

Aus dem Institut für Virologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Nipahvirus-induzierte Zytokinantwort in porcinen und humanen respiratorischen Epithelzellen

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Mareike Elvert
aus Rostock

Marburg, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
10.12.2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin.

Dekan i.V. der Prodekan: Prof. Dr. R. Müller

Referent: Prof. Dr. Andrea Maisner

1. Korreferent: Prof. Dr. Stefan Bauer

Für meine Familie

„Like I'm close to something real
I want to find something I've wanted all along
Somewhere I belong“

L.P.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary	3
I Einleitung.....	5
1.1 Das Nipahvirus.....	5
1.1.1 Epidemiologie.....	5
1.1.2 Verlauf einer NiV _{Malaysia} -Infektion im Schwein.....	8
1.1.3 Verlauf einer NiV _{Malaysia} -Infektion im Menschen	10
1.1.4 Taxonomie, Aufbau und Replikation von Nipahviren	11
1.2 Aufbau und Zellzusammensetzung der Lunge	15
1.2.1 Obere und untere Abschnitte der Atemwege von Mensch und Schwein	15
1.2.2 Zelltypen des Atemwegsepithels	17
1.2.3 Allgemeine Schutzmechanismen gegenüber Pathogenen.....	18
1.3 Die angeborene Immunantwort zur Abwehr von Virusinfektionen	19
1.3.1 Erkennung viraler RNA durch RIG-I und TLR3	19
1.3.1.1 TLR3-Signalweg	20
1.3.1.2 RIG-I-Signalweg	20
1.3.2 Proinflammatorische Zytokine und Entzündungsantwort in der Lunge	22
1.3.3 Typ-I und Typ-III Interferone und Interferon-stimulierte Gene (ISGs).....	23
1.3.3.1 Interferone	23
1.3.3.2 IFN-Rezeptoren	24
1.3.3.3 IFN-Signalkaskade	24
1.3.4 Antivirale Wirkung von ISGs.....	26
1.3.4.1 OAS.....	26
1.3.4.2 PKR	27
1.3.4.3 IFITs	27
1.3.4.4 Tetherin	28
1.3.5 Zytokin- und Entzündungsantwort in der Lunge bei einer NiV _{Malaysia} -Infektion <i>in vivo</i>	29
1.4 Fragestellung	33
II Ergebnisse	34
2.1 Vergleich von primären humanen Epithelzellen aus verschiedenen Tracheal- und Bronchialabschnitten (HTEpC, HBEpC und HSAEpC).....	34
2.1.1 NiV-Infektion und IFN-Induktion in HTEpC und HBEpC.....	34

2.1.2 NiV-Infektion und IFN- und ISG-Expression in humanen Bronchial-Epithelzellen aus dem oberen und unteren Bronchialabschnitt (HBEpC, HSAEpC)	36
2.1.2.1 NiV-Infektion und Zytokin-Induktion in HBEpC und HSAEpC	36
2.1.2.2 NiV-Rezeptorexpression in HBEpC und HSAEpC	38
2.1.2.3 IFNLR1-Expression in HBEpC und HSAEpC	40
2.1.2.4 Die unterschiedliche Menge an IFN- λ -Rezeptoren (IFNLR1) auf der Zelloberfläche von HBEpC (P9) und HSAEpC (P6) korreliert mit der IFN- λ -Sensitivität ..	42
2.2 Vergleich von primären porcinen Epithelzellen aus verschiedenen Tracheal- und Bronchialabschnitten (PTEpC, PBEpC und PSAEpC)	43
2.2.1 NiV-Infektion und IFN-Induktion in PTEpC, PBEpC und PSAEpC	43
2.2.2 Induktion von IFNs und proinflammatorischen Zytokinen in NiV-infizierten PTEpC, PBEpC und PSAEpC (24 h und 48 h p.i.)	44
2.3 Spezies-spezifische Unterschiede in NiV-infizierten HBEpC und PBEpC	49
2.3.1 NiV-vermittelte Zytokin-Induktion in HBEpC und PBEpC	49
2.3.1.1 Unterschiede in der IFN-Induktion und NiV-Replikation in HBEpC und PBEpC ..	49
2.3.1.2 Unterschiede in der Zytokin-Induktion in HBEpC und PBEpC, die die gleiche Menge viraler RNA in den Zellen exprimieren	51
2.3.1.3 Relative Zytokin-Induktion in HBEpC und PBEpC verschiedener Donore und Infektionsdosen	52
2.3.2 Unterschiede in der Poly(I:C) vermittelten Zytokin-Induktion in HBEpC und PBEpC.	54
2.3.3 Unterschiede in der NiV-Replikation und Virusfreisetzung in HBEpC und PBEpC	59
2.4 Hemmung der NiV-Infektion durch CSA in respiratorischen Epithelzellen	61
2.4.1 Einfluss von CSA auf die NiV-Infektion in Calu-3-Zellen	61
2.4.2 Einfluss von CSA auf die NiV-Infektion in HBEpC und PBEpC	62
2.5 Porcine <i>ex vivo</i> Lungenschnitte als Modellsystem	65
2.5.1 Etablierung der porcinen <i>ex vivo lung slice cultures</i> (LS)	65
2.5.2 Infektion von porcinen <i>ex vivo</i> Lungenschnitten mit rNiV _{eGFP}	66
III Diskussion	68
3.1 Verwendung von primären humanen und porcinen Epithelzellkulturen	68
3.2 Die humanen Bronchial-Epithelzellen reagieren mit einer stärkeren Zytokinantwort auf die NiV-Infektion als die Tracheal- und <i>Small-Airways</i> -Epithelzellen	69
3.3 Die Induktion von Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen unterscheidet sich in porcinen Tracheal-, Bronchial- und <i>Small-Airways</i> -Epithelzellen nach der NiV-Infektion	71
3.4 Die NiV-Infektion induziert Spezies-spezifische Zytokinantworten in primären humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen	73
3.5 Die durch Poly(I:C) induzierte TLR3-abhängige Antwort unterscheidet sich von der NiV-induzierten Zytokinantwort in HBEpC und PBEpC	75
3.6 Die Virus-Freisetzung unterscheidet sich in primären PBEpC und HBEpC	76

3.7	Cylosporin A hemmt die NiV-Infektion in Calu-3, HBEpC und PBEpC	77
3.8	Verwendung von porcinen <i>ex vivo</i> Lungenschnitten als Modellsystem für künftige Inhibitor-Testungen.....	78
IV	Material.....	81
V	Methoden.....	87
5.1	Molekularbiologische Methoden	87
5.1.1	RNA Isolierung.....	87
5.1.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren	88
5.1.3	cDNA-Synthese.....	89
5.1.4	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR (qPCR).....	90
5.1.5	Auswertung der qPCR	93
5.1.6	Erstellung einer Standardkurve zur Quantifizierung von NiV-N RNA im Überstand infizierter Zellen	94
5.1.7	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel.....	96
5.2	Zellbiologische Methoden.....	97
5.2.1	Zellkultur permanenter Zelllinien.....	97
5.2.2	Zellkultur primärer Zellen.....	98
5.2.2.1	Isolierung von porcinen Tracheal-, Bronchial- und <i>Small-Airways</i> -Epithelzellen	98
5.2.2.2	Kollagenbeschichtung	100
5.2.2.3	Charakterisierung der isolierten porcinen Tracheal-, Bronchial- und <i>Small-Airways</i> -Epithelzellen	101
5.2.2.4	Passagieren von primären Zellen.....	103
5.2.2.5	Einfrieren und Auftauen von primären Zellen	103
5.2.3	Zellzahlbestimmung	104
5.2.4	Behandlung der Zellen mit Zytokinen und Inhibitoren	104
5.2.4.1	Behandlung der Zellen mit IFN- λ	104
5.2.4.2	Behandlung der Zellen mit Poly(I:C).....	105
5.2.4.3	Behandlung der Zellen mit CSA.....	105
5.2.5	Etablierung von porcinen <i>ex vivo</i> Lungenschnitten	105
5.2.5.1	Präparation von porcinen <i>ex vivo</i> Lungenschnitten (LS).....	105
5.2.5.2	Kultivierung von porcinen <i>ex vivo</i> Lungenschnitten	107
5.3	Immunologische Methoden	108
5.3.1	FACS Analyse von primären Zellen.....	108
5.4	Virologische Methoden	109
5.4.1	Titerbestimmung mittels TCID ₅₀ (<i>Reed and Muench</i> Methode)	109
5.4.2	Infektion von permanenten und primären Zellen mit rNiV _{eGFP}	110
5.4.3	Infektion von porcinen Lungenschnitten	111

VI	Literaturverzeichnis.....	112
VII	Anhang	128
A.1	Abkürzungsverzeichnis.....	128
A.2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	134
A.3	Publikationsliste	137
A.4	Verzeichnis der akademischen Lehrer	139
A.5	Lebenslauf	140
A.6	Danksagung	141
A.7	Ehrenwörtliche Erklärung.....	142

Zusammenfassung

Das hochpathogene Nipahvirus (NiV), das zu dem Genus *Henipavirus* in der Familie *Paramyxoviridae* gehört, führt seit 1998 zu Ausbrüchen in Südostasien. Dabei verursacht das Virus schwere Erkrankungen in verschiedenen Spezies und hohe Letalitätsraten beim Menschen, wogegen es keine Behandlungsmöglichkeit oder Impfung gibt. Aus diesen Gründen ist das NiV in die höchste biologische Sicherheitsstufe 4 (BSL-4) eingestuft. Aufgrund der Schwere der Krankheitsverläufe befinden sich Nipahviren auf der *R&D Blueprint list of priority diseases* der *World Health Organization* (WHO), die die Erforschung dieser Viren als Priorität eingestuft hat. Beim ersten bekannten Ausbruch 1998/1999 in Malaysia und Singapur wurde das NiV von Flughunden, dem Virusreservoir, auf Schweine übertragen. Diese entwickelten eine starke symptomatische Entzündung der Lunge und konnten das Virus über Sekrete auch auf Menschen übertragen. Infizierte Menschen entwickelten eine schwere Enzephalitis, zeigten aber im Vergleich zu Schweinen nur selten respiratorische Symptome oder eine Virusausscheidung in Atemwegssekreten. Da sich die Genomsequenzen der Virusisolate aus Schweinen und Menschen nicht unterscheiden, deutet die unterschiedlich starke Beteiligung der Atemwege während der NiV-Infektion auf Wirtsspezies-spezifische Unterschiede hin.

Unsere Arbeitsgruppe hat bereits gezeigt, dass der Eintrittsrezeptor für NiV (Ephrin-B2) in humanen und porcinen Atemwegsepithelzellen unterschiedlich stark exprimiert wird, was auch einen gewissen Einfluss auf die Infektionseffizienz hatte. In dieser Arbeit sollten nun weitere Wirtsfaktoren identifiziert werden, die einen Einfluss auf die NiV_{Malaysia}-Infektion in den Atemwegsepithelien haben könnten. Zu diesem Zweck wurden Infektionsstudien in primären humanen und porcinen respiratorischen Epithelzellen durchgeführt. Dabei wurde die NiV-Replikation, die Freisetzung infektiöser Viruspartikel und die angeborene Immunantwort in infizierten Zellen, genauer die Induktion von Interferonen (IFN), Interferon-stimulierten Genen (ISGs) und proinflammatorischen Zytokinen untersucht. Die Infektion von Epithelzellen aus verschiedenen humanen und porcinen Lungenabschnitten (Trachea, Bronchien, *Small-Airways*) ergab, dass alle Atemwegskulturen mit einer deutlichen Hochregulierung von Typ-III IFN, vor allem von IFN- λ 2,3 (human) bzw. IFN- λ 3 (porcin), reagierten. Dabei zeigten humane und porcine Bronchial-Epithelzellen eine deutlich stärkere IFN-Antwort als NiV-infizierte Epithelzellen aus der Trachea oder den *Small-Airways*.

Neben den quantitativen Unterschieden in der IFN-Antwort der Zellen aus den verschiedenen Lungenabschnitten konnten in dieser Arbeit eindeutige Spezies-spezifische Unterschiede in der Zytokin-Induktion nachgewiesen werden. Direkte Vergleichsstudien von NiV-infizierten humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC) ergaben, dass bei gleich effizienter Virusreplikation (gemessen über die intrazellulären Virus-RNA-Mengen) die Typ-III

IFN- und ISG-Antwort in den PBEpC im Vergleich zu den HBEpC deutlich vermindert war. Die Virusfreisetzung, das heißt die Virustiter im Zellüberstand, waren in PBEpC erhöht. Dies spricht dafür, dass das NiV in porcinen Bronchial-Epithelzellen eine relativ geringe antivirale Antwort induziert und sich produktiv vermehrt. Die Infektionsstudien haben weiterhin gezeigt, dass die NiV-Infektion in den porcinen Bronchial-Epithelzellkulturen trotz der schwachen IFN- und ISG-Antwort eine eindeutige Expression von proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-8) induziert.

Insgesamt geben die vergleichenden Infektionsstudien klare Hinweise darauf, dass Unterschiede in der Zytokinantwort wichtige Wirtsspezies-spezifische Faktoren darstellen, die die NiV-Infektion in der menschlichen und porcinen Lunge beeinflussen könnten. Auf Basis der Ergebnisse könnte man die *in vivo* beobachteten Unterschiede in der respiratorischen Symptomatik und der Virusausscheidung in Atemwegssekreten wie folgt erklären: Eine NiV-Infektion der Lunge führt beim Menschen zu einer moderaten proinflammatorischen Antwort, induziert aber eine effiziente IFN-abhängige antivirale Immunantwort, die letztendlich die Virusproduktion limitiert. Im Gegensatz dazu kommt es in Schweinen bei einer NiV-Infektion der Lunge zu einer ausgeprägten inflammatorischen Antwort, aber einer geringen IFN-abhängigen Hemmung der Virusvermehrung, was die ausgeprägte respiratorische Symptomatik bei Schweinen und die produktive Virusausscheidung über Atemwegssekrete erklären könnte.

Da die bisherigen Untersuchungen stark darauf hinweisen, dass IFN- λ eine wichtige Rolle bei der antiviralen Immunantwort in Bronchial-Epithelzellen spielt, wurde in nachfolgenden Infektionsstudien die Wirkung von Cyclosporin A (CSA) untersucht. Für CSA wurde kürzlich ein IFN- λ abhängiger inhibitorischer Effekt auf MERS-Coronaviren beobachtet. Tatsächlich führte eine CSA-Behandlung der primären humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen zu einer Typ-III IFN-Hochregulierung und zu einer eindeutigen Hemmung der NiV-Infektion. Ob CSA ein möglicher Behandlungsansatz ist, um die NiV-Infektion in der Lunge zu hemmen, soll in Zukunft in komplexeren primären Zellkulturmodellen getestet werden, die größere intakte Epithelverbände mit verschiedenen epithelialen und submukosalen Zelltypen enthalten. Deshalb wurde im letzten Teil der Arbeit eine Methode zur Herstellung von Lungenschnitten, sogenannte *porcine ex vivo lung slices cultures* etabliert. Die aus frischen Schweinelungen gewonnenen Lungenschnitte waren über mehrere Tage vital und die Infektion mit einem rekombinanten NiV_{eGFP} konnte über den Nachweis autofluoreszierender NiV-positiver Zellen am Bronchuslumen und im Lungengewebe erfolgreich nachgewiesen werden. Somit steht nun ein System zur Verfügung, mit dem in Zukunft NiV-Inhibitorstudien in einem komplexen *ex vivo* Zellmodell durchgeführt werden können.

Summary

The highly pathogenic Nipah virus (NiV), which belongs to the genus *Henipavirus* in the family *Paramyxoviridae* causes outbreaks of infection in Southeast Asia since 1998. NiV induces severe diseases in various species and high mortality rates in humans, while no treatment or vaccination is available. For these reasons, NiV is classified as a biological safety level 4 (BSL-4) pathogen. Due to severe course of disease, NiV is listed on the R&D Blueprint list of priority diseases of the World Health Organization (WHO). This list contains viruses prioritized for further research.

During the first outbreak in Malaysia and Singapore in 1998/1999, NiV was transmitted from the virus reservoir, fruit bats, to pigs. Infected pigs showed a severe symptomatic inflammation of the lung and transmitted the virus also to humans via secretions. Infected humans developed severe encephalitis but rarely showed respiratory symptoms or virus shedding in airway secretions. Because the genome sequences of NiV isolates from pigs and humans do not differ, the variations in the respiratory involvement indicate host species-specific differences.

Our research group already revealed that the entry receptor for NiV (Ephrin-B2) is differently expressed in human and porcine respiratory epithelial cells, which also influenced the infection efficiency. The aim of this work was to identify further host factors that influence NiV_{Malaysia} infection in airway epithelia. Therefore, infection studies in primary human and porcine respiratory epithelial cells were performed. NiV replication, the release of infectious virus particles and innate immune responses, namely the induction of interferons (IFNs), interferon-stimulated genes (ISGs) and proinflammatory cytokines, were investigated. NiV infection of human and porcine epithelial cells from different parts of the lung (trachea, bronchia, small airways) showed that all epithelial cells reacted with an upregulation of type III IFN, especially IFN- λ 2,3 (human) or IFN- λ 3 (porcine). Both, human and porcine bronchial epithelial cells showed higher IFN responses to NiV compared to epithelial cells from the trachea or small airways.

In addition to quantitative differences in the IFN response in cells from different parts of the lung, this work revealed clear species-specific differences in cytokine induction. Direct comparative studies of NiV-infected human and porcine bronchial epithelial cells (HBEpC and PBEpC) showed that, despite similar replication rates (measured via the intracellular viral RNA content), the type III IFN and ISG responses in PBEpC were significantly reduced compared to HBEpC. The release of infectious virus particles (virus titres in the cell supernatant) was increased in PBEpC. This suggests that NiV induces a relatively low antiviral response in porcine bronchial epithelial cells and replicates productively. The infection studies of this work have further shown that, despite the limited IFN and ISG response, NiV infection induced a prominent expression of proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8) in porcine bronchial epithelial cell cultures.

Altogether, the comparative infection studies in this work provide the first clear evidence that differences in cytokine response are important host species-specific factors that could influence NiV infection in the human and porcine lung. Based on these results, the differences observed *in vivo* in respiratory symptoms and virus shedding in respiratory secretions might be explained as follows: In humans, NiV infection in the lung triggers a moderate proinflammatory response and induces an efficient IFN-dependent antiviral immune response, which in turn limits virus production. In contrast, NiV infection in pigs causes a pronounced inflammatory response in the lung. The IFN-dependent inhibition of virus replication is limited, which may explain the prominent respiratory symptoms in pigs and the productive virus shedding via airway secretions.

Since IFN- λ appears to play an important role in the antiviral immune response in bronchial epithelia, the effects of cyclosporine A (CSA) were analyzed, which was recently found to cause an IFN- λ dependent inhibitory effect on MERS coronaviruses. In fact, CSA treatment of primary human and porcine bronchial epithelial cells resulted in type III IFN upregulation and a strong inhibition of NiV infection. Whether CSA is a possible therapeutic approach to inhibit NiV infection in the lung, should be tested in the future in a more complex primary cell culture models containing larger intact epithelial layers with diverse epithelial and submucosal cell types. Therefore, in the last part of this work, a method to generate lung slices, so-called porcine *ex vivo* lung slices cultures, was established. The lung slices prepared from fresh pig lungs were viable for several days and infection with recombinant NiV_{eGFP} could be successfully detected by autofluorescent NiV-positive cells in the bronchial lumen and the lung tissue. Thus, a system is available for future NiV inhibitor studies in a complex *ex vivo* cell model.

I Einleitung

1.1 Das Nipahvirus

1.1.1 Epidemiologie

Ende September 1998 bis Mai 1999 kam es beginnend in der Nähe von Ipoh, im Staat Perak in Malaysia zum ersten und bis heute größten Ausbruch des bis dahin unbekanntes Nipahvirus (NiV_{Malaysia}). Es wurde bei infizierten Menschen eine akute fieberhafte Enzephalitis mit hoher Sterblichkeitsrate beobachtet. Neben Erkrankungen im Menschen traten in lokalen Schweinebetrieben zahlreiche Atemwegserkrankungen und neurologische Veränderungen bei Schweinen auf (CDC, 1999; Looi *and* Chua, 2007). Bevor das Virus identifiziert und ein Zusammenhang zwischen den Erkrankungen in Menschen und Schweinen hergestellt werden konnte, wurden infizierte Schweine u.a. nach Sikamat, Sungai Nipah, Bukit Pelanduk (Staat Negeri Sembilan) und nach Sepang, Sungai Buloh (Staat Selangor) weiterverkauft und so das Virus in Malaysia und durch Exporte auch nach Singapur verbreitet (Paton *et al.*, 1999; Mohd Nor und Ong, 2000; Looi und Chua, 2007).

Das Nipahvirus wurde nach der Isolierung aus einem Patienten aus Sungai Nipah identifiziert und nach diesem Dorf benannt (Mohd Nor und Ong, 2000; Looi und Chua, 2007). Fruchtfressende Flughunde der Gattungen *Pteropus* und *Eidolon* wurden als natürliche Wirte für das Nipahvirus identifiziert (Yob *et al.*, 2001; Hayman *et al.*, 2008).

Die Virus-Übertragung von Flughunden auf Schweine erfolgte vermutlich auf einer Farm (Index-Farm) in Perak, Malaysia. Ab den 1970er Jahren bis zum NiV-Ausbruch 1998/99 verdreifachte sich die Schweinehaltung sowie der Mango-Anbau in Malaysia und landwirtschaftliche Flächen wurden häufig für beides gleichzeitig genutzt. Um die Index-Farm herum befanden sich beispielsweise hunderte von Mangobäumen (Pulliam *et al.*, 2012). Das Virus wurde vermutlich 1997 mehrfach über mit Speichel kontaminierte angefressene Früchte oder Kot und Urin von den Flughunden auf Schweine der Farm übertragen (Lam und Chua, 2002, Pulliam *et al.*, 2012). Das NiV hat im Fruchtfleisch von durch Flughunde kontaminierte Mangos eine Halbwertszeit bis zu 30 h (bei pH 5 und 22 °C), was die Infektion von Schweinen, die solche Früchte verzehrten, begünstigt haben könnte (Fogarty *et al.*, 2008).

Durch die enge Stallhaltung konnte sich das Virus innerhalb der Schweinepopulation durch Aerosole oder Körperflüssigkeiten wie Urin ausbreiten (Mohd Nor und Ong, 2000). Außerdem kam es über engen Kontakt zur Virus-Übertragung von Schweinen auf Menschen, vor allem auf Mitarbeiter von Schweinefarmen (Abb. 1.1 A; Chua *et al.*, 2000; Parashar *et al.*, 2000).

Zur Eindämmung des Ausbruchs wurden in betroffenen Gebieten fast eine Million Schweine von etwa 896 Farmen getötet und die Schweinefarmen über mehrere Monate überwacht. In dieser

Zeit wurden Schweine von weiteren 50 Farmen gekeult. Um Übertragungen von Infektionen auf Menschen vorzubeugen, wurden Schweinefarm-Mitarbeiter über die NiV-Erkrankung in Schweinen aufgeklärt und die Verwendung von Schutzausrüstung wie Handschuhen und Kittel, sowie geeignete Hygienemaßnahmen empfohlen (Mohd Nor und Ong, 2000; Lam und Chua, 2002). Der Importhandel mit lebenden Schweinen und Schweinefleisch aus Malaysia nach Singapur wurde dauerhaft eingeschränkt (Ang *et al.*, 2018). Außerdem wurde ein größerer Abstand von Schweinefarmen und Obstbäumen eingeführt (Pulliam *et al.*, 2012).

Der NiV-Ausbruch in Malaysia und Singapur endete im Mai 1999. 276 Patienten mit akuter Enzephalitis (265 in Malaysia und 11 in Singapur) wurden behandelt, von denen 106 verstarben (Letalität von 38 %, Chua *et al.*, 2000).

Seit dem Ausbruch von 1998/1999 kam es zu keinen weiteren NiV-Ausbrüchen in Malaysia und Singapur. Allerdings kommt es seit 2001 zu fast jährlichen NiV-Ausbrüchen in Bangladesch und vereinzelt auch in Indien. Bei diesen Ausbrüchen, die durch den NiV-Bangladesch-Stamm (NiV_{Bangladesch}) verursacht werden, wird das Virus vermutlich über von Flughunden kontaminierten Palmsaft auf Menschen übertragen. Alle Ausbrüche in Südostasien fanden zwischen Dezember und Mai statt, was für saisonale Faktoren, wie zum Beispiel die Palmsaft-Ernte spricht (Chattu *et al.*, 2018). Der Palmsaft wird gewonnen, in dem die Rinde der Dattel-Palme angeritzt und der Saft in einem Gefäß über Nacht gesammelt wird. Die Flughunde trinken nachts von dem Saft und können ihn so mit Speichel, Urin oder Kot verunreinigen (Luby *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2010). Die Gefäße mit frischem Palmsaft werden früh am Morgen geerntet, verkauft und häufig sofort roh verzehrt, da der Saft über die Zeit seine Süße verliert (Luby *et al.*, 2006). Bei den Ausbrüchen in Bangladesch und Indien kommt es häufig zur Weiterverbreitung des Virus durch direkte Mensch-zu-Mensch-Übertragungen (Abb. 1.1 B). Dabei sind Mitarbeiter im Gesundheitswesen besonders gefährdet. Die durchschnittliche Letalität bei den jüngeren NiV_{Bangladesch}-Ausbrüchen ist mit 70 % viel höher als beim Ausbruch in Malaysia (Ang *et al.*, 2018).

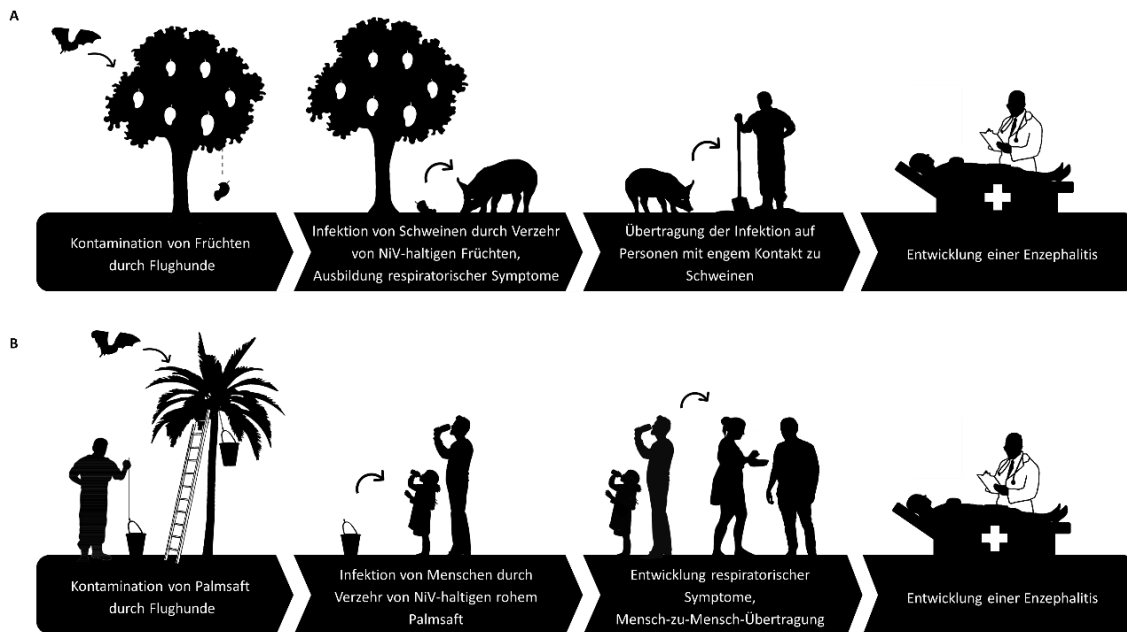


Abb. 1.1: Übertragungswege des Nipahvirus (Grafische Gestaltung: Hannes Müller, TourTouch UG, 2020).

(A) Ausbruch in Malaysia und Singapur 1998/1999

(B) Ausbrüche in Bangladesch und Indien seit 2001 (häufigste Übertragungswege)

Der aktuellste NiV-Ausbruch fand im Mai 2018 in der Stadt Kozhikode im Staat Kerala, Südindien statt. Bei diesem Ausbruch kam es zu 18 bestätigten humanen NiV-Infektionen, von denen 16 verstarben, was einer Letalität von 89 % entspricht. Es wird davon ausgegangen, dass sich Patient Null (nicht bestätigte NiV-Infektion) über Kontakt mit Flughunden oder durch Flughunde kontaminierte Früchte mit dem NiV angesteckt hat. Alle weiteren Infektionen konnten auf direkte Mensch-zu-Mensch-Übertragung in drei verschiedenen Krankenhäusern zurückgeführt werden. Der Ausbruch wurde eingedämmt durch strikte Infektionskontrollen, Aufklärung und Screening von Kontaktfällen (Thomas *et al.*, 2019; Pallivalappil *et al.*, 2020).

Alle bisherigen NiV-Ausbrüche sind in Abb. 1.2 zusammengefasst.

Zeitpunkt	Land	humane Infektionen	Todesfälle	Letalität
September 1998 - Mai 1999	Malaysia, Singapur	276 (265 Malaysia, 11 Singapur)	106 (105 Malaysia, 1 Singapur)	38 %
Januar-Februar 2001	Indien	66	45	68 %
April-Mai 2001	Bangladesch	13	9	69 %
Januar 2003	Bangladesch	12	8	67 %
Januar 2004	Bangladesch	31	23	74 %
April 2004	Bangladesch	36	27	75 %
Januar-März 2005	Bangladesch	12	11	92 %
Januar-Februar 2007	Bangladesch	7	3	43 %
Marz 2007	Bangladesch	8	5	63 %
April 2007	Bangladesch	3	1	33 %
April 2007	Indien	5	5	100 %
Februar 2008	Bangladesch	4	4	100 %
April 2008	Bangladesch	7	5	71 %
Januar 2009	Bangladesch	4	1	25 %
Februar-März 2010	Bangladesch	16	14	88 %
Januar-Februar 2011	Bangladesch	44	40	91 %
Februar 2012	Bangladesch	12	10	83 %
Januar-April 2013	Bangladesch	24	21	88 %
2014	Bangladesch	18	9	50 %
2015	Bangladesch	9	6	67 %
Mai 2018	Indien	18	16	89 %
Gesamt		625	369	59 %

Abb. 1.2: Nipavirus-Ausbrüche mit Anzahl der humanen Infektionen und Letalität (Modifiziert nach Chattu *et. al.*, 2018).

1.1.2 Verlauf einer NiV_{Malaysia}-Infektion im Schwein

Die NiV-Infektion im Schwein kann asymptomatisch, mild oder stark symptomatisch verlaufen. Die Inkubationszeit betrug etwa 7-14 Tage. Die symptomatische Krankheit wurde auch als „porcines respiratorisches und enzephalitisches Syndrom“ bezeichnet, das sich altersabhängig unterschiedlich manifestierte. Jüngere Schweine (bis zu sechs Monate alt) bildeten im

symptomatischen Verlauf Fieber und respiratorische Symptome mit schwerfälliger Atmung und einem auffällig lauten bellenden „Brüllhusten“ aus. Bei schweren Verläufen kamen Bluthusten und neurologische Symptome, wie Spasmen, Lähmungen und ein unkoordinierter Bewegungsablauf hinzu (Mohd Nor und Ong, 2000).

Ältere Tiere (ab sechs Monaten) konnten ähnliche respiratorische Krankheitssymptome mit zusätzlicher erhöhter Speichelbildung und schleimig-eitrig bis blutiges Nasensekret entwickeln. Überwiegend kam es zu neurologischen Symptomen, wie unruhigem Verhalten, starken spastischen Anfällen, sowie Lähmungen im Mundbereich, die mit erschwerter Schluckung und heraushängender Zunge einhergingen (Mohd Nor und Ong, 2000).

Die meisten infizierten Schweine zeigten histopathologische Auffälligkeiten, wie Virus-induzierte mehrkernige Riesenzellen (Synzytien) und Einblutungen in der Lunge. In der Trachea, den Bronchien, Bronchiolen und der Lunge kam es zur Ausbildung zahlreicher Läsionen und ausgeprägter Entzündungen. In der Lunge wurden Infiltrate von Immunzellen, wie Makrophagen und Neutrophilen, gefunden. NiV-Antigene wurden vor allem in den Epithelzellen der Atemwege, der Lunge und in Endothelzellen der Blutgefäße, sowie in abgelösten Zellen, die sich im Lumen der Atemwege befanden, nachgewiesen (Mohd Nor und Ong, 2000; Chua *et al.*, 2000; Hooper *et al.*, 2001).

Schweine, die eine Meningoenzephalitis entwickelten, konnten Ödeme und eine Vaskulitis mit eingewanderten Lymphozyten, Makrophagen und Neutrophilen aufweisen. Wie in der Lunge konnte dann auch im Gehirn virales Antigen nachgewiesen werden. Die Niere zeigte in seltenen Fällen ebenfalls Entzündungen, in den renalen Epithelzellen ließ sich dann NiV-Antigen nachweisen. In anderen Organen wurden NiV-Läsionen selten beobachtet (Mohd Nor und Ong, 2000; Chua *et al.*, 2000; Hooper *et al.*, 2001).

Bei Ferkeln lag die Sterblichkeitsrate mit etwa 40 % sehr hoch, jedoch ist unklar, ob das auf einen aggressiven Verlauf der NiV-Infektion zurückzuführen war oder auf eine NiV-Erkrankung der Muttersau, die die Ferkel nicht mehr versorgen konnte. Die Letalität insgesamt lag bei den Schweinen mit 1-5 % deutlich niedriger als beim Menschen. Auffällig war jedoch die hohe Infektionsrate von fast 100 %, die sich unter anderem durch die Virusausscheidung über Atemwegsekrete und die enge Tierhaltung von Schweinen erklären lässt (Mohd Nor und Ong, 2000).

Die beobachteten respiratorischen und neurologischen Symptome und pathologischen Charakteristika der NiV-Infektion im Schwein, sowie die Übertragung auf andere Schweine ließen sich auch in experimentell infizierten Schweinen bestätigen (Middleton *et al.*, 2002; Weingartl *et al.*, 2006).

1.1.3 Verlauf einer NiV_{Malaysia}-Infektion im Menschen

Bei dem NiV-Ausbruch in Malaysia und Singapur kam es zur Virus-Übertragung auf Menschen, die in engem Kontakt mit Schweinen standen, wie auf einer Schweinefarm oder einem Schlachthof. Dabei konnte es bei Tätigkeiten wie Fütterung und Schlachtungen zum Kontakt mit infizierten Blut- und Körperflüssigkeiten der Schweine und zur NiV-Übertragung auf die überwiegend männlichen Personen kommen (Paton *et al.*, 1999; Parashar *et al.*, 2000; Goh *et al.*, 2000; Chua, 2003).

Die NiV-Infektion verursacht im Menschen eine schwere, oft tödlich verlaufende Enzephalitis. Bei den meisten infizierten Menschen betrug die Inkubationszeit bis zu zwei Wochen (Chua, 2003). Asymptomatische Verläufe wurden sehr selten beobachtet (Tan *et al.*, 1999; Chew *et al.*, 2000; Parashar *et al.*, 2000). Die Krankheit begann häufig mit Fieber. Weitere klinische Symptome wie Kopfschmerzen, Schwindel, Erbrechen, seltener Husten und Myalgien wurden auch beobachtet. Außerdem konnten sich zahlreiche neurologische Krankheitszeichen, wie unter anderem vermindertes Bewusstsein und Reflexe, Tachykardie, erhöhter Blutdruck, gestörte Augenreflexe, segmentaler Myoklonus, Krampfanfälle und Koma ausbilden. Bei Patienten, die stärkere Symptome einer Hirnstammschädigung aufwiesen, wie zum Beispiel reduziertes Bewusstsein, gestörte Augenreflexe, Tachykardie und Koma, fand sich eine höhere Letalitätsrate (Goh *et al.*, 2000; Chua *et al.*, 1999; Paton *et al.*, 1999). Nur etwa 14-27 % der Patienten zeigten respiratorische Symptome und eine Lungenentzündung wurde selten beobachtet (Paton *et al.*, 1999; Goh *et al.*, 2000; Lo und Rota, 2008).

Auffällig bei NiV-infizierten Patienten war die dominante Schädigung des Gehirns mit Beteiligung des Großhirns, Kleinhirns, Hirnstamms und des Rückenmarks. Im Zentralnervensystem (ZNS) waren viele, durch Gefäßentzündungen und -schädigungen hervorgerufene, kleinere Infarkte nachweisbar. Andere Organe wie Herz, Lunge und Niere waren ebenfalls betroffen, wenn auch nicht so stark wie das Gehirn. Virus-induzierte Synzytien waren im Blutgefäßendothel von Gehirn, Lunge und Niere erkennbar (Chua *et al.*, 1999). Virales Antigen wurde in Endothelzellen, neuronalen Zellen und Gliazellen des ZNS, sowie schwächer in Zellen von Lunge, Herz, Milz und Niere nachgewiesen (Chua *et al.*, 2000; Chua, 2003). Obwohl das Virus in einigen Fällen auch in respiratorischen Ausscheidungen und im Urin nachweisbar war, wurden Mensch-zu-Mensch-Übertragungen bei dem Ausbruch 1998/1999 nicht eindeutig beobachtet (Chua *et al.*, 2001).

Bei manchen der genesenen Patienten kam es zu bleibenden neuronalen Schädigungen (Paton *et al.*, 1999; Goh *et al.*, 2000; Chua, 2003). Außerdem entwickelten einige geheilte Patienten mehrere Wochen bis Monate nach der Erkrankung eine wiederkehrende Enzephalitis mit klinischen Symptomen (Goh *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2002).

Zurzeit ist noch keine Therapie oder Impfung gegen NiV zugelassen, allerdings gibt es mehrere Studien mit verschiedenen Impfstoff-Strategien, die im Tiermodell vielversprechende Ergebnisse lieferten (zusammengefasst in Singh *et al.*, 2019). Die rekombinante lösliche Form des Glykoproteins des Hendravirus (Bossart *et al.*, 2005), einem nahem Verwandten des NiV, wurde als Impfstoff-Kandidat gegen NiV erfolgreich in verschiedenen Tiermodellen, wie Katzen, Frettchen und grünen Meerkatzen, getestet (Mungall *et al.*, 2006; McEachern *et al.*, 2008; Bossart *et al.*, 2012; Pallister *et al.*, 2013) und befindet sich seit Anfang des Jahres 2020 als HeV-sG-Vakzine in der Phase I einer klinischen Studie (<https://clinicaltrials.gov>).

Aufgrund der schweren Erkrankungen mit hohen Letalitätsraten und dem Fehlen einer spezifischen Behandlung ist die Arbeit mit NiV unter die biologische Sicherheitsstufe-4 (BSL-4) eingeordnet (Eaton *et al.*, 2006). Durch das hohe Risikopotenzial eines Ausbruchs ohne Behandlungsmöglichkeiten sollen Nipahviren mit Dringlichkeit erforscht werden und stehen mit anderen Infektionskrankheiten auf der *Blueprint list of priority diseases* der WHO (<https://www.who.int/>).

1.1.4 Taxonomie, Aufbau und Replikation von Nipahviren

Nipahviren sind umhüllte Viren und besitzen ein lineares, einzel- und negativsträngiges RNA-Genom und gehören deshalb zur Ordnung der *Mononegavirales*, zur Virusfamilie *Paramyxoviridae* und zum Genus *Henipavirus*. Zu den *Henipaviren* gehören die fünf Spezies Nipahvirus, Hendravirus, Cedarvirus, Mòjiāngvirus und Ghanavirus (Amarasinghe *et al.*, 2019). Es gibt zwei NiV-Genotypen, die nach ihrem geografischen Vorkommen benannt sind: das Nipahvirus-Malaysia (NiV_{Malaysia}) und das Nipahvirus-Bangladesch (NiV_{Bangladesch}). Die beiden Genotypen zeigen eine Ähnlichkeit auf Nukleotid-Ebene von etwa 92 % (Harcourt *et al.*, 2005). Die pleomorphen NiV-Partikel variieren stark in ihrer Größe mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 500 nm (Hyatt *et al.*, 2001; Goldschmidt *et al.*, 2003). Das virale 18,2 kb große Genom trägt die Information für sechs Strukturproteine, die durch untranslatierte Regionen getrennt sind: 3'-Nukleoprotein (N), Phosphoprotein (P), Matrixprotein (M), Fusionsprotein (F), Glykoprotein (G) und die Polymerase (L) -5'. Außerdem können aus dem P-Gen drei Nichtstrukturproteine durch RNA-Editing und einem zusätzlichen Leserahmen abgelesen werden: Das V-, W- und C-Protein (Wang *et al.*, 2001, Lo und Rota, 2008). Die N-, P-, und L-Proteine binden das RNA-Genom und bilden den Ribonukleoproteinkomplex. Das M-Protein liegt direkt unter der Wirtszell-abgeleiteten Virushülle und darauf befinden sich die zwei Oberflächenproteine, das F- und das G-Protein, die beide in der Virushülle verankert sind (Abb. 1.3; Modrow *et al.*, 2010). Die Nichtstrukturproteine agieren vermutlich hauptsächlich als

Virulenzfaktoren, indem sie die Immunantwort des Wirtes beeinflussen können (u.a. Shaw *et al.*, 2004 und 2005; Rodriguez *et al.*, 2004; Mathieu *et al.*, 2012; Satterfield *et al.*, 2015).

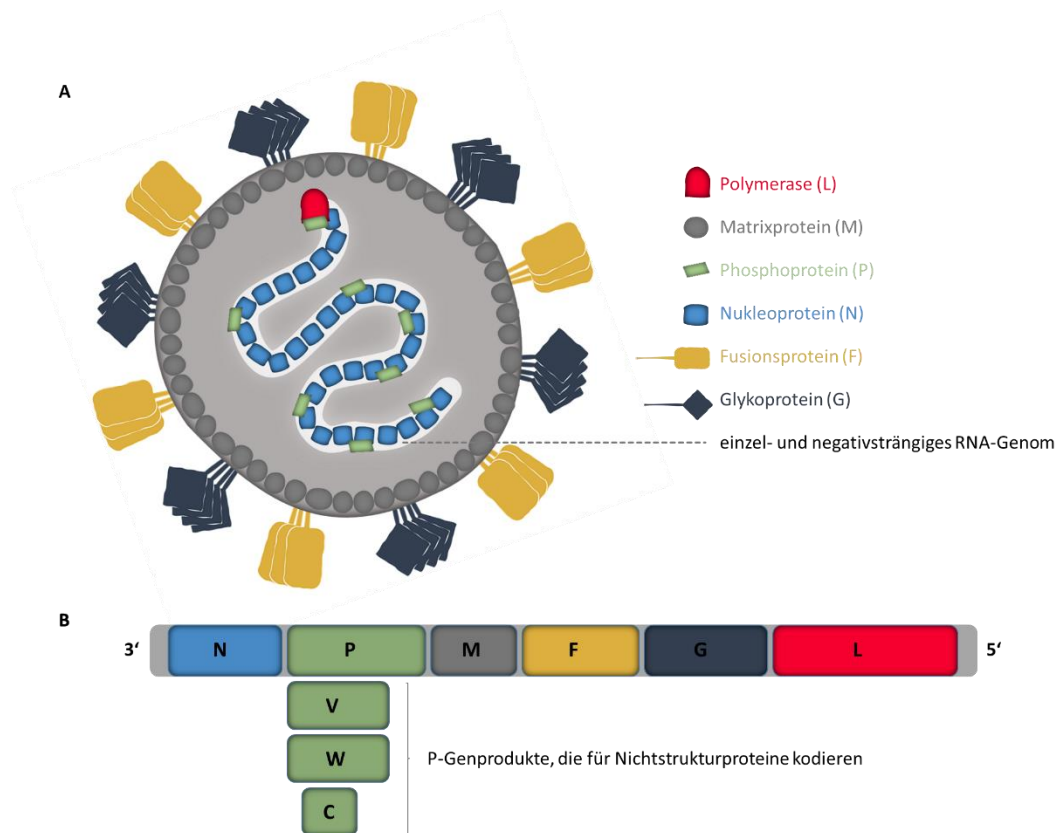


Abb. 1.3: Aufbau Nipahvirus (nach Harcourt *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2019).

(A) NiV-Partikel

(B) Genom-Aufbau, grau: untranslatierte Regionen, grau 3'-Ende: *Leader*-Sequenz, grau 5'-Ende: *Trailer*-Sequenz

Gelangt das NiV an eine Zielzelle, kommt es zur Bindung des G-Proteins an seinen Wirtszellrezeptor Ephrin-B2 oder mit schwächerer Affinität an Ephrin-B3 (Abb. 1.4 ①; Bonaparte *et al.*, 2005; Negrete *et al.*, 2005 und 2006).

Bei den NiV-Rezeptoren Ephrin-B2 und Ephrin-B3 handelt es sich um Transmembranproteine, die normalerweise als Liganden für Tyrosin-Kinase-Rezeptoren dienen, die Ephrin-(Eph)-Rezeptoren. Die dadurch ausgelösten bidirektionalen Signalwege sind vor allem an der embryonalen und neuronalen, sowie vaskulären Entwicklung sowie an verschiedenen Immunprozessen beteiligt. Sowohl Eph-Rezeptoren, als auch die Ephrine werden in vielen Geweben und von verschiedenen Zellen exprimiert (Palmer und Klein, 2003; Pasquale, 2008; Darling und Lamb, 2019). Ephrin-B2 wird u.a. stark in der Lunge und dem Bronchial-Epithel exprimiert, wohingegen Ephrin-B3 besonders im Gehirn vorkommt (Hafner *et al.*, 2004). Sowohl Ephrin-B2 als auch Ephrin-B3 zeigen eine stark konservierte Sequenz zwischen verschiedenen Spezies. Sie stellen damit NiV-Rezeptoren dar, die in Flughunden ebenso wie in Schweinen und Menschen exprimiert werden (Bossart *et al.*, 2008).

Nach erfolgreicher Bindung des NiV-G-Proteins an Ephrin-B2/B3 kommt es zu mehreren Konformationsänderungen im G-Protein (Aguilar *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013). Das führt durch Konformationsänderungen zur Aktivierung des F-Proteins. Dabei scheint die Bindung des G-Proteins an Ephrin-B2 zu einer besseren F-Aktivierung zu führen als die Bindung an Ephrin-B3 (Aguilar *et al.*, 2010, Aguilar und Iorio, 2012). Das Fusionspeptid des aktivierten F-Proteins lagert sich anschließend in die Zellmembran der Wirtszelle ein und vermittelt die Fusion der beiden Membranen (Virus-Zellfusion), was zur Freisetzung des Nukleokapsids und somit der viralen RNA in das Zytoplasma der Zelle führt (Abb. 1.4 ②; Modrow *et al.*, 2010).

Die anschließende Transkription wird durch den Ribonukleoproteinkomplex initiiert, indem das L-Protein, eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, beginnend an der *Leader*-Sequenz am 3'-Ende des viralen Genoms anfängt, die Information abzulesen und mRNAs der einzelnen Gene zu synthetisieren. Das erfolgt durch Anlagerung an das Start-Codon eines Gens, die anschließende Transkription des Gens bis zum Stopp-Codon und das Auslassen der intergenischen Region bis zur Wiederaufnahme der Transkription am Start-Codon des folgenden Gens. Die Gene werden in der Reihenfolge transkribiert, wie sie vom Genom kodiert werden: 3'-N-P-M-F-G-L-5'. Das Ansetzen der Polymerase am nächsten Start-Codon erfolgt mit zunehmendem Abstand zum 3'-Ende weniger effizient, was zu einem Transkriptionsgradienten ($N > P > M > F > G > L$ mRNA) führt (Abb. 1.4 ③; Modrow *et al.*, 2010; Cox und Plemper, 2015). Nach der Transkription aller Gene beginnt die Translation (Abb. 1.4 ④). N, P, M und L werden an zytoplasmatischen Ribosomen der Wirtszelle translatiert. Die Translation der Oberflächenproteine F und G findet an Ribosomen am endoplasmatischen Retikulum statt. Nach der Synthese werden F- und G-Proteine über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert, währenddessen die Proteine modifiziert werden (Abb. 1.4 ⑤). Trimere F- und tetramere G-Proteine werden auf der Zelloberfläche bzw. Virushülle exprimiert. Das Typ-I Transmembran-Fusionsprotein liegt zunächst als inaktives Vorläuferprotein F_0 auf der Zelloberfläche vor und wird nach Internalisierung endosomal durch Cathepsin L oder B in die aktive Form F_1 und F_2 gespalten, die über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb. 1.4 ⑥). Fusionsaktives F-Protein wird anschließend zurück zur Zelloberfläche transportiert, wo es dann zusammen mit dem G-Protein in neue Viruspartikel eingebaut werden oder Zell-Zellfusion (Synzytienbildung) vermitteln kann (Diederich *et al.*, 2005; Vogt *et al.*, 2005; Pager *et al.*, 2006; Diederich und Maisner, 2007; Diederich *et al.*, 2012; Maar *et al.*, 2012).

Die Transkription endet und die Replikation beginnt, sobald eine ausreichende Menge des N-Proteins gebildet ist, das sich an das 3'-Ende (*Leader*-Sequenz) anlagert und zusammen mit den P- und L-Proteinen das Überspringen der intergenischen Regionen verhindert. Die Polymerase liest somit Antigenome (RNA in positiver Orientierung) und anschließend davon

RNA-Genome in negativer Orientierung ab. Sowohl an das gesamte Antigenom als auch das Genom lagern sich N-Proteine an (Abb. 1.4; ⑤; Modrow *et al.*, 2010; Cox und Plemper, 2015). Das M-Protein wird über den Zellkern zur Plasmamembran transportiert. Der Kerntransit und die nukleäre Ubiquitin-Modifikation ist wichtig für die *Assembly*-Funktion des M-Proteins (Wang *et al.*, 2010). Das M-Protein bildet eine Schicht unter der Zytoplasmamembran und steht in Kontakt mit den beiden NiV-Oberflächenproteinen, sowie dem Ribonukleoproteinkomplex. Das M-Protein initiiert den Zusammenbau neuer Virionen und das *Budding* an der Wirtszellmembran (Abb. 1.4 ⑧ und ⑨, Modrow *et al.*, 2010; Aguilar und Lee, 2011).

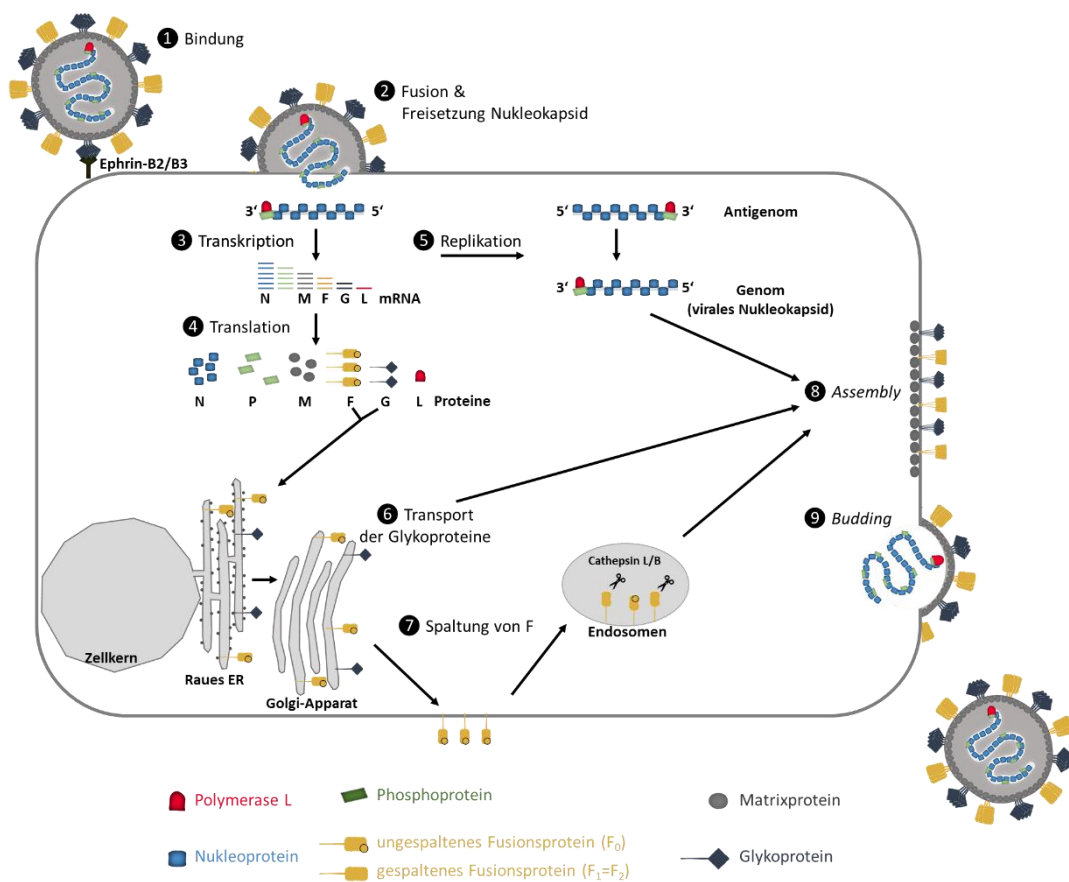


Abb. 1.4: Verlauf des NiV-Replikationszyklus.

1.2 Aufbau und Zellzusammensetzung der Lunge

1.2.1 Obere und untere Abschnitte der Atemwege von Mensch und Schwein

Der Respirationstrakt dient der Aufnahme, Verarbeitung und Abgabe von Atemluft. Dabei werden die anatomischen Strukturen in obere und untere Atemwege unterteilt. Die oberen Atemwege werden von der Nase mit den Nasennebenhöhlen und dem Rachen, die unteren Atemwege vom Kehlkopf, Trachea und den Bronchien gebildet. Die Atemwege münden in die Alveolen der Lunge, in denen der Gasaustausch vonstattengeht (Abb. 1.5; Winkelmann, 2011; Bösch, 2014). Die Struktur der Atemwege ähnelt sich bei Menschen und Schweinen (Judge *et al.*, 2014).

Die Nase trägt zur groben Reinigung über die Nasenhaare, sowie zur Befeuchtung über seromuköse Drüsen und Erwärmung über die Nasenschleimhaut und darin enthaltene Blutgefäße der eingeatmeten Luft bei (Waibl, 2004; Lauber, 2019). Die Nase beim Schwein ist als Rüssel mit langer Nasenhöhle und zahlreichen Nasennebenhöhlen ausgebildet (Waibl, 2004). Der Rachen endet im Kehlkopf und der Luftröhre. Im Rachenraum befinden sich viele zum lymphatischen System gehörende Mandeln, die auch als Waldeyerscher Rachenring bezeichnet werden und die der Erkennung von Pathogenen dienen (Thomé, 2004; Waibl, 2004; Herrmann, 2011; Lauber, 2019).

Die unteren Atemwege dienen vor allem dem Transport der Luft in die Lunge. Die unteren Abschnitte beginnen mit dem Kehlkopf, zu dem unter anderem die Stimmbänder und der Kehldeckel (*Epiglottis*) gehören, der die Trachea verschließt, wenn es zum Schluckmechanismus kommt (Herrmann, 2011; Winkelmann, 2011; Lauber, 2019). Die Trachea ist beim Menschen ungefähr 110 mm lang und wird durch 16-20 Knorpelspangen, die die dauerhafte Öffnung der Trachea unterstützen, verstärkt (Winkelmann, 2011). Die Luftröhre ist beim Schwein mit zirka 180 mm etwas länger und weist 32-45 Knorpelspangen auf, die teilweise überlappen können (Waibl, 2004; Judge *et al.*, 2014). Die Knorpelspangen werden zur Wirbelsäule hin durch Muskeln und Bindegewebe zusammengehalten, wodurch die Luftröhre ihren Innendurchmesser elastisch justieren kann. Die Trachea mündet in den linken und rechten Hauptbronchus (Waibl, 2004; Winkelmann, 2011). Beim Schwein kommt es bereits kurz vor der Aufzweigung in die Hauptbronchien zu einer Bronchienabzweigung der Trachea, die in die rechte Lunge führt (Waibl, 2004; Judge *et al.*, 2014). Die Bronchien, sowie die mit abnehmendem Durchmesser weiteren Verzweigungen Lappenbronchien und Segmentbronchien besitzen ebenfalls mehrere Knorpelspangen oder Knorpelplättchen, wobei die Knorpelausbildung Richtung Bronchiolen immer weiter abnimmt. Die weitere Verzweigung geht in die knorpelfreien Bronchiolen über, die sich über eine Zwischenstufe aus Bronchiolen und Alveolen (*Bronchioli respiratorii*) bis zu den Alveolen ($\varnothing \sim 0,25 - 0,4$ mm) erstrecken (Abb. 1.5). Die Alveolen sind von zahlreichen

Blutkapillaren umgeben, mit denen über die Blut-Luft-Schranke der Gasaustausch erfolgt (Waibl, 2004; Winkelmann, 2011; Lauber, 2019). Die gesamte (humane) Lunge beinhaltet etwa 300-400 Millionen bläschenartige Alveolen mit einer Gesamtfläche von 70-140 m², an denen Sauerstoff an die Kapillaren abgegeben und Kohlendioxid aus den Kapillaren aufgenommen wird (Winkelmann, 2011; Lauber, 2019).

Die Lunge unterteilt sich in zwei Lungenflügel, in denen sich die Bronchien bis zu den Alveolen verzweigen. Der linke Lungenlappen besteht bei Menschen und Schweinen aus zwei Lungenlappen. Der rechte Lungenlappen hat beim Menschen drei, beim Schwein vier ausgebildete Lappen (Waibl, 2004; Winkelmann, 2011; Judge *et al.*, 2014).

Die Alveolen und die Lunge mit ihrem Lungengewebe zählen im eigentlichen Sinne nicht zu den Atemwegen, da sie die Atemluft nicht „leiten“, sondern die Strukturen und das Organ sind, zu denen die sauerstoffreiche Atemluft hin- und die kohlendioxidreiche Luft wegtransportiert werden, damit der Gasaustausch mit dem Blutsystem des Organismus stattfinden kann (Winkelmann, 2011; Lauber, 2019).

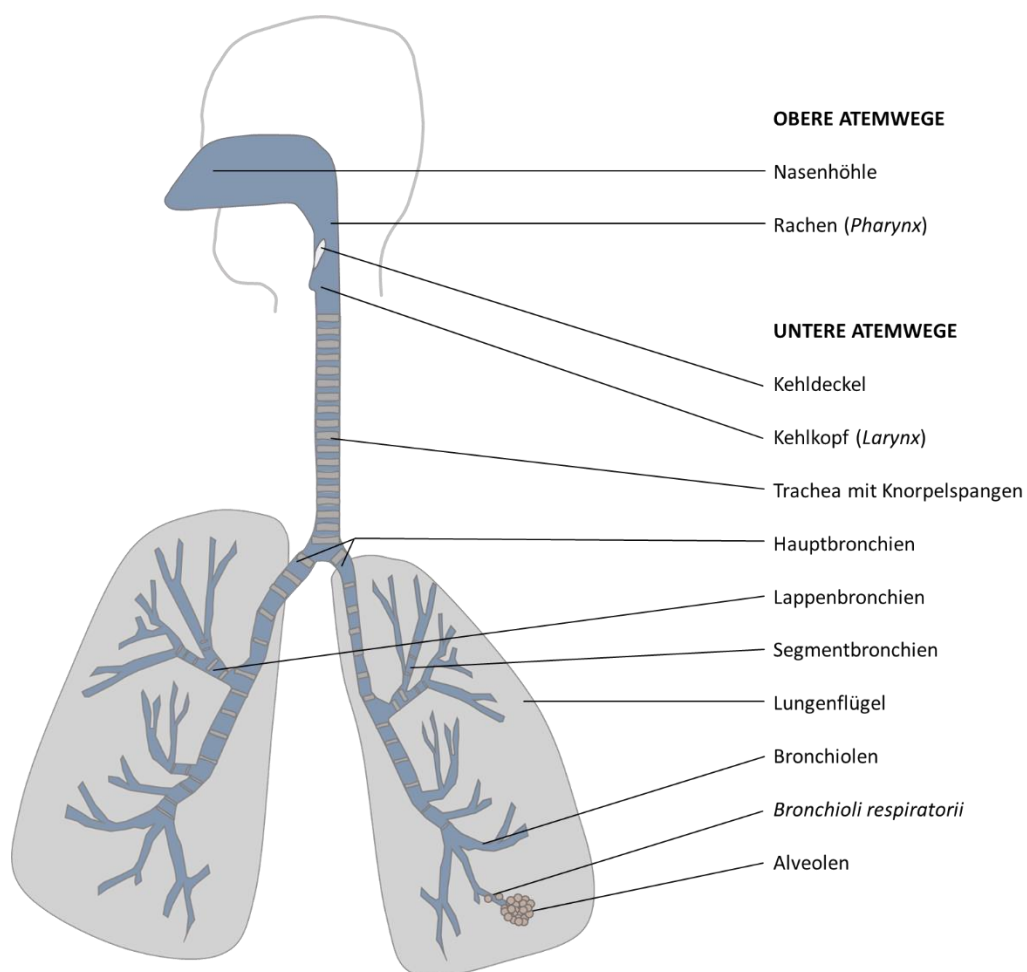


Abb. 1.5: Vereinfachte schematische Darstellung der humanen Atemwege.

1.2.2 Zelltypen des Atemwegsepithels

Die Atemwege von Menschen und Schweinen sind durch schleimproduzierende Becherzellen und durch ein mehrreihiges hochprismatisches Flimmerepithel ausgekleidet, das in den Bronchiolen in ein einschichtiges, prismatisches und in den *Bronchioli respiratorii* in ein kubisches Atemwegsepithel übergeht. In den oberen Atemwegen gibt es neben dem respiratorischen Epithel teilweise auch noch Plattenepithelien (Waibl, 2004; Kummer und Welsch, 2018). Charakteristisch für das mehrreihige Epithel sind übereinanderliegende Schichten von Zellkernen, wobei alle Zellen Kontakt mit der Basalmembran haben, die direkt unter der Epithelschicht liegt. Das ist möglich, indem einige Zellen säulenartig und mit unterschiedlicher Höhe angeordnet sind (Kühnel, 2014). Die Basalzellen, die die Stammzellen des respiratorischen Epithels sind, befinden sich direkt über der Basalmembran und da sie nicht zylindrisch wachsen, haben sie keinen Kontakt mit dem Lumen der Atemwege (McDowell *et al.*, 1978).

Ein Zelltyp, der fast in den gesamten Atemwegen (bis zu den Bronchiolen) vorkommt, sind in das Lumen hereinragende zilienträgende Flimmerepithelzellen. Die Flimmerepithelzellen besitzen zum Lumen hin etwa 200 zirka 6 μm lange Zilien pro Zelle. Dadurch ergibt sich etwa eine Milliarde Zilien pro cm^2 Atemweg (Kummer und Welsch, 2018).

In den oberen und unteren Atemwegen findet sich neben den Flimmerepithelzellen ein weiterer häufiger Zelltyp: die schleimproduzierende Becherzelle. In den Bronchiolen finden sich nur noch wenige bis keine Becherzellen mehr (Kummer und Welsch, 2018). Nicht zu der Epithelschicht gehörend liegen subepithelial vor allem seromuköse Drüsen, die zusammen mit den Becherzellen den Schleim produzieren, der die Atemwegsepithelien bedeckt. Der Schleimfilm liegt nicht direkt auf den Zilien der Flimmerepithelzellen auf, da er diese sonst verkleben würde. Zwischen Zilien und Schleim befindet sich eine wässrige Phase (Hypophase), in der die Zilien etwa 12-20-mal pro Sekunde schlagen und somit den darauf liegenden Schleim Richtung Rachen bewegen können (Kummer und Welsch, 2018).

Vor allem in den oberen Atemwegen, abnehmend bis zu den Bronchien, befinden sich außerdem Bürstenzellen im Atemwegsepithel. Bei diesen Zellen handelt es sich um sensorische Zellen, die Reize erkennen und über ihre Verbindung zu Nervenfasern beispielsweise einen Niesreiz auslösen können. Im tracheobronchialen Bereich kommen zudem vereinzelt endokrine Zellen vor, die z.B. Serotonin enthalten können (Kummer und Welsch, 2018).

In den distalen Luftwegen (Bronchiolen) befindet sich ein weiterer besonderer Zelltyp: die sekretorischen Keulenzellen (Club-Zellen), die unter anderem einen Bestandteil des Surfactants, die Surfactant-Proteine (SP-A, -B und -D), sowie Proteasen und Zytokine freisetzen können (Kummer und Welsch, 2018; Schubert, 2018).

In den *Bronchioli respiratorii* treten bereits Pneumozyten vom Typ II auf (Kummer und Welsch, 2018).

Die Alveolen besitzen ein Alveolarepithel aus Pneumozyten vom Typ-I, die für den Gasaustausch zuständig sind und Pneumozyten vom Typ-II, die den Großteil des Surfactants bilden und sich zu Pneumozyten vom Typ-I differenzieren können. Der Surfactant liegt über den Zellen des Alveolarepithels und verringert u.a. die Oberflächenspannung (Waibl, 2004; Kummer und Welsch, 2018; Schubert, 2018).

In den gesamten Atemwegen, sowie im lymphatischen Gewebe und in Lymphfollikeln finden sich sub- und intraepitheliale Immunzellen, wie zum Beispiel Lymphozyten, dendritische Zellen und Makrophagen (Thomé, 2004; Waibl, 2004; Kummer und Welsch, 2018).

1.2.3 Allgemeine Schutzmechanismen gegenüber Pathogenen

Die Atemwege haben Kontakt mit der Umwelt, Schmutzpartikeln und Pathogenen, weshalb verschiedene Abwehrmechanismen vorhanden sind. Die ersten, größeren Partikel werden bereits in der Nase durch die Nasenhaare und den Niesreflex daran gehindert, in die tieferen Atemwege zu gelangen. Kleinere Partikel und Pathogene, die in die unteren Atemwege gelangen, werden durch einen der wichtigsten Schutzmechanismen des respiratorischen Epithels, die mukoziliäre *Clearance*, entfernt. Dieser Mechanismus wird durch die Zilien der Flimmerepithelzellen und dem Schleim der Becherzellen und subepithelialen Drüsen gewährleistet. In der Schleimschicht können sich Schmutzpartikel und Pathogene verfangen, womit die Anhaftung von Pathogenen an die Epithelzellen verhindert wird. Außerdem werden die eingefangenen Fremdkörper durch die Bewegung der Zilien in Richtung Rachen transportiert und durch Aushusten entfernt oder durch Verschlucken in den Magen überführt (Murphy *et al.*, 2009; Kummer und Welsch, 2018).

Das tiefere Eindringen von Partikeln wird darüber hinaus durch die sogenannte Epithelbarriere verhindert. Da die respiratorischen Epithelzellen durch feste Zell-Zell-Kontakte eng verbunden sind, bilden sie eine dichte Epithelzellschicht (Murphy *et al.*, 2009).

Die Schutzfunktion des respiratorischen Epithels wird außerdem durch lymphatisches Gewebe (z.B. Nasenassoziiertes lymphatisches Gewebe [NALT], Waldeyerscher Rachenring und Bronchien-assoziiertes lymphatisches Gewebe [BALT]) unterstützt. Hier befinden sich verschiedene Immunzellen, wie zum Beispiel Lymphozyten, Mastzellen, Makrophagen und dendritische Zellen. Die Mastzellen geben nach Pathogenerkennung Stoffe aus ihren Granula ab und unterstützen so die Immunantwort. Die Makrophagen, die vermehrt in den Alveolen vorkommen und dort als Alveolarmakrophagen bezeichnet werden, können Fremdkörper durch Phagozytose aufnehmen und beseitigen (Murphy *et al.*, 2009; Kummer und Welsch, 2018). Das

können auch dendritische Zellen, die wie die Makrophagen dazu fähig sind, spezifische Bestandteile der aufgenommenen Pathogene als Antigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und somit zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort führen. Die aus aktivierten B-Zellen entstandenen Plasmazellen produzieren letztendlich Pathogen-spezifische Antikörper, wobei vor allem sekretorisches IgA für die Pathogenabwehr auf respiratorischen Schleimhäuten wichtig ist. Die adaptive Immunantwort der Atemwege gehört zu dem mucosalen Immunsystem (Murphy *et al.*, 2009, Kummer und Welsch, 2018).

Die verschiedenen Zellen des respiratorischen Epithels produzieren zahlreiche Stoffe zum Schutz der Atemwege. Einige der Surfactant-Proteine können Pathogene für die Phagozytose markieren. Die Epithelzellen und Immunzellen in den Atemwegen, vor allem in den Nasennebenhöhlen, produzieren Stickstoffmonoxid (NO), das unter anderem Bakterien schädigt. Außerdem können verschiedene Zellen antimikrobielle Stoffe, wie Defensine und Lysozyme, sezernieren. Viele Zellen setzen Zytokine frei, was eine Entzündungsreaktion und das Einwandern und Aktivieren weiterer Immunzellen hervorrufen kann (Murphy *et al.*, 2009; Kummer und Welsch, 2018).

Obwohl die Atemwege zahlreiche Abwehrmechanismen gegenüber Pathogenen aufweisen, beherbergen sie ein eigenes vielfältiges Mikrobiom. In den gesunden Atemwegen von Menschen und Schweinen können viele verschiedene Bakterienarten, wie Bakterien der Stämme *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Tenericutes* (Mycoplasmen, nur beim Schwein gezeigt) vorkommen (Dickson *et al.*, 2016; Siqueira *et al.*, 2017; Barcik *et al.*, 2020). Für das menschliche Mikrobiom wurde gezeigt, dass neben Bakterien auch verschiedene Viren, Bakteriophagen und Pilze vorkommen können (Barcik *et al.*, 2020). Das Mikrobiom der Lunge wird von der Aufnahme, Ansiedlung und Vermehrungsrate der Mikroorganismen, sowie der Eliminierung durch die Abwehrmechanismen der Lunge beeinflusst (Dickson *et al.*, 2016; Barcik *et al.*, 2020). Ein intaktes Mikrobiom kann unter anderem die Ausbreitung von Pathogenen verhindern und die Immunantwort beeinflussen (Ichinohe *et al.*, 2011; Barcik *et al.*, 2020). Bei Atemwegserkrankungen wie Asthma, schwerer COPD, Pneumonie, aber auch nach Lungentransplantationen wurde ein verändertes Mikrobiom beobachtet (Dickson *et al.*, 2016).

1.3 Die angeborene Immunantwort zur Abwehr von Virusinfektionen

1.3.1 Erkennung viraler RNA durch RIG-I und TLR3

Das angeborene Immunsystem kann Pathogene wie Viren durch ihre für den Organismus fremdartigen Strukturen, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP), identifizieren. Die Erkennung dieser Strukturen erfolgt durch Bindung an verschiedene *pattern-*

recognition-receptors (PRR), zu denen unter anderem die Toll-*like*-Rezeptoren (TLR) und die RIG-*I-like*-Rezeptoren gehören (Kawai und Akira, 2008; Murphy *et al.*, 2009).

Es gibt verschiedene TLRs, die unterschiedliche pathogene Bestandteile erkennen können und von zahlreichen Zellen exprimiert werden. TLR1, -2, -4, -5 und -6 befinden sich auf der Zelloberfläche, während TLR3, -7, -8 und -9 in Endosomen vorkommen und wichtig für die virale Erkennung sind. TLR7 und TLR8 erfassen einzelsträngige RNA, TLR9 virale DNA und TLR3 wird durch Bindung von doppelsträngiger RNA aktiviert, die auch während der Replikation einzelsträngiger RNA-Viren auftritt (Kawai und Akira, 2008; Murphy *et al.*, 2009). Der TLR3 Rezeptor kommt in verschiedenen humanen respiratorischen Epithelzellen vor. TLR7 und TLR8 wurden in humanen Epithelzellen nur selten oder gering nachgewiesen (Homma *et al.*, 2004; Sha *et al.*, 2004; Ritter *et al.*, 2005; Ioannidis *et al.*, 2013).

1.3.1.1 TLR3-Signalweg

Bindet dsRNA an TLR3, kann der Rezeptor über die cytoplasmatische TIR- (Toll-IL-1-Rezeptor) Domäne das Adapterprotein TRIF binden, das ebenfalls eine TIR-Struktur besitzt (Abb. 1.6 rechts). Dadurch kann es zur Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden kommen. In einer Signalkaskade rekrutiert TRIF anschließend die E3-Ubiquitin-Ligase TRAF-6 sowie das Rezeptor-interagierende Protein 1 (RIP1). TRAF-6 polyubiquitinyliert u.a. RIP1, welches über die Bindung von TAB2 und TAB3 die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase 7 (MAPKKK) TAK1 mobilisieren kann. TAK1 phosphoryliert IKK α und IKK β vom IKK-Komplex (IKK α , IKK β und IKK γ [NEMO]), wonach IKK β in der Lage ist I κ B zu phosphorylieren und somit vom zyttoplasmatischen NF κ B abzulösen. Das somit aktivierte NF κ B kann in den Zellkern wandern und dort die Expression von verschiedenen proinflammatorischen Genen auslösen (Kawai und Akira, 2007; Vercammen *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2009).

Außerdem kann TRIF mit TRAF3 interagieren und einen Komplex mit den Kinasen TBK1 und IKK ϵ bilden. Diese Kinasen können Interferon-regulierende Faktoren (IRFs) phosphorylieren, welche daraufhin in der Lage sind als Dimer in den Zellkern zu wandern und die Expression von Interferonen (beschrieben für Typ-I Interferone) auszulösen (Kawai und Akira, 2007; Vercammen *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2009). Ebenfalls kann über die Aktivierung von TLR3 die Induktion von Typ-III Interferonen vermittelt werden (Hermant und Michiels, 2014; Odendall und Kagan, 2015).

1.3.1.2 RIG-I-Signalweg

Zu den RIG-*I-like* Rezeptoren gehören die zyttoplasmatischen RNA Helikasen RIG-I, MDA5 und LGP2, die in vielen Geweben und Zellen, inklusive Epithelzellen, vorkommen. RIG-I, der

Rezeptor, der am besten untersucht ist, führt nach Bindung viraler RNA im Zytoplasma zur Aktivierung von Signalkaskaden. RIG-I besitzt (wie auch MDA5) am N-Terminus zwei CARD-Domänen (*caspase activation and recruitment domain*), gefolgt von der RNA-Helikase-Domäne, sowie eine C-terminale Domäne mit einer Repressor-Aktivität. LGP2 besteht hingegen nur aus der RNA-Helikase-Domäne und einer C-terminalen Domäne. Es wird angenommen, dass LGP2 die Signalkaskaden von RIG-I und MDA5 reguliert (Loo und Gale, 2011). RIG-I bindet bevorzugt kurze dsRNA, RNA mit 5' triphosphorylierten Enden und ssRNA mit 5-Phosphaten (Hornung *et al.*, 2006; Pichlmair *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2008). Ebenfalls kann durch zelluläre RNase L gesplattene RNA, die am 3' Ende monophosphoryliert ist, durch RIG-I und auch MDA5 erkannt werden (Malathi *et al.*, 2007).

Wird virale RNA detektiert, kommt es zur ATP-Hydrolyse, Konformationsänderungen und Modifikationen, wie Ubiquitylierungen, Dephosphorylierung und Deacetylierung, in RIG-I und somit zur Oligomerisierung und Aktivierung des Rezeptors. Dadurch kann das membrangebundene Adapterprotein MAVS/IPS-1/VISA/Cardif mit seiner CARD-Domäne mit der RIG-I CARD-Domäne interagieren (Abb. 1.6 links). MAVS kann einerseits TRAF3 binden und somit einen Komplex aus unter anderem TBK1 und IKKε rekrutieren, der Interferon-regulierende Faktoren 3 (IRF3) und 7 (IRF7) phosphorylieren kann. Die IRFs können dimerisieren und in den Zellkern wandern, um die Expression von Interferonen auszulösen (Liu *et al.*, 2017). Durch RIG-I können sowohl Typ-I, als auch Typ-III IFN aktiviert werden (Onoguchi *et al.*, 2007; Odendall und Kagan, 2015; Liu *et al.*, 2017).

Für die Transkription von IFN-β ist zusätzlich noch der Transkriptionsfaktor AP-1 wichtig, während IRF1 spezifisch die Expression von Typ-III IFNs induzieren kann. Die Typ-I und Typ-III Promotoren enthalten außerdem noch Bindungsstellen für NFκB, welches zusammen mit den IRFs die Transkription von IFNs auslösen kann (Odendall und Kagan, 2015).

Wie TRIF in der TLR-3-Signalkaskade (siehe 1.3.1.1) kann MAVS in der RIG-I-Signalkaskade auch TRAF6 binden und über den TAK1/TAB2/TAB3 Komplex den IKK-Komplex aktivieren, um somit IκB von NFκB zu lösen, damit NFκB im Zellkern die Transkription von proinflammatorischen Genen aktivieren kann (Arnoult *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2017).

Die Signalwege, die über TLR3 und RIG-I angeschaltet werden, können prinzipiell in der Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Interferonen resultieren. Es wird aber angenommen, dass die Signalinduktion über den TLR3 hauptsächlich NFκB anschaltet und somit die Aktivierung proinflammatorischer Zytokine bewirkt, während die RIG-I Signalkaskade überwiegend IRFs rekrutiert und damit die Interferon-Synthese aktiviert (Sirén *et al.*, 2006; Le Goffic *et al.*, 2007; Bertolusso *et al.*, 2014).

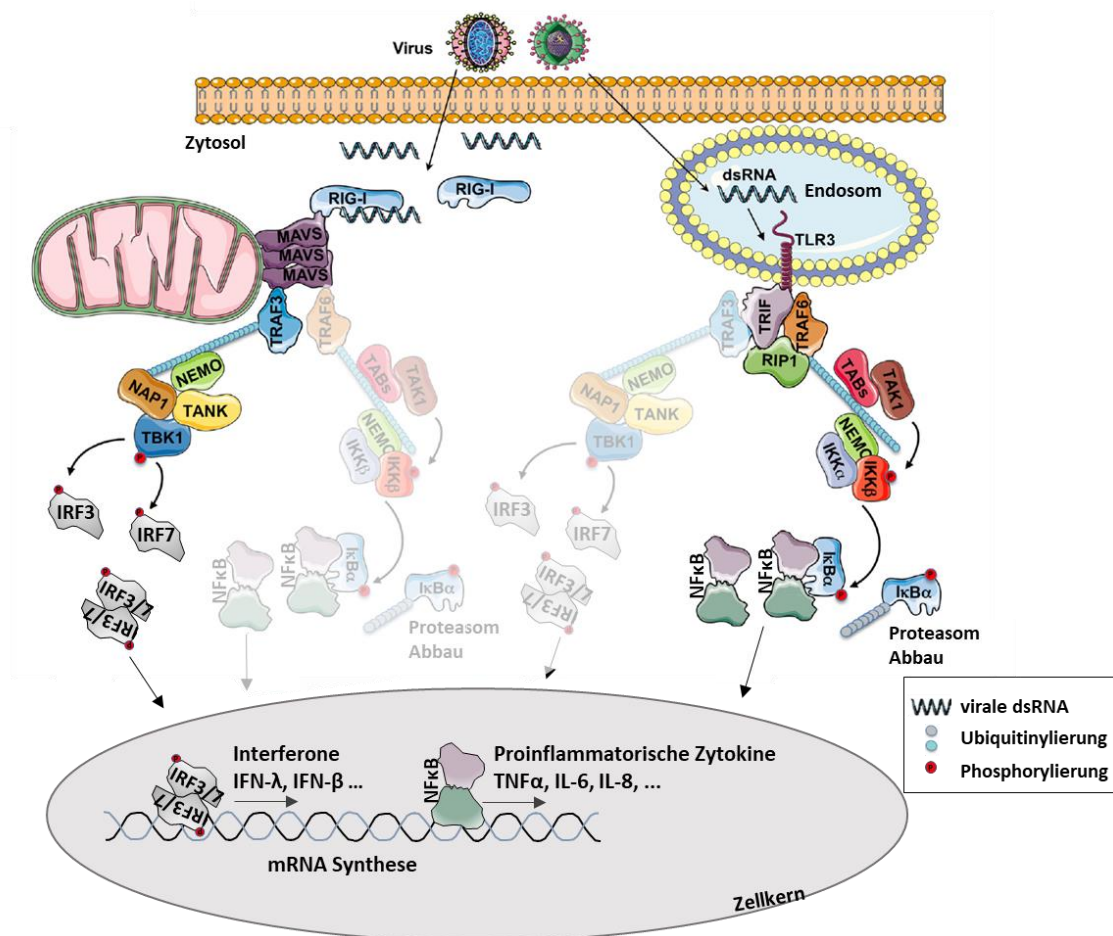


Abb. 1.6: TLR-3 und RIG-I Signalkaskaden (modifiziert aus Outlioua *et al.*, 2018; <https://www.rndsystems.com>).

1.3.2 Proinflammatorische Zytokine und Entzündungsantwort in der Lunge

Die meisten Viren induzieren eine starke inflammatorische Zytokinantwort. Die sezernierten Zytokine rekrutieren dann weitere Immunzellen, wie Makrophagen, Monozyten, Neutrophile, dendritische Zellen und Lymphozyten. Hierdurch wird die Entzündungsantwort verstärkt. Zytokine, die an einer Entzündung beteiligt sind, sind vor allem TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12 und MCP-1. Eine spezielle Untergruppe von Zytokinen, die Chemokine (z.B. IL8, MCP-1), sind u.a. dafür verantwortlich, dass weitere Immunzellen zum Infektionsherd rekrutiert werden (Moldovanu *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2009). Proinflammatorische Zytokine können nicht nur weitere Entzündungszellen anlocken, sondern beispielsweise in neutrophilen Zellen die Bildung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Granula-Freisetzung mitbeeinflussen (Murphy *et al.*, 2009; Bordon *et al.*, 2013; El-Benna *et al.*, 2016).

Zytokine wie TNFα sind auch an der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen beteiligt (Moldovanu *et al.*, 2009). Außerdem kann die Entzündungsreaktion eine Veränderung

des Blutgefäß-Durchmessers verursachen. Dadurch wird die Leukozyten-Einwanderung in das Gewebe erleichtert: Endothelzellen interagieren durch ihre auf der Oberfläche exprimierten Selektine mit den Leukozyten im Blutstrom. Diese Interaktion führt zu einer schwachen Adhäsion, sodass die Bindung immer wieder abbricht und neu aufgebaut wird, was zu einer Verlangsamung der Leukozyten-Bewegung im Blutstrom führt. Dieser Vorgang wird auch als rollende Bindung von Leukozyten an das Endothel bezeichnet. Anschließend kommt es zu einer festeren Bindung der Leukozyten an das Endothel, indem die Integrine und Chemokinrezeptoren auf den Leukozyten mit ICAM-1 und VCAM-1, sowie den gebundenen Chemokinen auf den Endothelzellen interagieren. Dadurch können sich die Leukozyten durch das Endothel bewegen (Diapedese) und über einen Chemokin-Gradienten zum Infektionsherd wandern. Vor allem neutrophile Zellen gehören zu den ersten Leukozyten, die in das betroffene Gewebe einwandern. Einige der eingewanderten Zellen können dann durch Phagozytose Pathogene aufnehmen und zerstören (Murphy *et al.*, 2009; siehe Kapitel 1.2.3).

Neben den proinflammatorischen Zytokinen produzieren Entzündungszellen auch antiinflammatorische Zytokine, wie IL-10 und TGF β , um die Entzündungsreaktion unter Kontrolle zu halten und das durch die Infektion und Entzündung geschädigte respiratorische Gewebe zu reparieren (Moldovanu *et al.*, 2009; Robb *et al.*, 2016).

Ist die Entzündungsreaktion und deren Regulierung, beziehungsweise das Gleichgewicht aus pro- und antiinflammatorischen Zytokinen gestört, kann es zu Erkrankungen der Lunge mit geschädigtem Gewebe, wie ARDS, Asthma und COPD, kommen (Moldovanu *et al.*, 2009; Robb *et al.*, 2016).

1.3.3 Typ-I und Typ-III Interferone und Interferon-stimulierte Gene (ISGs)

1.3.3.1 Interferone

Isaacs und Lindemann untersuchten 1957 die Virusinterferenz, die auftritt, wenn eine chorioallantoische Membran eines befruchteten Hühnereis zuerst mit einem hitzeinaktivierten Influenzavirus behandelt und anschließend mit einem lebenden Influenzavirus infiziert wurde. Die Virusinterferenz wurde auf die Bildung von nach ihnen benannten Interferonen zurückgeführt (Isaacs und Lindenmann, 1957).

Die Interferone gehören zu den Zytokinen und werden weiter unterteilt in verschiedene Typen: Im Menschen und Schwein bilden IFN- α , IFN- β , sowie IFN- δ (nur Schwein), IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω und IFN- $\alpha\omega$ (nur Schwein) die Typ-I Interferone (Durbin *et al.*, 2013; Sang *et al.*, 2014). Es sind bis jetzt 17 humane und 57 (davon 18 Duplikate) porcine funktionelle und 12 (humane) und 16 (porcine) Pseudo-Typ-I Interferon-Gene bekannt (Sang *et al.*, 2014).

Die Typ-III Interferone werden von den IFN- λ s gebildet: Im Menschen sind IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A), IFN- λ 3 (IL-28B) und IFN- λ 4 identifiziert (Kotenko *et al.*, 2003; Sheppard *et al.*, 2003; Prokunina-Olsson *et al.*, 2013). IFN- λ 2 und IFN- λ 3 sind sich sehr ähnlich, da sie eine 96 % Sequenzübereinstimmung aufweisen (Egli *et al.*, 2014). Im Schwein sind die Typ-III Interferone IFN- λ 1, IFN- λ 3 sowie IFN- λ 4 nachgewiesen. IFN- λ 2 ist im Schwein bis jetzt nicht identifiziert (Sang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2018).

Die Typ-I und Typ-III Interferone werden von einer infizierten Zelle freigesetzt und sind wichtig für die antivirale Antwort. Beide Interferon-Typen zeigen nur wenige Sequenzhomologie zueinander und binden an verschiedene Rezeptoren, weisen jedoch Ähnlichkeiten in der nachgeschalteten Signalkaskade und Induktion von ISGs auf (Langer *et al.*, 2004, Andreakos *et al.*, 2017).

1.3.3.2 IFN-Rezeptoren

Bei den IFN-Rezeptoren handelt es sich um spezifische Klasse-II-Zytokin-Rezeptoren, die von zwei heterodimeren Untereinheiten gebildet werden. Die einzelnen Untereinheiten der Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Zytokin-Rezeptor-Homologie-Domäne (CRH), die aus Fibronectin-III-Domänen gebildet wird, einer Transmembran-Domäne und einer zytoplasmatischen Domäne. Die zwei Untereinheiten weisen verschieden lange zytoplasmatische Domänen auf und haben unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu dem spezifischen Interferon (Langer *et al.*, 2004).

Der Rezeptor für die Typ-I Interferone IFN- α und IFN- β besteht aus einem Komplex von IFNAR1 und IFNAR2 (Interferon- α Rezeptor 1 und 2). Der Rezeptor für die Typ-III Interferone wird von den Untereinheiten IL-10R2 und IFNLR1 gebildet (Langer *et al.*, 2004; Stanifer *et al.*, 2019).

1.3.3.3 IFN-Signalkaskade

IFNs können an IFN-Rezeptoren auf der Zelle binden, die die IFNs sezerniert hat (autokrin), oder an IFN-Rezeptoren der uninfizierten Nachbarzelle (parakrin). Nach Rezeptorbindung kommt es zu Änderungen in der zytoplasmatischen Domäne der IFN-Rezeptoren, an die die Rezeptor-assoziierten Tyrosin-Kinasen JAK1 (an IFNAR2 und IFNLR1) und TYK2 (an IFNAR1 und IL10R2) gebunden sind und die somit aktiviert werden. Bei dem kanonischen IFN-Signalweg kommt es durch JAK1 und TYK2 zur Phosphorylierung der Kinasen selbst und des Rezeptors, was zur Bindung der Proteine STAT1 und STAT2 an den Rezeptor führt, die ebenfalls phosphoryliert werden. Die beiden STAT-Proteine bilden anschließend einen Komplex mit IRF9. Dieser sogenannte ISGF3 (*IFN-stimulated gene factor 3*) Komplex kann in den Zellkern wandern, an *interferon sensitive response elements* (ISRE) binden und so die Transkription von Interferon-stimulierten Genen (ISGs) auslösen (Abb. 1.7; Stanifer *et al.*, 2019).

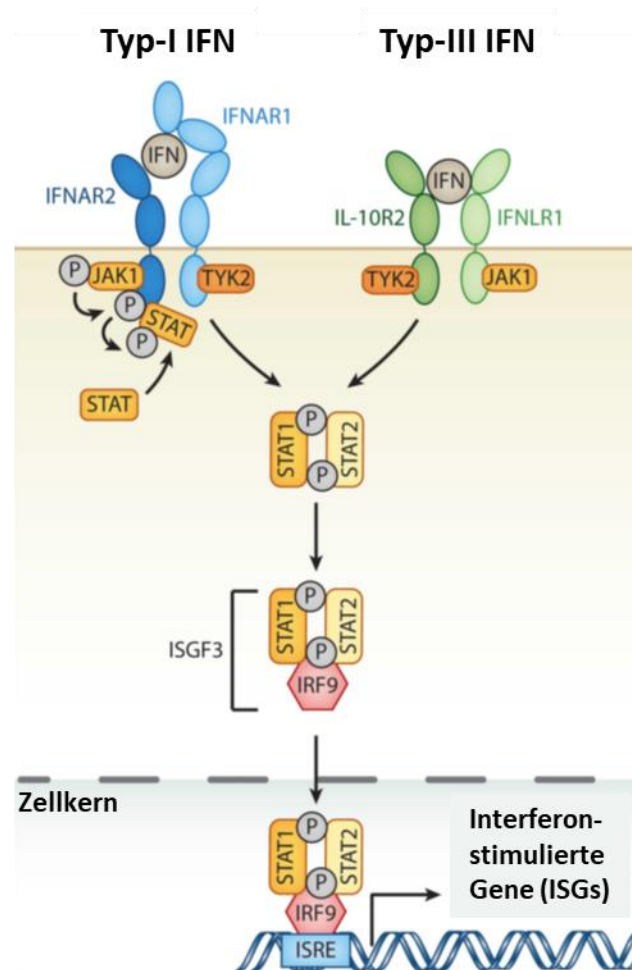


Abb. 1.7: Typ-I und Typ-III Interferon Signalkaskade und Induktion von Interferon-stimulierten Genen
(modifiziert aus Schneider *et al.*, 2014).

Dieser Prozess wird durch viele verschiedene Regulationsmechanismen gesteuert, um eine übermäßige IFN-Antwort zu verhindern. Phosphatasen können beispielsweise die Rezeptoren und Kinasen wieder dephosphorylieren (für IFNAR gezeigt). Für den IFNAR mit gebundenem Liganden wurde gezeigt, dass dieser über Clathrin-vermittelte Endozytose im Lysosom abgebaut werden kann. Der Rezeptor kann ohne vorher stattgefundene IFN-Bindung über den UPR- (*unfolded protein response*) Signalweg abgebaut werden, ein Weg, der bei vielen Virusinfektionen aktiviert werden kann. Außerdem gibt es verschiedene negative Regulatoren, die die Signalkaskade beeinflussen können. Die Protease USP18 kann beispielsweise mit dem IFNAR2 interagieren, wodurch die JAK1 Bindung gestört wird. USP18 scheint vor allem eine Rolle bei Rezeptoren zu spielen, die IFN- α gebunden haben. Das SOCS1 Protein kann die Signalwege von Typ-I und Typ-III Interferonen ebenfalls negativ beeinflussen (Stanifer *et al.*, 2019).

Der IFNAR und ein Teil des IFNLR, der IL-10R2, kommen ubiquitär auf vielen Zellen vor, während IFNLR1 von wenigen Zelltypen exprimiert wird, vor allem von Epithelzellen. Die IFN- λ Signalkaskaden spielen durch die spezifische IFNLR1 Expression eine besonders wichtige Rolle in

der Immunabwehr auf mucosalen Oberflächen (Andreakos *et al.*, 2017; Stanifer *et al.*, 2019). IFN- λ wird im Respirationstrakt nach Infektion mit verschiedenen Viren, wie beispielsweise dem Influenzavirus, Rhinovirus, respiratorischem Synzytial-Virus oder nach der Infektion mit Bakterien wie *S.pneumonia*, *S.aureus*, *H.influenza* und *M.tuberculosis* gebildet (Andreakos *et al.*, 2017). Auch kommt es nach der NiV-Infektion zur IFN- λ Induktion in humanen Bronchial-Epithelzellen (Sauerhering *et al.*, 2017).

Ein Unterschied zwischen Typ-I und Typ-III IFNs wurde im murinen Respirationstrakt nach der IAV-Infektion gezeigt. Typ-III IFN- λ wird früh nach der IAV-Infektion induziert und löst eine antivirale Antwort, jedoch keine Entzündung aus. Erst später in der Infektion, wenn die Infektion nicht kontrolliert werden konnte, werden die Typ-I IFNs hochreguliert und induzieren neben der antiviralen Antwort auch eine proinflammatorische Reaktion induzieren (Galani *et al.*, 2017).

1.3.4 Antivirale Wirkung von ISGs

Über die Interferon-Signalkaskade kann die Transkription von hunderten verschiedenen Interferon-stimulierten Genen (ISGs) induziert werden. Die ISG-kodierten Proteine haben zahlreiche Aufgaben in der Immunantwort.

Einerseits wirken sie innerhalb der Signalkaskaden, die zur Expression von weiteren IFNs und ISGs führen. Zu diesen ISGs-kodierten Proteine gehören beispielsweise IRFs, JAK2 und STAT1/2. Es gibt auch regulierende ISGs-kodierte Proteine, die wichtig für die Kontrolle der induzierten IFN-Antwort sind (IFN-Desensibilisierung), wie zum Beispiel SOCS und USP18 (siehe Kapitel 1.3.3.3). Andere ISGs sind an Prozessen der Apoptose beteiligt (Schneider *et al.*, 2014).

Viele von ISGs kodierte Proteine haben antivirale, antibakterielle oder antiparasitäre Wirkungen, indem sie in verschiedene pathogene Mechanismen eingreifen (Schneider *et al.*, 2014). Infolge einer Virusinfektion werden viele unterschiedliche ISGs exprimiert, die einzeln betrachtet meist nur gering antiviral wirken, aber die durch ihre Kombination aus vielen verschiedenen Wirkungsweisen eine Virusinfektion effizient hemmen können (Schoggins und Rice, 2011; Schneider *et al.*, 2014).

Die verschiedenen ISGs können an unterschiedlichen Abschnitten der viralen Infektion eingreifen, d.h. beim Viruseintritt, bei der Transkription, Translation oder Replikation, *Assembly* oder *Budding* (Schneider *et al.*, 2014; Schoggins, 2019). Wichtige antivirale ISGs sind im Folgenden beschrieben.

1.3.4.1 OAS

Die ISGs 2'-5'-Oligoadenylatsynthetasen (OAS) umfassen eine Familie von RNA-Polymerasen, zu denen humanes OAS1, OAS2, OAS3 und OASL, sowie porcines OAS1 (OAS1a und OAS1b), OAS2

und OASL gehören (Perelygin *et al.*, 2006; Kristiansen *et al.*, 2011). OAS-Proteine werden von einer β -Blatt N-terminalen und einer helikalen C-terminalen Domäne gebildet (Kristiansen *et al.*, 2011). OAS erkennt bestimmte (virale) dsRNA, wodurch das Protein durch Konformationsänderung aktiviert wird. Infolgedessen bildet OAS aus ATP 2'-5'-Oligoadenylate, die die RNase L durch Bindung aktivieren können. Die RNase L bildet Dimere und baut sowohl virale als auch zelluläre RNA ab (Abb. 1.8). Dadurch wird die Proteinsynthese der Zelle eingeschränkt (Kristiansen *et al.*, 2011). Außerdem werden durch die RNA-Spaltung neue virale Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) gebildet, die von PRRs, wie RIG-I, erkannt werden und somit die antiviralen Signalkaskaden verstärken können (Schneider *et al.*, 2014). OASL wird nach Infektion IFN-abhängig oder direkt über IRF3 aktiviert und besitzt keine enzymatische Aktivität, d.h. OASL kann keine 2'-5'-Oligoadenylate produzieren und darüber RNase L aktivieren. Im Gegensatz zu den anderen OAS-Proteinen, besitzt OASL C-terminale Ubiquitin-ähnliche Strukturen, welche wichtig für die antivirale Wirkung von OASL zu sein scheinen (Kristiansen *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2016). Außerdem wurde gezeigt, dass OASL mit dem Rezeptor RIG-I interagieren und dessen Aktivierung unterstützen kann (Zhu *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015).

1.3.4.2 PKR

Die Proteinkinase R (PKR) zählt zu den Serin-Threonin-Kinasen und besteht aus einer N-terminalen, dsRNA-bindenden Domäne und einer C-terminalen Domäne mit spezifischer Kinase-Aktivität. Wird virale dsRNA gebunden, kann PKR durch Konformationsänderungen Dimere bilden und sich selbst phosphorylieren. Anschließend phosphoryliert PKR eIF2 α , einen Faktor, der wichtig für die Translations-Initiation ist. Durch diese Inaktivierung von eIF2 α wird die Translationsmaschinerie der Zelle gehemmt, wodurch sowohl die virale als auch zelluläre Proteinsynthese gestört wird (Abb. 1.8; Munir und Berg, 2013; Gal-Ben-Ari *et al.*, 2019).

Außerdem kann PKR mit weiteren Substraten, wie dem IKK-Komplex interagieren, wodurch es zur Aktivierung von NF κ B kommt (Munir und Berg, 2013; Gal-Ben-Ari *et al.*, 2019). PKR ist auch in die Apoptose involviert, indem es den FADD-Caspase-8/3 und den Caspase-9 Signalweg beeinflussen kann (Gal-Ben-Ari *et al.*, 2019).

1.3.4.3 IFITs

Weitere ISGs mit zahlreichen antiviralen Funktionen gehören zur IFIT- (Interferon-induzierte Proteine mit Tetratricopeptid Wiederholungen) Familie, die bei Wirbeltieren konserviert ist und evolutionär Gemeinsamkeiten mit der Familie der Interferone zu haben scheint. Diese ISGs werden sowohl durch IFN als auch IFN-unabhängig, durch Aktivierung von PRRs oder IRFs, induziert. Dadurch können IFIT-Proteine nach einer Infektion früh und sehr stark hochreguliert

werden. Zu der IFIT-Familie zählen IFIT1 (ISG56), IFIT2 (ISG54), IFIT3 (ISG60) und IFIT5 (ISG58), im Menschen gibt es zusätzlich noch IFIT1B (Liu *et al.*, 2013b; Mears und Sweeney, 2018).

IFIT-Proteine (außer ISG58) können miteinander Homo- oder Heterooligomere bilden, wodurch Komplexe entstehen. Beispielsweise können sich ISG56, ISG54 und ISG60 zu einem Trimer zusammenlagern und sich dadurch gegenseitig stabilisieren. IFIT-Proteine können mit zahlreichen anderen Proteinen interagieren, die z.B. in der Immunantwort oder Apoptose eine Rolle spielen und dadurch unterschiedliche Funktionen erfüllen (Mears und Sweeney, 2018).

ISG56 (IFIT1) und ISG54 (IFIT2) können an eIF3 binden, einen Faktor, der eine Rolle bei der Einleitung der Translation spielt und somit die zelluläre, als auch virale Proteinsynthese hemmen (Fensterl und Sen, 2011; Mears und Sweeney, 2018). IFITs können auch direkt an bestimmte virale RNA binden, wie z.B. triphosphorylierte oder gekappte RNA mit bestimmten Methylierungsmustern und dadurch die Bindung von eIF4F verhindern und somit die Translation dieser RNAs beeinträchtigen (Abb.1.8; Mears und Sweeney, 2018).

1.3.4.4 Tetherin

Ein ISG das später in die Virusvermehrung eingreift, ist Tetherin (BST-2). Die Induktion von Tetherin kann über IFN-Signalwege erfolgen, aber auch IFN-unabhängig, zum Beispiel über IRFs. Bei Tetherin handelt es sich um ein Typ-II Transmembranprotein, das aus einer N-terminalen Domäne im Zytoplasma, einer Transmembran-Domäne, einer Ektodomäne mit *coiled-coil* Struktur, sowie einem C-terminalen GPI- (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol) Anker aufgebaut ist. Das bedeutet, dass Tetherin in der Membran zweifach über die Transmembran-Domäne und den GPI-Anker, der mit Lipidrafts assoziiert ist, befestigt ist. Tetherin kann Homodimere oder -tetramere bilden, ist glykosyliert und kommt vor allem an der Zellmembran, aber auch im trans-Golgi und in endosomalen Vesikeln vor. Letzteres wird über ein Motiv in der N-terminalen Domäne von Tetherin vermittelt, das über Interaktion mit dem Protein AP2 zur Clathrin-vermittelten endosomalen Aufnahme von Tetherin führt (Sauter, 2014; Mahauad-Fernandez und Okeoma, 2016).

Eine der wichtigsten antiviralen Wirkmechanismen von Tetherin ist die Verhinderung des viralen *Buddings*, und zwar dadurch, dass es entweder über den GPI-Anker oder seltener über die Transmembran-Domäne in die virale Membran von umhüllten Viren inseriert. Die zweite Membran-verankerte Domäne des Tetherins verbleibt dabei in der Zellmembran, wodurch neugebildete Viruspartikel am *Budding* gehindert werden und an der Zelle „haften“ bleiben. Die beiden Membran-Domänen von Tetherin können auch in zwei verschiedene Viruspartikel eingebaut werden, sodass diese nach dem *Budding* aneinanderhaften bleiben (Sauter, 2014; Mahauad-Fernandez und Okeoma, 2016).

Neben seiner „Tetherin“-Funktion kann die N-terminale zytoplasmatische Domäne von Tetherin an der Signalkaskade, die zur Aktivierung von NFκB führt, beteiligt sein, wodurch es zur Induktion von Zytokinen kommt (Sauter, 2014; Mahauad-Fernandez und Okeoma, 2016).

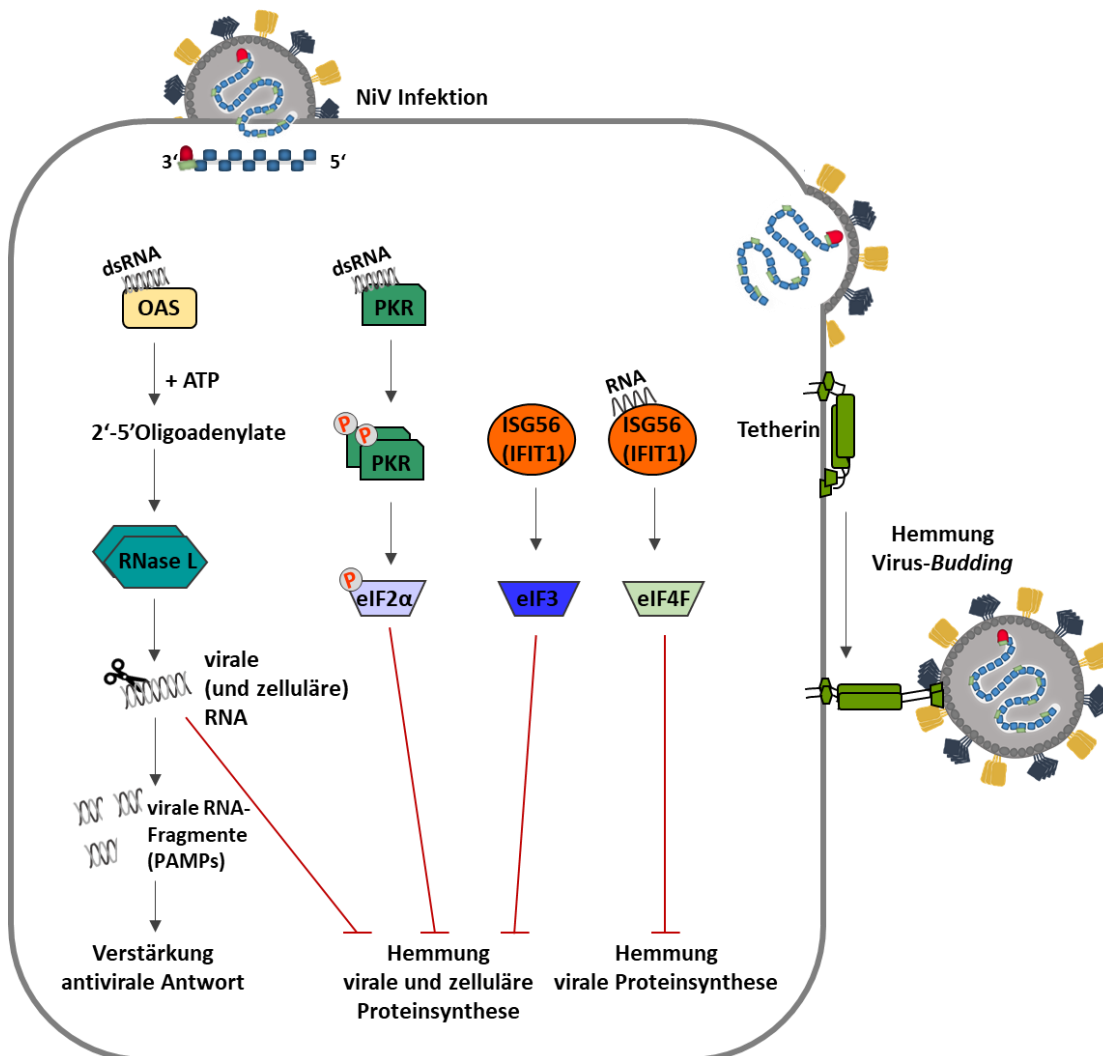


Abb. 1.8: Grob skizzierte antivirale Wirkung von den ISG-kodierten Proteinen OAS, PKR, ISG56 (IFIT1) und Tetherin (nach Choi *et al.*, 2015; Sauter, 2014; Hyde und Diamond, 2015; Mahauad-Fernandez und Okeoma, 2016; Burgess und Mohr, 2016).

1.3.5 Zytokin- und Entzündungsantwort in der Lunge bei einer NiV_{Malaysia}-Infektion *in vivo*

Bei infizierten Schweinen wurde während des NiV-Ausbruchs in Malaysia eine Lungenentzündung mit zahlreichen Läsionen in den Atemwegen und der Lunge beobachtet. Außerdem wurde eine hohe Konzentration an viralem Antigen in der Lunge nachgewiesen. Histopathologisch wurden vermehrte Alveolarmakrophagen, Neutrophile und mononukleäre Immunzell-Infiltrate in der Lunge beobachtet, was charakteristisch für eine Entzündungsantwort

ist (Mohd Nor und Ong, 1999; Hooper *et al.*, 2001). Ähnliches wurde auch in experimentell NiV-infizierten Schweinen beobachtet (Abb. 1.9; Middleton *et al.*, 2002; Weingartl *et al.*, 2006).

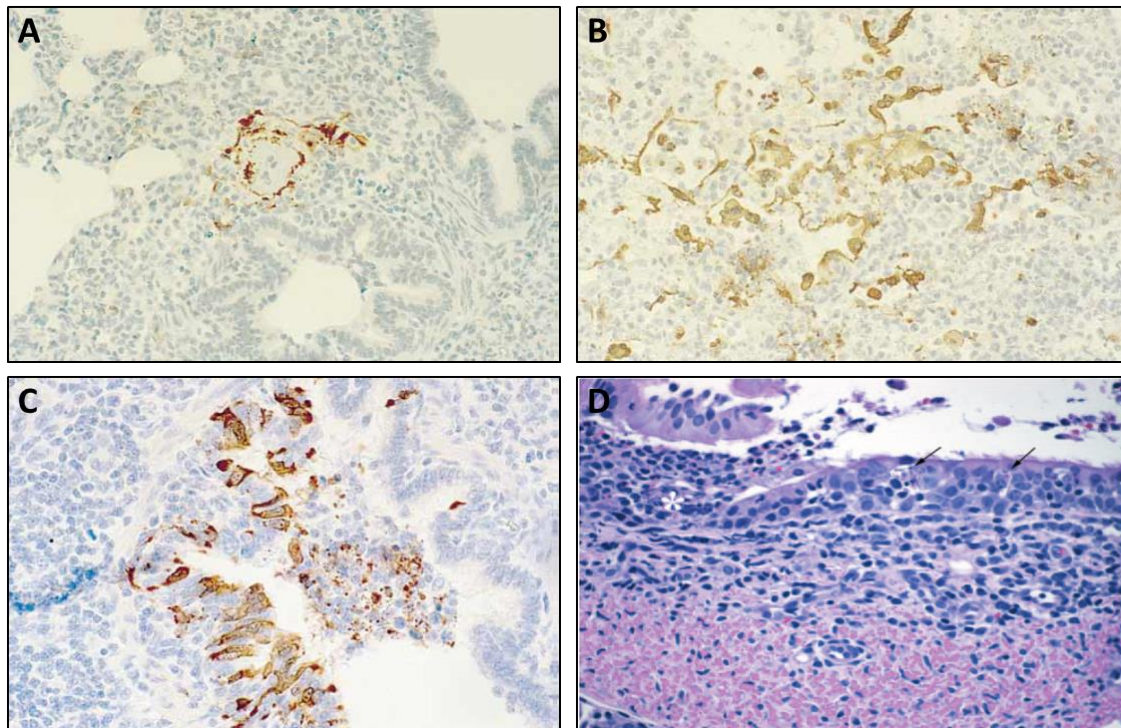


Abb. 1.9: NiV-Infektion in porcinen Atemwegen.

- (A-C) Immunhistochemischer Nachweis NiV-infizierter Zellen in der Lunge experimentell infizierter Schweine, (A-B) 7 Tage und (C) 8 Tage nach der Infektion (Middleton *et al.*, 2002).
 (D) Nachweis von trachealen Epithel-Schädigungen (Stern) und Nekrosen (Pfeil) in infizierten Schweinelungen, 6 Tage nach Infektion (Weingartl *et al.*, 2006).

Um die NiV-Infektion in der Lunge *in vivo* experimentell besser untersuchen zu können, wurden verschiedene Tiermodelle etabliert, wie z.B. Frettchen, Goldhamster oder die Afrikanische Grüne Meerkatze (Weingartl, 2015). Außerdem wurde ein humanes Lungen-Xenograft Mausmodell entwickelt, bei dem Teile einer humanen fetalen Lunge in Mäuse eingesetzt wurde und nachdem sich das Organ entwickelt hatte, mit NiV infiziert wurde. In diesem humanen Lungengewebe führte die NiV-Infektion zur Synzytienbildung (Abb. 1.10) und Hochregulierung von Zytokinen, die in der Entzündung eine wichtige Rolle spielen können, wie IP-10, IL-6, GM-CSF, G-CSF, Eotaxin-1, sowie TNF α und IL-1 β (Valbuena *et al.*, 2014).

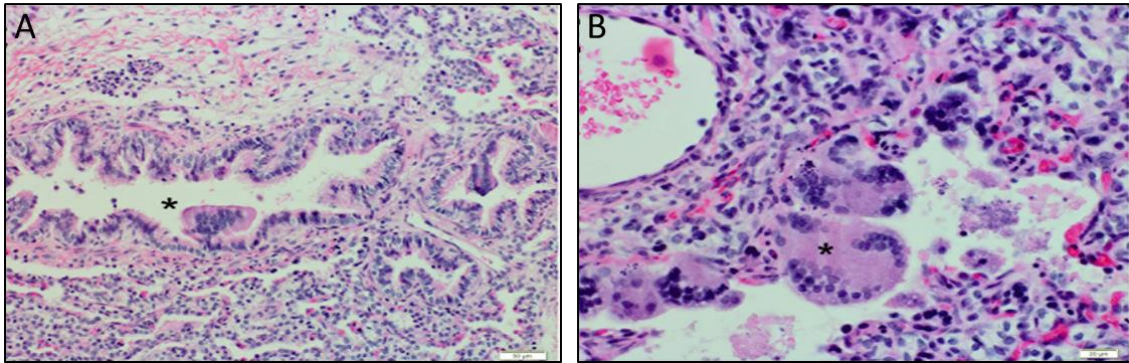


Abb. 1.10: NiV-Infektion in einem humanen Lungen-Xenograft Mausmodell (Valbuena *et al.*, 2014). (A-B) Nachweis von Synzytien (Sterne) 3 Tage nach der Infektion im Epithel von (A) Bronchien und (B) Alveolen.

Die NiV-Infektion in der Lunge wurde auch im Goldhamster-Modell untersucht. Intranasal infizierte syrische Goldhamster zeigten eine starke virale Replikation ab Tag 1 in der Trachea und eine zunächst schwächere NiV-Vermehrung am ersten Tag in der Lunge, die im Verlauf der Infektion jedoch deutlich anstieg. Der Respirationstrakt zeigte immunhistochemisch deutliche Entzündungszeichen. Es kam zur Einwanderung von mononukleären Zellen und Neutrophilen, sowie zur starken Induktion von IP-10 und zur Expression von IL-6, IL-4, IFN- γ . TNF α wurde nur früh in der Infektion induziert. Klinisch zeigten die Tiere eine Lungenentzündung. Wurden die Hamster mit einer sehr geringen NiV-Infektionsdosis infiziert (10^2 TCID $_{50}$ statt 10^5 TCID $_{50}$), wurde kein Virus in der Trachea gefunden. Erst ab Tag 3 war Virus in der Lunge nachweisbar und das zu deutlich niedrigeren Titern als bei der höheren Infektionsdosis. Interessanterweise wurde bei der niedrigeren Infektionsdosis das Virus überwiegend im Gehirn detektiert. Diese Tiere entwickelten neurologische Symptome (Rockx *et al.*, 2011).

Die Hochregulierung von IFN- γ , IL-4, IL-6, IP-10 und TNF α und die Infiltration von Entzündungszellen in die Lunge, sowie die Entwicklung einer Pneumonie in syrischen Goldhamstern, die mit einer hohen Infektionsdosis infiziert wurden (10^5 TCID $_{50}$), wurde ebenfalls von DeBuysscher und Kollegen beobachtet (DeBuysscher *et al.*, 2013).

Auch afrikanische grüne Meerkatzen, die mit NiV infiziert wurden, exprimierten in der Lunge proinflammatorische Zytokine, wie IL-6, TNF α , MIP-1 α , IL-1 β , IL-17A, sowie IL-4, welches anti-inflammatorisch wirkt. Manche Tiere entwickelten eine Lungenentzündung (Cong *et al.*, 2017).

Auch in einer weiteren Studie mit NiV-infizierten afrikanischen grünen Meerkatzen zeigten die Tiere immunologische Veränderungen und regulierten in der Lunge verschiedene Zytokine, wie MCP-1, IFN- γ , IL-8, GM-CSF, IL-15 und MIP-1 hoch, welche an der Einwanderung von Immunzellen und einer Entzündungsreaktion beteiligt sein können (Hammoud *et al.*, 2018).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das NiV in verschiedenen *in vivo* Modellen proinflammatorische Zytokine in der Lunge induzierte. Diese Entzündungsantwort, die die Infektion kontrollieren sollte, kann, wenn überschießend, pathologisch sein (siehe 1.3.2). Möglicherweise war das der Grund dafür, dass es in infizierten Schweinen während des NiV-Ausbruchs in Malaysia und Singapur 1998/99 zu schweren respiratorischen Erkrankungen mit Husten und Pneumonie (mit Zellabsterben und Lungenschäden) kam (siehe 1.1.2, Chua *et al.*, 2000; Mohd Nor und Ong, 2000; Hooper *et al.*, 2001).

Im Menschen zeigten sich nach Infektion mit NiV_{Malaysia} eher selten respiratorische Symptome (Paton *et al.*, 1999; Goh *et al.*, 2000), was vermuten lässt, dass entweder die gesamte Virusreplikation in der Lunge geringer als bei Schweinen ist oder die NiV-induzierte Entzündungsantwort beim Menschen viel weniger ausgeprägt ist.

1.4 Fragestellung

Die Nipahvirus_{Malaysia}-(NiV) Infektion verursacht in verschiedenen Wirtsspezies unterschiedliche Krankheitssymptome. Schweine entwickeln einen sogenannten „Brüllhusten“ und scheiden die Viren effizient über respiratorische Sekrete aus. Im Gegensatz dazu kommt es bei Menschen nur selten zu respiratorischen Symptomen und eine Virusübertragung über Atemwegssekrete wurde beim NiV-Ausbruch in Malaysia nicht beobachtet. Infizierte Menschen entwickeln überwiegend eine fiebrige Enzephalitis. Die Variationen in der Ausprägung der Atemwegssymptome weisen auf Spezies-spezifische Unterschiede hin. Die Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass der virale Eintrittsrezeptor Ephrin-B2 in humanen und porcinen respiratorischen Epithelzellen unterschiedlich exprimiert wird, was die NiV-Replikation beeinflusst, aber die Spezies-spezifischen Unterschiede nicht komplett erklären kann. Diese könnten vielmehr auf Unterschieden in der durch NiV ausgelösten angeborene Immunreaktion beruhen, was zu quantitativen oder qualitativen Unterschieden in der Hochregulierung von IFNs, antiviralen ISGs und proinflammatorischen Zytokinen führen könnte. Um diese Hypothese zu evaluieren, sollte in dieser Arbeit die NiV-Vermehrung und die Zytokinantwort in primären humanen und porcinen respiratorischen Epithelzellen auf molekularer Ebene untersucht und verglichen werden. Dazu sollten mit Hilfe von NiV-Infektionen und Virustitrationen im BSL-4 Labor, sowie qPCRs und FACS-Analysen folgende Aufgabenstellungen bearbeitet werden:

Untersuchungen zur NiV-Replikation, der IFN- und ISG-Induktion in kommerziell erhältlichen humanen Tracheal- (HTEpC), Bronchial- (HBEpC) und *Small-Airways*- (HSAEpC) Epithelzellen.

(Kapitel 2.1 Vergleich von primären humanen Epithelzellen aus verschiedenen Tracheal- und Bronchialabschnitten)

Isolierung von porcinen Epithelzellen aus verschiedenen Abschnitten einer Schweinelunge und anschließender Vergleich der NiV-Vermehrung und Zytokin-Induktion in den unterschiedlichen porcinen Atemwegsepithelzelltypen (PTEpC, PBEpC, PSAEpC).

(Kapitel 2.2 Vergleich von primären porcinen Epithelzellen aus verschiedenen Tracheal- und Bronchialabschnitten)

Direkter Vergleich der NiV-Replikation, -Freisetzung und der NiV-induzierten Hochregulierung von antiviralen und proinflammatorischen Zytokinen in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen.

(Kapitel 2.3 Spezies-spezifische Unterschiede in NiV-infizierten HBEpC und PBEpC)

Cyclosporin A (CSA) Inhibitorstudien mit NiV-infizierten respiratorischen Epithelzellen, um zu klären, ob CSA die NiV-Infektion hemmen kann, wie bereits für verschiedene andere Viren gezeigt wurde.

(Kapitel 2.4 Hemmung der NiV-Infektion durch Cyclosporin A in respiratorischen Epithelzellen)

Etablierung von porcinen *ex vivo lung slices cultures* (LS) und Infektion mit NiV_{eGFP}.

(Kapitel 2.5 Porcine ex vivo Lungenschnitte als Modellsystem).

Insgesamt sollen die Untersuchungen dieser Arbeit dazu beitragen, die Rolle der angeborenen Immunantwort während der NiV-Infektion in humanen und porcinen Atemwegsepithelien aufzuklären, um Spezies-spezifische Unterschiede zu identifizieren, die einen Einfluss auf die unterschiedliche respiratorische Symptomatik haben könnten.

II Ergebnisse

2.1 Vergleich von primären humanen Epithelzellen aus verschiedenen Tracheal- und Bronchialabschnitten (HTEpC, HBEpC und HSAEpC)

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass es in primären humanen Bronchial-Epithelzellen nach einer NiV-Infektion zu einer starken Induktion von IFN- λ 1 kommt, während IFN- β nur gering exprimiert wird (Sauerhering *et al.*, 2017). Unklar ist, ob sich die Induktion von IFN- λ in Epithelzellen von verschiedenen humanen Lungenabschnitten unterscheidet. Aus diesem Grund sollte die NiV-Replikation und IFN-Induktion in primären humanen Epithelzellen aus verschiedenen Abschnitten der Atemwege (Trachea, Bronchien und *Small-Airways*) analysiert werden. Außerdem wurde die Hochregulierung von Interferon-stimulierten Genen (ISGs) untersucht, um die antivirale Antwort nach der IFN-Induktion zu betrachten. Für diese Versuche wurden primäre humane, kommerziell erworbene Epithelzellen der Firma Provitro verwendet. Ein rekombinantes NiV_{eGFP} vom Malaysia-Stamm, das zusätzlich ein eGFP Reporter gen kodiert, ermöglichte dabei den Infektionsverlauf über einen direkten Fluoreszenznachweis zu analysieren (Dietzel *et al.*, 2015).

2.1.1 NiV-Infektion und IFN-Induktion in HTEpC und HBEpC

Zunächst sollte die NiV-Infektion in den Tracheal- (HTEpC) und Bronchial- (HBEpC) Epithelzellen verglichen werden, weshalb diese Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät (siehe 5.2.2.4 und 5.2.3) und mit der gleichen rNiV_{eGFP}-Dosis (3×10^4 TCID₅₀) im BSL-4 Labor infiziert wurden (siehe 5.4.2). 24 h *post infection* (p.i.) wurde die Ausbildung von Synzytien in den Zellkulturen über Phasenkontrast-Mikroskopie und das virale eGFP-Signal fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Die Zellen wurden anschließend mit RLT-Puffer + β -ME lysiert und nach Zugabe von absolutem Ethanol ausgeschleust (siehe 5.1.1). Außerhalb des BSL-4 Labors erfolgte die RNA-Isolierung und die cDNA-Synthese mit Oligo(dt) Primern (siehe 5.1.1 bis 5.1.3). In der anschließenden qPCR wurde mit spezifischen Primern die Menge an NiV-N mRNA als Maß für die Virus-Replikation bestimmt. Für die Normalisierung der verschiedenen Proben wurde die mRNA für Tubulin A1b (α -Tubulin) als *housekeeping gene* quantifiziert. Anschließend wurden die ct-Werte der NiV-N und α -Tubulin mRNA miteinander verrechnet (Δ ct). Der $2^{-\Delta$ ct} Wert gibt dann die Menge der NiV-N mRNA in einem Zelllysat an (siehe Methoden 5.1.4 bis 5.1.5).

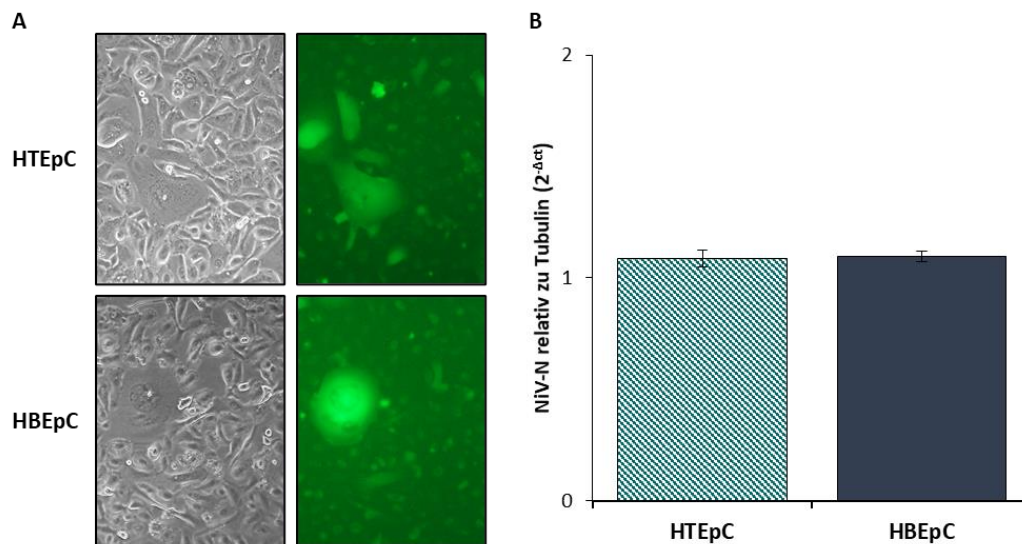


Abb. 2.1: Infektion von humanen Tracheal- (HTEpC) und Bronchial- (HBEpC) Epithelzellen mit rNiV_{eGFP}. HTEpC und HBEpC wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und mit 3×10^4 TCID₅₀ rNiV_{eGFP} infiziert. (A) 24 h p.i. wurde die NiV-induzierte Synzytien-Formation in lebenden Zellen am Nikon TS100 Mikroskop (100-fache Vergrößerung) analysiert. (B) Anschließend wurde die RNA aus den Zelllysaten isoliert und mit Oligo(dt) Primern in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde in einer qPCR mit spezifischen Primern gegen NiV-N ausgewertet und auf die Kontrolle α -Tubulin bezogen ($2^{-\Delta ct}$).

Die HTEpC und HBEpC sind nach der Infektion mit 3×10^4 TCID₅₀ rNiV_{eGFP} ähnlich gut infiziert. Wie in Abb 2.1 (A) zu sehen, bilden sich in beiden Epithelzellkulturen 24 h p.i. vereinzelte Synzytien aus, um die sich noch viele nicht infizierte Zellen befinden. Passend zu den mikroskopischen Aufnahmen ist die Menge viraler NiV-N mRNA in den Zelllysaten aus HTEpC und HBEpC ebenfalls vergleichbar (Abb. 2.1 [B]).

Um die Hochregulierung von IFNs in den infizierten HTEpC und HBEpC miteinander zu vergleichen, wurde mit der cDNA aus den infizierten Zelllysaten qPCRs mit spezifischen Primern gegen die humanen Interferone IFN- β , IFN- $\lambda 1$ und IFN- $\lambda 2,3$ durchgeführt. Die ct-Werte wurden anschließend auf das *housekeeping gene* α -Tubulin bezogen und auf die uninfizierte Probe (Mock) normalisiert, um die Hochregulierung der mRNA Menge zu berechnen (x-fache Erhöhung über Mock, $2^{-\Delta \Delta ct}$; siehe 5.1.4 - 5.1.5).

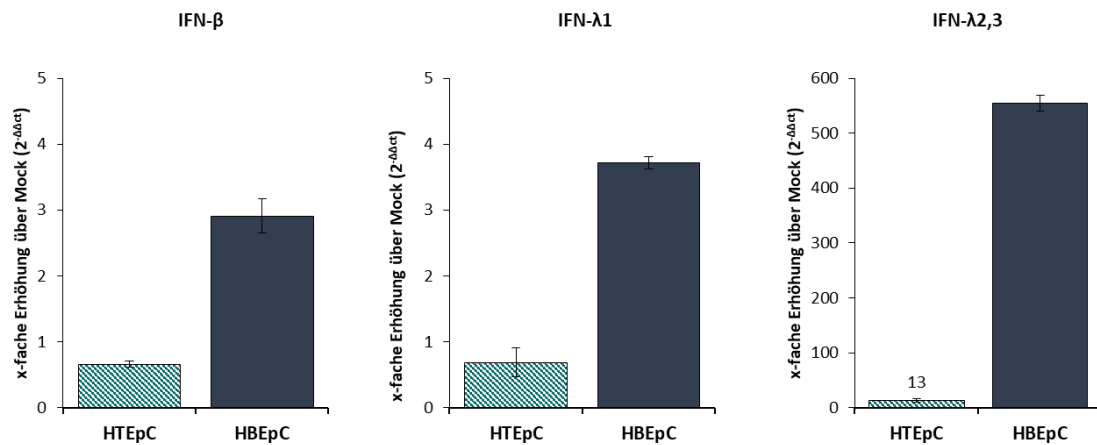


Abb. 2.2: Induktion von IFNs in NiV-infizierten humanen Tracheal- (HTEpC) und Bronchial- (HBEpC) Epithelzellen.

HTEpC und HBEpC wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und mit 3×10^4 TCID₅₀ rNiV_{eGFP} infiziert (gleiche Infektion wie in Abb. 2.1). 24 h p.i. wurde die RNA aus den Zelllysaten isoliert und mit Oligo(dt) Primern in cDNA umgeschrieben. Die qPCR erfolgte mit spezifischen Primern gegen humanes IFN-β, IFN-λ1 und IFN-λ2,3. Als Kontrolle diente α-Tubulin. Im Diagramm ist die x-fache Erhöhung über Mock (2^{ΔΔCt}) aufgetragen.

Wie Abb. 2.2 zeigt, kommt es in den HTEpC innerhalb von 24 h p.i. zu keiner Hochregulierung der IFN-β und IFN-λ1 mRNA, während die Expression dieser beiden IFNs in HBEpC eindeutig detektiert werden kann. Die Hochregulierung von IFN-λ2,3 mRNA ist in beiden Epithelzellkulturen nachweisbar, jedoch deutlich schwächer in HTEpC (13-fach) als in HBEpC (555-fach).

Insgesamt produzieren NiV-infizierte HTEpC und HBEpC nach einer NiV-Infektion mehr IFN-λ als IFN-β mRNA, wobei in beiden Zellkulturen IFN-λ2,3 stärker als IFN-λ1 induziert wird. Obwohl in den HTEpC und HBEpC eine ähnliche Menge Virus-RNA in den Zellen vorhanden ist (Abb.2.1), regulieren die HBEpC offensichtlich deutlich mehr IFN-λ2,3 hoch als die HTEpC (Abb.2.2).

Die NiV-Infektion und Zytokin-Expression in HBEpC wurden im Folgenden mit denen in humanen Bronchial-Epithelzellen aus tieferen Lungenabschnitten (*Small Airways*) verglichen.

2.1.2 NiV-Infektion und IFN- und ISG-Expression in humanen Bronchial-Epithelzellen aus dem oberen und unteren Bronchialabschnitt (HBEpC, HSAEpC)

2.1.2.1 NiV-Infektion und Zytokin-Induktion in HBEpC und HSAEpC

Um die NiV-Infektion und Zytokin-Induktion in humanen Bronchial-Epithelzellen aus verschiedenen Bronchialabschnitten zu vergleichen, wurden HBEpC und HSAEpC auf 6-Well-Platten kultiviert (siehe 5.2.2.4 und 5.2.3) und jeweils zwei Wells mit derselben rNiV_{eGFP}-Infektionsdosis (4×10^5 TCID₅₀) im BSL-4 Labor infiziert (siehe 5.4.2). 24 h p.i. erfolgte die Zelllyse

mit RLT-Puffer + β -ME und nach Zugabe von absolutem Ethanol das Ausschleusen der Proben aus dem BSL-4 Labor. Aus den Proben wurde die RNA isoliert und es folgte die cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase und Oligo(dt) Primern (siehe 5.1.1 bis 5.1.3). In der qPCR wurden NiV-N, sowie IFN- λ 1 und IFN- λ 2,3 mit spezifischen Primern analysiert. Die NiV-N Werte wurden auf α -Tubulin bezogen ($2^{-\Delta\text{ct}}$), die Induktion von zellulären IFN- λ 1 und IFN- λ 2,3 wurden über die $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ Methode berechnet und als x-fache Erhöhung über Mock aufgetragen (siehe 5.1.4 bis 5.1.5). Die Ergebnisse der Doppelbestimmung wurden gemittelt und sind in Abb. 2.3 dargestellt.

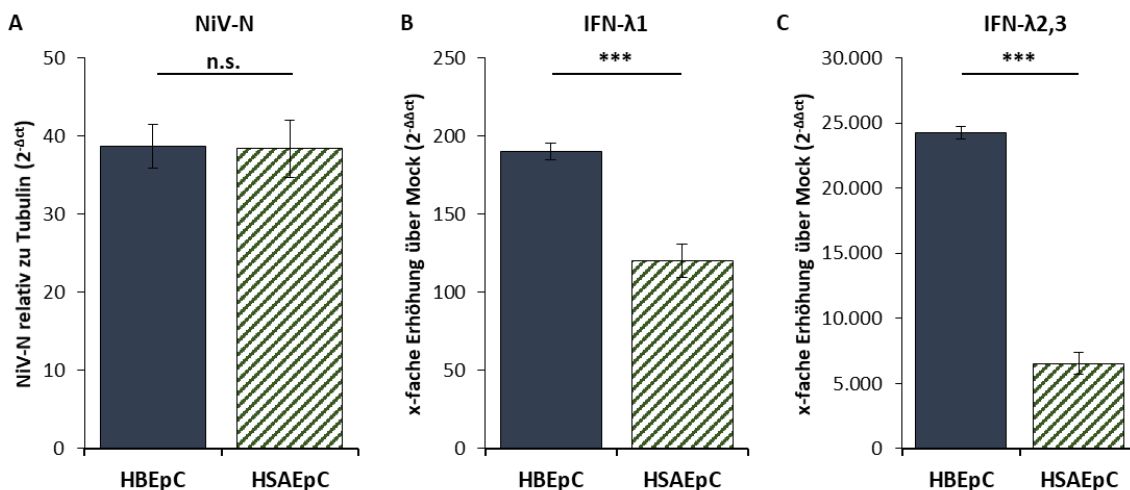


Abb. 2.3: Induktion von IFNs in NiV-infizierten humanen Bronchial- (HBEpC) und *Small-Airways*- (HSAEpC) Epithelzellen.

HBEpC (P9) und HSAEpC (P6) wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und mit 4×10^5 TCID₅₀ rNiV_{eGFP} infiziert. 24 h p.i. wurde die RNA aus den Zelllysaten isoliert und mit Oligo(dt) Primern in cDNA umgeschrieben. Die qPCR erfolgte mit spezifischen Primern. (A) NiV-N wurde auf die Kontrolle α -Tubulin bezogen ($2^{-\Delta\text{ct}}$). (B) Für humanes IFN- λ 1 und (C) IFN- λ 2,3 wurde die x-fache Erhöhung über Mock ($2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$) berechnet. (A-C) Die dargestellten Werte wurden gemittelt aus einer Doppelbestimmung. *** $p \leq 0,001$, n.s., nicht signifikant, ungepaarter t-Test.

Die HBEpC und HSAEpC zeigen nach Infektion mit der gleichen Infektionsdosis eine ähnliche Menge Virus-RNA in den Zellen (Abb. 2.3 A). Beide Zellkulturen regulieren die Typ-III Interferone IFN- λ 1 und IFN- λ 2,3 auf mRNA-Ebene stark hoch, wobei die Induktion von IFN- λ 2,3 (> 6000-fach, Abb. 2.3 C) ausgeprägter ist als die von IFN- λ 1 (< 200-fach, Abb. 2.3 B). Diese Beobachtung wurde zuvor auch in infizierten HTEpC und HBEpC gemacht (siehe Abb. 2.2). Das bedeutet, dass auch HSAEpC, wie HTEpC und HBEpC, in der Lage sind, auf eine NiV-Infektion mit der Hochregulierung von Typ-III IFNs zu reagieren. Die HSAEpC regulieren jedoch, trotz vergleichbarer viraler RNA-Menge in den Zellen, deutlich weniger IFN- λ als die HBEpC hoch.

Um zu überprüfen, ob die geringere Hochregulierung von IFN- λ in HSAEpC auch mit einer geringeren Induktion von ISGs korreliert, wurde aus der cDNA eine qPCR mit humanen Primern für die ISGs OAS, PKR und ISG56 durchgeführt.

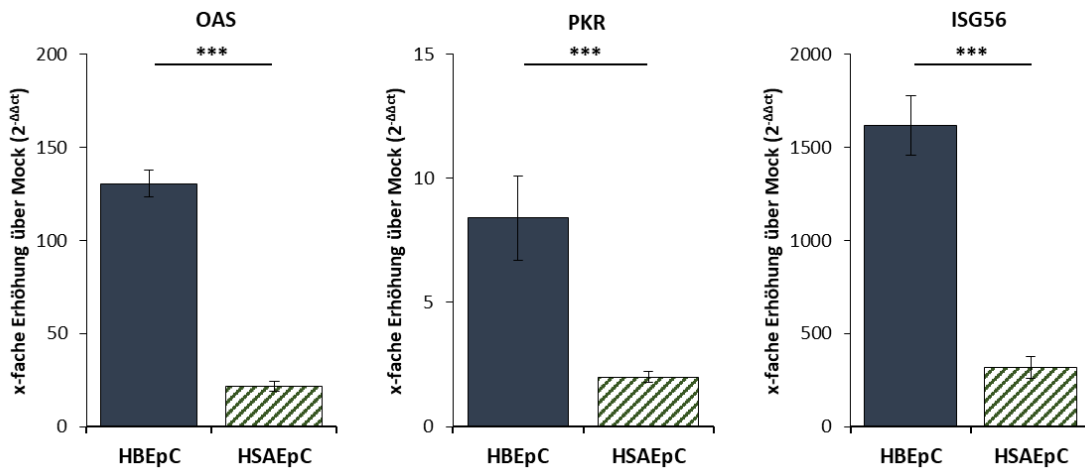


Abb. 2.4: Induktion von ISGs in NiV-infizierten humanen Bronchial- (HBEpC) und *Small-Airways*- (HSAEpC) Epithelzellen.

HBEpC (P9) und HSAEpC (P6), ausgesät auf 6-Well-Platten, wurden mit 4×10^5 TCID₅₀ rNiV_{eGFP} infiziert (gleiche Infektion wie in Abb. 2.3). 24 h p.i. wurde die RNA aus den Zelllysaten isoliert und mit Oligo(dt) Primern in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die qPCR mit spezifischen Primern gegen humanes OAS, PKR, ISG56 und α -Tubulin durchgeführt. Für die ISGs wurde die x-fache Erhöhung über Mock ($2^{-\Delta\Delta ct}$) berechnet. Die dargestellten Werte wurden gemittelt aus einer Doppelbestimmung. *** $p \leq 0,001$, ungepaarter t-Test.

Abb. 2.4 zeigt, dass es in den infizierten HBEpC und HSAEpC zur Hochregulierung der ISGs OAS, PKR und ISG56 auf mRNA-Ebene kommt. In beiden Zelltypen wird vor allem ISG56 stark induziert, gefolgt von der Expression von OAS. Die PKR mRNA wird, verglichen mit den anderen gemessenen ISGs, nur leicht hochreguliert.

Insgesamt reagieren die HSAEpC auf die NiV-Infektion mit einer deutlich geringeren ISG-Hochregulierung als die HBEpC, was zur schwächeren IFN- λ Antwort der HSAEpC passt (siehe Abb. 2.3).

2.1.2.2 NiV-Rezeptorexpression in HBEpC und HSAEpC

Bevor die HBEpC und HSAEpC infiziert werden konnten, wurden sie mehrmals passagiert und dabei vermehrt, um eine ausreichende Zellmenge für die Infektion zu erhalten. Die für die in Abb. 2.3 und 2.4 gezeigten Infektionsstudien verwendeten Zellkulturen stammten aus Passage 9 bzw. 6 (HBEpC P9; HSAEpC P6). Häufiges Passagieren kann die Expression von Proteinen in primären Zellen beeinflussen und damit eventuell auch die Expression von Virusrezeptoren. Um zu testen, ob das Passagieren der Zellen zu einer veränderten Expression des NiV-Rezeptors Ephrin-B2 (EB2) auf der Zelloberfläche der HBEpC und HSAEpC führt, wurde diese in verschiedenen Zell-Passagen mittels FACS-Analyse untersucht.

HBEpC der Passage 6 (P6) und Passage 9 (P9), sowie HSAEpC der Passage 3 (P3) und Passage 6 (P6) wurden auf 6-Well-Platten kultiviert (siehe 5.2.2.4). Die Zellen wurden mit

Detachment Solution (Passage Kit 4) vom *Well*-Boden gelöst und mit 0,5 % PFA (in PBS_{def} + 1 % BSA) fixiert. Anschließend erfolgte die EB2-Färbung über Nacht bei 4 °C mit rekombinanten Maus-EphB4/Fc (1:2, verdünnt in PBS_{def}/1 % BSA). EphB4/Fc ist ein chimäres Protein, das EphB4 und ein humanes IgG₁ Fc-Fragment enthält. EphB4 ist der Rezeptor für Ephrin-Liganden und bindet an Ephrin-B2. Zum Nachweis des gebundenen EphB4/Fc wurden die Zellen mit dem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper Ziege-anti-human IgG für 45 min bei 4 °C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde am Guava EasyCyte Mini Gerät (Guava Technologies) gemessen und mit der CytoSoft 4.2 Software (Guava Technologies) ausgewertet (siehe 5.3.1).

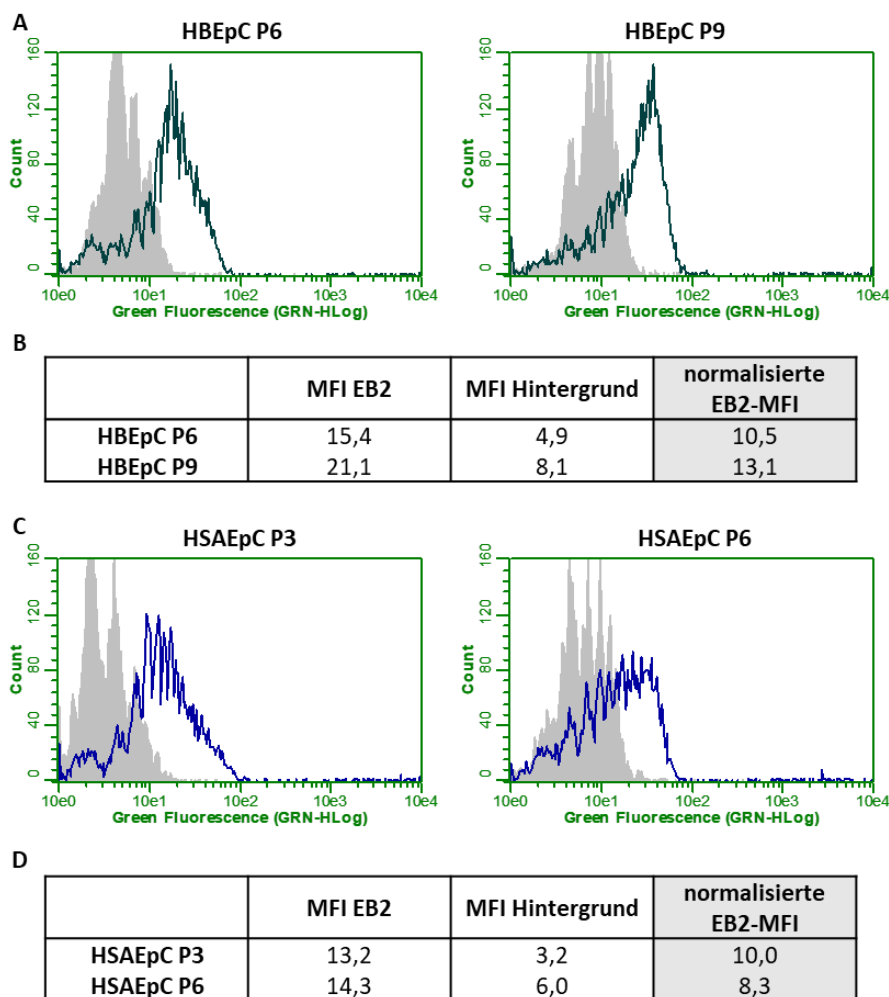


Abb. 2.5: Vergleich der Ephrin-B2 (EB2) Oberflächenexpression in humanen Bronchial- (HBEpC) und Small-Airways- (HSAEpC) Epithelzellen in verschiedenen Passagen.

HBEpC (P6 und P9) und HSAEpC (P3 und P6) wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und kultiviert, mit *Detachment Solution* abgelöst und mit 0,5 % PFA fixiert. EB2 wurde mit dem rekombinanten EphB4/Fc (1:2) und einem Ziege-anti-human FITC-Sekundärantikörper (1:200) gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit dem Guava EasyCyte Mini Gerät und der CytoSoft 4.2 Software.

(A, C) Die grauen Kurven zeigen den unspezifischen Hintergrund von Zellen, die nur mit Ziege-anti-human FITC-Sekundärantikörper gefärbt wurden. (A) Die grüne Kurve zeigt die spezifische EB2-Expression in HBEpC, (C) die blaue Kurve die spezifische EB2-Expression in HSAEpC.

(B, D) Die Tabelle zeigt die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI). Die normalisierte EB2-MFI gibt die spezifische EB2-Oberflächenexpression (MFI EB2 – MFI Hintergrund) in (B) HBEpC und (D) HSAEpC an.

Die FACS-Analyse ist in Abb. 2.5 gezeigt. Die grauen Graphen bezeichnen die Hintergrundfluoreszenz, die in den Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden, auftritt. Die grünen (HBEpC, Abb. 2.5 A) und blauen (HSAEpC, Abb. 2.5 C) Kurven zeigen die EB2-spezifische Fluoreszenz. Alle Zellkulturen weisen eine einheitliche Zellpopulation auf. Die Expression von EB2 bleibt relativ stabil über mehrere Passagen. Die normalisierten mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) liegen in allen Kulturen bei etwa 10 (8,3 bis 13,1, Abb. 2.5 B und D). Die ähnliche EB2-Oberflächenexpression passt zu den vergleichbaren Infektions-Effizienzen in den HBEpC (P9) und HSAEpC (P6) (Abb. 2.3).

2.1.2.3 IFNLR1-Expression in HBEpC und HSAEpC

Da bekannt ist, dass die Menge an IFN- λ -Rezeptoren auf Zellen variieren kann, was auch die Sensitivität gegenüber IFN- λ beeinflusst (Sauerhering *et al.*, 2017), sollte die IFN- λ -Rezeptorexpression in HBEpC und HSAEpC verglichen werden. Dazu wurde mittels Oberflächen-FACS-Analyse untersucht, wie die Untereinheit IFNLR1 des IFN- λ -Rezeptors in den beiden Zellkulturen exprimiert wird und ob diese durch die Passage der primären Zellen beeinflusst wird. Die Färbung für die Expression des IFNLR1 wurde parallel zur EB2-Färbung, d.h. mit den gleichen Zellkulturen, durchgeführt (Abb. 2.5).

Die HBEpC (P6 und P9) und HSAEpC (P3 und P6) wurden von 6-Well-Platten mit *Detachment Solution* gelöst, um die Zellen anschließend mit 0,5 % PFA zu fixieren. Danach erfolgte die Behandlung mit dem Erstantikörper Maus-anti-hIL-28 R α /IFN- λ R1 (1:20) über Nacht und eine Inkubation mit dem FITC-Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus für 45 min. Die Auswertung wurde am Guava EasyCyte Mini Gerät (Guava Technologies) mit der CytoSoft 4.2 Software (Guava Technologies) durchgeführt (siehe 5.3.1).

Die Oberflächenexpression von IFNLR1 ist in Abb. 2.6 dargestellt. Die HBEpC zeigen in beiden Passagen eine einheitliche Zellpopulation, wobei die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) mit steigender Passagezahl (P9) abnimmt (Abb. 2.6 A und B). Die HSAEpC weisen in der niedrigen Passage (P3) ebenfalls eine einheitlich IFNLR1-positive Zellpopulation auf (Abb. 2.6 C). Jedoch mit höherer Passage (P6) zeigen die HSAEpC Kulturen zwei Zellpopulationen, wovon nur eine den IFNLR1 spezifisch auf ihrer Oberfläche exprimiert. In dieser ist zudem die mittlere Fluoreszenzintensität deutlich vermindert (MFI von 10,2 im Vergleich zu 55,9 in HSAEpC P3; Abb. 2.6 D). Die beiden niedrigen Passagen (P6 HBEpC und P3 HSAEpC) zeigen somit eine höhere und etwa vergleichbare MFI (Abb. 2.6 B und D), während sich die MFI der beiden höheren Passagen (HBEpC P9 und HSAEpC P6) stark unterscheidet (normalisierte MFI bei HBEpC = 35 und bei HSAEpC = 10,2). Daraus lässt sich schließen, dass im Gegensatz zur NiV-Rezeptorexpression

(Abb. 2.5) die IFNLR1-Oberflächenexpression über mehrere Passagen abnimmt. Die Abnahme ist jedoch in HBEpC deutlich geringer als in HSAEpC.

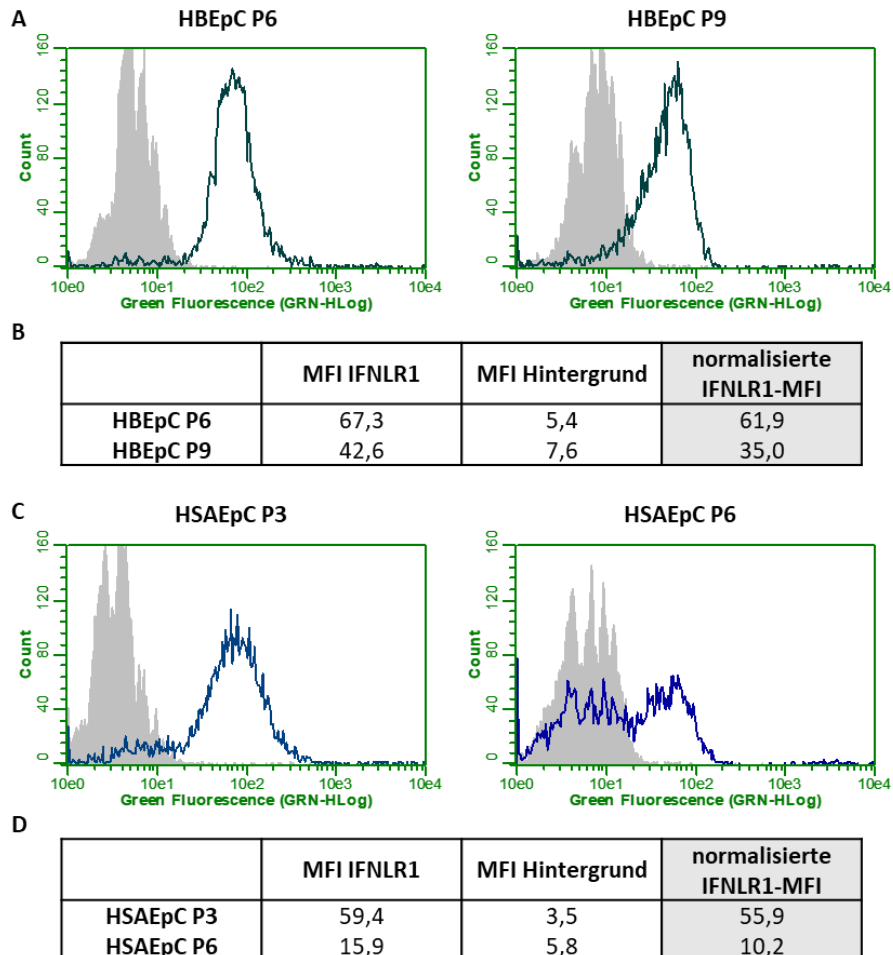


Abb. 2.6: Vergleich der IFNLR1-Oberflächenexpression in humanen Bronchial- (HBEpC) und Small-Airways- (HSAEpC) Epithelzellen in verschiedenen Passagen.

HBEpC (P6 und P9) und HSAEpC (P3 und P6) wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und kultiviert, mit *Detachment Solution* abgelöst und mit 0,5 % PFA fixiert. IFNLR1 wurde mit dem Maus-anti-hIL-28 α /IFN- λ R1 (1:20) und einem Ziege-anti-Maus FITC-Sekundärantikörper (1:200) gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit dem Guava EasyCyte Mini Gerät und der CytoSoft 4.2 Software.

(A, C) Die grauen Kurven zeigen die Hintergrundfärbung durch den FITC-Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus. (A) Die grüne Kurve zeigt die spezifische IFNLR1-Expression in HBEpC, (C) die blaue Kurve zeigt die spezifische IFNLR1-Expression in HSAEpC.

(B, D) Die Tabellen zeigen die mittleren normalisierten Fluoreszenzintensitäten (MFI IFNLR1 - MFI Hintergrund) in (B) HBEpC und (D) HSAEpC.

2.1.2.4 Die unterschiedliche Menge an IFN- λ -Rezeptoren (IFNLR1) auf der Zelloberfläche von HBEpC (P9) und HSAEpC (P6) korreliert mit der IFN- λ -Sensitivität

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in der IFNLR1-Oberflächenexpression die Fähigkeit der Zellen auf IFN- λ zu reagieren beeinflusst und dadurch auch die ISG-Induktion, wurde die IFN- λ -Sensitivität der HBEpC und HSAEpC analysiert.

Dafür wurden die auf 6-Well-Platten gewachsenen HBEpC (P9) und HSAEpC (P6) mit 10 ng/ml, 100 ng/ml oder 500 ng/ml rekombinatem humanen IFN- λ für 16,5 h stimuliert (siehe 5.2.2.4 und 5.2.4.1). Anschließend wurden die Zellen in RLT-Puffer + β -ME aufgenommen, die RNA isoliert, die cDNA mit Oligo(dt) Primern synthetisiert und eine qPCR mit spezifischen humanen OAS und ISG56 Primern durchgeführt. Über die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode wurde die x-fache Erhöhung über Mock bestimmt ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, siehe 5.1.1 bis 5.1.5).

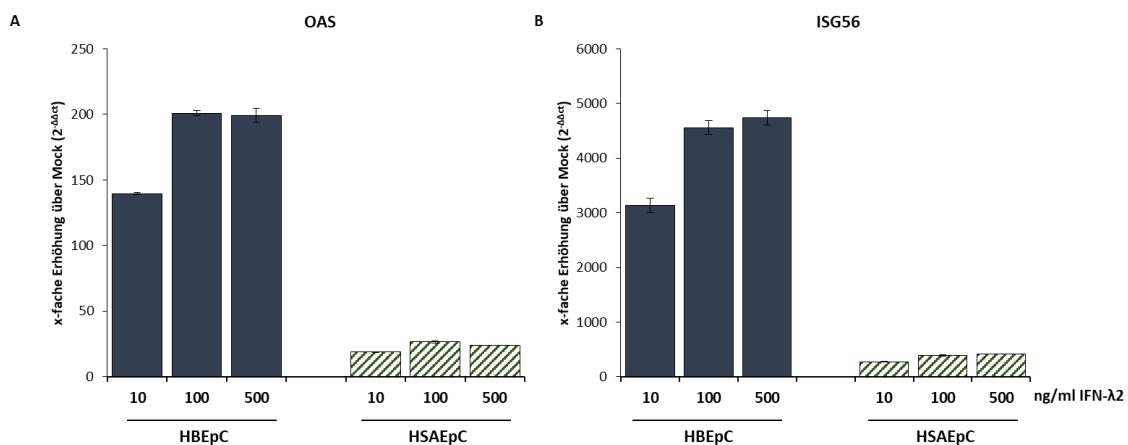


Abb. 2.7: Induktion von ISGs in humanen Bronchial- (HBEpC) und *Small-Airways*- (HSAEpC) Epithelzellen nach Stimulation mit rekombinanten IFN- λ 2.

HBEpC (P9) und HSAEpC (P6) wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und mit 10 ng/ml, 100 ng/ml oder 500 ng/ml rekombinatem humanen IFN- λ 2 für 16,5 h stimuliert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen isoliert, mit Oligo(dt) Primern in cDNA umgeschrieben und in der qPCR mit spezifischen humanen OAS und ISG56 Primern analysiert. Für die ISGs wurde die x-fache Erhöhung über Mock ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) bestimmt.

Die HBEpC und HSAEpC regulieren nach IFN- λ 2 Stimulation beide ISGs (OAS und ISG56) auf mRNA-Ebene hoch (Abb. 2.7). Die Hochregulierung von OAS und ISG56 scheint in beiden Zelltypen zwischen 10 und 100 ng/ml IFN- λ 2,3 das Maximum zu erreichen, da die Expression nach Stimulation mit 500 ng/ml IFN- λ 2 nicht gesteigert wird. ISG56 wird offensichtlich stärker hochreguliert als OAS, was auch zuvor in der Infektion beobachtet wurde (Abb. 2.4). Am auffälligsten ist, dass HBEpC OAS und ISG56 insgesamt deutlich stärker exprimieren, was zeigt, dass die größere Menge an IFNLR1 auf der Zelloberfläche (MFI 35 im Vergleich zu MFI 10,2 in HSAEpC, Abb. 2.6) mit einer erhöhten IFN- λ -Sensitivität der HBEpC korreliert. Die HSAEpC, in

denen nur ein Teil der Zellpopulation den IFNLR1 auf der Oberfläche trägt (Abb. 2.6 C), induzieren entsprechend weniger ISGs nach der Stimulation mit IFN- λ 2.

Die bisherigen Versuche zeigen, dass HBEpC besser als HSAEpC für vergleichende Studien mit porcinen Epithelzellen geeignet sind, weil sie (1) gut mit NiV infizierbar sind, (2) eine starke IFN- λ Antwort nach NiV-Infektion zeigen und (3) eine einheitliche IFNLR1-positive Zellpopulation (auch bei höherer Passage) und dadurch stärkere IFN- λ -Sensitivität zeigen.

2.2 Vergleich von primären porcinen Epithelzellen aus verschiedenen Tracheal- und Bronchialabschnitten (PTEpC, PBEpC und PSAEpC)

Mit den selbst isolierten primären porcinen Epithelzellen aus Trachea (PTEpC), Bronchien (PBEpC) und *Small-Airways* (PSAEpC) ist es möglich, die NiV-Infektion in verschiedenen Epithelzellkulturen der gleichen Schweinelunge zu untersuchen. Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, reagieren humane Tracheal-, Bronchial- und *Small-Airways*-Epithelzellen auf die NiV-Infektion mit einer Hochregulierung von vor allem IFN- λ 2,3 mRNA, jedoch gibt es Unterschiede in der Stärke der IFN- und ISG-Antwort (siehe Abschnitt 2.1). In porcinen respiratorischen Epithelzellen ist noch unbekannt, ob es durch die NiV-Infektion auch zu einer Hochregulierung von IFN- λ kommt und ob es Unterschiede im NiV-Wachstum und der Virus-vermittelten Zytokinantwort in verschiedenen Tracheal- und Bronchialabschnitten gibt.

2.2.1 NiV-Infektion und IFN-Induktion in PTEpC, PBEpC und PSAEpC

Zuerst sollte analysiert werden, ob es in porcinen wie in humanen respiratorischen Epithelzellen zu einer Induktion von IFN- λ nach der NiV-Infektion kommt. Die PTEpC, PBEpC und PSAEpC, isoliert aus jeweils der gleichen Schweinelunge, wurden auf Kollagen-beschichteten 6-Well-Platten ausgesät und kultiviert (siehe 5.2.2.4). Anschließend wurden die Zellen im Hochsicherheitslabor mit der gleichen Infektionsdosis rNiV_{eGFP} (6×10^5 TCID₅₀) infiziert (siehe 5.4.2). 24 h p.i. wurden die Zellen lysiert und für die RNA-Isolierung ausgeschleust. Die cDNA-Synthese wurde mit Oligo(dt) Primern durchgeführt, gefolgt von einer qPCR mit Primern für NiV-N, um die Virusreplikation zu quantifizieren, oder mit spezifischen porcinen Primern für IFN- β und IFN- λ 3. Als *housekeeping gene* wurde porcines Tubulin A1b (α -Tubulin) quantifiziert. NiV-N wurde auf die α -Tubulin-Werte bezogen ($2^{-\Delta\text{ct}}$). Für die IFNs wurde die x-fache Erhöhung über Mock ($2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$) bestimmt (siehe 5.1.1 bis 5.1.5).

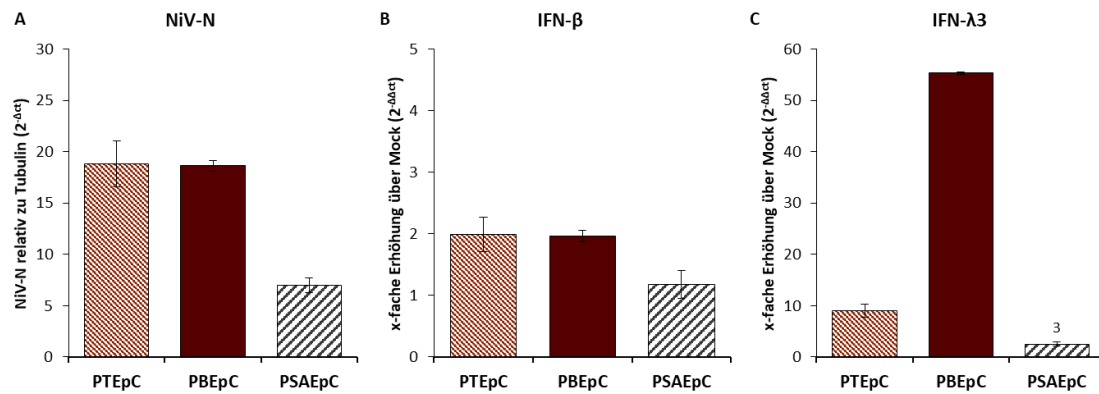


Abb. 2.8: Induktion von IFNs in NiV-infizierten porcinen Tracheal- (PTEpC), Bronchial- (PBEpC) und Small-Airways- (PSAEpC) Epithelzellen.

PTEpC, PBEpC und PSAEpC wurden auf 6-Well-Platten kultiviert und mit 6×10^5 TCID₅₀ rNiV_{eGFP} infiziert. 24 h p.i. erfolgte die RNA-Isolierung aus den Zelllysaten und die cDNA-Synthese mit Oligo(dt) Primern. Die qPCR wurde mit spezifischen Primern gegen (A) NiV-N, (B) porcines IFN- β und (C) IFN- $\lambda 3$ durchgeführt. (A) NiV-N wurde auf die Kontrolle α -Tubulin bezogen ($2^{\Delta ct}$). (B, C) Für IFN- β und IFN- $\lambda 3$ wurde die x-fache Erhöhung über Mock ($2^{\Delta \Delta ct}$) berechnet.

Abb. 2.8 A zeigt, dass die PBEpC und PTEpC eine ähnliche, die PSAEpC eine schwächere Virus-Replikation aufweisen, d.h. deutlich geringere Mengen an NiV-N RNA enthalten. Durch die Infektion kommt es in den PTEpC und PBEpC zu einer etwa zweifachen IFN- β Hochregulierung, während die PSAEpC IFN- β nicht exprimieren (Abb. 2.8 B). IFN- $\lambda 3$ wird in PTEpC, PBEpC und PSAEpC generell stärker induziert als IFN- β . Die stärkste Hochregulierung von IFN- $\lambda 3$ zeigen die PBEpC. Das lässt darauf schließen, dass die porcinen, wie die humanen respiratorischen Epithelzellen nach der NiV-Infektion vor allem Typ-III IFN produzieren.

2.2.2 Induktion von IFNs und proinflammatorischen Zytokinen in NiV-infizierten PTEpC, PBEpC und PSAEpC (24 h und 48 h p.i.)

Um zu untersuchen, wie sich die NiV-Infektion und die Zytokin-Hochregulation in den porcinen Epithelzellen über die Zeit entwickelt, wurden Infektionsversuche für 24 h und 48 h p.i. durchgeführt.

Die PTEpC, PBEpC und PSAEpC aus der gleichen porcinen Lunge wurden auf 6-Well-Platten kultiviert (siehe 5.2.2.4) und nach Erreichen der Konfluenz mit $1,5 \times 10^5$ TCID₅₀ rNiV_{eGFP} im BSL-4 Labor infiziert (siehe 5.4.2). 24 h und 48 h p.i. wurde die Synzytienbildung mikroskopisch kontrolliert. Die Virus-Freisetzung wurde untersucht, indem die Überstände von den Zellen abgenommen und eine Titerbestimmung mittels TCID₅₀, unter Verwendung der *Reed and Muench* Methode mit Vero76-Zellen durchgeführt wurde (siehe 5.2.1 und 5.4.1).

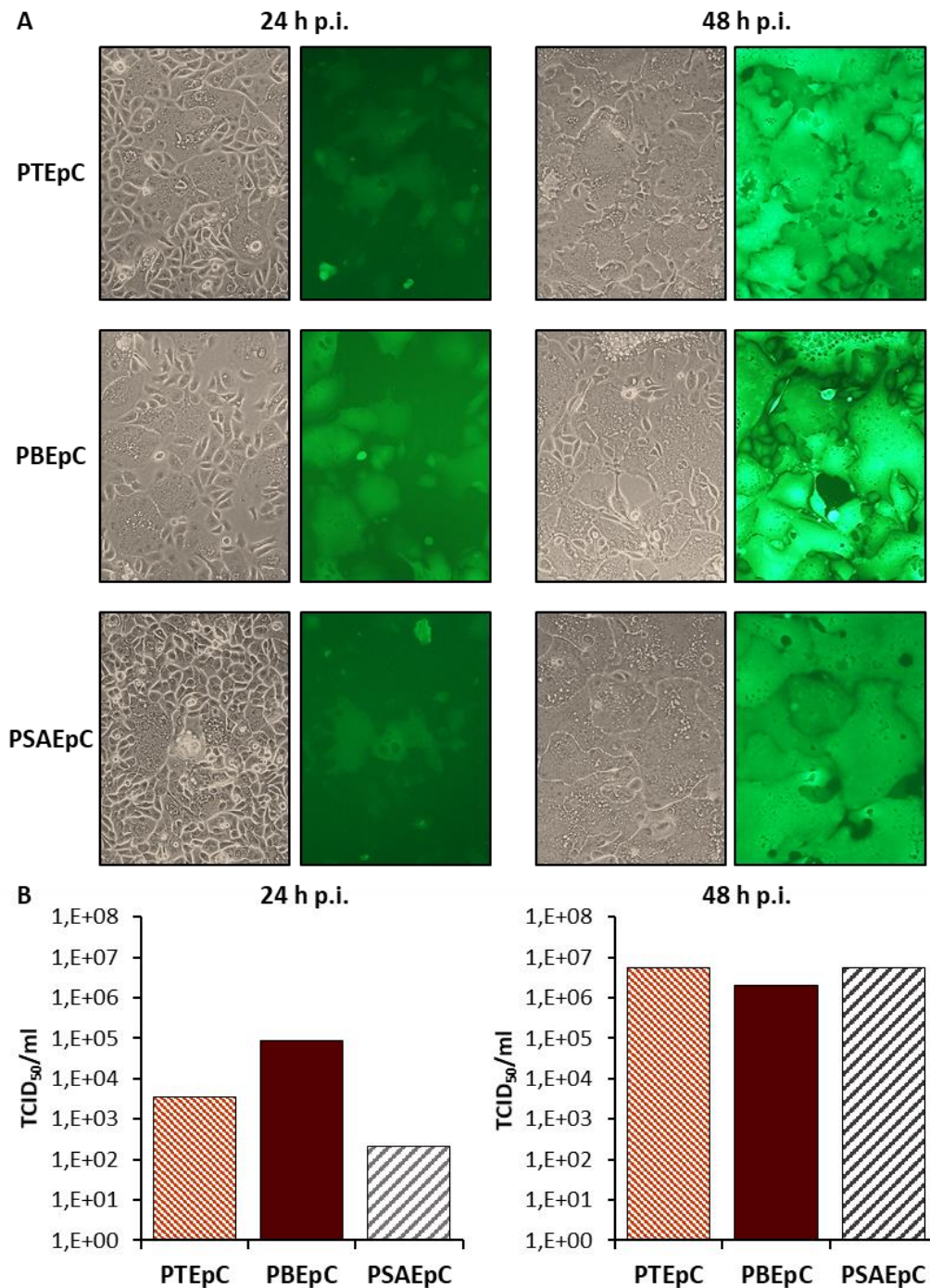


Abb. 2.9: NiV-Infektion in porcinen Tracheal- (PTEpC), Bronchial- (PBEpC) und Small-Airways- (PSAEpC) Epithelzellen.

PTEpC, PBEpC und PSAEpC auf 6-Well-Platten wurden mit $1,5 \times 10^5$ TCID₅₀ rNiV_{eGFP} infiziert. 24 h p.i. und 48 h p.i. wurde (A) die Synzytien-Formation in lebenden Zellen am Nikon TS100 Mikroskop (100-fache Vergrößerung) dokumentiert und (B) der Titer mittels TCID₅₀ Methode aus zellfreien Überständen bestimmt.

In Abb. 2.9 A ist deutlich zu erkennen, dass es in den PTEpC, PBEpC und PSAEpC zur Virus-induzierten Synzytienbildung kommt. 24 h p.i. bilden sich kleine vereinzelte Synzytien, die von uninfizierten eGFP-negativen Zellen umgeben sind. 48 h p.i. hat sich die Infektion in allen

respiratorischen Epithelzellkulturen so stark ausgebreitet, dass sich alle Zellen in großen eGFP-positiven Synzytien befinden. Passend dazu steigen auch die Virustiter im Überstand von 24 h zu 48 h p.i. (Abb. 2.9 B). 24 h p.i. zeigen die PBEpC den höchsten, die PSAEpC den niedrigsten Titer. Nach 48 h p.i. sind die Titer in allen drei Zellkulturen vergleichbar. Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass das NiV alle drei Epithelzellkulturen aus der porcinen Lunge infizieren kann, die Infektion sich ausbreitet und infektiöse Viren in den Überstand freigesetzt werden.

Als nächstes sollte untersucht werden, wie sich die Virus-Replikation in den Zellen und die IFN- λ 3 Antwort im Verlaufe der Infektion verändert. Dafür wurden die infizierten Zellen in RLT-Puffer mit β -ME lysiert und nach Zugabe von Ethanol aus dem BSL-4 Labor ausgeschleust, um eine RNA-Isolierung und cDNA-Synthese durchzuführen (siehe 5.1.1 bis 5.1.3). Die anschließende qPCR wurde mit Primern für NiV-N, porcines IFN- λ 3 und α -Tubulin als Kontrolle durchgeführt. Die NiV-N Werte wurden auf α -Tubulin bezogen ($2^{-\Delta ct}$), die Induktion von IFN- λ 3 wurden als x-fache Erhöhung über Mock berechnet (siehe 5.1.4 bis 5.1.5).

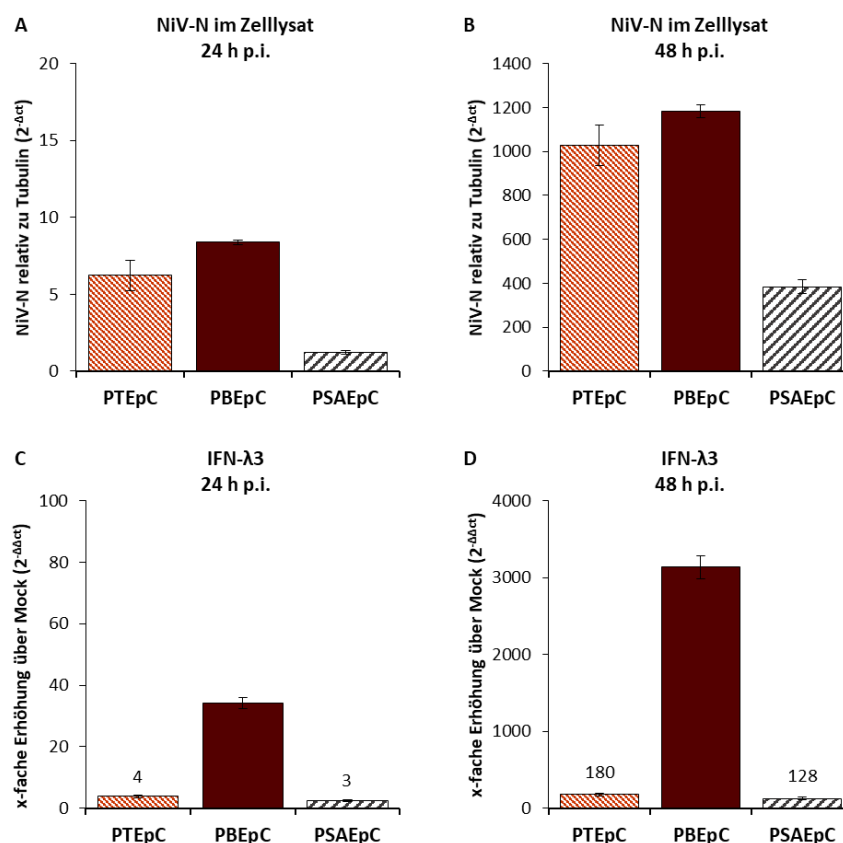


Abb. 2.10: Induktion von IFNs in NiV-infizierten porcinen Tracheal- (PTEpC), Bronchial- (PBEpC) und Small-Airways- (PSAepC) Epithelzellen.

PTEpC, PBEpC und PSAepC, kultiviert auf 6-Well-Platten, wurden mit $1,5 \times 10^5$ TCID₅₀ rNiV_{eGFP} infiziert. (A, C) 24 h p.i. und (B, D) 48 h p.i. wurde aus den Zelllysaten die RNA isoliert und mit Oligo(dt) Primern in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte eine qPCR mit spezifischen NiV-N und porcinen IFN- λ 3 Primern. (A-B) NiV-N wurde auf die Kontrolle α -Tubulin bezogen ($2^{-\Delta ct}$) und (B-D) für IFN- λ 3 wurde die x-fache Erhöhung über Mock berechnet ($2^{-\Delta\Delta ct}$).

Die Virus-Replikation, quantifiziert über die NiV-N RNA im Zelllysate, steigt in allen Zellkulturen über die Zeit an (Abb. 2.10 A und B). Die NiV-Replikation ist am stärksten und vergleichbar in den PBEpC und PTEpC zu beiden Zeitpunkten. Die PSAEpC exprimieren deutlich geringere NiV-N RNA Mengen. Die NiV-N Mengen in den Zelllysaten 24 h p.i. korrelieren gut mit den Virustitern im Überstand (Abb. 2.9). 24 h p.i. sind die NiV-N RNA Mengen in HBEpC-Lysaten am höchsten und in den HSAEpC am niedrigsten (Abb. 2.10 A) und es finden sich in HBEpC die höchsten und in HSAEpC die geringsten Virustiter (Abb. 2.9 B). 48 h p.i. ist diese Korrelation allerdings nicht mehr zu beobachten. Obwohl die PTEpC, PBEpC und PSAEpC ähnliche Titer im Überstand 48 h p.i. zeigen (Abb. 2.9 B), ist die virale RNA-Menge in den PSAEpC deutlich geringer (Abb. 2.10 B). Das deutet darauf hin, dass im Verlaufe der Infektion die Virusfreisetzung bezogen auf die zelluläre Virus-RNA Menge entweder in den PTEpC und PBEpC reduziert oder in den PSAEpC gesteigert ist.

Wie schon in Abb. 2.8 beobachtet, zeigt sich 24 h p.i. eine deutlich höhere IFN- λ 3 Expression in PBEpC als in PTEpC und PSAEpC (Abb. 2.10 C). Dieser Unterschied ist noch deutlicher nach 48 h p.i. zu sehen (Abb. 2.10 D). Die geringere IFN- λ 3 Induktion in PSAEpC passt zur geringeren Virus-Replikation in diesen Zellkulturen. Interessanterweise finden sich aber in PTEpC ähnlich geringe IFN- λ 3 Mengen im Zelllysate wie in PSAEpC, obwohl die PTEpC deutlich mehr Virus-RNA, d.h. eine bessere Virusreplikation, zeigen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die NiV-Replikation in der Trachea von Schweinen relativ effizient ist, dies aber nur zu einer geringen IFN-Antwort führt.

Um zu analysieren, ob die Unterschiede in der IFN-Antwort auch andere Zytokine betreffen, wurde in den infizierten porcinen Zellkulturen auch die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen untersucht. Diese könnten *in vivo* eine wichtige Rolle bei der Entzündung in den Lungen infizierter Schweine spielen (siehe Einleitung 1.3.5; Chua *et al.*, 2000; Mohd Nor und Ong, 2000; Hooper *et al.*, 2001, Middleton *et al.*, 2002; Weingartl *et al.*, 2006). Um die proinflammatorische Antwort auf die NiV-Infektion zu bestimmen, wurde mit der cDNA aus den infizierten porcinen Epithelzellen eine qPCR mit porcinen TNF α und IL-8 Primern durchgeführt (siehe 5.1.4 bis 5.1.5).

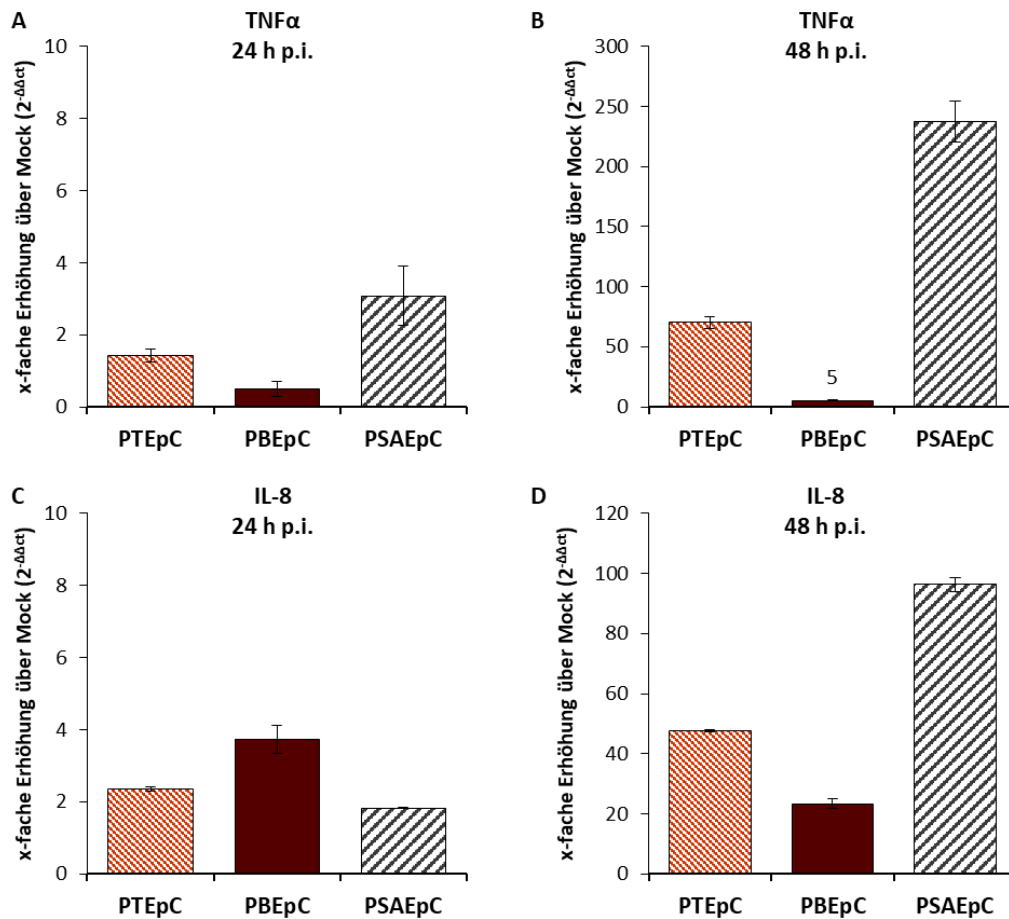


Abb. 2.11: Induktion von Interleukinen in NiV-infizierten porcinen Tracheal- (PTEpC), Bronchial- (PBEpC) und *Small-Airways*- (PSAEpC) Epithelzellen.

PTEpC, PBEpC und PSAEpC wurden mit $1,5 \times 10^5$ TCID₅₀ rNiV_{eGFP} infiziert. (A, C) 24 h p.i. und (B, D) 48 h p.i. wurde die RNA-Isolierung und cDNA Synthese mit Oligo(dt) Primer durchgeführt. In der qPCR erfolgte der Nachweis mit spezifischen porcinen (A, B) TNFα und (C, D) IL-8 Primern. Die ct-Werte wurden auf die Mock-Probe normalisiert (x-fache Erhöhung über Mock, $2^{-\Delta\Delta ct}$).

In den porcinen respiratorischen Epithelzellen kommt es 24 h p.i. zu keiner oder nur zu einer schwachen Induktion von TNFα und IL-8 (Abb. 2.11 [A, C]). Die Hochregulierung der proinflammatorischen Zytokine nimmt aber bei allen Epithelzellkulturen 48 h p.i. zu (Abb. 2.11 [B, D]). Die PSAEpC regulieren die proinflammatorischen Zytokine TNFα und IL-8 effizienter hoch als die PTEpC und PBEpC, obwohl die Virus-Replikation deutlich geringer ist (Abb. 2.10 A, B).

Insgesamt lässt das vermuten, dass in den porcinen Bronchial-Epithelzellen nach der NiV-Infektion eine verstärkte IFN- und in den *Small-Airways*-Epithelzellen eine verstärkte proinflammatorische Antwort hervorgerufen wird.

2.3 Spezies-spezifische Unterschiede in NiV-infizierten HBEpC und PBEpC

2.3.1 NiV-vermittelte Zytokin-Induktion in HBEpC und PBEpC

2.3.1.1 Unterschiede in der IFN-Induktion und NiV-Replikation in HBEpC und PBEpC

Zuerst wurde die IFN-Induktion in NiV-infizierten humanen (HBEpC) und porcinen (PBEpC) Bronchial-Epithelzellen verglichen. Dafür wurden HBEpC und PBEpC auf 6-Well-Platten kultiviert (siehe 5.2.2.4) und im Hochsicherheitslabor mit der gleichen rNiV_{eGFP} Infektionsdosis ($1,5 \times 10^5$ TCID₅₀) infiziert (siehe 5.4.2). 24 h p.i. wurde in den lebenden Zellkulturen das Virus-kodierte eGFP-Signal und die Ausbildung von Synzytien überprüft. Danach wurden die Zellen mit RLT-Puffer + β -ME lysiert und nach Zugabe von absolutem Ethanol aus dem BSL-4 Labor ausgeschleust. Es wurde anschließend eine RNA-Isolierung und eine cDNA-Synthese mit Oligo(dt) Primern durchgeführt (siehe 5.1.1 bis 5.1.3). In der qPCR erfolgte der Nachweis von NiV-N (als Maß für die Virus-Replikation), sowie eine Quantifizierung von IFN- β und IFN- λ 2,3 (HBEpC) bzw. IFN- λ 3 (PBEpC). Als Kontrolle (*housekeeping gene*) wurde humanes bzw. porcines α -Tubulin per qPCR bestimmt (siehe 5.1.4 bis 5.1.5).

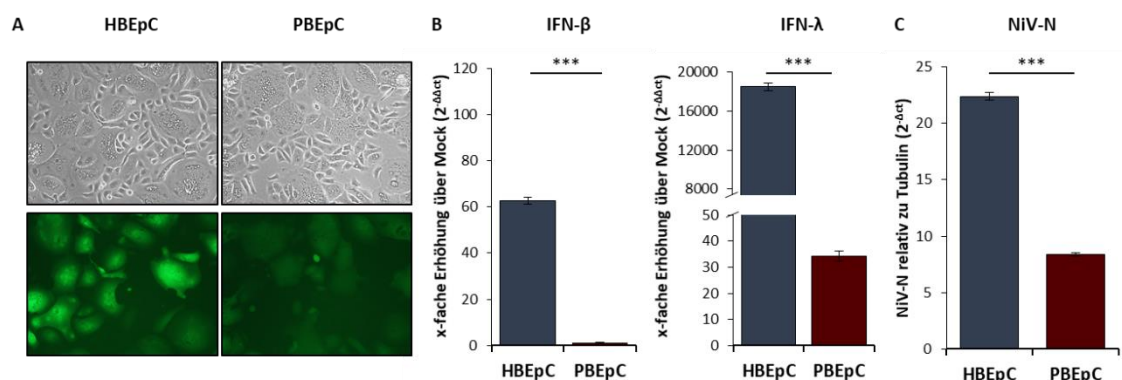


Abb. 2.12: NiV-Infektion und IFN-Induktion in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC). (Die Ergebnisse dieser Abbildung sind veröffentlicht in Elvert *et al.*, 2020).

HBEpC und PBEpC wurden auf 6-Well-Platten kultiviert und mit $1,5 \times 10^5$ TCID₅₀ rNiV_{eGFP} infiziert. (A) 24 h p.i. wurde die Formation von Synzytien am Nikon TS100 Mikroskop (100-fache Vergrößerung) untersucht. (B) Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Gesamt-RNA isoliert und mit Oligo(dt) Primern in cDNA umgeschrieben. Die qPCR wurde mit spezifischen humanen und porcinen IFN- β und IFN- λ 2,3 (HBEpC) bzw. IFN- λ 3 (PBEpC) Primern durchgeführt und die x-fache Erhöhung über Mock ($2^{-\Delta\Delta ct}$) berechnet. (C) Die virale NiV-N RNA wurde in der qPCR mit NiV-N Primern analysiert und auf α -Tubulin bezogen ($2^{-\Delta ct}$). *** $p \leq 0,001$, ungepaarter t-Test. (Einige der qPCR-Ergebnisse für PBEpC, die hier vergleichend dargestellt sind, sind auch in Abb. 2.9. A und 2.10 A, C gezeigt).

Sowohl die HBEpC als auch PBEpC zeigen eine deutliche Ausbildung von Virus-induzierten Synzytien. In beiden Zellkulturen sind ca. 75 % der Zellen infiziert und fusioniert (Abb. 2.12 A). Beide Epithelzellkulturen regulieren IFN- λ 2,3 (HBEpC) bzw. IFN- λ 3 (PBEpC) stärker hoch als IFN- β , wobei IFN- β in den PBEpC 24 h p.i. gar nicht und IFN- λ deutlich geringer als in HBEpC

induziert wird (Abb. 2.12 B). Um zu klären, ob in den PBEpC eine geringere Virus-Replikation stattfindet, die die schwächere IFN-Hochregulierung erklären könnte, wurde die NiV-N RNA Menge in den Zellen quantifiziert. Obwohl infizierte HBEpC und PBEpC eine vergleichbare Synzytienbildung zeigen, was für eine ähnlich gute Virusvermehrung und -ausbreitung spricht (Abb. 2.12 A), ist die NiV-N RNA Menge in den PBEpC deutlich geringer als in HBEpC (Abb. 2.12 C). Geht man davon aus, dass die IFN-Antwort direkt mit der viralen RNA Menge in infizierten Zellen korreliert, erklärt dies, warum HBEpC eine stärkere IFN-Hochregulierung zeigen als die PBEpC.

Ist die schwächere IFN-Antwort in PBEpC tatsächlich auf die geringere Menge an Virus-RNA in den Zellen zurückzuführen, sollten die porcinen Zellen bei einer erhöhten Virusreplikation, d.h. größeren NiV-RNA Mengen, eine vergleichbare Hochregulierung von IFN- λ wie die HBEpC zeigen. Um dies zu testen wurden die PBEpC mit der doppelten Infektionsdosis rNiV_{eGFP} (3×10^5 TCID₅₀) für 24 h sowie 48 h p.i. infiziert (siehe 5.4.2), auf Synzytienbildung untersucht und die NiV-N RNA Menge bzw. die IFN-Expression per qPCR analysiert (5.1.1 bis 5.1.5).

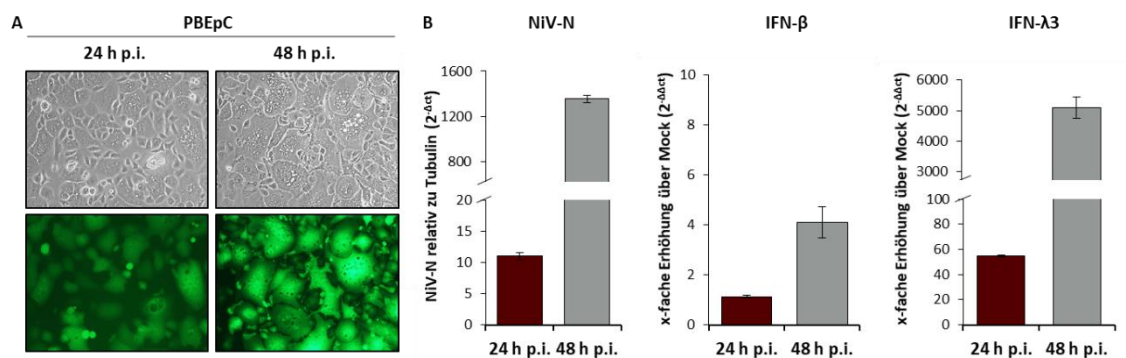


Abb. 2.13: NiV-Infektion und IFN-Induktion in porcinen Bronchial-Epithelzellen (PBEpC) für 24 h und 48 h. (Die Ergebnisse dieser Abbildung sind veröffentlicht in Elvert *et al.*, 2020).

PBEpC wurden auf 6-Well-Platten kultiviert und mit 3×10^5 TCID₅₀ rNiV_{eGFP} infiziert. (A) 24 h und 48 h p.i. wurde die Synzytien-Formation am Nikon TS100 Mikroskop (100-fache Vergrößerung) untersucht. (B) Die RNA wurde aus den Zellen isoliert und mit Oligo(dt) Primern in cDNA umgeschrieben. Die qPCR erfolgte mit spezifischen NiV-N, porcinen IFN- β und IFN- λ 3 Primern. NiV-N wurde auf α -Tubulin bezogen ($2^{-\Delta ct}$), die IFNs auf Mock normalisiert (x-fache Erhöhung über Mock, $2^{-\Delta\Delta ct}$).

Abb. 2.13 A zeigt, dass die Infektion mit einer höheren Infektionsdosis 24 h p.i. in einer starken Synzytienbildung resultiert und 48 h p.i. alle PBEpC infiziert und fusioniert sind. Die NiV-N Menge, als Maß für die Virus-Replikation, ist nach 24 h bei dieser Infektion mit der doppelten Virusdosis (Abb. 2.13 B) im Vergleich zu Abb. 2.12 C nur gering gesteigert. Sie nimmt aber 48 h p.i. sehr deutlich zu. Die erhöhte virale RNA-Menge nach 48 h korreliert eindeutig mit einer stärkeren IFN- λ 3 und IFN- β Induktion. Obwohl die PBEpC 48 h p.i. mehr Virus-RNA enthalten als die HBEpC 24 h p.i. (Vergleich Abb. 2.13 B 48 h und Abb. 12 B, C HBEpC), ist die

IFN-Hochregulierung in PBEpC deutlich schwächer als in HBEpC. Daraus lässt sich schließen, dass die Induktion von IFNs in HBEpC und PBEpC zwar mit der Menge der Virus-RNA in den Zellen korreliert, die NiV-RNA in den porcinen Zellen im Vergleich zu den HBEpC jedoch eine schwächere IFN-Antwort induziert.

2.3.1.2 Unterschiede in der Zytokin-Induktion in HBEpC und PBEpC, die die gleiche Menge viraler RNA in den Zellen exprimieren

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob es auch Spezies-spezifische Unterschiede zwischen HBEpC und PBEpC in der Zytokin-Expression gibt, wenn beide Zelltypen zum gleichen Infektionszeitpunkt vergleichbare NiV-RNA Mengen produzieren. Dazu wurden HBEpC und PBEpC auf 6-Well-Platten kultiviert (siehe 5.2.2.4) und mit unterschiedlichen Infektionsdosen infiziert (HBEpC $1,5 \times 10^5$ TCID₅₀, PBEpC 6×10^5 TCID₅₀ rNiV_{eGFP}; siehe 5.4.2). Das führte zur Expression vergleichbarer Menge viraler RNA in den Zellen nach 24 h. In der qPCR wurde dann mit spezifischen Primern die NiV-N mRNA und die mRNA für folgende zelluläre Proteine quantifiziert: humanes und porcines IFN- λ 2,3 bzw. IFN- λ 3, OAS und ISG56 (als prototypische antivirale ISGs), sowie IL-6 und IL-8 (als Vertreter der proinflammatorischen Interleukine) (siehe 5.1.4 bis 5.1.5).

Wie in Abb. 2.14 A zu sehen, bilden die HBEpC und PBEpC durch die unterschiedlichen Infektionsdosen in den Zellen eine vergleichbare Menge viraler (NiV-N) RNA. Trotzdem zeigen die PBEpC eine schwächere IFN- λ Hochregulierung als die HBEpC (Abb. 2.14 B). Die geringere IFN-Antwort spiegelt sich auch in einer verminderten ISG-Expression wider (Abb. 2.14 C). Die PBEpC induzieren 24 h p.i. keine OAS mRNA und zeigen nur eine geringe ISG56-Hochregulation. Dagegen sind sowohl OAS als auch ISG56 in den HBEpC stark induziert, was zur effizienten IFN- λ Antwort in den humanen Zellen passt.

Neben antiviralen IFN und ISGs induziert eine NiV-Infektion auch die Expression von proinflammatorischen Zytokinen (Rockx *et al.*, 2011; DeBuysscher *et al.*, 2013; Valbuena *et al.*, 2014; Cong *et al.*, 2017; Hammoud *et al.*, 2018). Dies ist auch in HBEpC und PBEpC der Fall. In Abb. 2.14 D ist gezeigt, dass sowohl IL-6 als auch IL-8 in den humanen und porcinen Epithelzellen auf mRNA-Ebene eindeutig hochreguliert werden. Überraschenderweise finden sich in PBEpC höhere Level an IL-6 und IL-8 mRNA als in HBEpC, was im Gegensatz zu der IFN- und ISG-Induktion steht. Das deutet darauf hin, dass die PBEpC (im Vergleich zu HBEpC) keine allgemein verringerte Zytokinantwort als Reaktion auf die NiV-Infektion zeigen, sondern Zytokine, die an der Entzündungsantwort beteiligt sein können, effizient aktivieren können.

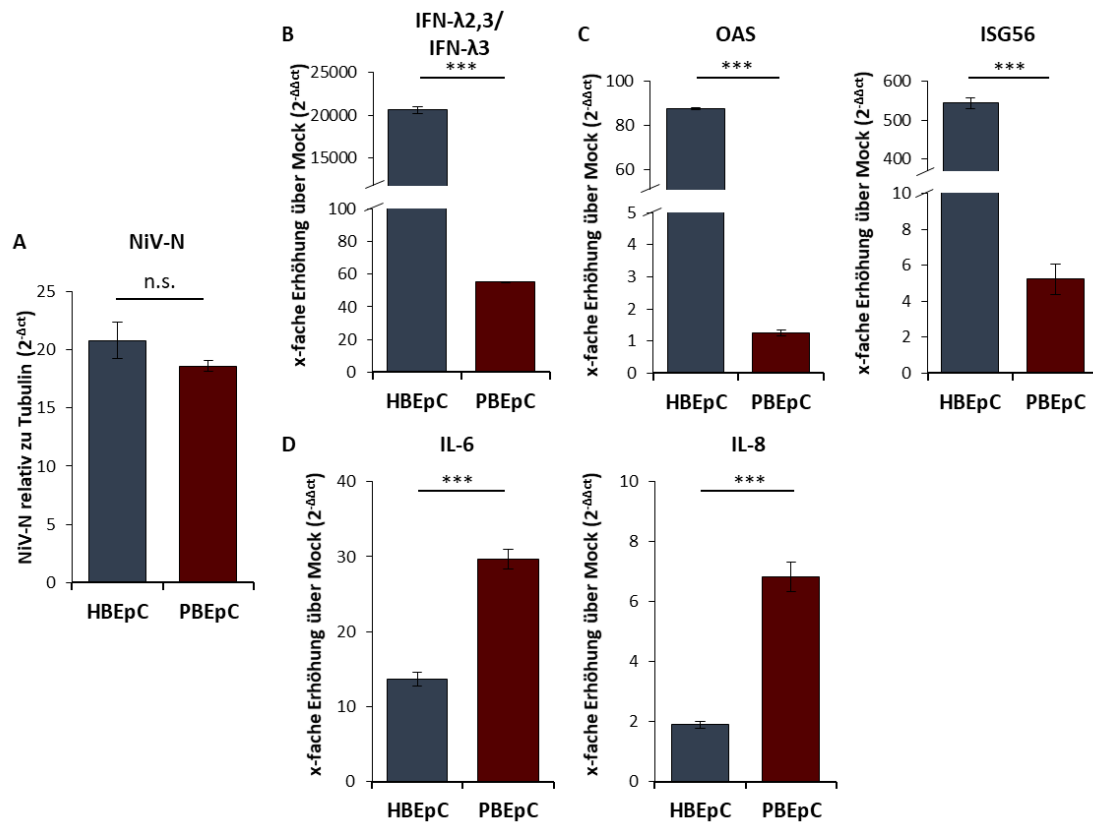


Abb. 2.14: Induktion von IFNs, ISGs und proinflammatorischen Zytokinen in NiV-infizierten humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC), mit vergleichbarer intrazellulärer viraler RNA Menge. (Die Ergebnisse dieser Abbildung sind veröffentlicht in Elvert *et al.*, 2020).

Auf 6-Well-Platten kultivierte HBEpC und PBEpC wurden mit $1,5 \times 10^5$ TCID₅₀ bzw. 6×10^5 TCID₅₀ rNiV_{eGFP} infiziert. 24 h p.i. wurde die RNA aus den Zellen isoliert und mit Oligo(dt) Primern in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde in der qPCR mit spezifischen Primern analysiert. (A) NiV-N wurde auf α -Tubulin bezogen (2^{-Δct}). (B-D) Die Hochregulierung der Zytokine und ISGs wurde untersucht, indem die x-fache Erhöhung über Mock (2^{-ΔΔct}) von (B) den Typ-III IFN-λ_{2,3} bzw. IFN-λ₃, (C) den ISGs OAS und ISG56 und (D) den proinflammatorischen Zytokinen IL-6 und IL-8 berechnet wurde. ***P < .001; n.s., nicht signifikant, ungepaarter t-Test.

2.3.1.3 Relative Zytokin-Induktion in HBEpC und PBEpC verschiedener Donore und Infektionsdosen

Die Infektionsstudien in primären humanen und porcinen Epithelzellen zeigen eine große Varianz in den absoluten qPCR-Ergebnissen. Dies ist zu erwarten, weil sich die NiV-Vermehrung in den Geno- und Phänotyp-variierenden primären Zellen verschiedener humaner und porciner Donore quantitativ unterscheidet, auch bei gleicher Infektionsdosis. Diese Donorvariabilität hängt von verschiedenen Faktoren ab und wird bei primären Zellen häufig beobachtet (Schlaak *et al.*, 2002; Sarkis *et al.*, 2006; Duong *et al.*, 2014; Travanty *et al.*, 2015; Sauerhering *et al.*, 2016; Sauerhering *et al.*, 2017). Dadurch ist es schwer, mehrere Experimente miteinander zu vergleichen. Um die zuvor beschriebenen Schlussfolgerungen zu den Spezies-spezifischen Unterschieden in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellkulturen auf breiterer Ebene zu validieren, wurden Bronchial-Epithelzellen von zwei verschiedenen humanen Donoren und drei

verschiedenen Schweinelungen mit vier verschiedenen Infektionsdosen rNiV_{eGFP} (3×10^4 , $1,5 \times 10^5$, 3×10^5 , 6×10^5 TCID₅₀) infiziert (siehe 5.4.2). Insgesamt wurden 23 NiV-Infektionen (HBEpC n = 11 und PBEpC n = 12) durchgeführt. 24 h p.i. wurde die RNA aus den Bronchial-Epithelzellen isoliert, mit Oligo(dt) Primer und reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend eine qPCR mit spezifischen Primern für NiV-N, humanes und porcines IFN- β und IFN- λ 2,3 bzw. IFN- λ 3, OAS, ISG56, IL-6 sowie IL-8 durchgeführt (siehe 5.1.1 bis 5.1.5). Die NiV-N Werte wurden auf α -Tubulin bezogen ($2^{-\Delta ct}$) und für die Zytokin-Werte wurde die x-fache Erhöhung über Mock ($2^{-\Delta \Delta ct}$) bestimmt. Anschließend wurden die $2^{-\Delta \Delta ct}$ Werte der Zytokine bzw. ISGs auf die $2^{-\Delta ct}$ Werte der Virus-RNA normalisiert. Dadurch konnten die Hochregulierungen der Zytokine bzw. ISGs von einzelnen Experimenten miteinander verglichen werden. Die Daten wurden mittels GraphPad-Prism und der Tuckey Methode im Boxplot grafisch dargestellt.

Abb. 2.15 bestätigt die vorher beobachteten Spezies-spezifischen Unterschiede in den Einzelinfektionen der HBEpC und PBEpC. Die PBEpC regulieren deutlich schwächer die Interferone IFN- β und IFN- λ , sowie die nachgeschalteten ISGs, am Beispiel von OAS und ISG56 gezeigt, hoch. Im Gegensatz dazu resultiert die NiV-Infektion in den HBEpC und PBEpC in einer vergleichbaren Induktion von IFN-unabhängigen proinflammatorischen Zytokinen IL-6 und IL-8.

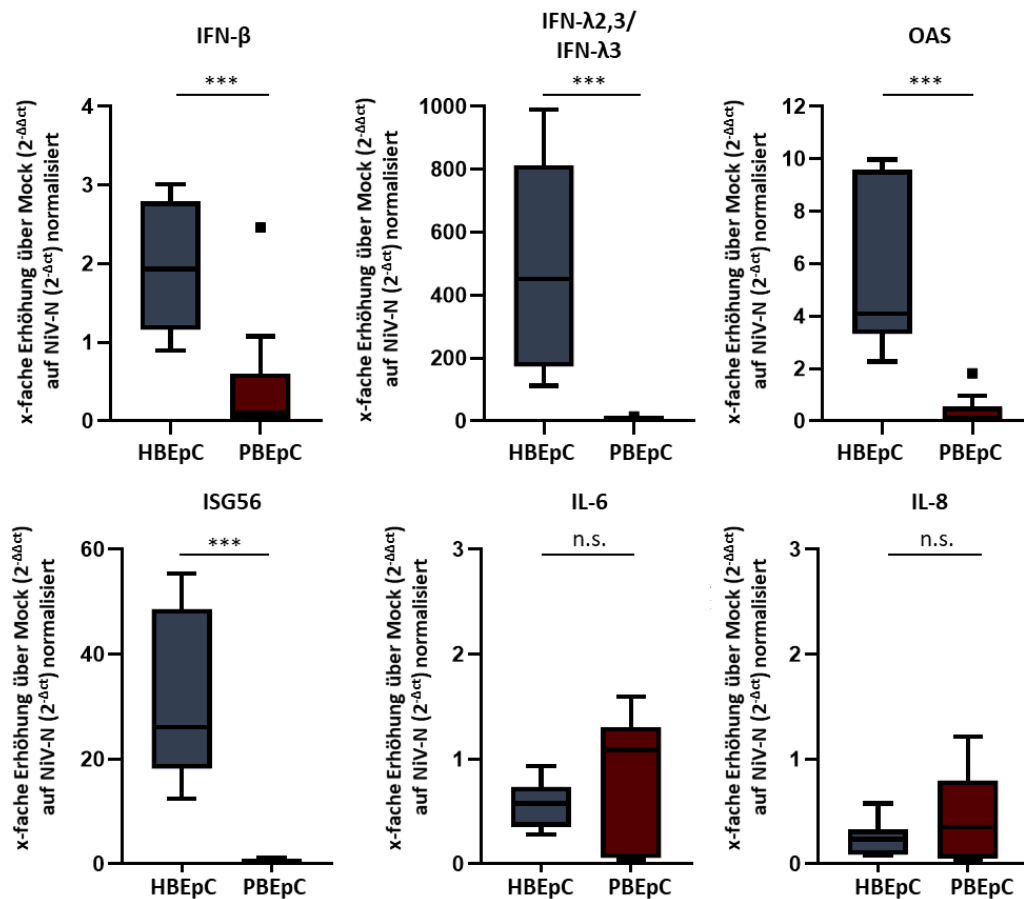


Abb. 2.15: Relative Induktion von Zytokinen und ISGs in NiV-infizierten humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC). (Die Ergebnisse dieser Abbildung sind veröffentlicht in Elvert *et al.*, 2020).

HBEpC von verschiedenen Donoren und PBEpC von mehreren Schweinelungen wurden mit unterschiedlichen NiV-Dosen (3×10^4 , $1,5 \times 10^5$, 3×10^5 , 6×10^5 TCID₅₀) infiziert (HBEpC n = 11 und PBEpC n = 12). 24 h p.i. wurde die RNA aus den Zelllysaten isoliert, in cDNA umgeschrieben und qPCRs mit spezifischen NiV-N oder humanen und porcinen IFN- β , IFN- λ 2,3 bzw. IFN- λ 3, OAS, ISG56, IL-6 und IL-8 Primern durchgeführt. Die relative Zytokin-Hochregulierung wurde berechnet, indem die x-fache Erhöhung über Mock bestimmt ($2^{-\Delta\Delta ct}$) und auf NiV-N relativ zu α -Tubulin ($2^{-\Delta ct}$) normalisiert wurde. Die zusammengefassten Daten von HBEpC und PBEpC wurden in Boxplots (Tukey Methode, GraphPad-Prism) aufgetragen. In der Box als Balken dargestellt ist der Median der aufgetragenen Werte, die *Whiskers* zeigen den 1,5-fachen Interquartilbereich (IQR) des oberen (75 %) und unteren Quartils (25 %) an. Außerhalb dieses Bereiches werden Werte durch schwarze Quadrate angezeigt. ***P < .001; n.s., nicht signifikant, ungepaarter t-Test.

2.3.2 Unterschiede in der Poly(I:C) vermittelten Zytokin-Induktion in HBEpC und PBEpC

Die unterschiedlich starke Hochregulierung von IFNs und proinflammatorischen IL-6/IL-8, deren Expression über zum Teil verschiedene Signalkaskaden induziert werden kann, deutet auf Spezies-spezifische Unterschiede entweder in der Induktion oder in der Effizienz dieser Signalwege hin. Auch wenn es je nach Zelltyp und nach Art der Induktoren Überlappungen in den Signalwegen gibt, die zur Expression von Typ-I und III IFNs bzw. zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen führen, scheint die IFN-Expression v.a. über den RIG-I/IRF-*Pathway*, während die IL-6/8 Induktion v.a. über den TLR-3/NF κ B-Weg verläuft (siehe

Einleitung 1.3.1 und Abb. 1.6; Sirén *et al.*, 2006; Le Goffic *et al.*, 2007; Bertolusso *et al.*, 2014). Die IL-6/IL-8 Antwort in PBEpC lässt vermuten, dass hier der TLR-3 Signalweg bei gleicher Virus-RNA Menge genauso gut oder besser als in HBEpC induziert werden kann (Abb. 2.14). Diese TLR-3 abhängige Immunantwort in HBEpC und PBEpC sollte verglichen werden, indem die Signalkaskade über den TLR-3 Rezeptor Virusunabhängig über die synthetische dsRNA Poly(I:C) stimuliert und anschließend analysiert wurde (siehe Einleitung 1.3.1.1).

Die HBEpC und PBEpC wurden auf 6-Well-Platten ausgesät (siehe 5.2.2.4) und nach dem Mediumwechsel wurden verschiedene Konzentrationen Poly(I:C) HMW (*High molecular weight*) zum Medium dazugegeben (siehe 5.2.4.2). Nach 24 h wurden die Zellen mit RLT-Puffer + β -ME lysiert, die RNA isoliert und mit Reverser Transkriptase und Oligo(dt) Primern in cDNA umgeschrieben (siehe 5.1.1 bis 5.1.3). In der qPCR wurden Primer für IFN- β und IFN- λ 1 und IFN- λ 2,3 (HBEpC) bzw. IFN- λ 3 (PBEpC) eingesetzt (siehe 5.1.4).

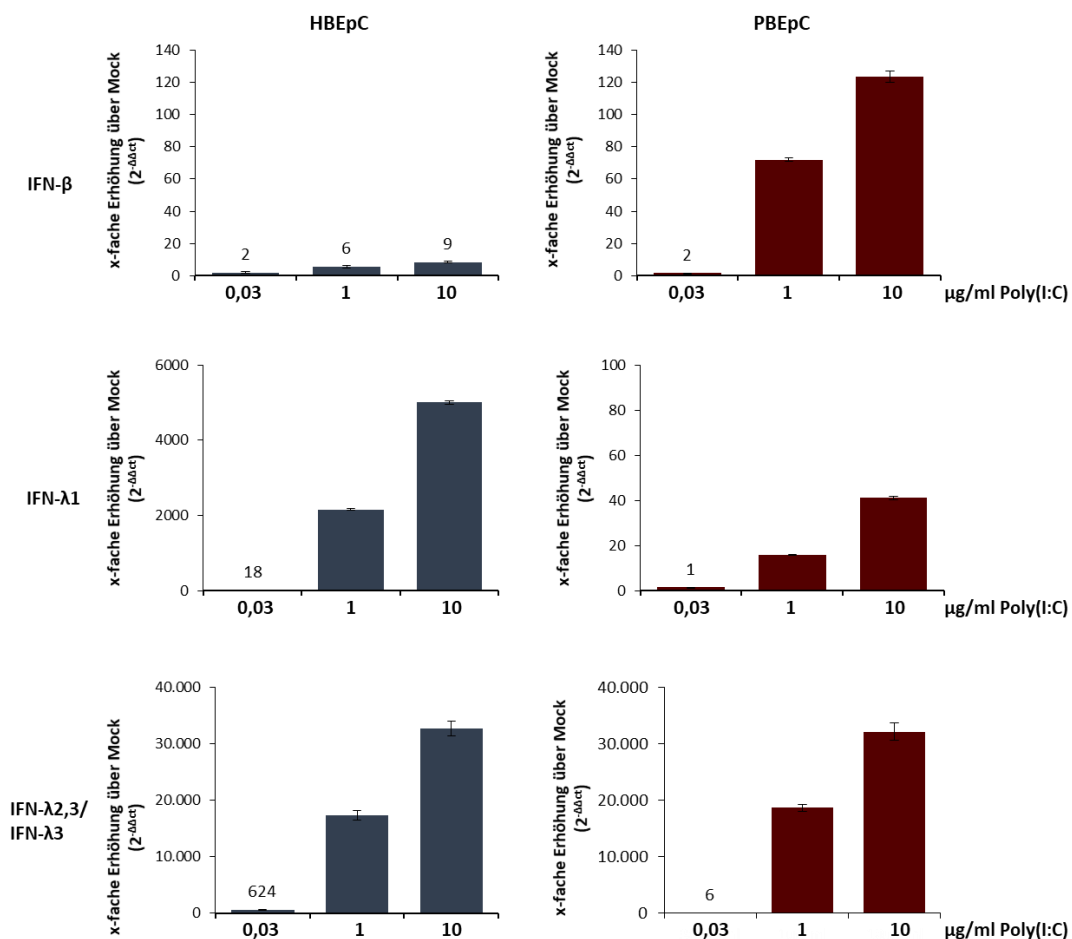


Abb. 2.16: Vergleich der Hochregulierung von IFN in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC) nach Stimulation mit Poly(I:C).

HBEpC und PBEpC wurden mit 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ oder 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Poly(I:C) stimuliert, das dem Zellkultur-Medium zugesetzt war. 24 h nach der Stimulation erfolgte die RNA-Isolierung und anschließende cDNA-Synthese mit Oligo(dt) Primern. Die qPCR wurde mit humanen und porcinen Primern für α -Tubulin, IFN- β , IFN- λ 1 und IFN- λ 2,3 bzw. IFN- λ 3 durchgeführt und die x-fache Erhöhung über Mock ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) bestimmt.

In Abb. 2.16 sind die Stimulierungen der IFN- β , IFN- λ 1 und IFN- λ 2,3 bzw. IFN- λ 3 mRNA dargestellt. Mit steigender Poly(I:C) Konzentration kommt es in den HBEpC nur zu einer schwachen IFN- β Hochregulierung, wohingegen die PBEpC deutlich mit einer IFN- β Antwort reagieren. Eine derart effiziente IFN- β Expression wurde in NiV-infizierten PBEpC nicht beobachtet (Abb. 2.12, 2.13 und 2.15). Das lässt darauf schließen, dass die Erkennung und die aktivierten Signalwege sich bei einer Poly(I:C) Stimulierung deutlich von der NiV-RNA induzierten Signalkaskade unterscheiden. In beiden Zellkulturen bewirkt die Poly(I:C) Stimulation die Hochregulierung von IFN- λ . IFN- λ 1 mRNA wird in den HBEpC stärker hochreguliert (ca. 5000-fach bei 10 μ g/ml Poly[I:C]) als in den PBEpC (ca. 40-fach). Die Induktion von IFN- λ 2,3 und IFN- λ 3 unterscheiden sich nur bei der geringsten Poly(I:C) Konzentration (0,03 μ g/ml). Hier findet man in HBEpC mehr IFN- λ 2,3 als IFN- λ 3 in PBEpC. Bei den beiden höheren Konzentrationen (1 μ g/ml und 10 μ g/ml Poly[I:C]) kommt es jedoch zu einer vergleichbaren IFN- λ 2,3 und IFN- λ 3 Induktion in den HBEpC und PBEpC, was während einer NiV-Infektion nie beobachtet wurde (Abb. 2.15). Das bedeutet, dass die PBEpC auf Poly(I:C), das über endosomales TLR-3 erkannt wird, mit einer starken IFN- λ Antwort reagieren, während die NiV-induzierte IFN-Antwort, die vermutlich über andere (u.a. RIG-I-abhängige) Signalkaskaden aktiviert wird, in den porcinen Zellen weniger ausgeprägt ist.

Um zu klären, ob die starke IFN-Induktion nach Poly(I:C)-Stimulation auch zu einer starken Expression von antiviralen ISGs führt, wurde die cDNA aus den gleichen Zelllysaten in einer qPCR mit spezifischen Primern für humanes und porcines OAS, PKR und ISG56 untersucht (siehe 5.1.4 bis 5.1.5).

Sowohl die HBEpC als auch PBEpC regulieren die ISGs OAS, PKR und ISG56 auf mRNA-Ebene nach Poly(I:C)-Stimulation hoch (Abb. 2.17). Die Induktion von OAS mRNA ist stärker in den PBEpC als in den HBEpC, während die humanen Zellen eine ausgeprägtere Induktion von PKR und ISG56 mRNA zeigen. Die unterschiedlich starke Induktion IFN-abhängiger Gene in HBEpC und PBEpC lassen vermuten, dass die IFN-Signalkaskade (siehe Einleitung 1.3.3.3) in den porcinen und humanen Zellen zwar generell zur Expression antiviraler Gene führt, es aber Spezies-spezifische Unterschiede in der Transkriptionseffizienz der verschiedenen ISGs gibt.

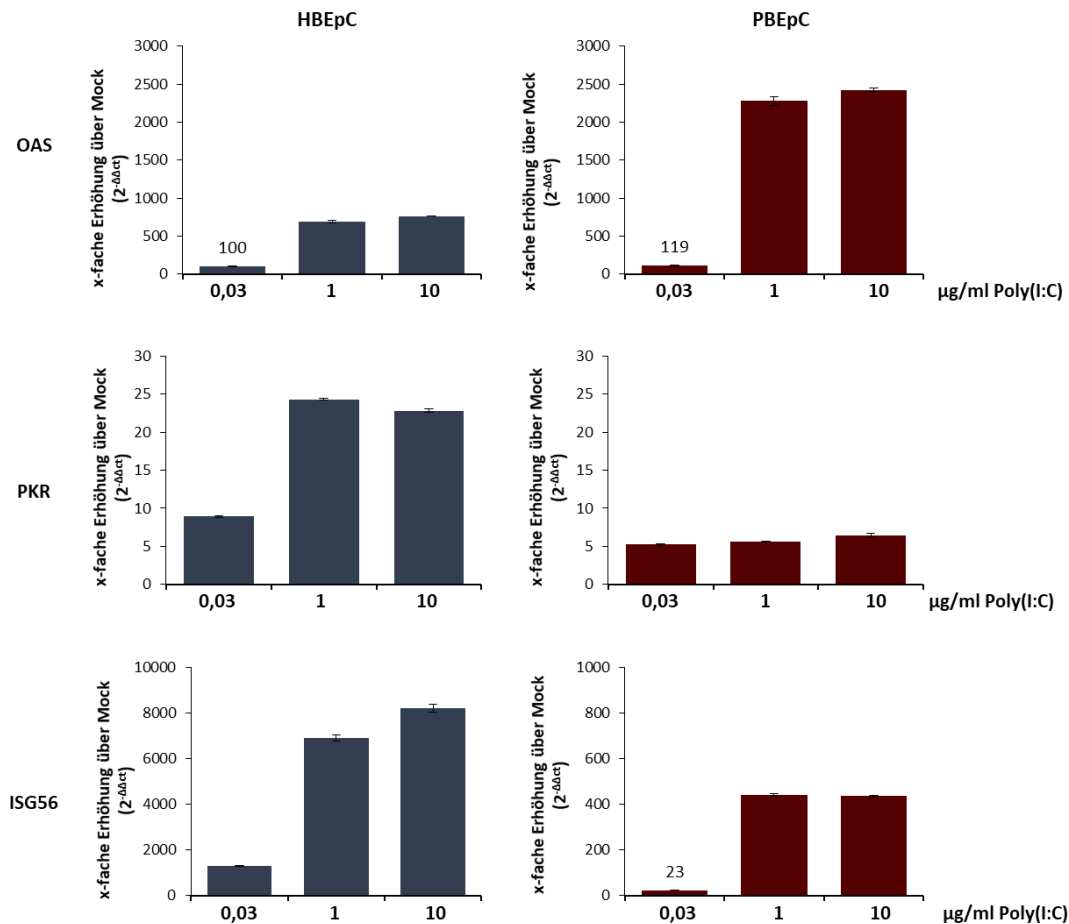


Abb. 2.17: Vergleich der Hochregulierung von ISGs in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC) nach Stimulation mit Poly(I:C).

Die HBEpC und PBEpC wurden wie in Abb. 2.16 mit verschiedenen Konzentrationen Poly(I:C) behandelt und die qPCR mit spezifischen humanen und porcinen Primern für OAS, PKR und ISG56 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Berechnung des $2^{-\Delta\Delta ct}$ Wertes (x-fache Erhöhung über Mock).

Neben dem Einfluss von Poly(I:C) auf die IFN- und ISG-Hochregulation wurde auch die Expression von proinflammatorischen Zytokinen auf mRNA-Ebene untersucht. Dazu wurde die cDNA aus Abb. 2.16 und 2.17 in einer qPCR mit spezifischen humanen und porcinen IL-6, IL-8 und TNF α Primern eingesetzt (siehe 5.1.4 bis 5.1.5).

Abb. 2.18 zeigt, dass in den HBEpC und PBEpC die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF α durch Poly(I:C) induziert werden, wobei die PBEpC bei 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Poly(I:C) keine IL-6/IL-8 Expression und nur eine zweifache Hochregulierung von TNF α aufweisen. Wie schon bei den ISGs zeigen sich auch bei dieser Analyse Spezies-spezifische Unterschiede in der Zytokinantwort. Die Interleukine IL-6 und IL-8 werden in den HBEpC deutlich stärker hochreguliert, während TNF α (zumindestens nach Stimulation mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Poly[I:C]) deutlicher in den PBEpC hochreguliert wird.

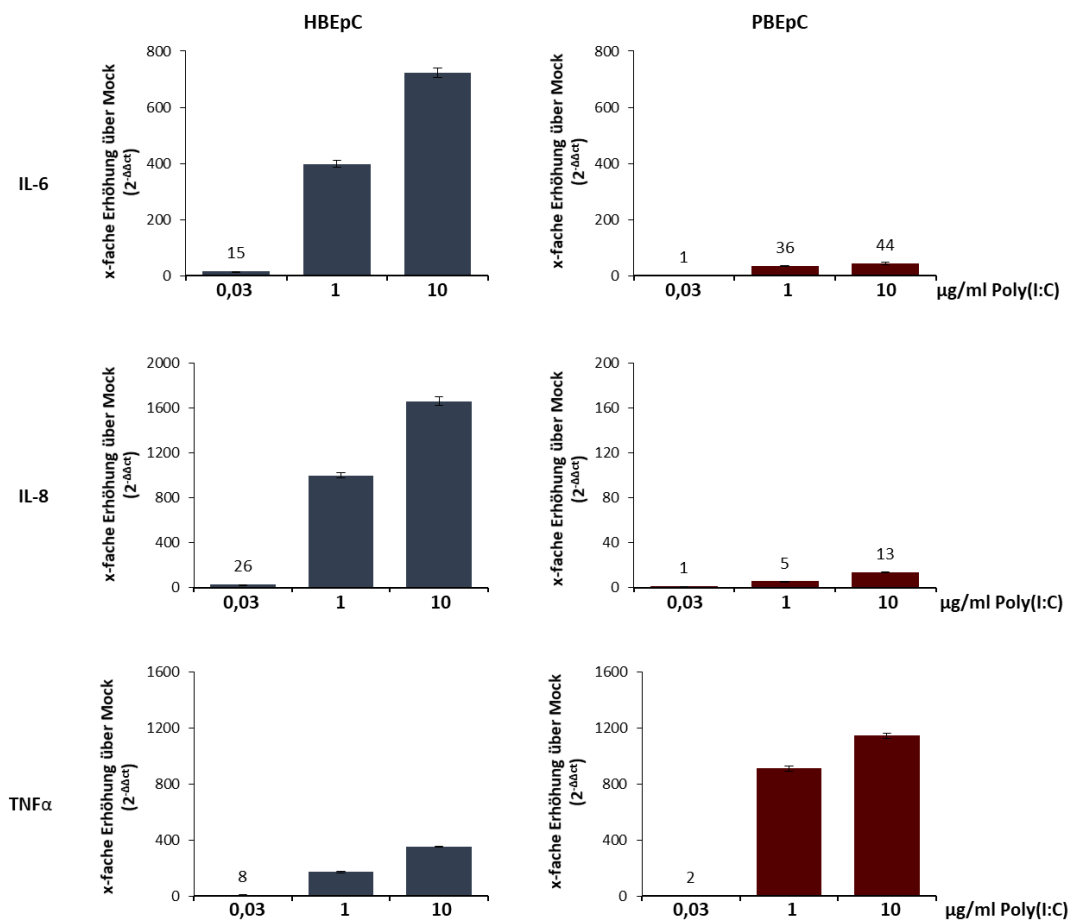


Abb. 2.18: Vergleich der Hochregulierung von proinflammatorischen Zytokinen in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC) nach Stimulation mit Poly(I:C).

Die HBEpC und PBEpC wurden wie in Abb. 2.16 mit verschiedenen Konzentrationen Poly(I:C) behandelt. In der qPCR erfolgte der Nachweis von IL-6, IL-8 und TNF α mit spezifischen humanen und porcinen Primern. Im Diagramm wurde die x-fache Erhöhung über Mock ($2^{-\Delta\Delta ct}$) aufgetragen.

Die Poly(I:C) Stimulierungsversuche zeigen, dass die PBEpC in der Lage sind, eine starke IFN-, ISG- und proinflammatorische Zytokinantwort auszubilden, teilweise stärker als die HBEpC. Neben IFN- β und OAS wird in den PBEpC bei der Stimulation mit 1 und 10 µg/µl Poly(I:C) auch deutlich mehr TNF α exprimiert. Dieses Ergebnis wurde in einem zweiten Stimulierungsversuch der porcinen Epithelzellen ebenfalls beobachtet (Daten nicht gezeigt). Damit unterscheiden sich diese Ergebnisse deutlich von den Ergebnissen in NiV-infizierten Zellen. Das lässt vermuten, dass die Stimulation mit Poly(I:C) über den TLR-3 Rezeptor in porcinen Zellen Signalwege anders/stärker aktiviert als die Infektion mit NiV, bei der die Virus-RNA vermutlich u.a. über den RIG-I-Pathway eine Zytokininduktion vermittelt (Habjan *et al.*, 2008).

2.3.3 Unterschiede in der NiV-Replikation und Virusfreisetzung in HBEpC und PBEpC

Um zu untersuchen, inwieweit die Spezies-spezifischen Unterschiede in der Zytokininduktion die Produktion und Freisetzung infektiöser NiV-Partikel in den humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen beeinflusst, wurden je drei 6-*Wells* der HBEpC und PBEpC im Hochsicherheitslabor mit 3×10^4 TCID₅₀ rNiV_{EGFP} infiziert (siehe 5.4.2). 24 h p.i. wurden die Überstände abgenommen und zentrifugiert. Ein Teil des Virus-haltigen Überstandes wurde eingefroren, um damit später den zellfreien Virustiter zu bestimmen (TCID₅₀ Methode in Vero76-Zellen in 5er-Verdünnungsschritten, siehe 5.2.1 und 5.4.1). Aus den restlichen zentrifugierten Überständen wurden jeweils 100 µl in RLT-Puffer + β-ME aufgenommen und mit absolutem Ethanol versetzt. Diese Proben wurden verwendet, um die virale genomische RNA im Überstand über eine qPCR zu quantifizieren. Dazu wurde RNA aus dem Überstand isoliert und mit *Random*-Hexamer Primern in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte eine qPCR mit NiV-N Primern. Mit Hilfe einer Standardkurve wurden anschließend über die ct-Werte die NiV-N Kopien/ml im Überstand berechnet (siehe 5.1.6).

Um die Virus-RNA in den infizierten Zellen zu quantifizieren, wurden die Zellen mit RLT + β-ME lysiert und absoluter Ethanol zugegeben. Aus den aus dem BSL-4 Labor ausgeschleusten Zelllysaten wurde dann die RNA isoliert (siehe 5.1.1). Die cDNA-Synthese erfolgte mit Oligo(dt) Primern, die anschließende qPCR mit spezifischen NiV-N Primern (siehe 5.1.2-5.1.4). Die NiV-N ct-Werte der Zelllysate wurden auf die Kontrolle α-Tubulin bezogen ($2^{-\Delta ct}$, siehe 5.1.5). Die Werte der drei 6-*Wells* (Replikate) wurden für die Auswertungen gemittelt.

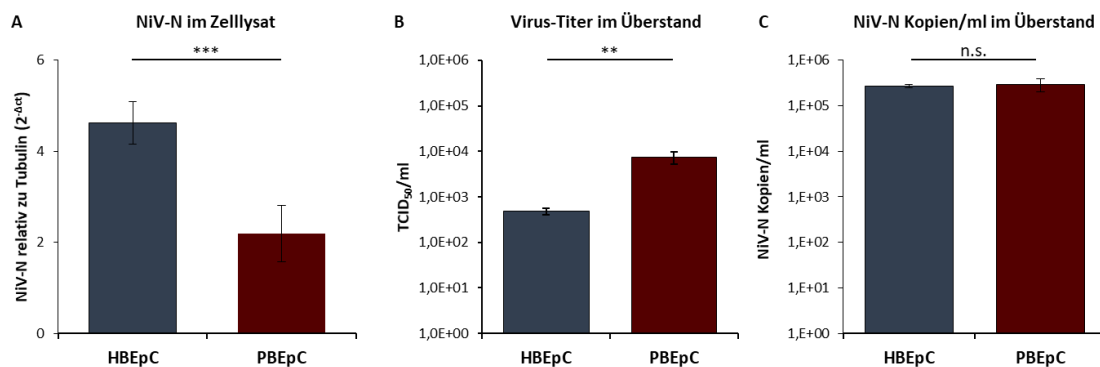


Abb. 2.19: Virus-Freisetzung und Replikation in NiV-infizierten humanen (HBEpC) und porcinen Bronchial- (PBEpC) Epithelzellen.

Die HBEpC und PBEpC wurden mit 3×10^4 TCID₅₀ rNiV_{EGFP} infiziert. 24 h p.i. wurden die (A) Zellen lysiert, die RNA isoliert und in cDNA mit Oligo(dt) Primern umgeschrieben. Die qPCR erfolgte mit spezifischen NiV-N Primern und die ct-Werte wurden auf die Kontrolle α-Tubulin bezogen ($2^{-\Delta ct}$). (B) Die Überstände der infizierten Zellen wurden abgenommen und zentrifugiert. Die zellfreien Virustiter wurden nach der TCID₅₀ Methode bestimmt. (C) Aus 100 µl Überstand wurde außerdem die RNA isoliert, mit *Random*-Hexamer Primern in cDNA umgeschrieben und in der qPCR mit NiV-N Primern analysiert. Mittels einer Standardkurve wurden die NiV-N Kopien/ml im Überstand berechnet.

Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert aus drei Replikaten dar. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s., nicht signifikant, ungepaarter t-Test.

Abb. 2.19 A zeigt, dass die Infektion in einer unterschiedlich starken Virus-RNA-Replikation (NiV-N im Zelllysate) in HBEpC und PBEpC resultiert. Dabei sind die NiV-RNA Mengen in den PBEpC signifikant geringer als in den HBEpC, was auch bei vorherigen Infektionen beobachtet wurde (Abb. 2.12). Auffällig ist jedoch, dass der Virustiter in den PBEpC trotzdem höher ist als in den HBEpC (Abb. 2.19 B). Dies spricht dafür, dass die Freisetzung infektiöser Viren in PBEpC verstärkt ist, obwohl in den HBEpC mehr Virus-RNA produziert wird. Abb. 2.19 C zeigt, dass die NiV-N Kopien im Überstand, d.h. die Anzahl der NiV-Genome, bei beiden Zellkulturen vergleichbar sind, obwohl die Virustiter in PBEpC-Überständen höher sind. Dies spricht für eine höhere Partikelinfektiosität von NiV-Virionen, die aus PBEpC freigesetzt werden.

Insgesamt weisen diese Infektionsstudien auf Spezies-spezifische Unterschiede im NiV-*Assembly* und *Budding* hin, welches in PBEpC effizienter zu sein scheint. Da Tetherin (ein ISG) die Freisetzung von NiV behindern kann (Radoshitzky *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2012; Hoffmann *et al.*, 2019), wurde analysiert, inwieweit Tetherin durch die NiV-Infektion in den Epithelzellen hochreguliert wird. Hierfür wurde aus der cDNA der Zelllysate eine qPCR mit humanen und porcinen Tetherin Primern durchgeführt und die x-fache Erhöhung über Mock berechnet ($2^{-\Delta\Delta ct}$; siehe 5.1.4 bis 5.1.5).

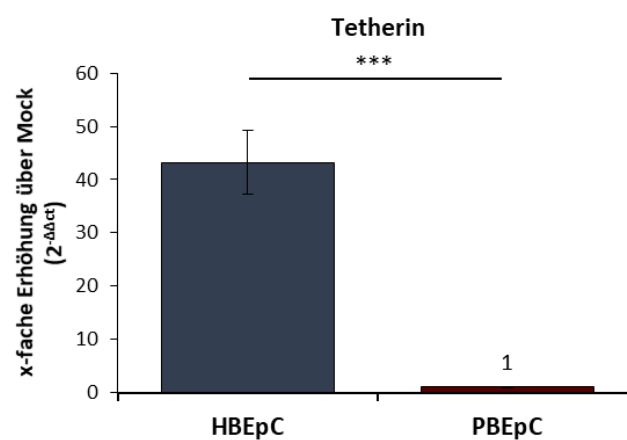


Abb. 2.20: Einfluss der NiV-Infektion auf die Induktion von Tetherin in humanen (HBEpC) und porcinen Bronchial- (PBEpC) Epithelzellen.

Mit der cDNA der Zelllysate von HBEpC und PBEpC aus Abb. 2.19 wurden qPCRs mit spezifischen humanen und porcinen Tetherin Primern durchgeführt. Im Diagramm ist die x-fache Erhöhung über Mock ($2^{-\Delta\Delta ct}$) gezeigt. Die dargestellten Werte wurden aus drei Replikaten gemittelt. *** $p \leq 0,001$.

In NiV-infizierten HBEpC kommt es zur deutlichen Hochregulierung der Tetherin mRNA, während Tetherin in PBEpC durch die Infektion nicht induziert wird (Abb. 2.20). Dies passt zu der zuvor beschriebenen geringen Hochregulierung von IFNs und ISGs in NiV-infizierten PBEpC (siehe Abb. 2.12 bis 2.15).

Diese Spezies-spezifische Hochregulierung von Tetherin nach der NiV-Infektion könnte einen Einfluss auf die Virus-Freisetzung haben. In HBEpC wird Tetherin stärker exprimiert und die zellfreien Titer sind geringer als in den PBEpC (Abb.2.19), bei denen Tetherin nicht hochreguliert wird.

2.4 Hemmung der NiV-Infektion durch CSA in respiratorischen Epithelzellen

2.4.1 Einfluss von CSA auf die NiV-Infektion in Calu-3-Zellen

Für mehrere Viren, wie HIV-1 (Franke und Luban, 1996), verschiedene Coronaviren, wie SARS-CoV, humanes Coronavirus 229E (de Wilde *et al.*, 2011), MERS-CoV (de Wilde *et al.*, 2013; Sauerhering *et al.*, 2020) und Influenza-A-Viren (Liu *et al.*, 2012) ist bekannt, dass Cyclosporin A (CSA) einen hemmenden Effekt auf die Infektion hat. Der Hemm-Mechanismus ist dabei wenig verstanden, allerdings haben Sauerhering *et al.* (2020) gezeigt, dass CSA eine IFN- λ Induktion bewirkt und die MERS-CoV Replikation und Freisetzung aus Calu-3-Zellen und primären humanen Alveolar-Epithelzellen (hAEC) hemmen kann.

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob CSA auch die NiV-Infektion negativ beeinflussen kann. Dafür wurde die CSA-Wirkung auf die NiV-Infektion zunächst in der humanen Epithelzelllinie Calu-3 analysiert, in der auch die MERS-CoV-Infektion untersucht wurde (Sauerhering *et al.*, 2020).

Die Calu-3-Zellen wurden auf 6-Well-Platten kultiviert (siehe 5.2.1) und anschließend im Hochsicherheitslabor mit rNiV_{eGFP} (8×10^5 TCID₅₀) infiziert (siehe 5.4.2). 1 h p.i. wurde das Virusinokulum durch Medium ersetzt und es erfolgte die Zugabe von 10 μ M CSA (gelöst in DMSO) oder DMSO als Kontrolle (siehe 5.2.4). 24 h p.i. wurde die RNA aus den Zellen und dem Überstand isoliert (siehe 5.1.1 bis 5.1.2). Die cDNA-Synthese der Zelllysate erfolgte mit Oligo(dt) Primern (zum späteren Nachweis von NiV-N mRNA), die cDNA-Synthese aus jeweils 100 μ l des Zellkulturüberstandes mit *Random*-Hexamer Primern (zum späteren Nachweis von genomischer NiV-RNA im Überstand) (siehe 5.1.3). Die nachfolgende qPCR wurde mit spezifischen NiV-N Primern durchgeführt (siehe 5.1.4). Als Maß für die intrazelluläre NiV-Replikation wurde aus den ct-Werten der Zelllysate NiV-N relativ zu α -Tubulin ($2^{-\Delta ct}$) ermittelt (siehe 5.1.5). Die NiV-N ct-Werte im Überstand wurden mit einer NiV-N Standardkurve auf NiV-N Kopien/ml umgerechnet (siehe Methoden 5.1.6). Außerdem wurde ein Teil der Überstände abgenommen, um den Virustiter mittels TCID₅₀ Methode in 10er-Verdünnungsstufen zu bestimmen (siehe 5.2.1 und 5.4.1).

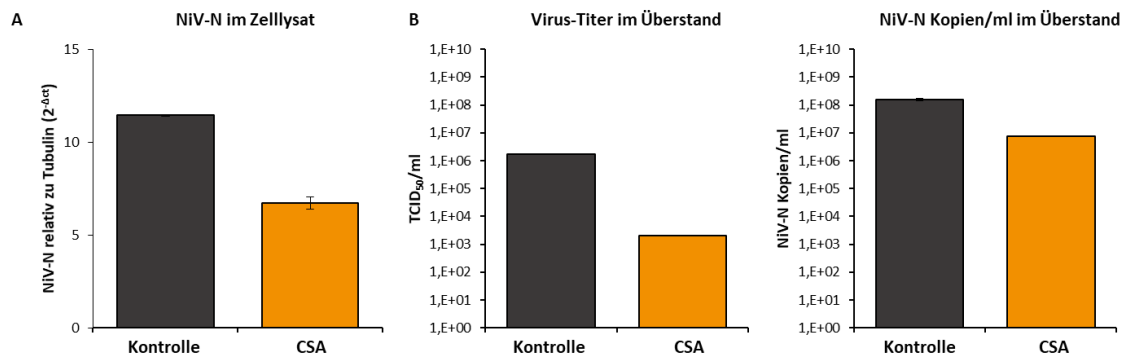


Abb. 2.21: Einfluss von Cyclosporin A (CSA) auf die NiV-Replikation und Freisetzung aus Calu-3-Zellen. Calu-3-Zellen auf 6-Well-Platten wurden mit 8×10^5 TCID₅₀ rNiV_{eGFP} infiziert. Nach 1 h wurde das Virusinokulum durch Medium ersetzt und 10 μ M CSA oder 1,33 μ l DMSO (Kontrolle) zugegeben. (A) 24 h p.i. wurden die Zellen lysiert, die RNA isoliert und in cDNA mit Oligo(dt) Primern umgeschrieben. Die qPCR erfolgte mit spezifischen Primern gegen NiV-N und die ct-Werte wurden auf die Kontrolle α -Tubulin bezogen ($2^{-\Delta ct}$). (B) Die Überstände wurden abgenommen und titriert (TCID₅₀ Methode). Aus jeweils 100 μ l Überstand wurde die RNA isoliert, mit *Random*-Hexamer Primern in cDNA umgeschrieben und in der qPCR mit NiV-N Primern analysiert. Mit Hilfe einer Standardkurve wurden die NiV-N Kopien/ml im Überstand berechnet.

Wie in Abb. 2.21 A zu sehen kommt es durch die CSA Behandlung zur Reduktion der Virus-RNA Menge im Zelllysat, d.h. zu einer Hemmung der Virus-Replikation. Außerdem ist die Virusfreisetzung in den Zellüberstand der Calu-3-Zellen vermindert (Abb. 2.21 B). Der Virustiter ist durch CSA um etwa 3 log-Stufen reduziert und auch die NiV-N Kopien/ml Überstand sind deutlich vermindert (ca. 21-fach).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung von Calu-3-Zellen mit CSA einen hemmenden Effekt auf die NiV-Replikation und Freisetzung hat.

2.4.2 Einfluss von CSA auf die NiV-Infektion in HBEpC und PBEpC

Nachdem die NiV-Infektion in Calu-3-Zellen durch CSA negativ beeinflusst wurde, stellte sich die Frage, ob die NiV-Infektion auch in den primären humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC) gehemmt werden kann.

Die HBEpC und PBEpC wurden auf 24-Well-Platten ausgesät (siehe 5.2.2.4) und mit zwei Infektionsdosen (2×10^4 und 5×10^4 TCID₅₀) rNiV_{eGFP} im BSL-4 Labor infiziert (siehe 5.4.2). 1 h p.i. wurde das Virusinokulum durch Medium ersetzt und es erfolgte die Zugabe von 10 μ M CSA (gelöst in DMSO) oder als Kontrolle DMSO (siehe 5.2.4.3). 24 h p.i. wurden die Überstände abgenommen, zentrifugiert und 100 μ l in RLT-Puffer + β -ME überführt. Die restlichen Überstände wurden für die Virustitration verwendet (5er Verdünnungsschritten nach der TCID₅₀ Methode, siehe 5.2.1 und 5.4.1). Die infizierten Zellen wurden mit RLT-Puffer + β -ME lysiert. Nach Ethanol-Zugabe und Ausschleusen aus dem BSL-4 Labor wurde aus den Zelllysaten und

Überständen die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA Synthese wurde für die Zelllysate mit Oligo(dt) Primer, für die Überstände mit *Random*-Hexamer Primer durchgeführt (siehe 5.1.1 bis 5.1.3). Die cDNAs wurden anschließend in der qPCR mit NiV-N Primern analysiert (siehe 5.1.4). Die NiV-N ct-Werte der Zelllysate wurden auf die Kontrolle α -Tubulin bezogen ($2^{-\Delta ct}$, siehe 5.1.5). Die NiV-N ct-Werte der Überstände wurden mittels einer NiV-N Standardkurve in NiV-N Kopien/ml umgerechnet (siehe 5.1.6).

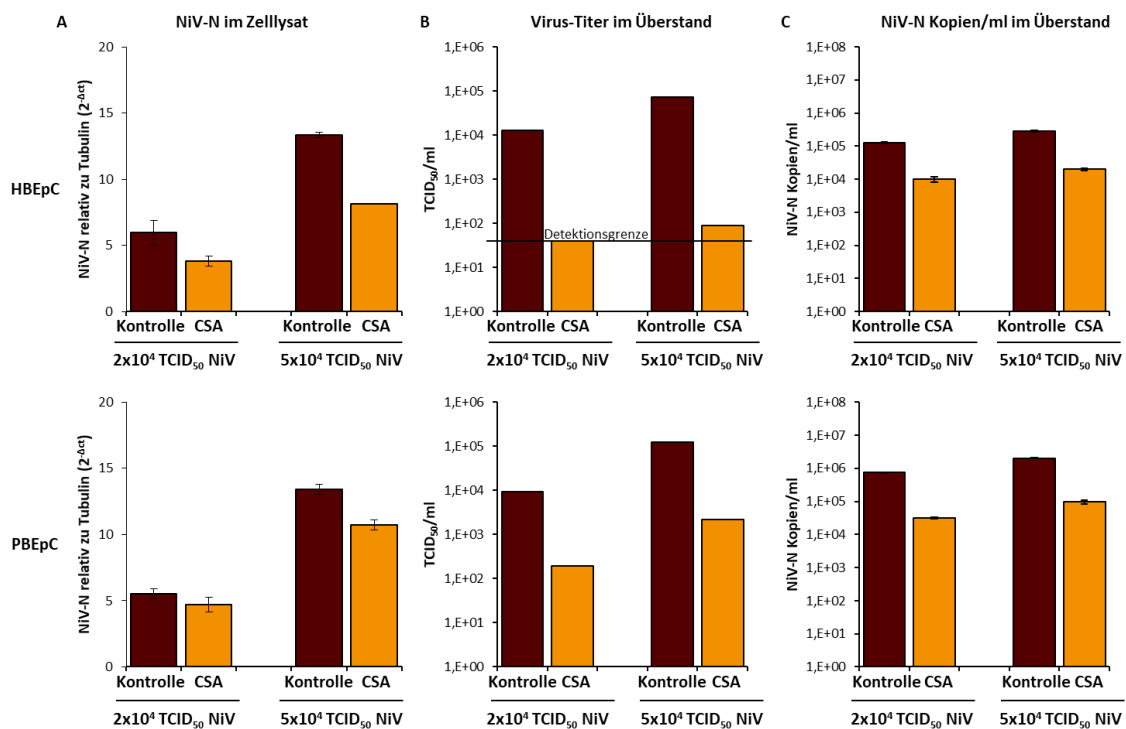


Abb. 2.22: Einfluss von Cyclosporin A (CSA) auf die NiV-Replikation und Freisetzung in humanen (HEpC) und porcinen Bronchial- (PBEpC) Epithelzellen.

HEpC und PBEpC wurden in 24-Well's kultiviert und mit 2×10^4 und 5×10^4 TCID₅₀ rNiV_{eGFP} für 24 h infiziert. Nach 1 h wurde das Virusinokulum durch Medium ersetzt und die Zellen mit 10 μ M CSA oder 0,67 μ l DMSO (Kontrolle) behandelt. (A) Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung aus den Zelllysaten und cDNA-Synthese mit Oligo(dt) Primern. Die qPCR wurde mit spezifischen Primern gegen NiV-N durchgeführt und die ct-Werte auf die Kontrolle α -Tubulin bezogen ($2^{-\Delta ct}$). (B-C) Die Überstände wurden abgenommen und zentrifugiert. (B) Die Virustiter wurden mittels TCID₅₀ Methode bestimmt. (C) Aus 100 μ l Überstand wurde die RNA isoliert. Die cDNA-Synthese erfolgte mit *Random*-Hexamer Primern, gefolgt von einer qPCR mit NiV-N Primern. Mit Hilfe einer NiV-N Standardkurve wurden die NiV-N Kopien/ml berechnet.

Wie in Abb. 2.22 A zu sehen, kommt es in den HEpC nach der Infektion mit 2×10^4 TCID₅₀ zu einer leichten Hemmung der Replikation, in PBEpC ist die Virus-Replikation bei dieser Infektionsdosis durch CSA nicht eindeutig beeinflusst. Bei der höheren Infektionsdosis (5×10^4 TCID₅₀) wird in beiden Epithelzellkulturen die Virus-Replikation durch CSA gehemmt. Die Virus-Freisetzung ist in den CSA-behandelten HEpC und PBEpC interessanterweise bei beiden Infektionsdosen stark beeinträchtigt (Abb. 2.22 B und C). Sowohl die Virus-Titer (Abb. 2.22 B) als

auch die NiV-N Kopien/ml (Abb.2.22 C) sind durch CSA vermindert. Die Virus-Freisetzung scheint in den HBepC insgesamt stärker gehemmt zu sein (Titerreduktion um ca. 3 log-Stufen). In den PBEpC beträgt die Hemmung der Virustiter ungefähr 2 log-Stufen.

Von Sauerhering *et al.*, 2020 wurde gezeigt, dass CSA eine IFN- λ abhängige antivirale Antwort in Calu-3-Zellen induzieren kann. Diese Beobachtung konnte in dem gleichen Zelltyp in dieser Arbeit auf mRNA-Ebene ebenfalls beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Unklar war allerdings, ob es in den HBepC und PBEpC durch die CSA-Behandlung ebenfalls zur Induktion von IFN- λ kommt. Um dies zu klären, wurden HBepC und PBEpC auf 24-Well-Platten kultiviert (siehe 5.2.2.4) und mit 10 μ M CSA oder als Kontrolle mit DMSO für 23 h behandelt (siehe 5.2.4.3). Die Zellen wurden in RLT-Puffer + β -ME lysiert und es erfolgte die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese mit Oligo(dt) Primern (siehe 5.1.1 bis 5.1.3). Die qPCR wurde mit spezifischen humanen IFN- λ 2,3 bzw. porcinen IFN- λ 3 Primern durchgeführt. Die IFN- λ ct-Werte wurden auf das *housekeeping gene* α -Tubulin bezogen und auf die uninfizierte DMSO-Kontrolle normalisiert, um die x-fache Erhöhung über DMSO darzustellen ($2^{-\Delta\Delta ct}$; siehe 5.1.4 - 5.1.5).

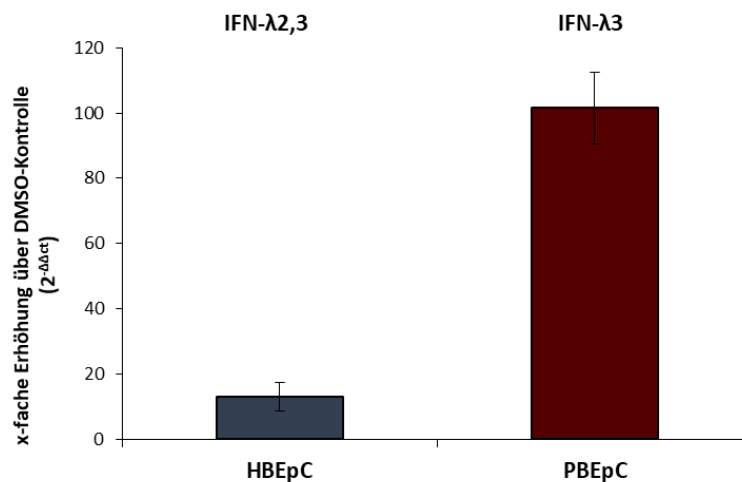


Abb. 2.23: Induktion von IFN- λ 2,3 nach Behandlung mit Cyclosporin A (CSA) in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBepC und PBEpC).

HBepC und PBEpC wurden in 24-Well's ausgesät und mit 10 μ M CSA und als Kontrolle mit 0,67 μ l DMSO für 23 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die RNA isoliert und mit Oligo(dt) Primern in cDNA umgeschrieben. Die qPCR wurde mit humanen IFN- λ 2,3 bzw. porcinen IFN- λ 3 Primern durchgeführt. Für die IFNs wurde die x-fache Erhöhung über DMSO-Kontrolle ($2^{-\Delta\Delta ct}$) bestimmt.

Wie Abb. 2.23 zeigt, induziert CSA in den HBepC und PBEpC IFN- λ 2,3 und IFN- λ 3 auf mRNA-Ebene. Interessanterweise wird IFN- λ in den PBEpC deutlich stärker durch CSA hochreguliert als in den HBepC. Dies wurde bei der NiV-Infektion der PBEpC nie beobachtet (siehe Abb. 2.15). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CSA über andere Signalkaskaden IFN- λ induziert als die

NiV-Infektion. Die Frage, ob die Induktion von IFN- λ durch CSA für die Hemmung der NiV-Infektion in HBEpC und PBEpC direkt verantwortlich ist, muss in weiteren Versuchen analysiert werden.

2.5 Porcine *ex vivo* Lungenschnitte als Modellsystem

2.5.1 Etablierung der porcinen *ex vivo lung slice cultures* (LS)

Bei den isolierten primären PTEpC, PBEpC und PSAEpC handelt es sich um respiratorische Epithelzellkulturen, die keine weiteren Zelltypen enthalten. Ein sehr viel komplexeres porcines Modell für die Atemwege sind die *ex vivo lung slice cultures* (LS), die neben den verschiedenen Epithelzelltypen noch weitere Zellen der Atemwege, wie beispielsweise Endothelzellen, verschiedene Immunzellen, submucosales Bindegewebe oder kleine Gefäße enthalten. Das bedeutet, dass in diesen LS die Zellvielfalt weitgehend der *in vivo* Situation entspricht. Um die NiV-Infektion in einem *ex vivo* Zellmodell näher zu charakterisieren und später Inhibitorstudien durchführen zu können, sollte das LS-Modell im letzten Teil dieser Arbeit etabliert werden. Die Methode zur LS-Herstellung aus frischen Schweinelungen ist ausführlich unter 5.2.5 beschrieben.

Bei der Herstellung der LS ist es wichtig, dass die Agarosefüllung schnell, aber vorsichtig vorgenommen wird, da sonst die Agarose in der Spritze polymerisiert oder sich die Lungenstücke beim Einfüllen der Agarose aufblähen und platzen können. Die stumpfe Kanüle muss ebenfalls vorsichtig eingeführt und deren Position mehrfach verändert werden, ansonsten wird der Bronchus verletzt und die Agarose läuft ins umliegende Gewebe. Aus solchen Lungenstücken ist es nicht möglich LS herzustellen.

Etwa 1-3 mm dicke LS, die mindestens ein Bronchuslumen enthielten, wurden mit verschiedenen Medien kultiviert, wobei sich RPMI 1640 (mit Penicillin/Streptomycin, Glutamin, Amphotericin B, Kanamycin, Enrofloxacin, Clotrimazol) als ein geeignetes Kultivierungsmedium herausstellte.

Die Lungenschnitte konnten mehrere Tage am Leben gehalten werden, wenn das Medium mehrmals täglich gewechselt wurde. Die Viabilität wurde jeden Tag anhand des Zilienschlages der Flimmerepithelzellen im Bronchuslumen mittels Durchlicht-Mikroskopie beurteilt. Die Zilienaktivität sah nach der Kultivierung über Nacht immer etwas schwächer aus und besserte sich, nachdem die LS gewaschen und das Medium gewechselt wurden (Abb. 2.24).

In Zusammenarbeit mit Ilka Fischer konnten in den LS verschiedene Zelltypen, wie die zilientragenden und schleimproduzierenden Becherzellen durch Immunfluoreszenz

nachgewiesen werden, auch wenn die Färbung und Auswertung wegen der Dicke der Schnitte (zirka 1-3 mm) schwierig war (BSc-Arbeit von Ilka Fischer, 2019).

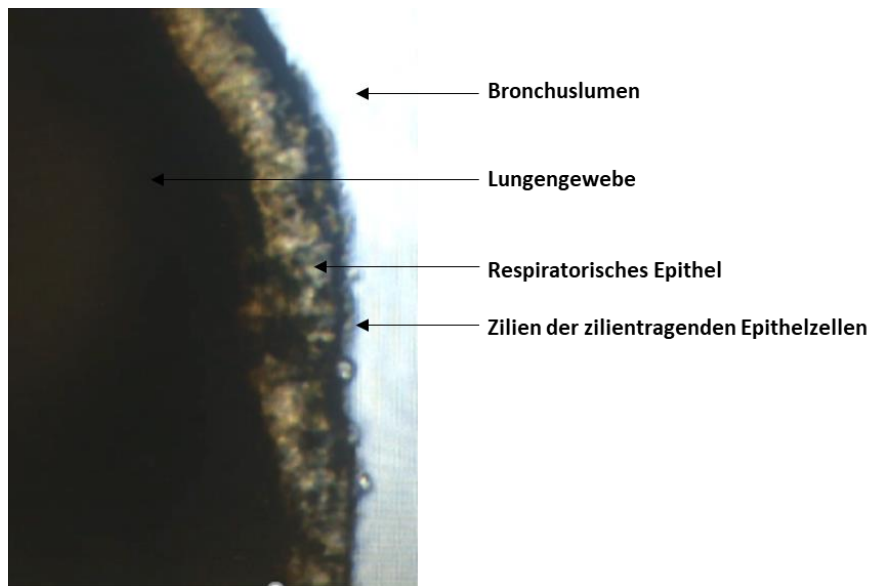


Abb. 2.24: Durchlicht-mikroskopische Aufnahme der zilientragenden Zellen in den porcinen *ex vivo lung slice cultures* (LS).

Die Lungenschnitte wurden aus frischen, mit Agarose gefüllten porcinen Lungen hergestellt. Gezeigt ist die 200-fache Vergrößerung (EVOS XL *core* Mikroskop).

2.5.2 Infektion von porcinen *ex vivo* Lungenschnitten mit rNiV_{eGFP}

Nach der erfolgreichen Herstellung vitaler porciner *ex vivo* Lungenschnitte sollte überprüft werden, ob diese mit NiV infizierbar sind und die Infektion mikroskopisch detektierbar ist.

Die LS wurden 4 h nach ihrer Herstellung, mehreren Waschschritten und der Überprüfung der Zilienaktivität (siehe 5.2.5) mit 1×10^6 TCID₅₀ rNiV_{eGFP} im BSL-4 Labor infiziert. Dabei wurde die Virusverdünnung direkt auf die Bronchusöffnung in den LS pipettiert (siehe 5.4.3). Nach 21 und 45 h p.i. wurden die Lungenschnitte mit 4 % PFA/DMEM fixiert und es erfolgte die Auswertung am Nikon TS100 Mikroskop im BSL-4 Labor.

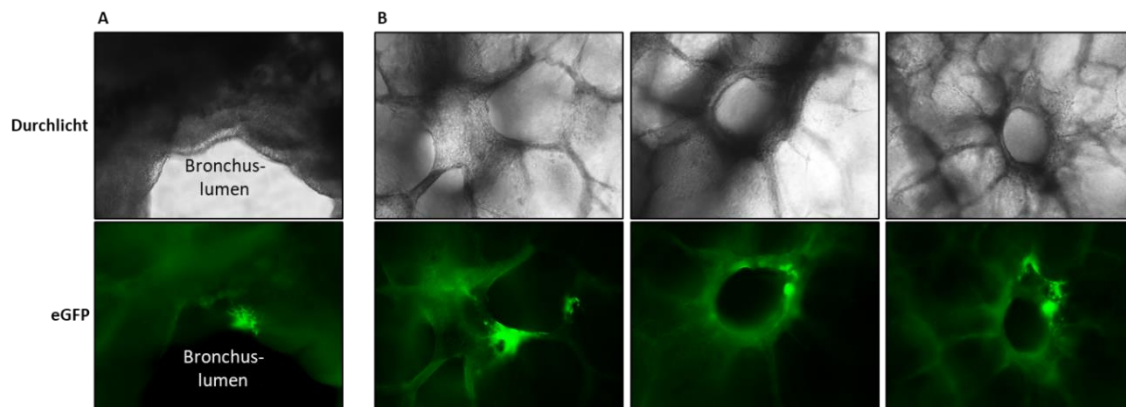


Abb. 2.25: Infektion von porcinen *ex vivo* Lungenschnitten (LS) mit rNiV_{eGFP}.

Die LS wurden 4 h nach der Präparation mit 1×10^6 TCID₅₀ rNiV_{eGFP} infiziert. 45 h p.i. wurden die LS mit 4 % PFA/DMEM fixiert und die Auswertung erfolgte am Nikon TS100 Mikroskop in der 100-fachen Vergrößerung. (A) Bronchus. (B) Lungengewebe.

21 h nach der Infektion konnte noch kein deutliches eGFP Signal nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nach 45 p.i. war jedoch eine deutliche eGFP-Fluoreszenz in den Lungenschnitten zu erkennen (Abb. 2.25). In den LS wurden mehrere eGFP positive Bereiche, sowohl am Bronchuslumen (Abb. 2.25 A), als auch im Lungengewebe (Abb. 2.25 B) beobachtet.

Diese ersten Ergebnisse zeigen, dass die Lungenschnitte für NiV-Infektionen geeignet sind und für spätere Inhibitorversuche verwendet werden können.

III Diskussion

3.1 Verwendung von primären humanen und porcinen Epithelzellkulturen

Ziel dieser Arbeit war es, die Zytokin-Induktion als Antwort auf eine NiV-Infektion in respiratorischen Epithelzellen zu analysieren, um Spezies-spezifische Unterschiede zu identifizieren, die einen Einfluss auf die unterschiedliche Ausprägung von respiratorischen Symptomen in Menschen und Schweinen während des NiV Malaysia und Singapur Ausbruchs 1998/1999 haben könnten.

Dazu wurden in dieser Arbeit für die meisten Experimente primäre humane und porcine Atemwegsepithelzellen benutzt. Die Verwendung von primären anstatt permanenten Zellkulturen für Zytokin-Untersuchungen hat den Vorteil, dass die primären Zellen der *in vivo* Situation ähnlicher sind und somit die verschiedenen Signalwege in der Immunantwort Gewebe- und Spezies-spezifisch induzieren können. Im Gegensatz dazu werden permanente Zellkulturen häufig aus Tumoren isoliert und können zahlreiche Defizite in Signalwegen der Immunantwort aufweisen. Zum Beispiel produzieren Nierenzellen aus der grünen Meerkatze (Vero-Zellen) keine Interferone (Desmyter *et al.*, 1968). Ein Nachteil beim Arbeiten mit primären Zellkulturen ist jedoch, dass die Zellen zeitaufwändig in der Isolierung bzw. Kultivierung sind, da sie meistens langsamer wachsen als permanente Zellkulturen. Die primären Zellen benötigen spezielles Medium sowie Zellkulturmaterial und sind generell empfindlicher als die permanenten Zellkulturen. Weil diese Zellen nur eine begrenzte Zahl an Zellteilungen durchlaufen können und es unmöglich ist große Zellkulturen zu generieren, können nur wenige Versuche mit Zellen aus dem gleichen Donor durchgeführt werden. Schwierig und aufwendig ist insbesondere die Differenzierung der Zellen, weshalb in dieser Arbeit nicht ausdifferenzierte Epithelzellen verwendet wurden. Vorarbeiten hatten bereits in diesen Zellkulturen klare Spezies-spezifische Unterschiede gezeigt (Sauerhering *et al.*, 2016).

Die humanen primären Epithelzellen aus verschiedenen Lungenabschnitten sind von verschiedenen Firmen erhältlich. In dieser Arbeit wurden alle humanen Epithelzellen von der Firma Provitro verwendet. Es wurden zwar auch humane Tracheal-Bronchial-Epithelzellen (NHBE) der Firma Lonza mit NiV infiziert, diese Daten sind aber in dieser Arbeit nicht gezeigt. Epithelzellen aus den Atemwegen von Schweinen sind nicht kommerziell erhältlich, weshalb diese nach dem etablierten Protokoll für porcine Bronchial-Epithelzellen von Lucie Sauerhering aus der Trachea, den Bronchien und den *Small-Airways* selbst isoliert wurden (Sauerhering, 2014). Während die humanen primären Zellen durch die Hersteller charakterisiert wurden, mussten die selbstisolierten porcinen Zellen vor Verwendung auf ihren Epithelzellcharakter

durch Immunfluoreszenz-Analysen und qPCR nach Stimulierungs-Versuchen analysiert werden (siehe Methoden 5.2.2.3).

3.2 Die humanen Bronchial-Epithelzellen reagieren mit einer stärkeren Zytokinantwort auf die NiV-Infektion als die Tracheal- und *Small-Airways*-Epithelzellen

Beim NiV-Ausbruch in Malaysia und Singapur 1998/1999 wurde in infizierten Menschen, neben dominanten Schädigungen im Gehirn, auch teilweise Auffälligkeiten und Virus-induzierte Synzytien in der Lunge nachgewiesen. Virales Antigen konnte in der Lunge, im Bronchial-Epithel oder in den tiefer gelegenen Alveolen von einigen Patienten gefunden werden (Wong *et al.*, 2002; Chua *et al.*, 2003). Interessanterweise wurden respiratorische Symptome und die Ausbildung einer Pneumonie vor allem für Patienten in Singapur dokumentiert (Paton *et al.*, 1999). Es ist nicht bekannt, warum einige Patienten eine respiratorische Ausprägung zeigten, die Mehrheit in dieser Hinsicht jedoch symptomatisch unauffällig war. Da das Virus bis zu diesem Ausbruch unbekannt war und anfangs davon ausgegangen wurde, dass es sich um einen Ausbruch von Japanischer Enzephalitis handelte (CDC, 1999), kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass eine leichte respiratorische Symptomatik besonders bei den ersten Fällen nicht dokumentiert wurde. Deshalb ist die Bedeutung der Lunge und anderer Abschnitte der Atemwege in der NiV-Infektion im Menschen beim Malaysia und Singapur Ausbruch weitgehend unklar. In Versuchen mit humanen Lungen-Xenograft Mausmodellen zeigte die NiV-Infektion eine Hochregulierung von verschiedenen Zytokinen, wie IP-10, IL-6 und TNF α in dem humanen Lungentransplantat (Valbuena *et al.*, 2014). Durch Zellkulturstudien unserer Arbeitsgruppe mit differenzierten humanen Bronchial-Epithelzellen konnte darüber hinaus eine deutliche Hochregulierung von Typ-III IFN- λ nachgewiesen werden, während Typ-I IFN- β nur schwach induziert wurde (Sauerhering *et al.*, 2017). Diese Beobachtung passt dazu, dass Epithelzellen eine der wenigen Zelltypen sind, die die IFNLR1-Untereinheit des IFN- λ Rezeptors exprimieren, sowie auf verschiedene Virusinfektionen mit der Induktion von IFN- λ reagieren, was keine inflammatorische Reaktion auslöst (Andreacos *et al.*, 2017; Galani *et al.*, 2017). Das würde dazu passen, dass in NiV-infizierten Patienten selten eine Entzündungsantwort in der Lunge beobachtet wurde.

In dieser Arbeit sollte die NiV-Infektion von Epithelzellen aus verschiedenen humanen Lungenabschnitten näher charakterisiert werden. Dazu wurden die höher gelegenen Tracheal-Epithelzellen (HTEpC) und die tiefer gelegenen *Small-Airways*- (HSAEpC) mit den Bronchial-Epithelzellen (HBEpC) verglichen, um zu klären, ob sich hier die Interferon- und Zytokinantwort unterscheidet. Es konnte beobachtet werden, dass die HTEpC, HBEpC und HSAEpC auf die NiV-Infektion mit einer starken Expression von IFN- λ auf mRNA-Ebene reagieren, wobei die HBEpC

die stärkste Induktion von IFN- λ und Interferon-stimulierten Genen zeigen (siehe Ergebnisse Abb. 2.2, 2.3 und 2.4). Dass die Tracheal-Epithelzellen mit einer geringeren Interferon-Antwort auf die Infektion reagieren, könnte damit zusammenhängen, dass die Tracheal-Epithelzellen *in vivo* häufig mit zahlreichen unbekanntem Umwelteinflüssen in Kontakt kommen und vermutlich deshalb eine schwächere Reaktion zeigen, als Zellen aus tiefer gelegenen Atemwegen. Dies vermeidet möglicherweise eine ständige Aktivierung der angeborenen Immunantwort und dadurch hervorgerufene Gewebeschädigungen. Bei den meisten kommerziell erhältlichen primären humanen Tracheal-Epithelzellen handelt es sich um tracheobronchiale Mischkulturen, wie die NHBE (*normal human bronchial/tracheal epithelial cells*) von Lonza. Die Ergebnisse der Infektionsstudien in den NHBE sind in dieser Arbeit nicht im Detail beschrieben und sollen hier nur zusammenfassend dargestellt werden. In NHBE-Zellen führt eine Infektion mit hohen NiV-Infektionsdosen (3×10^5 und 6×10^5 TCID₅₀) zur Induktion von vereinzelt kleinen Synzytien. Die NiV-N mRNA Menge im Zelllysate ist gering, was dafür spricht, dass die Virusreplikation in den NHBE limitiert ist. IFN- β und IFN- $\lambda 1$ sind 24 h p.i. gar nicht und IFN- $\lambda 2,3$ nur schwach induziert. Nach 48 h p.i. zeigt sich eine stärkere Virusreplikation in den NHBE-Zellen. Es sind große Synzytien und eine gesteigerte IFN- β , IFN- $\lambda 1$ und IFN- $\lambda 2,3$ Expression detektierbar. Wie in den HTEpC, HBEpC und HSAEpC wird mehr IFN- $\lambda 2,3$ gebildet als IFN- β . Aber obwohl die NHBE-Zellen 48 h p.i. mehr virale NiV-mRNA in den Zellen enthielten, produzieren sie weniger IFN- $\lambda 2,3$ als die HBEpC aus Abb. 2.2. Dies könnte daran liegen, dass eventuell der Anteil an Tracheal-Epithelzellen in den NHBE Mischkulturen auf die NiV-Infektion mit einer schwachen IFN-Induktion reagiert, was auch für die HTEpC Kulturen beobachtet wird (siehe Ergebnisse Abb. 2. 2).

Die humanen HBEpC und HSAEpC exprimieren beide ähnliche Mengen des NiV-Rezeptors Ephrin-B2 auf ihren Oberflächen (siehe Ergebnisse Abb. 2.5). Dazu passt, dass sich beide Epithelzellkulturen gleich gut infizieren lassen und ähnliche Virus-RNA Mengen in den Zellen enthalten (siehe Ergebnisse Abb.2.3). Die HSAEpC reagierten allerdings auf die NiV-Infektion mit einer deutlich geringeren IFN- λ Induktion als die HBEpC (siehe Ergebnisse Abb. 2.3 und 2.4). In NiV-Infektionsstudien von Escaffre und Kollegen wurde in Microarray-Analysen keine Hochregulierung von IFN- $\lambda 2$ in humanen *Small-Airways*-Epithelzellen nachgewiesen (Escaffre *et al.*, 2013). In dieser Arbeit wurde jedoch eine deutliche Induktion von IFN- $\lambda 2,3$ in HSAEpC (siehe Abb. 2.3) nachgewiesen. Die Unterschiede sind wahrscheinlich dadurch erklärbar, dass die Zellkultur- und Infektionsbedingungen sich in einigen Aspekten von denen von Escaffre *et al.* verwendeten Zellen unterschieden (z.B. Herkunft der Zellen, Passagezahl, Infektionsdosis).

Die geringere antivirale Immunantwort der HSAEpC (im Vergleich zu HBEpC, siehe Ergebnisse Abb. 2.4) in dieser Arbeit ist vermutlich nicht nur auf die geringere IFN- λ Produktion

zurückzuführen, sondern auch darauf, dass die hier verwendeten HSAEpC (P6) nur noch zum Teil den IFN- λ Rezeptor IFNLR1 auf der Oberfläche exprimiert haben (siehe Ergebnisse Abb. 2.6). Diese Erklärung wird auch durch die Stimulationsversuche mit rekombinantem IFN- λ unterstützt, die zeigten, dass die geringere IFNLR1-Oberflächenexpression auf den HSAEpC direkt mit einer verminderten IFN- λ -Sensitivität, d.h. einer geringeren ISG-Expression nach der IFN- λ Stimulation korreliert (siehe Ergebnisse Abb. 2.7). Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass HSAEpC, die weniger passagiert wurden bzw. mehr/homogener IFNLR1 exprimieren, das Potenzial haben mit einer ähnlich starken ISG-Hochregulierung auf die Infektion zu reagieren wie die HBEpC. Dafür würde sprechen, dass Escaffre und Kollegen zeigen konnten, dass HSAEpC mit einer stärkeren ISG56 Expression auf eine NiV-Infektion reagieren als NBHE (Escaffre *et al.*, 2013).

Zusammenfassend haben die Untersuchungen in dieser Arbeit gezeigt, dass die HBEpC die stärkste IFN- λ Antwort auf die NiV-Infektion im Vergleich zu den HTEpC und HSAEpC zeigten. Sie exprimierten über mehrere Passagen stabil den viralen Eintrittsrezeptor EB2 und obwohl die Expression des IFNLR1-Rezeptor mit zunehmender Passagezahl abnahm, wurde dieser einheitlicher und stabiler exprimiert als in den HSAEpC. Dementsprechend reagierten die HBEpC auf IFN- λ (IFN- λ -Sensitivität) generell mit einer starken Induktion von ISGs, was die Infektionsstudien in HBEpC aus verschiedenen Passagen besser vergleichbar macht.

3.3 Die Induktion von Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen unterscheidet sich in porcinen Tracheal-, Bronchial- und *Small-Airways*-Epithelzellen nach der NiV-Infektion

Beim Ausbruch in Malaysia und Singapur wurde NiV über Flughund-Sekrete auf Schweine übertragen (Chua *et al.*, 2002; Lam und Chua, 2002). Die porcinen Atemwege sind *in vivo* nach der natürlichen oder experimentellen NiV-Infektion stark infiziert und zeigten in der Trachea, den Bronchien, Bronchiolen und der Lunge Läsionen und Entzündungsherde mit Immunzell-Infiltraten (Chua *et al.*, 2000; Mohd Nor und Ong, 2000; Hooper *et al.*, 2001, Middleton *et al.*, 2002; Weingartl *et al.*, 2006). Die starke Virusreplikation in der Schweinelunge *in vivo* lässt vermuten, dass die NiV-Replikation auch in porcinen Atemwegszellkulturen effizient verläuft. Und tatsächlich konnte in PTEpC, PBEpC und PSAEpC eine starke Infektion und Synzytienbildung, vor allem nach 48 h p.i., beobachtet werden (siehe Ergebnisse 2.9). Allerdings war die Replikation in den Epithelzellen der verschiedenen Lungenabschnitte unterschiedlich stark und war am geringsten in den PSAEpC. Interessanterweise hatten diese Replikations-Unterschiede 48 h p.i. keinen Einfluss auf die Virusproduktion, da eine ähnliche Virus-Freisetzung aus PTEpC, PBEpC und PSAEpC beobachtet wurde (siehe Ergebnisse Abb. 2.9 B und 2.10 B).

Die Zytokin-Induktion in NiV-infizierten porcinen Tracheal-, Bronchial- und den tiefer gelegenen *Small-Airways*-Epithelzellen wurde in dieser Arbeit erstmalig miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass in den infizierten porcinen respiratorischen Epithelzellen, wie in den humanen Epithelzellen, dominant IFN- λ anstatt IFN- β induziert wurde (siehe Ergebnisse Abb. 2.8 und 2.10). IFN- $\lambda 3$ wurde auf mRNA-Ebene am stärksten in den PBEpC hochreguliert und deutlich schwächer in den PTEpC und PSAEpC und das sogar bei ähnlicher, d.h. vergleichbaren Mengen intrazellulärer NiV-RNA. Dabei ist jedoch anzumerken, dass in den uninfizierten PTEpC und PSAEpC bereits geringe Mengen IFN- $\lambda 3$ mRNA nachweisbar waren (nicht gezeigt). Das lässt vermuten, dass in den porcinen Tracheal- und *Small-Airways*-Epithelzellen schon vor der NiV-Infektion eine gewisse Menge IFN- λ vorhanden war und durch die Infektion nicht mehr so stark hochreguliert wurde. Das macht vor allem in den Tracheal-Epithelzellen Sinn, die durch die Anatomie des Schweines und dessen Schnüffelverhalten nah am Boden häufig Kontakt mit Viren und anderen Infektionserregern haben. Ein Grundlevel an Interferonen könnten hier sinnvoll sein, um eine dauerhafte/überschießende Hochregulierung zu vermeiden. Gelangt ein Virus dann trotz Abwehrmechanismen tiefer in die Atemwege zu den Bronchial-Epithelzellen, kommt es zu einer stärkeren Virus-abhängigen IFN- λ Produktion, wodurch eine antivirale Antwort induziert wird.

Obwohl die IFN-Hochregulierung in den PSAEpC geringer als in PBEpC war, war die proinflammatorische Antwort in den Epithelzellen der tieferen Atemwege (PSAEpC) auch bei weniger Virus-RNA Menge stark ausgeprägt (siehe Ergebnisse Abb. 2.11). Die starke antivirale IFN/ISG-Induktion in porcinen Bronchial-Epithelzellen und die vor allem proinflammatorische Antwort in den tiefer gelegenen Epithelzellverbänden (PSAEpC) könnte wichtig für die NiV-Eliminierung sein: Gelangt das Virus in die oberen Abschnitte des porcinen Respirationstraktes könnte zunächst eine IFN- λ abhängige antivirale Immunantwort ausgelöst werden, um die weitere Ausbreitung zu verhindern (Andreacos *et al.*, 2017; Galani *et al.*, 2017). Gelangen die Viren trotzdem in tiefere Lungenabschnitte kommt es dann zu einer starken Entzündungsreaktion, um die Infektion zu bekämpfen (siehe Einleitung 1.3.2). Dieses Modell passt auch zu den *in vivo* Daten. In NiV-infizierten Schweinen wurde beim Malaysia-Ausbruch und bei experimentellen Infektionen histologisch eine ausgeprägte Pneumonie beobachtet, was für eine starke Entzündung in den tiefergelegenen Lungenabschnitten spricht (Mohd Nor und Ong, 2000; Hooper *et al.*, 2001; Middleton *et al.*, 2002; Weingartl *et al.*, 2006).

3.4 Die NiV-Infektion induziert Spezies-spezifische Zytokinantworten in primären humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen

Die Ausprägung der respiratorischen Symptomatik während des NiV-Ausbruches in Malaysia und Singapur war in infizierten Menschen und Schweinen sehr unterschiedlich. Schweine zeigten eine ausgeprägte respiratorische Symptomatik und Entzündungszeichen in der Lunge (Mohd Nor und Ong, 2000; Hooper *et al.*, 2001). Die NiV-Infektion im Menschen resultierte nur bei 14-27 % der Patienten in respiratorischen Symptomen (Lo und Rota, 2008). Virales Antigen konnte in porcinen Lungen häufig, aber in humanen Lungen nur selten im Bronchial-Epithel nachgewiesen werden (Chua *et al.*, 2000; Hooper *et al.*, 2001; Middleton *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2002). NiV-Isolate aus Menschen und Schweinen zeigten dabei identische Sequenzen, weshalb die Unterschiede nicht auf adaptive Mutationen beim Übergang der Viren vom Schwein auf den Menschen zurückgeführt werden können (AbuBakar *et al.*, 2004). Vielmehr müssen Spezies-spezifische Unterschiede existieren, die die unterschiedliche Beteiligung der Atemwege im Menschen und Schweinen verursachten. Es wurde bereits gezeigt, dass der Rezeptor Ephrin-B2 unterschiedlich stark in humanen und porcinen Atemwegsepithelzellen exprimiert wurde (Sauerhering *et al.*, 2016). Allerdings können die Rezeptor-Expressions-Unterschiede die Replikations-Unterschiede in porcinen und humanen Bronchial-Epithelzellen nur zu einem Teil erklären. Es ist klar, dass es hier weitere wichtige Spezies-spezifische Faktoren geben muss.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PBEpC wie HBEpC IFN- λ und ISGs als Antwort auf die NiV-Infektion hochregulierten (siehe Ergebnisse Abb. 2.12). Allerdings war die IFN- λ Induktion in PBEpC deutlich geringer als in HBEpC, wenn beide Zellkulturen mit der gleichen Infektionsdosis infiziert wurden und sogar, wenn die gleiche Virus-RNA Menge vorhanden war (siehe Ergebnisse 2.12 und 2.14). Und auch wenn die porcinen Bronchial-Epithelzellen nach einer längeren Infektionsdauer (48 h) mehr NiV-RNA enthielten, war die IFN- λ und ISG Antwort (OAS und ISG56) schwächer als in den humanen Bronchial-Epithelzellen nach 24 h p.i. (siehe Ergebnisse Abb. 2.12 und 2.13). Interessanterweise war die Hochregulierung von proinflammatorischen Zytokinen (IL-6/IL-8) vergleichbar in HBEpC und PBEpC, teilweise sogar stärker in den PBEpC (siehe Ergebnisse Abb. 2.14 und 2.15), was darauf hinweist, dass hier ein anderer Signalweg zugrunde liegt. Eine Virusinfektion wird in den Bronchial-Epithelzellen von *pattern-recognition receptors* (PRR) wie beispielsweise dem TLR3 und RIG-I erkannt (Homma *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2009; Loo und Gale, 2011). Die Erkennung viraler RNA durch diese Rezeptoren führt zur Aktivierung von nachgeschalteten Signalkaskaden, wodurch es zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Interferonen kommen kann (siehe Einleitung 1.3). Es wird vermutet, dass die Expression von proinflammatorischen Zytokinen

hauptsächlich über den TLR3 Rezeptor und Aktivierung von NF κ B in den Epithelzellen ausgelöst wird. Die Induktion von Typ-I und Typ-III IFNs scheint hingegen bevorzugt nach Aktivierung des RIG-I Rezeptors über IRF3 und IRF7- oder IRF1 (nur Typ-III IFN) abhängige Signalwege abzulaufen (siehe Einleitung Abb. 1.6; Sirén *et al.*, 2006; Le Goffic *et al.*, 2007; Bertolusso *et al.*, 2014; Odendall und Kagan, 2015). Von Virus-infizierten Zellen sezernierte IFNs können anschließend autokrin oder parakrin an ihren spezifischen Rezeptor binden und über die Aktivierung von STAT-abhängigen Signalwegen die Induktion von Interferon-stimulierten Genen auslösen (siehe Abb. 1.7; Stanifer *et al.*, 2019).

Die im Vergleich geringere Fähigkeit der PBEpC, auf eine NiV-Infektion mit der Induktion von Interferonen und ISGs zu reagieren (siehe Ergebnisse Abb. 2.15), könnte darauf zurückzuführen sein, dass die RIG-I-Signalkaskade in den porcinen Bronchial-Epithelzellen weniger effizient aktiviert wurde. Dadurch, dass weniger Interferone in den PBEpC gebildet wurden, kam es dann auch zur geringeren Expression antiviraler ISGs. Für diese Vermutung sprechen die Ergebnisse von Hauser und Kollegen, die gezeigt haben, dass primäre porcine im Vergleich zu humanen Bronchial-Epithelzellen eine geringere RIG-I-Expression aufwiesen, was die geringere Hochregulierung von IFN- λ und ISGs nach einer Influenza-Infektion in den porcinen Epithelzellen erklären könnte (Hauser *et al.*, 2013). Das könnte auch die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede in NiV-infizierten porcinen und humanen Bronchial-Epithelzellen erklären. Um das zu überprüfen, müsste die RIG-I-Expression in HBEpC und PBEpC auf Proteinebene, z.B. durch Westernblot-Analysen untersucht werden.

Trotz der verminderten IFN-Antwort zeigten die PBEpC eine vergleichbare Expression von proinflammatorischen Zytokinen (siehe Ergebnisse 2.15). Das könnte bedeuten, dass der Signalweg über TLR3 ähnlich effizient in HBEpC und PBEpC angeschaltet wurde.

Diese Ergebnisse passen zu den *in vivo* Infektionen von Schweinen, bei denen eine starke Entzündungsreaktion in den Atemwegen und der Lunge nachgewiesen wurde (Chua *et al.*, 2000; Mohd Nor und Ong, 2000; Hooper *et al.*, 2001; Middleton *et al.*, 2002; Weingartl *et al.*, 2006). Die vornehmliche Induktion einer antiviralen Antwort in humanen Bronchial-Epithelzellen könnte darauf hindeuten, dass in der menschlichen Lunge die NiV-Infektion effizienter bekämpft werden kann als in der Schweinelunge, was letztendlich eine überschießende Entzündungsantwort hemmen könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Spezies-spezifische Unterschiede in der Zytokinantwort auf die NiV-Infektion in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen identifiziert werden konnten, die einen Einfluss auf die NiV-Symptomatik in der Lunge haben könnten. Diese Ergebnisse und Schlussfolgerungen konnten kürzlich auch publiziert werden (Elvert *et al.*, 2020).

3.5 Die durch Poly(I:C) induzierte TLR3-abhängige Antwort unterscheidet sich von der NiV-induzierten Zytokinantwort in HBEpC und PBEpC

In porcinen und humanen Atemwegsepithelzellen ist noch nicht genau bekannt, durch welche *pattern-recognition* Rezeptoren (PRR) die NiV-RNA genau erkannt wird. Zum Beispiel könnte die NiV-Infektion über virale einzelsträngige RNA durch TLR7 und TLR8 erkannt werden, allerdings konnte in verschiedenen humanen Epithelzellen nur selten oder gering die TLR7 und TLR8 Expression beobachtet werden. Dagegen wurde der TLR3 mittels PCR- und Immunfluoreszenzanalysen in allen (untersuchten) humanen respiratorischen Epithelzellen nachgewiesen (Homma *et al.*, 2004; Sha *et al.*, 2004; Ritter *et al.*, 2005; Ioannidis *et al.*, 2013). TLR3 erkennt eigentlich virale doppelsträngige RNA, aber auch bei vielen einzelsträngigen RNA-Viren werden dsRNA-Intermediate während der Replikation gebildet (Barton, 2007). Somit kann TLR3 sehr wahrscheinlich auch NiV-RNA erkennen.

Um die Virus-unabhängige Aktivierung von TLR3/NFκB-Signalwegen zu untersuchen und eventuell Spezies-spezifische Unterschiede aufzudecken, wurden die primären humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen mit *polyinosine-polycytidylic acid* (Poly(I:C)) stimuliert. Diese synthetische dsRNA wird endozytiert, vom TLR3 Rezeptor erkannt und kann die nachgeschalteten Signalkaskaden aktivieren. Die Stimulierung mit Poly(I:C) führte in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen zu einer konzentrationsabhängigen Hochregulierung von Interferonen, ISGs und proinflammatorischen Zytokinen, allerdings zeigten sich hier deutliche quantitative Spezies-spezifische Unterschiede (siehe Ergebnisse Abb. 2.16 bis 2.18). Dies könnte an Unterschieden in TLR3-Expressionsleveln oder aber an unterschiedlich effizienten Signalwegen liegen. Möglich ist auch, dass Poly(I:C) nicht nur die TLR3 Signalkaskade aktiviert. Poly(I:C) konnte z.B. in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293), humanen Bindehautepithelzellen und primären humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen die Hochregulierung von RIG-I zu bewirken (Manuse und Parks, 2010; Ueta *et al.*, 2010; Hauser *et al.*, 2013). Dadurch könnte Poly(I:C) nicht nur über den TLR3 Signalweg wirken, sondern weitere Signalwege hochregulieren und eventuell aktivieren, was zu Spezies-spezifischen Unterschiede in der Zytokinantwort führen könnte.

Die PBEpC regulierten nach der Poly(I:C)-Stimulierung IFN-λ3 teilweise ähnlich effizient hoch wie die HBEpC und exprimierten IFN-β und OAS sogar stärker als die HBEpC (siehe Ergebnisse 2.16 und 2.17). Auch die proinflammatorischen Zytokine wurden Spezies-spezifisch unterschiedlich stark nach der Poly(I:C)-Stimulierung exprimiert (HBEpC mehr IL-6 und IL-8, PBEpC mehr TNFα, siehe Abbildung 2.18). Damit unterschieden sich die Ergebnisse deutlich von der NiV-induzierten Zytokinantwort, in der die PBEpC immer deutlich weniger IFNs und ISGs hochregulierten als HBEpC. Die Induktion proinflammatorischer Zytokine (IL-6/IL-8) war ähnlich oder sogar stärker

in NiV-infizierten PBEpC im Vergleich zu HBEpC (siehe Ergebnisse Abb. 2.14 und 2.15). Daraus lässt sich schließen, dass die Poly(I:C) Stimulierung über den TLR-3 Rezeptor die Signalwege in porcinen Bronchial-Epithelzellen anders/stärker aktiviert als die NiV-Infektion, deren Erkennung wahrscheinlich eher über den viralen RIG-I Signalweg läuft (Habjan *et al.*, 2008).

3.6 Die Virus-Freisetzung unterscheidet sich in primären PBEpC und HBEpC

Die porcinen Bronchial-Epithelzellen zeigten, obwohl weniger Virus-RNA in den Zellen nachweisbar war, eine stärkere NiV-Freisetzung (siehe Ergebnisse Abb 2.19). Eine mögliche Erklärung könnte Tetherin sein, das nur in den HBEpC nach der Infektion hochreguliert wurde (siehe Ergebnisse Abb. 2.20). Tetherin ist ein Interferon-stimuliertes Gen, das zwei Transmembran-Domänen aufweist und das *Budding* von Viren verhindern kann, indem eine Tetherin Transmembran-Domäne in der Zellmembran und eine in der Virusmembran verankert wird, was die Viren quasi an die Zelle heftet („*tethern*“). Außerdem kann Tetherin mit seinen beiden TM-Domänen in zwei verschiedene Viruspartikel eingebaut werden. Das verhindert zwar nicht das *Budding* von der Zellmembran, aber die Partikel bleiben aneinanderhaften und sind somit weniger infektiös (Sauter, 2014; Mahauad-Fernandez und Okeoma, 2016). Die Hemmung des *Virusbuddings* durch Tetherin wurde zuerst für HIV-1 beschrieben, dessen kodiertes Vpu Protein einen Antagonisten von Tetherin darstellt und dessen Wirkung beeinträchtigt (Neil *et al.*, 2007; Neil *et al.*, 2008; van Damme *et al.*, 2008). Später wurde gezeigt, dass Tetherin auch das *Budding* anderer umhüllter Viren aus der Familie der Retroviren, Filoviren, Rhabdoviren, Arenaviren und Paramyxoviren hemmen kann (zusammengefasst in Sauter, 2014; Mahauad-Fernandez und Okeoma, 2016). Die in dieser Arbeit beobachtete Tetherin-Hochregulierung in NiV-infizierten HBEpC lässt vermuten, dass es dadurch zu einer stärkeren Hemmung des *Budding*-Prozesses kam, was die Virus-Freisetzung verringerte. Dazu passt, dass in humanen Zellen überexprimiertes Tetherin in der Lage war die Freisetzung von Nipah-viralen *Virus-like-particles* (VLPs) zu hemmen (Radoshitzky *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu HBEpC zeigten PBEpC keine Hochregulierung von Tetherin durch NiV, was eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Freisetzung in den porcinen Bronchial-Epithelzellen sein könnte. Diese Vermutung würde auch zu den *in vivo* Daten passen, denn Schweine scheiden über respiratorische Sekrete vermutlich große Mengen infektiöse NiV-Partikel aus, was die Virusübertragung begünstigt (Mohd Nor und Ong, 2000; Chua *et al.*, 2000; Chua *et al.*, 2001; Hooper *et al.*, 2001; Middleton *et al.*, 2002). In einigen NiV-infizierten Menschen konnten in Atemwegssekreten zwar ebenfalls Viruspartikel nachgewiesen werden, jedoch wurde beim Ausbruch 1998/1999 keine Mensch-zu-Mensch-Übertragungen beobachtet, was auf eine geringere Virus Menge in humanen respiratorischen Sekreten hinweisen könnte (Chua *et al.*, 2001).

3.7 Cyclosporin A hemmt die NiV-Infektion in Calu-3, HBEpC und PBEpC

Bei Cyclosporin A (CSA) handelt es sich um ein zyklisches Peptid aus Pilzen mit immunsupprimierenden Eigenschaften (Borel *et al.*, 1976). CSA wurde 1983 als Immunsuppressivum zugelassen und wird unter anderem bei Organtransplantationen zur Verhinderung einer Abstoßungsreaktion eingesetzt. Die Wirkung von CSA wird unter anderem durch die Bindung an Cyclophiline erzielt und bewirkt die Hemmung der Phosphatase Calcineurin. Calcineurin ist dadurch nicht mehr in der Lage den *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) zu dephosphorylieren, der dann nicht in den Zellkern wandern und die Transkription von beispielsweise IL-2, IL-4 und TNF α auslösen kann. Dadurch wird die Aktivierung der T-Zell-abhängigen Immunantwort gehemmt (Matsuda und Koyasu, 2000; Flores *et al.*, 2019). Zusätzlich kann CSA die MAP-Kinasen JNK- und p38 hemmen, die normalerweise verschiedene Substrate phosphorylieren und eine Rolle in Immunantworten spielen (Matsuda und Koyasu, 2000; Huang *et al.*, 2010). Während hohe CSA-Dosen die beschriebenen immunsupprimierenden Effekte induzieren, wurde beobachtet, dass geringe Dosen CSA die angeborene Immunantwort nicht blocken, sondern aktivieren können (Flores *et al.*, 2019). Dies ist vermutlich dafür verantwortlich, dass CSA verschiedene Viren hemmen kann, wie beispielsweise HIV-1 (Franke und Luban, 1996), Influenza-A-Viren (Liu *et al.*, 2012) und verschiedene Coronaviren (de Wilde *et al.*, 2011; de Wilde *et al.*, 2013; Sauerhering *et al.*, 2020). Seit kurzem ist bekannt, dass CSA die antivirale Immunantwort über IRF-1 und IFN- λ aktivieren kann und zur Hemmung der MERS-Coronavirus-Infektion in Calu-3-Zellen, in primären humanen Alveolar-Epithelzellen (hAEC) und im Maus-Tiermodell führte (Sauerhering *et al.*, 2020). Eine CSA-abhängige IFN-Induktion sollte nicht nur Coronaviren, sondern auch NiV hemmen können. Und tatsächlich wurde in Calu-3-Zellen nach CSA-Behandlung eine deutliche Hemmung der NiV-Replikation und Freisetzung beobachtet (siehe Ergebnisse Abb. 2.21). Auch in primären humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen kam es durch die CSA-Behandlung zu einer deutlichen Reduktion der NiV-Freisetzung in den Überstand und auch zur Hemmung der Virus-Replikation (siehe Ergebnisse Abb. 2.22). Die CSA-Stimulierung bewirkte auch in den HBEpC und PBEpC eine Hochregulierung von IFN- λ 2,3 bzw. IFN- λ 3 mRNA, wobei die Hochregulierung von IFN- λ 3 in den PBEpC stärker war als die IFN- λ 2,3 Induktion in den HBEpC (siehe Ergebnisse Abb. 2.23). Dies steht im Gegensatz zur NiV-induzierten IFN-Expression. Diese führte zu einer stärkeren IFN- λ 2,3-Hochregulierung in den HBEpC (siehe Ergebnisse Abb. 2.14 und 2.15), was vermuten lässt, dass CSA über andere Signalwege zur IFN- λ -Expression führt als die NiV-Infektion.

Es muss neben der Hochregulierung von IFN- λ noch weitere Faktoren geben, durch die CSA die Virusinfektion beeinflussen kann. Dies lässt sich auch aus Versuchen mit neutralisierenden IFN- λ

Antikörpern und IRF-1 siRNA schließen, mit denen die CSA-induzierte MERS-CoV-Hemmung nur partiell verhindert werden konnte (Sauerhering *et al.*, 2020). Ein möglicher Faktor, über den CSA IFN-unabhängig die Virus-Replikation hemmen könnte, ist die Beeinflussung des Cyclophilin- oder JNK/p38-Signalwegs. Die Hemmung der MAP-Kinase JNK führte zur reduzierten MERS-CoV-Freisetzung in Überständen von Calu-3-Zellen und primären humanen Alveolar-Epithelzellen (hAEC). Die Hemmung von Calcineurin, NFAT oder p38 zeigten jedoch keinen Einfluss auf die MERS-CoV-Freisetzung (Sauerhering *et al.*, 2020). In NiV-infizierten HBEpC und PBEpC müsste der Einfluss von CSA auf die verschiedenen Signalwege mittels Inhibitorstudien noch untersucht werden, um zu analysieren, ob es Unterschiede in den porcinen und humanen Bronchial-Epithelzellen gibt. Bei diesen zukünftigen Versuchen könnte analysiert werden, ob CSA in den HBEpC und PBEpC einen Einfluss auf das Virus-*Assembly* und *Budding* hat, indem es direkt mit den viralen Proteinen interagiert oder in weitere Signalwege eingreift oder zelluläre Proteine hochreguliert. Damit könnte die molekulare Grundlage der CSA-vermittelten Hemmung der NiV-Infektion genauer aufgeklärt werden und welche Rolle dabei die CSA-abhängige IFN- λ Induktion spielt.

3.8 Verwendung von porcinen *ex vivo* Lungenschnitten als Modellsystem für künftige Inhibitor-Testungen

Lungenschnitte beinhalten neben den respiratorischen Epithelzellen noch weitere Zelltypen der Atemwege, wie Immunzellen, aber auch Endothel-, Bindegewebs- und Muskelzellen, die miteinander in Wechselwirkung stehen können. Das bedeutet, Lungenschnitte stellen ein gutes *ex vivo* System dar, um die *in vivo* Situation der Lunge außerhalb von Tierversuchen untersuchen zu können. Für *in vivo* Studien konnten solche Lungenschnitte aus menschlichem Biopsie-Material oder ganze Lungen von Versuchstieren wie Hamstern, Ratten, Mäuse, Meerschweinchen, Frettchen oder Makaken gewonnen werden. Dabei konnten die Schnitte entweder per Hand mit einer Mikrotomklinge oder einem Skalpell (Placke und Fisher, 1987; Dandurand *et al.*, 1993; Kurosawa *et al.*, 1995; Nguyen *et al.*, 2013; de Vries *et al.*, 2018) oder mit einem *Tissue slicer* hergestellt werden (Martin *et al.*, 1996 und 2001; Bergner und Sanderson, 2002; Wohlsen *et al.*, 2003; Booth *et al.*, 2004; Ressmeyer *et al.*, 2006).

Viele Studien in den Lungenschnitten untersuchten Stoffwechselprozesse und deren Veränderung nach Stimulationen und Infektionen (zusammengefasst in Liberati *et al.*, 2010). Porcine Lungenschnitte, wie sie in dieser Arbeit generiert wurden, wurden auch bereits für *ex vivo* Studien verwendet (Meng *et al.*, 2013; Delgado-Ortega *et al.*, 2014). Es gibt mehrere Publikationen, in denen Lungenschnitte erfolgreich mit Viren, wie beispielsweise mit Masern-,

humanen Metapneumo-, Respiratorisches Synzytial- oder Hundestaube-Viren, Influenzaviren oder Adenoviren infiziert wurden (Booth *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2013; Delgado-Ortega *et al.*, 2014; de Vries *et al.*, 2018), was zur Idee führte, ein solches Modellsystem auch für NiV-Infektionen zu etablieren. Dies gelang in dieser Arbeit erfolgreich. Mittels lichtmikroskopischer Analyse wurde in den porcinen Schnitten (LS) die Bewegung der Zilien am Bronchuslumen nachgewiesen, was die Vitalität des Gewebes bewies (siehe Ergebnisse Abb. 2.24). Die LS konnten mit einem rekombinanten eGFP-kodierenden NiV infiziert werden und NiV-positive Bereiche am Bronchuslumen und im Lungengewebe über die GFP-Autofluoreszenz eindeutig detektiert werden (siehe Ergebnisse 2.25). Mit diesem System ist es möglich, zahlreiche Lungenschnitte von der gleichen porcinen Lunge anzufertigen und zu untersuchen. Ein Nachteil gegenüber primären respiratorischen Epithelzellkulturen ist jedoch die kurze Lebensdauer der Lungenschnitte von wenigen Tagen. Das macht die Durchführung von längeren Infektionsstudien schwierig. Durch die begrenzte Lebensfähigkeit und die fehlende Möglichkeit des Einfrierens und Aufbewahrens der Lungenschnitte, ist es zudem nicht möglich, Wiederholungs-Versuche mit Lungenschnitten aus der gleichen Lunge durchzuführen. Trotz dieser Limitierungen ist geplant, die LS in Zukunft für umfangreiche Infektions- und Inhibitorstudien (z.B. CSA) einzusetzen, um diese sowohl in primären Epithelzellen als auch in einem komplexeren *ex vivo* System untersuchen zu können. Auch für die Testung von potenziellen NiV-Lebendimpfstoffkandidaten könnten sich die Lungenschnitte eignen.

Zusammenfassend wurde in den ersten Teilen dieser Arbeit gezeigt, dass humane und porcine respiratorische Epithelzellen aus verschiedenen Lungenabschnitten (Trachea, Bronchien, *Small-Airways*) produktiv mit NiV_{Malaysia} infiziert werden konnten. Alle Atemwegszellkulturen reagierten auf die Infektion mit einer Typ-III Interferon-Antwort, allerdings unterschiedlich ausgeprägt. Beim direkten Vergleich NiV-infizierter humaner und porciner Bronchial-Epithelzellen zeigte sich eine weniger ausgeprägte IFN- λ und ISG-Antwort in den porcinen Zellen, während die Expression von proinflammatorischen Zytokinen vergleichbar war. Diese Spezies-spezifischen Unterschiede können nicht mit einer generell verminderten Fähigkeit der PBEpC erklärt werden, Interferone und ISGs hochzuregulieren, denn diese wurden bei einer Poly(I:C) Stimulierung stark induziert. Neben den Unterschieden in der Zytokinantwort zeigten sich beim Vergleich der porcinen und humanen Bronchial-Epithelzellen auch quantitative Unterschiede in der Virusfreisetzung. Diese war deutlich stärker in PBEpC, was möglicherweise auf die fehlende Hochregulierung des ISGs Tetherin zurückzuführen ist. Auf Basis der Ergebnisse dieser *in vitro* Infektionsstudien könnte man folgendes Modell für die *in vivo* beobachteten Spezies-spezifischen Unterschiede in der respiratorischen Symptomatik und der Virusausscheidung in Atemwegssekreten postulieren:

Eine NiV-Infektion der Lunge führt beim Menschen zu einer moderaten proinflammatorischen Antwort, induziert aber eine effiziente IFN-abhängige antivirale Immunantwort, die letztendlich die Virusproduktion limitiert. Im Gegensatz dazu kommt es in Schweinen bei einer NiV-Infektion der Lunge zu einer ausgeprägten inflammatorischen Antwort, aber einer geringen IFN-abhängigen Hemmung der Virusvermehrung, was die ausgeprägte respiratorische Symptomatik bei Schweinen und die produktive Virusausscheidung über Atemwegssekrete erklären könnte.

Die im vorletzten Teil dieser Arbeit durchgeführten Inhibitorversuche mit Cyclosporin A (CSA) haben erstmalig gezeigt, dass eine CSA-Behandlung der primären Bronchial-Epithelzellen beider Spezies zu einer starken Hemmung der NiV-Infektion führte. CSA und die dadurch induzierte IFN- λ Expression könnten somit ein möglicher Therapieansatz sein, um die NiV-Infektion in der Lunge zu hemmen. Dies soll zukünftig in weiteren Studien untersucht werden, wobei die im letzten Teil dieser Arbeit etablierten porcinen Lungenschnitten zum Einsatz kommen werden, mit denen nun ein komplexes primäres *ex vivo* Zellkulturmodell zur Verfügung steht, um CSA oder andere Inhibitoren zu testen.

IV Material

4.1 Materialien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2-Mercaptoethanol (β -ME)	Sigma-Aldrich
2-Propanol (Isopropanol)	Sigma-Aldrich
Agarose <i>Low Melting</i>	GERBU Biotechnik
Amphotericin B (Fungizone®)	Gibco
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V, Protease-frei	SERVA
<i>CryoSure</i> -DMSO	WAK-Chemie Medical
DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]octan)	Merck
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Enrofloxacin	Sigma-Aldrich
Essigsäure (Eisessig)	Supleco
Ethanol (EtOH), $\geq 99,8\%$, p.a.	Carl Roth
Ethidiumbromidlösung 1 %, 10 mg/ml in Wasser	Carl Roth
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco
Glycerin, $\geq 99,5\%$, p.a., wasserfrei	Carl Roth
L-Glutamin (200 mM)	Gibco
Kanamycin-Sulfat	Gibco
Kollagen I, <i>rat tail</i>	Gibco
LE Agarose	Biozym Scientific
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich
Nuklease-freies Wasser	Thermo Fisher Scientific
O'RangeRuler 50 bp DNA-Marker	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Protease XIV (aus <i>Streptomyces griseus</i>)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich

4.2 Kits

Maxima™ SYBR™ Green/ROX 2x qPCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific
Passage-Kit 4	Provitro
ReagentPack™ <i>Subculture Reagents</i>	Lonza
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen

4.3 Antikörper

4.2.1 Primärantikörper

<i>anti</i> -E-Cadherin, aus Maus	BD Bioscience
<i>anti</i> -Zytokeratin basisch, aus Maus	Acris Antibodies
<i>anti</i> -Zytokeratin sauer, aus Maus	Acris Antibodies
<i>Human</i> IL-28 R α /IFN- λ R1 Antikörper	R&D Systems
<i>Recombinant Mouse</i> EphB4 Fc Chimera	R&D Systems

4.2.2 Sekundärantikörper

AlexaFluor™ 488, <i>anti</i> -Maus IgG, aus Ziege	Invitrogen
Fluorescein (FITC)- <i>conjugated</i> AffiniPure <i>Goat Anti-Human</i> IgG	Jackson ImmunoResearch
Fluorescein (FITC)- <i>conjugated</i> AffiniPure <i>Goat Anti-Mouse</i> IgG	Jackson ImmunoResearch

4.4 Enzyme, Stimulantien, Inhibitoren

Cyclosporin A	Sigma-Aldrich
dNTP-Mix, 10 mM	Thermo Fisher Scientific
<i>High molecular weight polyinosine-polycytidylic acid</i> (Poly(I:C) HMW)	InvivoGen
Oligo(dT) ₁₈ Primer	Thermo Fisher Scientific
Protease XIV von <i>Streptomyces griseus</i>	Sigma-Aldrich
<i>Random</i> -Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific
<i>Recombinant Human</i> IFN- λ 2	Peprtech
RevertAid™ Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific GmbH

RiboLock RNase-Inhibitor	Thermo Fisher Scientific GmbH
Trypsin-EDTA (0,05 %), phenolrot	Gibco, Carlsbad
<i>Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNFα) Porcine Recombinant</i>	Prospec

4.5 Viren

rNiV _{EGFP} , Malaysia Stamm	Erik Dietzel, Dietzel <i>et al.</i> , 2015
---------------------------------------	--

4.6 Zellen

Calu-3-Zellen (humane Epithelzellen aus einem Lungenkarzinom)	Zentrale Zellkultur, Institut für Virologie, Marburg
<i>Human bronchial epithelial cells</i> (HBEpC), cryo	Provitro
<i>Human tracheal epithelial cells</i> (HTEpC), cryo	Provitro
<i>Human small airways epithelial cells</i> (HSAEpC), cryo	Provitro
porcine Bronchial-Epithelzellen (PBEpC)	selbstisoliert aus frischen, gesunden Schweinlungen vom Viehhandel und Schlachtbetrieb Klaus Wiegand, Münchhausen
porcine <i>Small-Airways</i> -Epithelzellen (PSAEpC)	selbstisoliert aus frischen, gesunden Schweinlungen vom Viehhandel und Schlachtbetrieb Klaus Wiegand, Münchhausen
porcine Tracheal-Epithelzellen (PTEpC)	selbstisoliert aus frischen, gesunden Schweinlungen vom Viehhandel und Schlachtbetrieb Klaus Wiegand, Münchhausen
Vero76-Zellen (Zellen aus der Niere der grünen Meerkatze)	Zentrale Zellkultur, Institut für Virologie, Marburg

4.7 Wachstumsmedien für eukaryotische Zellen

<i>Airway Epithelial Cell Growth Medium</i> (Ready to use)	PromoCell
BEGM™ <i>Bronchial Epithelial Cell Growth Medium BulletKit™</i>	Lonza
DMEM/F-12, GlutaMAX™ <i>Supplement</i>	Gibco
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose</i>	Gibco
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), low glucose</i>	Gibco
RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) 1640 Medium	Gibco

4.8 Oligonukleotide

Alle *forward* und *reverse* Primer für die qPCR wurden von der Firma Eurofins Genomics hergestellt (Primersequenzen siehe Methoden 5.1.4, Tabelle 5.1).

4.9 Puffer

0,02 M Essigsäure	0,17 ml Essigsäure 149,83 ml dH ₂ O - steril filtrieren
5X <i>Reaction Buffer</i> (250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT)	Thermo Fisher Scientific
Clotrimazol (Stocklösung 6 mg/ml)	0,06 g Clotrimazol in 10 ml DMSO
DNA-Probenpuffer (6x)	0,25 % Bromphenolblau 40 % Sucrose
Enrofloxacin (Stocklösung 10 mg/ml)	0,5 g Enrofloxacin in 50 ml dH ₂ O

FACS-Puffer	2 g BSA (1 %) in 200 ml PBS _{def}
Kanamycin (Stocklösung 50 mg/ml)	750 mg Kanamycin-Sulfat in 15 ml dH ₂ O - steril filtrieren
Kollagen-Lösung (1:100)	500 µl Kollagen in 50 ml 0,02 M Essigsäure
Paraformaldehyd (PFA)	4 g PFA in 100 ml DMEM bei 80 °C lösen mit 0,45 µm Filter steril-filtrieren
PBS _{def} (<i>phosphate-buffered saline</i>), pH 7,1	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ in 1 l dH ₂ O lösen
PBS ⁺⁺	0,13 g CaCl ₂ ·2H ₂ O 0,1 g MgCl ₂ ·6H ₂ O in 1 l PBS _{def}
TAE-Puffer 50x	2 M TRIS 1 M Eisessig 5 mM EDTA in 1 l dH ₂ O lösen

4.10 Mowiol

Mowiol 4-88

2,4 g Mowiol 4-88

6 g Glycerin

6 ml d H₂O

- Inkubation über Nacht (Quellen)
- + 12 ml 0,2 M TRIS-HCl (pH 8,5)
- lösen bei 50-60 °C
- Zentrifugation bei 1000 x g, 10 min
- Überstand + DABCO (10 % w/v)
- aliquotieren, lagern bei -20 °C

V Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 RNA Isolierung

Gesamt-RNA aus Zellen und Virus-haltigen Überständen wurden mit dem *RNeasy*-Mini-Kit von Qiagen isoliert und aufgereinigt. Die verwendeten Zellen (verschiedene humane und porcine Epithelzellen, Calu-3-Zellen), die auf 6-*Well*- oder 24-*Well*-Platten gewachsen waren, wurden für einige Experimente vorher behandelt (IFN- λ , Poly(I:C), CSA, siehe 5.2.4) und/oder mit rNiV_{eGFP} (siehe 5.4.2) infiziert.

Um die Gesamt-RNA aus den Zellen zu isolieren, wurde das Medium abgenommen und 600 μ l RLT mit 6 μ l β -Mercaptoethanol (β -ME, 1:100) auf den Zellrasen pipettiert. Der RLT-Puffer beinhaltet Guanidin-Thiocyanat, welches durch seine denaturierende Wirkung zur Lyse der Zellen führt und in der Probe enthaltene RNasen inaktiviert. Die Zellen wurden für 10 min bei Raumtemperatur lysiert und anschließend mit einem Zellschaber sorgfältig vom *Well* abgelöst und in ein Mikroröhrchen überführt. Zum Zelllysat wurden 600 μ l absoluter Ethanol (100 % EtOH) dazugeben und gemischt. Anschließend wurden Proben, die im BSL-4 Labor lysiert wurden, in ein neues Mikroröhrchen überführt und ausgeschleust. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C aufbewahrt.

Um NiV-RNA aus Zellkulturmedium zu gewinnen, wurden im BSL-4 Labor der Überstand der Zellen in ein Mikroröhrchen mit Schraubverschluss überführt. Um abgelöste Zellen und Zelltrümmer zu entfernen, wurden die (meisten) Überstände für 5 min bei 1800 x g zentrifugiert. In einem neuen Mikroröhrchen wurden 350 μ l RLT-Puffer, versetzt mit 3,5 μ l β -ME, vorgelegt. Dazu wurde dann 100 μ l zentrifugierter Überstand pipettiert, vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Proben wurde 250 μ l absoluter Ethanol (100 % EtOH) dazugegeben, vermischt und in ein neues Mikroröhrchen überführt, bevor die Proben aus dem BSL-4 Labor ausgeschleust werden konnte. Bis zur Aufreinigung der RNA wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

Zur RNA-Aufreinigung wurden 700 μ l der RNA-haltigen Probe auf Eis in eine Säule mit einer speziellen Kieselsäure-Membran (*RNeasy* Mini-Spin-Säule) pipettiert. Diese Kieselsäure-Membran bindet RNA, die mehr als 200 Nukleotide groß ist. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15-30 sek bei 8600 x g, wodurch die Probe durch die Säule lief und die RNA an die Membran gebunden wurde. Die Flüssigkeit wurde nach der Zentrifugation aus dem Sammelröhrchen verworfen. Bei den Zelllysat-Proben (1200 μ l) wurde in einem zweiten Schritt das restliche Lysat auf die gleiche Säule gegeben und zentrifugiert. Danach folgten drei Waschschrte: Zuerst wurden die Proben mit 700 μ l RW1 Puffer für 15-30 sek bei 8600 x g, anschließend mit 500 μ l RPE

Puffer ebenfalls für 15-30 sek bei 8600 x g und zum Schluss mit 500 µl RPE Puffer für 2 min bei 8600 x g zentrifugiert. Die Waschflüssigkeit wurde nach jedem Zentrifugationsschritt verworfen. Die Säule mit der gebundenen RNA wurde danach in ein neues Sammelröhrchen überführt und bei 13000 x g für 1 min trocken zentrifugiert. Um die RNA von der Kieselsäure-Membran zu lösen, wurden 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert und bei 8600 x g für 1 min zentrifugiert (Qiagen, *RNeasy* Mini Handbuch). Das RNA-haltige Eluat wurde auf Eis aufbewahrt, um die RNA-Konzentration (siehe 5.1.2) zu bestimmen und im Anschluss die cDNA-Synthese (siehe 5.1.3) durchzuführen.

5.1.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Mit dem NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) ist es möglich, die RNA- oder DNA-Konzentration einer Probe in einem geringen Volumen zu ermitteln.

Die RNA Konzentration wurde bei Proben aus Zelllysaten gemessen. In den Proben aus Überständen befand sich, im Gegensatz zu den Zelllysaten, ausschließlich die virale RNA, weshalb die RNA Menge für eine spektrometrische Bestimmung zu gering war.

Das Spektrometer ermittelt die Proben Konzentration durch Absorptions-Messung bei 260 nm mit der Formel:

$$c \text{ (ng/}\mu\text{l)} = \frac{\text{Absorption der Probe} \times \text{Umrechnungsfaktor} \left(\frac{\text{ng-cm}}{\mu\text{l}} \right)}{\text{Länge des Weges (cm)}}$$

Der Umrechnungsfaktor für RNA beträgt 40 ng-cm/µl und die Länge des Weges bei den Messungen des Gerätes 1 cm. Das heißt, wurde bei einer RNA-Probe eine Absorption von 6,5 gemessen, ermittelt das Gerät die Konzentration wie folgt:

$$c \text{ (ng/}\mu\text{l)} = \frac{6,5 \times 40 \frac{\text{ng-cm}}{\mu\text{l}}}{1 \text{ cm}} = 260 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

Für die Konzentrationsbestimmung wurde das Gerät auf RNA-Messung eingestellt und als Leerwert zweimal RNase-freies Wasser pipettiert. Danach wurde 1 µl Probe auf den Messpunkt des Gerätes pipettiert, die Absorption gemessen und die Konzentration vom Gerät bestimmt.

Außerdem ermittelt das Gerät die Reinheit der RNA-Probe durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm und Bestimmung des A260/280 Wertes. Der A260/A280 Wert sollte bei gereinigter RNA bei 2 liegen (Thermo Scientific NanoDrop Lite, 2012).

5.1.3 cDNA-Synthese

Damit die isolierte und aufgereinigte RNA mit quantitativer *Real-Time*-PCR (qPCR) untersucht werden konnte, musste die RNA vorher durch eine Reverse Transkriptase (RT) in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Für die nachfolgende qPCR wurden 50 ng RNA aus dem Zelllysate pro Reaktion in einem PCR-Reaktionsgefäß eingesetzt. Die berechnete RNA Menge wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 10,5 µl aufgefüllt. Dazu wurden 2 µl Oligo(dt)₁₈ Primer ([100 µM], 1:1 mit RNase-freiem Wasser verdünnt) hinzugefügt. Diese Primer bestehen aus 18 Desoxythymidinen und sind dadurch komplementär zu den poly(A)-Enden von mRNAs. Das bedeutet, durch die Oligo(dt)₁₈ Primer werden ausschließlich mRNAs umgeschrieben (<https://www.thermofisher.com>).

Die aus 100 µl Überstand gewonnene RNA wurde nicht quantifiziert. Es wurde generell 10,5 µl RNA in ein Reaktionsgefäß pipettiert und 2 µl *Random*-Hexamer Primer [100 µM] dazugegeben. Diese Primer bestehen aus einer zufälligen, sechs Nukleotide langen Sequenz und können dadurch beliebige RNA binden, weshalb durch diese Primer die gesamte RNA (wie mRNA und genomische vRNA) umgeschrieben wird (<https://www.thermofisher.com>).

Die RNA-Primer-Gemische wurden gevortext, zentrifugiert und anschließend für 5 min bei 65 °C im RegSTAR 2xThermocycler (PepLab PCR Cycler) inkubiert (*Annealing*). Darauf folgte ein 10 min Inkubationsschritt auf Eis. Anschließend wurden 7,5 µl RT-Mastermix, der für die Umschreibung der RNA in cDNA notwendige Reagenzien enthält, dazugegeben:

RT-Mastermix	Volumen/Ansatz
<i>5X Reaction Buffer</i> [250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT]	4,5 µl
<i>RevertAid Reverse Transcriptase</i> [200 U/µl]	0,5 µl
dNTP Mix [10 mM]	2 µl
<i>RiboLock RNase Inhibitor</i> [40 U/µl]	0,5 µl
Gesamt	7,5 µl

Die Ansätze (20 µl) wurden gevortext und kurz abzentrifugiert. Darauf folgte die Umschreibung der RNA in cDNA durch die Reverse Transkriptase im RegSTAR 2xThermocycler (PepLab PCR Cycler) mit folgenden Einstellungen:

Zeit	Temperatur
10 min	25 °C
60 min	42 °C
10 min	70 °C

Die cDNA konnte für längere Zeit bei 4 °C aufbewahrt werden.

5.1.4 Quantitative *Real-Time*-PCR (qPCR)

Die quantitative *SYBR-Green Real-Time*-PCR (qPCR) ermöglicht die Amplifizierung einer cDNA. Die Amplifikate werden dabei über einen DNA-interagierenden Fluoreszenzfarbstoff detektiert und quantifiziert.

Für die qPCR wurde der Maxima *SYBR-Green/ROX 2x* qPCR Mastermix von Thermo Fisher Scientific verwendet. Dieser enthält eine *Hot Start Taq* DNA-Polymerase, die erst bei hohen Temperaturen aktiviert wird. Die im Mastermix enthaltenen dNTPs werden von der Polymerase für die Vermehrung der cDNA benötigt. Der Mastermix enthält außerdem einen spezifischen Puffer aus KCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, der optimale Bedingungen für die Synthese neuer cDNA gewährleistet, und *SYBR-Green*. *SYBR-Green I* ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nach Bindung an doppelsträngige DNA ein Anregungsmaximum bei 494 nm und ein Emissionsmaximum bei 521 nm hat. Das Fluoreszenzsignal wird nach jedem Zyklus bestimmt und ist proportional zu der Menge der amplifizierten DNA. Bei dem im Mix enthaltenen ROX handelt es sich ebenfalls um einen Fluoreszenzfarbstoff, der als passive Referenz zur Normalisierung der *SYBR-Green* Fluoreszenz verwendet wird (Thermo Scientific, Maxima *SYBR-Green/ROX* qPCR Master Mix, 2011).

Für die qPCR wurden pro Reaktion 50 ng cDNA eingesetzt. Dies ist die cDNA Menge, die durch reverse Transkription von 50 ng RNA entstanden ist (siehe 5.1.3).

DNA-Mastermix	Volumen
cDNA 50 ng	
RNase-freies Wasser	Auffüllen auf 10,5 µl

Für die qPCR wurden Gen-spezifische *forward* und *reverse* Primer (Eurofins Genomics) verwendet (Tabelle 5.1).

Pro Reaktion wurden 10,5 µl DNA-Mastermix zusammen mit 14,5 µl *SYBR-Green* Mastermix in eine 96-Well-Platte (MicroAmp, Applied Biosystems) pipettiert, um auf ein Gesamtvolumen von 25 µl zu kommen.

<i>SYBR-Green</i> Mastermix	Volumen
Maxima <i>SYBR-Green</i> /ROX 2x qPCR Mastermix	14 µl
<i>Forward</i> Primer (100 pmol/µl)	0,6 µl
<i>Reverse</i> Primer (100 pmol/µl)	0,6 µl

Die Proben wurden in der Regel als Triplikate aufgetragen. Die qPCR wurde im *Real-Time*-PCR-Cycler (Step One, Applied Biosystem) wie folgt durchgeführt:

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1x
Denaturierung DNA-Doppelstrang	95 °C	15 sek	40 x
Primer Bindung an DNA	53 °C	15 sek	
Elongation und Fluoreszenz-Messung	72 °C	30 sek	
Schmelzkurvenbestimmung (in 0,3 °C Schritten)	60 - 95 °C		1x

Zum Ende der qPCR wurde eine Schmelzkurve angefertigt. Dabei wurde die Temperatur im StepOne Gerät schrittweise erhöht und somit die doppelsträngige DNA langsam denaturiert. Dadurch kommt es zur Ablösung von *SYBR-Green I* und das Fluoreszenzsignal nimmt ab. Mit der Schmelzkurve kann überprüft werden, ob in der qPCR ein einziges spezifisches DNA-Amplifikat mit einem definierten Schmelzpunkt gebildet wurde. „Unsaubere“ Schmelzkurven weisen darauf hin, dass in der qPCR unspezifische oder mehrere Produkte, wie Primerdimere, mitdetektiert wurden (Schmidt und Rothhämel, 2012; Thermo Scientific, Maxima *SYBR-Green*/ROX qPCR Master Mix, 2011).

Tab. 5.1: Verwendete humane und porcine *forward* (*for*) und *reverse* (*rev*) Primer für qPCR

Primer	Sequenz
NiV-N <i>for</i>	5'- ATCAATCGTGGTTATCTTGA -3'
NiV-N <i>rev</i>	5'- CAGCCAGTTCTGCAACTTGATC -3'
humanes Tubulin A1b <i>for</i>	5'- ACCACCCTGGAGCACTCTGA -3'
humanes Tubulin A1b <i>rev</i>	5'- GACAGATGTCATAGATGGCCTCAT -3'

humanes IFN-β for	5'- TGCCTCAAGGACAGGATGAAC -3'
humanes IFN-β rev	5'- GGAAGTCTGCAGCTGCTTA -3'
humanes IFN-λ1 for	5'- CGCCTTGGAAGAGTCACTCA -3'
humanes IFN-λ1 rev	5'-GAAGCCTCAGGTCCCAATTC -3'
humanes IFN-λ2/3 for	5'- GCCAAAGATGCCTTAGAAGAG -3'
humanes IFN-λ2/3 rev	5'- CAGAACCTTCAGCGTCAGG -3'
humanes OAS for	5'- GCCCTGGGTCAGTTGACTGG -3'
humanes OAS rev	5'- TGAAGCAGGTGGAGAAGTCCGC -3'
humanes PKR for	5'- ACACTCGTCTCTGAATCATC-3'
humanes PKR rev	5'- GAGACCATTCCATAAGCAACG-3'
humanes ISG56 for	5'- CAGCAACCATGAGTACAAAT -3'
humanes ISG56 rev	5'- AAGTGACATCTCAATTGCTC -3'
humanes Tetherin for	5'-CCGTCCTGCTCGGCTTT-3'
humanes Tetherin rev	5'-CCGCTCAGAAGTATGAGATCA-3'
humanes IL-6 for	5'- AGGGCTCTTCGGCAAATGT -3'
humanes IL-6 rev	5'- GAAGAAGGAATGCCCATTAACAAC -3'
humanes IL-8 for	5'- TTCAGAGACAGCAGAGCACACA -3'
humanes IL-8 rev	5'- TGGTTCCTCCGGTGGTTT -3'
humanes TNFα for	5'- ACCCTCTCTCCCCTGGAAAG-3'
humanes TNFα rev	5'- CTGCCACGATCAGGAAGGAG-3'
porcines Tubulin A1b for	5'- CTGAACCGCCTTATTAGCCAAA -3'
porcines Tubulin A1b rev	5'- CGTTCAGGGCCCCATCA -3'
porcines IFN-β for	5'- GCTAACAAGTGCATCCTCCAAA -3'
porcines IFN-β rev	5'- AAGCACATCATAGCTCATGGAAAG -3'
porcines IFN-λ1 for	5'- ACTGTGATGCTGGACTTGGC -3'
porcines IFN-λ1 rev	5'- TGCAGCTCCAGTTCTTCAGT -3'
porcines IFN-λ3 for	5'- AAGAGGGCCAAGGATGCCTTTGAA -3'
porcines IFN-λ3 rev	5'- AGGCGGAAGAGGTTGAACATGACA -3'
porcines OAS for	5'- GAGCTGCAGCGAGACTTCCT -3'
porcines OAS rev	5'- TGCTTGACAAGGCGGATGA -3'
porcines PKR for	5'-AAAGCGGACAAGTCGAAAGG-3'
porcines PKR rev	5'-TCCACTTCATTTCCATAGTCTTCTGA-3'

porcines ISG56 for	5'- TCAGAGGTGAGAAGGCTGGT -3'
porcines ISG56 rev	5'- GCTTCCTGCAAGTGTCTTC -3'
porcines Tetherin for	5'- AAGGAGCTTCAGGGAGAGATCAAG-3'
porcines Tetherin rev	5'- TTCTCCTGAACGCCTTCCTTAGTC-3'
porcines IL-6 for	5'- TGTCGAGGCTGTGCAGATTAGT -3'
porcines IL-6 rev	5'- GGTGGCTTTGTCTGGATTCTTT -3'
porcines IL-8 for	5'- CCGTGTCAACATGACTTCCAA -3'
porcines IL-8 rev	5'- GCCTCACAGAGAGCTGCAGAA -3'
porcines TNFα for	5'- CAAGGACTCAGATCATCGTCTCA-3'
porcines TNFα rev	5'- CGGCTTTGACATTGGCTACA-3'

5.1.5 Auswertung der qPCR

Die qPCR wurde mit der StepOne Software für *Real Time* PCR Systeme von Applied Biosystem ausgewertet. Dabei erfolgt die Analyse über den *cycle threshold*- (ct) Wert, der angibt ab welchem PCR-Zyklus das Fluoreszenzsignal spezifisch den Schwellenwert übersteigt. Je niedriger der ct-Wert ist, desto größere Mengen an cDNA des untersuchten Zielgens war in der Probe (Thermo Fisher Scientific, *Real-time PCR: understanding C_t*).

Aus der cDNA der Zelllysate wurde neben der spezifischen qPCR aus der gleichen Probe als Kontrolle Tubulin A1b (α -Tubulin) bestimmt („*housekeeping gene*“). Darauf wurden die ct-Werte des spezifischen Amplifikats normalisiert. Nur so können die cDNA (RNA) Mengen aus verschiedenen Zelllysaten verglichen werden.

$$\Delta ct = ct_{\text{Probe}} - ct_{\text{Tubulin}}$$

$2^{-\Delta ct}$ = spezifische Expression relativ zu Tubulin

Die Menge viraler RNA in NiV-Zelllysaten, als Maßstab für die intrazelluläre Virusreplikation, wurde über eine NiV-N qPCR bestimmt und als $2^{-\Delta ct}$ dargestellt. Die Menge an NiV-RNA in Zellkulturüberständen wurde ebenfalls über eine qPCR bestimmt. Hier wurden mittels der ct-Werte und einer Standardkurve (siehe 5.1.6) die NiV-N Kopien/ml bestimmt.

Um die Hochregulierung von mRNAs spezifischer zellulärer Gene, wie z.B. IFN- λ , zu untersuchen, wurden die auf Tubulin-normalisierten ct-Werte (Δct) auf die Tubulin-normalisierten Werte einer Mock-Probe bezogen. Dadurch konnte die Hochregulierung einer mRNA im Vergleich zu Mock berechnet werden. Diese Berechnung wird *fold change over mock* oder $2^{-\Delta \Delta ct}$ Methode genannt (Livak und Schmittgen, 2001).

$$\Delta\Delta\text{ct} = \Delta\text{ct}_{\text{Probe}} - \Delta\text{ct}_{\text{Mock}}$$

$$2^{-\Delta\Delta\text{ct}} = x\text{-fache Erhöhung über Mock}$$

5.1.6 Erstellung einer Standardkurve zur Quantifizierung von NiV-N RNA im Überstand infizierter Zellen

Um aus den ct-Werten einer NiV-N qPCR aus 100 μl Zellkulturüberstand die NiV-N Kopien/ml zu berechnen, wurde eine NiV-N Standardkurve etabliert. Hierbei wurde eine Verdünnungsreihe eines NiV-N Plasmides erstellt, die definierte Mengen von NiV-N Kopien/ μl enthält.

Diese wird wie folgt berechnet:

$$\text{NiV-N} \frac{\text{Moleküle}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{Konzentration NiV-N Plasmid} \left(\frac{\text{g}}{\mu\text{l}}\right) \times \text{Avogadro-Zahl} \left(\frac{\text{Moleküle}}{\text{mol}}\right)}{\text{molare Masse Basenpaar} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) \times \text{Plasmidlänge (Basenpaare)}}$$

Die Avogadro-Zahl = $6,022 \times 10^{23}$ gibt an, wie viele Moleküle in einem mol enthalten sind. Die molare Masse für ein Basenpaar eines doppelsträngigen Templates beträgt 660 g/mol (Adams, 2007).

Für die NiV-N Standardkurve in dieser Arbeit wurde ein pCG-NiV-N Plasmid verwendet, das eine DNA-Konzentration von $5,3 \times 10^{-7}$ g/ μl und eine Plasmidlänge von 6097 Basenpaaren hatte. Dementsprechend ergeben sich:

$$\frac{5,3 \times 10^{-7} \frac{\text{g}}{\mu\text{l}} \times 6,022 \times 10^{23} \frac{\text{Moleküle}}{\text{mol}}}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 6097} = 7,9 \times 10^{10} \frac{\text{Moleküle}}{\mu\text{l}} = 7,9 \times 10^{10} \frac{\text{Kopien}}{\mu\text{l}}$$

Aus der pCG-NiV-N DNA wurden Verdünnungsreihen bis 1 (10^0) Kopie/ μl in RNase-freiem Wasser angesetzt. Die Verdünnungen mit den Konzentrationen 10^7 bis 1 Kopie/ μl wurden in der qPCR für die Standardkurve in Triplikaten eingesetzt. Die Verdünnungen (10,5 μl) wurden mit 14,5 μl SYBR-Green Mastermix und den NiV-N *forward* und *reverse* Primer in die 96-Well-Platte pipettiert. Die qPCR (siehe 5.1.4) erfolgte im *Real-Time-PCR-Cycler* (Step One, Applied Biosystem), wobei das Gerät auf *Quantitation Relative Standard Curve* und die Proben auf „Standard“ eingestellt und für jede Verdünnung die entsprechende Kopienzahl/ μl eingegeben wurde. Nach der qPCR wurde die Effizienz der Standard-PCR, die ungefähr bei 90-110 % liegen sollte (*Slope*-Wert von -3,1 bis -3,6) überprüft. Der R^2 Wert ist eine Korrelations-Größe und sollte

bei etwa 1 liegen (Thermo Fisher Scientific, *Important Parameters of Quantitative PCR (qPCR) Analysis*; Thermo Fisher Scientific, *Real-time PCR: understanding C_t*).

Mit den ct-Werten der pCG-NiV-N Verdünnungen wurde eine halblogarithmische Standardkurve mit Trendlinie erstellt (Abb. 5.1). Die Trendlinie zeigt die Annäherung der Punkte (ct-Werte der Verdünnungen) und wird von Excel über folgende Formel berechnet:

$$y = a \ln(x) + b \quad \text{bzw.} \quad x = e^{\frac{(y-b)}{a}}$$

y = ct-Wert

x = Kopien/μl

a = Steigung

b = Schnittpunkt mit der y-Achse

ln = natürlicher Logarithmus

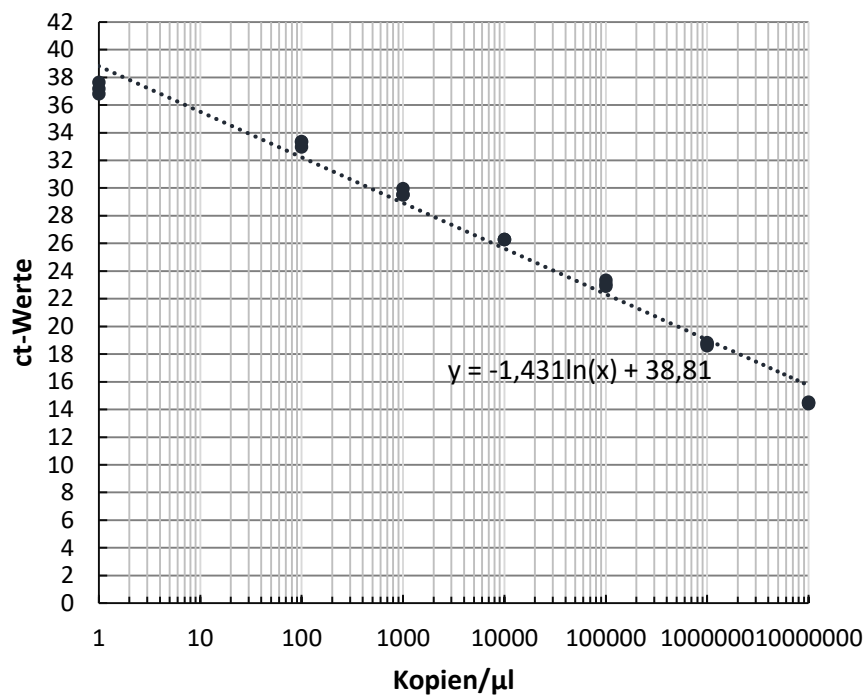


Abb. 5.1: NiV-N Standardkurve.

Die pCG-NiV-N Verdünnungen von 10^7 bis 10^0 Kopien/μl (außer 10^1) wurden in einer qPCR in Triplikaten eingesetzt. Effizienz: 101 %, Slope: -3,3 und R^2 : 0,98. Im Diagramm ist die halblogarithmische Auftragung der ct-Werte gegen die Kopien/μl mit Trendlinie und Formel dargestellt.

Um die ct-Werte einer NiV-N qPCR aus Zellkulturüberständen in Kopienzahl/μl umzurechnen wurde folgende Formel verwendet:

$$x = e^{\frac{(y-b)}{a}}$$

Beispiel: Zellkulturüberstandsprobe mit einem ct-Wert von 20 für NiV-N entspricht

$$x = e^{\frac{(ct\text{-Wert}-b)}{a}} = e^{\frac{(20-38,81)}{-1,431}} = 511270,5 \text{ Kopien/}\mu\text{l}$$

Die Berechnung der Kopienzahl/ml erfolgte dann nach der Formel:

$$\frac{\text{Kopienzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Kopienzahl}}{\mu\text{l}} \times \frac{\text{Elutionsvolumen } (\mu\text{l})}{\text{Probenvolumen (ml)}} \times \text{Kehrwert der Verdünnung bei der cDNA Synthese}$$

Das Probenvolumen waren 100 μl Zellkulturüberstand. Nach der RNA-Isolierung wurde die RNA in 50 μl RNase-freiem Wasser aufgenommen (Elutionsvolumen). Für die cDNA-Synthese wurden 10,5 μl RNA mit 2 μl Primer und 7,5 μl Mastermix gemischt (Verdünnung bei der cDNA-Synthese 1:2):

$$\frac{\text{Kopienzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Kopienzahl}}{\mu\text{l}} \times \frac{50 \mu\text{l}}{0,1 \text{ ml}} \times 2$$

Für das oben genannte Beispiel heißt das:

$$\frac{511270,5 \text{ Kopien}}{\mu\text{l}} \times \frac{50 \mu\text{l}}{0,1 \text{ ml}} \times 2 = 5,1 \times 10^8 \text{ Kopien/ml.}$$

5.1.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Nach der qPCR wurden die DNA-Proben im Agarosegel aufgetrennt. Wenn die verwendeten Primer nicht spezifisch sind, können sie auch an andere Sequenzen als die Zielsequenz binden. Damit entstehen „falsche“ PCR-Produkte, die dann zu unspezifischen *SYBR-Green* Signalen in der qPCR führen. Durch die Auftrennung im Agarosegel ist es möglich zu analysieren, welche und wieviele PCR-Produkte entstanden sind.

Für die Herstellung des Gels wurden 1 g Agarose mit 100 ml TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer) angesetzt und erwärmt, bis sich die Agarose auflöste. Nachdem die Agarose-Lösung abgekühlt war, wurde 3 μl des DNA-interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid Stocklösung (10 mg/ml) mit dazu pipettiert und in eine Gelkammer-Vorrichtung mit Kamm luftblasenfrei gegossen. Während das Agarosegel aushärtete, wurden 10 μl Probe aus der qPCR 96-Well-Platte in eine v-förmige 96-Well-Platte überführt und mit 2 μl 6xProbenpuffer versetzt.

Das Agarosegel wurde in eine Bio-Rad Kammer mit TAE-Puffer überführt, der Kamm entfernt und die Proben in die Geltaschen aufgetragen. Um die Größe der Gelbanden später bestimmen zu können, wurde als Standard ein DNA-Marker (z.B. *O'RangeRuler* 50 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Die Gelkammer wurde an eine Biorad-Stromquelle bei 100 V angeschlossen. Dadurch konnte die Proben-DNA aufgrund ihrer negativen Phosphatgruppen durch die Poren des Agarosegels von der Kathode zur Anode wandern und wurde aufgrund unterschiedlicher Laufgeschwindigkeiten nach ihrer Größe aufgetrennt. Das im Gel enthaltene

Ethidiumbromid lagert sich in der Proben-DNA ein (Dechert, 2012). Die DNA-Banden wurden am Bio-Rad GelDoc unter UV-Licht sichtbar gemacht und digital aufgenommen (Abb. 5.2).

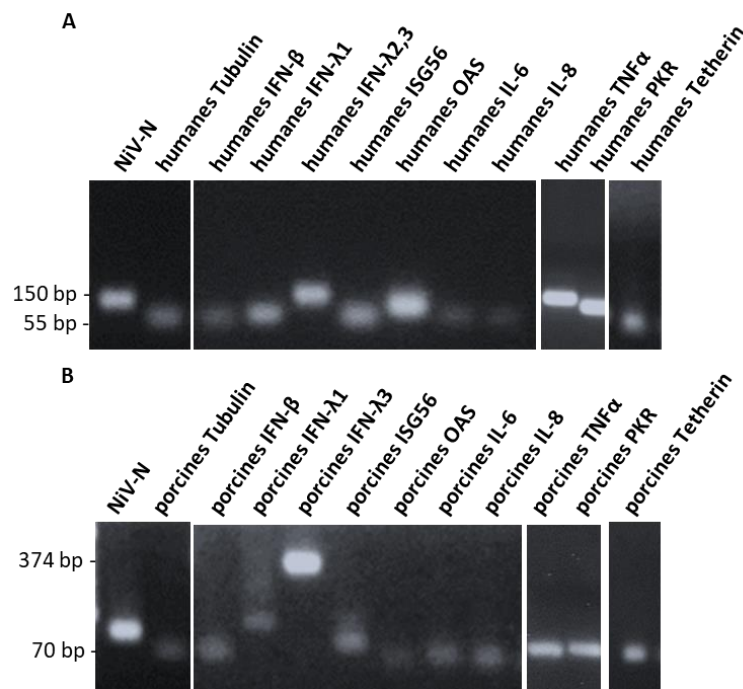


Abb. 5.2: Spezifität der humanen und porcinen qPCR Primer.

Nach einer qPCR mit spezifischen (A) humanen und (B) porcinen Primern (siehe 5.1.4) wurden 10 µl der Probe mit 2 µl 6xPP versetzt und auf einem 1 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt.

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Zellkultur permanenter Zelllinien

Für diese Arbeit wurden Vero76-Zellen (Zellen aus der Niere der grünen Meerkatze) und Calu-3-Zellen (humane Epithelzellen aus einem Lungenkarzinom) verwendet. Diese Zellen wurden steril unter der Lamina Flow (Heraeus) passagiert, behandelt oder infiziert.

Die Vero76-Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen (T75) wurden für Virustitrationen (TCID₅₀ Bestimmungen) auf 96-Well-Platten ausgesät (siehe 5.4.1). Dafür wurden die Zellen, nachdem sie einmal mit PBS_{def} (*phosphate buffered saline, deficient*) gewaschen wurden, mit 1 ml Trypsin/EDTA (0,05 %, Gibco) von dem Flaschenboden bei 37 °C abgelöst und vereinzelt. Die Zellen wurden in 14 ml *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), mit zugesetztem 2 % FCS, 4 mM L-Glutamin (Gibco), 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (Gibco), suspendiert. Für das Aussäen der Zellen auf 96-Well-Platten wurde die Zellsuspension mit DMEM Medium in einer Zellkultur-Glasflasche vermischt und anschließend mit einer Mehrkanalpipette ausgesät:

	pro 96-Well-Platte	Volumen pro Well
TCID₅₀ in 5er Verdünnungsschritten	1 ml Zellsuspension + 13 ml DMEM (2 % FCS)	128 µl
TCID₅₀ in 10er Verdünnungsschritten	1 ml Zellsuspension + 18 ml DMEM (2 % FCS)	180 µl

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und am nächsten Tag für die Virustitration (siehe 5.4.1) verwendet.

Die Calu-3-Zellen wurden für Cyclosporin-A (CSA) Behandlungen und NiV-Infektionen verwendet (siehe 5.2.4.3 und 5.4.2). Diese Zellen wurden mit dem Medium DMEM/F-12 GlutaMAX mit 10 % FCS, 4 mM L-Glutamin (Gibco), 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (Gibco) kultiviert. Die Calu-3-Zellen wurden ebenfalls von einer 75 cm² Zellkulturflaschen (T75) mit 1 ml Trypsin/EDTA (0,05 %, Gibco) gelöst, nachdem sie einmal mit PBS_{def} gewaschen wurden. Die Zellen einer T75-Flasche wurden in 11 ml DMEM/F-12 GlutaMAX aufgenommen und auf einer 6-Well-Platte ausgesät (2 ml/Well). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

5.2.2 Zellkultur primärer Zellen

5.2.2.1 Isolierung von porcinen Tracheal-, Bronchial- und *Small-Airways*-Epithelzellen

Permanente immortalisierte Zellkulturen können veränderte Geno- und Phänotypen aufweisen. Um die NiV-Infektion in möglichst natürlichen humanen und porcinen respiratorischen Epithelzellen untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit primäre humane und porcine Epithelzellen verwendet. Die humanen Tracheal- (HTEpC), Bronchial- (HBEpC) und *Small-Airways*- (HSAEpC) Epithelzellen wurden von der Firma Provitro erworben.

Die primären porcinen Tracheal- (PTEpC), Bronchial- (PBEpC) und *Small-Airways*- (PSAepC) Epithelzellen wurden aus den Atemwegen von frischen, gesunden Schweinlungen vom Viehhandel und Schlachtbetrieb Klaus Wiegand, Münchenhausen, isoliert (Abb.5.4 [A]). Die Isolierung erfolgte nach dem Protokoll von Lucie Sauerhering (Sauerhering, 2014). Die Isolierung wurde für die Epithelzellen aus den verschiedenen Lungenabschnitte gleich durchgeführt. Die Effizienz der Zellisolierung hing stark von der „Frische“ der Schweinelunge ab. Je länger eine Lunge nach der Schlachtung aufbewahrt wurde, umso geringer war die Zellausbeute.

Aus der Lunge wurden so schnell wie möglich die Trachea für PTEpC, die Hauptbronchien für PBEpC und die tiefer gelegenen Lungenabschnitten (mit Segmentbronchien und Bronchiolen) für PSAepC (Abb. 5.3) vom umliegenden Lungengewebe mit einem Skalpell grob befreit.

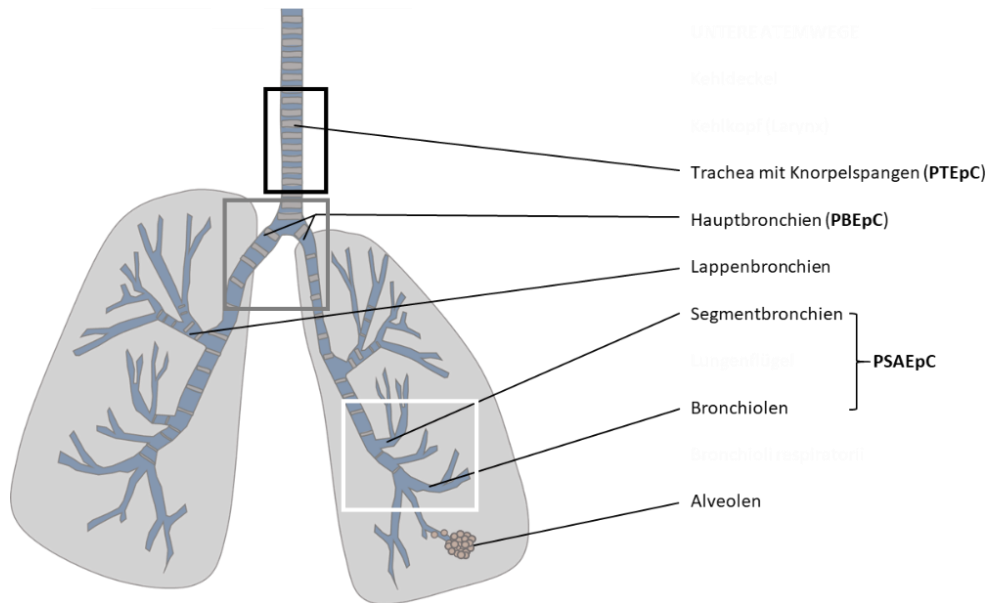


Abb. 5.3: Grobe Skizzierung, aus welchen Abschnitten die Tracheal- (PTEpC), Bronchial- (PBEpC) und Small-Airways- (PSAEpC) Epithelzellen isoliert wurden.

Anschließend wurden die Lungenstücke sorgfältig von Muskel- und Bindegewebe unter sterilen Bedingungen in der Lamina-Flow frei präpariert (Abb.5.4 [B] und [C], exemplarisch für Bronchien). Die größeren Lungenabschnitte (Trachea und Bronchien) wurden in kleinere Segmente von etwa 2-4 cm zerteilt und mit PBS_{def} gewaschen. Diese Segmente wurden in abgedeckten Bechergläsern mit Isolierungsmedium für 24 h bei 4 °C inkubiert, um die Mukus-Schicht aus den Atemwegen durch das im Medium enthaltene DL-Dithiothreitol (DTT) zu entfernen.

Isolierungsmedium

Low-glucose (1.0 g/l) DMEM (500 ml, Gibco) mit 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin

- 2.5 µg/ml Amphotericin B/Fungizone
- 100 µg/ml Kanamycin in H₂O
- 10 µg/ml Enrofloxacin in H₂O
- 1 µg/ml Clotrimazol in DMSO
- 0,5 mg/ml DL-Dithiothreitol

Die Lungenabschnitte wurden anschließend in neue Bechergläser, die Isolierungsmedium mit 1 mg/ml Protease XIV (aus *Streptomyces griseus*) enthielten, überführt und für 36 h bei 4 °C inkubiert (Abb.5.4 [D]). Danach erfolgte wieder ein Waschschrift mit PBS_{def}. Die einzelnen Lungenstücke wurden in einer Petrischale mit einem Skalpell longitudinal geöffnet. Die innenliegenden Epithelzellen wurde dann vorsichtig in die Petrischale abgekratzt, in PBS_{def}

aufgenommen und in ein Zellkulturröhrchen überführt (Abb.5.4 [E] und [F]). Nachdem die Petrischalen und das Skalpell einmal mit PBS_{def} gewaschen und dieses ebenfalls in das Zellkulturröhrchen überführt wurde, erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 250 x g für 10 min. Das Zellpellet wurde in speziellem Kultivierungsmedium (AEGM) suspendiert. Um ungelöste Zellstücke zu entfernen wurde die Suspension durch eine sterile Gaze (Siebgewebe Polyester Monolen, Maschenweite 250 µm, Neolab) filtriert.

Kultivierungsmedium

Airway Epithelial Cell Growth Medium (AEGM, *Ready to use*, Promocell) mit

Supplement-Mix

(BPE, EGF, Insulin, Hydrokortison, Epinephrin, Triiodo-L-Thyronin, Transferrin, Retinolsäure)

4 mM L-Glutamin

50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin

2.5 µg/ml Amphotericin B/Fungizone

100 µg/ml Kanamycin in H₂O

Die Zellsuspension, die aus einer Trachea oder den Bronchien einer Schweinelunge stammten, wurden auf je vier 25 cm² Kollagen-beschichteten Costar-Flaschen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellsuspension, die aus den *Small-Airways* einer Schweinelunge gewonnen wurde, wurde nur auf zwei Kollagen-beschichteten T25-Flaschen, aufgrund der geringeren Zellzahl, ausgesät. Das AEGM Medium wurde einen Tag später und danach alle zwei Tage gewechselt, bis die Zellen passagiert werden konnten.

5.2.2.2 Kollagenbeschichtung

Vor Aussäen und Passage der primären porcinen Epithelzellen wurden die Costar-Kulturmateriale (T25 und T75 Flaschen, 6-*Well*- oder 24-*Well*-Platten, 12-*Transwell*-Filter) mit Kollagen-Typ-I (aus dem Rattenschwanz, 1:100 verdünnt in 0,2 M steril gefilterter Essigsäure) beschichtet. Nach Kollagen-Zugabe wurden die geöffneten Flaschen und Platten zunächst unter der Lamina Flow für 60 min mit UV-Licht sterilisiert. Danach wurden die Flaschen/Platten für 1-2 h bei 37 °C oder ü.N. bei 4 °C (eingepackt in einem sterilen Plastikbeutel) inkubiert. Vor der Verwendung wurden die Flaschen zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen.

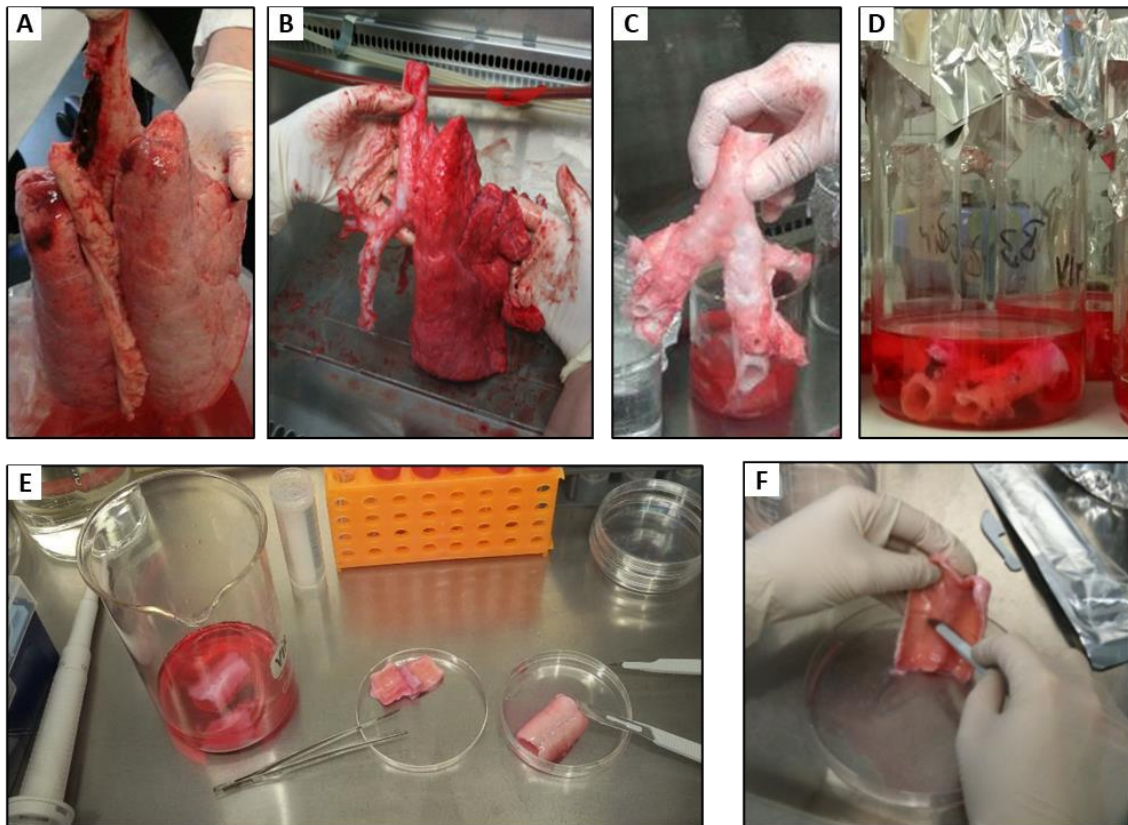


Abb. 5.4: Isolierung von porcinen Atemwegsepithelzellen aus Bronchien.

5.2.2.3 Charakterisierung der isolierten porcinen Tracheal-, Bronchial- und *Small-Airways*-Epithelzellen

Die isolierten porcinen Epithelzellen wurden vor der weiteren Verwendung hinsichtlich ihres Epithelzellcharakters und -Verhaltens analysiert. Dafür wurden die porcinen Epithelzellen auf *Transwell*-Filtern ausgesät (siehe 5.2.2.4). Die *Transwell*-Filter erlauben eine Versorgung der Zellen mit Medium von apikal und basal. Die Epithelzellen wachsen dadurch polar und bilden Zell-Zell-Kontakte wie *Tight junctions* und *Adherens junctions* (E-Cadherin) aus. E-Cadherin und das Epithelzell-spezifische Intermediärfilament Zytokeratin wurden als Marker für die Epithelzellcharakterisierung verwendet (Dongre und Weinberg, 2019) und in den porcinen Epithelzellen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dafür wurden die Zellen kultiviert bis zur 100 % Konfluenz. Der *Transwell*-Filter wurde dann mit einem Skalpell von der Halterung gelöst und in ein *24-Well* überführt. Zwischen jedem Inkubationsschritt erfolgte dreimal ein Waschschrift mit PBS⁺⁺. Die Fixierung erfolgte mit 4 % PFA für 15 min bei RT. Die Permeabilisierung wurde mit 0,2 % Triton X-100 für 30 min bei 37 °C durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Absättigung mit 2 % BSA/PBS⁺⁺ für 1 h, RT. Die Zellen auf den *Transwell*-Filtern wurden mit Primärantikörpern (in 0,35 % BSA/PBS⁺⁺) gegen Zytokeratine (saure und basische Zytokeratine 1:1, aus Maus, je 1:10) oder gegen E-Cadherin (aus Maus, 1:50) für 2 h bei 4 °C

inkubiert. Dafür wurden 40 μl Antikörper auf einen Parafilm pipettiert, darauf der Filter mit der basalen Zellseite gelegt und anschließend 60 μl Antikörper apikal dazupipettiert. Danach wurden die Filter zurück in die 24-Well-Platten überführt und gewaschen. Die Färbung mit AlexaFluor-Sekundärantikörper 488, anti-Maus (in 0,35 % BSA/PBS⁺⁺, 1:250), zusammen mit dem Zellkernmarker DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, 1:10.000) wurde für 2 h bei 4 °C durchgeführt. Die Filter wurden mit Mowiol unter einem Deckglas eingedeckelt und am Konfokalen Laserscanning Mikroskops (Leica TCS SP5 II) analysiert (Abb. 5.5 [A]).

Für respiratorische Epithelzellen ist beschrieben, dass eine TNF α Stimulierung zur Hochregulierung von ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) führt (u.a. Tosi *et al.*, 1992, Rosseau *et al.*, 2000). Deshalb wurde das Epithelzell-Verhalten analysiert, indem die isolierten Zellen auf 6-Well-Platten kultiviert wurden und mit porcinen TNF α (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Prospec) für 1 h und 24 h stimuliert wurden. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, eine cDNA-Synthese mit *Random*-Hexamer Primern und eine qPCR mit spezifischen porcinen ICAM-1 Primern durchgeführt (Abb. 5.5 [B]; siehe 5.1.1 bis 5.1.5; Elvert, 2014).

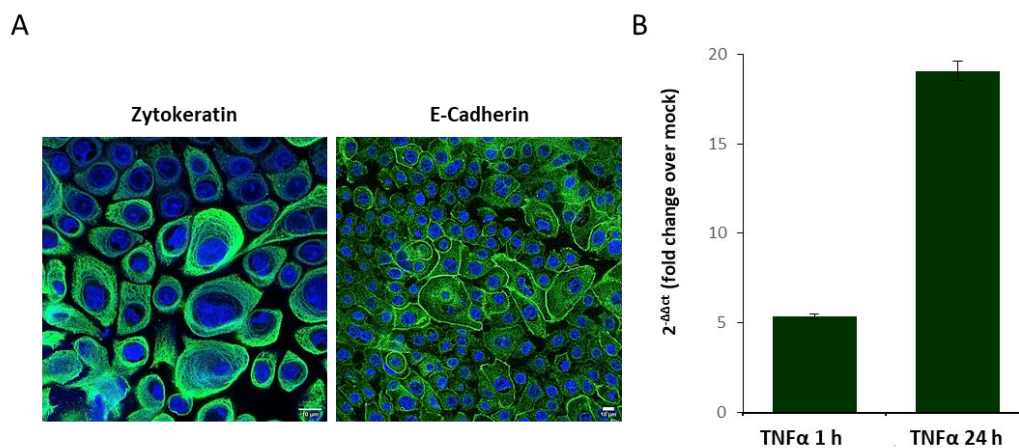


Abb. 5.5: Charakterisierung von isolierten Epithelzellen, am Beispiel der primären porcinen Bronchial-Epithelzellen (PBEpC).

(A) Immunfluoreszenz von Epithelzellmarkern in auf Transwell-Filtern gewachsenen PBEpC. Die Zellen wurden mit 4 % PFA fixiert und mit 0,2 % Triton-X-100 permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit Primärantikörpern gegen Zytokeratin (saure und basische, aus Maus, 1:10) und E-Cadherin (aus Maus, 1:50). Die Zellen wurden mit AlexaFluor-Sekundärantikörper 488 (anti-Maus, 1:250) und DAPI (1:10.000) für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Filter wurden mit Mowiol eingedeckelt und die Auswertung erfolgte am Konfokalen Laserscanning Mikroskops (Leica TCS SP5 II).

(B) ICAM-1 Induktion. PBEpC auf 6-Well-Platten wurden für 1 h und 24 h mit porcinem TNF α (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert. Zelluläre Gesamt-RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und porcines ICAM-1 in der qPCR analysiert. Der 2^{-ΔΔct}-Wert (x-fache Erhöhung über Mock) ist im Diagramm aufgetragen.

5.2.2.4 Passagieren von primären Zellen

Die primären humanen und porcinen Epithelzellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90 % mit dem Passage-Kit 4 und dessen Protokoll (Provitro) passagiert. Die Zellen wurden dafür einmal mit 0,2 ml/cm² PBS gewaschen und mit 0,1 ml/cm² *Detachment Solution* bei 37 °C und 5 % CO₂ abgelöst. Die humanen Epithelzellen lösten sich nach etwa 5 min schneller als die porcinen Epithelzellen, die etwa 10-15 min benötigten. Die abgelösten Zellen wurden in ein Zellkulturröhrchen überführt und die Zellkulturflasche oder -*Wells* einmal mit AEGM nachgespült. Die Zellsuspension wurde bei 250 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 1 ml AEGM resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend auf verschiedenen Costar-Kulturmaterialeien (T25 und T75 Flaschen, 6-*Well*- oder 24-*Well*-Platten, 12-*Transwell*-Filter) ausgesät, in die verschiedene Mengen AEGM vorgelegt wurden (siehe Tabelle unten). Für die porcinen Epithelzellen wurden die Zellkulturmaterialien vorher Kollagen-beschichtet (siehe 5.2.2.2). Die humanen Epithelzellen konnten auch ohne Kollagenbeschichtung wachsen.

	Volumen AEGM
25 cm ² Zellkulturflasche	5 ml
75 cm ² Zellkulturflasche	15 ml
6- <i>Well</i> (9,5 cm ²)	2 ml
24- <i>Well</i> (1,9 cm ²)	1 ml
12- <i>Transwell</i> -Filter (1,12 cm ²)	500 µl apikal 1000 µl basal

Die frisch ausgesäten Zellkulturen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, wobei das AEGM Medium am ersten Tag und anschließend alle zwei Tage durch frisches Medium ersetzt wurde.

5.2.2.5 Einfrieren und Auftauen von primären Zellen

Die mit dem Passage-Kit 4 abgelösten primären Epithelzellen konnten zur längeren Aufbewahrung auch eingefroren werden. Dafür wurden die Zellen einer T25 Flasche abgelöst, zentrifugiert, in 1 ml AEGM suspendiert und in ein Cryo-Röhrchen (mit 150 µl Glycerin) pipettiert. Die Zellen einer T75 Flasche wurden in 2 ml AEGM resuspendiert und je 1 ml/Cryoröhrchen eingefroren. Die Cryo-Röhrchen mit den Zellen wurden in einem Isopropanol-Einfrierbehälter bei -80 °C eingefroren. Durch das Isopropanol wird die Zellsuspension langsam mit etwa -1 °C pro Minute heruntergekühlt, was verhindert, dass die Zellen beim Einfrieren

beschädigt werden. Die eingefrorenen Zellen werden nach 24 bis 48 h in die gasförmige Phase des Stickstofftanks überführt und konnten dort dauerhaft gelagert werden.

Bei Bedarf wurden die in Stickstoff-gelagerten Zellen aufgetaut, indem die Cryo-Röhrchen möglichst schnell bei 37 °C im Wasserbad schwenkend fast vollständig aufgetaut wurden. Die Cryo-Röhrchen wurden anschließend unter der Lamina Flow geöffnet, dann wurden 500 µl AEGM dazugegeben und die Zellsuspension vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension (ca. 1,5 ml) wurde in ein Zellkulturröhrchen überführt und das Cryo-Röhrchen zweimal mit 1 ml AEGM gewaschen, um die restlichen Zellen ebenfalls in das Zellkulturröhrchen zu überführen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 250 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem 1-2 ml AEGM Medium aufgenommen. Die Zellsuspension konnte dann auf Zellkulturflaschen (T25 oder T75) mit vorgelegtem AEGM ausgesät werden, die für die porcinen Zellen vorher mit Kollagen beschichtet wurden (siehe 5.2.2.2). Das Medium wurde am nächsten Tag und anschließend alle zwei Tage gewechselt.

5.2.3 Zellzahlbestimmung

Um die Infektionsdosis pro Zelle zu berechnen (*Multiplicity of Infection* [MOI]) muss die Zellzahl einer Zellkultur bekannt sein. Deshalb wurde die Zellzahl der primären porcinen und humanen Epithelzellen in einem 6- oder 24-Well bestimmt. Hierfür wurden die Zellen mit dem Passage-Kit 4 abgelöst und zentrifugiert, wie unter 5.2.2.4 beschrieben. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml AEGM resuspendiert. In die Neubauer-Zählkammer wurden 8 µl Zellsuspension pipettiert und am Mikroskop die lebenden Zellen in vier Großquadraten gezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Gesamtzellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Mittelwert Zellen von 4 Großquadraten} \times 10000 \text{ (Kammerfaktor)} = \text{Zellzahl/ml}$$

$$\text{Zellzahl/ml} \times \text{Volumen der Zellsuspension (ml)} = \text{Gesamtzellzahl pro 6- oder 24-Well}$$

5.2.4 Behandlung der Zellen mit Zytokinen und Inhibitoren

5.2.4.1 Behandlung der Zellen mit IFN-λ

Die primären humanen Bronchial- (HBEpC) und *Small-Airways*- (HSAEpC) Epithelzellen wurden mit Typ-III Interferon (IFN-λ) stimuliert, um die IFN-Sensitivität der Epithelzellen zu untersuchen. Dafür wurden die humanen Epithelzellen auf 6-Well-Platten ausgesät. Nachdem sie konfluent gewachsen waren, wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden mit verschiedenen

Konzentrationen humanem IFN- λ 2 (Peprotech) für 16,5 h bei 37 °C stimuliert. Anschließend wurde aus den Zellen die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR durchgeführt (siehe 5.1.1 bis 5.1.5).

5.2.4.2 Behandlung der Zellen mit Poly(I:C)

Die primären Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC) wurden mit Poly(I:C) (*polyinosine-polycytidylic acid*) stimuliert. Poly(I:C) ist eine synthetisch hergestellte dsRNA, die an den TLR3 Rezeptor binden kann und damit die nachgeschalteten Signalkaskaden aktivieren und Zytokine hochregulieren kann (siehe Einleitung 1.3.1).

Für die Stimulierung wurden die auf 6-Well-Platten gewachsene HBEpC und PBEpC nach einem Mediumwechsel mit 2 ml frischem AEGM inkubiert, das Poly(I:C) HMW (*High molecular weight*, InvivoGen) enthielt. Nach 24 h erfolgte die RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und qPCR mit verschiedenen Zytokin-spezifischen Primern (siehe 5.1.1 bis 5.1.5).

5.2.4.3 Behandlung der Zellen mit CSA

Bei Cyclosporin A (CSA) handelt es sich um ein zyklisches Peptid aus Pilzen (Borel *et al.*, 1976), das zahlreiche Viren hemmen kann, wie HIV-1 (Franke und Luban, 1996), Coronaviren (de Wilde *et al.*, 2011; de Wilde *et al.*, 2013; Sauerhering *et al.*, 2020) und Influenza-A-Viren (Liu *et al.*, 2012).

Um den Einfluss von CSA auf die NiV-Infektion zu untersuchen, wurden Zellen auf 6-Well (Calu-3) oder 24-Well (HBEpC, PBEpC) mit rNiV_{eGFP} infiziert (siehe 5.4.2). 1 h nach der Infektion wurden die Zellrasen viermal gewaschen und neues DMEM/F-12 GlutaMAX/2 % FCS (2 ml, Calu3) oder AEGM (1 ml, HBEpC, PBEpC) zu den Zellen pipettiert. Zum Medium wurden 10 μ M CSA (Sigma-Aldrich, gelöst in DMSO) oder als Kontrolle die entsprechende Menge DMSO (1,33 μ l bei Calu-3-Zellen auf 6-Well, 0,67 μ l bei HBEpC/PBEpC auf 24-Well) dazugegeben und vorsichtig im Medium durch Schwenken verteilt. Die infizierten Zellen wurden für 23 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden Überstände für eine Titerbestimmung (TCID₅₀) abgenommen (siehe 5.4.1). Außerdem wurden aus den Überständen und den infizierten Zellen die RNA isoliert und nach cDNA-Synthese mittels qPCR analysiert (5.1.1 bis 5.1.6).

5.2.5 Etablierung von porcinen *ex vivo* Lungenschnitten

5.2.5.1 Präparation von porcinen *ex vivo* Lungenschnitten (LS)

Bei den porcinen *ex vivo lung slice cultures* (LS) handelt es sich um ein *in-vitro* Modell, das ein großes Spektrum an Zelltypen enthält. Neben verschiedenen Epithelzelltypen der porcinen Lunge finden sich hier u.a. auch Endothelzellen und Immunzellen, sowie submucosales Gewebe.

Die Etablierung der porcinen *ex vivo lung slice cultures* (LS) aus Schweinelungen erfolgte weitgehend nach den Protokollen von de Vries *et al.*, 2018 und Meng *et al.*, 2013). Die LS unterscheiden sich vom Protokoll zur Erzeugung der *precision-cut lung slices* (PCLS) Kulturen darin, dass die LS per Hand mit einer Mikrotomklinge geschnitten werden, anstatt wie die PCLS mit einem *Krumdieck tissue slicer*. Dadurch sind LS deutlich „dicker“ (etwa 1-3 mm) als PCLS.

Die LS wurden wie die Epithelzellen aus frischen, gesunden Schweinelungen hergestellt, die vom Viehhandel und Schlachtbetrieb Klaus Wiegand, Münchhausen erworben wurden. Alle verwendeten Materialien wurden vorher sterilisiert oder autoklaviert. Außerdem wurde LS Medium hergestellt (siehe unten) und eine 4 % Agaroselösung, indem 4 g Agarose (*low melting*) in 100 ml PBS⁺⁺ in einer Mikrowelle vorsichtig gelöst und anschließend autoklaviert wurde. Vor Beginn der Präparation wurde diese Lösung nochmals erhitzt und mit 100 ml LS Medium 1:2 verdünnt. Diese 2 % Agaroselösung wurde in einem Wasserbad bei 42 °C gelagert und immer nur kleine Mengen in einem Becherglas abgenommen, um die frühzeitige Aushärtung der Agarose zu verhindern.

LS Medium

RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 Medium, 500 ml (Gibco)

50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin

4 mM L-Glutamin

2,5 µg/ml Amphotericin B/Fungizone

100 µg/ml Kanamycin in H₂O

10 µg/ml Enrofloxacin in H₂O

1 µg/ml Clotrimazol in DMSO

Aus den Lungenlappen wurden unter der Lamina Flow kleine Lungenstücke mit dem Skalpell abgetrennt (Abb.5.6 [A]). Bei diesen Lungenstücken ist es wichtig, dass ein Bronchusquerschnitt sichtbar ist und sie nur eine Schnittkante aufweisen, damit später die eingefüllte Agarose in der Lunge verbleibt (Abb.5.6 [B]). In den größten angeschnittenen Bronchus des Lungenstückes wurde vorsichtig eine Metallkanüle mit stumpfer Spitze (verschiedene Längen, Acufirm) eingeführt und mit einer Klemme befestigt. Die Schnittkante mit angeschnittenen Bronchien und Gefäßen wurde durch weitere Klemmen abgeklemmt (Abb.5.6 [C]). Über die Kanüle und die Änderung ihrer Position wurde eine 2 % Agaroselösung möglichst gleichmäßig im gesamten Bronchuslumen verteilt. Die Lungenstücke wurden mit weiterhin abgeklemmter Schnittfläche für etwa 30 min zur Aushärtung der Agarose auf Eis inkubiert (Abb.5.6 [D]). Anschließend wurden die Stücke unter der Lamina Flow zunächst mit einem Skalpell angeschnitten, um die

Agarosefüllung zu überprüfen und anschließend wurden mit einer MX 35 Ultra Mikrotomklingen (Thermo Fisher Scientific) etwa 1-3 mm dicke LS angefertigt, die mindestens einen Bronchusquerschnitt aufweisen (Abb.5.6 [E]).

5.2.5.2 Kultivierung von porcinen *ex vivo* Lungenschnitten

Die frisch geschnittenen LS wurden in LS Medium in 12-Well-Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (Abb.5.6 [F]). Die nächsten 4-5 h wurden die LS halbstündlich bis stündlich gewaschen, indem das Medium mehrmals vorsichtig auf die Bronchusöffnung pipettiert und anschließend das Medium gewechselt wurde. Durch diese ausgiebigen Waschschrte wurde die in den LS vorhandene Agarose ausgewaschen, da diese unter anderem die zilienträgenden Zellen verklebt. Die Schnitte wurden nach frühestens 3 h unter dem Mikroskop auf ihre Viabilität untersucht. Ein intakter Zilienschlag im Bronchusquerschnitt war der Indikator für „lebende“ LS (Abb.5.6 [G]). Für die weitere Kultivierung wurden die LS jeden Tag mindestens zweimal gewaschen und das Medium gewechselt, sowie der Zilienschlag überprüft. Nach frühestens 4 h wurden die LS mit rNiV_{EGFP} unter BSL-4-Bedingungen infiziert (siehe 5.4.2).

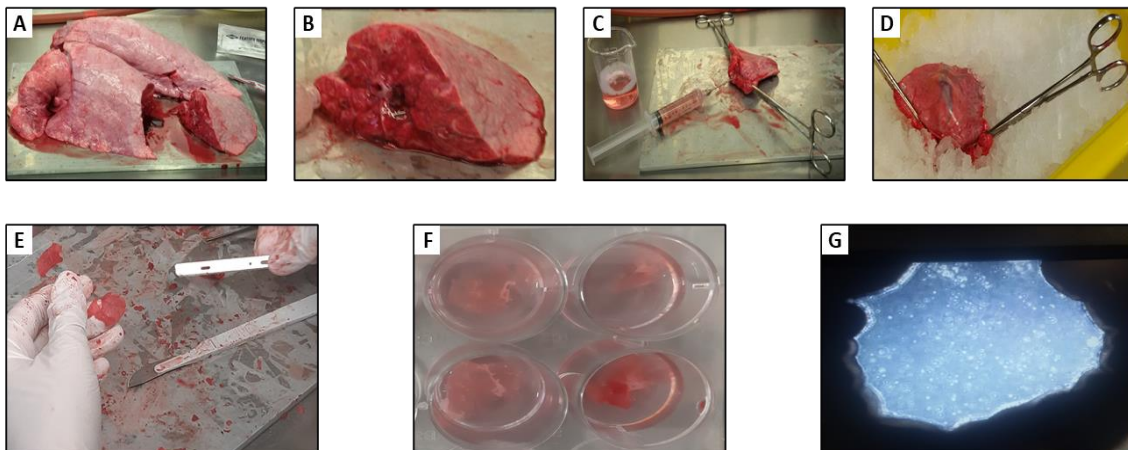


Abb. 5.6: Präparation und Kultivierung von porcinen *ex vivo* lung slice cultures (LS).

5.3 Immunologische Methoden

5.3.1 FACS Analyse von primären Zellen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie bzw. *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) ist es möglich, Zellen in einer Zellsuspension nach ihrer Größe, Granularität und Intensität des Fluoreszenzsignals zu analysieren. Um die Fluoreszenz zu messen, wird eine Zellsuspension vorher mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern, die ein spezifisches Antigen erkennen, inkubiert. Die Zellsuspension wird vom FACS-Gerät durch eine Kapillare geführt und über einen Laser können die unterschiedlichen Einzelzellen über Lichtstreuung (Größe, Granularität) und Emission der Fluoreszenz detektiert und analysiert werden (Murphy *et al.*, 2009).

Die primären humanen Bronchial- (HBEpC) und *Small-Airways*- (HSAEpC) Epithelzellen wuchsen konfluent auf 6-Well-Platten und wurden einmal mit PBS gewaschen, bevor sie mit 1,5 ml *Detachment Solution* bei 37 °C abgelöst wurden (siehe 5.2.2.4). Die Zellsuspension wurde in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Die eventuell im *Well* verbliebenen Zellen wurden in 1 ml PBS aufgenommen und ebenfalls in das FACS Röhrchen überführt. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 270 x g für 10 min bei 4 °C. Die weitere Behandlung erfolgte auf Eis oder bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 500 µl 0,5 % PFA in FACS-Puffer (PBS_{def} mit 1 % BSA) für 15 min inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 270 x g für 5 min). Danach wurden die fixierten Zellen in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und je 500 µl auf zwei FACS-Röhrchen aufgeteilt und noch einmal zentrifugiert. Ein Röhrchen diente als Kontrolle und wurde nur mit dem Sekundäntikörper gefärbt.

Für die Färbung des IFN-λ-Rezeptors bzw. Ephrin-B2 wurden folgende Primäntikörper verwendet: IFNLR1 (*mouse Anti-hIL-28 Rα/IFN-λ R1*, R&D Systems, 1:20) oder EphB4 (*mouse recombinant EphB4/Fc Chimera*, R&D Systems, 1:2). Das Zellpellet wurde jeweils in 100 µl Antikörperverdünnung (in FACS-Puffer) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und jeweils für 5 min bei 270 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit den FITC- (*Fluorescein isothiocyanate*) gekoppelten Sekundäntikörpern *goat-anti-mouse* IgG (IFNLR1-Nachweis) oder *goat-anti-human* IgG (EphB4-Nachweis). Beide Sekundäntikörper wurden 1:200 in FACS-Puffer verdünnt. Das Zellpellet wurde mit 100 µl Sekundäntikörper für 45 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde erneut dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert, in 250 µl FACS-Puffer aufgenommen und in ein Mikroröhrchen überführt. Die Proben wurden am Guava EasyCyte Mini Gerät (Guava Technologies) gemessen und mit der CytoSoft 4.2 Software (Guava Technologies) ausgewertet.

5.4 Virologische Methoden

Die NiV-Infektionen wurden alle im Hochsicherheitslabor (BSL-4 Labor) in Marburg unter den zugelassenen Sicherheitsbedingungen durchgeführt. Für die Infektionsstudien wurde ein rekombinantes NiV_{eGFP} vom Malaysia-Stamm verwendet, welches von Erik Dietzel in der Arbeitsgruppe generiert wurde (Dietzel *et al.*, 2015).

5.4.1 Titerbestimmung mittels TCID₅₀ (*Reed and Muench Methode*)

Die NiV-Virustiter in den Überständen von primären humanen und porcinen Epithelzellen, sowie Calu-3-Zellen wurden nach der TCID₅₀ Methode (*tissue culture infective dose*) ermittelt. Dieser Wert gibt die Virus-Verdünnung an, bei der mindestens die Hälfte (50 %) der Zellkultur infiziert ist und somit einen cytopathischen Effekt (CPE) zeigt (Hierholzer und Killington, 1996).

Für die Titerbestimmung wurden Vero76-Zellen in 128 µl (für 5er Verdünnungsstufen) oder 180 µl DMEM (für 10er Verdünnungsstufen) auf 96-Well-Platten ausgesät (siehe 5.2.1). Am darauffolgenden Tag wurden die konfluenten Zellen mit den NiV-haltigen, zellfreien Überständen infiziert. Dafür wurden 32 µl unverdünnter Virusüberstand (5er Verdünnungsschritte) oder 20 µl (10er Verdünnungsschritte) in das erste Well zum Medium gegeben und mit einer neuen Pipettenspitze vermischt. 32 µl bzw. 20 µl wurden anschließend in das zweite Well überführt, die Pipettenspitze gewechselt und wieder gemischt. Nach dieser Methode wurde die Verdünnungsreihen in 5er oder 10er Verdünnungsschritten bis zum achten Well durch pipettiert und aus dem letzten Well 32 µl bzw. 20 µl verworfen. Dabei wurde die Pipettenspitze bis zum 4. Well gewechselt. Jeder Virus-haltige Überstand wurde in 8 Verdünnungsreihen aufgetragen (8-fach Bestimmung). Die Zellkulturplatten wurden anschließend für 5 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert, bevor der zytopathische Effekt in jedem Well lichtmikroskopisch beurteilt wurde. Dabei wurden alle Wells mit einem deutlich sichtbaren CPE markiert und anschließend die TCID₅₀/ml nach der *Reed and Munich* Methode (Hierholzer und Killington, 1996) berechnet:

$$TCID_{50}/ml = \frac{10^{\log(\frac{1}{a}) + (b \times \log(c))}}{d}$$

a = letzte/höchste Verdünnungsstufe bei der mindestens 50 % der Wells CPE zeigen (d.h. mindestens 4 von 8 Wells)

b = Korrekturfaktor =

$$\frac{\text{Anzahl der Wells, die bei a CPE zeigen} - \text{Anzahl der Wells, die 50 \% der Wells entsprechen}}{\text{Anzahl der Wells, die bei a CPE zeigen} - \text{Anzahl der Verdünnungsreihen, die in höheren Verdünnungsstufen als a noch CPE zeigen}}$$

c = Verdünnungsfaktor (5 oder 10)

d = Volumen im Well in ml (0,128 ml oder 0,18 ml)

Beispiel an einer Probe, die in 10er Verdünnungsstufen und 8 Verdünnungsreihen pipettiert wurde (X kennzeichnet Wells mit CPE):

10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
X	X	X					
X	X	X					
X	X	X					
X	X	X	X				
X	X	X	X				
X	X	X	X				
X	X	X	X				
X	X	X	X	X			

a = 10⁻⁴

b = $\frac{5-4}{5-1} = 0,25$

c = 10

d = 0,18 ml

$$\frac{10^{\log\left(\frac{1}{10^{-4}}\right) + (0,25 \times \log(10))}}{0,18 \text{ ml}} = 9,8 \times 10^4 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$$

5.4.2 Infektion von permanenten und primären Zellen mit rNiV_{eGFP}

Sowohl primäre humane und porcine Epithelzellen als auch Calu-3-Zellen wurden mit einer definierten Menge rNiV_{eGFP} (Dietzel *et al.*, 2015) infiziert.

Vor der Infektion wurden die Zellen von einem Well gezählt (siehe 5.2.3). Die Zellen wurden mit definierten Virusmengen (TCID₅₀/Well) infiziert und anschließend die *Multiplicity of Infection* (MOI), die das Verhältnis von Viruspartikeln zur Zellzahl angibt, berechnet:

$$\text{MOI} = \frac{\text{verwendete ml} \times \text{Virustiter (TCID}_{50}/\text{ml)}}{\text{Zellzahl}}$$

Wurden die Zellen beispielsweise mit 5 µl Virusstock, der einen Titer von 1x10⁷ TCID₅₀/ml hat, infiziert, entspricht das einer Dosis von 5x10⁴ TCID₅₀. Wenn die Zellzahl 1x10⁵ Zellen/Well beträgt, dann entspricht das einer MOI von 0,5, das heißt rechnerisch würde mit dieser Infektionsdosis jede zweite Zelle mit einem Viruspartikel infiziert werden.

Die Virusverdünnungen wurden mit AEGM (HBEpC, PBEpC) oder DMEM/F-12 GlutaMAX/2 % FCS (Calu3) in Falcon-Röhrchen angesetzt. Vor der Infektion wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen und dann mit 500 μ l (6-Well) oder 200 μ l (24-Well) Virusverdünnung infiziert. Die Infektion wurde für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, wobei alle 15 min die Zellkulturplatte mit der Virussuspension vorsichtig geschwenkt wurde, um die Virusverdünnung gleichmäßig zu verteilen. Danach wurde die Virussuspension abgenommen und der Zellrasen viermal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Zu den Zellen wurden 1 ml (24-Well) oder 2 ml (6-Well) AEGM (HBEpC, PBEpC) oder DMEM/F-12 GlutaMAX/2 % FCS (Calu-3) dazugegeben und bei 37 °C inkubiert. Der Zellrasen wurde 24 h oder 48 h *post infection* (p.i.) auf Synzytienbildung und eGFP-Autofluoreszenz untersucht (Nikon TS100 Mikroskop, 100-fache Vergrößerung). Die Überstände wurden an den Zeitpunkten t_0 , t_{24} und t_{48} für die Titerbestimmung und die NiV-qPCR abgenommen (siehe 5.4.1 und 5.1.1). Nach 24 h und/oder 48 h p.i. wurden die Zellen in RLT-Puffer + β -ME für die RNA-Isolierung aufgenommen (siehe 5.1.1).

5.4.3 Infektion von porcinen Lungenschnitten

Die porcinen Lungenschnitte (LS) wurden vor der Infektion gründlich gewaschen, das Medium gewechselt und die Zilienaktivität überprüft (siehe 5.2.5). Nach dem Ansetzen der Virusverdünnung in LS Medium, wurde das Medium von den LS abgenommen und die Lungenschnitte mit 500 μ l Virussuspension infiziert. Dabei wurden die 500 μ l Virusverdünnung mit der Pipette tröpfchenweise direkt auf den Bronchus pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂, wobei alle 15 min die Lungenschnitte vorsichtig geschwenkt wurden. Danach wurde die Viruslösung abgenommen, die LS viermal mit PBS⁺⁺ gewaschen und 2 ml LS Medium dazugegeben. Die LS inkubierten für 45 h im Brutschrank. Danach wurden diese dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit 4 ml 4 % PFA/DMEM für 30 min fixiert. Anschließend erfolgte wieder ein dreimaliger Waschschrift mit PBS⁺⁺. Die Lungenschnitte wurden im BSL-4 Labor in PBS⁺⁺ bei 4 °C bis zur Auswertung gelagert. Die Auswertung erfolgte im BSL-4 Labor am Nikon TS100 Mikroskop, indem die eGFP-Autofluoreszenz NiV-infizierter Zellen in den LS analysiert wurde.

VI Literaturverzeichnis

- AbuBakar, S., Chang, L.-Y., Ali, A.R.M., Sharifah, S.H., Yusoff, K., Zamrod, Z., 2004. Isolation and Molecular Identification of Nipah Virus from Pigs. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2228–2230.
- Adams, P.S., 2007. Kapitel 2 Data analysis and reporting, in *Real-time PCR*. Garland Science.
- Aguilar, H.C., Aspericueta, V., Robinson, L.R., Aanensen, K.E., Lee, B., 2010. A Quantitative and Kinetic Fusion Protein-Triggering Assay Can Discern Distinct Steps in the Nipah Virus Membrane Fusion Cascade. *J. Virol.* 84, 8033–8041.
- Aguilar, H.C., Ataman, Z.A., Aspericueta, V., Fang, A.Q., Stroud, M., Negrete, O.A., Kammerer, R.A., Lee, B., 2009. A novel receptor-induced activation site in the nipah virus attachment glycoprotein (G) involved in triggering the fusion glycoprotein (F). *J. Biol. Chem.* 284, 1628–1635.
- Aguilar, H.C., Iorio, R.M., 2012. Henipavirus Membrane Fusion and Viral Entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 359, 79–94.
- Aguilar, H.C., Lee, B., 2011. Emerging paramyxoviruses: Molecular mechanisms and antiviral strategies. *Expert Rev. Mol. Med.* 13, 1–19.
- Amarasinghe, G.K., Ayllón, M.A., Bào, Y., Basler, C.F., Bavari, S., Blasdel, K.R., Briese, T., Brown, P.A., Bukreyev, A., Balkema-Buschmann, A., Buchholz, U.J., Chabi-Jesus, C., Chandran, K., Chiapponi, C., Crozier, I., de Swart, R.L., Dietzgen, R.G., Dolnik, O., Drexler, J.F., Dürrwald, R., Dundon, W.G., Duprex, W.P., Dye, J.M., Easton, A.J., Fooks, A.R., Formenty, P.B.H., Fouchier, R.A.M., Freitas-Astúa, J., Griffiths, A., Hewson, R., Horie, M., Hyndman, T.H., Jiāng, D., Kitajima, E.W., Kobinger, G.P., Kondō, H., Kurath, G., Kuzmin, I. V., Lamb, R.A., Lavazza, A., Lee, B., Lelli, D., Leroy, E.M., Lǐ, J., Maes, P., Marzano, S.Y.L., Moreno, A., Mühlberger, E., Netesov, S. V., Nowotny, N., Nylund, A., Økland, A.L., Palacios, G., Pályi, B., Pawęska, J.T., Payne, S.L., Prospero, A., Ramos-González, P.L., Rima, B.K., Rota, P., Rubbenstroth, D., Shī, M., Simmonds, P., Smither, S.J., Sozzi, E., Spann, K., Stenglein, M.D., Stone, D.M., Takada, A., Tesh, R.B., Tomonaga, K., Tordo, N., Towner, J.S., van den Hoogen, B., Vasilakis, N., Wahl, V., Walker, P.J., Wang, L.F., Whitfield, A.E., Williams, J. V., Zerbini, F.M., Zhāng, T., Zhang, Y.Z., Kuhn, J.H., 2019. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2019. *Arch. Virol.* 164, 1967–1980.
- Andreaskos, E., Salagianni, M., Galani, I.E., Koltsida, O., 2017. Interferon-λs: Front-line guardians of immunity and homeostasis in the respiratory tract. *Front. Immunol.* 8, 1–7.
- Ang, B.S.P., Lim, T.C.C., Wang, L., 2018. Nipah virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 56, 1–10.
- Arnoult, D., Soares, F., Tattoli, I., Girardin, S.E., 2011. Mitochondria in innate immunity. *EMBO Rep.* 12, 901–910.
- Barcik, W., Boutin, R.C.T., Sokolowska, M., Finlay, B.B., 2020. The Role of Lung and Gut Microbiota in the Pathology of Asthma. *Immunity* 52, 241–255.
- Barton, G.M., 2007. Viral recognition by Toll-like receptors. *Semin. Immunol.* 19, 33–40.
- Bergner, A., Sanderson, M.J., 2002. Acetylcholine-induced calcium signaling and contraction of airway smooth muscle cells in lung slices. *J. Gen. Physiol.* 119, 187–198.

- Bertolusso, R., Tian, B., Zhao, Y., Vergara, L., Sabree, A., Iwanaszko, M., Lipniacki, T., Brasier, A.R., Kimmel, M., 2014. Dynamic cross talk model of the epithelial innate immune response to double-stranded RNA stimulation: Coordinated dynamics emerging from cell-level noise. *PLoS One* 9, 1–21.
- Bonaparte, M.I., Dimitrov, A.S., Bossart, K.N., Crameri, G., Mungall, B. a, Bishop, K. a, Choudhry, V., Dimitrov, D.S., Wang, L.-F., Eaton, B.T., Broder, C.C., 2005. Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10652–10657.
- Booth, J.L., Coggeshall, K.M., Gordon, B.E., Metcalf, J.P., 2004. Adenovirus Type 7 Induces Interleukin-8 in a Lung Slice Model and Requires Activation of Erk. *J. Virol.* 78, 4156–4164.
- Bordon, J., Aliberti, S., Fernandez-Botran, R., Uriarte, S.M., Rane, M.J., Duvvuri, P., Peyrani, P., Morlacchi, L.C., Blasi, F., Ramirez, J.A., 2013. Understanding the roles of cytokines and neutrophil activity and neutrophil apoptosis in the protective versus deleterious inflammatory response in pneumonia. *Int. J. Infect. Dis.* 17, e76–e83.
- Borel, J.F., Feurer, C., Gubler, H.U., Stähelin, H., 1976. Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6, 468–475.
- Bösch, D., 2014. Kapitel 1 Anatomie und Physiologie der Lunge und Atemwege, in *Lunge und Atemwege*. Springer-Verlag.
- Bossart, K.N., Crameri, G., Dimitrov, A.S., Mungall, B.A., Feng, Y.-R., Patch, J.R., Choudhary, A., Wang, L.-F., Eaton, B.T., Broder, C.C., 2005. Receptor Binding, Fusion Inhibition, and Induction of Cross-Reactive Neutralizing Antibodies by a Soluble G Glycoprotein of Hendra Virus. *J. Virol.* 79, 6690–6702.
- Bossart, K.N., Tachedjian, M., McEachern, J.A., Crameri, G., Zhu, Z., Dimitrov, D.S., Broder, C.C., Wang, L.-F., 2008. Functional studies of host-specific ephrin-B ligands as Henipavirus receptors. *Virology* 372, 357–371.
- Bossart, K.N., Rockx, B., Feldmann, F., Brining, D., Scouff, D., LaCasse, R., Geisbert, J.B., Feng, Y., Chan, Y., Hickey, Andrew, C., Broder, C.C., Feldmann, H., Geisbert, T.W., 2012. A Hendra Virus G Glycoprotein Subunit Vaccine Protects African Green Monkeys from Nipah Virus Challenge. *Sci Transl Med.* 4, 1–16.
- Burgess, H.M., Mohr, I., 2016. Evolutionary clash between myxoma virus and rabbit PKR in Australia. *PNAS* 113, 3912–3914. <https://doi.org/org/10.1073/pnas.1602063113>
- CDC, 1999. Outbreak of Hendra-like virus - Malaysia and Singapore, 1998-1999. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 48, 265–284.
- Chattu, V.K., Kumar, R., Kumary, S., Kajal, F., David, J.K., 2018. Nipah virus epidemic in southern India and emphasizing “One Health” approach to ensure global health security. *J Fam. Med Prim Care* 7, 275–283.
- Chew, M.H.L., Arguin, P.M., Shay, D.K., Goh, K., Rollin, P.E., Shieh, W., Zaki, S.R., Rota, P.A., Ling, A., Ksiazek, T.G., Chew, S., Anderson, L.J., 2000. Risk Factors for Nipah Virus Infection among Abattoir Workers in Singapore. *J. Infect. Dis.* 181, 1760–1763.

- Choi, U.Y., Kang, J.-S., Hwang, Y.S., Kim, Y.J., 2015. Oligoadenylate synthase-like (OASL) proteins: dual functions and associations with diseases. *Exp. Mol. Med.* 47, e144.
- Chua, K.B., Bellini, W.J., Rota, P. a, Harcourt, B.H., Tamin, a, Lam, S.K., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Zaki, S.R., Shieh, W., Goldsmith, C.S., Gubler, D.J., Roehrig, J.T., Eaton, B., Gould, a R., Olson, J., Field, H., Daniels, P., Ling, a E., Peters, C.J., Anderson, L.J., Mahy, B.W., 2000. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288, 1432–1435.
- Chua, K.B., Lam, S.K., Goh, K.J., Hooi, P.S., Ksiazek, T.G., Kamarulzaman, A., Olson, J., Tan, C.T., 2001. The presence of nipah virus in respiratory secretions and urine of patients during an outbreak of nipah virus encephalitis in Malaysia. *J. Infect.* 42, 40–43.
- Chua, K.B., 2003. Nipah virus outbreak in Malaysia. *J. Clin. Virol.* 26, 265–275.
- Chua, K.B., Chua, B.H., Wang, C.W., 2002. Anthropogenic deforestation, El Niño and the emergence of Nipah virus in Malaysia. *Malays. J. Pathol.* 24, 15–21.
- Chua, K.B., Goh, K.J., Wong, K.T., Kamarulzaman, A., Tan, P.S.K., Ksiazek, T.G., Zaki, S.R., Paul, G., Lam, S.K., Tan, C.T., 1999. Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet* 354, 1257–1259.
- Cong, Y., Lentz, M.R., Lara, A., Alexander, I., Bartos, C., Bohannon, J.K., Hammoud, D., Huzella, L., Jahrling, P.B., Janosko, K., Jett, C., Kollins, E., Lackemeyer, M., Mollura, D., Ragland, D., Rojas, O., Solomon, J., Xu, Z., Munster, V., Holbrook, M.R., 2017. Loss in lung volume and changes in the immune response demonstrate disease progression in African green monkeys infected by small-particle aerosol and intratracheal exposure to Nipah virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–24.
- Cox, R., Plemper, R.K., 2015. The paramyxovirus polymerase complex as a target for next-generation anti-paramyxovirus therapeutics. *Front. Microbiol.* 6, 1–14.
- Dandurand, R.J., Wang, C.G., Phillips, N.C., Eidelman, D.H., 1993. Responsiveness of individual airways to methacholine in adult rat lung explants. *J. Appl. Physiol.* 75, 364–372.
- Darling, T.K., Lamb, T.J., 2019. Emerging roles for Eph receptors and ephrin ligands in immunity. *Front. Immunol.* 10, 1–15.
- de Vries, R.D., Rennick, L.J., Duprex, W.P., de Swart, R.L., 2018. Paramyxovirus Infections in Ex Vivo Lung Slice Cultures of Different Host Species. *Methods Protoc.* 1, 1–9.
- de Wilde, A.H., Raj, V.S., Oudshoorn, D., Bestebroer, T.M., van Nieuwkoop, S., Limpens, R.W.A.L., Posthuma, C.C., van der Meer, Y., Bárcena, M., Haagmans, B.L., Snijder, E.J., van den Hoogen, B.G., 2013. MERS-coronavirus replication induces severe in vitro cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon- α treatment. *J. Gen. Virol.* 94, 1749–1760.
- de Wilde, A.H., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Thiel, V., Narayanan, K., Makino, S., Snijder, E.J., van Hemert, M.J., 2011. Cyclosporin A inhibits the replication of diverse coronaviruses. *J. Gen. Virol.* 92, 2542–2548.

- DeBuysscher, B.L., de Wit, E., Munster, V.J., Scott, D., Feldmann, H., Prescott, J., 2013. Comparison of the Pathogenicity of Nipah Virus Isolates from Bangladesh and Malaysia in the Syrian Hamster. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, 1–11.
- Dechert, U., 2012. Kapitel 2 Gelelektrophoresen, In *Gentechnische Methoden*, 5. Auflage. ed. Spektrum Akademischer Verlag.
- Delgado-Ortega, M., Melo, S., Punyadarsaniya, D., Ramé, C., Olivier, M., Soubieux, D., Marc, D., Simon, G., Herrler, G., Berri, M., Dupont, J., Meurens, F., 2014. Innate immune response to a H3N2 subtype swine influenza virus in newborn porcine trachea cells, alveolar macrophages, and precision-cut lung slices. *Vet. Res.* 45, 1–18.
- Desmyter, J., Melnick, J.L., Rawls, W.E., 1968. Defectiveness of Interferon Production and of Rubella Virus Interference in a Line of African Green Monkey Kidney Cells (Vero). *J. Virol.* 2, 955–961.
- Dickson, R.P., Erb-Downward, J.R., Martinez, F.J., Huffnagle, G.B., 2016. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 481–504. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105238>
- Diederich, S., Sauerhering, L., Weis, M., Altmeyen, H., Schaschke, N., Reinheckel, T., Erbar, S., Maisner, A., 2012. Activation of the Nipah Virus Fusion Protein in MDCK Cells Is Mediated by Cathepsin B within the Endosome-Recycling Compartment. *J. Virol.* 86, 3736–3745.
- Diederich, S., Maisner, A., 2007. Molecular characteristics of the Nipah virus glycoproteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1102, 39–50.
- Diederich, S., Moll, M., Klenk, H.D., Maisner, A., 2005. The Nipah virus fusion protein is cleaved within the endosomal compartment. *J. Biol. Chem.* 280, 29899–29903.
- Dietzel, E., Kolesnikova, L., Sawatsky, B., Heiner, A., Weis, M., Kobinger, G.P., Becker, S., von Messling, V., Maisner, A., 2015. Nipah Virus Matrix Protein Influences Fusogenicity and Is Essential for Particle Infectivity and Stability. *J. Virol.* 90, 2514–2522.
- Dongre, A., Weinberg, R.A., 2019. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 69–84.
- Duong, F.H.T., Trincucci, G., Boldanova, T., Calabrese, D., Campana, B., Krol, I., Durand, S.C., Heydmann, L., Zeisel, M.B., Baumert, T.F., Heim, M.H., 2014. IFN- λ receptor 1 expression is induced in chronic hepatitis C and correlates with the IFN- λ 3 genotype and with nonresponsiveness to IFN- α therapies. *J. Exp. Med.* 211, 857–868.
- Durbin, R.K., Kotenko, S. V., Durbin, J.E., 2013. Interferon induction and function at the mucosal surface. *Immunol. Rev.* 255, 25–39. <https://doi.org/10.1111/imr.12101>
- Eaton, B.T., Broder, C.C., Middleton, D., Wang, L.F., 2006. Hendra and Nipah viruses: Different and dangerous. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 23–35.
- Egli, A., Santer, D.M., O’Shea, D., Tyrrell, D.L., Houghton, M., 2014. The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. *Emerg. Microbes Infect.* 3, 1–12.

- El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J.C., Gougerot-Pocidallo, M.A., Dang, P.M.C., 2016. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol. Rev.* 273, 180–193.
- Elvert, M., 2014. Variabilität der Nipahvirus-Rezeptorexpression in porcinen respiratorischen Epithelzellen. Bachelorarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Elvert, M., Sauerhering, L., Maisner, A., 2020. Cytokine Induction in Nipah Virus-Infected Primary Human and Porcine Bronchial Epithelial Cells. *J. Infect. Dis.* 221, S395–S400.
- Escaffre, O., Borisevich, V., Carmical, J.R., Prusak, D., Prescott, J., Feldmann, H., Rockx, B., 2013. Henipavirus Pathogenesis in Human Respiratory Epithelial Cells. *J. Virol.* 87, 3284–3294.
- Fensterl, V., Sen, G.C., 2011. The ISG56/IFIT1 gene family. *J. Interf. Cytokine Res.* 31, 71–78.
- Fischer, I., 2019. Porcine *ex-vivo* Lungenschnitte als *in-vitro* Zellkultursysteme für Virusinfektionen. Bachelorarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Flores, C., Fouquet, G., Moura, I.C., Maciel, T.T., Hermine, O., 2019. Lessons to learn from low-dose cyclosporin-A: A new approach for unexpected clinical applications. *Front. Immunol.* 10, 1–7.
- Fogarty, R., Halpin, K., Hyatt, A.D., Daszak, P., Mungall, B.A., 2008. Henipavirus susceptibility to environmental variables. *Virus Res.* 132, 140–144.
- Franke, E.K., Luban, J., 1996. Inhibition of HIV-1 replication by cyclosporine A or related compounds correlates with the ability to disrupt the Gag-cyclophilin A interaction. *Virology* 222, 279–282.
- Galani, I.E., Triantafyllia, V., Eleminiadou, E.E., Koltsida, O., Stavropoulos, A., Manioudaki, M., Thanos, D., Doyle, S.E., Kotenko, S. V., Thanopoulou, K., Andreakos, E., 2017. Interferon- λ Mediates Non-redundant Front-Line Antiviral Protection against Influenza Virus Infection without Compromising Host Fitness. *Immunity* 46, 875–890.
- Gal-Ben-Ari, S., Barrera, I., Ehrlich, M., Rosenblum, K., 2019. PKR: A kinase to remember. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 1–20.
- Goh, K.J., Tan, C.T., Chew, N.K., Tan, P.S.K., Kamarulzaman, A., Sarji, S.A., Wong, K.T., Abdullah, B.J.J., Chua, K.B., Lam, S.K., 2000. Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia. *N. Engl. J. Med.* 342, 1229–1235.
- Goldsmith, C.S., Whistler, T., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Rota, P.A., Bellini, W.J., Daszak, P., Wong, K.T., Shieh, W.J., Zaki, S.R., 2003. Elucidation of Nipah virus morphogenesis and replication using ultrastructural and molecular approaches. *Virus Res.* 92, 89–98.
- Habjan, M., Andersson, I., Klingström, J., Schümman, M., Martin, A., Zimmermann, P., Wagner, V., Pichlmair, A., Schneider, U., Mühlberger, E., Mirazimi, A., Weber, F., 2008. Processing of genome 5' Termini as a Strategy of Negative-Strand RNA Viruses to Avoid RIG-I-Dependent Interferon Induction. *PLoS One* 3, e2032.

- Hafner, C., Schmitz, G., Meyer, S., Bataille, F., Hau, P., Langmann, T., Dietmaier, W., Landthaler, M., Vogt, T., 2004. Differential Gene Expression of Eph Receptors and Ephrins in Benign Human Tissues and Cancers. *Clin. Chem.* 50, 490–499.
- Hammoud, D.A., Lentz, M.R., Lara, A., Bohannon, J.K., Feuerstein, I., Huzella, L., Jahrling, P.B., Lackemeyer, M., Laux, J., Rojas, O., Sayre, P., Solomon, J., Cong, Y., Munster, V., Holbrook, M.R., 2018. Aerosol exposure to intermediate size Nipah virus particles induces neurological disease in African green monkeys. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, 1–26.
- Harcourt, B.H., Lowe, L., Tamin, A., Liu, X., Bankamp, B., Bowden, N., Rollin, P.E., Comer, J.A., Ksiazek, T.G., Hossain, M.J., Gurley, E.S., Breiman, R.F., Bellini, W.J., Rota, P.A., 2005. Genetic Characterization of Nipah Virus, Bangladesh, 2004. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1594–1597.
- Harcourt, B.H., Tamin, A., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Anderson, L.J., Bellini, W.J., Rota, P.A., 2000. Molecular characterization of Nipah virus, a newly emergent paramyxovirus. *Virology* 271, 334–349. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0340>
- Hauser, M.J., Dlugolenski, D., Culhane, M.R., Wentworth, D.E., Tompkins, S.M., Tripp, R.A., 2013. Antiviral Responses by Swine Primary Bronchoepithelial Cells Are Limited Compared to Human Bronchoepithelial Cells Following Influenza Virus Infection. *PLoS One* 8, 1–14.
- Hayman, D.T.S., Suu-Ire, R., Breed, A.C., McEachern, J. a., Wang, L., Wood, J.L.N., Cunningham, A. a., 2008. Evidence of henipavirus infection in West African fruit bats. *PLoS One* 3, 1–4.
- Hermant, P., Michiels, T., 2014. Interferon- λ in the context of viral infections: Production, response and therapeutic implications. *J. Innate Immun.* 6, 563–574.
- Herrmann, G., 2011. Kapitel 16 Hals, in *Taschenlehrbuch Anatomie*. Thieme.
- Hierholzer, J.C., Killington, R.A., 1996. Virus isolation and quantitation, in: *Virology Methods Manual*. pp. 25–46.
- Hoffmann, M., Nehlmeier, I., Brinkmann, C., Krähling, V., Behner, L., Moldenhauer, A.-S., Krüger, N., Nehls, J., Schindler, M., Hoenen, T., Maisner, A., Becker, S., Pöhlmann, S., 2019. Tetherin Inhibits Nipah Virus but Not Ebola Virus Replication in Fruit Bat Cells. *J. Virol.* 93, 1–16.
- Homma, T., Kato, A., Hashimoto, N., Batchelor, J., Yoshikawa, M., Imai, S., Wakiguchi, H., Saito, H., Matsumoto, K., 2004. Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31, 463–469.
- Hooper, P., Zaki, S., Daniels, P., Middleton, D., 2001. Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect.* 3, 315–322.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., Endres, S., Hartmann, G., 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314 (5801). 994–997.

- Huang, G., Shi, L.Z., Chi, H., 2010. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. *Cytokine* 48, 161–169.
- Hyatt, A.D., Zaki, S.R., Goldsmith, C.S., Wise, T.G., Hengstberger, S.G., 2001. Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals. *Microbes Infect.* 3, 297–306.
- Hyde, J.L., Diamond, M.S., 2015. Innate immune restriction and antagonism of viral RNA lacking 2'-O methylation. *Virology* 479–480, 66–74.
- Ichinohe, T., Pang, I.K., Kumamoto, Y., Peaper, D.R., Ho, J.H., Murray, T.S., Iwasaki, A., 2011. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5354–5359.
- Ioannidis, I., Ye, F., McNally, B., Willette, M., Flano, E., 2013. Toll-Like Receptor Expression and Induction of Type I and Type III Interferons in Primary Airway Epithelial Cells. *J. Virol.* 87, 3261–3270.
- Isaacs, A., Lindenmann, J., 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. London. Ser. B - Biol. Sci.* 147, 258–267.
- Judge, E.P., Hughes, J.M.L., Egan, J.J., Maguire, M., Molloy, E.L., O'Dea, S., 2014. Anatomy and bronchoscopy of the porcine lung: A model for translational respiratory medicine. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 51, 334–343.
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., Akira, S., 2008. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.* 205, 1601–1610.
- Kawai, T., Akira, S., 2008. Toll-like receptor and RIG-1-like receptor signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1143, 1–20.
- Kawai, T., Akira, S., 2007. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 13, 460–469.
- Khan, M.S.U., Hossain, J., Gurley, E.S., Nahar, N., Sultana, R., Luby, S.P., 2010. Use of infrared camera to understand bats' access to date palm sap: Implications for preventing Nipah virus transmission. *Ecohealth* 7, 517–525.
- Kong, W.S., Irie, T., Yoshida, A., Kawabata, R., Kadoi, T., Sakaguchi, T., 2012. Inhibition of virus-like particle release of Sendai virus and Nipah virus, but not that of Mumps virus, by Tetherin/CD317/BST-2. *Hiroshima J. Med. Sci.* 61, 59–67.
- Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H., Donnelly, R.P., 2003. IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4, 69–77.
- Kristiansen, H., Gad, H.H., Eskildsen-Larsen, S., Despres, P., Hartmann, R., 2011. The oligoadenylate synthetase family: An ancient protein family with multiple antiviral activities. *J. Interf. Cytokine Res.* 31, 41–47.

- Kühnel, W., 2014. Kapitel Epithelgewebe, Taschenatlas Histologie, 13. Auflag. ed. Georg Thieme Verlag.
- Kummer, W., Welsch, U., 2018. Kapitel 8, Atmungsorgane, in Histologie - Das Lehrbuch, 5.Auflage. Elsevier Health Sciences.
- Kurosawa, H., Wang, C.G., Dandurand, R.J., King, M., Eidelman, D.H., 1995. Mucociliary function in the mouse measured in explanted lung tissue. *J. Appl. Physiol.* 79, 41–46.
- Lam, SK and Chua, K., 2002. Nipah Virus Encephalitis Outbreak in Malaysia. *Clin. Infect. Dis.* 34, 48–51.
- Langer, J.A., Cutrone, E.C., Kotenko, S., 2004. The Class II cytokine receptor (CRF2) family: Overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 33–48.
- Lauber, A., 2019. Der Respirationstrakt: Anatomie-Physiologie-Pathologie, Band 3. ed. neobooks.
- Le Goffic, R., Pothlichet, J., Vitour, D., Fujita, T., Meurs, E., Chignard, M., Si-Tahar, M., 2007. Cutting Edge: Influenza A Virus Activates TLR3-Dependent Inflammatory and RIG-I-Dependent Antiviral Responses in Human Lung Epithelial Cells. *J. Immunol.* 178, 3368–3372.
- Liberati, T.A., Randle, M.R., Toth, L.A., 2010. In vitro lung slices: A powerful approach for assessment of lung pathophysiology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 10, 501–508.
- Liu, Q., Stone, J.A., Bradel-Tretheway, B., Dabundo, J., Benavides Montano, J.A., Santos-Montanez, J., Biering, S.B., Nicola, A. V., Iorio, R.M., Lu, X., Aguilar, H.C., 2013. Unraveling a Three-Step Spatiotemporal Mechanism of Triggering of Receptor-Induced Nipah Virus Fusion and Cell Entry. *PLoS Pathog.* 9, 1–12.
- Liu, X., Zhao, Z., Li, Z., Xu, C., Sun, L., Chen, J., Liu, W., 2012. Cyclosporin A inhibits the influenza virus replication through cyclophilin A-dependent and -independent pathways. *PLoS One* 7, 1–8.
- Liu, Y., Olagnier, D., Lin, R., 2017. Host and viral modulation of RIG-I-mediated antiviral immunity. *Front. Immunol.* 7, 1–12.
- Liu, Y., Zhang, Y.B., Liu, T.K., Gui, J.F., 2013b. Lineage-Specific Expansion of IFIT Gene Family: An Insight into Coevolution with IFN Gene Family. *PLoS One* 8, 1–14.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lo, M.K., Rota, P.A., 2008. The emergence of Nipah virus, a highly pathogenic paramyxovirus. *J. Clin. Virol.* 43, 396–400.
- Loo, Y.M., Gale, M., 2011. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity* 34, 680–692.
- Looi, L.M., Chua, K.B., 2007. Lessons from the Nipah virus outbreak in Malaysia. *Malays. J. Pathol.* 29, 63–67.

- Luby, S.P., Rahman, M., Hossain, M.J., Blum, L.S., Husain, M.M., Gurley, E., Khan, R., Ahmed, B.N., Rahman, S., Nahar, N., Kenah, E., Comer, J.A., Ksiazek, T.G., 2006. Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1888–1894.
- Maar, D., Harmon, B., Chu, D., Schulz, B., Aguilar, H.C., Lee, B., Negrete, O.A., 2012. Cysteines in the Stalk of the Nipah Virus G Glycoprotein Are Located in a Distinct Subdomain Critical for Fusion Activation. *J. Virol.* 86, 6632–6642.
- Mahauad-Fernandez, W.D., Okeoma, C.M., 2016. The role of BST-2/Tetherin in host protection and disease manifestation. *Immun. Inflamm. Dis.* 4, 4–23.
- Malathi, K., Dong, B., Gale Jr, M., Silverman, R.H., 2007. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* 448, 816–819.
- Manuse, M.J., Parks, G.D., 2010. TLR3-dependent Upregulation of RIG-I Leads to Enhanced Cytokine Production From Cells Infected with the Parainfluenza Virus SV5. *Virology* 397(1), 231.
- Martin, C., Uhlig, S., Ullrich, V., 2001. Cytokine-induced bronchoconstriction in precision-cut lung slices is dependent upon cyclooxygenase-2 and thromboxane receptor activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24, 139–145.
- Martin, C., Uhlig, S., Ullrich, V., 1996. Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. *Eur. Respir. J.* 9, 2479–2487.
- Mathieu, C., Guillaume, V., Volchkova, V.A., Pohl, C., Jacquot, F., Looi, R.Y., Wong, K.T., Legras-Lachuer, C., Volchkov, V.E., Lachuer, J., Horvat, B., 2012. Nonstructural Nipah Virus C Protein Regulates both the Early Host Proinflammatory Response and Viral Virulence. *J. Virol.* 86, 10766–10775.
- Matsuda, S., Koyasu, S., 2000. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 47, 119–125.
- McDowell, E.M., Barrett, L.A., Glavin, F., Harris, C.C., Trump, B.F., 1978. The Respiratory Epithelium. I. Human Bronchus. *J. Natl. Cancer Inst.* 61, 539–549.
- McEachern, J.A., Bingham, J., Cramer, G., Green, D.J., Hancock, T.J., Middleton, D., Feng, Y.R., Broder, C.C., Wang, L.F., Bossart, K.N., 2008. A recombinant subunit vaccine formulation protects against lethal Nipah virus challenge in cats. *Vaccine* 26, 3842–3852.
- Mears, H. V., Sweeney, T.R., 2018. Better together: The role of IFIT protein-protein interactions in the antiviral response. *J. Gen. Virol.* 99, 1463–1477.
- Meng, F., Punyadarsaniya, D., Uhlenbruck, S., Hennig-Pauka, I., Schwegmann-Wessels, C., Ren, X., Dürrwald, R., Herrler, G., 2013. Replication characteristics of swine influenza viruses in precision-cut lung slices reflect the virulence properties of the viruses. *Vet. Res.* 44, 1–9.
- Middleton, D.J., Westbury, H. a., Morrissy, C.J., Van der Heide, B.M., Russell, G.M., Braun, M. a., Hyatt, a. D., 2002. Experimental Nipah virus infection in pigs and cats. *J. Comp. Pathol.* 126, 124–136.

- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Schätzl, H., 2010. *Molekulare Virologie*, 15.3 Paramyxoviren., 3. Auflage. ed. Spektrum Akademischer Verlag.
- Mohd Nor, M.N., Gan, C.H., Ong, B.L., 2000. Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia. *OIE Rev. Sci. Tech.* 19, 160–165.
- Moldoveanu, B., Otmishi, P., Jani, P., Walker, J., Sarmiento, X., Guardiola, J., Saad, M., Yu, J., 2009. Inflammatory mechanisms in the lung. *J. Inflamm. Res.* 2, 1–11.
- Müller, Hannes, 2020. *Grafische Gestaltung Abb. 1.1.* TourTouch UG.
- Mungall, B.A., Middleton, D., Crameri, G., Bingham, J., Halpin, K., Russell, G., Green, D., McEachern, J., Pritchard, L.I., Eaton, B.T., Wang, L.-F., Bossart, K.N., Broder, C.C., 2006. Feline Model of Acute Nipah Virus Infection and Protection with a Soluble Glycoprotein-Based Subunit Vaccine. *J. Virol.* 80, 12293–12302.
- Munir, M., Berg, M., 2013. The multiple faces of protein kinase R in antiviral defense. *Virulence* 4, 85–89.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., 2009. *Janeway Immunologie*, 7. Auflage. ed. Spektrum Akademischer Verlag.
- Negrete, O.A., Levroney, E.L., Aguilar, H.C., Bertolotti-Ciarlet, A., Nazarian, R., Tajyar, S., Lee, B., 2005. EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus. *Nature* 436, 401–405.
- Negrete, O. a., Wolf, M.C., Aguilar, H.C., Enterlein, S., Wang, W., Mühlberger, E., Su, S. V., Bertolotti-Ciarlet, A., Flick, R., Lee, B., 2006. Two key residues in EphrinB3 are critical for its use as an alternative receptor for Nipah virus. *PLoS Pathog.* 2, 0078–0086.
- Neil, S.J.D., Sandrin, V., Sundquist, W.I., Bieniasz, P.D., 2007. An Interferon- α -Induced Tethering Mechanism Inhibits HIV-1 and Ebola Virus Particle Release but Is Counteracted by the HIV-1 Vpu Protein. *Cell Host Microbe* 2, 193–203.
- Neil, S.J.D., Zang, T., Bieniasz, P.D., 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425–431.
- Nguyen, D.T., de Vries, R.D., Ludlow, M., van den Hoogen, B.G., Lemon, K., van Amerongen, G., Osterhaus, A.D.M.E., De Swart, R.L., Duprex, W.P., 2013. Paramyxovirus infections in *ex vivo* lung slice cultures of different host species. *J. Virol. Methods* 193, 159–165.
- Odendall, C., Kagan, J.C., 2015. The unique regulation and functions of type III interferons in antiviral immunity. *Curr. Opin. Virol.* 12, 47–52.
- Onoguchi, K., Yoneyama, M., Takemura, A., Akira, S., Taniguchi, T., Namiki, H., Fujita, T., 2007. Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J. Biol. Chem.* 282, 7576–7581.
- Outlioua, A., Pourcelot, M., Arnoult, D., 2018. The role of optineurin in antiviral type I interferon production. *Front. Immunol.* 9.

- Pager, C.T., Craft, W.W., Patch, J., Dutch, R.E., 2006. A mature and fusogenic form of the Nipah virus fusion protein requires proteolytic processing by cathepsin L. *Virology* 346, 251–257.
- Pallister, J.A., Klein, R., Arkinstall, R., Haining, J., Long, F., White, J.R., Payne, J., Feng, Y.R., Wang, L.F., Broder, C.C., Middleton, D., 2013. Vaccination of ferrets with a recombinant G glycoprotein subunit vaccine provides protection against Nipah virus disease for over 12 months. *Virol. J.* 10, 1–7.
- Pallivalappil, B., Ali, A., Thulaseedharan, N., Karadan, U., Chellenton, J., Dipu, K., Kumar, A.A., Kumar, K.S., Rajagopal, T., Suraj, K., Kumar, G.S., Supreeth, R., Yelisetti, M., Muthyala, P.R., Aryasree, K., Rao, K.A., 2020. Dissecting an Outbreak: A Clinico-epidemiological Study of Nipah Virus Infection in Kerala, India, 2018. *J Glob Infect Dis.* 12, 21–27.
- Palmer, A., Klein, R., 2003. Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. *Genes Dev.* 17, 1429–1450.
- Parashar, U.D., Sunn, L.M., Ong, F., Mounts, A.W., Arif, M.T., Ksiazek, T.G., Kamaluddin, M.A., Mustafa, A.N., Kaur, H., Ding, L.M., Othman, G., Radzi, H.M., Kitsutani, P.T., Stockton, P.C., Arokiasamy, J., Gary, Jr., H.E., Anderson, L.J., 2000. Case-Control Study of Risk Factors for Human Infection with a New Zoonotic Paramyxovirus, Nipah Virus, during a 1998–1999 Outbreak of Severe Encephalitis in Malaysia. *J. Infect. Dis.* 181, 1755–1759.
- Pasquale, E.B., 2008. Eph-Ephrin Bidirectional Signaling in Physiology and Disease. *Cell* 133, 38–52.
- Paton, N.I., Leo, Y.S., Zaki, S.R., Auchus, A.P., Lee, K.E., Ling, A.E., Chew, S.K., Ang, B., Rollin, P.E., Umapathi, T., Sng, I., Lee, C.C., Lim, E., Ksiazek, T.G., 1999. Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. *Lancet* 354, 1253–1256.
- Perelygin, A.A., Zharkikh, A.A., Scherbik, S. V., Brinton, M.A., 2006. The mammalian 2'-5' oligoadenylate synthetase gene family: Evidence for concerted evolution of paralogous Oas1 genes in Rodentia and Artiodactyla. *J. Mol. Evol.* 63, 562–576.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Näslund, T.I., Liljeström, P., Weber, F., Reis E Sousa, C., 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* (5801). 314, 997–1001.
- Placke, M.E., Fisher, G.L., 1987. Adult peripheral lung organ culture-A model for respiratory tract toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 90, 284–298.
- Prokunina-Olsson, L., Muchmore, B., Tang, W., Pfeiffer, R.M., Park, H., Dickensheets, H., Hergott, D., Porter-Gill, P., Mumy, A., Kohaar, I., Chen, S., Brand, N., Tarway, M., Liu, L., Sheikh, F., Astemborski, J., Bonkovsky, H.L., Edlin, B.R., Howell, C.D., Morgan, T.R., Thomas, D.L., Rehermann, B., Donnelly, R.P., O'Brien, T.R., 2013. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat. Genet.* 45, 164–173.
- Provitro, Passage kit 4, Version 3.0.
https://www.provitro.de/fileadmin/provitro-data/Culture_Media/2040004.Passage_kit_4.v3.0.pdf (Stand 19.08.2020).

- Pulliam, J.R.C., Epstein, J.H., Dushoff, J., Rahman, S.A., Bunning, M., Jamaluddin, A.A., Hyatt, A.D., Field, H.E., Dobson, A.P., Daszak, P., (HERG), and the H.E.R.G., 2012. Agricultural intensification, priming for persistence and the emergence of Nipah virus: A lethal bat-borne zoonosis. *J. R. Soc. Interface* 9, 89–101.
- QIAGEN, 2019. RNeasy Mini Handbook, 1–100.
<https://www.qiagen.com/de/resources/download.aspx?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en> (Stand 19.08.2020)
- Radoshitzky, S.R., Dong, L., Chi, X., Clester, J.C., Retterer, C., Spurgers, K., Kuhn, J.H., Sandwick, S., Ruthel, G., Kota, K., Boltz, D., Warren, T., Kranzusch, P.J., Whelan, S.P.J., Bavari, S., 2010. Infectious Lassa Virus, but Not Filoviruses, Is Restricted by BST-2/Tetherin. *J. Virol.* 84, 10569–10580.
- Ressmeyer, A.R., Larsson, A.K., Vollmer, E., Dahlèn, S.E., Uhlig, S., Martin, C., 2006. Characterisation of guinea pig precision-cut lung slices: Comparison with human tissues. *Eur. Respir. J.* 28, 603–611.
- Ritter, M., Mennerich, D., Weith, A., Seither, P., 2005. Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: Strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the regulation of Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response. *J. Inflamm.* 2, 1–15.
- Robb, C.T., Regan, K.H., Dorward, D.A., Rossi, A.G., 2016. Key mechanisms governing resolution of lung inflammation. *Semin. Immunopathol.* 38, 425–448.
- Rockx, B., Brining, D., Kramer, J., Callison, J., Ebihara, H., Mansfield, K., Feldmann, H., 2011. Clinical outcome of henipavirus infection in hamsters is determined by the route and dose of infection. *J. Virol.* 85, 7658–7671.
- Rodriguez, J.J., Cruz, C.D., Horvath, C.M., 2004. Identification of the Nuclear Export Signal and STAT-Binding Domains of the Nipah Virus V Protein Reveals Mechanisms Underlying Interferon Evasion. *J. Virol.* 78, 5358–5367.
- Rosseau, S., Selhorst, J., Wiechmann, K., Leissner, K., Maus, U., Mayer, K., Grimminger, F., Seeger, W., Lohmeyer, J., 2000. Monocyte Migration Through the Alveolar Epithelial Barrier: Adhesion Molecule Mechanisms and Impact of Chemokines. *J. Immunol.* 164, 427–435.
- Sang, Y., Bergkamp, J., Blecha, F., 2014. Molecular evolution of the porcine type I interferon family: Subtype-specific expression and antiviral activity. *PLoS One* 9, 1–14.
- Sang, Y., Rowland, R.R.R., Blecha, F., 2010. Molecular characterization and antiviral analyses of porcine type III interferons. *J. Interf. Cytokine Res.* 30, 801–807.
- Sarkis, P.T.N., Ying, S., Xu, R., Yu, X.-F., 2006. STAT1-Independent Cell Type-Specific Regulation of Antiviral APOBEC3G by IFN- α . *J. Immunol.* 177, 4530–4540.
- Satterfield, B. a, Cross, R.W., Fenton, K. a, Agans, K.N., Basler, C.F., Geisbert, T.W., Mire, C.E., 2015. The immunomodulating V and W proteins of Nipah virus determine disease course. *Nat. Commun.* 6, 1–15.

- Sauerhering, L., 2014. Einfluss von Wirtsfaktoren auf die Nipahvirus-Infektion humaner und porciner Bronchial-Epithelzellen.
- Sauerhering, L., Kupke, A., Meier, L., Dietzel, E., Hoppe, J., Gruber, A.D., Gattenloehner, S., Witte, B., Fink, L., Hofmann, N., Zimmermann, T., Goesmann, A., Nist, A., Stiewe, T., Becker, S., Herold, S., Peteranderl, C., 2020. Cyclophilin Inhibitors Restrict Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Via Interferon λ In Vitro And In Mice. *Eur. Respir. J.*
- Sauerhering, L., Müller, H., Behner, L., Elvert, M., Fehling, S.K., Strecker, T., Maisner, A., 2017. Variability of interferon- λ induction and antiviral activity in nipah virus infected differentiated human bronchial epithelial cells of two human donors. *J. Gen. Virol.* 98, 2447–2453.
- Sauerhering, L., Zickler, M., Elvert, M., Behner, L., Matrosovich, T., Erbar, S., Matrosovich, M., Maisner, A., 2016. Species-specific and individual differences in Nipah virus replication in porcine and human airway epithelial cells. *J. Gen. Virol.* 97, 1511–1519.
- Sauter, D., 2014. Counteraction of the multifunctional restriction factor tetherin. *Front. Microbiol.* 5, 1–14.
- Schlaak, J.F., Hilkens, C.M.U., Costa-Pereira, A.P., Strobl, B., Aberger, F., Frischauf, A.-M., Kerr, I.M., 2002. Cell-type and donor-specific transcriptional responses to interferon- α : Use of customized gene arrays. *J. Biol. Chem.* 277, 49428–49437.
- Schmidt, H., Rothhämel, S., 2012. Kapitel 4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR), In *Gentechnische Methoden*, 5. Auflage. ed. Spektrum Akademischer Verlag.
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., Rice, C.M., 2014. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses *William. Annu Rev Immunol.* 32, 513–545.
- Schoggins, J.W., 2019. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu. Rev. Virol.* 6, 567–584.
- Schoggins, J.W., Rice, C.M., 2011. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr. Opin. Virol.* 1, 519–525.
- Schubert, J., 2018. Kapitel 2 Aufbau des Lungen- und Bronchialsystem, in *Pneumologische Zytopathologie*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- Sha, Q., Truong-Tran, A.Q., Plitt, J.R., Beck, L.A., Schleimer, R.P., 2004. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31, 358–364.
- Shaw, M.L., Cardenas, W.B., Zamarin, D., Palese, P., Basler, C.F., 2005. Nuclear Localization of the Nipah Virus W Protein Allows for Inhibition of both Virus- and Toll-Like Receptor 3-Triggered Signaling Pathways. *J. Virol.* 79, 6078–6088.
- Shaw, M.L., García-Sastre, A., Palese, P., Basler, C.F., 2004. Nipah virus V and W proteins have a common STAT1-binding domain yet inhibit STAT1 activation from the cytoplasmic and nuclear compartments, respectively. *J. Virol.* 78, 5633–5641.

- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T.E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., Ostrander, C., Dong, D., Shin, J., Presnell, S., Fox, B., Haldeman, B., Cooper, E., Taft, D., Gilbert, T., Grant, F.J., Tackett, M., Krivan, W., McKnight, G., Clegg, C., Foster, D., Klucher, K.M., 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* 4, 63–68.
- Singh, R.K., Dhama, K., Chakraborty, S., Tiwari, R., Natesan, S., Khandia, R., Munjal, A., Vora, K.S., Latheef, S.K., Karthik, K., Singh Malik, Y., Singh, R., Chaicumpa, W., Mourya, D.T., 2019. Nipah virus: epidemiology, pathology, immunobiology and advances in diagnosis, vaccine designing and control strategies—a comprehensive review. *Vet. Q.* 39, 26–55.
- Siqueira, F.M., Pérez-Wohlfeil, E., Carvalho, F.M., Trelles, O., Schrank, I.S., Vasconcelos, A.T.R., Zaha, A., 2017. Microbiome overview in swine lungs. *PLoS One* 12, 1–12.
- Sirén, J., Imaizumi, T., Sarkar, D., Pietilä, T., Noah, D.L., Lin, R., Hiscott, J., Krug, R.M., Fisher, P.B., Julkunen, I., Matikainen, S., 2006. Retinoic acid inducible gene-I and mda-5 are involved in influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines. *Microbes Infect.* 8, 2013–2020.
- Stanifer, M.L., Pervolaraki, K., Boulant, S., 2019. Differential regulation of type I and type III interferon signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1–22.
- Tan, C.T., Goh, K.J., Wong, K.T., Sarji, S.A., Chua, K.B., Chew, N.K., Murugasu, P., Loh, Y.L., Chong, H.T., Tan, K.S., Thayaparan, T., Kumar, S., Jusoh, M.R., 2002. Relapsed and late-onset Nipah encephalitis. *Ann. Neurol.* 51, 703–708.
- Tan, K.-S., Tan, C., Goh, K., 1999. Epidemiological aspects of Nipah virus infection. *Neurol J Southeast Asia* 4, 77–81.
- Thermo Fisher Scientific, Applied biosystems, 2016. Real-time PCR : understanding Ct. <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf> (Stand 19.08.2020)
- Thermo Scientific, 2012. NanoDrop Lite, User Guide. Revision A. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/User-Guide-2752-NanoDrop-Lite-UG.pdf> (Stand 19.08.2020)
- Thermo Scientific, 2011. Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 1–9, Rev.9. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012924_Maxima_SYBR_GreenROX_qPCR_MasterMix_k0221_UG.pdf (Stand 19.08.2020)
- Thermo Fisher Scientific. Important Parameters of Quantitative PCR (qPCR) Analysis. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/appendix/pcr_rtqcr/important%20parameters%20of%20qpcr.pdf (Stand 19.08.2020)
- Thomas, B., Chandran, P., Lilabi, M.P., George, B., Sivakumar, C.P., Jayadev, V.K., Bindu, V., Rajasi, R.S., Vijayan, B., Mohandas, A., Hafeez, N., 2019. Nipah Virus Infection in Kozhikode, Kerala, South India, in 2018: Epidemiology of an Outbreak of an Emerging Disease. *Indian J Community Med* 44, 383–387.

- Thomé, H., 2004. 2 Mundhöhle und Schlundkopf, Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band II Eingeweide, 9. Auflage. ed. Parey.
- Tosi, M.F., Stark, J.M., Smith, C.W., Hamedani, A., Gruenert, D.C., Infeld, M.D., 1992. Induction of ICAM-1 expression on human airway epithelial cells by inflammatory cytokines: effects on neutrophil-epithelial cell adhesion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7, 214–221.
- Travanty, E., Zhou, B., Zhang, H., Di, Y.P., Alcorn, J.F., Wentworth, D.E., Mason, R., Wang, J., 2015. Differential Susceptibilities of Human Lung Primary Cells to H1N1 Influenza Viruses. *J. Virol.* 89, 11935–11944.
- Ueta, M., Mizushima, K., Yokoi, N., Naito, Y., Kinoshita, S., 2010. Gene-expression analysis of polyI:C-stimulated primary human conjunctival epithelial cells. *Br. J. Ophthalmol.* 94, 1528–1532.
- Valbuena, G., Halliday, H., Borisevich, V., Goetz, Y., Rockx, B., 2014. A Human Lung Xenograft Mouse Model of Nipah Virus Infection. *PLoS Pathog.* 10, 1–11.
- Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R.L., Mitchell, R., Johnson, M., Stephens, E.B., Guatelli, J., 2008. The interferon-induced protein BST-2/CD317 restricts release of virions from infected cells and is down-regulated from the cell surface by HIV-1 Vpu. *Cell Host Microbe* 3, 245–252.
- Vercammen, E., Staal, J., Beyaert, R., 2008. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 13–25.
- Vogt, C., Eickmann, M., Diederich, S., Moll, M., Maisner, A., 2005. Endocytosis of the Nipah Virus Glycoproteins. *J. Virol.* 79, 3865–3872.
- Waibl, H., 2004. 5 Atmungsapparat, Apparatus Respiratorius, Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band II Eingeweide, 9. Auflage. ed. Parey.
- Wang, L.-F., Harcourt, B.H., Yu, M., Tamin, A., Rota, P.A., Bellini, W.J., Eaton, B.T., 2001. Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect.* 3, 279–287.
- Wang, Y.E., Park, A., Lake, M., Pentecost, M., Torres, B., Yun, T.E., Wolf, M.C., Holbrook, M.R., Freiberg, A.N., Lee, B., 2010. Ubiquitin-regulated nuclear-cytoplasmic trafficking of the Nipah virus matrix protein is important for viral budding. *PLoS Pathog.* 6, 1–17.
- Weingartl, H.M., 2015. Hendra and Nipah viruses: pathogenesis, animal models and recent breakthroughs in vaccination. *Vaccine Dev. Ther.* 5, 59–74.
- Weingartl, H.M., Berhane, Y., Caswell, J.L., Loosmore, S., Audonnet, J.-C., Roth, J.A., Czub, M., 2006. Recombinant Nipah Virus Vaccines Protect Pigs against Challenge. *J. Virol.* 80, 7929–7938.
- Winkelmann, A., 2011. Kapitel 13 Brusteingeweide, in Taschenlehrbuch Anatomie. Thieme.
- Wohlsen, A., Martin, C., Vollmer, E., Branscheid, D., Magnussen, H., Becker, W.M., Lepp, U., Uhlig, S., 2003. The early allergic response in small airways of human precision-cut lung slices. *Eur. Respir. J.* 21, 1024–1032.

- Wong, K.T., Shieh, W.-J., Kumar, S., Norain, K., Abdullah, W., Guarner, J., Goldsmith, C.S., Chua, K.B., Lam, S.K., Tan, C.T., Goh, K.J., Chong, H.T., Jusoh, R., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Zaki, S.R., Group, and the N.V.P.W., 2002. Nipah virus infection: pathology and pathogenesis of an emerging paramyxoviral zoonosis. *Am. J. Pathol.* 161, 2153–2167.
- Yob, J.M., Field, H., Rashdi, a. M., Morrissy, C., van der Heide, B., Rota, P., bin Adzhar, a., White, J., Daniels, P., Jamaluddin, a., Ksiazek, T., 2001. Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 439–441.
- Zhang, Q., Ke, H., Blikslager, A., Fujita, T., Yoo, D., 2018. Type III Interferon Restriction by Porcine Epidemic Diarrhea Virus and the Role of Viral Protein nsp1 in IRF1 Signaling. *J. Virol.* 92, 1–23.
- Zhu, J., Ghosh, A., Sarkar, S.N., 2015. OASL – a new player in controlling antiviral innate immunity Jianzhong. *Curr Opin Virol.* 12, 15–19.
- Zhu, J., Zhang, Y., Ghosh, A., Cuevas, R.A., Forero, A., Dhar, J., Ibsen, M.S., Schmid-Burgk, J.L., Schmidt, T., Ganapathiraju, M.K., Fujita, T., Hartmann, R., Barik, S., Hornung, V., Coyne, C.B., Sarkar, S.N., 2014. Antiviral activity of human OASL protein is mediated by enhancing signaling of the RIG-I RNA sensor. *Immunity* 40, 936–948.

Verzeichnis der verwendeten Internetquellen

- <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04199169> (Stand 19.08.2020)
- <https://www.rndsystems.com/resources/posters/pattern-recognition-receptors-innate-immune-response> bzw.
- https://resources.rndsystems.com/images/site/bb2009_issue2_2360.png (Stand 19.08.2020)
- <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-setup.html> (Stand 19.08.2020)
- <https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts> (Stand 19.08.2020)

VII Anhang

A.1 Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
AEGM	<i>Airway Epithelial Cell Growth Medium</i>
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
ATP	Adenosintriphosphat

B

β-ME	β-Mercaptoethanol
BSA	bovines Serumalbumin
BSL-4	<i>biosafety level 4</i>
BST-2	<i>bone marrow stromal antigen 2</i>

C

C (°C)	Celcius (Grad Celsius)
Calu-3	humane Epithelzellen aus einem Lungenkarzinom
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i>
Cardif	<i>caspase activation recruitment domain adaptor inducing IFN-β</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
CPE	Cytopathischer Effekt
CSA	Cyclosporin A
ct	<i>cycle Threshold</i>

D

def.	<i>deficient</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	<i>double-stranded</i> Ribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol

E

EB2	Ephrin-B2
EB3	Ephrin-B2
EDTA	Ethlyendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
eIF	Eukaryotischer Initiationsfaktor
Eph	Ephrin
<i>et.al.</i>	et alii (und andere)

F

F	Fusionsprotein
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum

G

g	Gramm
G	Glykoprotein
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPI	<i>Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol</i>

H

h	Stunde
hAEC	humanen Alveolar-Epithelzellen
HBEpC	humane Bronchial-Epithelzellen
<i>H.influenza</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HiV-1	<i>Human immunodeficiency virus 1</i>
HMW	<i>High molecular weight</i>
H ₂ O	Wasser
HSAEpC	humane <i>Small-Airways</i> -Epithelzellen
HTEpC	humane Tracheal-Epithelzellen

I

IAV	Influenza-A-Virus
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IFIT	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats</i>

IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α Rezeptor
IFNLR1	Interferon- λ -Rezeptor 1
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukin
IP-10	Interferon <i>gamma-induced</i> protein 10
IL-10R2	Interleukin-10-Rezeptor 2
IPS-1	IFN- β promoter stimulator 1
IRF	Interferon-regulierender Faktor
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
ISGF3	<i>IFN-stimulated gene factor 3</i>
ISRE	<i>interferon sensitive response elements</i>
J	
JAK1	Janus Kinase 1
L	
λ	lambda
l	Liter
L	Polymerase
LGP2	<i>laboratory of genetics and physiology 2</i>
LS	porcine <i>ex vivo</i> Lungenschnitte
M	
μ	Mikro
M	Matrixprotein
M	Molar (mol/l)
m	Meter
m	Milli
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
MDA5	melanoma differentiation-associated protein 5
MERS-CoV	<i>Middle East respiratory syndrome coronavirus</i>
min	Minute

MIP-1	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
<i>M.tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N	
n	Nano
N	Nukleoprotein
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>
NFκB	Nuklearfaktor-kappa B
NiV	Nipahvirus
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
O	
OAS	2'-5'-Oligoadenylatsynthetase
P	
P	Phosphoprotein
P	Passage
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBEpC	porcine Bronchial-Epithelzellen
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PKR	Proteinkinase R
Poly(I:C)	<i>polyinosine-polycytidylic acid</i>
PRR	<i>pattern-recognition-receptors</i>
PSAepC	porcine <i>Small-Airways</i> -Epithelzellen
PTEpC	porcine Tracheal-Epithelzellen
Q	
qPCR	quantitative <i>polymerase chain reaction</i>
R	
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
RIP1	Rezeptor-interagierendes Protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
S	
SARS-CoV	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
sek	Sekunde
SOCS1	<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>
SP	Surfactant-Protein
<i>S.pneumonia</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
ssRNA	<i>single-stranded</i> Ribonukleinsäure
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T	
TAB	<i>TGF-Beta-Activated Kinase 1-Binding Protein</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor beta-activated kinase 1</i>
TBK1	<i>TANK Binding Kinase 1</i>
TCID ₅₀	<i>Median tissue culture infectious dose</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIR	Toll-IL-1-Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
TRAF	<i>tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
TRIF	<i>Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN-β</i>
TYK2	Tyrosin Kinase 2
U	
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UPR	<i>unfolded protein response</i>
USP18	<i>Ubiquitin Specific Peptidase 18</i>
V	
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
Vero76	Zellen aus der Niere der grünen Meerkatze

VISA *virus induced signaling adaptor*

Z

z.B. zum Beispiel

ZNS Zentralnervensystem

A.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1: Übertragungswege des Nipahvirus.....	7
Abb. 1.2: Nipahvirus-Ausbrüche mit Anzahl der humanen Infektionen und Letalität.....	8
Abb. 1.3: Aufbau Nipahvirus	12
Abb. 1.4: Verlauf des NiV-Replikationszyklus.....	14
Abb. 1.5: Vereinfachte schematische Darstellung der humanen Atemwege	16
Abb. 1.6: TLR-3 und RIG-I Signalkaskaden.....	22
Abb. 1.7: Typ-I und Typ-III Interferon Signalkaskade und Induktion von Interferon-stimulierten Genen.....	25
Abb. 1.8: Grob skizzierte antivirale Wirkung von den ISG-kodierten Proteinen OAS, PKR, ISG56 (IFIT1) und Tetherin	29
Abb. 1.9: NiV-Infektion in porcinen Atemwegen	30
Abb. 1.10: NiV-Infektion in einem humanen Lungen-Xenograft Mausmodell	31
Abb. 2.1: Infektion von humanen Tracheal- (HTEpC) und Bronchial- (HBEpC) Epithelzellen mit rNiV _{eGFP}	35
Abb. 2.2: Induktion von IFNs in NiV-infizierten humanen Tracheal- (HTEpC) und Bronchial- (HBEpC) Epithelzellen	36
Abb. 2.3: Induktion von IFNs in NiV-infizierten humanen Bronchial- (HBEpC) und <i>Small-Airways</i> - (HSAEpC) Epithelzellen	37
Abb. 2.4: Induktion von ISGs in NiV-infizierten humanen Bronchial- (HBEpC) und <i>Small-Airways</i> - (HSAEpC) Epithelzellen	38
Abb. 2.5: Vergleich der Ephrin-B2 (EB2) Oberflächenexpression in humanen Bronchial- (HBEpC) und <i>Small-Airways</i> - (HSAEpC) Epithelzellen in verschiedenen Passagen.....	39
Abb. 2.6: Vergleich der IFNLR1-Oberflächenexpression in humanen Bronchial- (HBEpC) und <i>Small-Airways</i> - (HSAEpC) Epithelzellen in verschiedenen Passagen	41
Abb. 2.7: Induktion von ISGs in humanen Bronchial- (HBEpC) und <i>Small-Airways</i> - (HSAEpC) Epithelzellen nach Stimulation mit rekombinanten IFN- λ 2.....	42
Abb. 2.8: Induktion von IFNs in NiV-infizierten porcinen Tracheal- (PTEpC), Bronchial- (PBEpC) und <i>Small-Airways</i> - (PSAEpC) Epithelzellen.....	44
Abb. 2.9: NiV-Infektion in porcinen Tracheal- (PTEpC), Bronchial- (PBEpC) und <i>Small-Airways</i> - (PSAEpC) Epithelzellen.....	45
Abb. 2.10: Induktion von IFNs in NiV-infizierten porcinen Tracheal- (PTEpC), Bronchial- (PBEpC) und <i>Small-Airways</i> - (PSAEpC) Epithelzellen.....	46

Abb. 2.11: Induktion von Interleukinen in NiV-infizierten porcinen Tracheal- (PTEpC), Bronchial- (PBEpC) und <i>Small-Airways</i> - (PSAEpC) Epithelzellen	48
Abb. 2.12: NiV-Infektion und IFN-Induktion in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC).....	49
Abb. 2.13: NiV-Infektion und IFN-Induktion in porcinen Bronchial-Epithelzellen (PBEpC) für 24 h und 48 h	50
Abb. 2.14: Induktion von IFNs, ISGs und proinflammatorischen Zytokinen in NiV-infizierten humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC), mit vergleichbarer intrazellulärer viraler RNA Menge	52
Abb. 2.15: Relative Induktion von Zytokinen und ISGs in NiV-infizierten humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC)	54
Abb. 2.16: Vergleich der Hochregulierung von IFN in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC) nach Stimulation mit Poly(I:C)	55
Abb. 2.17: Vergleich der Hochregulierung von ISGs in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC) nach Stimulation mit Poly(I:C)	57
Abb. 2.18: Vergleich der Hochregulierung von proinflammatorischen Zytokinen in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC) nach Stimulation mit Poly(I:C).....	58
Abb. 2.19: Virus-Freisetzung und Replikation in NiV-infizierten humanen (HBEpC) und porcinen Bronchial- (PBEpC) Epithelzellen	59
Abb. 2.20: Einfluss der NiV-Infektion auf die Induktion von Tetherin in humanen (HBEpC) und porcinen Bronchial- (PBEpC) Epithelzellen	60
Abb. 2.21: Einfluss von Cyclosporin A (CSA) auf die NiV-Replikation und Freisetzung aus Calu-3-Zellen.....	62
Abb. 2.22: Einfluss von Cyclosporin A (CSA) auf die NiV-Replikation und Freisetzung in humanen (HBEpC) und porcinen Bronchial- (PBEpC) Epithelzellen	63
Abb. 2.23: Induktion von IFN- λ 2,3 nach Behandlung mit Cyclosporin A (CSA) in humanen und porcinen Bronchial-Epithelzellen (HBEpC und PBEpC)	64
Abb. 2.24: Durchlicht-mikroskopische Aufnahme der zilienträgenden Zellen in den porcinen <i>ex vivo lung slice cultures</i> (LS)	66
Abb. 2.25: Infektion von porcinen <i>ex vivo</i> Lungenschnitten (LS) mit rNiV _{eGFP}	67
Abb. 5.1: NiV-N Standardkurve	95
Abb. 5.2: Spezifität der humanen und porcinen qPCR Primer	97

Abb. 5.3: Grobe Skizzierung, aus welchen Abschnitten die Tracheal- (PTEpC), Bronchial- (PBEpC) und <i>Small-Airways</i> - (PSAEpC) Epithelzellen isoliert wurden	99
Abb. 5.4: Isolierung von porcinen Atemwegsepithelzellen aus Bronchien.....	101
Abb. 5.5: Charakterisierung von isolierten Epithelzellen, am Beispiel der primären porcinen Bronchial-Epithelzellen (PBEpC)	102
Abb. 5.6: Präparation und Kultivierung von porcinen <i>ex vivo lung slice cultures</i> (LS)	107
Tab. 5.1: Verwendete humane und porcine <i>forward</i> (<i>for</i>) und <i>reverse</i> (<i>rev</i>) Primer für qPCR ..	91

A.3 Publikationsliste

Veröffentlichungen

Elvert, M., Sauerhering, L., Heiner, A., Maisner, A. **Isolation of primary porcine bronchial epithelial cells for Nipah virus infections.** Methods in Molecular Biology. (Manuskript fertig zur Einreichung)

Elvert, M., Sauerhering, L., Maisner, A., 2020. **Cytokine Induction in Nipah Virus-Infected Primary Human and Porcine Bronchial Epithelial Cells.** J. Infect. Dis. 221, S395–S400.

Sauerhering, L., Müller, H., Behner, L., **Elvert, M.,** Fehling, S.K., Strecker, T., Maisner, A., 2017. **Variability of interferon- λ induction and antiviral activity in nipah virus infected differentiated human bronchial epithelial cells of two human donors.** J. Gen. Virol. 98, 2447–2453.

Vorträge

Elvert, M., Maisner, A., 2019. **Characterization of NiV infection in primary human and porcine airway epithelial cultures.** 2nd Paramyxo-Meeting, 18.03.-19.03.2019, Langen, Germany

Elvert, M., Maisner, A., 2018. **Nipah virus replication and cytokine induction in human airway cultures.** Kick-off (1st) Paramyxo-Meeting, 12.03.-13.03.2018, Marburg, Germany

Poster

Elvert, M., Sauerhering, L., Behner, L., Maisner, A., 2018. Nipah virus replication in respiratory epithelial cells: Cytokine induction differs in human airway cultures from trachea and bronchi. International Symposium SFB 1021, 19.09.-21.09.2018, Marburg, Germany

Elvert, M., Sauerhering, L., Maisner, A., 2018. Nipah virus replication and cytokine induction differs in human airway cultures from trachea and bronchi. 28th Annual Meeting of the Society for Virology (GfV), 14.03. – 17.03.2018, Würzburg, Germany

Elvert, M., Dolnik, O., Sauerhering, S., Maisner, A., 2017. Establishment of recombinant VSveGFPΔG viruses pseudotyped with Nipah virus surface proteins. 27th Annual Meeting of the Society for Virology (GfV), 22.03. – 25.03.2017, Marburg, Germany

A.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrenden waren folgende Damen und Herren an der Philipps-Universität Marburg:

Adamkiewicz, Adhikary, Agarwal, Arenz, Bacher, Balzer-Geldsetzer, Baranovski, Bartsch, S. Bauer, U-M. Bauer, Becker, Bette, Brandt, Brehm, Brendel, Buchholz, Burchert, Busch, Czubayko, Daut, Dodel, Eickmann, Elsässer, Eming, Feuser, Friebertshäuser, Garn, Greiner, Grgic, Grosse, Hänze, Hertl, Holst, Huber, Jacob, Keller, Kerwat, Khan, Kinscherf, Konrad, Lill, Lohoff, Maisner, Milani, Müller-Brüsselbach, Oliver, Pankuweit, Parak, Plant, Preisig-Müller, Przyborski, Reinartz, Reinhard, Reiß, Rust, Schieffer, Schmeck, Schnare, Schratt, Schütz, Sittka, Slenczka, Sprenger, Steinhoff, Strauer, Suske, Ter Meulen, Timmelsfeld, Visekruna, Weber, Weirich, Westermann, Worzfeld, Wrocklage, Yu, Zemlin

A.5 Lebenslauf

A.6 Danksagung

DANKE,

Prof. Dr. Andrea Maisner, dass ich meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen durfte.
Danke für die Betreuung, Unterstützung und Diskussionen während der gesamten Zeit!

Prof. Dr. Stefan Becker, sowie dem gesamten Institut für Virologie und auch vielen ehemaligen Mitarbeitern für die tolle Arbeitsatmosphäre und die offenen Ohren bei Fragen.

Der Jürgen-Manchot-Stiftung für die Finanzierung meiner Promotion und meines Projektes, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Markus, Olga und Anja für die großartige Einarbeitung in das BSL-4 Labor und dem gesamten BSL-4 Team mit Gotthard und Michael für den reibungslosen Ablauf und die Unterstützung.

Dem Schlachtbetrieb Klaus Wiegand in Münchhausen für die jahrelange Versorgung und unproblematische Bestellung von Schweinelungen.

Anja, dass du mir seit Jahren immer wieder Schweinelungen mitbringst und für das Butterbrot-Angebot, wenn mein Auto mal wieder zu häufig in der Werkstatt war!

Lucie für die Unterstützung und Aufmunterung!

An die aktuelle AG-Maisner mit Anja, Nico, Julian, Malte, Kathleen und den Pausen-Kollegen Lucie und Lars, sowie den ehemaligen Mitarbeitern Erik, Laura, Marc, Louisa und Ilka für die wissenschaftliche und unwissenschaftliche grandiose Zeit im Labor und außerhalb.

Sinja, Nico und Lucie für die Korrektur und das Feedback meiner Arbeit.

Sinja für die beste WG-Zeit und für das Dasein in soo vielen Momenten!

Allen Freunden, verstreut in Deutschland, besonders Elena, Irene und der gesamten Bremen-Crew für die ganzen tollen Erinnerungen und Erlebnisse.

Meiner Familie für die ganze Unterstützung in so vieler Hinsicht und euer Vertrauen, ohne das ich nicht so weit gekommen wäre!

Hannes für den Halt und die Kraft, die du mir gibst und für die unvergesslichen Abenteuer der letzten Jahre!

A.7 Ehrenwörtliche Erklärung