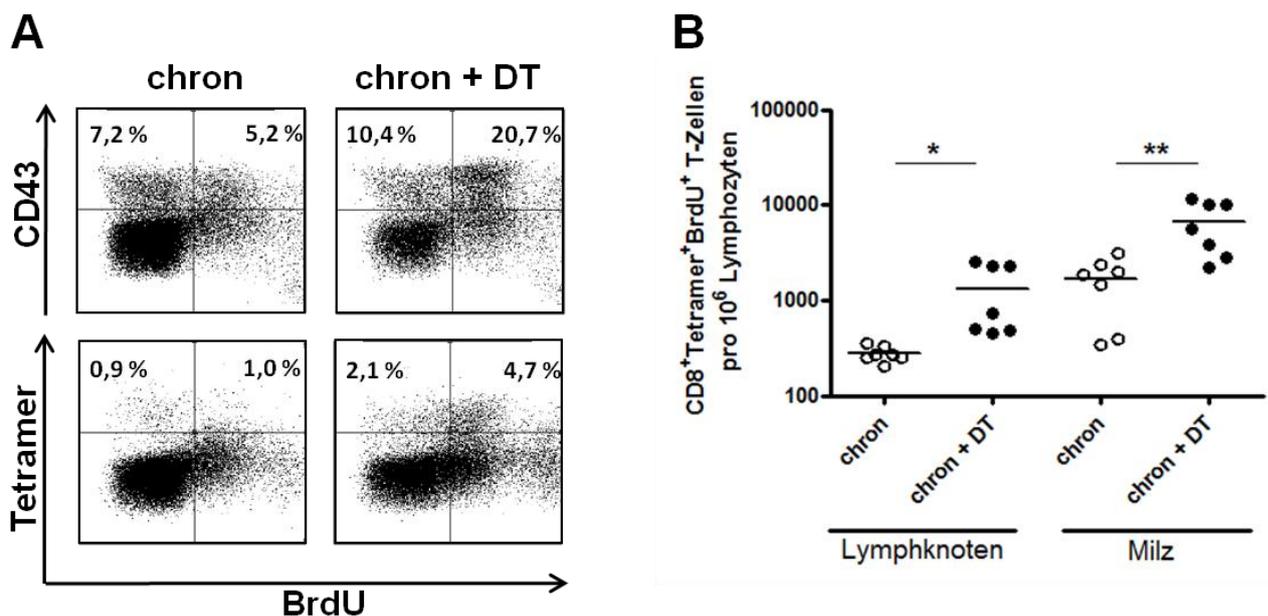


Abbildung 4.22 Proliferation von Effektorzellen und FV-spezifischen Effektorzellen in der chronischen Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen

Chronisch infizierte Mäuse und chronisch infizierte Mäuse nach Depletion von regulatorischen T-Zellen wurden, wie in Abbildung 4.21 beschrieben mit BrdU behandelt. Die Zellsuspensionen von Lymphknoten und Milz der so behandelten Tiere wurden durchflusszytometrisch auf proliferierende (BrdU⁺) aktivierte (CD43⁺) und FV-spezifische (Tetramer I⁺) CD8⁺ T-Zellen hin untersucht. Es sind repräsentative Dot Plots für die jeweiligen Gruppen dargestellt (A). Die Zahlen im linken oberen Quadranten stellen den prozentualen Anteil der CD8⁺ T-Zellen dar, die negativ für BrdU waren und positiv für den Aktivierungsmarker CD43 oder Tetramer I. Der prozentuale Anteil der CD8⁺ T-Zellen, die doppelt positiv für BrdU und CD43 oder Tetramer I waren, ist im rechten oberen Quadranten angegeben. (B) zeigt die statistische Analyse der proliferierenden, FV-spezifischen T-Zellen (CD8⁺ Tetramer I⁺ BrdU⁺). Die absolute Anzahl von CD8⁺ Tetramer I⁺ BrdU⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Analysiert wurden 7 Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten, der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

4.2.3.3 Verbesserte Funktionalität von CD8⁺ Effektorzellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen in chronisch infizierten Mäusen

In 4.1 wurde gezeigt, dass regulatorische T-Zellen einen signifikanten Einfluss auf die CD8⁺ Effektorzellantwort hatten und deren Dysfunktion zu Beginn der chronischen Infektion vermittelten. In der akuten Infektion hatte die zeitlich begrenzte Depletion von regulatorischen T-Zellen eine Expansion und verbesserte Funktion von CD8⁺ Effektorzellen zur Folge. Nachdem in dieser Arbeit schon nachgewiesen wurde, dass die Depletion regulatorischer T-Zellen in der chronischen Infektion, ähnlich wie in der akuten Phase, eine gesteigerte Expansion von CD8⁺ Effektorzellen zur Folge hatte (siehe 4.2.3.1 und 4.2.3.2), sollte im Folgenden untersucht werden, ob diese Depletion auch die funktionellen Eigenschaften der CD8⁺ Effektorzellen beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde die Expression von zytotoxischen Molekülen und Zytokinen analysiert. Zu Beginn wurde die Produktion der Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 in Effektor CD8⁺ T-Zellen von chronisch infizierten Mäusen und chronisch infizierten Mäusen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen untersucht. Abbildung 4.23 zeigt, dass die Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen in der chronischen Infektion einen signifikant erhöhten Anteil an Zytokin-produzierenden CD8⁺ T-Zellen zur Folge hatte. Im Falle der IFN- γ produzierenden CD8⁺ Effektorzellen (Abbildung 4.23 A) erhöhte sich deren Anzahl in den Lymphknoten verglichen mit nicht depletierten Tieren in den depletierten Tieren um mehr als das Vierfache (von etwa 2 000 auf 9 000 CD8⁺ CD43⁺ IFN- γ ⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten). Ein ebenfalls fast vierfacher Anstieg der Anzahl dieser Zellen war in der Milz zu finden (von etwa 3 000 auf ca. 11 000). Ähnliches galt für TNF- α (Abbildung 4.23 B). In den Lymphknoten erhöhte sich die Anzahl CD8⁺ CD43⁺ TNF- α ⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in den depletierten Tieren verglichen mit den nicht depletierten ebenfalls um das etwa Vierfache (von ca. 2 000 auf ca. 8 500). In der Milz wurde, verglichen mit den nicht depletierten Tieren ein etwa dreifacher Anstieg der Anzahl CD8⁺ CD43⁺ TNF- α ⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in den chronisch infizierten, depletierten Tieren nachgewiesen (von ca. 2 000 auf ca. 6 000). Auch im Fall von IL-2 wurden ähnliche Ergebnisse gefunden (Abbildung 4.23 C). Hier erhöhte sich die Anzahl CD8⁺ CD43⁺ IL-2⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in den Lymphknoten der depletierten Tiere, verglichen mit den nicht depletierten Tieren, um das etwa Dreifache (von ca. 1 800 auf 5 500). In der Milz fand sich ebenfalls eine größere Anzahl dieser Zellen. Diese stieg in den chronisch infizierten, depletierten

ebenfalls um das etwa Dreifache an (von ca. 1 000 $CD8^+ CD43^+ IL-2^+$ T-Zellen pro 10^6 Lymphozyten auf ca. 3 500). Demzufolge induzierte die Depletion regulatorischer T-Zellen, ebenso wie in der akuten Infektion, auch in der chronischen Phase eine Expansion von Zytokin-produzierenden $CD8^+$ Effektorzellen.

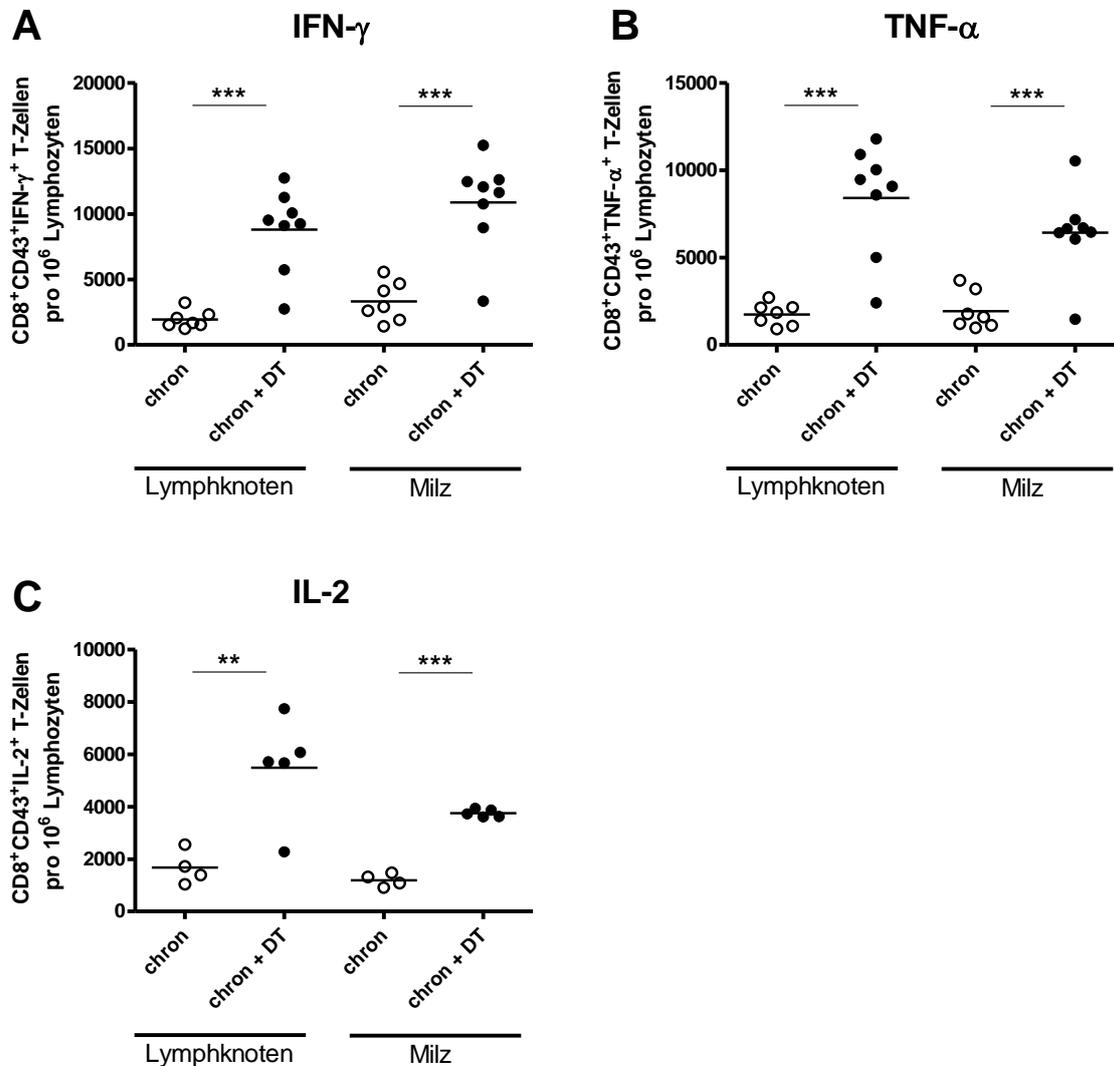


Abbildung 4.23 Produktion verschiedener Zytokine in $CD8^+$ T-Zellen von chronisch infizierten Mäusen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen

Die Zellsuspensionen von Lymphknoten und Milz chronisch infizierter Mäuse und chronisch infizierter Mäuse nach Depletion von regulatorischen T-Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Untersucht wurde die intrazelluläre Expression von IFN- γ (A), TNF- α (B) und IL-2 (C) in aktivierten T-Zellen ($CD8^+ CD43^+$). Die absolute Anzahl von $CD8^+ CD43^+ IFN-\gamma^+$ (bzw. $TNF-\alpha^+$ oder $IL-2^+$) T-Zellen pro 10^6 Lymphozyten ist dargestellt. Analysiert wurden 4-8 Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten, der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Aus der HIV Forschung ist bekannt, dass CD8⁺ T-Zellen, die gleichzeitig mehrere Zytokine produzieren, besonders antiviral aktiv sind. So werden sie auch mit einer verzögerten Progression von AIDS in Verbindung gebracht (12). Aus diesem Grund wurden die chronisch FV-infizierten und chronisch infizierten, depletierten Tiere auf das Vorhandensein von mehrfach-Zytokin-produzierenden CD8⁺ T-Zellen in den Lymphknoten untersucht (Abbildung 4.24). Hierfür wurde, wie schon in Abbildung 4.23, die Expression von IFN- γ , TNF- α und IL-2 in aktivierten CD8⁺ CD43⁺ T-Zellen auf Einzelzellniveau detektiert und im Folgenden entsprechend ausgewertet. In chronischen Tieren beträgt der Anteil der CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen, die keine Zytokine produzieren im Schnitt etwa 72%. Im Gegensatz dazu verringerte sich dieser Anteil in den depletierten Tieren um etwa ein Viertel auf durchschnittlich 55%. Der Anteil der CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen, die mindestens eines der erwähnten Zytokine produzieren lag im Falle der chronisch infizierten Tieren im Mittel bei 18%, stieg aber in den depletierten Tieren auf durchschnittlich 21% an. Zweifach Zytokin-produzierende CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen machten in chronisch infizierten Tieren im Schnitt etwa 8% der Effektorzellen aus, bei den depletierten Tieren stieg dieser Anteil um fast das Doppelte auf ca. 15%. Die stärkste Steigerung des Anteils Zytokin-produzierender Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen wurde aber bei den Dreifach-Zytokinproduzenten nachgewiesen. In diesem Fall stieg deren Anteil an der Gesamtzahl der Effektorzellen um mehr als das Vierfache von im Schnitt 2% in den chronischen Tieren auf durchschnittlich 9% in den chronisch infizierten und depletierten Tieren an. Folglich induzierte die Depletion regulatorischer T-Zellen in der chronischen Infektion nicht nur, wie in Abbildung 4.23 gezeigt, eine Expansion von Zytokin-produzierenden CD8⁺ Effektorzellen insgesamt, sondern auch eine deutliche Zunahme des Anteils an multifunktionellen CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen, die mehr als ein Zytokin gleichzeitig produzieren.

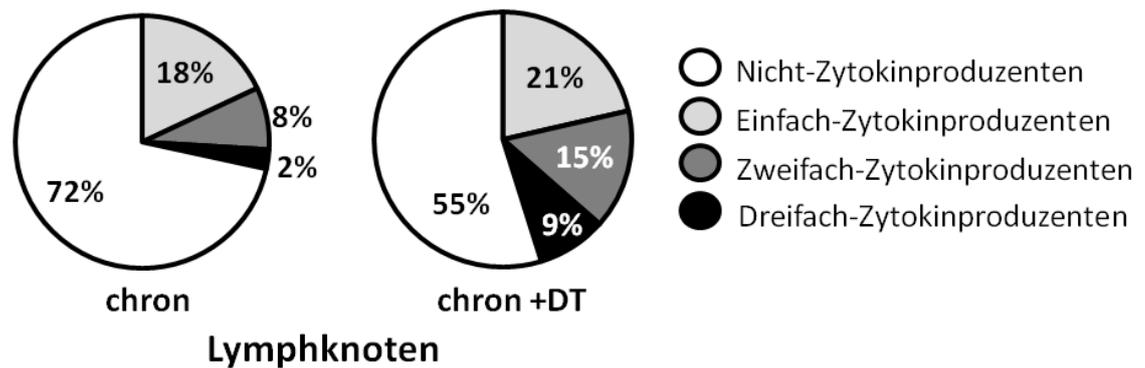


Abbildung 4.24 Prozentualer Anteil verschiedener zytokinproduzierender CD8⁺ T-Zellen in der chronischen Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen

Die Zellsuspensionen von Lymphknoten chronisch infizierter Mäuse und chronisch infizierter Mäuse nach Depletion von regulatorischen T-Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Untersucht wurde die intrazelluläre Expression von IFN- γ , TNF- α und IL-2 in aktivierten T-Zellen (CD8⁺ CD43⁺). Gezeigt ist der durchschnittliche prozentuale Anteil von nicht-, einfach-, zweifach- und dreifach-Zytokin-produzierender CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen in der chronisch infizierten (links) und der chronisch infizierten, depletierten Gruppe (rechts). Analysiert wurden 6-8 Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten.

Es ist bekannt, dass CD8⁺ T-Zellen in der chronischen FV-Infektion in ihrer zytotoxischen Aktivität stark eingeschränkt sind (143). Daher sollten die zytotoxischen Eigenschaften von CD8⁺ Effektorzellen während der chronischen Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen untersucht werden. Zum Einen sollte die Expression von GzmB analysiert werden, einem zytotoxischen Molekül, was nicht nur in der FV-Infektion eine entscheidende Rolle spielt (140), sondern auch im Falle einer HIV-Infektion (82). Außerdem sollte Expression des Degranulationsmarkers CD107a, ein Maßstab für die zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen bestimmt werden. In Abbildung 4.25 A ist die Anzahl GzmB produzierender CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen gezeigt. Dabei zeigte sich in den Lymphknoten der depletierten Tiere im Vergleich zu den nicht Depletierten eine fast fünffache Steigerung der Anzahl dieser Zellen (von ca. 950 auf ca. 4 500). In der Milz stieg diese Anzahl in den depletierten Tieren ebenfalls um mehr als das Fünffache an (von ca. 1 500 auf ca. 8 000).

Um zu festzustellen, ob diese durch die Abwesenheit regulatorischer T-Zellen verursachte Expansion GzmB-produzierender Zellen auch bei FV-spezifischen CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen zu finden war, wurde eine Tetramerfärbung durchgeführt. Abbildung 4.25 B zeigt, dass auch die Anzahl der FV-spezifischen GzmB⁺ CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen signifikant erhöht

war. Für die Lymphknoten wurde eine Verdoppelung der Anzahl $CD8^+$ Tetramer⁺ GzmB⁺ T-Zellen von durchschnittlich 200 Zellen pro 10^6 Lymphozyten in den chronisch infizierten Tieren auf ca. 450 in den depletierten Tieren nachgewiesen. Ebenso wie in den Lymphknoten erhöhte sich auch die Anzahl der $CD8^+$ Tetramer⁺ GzmB⁺ T-Zellen pro 10^6 Lymphozyten in der Milz von chronischen, depletierten Tieren auf das etwa Doppelte (von ca. 900 auf ca. 2 000). Wie also bereits für die Zytokinproduktion gezeigt, hatte die Depletion regulatorischer T-Zellen auch eine positive Auswirkung auf die Produktion zytotoxischer Moleküle von $CD8^+$ Effektorzellen in chronisch infizierten Mäusen.

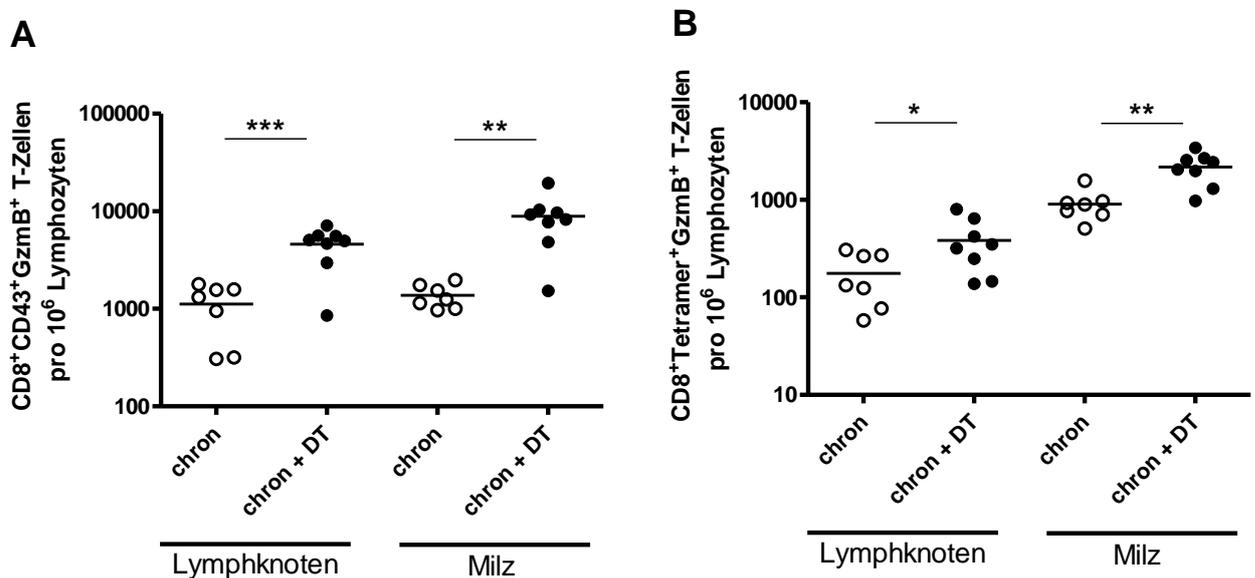


Abbildung 4.25 Anzahl GzmB-produzierender Effektorzellen in der chronischen Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen

Lymphknoten- und Milzzellsuspensionen von chronisch infizierten Mäusen und chronisch infizierten Mäusen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Untersucht wurde die intrazelluläre Expression von GzmB in **(A)** aktivierten ($CD43^+$) $CD8^+$ T-Zellen und in **(B)** Virus-spezifischen (Tetramer I⁺) $CD8^+$ T-Zellen. Die absolute Anzahl von GzmB⁺ $CD43^+$ $CD8^+$ T-Zellen, bzw. GzmB⁺ Tetramer I⁺ $CD8^+$ T-Zellen pro 10^6 Lymphozyten ist dargestellt. Es wurden zwei unabhängige Experimente mit jeweils 3-4 Tieren pro Gruppe durchgeführt. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Wie bereits beschrieben, beinhaltet also der durch die Depletion gestiegene Anteil an Effektorzellen mehr Zytokin-produzierende Zellen und mehr Gzm-produzierende

Zellen. Um zu verifizieren, dass die Gzm-produzierenden CD8⁺ Effektorzellen wirklich in der Lage sind zu degranulieren, wurden die Zellen auf die Expression des Markers CD107a überprüft. CD107a-Moleküle gelangen durch den Degranulationsvorgang zytotoxischer Granula auf die Zelloberfläche von Effektorzellen und zeigen damit die zytotoxische Aktivität dieser Zellen an (3). Wie in Abbildung 4.26 gezeigt, wurden in den Lymphknoten chronisch infizierter Tiere durchschnittlich etwa 2 000 CD8⁺ CD43⁺ CD107a⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten nachgewiesen. Im Vergleich dazu erhöhte sich diese Anzahl nach Depletion von regulatorischen T-Zellen um mehr als das Doppelte (auf ca. 4 500). Auch in der Milz erhöhte sich die Anzahl an CD8⁺ CD43⁺ CD107a⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in den depletierten Tieren, verglichen mit den nicht Depletierten, um mehr als das Doppelte (von ca. 2 500 auf ca. 6 500). Diese Ergebnisse korrelieren mit der vorher gezeigten Zytokin- und GzmB-Produktion der CD8⁺ T-Zellen in den beiden Organen. Die Depletion der regulatorischen T-Zellen führte demzufolge zu einer signifikant erhöhten Anzahl FV-spezifischer Effektorzellen in chronisch infizierten Mäusen. Innerhalb dieser Population wurde eine signifikant erhöhte Anzahl an Zytokin- und GzmB-produzierenden Zellen und ebenfalls eine erhöhte Anzahl degranulierender Effektorzellen nachgewiesen, was auf eine verbesserte Zytotoxizität der CD8⁺ Effektorzellen schließen ließ.

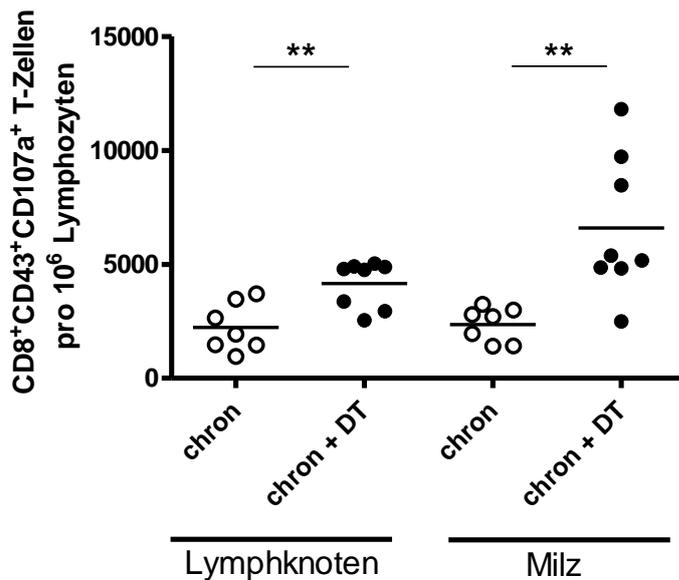


Abbildung 4.26 Anzahl degranulierender CD8⁺ Effektorzellen in der chronischen Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen

Lymphknoten- und Milzzellsuspensionen von chronisch infizierten Mäusen und chronisch infizierten Mäusen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Untersucht wurde die Expression des Degranulationsmarkers CD107a auf aktivierten (CD43⁺) CD8⁺ T-Zellen. Die absolute Anzahl von CD8⁺ CD43⁺ CD107a⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten ist dargestellt. Es wurden zwei unabhängige Experimente mit jeweils 3-4 Tieren pro Gruppe durchgeführt. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Die gezeigten Daten belegen eine signifikante Erhöhung der Anzahl an FV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit antiviralem Potential nach Depletion von regulatorischen T-Zellen in chronisch infizierten Mäusen.

Ein *in vivo* CTL Test, wie in 3.11 beschrieben, sollte nun zeigen, ob dies auch mit einer verbesserten zytotoxischen Aktivität gegen FV-infizierte Zellen *in vivo* assoziiert war. Dazu wurden unbeladene und mit FV-spezifischen Peptiden beladene Zellen in chronisch infizierte Mäuse und chronisch infizierte Mäuse nach Depletion von regulatorischen T-Zellen injiziert. Zwei Stunden später wurden die Tiere getötet und deren Blut, Lymphknoten und Milz auf die Elimination der markierten Zielzellen hin durchflusszytometrisch analysiert. In Abbildung 4.27 sind zwei für alle Experimente repräsentative Histogramme von Milzzellen einer chronisch infizierten Maus und einer chronisch infizierten Maus nach Depletion von regulatorischen T-Zellen gezeigt. Die jeweils linken Populationen im Histogramm stellen die Anzahl der unbeladenen Donorzellen (Kontrollen) dar, die rechten Populationen die Anzahl der mit dem FV-

spezifischen Peptid beladenen Donorzellen. Deutlich zu erkennen ist die effiziente Elimination von Peptid-beladenen Zielzellen in den Mäusen, in denen die regulatorischen T-Zellen depletiert wurden.

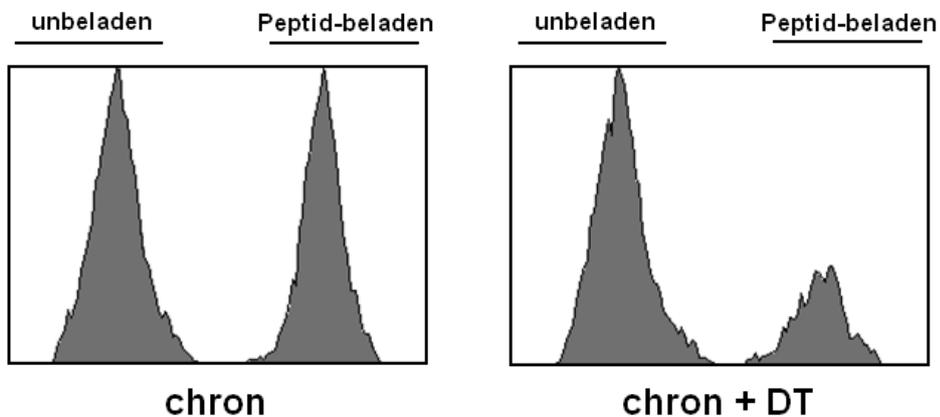


Abbildung 4.27 Elimination von Peptid-beladenen Zielzellen in der chronischen Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen

Milz- und Lymphknotenzellsuspensionen von naiven Mäusen wurden mit dem FV-spezifischen DbGagL-Peptid beladen und mit CFSE markiert. Diese Zellen wurden in chronisch FV-infizierte Mäuse und chronisch infizierte, depletierte Mäuse injiziert (i.v.). Als Kontrolle wurden unbeladene Zellen mit einer geringeren Konzentration an CFSE markiert und zusammen mit den beladenen Zellen in die Mäuse injiziert. Zwei Stunden nach dem Transfer wurden die Donorzellen im Blut, in den Lymphknoten und in der Milz der Empfängertiere durchflusszytometrisch analysiert. Repräsentativ für alle untersuchten Organe sind Histogramme von Milzzellen einer chronisch infizierten und einer chronisch infizierten Maus nach Depletion von regulatorischen T-Zellen dargestellt.

Die Eliminationsraten von Zielzellen wurden in den untersuchten Organen durchflusszytometrisch quantifiziert und, wie in 3.11 beschrieben, berechnet. Wie in Abbildung 4.28 A gezeigt, betrug der Anteil an eliminierten Zielzellen im Blut der chronischen Tiere durchschnittlich 6%. Nach Depletion von regulatorischen T-Zellen erhöhte sich dieser Anteil um fast das Doppelte auf ca. 11%. In den Lymphknoten chronisch infizierter Tiere wurde eine Elimination der Zielzellen von ca. 3% festgestellt (Abbildung 4.28 B). Dieser Anteil an eliminierten Zielzellen erhöhte sich bei Abwesenheit regulatorischer T-Zellen um das Sechsfache auf 18%. In der Milz wurde ebenfalls eine sechsfache Steigerung des Anteils an eliminierten Zielzellen nach Depletion ermittelt. Hier erhöhte sich dieser Anteil in depletierten Tieren, verglichen mit nicht Depletierten, von 6% auf im Schnitt 35%. Diese Resultate korrelieren mit den auf Zellzahlbestimmungen basierenden Daten (siehe Abbildung 4.23 bis Abbildung 4.26). Nach Depletion von regulatorischen T-Zellen während der chronischen Infektion wurde demnach eine erhöhte Anzahl Virus-spezifischer

Effektorzellen nachgewiesen, und innerhalb dieser Population eine erhöhte Anzahl an Effektorzellen, die zytotoxische Moleküle und Zytokine produzierten und effektiv degranulierten. Dies ließ auf eine verbesserte zytotoxische Aktivität der CD8⁺ Effektorzellen schließen, was direkt *in vivo* bestätigt werden konnte. Vermutlich verursachte also die Aufhebung der durch regulatorische T-Zellen vermittelten Suppression von CD8⁺ Effektorzellen in der chronischen Infektionsphase eine Reaktivierung der vorher dysfunktionalen Zellen.

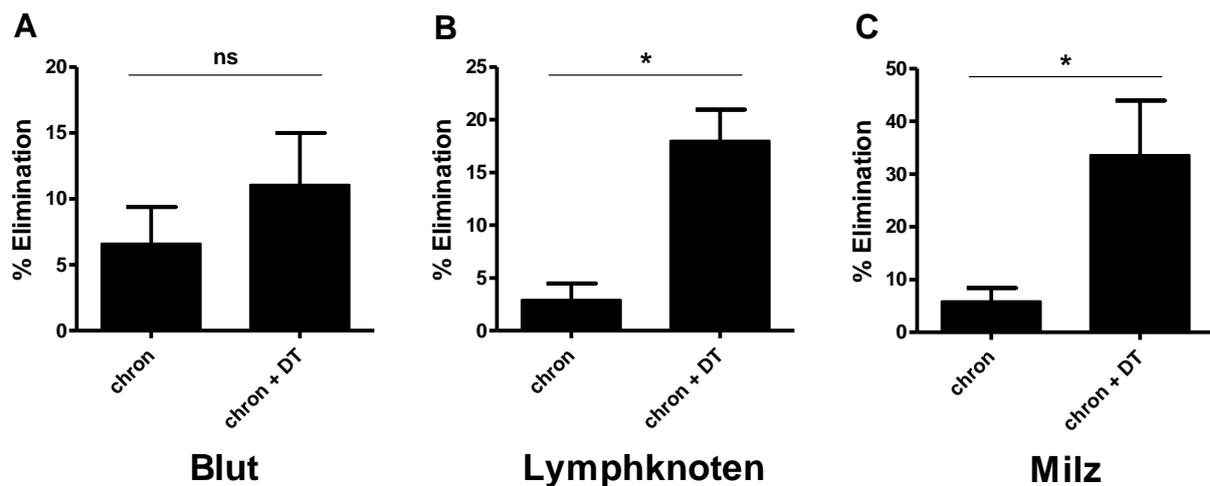


Abbildung 4.28 Elimination von Peptid-beladenen Zielzellen in verschiedenen Organen chronisch infizierter Mäuse nach Depletion von regulatorischen T-Zellen

Milz- und Lymphknotenzellsuspensionen von naiven Mäusen wurden mit dem FV-spezifischen DbGagL-Peptid beladen und mit CFSE markiert. Diese Zellen wurden in chronisch FV-infizierte Mäuse und chronisch infizierte, depletierte Mäuse injiziert (i.v.). Als Kontrolle wurden unbeladene Milzzellen mit einer geringeren Konzentration an CFSE markiert und zusammen mit den beladenen Zellen in die Mäuse injiziert. Zwei Stunden nach dem Transfer wurden die Donorzellen im Blut, in den Lymphknoten und in der Milz der Empfängertiere durchflusszytometrisch analysiert. Es ist der prozentuale Anteil an Zielzell-spezifischer Elimination in den untersuchten Organen und dem Blut gezeigt. Es sind die Mittelwerte von 4-5 Mäusen pro Gruppe mit Standardabweichung gezeigt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

4.2.4 Effekte der Depletion regulatorischer T-Zellen auf die Viruslast in der chronischen FV-Infektion

Die Depletion der regulatorischen T-Zellen während der chronischen Phase der FV-Infektion in der Maus führte sowohl in den Lymphknoten als auch in der Milz zu einer erhöhten Anzahl an CD8⁺ Effektorzellen. Diese Effektorzellen besaßen eine

signifikant verbesserte zytotoxische Aktivität, was in 4.2.3.3 auch *in vivo* gezeigt werden konnte. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob die Depletion der regulatorischen T-Zellen während der chronischen FV-Infektion die Viruslast senken kann, also einen therapeutischen Effekt vermittelt. Daher wurde die Viruslast in verschiedenen Organen chronisch infizierter und chronisch infizierter, depletierter Mäuse mittels *Infectious Center Assay* bestimmt. Zusätzlich zu einer Analyse der Viruslast in Mäusen unmittelbar nach Depletion (Tag 7 nach der ersten DT Injektion) wurde eine Gruppe von Mäusen erst mehrere Wochen (6, 7 und 8 Wochen) nach der Depletion getötet und deren Viruslast analysiert. Auf diese Weise sollte untersucht werden, wie sich die Viruslast verhält, nachdem eine Rekonstitution der regulatorischen T-Zellpopulation nach einer Depletion stattgefunden hatte.

Die Viruslast war unmittelbar nach Depletion der regulatorischen T-Zellen sowohl in den Lymphknoten, als auch in der Milz signifikant geringer als in nicht depletierten Tieren, wie in Abbildung 4.29 zu sehen ist. In den Lymphknoten wurden in chronisch infizierten Tieren durchschnittlich etwa 30 infizierte Zellen pro 10^6 Zellen nachgewiesen. Unmittelbar nach Depletion der regulatorischen T-Zellen, also an Tag 7 nach der ersten DT Injektion (wie in Abbildung 4.17 gezeigt), sank diese Anzahl um das fast Fünffache auf durchschnittlich 7 infizierte Zellen pro 10^6 Zellen. Auch in den Milzen wurde eine signifikante Reduzierung der Viruslast unmittelbar nach Depletion festgestellt. In den chronisch infizierten, depletierten Tieren sank die Viruslast im Vergleich zu den nicht depletierten Tieren um zwei Drittel von etwa 15 infizierten Zellen pro 10^6 Zellen auf im Schnitt ca. 5.

Mehr als 6 Wochen nach der ersten Injektion von DT wiesen die Lymphknoten im Schnitt noch 6 infizierte Zellen pro 10^6 Zellen auf, was keine signifikante Veränderung verglichen mit den unmittelbar nach Depletion untersuchten Tieren darstellt. Wie schon in den Lymphknoten lag auch in der Milz keine Veränderung dieses Wertes in den erst 6 Wochen nach Depletion untersuchten Tieren vor. Wie in den unmittelbar nach Depletion analysierten Tieren, wurden in diesen Tieren durchschnittlich noch 5 infizierte Zellen pro 10^6 Zellen nachgewiesen.

Die Viruslast blieb also auch nach der vermuteten Rekonstitution der vorher depletierten regulatorischen T-Zellen auf einem gleichbleibend niedrigen Niveau. Dies zeigt, dass eine Depletion von regulatorischen T-Zellen nicht nur eine kurzfristige, sondern offenbar eine langfristige Reduktion der Viruslast in chronisch infizierten Tieren zur Folge hatte.

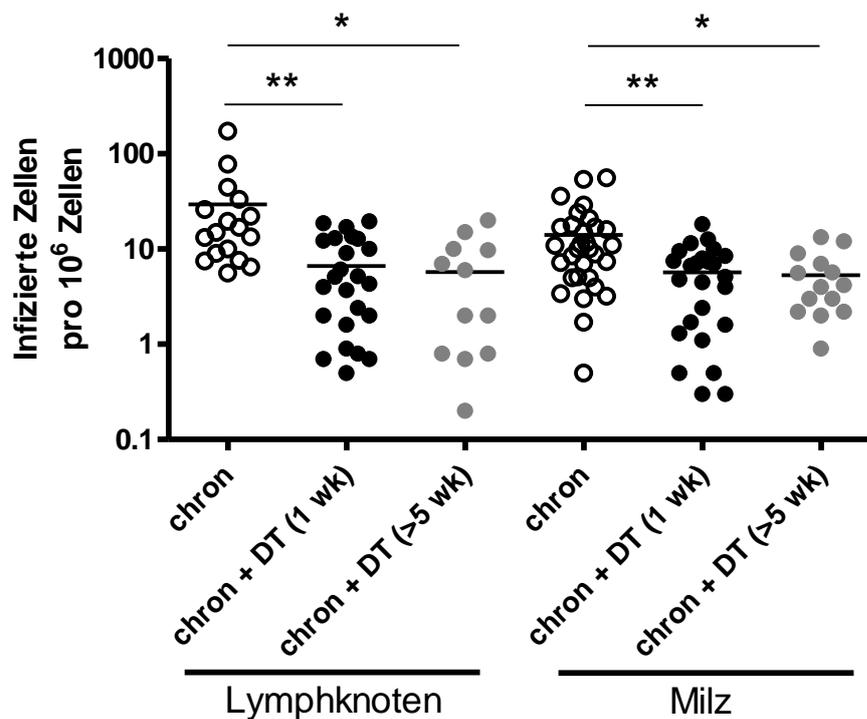


Abbildung 4.29 Viruslast in der chronischen Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen

Lymphknoten- und Milzzellsuspensionen chronisch infizierter Mäuse, chronisch infizierter Mäuse unmittelbar nach Depletion und 5 Wochen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen wurden mittels *Infectious Center Assay* auf die Viruslast hin analysiert. Die absolute Anzahl von Virus-infizierten Zellen pro 10⁶ Zellen ist dargestellt. Es sind die Mittelwerte von 12-26 Mäusen pro Gruppe gezeigt. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „*student t Test*“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

Aufgrund dieser Resultate sollte überprüft werden, ob die dauerhaft niedrigere Viruslast in den depletierten Tieren eventuell dadurch verursacht wird, dass die regulatorischen T-Zellen in der chronischen Infektion nach Depletion längerfristig abwesend sind. Zu diesem Zweck wurde die Anzahl an CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen pro 10⁶ Lymphozyten in beiden Organen in der chronischen Infektion und 5 Wochen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Diese Analyse ist in Abbildung 4.30 dargestellt. Die Lymphknoten der nach 5 Wochen untersuchten Mäuse wiesen zu diesem Zeitpunkt wieder etwa 75% der zum chronischen Zeitpunkt vorliegenden regulatorischen T-Zellen auf, in der Milz waren etwa 90% dieser Population wieder vorhanden. Demzufolge hatte die Gegenwart von regulatorischen T-Zellen zum Zeitpunkt 5 Wochen nach Depletion keinerlei Auswirkungen auf die nach Depletion reduzierte Viruslast.

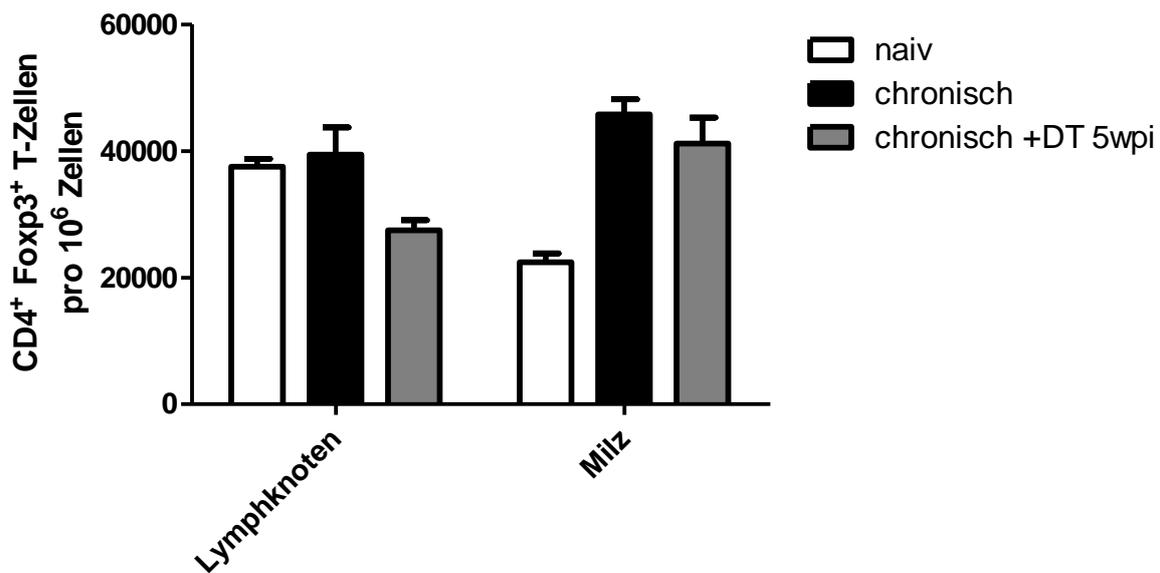


Abbildung 4.30 Anzahl regulatorischer T-Zellen in chronisch infizierten Tieren 5 Wochen nach Depletion

Lymphknoten- und Milzellsuspensionen chronisch infizierter Mäuse und chronisch infizierter Mäuse 5 Wochen nach Depletion (*weeks post injection, wpi*) von regulatorischen T-Zellen wurden durchflusszytometrisch auf die Anzahl von CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen untersucht. Die absolute Anzahl von CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen pro 10⁶ Zellen ist dargestellt. Es sind die Mittelwerte von 3-9 Mäusen pro Gruppe mit Standardabweichung gezeigt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die dauerhaft reduzierte Viruslast nach einmaliger Depletion eventuell auf eine dauerhaft reaktivierte Effektorzellantwort zurückzuführen sein könnte. Wie aus der Literatur bekannt (143), sind die CD8⁺ Effektorzellen in der Phase der chronischen Infektion dysfunktional. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Funktionsverlust von CD8⁺ Effektorzellen zwischen der zweiten und dritten Woche der Infektion, also nach Expansion von regulatorischen T-Zellen, beginnt. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass der Funktionsverlust von CD8⁺ Effektorzellen, der durch Depletion von regulatorischen T-Zellen in der chronischen Infektion aufgehoben wurde (siehe 4.2.3.3), spätestens nach Wiedererscheinen der regulatorischen T-Zellen erneut auftreten sollte. Dies war, wie in Abbildung 4.30 gezeigt, spätestens 5 Wochen nach Depletion der Fall. Daher wurde die Funktion von CD8⁺ Effektorzellen 5 Wochen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen analysiert. Als Marker für aktivierte CD8⁺ Effektorzellen wurde in diesem Fall die Expression von CD43 und als funktioneller Marker die intrazelluläre Expression des Zytokins IFN- γ verwendet. Abbildung 4.31 zeigt

repräsentative Dot Plots von Lymphknotenzellen einer chronisch infizierten Maus unmittelbar nach Depletion und einer chronisch infizierten Maus 5 Wochen nach Depletion. Wie zu erkennen ist, war der erwartete Funktionsverlust der CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen 5 Wochen nach Depletion tatsächlich wieder vorhanden. Im linken Dot Plot ist zu erkennen, dass der Anteil an aktivierten (CD43⁺) CD8⁺ Effektorzellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen bei einer chronisch infizierten Maus unmittelbar nach Depletion etwa 16% betrug. Der Anteil der CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen, die IFN- γ produzierten lag in diesem Fall bei ca. 4%. Im Gegensatz dazu betrug der Anteil an CD8⁺ CD43⁺ Effektorzellen an den gesamten CD8⁺ T-Zellen im chronisch infizierten Tier 5 Wochen nach Depletion nur noch etwa 7%. Auch lag der Anteil der aktivierten T-Zellen, die IFN- γ produzierten, hier nur noch bei 0,6%, was den Funktionsverlust deutlich dokumentiert. Es ist also eindeutig zu erkennen, dass der erwartete Funktionsverlust der CD8⁺ Effektorzellen 5 Wochen nach Depletion erneut vorlag. Dies bedeutet, dass die dauerhaft gesenkte Viruslast in diesen Tieren nicht durch das Vorhandensein dauerhaft reaktivierter CD8⁺ Effektorzellen erklärt werden kann.

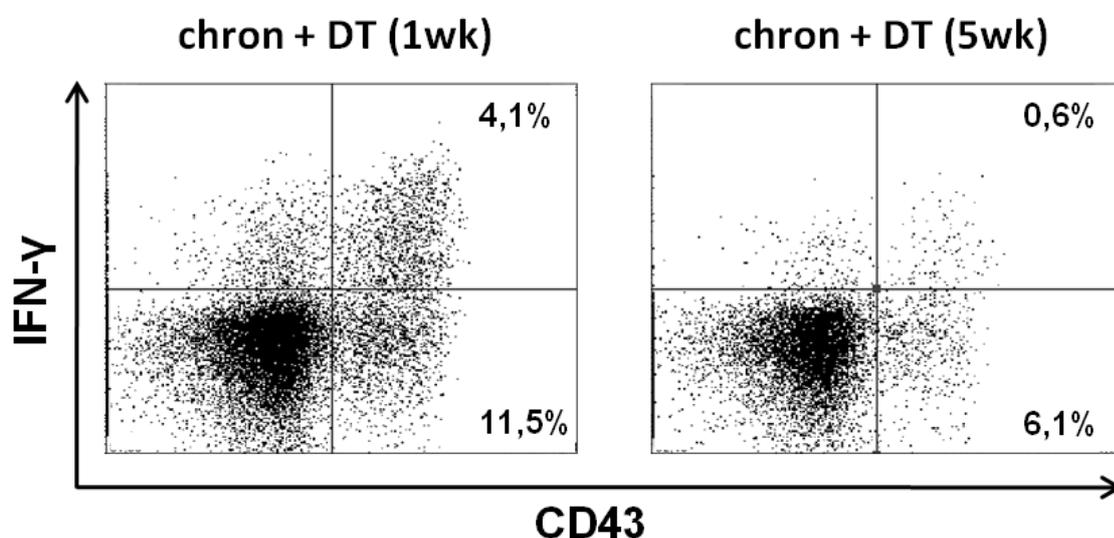


Abbildung 4.31 Funktion von CD8⁺ Effektorzellen in chronisch infizierten Mäusen unmittelbar nach Depletion von regulatorischen T-Zellen und 5 Wochen danach

Lymphknoten- und Milzzellsuspensionen chronisch infizierter Mäuse und chronisch infizierter Mäuse 5 Wochen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen wurden durchflusszytometrisch auf die Anzahl von IFN- γ produzierenden CD8⁺ CD43⁺ Effektor T-Zellen hin untersucht. Repräsentativ für beide Organe sind Dot Plots von Lymphknotenzellsuspensionen beider Gruppen dargestellt. Die Zahlen im rechten unteren Quadranten stellen den prozentualen Anteil an CD8⁺ T-Zellen dar, die positiv für den Aktivierungsmarker CD43, aber negativ für IFN- γ waren. Der prozentuale Anteil an CD8⁺ T-Zellen, die positiv für CD43 waren und gleichzeitig IFN- γ produziert haben, sind im rechten oberen Quadranten angegeben. Analysiert wurden 4-7 Tiere pro Gruppe in zwei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 4.29 zu sehen ist, hatte die einmalige Depletion von regulatorischen T-Zellen in der chronischen Phase der FV-Infektion eine reduzierte Viruslast zur Folge. Da es auch einige Wochen nach der Depletion nicht wieder zu einer Steigerung der Viruslast kam, konnte diese Reduktion als anhaltend bezeichnet werden. Diese Resultate warfen die Frage auf, ob durch mehrere Depletionen nacheinander die Viruslast noch stärker gesenkt oder das Virus sogar vollständig beseitigt werden könne. Aus diesem Grund wurde die Viruslast von drei Gruppen von Mäusen mit verschiedenen Depletionsschemata miteinander verglichen. Wie in Abbildung 4.32 gezeigt ist, wurde eine Gruppe nur einmal depletiert (drei Injektionen DT im Abstand von 2 Tagen), eine zweite Gruppe wurde einer zweiten Depletion regulatorischer T-Zellen im Abstand von 2 Wochen unterzogen. Die dritte Gruppe wurde dreimal mit je drei Injektionen DT im Abstand von jeweils 2 Wochen behandelt. Die Analyse der Viruslast erfolgte für die erste Gruppe an Tag 7, für die zweite Gruppe an Tag 28 und für die dritte Gruppe an Tag 49 nach der ersten DT Injektion mittels *Infectious Center Assay*.

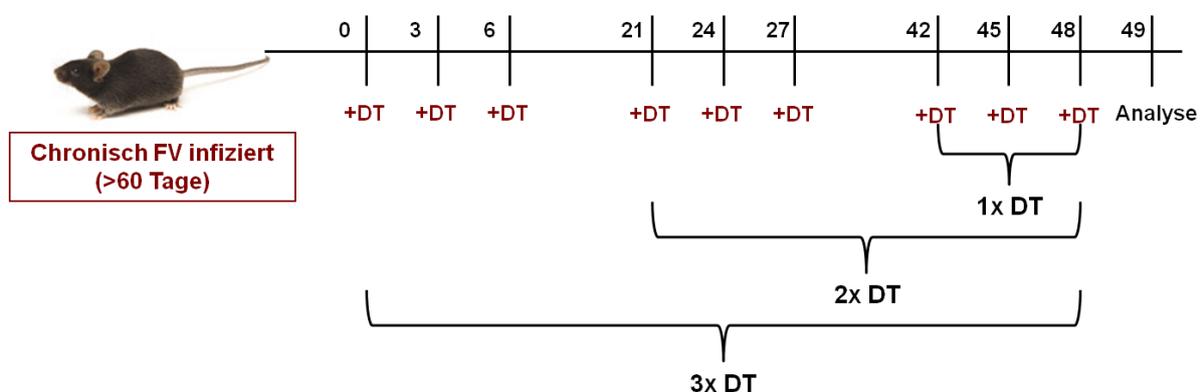


Abbildung 4.32 Versuchsschema zur Mehrfachdepletion von regulatorischen T-Zellen in der chronischen Infektion

Für die Depletion der regulatorischen T-Zellen in chronisch infizierten DEREK Mäusen wurde den Tieren dreimal mit jeweils 2 Tagen Abstand DT i.p. injiziert (einmalige Depletion). Für die zwei-, bzw. dreimalige Depletion wurde dieses Protokoll mit einem Abstand von 14 Tagen ein-, bzw. zweimal wiederholt. Die Analyse der Viruslast wurde an Tag 7 (einmalige Depletion), Tag 28 (zweimalige Depletion), bzw. Tag 49 (dreimalige Depletion) nach der ersten DT Injektion durchgeführt.

Die Resultate dieses Versuches sind in Abbildung 4.33 dargestellt. In den Lymphknoten chronisch infizierter Tiere lag die Viruslast durchschnittlich etwa bei 30 infizierten Zellen pro 10^6 Zellen. Nach einmaliger Depletion sank dieser Wert, wie

oben schon gezeigt, auf im Schnitt etwa 7 infizierte Zellen pro 10^6 Zellen. Nach zweimaliger Depletion lag die Anzahl an infizierten Zellen pro 10^6 Zellen bei etwa 10, was gegenüber den einmalig depletierten Tieren keine signifikante Veränderung darstellt. Ebenso verhält es sich für die Gruppe der dreimal depletierten Tiere. Hier wurden im Schnitt ca. 5 infizierte Zellen pro 10^6 Zellen nachgewiesen, was gegenüber der Gruppe von Mäusen mit einmaliger Depletion keine signifikante Verbesserung ausmacht. Für die Milz zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier lag die Viruslast in chronisch infizierten Tieren im Schnitt bei 15 infizierten Zellen pro 10^6 Zellen, nach einmaliger Depletion sank dieser Wert auf durchschnittlich ca. 5. Sowohl nach zweimaliger, als auch nach dreimaliger Depletion wurde auch in der Milz keine signifikante Veränderung im Vergleich zu den einmal depletierten Tieren nachgewiesen. In beiden Fällen lag die Viruslast bei durchschnittlich etwa 6 infizierten Zellen pro 10^6 Zellen. Dieser Versuch zeigt also erneut, dass eine Depletion von regulatorischen T-Zellen die Viruslast gegenüber nicht depletierten Tieren signifikant reduziert, eine mehrmalige Depletion allerdings keine weiteren Auswirkungen auf die Höhe der Viruslast chronisch infizierter Tiere hat.

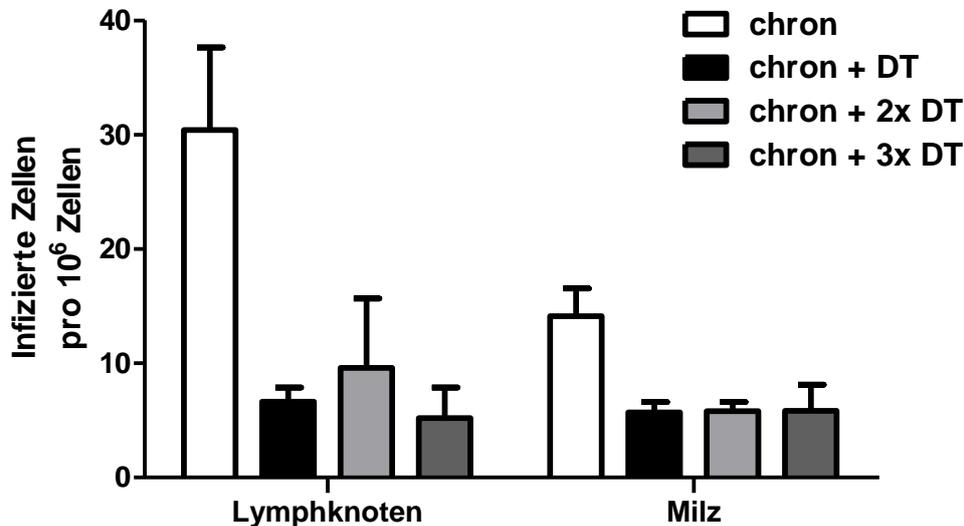


Abbildung 4.33 Auswirkung einer mehrfachen Depletion von regulatorischen T-Zellen auf die Viruslast in der chronischen Infektion

Lymphknoten- und Milzzellsuspensionen chronisch infizierter Mäuse und chronisch infizierter Mäuse nach ein-, zwei-, bzw. dreimaliger Depletion von regulatorischen T-Zellen (siehe Abbildung 4.32) wurden mittels *Infectious Center Assay* auf die Viruslast hin analysiert. Die absolute Anzahl von Virusinfizierten Zellen pro 10^6 Zellen ist dargestellt. Es sind die Mittelwerte von 5-31 Mäusen pro Gruppe mit Standardabweichung gezeigt.

4.2.5 CD8⁺ T-Zellen sind für die reduzierte Viruslast nach Depletion von regulatorischen T-Zellen in der chronischen Infektion verantwortlich

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bisher gezeigt, dass eine Depletion der regulatorischen T-Zellen während der chronischen Phase der FV-Infektion zu einer erhöhten Anzahl an CD8⁺ Effektorzellen führte. Zusätzlich besaßen diese Effektorzellen eine signifikant verbesserte zytotoxische Aktivität (siehe in 4.2.3.3). Im Anschluss daran wurde gezeigt, dass die Depletion der regulatorischen T-Zellen in der chronischen FV-Infektion die Viruslast signifikant reduzierte. Abschließend sollte nachgewiesen werden, dass die CD8⁺ Effektorzellen tatsächlich für die Reduktion der Viruslast nach Depletion von regulatorischen T-Zellen verantwortlich sind. Hierzu wurden, wie in Abbildung 4.34 gezeigt, in chronisch infizierten Mäusen, gleichzeitig mit der Depletion von regulatorischen T-Zellen auch CD8⁺ T-Zellen depletiert. Wie in 3.9 beschrieben, ließen sich durch die viermalige Injektion des CD8⁺-spezifischen monoklonalen Antikörpers etwa 97% der CD8⁺ T-Zellen depletieren. Die Analyse der Viruslast erfolgte mittels *Infectious Center Assay*.

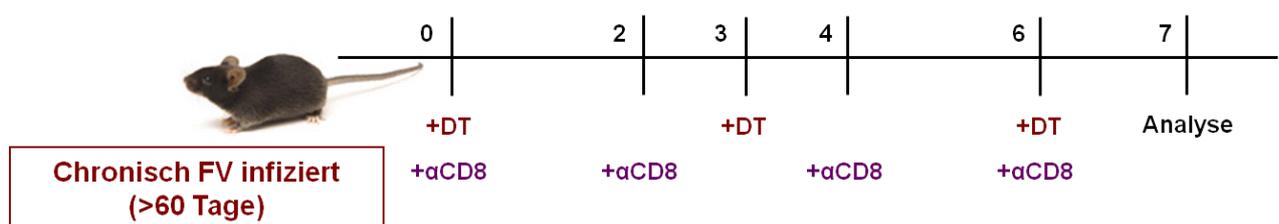


Abbildung 4.34 Versuchsschema zur Depletion von regulatorischen T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen in der chronischen Infektion

Für die Depletion der regulatorischen T-Zellen in chronisch infizierten DEREK Mäusen wurde den Tieren dreimal mit jeweils 2 Tagen Abstand DT i.p. injiziert. Die Depletion von CD8⁺ T-Zellen wurde durch vier Injektionen des Zell-spezifischen monoklonalen Antikörpers gegen CD8, beginnend mit dem Tag der ersten DT Injektion, durchgeführt. Die Analyse der Viruslast wurde an Tag 7 nach der ersten Injektion durchgeführt.

Die Resultate dieses Versuchs sind in Abbildung 4.35 gezeigt. Repräsentativ für beide Organe ist hier eine Analyse der Milz dargestellt. In den chronisch infizierten Tieren lag die mittlere Viruslast bei ca. 16 infizierten Zellen pro 10⁶ Zellen. In der Kontrollgruppe für die CD8⁺ Depletion, in denen ausschließlich die CD8⁺ T-Zellen depletiert wurden, lagen im Schnitt etwa 17 infizierte Zellen pro 10⁶ Zellen vor. Dies stellt keine signifikante Veränderung verglichen mit der Gruppe der chronisch infizierten, unbehandelten Tiere dar. Dies bestätigt, dass CD8⁺ T-Zellen für die

Kontrolle der chronischen Infektion keine entscheidende Rolle spielen (53). Nach Depletion von regulatorischen T-Zellen reduzierte sich die chronische Viruslast, wie bereits gezeigt, um ca. zwei Drittel auf durchschnittlich ca. 5 infizierte Zellen pro 10^6 Zellen. In der Gruppe der Tiere, in denen sowohl regulatorische T-Zellen als auch $CD8^+$ T-Zellen depletiert wurden, lag die Viruslast dagegen bei durchschnittlich ca. 21 infizierten Zellen pro 10^6 Zellen. Dies stellt im Vergleich zu den unbehandelten Tieren keine signifikante Veränderung dar und zeigt, dass ohne $CD8^+$ T-Zellen kein therapeutischer Effekt erzielt werden konnte. Dies beweist, dass $CD8^+$ T-Zellen tatsächlich für die reduzierte Viruslast in chronisch infizierten Mäusen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen verantwortlich waren.

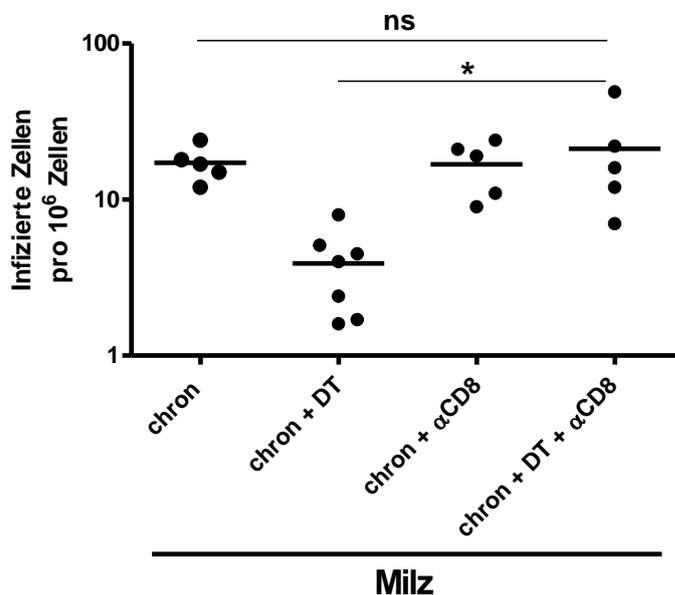


Abbildung 4.35 Viruslast nach Depletion von regulatorischen T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen in der chronischen Infektion

Milzellsuspensionen chronisch infizierter Mäuse, chronisch infizierter Mäuse nach Depletion von regulatorischen T-Zellen, chronisch infizierter Mäuse nach Depletion von $CD8^+$ T-Zellen und chronisch infizierter Mäuse nach Doppel-Depletion von sowohl regulatorischen T-Zellen als auch $CD8^+$ T-Zellen wurden mittels *Infectious Center Assay* auf die Viruslast hin analysiert. Die absolute Anzahl von Virusinfizierten Zellen pro 10^6 Zellen ist dargestellt. Es sind die Mittelwerte von 5-7 Mäusen pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005.

5 Diskussion

Um eine Infektion erfolgreich zu bekämpfen, muss der Wirt eine effiziente Immunantwort gegen eindringende Pathogene entwickeln. Allerdings muss diese Immunantwort auch zum Zeitpunkt, an dem die Anzahl der eingedrungenen Pathogene bereits deutlich reduziert ist, limitiert werden, um eine durch eine überschießende Immunantwort verursachte kollaterale Schädigung des Wirtsgewebes zu verhindern. Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Balance zwischen diesen beiden gegensätzlichen Effekten, die in den meisten Infektionskrankheiten zu beobachten sind. Auf der einen Seite tragen sie zur Vermeidung einer Immunpathologie im Wirt bei, indem sie die Pathogen-spezifische Immunantwort supprimieren. Auf der anderen Seite könnte genau diese Beschränkung der Immunantwort zu einer weniger effizienten Elimination der Pathogene führen und damit die Etablierung einer chronischen Infektion begünstigen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Interaktionen von regulatorischen T-Zellen und CD8⁺ Effektorzellen sowohl in der akuten, als auch in der chronischen FV-Infektion untersucht, um den Einfluss der regulatorischen T-Zellen auf den Verlauf einer retroviralen Infektion zu analysieren. Aus diesen Experimenten wurden Rückschlüsse zur möglichen Manipulation von regulatorischen T-Zellen als neue Behandlungsstrategie von akuten und vor allem chronischen Infektionskrankheiten gezogen.

5.1 Akute FV-Infektion

Bei der Kontrolle der akuten FV-Infektion in der Maus eliminieren zytotoxische CD8⁺ T-Zellen Virus-infizierte Zellen und spielen dadurch eine zentrale Rolle (32). Da ihre Funktion allerdings im Verlauf der Infektion von regulatorischen T-Zellen unterdrückt wird, sind sie nicht in der Lage, das Virus vollständig zu eliminieren (142). Während der akuten FV-Infektion zeigt sich eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an CD8⁺ Effektorzellen und der Höhe der Viruslast in den Lymphknoten, der Milz und dem Knochenmark (141). Da diese Beobachtungen auf einer durchflusszytometrischen Bestimmung von Zellzahlen basierte, wurden im Rahmen dieser Arbeit Funktionsanalysen von CD8⁺ T-Zellen durchgeführt, um die antivirale Aktivität dieser Zellen zu bestimmen. Dabei wurde mittels des *in vivo* CTL-Tests in

den Lymphknoten die geringste zytotoxische Aktivität nachgewiesen, die der Milz lag im mittleren Bereich und die höchste zytotoxische Aktivität lag im Knochenmark vor. Auch die durchgeführte kinetische Analyse der zytotoxischen Aktivität in der Milz und im Knochenmark zeigte eine Korrelation der in der Vorarbeit (siehe 1.2.4.4) beschriebenen kinetischen Untersuchungen der Anzahl an CD8⁺ Effektorzellen in den untersuchten Organen mit der Stärke der detektierten Virus-spezifischen zytotoxischen Aktivität. Nach Depletion von regulatorischen T-Zellen zeigte sich eine verbesserte Zytotoxizität der CD8⁺ Effektor T-Zellen. Damit korrelierend wurde nachgewiesen, dass alle untersuchten Zytokine nach Depletion von regulatorischen T-Zellen vermehrt von CD8⁺ T-Zellen produziert wurden. Dies zeigt, dass regulatorische T-Zellen in der akuten FV-Infektion einen supprimierenden Einfluss auf die antiviralen Funktionen von CD8⁺ T-Zellen haben. Desweiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Expansion von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen von der Stärke der CD8⁺ T-Zellantwort in den verschiedenen Organen abhängig war (Abbildung 4.4) und nicht von der Viruslast.

Um eine generelle Immunsuppression zu verhindern, wäre eine lokal begrenzte Aktivität der regulatorischen T-Zellen in den jeweils betroffenen entzündeten Geweben für den Wirt von großem Vorteil. In der Tat wurde gezeigt, dass es besonders in entzündeten Geweben zu einer von regulatorischen T-Zellen vermittelten Suppression von Immunantworten kommt (117). In okularen HSV-Infektionen gibt es eine erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen am Ort der Infektion, der Bindehaut, wobei dies nicht in der Milz oder im Blut der Fall ist (93, 125). Während einer Leishmaniasis kommt es ausschließlich am Ort der Primärinfektion zu einer Expansion von regulatorischen T-Zellen (81). Bei einer Leishmania-Infektion in einem Fußballen von Mäusen treten in diesem vermehrt regulatorische T-Zellen auf und nicht in den Ballen der uninfizierten Füße. Dies hat zur Folge, dass die Immunantworten auf Sekundärinfektionen nicht generell negativ von regulatorischen T-Zellen beeinflusst werden, sondern nur dort, wo eine Primärinfektion stattgefunden hat (91). Auch die vorliegende Arbeit mit FV-Infektionen belegte eine lokal begrenzt erfolgende und nicht systemische Immunregulation, da die Expansion von regulatorischen T-Zellen von der Stärke der CD8⁺ T-Zellantwort abhängig war, die wiederum, wie in der Vorarbeit (siehe 1.2.4.4) beschrieben, mit der Viruslast korrelierte. Verschiedene Studien zeigen eine

derartige Kompartimentierung der Immunantwort auch im Fall von HIV-infizierten Patienten. Bei der Untersuchung von Blutproben HIV-infizierter Patienten wurde zwar eine erhöhte Anzahl von regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen nachgewiesen, diese korrelierte aber nicht eindeutig mit der Viruslast und dem Stadium der Krankheitsprogression (1, 68). Im Gegensatz dazu zeigte eine Analyse der Lymphknoten, die bei einer HIV-Infektion die Hauptviruslast tragen, eine klare Korrelation der Anzahl regulatorischer T-Zellen mit der Viruslast, der Dysfunktion der CD8⁺ T-Zellen und dem Fortschritt der Krankheit (5, 95). Diese Studien legen nahe, dass die regulatorische T-Zellantwort in retroviralen Infektionen lokal begrenzt ist und somit die Immunpathologie am Ort der Infektion verhindert. Dies kann dann aber mit einer lokalen Erhöhung der Viruslast einhergehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die maßgebliche Rolle, die CD8⁺ T-Zellen für die Expansion von regulatorischen T-Zellen spielen, durch die Tatsache bestätigt, dass in FV-infizierten Mäusen nach Depletion von CD8⁺ T-Zellen keine Expansion von regulatorischen T-Zellen stattfand (Abbildung 4.6), obwohl die Viruslast in CD8⁺ T-Zell-depletierten Mäusen deutlich höher ist, verglichen mit FV-infizierten, nicht CD8⁺ T-Zell-depletierten Mäusen (140). Diese Ergebnisse korrelieren mit einer Studie von Antunes *et al.* Diese zeigte, dass die Suppression der Knochenmarkpathologie FV-infizierter Mäuse durch regulatorische T-Zellen vermittelt wurde und dass die Expansion dieser regulatorischen T-Zellen ausschließlich von der Anwesenheit Virus-spezifischer CD4⁺ T-Zellen abhängig war (6). Dies deutet klar darauf hin, dass die Expansion regulatorischer T-Zellen in viralen Infektionen von Virus-spezifischen Effektorzellen abhängig ist und nicht von der Höhe der Viruslast beeinflusst wird.

Es ist immer noch eine viel diskutierte Frage, ob regulatorische T-Zellen, die Pathogen-spezifische Effektor T-Zellen supprimieren, selbst auch Pathogen-spezifisch sein müssen. Bei verschiedenen Infektionskrankheiten, wie z.B. Leishmaniasis (123) oder HCV (75), wurden Pathogen-spezifische regulatorische T-Zellen nachgewiesen. Des Weiteren sind bei einigen Autoimmunkrankheiten nur Antigen-spezifische regulatorische T-Zellen in der Lage, autoreaktive T-Zellen zu supprimieren, wohingegen unspezifische regulatorische T-Zellen unwirksam sind (134). Diese Studien könnten vermuten lassen, dass nur Antigen-spezifische regulatorische T-Zellen eine signifikante Rolle im Verlauf von Infektionskrankheiten spielen. Allerdings konnten im FV-Modell keine Virus-spezifischen regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden (141). In einer Studie von Antunes *et al.* wurde die

effiziente Suppression von Virus-spezifischen, IFN- γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen, die eine Pathologie im Knochenmark induzieren, durch unspezifische regulatorische T-Zellen nachgewiesen (6). Diese Daten verdeutlichen, dass unspezifische regulatorische T-Zellen, die effizient in die von der Infektion betroffenen Organe rekrutiert wurden oder dort proliferierten, die Virus-spezifische T-Zellantwort supprimieren können. Wie in Abbildung 4.8 gezeigt ist, könnte eine Virus-unabhängige Proliferation eine sehr wichtige Rolle in der lokalen Expansion von regulatorischen T-Zellen spielen, denn diese proliferieren besonders in den Organen mit einer starken CD8⁺ T-Zellantwort, wie dem Knochenmark und der Milz. Wie in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, gab es in der Tat keine Virus-induzierte Konversion von CD4⁺ CD25⁻ GFP⁻ T-Zellen in regulatorische CD4⁺ CD25⁺ GFP⁺ T-Zellen (Abbildung 4.9). Dies belegt, dass für die Expansion regulatorischer T-Zellen während der FV-Infektion eine Rekrutierung natürlicher regulatorischer T-Zellen wichtig war, und keine *de novo*-Induktion regulatorischer T-Zellen aus Foxp3⁻ CD4⁺ T-Zellen stattfand.

In einer aktuellen Studie von Lund *et al.* wurde beschrieben, dass eine Depletion von regulatorischen T-Zellen während einer Infektion von Mäusen mit HSV-2 in diesen Tieren eine verheerende Beschleunigung der Infektion mit erhöhter Viruslast verursachte, statt, wie erwartet, eine bessere Immunantwort auf die Infektion (76). In dieser Studie wurde ebenfalls ein Mausmodell verwendet, in welchem sich regulatorische T-Zellen selektiv durch die Injektion von DT depletieren lassen. Die Depletion verstärkte zwar die Immunantwort in den ableitenden Lymphknoten am Ort der Infektion, verzögerte allerdings die Einwanderung der Immunzellen aus den Lymphknoten in die HSV-infizierten Gewebe. Daher folgerten die Autoren, dass regulatorische T-Zellen eine die Immunantwort begünstigende Rolle in akuten Infektionen haben können. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Suppression der Immunantwort durch regulatorische T-Zellen der vorherrschende Mechanismus in einer viralen Infektion sein kann. Der Unterschied zu der oben beschriebenen Studie im HSV-Modell besteht allerdings darin, dass bei HSV die Pathogenreplikation hauptsächlich in nicht-lymphatischen Geweben stattfindet, während die primären Zielzellen des FV die Zellen lymphoider Organe sind. Dies zeigt, dass die biologischen Effekte von regulatorischen T-Zellen in verschiedenen viralen Infektionen durchaus unterschiedlich sein können.

Demzufolge könnte die Suppression der regulatorischen T-Zellantwort im Verlauf von lymphotropischen Virusinfektionen eine interessante Möglichkeit einer Therapie sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Depletion regulatorischer T-Zellen in der Tat in einer qualitativ und quantitativ verbesserten CD8⁺ T-Zellantwort und infolgedessen in einer Reduktion der Viruslast resultierte. Ein weiterer wichtiger Teil dieser Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob die Depletion von regulatorischen T-Zellen negative Auswirkungen auf die Pathobiologie der Maus während einer FV-Infektion haben könnte. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass eine langanhaltende Depletion regulatorischer T-Zellen zur Entwicklung von Autoimmunkrankheiten in neugeborenen, aber auch in erwachsenen Mäusen führte (67, 71). Da regulatorische T-Zellen einen wichtigen Faktor für die Vermeidung von Immunpathologien darstellen (111), war es wichtig, im FV-Modell negative Auswirkungen einer Depletion von regulatorischen T-Zellen auf die Pathobiologie der Maus auszuschließen. Wie in 4.1.5 gezeigt, resultierte die kurzfristige Depletion von regulatorischen T-Zellen, die in dieser Arbeit Anwendung fand, nicht in einer Immunpathologie, auch nicht während einer gerade ablaufenden starken CD8⁺ T-Zellantwort (siehe Abbildung 4.14). Dies belegt, dass eine kurzfristige Depletion von regulatorischen T-Zellen als Therapie auch für humane chronische Infektionskrankheiten in Betracht kommen könnte.

5.2 Chronische FV-Infektion

Bei humanen chronischen Virusinfektionen, wie z.B. HIV- oder HCV-Infektionen, wurde zwar eine deutliche Expansion von regulatorischen T-Zellen und eine Dysfunktion von Virus-spezifischen CD8⁺ Effektorzellen nachgewiesen (75), jedoch konnte bis jetzt kein kausaler Zusammenhang zwischen regulatorischen T-Zellen und der chronischen Viruslast ermittelt werden. Für die akute FV-Infektion wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass regulatorische T-Zellen einen starken Einfluss auf die CD8⁺ Effektorzellantwort hatten und für deren Dysfunktion in der chronischen Infektion verantwortlich waren. Die zeitlich begrenzte Depletion von regulatorischen T-Zellen hatte eine quantitativ und qualitativ gesteigerte Effektorzellantwort zur Folge, was mit einer signifikant niedrigeren Viruslast korrelierte (141). Um Rückschlüsse auf mögliche Behandlungskonzepte vor allem für chronische Virusinfektionen zu ziehen,

sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Manipulation von regulatorischen T-Zellen auch in der chronischen Phase der FV-Infektion möglich ist und dadurch die Dysfunktionalität der CD8⁺ Effektorzellen aufgehoben werden kann.

Zu diesem Zweck wurden die regulatorischen T-Zellen in chronisch FV-infizierten Mäusen (etwa 6 - 8 Wochen nach Infektion) selektiv depletiert. Die Depletion hatte, ähnlich wie in der akuten Phase, eine erhöhte Anzahl an Virus-spezifischen CD8⁺ Effektorzellen zur Folge. Diese produzierten mehr zytotoxische Moleküle und Zytokine und zeigten eine gesteigerte Degranulation. Die qualitativ verbesserte Funktionalität von CD8⁺ Effektorzellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen wurde auch *in vivo* nachgewiesen. Ebenso wie in der akuten Infektion hatte die Depletion von regulatorischen T-Zellen eine signifikante Reduktion der Viruslast zur Folge. Diese Reduktion blieb auch dann noch erhalten, wenn die regulatorischen T-Zellen etwa 6 Wochen nach ihrer experimentellen Depletion wieder die ursprünglich in der chronischen Infektion vorhandene Anzahl erreicht hatten.

Diese konstant niedrige Viruslast nach kurzzeitiger Depletion von regulatorischen T-Zellen wäre für viele chronische virale Infektionen beim Menschen ebenfalls wünschenswert. Dies gilt im Besonderen für chronische HIV-Infektionen. Im Verlauf der chronischen HIV-Infektion korreliert eine hohe Viruslast stark mit der Progression von AIDS (80). Des Weiteren findet sich in dieser Phase eine Ansammlung von regulatorischen T-Zellen in den infizierten lymphoiden Geweben, was sowohl mit einer Dysfunktion der Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (12, 95), als auch mit einer erhöhten Viruslast korreliert (5). Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenso für die chronische FV-Infektion nachgewiesen (siehe Abbildung 4.29). In der chronischen FV-Infektion führte die kurzfristige Depletion von regulatorischen T-Zellen zu einer dauerhaft reduzierten Viruslast, was vermuten lässt, dass eine Depletion von regulatorischen T-Zellen in HIV-infizierten Patienten ebenfalls zu einer längerfristig gesenkten Viruslast führen und somit die Progression der Krankheit verlangsamen könnte. Dabei muss allerdings bedacht werden, dass HIV, im Gegensatz zur FV-Infektion, paradoxerweise nicht nur ein Krankheitsbild verursacht, das durch Immunsuppression, sondern ebenso durch eine Hyperaktivierung des Immunsystems gekennzeichnet ist, die sich nachteilig auf das Überleben des Patienten auswirkt (18, 47). Da regulatorische T-Zellen sowohl die

Immunhyperaktivierung limitieren (35), als auch die HIV-spezifische Immunantwort supprimieren (1, 68), ist es schwer vorauszusagen, ob eine Depletion von regulatorischen T-Zellen die Krankheitsprogression bei HIV Infektionen möglicherweise verzögern oder sogar beschleunigen würde. Bevor also eine Immuntherapie, die auf der Depletion von regulatorischen T-Zellen basiert, für HIV-Infektionen in Betracht kommt, ist es unerlässlich diese Strategie in einem Modell wie z.B. der SIV-Infektion von Makaken weiter zu analysieren.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der Depletion von regulatorischen T-Zellen über die Expression des Foxp3 Moleküls ist in dieser Weise allerdings nicht auf den Menschen übertragbar, da dieser Marker im humanen System nicht auf regulatorische T-Zellen beschränkt ist, sondern auch in anderen aktivierten T-Zellen vorliegt (46). Vorstellbar ist beispielsweise eine Depletion von regulatorischen T-Zellen mit Hilfe von verschiedenen Antikörpern beispielsweise gegen CD25, wie es auch in Mausmodellen durchgeführt wird (27).

Diese Methode der Depletion von regulatorischen T-Zellen wurde in einer Studie mit FIV-infizierten Katzen angewendet (83). Während der kurzfristigen Depletion von regulatorischen T-Zellen mit einem anti-CD25-Antikörper im Verlauf der asymptomatischen Phase der FIV-Infektion wurde eine gesteigerte antivirale T-Zellaktivität, gemessen an der Produktion von IFN- γ , nachgewiesen, allerdings zeigte sich keine Expansion von FIV-spezifischen Effektorzellen. Auch war die Viruslast nach Depletion von regulatorischen T-Zellen nicht reduziert. Die Autoren dieser Studie mutmaßen allerdings, dass diese kurzfristige Depletion von regulatorischen T-Zellen eine Art Zeitfenster bieten würde, in dem weitere Strategien, wie beispielsweise eine therapeutische Vakzinierung, angewendet werden könnten, um die Virus-spezifische T-Zellantwort zu verstärken. Ein ähnlicher Ansatz bietet erste Anhaltspunkte, dass eine Depletion von regulatorischen T-Zellen im Menschen einen positiven Effekt auf spezifische T-Zellantworten haben kann und keine schwerwiegenden Autoimmunreaktionen verursacht. Durch die Gabe eines rekombinanten IL-2-Diphtherietoxin Fusionsproteins (ONTAK) wurden regulatorische T-Zellen in Krebspatienten kurzfristig depletiert (29). Dieses Prinzip beruht auf der erhöhten Expression von CD25, also der α -Kette des IL-2-Rezeptors, auf regulatorischen T-Zellen. Zwar wird CD25 auch von anderen, nicht-regulatorischen T-Zellen exprimiert, jedoch in einem wesentlich geringeren Ausmaß. Durch die

Bindung des Fusionsproteins an CD25 der regulatorischen T-Zellen wurde in diesen durch das gekoppelte Diphtherietoxin die Apoptose induziert. Die kurzfristige Reduktion von regulatorischen T-Zellen durch ONTAK erhöhte die Tumor-spezifische T-Zellantwort in den Patienten, nachdem diese eine Vakzinierung mit Tumor-Antigenen erhalten hatten. Nach dieser Behandlung zeigten sich in den Patienten außer Allergie-ähnlichen Symptomen keine schwerwiegenden Nebenwirkungen. Auch die Behandlung von Patienten mit metastasierenden Melanomen mit ONTAK zeigte einen Erfolg, da die Tumor-spezifische T-Zellantwort gesteigert und dadurch eine Reduktion des Tumors erzielt wurde (106). Ebenso führte eine ONTAK-Behandlung von Patienten mit kutanen T-Zelllymphomen zu einer effektiven Immunantwort gegen den Tumor (137). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Behandlung von HIV-Patienten mit diesem Wirkstoff von großem Vorteil sein könnte, um deren Virus-spezifische T-Zellantwort zu steigern.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Depletion von regulatorischen T-Zellen eine wirksame Methode zur Wiederherstellung von Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten in einer chronischen retroviralen Infektion darstellt. In anderen Studien wurde ein weiterer Ansatz verfolgt, um die CD8⁺ T-Zellantwort in der chronischen LCMV-Infektion zu reaktivieren. Dabei wurden inhibitorische Rezeptoren auf der Oberfläche von CD8⁺ T-Zellen blockiert, was zu einer verbesserten Virus-spezifischen T-Zellantwort und reduzierter Viruslast führte (8, 15). In einer FV-Infektion war dieser Ansatz, die CD8⁺ T-Zellantwort in der chronischen Phase zu reaktivieren allerdings nicht erfolgreich (127). Dies zeigt, dass verschiedene therapeutische Ansätze auf die spezifischen Mechanismen, die im Verlauf von verschiedenen Infektionen zu einer Dysfunktion von regulatorischen T-Zellen führen, zugeschnitten sein müssen.

Möglicherweise gibt es in der chronischen FV-Infektion mehr als einen Mechanismus der Effektor T-Zell Aktivierung bzw. Suppression, denn die Depletion von regulatorischen T-Zellen führte zwar zu einer signifikanten Reduktion der Viruslast in den behandelten Tieren, dennoch konnten die Viren nicht vollständig eliminiert werden (siehe Abbildung 4.29). Es ist möglich, dass eine zu schnelle Rekonstitution der regulatorischen T-Zellen in den infizierten Organen eine vollständige Eliminierung des Virus verhindert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Population von regulatorischen T-Zellen 5 Wochen nach Depletion zahlenmäßig fast vollständig

wieder hergestellt war und erneut eine Dysfunktion der CD8⁺ Effektorzellen aufgetreten war (siehe Abbildung 4.30 und Abbildung 4.31), wobei die Viruslast konstant reduziert blieb (Abbildung 4.29). Auch durch eine Mehrfach-Depletion von regulatorischen T-Zellen konnte weder eine vollständige Eliminierung, noch eine weitere Reduktion der Viruslast, verglichen mit den nur einmal depletierten Mäusen, erreicht werden.

Durch Depletion von regulatorischen T-Zellen wurde demnach zwar eine signifikante Reduktion der Viruslast, jedoch keine vollständige Beseitigung des Virus erreicht. Eine vielversprechende Strategie, um diese vollständige Beseitigung, das ultimative Ziel einer Behandlung chronischer Infektionen, zu erreichen, könnte möglicherweise eine Kombination von anderen Maßnahmen, wie z.B. einer Behandlung mit antiviralen Medikamenten oder einer therapeutischen Vakzinierung, mit der Depletion von regulatorischen T-Zellen sein.

6 Zusammenfassung

Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen spielen bei der Kontrolle der akuten FV Infektion eine maßgebliche Rolle. Allerdings wird ihre Funktion im Verlauf der akuten Infektion von regulatorischen T-Zellen supprimiert, bevor sie in der Lage sind, die Virus-infizierten Zellen vollständig zu eliminieren. Nach Depletion von regulatorischen T-Zellen während der akuten Infektion wurde in Vorarbeiten in Form meiner Diplomarbeit eine Expansion von CD8⁺ Effektorzellen, die zytotoxische Moleküle exprimierten, nachgewiesen. Diese Analysen basierten ausschließlich auf der durchflusszytometrischen Bestimmung von absoluten Zellzahlen von Effektor T-Zellpopulationen.

Um die funktionelle Aktivität der expandierten CD8⁺ T-Zellen bestimmen zu können, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit das zytotoxische Potential von CD8⁺ T-Zellen *in vivo* untersucht. Dazu wurde ein *in vivo* CTL-Test etabliert und eine Kinetik der CD8⁺ T-Zellzytotoxizität während der akuten FV-Infektion angefertigt. Mit diesen Untersuchungen wurde gezeigt, dass es eine Korrelation zwischen der Anzahl an CD8⁺ Effektor T-Zellen und der Stärke der detektierten zytotoxischen Aktivität *in vivo* gibt. Danach wurde die *in vivo* Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen bestimmt und eine verbesserte Zytotoxizität der CD8⁺ Effektor T-Zellen nachgewiesen. Außerdem zeigten die Untersuchungen der Zytokinproduktion von CD8⁺ Effektorzellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen während der akuten Infektion, dass signifikant mehr Zytokine in Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen von CD8⁺ T-Zellen produziert wurden. Diese Daten beweisen erstmals, dass regulatorische T-Zellen in einer akuten Retrovirus-Infektion einen supprimierenden Einfluss auf die antiviralen Funktionen von CD8⁺ T-Zellen haben.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der chronischen Infektion mit Retroviren. In diesem Teil der Arbeit wurde der Funktionsverlust von CD8⁺ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion, der durch die supprimierende Aktivität von regulatorischen T-Zellen verursacht wird, detailliert charakterisiert. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Fragestellung, ob es in der chronischen Phase der FV-Infektion möglich ist, durch Depletion von regulatorischen T-Zellen die Dysfunktionalität der CD8⁺ Effektor T-Zellen aufzuheben. Die Resultate dieser Versuche zeigten, dass die Depletion von regulatorischen T-Zellen in der

chronischen FV-Infektion zu einer erhöhten Anzahl an Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen führte. Diese Zellen zeigten eine gesteigerte Proliferationsrate und eine erhöhte Produktion von Zytokinen und zytotoxischen Molekülen. Dies ließ auf eine verbesserte zytotoxische Aktivität der CD8⁺ Effektorzellen schließen, was mit einem *in vivo* CTL-Test bestätigt werden konnte. Die Aufhebung der durch regulatorische T-Zellen vermittelten Suppression von CD8⁺ Effektorzellen in der chronischen Infektionsphase ermöglichte also eine Reaktivierung der vorher dysfunktionalen Zellen. Eine Analyse der Viruslast zeigte, dass die Depletion von regulatorischen T-Zellen eine signifikante Reduktion der Viruslast in chronisch infizierten Tieren zur Folge hatte, die nicht nur kurzfristig war, sondern über einen längerfristigen Zeitraum Bestand hatte.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die durch regulatorische T-Zellen vermittelte Immunsuppression ein signifikanter Faktor in der Etablierung und Aufrechterhaltung von chronischen viralen Infektionen ist. Immuntherapien, die sich auf eine Manipulation von regulatorischen T-Zellen konzentrieren, könnten also eine erfolgversprechende Strategie für die Behandlung von chronischen Infektionskrankheiten darstellen.

Summary

Cytotoxic CD8⁺ T cells are critical for the control of acute FV infection. However, they are functionally suppressed by regulatory T cells, compromising the ability of CD8⁺ T cells to completely eliminate the virus-infected cells. On the basis of preliminary work performed during my diploma, it was observed that depletion of regulatory T cells during the acute infection resulted in an expansion of effector CD8⁺ T cell population with enhanced production of cytotoxic molecules. These analyses were exclusively based on determination of absolute cell numbers of effector T cell populations by Flow cytometry.

To identify the functional activity of these expanded CD8⁺ T cells, the cytotoxic potential of CD8⁺ T cells was analyzed in the first part of the present work. For that purpose an *in vivo* CTL assay was established and firstly, the kinetics of the CD8⁺ T cell cytotoxicity in the course of the acute FV infection was obtained. These studies indicated a correlation of the numbers of CD8⁺ T cells with the magnitude of the detected cytotoxic activity *in vivo*. Secondly, the *in vivo* cytotoxicity of the CD8⁺ T cells after depletion of regulatory T cells was analyzed. After depletion of regulatory T cells, an enhanced cytotoxicity of CD8⁺ T cells was found. Correlating with that the analyses of cytokine production after depletion of regulatory T cells showed an enhanced production of cytokines by the CD8⁺ T cells. These results demonstrated that regulatory T cells suppress the antiviral functions of CD8⁺ T cells during the acute FV infection.

The main focus of the present work was on the analysis of chronic FV infection. In this second part of the work, the dysfunction of the CD8⁺ T cells during chronic infection, caused by the immunosuppressive regulatory T cells, was characterized in detail. Therefore, the emphasis was on the question, if it could be possible to abrogate the dysfunctionality of the CD8⁺ T cells during the chronic phase of infection by depleting regulatory T cells. The results of these experiments showed enhanced numbers of virus-specific CD8⁺ T cells after transient depletion of regulatory T cells. These cells showed increased proliferation rates, an increased production of cytokines and cytotoxic molecules. These results indicated an improved cytotoxic activity of the effector CD8⁺ T cells, which was verified by analyzing cytotoxicity in an *in vivo* CTL assay. In this respect, reversal of regulatory T cell-mediated suppression probably allowed a regain of function of previously exhausted effector CD8⁺ T cells. A conclusive analysis of the viral loads after short term depletion of regulatory T cells

showed a significant long term reduction of the viral setpoints in chronic infected mice. These results demonstrate that regulatory T cell-mediated immunosuppression can be a significant factor in the maintenance of chronic viral infections and that Treg-targeted immunotherapy could be a valuable component in therapeutic strategies to treat chronic infectious diseases.

7 Literaturverzeichnis

1. Aandahl, E. M., J. Michaelsson, W. J. Moretto, F. M. Hecht, and D. F. Nixon. 2004. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol* 78:2454-9.
2. Aderem, A., and D. M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593-623.
3. Alter, G., J. M. Malenfant, and M. Altfeld. 2004. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294:15-22.
4. Altman, J. D., P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael, and M. M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274:94-6.
5. Andersson, J., A. Boasso, J. Nilsson, R. Zhang, N. J. Shire, S. Lindback, G. M. Shearer, and C. A. Chougnet. 2005. The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J Immunol* 174:3143-7.
6. Antunes, I., M. Tolaini, A. Kissenpfennig, M. Iwashiro, K. Kuribayashi, B. Malissen, K. Hasenkrug, and G. Kassiotis. 2008. Retrovirus-specificity of regulatory T cells is neither present nor required in preventing retrovirus-induced bone marrow immune pathology. *Immunity* 29:782-94.
7. Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 184:387-96.
8. Barber, D. L., E. J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J. P. Allison, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, and R. Ahmed. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439:682-7.
9. Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-71.
10. Becker, C., S. Stoll, T. Bopp, E. Schmitt, and H. Jonuleit. 2006. Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Med Microbiol Immunol* 195:113-24.
11. Beilharz, M. W., L. M. Sannels, A. Paun, K. Shaw, P. van Eeden, M. W. Watson, and M. L. Ashdown. 2004. Timed ablation of regulatory CD4⁺ T cells can prevent murine AIDS progression. *J Immunol* 172:4917-25.
12. Betts, M. R., M. C. Nason, S. M. West, S. C. De Rosa, S. A. Migueles, J. Abraham, M. M. Lederman, J. M. Benito, P. A. Goepfert, M. Connors, M. Roederer, and R. A. Koup. 2006. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood* 107:4781-9.
13. Beutler, B. 2003. Innate immune responses to microbial poisons: discovery and function of the Toll-like receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:609-28.
14. Beutler, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40:845-59.
15. Blackburn, S. D., H. Shin, W. N. Haining, T. Zou, C. J. Workman, A. Polley, M. R. Betts, G. J. Freeman, D. A. Vignali, and E. J. Wherry. 2009. Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 10:29-37.

16. Boyer, O., D. Saadoun, J. Abriol, M. Dodille, J. C. Piette, P. Cacoub, and D. Klatzmann. 2004. CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood* 103:3428-30.
17. Brady, M. T., A. J. MacDonald, A. G. Rowan, and K. H. Mills. 2003. Hepatitis C virus non-structural protein 4 suppresses Th1 responses by stimulating IL-10 production from monocytes. *Eur J Immunol* 33:3448-57.
18. Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B. R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J. N. Martin, F. M. Hecht, L. J. Picker, M. M. Lederman, S. G. Deeks, and D. C. Douek. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12:1365-71.
19. Brun-Vezinet, F., C. Rouzioux, L. Montagnier, S. Chamaret, J. Gruest, F. Barre-Sinoussi, D. Geroldi, J. C. Chermann, J. McCormick, S. Mitchell, and et al. 1984. Prevalence of antibodies to lymphadenopathy-associated retrovirus in African patients with AIDS. *Science* 226:453-6.
20. Bukowski, J. F., J. F. Warner, G. Dennert, and R. M. Welsh. 1985. Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J Exp Med* 161:40-52.
21. Cabrera, R., Z. Tu, Y. Xu, R. J. Firpi, H. R. Rosen, C. Liu, and D. R. Nelson. 2004. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 40:1062-71.
22. Cao, X., S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms, and T. J. Ley. 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27:635-46.
23. Chen, W., H. Qin, B. Chesebro, and M. A. Cheever. 1996. Identification of a gag-encoded cytotoxic T-lymphocyte epitope from FBL-3 leukemia shared by Friend, Moloney, and Rauscher murine leukemia virus-induced tumors. *J Virol* 70:7773-82.
24. Clavel, F., M. Guyader, D. Guetard, M. Salle, L. Montagnier, and M. Alizon. 1986. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 324:691-5.
25. Cobbold, S. P., S. X. Qin, and H. Waldmann. 1990. Reprogramming the immune system for tolerance with monoclonal antibodies. *Semin Immunol* 2:377-87.
26. Collins, J. K., W. J. Britt, and B. Chesebro. 1980. Cytotoxic T lymphocyte recognition of gp70 on Friend virus-induced erythroleukemia cell clones. *J Immunol* 125:1318-24.
27. Curtin, J. F., M. Candolfi, T. M. Fakhouri, C. Liu, A. Alden, M. Edwards, P. R. Lowenstein, and M. G. Castro. 2008. Treg depletion inhibits efficacy of cancer immunotherapy: implications for clinical trials. *PLoS ONE* 3:e1983.
28. D'Andrea, A. D. 1992. The interaction of the erythropoietin receptor and gp55. *Cancer Surv* 15:19-36.
29. Dannull, J., Z. Su, D. Rizzieri, B. K. Yang, D. Coleman, D. Yancey, A. Zhang, P. Dahm, N. Chao, E. Gilboa, and J. Vieweg. 2005. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* 115:3623-33.
30. DeLarco, J., and G. J. Todaro. 1976. Membrane receptors for murine leukemia viruses: characterization using the purified viral envelope glycoprotein, gp71. *Cell* 8:365-71.

31. Dittmer, U., and K. J. Hasenkrug. 2001. Cellular and molecular mechanisms of vaccine-induced protection against retroviral infections. *Curr Mol Med* 1:431-6.
32. Dittmer, U., H. He, R. J. Messer, S. Schimmer, A. R. Olbrich, C. Ohlen, P. D. Greenberg, I. M. Stromnes, M. Iwashiro, S. Sakaguchi, L. H. Evans, K. E. Peterson, G. Yang, and K. J. Hasenkrug. 2004. Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity* 20:293-303.
33. Dittmer, U., B. Race, and K. J. Hasenkrug. 1999. Kinetics of the development of protective immunity in mice vaccinated with a live attenuated retrovirus. *J Virol* 73:8435-40.
34. Dittmer, U., B. Race, K. E. Peterson, I. M. Stromnes, R. J. Messer, and K. J. Hasenkrug. 2002. Essential roles for CD8+ T cells and gamma interferon in protection of mice against retrovirus-induced immunosuppression. *J Virol* 76:450-4.
35. Eggena, M. P., B. Barugahare, N. Jones, M. Okello, S. Mutalya, C. Kityo, P. Mugenyi, and H. Cao. 2005. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol* 174:4407-14.
36. Eisenbarth, G. S., and B. L. Kotzin. 2003. Enumerating autoreactive T cells in peripheral blood: a big step in diabetes prediction. *J Clin Invest* 111:179-81.
37. Enders, J. F., and T. C. Peebles. 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med* 86:277-86.
38. Estes, J. D., Q. Li, M. R. Reynolds, S. Wietgreffe, L. Duan, T. Schacker, L. J. Picker, D. I. Watkins, J. D. Lifson, C. Reilly, J. Carlis, and A. T. Haase. 2006. Premature induction of an immunosuppressive regulatory T cell response during acute simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 193:703-12.
39. Figdor, C. G., Y. van Kooyk, and G. J. Adema. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2:77-84.
40. Finkelman, F. D., J. Holmes, I. M. Katona, J. F. Urban, Jr., M. P. Beckmann, L. S. Park, K. A. Schooley, R. L. Coffman, T. R. Mosmann, and W. E. Paul. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 8:303-33.
41. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-6.
42. Frank, M. M., and L. F. Fries. 1991. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* 12:322-6.
43. Friend, C. 1957. Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *J Exp Med* 105:307-18.
44. Fruh, K., and Y. Yang. 1999. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr Opin Immunol* 11:76-81.
45. Gallo, R. C. 1986. HTLV: the family of human T-lymphotropic retroviruses and their role in leukemia and AIDS. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 3:265-7.
46. Gavin, M. A., T. R. Torgerson, E. Houston, P. DeRoos, W. Y. Ho, A. Stray-Pedersen, E. L. Ocheltree, P. D. Greenberg, H. D. Ochs, and A. Y. Rudensky. 2006. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6659-64.
47. Giorgi, J. V., M. A. Hausner, and L. E. Hultin. 1999. Detailed immunophenotype of CD8+ memory cytotoxic T-lymphocytes (CTL) against

- HIV-1 with respect to expression of CD45RA/RO, CD62L and CD28 antigens. *Immunol Lett* 66:105-10.
48. Graf, T. 2008. Immunology: blood lines redrawn. *Nature* 452:702-3.
 49. Greaves, M. F., and G. Brown. 1973. A human B lymphocyte specific antigen. *Nat New Biol* 246:116-9.
 50. Gregory, S. H., and E. J. Wing. 1993. IFN-gamma inhibits the replication of *Listeria monocytogenes* in hepatocytes. *J Immunol* 151:1401-9.
 51. Hahn, S., R. Gehri, and P. Erb. 1995. Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol Rev* 146:57-79.
 52. Hasenkrug, K. J. 1999. Lymphocyte deficiencies increase susceptibility to friend virus-induced erythroleukemia in Fv-2 genetically resistant mice. *J Virol* 73:6468-73.
 53. Hasenkrug, K. J., D. M. Brooks, and U. Dittmer. 1998. Critical role for CD4(+) T cells in controlling retrovirus replication and spread in persistently infected mice. *J Virol* 72:6559-64.
 54. Hasenkrug, K. J., and B. Chesebro. 1997. Immunity to retroviral infection: the Friend virus model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7811-6.
 55. Haynes, L. M., C. L. Vanderlugt, M. C. Dal Canto, R. W. Melvold, and S. D. Miller. 2000. CD8(+) T cells from Theiler's virus-resistant BALB/cByJ mice downregulate pathogenic virus-specific CD4(+) T cells. *J Neuroimmunol* 106:43-52.
 56. Hoatlin, M. E., and D. Kabat. 1995. Host-range control of a retroviral disease: Friend erythroleukemia. *Trends Microbiol* 3:51-7.
 57. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-61.
 58. Hunter, E., and R. Swanstrom. 1990. Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 157:187-253.
 59. Iwashiro, M., K. Peterson, R. J. Messer, I. M. Stromnes, and K. J. Hasenkrug. 2001. CD4(+) T cells and gamma interferon in the long-term control of persistent friend retrovirus infection. *J Virol* 75:52-60.
 60. Janeway. 2002. *Immunologie*, vol. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
 61. Jarrett, W. F., W. B. Martin, G. W. Crichton, R. G. Dalton, and M. F. Stewart. 1964. Transmission Experiments with Leukemia (Lymphosarcoma). *Nature* 202:566-7.
 62. Jolles, J., and P. Jolles. 1967. Human tear and human milk lysozymes. *Biochemistry* 6:411-7.
 63. Jonuleit, H., E. Schmitt, H. Kakirman, M. Stassen, J. Knop, and A. H. Enk. 2002. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 196:255-60.
 64. Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A. H. Enk. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193:1285-94.
 65. Kabat, D. 1989. Molecular biology of Friend viral erythroleukemia. *Curr Top Microbiol Immunol* 148:1-42.
 66. Keynan, Y., C. M. Card, P. J. McLaren, M. R. Dawood, K. Kasper, and K. R. Fowke. 2008. The role of regulatory T cells in chronic and acute viral infections. *Clin Infect Dis* 46:1046-52.

67. Kim, J. M., J. P. Rasmussen, and A. Y. Rudensky. 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 8:191-7.
68. Kinter, A. L., M. Hennessey, A. Bell, S. Kern, Y. Lin, M. Daucher, M. Planta, M. McGlaughlin, R. Jackson, S. F. Ziegler, and A. S. Fauci. 2004. CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med* 200:331-43.
69. Kolokithas, A., K. Rosenke, F. Malik, D. Hendrick, L. Swanson, M. L. Santiago, J. L. Portis, K. J. Hasenkrug, and L. H. Evans. 2010. The glycosylated Gag protein of a murine leukemia virus inhibits the antiretroviral function of APOBEC3. *J Virol* 84:10933-6.
70. Konig, R., L. Y. Huang, and R. N. Germain. 1992. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* 356:796-8.
71. Lahl, K., C. Loddenkemper, C. Drouin, J. Freyer, J. Arnason, G. Eberl, A. Hamann, H. Wagner, J. Huehn, and T. Sparwasser. 2007. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* 204:57-63.
72. Lander, M. R., and S. K. Chattopadhyay. 1984. A *Mus dunni* cell line that lacks sequences closely related to endogenous murine leukemia viruses and can be infected by ectropic, amphotropic, xenotropic, and mink cell focus-forming viruses. *J Virol* 52:695-8.
73. Letvin, N. L., K. A. Eaton, W. R. Aldrich, P. K. Sehgal, B. J. Blake, S. F. Schlossman, N. W. King, and R. D. Hunt. 1983. Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:2718-22.
74. Levy, J. A., A. D. Hoffman, S. M. Kramer, J. A. Landis, J. M. Shimabukuro, and L. S. Oshiro. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco testpatients with AIDS. *Science* 225:840-2.
75. Li, S., E. J. Gowans, C. Chougnnet, M. Plebanski, and U. Dittmer. 2008. Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J Virol* 82:21-30.
76. Lund, J. M., L. Hsing, T. T. Pham, and A. Y. Rudensky. 2008. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science* 320:1220-4.
77. MacDonald, A. J., M. Duffy, M. T. Brady, S. McKiernan, W. Hall, J. Hegarty, M. Curry, and K. H. Mills. 2002. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis* 185:720-7.
78. Mahalingam, S., and G. Karupiah. 1999. Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases. *Immunol Cell Biol* 77:469-75.
79. Marshall, N. A., M. A. Vickers, and R. N. Barker. 2003. Regulatory T cells secreting IL-10 dominate the immune response to EBV latent membrane protein 1. *J Immunol* 170:6183-9.
80. Mellors, J. W., C. R. Rinaldo, Jr., P. Gupta, R. M. White, J. A. Todd, and L. A. Kingsley. 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272:1167-70.
81. Mendez, S., S. K. Reckling, C. A. Piccirillo, D. Sacks, and Y. Belkaid. 2004. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med* 200:201-10.

82. Migueles, S. A., C. M. Osborne, C. Royce, A. A. Compton, R. P. Joshi, K. A. Weeks, J. E. Rood, A. M. Berkley, J. B. Sacha, N. A. Cogliano-Shutta, M. Lloyd, G. Roby, R. Kwan, M. McLaughlin, S. Stallings, C. Rehm, M. A. O'Shea, J. Mican, B. Z. Packard, A. Komoriya, S. Palmer, A. P. Wiegand, F. Maldarelli, J. M. Coffin, J. W. Mellors, C. W. Hallahan, D. A. Follman, and M. Connors. 2008. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* 29:1009-21.
83. Mikkelsen, S. R., S. K. Reckling, E. A. Egan, and G. A. Dean. 2010. In vivo depletion of CD4(+)CD25(hi) regulatory T cells is associated with improved antiviral responses in cats chronically infected with feline immunodeficiency virus. *Virology* 403:163-72.
84. Mills, K. H. 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 4:841-55.
85. Mills, K. H., and P. McGuirk. 2004. Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. *Semin Immunol* 16:107-17.
86. Mittrucker, H. W., and S. H. Kaufmann. 2004. Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited. *Eur J Immunol* 34:306-12.
87. Miyazawa, M., J. Nishio, and B. Chesebro. 1992. Protection against Friend retrovirus-induced leukemia by recombinant vaccinia viruses expressing the gag gene. *J Virol* 66:4497-507.
88. Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-73.
89. Müller, U., P. Vogel, G. Alber and G. A. Schaub. 2008. The innate immune system of mammals and insects. *Contribution in Microbiology* 15:21-44.
90. Mullbacher, A., M. Lobigs, R. T. Hla, T. Tran, T. Stehle, and M. M. Simon. 2002. Antigen-dependent release of IFN-gamma by cytotoxic T cells up-regulates Fas on target cells and facilitates exocytosis-independent specific target cell lysis. *J Immunol* 169:145-50.
91. Nagase, H., K. M. Jones, C. F. Anderson, and N. Noben-Trauth. 2007. Despite increased CD4+Foxp3+ cells within the infection site, BALB/c IL-4 receptor-deficient mice reveal CD4+Foxp3-negative T cells as a source of IL-10 in *Leishmania major* susceptibility. *J Immunol* 179:2435-44.
92. Nagata, S. 1996. Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 406:119-24.
93. Nesburn, A. B., I. Bettahi, G. Dasgupta, A. A. Chentoufi, X. Zhang, S. You, N. Morishige, A. J. Wahlert, D. J. Brown, J. V. Jester, S. L. Wechsler, and L. BenMohamed. 2007. Functional Foxp3+ CD4+ CD25(Bright+) "natural" regulatory T cells are abundant in rabbit conjunctiva and suppress virus-specific CD4+ and CD8+ effector T cells during ocular herpes infection. *J Virol* 81:7647-61.
94. Nickell, S. P., and D. Sharma. 2000. *Trypanosoma cruzi*: roles for perforin-dependent and perforin-independent immune mechanisms in acute resistance. *Exp Parasitol* 94:207-16.
95. Nilsson, J., A. Boasso, P. A. Velilla, R. Zhang, M. Vaccari, G. Franchini, G. M. Shearer, J. Andersson, and C. Chougnet. 2006. HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood* 108:3808-17.
96. Nisole, S., J. P. Stoye, and A. Saib. 2005. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 3:799-808.
97. Novembre, F. J., J. de Rosayro, S. Nidtha, S. P. O'Neil, T. R. Gibson, T. Evans-Strickfaden, C. E. Hart, and H. M. McClure. 2001. Rapid CD4(+) T-cell

- loss induced by human immunodeficiency virus type 1(NC) in uninfected and previously infected chimpanzees. *J Virol* 75:1533-9.
98. O'Neil, S. P., F. J. Novembre, A. B. Hill, C. Suwyn, C. E. Hart, T. Evans-Strickfaden, D. C. Anderson, J. deRosayro, J. G. Herndon, M. Saucier, and H. M. McClure. 2000. Progressive infection in a subset of HIV-1-positive chimpanzees. *J Infect Dis* 182:1051-62.
 99. Parnes, J. R. 1989. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv Immunol* 44:265-311.
 100. Pedersen, N. C., J. K. Yamamoto, T. Ishida, and H. Hansen. 1989. Feline immunodeficiency virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 21:111-29.
 101. Popovic, M., M. G. Sarngadharan, E. Read, and R. C. Gallo. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224:497-500.
 102. Portnoy, D. A., R. D. Schreiber, P. Connelly, and L. G. Tilney. 1989. Gamma interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. *J Exp Med* 170:2141-6.
 103. Powell, B. R., N. R. Buist, and P. Stenzel. 1982. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr* 100:731-7.
 104. Price, D. A., P. Klenerman, B. L. Booth, R. E. Phillips, and A. K. Sewell. 1999. Cytotoxic T lymphocytes, chemokines and antiviral immunity. *Immunol Today* 20:212-6.
 105. Rakenius, A. 2005. The activation-specific blockade of GPIIb/IIIa on platelets with single-chain antibodies and peptides. Inaugural-Dissertation.
 106. Rasku, M. A., A. L. Clem, S. Telang, B. Taft, K. Gettings, H. Gragg, D. Cramer, S. C. Lear, K. M. McMasters, D. M. Miller, and J. Chesney. 2008. Transient T cell depletion causes regression of melanoma metastases. *J Transl Med* 6:12.
 107. Robertson, M. N., M. Miyazawa, S. Mori, B. Caughey, L. H. Evans, S. F. Hayes, and B. Chesebro. 1991. Production of monoclonal antibodies reactive with a denatured form of the Friend murine leukemia virus gp70 envelope protein: use in a focal infectivity assay, immunohistochemical studies, electron microscopy and western blotting. *J Virol Methods* 34:255-71.
 108. Robertson, S. J., C. G. Ammann, R. J. Messer, A. B. Carmody, L. Myers, U. Dittmer, S. Nair, N. Gerlach, L. H. Evans, W. A. Cafruny, and K. J. Hasenkrug. 2008. Suppression of acute anti-friend virus CD8+ T-cell responses by coinfection with lactate dehydrogenase-elevating virus. *J Virol* 82:408-18.
 109. Rous, P. 1911. A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med* 13:397-411.
 110. Ruscetti, S. K. 1995. Erythroleukaemia induction by the Friend spleen focus-forming virus. *Baillieres Clin Haematol* 8:225-47.
 111. Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6:345-52.
 112. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-64.
 113. Scapini, P., J. A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni, and M. A. Cassatella. 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 177:195-203.

114. Schepers, K., M. Toebes, G. Sotthewes, F. A. Vyth-Dreese, T. A. DelleMijn, C. J. Melief, F. Ossendorp, and T. N. Schumacher. 2002. Differential kinetics of antigen-specific CD4+ and CD8+ T cell responses in the regression of retrovirus-induced sarcomas. *J Immunol* 169:3191-9.
115. Seder, R. A., and W. E. Paul. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12:635-73.
116. Shimizu, T., H. Uenishi, Y. Teramura, M. Iwashiro, K. Kuribayashi, H. Tamamura, N. Fujii, and H. Yamagishi. 1994. Fine structure of a virus-encoded helper T-cell epitope expressed on FBL-3 tumor cells. *J Virol* 68:7704-8.
117. Siegmund, K., M. Feuerer, C. Siewert, S. Ghani, U. Haubold, A. Dankof, V. Krenn, M. P. Schon, A. Scheffold, J. B. Lowe, A. Hamann, U. Syrbe, and J. Huehn. 2005. Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood* 106:3097-104.
118. Sourvinos, G., C. Tsatsanis, and D. A. Spandidos. 2000. Mechanisms of retrovirus-induced oncogenesis. *Folia Biol (Praha)* 46:226-32.
119. Stalder, T., S. Hahn, and P. Erb. 1994. Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 152:1127-33.
120. Steinman, R. M., and H. Hemmi. 2006. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 311:17-58.
121. Stevens, T. L., A. Bossie, V. M. Sanders, R. Fernandez-Botran, R. L. Coffman, T. R. Mosmann, and E. S. Vitetta. 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334:255-8.
122. Stromnes, I. M., U. Dittmer, T. N. Schumacher, K. Schepers, R. J. Messer, L. H. Evans, K. E. Peterson, B. Race, and K. J. Hasenkrug. 2002. Temporal effects of gamma interferon deficiency on the course of Friend retrovirus infection in mice. *J Virol* 76:2225-32.
123. Suffia, I. J., S. K. Reckling, C. A. Piccirillo, R. S. Goldszmid, and Y. Belkaid. 2006. Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Med* 203:777-88.
124. Sugahara, D., S. Tsuji-Kawahara, and M. Miyazawa. 2004. Identification of a protective CD4+ T-cell epitope in p15gag of Friend murine leukemia virus and role of the MA protein targeting the plasma membrane in immunogenicity. *J Virol* 78:6322-34.
125. Suvas, S., A. K. Azkur, B. S. Kim, U. Kumaraguru, and B. T. Rouse. 2004. CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J Immunol* 172:4123-32.
126. Suvas, S., U. Kumaraguru, C. D. Pack, S. Lee, and B. T. Rouse. 2003. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 198:889-901.
127. Takamura, S., S. Tsuji-Kawahara, H. Yagita, H. Akiba, M. Sakamoto, T. Chikaishi, M. Kato, and M. Miyazawa. 2010. Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8+ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors. *J Immunol* 184:4696-707.
128. Tang, Q., and J. A. Bluestone. 2008. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 9:239-44.
129. Trapani, J. A., and M. J. Smyth. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2:735-47.
130. UNAIDS. 2008. AIDS epidemic update : December 2007.
131. Voisset, C., O. Bouton, F. Bedin, L. Duret, B. Mandrand, F. Mallet, and G. Paranhos-Baccala. 2000. Chromosomal distribution and coding capacity of the

- human endogenous retrovirus HERV-W family. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:731-40.
132. Wallach, D., E. E. Varfolomeev, N. L. Malinin, Y. V. Goltsev, A. V. Kovalenko, and M. P. Boldin. 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17:331-67.
 133. Weiss, L., V. Donkova-Petrini, L. Caccavelli, M. Balbo, C. Carbonneil, and Y. Levy. 2004. Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients. *Blood* 104:3249-56.
 134. Westendorf, A. M., D. Fleissner, L. Groebe, S. Jung, A. D. Gruber, W. Hansen, and J. Buer. 2009. CD4+Foxp3+ regulatory T cell expansion induced by antigen-driven interaction with intestinal epithelial cells independent of local dendritic cells. *Gut* 58:211-9.
 135. Wildin, R. S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, and M. E. Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27:18-20.
 136. Wildin, R. S., S. Smyk-Pearson, and A. H. Filipovich. 2002. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 39:537-45.
 137. Wong, B. Y., S. A. Gregory, and N. H. Dang. 2007. Denileukin diftitox as novel targeted therapy for lymphoid malignancies. *Cancer Invest* 25:495-501.
 138. Zelinskyy, G. 2004. Untersuchungen zur Rolle von zytotoxischen Molekülen bei der Immunabwehr gegen Retroviren. Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
 139. Zelinskyy, G., S. Balkow, S. Schimmer, K. Schepers, M. M. Simon, and U. Dittmer. 2004. Independent roles of perforin, granzymes, and Fas in the control of Friend retrovirus infection. *Virology* 330:365-74.
 140. Zelinskyy, G., S. Balkow, S. Schimmer, T. Werner, M. M. Simon, and U. Dittmer. 2007. The level of friend retrovirus replication determines the cytolytic pathway of CD8+ T-cell-mediated pathogen control. *J Virol* 81:11881-90.
 141. Zelinskyy, G., K. K. Dietze, Y. P. Husecken, S. Schimmer, S. Nair, T. Werner, K. Gibbert, O. Kershaw, A. D. Gruber, T. Sparwasser, and U. Dittmer. 2009. The regulatory T-cell response during acute retroviral infection is locally defined and controls the magnitude and duration of the virus-specific cytotoxic T-cell response. *Blood* 114:3199-207.
 142. Zelinskyy, G., A. R. Kraft, S. Schimmer, T. Arndt, and U. Dittmer. 2006. Kinetics of CD8+ effector T cell responses and induced CD4+ regulatory T cell responses during Friend retrovirus infection. *Eur J Immunol* 36:2658-70.
 143. Zelinskyy, G., S. J. Robertson, S. Schimmer, R. J. Messer, K. J. Hasenkrug, and U. Dittmer. 2005. CD8+ T-cell dysfunction due to cytolytic granule deficiency in persistent Friend retrovirus infection. *J Virol* 79:10619-26.
 144. Zinkernagel, R. M., and P. C. Doherty. 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248:701-2.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

7AAD 7-Aminoactinomycin D

A

AF Alexa Fluor

AIDS erworbenes Immundefizienzsyndrom (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*)

AK Antikörper

APC Antigen präsentierende Zelle

APC Allophycocyanin

B

BAC Bacterial Artificial Chromosome

BFA Brefeldin A

bp Basenpaare

BrdU Bromodeoxyuridin

BSA Rinderserumalbumin

C

C Celsius

CD Nomenklatur für Zelloberflächenmoleküle (*Cluster of differentiation*)

CFSE *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

chron chronisch

CTL Zytotoxische T-Lymphozyten

CTLA-4 Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4

D

d Tage (*days*)

DC Dendritische Zelle

DEREG	Depletion von regulatorischen T-Zellen (<i>depletion of regulatory T cell</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelsträngig (<i>double-stranded</i>)
DT	Diphtherietoxin

E

EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eF450	eFluor 450
env	Virushülle (<i>envelope</i>)
EPO-R	Erythropoietinrezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum

F

FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FasL	Fas Ligand
FCS	Fötale Kälberserum
FeLV	Felines Leukosevirus
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FIV	Felines Immundefizienz Virus
F-MuLV	<i>Friend murine leukemia virus</i>
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
FV	Friend Retrovirus

G

g	Gravitation, Erdbeschleunigung
g	Gramm
gag	Gruppenspezifische Antigene
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
gp	Glykoprotein
Gzm	Granzym

H

h	Stunde
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie (<i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i>)
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
HSV	Herpes Simplex Virus
HTLV	Humanes T-Zell-lymphotropes Virus

I

IC	<i>infectious center</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
inf	infiziert
i.p.	intraperitoneal
IPEX	<i>immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome</i>
i.v.	Intravenös

K

Kb	Kilobase
kDA	Kilodalton

L

l	Liter
LAMP-1	<i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LDV	<i>Lactate dehydrogenase-elevating virus</i>
LTR	<i>Long terminal repeats</i>

M

μ	mikro
m	milli
M	Molar

MACS	<i>Magnetic Cell Sorting</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
MIP-1 α,β	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1</i>
MOI	Multiplizität der Infektion
mRNA	<i>messenger RNA</i>

N

n	nano
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle

P

PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PAMP	pathogenassoziierte molekulare Muster (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PE	Phycoerythrin
PE Cy7	Phycoerythrin-Cy7
PerCP	<i>Peridinin-chlorophyll-protein complex</i>
pH	negative dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration (lat. <i>potentia Hydrogenii</i>)
PI	Propidiumiodid
pit-1/2	<i>inorganic phosphate transporter</i>
pol	Polymerase
pro	Protease

R

RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	Rous Sarkom Virus
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase

S

SFFU	<i>spleen focus forming units</i>
SFFV	<i>spleen focus forming virus</i>
SFV	Simianes Foamyvirus
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
ss	Einzelsträngig (<i>single-stranded</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>sideward scatter</i>)
SPF	Speziell pathogenfrei

T

Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
Tetr	Tetramer
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>Transforming Growth Factor</i>)
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-ähnlicher-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor

U

U	Units
---	-------

W

wk	Wochen (weeks)
wpi	Wochen nach Depletion (weeks post injection)

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Schematischer Aufbau eines Retrovirus (131).....	2
Abbildung 1.2 Repräsentative Genome einfacher (MuLV) und komplexer (HIV-1) Retroviren.....	3
Abbildung 1.3 Replikationszyklus von Retroviren.....	5
Abbildung 1.4 Mechanismen der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität.....	17
Abbildung 1.5 Natürliche und induzierte regulatorische T-Zellen.....	18
Abbildung 1.6 Protektive Immunität durch regulatorische T-Zellen.....	23
Abbildung 1.7 Regulatorische T-Zellen induzieren eine Immunpathologie.....	24
Abbildung 3.1 Funktionsweise eines Durchflusszytometers (verändert nach (105)).	50
Abbildung 3.2 Aufbau eines MHC Klasse I-Tetramers (verändert nach (36)).....	53
Abbildung 3.3 Depletion von CD8 ⁺ T-Zellen.....	54
Abbildung 3.4 Depletion regulatorischer T-Zellen.....	55
Abbildung 3.5 Nachweis von Zellen nach Proliferation.....	58
Abbildung 4.1 FV-spezifische zytotoxische Aktivität von CTL in verschiedenen Organen FV-infizierter Mäuse.....	61
Abbildung 4.2 Kinetik der zytotoxischen Aktivität in der Milz und im Knochenmark FV-infizierter Mäuse.....	63
Abbildung 4.3 Anzahl regulatorischer T-Zellen in Mäusen 10 Tage nach Infektion mit verschieden hohen Dosen FV.....	65
Abbildung 4.4 Korrelation von Effektorzellanzahl und der Anzahl an regulatorischen T-Zellen in FV-infizierten Mäusen.....	66
Abbildung 4.5 Versuchsschema zur Depletion von CD8 ⁺ T-Zellen in der akuten FV-Infektion.....	67
Abbildung 4.6 Anzahl regulatorischer T-Zellen in FV-infizierten Mäusen nach Depletion von CD8 ⁺ T-Zellen.....	68
Abbildung 4.7 Versuchsschema zur Behandlung naiver und akut infizierter Mäuse mit BrdU.....	69
Abbildung 4.8 Proliferation von regulatorischen T-Zellen nach FV-Infektion.....	70
Abbildung 4.9 Untersuchung zur <i>in vivo</i> Konversion von Foxp3 ⁻ T-Zellen zu Foxp3 ⁺ regulatorischen T-Zellen während einer FV-Infektion.....	71
Abbildung 4.10 Versuchsschema zur Depletion von regulatorischen T-Zellen in der akuten Infektion.....	73

Abbildung 4.11 Zytokinproduktion von CD8 ⁺ T-Zellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen in FV-infizierten Mäusen	74
Abbildung 4.12 Verbesserte Zytotoxizität von CD8 ⁺ T-Zellen in FV-infizierten Mäusen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen 10 Tage nach Infektion	76
Abbildung 4.13 CD8 ⁺ Effektorzellantwort in DEREK Mäusen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion	79
Abbildung 4.14 Histologie von exemplarisch untersuchten Lymphknoten einer naiven, einer 10 Tage infizierten, und einer 10 Tage infizierten Maus nach Depletion von regulatorischen T-Zellen.....	81
Abbildung 4.15 Vergleich der Viruslast in der chronischen Phase nach Infektion mit FV oder FV+LDV	83
Abbildung 4.16 Viruslast in verschiedenen Lymphatischen Organen während der chronischen Infektion.....	84
Abbildung 4.17 Versuchsschema zur Depletion von regulatorischen T-Zellen während der chronischen Infektion.....	85
Abbildung 4.18 Depletion regulatorischer T-Zellen in chronische infizierten DEREK Mäusen.....	86
Abbildung 4.19 Anzahl CD8 ⁺ CD43 ⁺ Effektorzellen in der chronischen FV-Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen	87
Abbildung 4.20 Anzahl FV-spezifischer CD8 ⁺ CD43 ⁺ Effektorzellen in der chronischen Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen	88
Abbildung 4.21 Versuchsschema zur Depletion von regulatorischen T-Zellen in der chronischen Infektion bei gleichzeitiger Behandlung mit BrdU	89
Abbildung 4.22 Proliferation von Effektorzellen und FV-spezifischen Effektorzellen in der chronischen Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen	90
Abbildung 4.23 Produktion verschiedener Zytokine in CD8 ⁺ T-Zellen von chronisch infizierten Mäusen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen	92
Abbildung 4.24 Prozentualer Anteil verschiedener zytokinproduzierender CD8 ⁺ T-Zellen in der chronischen Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen	94
Abbildung 4.25 Anzahl GzmB-produzierender Effektorzellen in der chronischen Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen.....	95
Abbildung 4.26 Anzahl degranulierender CD8 ⁺ Effektorzellen in der chronischen Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen.....	97

Abbildung 4.27 Elimination von Peptid-beladenen Zielzellen in der chronischen Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen.....	98
Abbildung 4.28 Elimination von Peptid-beladenen Zielzellen in verschiedenen Organen chronisch infizierter Mäuse nach Depletion von regulatorischen T-Zellen.....	99
Abbildung 4.29 Viruslast in der chronischen Infektion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen.....	101
Abbildung 4.30 Anzahl regulatorischer T-Zellen in chronisch infizierten Tieren 5 Wochen nach Depletion	102
Abbildung 4.31 Funktion von CD8 ⁺ Effektorzellen in chronisch infizierten Mäusen unmittelbar nach Depletion von regulatorischen T-Zellen und 5 Wochen danach	103
Abbildung 4.32 Versuchsschema zur Mehrfachdepletion von regulatorischen T-Zellen in der chronischen Infektion.....	104
Abbildung 4.33 Auswirkung einer mehrfachen Depletion von regulatorischen T-Zellen auf die Viruslast in der chronischen Infektion	105
Abbildung 4.34 Versuchsschema zur Depletion von regulatorischen T-Zellen und CD8 ⁺ T-Zellen in der chronischen Infektion	106
Abbildung 4.35 Viruslast nach Depletion von regulatorischen T-Zellen und CD8 ⁺ T-Zellen in der chronischen Infektion.....	107

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Verwendete Geräte.....	34
Tabelle 2.2 Verwendete Materialien	35
Tabelle 2.3 Puffer und Medien.....	38
Tabelle 2.4 Verwendete Antikörper	39
Tabelle 2.5 Charakterisierung der Fluorochrome	40
Tabelle 2.6 Verwendete Standardtests.....	40
Tabelle 2.7 Verwendete Zelllinien.....	41

8.4 Publikationen

1. Regulatory T cells suppress antiviral immune responses and increase viral loads during acute infection with a lymphotropic retrovirus.
Zelinsky G, Dietze KK, Sparwasser T, Dittmer U.
PLoS Pathog. 2009 Aug;5(8):e1000406. Epub 2009 Aug 28.
2. The regulatory T-cell response during acute retroviral infection is locally defined and controls the magnitude and duration of the virus-specific cytotoxic T-cell response.
Zelinsky G, Dietze KK, Hüsecken YP, Schimmer S, Nair S, Werner T, Gibbert K, Kershaw O, Gruber AD, Sparwasser T, Dittmer U.
Blood. 2009 Oct 8;114(15):3199-207. Epub 2009 Aug 11.
3. Polyinosinic-Polycytidylic Acid Treatment of Friend Retrovirus-Infected Mice Improves Functional Properties of Virus-Specific T Cells and Prevents Virus-Induced Disease.
Gibbert K, Dietze KK, Zelinsky G, Lang KS, Barchet W, Kirschning CJ, Dittmer U.
J Immunol. 2010 Nov 15;185(10):6179-89. Epub 2010 Oct 13
4. Transient depletion of regulatory T cells in transgenic mice reactivates virus-specific CD8⁺ T cells and reduces chronic retroviral setpoints
Dietze KK, Zelinsky G, Gibbert K, Schimmer S, Francois S, Myers L, Sparwasser T, Hasenkrug KJ, Dittmer U.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Feb 8;108(6):2420-5. Epub 2011 Jan 24.

8.5 Danksagung

Ich danke an erster Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulf Dittmer für die gute Betreuung meiner Arbeit sowie die Gewährung großer wissenschaftlicher Freiräume. Durch ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und seinen kompetenten Rat hat er maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beigetragen.

Ich danke Prof. Dr. Roggendorf für die Möglichkeit, meine Arbeit in seinem Institut angefertigt haben zu können.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei unserem Kooperationspartner Kim Hasenkrug bedanken.

Bei Kathrin, Gennadiy, Nicole, Simone, Savita, Ilseyar, Volker, Tanja, Wibke, Nora, Jara, Sonja, Sandra und Ady möchte ich mich für die wirklich gute Zeit, für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor und die (nicht immer) fachbezogenen Diskussionen und Gespräche zur Vergrößerung des Allgemeinwissens bedanken. Ein großer Dank geht insbesondere an Kathrin, für die vielen guten Tipps, die große Unterstützung und die lustige gemeinsame Zeit im Büro. Ebenso geht ein besonderer Dank an Simone, die eine große Hilfe bei den Experimenten mit einer Vielzahl an Mäusen war und immer ein offenes Ohr für mich hatte. Bei Wibke möchte ich mich an dieser Stelle für die in das leidige Korrekturlesen meiner Arbeit investierte Zeit bedanken.

Allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Virologie sei für die freundschaftlich kollegiale Zusammenarbeit gedankt.

Großer Dank gilt auch den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 1045 und des Transregio 60, für die wissenschaftliche Unterstützung und die Diskussionen und Anregungen in netter Atmosphäre.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für die ständige Unterstützung bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Mann Tobias für die rückhaltlose Unterstützung, das große Verständnis und für die große Gabe, mich immer liebevoll wieder aufmuntern zu können.

8.6 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

8.7 Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Selektive Depletion von regulatorischen T-Zellen zur Verstärkung der CD8⁺ T-Zellantwort während einer Infektion der Maus mit dem Friend Retrovirus*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Kirsten Dietze befürworte.

Essen, den _____

Ulf Dittmer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Kirsten Dietze

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Kirsten Dietze