

# **Die Rolle des sympathischen Nervensystems im murinen Friend Retrovirus-Infektionsmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für  
Biologie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Dominique Blömker  
aus Essen

November 2015

Für meinen Vater *Walter Blömker*

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensimmunbiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Engler

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Hansen

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. U. Dittmer

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Februar 2016

**Jedes Naturgesetz, das sich dem Beobachter offenbart, lässt auf ein höheres, noch unerkanntes schließen.**

*Alexander von Humboldt*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Infektionen .....	1
1.1.1 Die Vielfalt der Pathogene .....	1
1.1.2 Infektionsimmunologie .....	2
1.2 Einfluss des Nervensystems auf Infektionen.....	5
1.2.1 Neuro-Immun-Interaktionen .....	5
1.2.2 Sympathikus-vermittelte Modulation von Immunprozessen.....	7
1.2.3 Sympathikus-vermittelter Einfluss auf Infektionen.....	9
1.2.4 Das SNS und retrovirale Infektionen .....	11
1.3 Das Friend Virus - ein retrovirales Infektionsmodell in der Maus.....	12
1.3.1 Aufbau und Replikationszyklus von Retroviren .....	12
1.3.2 Der Friend-Retrovirus-Komplex .....	15
1.3.2.1 FV-Vermehrungsstrategie .....	15
1.3.2.2 FV-induzierte Immunantworten .....	16
1.4 Zielsetzung .....	17
<b>2. Material</b> .....	18
2.1 Geräte .....	18
2.2 Verbrauchsmaterial .....	19
2.3 Versuchstiere.....	19
2.4 Viren.....	20
2.5 Zelllinie .....	20
2.6 Chemikalien und Medien .....	20
2.7 Pharmakologische Substanzen .....	22
2.8 Puffer und Medien.....	22
2.9 Antikörper .....	24
2.10 Oligonukleotide.....	25
2.11 Kommerzielle Tests.....	26
2.12 Verwendete Software .....	27
<b>3. Methoden</b> .....	28
3.1 FV-Infektion.....	28
3.2 Organentnahme .....	28
3.3 <i>In vivo</i> -Experimente während der akuten FV-Infektion.....	29
3.3.1 Neurotransmitter-Konzentration der Milz.....	29
3.3.2 Behandlung mit einem selektiven $\beta_2$ -AR Agonisten.....	29

3.3.3 MAO-A- und COMT-Enzymblockade .....	30
3.3.4 Chemische Sympathektomie .....	31
3.3.5 Behandlung mit $\alpha$ - und $\beta$ -AR Antagonisten.....	32
3.4 <i>In vivo</i> -Experimente während der chronischen FV-Infektion .....	33
3.4.1 Chemische Sympathektomie .....	33
3.4.2 Behandlung mit einem selektiven $\beta_2$ -AR Agonisten.....	33
3.5 Verarbeitung von Gewebeproben.....	34
3.5.1 Herstellung einer Zellsuspension aus der Milz .....	34
3.5.2 Zellzahlbestimmung .....	34
3.5.3 Isolierung von Ter119 <sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen mittels MACS .....	35
3.5.4 Herstellung von Zelllysaten für RNA-Analysen .....	35
3.5.5 Herstellung von Gewebelysaten für Protein-Analysen .....	36
3.5.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	36
3.6 Zellkultur.....	36
3.6.1 Kultivierung der <i>Mus dunni</i> -Fibroblasten Zelllinie.....	36
3.6.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	37
3.6.3 <i>Infectious Center Assay</i> .....	37
3.6.4 F-MuLV-Test .....	38
3.7 Immunologische und molekularbiologische Methoden .....	39
3.7.1 Durchflusszytometrie .....	39
3.7.1.1 Zelloberflächen-Färbung.....	40
3.7.1.2 Färbung intrazellulärer Zytokine.....	40
3.7.2 Nachweis spezifischer Proteine.....	41
3.7.2.1 Bestimmung des Proteingehalts mittels Pierce BCA Protein Assay .....	41
3.7.2.2 Proteinauftrennung durch die diskontinuierliche SDS-PAGE .....	41
3.7.2.3 Antikörper-vermittelte Detektion spezifischer Proteine mittels Western Blot.....	42
3.7.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	43
3.7.3.1 RNA-Extraktion aus Zelllysaten .....	44
3.7.3.2 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT-PCR) .....	44
3.7.3.3 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) .....	45
3.8 Das parasitische <i>Litomosoides sigmodontis</i> -Infektionsmodell.....	45
3.9 Statistische Analysen.....	46
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
4.1 Lokale Neurotransmitter-Konzentration in der Milz akut FV-infizierter Mäuse.....	48
4.1.1 Der akute FV-Infektionsverlauf .....	48
4.1.2 Neurotransmitter-Konzentration der Milz.....	48

4.1.3 Einfluss von Noradrenalin auf die FV-Replikation.....	50
4.2 Effekt eines $\beta_2$ -AR-Agonisten auf die akute FV-Infektion .....	51
4.3 Einfluss Katecholamin-degradierender Enzyme auf die akute FV-Infektion .....	52
4.3.1 MAO-A und COMT Protein-Expression .....	53
4.3.2 Effekt einer pharmakologischen Enzymblockade von MAO-A und COMT .....	53
4.4 Chemische Sympathektomie im akuten FV-Infektionsverlauf .....	55
4.4.1 Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf die FV-induzierte Splenomegalie .....	55
4.4.2 Auswirkungen einer chemischen Sympathektomie auf die Viruslast .....	57
4.4.3 Effekt einer chemischen Sympathektomie auf zelluläre Parameter .....	57
4.5 Adrenerge Rezeptorblockade im akuten FV-Infektionsverlauf .....	60
4.5.1 Einfluss einer $\alpha$ - und $\beta$ -AR-Rezeptorblockade .....	60
4.6 Chemische Sympathektomie im chronischen FV-Infektionsmodell .....	62
4.7 $\beta_2$ -AR-Agonisten Einfluss im chronischen FV-Infektionsmodell.....	63
4.8 Sympathischer Einfluss im parasitären <i>Litomosoides sigmodontis</i> -Infektionsmodell .....	65
4.8.1 Effekt einer <i>L.s.</i> -Infektion auf das Gewicht und die NA-Konzentration der Milz.....	65
<b>5. Diskussion</b> .....	67
5.1 Mögliche Ursachen für die FV-induzierte NA-Depletion in der Milz .....	67
5.2 Adrenozeptor-vermittelte Einflüsse auf die FV-Infektion .....	71
5.3 Einfluss des SNS auf unterschiedliche Immunparameter .....	72
5.4 Die Rolle des SNS im FV-Infektionsmodell.....	74
5.5 NA-Depletion ist nicht pathogen-spezifisch .....	76
5.6 Ausblick .....	77
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	79
6.1 Summary .....	80
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	81
<b>8. Anhang</b> .....	92
8.1 Abkürzungsverzeichnis .....	92
8.2 Abbildungsverzeichnis .....	96
8.3 Tabellenverzeichnis.....	98
8.4 Publikationen.....	99
8.5 Danksagung.....	100
8.6 Lebenslauf .....	102
8.7 Erklärungen .....	104

# 1. Einleitung

## 1.1 Infektionen

Infektionen und die durch sie verursachten Erkrankungen sind seit jeher ein ständiger Begleiter von Mensch und Tier. Verursacht durch unterschiedlichste Mikro- und Makroorganismen, nehmen sie Einfluss auf Gesundheit, Vitalität und Mortalität des Wirtes. Die Übertragung von Erregern kann über verschiedenste Wege, wie z. B. von Mensch zu Mensch, von Tier zu Mensch, über die Nahrungsaufnahme oder die allgemeine Umwelt erfolgen. Demzufolge können sich Infektionskrankheiten in kürzester Zeit von sporadischen einzelnen Infektionen zu Endemien, Epidemien und Pandemien entwickeln und somit schnell globale medizinische Notstände herbeiführen [Groß, 2009; Renz-Polster, 2012]. Aktuellen Statistiken der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*; WHO) zufolge befinden sich unter den zehn häufigsten weltweiten Todesursachen drei Infektionskrankheiten. In den Entwicklungsländern sind es sogar fünf. Darunter zählen Atemwegsinfektionen, die Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und das mit ihm verbundene erworbene Immundefektsyndrom (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*; AIDS), Durchfallerkrankungen, Malaria und Tuberkulose [WHO Bericht, 2012]. Diese Diskrepanz erklärt sich vor allem durch den medizinischen, wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Vorsprung der Industriestaaten. Nichtsdestotrotz wird durch Bevölkerungszunahmen, zunehmende Mobilität, Nahrungsmittelaufbereitung und -verteilung, Massentierhaltung, Impfmüdigkeit und den unnötig hohen Gebrauch von Antibiotika, auch in diesen Ländern die Ausbreitung von humanpathogenen Erregern wieder beachtlich begünstigt [Geffers, 2011; Hacker, 2003]. Infektionen stellen also ein weltweites zentrales Problem des 21. Jahrhunderts und somit einen essentiellen Schwerpunkt in der medizinischen Forschung dar [Hacker, 2003].

### 1.1.1 Die Vielfalt der Pathogene

Infektionen können durch Prionen, Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten verursacht werden [Groß, 2009; Renz-Polster, 2012]. Somit reicht die Vielfalt der Pathogene über verschiedenste Organismengruppen hinaus und stellt ein erhöhtes Risikopotential für Wirtsorganismen dar. Obwohl sich alle fünf Pathogen-Gruppen in Ursprung, Aufbau und Vermehrungsstrategie sichtlich unterscheiden, können Vertreter aller Gruppen gravierende



Infektionserkrankungen herbeiführen, die bis zum Tod des Wirtes führen. Im Laufe der Evolution haben sich vor allem Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten gezielt an ihre Wirtsorganismen angepasst und unterschiedliche Überlebens- und Vermehrungsstrategien entwickelt [Groß, 2009].

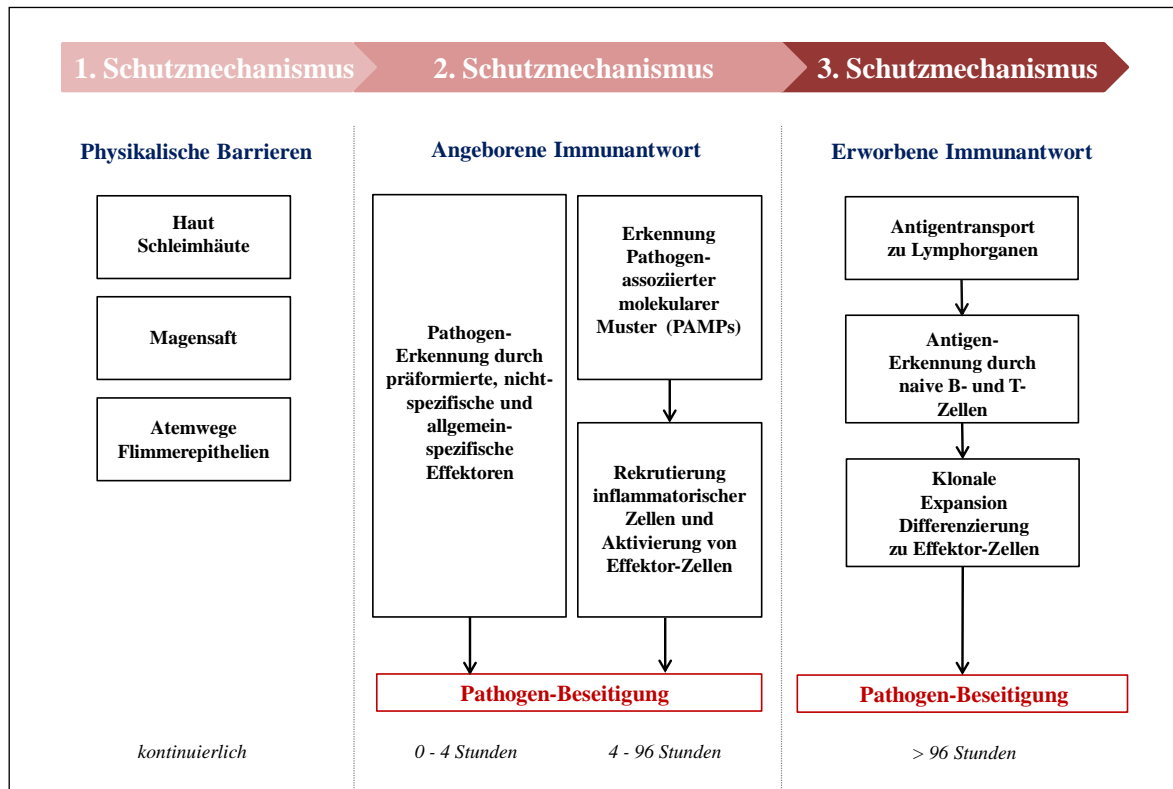
Prionen und Viren sind beispielsweise zu keiner eigenständigen Lebensform befähigt und somit auf wirtseigene Stoffwechselmechanismen angewiesen. Während es sich bei Prionen um aberrante pathogene Formen des Prion Säugetier-Proteins (PrP) handelt, welche zu starken Zellschädigungen respektive neurodegenerativen Krankheiten führen, repräsentieren Viren den größten Anteil an tier- und humanpathogenen Krankheitserregern [Aguzzi, 2013; Modrow, 2010; Renz-Polster, 2012]. Daher ist es nicht überraschend, dass allein die Infektion mit HIV und das mit ihm verbundene erworbene Immundefektsyndrom zu einer der häufigsten Todesursachen weltweit zählen [WHO Bericht, 2012].

Bakterien, Pilze und Parasiten sind dagegen mit einigen Ausnahmen extrazelluläre Pathogene, die zu eigenständigen Lebensformen befähigt sind. Anders als Viren, die durch den Befall von Wirtszellen dem Wirt vor allem auf zellulärer Ebene schaden, führen bei Bakterien, Pilzen und Parasiten vor allem toxische Stoffwechselprodukte zu Krankheitserscheinungen. Zudem verursachen sie meist starke Gewebeschädigungen [Groß, 2009; Renz-Polster, 2012].

### **1.1.2 Infektionsimmunologie**

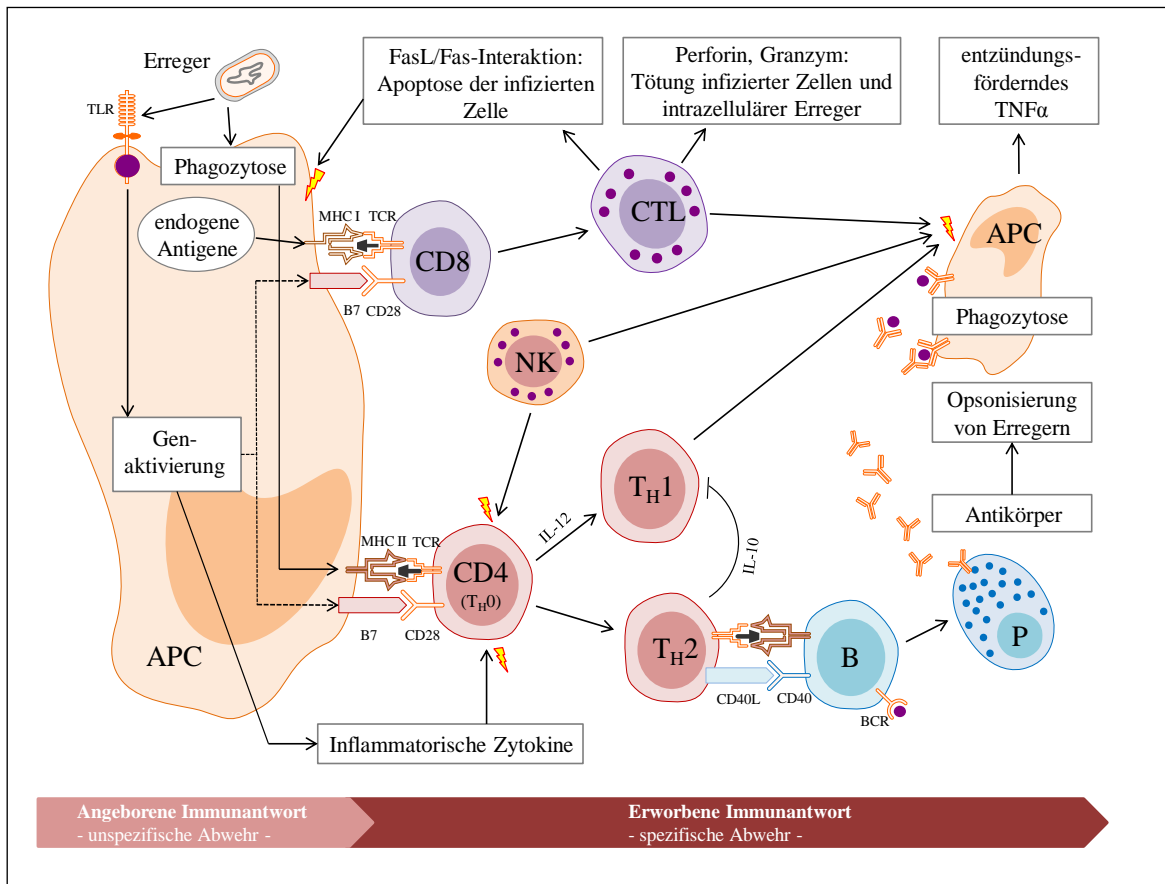
Virulenz und Pathogen-Vielfalt üben seit jeher einen starken Selektionsdruck auf die Wirtsorganismen aus. Infolgedessen entwickelten diese fortwährend Abwehrstrategien bis hin zum hochspezialisierten Immunsystem der heutigen Säugetiere, wie z. B. das des Menschen [Lucius, 2008]. Das Immunsystem lässt sich in zwei stark miteinander verzweigte Bereiche einteilen: Das angeborene Immunsystem (unspezifisch) und das erworbene Immunsystem (spezifisch). Überwinden Pathogene die physikalischen Barrieren des Wirtes greift zunächst das angeborene Immunsystem ein. Dieses wird charakterisiert durch die Aktivität von Phagozyten (Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die schnelle Produktion von inflammatorischen Zytokinen und die Aktivierung des Komplementsystems [Abbas, 2005; Murphy, 2012]. Diese Eigenschaften befähigen das angeborene Immunsystem zu einer schnellen

Eliminierung von körperfremden Komponenten, wodurch es als erste Verteidigungslinie gegen eingedrungene Pathogene fungiert (s. Abb. 1.1).



**Abb. 1.1** Drei-Phasen-Schema der Immunantwort [bearbeitet mit Motifolio nach Murphy, 2012; Turvey, 2010]. Die Immunantwort des Menschen oder anderer Säugetiere kann in drei Phasen eingeteilt werden. Der 1. Schutzmechanismus wird durch physikalische Barrieren gewährleistet. Werden diese trotzdem durch ein Pathogen überwunden, erfolgt die Aktivierung des angeborenen Immunsystems (2. Schutzmechanismus). Im 3. Schutzmechanismus tritt das hochspezifische erworbene Immunsystem in Aktion.

Die erworbene Immunabwehr hingegen tritt vergleichsweise spät im Infektionsverlauf auf. Sie ist sehr spezifisch und baut ein Pathogen-bezogenes Gedächtnis auf, welches dem Wirtsorganismus eine schnellere und effektivere Beseitigung des Pathogens bei erneuter Infektion ermöglicht (s. Abb. 1.2). Zellen des erworbenen Immunsystems sind B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen). Sie werden vor allem durch Komponenten der angeborenen Immunantwort aktiviert und sorgen mit Antikörper- und Granzymproduktion für die effektive Beseitigung der Pathogene [Groß, 2009; Murphy, 2012; Turvey, 2010].



**Abb. 1.2** Interaktion von angeborenem und erworbenem Immunsystem [bearbeitet mit Motifolio nach Groß, 2009; Turvey, 2010]. Mit der Bindung von pathogenen Partikeln oder der Phagozytose von Pathogenen wird eine Antigen-präsentierende Zelle (APC) aktiviert. Es kommt zur Produktion inflammatorischer Zytokine und der Präsentation des Antigens durch die MHC I oder II Rezeptoren an der Oberfläche der Zelle. Diese werden wiederum durch T-Zellrezeptoren (TCR) von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen gebunden. Mit diesem Schritt kommt es folglich zur Initialisierung der erworbenen Immunantwort. Es folgen die Aktivierung von NK-Zellen und die Differenzierung der T-Zellen in aktivierte cytotoxische T-Zellen (CTL) oder T<sub>H1</sub>- oder T<sub>H2</sub>-Zellen. Letztere stehen in Kontakt zu B-Zellen (B), welche zu Plasmazellen (P) differenzieren und Pathogen-spezifische Antikörper sezernieren.

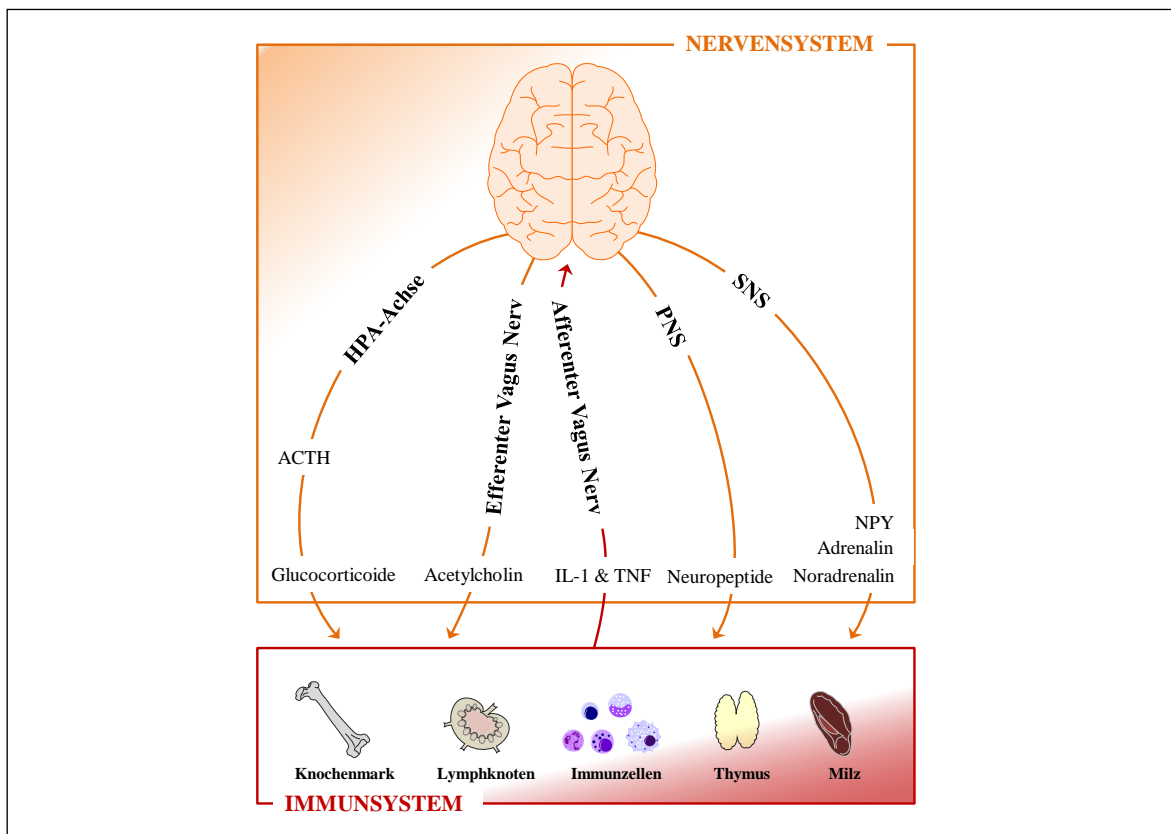
Nichtsdestotrotz ist zu berücksichtigen, dass das Immunsystem im Kampf gegen Infektionen oder andere Krankheiten an sich nicht autonom agiert. Studien der letzten Dekaden zeigten deutlich, dass Immunsystem, Hormonsystem und Nervensystem intensiv miteinander interagieren [Besedovsky, 1996; Pavlov, 2004; Roszman, 1985; Tracey, 2010]. Es sollte demnach beachtet werden, dass die Bekämpfung von Pathogenen nicht allein durch die Immunologie gewährleistet wird [Tracey, 2010]. So können Hormone und Neurotransmitter effektiv Einfluss auf Aktivität und Vitalität von Immunzellen nehmen und infolgedessen Immunantworten gegenüber Pathogenen beachtlich verändern.

## 1.2 Einfluss des Nervensystems auf Infektionen

In den 1980er Jahren konnten neuroanatomische Studien zeigen, dass das Immunsystem und das Nervensystem stark miteinander verknüpft sind [Nance, 2007]. Dabei wurde nachgewiesen, dass Nervenfasern des autonomen Nervensystems lymphoide Organe innervieren und in engem Kontakt zu Immunzellen stehen [Felten, 1984, 1985, 1987; Nance, 2007; Williams, 1980]. Demzufolge gewannen das zentrale und das periphere Nervensystem in der Infektionsforschung mehr und mehr an Bedeutung. Über hormonelle Stressantworten und die Freisetzung von Neurotransmittern reguliert das Nervensystem Immunaktivitäten gegen verschiedenste Pathogene. Während es auf der einen Seite die zelluläre Immunität unterdrückt, verstärkt es auf der anderen die humoralen Immunantworten [Elenkov, 1999; Eskandari, 2002]. Es kann somit einen divergenten Einfluss auf die Pathogenese von Infektionen ausüben. So konnte gezeigt werden, dass bestimmte Hormone oder Neurotransmitter des Nervensystems die HIV-Replikation beschleunigen [Cole, 1998], die Influenza-A-Virus Pathogenese verschlimmern [Grebe 2009, 2010], cytotoxische T-Zell (CTL) Immunantworten gegen das Virus der lymphozytären Choriomeningitis (LCMV) abschwächen [Sommershof, 2011], inflammatorische Immunantworten gegen bakterielle Infektionen inhibieren [Rice, 2001], bakterielles Wachstum fördern oder die Pathogenität von z. B. *Campylobacter jejuni* erhöhen [Belay, 2002; Cogan, 2007]. Insofern scheint das Nervensystem im Verlauf von Infektionen eine wichtige Rolle zu spielen.

### 1.2.1 Neuro-Immun-Interaktionen

Die Interaktion zwischen Nervensystem und Immunsystem erfolgt über verschiedenste bidirektionale Wege (afferent vs. efferent). So kann das Nervensystem aktiv über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse), das periphere Nervensystem (PNS), den parasympathischen Vagus Nerv (VN) oder über das sympathische Nervensystem (SNS) Einfluss auf Immunzellen und deren Eigenschaften nehmen (s. Abb. 1.3). Auf der anderen Seite tritt das Immunsystem über die Ausschüttung von Zytokinen, wie dem Interleukin-1 (IL-1) und dem Tumornekrosefaktor (TNF), in Kontakt mit dem zentralen Nervensystem [Tracey 2002; Sternberg, 2006; Webster, 2002].



**Abb. 1.3** *Neuro-Immun-Interaktionen* [bearbeitet mit Motifolio nach Sternberg, 2006; Tracey, 2002]. Die Interaktion zwischen dem Nervensystem und dem Immunsystem erfolgt über unterschiedliche Wege. So kann das Nervensystem über die HPA-Achse (Glucocorticoide), den Vagus Nerv (Acetylcholin; parasympathisch), das periphere Nervensystem (Neuropeptide) oder das sympathische Nervensystem (Adrenalin, Noradrenalin, NPY) Immunantworten beeinflussen. Auf der anderen Seite ist auch das Immunsystem in der Lage die Ausschüttung von Zytokinen (IL-1, TNF) und den Vagus Nerv Informationen an das zentrale Nervensystem (ZNS) weiterzuleiten.

Der Regelkreis der HPA-Achse beginnt mit der Ausschüttung des *Corticotropin-Releasing* Hormons (CRH) im Hypothalamus und der nachfolgenden Expression des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) im Hypophysenvorderlappen. Dieses gelangt über den Blutkreislauf zu den Nebennieren und induziert dort die Produktion und Freisetzung von Glucocorticoiden [Webster, 2002]. Diese Steroidhormone inhibieren mit ihren anti-inflammatorischen Eigenschaften Entzündungsreaktionen und somit die Aktivität des Immunsystems [Sternberg, 2006].

Über das periphere Nervensystem (PNS) werden Entzündungsreaktionen lokal mithilfe von Neuropeptiden, wie der Substanz P, CRH oder dem *Calcitonin Gene-Related Peptide* (CGRP) reguliert. Dabei agieren sie überwiegend entzündungsfördernd, d. h. pro-inflammatorisch [Agelaki, 2002; Bulloch, 1998; Cuesta, 2002; Sternberg, 2006].

Die Kommunikation zwischen dem VN und dem Immunsystem erfolgt auf bidirektionalem Wege über afferente und efferente Fasern. Während der afferente Teil des VN Zytokin-Rezeptoren besitzt (z. B. IL-1 und TNF) und das Gehirn über periphere Entzündungsreaktionen informiert, inhibiert der efferente Teil durch Ausschüttung des parasympathischen Neurotransmitters Acetylcholin das inflammatorische Potenzial von diversen Immunzellen [Czura, 2005; de Jonge, 2005; Sternberg, 2006; Tracey 2002; Wang, 2003; Watkins, 1999].

Dem SNS hingegen werden im Bezug auf Infektionen divergente Eigenschaften zugesprochen [Sternberg, 2006]. Es kommuniziert mit Immunzellen über seine Neurotransmitter Adrenalin (ADR) und Noradrenalin (NA), welche durch adrenerge Rezeptoren auf der Zelloberfläche gebunden werden. Infolgedessen können die Expression pro-inflammatorischer Zytokine, die Zellproliferation oder auch die Wanderung von Immunzellen stark moduliert werden [Maestroni, 2006; Nance, 2007; Tracey, 2002].

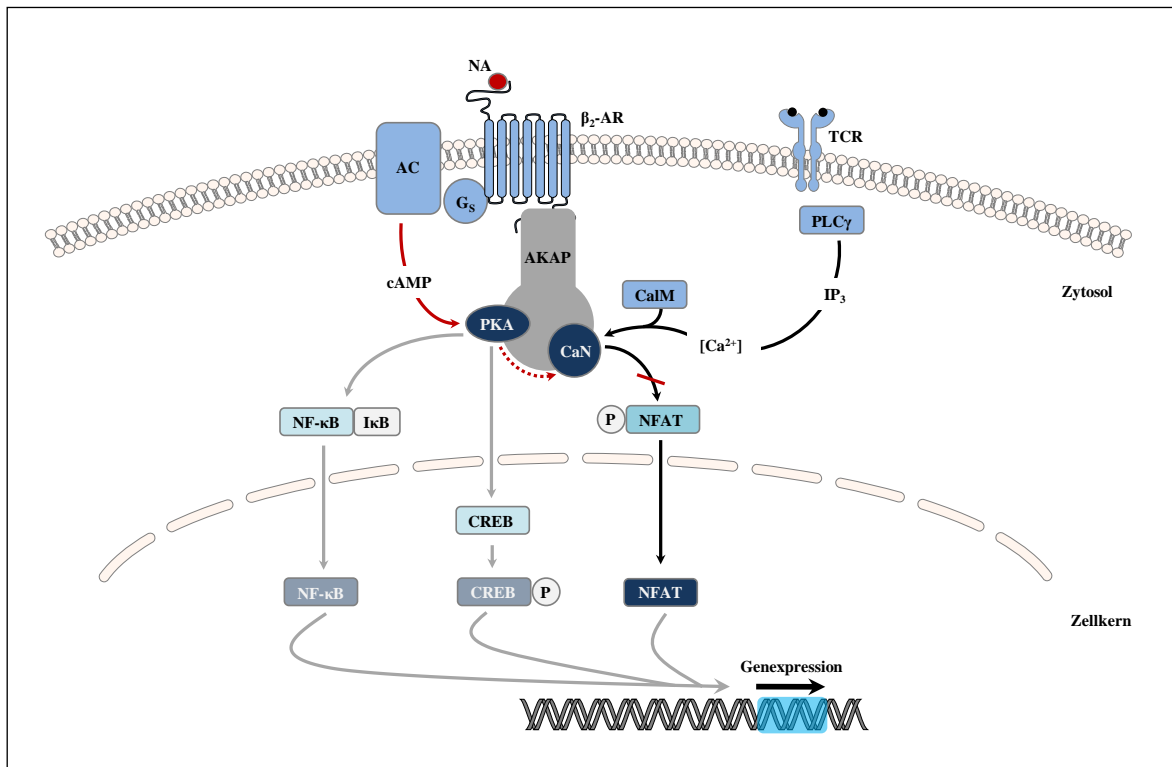
### **1.2.2 Sympathikus-vermittelte Modulation von Immunprozessen**

Die sympathische Interaktion mit dem Immunsystem erfolgt über den Neurotransmitter NA und das Stresshormon ADR. Diese werden in den Nebennieren oder im Nervensystem mittels Hydroxylasen aus der Aminosäure Tyrosin und dem nachfolgend synthetisierten Dopamin (DA) gewonnen. Ihr Abbau wird vor allem über die Enzyme Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und Monoaminoxidase (MAO) geregelt [Feldman, 1997; Fuller, 1982; Kvetnansky, 2009; Levite, 2012]. Da alle lymphoiden Organe mit sympathischen Nervenfasern innerviert sind, greift vor allem NA weitreichend in die Immunaktivitäten der Zellen ein [Bellinger, 2008; Elenkov, 2000; Levite, 2012]. Einfluss auf das Immunsystem üben NA und ADR über Adrenozeptoren (AR) auf der Oberfläche von Immunzellen aus. Diese werden als  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - und  $\beta$ -ARs klassifiziert und jeweils in drei weitere Subtypen eingeteilt [Levite, 2012]. Die Expression dieser Rezeptoren variiert zwischen den unterschiedlichen Immunzellen (s. Tab.1.1). Der meist exprimierte adrenerge Rezeptor im Immunsystem ist der  $\beta_2$ -AR. Demzufolge werden die meisten Modulationen des Immunsystems über diesen AR vermittelt. Je nach Zelltypus können NA und ADR über ARs sowohl pro-inflammatorische, als auch anti-inflammatorische Effekte ausüben. Weitreichend untersucht wurde diesbezüglich vor allem der inhibierende Einfluss von NA auf T-Lymphozyten [Holen, 1998; Kohm, 2001; Riether, 2011; Sanders, 2012].

**Tab. 1.1 Adrenozeptoren-Expression auf Immunzellen.** Die verschiedenen Adrenozeptor-Typen werden von Immunzellen unterschiedlich stark oder gar nicht exprimiert. Diese Tabelle fasst daher die Adrenozeptoren- Expression unterschiedlicher Immunzellen aus verschiedenen Studien zusammen [Kavelaars, 2002; Marino, 2013; Sanders, 2002; Sternberg, 2006].

Immunzelle	Adrenozeptor		
Monozyten/Makrophagen	$\alpha_1$	$\beta_1$	$\beta_2$
Dendritische Zellen	$\alpha_1$	$\beta_1$	$\beta_2$
Neutrophile	$\alpha_1$		$\beta_2$
NK-Zellen			$\beta_2$
B-Zellen			$\beta_2$
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen			$\beta_2$
Naive CD4 <sup>+</sup> T-Zellen		$\beta_1$	$\beta_2$
T <sub>H</sub> 1-Zellen			$\beta_2$
T <sub>H</sub> 2-Zellen			-
Regulatorische T-Zellen	$\alpha_1$	$\beta_1$	$\beta_2$

Die Bindung von NA an den  $\beta_2$ -AR führt zu einer komplexen Signalkaskade, die mit der Konformationsänderung des an den Rezeptor gekoppelten G-Proteins beginnt (s. Abb. 1.4). Dabei wird Guanosindiphosphat (GDP) freigesetzt und Guanosintriphosphat (GTP) durch die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins gebunden. Die  $\alpha$ -Untereinheit wird daraufhin abgespalten und aktiviert im Anschluss die Adenylylcyclase [Riether, 2011]. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Adenosintriphosphat (ATP) zu cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), welches sich folglich im Zytosol der Zelle anhäuft [Kobilka, 1992]. Die erhöhte cAMP-Konzentration führt schließlich zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche die Aktivität der Phosphatase Calcineurin (CaN) inhibiert. Üblicherweise dephosphoryliert CaN z. B. in T-Lymphozyten den Transkriptionsfaktor *Nuclear Factor of Activated T-cells* (NFAT). Da die Hemmung von CaN zu einer Einschränkung dieser Dephosphorylierung führt, kann NFAT nicht durch die Kernporen in den Zellkern gelangen. Demgemäß wird die Transkription verschiedenster Gene inhibiert [Riether, 2011]. Die Zelle produziert somit weniger Zytokine oder wird in ihrer Proliferation gehemmt. Es ist jedoch zu beachten, dass auch die PKA-abhängige Modulation anderer Transkriptionsfaktoren, wie dem *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) oder dem *cAMP Response Element-Binding Protein* (CREB), zu einer Unterdrückung der Genexpression und somit der Zellaktivität führen kann [Ho, 1997; Solomou, 2001].



**Abb. 1.4**  $\beta_2$ -AR Signalkaskade in einem T-Lymphozyten [bearbeitet mit Motifolio nach Riether, 2011]. Die Aktivierung des T-Zell Rezeptors (TCR) führt zu einer Signalkaskade, die über Calmodulin (CaM) zur Aktivierung der Phosphatase Calcineurin (CaN) führt. Im Anschluss wird der Transkriptionsfaktor NFAT dephosphoryliert und in den Zellkern transportiert, wo er die Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine steigert. Die Bindung von NA an den  $\beta_2$ -AR führt zur Konformationsänderung des an den Rezeptor-gekoppelten G-Proteins. Dadurch wird die Adenylylcyclase aktiviert. Sie katalysiert die Produktion und Anreicherung von cAMP im Zytosol. Durch die erhöhte cAMP-Konzentration wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, welche die Aktivität von CaN inhibiert. Es kommt folglich nicht zur Transkription im Zellkern. Die PKA-anhängige Inhibition der Genexpression kann allerdings auch über die Modulation anderer Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B oder CREB erfolgen.

### 1.2.3 Sympathikus-vermittelter Einfluss auf Infektionen

Bereits im Forschungsbereich der Bakteriologie wird deutlich, dass das SNS unterschiedliche Bedeutungen in Infektionsverläufen einnimmt. So können Katecholamine, wie NA, auf der einen Seite das Wachstum und die Pathogenität verschiedener Bakterienstämme (z. B. *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*) begünstigen [Belay, 2002; Cogan, 2007; Kinney, 2000; Lyte, 1991] und andererseits in *Staphylococcus aureus*-Modellen zu einer verminderten Ausbreitung und Bakterienlast führen [Straub, 2005]. Weitere Studien zeigen, dass bakteriell-infizierte und gleichzeitig sympathektomierte Mäuse (Sympathikusblockade/-zerstörung) eine geringere Bakterienlast, eine verstärkte Phagozytoseaktivität oder höhere Konzentrationen an pro-inflammatorischen Zytokinen aufwiesen [de Luigi, 1998; Miura, 2001; Rice, 2001; Straub,



2005]. Auch in verschiedenen Sepsis-Modellen wurden unterschiedliche Wirkungsweisen des SNS beobachtet. So führt die Verabreichung von adrenergen Rezeptorblockern im Modell mit Ratten zu einer erhöhten Überlebensrate [Mori, 2011], während sie gegensätzlich dazu die Mortalität im Maus-Modell steigert [Schmitz, 2007].

Gleicherweise divergente Effekte des SNS wurden auch in Studien zu viralen Infektionen beschrieben. So führt die Sympathektomie in Herpes-simplex-Virus-infizierten (HSV) Mäusen zu einer gehemmten virus-spezifischen CTL-Immunantwort, in einem Influenza-A-Virus-Modell jedoch zu einer verminderten Morbiditäts- und Mortalitätsrate [Grebe, 2010; Leo, 1998, 2000]. Eine weitere HSV-Studie demonstrierte dagegen, dass die Verabreichung des adrenergen Rezeptoragonisten Salbutamol zu verbesserten virus-spezifischen Antikörperantworten und einer stärker induzierten T<sub>H</sub>2-Immunantwort führt [Kim, 2009]. Des Weiteren wurden widersprüchliche Befunde zu einem direkten Effekt des SNS auf die HIV-1- oder Kaposi-Sarkom-Herpesvirus-Replikation (KSHV) publiziert [Chang, 2005; Cole, 1998; Moriuchi, 2006]. Außerdem kann die Stimulation des  $\beta_2$ -ARs auf Monozyten zu einer Reaktivierung des Cytomegalovirus führen [Prösch, 2000].

Im Forschungsbereich der Parasitologie sind nur wenige Studien bekannt, die sich zusätzlich mit einem Sympathikus-vermittelten Einfluss beschäftigen. Allerdings geht aus diesen hervor, dass das SNS für den Wirt einen eher negativen Einfluss auf den Infektionsverlauf nimmt. So führt beispielsweise die Verabreichung von adrenergen Rezeptorblockern zu einer erhöhten Überlebensrate bei *Trypanosoma cruzi* infizierten Mäusen [Gongora-Alfaro, 1995]. Außerdem konnte bei  $\beta_2$ -AR Knockout Mäusen, die ebenfalls mit diesem Parasiten infiziert wurden, die Mortalitätsrate signifikant reduziert werden [Machado, 2012]. Darüber hinaus ist seit einigen Jahrzehnten bekannt, dass *Trypanosoma cruzi* Bindungsstellen besitzt, die von adrenergen Agonisten reguliert werden können [Connelly, 1988; Oliveira, 1984]. Der inhibitorische SNS-Einfluss auf parasitische Infektionen wurde auch durch Studien mit dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* bestätigt. Behandlungen mit adrenergen Rezeptoragonisten erhöhten die Infektionsrate, während adrenerge Rezeptorantagonisten diesen Effekt wieder rückgängig machten [Harrison, 2003; Murphy, 2006].

Die hier aufgelisteten Studien verdeutlichen somit, dass Sympathikus-vermittelte Modulationen von Infektionsverläufen nicht auf ein einzelnes Konzept zurückzuführen sind. Effektstärke und Wirkungsgrad hängen dabei vor allem vom Gesundheitszustand des

Wirtsorganismus, dem Pathogen oder dem Ort der Infektion ab. Das SNS kann Infektionsverläufe demnach für den Wirt verschlimmern oder verbessern.

#### **1.2.4 Das SNS und retrovirale Infektionen**

Dem aktuellen Forschungsstand zufolge ist noch wenig über den Einfluss des SNS auf retrovirale Infektionen bekannt. In Anbetracht der Tatsache, dass HIV zu einer der weltweit häufigsten Todesursachen zählt, wurde vor allem in diesem Bereich der retroviralen Forschung der Einfluss des SNS untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass das SNS unterschiedliche Auswirkungen auf den Infektionsverlauf oder die Virus-Replikation ausüben kann. [Cole, 1998, 2001, 2008; Collado-Hidalgo, 2006; Moriuchi, 2006; Sloan 2006, 2008; Sundstrom, 2003].

Bereits in den 1990er Jahren konnte belegt werden, dass NA die HIV-1 Replikation in humanen peripheren Blutzellen (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*; PBMCs) stark beschleunigt, indem es die Aktivität der Zellen und die Produktion von anti-viralen Zytokinen hemmt [Cole, 1998]. Der inhibierende Effekt von NA basiert dabei auf einer PKA-abhängigen Unterdrückung der Transkription von Typ I Interferonen und anderer anti-viraler Zytokine. Mit der Zugabe von Interferon-(IFN)- $\gamma$  oder IL-10 konnte der Einfluss von NA auf die Replikation des Virus wieder rückgängig gemacht werden [Cole, 1998; Collado-Hidalgo, 2006]. Eine weitere Studie demonstrierte, dass HIV-Patienten mit einer erhöhten Aktivität des autonomen Nervensystems (ANS) und somit erhöhten NA-Konzentrationen, eine geminderte Antwort auf die hochaktive anti-retrovirale Therapie (HAART) aufwiesen. Die Untersuchung ihrer Blutproben zeigte, dass NA die zelluläre Expression der verschiedenen HIV-1 Stämme CXCR4 und CCR5 steigert und somit für eine erhöhte virale Genexpression in infizierten Zellen sorgt [Cole, 2001, 2008]. Gegensätzlich dazu publizierten M. Moriuchi et al. jedoch auch, dass NA die HIV-1 Infektion humaner PBMCs durch die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B signifikant inhibiert [Moriuchi, 2006].

Des Weiteren wiesen auch tierexperimentelle Studien einen sympathischen Einfluss auf retrovirale Infektionen auf. Erica Sloan veröffentlichte Studien über das Simiane Immundefizienz-Virus (SIV). Sie konnte zeigen, dass die SIV-Replikationsrate in Lymphknoten in Regionen mit katecholaminergen Nervenfasern deutlich erhöht ist und chronische SIV-Infektionen zu einer verringerten Lymphknoten-Innervation führen [Sloan,

2006, 2008]. Zudem wiesen Milzen *Murine Acquired Immunodeficiency Syndrome* (MAIDS)-erkrankter Mäuse zerstörte sympathische Nervenfasern und verringerte NA-Konzentrationen auf [Kelly, 2002, 2003].

In Anbetracht der Tatsache, dass es nur wenige Studien zum sympathischen Einfluss auf retrovirale Infektionen gibt, wird deutlich, dass es weiterer Forschungsansätze bedarf. Bisherige Studien offenbarten ausschließlich widersprüchliche Befunde. Dabei könnte das SNS gerade im Bereich der HIV-Forschung durchaus eine Rolle spielen und zu einer Verbesserung von Therapien, Medikamenten und Nebenwirkungen beitragen.

### **1.3 Das Friend Virus - ein retrovirales Infektionsmodell in der Maus**

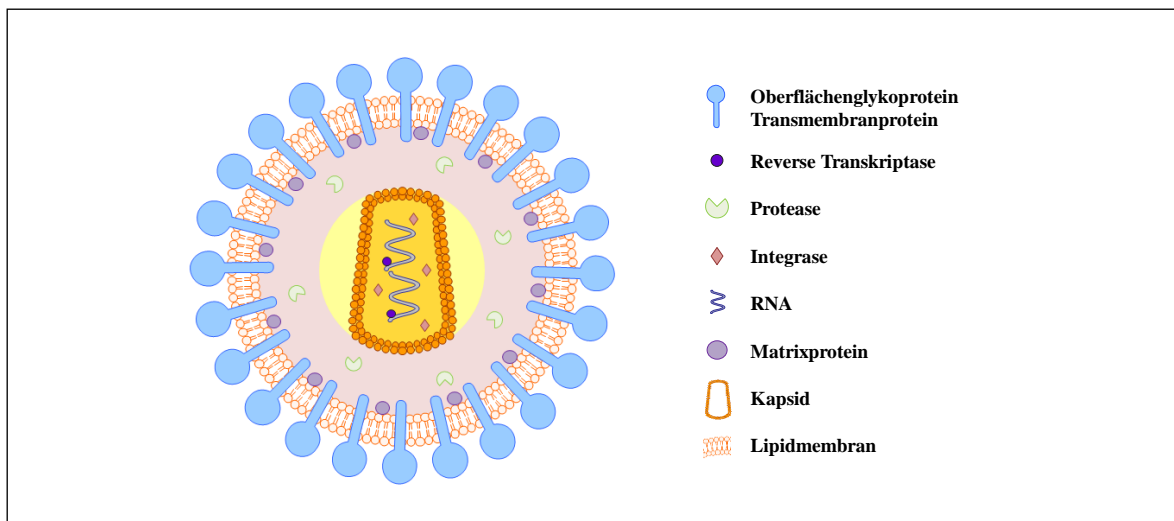
Im Vordergrund der gegenwärtigen retroviralen Forschung stehen vor allem HIV und das Murine Leukämievirus (MuLV), zu dem auch der Stamm des Friend Retrovirus (FV) gezählt wird. Das FV hat sich besonders in der Grundlagenforschung als adäquater Modellorganismus erwiesen mit dem grundlegende Eigenschaften der retroviralen Replikation oder Abwehrmechanismen des Immunsystems detailreich beschrieben werden konnten.

#### **1.3.1 Aufbau und Replikationszyklus von Retroviren**

Aufgrund ihrer hohen Pathogenität konnten Retroviren bereits vor 100 Jahren als Verursacher von Tumorerkrankungen, Immundefizienz und neurologischen Defekten beschrieben werden [Modrow, 2010]. Retrovirale Erkrankungen treten primär in Wirbeltieren, wie der Maus, dem Affen oder dem Menschen auf. Das bekannteste humanpathogene Retrovirus ist HIV-1, gegen welches bis heute noch kein dauerhaftes Heilmittel gefunden wurde [Kurth, 2010; Modrow, 2010].

Die Familie der *Retroviridae* wird in die zwei Unterfamilien *Orthoretrovirinae* und *Spumavirinae* aufgeteilt. Dabei enthalten die Spumavirinae nur die Gattung des Spumavirus, während die *Orthoretrovirinae* in sechs weitere Gattungen aufgeteilt werden ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -, und  $\epsilon$ -Retroviren und Lentiviren). Der Begriff „Retrovirus“ geht zurück auf die Fähigkeit der Reversen Transkriptase (RT) virale RNA in doppelsträngige DNA (dsDNA) umzuschreiben. Retroviren besitzen grundsätzlich die genetische Information für

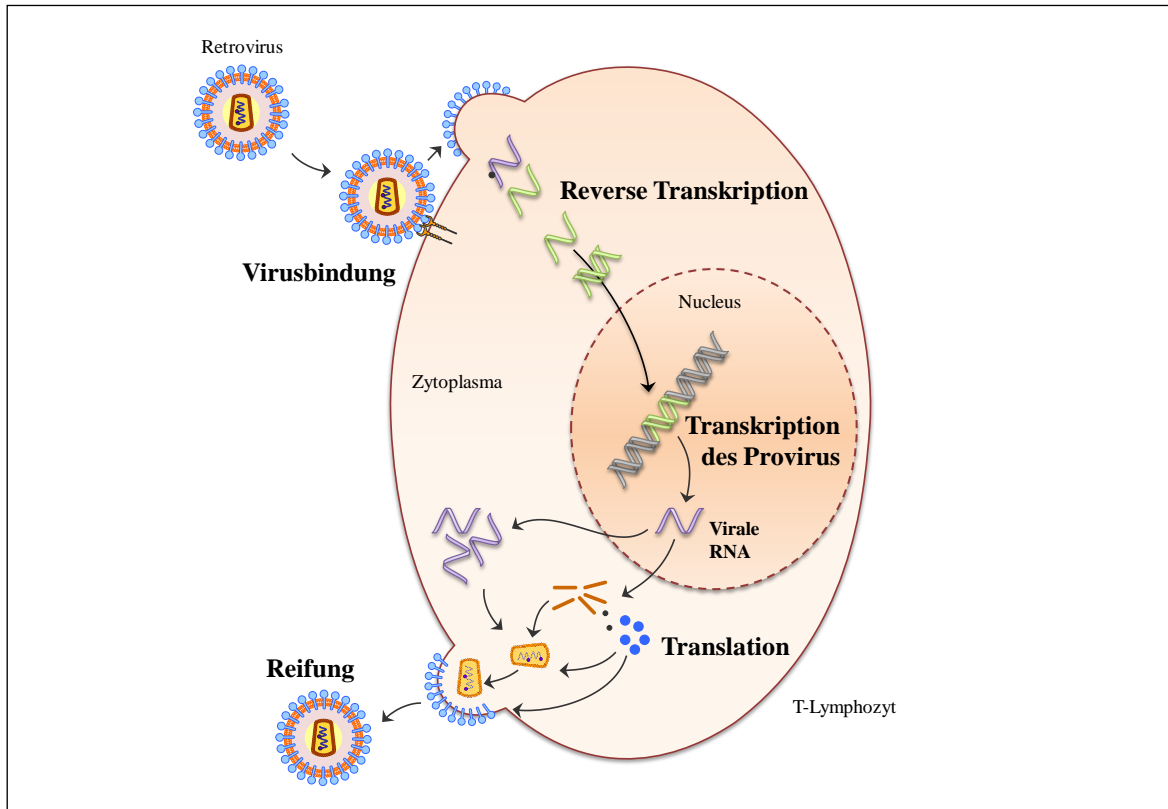
dieses Enzym, um die Replikation ihres Genoms und somit ihre Vermehrung anhaltend zu gewährleisten [Coffin, 1997; Modrow, 2010]. Retroviren sind ca. 100 nm kleine einzel-(+)-strängige RNA-Viren (ss(+)-RNA), aufgebaut aus einem Kapsid und einer dies umgebenden Hüllmembran (s. Abb. 1.5). Die Hüllmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht und enthält Transmembran- und Oberflächenglykoproteine. Des Weiteren ist die Innenseite der Hüllmembran mit Matrixproteinen bedeckt. Das von der Hüllmembran ummantelte konische Kapsid besteht aus Kapsidproteinen und enthält zwei ss(+)-RNA Genome und die Enzyme RT und Integrase. Die ss(+)-RNA tritt dabei stets nur im Komplex mit Nucleokapsidproteinen auf. Zusätzlich beinhaltet das Viruspartikel noch das Enzym Protease [Kurth, 2010; Modrow, 2010].



**Abb. 1.5** Aufbau eines Retrovirus [bearbeitet mit Motifolio nach Modrow, 2010]. Im Inneren eines Retrovirus befindet sich ein Kapsid, welches die zwei RNA Genome mit Nucleokapsidproteinen, die Integrasen und die Reverse Transkriptase beinhaltet. Außerhalb des Kapsids befinden sich Proteasen. Die Hülle des Virus besteht aus einer mit Matrix- und Glykoproteinen ausgestatteten Lipidmembran.

Infiziert ein Retrovirus eine Wirtszelle, so bindet es zunächst durch seine Oberflächenproteine an bestimmte Rezeptoren der Zelle. Durch Strukturveränderungen in der Virusoberfläche kommt es folglich zur Fusion der viralen Hüllmembran mit der Zytoplasmamembran und somit zur Freisetzung des Kapsids in das Zytoplasma der Wirtszelle (s. Abb. 1.6). Das Kapsid zerfällt und entlässt alle Bestandteile ins Zytoplasma. Es folgt die reverse Transkription der viralen ss(+)-RNA in dsDNA durch die RT. Mithilfe

von viralen und zellulären Proteinen wird die dsDNA in den Nucleus transportiert und dort durch die Integrase in das Wirtszellgenom integriert (Provirus).



**Abb. 1.6** Retroviraler Replikationszyklus in T-Lymphozyten [bearbeitet nach Kurth, 2010; Modrow, 2010]. Das Retrovirus bindet an spezifische Rezeptoren der Wirtszelle. Im Zytosol erfolgt die Umschreibung des viralen RNA Genoms in doppelsträngige DNA. Danach wird die virale DNA in das Zellgenom integriert. Durch die wirtseigene Transkriptionsmaschinerie wird das Provirus in virale RNA umgeschrieben und aus dem Zellkern befördert. Im Zytosol erfolgen die Translation und Verpackung der viralen RNA/Proteine und schließlich die Abkapselung zu neuen Viruspartikel.

Im Anschluss wird das Provirus durch die zelleigene RNA-Polymerase II transkribiert. Die entstandene neue virale ss(+)-RNA wird wieder ins Zytoplasma überführt. Dort werden die viralen Proteine translatiert. Es folgt die Einbettung der viralen Oberflächen- und Transmembranproteine in die Zellmembran und die Zusammensetzung neuer Kapside. Durch die nahe Lagerung der Kapside, an der mit den viralen Proteinen veränderten Zellmembran, können folglich komplett neue Viruspartikel abgeschnürt und freigesetzt werden [Coffin, 1997; Johnson, 2010; Kurth, 2010; Modrow, 2010].

### 1.3.2 Der Friend-Retrovirus-Komplex

Das FV wurde erstmals 1957 durch seine Namensgeberin Charlotte Friend beschrieben. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ehrlich-Ascites-Karzinom-Zellen ließen damals die Vermutung aufkommen, dass jene Zellen virus-ähnliche Partikel enthielten. Durch nachfolgende Isolations- und Reinfektionsversuche wurden diese schließlich als Retroviren charakterisiert [Friend, 1957]. Seit einigen Dekaden ist bekannt, dass FV vielmehr einen Komplex aus zwei unterschiedlichen Viren darstellt. Es handelt sich dabei um ein replikationsunfähiges aber zugleich pathogenes Virus, das *Spleen Focus Forming Virus* (SFFV) und ein replikationskompetentes-Helfervirus, das murine Friend Leukämie-Virus (F-MuLV), welches nur in neugeborenen Mäusen pathogen wirkt. F-MuLV gleicht als Replikationshelfer die Unfähigkeit des SFFV aus Viruspartikel zu bilden, da dieses einzelne Deletionen im erforderlichen *gag*-Gen aufweist. Folglich führt erst eine Koninfektion der Wirtszelle mit beiden Viren zur Vermehrung des pathogenen SFFV und somit zum möglichen Krankheitsausbruch [Friend, 1957, 1985].

Die Infektion mit dem FV-Komplex führt in suszeptiblen Mausstämmen (z. B. Balb/c WT, DBA/2J, Y10A etc.) zur Splenomegalie und im Folgenden zu einer stark ausgeprägten malignen Erythroleukämie, welche schließlich nach wenigen Wochen zum Tod führt. Zielzellen des Virus-Komplexes sind Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und primär Erythrozyten-Vorläuferzellen [Dittmer, 2002]. Die Entartung der Erythropoese äußert sich vor allem durch eine übermäßige Proliferation von Erythrozyten-Vorläuferzellen. Die Differenzierung zu normalen Erythrozyten ist durch die FV-Infektion gestört und führt zu einer extensiven Anhäufung großer mononuklearer Erythrozyten-Vorläuferzellen in Knochenmark, Leber und vor allem der Milz [Ben-David, 1991; Friend, 1957, 1985].

#### 1.3.2.1 FV-Vermehrungsstrategie

Die Infektion der Zielzelle mit F-MuLV und SFFV erfolgt mit der Bindung an spezifische Rezeptoren. Allerdings ist bis heute nur der Pit-1/2 Rezeptor bekannt, an welchen F-MuLV bindet [DeLarco, 1976]. Mit SFFV infizierte Erythroblasten exprimieren zunächst auf ihrer Zelloberfläche das gp55 Glykoprotein. Dieses Glykoprotein wird durch den Erythropoetin-Rezeptor (EpoR) von Erythrozyten-Vorläuferzellen gebunden und induziert in diesen ein falsches polyklonales Proliferationssignal, wodurch die Zellen zu einer verstärkten Proliferation stimuliert werden [D'Andrea, 1992; Ney, 2000]. Entsprechend dem

retroviralen Replikationszyklus wird in einem weiteren Schritt das SFFV Genom in das Wirtsgenom integriert. Das Ergebnis dieser Provirus Etablierung ist die Überexpression des Transkriptionsfaktors PU.1, welcher die weitere Differenzierung der Erythrozyten-Vorläuferzellen zum nächsten Entwicklungsstadium exzessiv hemmt [Kabat, 1989; Moreau-Gachelin, 2008]. Mit der zusätzlichen Inaktivierung des Tumorsuppressor-Gens *p53* wird den nun maligne transformierten Erythrozyten-Vorläuferzellen schließlich eine weiterlaufende Proliferation ermöglicht [Cmarik, 2010]. Daraus resultierend leiden suszeptible Mäuse folglich an einer gravierenden Splenomegalie und einer schwerwiegenden Erythroleukämie, die zum Tod führt.

### 1.3.2.2 FV-induzierte Immunantworten

Schutz gegen retrovirale Infektionen wird vom Immunsystem zum einen durch die Aktivierung  $CD8^+$  CTLs und  $CD4^+$   $T_H$ -Zellen und zum anderen durch die Produktion pathogen-spezifischer Antikörper gewährleistet [Modrow, 2010]. Da diese Eigenschaften genetisch festgelegt sind, können Mutationen in immunologisch wichtigen Genabschnitten folglich zu Unterschieden in der Suszeptibilität oder Resistenz gegen ein Pathogen führen. Ein erfolgreicher FV-Infektionsverlauf ist vor allem von dem genetischen Status quo des infizierten Mausstammes abhängig. Dem aktuellen Forschungsstand zufolge gibt es 5 immunologische Resistenzgene. Darunter vier MHC-Gene (murin = H-2) und das Rfv-3 Gen, welche Zell- und Antikörper-vermittelte Immunantwort gegen FV beeinflussen [Chesebro, 1979, 1990; Hasenkrug, 1997]. Zusätzlich wurden sechs Gene ohne immunologischen Hintergrund entdeckt, Fv1 bis Fv6 [Ben-David, 1991; Chesebro, 1990; Hoatlin, 1995]. So greifen Fv1 und Fv4 in die FV-Infektion ein, während Fv3 und Rfv1-3 Immunantworten modulieren und Fv2 und Fv5 die Proliferation/Differenzierung der Erythrozyten-Vorläuferzellen regulieren [Ney, 2000].

Die in dieser Arbeit verwendeten C57BL/6 Mäuse des Haplotyps  $H-2^{b/b}$  gelten als FV-resistent, da sie durch ihre genetisch festgelegte MHC H-2 Immunantwort und das Fv2 Gen in der Lage sind die Infektion zu steuern. Sie entwickeln im Gegensatz zu suszeptiblen Mausstämmen keine maligne Erythroleukämie, sondern lediglich eine transiente Splenomegalie. Nichtsdestotrotz bleiben sie bis zum Ende ihres Lebens persistierend infiziert. In einigen Studien konnte aber festgestellt werden, dass die Depletion einzelner Immunzellpopulationen, wie den  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  T-Zellen, in FV-

resistenten Mäusen zu einer Erythroleukämie führt [Dittmer, 1999; Hasenkrug, 1999]. Außerdem sind B-Zellen und ihre virus-spezifischen Antikörper ein essentieller Faktor in der FV-Bekämpfung [Hasenkrug, 1995]. Fällt ein Resistenzfaktor aus, sind auch sie nicht mehr gegen den Virus-Komplex geschützt.

## 1.4 Zielsetzung

Die erfolgreiche Abwehr von Infektionen setzt ein effizientes Zusammenspiel von Immunsystem und Nervensystem voraus. Beide Systeme interagieren über verschiedenste Wege miteinander. So innerviert das sympathische Nervensystem (SNS) Lymphorgane, wie die Milz, und übt über Neurotransmitter Einfluss auf Immunzellen aus. Im akuten Infektionsmodell mit dem Friend Retrovirus (FV), stellt die Milz zudem einen der wichtigsten Orte der viralen Replikation dar. Es kommt schließlich zu einer transienten Splenomegalie. In Anlehnung an diesen Kenntnisstand sollte das Interaktionsspektrum zwischen dem SNS und der retroviralen Infektion genauer definiert werden.

Dazu sollte in dieser Arbeit zunächst überprüft werden, ob sich während einer akuten FV-Infektion die Konzentration sympathischer Neurotransmitter (z. B. Noradrenalin (NA)) in der Milz verändert. Im Hinblick auf eine mögliche SNS-induzierte Modulation des Immunsystems sollten außerdem die Auswirkungen adrenerger Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten auf die FV-Infektion verifiziert werden. Darüber hinaus sollte die Rolle der Katecholamin-degradierenden Enzyme Monoaminoxidase A (MAO-A) und Catechol-O-Methyltransferase (COMT) im FV-Infektionsmodell genauer definiert werden. Ein weiterer Aspekt zur Aufklärung der komplexen Interaktionen zwischen SNS und FV-Infektion sollte die Untersuchung einer experimentell-induzierten NA-Depletion im akuten und chronischen Infektionsverlauf sein. Die Durchführung einer chemischen Sympathektomie sollte daher zusätzlich Aufschluss über einen möglichen Einfluss auf die Infektion gewähren.

Das Ziel dieser Arbeit ist demzufolge die Aufklärung eines möglichen Sympathikus-vermittelten Einflusses auf den FV-Infektionsverlauf. In diesem Zusammenhang sollte festgestellt werden, ob ein möglicher Effekt auf die Infektion, durch die Kommunikation zwischen SNS und Immunsystem oder durch andere physiologische Eigenschaften herbeigeführt wird.



## 2. Material

### 2.1 Geräte

**Tab. 2.1** Auflistung der verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage ACS 120-4	Kern, Balingen, Deutschland
Binokular CK40 – F200	OLYMPUS, Tokio, Japan
Bio Photometer ( 8.5 mm)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ChemiDoc MP System	Bio-Rad, Hercules, USA
CO <sub>2</sub> Inkubator Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD, Heidelberg, Deutschland
Finnpipette F1 (5 µl - 5000 µl)	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
Gefrierschrank FORMA 900 Series	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
Gefrierschrank Comfort	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gelelektrophorese Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad, Hercules, USA
Heizblock TH23	HLC, Bovenden, Deutschland
Kühl-Gefrier-Kombination Comfort	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer COMBIMAG RCT	IKA, Staufen, Deutschland
Mikroliterspritze 705RN (50 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Mikroplattenleser FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Mikroskop Axiostar plus 5x bis 100x	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Multipipette für Combitip-System	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Netzgerät Power Pac Basic	Bio-Rad, Hercules, USA
Neubauer-Zählkammer	LO, Lancing, Großbritannien
OP-Besteck (Scheren, Pinzetten)	AESCULAP, Tuttlingen, Deutschland
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus (0,1 ml – 200 ml)	Hirschmann GmbH, Eberstadt, Deutschland
Probenroller SRT6	Stuart, Staffordshire, Großbritannien
Schüttler VORTEX GENIUS 3	IKA, Staufen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wärmelampe	Philips, Amsterdam, Niederlande
Werkbank Hera Safe HS18 1/PEAC	Heraeus, München, Deutschland
Western Blot Transfersystem Trans-Blot Turbo	Bio-Rad, Hercules, USA
Zellseparator MACS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge MIKRO 200R & ROTANTA 460R	Hettich, Mühlheim a. d. Ruhr, Deutschland
2720 Thermal Cycler Applied Biosystems	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
7500 Real-Time PCR System Applied Biosystems	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA

## 2.2 Verbrauchsmaterial

Tab. 2.2 Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Combitips (0,5 - 10 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
FACS-Röhrchen	BD, Heidelberg, Deutschland
Einmalspritzen (1 ml)	BBraun, Melsungen, Deutschland
Einmalspritzen (10, 20ml)	BD, Heidelberg, Deutschland
Einwegskalpell	MediWare, Eindhoven, Niederlande
Flachbodenplatte, steril (24 - und 96-Well)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Flachbodenplatte, steril (6-Well)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Kanülen (18, 20, 23, 26, 27 G)	BD, Heidelberg, Deutschland
Laborglas	Simax, Prag, Tschechien
MACS LS Säulen	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Filter (30 µm)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate 0.1 ml	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Mikrovetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Parafilm	American National Can, Chicago, USA
Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten, steril (5, 10, 25 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen steril (10 - 5000 µl)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
PP-Falkon, steril (15, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Proteingrößenstandard (Precision Plus)	Bio-Rad, Hercules, USA
Reaktionsgefäß (0.5, 1.5, 2 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Rundbodenplatte, steril (96-Well)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Rundbodenröhrchen, steril (12 ml)	BD Falkon, Heidelberg, Deutschland
Sterilfilter (0.2 µm)	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
Trans-Blot Turbo Mini Nitrozellulose Transfer Packs	Bio-Rad, Hercules, USA
Zellkulturflaschen (50 ml)	BD Falkon, Heidelberg, Deutschland
Zellsiebe	Falcon BD, Heidelberg, Deutschland

## 2.3 Versuchstiere

Alle Experimente dieser Arbeit wurden ausschließlich mit 8-10 Wochen alten weiblichen C57BL/6 Haplotyp H-2<sup>b</sup> Inzuchtmäusen (Harlan, Borchon, Deutschland) durchgeführt. Einzig im Pilotversuch mit dem Parasiten *Litomosoides sigmodontis* (s. Kapitel 3.9)

wurden weibliche BALB/c WT Inzuchtmäuse verwendet (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich). Die Tiere wurden in Gruppen unter pathogen-freien Bedingungen bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten (Lichtphase: 07.00 bis 19.00 Uhr). Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Die Raumtemperatur lag bei 22 °C und die Luftfeuchtigkeit bei 60 %. Alle Experimente wurden durch die zugehörige Landesbehörde genehmigt und gemäß des Tierschutzgesetzes und den Verordnungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) durchgeführt.

## 2.4 Viren

Der in dieser Arbeit verwendete Friend Retrovirus Stock wurde am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Essen unter der Leitung von Prof. Dr. U. Dittmer hergestellt [Dittmer, 1999; Gibbert, 2010]. Für die akuten FV-Infektionsversuche wurde ausschließlich der FV-Stock eingesetzt. Bei den chronischen Infektionsversuchen wurde dagegen ein mit dem *Lactat Dehydrogenase-Elevating Virus* (LDV) versetzter FV-Stock verwendet (FV+LDV), da LDV in diesem Modell die persistierende Virämie unterstützt.

## 2.5 Zelllinie

Für die Durchführung des *Infectious Center Assays* und des F-MuLV-Tests wurde die *Mus dunni*-Zelllinie verwendet, welche aus murinen Fibroblasten besteht (s. Kapitel 3.6).

## 2.6 Chemikalien und Medien

Tab. 2.3 Auflistung der verwendeten Chemikalien und Medien

Substanz	Verwendungszweck	Hersteller
Acrylamid	Western Blot	Bio-Rad, Hercules, USA
Amoniumpersulfat (APS)	Western Blot	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
β-Mercaptoethanol	PCR, Zellkultur	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Desoxycholat	Western Blot	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Zellkultur	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Erythrozytenlyse	Zellkultur	BD, Heidelberg, Deutschland

Ethanol (70, 95 %)	Desinfektion, Zellkultur	Universitätsklinikum Essen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Zellkultur	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FACS Clean	FACS	BD, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	FACS	BD, Heidelberg, Deutschland
FACS Lyse	FACS	BD, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse	FACS	BD, Heidelberg, Deutschland
Fötales Kälberserum	Zellkultur	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Glukose	Zellkultur	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycin	Western Blot	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Immobilon Western Chemilumineszenz HRP Substrat	Western Blot	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Western Blot	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Laufpuffer RotiLoad	Western Blot	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	Western Blot	Granovita, Heimertingen, Deutschland
Natriumacetat	Zellkultur	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumchlorid	Western Blot	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumchlorid Lösung (0.9 %)	Zellkultur	BBraun, Melsungen, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Western Blot	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natronlauge	Standardtests, Western Blot	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Zellkultur	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Zellkultur	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Polybren A	F-MuLV-Test	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S	Western Blot	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Proteaseinhibitor Tabletten	Western Blot	Roche, Basel, Schweiz
Rinderserumalbumin (BSA)	Zellkultur	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
RPMI-1640 + Glutamax	Zellkultur	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Standardtests, Western Blot	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Schwefelsäure	Standardtests, Western Blot	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Takyon Low ROX Probe MasterMix UNG	qRT-PCR	Eurogentec, Liège, Belgien
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Western Blot	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Triton X	Western Blot	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris	Western Blot	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypanblau 0.4 %	Zellzahlbestimmung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypsin	Zellkultur	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Western Blot	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Wasserstoffperoxid	Zellkultur	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
3-Amino-9-Ethylencarbazol	Zellkultur	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

## 2.7 Pharmakologische Substanzen

Tab. 2.4 Auflistung der verwendeten pharmakologischen Substanzen

Substanz	Verwendungszweck	Hersteller
Bricanyl (Terbutalinsulfat)	<i>in vivo</i> als $\beta_2$ -Agonist	AstraZeneca, Wedel, Deutschland
Chlorgylin (CLG)	<i>in vivo</i> als MAO-A-Hemmer	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
D-(-)-Isoascorbinsäure	<i>in vivo</i> als Kontrolle/Lösungsmittel	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DL-Noradrenalin Hydrochlorid	F-MuLV-Test	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
3,5-Dinitrocatechol (OR-486)	<i>in vivo</i> als COMT-Hemmer	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Penicillin-Streptomycin 5000 U/ml	Zellkulturmedium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phentolamin Hydrochlorid	<i>in vivo</i> als nicht selektiver $\alpha$ -Blocker	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
(S)-(-)-Propranolol Hydrochlorid	<i>in vivo</i> als nicht selektiver $\beta$ -Blocker	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
6-Hydroxydopamine Hydrochlorid (6-OHDA)	<i>in vivo</i> als Neurotoxin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

## 2.8 Puffer und Medien

Tab. 2.5 Auflistung häufig hergestellter Puffer und Medien

Puffer bzw. Medium	Bestandteile	Verwendungszweck
Absättigungslösung	Magermilchpulver TBST	Western Blot
AEC Assaylösung	Aqua dest. Wasserstoffperoxid 4.5 % AEC Stocklösung 2.4 % Natriumazetat	Zellkultur
AEC Stocklösung	N,N-Dimethylformamid Proteaseinhibitor Tabletten	Zellkultur
Einfriermedium	10 % DMSO	

	40 % FKS 50 % RPMI-1640 + Glutamax	
FACS-Puffer	10 % FKS Natriumazid PBS	FACS
Zellmedium	Penicillin/Streptomycin RPMI-1640 + Glutamax 10 % FKS	Zellkultur
Lower Tris pH 8,8	Aqua dest. Natriumlaurylsulfat (SDS) Tris	Western Blot
PBBS	Glukose PBS	Zellkultur
PBS/BSA	0.1 % BSA PBS	Zellkultur
Ripa Lyse-Puffer	Aqua dest. Desoxycholat EDTA SDS Triton X 2 M Natriumchlorid 20 mM Tris Hydrochlorid	Zellkultur
Sammelgel (4 %)	Acrylamid APS (10 %) Aqua dest. Tetramethylethyldiamin Upper Tris	Western Blot
SDS Laufpuffer	Aqua dest. Glycin SDS Tris	Western Blot
TBST	Aqua dest. Natriumchlorid Tris Hydrochlorid Tween 20	Western Blot
Trenngel (10 %)	Acrylamid APS (10 %) Aqua dest. Lower Tris Tetramethylethyldiamin	Western Blot
Upper Tris pH 6,8	Aqua dest. Natriumlaurylsulfat (SDS) Tris	Western Blot

## 2.9 Antikörper

Bei den aufgelisteten Antikörpern handelt es sich, wenn nicht anders vermerkt, um monoklonale Antikörper, die für verschiedene Analysen verwendet wurden. Die an die Antikörper gekoppelten Fluorochrome, welche für die Durchflusszytometrie verwendet wurden, werden in Tab. 2.7 beschrieben.

**Tab. 2.6** Auflistung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Klon	Verwendungszweck	Hersteller
AF 488 anti-Maus CD8	53-6.7	FACS	BD, Heidelberg, Deutschland
AK 720 Maus anti-MuLV env (Isotyp IgG2b)		<i>Infectious Center Assay</i>	Uniklinikum Essen, Essen, Deutschland
Anti-Hase IgG (HRP-gekoppelt) Sekundärantikörper		Western Blot	Cell Signaling, Cambridge, Großbritannien
Anti-Maus $\beta$ -Actin Primärantikörper		Western Blot	GeneTex, Irvine, USA
Anti-Maus CD3 $\epsilon$	145-2C11	<i>In vitro</i> Zellstimulation	BioLegend, San Diego, USA
Anti-Maus CD28	E18	<i>In vitro</i> Zellstimulation	BioLegend, San Diego, USA
Anti-Maus COMT Primärantikörper		Western Blot	GeneTex, Irvine, USA
Anti-Maus MAO-A Primärantikörper		Western Blot	GeneTex, Irvine, USA
APC anti-Maus CD25	PC61.5	FACS	eBioscience, San Diego, USA
APC anti-Maus CD11b	M1/70	FACS	BioLegend, San Diego, USA
APC anti-Maus CD11c	N418	FACS	BioLegend, San Diego, USA
APC anti-Maus CD43	1B11	FACS	BioLegend, San Diego, USA
APC anti-Maus CD49b	HMa2	FACS	BD, Heidelberg, Deutschland
APC-Cy7 anti-Maus CD8a	53-6.7	FACS	BD, Heidelberg, Deutschland
eF780 Fixable Viability Dye		FACS	eBioscience, San Diego, USA
FITC anti-Maus CD3 $\epsilon$	145-2C11	FACS	BioLegend, San Diego, USA
FITC anti-Maus CD4	RM 4-5	FACS	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-Maus F4/80	BM8	FACS	BioLegend, San Diego, USA
PB anti-Maus CD4	RM 4-5	FACS	BD, Heidelberg, Deutschland

PE anti-Maus CD4	RM 4-5	FACS	BioLegend, San Diego, USA
PE anti-Maus IFN $\gamma$	XMG 1.2	FACS	BioLegend, San Diego, USA
PE anti-Maus IL-2	JES6-5H4	FACS	BioLegend, San Diego, USA
PE anti-Maus TNF- $\alpha$	MP6-XT22	FACS	BioLegend, San Diego, USA
PeCy7 anti-Maus TER-119	TER-119	FACS	eBioscience, San Diego, USA
PerCP anti-Maus NK1.1	136	FACS	BioLegend, San Diego, USA
Polyklonal Ziege anti-Maus Ig (HRP-gekoppelt)		<i>Infectious Center Assay</i>	Dako, Glostrup, Dänemark
TruStain fcX anti-Maus CD16/32	93	FACS	BioLegend, San Diego, USA

**Tab. 2.7** Bezeichnung der Fluorochrome in der Durchflusszytometrie

Abkürzung	Bezeichnung	Absorption [nm]	Emission [nm]	Fluoreszenz-emissionsfarbe
AF 488	Alexa Fluor 488	488	519	grün
APC	Allophycocyanin	595, 633, 635, 647	660	rot
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cy7	595, 633, 635, 647	785	infrarot
eF780	eFluor 780	595	785	infrarot
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	488	519	grün
PB	Pacific blue	360, 405, 407	455	blau
PE	R-Phycoerythrin	488, 532	578	gelb
PeCy7	Phycoerythrin-Cy7	488, 532	785	infrarot
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex	488, 532	678	rot

## 2.10 Oligonukleotide

Die hier aufgelisteten Oligonukleotide (Primer) und Sonden (Probe) wurden für die quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) verwendet und bei der Firma EUROGENTEC S.A (Liège, Belgien) bestellt. Die Sonden wiesen am 5'-Ende den Reporter-Farbstoff 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) und am 3'-Ende den *Black Hole* Quencher-Farbstoff 1 (BHQ1) auf. Der Random Primer Mix für die cDNA Synthese war Bestandteil eines cDNA Synthese Kits von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland).



Tab. 2.8 Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Gen	Primer (Probe)	Sequenz (5'-3')	Verwendete Konzentration [nM]
$\beta_1$ -AR	Forward	GCATTGAGACCCTGTGTGTCA	300
	Reverse	AGCAAACCTCTGGTAGCGAAAGG	300
	Sonde	6-FAM-ACCGCTACCTCGCCATCACGTCG-BHQ1	150
$\beta_2$ -AR	Forward	CATCATCATGGGCACATTAC	600
	Reverse	GTCCCTGATAACGTGCACGAT	600
	Sonde	6-FAM-CTGCTGGCTGCCCTTCTTCATTGTCA-BHQ1	200
$\alpha_1$ -AR	Forward	GCATTGTGGTGGGATGCT	900
	Reverse	GGCTTGAAATTCGGGAAGAA	900
	Sonde	6-FAM-CTGCCATTCTTCCTCGTGATGCC-BHQ1	200
$\beta$ -Aktin	Forward	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	600
	Reverse	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	600
	Sonde	6-FAM-CACTGCCGCATCCTCTTCCTCCC-BHQ1	150
Random primer Mix RT PCR	-	Sequenzen nicht in Kit angegeben	

## 2.11 Kommerzielle Tests

Tab. 2.9 Auflistung der verwendeten Standardtests

Standardtest	Hersteller
Anti-Ter-119 MicroBeads, Maus	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Intracellular Cytokine Staining Kit IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$	BioLegend, San Diego, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
cDNA Synthese Kit (dNTP Mix, 10x RT Puffer, MultiScribe Reverse Transkriptase, RNase Inhibitor, 10x RT Random Primers)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

## 2.12 Verwendete Software

**Tab. 2.10** Auflistung der verwendeten Software-Programme

<b>Software</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Hersteller</b>
FACSDiva™ v8.0.1 Software	FACS	BD, Heidelberg, Deutschland
Image Lab™ Software 5.0	Western Blot	Bio-Rad, Hercules, USA
Millennium Session Manager	HPLC	Merck Milipore, Darmstadt, Deutschland
Optima Software Version: 2.10R2 © 2001-2007	BCA-Assay	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
SPSS Statistics 19	Statistische Auswertung	IBM, Armonk, USA
GraphPad Prism 6	Statistische Auswertung	GraphPad Software, La Jolla, USA
7500 Software v2.0.6	qRT-PCR	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA

---

## 3. Methoden

### 3.1 FV-Infektion

In Abhängigkeit von der Fragestellung wurden Versuchstiere akut oder chronisch mit FV infiziert. Bei der akuten Infektion wurden jeder Maus 20.000 *Spleen Focus-Forming Units* (SFFU) FV und bei der chronischen Infektion 15.000 SFFU FV+LDV injiziert. Die Injektion des in PBS verdünnten Virusstocks erfolgte intravenös (*i.v.*) über die laterale Schwanzvene. Für eine einwandfreie Applikation wurde der Schwanz vorher mithilfe einer Rotlichtlampe erwärmt. Naiven Kontrolltieren wurde ein entsprechendes Volumen PBS *i.v.* injiziert.

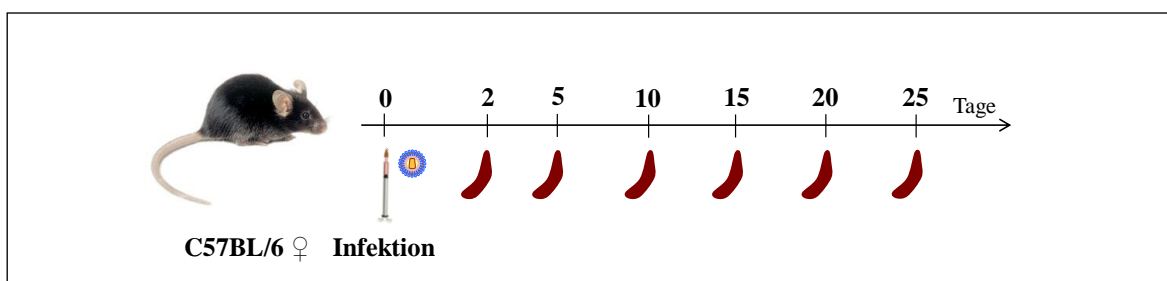
### 3.2 Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Versuchstiere mittels zervikaler Dislokation getötet. wurde der Rumpf der Tiere mit Ethanol (70 %) desinfiziert und lateral geöffnet. So konnte die Milz entnommen und gewogen werden. Im Anschluss wurde die Milz halbiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde eine Milzhälfte auf Trockeneis (anschließend -80 °C) und die andere Hälfte in PBS auf Eis gelagert.

### 3.3 *In vivo*-Experimente während der akuten FV-Infektion

#### 3.3.1 Neurotransmitter-Konzentration der Milz

Mithilfe des nachfolgend beschriebenen Experimentes wurde der Einfluss einer FV-Infektion auf die lokale Neurotransmitter-Konzentration (NA und DA) der Milz untersucht (s. Abb. 3.1). Dazu wurden die Versuchstiere mit FV infiziert oder erhielten als naive Kontrollen ein entsprechendes Volumen Vehikel (PBS). Danach erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion die Organentnahme (2, 5, 10, 15, 20 oder 25 *days post infection* (dpi)). Im direkten Anschluss wurden die separierten Milz-Proben mittels HPLC und IC-Assay weiter analysiert.

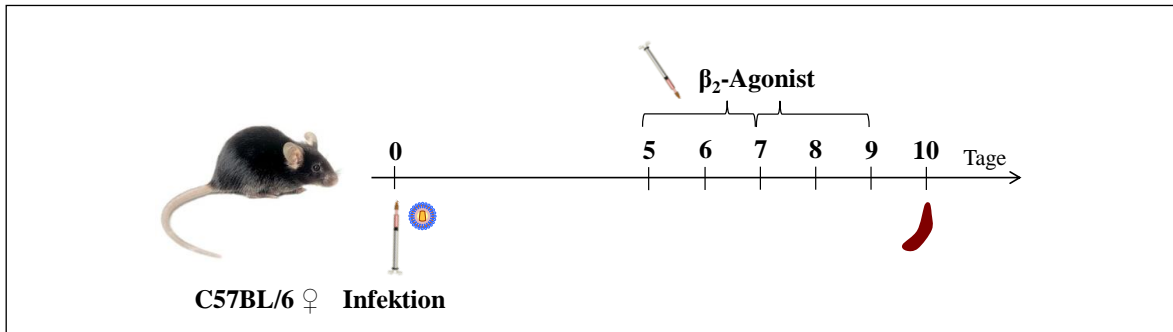


**Abb. 3.1** Experimenteller Aufbau „Neurotransmitter-Konzentration der Milz im akuten FV-Infektionsmodell“. C57BL/6 Weibchen wurden mit FV infiziert. Naive Tiere erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel. wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion die Milz separiert.

#### 3.3.2 Behandlung mit einem selektiven $\beta_2$ -AR Agonisten

In diesem Experiment sollte der Einfluss einer adrenergen Rezeptorstimulation auf den akuten FV-Infektionsverlauf untersucht werden. Die Versuchstiere wurden dafür zunächst mit FV infiziert (s. Abb. 3.2) oder erhielten als naive Kontrollen ein entsprechendes Volumen Vehikel (PBS). Anschließend wurden die Versuchstiere subkutan (*s.c.*) mit dem  $\beta_2$ -Agonisten Terbutalin (0,25 mg/kg in NaCl 0,9 %; 100  $\mu$ l) behandelt. Terbutalin ist ein selektiver und synthetischer  $\beta_2$ -AR Agonist, der im Vergleich zu NA eine deutlich längere Halbwertszeit besitzt [Tonner, 2011]. Da die Behandlung mit  $\beta_2$ -AR Agonisten jedoch zum Sensitivitätsverlust des Rezeptors führen kann, wurden zwei verschiedene Zeiträume für die Injektionen festgelegt. So wurde eine infizierte Gruppe einmal täglich im Zeitraum 5 bis 7 dpi (TERB1) und die andere einmal täglich im Zeitraum 7 bis 9 dpi (TERB2) behandelt. Infizierte Behandlungskontrollen (VEH) erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (NaCl 0,9 %; 100  $\mu$ l). Die Organentnahme wurde zum Zeitpunkt 10 dpi

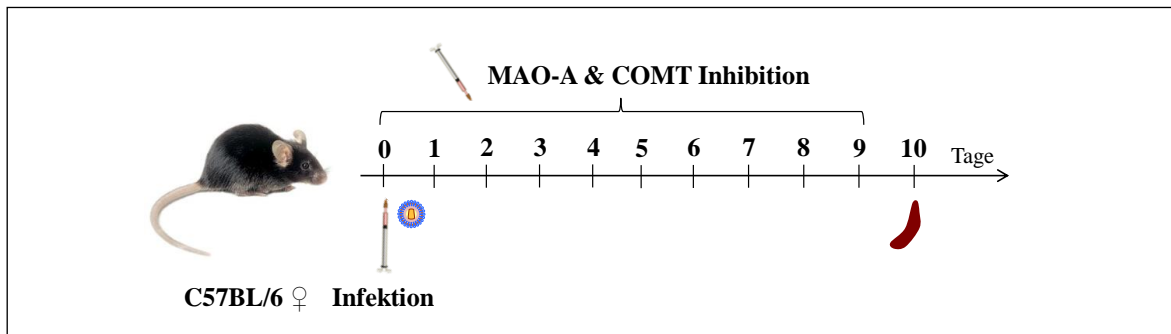
durchgeführt. Im direkten Anschluss wurden die separierten Milz-Proben mittels FACS und IC-Assay weiter analysiert.



**Abb. 3.2** Experimenteller Aufbau „ $\beta_2$ -AR Agonisten Behandlung im akuten FV-Infektionsmodell“. C57BL/6 Weibchen wurden mit FV infiziert. Naive Tiere erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel. wurden die Versuchstiere mit dem  $\beta_2$ -Agonisten Terbutalin behandelt. Die Applikation erfolgte täglich entweder im Zeitraum 5-7 dpi oder im Zeitraum 7-9 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel. Die Organentnahme erfolgten zum Zeitpunkt 10 dpi.

### 3.3.3 MAO-A- und COMT-Enzymblockade

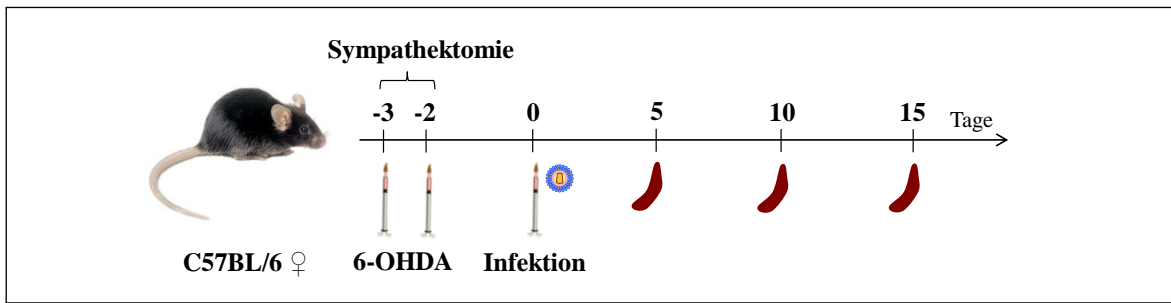
In diesem Versuchsvorhaben wurde der Einfluss der Katecholamin-degradierenden Enzyme Monoaminoxidase A (MAO-A) und Catechol-O-Methyltransferase (COMT) auf eine akute FV-Infektion untersucht. Dazu wurden die Versuchstiere zunächst mit FV infiziert (s. Abb. 3.3) oder erhielten als naive Kontrollen ein entsprechendes Volumen Vehikel (PBS). Zur pharmakologischen Inhibition von MAO-A wurden die Tiere mit Chlorgylin (CLG; 10 mg/kg in 0,9 % NaCl; 200  $\mu$ l) behandelt. Die Inhibition von COMT erfolgte durch Injektionen mit 3,5-Dinitrocatechol (OR-486; 25 mg/kg in 4,5 %-iger (2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin-Lösung; 200  $\mu$ l). Infizierte Behandlungskontrollen (VEH) wurden mit einem entsprechenden Volumen 0,9 % NaCl behandelt. Es ergaben sich demnach folgende Gruppen: Naive, VEH, CLG und OR-486. Die Applikation der Substanzen erfolgte einmal täglich intraperitoneal (*i.p.*) im Zeitraum 0-9 dpi. Zehn Tage nach der Infektion erfolgte die Organentnahme. Die separierten Milz-Proben wurden anschließend mittels HPLC, IC-Assay und FACS weiter analysiert.



**Abb. 3.3** Experimenteller Aufbau „MAO-A- und COMT-Enzymblockade im akuten FV-Infektionsmodell“. C57BL/6 Weibchen wurden mit FV infiziert. Naive Tiere erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel. Im Anschluss wurden die Versuchstiere mit dem MAO-A-Inhibitor Chlorgylin oder dem COMT-Inhibitor OR-486 behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum 0-9 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel. Die Organentnahme erfolgte zum Zeitpunkt 10 dpi.

### 3.3.4 Chemische Sympathektomie

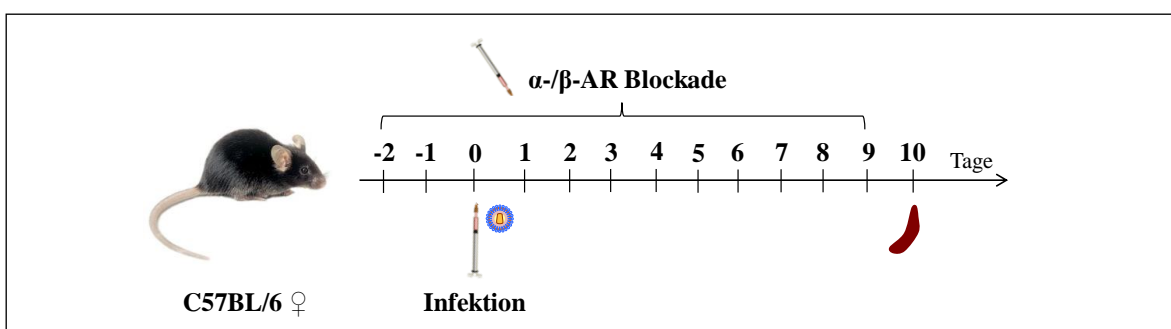
Um den Mangel sympathischen Einflusses auf den Verlauf einer akuten FV-Infektion untersuchen zu können, wurden die Versuchstiere einer peripheren chemischen Sympathektomie unterzogen. Diese wurde durch die Verabreichung des Neurotoxins 6-Hydroxydopamin (6-OHDA; 150mg/kg in 0,01 % D(-)-Isoascorbinsäure; 200 µl) induziert (s. Abb. 3.4). Die Behandlung mit 6-OHDA hält bis zu 21 Tage an. Das Neurotoxin passiert nicht die Blut-Hirn-Schranke und führt daher ausschließlich zur Zerstörung peripherer sympathischer Nervenfasern [Porter, 1965; Thoenen, 1968]. Dadurch wird eine massive Depletion von NA in der Peripherie verursacht. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (0,01 % D(-)-Isoascorbinsäure; 200 µl). Die Applikation der Substanzen erfolgte einmal täglich *i.p.* zu den Zeitpunkten -3 und -2 dpi. Nach einem Tag Pause wurden sowohl die sympathektomierten Mäuse als auch deren Behandlungskontrollen mit FV infiziert. Infektionskontrollen erhielten dagegen ein entsprechendes Volumen Vehikel (PBS). Aufgrund der verschiedenen Behandlungsmethoden ergaben sich folgende vier Gruppen: Naive/VEH, Naive/6-ODHA, FV/VEH und FV/6-OHDA. Die Organentnahme erfolgte zu den Zeitpunkten 5, 10 oder 15 dpi. Die separierten Milz-Proben wurden schließlich im direkten Anschluss mittels HPLC, IC-Assay und FACS weiter analysiert.



**Abb. 3.4** Experimenteller Aufbau „Chemische Sympathektomie im akuten FV-Infektionsmodell“. C57BL/6 Weibchen wurden mit dem Neurotoxin 6-OHDA behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum -3 bis -2 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel. Anschließend erfolgte die akute FV-Infektion. Nicht-infizierte Tiere erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel. Die Organentnahme erfolgte zu den Zeitpunkten 5, 10 oder 15 dpi.

### 3.3.5 Behandlung mit $\alpha$ - und $\beta$ -AR Antagonisten

In diesem Experiment wurden AR-abhängige Effekte auf eine akute FV-Infektion untersucht (s. Abb. 3.5). Bereits zwei Tage vor der FV-Infektion wurde den Versuchstieren der  $\alpha$ -AR-Blocker Phentolamin (PHE) oder der  $\beta$ -AR-Blocker Propranolol (PRO) verabreicht. Die Applikation der Blocker erfolgte täglich *i.p.* (3,75 mg/kg in 0,9 % NaCl; 200  $\mu$ l) im Zeitraum -2 bis 9 dpi. Infizierte Behandlungskontrollen (VEH) erhielten ein entsprechendes Volumen 0,9 % NaCl. Zum Zeitpunkt 0 dpi wurden die Tiere mit FV infiziert oder erhielten als naive Kontrollen ein entsprechendes Volumen Vehikel (PBS). Die Organentnahme erfolgte zum Zeitpunkt 10 dpi. Die separierten Milz-Proben wurden nachfolgend mittels HPLC, IC-Assay oder FACS weiter analysiert.

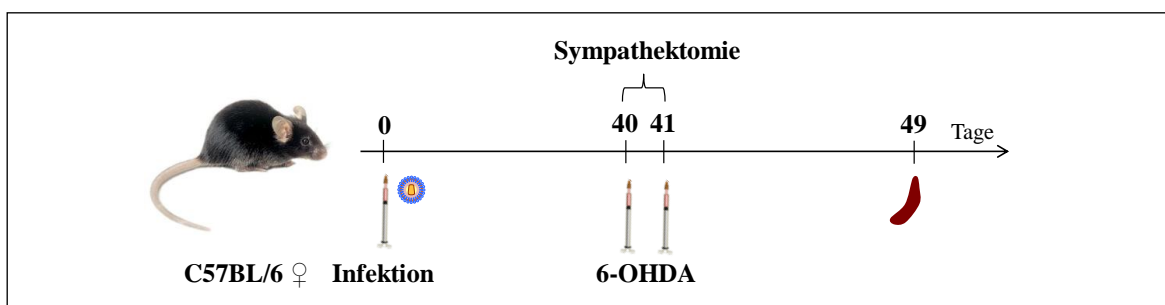


**Abb. 3.5** Experimenteller Aufbau „ $\alpha$ - und  $\beta$ -AR Antagonisten Behandlung im akuten FV-Infektionsmodell“. C57BL/6 Weibchen wurden mit FV infiziert. Naive Tiere erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel. Außerdem wurden die Versuchstiere mit dem  $\alpha$ -AR-Blocker Phentolamin oder dem  $\beta$ -AR-Blocker Propranolol behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum -2-9 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel. Die Organentnahme erfolgte zum Zeitpunkt 10 dpi.

### 3.4 *In vivo*-Experimente während der chronischen FV-Infektion

#### 3.4.1 Chemische Sympathektomie

Um den Einfluss des SNS im chronischen FV-Infektionsmodell untersuchen zu können, wurden Versuchstiere zunächst mit FV+LDV infiziert (s. Abb. 3.6). Nach einigen Wochen erfolgte die periphere chemische Sympathektomie mittels 6-OHDA (150 mg/kg in 0,01 % D-(-)-Isoascorbinsäure; 200 µl). Infizierte Behandlungskontrollen (VEH) erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (0,01 % D-(-)-Isoascorbinsäure; 200 µl). Die Applikation des Neurotoxins oder des Vehikel erfolgte täglich *i.p.* im Zeitraum 40 bis 41 dpi. Die Organentnahme wurde zum Zeitpunkt 49 dpi durchgeführt. Die separierten Milz-Proben wurden nachfolgend mittels HPLC, IC-Assay oder FACS weiter analysiert.



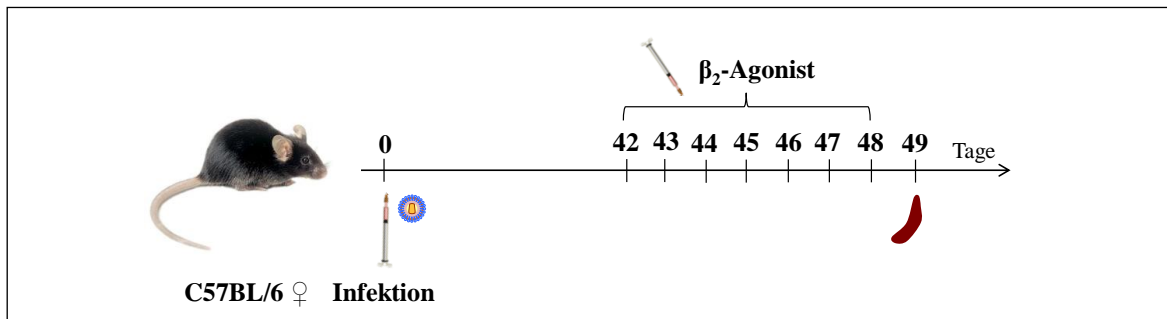
**Abb. 3.6** Experimenteller Aufbau „Chemische Sympathektomie im chronischen FV-Infektionsmodell“. C57BL/6 Weibchen wurden zunächst mit FV+LDV infiziert. wurden die Versuchstiere mit dem Neurotoxin 6-OHDA behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum 40-41 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel. Die Organentnahme erfolgte zum Zeitpunkt 49 dpi.

#### 3.4.2 Behandlung mit einem selektiven $\beta_2$ -AR Agonisten

Mithilfe des nachfolgend beschriebenen Experimentes wurde der Einfluss einer adrenergen Rezeptorstimulation auf den chronischen FV-Infektionsverlauf untersucht (s. Abb. 3.7). Die Tiere wurden dafür zunächst mit FV+LDV infiziert. Danach erfolgte die Behandlung mit Terbutalin (in NaCl 0,9 %; 200 µl; TERB). Die verabreichte Dosis des  $\beta_2$ -AR Agonisten wurde dabei jeden Tag um 150 µg/kg gesteigert, um einem möglichen Sensitivitätsverlust des ARs entgegenzuwirken. Folgende Terbutalin-Konzentrationen wurden verwendet: 350, 500, 650, 800, 950, 1100 und 1250 µg/kg. Behandlungskontrollen (VEH) erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (NaCl 0,9 %; 200 µl). Die Applikation der Substanzen erfolgte täglich *i.p.* im Zeitraum 42-48 dpi. Zum Zeitpunkt 49



dpi wurde schließlich die Organentnahme durchgeführt. Im direkten Anschluss wurden die separierten Milz-Proben mittels HPLC, IC-Assay oder FACS weiter analysiert.



**Abb. 3.7** Experimenteller Aufbau „ $\beta_2$ -AR Agonisten Behandlung im chronischen FV-Infektionsmodell“. C57BL/6 Weibchen wurden zunächst mit FV+LDV infiziert. wurden die Versuchstiere mit dem  $\beta_2$ -Agonisten Terbutalin behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum 42-48 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel. Die Organentnahme erfolgte zum Zeitpunkt 49 dpi.

## 3.5 Verarbeitung von Gewebeproben

### 3.5.1 Herstellung einer Zellsuspension aus der Milz

Nach der Organentnahme wurde eine Hälfte der Milz mit dem Stopfen einer sterilen 1 ml Einwegspritze durch ein Zellsieb gerieben. Danach wurde das Sieb mit 10 ml PBS gespült, um die Zellen im 50 ml Falcon auffangen zu können. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (350 x g, 8 min, 4 °C) und erneut in PBS resuspendiert. Es folgten die Zellzahlbestimmung, ein erneuter Zentrifugationsschritt und die Resuspendierung der Zellen in der gewünschten Zellkonzentration in Zellmedium. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellsuspension und alle verwendeten Medien auf Eis gelagert.

### 3.5.2 Zellzahlbestimmung

Zum Einstellen der Zellzahl wurde die zu bestimmende Probe in Trypanblau verdünnt (1:10) und auf eine Neubauerzählkammer pipettiert. Mittels Mikroskopie wurden die Zellen der Probe begutachtet und ausgezählt. Da tote Zellen eine höhere Membrandurchlässigkeit aufweisen, kann der Farbstoff ins Zytosol eindringen und die Zellen blau färben. Gezählt wurden somit nur die ungefärbten lebenden Zellen aller vier Großquadrate ( $\cong$  16 Kleinquadrate) der Zählkammer. Die Zellzahl konnte dann mit

nachfolgender Formel berechnet werden:  $C = N \times 10^4$ . Dabei entspricht C der Zellzahl pro ml, N dem Mittelwert der gezählten Zellzahl und  $10^4$  dem Volumenrechnungsfaktor für  $1 \text{ mm}^3$ .

### 3.5.3 Isolierung von Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen mittels MACS

Die Isolierung von Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen erfolgte über das *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)-System. Dabei werden alle Ter119<sup>+</sup> Zellen nach dem Prinzip der positiven Selektion über Antikörperbindungen spezifisch gekennzeichnet und nachfolgend von den nicht markierten übrigen Zellen der Zellsuspension getrennt. Für dieses Experiment wurden ausschließlich Zellsuspensionen von Milzen naiver Versuchstiere verwendet. Die Isolierung der Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen begann zunächst mit dem Einstellen der Zellkonzentration. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (300 x g, 8 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das gewonnene Zellpellet wurde schließlich in PBS resuspendiert (90 µl/ 10<sup>7</sup> Zellen), mit der entsprechenden Menge Anti-Ter-119 MicroBeads (10 µl/ 10<sup>7</sup> Zellen) gemischt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit PBS (1-2 ml/ 10<sup>7</sup> Zellen) gewaschen, zentrifugiert und in PBS (500 µl/10<sup>8</sup> Zellen) resuspendiert. Dann wurde die Zellsuspension im magnetischen Feld auf eine mit PBS vorbehandelte Zellseparationssäule (Typ LS) pipettiert. Der Säulendurchfluss wurde aufgefangen und die Säule dreimal mit 1 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt, auf ein Falcon justiert und mit 5 ml PBS befüllt. Mithilfe eines Druckstempels wurden die isolierten Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen von der Säule eluiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in Zellmedium auf Eis gelagert.

### 3.5.4 Herstellung von Zelllysaten für RNA-Analysen

Für die PCR-Analysen wurden  $1,5 \times 10^7$  Zellen (Ter119<sup>+</sup>, Ter119<sup>-</sup>, Milz-Zellen) in ein Falcon aufgenommen und zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4°C). Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 2 ml PBS resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation und die Resuspendierung des Zellpellets in 700 µl RLT Puffer/1 % 2-Mercaptoethanol (RNeasy Micro Kit). Das Lysat wurde dann auf Schreddersäulen gegeben und 2 min bei 12.000 RCF zentrifugiert. Das aufgefangene Eluat wurde schließlich bis zur weiteren Verwendung (PCR) bei -80 °C gelagert.

### 3.5.5 Herstellung von Gewebelysaten für Protein-Analysen

Für Protein-Analysen wurden separierte Milzstücke direkt nach der Organentnahme in Ripa Lyse-Puffer aufgenommen (3µl/mg Gewebe) und für 30 min auf Eis gelagert. Es folgte die Homogenisierung der Proben mithilfe eines Gewebehomogenisators, wobei die Proben durchgehend auf Eis gehalten wurden. Danach wurden die Lysate zentrifugiert (12.000 RCF, 3 min, 4 °C) und die Überstände aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung (Western Blot) wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

### 3.5.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Konzentrationsbestimmung von Neurotransmittern in der Milz wurde mithilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*; HPLC) durchgeführt. Mit dieser Technik können Proben chemisch in ihre einzelnen Bestandteile aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurden die separierten Gewebeproben in 0,4 M Perchlorsäure auf Eis homogenisiert und anschließend zentrifugiert (12.000 RCF, 10 min, 4 °C). Danach wurden die Überstände aliquotiert und für die elektrochemische Messung in ein HPLC-System überführt (10 µl). Die Quantifizierung der auftretenden Peaks erfolgte mit einem Evaluierungs-Softwareprogramm. Durchgeführt wurden die Analysen am Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. A. del Rey.

## 3.6 Zellkultur

### 3.6.1 Kultivierung der *Mus dunni*-Fibroblasten Zelllinie

Die Kultivierung der *Mus dunni*-Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen bei einem 5 % CO<sub>2</sub>/Luft-Gemisch und 37 °C. Gesplittet wurden die Zellen alle 3-4 Tage. Nach Ablauf der Inkubation wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen (10 ml). Im Anschluss wurden die Zellen in 5 %-Trypsin-EDTA (2ml) für 3-5 min bei 37 °C inkubiert. Sobald sich die Zellen vom Boden der Flasche gelöst hatten, wurden sie in Zellmedium aufgenommen (8 ml) und nach der Zellzahlbestimmung in einer neuen Zellkulturflasche und neuem Zellmedium ausgesät (1 x 10<sup>5</sup> Zellen).

### 3.6.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden *Mus dunni*-Zellen oder Milzzellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dazu wurde die Zellsuspension auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Dann wurden die Zellen zentrifugiert (350 x g, 8 min, 4 °C) und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Es folgte eine zwei- bis dreistündige Lagerung der Aliquots bei -20 °C. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei -80 °C eingefroren. Am darauffolgenden Tag wurden die Aliquots schließlich bis zur weiteren Verwendung im flüssigen Stickstoff gelagert. Um die Löslichkeit in der Zelle zu gewährleisten und die Bildung von Eiskristallen zu vermeiden enthielt das Einfriermedium Dimethylsulfoxid (DMSO), welches das in der Zelle befindliche Wasser ersetzt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Aliquots bei 37 °C im Wasserbad erwärmt und sofort in 10 ml aufgewärmtes Zellmedium übertragen. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (350 x g, 8 min, 4°C). Zur vollständigen Entfernung des DMSO wurden die Zellen erneut gewaschen und für weitere Analysen oder Kultivierungen in neuem Zellmedium aufgenommen.

### 3.6.3 Infectious Center Assay

Um die Anzahl FV-infizierter Zellen in der Milz bestimmen zu können, wurde der *Infectious Center Assay* (IC-Assay) durchgeführt. Das Prinzip des IC-Assays basiert auf der Koinkubation von Milzzellen FV-infizierter Mäuse mit *Mus dunni*-Zellen. Die infizierten Milzzellen übertragen das Virus über Zell-Zell-Kontakt auf die adhärenen *Mus dunni*-Indikatorzellen. Durch ihre weitere Zellteilung geben die infizierten *Mus dunni*-Zellen das Friend Retrovirus an ihre Tochtergenerationen weiter, wodurch virale Foci entstehen, die mittels Antikörperfärbung sichtbar gemacht werden können [Dittmer, 1998].

Zu Beginn eines jeden IC-Assays wurden in jede Vertiefung einer 6-Well Flachbodenplatte  $2 \times 10^4$  *Mus dunni*-Zellen in 3 ml Zellmedium ausgesät. Die Platten wurden im Anschluss über Nacht bei 37 °C im Inkubator gelagert und am nächsten Tag mit Zellen von FV-infizierten Milzsuspensionen inkubiert. Dazu wurden jeweils  $10^7$  bis  $10^2$  FV-infizierte Zellen auf die *Mus dunni*-Zellen gegeben. Die Koinkubation erfolgte für drei Tage bei 37 °C im Inkubator. Zur Kontrolle wurden auch einzelne Tests für nicht-infizierte Tiere durchgeführt.

Nach Ablauf der dreitägigen Inkubationszeit wurde das Medium verworfen und die Zellen durch Zugabe von 95 %-igen Ethanol für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Es folgten ein Waschschrift mit PBS und einer mit PBS/BSA. wurden die Zellen bei Raumtemperatur für etwa 2 h mit dem ersten Antikörper AK 720 Maus anti-MuLV env inkubiert (700 µl). Dieser Antikörper gilt durch seine Bindung an das env-Protein des MuLV Komplexes als FV-spezifisch. Nach der Inkubation wurde der Überstand wieder verworfen, damit die Platten zweimal mit PBS/BSA gewaschen werden konnten. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des zweiten Antikörpers (Polyklonal Ziege anti-Maus Ig, HRP-gekoppelt; 1:500 in PBS; 700 µl) und eine weitere Inkubation für 90 min bei Raumtemperatur. Dieser Antikörper bindet an den Fc-Abschnitt des ersten Antikörpers und sorgt durch seine HRP-Kopplung für die Umsetzung der nachfolgend zu den gewaschenen Platten gegebenen AEC Substratlösung. Die Inkubation mit der Substrat Lösung dauerte 10-15 min und wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln vollzogen. Anschließend wurde die umgesetzte nun rote Lösung entfernt, die Platten mit Aquadest gewaschen und über Nacht getrocknet. Am darauffolgenden Tag wurden die rot gefärbten Virus-Foci ausgezählt und die Anzahl infektiöser Milzzellen pro Maus berechnet.

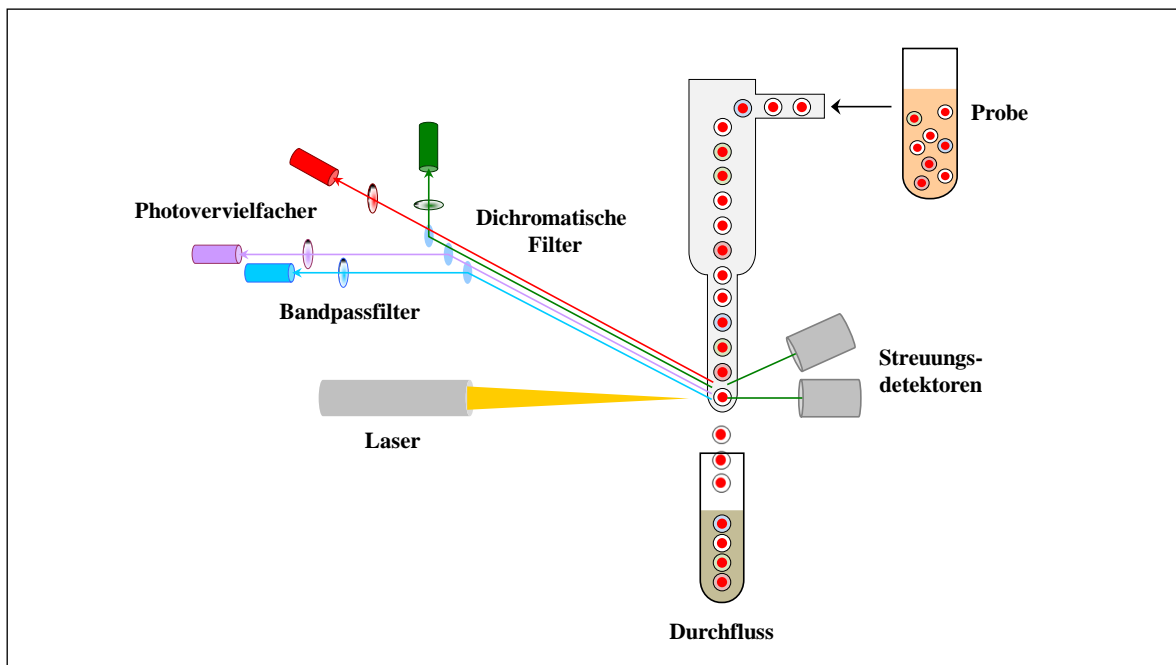
#### **3.6.4 F-MuLV-Test**

Um einen direkten Einfluss des sympathischen Neurotransmitters NA auf die FV-Replikationsrate untersuchen zu können, wurde der F-MuLV-Test durchgeführt. Dazu wurden zunächst  $7,5 \times 10^3$  *Mus dunni*-Zellen in Zellmedium in 24-Well Flachbodenplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C im Inkubator gelagert. Danach wurde das Medium ausgetauscht und es erfolgte die Zugabe von Polybren A (8 µg/ml) und 25 FFU F-MuLV. Polybren A ist ein Polymer welches die Ladungsabstoßung zwischen Viren und freien Sialinsäuren auf der Zelloberfläche mildert. Dadurch kommt es zu einer verbesserten Bindung des Virus an die Rezeptoren der Zielzelle. Im Anschluss wurden die Zellen für drei Tage bei 37 °C inkubiert. Die Zugabe von NA erfolgte entweder während der Aussaat der Zellen oder mit der Zugabe von F-MuLV. Dabei wurden drei verschiedene Konzentrationen des Neurotransmitters getestet ( $10^{-5}$  M,  $10^{-7}$  M und  $10^{-9}$  M). Nicht behandelte Kontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Zellmedium. Nach der dreitägigen Inkubation wurden die Zellen nach Protokoll des IC-Assays fixiert und gefärbt (s. Kapitel 3.6.3). Anschließend wurden die rotgefärbten Foci ausgezählt und statistisch ausgewertet.

## 3.7 Immunologische und molekularbiologische Methoden

### 3.7.1 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der unterschiedlichen Zelltypen oder intrazellulärer Zytokine wurde die Methode der Durchflusszytometrie (*Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)*) angewendet (s. Abb. 3.8). Dazu werden Zellen und Zytokine mit speziellen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer an einem Laser vorbeigeleitet. Über das vom Laser gestreute Licht lassen sich dann Größe (*Forwardscatter (FSC)*) und Granularität (*Sidescatter (SSC)*) der Zellen bestimmen.



**Abb. 3.8 Vereinfachte Darstellung der Durchflusszytometrie** [bearbeitet mit Motifolio nach Luttmann, 2009]. Mittels der Durchflusszytometrie ist es möglich Zellsuspensionen nach ihren einzelnen Zelltypen aufzutrennen oder den Anteil verschiedenster Zellpopulationen einer Lösung zu bestimmen. Dabei können Zellen sowohl aufgrund ihrer Granularität oder Größe als auch über spezifisch gebundene Antikörper genauestens typisiert werden. Die Charakterisierung erfolgt über die Streuung und Reflexion des auf sie im Durchflusszytometer gerichteten Lichtes.

Zusätzlich regt das Licht des Lasers die Fluoreszenzfarbstoffe der gebundenen Antikörper an [Luttmann, 2009], wodurch diese Licht niedrigerer Energie emittieren. Dessen Wellenlänge wird wiederum über ein optisches System und unterschiedlichste Detektoren quantifiziert. So kann für jede gefärbte Zelle ein spezifisches Signal erfasst werden, welches Aufschluss über ihren Zelltypus bietet [Luttmann, 2009].

### 3.7.1.1 Zelloberflächen-Färbung

Um die verschiedenen Zelltypen einer Zellsuspension mittels FACS typisieren zu können, musste eine Färbung der Oberflächenproteine durchgeführt werden. Dazu wurden die Zellen ( $1 \times 10^6$ ) zunächst mit dem anti-CD16/CD32 Antikörper 10 min bei 4 °C in FACS-Puffer inkubiert (1:200). Bei diesem Antikörper handelt es sich um einen Fc-Block, der unspezifische Bindungsstellen von Immunglobulinen an Fc-Rezeptoren blockiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (350 x g, 5 min, 4 °C) und in FACS-Puffer mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper gegen verschiedene Oberflächenmoleküle (z.B. CD3, CD4, CD8, Ter119 oder NK1.1; 1:200) gefärbt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4 °C wurden die Proben zentrifugiert (350 x g, 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde dann in der 1:10 verdünnten FACS Lyse resuspendiert. Nach kurzem Mischen und einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln folgte der nächste Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert. Diese zwei Schritte wurden einmal wiederholt. Zuletzt wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und mittels FACS gemessen.

### 3.7.1.2 Färbung intrazellulärer Zytokine

Mittels der Durchflusszytometrie können nicht nur Zellen, sondern auch die in ihnen befindlichen intrazellulären Zytokine detektiert werden. Dazu wurden Zellen ( $1 \times 10^6$ ) der zu untersuchenden Milzsuspensionen auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und für 5 h mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern bei 37 °C im Inkubator stimuliert. Außerdem wurde den Ansätzen Brefeldin A (2 µg/ml) zugefügt. Dieser Wirkstoff hemmt die Proteinsekretion, sodass der Proteingehalt und folglich der Zytokinanteil in den Zellen rapide ansteigt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen. wurden der Fc-Block, die Oberflächenfärbung der Zellen (CD16/CD32; CD3, CD4, CD43; s.o.) und die Zellfixierung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zentrifugiert (350 x g, 5 min, 4 °C) und im Kit-eigenen Fixierungspuffer (*Intracellular Cytokine Staining Kit*) bei Raumtemperatur im Dunkeln 20 min fixiert. Es folgten zwei Waschschrte mit Zellfärbungspuffer (*Intracellular Cytokine Staining Kit*). Nach einer Lagerung über Nacht bei 4 °C wurden die Zellen wieder zentrifugiert und in 1xPermeabilisierungspuffer (*Intracellular Cytokine Staining Kit*) aufgenommen. Im Anschluss wurden die Proben mit den spezifischen Antikörpern für IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  gefärbt (1:200). Die nachfolgende Inkubation erfolgte für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Zum Schluss wurden

die Zellen zentrifugiert, in 1xPermeabilisierungspuffer resuspendiert und nach einem weiteren Waschschrift mit FACS-Puffer im Durchflusszytometer gemessen.

### 3.7.2 Nachweis spezifischer Proteine

Der Nachweis spezifischer Proteine erfolgte über mehrere Schritte. So wurde zunächst der gesamte Proteingehalt der Lysate bestimmt (Pierce BCA Protein Assay). Dann erfolgten die Massenauftrennung aller Proteine eines Lysats mithilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und schlussendlich die Antikörpergekoppelte Detektion spezifischer Proteine mittels Western Blot.

#### 3.7.2.1 Bestimmung des Proteingehalts mittels Pierce BCA Protein Assay

Um den gesamten Proteingehalt in einem Zellysate bestimmen zu können, wurde der Pierce BCA Protein Assay angewendet. Die Funktion dieses Assays basiert auf der Kombination der Biuretreaktion (Reduktion von  $\text{Cu}^{+2}$  zu  $\text{Cu}^{+1}$  durch Eiweiße) mit der hochsensitiven und selektiven kolorimetrischen Detektion des Kupferkations ( $\text{Cu}^{+1}$ ) mittels Bicinchoninsäure. Gemäß dem Kit-eigenen Protokoll wurde zunächst eine Albuminstandardreihe hergestellt. Es folgte das Auftragen der Standardreihe und der Proben (10  $\mu\text{l}$ ) auf eine Mikrotiterplatte. Allen Vertiefungen wurde umgehend die Reaktionslösung zugeführt. Nach gründlichem Schütteln wurde die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Positive Proben verzeichneten einen Farbumschlag von grün nach lila. Durch die kolorimetrische Messung im Mikroplattenleser konnte schließlich die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

#### 3.7.2.2 Proteinauftrennung durch die diskontinuierliche SDS-PAGE

Bevor die Auftrennung der Proteinlysate im elektrischen Feld durchgeführt werden konnte, musste zunächst das diskontinuierliche Polyacrylamidgel hergestellt werden. Dazu wurde das 10 %-ige Trenngel zwischen zwei verankerte Scheiben gekippt. Zum Erreichen einer klaren Kante wurde das Trenngel oberhalb mit 400  $\mu\text{l}$  Isopropanol bedeckt. Nach der Polymerisierung des Gels wurde der Alkohol vollständig entfernt. Es folgte die Zugabe des 4 %-igen Sammelgels und das Einsetzen des Taschenkamms. Polymerisierte auch das Sammelgel, wurde das komplette Polyacrylamidgel mit Scheiben in die vorgesehene



Elektrophoresekammer montiert. Der Taschenkamm wurde entfernt und es folgte die Zugabe des SDS-Laufpuffers in die Kammer. Bevor die Proben jedoch auf das Gel aufgetragen werden konnten, mussten diese auf eine bestimmte Menge Protein eingestellt und mit Probenpuffer (4x) angereichert werden. Des Weiteren wurden sie nachfolgend für 5 min bei 95 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Nach der Proben- und Markerbeladung der Gele, lief die Elektrophorese für 60-90 min bei konstanten 120 eV. Dabei wanderten die negativ geladenen Proteine durch das Polyacrylamidgel. Je kleiner das Protein, desto weiter migriert es durch das Gel. Damit wird schließlich eine Größensortierung der Proteine hervorgerufen.

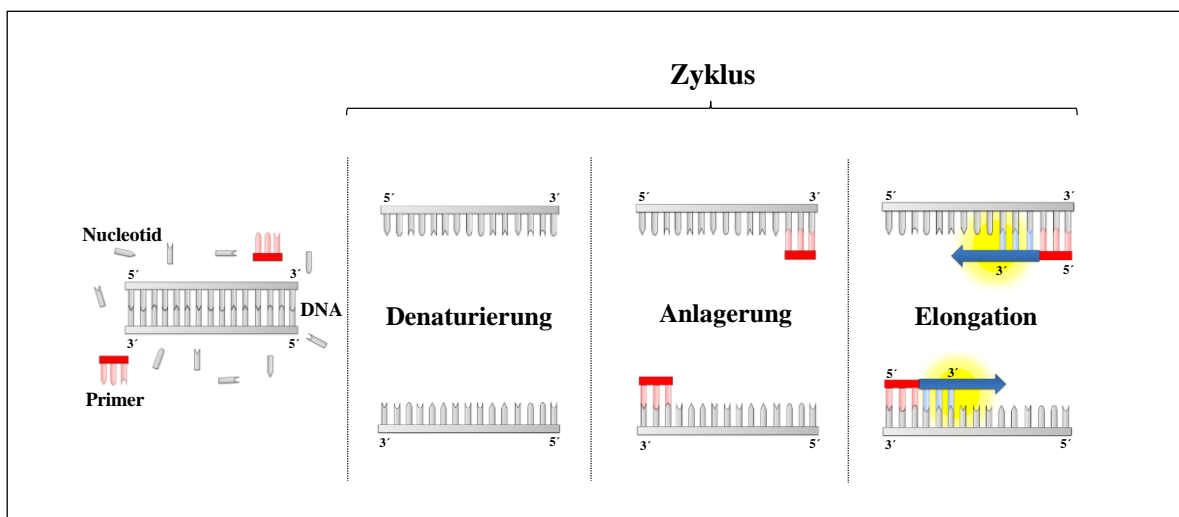
### 3.7.2.3 Antikörper-vermittelte Detektion spezifischer Proteine mittels Western Blot

Um die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine identifizieren zu können, mussten diese mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Dazu wurde das Trenngel vom Sammelgel befreit und auf die oben benannte Membran gelegt. Unter der Membran und über dem Gel wurden Puffer-getränkte Filterpapiere positioniert (Trans-Blot Turbo Mini Nitrozellulose Transfer Packs). Durch das Anlegen eines senkrecht gerichteten Feldes im Blotsystem (Western Blot Transfersystem Trans-Blot Turbo), wanderten die Proteine in Richtung der Anode auf die Nitrozellulosemembran. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran 5 min in TBST (1x) gewaschen und anschließend 5 min mit Ponceau S gefärbt. Somit konnten die Proteinbanden kenntlich gemacht werden. Die Färbung der Banden ermöglichte ein einwandfreies Zuschneiden der Membran. Es folgten weitere Waschschrte in TBST (1x) und eine dreißigminütige Inkubation in einer Milchpulverlösung zur Absättigung der Bindungsstellen. Danach wurde die Membran über Nacht unter ständigem Rollen mit dem Protein-spezifischen ersten Antikörper (MAO-A, COMT,  $\beta$ -Aktin; 1:500 in Milchpulverlösung) inkubiert. Am nächsten Tag wurden zuerst die Waschschrte und die dreißigminütige Inkubation in der Milchpulverlösung wiederholt. Anschließend wurde die Membran 1 h rollend mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-Hase IgG; 1:500 in Milchpulverlösung) bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet dabei den Primärantikörper. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran dreimal gewaschen und kurz vor der Messung im ChemiDoc MP Bildgebungssystem in der Substratlösung (Immobilon Western) geschwenkt. Das an den Sekundärantikörper gebundene HRP setzte die

Dioxetane der Substratlösung um, wobei Lumineszenz freigesetzt wird. Durch die Detektion der Lumineszenz konnte dann die Konzentration des Proteins bestimmt werden.

### 3.7.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Standardmethode der Molekularforschung und dient zur DNA-Vervielfältigung (s. Abb. 3.9). Das PCR-Prinzip basiert auf drei Schritten: Denaturierung, Anlagerung und Elongation. Während der Denaturierung wird die Doppelhelix, durch das Erhitzen auf  $> 90\text{ °C}$ , in beide Einzelstränge aufgetrennt. Es folgt der Anlagerungsschritt bei dem die Temperatur wieder gesenkt wird, damit die spezifischen Oligonukleotid-Primer an die einzelnen Stränge hybridisieren können.



**Abb. 3.9** Schematische und vereinfachte Darstellung der PCR-Methode [bearbeitet mit Motifolio nach Mülhardt, 2009]. Zu Beginn der PCR werden die DANN-Stränge durch das Erhitzen auf  $90\text{ °C}$  in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt. Mit der nachfolgenden Senkung der Temperatur folgt das Anlagern der spezifischen Oligonukleotid-Primer an die Einzelstränge. Im letzten Schritt, der Elongationsphase wird die Temperatur auf das Optimum der Polymerase eingestellt. Dieses Enzym fördert die Zweistrangsynthese und die DNA wird somit vervielfältigt.

In der Elongationsphase wird die Temperatur wieder auf das Optimum der thermostabilen Polymerase erhöht. Dieses Enzym sorgt für die Zweistrangsynthese, indem es ab dem 3' Ende der Oligonukleotid-Primer die fehlenden Stränge mit Nukleotiden auffüllt. Während einer PCR werden also aus den Produkten vorheriger Zyklen neue DNA-Stränge gewonnen, wodurch es zur Vervielfältigung des gewünschten DNA-Stranges bzw. Genes kommt [Mülhardt, 2009].

### 3.7.3.1 RNA-Extraktion aus Zelllysaten

Um RNA aus den bereits vorbereiteten Zell- und Milzlysaten FV-infizierter und nicht-infizierter Tiere isolieren zu können, wurde das RNeasy Micro Kit (Qiagen, Deutschland) verwendet. Nach dem im Kit enthaltenen Protokoll wurde das Lysat zunächst mit 70 %-igen Ethanol vermischt. Das Gemisch wurde nachfolgend auf spezielle Säulen pipettiert und dann für 15 sec bei 8000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen, da sich die RNA in der Säule befand. Es folgte die Zugabe von 350 µl RW1 Puffer und eine weitere Zentrifugation. Anschließend wurde der DNase-Verdau durchgeführt, um mögliche DNA-Reste aus der Probe zu entfernen. Hierzu wurde die DNase auf die Säule gegeben und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Nach den erneuten Waschschrritten mit RW1 Puffer, RPE-Puffer und 80 %-igen Ethanol wurde die RNA schließlich mit RNase freiem Wasser durch eine Zentrifugation bei 14.000 x g aus der Säule gelöst. Schließlich konnte im Photometer der RNA-Gehalt der Proben detektiert werden. Bis zur weiteren Verwendung (RT PCR, Real-time PCR) wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

### 3.7.3.2 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT-PCR)

Mit der RT-PCR wurde aus der extrahierten RNA cDNA synthetisiert, welche im Anschluss für die unterschiedlichsten PCR Methoden verwendet werden konnte (quantitative Real-time PCR). Dazu wurden 1,5 µg RNA mit einem Mastermix aus RT Puffer, dNTP Mix, RT Random Primer, Reverse Transkriptase, RNase Inhibitor und Wasser, vermischt. Die Proben durchliefen dann im PCR Cycler das nachfolgend aufgelistete Programm (s. Tab. 3.1). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

**Tab. 3.1** RT-PCR Programm

Zeit [min]	Temperatur [°C]
10	25
120	37
5	85
∞	4

### 3.7.3.3 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

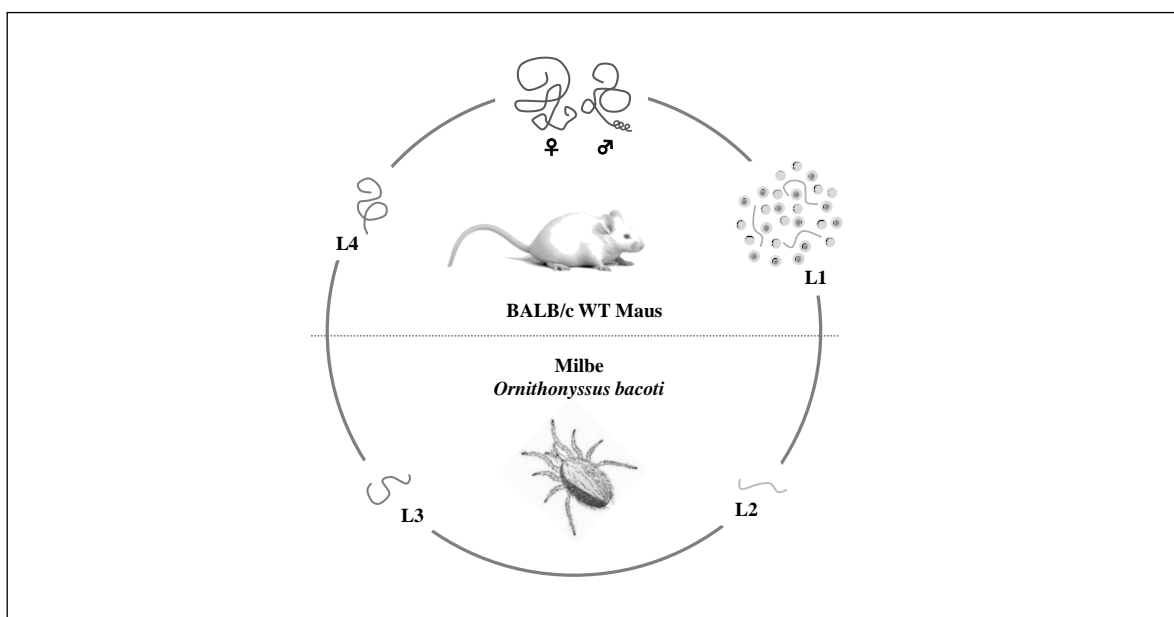
Die quantitative *Real-time* PCR (qRT-PCR) basiert auf dem gewöhnlichen PCR-Prinzip, ermöglicht jedoch auch zusätzlich die Quantifizierung der gewonnen DNA nach entsprechenden spezifischen Genabschnitten. Dazu werden während der PCR mittels fluoreszenzmarkierter Sonden Messungen durchgeführt, welche Aufschluss über die Menge des spezifischen PCR-Produktes bieten. Je mehr PCR-Produkte produziert wurden, desto intensiver wird die Fluoreszenz wahrgenommen.

Zur Bestimmung der Expressionsrate verschiedener Gene ( $\alpha_1$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -AR,  $\beta$ -Aktin) wurde zunächst ein Reaktionsgemisch hergestellt, das den FAST qPCR MasterMix (2x), Nukleasefreies Wasser, und die für ein Gen spezifischen Oligonukleotide (Primer) und FAM-markierte Sonden enthielt. Die verwendeten Konzentrationen der Oligonukleotide oder Sonden (Probes) können Tab. 2.8 entnommen werden. Im Anschluss wurden das Reaktionsgemisch und die cDNA Proben in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte überführt. Negative Kontrollen erhielten anstelle der cDNA ein entsprechendes Volumen Vehikel (Nukleasefreies Wasser). wurden die Platten kurz angefügt und dem 7500 Real-Time PCR System Cyler zugeführt. Es folgte schließlich die Messung der Fluoreszenzsignale (1 x: 50 °C, 2 min/ 95 °C 5 min; 40 x: 95 °C 3 sec/ 60 °C 20 sec/ 72 °C 26 sec) und die Auswertung der Proben mittels der 7500 Software v2.0.6.

## 3.8 Das parasitische *Litomosoides sigmodontis*-Infektionsmodell

Um eine Generalisierbarkeit des Sympathikus-vermittelten Effekts auf Infektionen untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit zusätzlich der Einfluss einer Infektion mit der Nagetierfilarie *Litomosoides sigmodontis* (*L. s.*) auf die NA-Konzentration in der Milz von BALB/c WT Weibchen untersucht. Die Infektion der Mäuse erfolgte unter der Leitung von Dr. Marc Hübner, am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie des Universitätsklinikums Bonn. Die Tiere werden dort durch den Biss der Milbenart *Ornithonyssus bacoti* mit infektiösen *L. s.* L3 Larven infiziert, entwickeln aber keine Krankheitssymptome. Nach der Häutung zu juvenilen Würmern können bereits zum Zeitpunkt 25 dpi Adultwürmer in der Pleurahöhle der Mäuse aufgefunden werden. 50 Tage nach der Infektion finden sich zudem Mikrofilarien im Blut der Tiere (s. Abb. 3.10). Im Rahmen dieses Versuches wurden die infizierten Versuchstiere und naiven Kontrolltiere zu

den Zeitpunkten 35 und 70 dpi zur Organentnahme getötet. Die Organproben wurden gewogen, direkt auf Trockeneis gestellt und bis zur weiteren Analyse zur HPLC-Messung bei -80 °C gelagert. Außerdem wurde die Infektion durch das Absuchen der Pleurahöhle nach adulten Würmern kontrolliert. Für die weitere Bestimmung des Infektionserfolges wurden 2-3 Tage vor der Organentnahme Blutproben über die Vena facialis gewonnen, welche im Anschluss in 1:10 verdünnte Erythrozytenlyse überführt und bis zur weiteren mikroskopischen Untersuchung bei Raumtemperatur gelagert wurden.



**Abb. 3.10** Entwicklungszyklus von *Litomosoides sigmodontis* [bearbeitet mit Motifolio nach Hübner, 2009]. BALB/c WT Mäuse, welche in ihrer Pleurahöhle weibliche und männliche *L. s.* Adultwürmer beherbergen, weisen spätestens 50 Tage nach ihrer Infektion mit der Nagetierfilarie Mikrofilarien (L1-Larven) im Blut auf. Wird der Wirt zu diesem Zeitpunkt von einer Milbe der Art *Ornithonyssus bacoti* gebissen, gelangen die Mikrofilarien in das Darmepithel dieses Zwischenwirtes. Dort entwickeln sie sich innerhalb von zehn Tagen zu infektiösen L3-Larven. Beißt die Milbe nun erneut eine BALB/c WT Maus, so infiziert sich diese mit den L3-Larven des Parasiten. Es folgt die Migration zur Pleurahöhle. Acht Tage nach der Infektion häuten sich die L3-Larven zu juvenilen Würmern (L4-Larven). Zum Zeitpunkt 25 dpi finden sich ausgereifte Adultwürmer in der Pleurahöhle der infizierten Maus.

### 3.9 Statistische Analysen

Zur Auswertung der erfassten Datensätze wurden die Software-Programme SPSS Statistics 19 und GraphPad Prism 6 (s. Tab. 2.10) verwendet. Zu Beginn wurde zunächst die Normalverteilung der Daten mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests überprüft. Für die

Vergleichsanalysen zwischen zwei Gruppen wurden in dieser Arbeit ungepaarte t-Test verwendet. Berechnungen für eine Gruppenanzahl größer zwei wurden mithilfe der *one-way* ANOVA und der zwei- oder dreifaktoriellen ANOVA durchgeführt. Für Post-hoc Vergleiche wurden entweder der Tukey's HSD Test, der Bonferroni-Test oder geplante t-Tests benutzt. Das Signifikanz-Niveau wurde auf  $*p \leq 0,05$  festgelegt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Lokale Neurotransmitter-Konzentration in der Milz akut FV-infizierter Mäuse

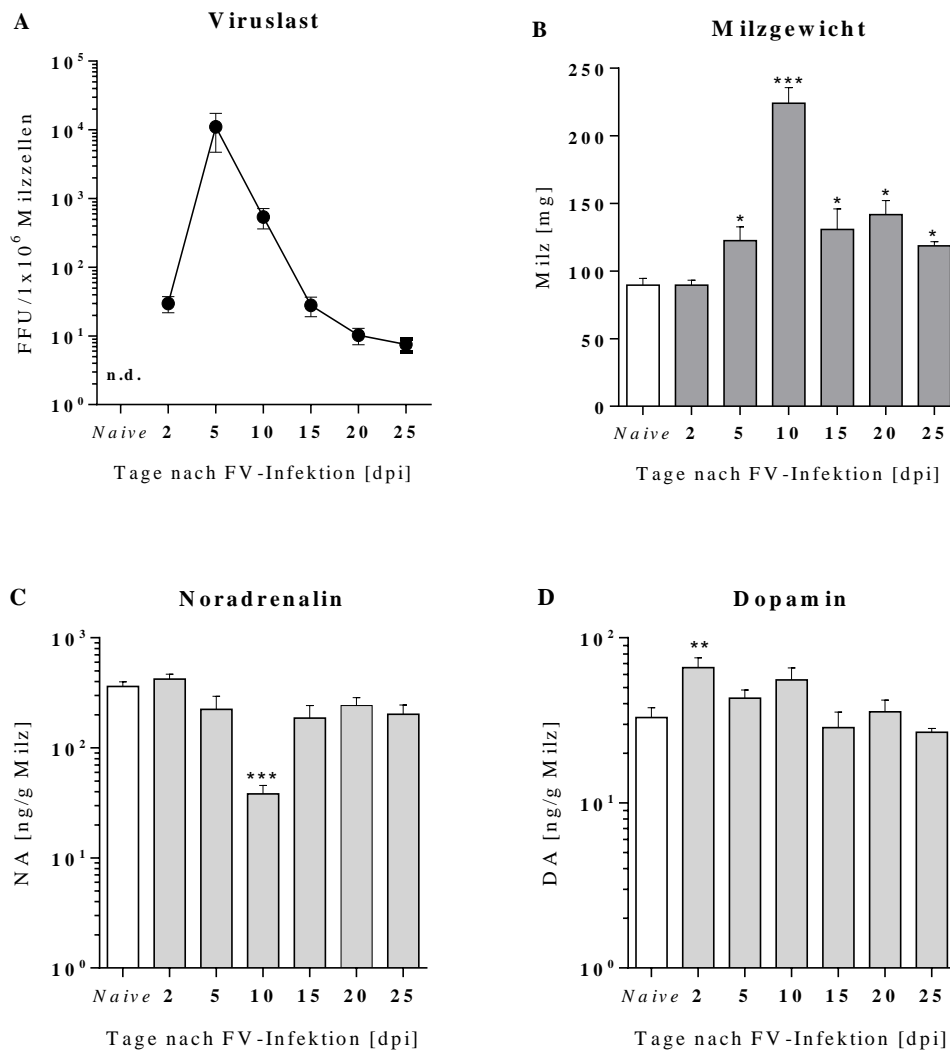
Um das Interaktionsspektrum zwischen einer FV-Infektion und dem SNS genauer aufklären zu können, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion (2, 5, 10, 15, 20 oder 25 dpi) die Milzen FV-infizierter und naiver Versuchstiere separiert. Dabei wurden die Milzen sowohl hinsichtlich ihres Infektionsstatus als auch ihrer sympathischen Neurotransmitter-Konzentration analysiert.

#### 4.1.1 Der akute FV-Infektionsverlauf

Der Verlauf einer akuten FV-Infektion wurde über zwei verschiedene Parameter definiert. Zum einen über die Viruslast und zum anderen über das Gewicht der Milz. Abb. 4.1 verdeutlicht, dass sich mit Zunahme der Viruslast auch das Milzgewicht FV-infizierter Tiere erhöhte. Die maximale Viruslast konnte zum Zeitpunkt 5 dpi detektiert werden und sank wieder. Die niedrigste virale Belastung wurde für den Zeitpunkt 25 dpi festgehalten. Das maximale Milzgewicht konnte zum Zeitpunkt 10 dpi detektiert werden. Dabei stieg das Milzgewicht der FV-infizierten Tiere, im Vergleich zu den naiven Tieren, signifikant um 150 % an. Ähnlich der Viruslast nahm auch das Milzgewicht mit zunehmender Dauer der FV-Infektion wieder ab. Basierend auf diesen Ergebnissen wird der Zeitpunkt 10 dpi in dieser Arbeit fortlaufend als Höhepunkt der akuten FV-Infektion definiert.

#### 4.1.2 Neurotransmitter-Konzentration der Milz

Die HPLC-Analysen der separierten Milz-Proben wurden u.a. für die Neurotransmitter NA und DA durchgeführt. Dabei wurde ausschließlich für NA ein signifikanter Effekt zum Höhepunkt der FV-Infektion ermittelt (s. Abb. 4.1 C). So nahm die NA-Konzentration in der Milz FV-infizierter Tiere im Vergleich zu den naiven Kontrolltieren zum Zeitpunkt 10 dpi signifikant um 90 % ab. Mit nachfolgender Abnahme des Milzgewichts stieg auch wieder die NA-Konzentration in der Milz an.



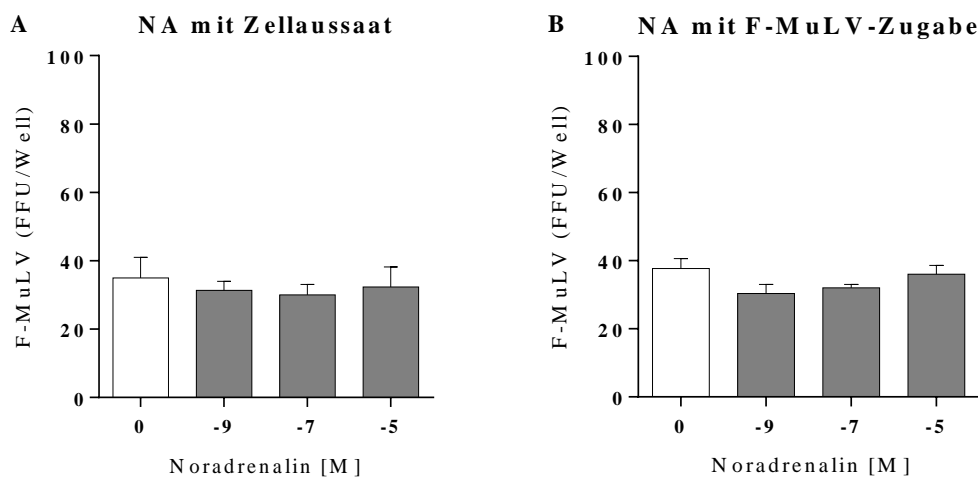
**Abb. 4.1** Akuter FV-Infektionsverlauf. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 20.000 SFFU des FV-Komplexes infiziert ( $n = 5$ /Gruppe). Naive Mäuse erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (PBS,  $n = 10$ ). wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion (2, 5, 10, 15, 20 oder 25 dpi) die Viruslast (A) und das Milzgewicht (B) bestimmt. Zusätzlich wurde in der Milz die Konzentration von Noradrenalin (NA, C) und Dopamin (DA, D) ermittelt. Statistik: One-Way ANOVA und Bonferroni Post-hoc-Test. Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  vs. Naive). n.d. = nicht detektierbar.

Dass es sich bei der beschriebenen NA-Depletion nicht um einen Verdünnungseffekt durch das größere Volumen der Milz handelte, veranschaulicht Abb. 4.1 D. So wurde in Milzen FV-infizierter Mäuse für das Katecholamin DA lediglich zu Beginn der Infektion (2 dpi) ein signifikant höherer Wert, im Vergleich zu den naiven Kontrolltieren, detektiert. Nachfolgend traten zwischen beiden Konditionen vergleichbare Werte auf. Es wurde demnach zum Höhepunkt der FV-Infektion kein signifikanter DA-Verlust oder -Anstieg gemessen.



Um nachweisen zu können, dass es sich bei den in Abb. 4.1 beschriebenen Ergebnissen, um einen lokalen Effekt in der Milz handelte, wurden auch Gehirn, Nebennieren und Thymus hinsichtlich ihres Gewichtes oder der NA- und DA-Konzentration untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass alle drei Organtypen während der akuten FV-Infektion keine Schwankungen im Gewicht oder der Neurotransmitter-Konzentration aufwiesen und sich nicht von den Werten der naiven Tiere unterschieden (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.3 Einfluss von Noradrenalin auf die FV-Replikation

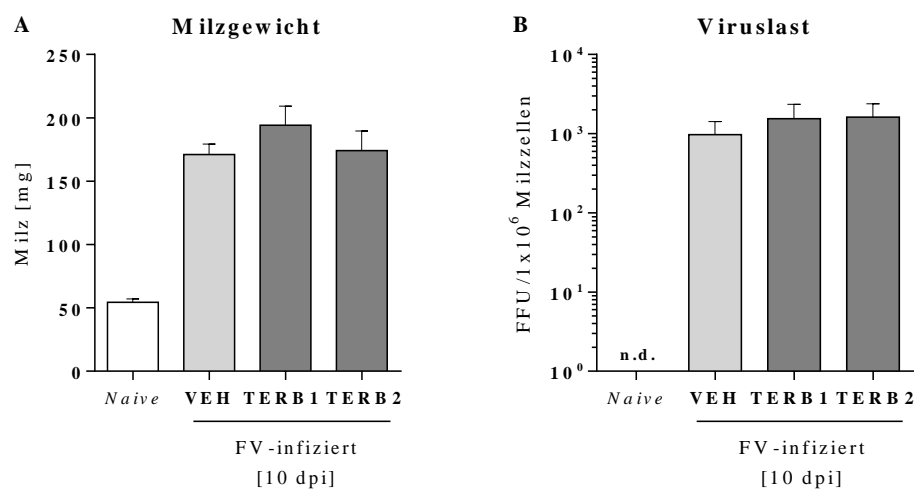


**Abb. 4.2** Noradrenerger Einfluss auf die F-MuLV Replikationsrate. *Mus dunni*-Zellen wurden zusammen mit NA ( $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  und  $10^{-9}$  M), Polybren A (8  $\mu\text{g/ml}$ ) und 25 FFU F-MuLV für 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. NA wurde entweder mit Aussaat der Zellen (A) oder mit der Zugabe des Virus (B) zu dem Inkubationsansatz hinzugegeben. Kontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Zellmedium (NA 0 M). Statistik: One-Way ANOVA. Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3).

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.1.2 (NA-Depletion) ließen die Frage aufkommen, ob das Virus in der Milz direkt auf die NA-Konzentration einwirkt, um sich so vor einem möglichen Einfluss des sympathischen Neurotransmitters auf die eigene Replikation zu schützen. Aus diesem Grund wurde der F-MuLV Test durchgeführt, bei dem eine Ko-Inkubation der *Mus dunni*-Zellen mit NA und dem Virus F-MuLV erfolgte. Abb. 4.2 zeigt, dass weder unterschiedliche Konzentrationen noch eine zeitlich unterschiedliche Zugabe des Neurotransmitters zu den *Mus dunni*-Zellen, zu signifikanten Veränderungen in der Virus-Replikation führten.

## 4.2 Effekt eines $\beta_2$ -AR-Agonisten auf die akute FV-Infektion

In Anlehnung an die vorherigen Ergebnisse (s. Kapitel 4.1) stellte sich die Frage, ob die Behandlung mit dem selektiven  $\beta_2$ -AR Agonisten Terbutalin um den Höhepunkt der FV-Infektion einen Einfluss auf den Infektionsverlauf hat. In Anbetracht der Tatsache, dass NA vor allem über den  $\beta_2$ -AR Immunantworten modulieren kann, wäre davon auszugehen, dass eine Behandlung der Tiere mit Terbutalin der NA-Depletion in Milzen FV-infizierter Tiere entgegenwirkt und somit Einfluss auf den Verlauf der FV-Infektion nehmen kann. Um einer Desensibilisierung des  $\beta_2$ -ARs entgegen zu wirken, wurden zwei verschiedene Zeiträume für die Terbutalin-Applikation gewählt (TERB1: 5-7 dpi; TERB2: 7-9 dpi). Abb. 4.3 zeigt, dass eine Behandlung mit dem  $\beta_2$ -AR Agonisten in akut FV-infizierten Tieren zu keiner Veränderung der FV-Pathogenese führte. Weder das Milzgewicht noch die Viruslast wiesen im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren (VEH) signifikante Veränderungen auf. Auch die zeitlich divergente Applikation übte keinen Einfluss auf die akute FV-Infektion aus.



**Abb. 4.3**  $\beta_2$ -AR Agonisten Einfluss auf akute FV-Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 20.000 SFFU des FV-Komplexes infiziert (n = 8/Gruppe). Naive Mäuse erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (PBS, n = 5). Im Anschluss wurden die Versuchstiere *s.c.* mit dem  $\beta_2$ -Agonisten Terbutalin (0,25 mg/kg) behandelt. Die Applikation erfolgte täglich entweder im Zeitraum 5-7 dpi (TERB1) oder im Zeitraum 7-9 dpi (TERB2). Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (NaCl 0,9 %, VEH). Das Milzgewicht (A) und die Viruslast (B) wurden zum Zeitpunkt 10 dpi analysiert. Statistik: One-Way ANOVA und Bonferroni Post-hoc-Test. Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten (VEH vs. TERB1 oder TERB2). n.d. = nicht detektierbar.

Mittels Durchflusszytometrie wurden außerdem Milzsuspensionen der einzelnen Behandlungsgruppen auf ihre zelluläre Zusammensetzung hin untersucht. Doch weder für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, noch für NK-Zellen, B-Zellen, Granulozyten oder Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen konnten zwischen den FV-infizierten Gruppen VEH, TERB1 und TERB2, signifikante Unterschiede in der Ausprägung ihrer Populationsgröße festgestellt werden (s. Tab. 4.1).

**Tab. 4.1** Zelluläre Zusammensetzung der Milzen im Agonistenversuch. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 20.000 SFFU des FV-Komplexes infiziert (n = 4/Gruppe). Im Anschluss wurden die Versuchstiere *s.c.* mit dem  $\beta_2$ -Agonisten Terbutalin (0,25 mg/kg) behandelt. Die Applikation erfolgte täglich entweder im Zeitraum 5-7 dpi (TERB1) oder im Zeitraum 7-9 dpi (TERB2). Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (NaCl 0,9 %, VEH). Die zelluläre Zusammensetzung der Milzen wurde mittels FACS zum Zeitpunkt 10 dpi analysiert. Statistik: One-Way ANOVA und Bonferroni Post-hoc-Test. Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM des prozentualen Anteils [%] von  $1 \times 10^6$  Milzzellen (VEH vs. TERB1 oder TERB2).

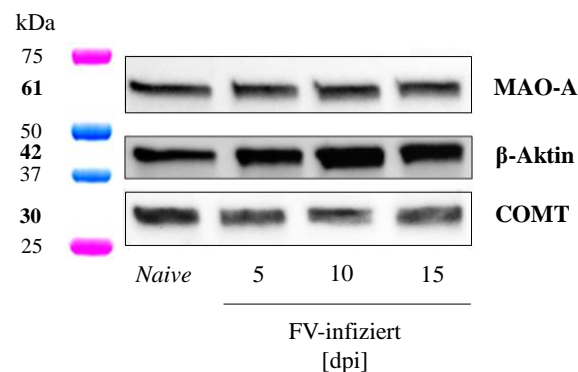
[%] von $1 \times 10^6$ Zellen	VEH	TERB1	TERB2
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	16,4 $\pm$ 0,4	15,7 $\pm$ 1,5	15,8 $\pm$ 1,0
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	13,3 $\pm$ 0,2	13,1 $\pm$ 1,0	12,4 $\pm$ 1,3
NK-Zellen	1,7 $\pm$ 0,08	1,60 $\pm$ 0,1	1,50 $\pm$ 0,3
B-Zellen	41,1 $\pm$ 0,5	39,6 $\pm$ 1,4	40,9 $\pm$ 1,3
Granulozyten	2,3 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,1
Ter119 <sup>+</sup> Ery.-Vorläuferzellen	7,9 $\pm$ 0,4	10,6 $\pm$ 4,0	11,8 $\pm$ 4,2

### 4.3 Einfluss Katecholamin-degradierender Enzyme auf die akute FV-Infektion

Um die Ursache für die NA-Depletion (10 dpi) während der akuten FV-Infektion genauer definieren zu können, wurde im Folgenden der Einfluss Katecholamin-degradierender Enzyme (MAO-A und COMT) auf den akuten FV-Infektionsverlauf untersucht. In Anlehnung an eine frühere Arbeit unserer Arbeitsgruppe, in welcher gezeigt werden konnte, dass Leukozyten akut FV-infizierter Tiere zum Höhepunkt der Infektion signifikant höhere Level an MAO-A und COMT mRNA aufwiesen [Mollérus, 2013], wurde in dieser Arbeit zunächst auf Proteinbasis der MAO-A- und COMT-Gehalt kompletter Milzgewebelysate FV-infizierter Tiere untersucht.

### 4.3.1 MAO-A und COMT Protein-Expression

Obwohl die Milzen der akut FV-infizierten Mäuse zum Höhepunkt der Infektion (10 dpi) deutlich höhere Gesamt-Protein-Konzentrationen aufwiesen, wurden zu keinem Zeitpunkt der akuten FV-Infektion (5, 10 und 15 dpi) Unterschiede in der Proteinexpression von MAO-A und COMT festgestellt. Vielmehr glichen die Protein-Werte der FV-infizierten Tiere denen der naiven Kontrolltieren (s. Abb. 4.4).



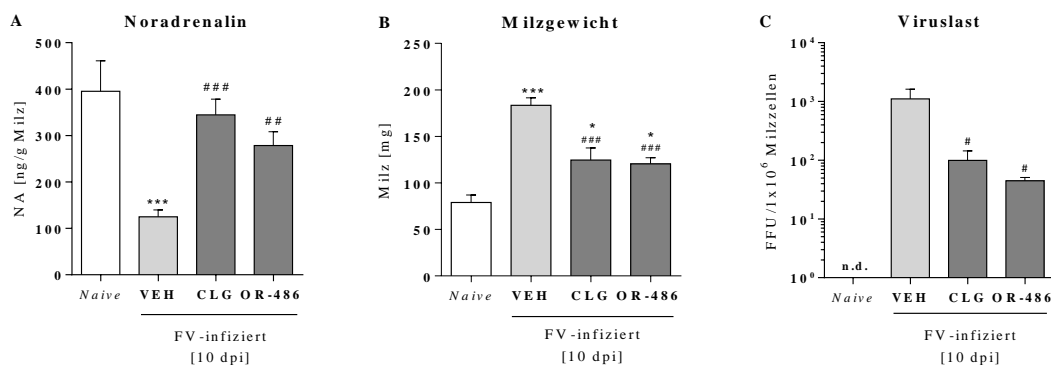
**Abb. 4.4** MAO-A und COMT-Proteinnachweis während einer akuten FV-Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 20.000 SFFU des FV-Komplexes infiziert (n = 6/Gruppe). Naive Mäuse erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (PBS, n = 6). Die Separation der Milzen erfolgte zu den Zeitpunkten 5, 10 oder 15 dpi. Im Anschluss wurden MAO-A und COMT auf Proteinebene in der Milz mithilfe der Western Blot Methode nachgewiesen (Referenzprotein:  $\beta$ -Aktin; 40  $\mu$ g Protein/Probe).

### 4.3.2 Effekt einer pharmakologischen Enzymblockade von MAO-A und COMT

Um *in vivo* einen möglichen Einfluss von MAO-A und COMT auf die NA-Konzentration der Milz im FV-Infektionsverlauf untersuchen zu können, wurden akut FV-infizierte Tiere mit MAO-A- und COMT-Inhibitoren behandelt (CLG und OR-486). Damit sollte der Neurotransmitter-Abbau in der Milz während der Infektion verhindert werden. Abb. 4.5 A verdeutlicht, dass die pharmakologische Inhibition von MAO-A und COMT in FV-infizierten Tieren, im Vergleich zur infizierten VEH Gruppe, zu einer signifikanten Steigerung der NA-Konzentration in der Milz (CLG 163 %; OR-486 112 %) führte. Die NA-Konzentration war damit in den CLG- bzw. OR-486-behandelten FV-infizierten Tieren vergleichbar hoch, wie in den naiven Tieren.

Des Weiteren sank das Milzgewicht für beide behandelten Gruppen im Vergleich zu der infizierten VEH-Gruppe signifikant um etwa 67 % (s. Abb. 4.5 B). Die Auswirkungen der Enzymblockade beliefen sich auch auf die Viruslast. Tiere beider Gruppen wiesen eine signifikante Minderung der Viruslast auf (s. Abb. 4.5 C). Somit resultierte sowohl aus der MAO-A-, als auch aus der COMT-Enzymblockade eine Abschwächung der FV-Pathogenese.

Auf zellulärer Ebene konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil der verschiedenen Immunzellen in der Milz festgestellt werden. Lediglich für die Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen wurde in der VEH-Gruppe ein tendenziell höherer Anteil gegenüber den behandelten Gruppen ermittelt (s. Tab. 4.2).



**Abb. 4.5** MAO-A- und COMT-Enzymblockade während einer akuten FV-Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 20.000 SFFU des FV-Komplexes infiziert (n = 7/Gruppe). Naive Mäuse erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (PBS, n = 7). Im Anschluss wurden die Versuchstiere *i.p.* mit dem MAO-A-Inhibitor Chlorgylin (CLG, 10 mg/kg) oder dem COMT-Inhibitor 3,5-Dinitrocatechol (OR-486, 25 mg/kg) behandelt. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (NaCl 0,9 %, VEH). Die NA-Konzentration der Milz (A), das Milzgewicht (B) und die Viruslast (C) wurden zum Zeitpunkt 10 dpi analysiert. Statistik: One-Way ANOVA und Tukey's HSD Test. Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten (\* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$  vs. Naive; # $p \leq 0,05$ , ## $p \leq 0,01$ , ### $p \leq 0,001$  vs. VEH). n.d. = nicht detektierbar.

**Tab. 4.2** Zelluläre Zusammensetzung der Milzen während MAO-A- und COMT-Enzymblockade. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 20.000 SFFU des FV-Komplexes infiziert (n = 7/Gruppe). Im Anschluss wurden die Versuchstiere *i.p.* mit dem MAO-A-Inhibitor Chlorgylin (CLG, 10 mg/kg) oder dem COMT-Inhibitor 3,5-Dinitrocatechol (OR-486, 25 mg/kg) behandelt. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (NaCl 0,9 %, VEH). Die zelluläre Zusammensetzung der Milzen wurde mittels FACS zum Zeitpunkt 10 dpi analysiert. Statistik: One-Way ANOVA und Bonferroni Post-hoc-Test. Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM des prozentualen Anteils [%] von  $1 \times 10^6$  Milzzellen aus zwei unabhängigen Experimenten (VEH vs. CLG oder OR-486).

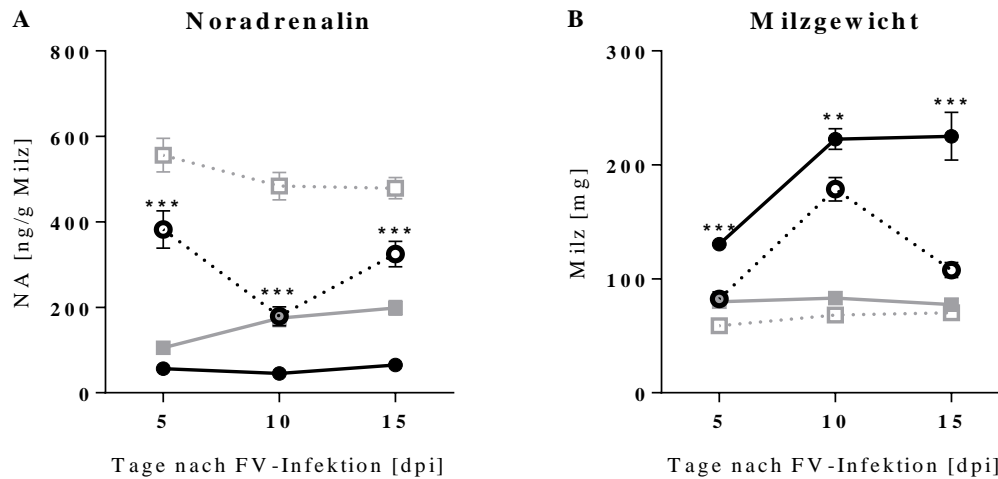
[%] von $1 \times 10^6$ Zellen	VEH	CLG	OR-486
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	14,7 $\pm$ 1,7	15,2 $\pm$ 1,6	14,6 $\pm$ 1,9
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	12,4 $\pm$ 2,3	13,7 $\pm$ 2,8	12,5 $\pm$ 2,7
NK-Zellen	1,7 $\pm$ 0,08	2,5 $\pm$ 0,6	2,2 $\pm$ 0,5
Ter119 <sup>+</sup> Ery.-Vorläuferzellen	37,6 $\pm$ 4,9	30,5 $\pm$ 3,5	30,2 $\pm$ 4,1

## 4.4 Chemische Sympathektomie im akuten FV-Infektionsverlauf

Im Anschluss an die Experimente des vorherigen Kapitels, in denen eine experimentell erzeugte höhere NA-Konzentration in Milzen akut FV-infizierter Mäuse zu einer Verminderung des Infektionsausmaßes führte, wurde gegensätzlich dazu der Einfluss einer chemisch verursachten Sympathektomie auf den FV-Infektionsverlauf untersucht. Mit der Behandlung der Versuchstiere durch 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) wurde bereits 2-3 Tage vor der FV-Infektion in der Peripherie eine massive Depletion von NA induziert.

### 4.4.1 Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf die FV-induzierte Splenomegalie

Um gewährleisten zu können, dass ein möglicher Effekt der chemischen Sympathektomie im Infektionsverlauf auf die experimentell induzierte NA-Depletion zurückzuführen ist, wurden die separierten Milzen zusätzlich mittels HPLC analysiert. Abb. 4.6 A veranschaulicht die Ergebnisse dieser Analysen. Milzen sympathektomierter Tiere wiesen zu allen drei Zeitpunkten der Infektion signifikant weniger NA auf, als die der VEH-behandelten Kontrollen. Die chemische Sympathektomie führte in der Milz im Durchschnitt zu einer 70 %-igen (Naive/6-OHDA) bis 89 %-igen (FV/6-OHDA) Reduktion der NA-Konzentration.

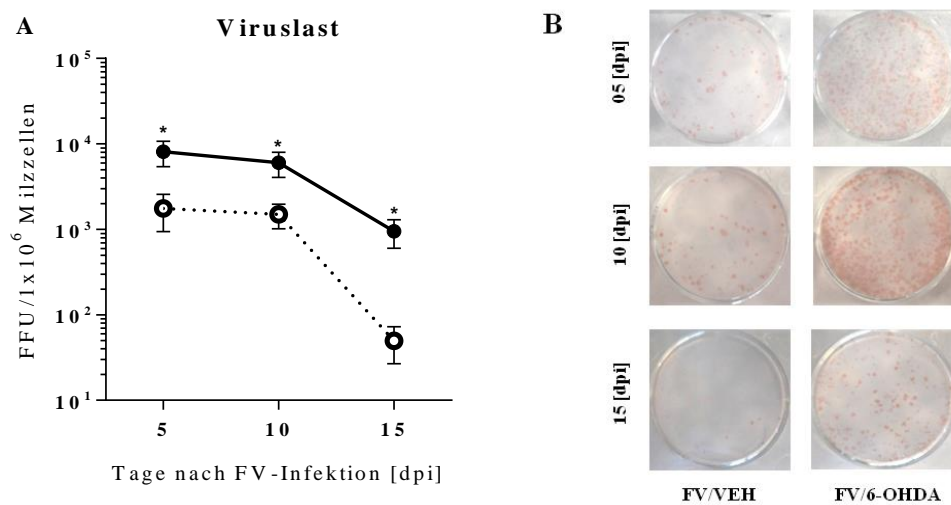


**Abb. 4.6** Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf die FV-induzierte Splenomegalie. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 20.000 SFFU des FV-Komplexes infiziert (n = 12/Gruppe). Naive Mäuse erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (PBS, n = 12/Gruppe). Die Versuchstiere wurden außerdem *i.p.* mit dem Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA, 150mg/kg) behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum -3 bis -2 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (0,01 % Isoascorbinsäure). Analysiert wurden die NA-Konzentration in der Milz (A) und das Milzgewicht (B) zu den Zeitpunkten 5, 10 oder 15 dpi. Behandlungsgruppen: □ Naive/VEH, ■ Naive/6-OHDA, ○ FV/VEH und ● FV/6-OHDA. Statistik: Dreifaktorielle ANOVA und geplante t-Tests. Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Experimenten (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; FV/6-OHDA vs. FV/VEH).

FV/6-OHDA Mäuse wiesen im Vergleich zu der FV/VEH Gruppe zu allen Zeitpunkten der FV-Infektion signifikant größere Milzen auf. Es entwickelte sich in beiden FV-infizierten Gruppen im Vergleich zu ihren jeweiligen naiven Kontrollgruppen bis zum Zeitpunkt 10 dpi eine bis zu 168 %-ige Vergrößerung der Milz. Dabei stieg das Milzgewicht der FV/6-OHDA Tiere um 24,7 % höher an, als das der FV/VEH Tiere. Entsprechend dem akuten FV-Infektionsverlauf, reduzierte sich das Milzgewicht der FV/VEH Gruppe bis zum Zeitpunkt 15 dpi jedoch wieder (um 104 %). Im Gegensatz dazu sank das Milzgewicht der FV/6-OHDA Tiere bis zum Ende der experimentellen Erfassung (15 dpi) nicht. Die Differenz des Milzgewichtes zwischen FV/VEH und FV/6-OHDA lag daher zum Zeitpunkt 15 dpi bei über 109 %. Folglich konnte für die sympathektomierten Tiere keine übliche Rückbildung der transienten Splenomegalie festgestellt werden. Die Milzen der naiven Kontrollgruppen (Naive/VEH und Naive/6-OHDA) wiesen zu keinem Zeitpunkt der Infektion vergrößerte Milzen auf. Für beide Gruppen wurden annähernd ähnliche Werte detektiert.

#### 4.4.2 Auswirkungen einer chemischen Sympathektomie auf die Viruslast

Betrachtet man des Weiteren die Viruslast der FV-infizierten Tiere, so wird deutlich, dass die FV/6-OHDA Gruppe zu jedem Zeitpunkt der Infektion höhere Werte aufwies als die FV/VEH Gruppe (s. Abb. 4.7 A). Verdeutlicht wird dieses Verhältnis auch über die IC-Assay Aufnahmen aus Abb. 4.7 B. Außerdem ist zu erkennen, dass die Viruslast beider Gruppen wieder bis zum Zeitpunkt 15 dpi sank. Somit nahm die Viruslast in der FV/6-OHDA Gruppe im Gegensatz zum Milzgewicht kontinuierlich ab.



**Abb. 4.7** Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf die Viruslast im akuten FV-Infektionsverlauf. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 20.000 SFFU des FV-Komplexes infiziert (n = 12/Gruppe). Die Versuchstiere wurden außerdem *i.p.* mit dem Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA, 150mg/kg) behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum -3 bis -2 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (0,01 % Isoascorbinsäure, VEH). Die Viruslast wird hier über statistische Auswertungen (A) und über Photographien (B) dargestellt. Behandlungsgruppen: ● FV/6-OHDA, ○ FV/VEH. Statistik: Dreifaktorielle ANOVA und geplante t-Tests. Angegeben wird der Mittelwert ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten (\*p≤0,05; FV/6-OHDA vs. FV/VEH).

#### 4.4.3 Effekt einer chemischen Sympathektomie auf zelluläre Parameter

Angesichts des gravierenden Einflusses der chemischen Sympathektomie auf die FV-Infektion, wurde zudem der zelluläre Milzaufbau der Versuchstiere untersucht. Der Fokus lag dabei auf 15 dpi, dem Zeitpunkt der größten Differenz im Milzgewicht zwischen den FV-infizierten Gruppen. Mittels FACS konnte bestimmt werden, dass die FV/6-OHDA Gruppe im Vergleich zur FV/VEH Gruppe einerseits einen signifikant geringeren Prozentanteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen und andererseits einen signifikant höheren Prozentanteil an Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen aufwies (s. Tab. 4.3). Für CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-



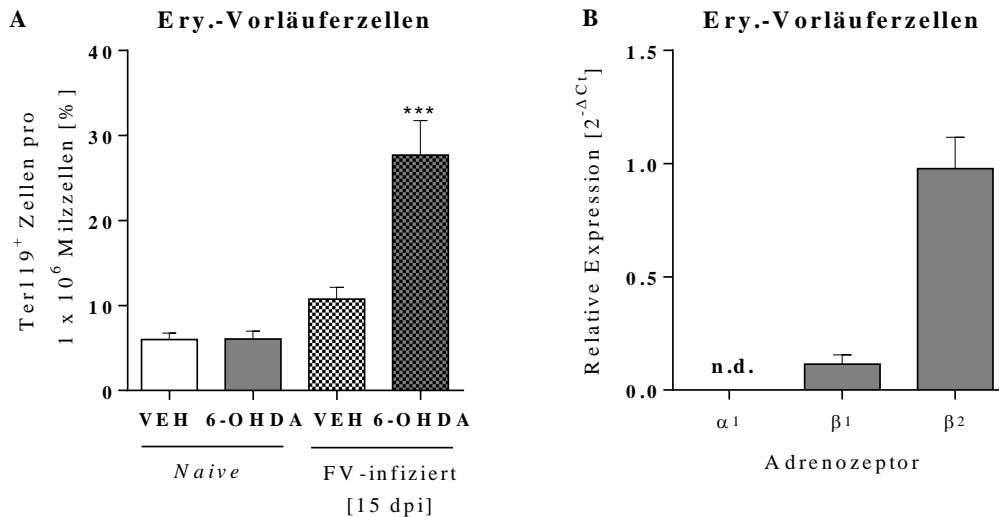
Zellen wurde zwischen den beiden FV-infizierten Gruppen kein Unterschied festgestellt. Auch der Vergleich zwischen beiden naiven Gruppen ergab keinen Unterschied für die verschiedenen Zellpopulationen (CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NK-Zellen, Ter119<sup>+</sup> Zellen und Granulozyten).

**Tab. 4.3** Zelluläre Zusammensetzung der Milzen im Sympathektomieversuch. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 20.000 SFFU des FV-Komplexes infiziert (n = 12/Gruppe). Naive Mäuse erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (PBS, n = 12/Gruppe). Die Versuchstiere wurden außerdem *i.p.* mit dem Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA, 150mg/kg) behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum -3 bis -2 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (0,01 % Isoascorbinsäure, VEH). Die zelluläre Zusammensetzung der Milzen wurde mittels FACS zum Zeitpunkt 15 dpi analysiert. Statistik: Zweifaktorielle ANOVA und geplante t-Tests. Angegeben wird der MW ± SEM des prozentualen Anteils [%] von 1 x 10<sup>6</sup> Milzzellen aus zwei unabhängigen Experimenten (FV/VEH vs. FV/6-OHDA).

[%] von 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen	Naive/VEH	Naive/6-OHDA	FV/VEH	FV/6-OHDA
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	19,3 ± 0,7	17,9 ± 1	21,9 ± 0,6	15,7 ± 1,4 **
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	11,9 ± 0,4	12,2 ± 0,5	13,0 ± 0,4	11,5 ± 0,8
NK-Zellen	4,8 ± 0,3	4,2 ± 0,2	3,3 ± 0,2	3,0 ± 0,2
Granulozyten	0,4 ± 0,1	0,42 ± 0,1	1,10 ± 0,3	1,70 ± 0,4
Ter119 <sup>+</sup> Ery.-Vorläuferzellen	6,0 ± 0,8	6,0 ± 0,9	11,1 ± 1,5	27,7 ± 4,0 **

Aufgrund der Tatsache, dass die Depletion von NA zu einem gravierenden Anstieg der Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen führte (s. Abb. 4.8), stellte sich die Frage, ob NA mit Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen über Adrenozeptoren interagieren kann. Daher wurden Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen aus Milzen naiver C57BL/6 Weibchen isoliert (Reinheit 84 %) und hinsichtlich einer  $\alpha_1$ -,  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -AR Expression untersucht.

Hierbei wurde festgestellt, dass Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen sowohl den  $\beta_1$ -, als auch in größeren Mengen den  $\beta_2$ -AR exprimieren (Abb. 4.8 B). Konträr dazu lagen die Werte für den  $\alpha_1$ -AR unterhalb des Detektionslimits. Eine Interaktion zwischen dem SNS und Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen über NA und  $\beta$ -ARs scheint daher durchaus möglich.



**Abb. 4.8** *Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen.* C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 20.000 SFU des FV-Komplexes infiziert (n = 12/Gruppe). Naive Mäuse erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (PBS, n = 12/Gruppe). Die Versuchstiere wurden außerdem *i.p.* mit dem Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA, 150mg/kg) behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum -3 bis -2 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (0,01 % Isoascorbinsäure, VEH). Angezeigt wird der Anteil von *Ter119<sup>+</sup>* Erythrozyten-Vorläuferzellen in der Milz zum Zeitpunkt 15 dpi (**A**). Statistik: Zweifaktorielle ANOVA und geplante t-Tests. Angegeben wird der Mittelwert ± SEM aus 2 unabhängigen Experimenten (\*\*\*) $p \leq 0,001$ ; FV/6-OHDA vs. FV/VEH). n.d. = nicht detektierbar. Des Weiteren wurden *Ter119<sup>+</sup>* Erythrozyten-Vorläuferzellen aus Milzen naiver C57BL/6 Weibchen (n = 12) isoliert und hinsichtlich ihrer relativen  $\alpha_1$ -,  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR Expression analysiert (n = 4; **B**).

Um einen weiteren Eindruck des Sympathektomie-Einflusses auf die FV-Infektion und in diesem Fall auf das Immunsystem zu erlangen, wurde zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt 15 dpi außerdem die pro-inflammatorische intrazelluläre Zytokinproduktion von  $CD3^+CD4^+CD43^+$  T-Zellen untersucht. Im Mittelpunkt standen hierbei die Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Allerdings konnte für kein Zytokin zwischen den einzelnen Gruppen ausschlaggebende Differenzen ermittelt werden. Lediglich für TNF- $\alpha$  wurden höhere Werte für die FV/6-OHDA Gruppe im Vergleich zur FV/VEH Gruppe detektiert. Dennoch relativiert sich dieser Effekt mit der erhöhten TNF- $\alpha$  Produktion der Naiven/6-OHDA Tiere.

**Tab. 4.4** Intrazelluläre Zytokinproduktion  $CD3^+CD4^+CD43^+$  T-Zellen im Sympathektomieversuch. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 20.000 SFU des FV-Komplexes infiziert (n = 12/Gruppe). Naive Mäuse erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (PBS, n = 12/Gruppe). Die Versuchstiere wurden außerdem *i.p.* mit dem Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA, 150mg/kg) behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum -3 bis -2 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (0,01 % Isoascorbinsäure, VEH). IL-2-, IFN- $\gamma$ -, und TNF- $\alpha$ -produzierende  $CD3^+CD4^+CD43^+$  T-Zellen der Milz wurden mittels FACS zum Zeitpunkt 15 dpi analysiert. Statistik: Zweifaktorielle ANOVA und geplante t-Tests (FV/VEH vs. FV/6-OHDA). Angegeben wird der MW  $\pm$  SEM des prozentualen Anteils [%] von  $1 \times 10^6$  Milzzellen aus zwei unabhängigen Experimenten (\*\*p $\leq$ 0,01; FV/VEH vs. FV/6-OHDA).

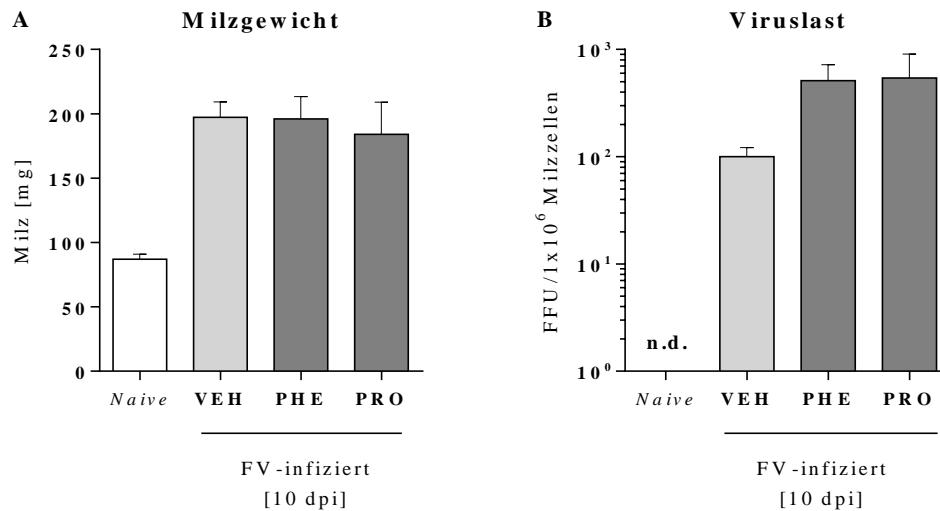
<b>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> Zellen</b> [% von $1 \times 10^6$ ]	<b>Naive/VEH</b>	<b>Naive/6-OHDA</b>	<b>FV/VEH</b>	<b>FV/6-OHDA</b>
IL-2	3,6 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,4
IFN $\gamma$	4,2 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,5	3,8 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,2
TNF- $\alpha$	6,5 $\pm$ 0,5	8,4 $\pm$ 0,5	5,6 $\pm$ 0,5	8,5 $\pm$ 0,4**

## 4.5 Adrenerge Rezeptorblockade im akuten FV-Infektionsverlauf

Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse wurde in einem letzten akuten FV-Infektionsversuch die Bedeutung einer adrenergen Rezeptorblockade für den Infektionsverlauf untersucht. In Anbetracht der Tatsache, dass die Behandlung FV-infizierter Tiere mit dem AR-Agonisten Terbutalin keinen Einfluss auf die Infektion nahm, eine chemische Sympathektomie den Schweregrad dieser jedoch verstärkte, stellte sich die Frage, ob auch eine *in vivo* AR-Blockade Einfluss auf die Infektion nehmen kann.

### 4.5.1 Einfluss einer $\alpha$ - und $\beta$ -AR-Rezeptorblockade

Ähnlich der  $\beta_2$ -AR Agonisten Applikation wurden auch nach der  $\alpha$ - und  $\beta$ -AR Antagonisten Behandlung, zum Höhepunkt der FV-Infektion (10 dpi) im Milzgewicht und der Viruslast keine Unterschiede zwischen der FV-infizierten VEH Gruppe und den FV-infizierten Antagonisten Gruppen PHE (Phentolamin;  $\alpha$ ) und PRO (Propranolol,  $\beta$ ) ermittelt (s. Abb. 4.9). Des Weiteren wurden zwischen den FV-Infizierten Gruppen keine eindeutigen Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung der Milz festgestellt (s. Tab. 4.5). Konträr dazu wiesen FV/PRO im Vergleich zu der FV/VEH jedoch signifikant weniger IL-2 und IFN- $\gamma$  produzierende  $CD3^+CD4^+CD43^+$  T-Zellen auf. Für die FV/PHE wurde dagegen nur eine signifikante Reduktion der IL-2 produzierenden  $CD3^+CD4^+CD43^+$  T-Zellen festgestellt (s. Tab. 4.6).



**Abb. 4.9** Adrenerge Rezeptorblockade während einer akuten FV-Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 20.000 SFFU des FV-Komplexes infiziert ( $n = 7$ /Gruppe). Naive Mäuse erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (PBS,  $n = 7$ ). Außerdem wurden die Versuchstiere *i.p.* mit dem  $\alpha$ -AR-Blocker Phentolamin (PHE, 3,75 mg/kg) oder dem  $\beta$ -AR-Blocker Propranolol (PRO, 3,75 mg/kg) behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum -2-9 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (0,9 % NaCl, VEH). Das Milzgewicht (**A**) und die Viruslast (**B**) wurden zum Zeitpunkt 10 dpi bestimmt. Statistik: One-Way ANOVA und Bonferroni Post-hoc-Test (VEH vs. PHE oder PRO). Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM.

**Tab. 4.5** Zelluläre Zusammensetzung der Milzen im Antagonistenversuch. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 20.000 SFFU des FV-Komplexes infiziert ( $n = 7$ /Gruppe). Außerdem wurden die Versuchstiere *i.p.* mit dem  $\alpha$ -AR-Blocker Phentolamin (PHE, 3,75 mg/kg) oder dem  $\beta$ -AR-Blocker Propranolol (PRO, 3,75 mg/kg) behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum -2-9 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (0,9 % NaCl, VEH). Die zelluläre Zusammensetzung der Milzen wurde mittels FACS zum Zeitpunkt 10 dpi analysiert. Statistik: One-Way ANOVA und Bonferroni Post-hoc-Test. Angegeben wird der MW  $\pm$  SEM des prozentualen Anteils [%] von  $1 \times 10^6$  Milzzellen (VEH vs. PHE oder PRO).

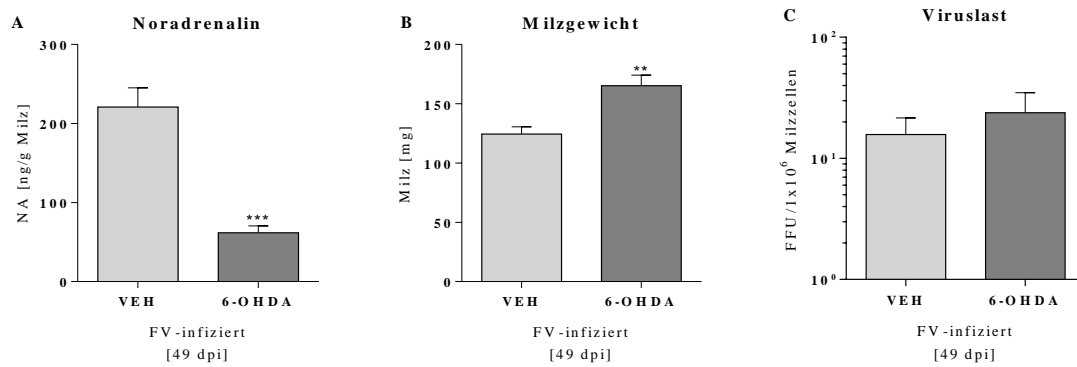
[%] von $1 \times 10^6$ Zellen	VEH	PHE	PRO
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	7,4 $\pm$ 0,5	6,7 $\pm$ 0,3	7,0 $\pm$ 1,3
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	5,0 $\pm$ 0,3	4,6 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,9
NK-Zellen	1,1 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,2
Granulozyten	0,7 $\pm$ 0,06	0,7 $\pm$ 0,03	0,7 $\pm$ 0,1
Ter119 <sup>+</sup> Ery.-Vorläuferzellen	62,3 $\pm$ 2,8	64,5 $\pm$ 1,5	64,7 $\pm$ 5,8

**Tab. 4.6** Intrazelluläre Zytokinproduktion  $CD3^+CD4^+CD43^+$  T-Zellen im Antagonistenversuch. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 20.000 SFFU des FV-Komplexes infiziert ( $n = 7$ /Gruppe). Außerdem wurden die Versuchstiere *i.p.* mit dem  $\alpha$ -AR-Blocker Phentolamin (PHE, 3,75 mg/kg) oder dem  $\beta$ -AR-Blocker Propranolol (PRO, 3,75 mg/kg) behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum -2-9 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (0,9 % NaCl, VEH). IL-2-, IFN- $\gamma$ -, und TNF- $\alpha$ -produzierende  $CD3^+CD4^+CD43^+$  T-Zellen der Milz wurden mittels FACS zum Zeitpunkt 10 dpi analysiert. Statistik: One-Way ANOVA und Bonferroni Post-hoc-Test. Angegeben wird der MW  $\pm$  SEM des prozentualen Anteils [%] von  $1 \times 10^6$  Milzzellen (\*\* $p=0,001$ , \*\*\* $p\leq 0,0001$ ; VEH vs. PHE oder PRO).

<b>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> Zellen</b> [% von $1 \times 10^6$ ]	<b>VEH</b>	<b>PHE</b>	<b>PRO</b>
IL-2	14 $\pm$ 0,5	10,3 $\pm$ 1,0 **	6,3 $\pm$ 0,3 ***
IFN $\gamma$	7,5 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,4	5,6 $\pm$ 0,4 **
TNF- $\alpha$	10,4 $\pm$ 0,3	9,5 $\pm$ 0,5	9,2 $\pm$ 0,6

#### 4.6 Chemische Sympathektomie im chronischen FV-Infektionsmodell

Die Infektion von C57BL/6 Mäusen mit dem FV-Komplex äußert sich, wie bereits veranschaulicht, zunächst durch einen zeitlich begrenzten akuten Infektionsverlauf und im Anschluss durch einen persistierenden chronischen Infektionsstatus. Da eine chemische Sympathektomie im akuten FV-Infektionsmodell zu einer verstärkten Pathologie führte (s. Kapitel 4.4), stellte sich die Frage, ob eine experimentell verursachte NA-Depletion auch auf einen chronischen Infektionsverlauf Einfluss nehmen kann. Aus diesem Grund wurden chronisch FV-infizierte Mäuse einer chemischen Sympathektomie mittels 6-OHDA unterzogen und acht Tage später hinsichtlich ihres Infektionsstatus untersucht. Die chemische Sympathektomie führte dabei zu einer NA-Depletion von über 72 % (s. Abb. 4.10 A). Ähnlich den Ergebnissen aus Kapitel 4.4 verursachte die chemische Sympathektomie auch im chronischen FV-Infektionsmodell (49 dpi) eine signifikante Vergrößerung der Milz (Abb. 4.10 B). Im Vergleich zu der infizierten VEH Gruppe stieg das Milzgewicht der sympathektomierten Tiere um etwa 30 % an. Auf zellulärer Ebene wiesen die Milzen der infizierten 6-OHDA-Mäuse im Vergleich zu den VEH Tieren einerseits signifikant geringere Prozentanteile an  $CD4^+$  T-Zellen oder  $CD8^+$  T-Zellen und andererseits einen signifikant höheren Prozentanteil an Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen auf (s. Tab. 4.7). Entgegen dieser Anzeichen einer Begünstigung der FV-Pathogenese konnten für die Viruslast keinerlei Unterschiede zwischen beiden chronisch FV-infizierten Gruppen festgestellt werden (s. Abb. 4.10 C).



**Abb. 4.10** Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf eine chronische FV-Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 15.000 SFFU eines FV/LDV Gemisches infiziert (n = 7/Gruppe). wurden die Versuchstiere *i.p.* mit dem Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA, 150mg/kg) behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum 40-41 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (0,01 % Isoascorbinsäure, VEH). Die NA-Konzentration in der Milz (A), das Milzgewicht (B) und die Viruslast (C) wurden zum Zeitpunkt 49 dpi bestimmt. Statistik: ungepaarter t-Test. Angegeben werden der Mittelwert  $\pm$  SEM (\*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

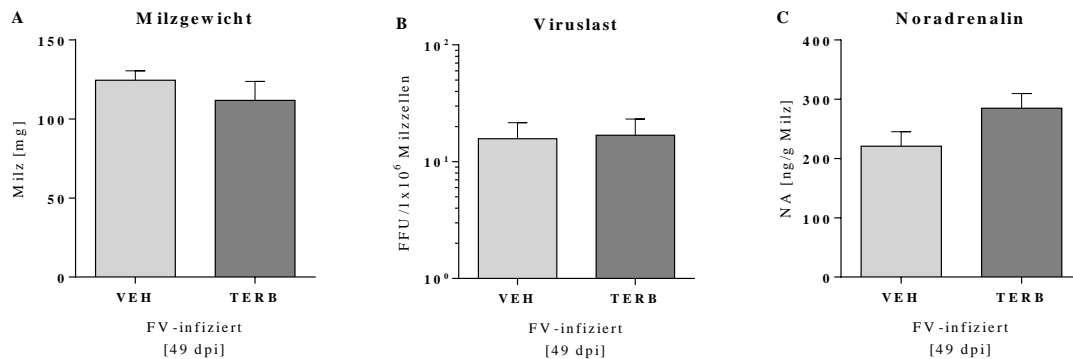
**Tab. 4.7** Zelluläre Zusammensetzung der Milz während einer chronischen FV-Infektion im Sympathektomieversuch. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 15.000 SFFU eines FV/LDV Gemisches infiziert (n = 7/Gruppe). wurden die Versuchstiere *i.p.* mit dem Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA, 150mg/kg) behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum 40-41 dpi. Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (0,01 % Isoascorbinsäure, VEH). Die zelluläre Zusammensetzung der Milzen wurde mittels FACS zum Zeitpunkt 49 dpi analysiert. Statistik: ungepaarter t-Test. Angegeben wird der MW  $\pm$  SEM des prozentualen Anteils [%] von  $1 \times 10^6$  Milzzellen (\*\* $p \leq 0,001$ ).

[%] von $1 \times 10^6$ Zellen	VEH	6-OHDA
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	24,1 $\pm$ 0,8 ***	16,6 $\pm$ 0,4
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	15,8 $\pm$ 0,4 ***	12,7 $\pm$ 0,6
Ter119 <sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen	6,70 $\pm$ 0,5	14,7 $\pm$ 1,7 ***

#### 4.7 $\beta_2$ -AR-Agonisten Einfluss im chronischen FV-Infektionsmodell

Da mit der Durchführung einer chemischen Sympathektomie im chronischen Infektionsmodell eine signifikante Vergrößerung der Milz induziert werden konnte, sollte auch untersucht werden, ob auch eine Verabreichung des  $\beta_2$ -AR-Agonisten Terbutalin Einfluss auf den chronischen FV-Infektionsverlauf nehmen kann. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Kapitel 4.2 wurde in diesem Experiment versucht, der möglichen Desensibilisierung des  $\beta_2$ -AR, anderweitig durch eine längere Applikationsspanne und eine täglich steigende Agonisten-Konzentration, entgegenzuwirken.

Abb. 4.11 verdeutlicht, dass die Behandlung chronisch FV-infizierter Mäuse mit dem  $\beta_2$ -AR Agonisten Terbutalin keinen Einfluss auf das Milzgewicht, die Viruslast oder die NA-Konzentration hatte. Des Weiteren zeigte auch die zytometrische Untersuchung der Zellpopulationen der Milz keinen signifikanten Effekt seitens der Agonisten-behandelten Gruppe (s. Tab. 4.8).



**Abb. 4.11** Einfluss des  $\beta_2$ -AR Agonisten Terbutalin auf eine chronische FV-Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 15.000 SFFU eines FV/LDV Gemisches infiziert (n = 7/Gruppe). wurden die Versuchstiere *i.p.* mit dem  $\beta_2$ -Agonisten Terbutalin (TERB) behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum 42-48 dpi. Dabei wurden täglich steigende Konzentrationen Terbutalin verwendet (350, 500, 650, 800, 950, 1100 und 1250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (0,9 % NaCl, VEH). Die NA-Konzentration in der Milz (A), das Milzgewicht (B) und die Viruslast (C) wurden zum Zeitpunkt 49 dpi bestimmt. Statistik: ungepaarter t-Test. Angegeben werden der Mittelwert  $\pm$  SEM.

**Tab. 4.8** Zelluläre Zusammensetzung der Milz während einer chronischen FV-Infektion im Agonistenversuch. C57BL/6 Mäuse wurden *i.v.* mit 15.000 SFFU eines FV/LDV Gemisches infiziert (n = 7/Gruppe). wurden die Versuchstiere *i.p.* mit dem  $\beta_2$ -Agonisten Terbutalin (TERB) behandelt. Die Applikation erfolgte täglich im Zeitraum 42-48 dpi. Dabei wurden täglich steigende Konzentrationen Terbutalin verwendet (350, 500, 650, 800, 950, 1100 und 1250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Behandlungskontrollen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (0,9 % NaCl, VEH). Die zelluläre Zusammensetzung der Milzen wurde mittels FACS zum Zeitpunkt 49 dpi analysiert. Statistik: ungepaarter t-Test. Angegeben wird der MW  $\pm$  SEM des prozentualen Anteils [%] von  $1 \times 10^6$  Milzzellen.

[%] von $1 \times 10^6$ Zellen	VEH	TERB
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	24,1 $\pm$ 0,8	25,4 $\pm$ 1,1
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	15,8 $\pm$ 0,4	16,5 $\pm$ 0,7
Ter119 <sup>+</sup> Ery.-Vorläuferzellen	6,70 $\pm$ 0,5	5,70 $\pm$ 0,5

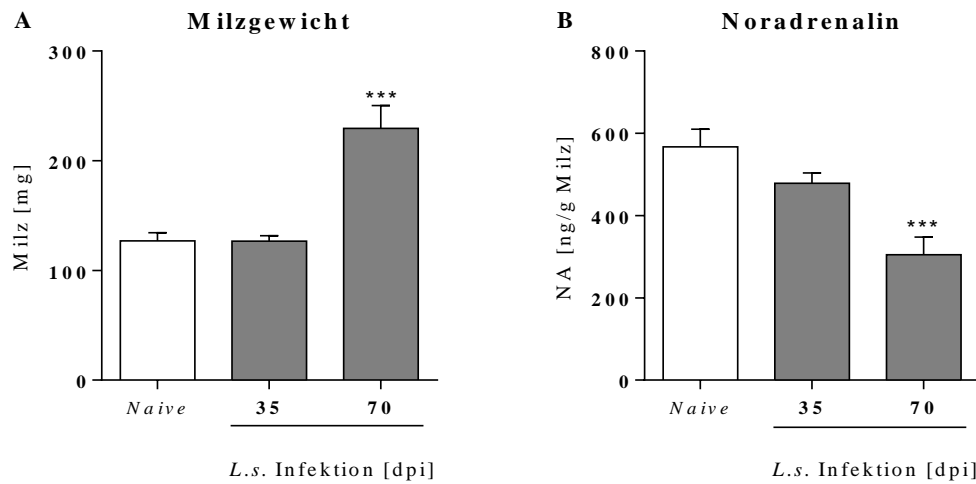
## 4.8 Sympathischer Einfluss im parasitären *Litomosoides sigmodontis*-Infektionsmodell

Um zu erörtern, ob sich die Befunde der FV-Infektion auch auf andere Infektionen übertragen lassen, wurde in zwei unabhängigen Pilotversuchen der Einfluss einer Infektion mit der Nagetierfilarie *Litomosoides sigmodontis* (*L.s.*) auf die NA-Konzentration in der Milz infizierter BALB/c WT Mäuse untersucht.

### 4.8.1 Effekt einer *L.s.*-Infektion auf das Gewicht und die NA-Konzentration der Milz

Anders als die akute FV-Infektion, welche bereits zum Zeitpunkt 10 dpi zu einer deutlichen Vergrößerung der Milz führte (s. Kapitel 4.1.1), vergrößerte sich das Milzgewicht von *L.s.*-infizierten BALB/c WT Mäusen im Vergleich zu naiven Kontrollen erst zum Zeitpunkt 70 dpi signifikant um 81 % (s. Abb. 4.12 A). Dies ist vor allem durch den langwierigen Infektionskreislauf und die unterschiedlichen *L.s.* Entwicklungsstadien zu erklären. Denn erst zu diesem Zeitpunkt der Infektionen befanden sich, neben den Adultwürmern, auch Mikrofilarien im Blut der infizierten Tiere. Dieser Zeitpunkt wird allgemein als Höhepunkt der *L.s.*-Infektion betrachtet. Ähnlich der FV-Infektion wurde auch in den Milzen *L.s.*-infizierter BALB/c WT Mäuse im Vergleich zu den naiven Kontrolltieren eine signifikante NA-Depletion detektiert. Die NA-Konzentration sank bis zum Zeitpunkt 70 dpi um über 54 % (s. Abb. 4.12 B). Damit wird deutlich, dass es nicht nur während des Höhepunktes einer akuten FV-Infektion zu einer signifikanten NA-Depletion kommt, sondern auch während des Höhepunktes einer parasitären Infektion.





**Abb. 4.12** Auswirkungen einer *L.s.*-Infektion auf das Gewicht und die NA-Konzentration in der Milz. BALB/c WT Mäuse wurden mit der Nagetierfilarie *Litomosoides sigmodontis* (*L.s.*) infiziert (n = 10/Gruppe). Als Kontrolltiere dienten naive BALB/c WT Mäuse (n = 9). Das Milzgewicht (**A**) und die NA-Konzentration in der Milz (**B**) wurde zu den Zeitpunkten 35 und 70 dpi analysiert. Statistik: One-Way ANOVA und Bonferroni Post-hoc-Test. Angegeben wird der Mittelwert  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten (\*\*\*) $p \leq 0,001$  vs. *Naive*).

## 5. Diskussion

Unter Berücksichtigung der bis dato veröffentlichten Forschungsarbeiten ist der Einfluss des SNS auf Infektionen noch nicht explizit geklärt. Vielmehr werden dem SNS unterschiedliche Eigenschaften zugesprochen. Diese sind abhängig von der Art des Pathogens, dem Ort der Infektion oder dem physiologischen/immunologischen Status des Wirtes. Entsprechend der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse soll der sympathische Einfluss auf die FV-Infektion in den nachfolgenden Kapiteln genauer interpretiert, diskutiert und mit anderen Publikationen verglichen werden.

### 5.1 Mögliche Ursachen für die FV-induzierte NA-Depletion in der Milz

Mit den ersten Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es während einer akuten FV-Infektion zu einer signifikanten NA-Depletion in der Milz kommt. Während die FV-induzierte Splenomegalie zum Höhepunkt der Infektion (10 dpi) ihr Maximum erreicht, wurde zeitgleich für die NA-Konzentration in der Milz eine signifikante Depletion um 90 % ermittelt (s. Kapitel 4.1). Dieser Effekt trat selektiv nur in der Milz auf, einer der wichtigsten Orte der FV-Replikation. Für andere Organe (Gehirn, Nebennieren oder Thymus) wurden keine Veränderungen der NA-Konzentration festgestellt. Angesichts dieser Ergebnisse, stellten sich folgende Fragen: Warum kommt es während der akuten FV-Infektion zur NA-Depletion? Wodurch wird diese verursacht? Und für wen ist die NA-Depletion vorteilhaft, den Wirt oder das Virus?

Basierend auf den Ergebnissen einer früheren Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe, in welcher gezeigt werden konnte, dass Milzzellen FV-infizierter Mäuse zum Infektionshöhepunkt signifikant mehr mRNA für die Katecholamin-degradierenden Enzyme MAO-A und COMT exprimieren [Mollérus, 2013], wurde in dieser Arbeit die Rolle jener Enzyme bei der FV-induzierten NA-Depletion genauer untersucht. Auf Protein-Ebene konnten jedoch zu keinem Zeitpunkt der FV-Infektion (5, 10 oder 15 dpi) in Milzlysaten Veränderungen des MAO-A- und COMT-Gehaltes festgehalten werden (s. Kapitel 4.3.1). Möglicherweise führte die Untersuchung ganzer Organlysate zu einer Verdünnung des Proteinanteils und folglich zum Verlust eines messbaren Effektes. Nichtsdestotrotz konnte mit der Verabreichung von CLG und OR-486 die Aktivität von MAO-A und COMT *in vivo* inhibiert werden. Dadurch verringerte sich zum einen die NA-Depletion in den Milzen FV-

infizierter Tiere signifikant, zum anderen führte die Behandlung zu einer verminderten Ausprägung der transienten Splenomegalie und einer reduzierten Viruslast (s. Kapitel 4.3.2). Die vorliegende Arbeit zeigt demnach, dass die Enzyme MAO-A und COMT eine wichtige Rolle in der FV-induzierten NA-Depletion spielen. Allerdings bleiben die Fragen, warum und wodurch es während der FV-Infektion zu einem enzymgesteuerten NA-Abbau kommt, noch unbeantwortet. Eine aktuelle Studie konnte demonstrieren, dass SIV- und HIV-Infektionen im Gehirn des Wirtes eine erhöhte MAO-B Aktivität nach sich ziehen [Meulendyke, 2014]. Da zudem bekannt ist, dass Immunzellen sowohl MAO-A als auch COMT konstitutiv exprimieren [Balsa, 1989; Mollérus, 2013], scheint ein NA-Abbau durch eine FV-induzierte MAO-A oder COMT Aktivität durchaus wahrscheinlich. Es sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass noch weitere Faktoren zu diesem Effekt beigetragen haben könnten.

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Neurotransmitter einen direkten Einfluss auf Immunzellen ausüben [Nance, 2007; Riether, 2011] und das SNS am Ort der Inflammation, wie z. B. in sekundären Lymphorganen, rein anti-inflammatorisch agiert [Pongratz, 2014]. Mithilfe eines Arthritis-Modells konnte schließlich aufgedeckt werden, dass der Einfluss des SNS durch den zentral regulierten aktiven Rückzug sympathischer Nervenfasern unterbunden wird. Dadurch wird die Interaktion sympathischer Neurotransmitter mit diversen Immunzellen am Ort der Inflammation verhindert und eine durch das ZNS gesteuerte systemische Kontrolle der Inflammation gefördert [Pongratz, 2014]. Obwohl dieser Effekt hauptsächlich für die Gelenkinnenhaut im Arthritis-Modell oder die Innervation des Darmtraktes beschrieben werden konnte [Fassold, 2009; Ferrero, 2010; Mapp, 1994; Miller, 2000; Pongratz, 2014], erscheint es durchaus möglich, dass ein Rückzug der sympathischen Nervenfasern auch im FV-Modell für die NA-Depletion verantwortlich sein kann. In weiteren Experimenten sollte demnach überprüft werden, ob nicht auch ein(e) Rückzug/Repulsion sympathischer Nervenfasern für die NA-Depletion in der Milz verantwortlich sein kann.

Neben dem Rückzug der Nervenfasern aus der Milz, besteht zudem die Möglichkeit einer Nervenfaserschädigung. So konnte in den letzten Jahren durchaus bewiesen werden, dass Retroviren mit Neuronen des ZNS interagieren und infolgedessen zu einer erhöhten Neurotoxizität führen [Wallace, 2007; Xu, 2004]. Retrovirale Proteine in HIV-Modellen können die Apoptose von Neuronen induzieren und führen zu oxidativen Nervenschädigungen [Melli, 2006; Patel, 2000; Pardo, 2001; Keswani, 2003; Sabatier,

1991]. Außerdem kann HIV-1 zu einer übermäßigen Synthese und Freigabe von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1) führen, die für Neurone äußerst toxisch wirken [Bezzi, 2001; Merrill, 1992]. Des Weiteren wurde eine Studie veröffentlicht, welche belegt, dass die Infektion mit dem Mäuseleukämie-Virus PVC-MuLV, eine neuropathogene Variante des F-MuLV, zu einer durch oxidativen Schaden verursachten Nervendegeneration führt [Wilt, 2000]. Die Resultate der hier aufgelisteten Studien beziehen sich allerdings hauptsächlich auf Schädigungen des ZNS. Veröffentlichungen zu retroviralen Infektionen und peripheren Nervenschädigungen in lymphoiden Organen sind nicht bekannt. Würde eine FV-Infektion zu oxidativen Schädigungen sympathischer Nerven führen und somit für die NA-Depletion in der Milz verantwortlich sein, müsste solch ein Effekt auch in anderen sympathisch innervierten Organen nachgewiesen werden können, da FV auch in anderen Organen auftritt [Friend, 1957]. Doch weder für Gehirn und Thymus noch für die Nebennieren FV-infizierter C57BL/6 Mäuse konnten während des akuten Infektionsverlaufs signifikante Veränderungen in der NA-Konzentration festgestellt werden. Zusätzlich müssten bei der Schädigung der sympathischen Nervenfasern zum Höhepunkt der FV-Infektion auch Unterschiede in der DA-Konzentration der Milz auftreten, da sympathische Nervenfasern auch DA anreichern und sezernieren [Bencsics, 1997; Elenkov, 2000]. Dieses weitere Katecholamin tritt während der gesamten FV-Infektion jedoch stets in annähernd konstanten Konzentrations-Verhältnissen auf (s. Abb. 4.1). Aufgrund dieser Tatsachen scheint es prinzipiell unwahrscheinlich, dass eine Zerstörung der sympathischen Nervenfasern in der Milz den Grund für die NA-Depletion zum Höhepunkt der FV-Infektion darstellt. Wenngleich in einer anderen Studie demonstriert werden konnte, dass die Infektion mit LP-BM5 und das murine erworbene Immundefektsyndrom (MAIDS) zu einer Zerstörung sympathischer Nerven in der Milz führen [Kelley, 2003], sprechen im FV-Infektionsmodell vor allem die schnelle Regeneration der NA-Konzentration (transiente Depletion) und die kurze akute Infektionsdauer gegen eine aktive Degeneration der Nervenfasern. So führt vergleichsweise auch eine chemische Sympathektomie mittels 6-OHDA zu einer Zerstörung peripherer sympathischer Nervenfasern und einer daraus resultierenden NA-Depletion von über 90 %. Die Regeneration der Nervenfasern und die Rückgewinnung ihrer vollständigen Funktionalität dauert jedoch etwa 21 Tage [Kostrzewa, 1974; Porter, 1965; Thoenen, 1968]. Im akuten FV-Modell beläuft sich die Regenerationsphase allerdings auf gerade einmal fünf Tage. Bereits zum Zeitpunkt 15 dpi wiesen die FV-

infizierten Tiere ähnliche NA-Werte auf, wie die naive Kontrollgruppe. Eine Zerstörung der sympathischen Nervenfasern, scheint daher unwahrscheinlich.

Des Weiteren sollte berücksichtigt werden, dass Katecholamine, wie NA nicht nur durch sympathische Nervenfasern an die Umgebung abgegeben werden können. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass auch periphere Immunzellen, wie TH<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> Makrophagen oder PBMCs die Fähigkeit besitzen NA zu synthetisieren [Capellino 2010, 2012; Cosentino, 2002; Miller, 2000]. Katecholamin-produzierende Zellen treten auch in der Milz auf [Pongratz, 2014]. Eine mögliche FV-induzierte Inhibition ihrer Aktivität repräsentiert somit einen weiteren Aspekt, der zur beobachteten NA-Depletion beigetragen haben könnte. Da z. B. PBMCs Katecholamine wie NA und DA unterschiedlich stark synthetisieren [Cosentino, 2002], kann die konstante DA Konzentration während der FV-Infektion in diesem Fall nicht als Ausschlusskriterium dienen. Es bedarf demnach weiterer Analysen, um die Inhibition Katecholamin-produzierender Zellen als Ursache für die NA-Depletion im akuten FV-Infektionsverlauf ausschließen zu können.

Da die Milz einen der wichtigsten Orte der FV-Replikation repräsentiert, erschien es fernerhin naheliegend, dass ein direkter Effekt des Virus die NA-Depletion verursacht. Mit dem F-MuLV Test konnte jedoch gezeigt werden, dass NA weder einen inhibitorischen noch einen stimulierenden Effekt auf die FV-Replikation ausübt (s. Kapitel 4.1.3). Eine direkte FV-Infektion der Nervenfasern stellt auch eine Möglichkeit dar, allerdings sind bisher in keinem retroviralen Infektionsmodell (z. B. LP-BM5, HIV oder MuLV) direkte Infektionen von Nervenfasern festgestellt worden [Espey, 1998; Sei, 1998]. Ein direkter Effekt des Virus auf die NA-Konzentration der Milz scheint daher zweifelhaft.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es noch einiger weiterer Experimente und Studien bedarf, um weitere mögliche Faktoren, wie eine sympathische Nervenschädigung, einen Rückzug der SNS-Fasern, die Inhibition Katecholamin-produzierender Zellen, hormonelle Veränderungen, Änderungen im zellulären Aufbau der Milz oder eine Reduktion neuronaler Wachstumsfaktoren, als Verursacher der FV-induzierten NA-Depletion, neben der bewiesenen Enzymaktivität von MAO-A und COMT ausschließen zu können. Ein mögliches Zusammenspiel einiger Faktoren kann noch nicht ausgeschlossen werden.

## 5.2 Adrenozeptor-vermittelte Einflüsse auf die FV-Infektion

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, wird die Kommunikation zwischen dem SNS und dem Immunsystem über die Bindung von Neurotransmittern an ARs auf der Oberfläche verschiedenster Immunzellen vermittelt [Kohm, 2001; Marino, 2013; Sanders, 2012]. Diese Interaktionen spielen bei verschiedenen Infektionen eine wichtige Rolle und können für den jeweiligen Wirtsorganismus sowohl vorteilhaft als auch nachteilhaft ausfallen. So führt die Behandlung mit AR-Blockern im Sepsis-Modell mit Ratten zu einer erhöhten Überlebensrate der Versuchstiere [Mori, 2011], während sie im Gegensatz dazu im Sepsis-Modell mit Mäusen die Mortalität dieser steigert [Schmitz, 2007]. Des Weiteren konnte mit einer AR-Agonisten-Behandlung in einer HSV-Studie eine verbesserte Virus-spezifische Immunantwort induziert werden [Kim, 2009]. Zudem kann die Stimulation des  $\beta_2$ -ARs auf Monozyten zu einer Reaktivierung des Cytomegalovirus führen [Prösch, 2000]. Basierend auf diesen Fakten sollte in dieser Arbeit ein möglicher AR-Einfluss auf die FV-Infektion genauer untersucht werden. Daher wurden FV-infizierte C57BL/6 Mäuse *in vivo* sowohl mit dem  $\beta_2$ -AR-Agonisten Terbutalin, als auch mit den AR-Blockern Phentolamin und Propranolol behandelt. Die daraus resultierenden Ergebnisse verdeutlichten jedoch, dass weder die Behandlung mit Terbutalin, noch die Blockade des  $\alpha$ -ARs durch Phentolamin oder des  $\beta$ -ARs durch Propranolol, Auswirkungen auf die akute FV-Infektion ausübten.

Die Applikation des  $\beta_2$ -AR-Agonisten Terbutalin (TERB) führte, verglichen mit den infizierten Kontrollgruppen (VEH), weder im akuten noch im chronischen FV-Infektionsmodell zu einer signifikanten Veränderung im Milzgewicht, der Viruslast oder der zellulären Zusammensetzung der Milz. Verschiedenste Konzentrationen, Methoden oder Zeitpunkte für die Applikation änderten nichts an den erlangten Resultaten. Ein möglicher AR-abhängiger Einfluss sollte dennoch nicht generell ausgeschlossen werden, da die durch CLG und OR-486 (MAO-A- und COMT-Inhibitor) herbeigeführte Verminderung der NA-Depletion in der Milz akut FV-infizierter Tiere zu einer Linderung der Infektionssymptome (s. Kapitel 4.3) führte. Somit besteht die Möglichkeit, dass NA über ARs bestimmter Milzzellen Einfluss auf den Infektionsverlauf ausübt. Denn verschiedene Human- und Tierstudien zeigten, dass eine langanhaltende Behandlung mit Terbutalin zu einer verminderten Expression oder Desensibilisierung des  $\beta_2$ -ARs auf Lymphozyten führt [Brodde, 1985; Johnson, 1998]. Eine Agonisten-induzierte Verringerung der Sensitivität des Rezeptors könnte den mangelnden Einfluss durch

Terbutalin erklären. Warum allerdings die Behandlung FV-infizierter Mäuse mit den  $\alpha$ - und  $\beta$ -AR Antagonisten Phentolamin und Propranolol auch keinen Effekt auf den FV-Infektionsverlauf vorwies, bleibt ungeklärt. Die Blockierung der Adrenozeptoren verhindert die Bindung von NA, wodurch die Annahme einer Verschlechterung des Infektionsstatus bestand, ähnlich der Sympathektomie-Resultate (s. Kapitel 4.4). Aufgrund dieser Ergebnisse würde ein AR-abhängiger Einfluss auf die FV-Infektion ausgeschlossen werden können. Nichtsdestotrotz sollte aufgrund der CLG- und OR-486-induzierten verminderten NA-Depletion weiter untersucht werden, ob NA über die Interaktion mit Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen die Pathologie der Infektion verändert. Anlass für diese Annahme ist die Tatsache, dass bereits eine frühere FV-Studie die Präsenz von  $\beta$ -ARs auf der Oberfläche von Erythroleukämie-Zellen belegt [Schmitt, 1980]. Bekräftigt wird dies auch durch die vorliegende Arbeit, in welcher gezeigt werden konnte, dass Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen den  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR exprimieren, die Grundvoraussetzung für einen direkten NA-Effekt.

### 5.3 Einfluss des SNS auf unterschiedliche Immunparameter

Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, übt das SNS über ARs auf der Oberfläche von Immunzellen Einfluss auf das Immunsystem und damit auf Infektionen aus. Es kann sowohl die Aktivität von Immunzellen als auch deren Proliferation und Zytokinproduktion modulieren. Die Förderung von pro- oder anti-inflammatorischen Immunantworten durch das SNS folgt jedoch keinem allgemeinen Konzept, sondern ist vielmehr abhängig von der Art des Pathogens, dem Ort der Infektion, dem Wirt oder dessen Immunstatus. So ist die Sympathikus-vermittelte Modulation verschiedenster Immunparameter nicht nur von der Art des Pathogen an sich, sondern auch vom Aktivierungszustand der Immunzelle, der Nähe der Zelle zur Neurotransmitter-Quelle, dem Neurotransmitter und der vorwiegenden AR-Expression auf der Zelle abhängig [Bellinger, 2008; Pongratz, 2014]. Dementsprechend liegen viele Publikationen mit divergenten Ergebnissen zum Einfluss des SNS auf Immunfunktionen vor. So können sympathische Neurotransmitter z. B. die Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen oder B-Zellen, sowie deren Zytokin- oder Antikörperproduktion hemmen [Bellinger 2008; Kouassi, 1988; Riether, 2011; Saha, 2001], die Phagozytoseaktivität und Zytokinproduktion von Makrophagen unterdrücken [Abrass, 1985; Pongratz, 2014] oder die lytischen Eigenschaften von NK-Zellen oder

CTLs inhibieren [Cook-Mills, 1995; Hellstrand, 1985]. Im Kontrast dazu wurde allerdings auch publiziert, dass das SNS die soeben beschriebenen Eigenschaften von CTLs, Makrophagen, NK- oder B-Zellen fördern kann [Bellinger, 2008; Hatfield, 1986; Hellstrand, 1985; Javierre, 1975; Kouassi, 1988].

Anlässlich der vielen verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten zwischen SNS und Immunsystem, wurde in dieser Arbeit auch ein möglicher sympathischer Einfluss auf FV-induzierte Immunreaktionen untersucht. Durch die zytometrischen Analysen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung akut oder chronisch FV-infizierter Mäuse mit dem  $\beta_2$ -AR-Agonisten Terbutalin keinen Einfluss auf die Proliferation oder Migration verschiedenster Immunzellen ausübte (s. Kapitel 4.2/4.7). Terbutalin behandelte Mäuse wiesen im Vergleich mit der VEH Gruppe zum Infektionshöhepunkt in der Milz vergleichbare Prozentanteile für  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Granulozyten oder Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen auf. Gleiches galt auch für die AR-Blocker-Behandlung akut FV-infizierter Tiere (s. Kapitel 4.5), wobei hier jedoch im Vergleich zur infizierten VEH Gruppe für die Phentolamin-behandelten Tiere signifikant weniger IL-2-produzierende  $CD4^+$  T-Zellen und für die Propranolol Gruppe signifikant weniger IL-2- und IFN- $\gamma$ -produzierende  $CD4^+$  T-Zellen detektiert werden konnten. In Anbetracht der Tatsache, dass die PHE und PRO Gruppe im Vergleich zu den VEH Tieren eine tendenziell höhere Viruslast aufwiesen, kann nur spekuliert werden, ob dies durch die verminderte Zytokin-Produktion verursacht wurde.

Nichtsdestotrotz konnten durch die verstärkte NA-Depletion in sympathektomierten und FV-infizierten Tieren eine signifikante Steigerung der Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen- und eine signifikante Reduktion der  $CD4^+$  T-Zellen-Anzahl induziert werden. Dies galt sowohl für den akuten, als auch für den chronischen Infektionsverlauf.  $CD4^+$  T-Zellen sind für die anti-viralen Immunantworten im FV-Infektionsmodell ausschlaggebend [Nair, 2011]. Daher ließe sich gerade durch ihre Depletion sowohl im akuten als auch im chronischen Infektionsverlauf die Steigerung des Milzgewichts und im akuten Modell zusätzlich die Steigerung der Viruslast erklären. In Anlehnung an weitere Studien, zeigen diese Ergebnisse auch, dass das SNS für effektive zelluläre und humorale T-Zell Immunantworten wichtig ist [del Rey, 2002; Engler, 2010].

Basierend auf den Ergebnissen der Sympathektomie-Versuche und der Tatsache, dass Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen auch  $\beta$ -ARs exprimieren (s. Kapitel 4.4), besteht die



Möglichkeit, dass NA die Proliferation dieser Zellen inhibiert und so dem falschen FV-induzierten Proliferationssignal entgegenwirkt [D'Andrea, 1992; Ney, 2000]. Ein solcher Effekt erscheint nicht haltlos, da aus mehreren Studien bekannt ist, dass NA oder selektive Rezeptoragonisten auf diverse Zelltypen inhibierenden Einfluss ausüben, darunter auch auf die Proliferation [Bellinger, 2008; Riether, 2010; Rontgen, 2004; Xiu, 2013]. Zudem zeigten weitere Studien, dass NA oder  $\beta$ -AR Agonisten das Wachstum von Erythrozyten-Vorläuferzellen des Knochenmarks oder der Milz unterdrücken können [Beckman, 1980; Penn, 2010]. Eine Inhibition der virus-induzierten Proliferation von Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen durch NA würde zudem erklären, warum das Milzgewicht und die Viruslast in FV-infizierten Mäusen mit verringerter NA-Depletion (s. Kapitel 4.3) signifikant sank und diese Tiere zudem tendenziell weniger Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen aufwiesen. Zuletzt konnte auch durch den F-MuLV-Test demonstriert werden, dass NA keinen direkten Einfluss auf die Virus-Replikation ausübt (s. Kapitel 4.1). Der positive Einfluss des sympathischen Neurotransmitters auf den FV-Infektionsverlauf und die verminderte Proliferationsrate, weist zusätzlich auf eine Interaktion zwischen NA und den Ter119<sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen hin. Die *in vitro* Stimulation dieser Zellen durch NA sollte daher in weiteren Experimenten genauer untersucht werden. So könnte Aufschluss über einen AR-abhängigen Einfluss von NA auf die FV-Infektion gewonnen werden.

#### 5.4 Die Rolle des SNS im FV-Infektionsmodell

Aufgrund der Erkenntnis, dass eine FV-induzierte transiente Splenomegalie mit einer massiven NA-Depletion verbunden ist und sich diese wieder verringert sobald das Milzgewicht abnimmt (s. Kapitel 4.1), stellte sich die Frage, ob NA und folglich das SNS für den Wirt einen vorteilhaften oder nachteilhaften Effekt auf die Pathologie der Infektion ausübt. Einen ersten Aufschluss darüber gewährte die Verabreichung von MAO-A- und COMT-Inhibitoren, infolgedessen sich die NA-Depletion signifikant verringerte. Außerdem führte dies zu einer stark verminderten Splenomegalie und einer reduzierten Viruslast (s. Kapitel 4.3). Hinsichtlich dieser Ergebnisse erscheint der Einfluss des SNS auf die FV-Infektion für den Wirt vorteilhaft. Unterstützt wird diese Annahme auch durch die erschwerte Pathologie in Mäusen, die einer chemischen Sympathektomie unterzogen wurden. Diese wiesen zu jedem Zeitpunkt der FV-Infektion ein signifikant höheres

Milzgewicht und eine verstärkte Viruslast auf (s. Kapitel 4.4). Des Weiteren klang die Infektion in den sympathektomierten Mäusen bis zum Zeitpunkt 15 dpi nicht ab, während die infizierte VEH Gruppe wieder einen gewöhnlichen Anstieg der NA-Konzentration in der Milz, eine Verkleinerung dieser und eine verminderte Viruslast aufwies. Mit der Durchführung einer chemischen Sympathektomie im chronischen FV-Infektionsmodell, konnte gezeigt werden, dass der Mangel sympathischen Einflusses durchaus das Potential zeigt, einen erneuten Infektionsausbruch zu bestärken. Die Etablierung einer NA-Konzentration in der Milz ähnlich der einer nicht infizierten Kontrollgruppe begünstigt demnach die Kontrolle einer chronischen FV-Infektion (s. Kapitel 4.8). In Anbetracht der aufgezeigten Ergebnisse, ist davon auszugehen, dass das SNS für den Wirt einen vorteilhaften Einfluss auf die FV-Pathologie ausübt. Damit würden sich die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Annahmen verschiedener anderer Studien decken, in denen dem SNS für den Wirt ein positiver Einfluss zugesprochen wird. So veröffentlichten RH Straub et al. 2005, dass eine chemisch-induzierte NA-Depletion die Bakterienlast in *Staphylococcus aureus*-Modellen signifikant erhöht. Außerdem zeigte eine Studie mit dem Herpes-simplex-Virus, dass sich die Verabreichung des adrenergen Rezeptoragonisten Salbutamol positiv auf virus-spezifische Immunantworten auswirkt [Kim, 2009]. Des Weiteren ist bekannt, dass NA einen inhibierenden Einfluss auf die HIV-Replikation ausüben kann [Moriuchi, 2006].

Konträr dazu wurden allerdings auch Studien veröffentlicht, die dem SNS eine nachteilige Rolle für den Wirt zusprechen. So begünstigt NA das Wachstum und die Pathogenität verschiedener Bakterienstämme [Belay, 2002; Cogan, 2007; Kinney, 2000; Lyte, 1991]. Zudem kann eine chemische Sympathektomie in verschiedenen bakteriellen Infektionsmodellen zu einer verminderten Bakterienlast, einer verstärkten Phagozytoseaktivität oder höheren Konzentrationen an pro-inflammatorischen Zytokinen führen [de Luigi, 1998; Miura, 2001; Rice, 2001; Straub, 2005]. Über dies ist auch bekannt, dass das SNS die Replikation verschiedener Viren, wie HIV-1 und KSHV, deutlich steigern oder neu induzieren kann [Chang, 2005; Cole, 1998]. Des Weiteren sind im Bereich der Parasitologie bis dato vermehrt Studien veröffentlicht worden, in denen das SNS die Vermehrungsstrategien der Parasiten begünstigt [Gongora-Alfaro, 1995; Harrison, 2003; Machado, 2012; Murphy, 2006].

Der Einfluss des SNS auf Infektionen lässt sich demnach nicht verallgemeinern. Ob das SNS pro- oder anti-inflammatorisch wirkt oder für den Wirt vorteilhaft oder nachteilhaft

agiert, ist von zu vielen unterschiedlichen Parametern abhängig. So führen unterschiedliche Arten an Pathogenen zu divergenten Immunantworten oder Krankheitssymptomen. Zusätzlich ist der Einfluss des SNS auch von Ort (z. B. unterschiedliche Gewebe) und Schweregrad der Infektion abhängig. Des Weiteren ist der Immunstatus des Wirtes ein wichtiger Faktor für den Verlauf der Infektion. Damit ist die Funktion des SNS schließlich als Kontext-abhängig zu betrachten [Pongratz, 2014].

Nichtsdestotrotz zeigt diese Arbeit, dass NA und folglich das SNS nicht zwangsläufig retrovirale Infektionen fördert. Es spielt hier vielmehr eine vorteilhafte Rolle für den Wirt. Damit können gerade im Bereich der Retroviren-Forschung neue Denk- und Therapieansätze weiter evaluiert werden. Vor allem im Bereich der HIV-Forschung finden sich in der Literatur kontroverse Befunde in Bezug auf einen Sympathikus-vermittelten Einfluss [Cole, 1998, 2001, 2008; Collado-Hidalgo, 2006; Moriuchi, 2006; Sloan 2006, 2008; Sundstrom, 2003]. In Anbetracht der Tatsache, dass HIV/AIDS nach jahrzehntelanger Forschungsarbeit immer noch zu einer der weltweit häufigsten Todesursachen zählt [WHO-Bericht, 2012], sollte ein Sympathikus-vermittelter Effekt auf die Infektion noch genauer untersucht werden. In der Forschung wird kontinuierlich nach neuen Behandlungsmethoden gegen retrovirale Infektionen geforscht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das SNS durchaus vorteilhaft auf eine retrovirale Infektion einwirken kann, wenngleich es sich um Resultate der präklinischen Forschung im Maus-Modell handelt. Bei der Entwicklung von neuen Therapien zur Abwehr von Retroviren sollte das SNS daher mehr an Relevanz gewinnen.

## 5.5 NA-Depletion ist nicht pathogen-spezifisch

Vor einigen Jahren konnte bereits gezeigt werden, dass die Infektion mit dem Retroviren-Mix LP-BM5 zu einer Vergrößerung der Milz führt und simultan eine signifikante NA-Depletion verursacht [Kelley, 2002, 2003]. Ein vergleichbarer Effekt wurde in dieser Arbeit für die FV-Infektion ermittelt. Eine Generalisierbarkeit des Effekts auf andere Infektionen ist dadurch allerdings nicht gegeben. Aus diesem Grund wurde in einem Pilotprojekt der Einfluss einer parasitären *L.s.*-Infektion auf das Milzgewicht und die NA-Konzentration untersucht. Auch hier induzierte die Infektion eine signifikante NA-Depletion in der Milz, während für diese ein signifikanter Anstieg des Gewichts detektiert wurde. Das Auftreten der NA-Depletion in beiden Infektionsmodellen (FV und *L.s.*)

impliziert zunächst den Verdacht, dass der verursachte Effekt nicht durch pathogen-spezifische Immunantworten verursacht wird. Da retrovirale Infektionen vor allem  $T_H1$ -Immunantworten induzieren [Hasenkrug, 1997], extrazelluläre Parasiten, wie *L.s.* jedoch vor allem  $T_H2$ -Immunantworten herbeiführen [MacDonald, 2002; Maréchal, 1997], könnte ein immunomodulatorischer Einfluss zunächst ausgeschlossen werden. Da es sich allerdings nur um zwei Pilotversuche handelte, wurden außer der Milz keine weiteren lymphoiden Organe untersucht. Des Weiteren konnten keine durchflusszytometrischen Analysen zur Aufklärung der zellulären Zusammensetzung der Milz durchgeführt werden. Die Synthese von Zytokinen und Chemokinen wurde auch nicht verifiziert. Aus diesem Grund ist die Interpretation der Ergebnisse mit starken Einschränkungen verbunden. Eine immunomodulatorische Ursache für die NA-Depletion kann daher nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren sollte beachtet werden, dass der Anstieg des Milzgewichtes während der akuten FV-Infektion mit einer massiven Proliferation der  $Ter119^+$  Erythrozyten-Vorläuferzellen verbunden ist, welche als Zielzellen des Virus gelten. *L.s.* hingegen ist ein extrazellulärer Parasit, der nicht in der Milz, sondern als Adultwurm in der Pleurahöhle und im Blut in Form von Mikrofilarien auftritt. Demnach müssten weitere Experimente aufklären, ob auch  $Ter119^+$  Erythrozyten-Vorläuferzellen in diesem Infektionsmodell für die Zunahme des Milzgewichtes verantwortlich sind. Die Rolle von Erythrozyten-Vorläuferzellen wurde im *L.s.*-Infektionsmodell bisher noch nicht weiter untersucht. Die Zunahme des Milzgewichtes könnte hier vor allem mit der steigenden Anzahl an Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen, T- und B-Zellen assoziiert werden [Ajendra, 2014]. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der Effekt der NA-Depletion in der Milz nicht allein auf retrovirale Infektionen zurückzuführen ist und somit nicht pathogen-spezifisch induziert wird. Um jedoch eine Generalisierbarkeit des Effektes weiter untermauern zu können, sollten weitere Infektionsmodelle (bakteriell und fungal) diesbezüglich verifiziert werden.

## 5.6 Ausblick

Weltweit sterben Menschen und Tiere an den Folgen von Infektionserkrankungen. Eine große Rolle spielen dabei Erkrankungen, die durch Retroviren, wie HIV verursacht werden. Mithilfe des murinen FV-Infektionsmodells konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass auch das SNS auf den Verlauf einer retroviralen Infektion Einfluss nehmen

kann. So steigerte die chemische Depletion des sympathischen Neurotransmitters NA den Schweregrad der akuten und chronischen FV-Infektion. Im Umkehrschluss linderte eine experimentell-induzierte Verminderung der NA-Depletion in der Milz, die Symptome der Infektion zugunsten des Wirtes. Weitere Ergebnisse dieser Arbeit deuten dabei auf eine Interaktion des Neurotransmitters NA mit den Zielzellen des FV hin. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse müsste daher in weiteren Untersuchungen geklärt werden, ob NA die Proliferation der Virus-Zielzellen über einen  $\beta_2$ -AR vermittelten Signalweg inhibieren kann. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob solch ein positiver Effekt auch in humanen retroviralen Infektionsmodellen auftreten kann. Denn gerade in der HIV-Forschung gibt es kontroverse Ergebnisse zur Rolle des SNS [Cole, 2001; Collado-Hidalgo, 2006; Kopnisky, 2004; Moriuchi, 2006]. Nichtsdestotrotz zeigen die Resultate dieser Arbeit auch, dass es weiterer klinischer Studien bedarf, um die Auswirkungen adrenerger Agonisten/Antagonisten und MAO-A- und COMT-Inhibitoren auf Patienten retroviraler Infektionen besser bestimmen zu können. Das SNS scheint daher durchaus einen neuen möglichen Forschungsansatz zur Verbesserung humaner retroviraler Therapien darzustellen.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des sympathischen Nervensystems (SNS) im Verlauf einer Friend Retrovirus (FV)-Infektion bei Mäusen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es zum Höhepunkt der virus-induzierten Splenomegalie zu einem massiven Verlust des sympathischen Neurotransmitters Noradrenalin (NA) in der Milz kommt. Dieser Effekt war transient und am Ende der akuten Infektion nicht mehr zu beobachten. Die FV-induzierte NA-Depletion konnte durch die pharmakologische Blockade der Katecholamin-degradierenden Enzyme Monoaminoxidase A (MAO-A) bzw. Catechol-O-Methyltransferase (COMT) mithilfe der selektiven Inhibitoren Clorgylin bzw. 3,5-Dinitrocatechol verhindert werden. Diese Intervention führte in FV-infizierten Mäusen zudem zu einer signifikanten Reduktion in der Viruslast und zu einer verminderten virus-induzierten Splenomegalie. Eine periphere chemische Sympathektomie vor der FV-Infektion hatte hingegen eine verstärkte Pathologie zur Folge. Sympathektomierte FV-infizierte Mäuse wiesen im Vergleich zu intakten Tieren eine signifikant höhere Viruslast auf und zeigten eine signifikant stärkere Splenomegalie. Eine Behandlung mit selektiven adrenergen Agonisten bzw. Antagonisten hatte keinen Einfluss auf den Infektionsverlauf. In chronisch FV-infizierten Tieren führte die chemische Sympathektomie ebenfalls zu einer Vergrößerung der Milz. Direkte Effekte von NA auf die Virus-Replikation konnten in *in vitro* Experimenten ausgeschlossen werden. Die Expression von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren in Erythrozyten-Vorläuferzellen deuten auf eine mögliche Interaktion des Neurotransmitters mit den Zielzellen des Virus hin, was jedoch in weiterführenden Experimenten bestätigt werden muss. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es während der Pathogenese einer FV-Infektion zu Veränderungen im Neurotransmitterstoffwechsel in einem wichtigen Zielorgan der Infektion kommt. Pharmakologische Interventionen, die eine experimentelle Erhöhung bzw. Erniedrigung der NA-Konzentration in der Milz bewirken, haben eine abgeschwächte bzw. verstärkte Pathologie zur Folge. Des Weiteren demonstriert diese Arbeit, als eine von wenigen präklinischen Studien, dass sich das SNS, während einer retroviralen Infektion, für den Wirt als äußerst vorteilhaft erweisen kann. Somit wird deutlich, dass ein dringender Bedarf an klinischen Studien besteht, die das Risiko und das therapeutische Potential von adrenergen Agonisten/Antagonisten oder von MAO-A/COMT-Inhibitoren in Patienten retroviraler Infektionserkrankungen, sorgfältig beurteilen.

## 6.1 Summary

The present thesis investigated the role of the sympathetic nervous system (SNS) during Friend retrovirus (FV) infection in mice. Results show that the splenic concentration of the sympathetic neurotransmitter noradrenaline (NA) was massively reduced at the peak of the virus-induced splenomegaly. This effect was transient and could not be observed at the end of the acute infection. FV-induced NA depletion was prevented by pharmacological inhibition of the catecholamine degrading enzymes monoamine oxidase A (MAO-A) and catechol-O-methyltransferase (COMT) using the selective inhibitors clorgyline (CLG) and 3,5-dinitrocatechol (OR-486). Moreover, this intervention resulted in significantly reduced viral load and a less pronounced virus-induced splenomegaly in FV-infected mice. In contrast, chemical sympathectomy prior to FV-infection aggravated the pathology of the disease. Sympathectomized and simultaneously FV-infected mice exhibited both, a significant higher viral burden and a more pronounced increased splenomegaly compared to intact FV-infected mice. Noteworthy, treatment with selective adrenergic agonists or antagonists did not influence the course of FV infection. Chemical sympathectomy in chronically FV-infected mice also resulted in a significant enlargement of the spleen. Direct effects of NA on viral replication could be excluded by *in vitro* studies. The expression of  $\beta$ -adrenergic receptors in erythroid precursor cells suggests a possible interaction between the sympathetic neurotransmitter and the viral target cells. However, this has to be confirmed in future experiments. Together, the results of this thesis demonstrate that FV infection leads to substantial changes in neurotransmitter metabolism in the spleen, one of the main sites of viral replication. Pharmacological interventions, that increase or decrease splenic NA concentration, can have a major impact on viral pathology. Furthermore, this work belongs to the minority of pre-clinical studies that were able to demonstrate, that the SNS plays an important and beneficial role for the host in terms of retroviral infections. Thus, there is an urgent need for clinical studies that carefully evaluate the risks and therapeutic potential of adrenergic agonists/antagonists or MAO-A/COMT inhibitors in patients suffering from retroviral infections.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Lichtman AH.** 2005. Cellular and Molecular Immunology. *Elsevier Saunders*: 1-345
- Abrass CK, O'Connor SW, Scarpace PJ, Abrass IB.** 1985. Characterization of the beta-adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. *J Immunol* 135: 1338-1341
- Agelaki S, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN.** 2002. Corticotropin-Releasing Hormone Augments Proinflammatory Cytokine Production from Macrophages In Vitro and in Lipopolysaccharide-Induced Endotoxin Shock in Mice. *Infect Immun* 70: 6068-6074
- Aguzzi A, Nuvolone M, Zhu C.** 2013. The 81alcalneurin81y of prion diseases. *Nat Rev Immunol* 13: 888-902
- Ajendra J, Specht S, Neumann AL, Gondorf F, Schmidt D, Gentil K, Hoffmann WH, Taylor MJ, Hoerauf A, Hübner MP.** 2014. ST2 Deficiency Does Not Impair Type 2 Immune Responses during Chronic Filarial Infection but Leads to an Increased Microfilaremia Due to an Impaired Splenic Microfilarial Clearance. *PLoS One* 9: e93072
- Balsa MD, Gómez N, Unzeta M.** 1989. Characterization of monoamine oxidase activity present in human granulocytes and lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 992: 140-144
- Beckman B, Mirand E, Fisher JW.** 1980. Effects of beta adrenergic agents and prostaglandin E1 on erythroid colony (CFU-E) growth and cyclic AMP formation in Friend erythroleukemic cells. *J Cell Physiol* 105: 355-361
- Belay T, Sonnenfeld G.** 2002. Differential effects of catecholamines on in vitro growth of pathogenic bacteria. *Life Sci* 71: 447-456
- Bellinger DL, Millar BA, Perez S, Carter J, Wood C, ThyagaRajan S, Molinaro C, Lubahn C, Lorton D.** 2008. Sympathetic modulation of immunity: Relevance to disease. *Cell immunol* 252: 27-56
- Ben-David Y, Bernsteint A.** 1991. Friend Virus-Induced Erythroleukemia and the Multistage Nature of Cancer. *Cell* 66: 831-834
- Bencsics A, Sershen H, Baranyi M, Hashim A, Lajtha A, Vizi ES.** 1997. Dopamine, as well as norepinephrine, is a link between noradrenergic nerve terminals and splenocytes. *Brain Res* 761:236-243
- Besedovsky HO, Del Rey A.** 1996. Immune-Neuro-Endocrine Interactions: Facts and Hypotheses. *Endocr Rev* 17: 64-102
- Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A.** 2001. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF $\alpha$ : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4: 702-710
- Brodde OE, Brinkmann M, Schemuth R, O'Hara N, Daul A.** 1985. Terbutaline-induced desensitization of human lymphocyte beta 2-adrenoceptors. Accelerated restoration of beta-adrenoceptor responsiveness by prednisone and ketotifen. *J Clin Invest* 76: 1096-1101



- Bulloch K, Milner TA, Prasad A, Hsu M, Buzsaki G, McEwen BS.** 1998. Induction of Calcitonin Gene-Related Peptide-like Immunoreactivity in Hippocampal Neurons Following Ischemia: A Putative Regional Modulator of the CNS Injury/Immune Response. *Exp Neurol* 150: 195–205
- Capellino S, Cosentino M, Wolff C, Schmidt M, Grifka J, Straub RH.** 2010. Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. *Ann Rheum Dis* 69:1853-1860
- Capellino S, Weber K, Gelder M, Härle P, Straub RH.** 2012. First Appearance and Location of Catecholaminergic Cells During Experimental Arthritis and Elimination by Chemical Sympathectomy. *Arthritis Rheum* 64: 1110–1118
- Chang M, Brown HJ, Collado-Hidalgo A, Arevalo JM, Galic Z, Symensma TL, Tanaka L, Deng H, Zack JA, Sun R, Cole SW.** 2005. B-Adrenoreceptors reactivate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication via PKA-dependent control of viral RTA. *J Virol* 79: 13538-13547
- Chesebro B, Wehrly K.** 1979. Identification of a non-H-2 gene (Rfv-3) influencing recovery from viremia and leukemia induced by Friend virus complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 425-429
- Chesebro B, Miyazawa M, Britt WJ.** 1990. Host genetic control of spontaneous and induced immunity to Friend murine retrovirus infection. *Annu Rev Immunol* 8: 477-499
- Cmarik, J, Ruscetti S.** 2010. Friend Spleen Focus-Forming Virus Activates the Tyrosine Kinase sf-Stk and the Transcription Factor PU.1 to Cause a Multi-Stage Erythroleukemia in Mice. *Viruses* 2: 2235-2257
- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE.** 1997. Retroviruses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Cogan TA, Thomas AO, Rees LE, Taylor AH, Jepson MA, Williams PH, Ketley J, Humphrey TJ.** 2007. Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*. *Gut* 56: 1060-1065
- Cole SW.** 2008. Psychosocial influences on HIV-1 disease progression: neural, endocrine, and virologic mechanisms. *Psychosom Med* 70: 562-568
- Cole SW, Korin YD, Fahey JI, Zack JA.** 1998. Norepinephrine Accelerates HIV Replication Via Protein kinase A-Dependent Effects on Cytokine Production. *J Immunol* 161: 610-616
- Cole SW, Naliboff BD, Kemeny ME, Griswold MP, Fahey JL, Zack JA.** 2001. Impaired response to HAART in HIV-infected individuals with high autonomic nervous system activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12695-700
- Collado-Hidalgo A, Sung C, Cole S.** 2006. Adrenergic inhibition of innate anti-viral response: PKA blockade of Type I interferon gene transcription mediates catecholamine support for HIV-1 replication. *Brain Behav Immun* 20: 552-563
- Connelly MC, Ayala A, Kierszenbaum F.** 1988. Effects of alpha- and beta-adrenergic agonists on *Trypanosoma cruzi* interaction with host cells. *J Parasitol* 74:379-86

- Cook-Mills JM, Mokyr MB, Cohen RL, Perlman RL, Chambers DA.** 1995. Neurotransmitter suppression of the in vitro generation of a cytotoxic T lymphocyte response against the syngeneic MOPC-315 plasmacytoma. *Cancer Immunol Immunother* 40: 79-87
- Cosentino M, Zaffaroni M, Marino F, Bombelli R, Ferrari M, Rasini E, Lecchini S, Ghezzi A, Frigo G.** 2002. Catecholamine production and tyrosine hydroxylase expression in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients: effect of cell stimulation and possible relevance for activation-induced apoptosis. *J Neuroimmunol* 133: 233-240
- Cuesta MC, Quintero L, Pons H, Suarez-Roca H.** 2002. Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  secretion from human peripheral blood mononuclear cells. *Neurochem Int* 40: 301-306
- Czura CJ, Tracey KJ.** 2005. Autonomic neural regulation of immunity. *J Intern Med* 257: 156-166
- D'Andrea AD.** 1992. The interaction of the erythropoietin receptor and gp55. *Cancer Surv* 15: 19-36
- de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud HR, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE.** 2005. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 6: 844-851
- DeLarco J, Todaro GJ.** 1976. Membrane receptors for murine leukemia viruses: characterization using the purified viral envelope glycoprotein, gp71. *Cell* 8: 365-371
- del Rey A, Kabiersch A, Petzoldt S, Besedovsky HO.** 2002. Involvement of noradrenergic nerves in the activation and clonal deletion of T cells stimulated by superantigen in vivo. *J Neuroimmunol* 127: 44-53
- de Luigi A, Terreni L, Sironi M, de Simoni MG.** 1998. The sympathetic nervous system tonically inhibits peripheral interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 induction by central Lipopolysaccharide. *Neuroscience* 83: 1245-1250
- Dittmer U, Brooks DM, Hasenkrug KJ.** 1998. Characterization of a Live-Attenuated Retroviral Vaccine Demonstrates Protection via Immune Mechanisms. *J Virol* 72: 6554-6558
- Dittmer U, Race B, Hasenkrug KJ.** 1999. Kinetics of the development of protective immunity in mice vaccinated with a live attenuated retrovirus. *J Virol* 73: 8435-8440
- Dittmer U, Race B, Peterson KE, Stromnes IM, Messer RJ, Hasenkrug KJ.** 2002. Essential roles for CD8 $^{+}$  T cells and gamma interferon in protection of mice against retrovirus-induced immunosuppression. *J Virol* 76: 450-454
- Elenkov IJ, Chrousos GP.** 1999. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *TEM* 10: 359-368

- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES.** 2000. The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52: 595-638
- Engler H, Doenlen R, Riether C, Engler A, Besedovsky HO, Del Rey A, Pacheco-Lopez G, Schedlowski M.** 2010. Chemical destruction of brain noradrenergic neurons affects splenic cytokine production. *J Neuroimmunol* 219: 75-80
- Eskandari F, Sternberg EM.** 2002. Neural-Immune Interactions in Health and Disease. *Ann NY Acad Sci* 966: 20-27
- Espey MG, Kustova Y, Sei Y, Basile AS.** 1998. LP-BM5 MuLV infection: Impact on the immune and central nervous systems. Buch: Neuroimmunodegeneration *Springer Verlag*: 95-114
- Fassold A, Falk W, Anders S, Hirsch T, Mirsky VM, Straub RH.** 2009. Soluble neuropilin-2, a nerve repellent receptor, is increased in rheumatoid arthritis synovium and aggravates sympathetic fiber repulsion and arthritis. *Arthritis Rheum* 60: 2892-2901
- Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF.** 1997. Catecholamines. Principles of neuropsychopharmacology *Sinauer, Sunderland*: 277–344
- Felten DL, Ackerman KD, Wiegand SJ, Felten SY.** 1987. Noradrenergic Sympathetic Innervation of the Spleen: I. Nerve Fibers Associate With Lymphocytes and Macrophages in Specific Compartments of the Splenic White Pulp. *J Neurosci Res* 18: 28-36
- Felten DL, Felten SY, Carlson SL, Olschowka JA, Livnat S.** 1985. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol* 125: 755-765
- Felten DL, Livnat S, Felten SY, Carlson SL, Bellinger DL, Yeh P.** 1984. Sympathetic Innervation of Lymph Nodes in Mice. *Brain Res Bull* 693-699
- Ferrero S, Haas S, Remorgida V, Camerini G, Fulcheri E, Ragni N, Straub RH, Capellino S.** 2010. Loss of sympathetic nerve fibers in intestinal endometriosis. *Fertil Steril* 94: 2817-19
- Friend C.** 1957. Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *J Exp Med* 105: 307-318
- Friend C, Pogo BGT.** 1985. The molecular pathology of Friend erythroleukemia virus strains – an overview. *Biochim Biophys Acta* 780: 181-195
- Fuller RW.** 1982. Pharmacology of brain epinephrine neurons. *Annu Rev Pharmacol* 22: 31–55
- Geffers C, Gastmeier G.** 2011. Nosokomiale Infektionen und multiresistente Erreger in Deutschland. *Dtsch Arztebl Int* 108: 87-93
- Gibbert K.** 2010. Interferon- $\alpha$  vermittelte Immuntherapie in der Friend Retrovirus Infektion. *Universitätsbibliothek Duisburg-Essen* Identifikator: DOI urn:nbn:de:hbz:464-20101229-091437-8
- Góngora-Alfaro JL, Suárez-Solis V, Zavala-Castro JE.** 1995. Effect of beta-adrenergic blockers on survival, parasitemia and parasitic load of the heart of mice during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Biomed* 6: 182-192

- Grebe KM, Hickman HD, Irvine KR, Takeda K, Bennink JR, Yewdell JW.** 2009. Sympathetic nervous system control of anti-influenza CD8+ T cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 5300-5
- Grebe KM, Takeda K, Hickman HD, Bailey AL, Embry AC, Bennink JR, Yewdell JW.** 2010. Cutting edge: Sympathetic nervous system increases proinflammatory cytokines and exacerbates influenza A virus pathogenesis. *J Immunol* 184: 540-4
- Groß U.** 2009. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. *Georg Thieme Verlag KG*: 1-22
- Hacker J.** 2003. Menschen, Seuchen und Mikroben – Infektionen und ihre Erreger. *C. H. Beck oHG*: 7-13
- Harrison T, Samuel BU, Akompong T, Hamm H, Mohandas N, Lomasney JW, Haldar K.** 2003. Erythrocyte G Protein-Coupled Receptor Signaling in Malarial Infection. *Science* 301: 1734-1736
- Hasenkrug KJ.** 1999. Lymphocyte deficiencies increase susceptibility to friend virus-induced erythroleukemia in Fv-2 genetically resistant mice. *J Virol* 73: 6468-6473
- Hasenkrug KJ, Brooks DM, Chesebro B.** 1995. Passive immunotherapy for retroviral disease: influence of major histocompatibility complex type and T-cell responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10492-10495
- Hasenkrug KJ, Chesebro B.** 1997. Immunity to retroviral infection: the Friend virus model. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7811-7816
- Hatfield SM, Petersen BH, DiMicco JA.** 1986. Beta adrenoceptor modulation of the generation of murine cytotoxic T lymphocytes in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 239: 460-466
- Hellstrand K, Hermodsson S, Strannegard O.** 1985. Evidence for a betaadrenoceptor-mediated regulation of human natural killer cells. *J Immunol.* 134: 4095-4099
- Ho HY, Lee HH, Lai MZ.** 1997. Overexpression of mitogen-activated protein kinase kinase reversed cAMP inhibition of NF- $\kappa$ B in T cells. *Eur J Immunol* 27: 222–226
- Hoatlin ME, Kabat D.** 1995. Host-range control of a retroviral disease: Friend erythroleukemia. *Trends Microbiol* 3: 51-57
- Holen E, Elsayed S.** 1998. Effects of  $\beta_2$  adrenoceptor agonists on T-cell subpopulations. *APMIS* 106: 849-857
- Hübner MP, Torrero MN, McCall JW, Mitre E.** 2009. *Litomosoides sigmodontis*: a simple method to infect mice with L3 larvae obtained from the pleural space of recently infected jirds (*Meriones unguiculatus*). *Exp Parasitol* 123: 95-98
- Javierre MQ, Pinto LV, Lima AO, Sassine WA.** 1975. Immunologic phagocytosis by macrophages: effect by stimulation of alpha adrenergic receptors. *Re. Bras Pesqui Med Biol* 8: 271-274
- Johnson M.** 1998. The  $\beta$ -Adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 146–153

- Johnson SF, Telesnitsky A.** 2010. Retroviral RNA Dimerization and Packaging: The What, How, When, Where, and Why. *PloS Pathogens* 6: 1-4
- Kabat D.** 1989. Molecular biology of Friend viral erythroleukemia. *Curr Top Microbiol Immunol* 148: 1-42
- Kavelaars A.** 2002. Regulated expression of  $\alpha$ -1 adrenergic receptors in the immune system. *Brain Behav Immun* 16: 799-807
- Kelley SP, Moynihan JA, Stevens SY, Grota LJ, Felten DL.** 2002. Chemical sympathectomy has no effect on the severity of murine AIDS: murine AIDS alone depletes norepinephrine levels in infected spleen. *Brain Behav Immun* 16: 118-139
- Kelley SP, Moynihan JA, Stevens SY, Grota LJ, Felten DL.** 2003. Sympathetic nerve destruction in spleen in murine AIDS. *Brain Behav Immun* 17: 94-109
- Keswani SC, Polley M, Pardo CA, Griffin JW, McArthur JC, Hoke A.** 2003. Schwann cell chemokine receptors mediate HIV-1 gp120 toxicity to sensory neurons. *Ann Neurol* 54: 287-296
- Kim SB, Han YW, Rahman MM, Kim SJ, Yoo, DJ, Kang SH, Kim K, Eo SK.** 2009. Modulation of protective immunity against herpes simplex virus via mucosal genetic co-transfer of DNA vaccine with beta2-adrenergic agonist. *Exp Mol Med* 41: 812-823
- Kinney KS, Austin CE, Morton DS, Sonnenfeld G.** 2000. Norepinephrine as a growth stimulating factor in bacteria – mechanistic studies. *Life Sci* 67: 3075-3085
- Kobilka B.** 1992. Adrenergic Receptors as Models for G Protein-Coupled Receptors. *Annu Rev Neurosci* 15: 87-114
- Kohm AP, Sanders VM.** 2001. Norepinephrine and beta2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. *Pharmacol Rev* 53: 487-525
- Kopnisky KL, Stoff DM, Rausch DM.** 2004. Workshop report: The effects of psychological variables on the progression of HIV-1 disease. *Brain Behav Immun* 18: 246-261
- Kostrzewa RM, Jacobowitz DM.** 1974. Pharmacological Actions of 6-Hydroxydopamine. *Pharmacol Rev* 26: 199-288
- Kouassi E, Li YS, Boukhris W, Millet I, Revillard JP.** 1988. Opposite effects of the catecholamines dopamine and norepinephrine on murine polyclonal B-cell activation. *Immunopharmacology* 16: 125-137
- Kurth R, Bannert N.** 2010. Retroviruses: Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis. *Caister Academic Press*
- Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M.** 2009. Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches. *Physiol Rev* 89: 535-606
- Leo NA, Bonneau RH.** 2000. Chemical sympathectomy alters cytotoxic T lymphocyte responses to Herpes Simplex Virus infection. *Ann NY Acad Sci* 917: 923-34

- Leo NA, Callahan TA, Bonneau RH.** 1998. Peripheral Sympathetic Denervation Alters Both the Primary and Memory Cellular Immune Responses to Herpes simplex Virus Infection. *Neuroimmunomodulat* 5: 22-35
- Levite M.** 2000. Nerve-Driven Immunity-The Direct Effects of Neurotransmitters on T-Cell Function. *Ann NY Acad Sci.* 917:307-321
- Löscher W, Ungemach FR, Kroker R.** 2010. Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. *Enke Verlag:* 43-54
- Lucius R, Loos-Frank B.** 2008. Biologie von Parasiten. *Springer-Verlag:* 37-51
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D.** 2009. Der Experimentator: Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag:* 77-104
- Lyte M, Ernst S.** 1991. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sci* 51: 203-212
- MacDonald AS, Araujo MI, Pearce EJ.** 2002. Immunology of Parasitic Helminth Infections. *Infect Immun* 70: 427-433
- Machado MP, Rocha, AM, de Oliveira LF, de Cuba MB, de Oliveira Loss I, Castellano LR, Silva MV, Machado JR, Nascentes GA, Paiva LH, Savino W, Junior VR, Brum PC, Prado VF, Prado MA, Silva EL, Montano N, Ramirez LE, Dias da Silva VJ.** 2012. Autonomic nervous system modulation affects the inflammatory immune response in mice with acute Chagas disease. *Exp Physiol* 97: 1186-2202
- Madden KS, Sanders VM, Felten DL.** 1995. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev Pharmacol* 35: 417-448
- Maestroni GJ.** 2006. Sympathetic nervous system influence on the innate immune response. *Ann NY Acad Sci* 1069: 195-207
- Mapp PI, Walsh DA, Garrett NE, Kidd BL, Cruwys SC, Polak JM, Blake DR.** 1994. Effect of three animal models of inflammation on nerve fibers in the synovium. *Ann Rheum Dis* 53: 240-246
- Maréchal P, Le Goff L, Hoffman W, Rapp J, Oswald IP, Ombrouck C, Taylor DW, Bain O, Petit G.** 1997. Immune response to the filarial *Litomosoides sigmodontis* in susceptible and resistant mice. *Parasite Immunol* 19: 273-279
- Marino F, Cosentino M.** 2013. Adrenergic modulation of immune cells: an update. *Amino Acids* 45: 55-71
- Melli G, Keswani SC, Fischer A, Chen W, Höke A.** 2006. Spatially distinct and functionally independent mechanisms of axonal degeneration in a model of HIV-associated sensory neuropathy. *Brain* 129: 1330-1338
- Merrill JE, Koyanagi Y, Zack J, Thomas L, Martin F, Chen ISY.** 1992. Induction of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Alpha in Brain Cultures by Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 66: 2217-2225

- Meulendyke KA, Ubaida-Mohien C, Drewes JL, Liao Z, Gama L, Witwer KW, Graham DR, Zink MC.** 2014. Elevated brain monoamine oxidase activity in SIV- and HIV-associated neurological disease. *J Infect Dis* 210: 904-912
- Miller LE, Justen HP, Scholrnerich J, Straub RH.** 2000. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J* 14: 2097-2107
- Miura T, Kudo T, Matsuki A, Sekikawa K, Tagawa, Y, Iwakura Y, Nakane A.** 2001. Effect of 6-hydroxydopamine on host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 69: 7234-7241
- Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H.** 2010. Molekulare Virologie. *Spektrum Akademischer Verlag*: 13-17 und 409-458
- Mollérus S.** 2013. Expression der Enzyme für die Synthese und die Degradierung von Katecholaminen in Immunzellen. *Universitätsbibliothek Duisburg-Essen* Identifikator: DOI urn:nbn:de:hbz:464-20131031-102112-7
- Moreau-Gachelin F.** 2008. Multi-stage Friend murine erythroleukemia: molecular insights into oncogenic cooperation. *Retrovirology* 5: 99
- Mori K, Morisaki H, Yajima S, Suzuki T, Ishikawa A, Nakamura N, Innami Y, Takeda J.** 2011. Beta-1 blocker improves survival of septic rats through preservation of gut barrier function. *Intensive Care Med* 37: 1849-1856
- Moriuchi M, Yoshimine H, Oishi K, Moriuchi H.** 2006. Norepinephrine inhibits human immunodeficiency virus type-1 infection through the NF-kappaB inactivation. *Virology* 345: 167-173
- Mülhardt C.** 2009. Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics. *Spektrum Akademischer Verlag*: 84-134
- Murphy KP.** 2012. Janeway's Immunobiology. *Garland Science*: 1-669
- Murphy SC, Hiller NL, Harrison T, Lomasney JW, Mohandas N, Haldar K.** 2006. Lipid rafts and malaria parasite infection of erythrocytes. *Mol Membr Biol* 23: 81-88
- Nance DM, Sanders VM.** 2007. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun* 21: 736-45
- Nair S, Bayer W, Ploquin MJ, Kassiotis G, Hasenkrug KJ, Dittmer U.** 2011. Distinct roles of CD4+ T cell subpopulations in retroviral immunity: lessons from the Friend virus mouse model. *Retrovirology* 8: 76
- Ney PA, D'Andrea AD.** 2000. Friend erythroleukemia revisited. *Blood* 96: 3675-3680
- Oliveira MM, Antunes A, De Mello FG.** 1984. Growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes controlled by shifts in cyclic AMP mediated by adrenergic ligands. *Mol Biochem Parasitol* 11: 283-292

- Pardo CA, McArthur JC, Griffin JW.** 2001. HIV neuropathy: insights in the pathology of HIV peripheral nerve disease. *J Peripher Nerv Syst* 6: 21–27
- Patel CA, Mukhtar M, Pomerantz RJ.** 2000. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Induces Apoptosis in Human Neuronal Cells. *J Virol* 74: 9717–9726
- Pavlov VA, Tracey KJ.** 2004. Neural regulators of innate immune responses and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 61: 2322-31
- Penn A, Mohr AM, Shah SG, Sifri ZC, Kaiser VL, Rameshwar P, Livingston DH.** 2010. Dose-response relationship between norepinephrine and erythropoiesis: evidence for a critical threshold. *J Surg Res* 163: 85-90
- Pongratz G, Straub RH.** 2014. The sympathetic nervous response in inflammation. *Arthritis Res Ther* 16: 504-515
- Porter CC, Totaro JA, Burcin A.** Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *J Pharm Exp Ther* 150: 17
- Prösch S, Wendt CEC, Reinke P, Priemer C, Oppert M, Krüger DH, Volk HD, Döcke WD.** 2000. A Novel Link between Stress and Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection: Sympathetic Hyperactivity Stimulates HCMV Activation. *Virology* 272: 357-365
- Renz-Polster H, Krautzig S.** 2012. Basislehrbuch Innere Medizin: kompakt-greifbar-verständlich. *Urban & Fischer Verlag/ Elsevier GmbH*: 973-993
- Rice PA, Boehm GW, Moynihan JA, Bellinger DL, Stevens SY.** 2001. Chemical sympathectomy increases the innate immune response and decreases the specific immune response in the spleen to infection with *Listeria monocytogenes*. *J Neuroimmunol* 114: 19-27
- Riether C, Kavelaars A, Wirth T, Pacheco-Lopez G, Doenlen R, Willems H, Heijnen CJ, Schedlowski M, Engler H.** 2011. Stimulation of beta(2)-adrenergic receptors inhibits 89alpha-cineurin activity in CD4(+) T cells via PKA-AKAP interaction. *Brain Behav Immun* 25: 59-66
- Rontgen P, Sablotzki A, Simm A, Silber RE, Czeslick E.** 2004. Effect of catecholamines on intracellular cytokine synthesis in human monocytes. *Eur Cytokine Netw* 15: 14–23
- Roszman TL, Brooks WH.** 1985. Neural Modulation of Immune Function. *J Neuroimmunol* 10: 59-69
- Sabatier JM, Vives E, Mabrouk K, Benjouad A, Rochat H, Duval A, Hue B, Bahraoui E.** 1991. Evidence for Neurotoxic Activity of tat from Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 65: 961-967
- Saha B, Mondal AC, Majumder J, Basu S, Dasgupta PS.** 2001. Physiological Concentrations of Dopamine Inhibit the Proliferation and Cytotoxicity of Human CD4+ and CD8+ T Cells in vitro: A Receptor-Mediated Mechanism. *Neuroimmunomodulat* 9: 23-33
- Sanders VM.** 2012. The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: do we understand it yet? *Brain Behav Immun* 26: 195-200



- Sanders VM, Straub RH.** 2002. Norepinephrine, the  $\beta$ -Adrenergic Receptor, and Immunity. *Brain Behav Immun* 16: 290-332
- Schmitt H, Guyaux M, Pochet R, Kram R.** 1980. Induction and properties of  $\beta$ -adrenergic receptors during erythroid differentiation of Friend leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4065-4068
- Schmitz D, Wilsenack K, Lendemanns S, Schedlowski M, Oberbeck R.** 2007. B-Adrenergic blockade during systemic inflammation: impact on cellular immune functions and survival in a murine model of sepsis. *Resuscitation* 72: 286-294
- Sei Y, Kustova Y, Li Y, Morse H III, Skolnick P, Basile A.** 1998. The encephalopathy associated with murine acquired immunodeficiency syndrome (MAIDS). *Ann NY Acad Sci* 840: 822-834
- Sloan EK, Nguyen CT, Cox BF, Tarara RP, Capitanio JP, Cole SW.** 2008. SIV infection decreases sympathetic innervation of primate lymph nodes: The role of neurotrophins. *Brain Behav Immun* 22: 185-194
- Sloan EK, Tarara RP, Capitanio JP, Cole SW.** 2006. Enhanced replication of simian immunodeficiency virus adjacent to catecholaminergic varicosities in primate lymph nodes. *J Virol* 80: 4326-4335
- Solomou EE, Juang YT, Tsokos GC.** 2001. Protein kinase C- $\Theta$  participates in the activation of cyclic AMP-responsive element-binding protein and its subsequent binding to the 180 site of the IL-2 promoter in normal human T lymphocytes. *J Immunol* 166: 5665-5674
- Sommershof A, Basler M, Riether C, Engler H, Groettrup M.** 2011. Attenuation of the cytotoxic T lymphocyte response to lymphocytic choriomeningitis virus in mice subjected to chronic social stress. *Brain Behav Immun* 25: 340-348
- Sternberg EM.** 2006. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* 6: 318-328
- Straub RH, Pongratz G, Weidler C, Linde HJ, Kirschning CJ, Glück T, Schölmerich J, Falk W.** 2005. Ablation of the Sympathetic Nervous System Decreases Gram-Negative and Increases Gram-Positive Bacterial Dissemination: Key Roles for Tumor Necrosis Factor/Phagocytes and Interleukin-4/Lymphocytes. *JID* 192: 560-572
- Sundstrom JB, Martinson DE, Mosunjac M, Bostik P, McMullan LK, Donahoe RM, Gravanis MB, Ansari AA.** 2003. Norepinephrine Enhances Adhesion of HIV-1-Infected Leukocytes to Cardiac Microvascular Endothelial Cells. *Exp Biol Med* 228: 730-740
- Thoenen H, Tranzer JP.** 1968. Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine. *Arch Pharmak u Exp Path* 261: 271
- Tonner PH, Hein L.** 2011. Pharmakotherapie in der Anästhesie und Intensivmedizin – Grundlagen und klinische Konzepte. *Springer Verlag*: 191
- Tracey KJ.** 2002. The inflammatory reflex. *Nature* 420: 853-859
- Tracey KJ.** 2010. Understanding immunity requires more than immunology. *Nat Immun* 11: 561-564

- Turvey SE, Broide DH.** 2010. Innate Immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125: 24-32
- Wallace VCJ, Blackbeard J, Segerdahl AR, Hasnie F, Pheby T, McMahon SB, Rice ASC.** 2007. Characterization of rodent models of HIV-gp120 and anti-retroviral-associated neuropathic pain. *Brain* 130: 2688-2702
- Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ & Tracey KJ.** 2003. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421: 384-388
- Watkins LR, Maier SF.** 1999. Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7710–7713
- Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM.** 2002. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 20: 125-163
- WHO (World Health Organization).** 2012. The top 10 causes of death. Stand 08.07.2015  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- Williams JM, Peterson RG, Shea PA, Schmedtje JF, Bauer DC, Felten, DL.** 1980. Sympathetic Innervation of Murine Thymus and Spleen: Evidence for a Functional Link Between the Nervous and Immune Systems. *Brain Res Bull* 6: 83-94
- Wilt SG, Dugger NV, Hitt ND, Hoffman PM.** 2000. Evidence for oxidative damage in a murine leukemia virus-induced neurodegeneration. *J Neurosci Res* 62: 440-450
- Xiu F, Stanojic M, Jeschke MG.** 2013. Norepinephrine inhibits macrophage migration by decreasing CCR2 expression. *PloS One* 8: 1-11
- Xu Y, Kulkosky J, Acheampong E, Nunnari G, Sullivan J, Pomerantz RJ.** 2004. HIV-1-mediated apoptosis of neuronal cells: Proximal molecular mechanisms of HIV-1-induced encephalopathy. *PNAS* 101: 7070 –7075

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
<b>ACTH</b>	Adrenocortikotropes Hormon
<b>ADR</b>	Adrenalin
<b>AF 488</b>	Alexa Fluor 488
<b>AIDS</b>	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> (erworbenes Immundefektsyndrom)
<b>AK</b>	Antikörper
<b>ANS</b>	Autonomes Nervensystem
<b>APC</b>	<i>Antigen Presenting Cell</i> (Antigen-präsentierende Zelle) Allophycocyanin
<b>AR</b>	Adrenozeptor
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>B</b>	B-Zelle
<b>BCR</b>	<i>B Cell Receptor</i> (B-Zell Rezeptor)
<b>BHQ1</b>	<i>Black Hole Quencher Dye 1</i> (Quencher-Farbstoff)
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>c</b>	cyclisch
<b>CalM</b>	Calmodulin
<b>cAMP</b>	cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>CaN</b>	Calcineurin
<b>CCR</b>	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i> (Unterscheidungsgruppe immunphänotypischer Oberflächenmerkmale)
<b>CGRP</b>	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i> (Neuropeptid)
<b>CLG</b>	Chlorgylin (MAO-A-Inhibitor)
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>COMT</b>	Catechol-O-Methyltransferase
<b>CREB</b>	<i>cAMP Response Element-Binding Protein</i> (Transkriptionsfaktor)
<b>CRH</b>	<i>Corticotrophin-Releasing Hormone</i> (Corticoliberin)
<b>CTL</b>	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i> (cytotoxische T-Zelle)
<b>CXCR</b>	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
<b>DA</b>	Dopamin
<b>d. h.</b>	das heißt

<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>dpi</b>	<i>days post infection</i> (Tage nach der Infektion)
<b>ds</b>	doppelsträngig
<b>EpoR</b>	Erythropoietin-Rezeptor
<b>eV</b>	Elektronenvolt
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)
<b>6-FAM</b>	<i>6-Carboxyfluorescein</i>
<b>Fc</b>	<i>crystallisable Fragment</i> (kristallisierbaren Fragment)
<b>FELASA</b>	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
<b>FFU</b>	<i>Focus-Forming Unit</i> (Herd/Fokus-bildene Einheit)
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>F-MuLV</b>	<i>Friend Murine Leukemia Virus</i> (Murines Friend Leukämie-Virus)
<b>FSC</b>	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
<b>FV</b>	Friend Retrovirus
<b>g</b>	Gramm Erdbeschleunigung
<b>G</b>	Gauge
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	Stunde
<b>HAART</b>	Hochaktive antiretrovirale Therapie
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz-Virus
<b>HPA</b>	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
<b>HPLC</b>	<i>High Performance liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
<b>HRP</b>	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
<b>HSV</b>	Herpes-simplex-Virus
<b>i.p.</b>	<i>intraperitoneal</i>
<b>IC</b>	<i>Infectious Center</i>
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IL</b>	Interleukin
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>KSHV</b>	Kaposi-Sarkom-Herpesvirus
<b>LCMV</b>	<i>Lymphocytic Choriomeningitis Virus</i>
<b>LDV</b>	<i>Lactate Dehydrogenase elevating Virus</i>

<b>M</b>	Molar
<b>MACS</b>	<i>Magnetic Cell Sorting</i> (Magnetische Zellsortierung)
<b>MAIDS</b>	<i>Murine Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (murines erworbenes Immundefektsyndrom)
<b>MAO</b>	Monoaminoxidase
<b>mg</b>	Miligramm
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Mililiter
<b>mm</b>	Milimeter
<b>MuLV</b>	Murines Leukämievirus
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>n</b>	Anzahl der Merkmalsausprägungen
<b>NA</b>	Noradrenalin
<b>NFAT</b>	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i> (Transkriptionsfaktor aktivierter T-Zellen)
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B-cells</i> (Transkriptionsfaktor aktivierter B-Zellen)
<b>NK</b>	Natürliche Killerzelle
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NPY</b>	Neuropeptid Y
<b>OR-486</b>	3,5-Dinitrocatechol (COMT-Inhibitor)
<b>p</b>	p-value von <i>probability</i> (Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert)
<b>P</b>	Plasmazelle
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>PAMP</b>	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
<b>PB</b>	<i>Pacific Blue</i>
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
<b>PE</b>	R-Phycoerythrin
<b>PerCP</b>	Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex
<b>pH</b>	<i>Potentia Hydrogenii</i>
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PNS</b>	Peripheres Nervensystem
<b>PrP</b>	Prion Protein
<b>PVC</b>	PVC-211 neurodegenerative Variante von F-MuLV
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative Echtzeit-PCR

---

<b>RCF</b>	<i>Relative Centrifugal Force</i> (Relative Zentrifugalbeschleunigung)
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase
<b>s.</b>	siehe
<b>s.c.</b>	subcutan
<b>sec</b>	Sekunde
<b>SEM</b>	<i>Standard Error of Mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
<b>SFFU</b>	<i>Spleen Focus-Forming Units</i>
<b>SFFV</b>	<i>Spleen Focus-Forming Virus</i>
<b>SIV</b>	Simianes Immundefizienz-Virus
<b>SNS</b>	Sympathisches Nervensystem
<b>ss</b>	<i>single strand</i> (einzelsträngig)
<b>SSC</b>	<i>Side Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
<b>TCR</b>	<i>T Cell Receptor</i> (T-Zell Rezeptor)
<b>TERB</b>	Terbutalin
<b>T<sub>H</sub></b>	T-Helfer-Zelle
<b>TH</b>	Tyrosinhydroxylase
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>U</b>	<i>Unit</i> (Einheit)
<b>u. a.</b>	unter anderem
<b>VEH</b>	Vehikel
<b>VN</b>	Vagus Nerv
<b>vs.</b>	<i>versus</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1</b>	Drei-Phasen-Schema der Immunantwort	S. 3
<b>Abb. 1.2</b>	Interaktion von angeborenem und erworbenem Immunsystem	S. 4
<b>Abb. 1.3</b>	Neuro-Immun-Interaktionen	S. 6
<b>Abb. 1.4</b>	$\beta_2$ -AR Signalkaskade in einem T-Lymphozyten	S. 9
<b>Abb. 1.5</b>	Aufbau eines Retrovirus	S. 13
<b>Abb. 1.6</b>	Retroviraler Replikationszyklus in T-Lymphozyten	S. 14
<b>Abb. 3.1</b>	Experimenteller Aufbau „Neurotransmitter-Konzentration der Milz im akuten FV-Infektionsmodell“	S. 29
<b>Abb. 3.2</b>	Experimenteller Aufbau „ $\beta_2$ -AR Agonisten Behandlung im akuten FV-Infektionsmodell“	S. 30
<b>Abb. 3.3</b>	Experimenteller Aufbau „MAO-A- und COMT-Enzymblockade im akuten FV-Infektionsmodell“	S. 31
<b>Abb. 3.4</b>	Experimenteller Aufbau „Chemische Sympathektomie im akuten FV-Infektionsmodell“	S. 32
<b>Abb. 3.5</b>	Experimenteller Aufbau „ $\alpha$ - und $\beta$ -AR Antagonisten Behandlung im akuten FV-Infektionsmodell“	S. 32
<b>Abb. 3.6</b>	Experimenteller Aufbau „Chemische Sympathektomie im chronischen FV-Infektionsmodell“	S. 33
<b>Abb. 3.7</b>	Experimenteller Aufbau „ $\beta_2$ -AR Agonisten Behandlung im chronischen FV-Infektionsmodell“	S. 34
<b>Abb. 3.8</b>	Vereinfachte Darstellung der Durchflusszytometrie	S. 39
<b>Abb. 3.9</b>	Schematische und vereinfachte Darstellung der PCR-Methode	S. 43
<b>Abb. 3.10</b>	Entwicklungszyklus von <i>Litomosoides sigmodontis</i>	S. 46
<b>Abb. 4.1</b>	Akuter FV-Infektionsverlauf	S. 49
<b>Abb. 4.2</b>	Noradrenerger Einfluss auf die F-MuLV-Replikationsrate	S. 50
<b>Abb. 4.3</b>	$\beta_2$ -AR Agonisten Einfluss auf akute FV-Infektion	S. 51
<b>Abb. 4.4</b>	MAO-A und COMT-Proteinnachweis während einer akuten FV-Infektion	S. 53

<b>Abb. 4.5</b>	MAO-A- und COMT-Enzymblockade während einer akuten FV-Infektion	S. 54
<b>Abb. 4.6</b>	Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf die FV-induzierte Splenomegalie	S. 56
<b>Abb. 4.7</b>	Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf die Viruslast im akuten FV-Infektionsverlauf	S. 57
<b>Abb. 4.8</b>	Ter119 <sup>+</sup> Erythrozyten-Vorläuferzellen	S. 59
<b>Abb. 4.9</b>	Adrenerge Rezeptorblockade während einer akuten FV-Infektion	S. 61
<b>Abb. 4.10</b>	Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf eine chronische FV-Infektion	S. 63
<b>Abb. 4.11</b>	Einfluss des $\beta_2$ -AR Agonisten Terbutalin auf eine chronische FV-Infektion	S. 64
<b>Abb. 4.12</b>	Auswirkungen einer <i>L.s.</i> -Infektion auf das Gewicht und die NA-Konzentration in der Milz	S. 66

### Einzelbildnachweise

**C57BL/6 Maus**      <http://old.harlan.com> Stand 31.10.2015

**BALB/c WT Maus**      <http://www.janvier-labs.com/> Stand 31.10.2015

**Milbe**      <http://citybugs.tamu.edu> Stand 31.10.2015

Graphische Darstellungen mittels **Motifolio PPT Drawing Toolkit**



### 8.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1.1</b>	Adrenozeptoren-Expression auf Immunzellen	S. 8
<b>Tab. 2.1</b>	Auflistung der verwendeten Geräte	S. 18
<b>Tab. 2.2</b>	Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	S. 19
<b>Tab. 2.3</b>	Auflistung der der verwendeten Chemikalien und Medien	S. 20
<b>Tab. 2.4</b>	Auflistung der verwendeten pharmakologischen Substanzen	S. 22
<b>Tab. 2.5</b>	Auflistung häufig hergestellter Puffer und Medien	S. 22
<b>Tab. 2.6</b>	Auflistung der verwendeten Antikörper	S. 24
<b>Tab. 2.7</b>	Bezeichnung der Fluorochrome in der Durchflusszytometrie	S. 25
<b>Tab. 2.8</b>	Auflistung der verwendeten Oligonukleotide	S. 26
<b>Tab. 2.9</b>	Auflistung der verwendeten Standardtests	S. 26
<b>Tab. 2.10</b>	Auflistung der verwendeten Software-Programme	S. 27
<b>Tab. 3.1</b>	RT-PCR Programm	S. 44
<b>Tab. 4.1</b>	Zelluläre Zusammensetzung der Milzen im Agonistenversuch	S. 52
<b>Tab. 4.2</b>	Zelluläre Zusammensetzung der Milzen während MAO-A/COMT-Enzymblockade	S. 55
<b>Tab. 4.3</b>	Zelluläre Zusammensetzung der Milzen im Sympathektomieversuch	S. 58
<b>Tab. 4.4</b>	Intrazelluläre Zytokinproduktion CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD43 <sup>+</sup> T-Zellen im Sympathektomieversuch	S. 60
<b>Tab. 4.5</b>	Zelluläre Zusammensetzung der Milzen im Antagonistenversuch	S. 61
<b>Tab. 4.6</b>	Intrazelluläre Zytokinproduktion CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD43 <sup>+</sup> T-Zellen im Antagonistenversuch	S. 62
<b>Tab. 4.7</b>	Zelluläre Zusammensetzung der Milzen während einer chronischen FV-Infektion im Sympathektomieversuch	S. 63
<b>Tab. 4.8</b>	Zelluläre Zusammensetzung der Milzen während einer chronischen FV-Infektion im Agonistenversuch	S. 64

## 8.4 Publikationen

1. **D. Bloemker**, S. Mollerus, K. Gibbert, U. Dittmer, A. del Rey, M. Schedlowski, H. Engler. *Inhibition of catecholamine degradation ameliorates while chemical sympathectomy aggravates the severity of acute Friend retrovirus infection in mice.* Brain Behav Immun: **Seit 10.10.2015 in Begutachtung**
2. F. Gondorf, A. Berbudi, B. C. Buerfent, J. Ajendra, **D. Bloemker**, S. Specht, D. Schmidt, A. Neumann, L. E. Layland, A. Hoerauf, M. P. Hübner. *Chronic Filarial Infection Provides Protection against Bacterial Sepsis by Functionally Reprogramming Macrophages.* PLOS Pathogens (2015)
3. T. Wirth, A. M. Westendorf, **D. Bloemker**, J. Wildmann, H. Engler, S. Mollerus, M. Wadwa, M. K. Schäfer, M. Schedlowski, A. Del Rey. *The sympathetic nervous system modulates CD4Foxp3 regulatory T cells via noradrenaline-dependent apoptosis in a murine model of lymphoproliferative disease.* Brain Behav Immun (2014)
4. I. P. Rick, **D. Bloemker**, T. C. M. Bakker. *Spectral composition and visual foraging in the three-spined stickleback (Gasterosteidae: Gasterosteus aculeatus L.): elucidating the role of ultraviolet wavelengths.* Biological Journal of the Linnean Society (2012)

## 8.5 Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Harald Engler für die gute Betreuung meiner Arbeit. Durch seine immerwährende Gesprächs- und Hilfsbereitschaft hat er maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

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

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei unseren Kooperationspartnern des Instituts für Virologie am Universitätsklinikum Essen: Der Dank gilt hier vor allem Dr. Kathrin Gibbert, Sandra Francois und Prof. Dr. Ulf Dittmer. Kathrin stand mir immer ratsam und unterstützend zur Seite. Ihre Tipps und Ideen haben mir sehr geholfen.

Ein wesentlicher Dank gilt auch Prof. Dr. Adriana del Rey des Instituts für Physiologie und Pathophysiologie der Philipps Universität Marburg für die Hilfe bei den HPLC-Analysen.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Ivo Bendix (Klinik für Kinderheilkunde I / Neonatologie, Universitätsklinikum Essen) für die Hilfe bei der Western Blot Entwicklung bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt ebenso Alexandra Kornowski, Jessica Wunderling und Magdalene Vogelsang für die uneingeschränkte und herzliche Hilfsbereitschaft bei meinen Versuchen und der Arbeit im Labor.

Bei Antje Albring, Julia Kirchof, Katharina Bösche, Kathrin Orłowski, Laura Lückemann, Laura Wendt und Tobias Weigl möchte ich mich für die schöne Zeit, die fachliche Unterstützung und die tollen Gespräche, ob wissenschaftlicher oder privater Natur, bedanken.

Des Weiteren danke ich allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Psychologie und Verhaltensimmunbiologie für die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit.

Schließlich möchte ich mich auch noch bei den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 1045 für die wissenschaftliche Unterstützung und die Diskussionen und Anregungen in netter Atmosphäre bedanken.

### **Der größte Dank gebührt jedoch meiner Familie und meinen Freunden!**

So widme ich diese Arbeit meinen Eltern Bettina und Walter Blömker. Mit ihrer bedingungslosen und liebevollen Unterstützung bereiteten sie mich hingebungsvoll für meinen Lebensweg vor.

Ich danke meinen Geschwistern Désirée und Marc-Alexander Blömker bei Höhen und Tiefen für den wunderbaren geschwisterlichen Zusammenhalt.

Zudem möchte ich mich bei meinen Großeltern Katharina und Gerhard Hemp und Maria Blömker für die wohlwollende und liebevolle Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Ein Dank gilt auch meinem Patenkind Maia Blömker. Mit ihrem kindlichen Frohsinn und ihrem herzlich strahlendem Lächeln zeigte sie mir immer wieder, dass Arbeit und Erfolg nicht alles sind im Leben!

Schlussendlich möchte ich mich noch bei meinen Freunden bedanken: Anna Lena Neumann, Jesuthas Ajendra, Lea Schmitz, Lena Rimpel, Nina Paulussen und Sebastian Joseph. Danke für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die tolle Zeit während eben dieser, dem Studium oder der Schule. Ihr seid die Besten!

## **8.6 Lebenslauf**

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



## 8.7 Erklärungen

### Erklärung zur Befürwortung der Promotion

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat.- Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die Rolle des sympathischen Nervensystems im murinen Friend Retrovirus-Infektionsmodell“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Dominique Blömker befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Harald Engler

### Erklärung zur Anfertigung der Dissertation

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat.- Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Dominique Blömker

### Erklärung zu laufenden oder früheren Promotionen

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat.- Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren erreiche.

Essen, den \_\_\_\_\_

Dominique Blömker