

## Ergebnisbeschreibung

Abb.20 Abgebildet ist das HE -Bilder in der 10x Vergrößerung (200 $\mu$ m Balken im Bild) der mit Medium infizierten Tiere. Das Bild zeigt einen angeschnittenen Brochiolus mit regelrechtem Epithel. Das übrige Lungengewebe zeigt zarte Septen und eine unauffällige Alveolarstruktur.

Abb. 21 CD3+ Zellen/0,6 mm<sup>2</sup>

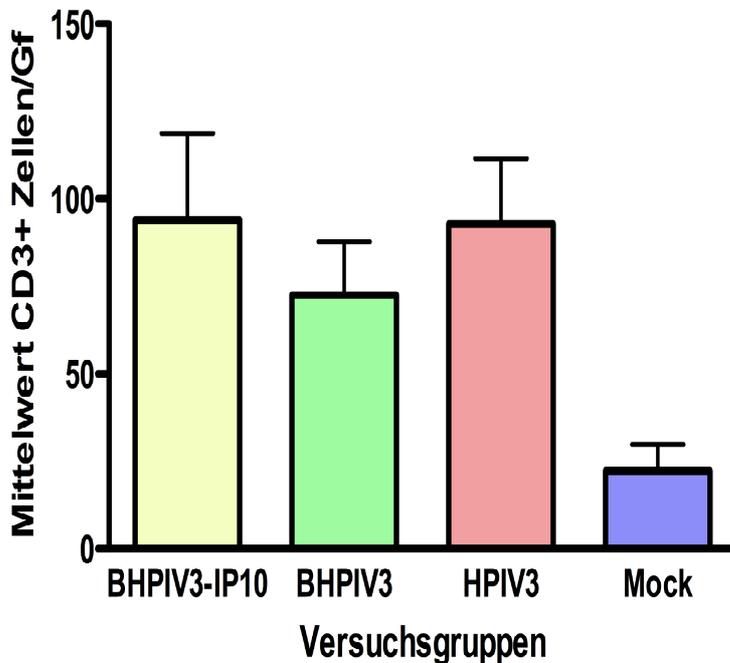


Abb.21 Dargestellt sind die Mittelwerte der vier-fünf Tiere der CD3<sup>+</sup> Zellen pro Gesichtsfeld (Gf) mit einer Fläche von F=0,651mm<sup>2</sup>. Es wurden drei Gesichtsfelder pro Tier ausgezählt und davon der Mittelwert gebildet. Die Gruppen B/HPIV3-IP10 (94±25 Zellen/Gf, n=5) und HPIV3 (93±19 Zellen/Gf, n=4) haben annähernd gleich viele Zellen pro GF. B/HPIV3 (73±15 Zellen/Gf, n=5) zeigt einen niedrigeren Wert, der jedoch nicht statistisch signifikant niedriger ist. Die Zelldichte in den zellulären Infiltraten war zwar bei allen Gruppen etwa gleich hoch, doch hatte B/HPIV3 in den nichtentzündlichen Arealen eine geringe Zelldichte. Nicht so für die B/HPIV3-IP10 und HPIV3. Dort zeigte sich eine gleichmäßige Zellverteilung mit mäßig bis hoher Dichte. Die Mock Gruppe (22±7 Zellen/Gf, n=5) hatte die geringste Zelldichte, die nur zu B/HPIV3-IP10 signifikant unterschiedlich war.

Zusammenfassend lassen sich die histologischen Befunde an Tag 5 nach Infektion wie folgt beschreiben: Die Immunhistologie zeigte für B/HPIV3-infizierte Tiere eine eher ungleichmäßige Zelldichte (73±15 Zellen/Gf). Es gab Foci zellulärer Infiltrate mit verdickten Alveolarsepten und vielen CD3<sup>+</sup> Zellen, zeigten jedoch keine Signifikanz zur Mock Gruppe (22±7 Zellen/Gf). Diese Foci waren aber im Vergleich zu den HPIV3-infizierten Lungen stärker umschrieben. Dann wiederum gab es Areale mit sehr geringer Zelldichte. Die Entzündung schien hier herdförmig zu sein.

## Ergebnisbeschreibung

Für HPIV3 (93±19 Zellen/Gf) zeigte sich in der Immunhistologie Lungenparenchym mit generalisiert leicht verdickten Alveolarsepten, Hyperplasie von Pneumozyten Typ2 und mäßig dichten CD3<sup>+</sup> T-Zellinfiltraten, die jedoch bezogen auf das Gesamtgesichtsfeld dichter als bei B/HPIV3 waren. Die fokalen Läsionen waren hier nicht so stark ausgeprägt, eher seltener und von ihrer Art eher diffus als umschrieben. Die Entzündung schien hier generalisiert zu sein.

Die B/HPIV3-IP10 Schnitte zeigten ein regelhaft aufgebautes Lungenparenchym mit zarten Alveolarsepten und vielen CD3<sup>+</sup> T-Zellen (94±25 Zellen/Gf) im Interstitium, vergleichbar mit der HPIV3 Gruppe, jedoch im Unterschied zu HPIV3 signifikant unterschiedlich zur Mock Gruppe. Es zeigte sich auch hier abschnittsweise in zwei Tieren ein zelluläres interstitielles Infiltrat i. S. einer interstitiellen Pneumonie, das jedoch in seiner Intensität viel geringer war als die beiden erstgenannten Gruppen. In der Mock-Gruppe zeigte sich wiederum ein regelhaftes Lungenparenchym mit zarten Alveolarsepten und nur äußerst spärlich vorkommenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen.

Die HE Bilder zeigten für die mit B/HPIV3 infizierten Tiere hyperplastisches Epithel im Bronchiolus und Zeichen einer Peribronchiolitis mit Gewebs- und Zellvermehrung. Weiterhin waren Zeichen einer ablaufenden Entzündung mit fokalen Infiltraten im Lungengewebe zu erkennen. Die Alveolen waren verdickt und enthielten Zellen i.S. einer Alveolitis mit zellulären Infiltraten und einer interstitiellen Pneumonie.

Die HE Bilder, der mit HPIV3 infizierten Tiere zeigten eine eher diffus, generalisierte Inflammation im Gesamtbild ebenfalls mit hyperplastischem Epithel im Bronchiolus, Zeichen einer Peribronchiolitis und mit zellulärem entzündlichem Infiltrat. Auch hier waren Zeichen einer Alveolitis und interstitieller Pneumonie zu erkennen.

Die HE Bilder der mit B/HPIV3-IP10 infizierten Tiere zeigten neben der Mockgruppe am wenigsten Veränderungen in der Lungenstruktur. Das unauffällige Epithel und die feinen Alveolarstrukturen waren mit der Mockgruppe vergleichbar.

## 6. Diskussion

Intranasal applizierte attenuierte Lebendimpfstoffe gewinnen zunehmend an Bedeutung als potente Impfstrategie gegen Atemwegsinfektionen [54]. Zum einen induzieren sie neben der systemischen auch eine lokale mukosale Immunantwort, zum anderen kann durch die mukosale Applikation der Nestschutz der Neugeborenen umgangen werden [55]. Ein weiterer Vorteil ist, dass bislang bei experimentellen RSV und PIV Lebendimpfstoffen, im Gegensatz zu inaktivierten Impfstoffen, keine Immunpathologie beobachtet wurde [56]. Die intranasale Lebendimpfung folgt dem natürlichen Infektionsweg und die Replikation des attenuierten Lebendimpfstoffs korreliert generell mit der Immunogenität und eventuellen klinischen Symptomen [34].

Das Ziel dieser Arbeit war zu testen, ob die Immunogenität eines attenuierten intranasal applizierten HPIV3 Impfstoffes durch Expression von IP10 gesteigert werden kann. Intranasale Impfung von Säuglingen und Kindern mit BPIV3 in einer Dosis von  $10^6$  TCID<sub>50</sub> wurden ohne Krankheitseffekt toleriert. Antikörpertiter gegen BPIV3 wurden induziert [57], jedoch war die Kreuzreaktivität zu HPIV3 zu schwach, um einen ausreichenden Schutz zu bieten [58]. Daraufhin wurde B/HPIV3 entwickelt, ein Impfvirus bei dem die Glykoproteine des bovinen Virus gegen die des humanen Virus ausgetauscht wurden. Die Replikation von B/HPIV3 in seronegativen Rhesusaffen war, verglichen mit HPIV3, etwa um den Faktor 10 reduziert. Die Expression zusätzlicher Gene aus dem rekombinanten Genom hob diese Attenuierung nicht auf [41, 47].

Im Anschluss an RSV und HPIV Atemwegserkrankungen werden postinfektiöse Veränderungen der Lungenfunktion mit einem über mehrere Jahre hinweg hyperreagiblem Bronchialsystem beobachtet [59]. Junge Brown Norway (BN) Ratten entwickeln nach Sendai Virus (Murines Parainfluenza Virus Typ 1 (MPIV1) Infektion eine Bronchiolitis, auf die ein Remodeling der Lunge mit hyperreagiblem Bronchialsystem folgt. F344 Ratten sind vor diesen langandauernden Effekten einer MPIV1 Infektion geschützt und erkranken auch akut weniger stark. Cai und Castleman beschrieben, dass F344 Ratten ca. 200 mal mehr IP10 exprimieren als BN Ratten und vermuteten, dass die durch IP10 verstärkte Th1 Antwort für diesen Schutz verantwortlich sein könnte [60]. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, den IP10 Leserahmen der Baumwollratte in das Genom des B/HPIV3 Virus zu integrieren.

Die im Tiermodell (Baumwollratten) getestete Hypothese lautete: Die Expression von IP10 erhöht die Immunogenität des Impfvirus und ist nicht für eine pulmonale Immunpathogenese verantwortlich.

## 6.1 Generierung der Viren und Analyse derselben

Nachdem die kodierende Sequenz des IP10 Gens der Baumwollratte in das B/HPIV3-Genom kodierende Plasmid kloniert war, konnte von dieser cDNS ausgehend de novo ein rekombinantes Virus generiert werden. Das neu geschaffene B/HPIV3-IP10 Virus replizierte in vitro ebenso gut wie B/HPIV3 und HPIV3, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Expression nicht mit der Replikation von B/HPIV3 interferiert und dass das Chemokin nicht toxisch für LLC-Mk2 Zellen ist. In vorausgegangen Studien konnte gezeigt werden, dass HPIV3 die Expression von zusätzlichen Genen problemlos toleriert und dass auch Zytokine exprimiert werden können, ohne dass die in vitro Replikationskompetenz eingeschränkt wird [47, 61]. Diese Toleranz für Verlängerungen des Genoms ohne negative Effekte auf die Replikation unterscheidet HPIV3 von RSV [62]. Erfreulicherweise zeigte B/HPIV3-IP10 trotz mehrfacher Passagierung keine Aminosäuresubstitutionen. Insbesondere in nicht-essenziellen Genen - hier also im IP10 Gen - kann es vorkommen, dass als Teil der antiviralen Immunantwort Adenosindeaminasen aktiviert werden und dass hypermutierte Sequenzen entstehen, ohne dass das Virus replikationsinkompetent wird [61, 63].

Im Western Blot zeigten sich zwei Banden für IP10 bei 10 kDa und 12 kDa, wobei die 12 kDa Bande nur spärlich ausgeprägt war. Die intensive 10 kDa Bande nach nur kurzer Exposition kann, obwohl ohne zelluläre Kontrollgene durchgeführt, zumindest als Hinweis auf eine robuste IP10 Expression durch das Virus gewertet werden. Für das IP10 Genprodukt zeigt das primäre Translationsprodukt eine Größe von 12 kDa. Die Signalpeptidase produziert dann ein 10 kDa Polypeptid [48]. Dieser Vorgang ist auf Grund der begrenzten Kapazität des endoplasmatischen Retikulums für Translationsprodukte sättigbar, sodass bei Überexpression, wie es hier anscheinend der Fall war, auch die nicht geschnittenen Formen detektierbar sind. Die starke Expression des IP10 Gens war erwartet und erwünscht. Die Transkription von HPIV Genen weist einen von promotorproximal nach promotordistal abnehmenden Gradienten auf. Dies wird darauf zurückgeführt, dass die virale Transkriptase jedes Gen einzeln transkribiert, am Ende des Gens die Transkription einstellt, die intergenische Sequenz überspringt und dann erneut mit der Transkription des nächsten Gens beginnt. Da dieser Prozess nicht perfekt ist, kann sich die Transkriptase vom Antigenom lösen, sodass es am Ende der intergenischen Sequenz nicht wieder zur Initiierung der Transkription kommt. Je weiter promotordistal ein Gen liegt, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Transkriptase nicht mehr mit dem Antigenom assoziiert ist [64]. Da das IP10 Gen an erster Stelle, also promotorproximal, liegt wurde mit einer

starken Expression gerechnet. Virale Fremdantigene, die an gleicher Stelle in das B/HPIV3 Genom eingefügt wurden, wurden ebenfalls ausgesprochen stark exprimiert [64].

## 6.2 Replikation und Antikörperantwort in der Baumwollratte

Die Baumwollratte (*Sigmodon hispidus*) wurde als Modell für den Vergleich der Replikation und Immunogenität von HPIV3, B/HPIV3 und B/HPIV3-IP10 gewählt, da Baumwollratten semipermissiv für HPIV3 sind und bereits in anderen Arbeitsgruppen als Kleintiermodell für die Evaluierung von Parainfluenzaviren genutzt wurden [65-69]. Ein Nachteil des Baumwollrattenmodells ist, dass bislang nur wenige immunologische Reagenzien kommerziell erhältlich sind, sodass nur eine begrenzte Auswahl von Analysen möglich sind. Es zeigte sich in dieser Arbeit eine Restriktion der Virusreplikation um das 200 fache für B/HPIV3 und um das 285 fache für B/HPIV3-IP10 im Vergleich zum HPIV3. Die in dieser Arbeit beschriebenen HPIV3 Virustiter in der Lunge von *Sigmodon hispidus* entsprechen den von anderen Arbeitsgruppen publizierten Titern, d.h. sie liegen in der Größenordnung von  $10^4$  infektiösen Einheiten pro Gramm Lungengewebe [68]. In anderen Studien wurden Rhesusaffen ebenfalls als Tiermodell für die Evaluierung des Attenuierungsphänotyps von B/HPIV3 genutzt, doch zeigt sich in diesem Modell lediglich eine Restriktion der Replikation um den Faktor 10 im Vergleich zu HPIV3 [41, 47]. Auch in Hamstern zeigt sich für das B/HPIV3 ein ähnlicher Attenuierungsphänotyp, d.h. eine Restriktion der Replikation um den Faktor zehn [70]. Keines der drei Tiermodelle stellt ein Krankheitsmodell dar, d.h. weder Baumwollratten, noch Hamster, noch Rhesusaffen entwickeln Symptome einer PIV3 Atemwegserkrankung (Pharyngitis, Laryngotracheitis, Bronchitis, Bronchiolitis oder Pneumonie); die eingeschränkte Replikation dient lediglich als Surrogat für die in Kleinkindern erwartete Attenuierung, also das Ausbleiben klinischer Symptome in dieser Zielgruppe für einen HPIV3 Impfstoff.

Der primäre Endpunkt für die Beurteilung der Immunogenität der Impfviren in dieser Studie war der Titer von HPIV3 neutralisierenden Antikörpern im Serum an Tag 21 nach Infektion. In seronegativen Primaten und in seronegativen Kleinkindern und Säuglingen konnte gezeigt werden, dass eine HPIV3-spezifische Serokonversion mit Schutz vor Replikation einer Challenge Infektion (HPIV3 im Falle der Affen, eine zweite Dosis Impfvirus im Falle des Säuglinge) einhergeht, also als Korrelat eines Immunschutzes gewertet werden kann [35, 36]. B/HPIV3, B/HPIV3-IP10 und HPIV3 induzierten ähnliche Neutralisationstiter, d.h. es konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden. Dies ist erstaunlich, da HPIV3 200 bis 300 mal besser repliziert als B/HPIV3 und B/HPIV3-IP10 und allgemein davon ausgegangen wird, dass

die Immunogenität von attenuierten Lebendimpfstoffen mit der Replikation der Impfviren korreliert. In publizierten Studien, in denen HPIV3 und B/HPIV3 in Rhesusaffen verglichen wurden, zeigte sich, dass B/HPIV3 etwas weniger immunogen war als HPIV3 [41, 47]. In diesen Studien wurden jedoch lediglich Hämagglutinationsinhibitionstiter (HAI Titer) bestimmt und es kann davon ausgegangen werden, dass HAI Titer nicht perfekt mit Neutralisationstitem korrelieren. Antikörpertiter gegen HPIV3 können auch 5 und 6 Wochen nach Infektion noch ansteigen, und die Bestimmung an Tag 21 war eventuell weniger differenzierend als eine Bestimmung an einem späteren Zeitpunkt. Eine Studie in Primaten konnte hier leider nicht durchgeführt werden, sodass die Immunogenität von B/HPIV3-IP10 nicht abschließend bewertet werden kann.

Derzeit wird B/HPIV3 als experimenteller HPIV3 Lebendimpfstoff in seronegativen Kleinkindern evaluiert (ClinicalTrials.gov Registernummer NCT00366782). Obwohl diese Studien noch nicht abgeschlossen sind, zeigen die Virustiter in den ersten geimpften Kleinkindern, dass B/HPIV3 eher um den Faktor 10 als den Faktor 300 attenuiert ist, sodass das Tiermodell Rhesusaffe besser der Attenuierung in Kleinkinder zu entsprechen scheint als das Modell Baumwollratte (persönliche Kommunikation, Alexander Schmidt, NIH).

### 6.3 Zelluläre Immunantwort

Für eine effektive antivirale Immunantwort bei HPIV3 Primärinfektion sind zwei Zelltypen essenziell. Zum einen sind dies die antigenpräsentierenden Zellen (insbesondere dendritische Zellen) und zum anderen T-Zellen. Bei viralen Infektionen spielen die plasmacytoiden dendritischen Zellen (PDZ) eine wichtige Rolle. Sie sind in der Lage eine Th1 bzw. Th2 Antwort zu generieren, je nachdem wie sie aktiviert wurden [71]. Virus aktivierte humane PDZ sorgen dafür, dass sich native  $CD4^+$  T Zellen in einem  $IFN\alpha$  abhängigen Milieu zu Th1 Zellen differenzieren [72, 73]. Dabei differenzieren sie selbst durch einen autokrinen Mechanismus und stimulieren die T-Zellen zur Produktion von  $IFN\gamma$ . Darüber hinaus werden durch  $IFN\alpha$  natürliche Killerzellen angelockt.

Virale Erreger von akuten Atemwegserkrankungen können unterschiedliche Zytokinmuster induzieren. Eine Studie, die die nasopharyngealen Aspirate von Kleinkindern hinsichtlich dieser Zytokinmuster untersuchte, konnte zeigen, dass RSV eine vornehmlich Th2 Antwort, Influenzaviren eine vornehmlich Th1 Antwort und Adenoviren und Parainfluenzaviren eine Th1 und Th2 Antwort in der Lunge induzieren [74].

## Diskussion

Dabei zeigte, wie oben schon erwähnt, die Th1 Antwort in mehreren Studien Virusspezies übergreifend einen protektiven Effekt. Das Th1 Milieu sorgt dabei für schnelle Klärung der Viren, eine beschleunigte Reifung von dendritischen Zellen und T-Zellen, und einen Influx von Immunzellen [49, 60]. IP10 spielt dabei eine bedeutende Rolle, wie in Balb/c Mäusen gezeigt werden konnte. So verstärkte sich die RSV induzierte Lungenpathologie durch Neutralisation von IP10. Weiterhin zeigte sich in Mäusen nach IP10 Neutralisation eine verzögerte Virusklärung von RSV. Erstaunlicherweise konnten in Lungen von Mäusen nach IP10 Neutralisation, im Vergleich zu Kontrolltieren, keine Veränderungen im Hinblick auf die IFN $\gamma$ - oder Th2 Zytokininduktion beobachtet werden, es kam jedoch zur Reduktion des IL-12 Proteins und der IFN $\alpha$  mRNA im Lungengewebe. Somit führte die IP10 Neutralisation zur Abnahme von Th1 spezifischen Zytokinen, jedoch nicht zur Induktion einer Th2 Antwort. Immunzellen, dendritische Zellen und CD8<sup>+</sup> Zellen wurden weniger effektiv in die Lunge von IP10 neutralisierten Mäusen rekrutiert [49].

Um meine Arbeitshypothese zu evaluieren, dass die Überexpression des IP10 die Immunogenität des B/HPIV3-IP10 steigert, wurden IFN $\gamma$  (Th1 Antwort) und IL-4 (Th2 Antwort) mit dem ELISA gemessen. Die Überexpression des IP10 hat dabei den Vorteil, dass das Zytokin IP10 in größerer Menge und über einen längeren Zeitraum das Lungenepithel und die lokalen Immunzellen stimulieren kann, da gezeigt wurde, dass A549 Lungenepithelzellen, die mit Sendaiviren infiziert wurden, eine Spitzenkonzentration von IP10 nach 12h exprimierten und dass IP10 nach 12 Stunden herunterreguliert wurde. Auch zeigte diese Studie, dass die IP10 Produktion in A549 Lungenepithelzellen nach Sendaivirus Infektion mit steigender Viruslast anfangs bei einer MOI von 0,2-1 zunimmt und bei MOI von 5-25 wieder auf den Anfangswert sinkt [75]. Leider konnte in dieser Arbeit die Konzentration des IP10 Proteins nicht bestimmt werden, da für die Baumwollratte noch kein Assay existierte. Im Nachhinein wäre es sicher sinnvoll gewesen, die IP10 mRNA mittels einer qPCR zu quantifizieren, doch dies war nicht als Teil des Tierversuchs berücksichtigt worden.

An Tag drei wurden die Zytokine aus dem Blut bestimmt und für sowohl IL-4 als auch IFN $\gamma$  waren nur an der Nachweisgrenze ermittelbar. Grundvoraussetzung einer messbaren Erhöhung der Zytokinausschüttung ist eine Rekrutierung und Stimulierung der Immunzellen in einem bestimmten Zeitintervall. Das keine Erhöhung der Zytokine ermittelt werden konnte, kann mehrere Ursachen haben. So ist es fraglich, ob der gewählte Zeitpunkt drei Tage nach Infektion der beste Zeitpunkt für dieses Assay war, da die Virus Spitzen-Titer in der Lunge von mit HPIV3 infizierten Baumwollratten an Tag 3 liegen [67]. Die maximale Rekrutierung zytokinsezernierender Zellen und die Zytokinausschüttung in der Lunge und in mediastinalen

## Diskussion

Lymphknoten (nach Restimulation) von C57BL/J6 Mäusen, die mit Sendaiviren infiziert wurden, lag zwischen Tag 7 und 10 nach Infektion. Das ist auch der Zeitraum, zu dem die Viren von der Lunge geklärt sind. Zum anderen ist es denkbar, dass die Assaymethode nicht empfindlich genug war. Wir haben hier eine ELISA Methode gewählt und hätten uns auch für einen ELISPOT entscheiden können. Beide Methoden liefern nicht unbedingt vergleichbare Ergebnisse. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da der ELISPOT keine Konzentrationen misst und die unterschiedlichen Detektionsmethoden unterschiedliche Aspekte der Zytokinproduktion reflektieren [76]. Somit können Zellen positiv im Elispot dargestellt werden, jedoch keine Zytokine im ELISA feststellbar sein. Messbare Zytokine in fluiden Medien (Serum, BAL) repräsentieren dabei nur den Überschuss nach Eigenverbrauch und Abbau durch die Zellen.

Der langfristige Effekt der Virusstimulation auf das Immunsystem sollte durch Zytokinbestimmung nach Restimulation und Proliferation der PBMC an Tag 21 in dieser Arbeit bestimmt werden. Dass der gewählte Zeitpunkt und das zu untersuchende Material messbare Ergebnisse unterstützt, zeigt sich in einer Studie, in der in Rhesusaffen die Anzahl an IFN $\gamma$  sezernierender PBMC nach Infektion mit B/HPIV3, das zusätzliche Gene exprimiert, gemessen wurde. Es zeigten sich weniger als 20 IFN $\gamma$  sezernierender PBMC pro 400.000 Zellen an Tag 6 und an Tag 10 stieg die Zahl auf 40-140 pro 400.000 Zellen. An Tag 21 lag die Zahl der IFN $\gamma$  sezernierender PBMC etwas niedriger jedoch immer noch erhöht bei 18-90 pro 400.000 Zellen [47]. Es zeigte sich in dieser Arbeit nur in der HPIV3-Gruppe in dem UV-inaktivierten Virusstimulationsansatz ein zu allen Gruppen bis auf B/HPIV3-IP10 und HPIV3 im virusstimulierten Ansatz signifikanter Anstieg im Hinblick auf die IFN $\gamma$  Ausschüttung und ein zu allen Gruppen bis auf B/HPIV3-IP10 und B/HPIV3 im UV-inaktivierten Virusstimulationsansatz signifikanter Anstieg im Hinblick auf die Proliferation der PBMC nach Restimulation. Es stellen sich somit bei diesem Ergebnis drei Fragen. Erstens: Warum hat die Stimulation mit lebenden Viren keine Proliferation der PBMC induziert? Zweitens: Warum waren B/HPIV3 und B/HPIV3-IP10 nicht in der Lage, eine mit HPIV3 vergleichbare Immunantwort (IFN $\gamma$  Ausschüttung in Verbindung mit der PBMC Proliferation) zu induzieren? Drittens: Warum war die IL-4 Antwort der PBMC nach Restimulation für alle Gruppen an Tag 21 nur an der Nachweisgrenze messbar?

Hinsichtlich der ausbleibenden Proliferation nach Stimulation mit lebenden Viren: Durch die starke IFN $\gamma$  Ausschüttung sind Zellen (Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Pneumozyten Typ II und Fibroblasten) im Entzündungsgeschehen in der Lage das Chemokin IP10 zu produzieren und aktivierte CD4<sup>+</sup> Zellen anzulocken [77].

## Diskussion

Aktivierete angelockte CD4<sup>+</sup> Zellen produzieren IFN $\gamma$ , proliferieren und unterhalten somit das antivirale Milieu. Jedoch infiziert HPIV3 Immunzellen, inhibiert diese Proliferation und verhindert einen langfristigen Schutz. Eine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass nicht aktivierte T-Zellen nicht infiziert werden und eine Aktivierung der T-Lymphozyten für die Infektion mit HPIV3 notwendig ist. Zuvor durch Cyclosporin A inaktivierte T-Lymphozyten konnten auch nach Zugabe von IL-2 nicht infiziert werden. Die Fähigkeit infektiöse Viren in T-Lymphozyten zu replizieren konnte auch nur in aktivierten T-Lymphozyten beobachtet werden. Weiterhin verhinderte HPIV3 die Proliferation von aktivierten T-Lymphozyten und inhibierte zugegebenes IL-2 eine Wachstumsstimulation in rezeptorpositiven Zellen zu induzieren. Die nichtinfizierten aber stimulierten T-Lymphozyten, denen analog IL-2 und Cyclosporin A zugegeben wurde konnten die Wachstumsinhibition durch Cyclosporin A umgehen. Der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau zeigte eine dosisabhängige Inhibition der Inkorporation von aktivierten T-Lymphozyten durch das Virus [78]. Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte, dass die Inhibition des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbaus in aktivierten T-Lymphozyten nicht durch Metabolite der Arachidonsäuresynthese verursacht wird, da man annahm, dass die Metabolite für Proliferationshemmung verantwortlich sind. Die Zugabe von bovinem rekombinantem IL-1 $\beta$  oder IL-2 hoben diese Inhibition ebenfalls nicht auf, was mit der oben genannten Studie übereinstimmt. Überstand von infizierten Brochiolarmakrophagen (BAM) und gemischten Lymphozytenkulturen konnten keine Inhibition des [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbaus bewirken. Sie zeigten weiterhin, dass die [<sup>3</sup>H]-Thymidin Inkorporation von PBMC, die direkten Kontakt mit HPIV3 infizierten BAM hatten, supprimiert ist. Wenn die PBMC jedoch durch eine semipermeable Membran von den BAM getrennt wurden, der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau wiederhergestellt war und den der Kontrollgruppe sogar übertraf. Der Zell-Zell Kontakt ist dabei die Grundvoraussetzung für eine Infektion [79]. Zwei weitere Studien verdeutlichen die funktionalen immunologischen Veränderungen infizierter T-Lymphozyten, die einen inhibitorischen Effekt auf den [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau haben [80, 81]. Diese Studien bestätigen die in dieser Arbeit festgestellte Proliferationshemmung im Stimulationsansatz mit lebenden Viren. Auf der anderen Seite zeigt die Antwort der mit HPIV3 infizierten PBMC im Stimulationsansatz mit UV-inaktivierten Viren, dass viele T-Lymphozyten bei Infektion in vivo aktiviert wurden, sodass die Restimulation mit nichtreplikativen Viren einen gesteigerten [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau bewirkte, der im Vergleich zur Mock Gruppe signifikant war.

Mehr aktivierte Lymphozyten produzieren folglich auch mehr IFN $\gamma$  [47, 76]. Deshalb reflektiert die hohe IFN $\gamma$  Ausschüttung der HPIV3-Gruppe in dem UV-inaktivierten Virusstimulationsansatz eine gute Virusstimulation in der Lunge. Grund dafür ist insbesondere in

## Diskussion

die mit anderen Studien vergleichbare in vivo Replikation von HPIV3, die bei  $10^4$  PFU/g Lungengewebe lag [68].

Hinsichtlich der verminderten Proliferation und  $\text{IFN}\gamma$  Ausschüttung nach B/HPIV3 oder B/HPIV3-IP10 Infektion: Auf der anderen Seite spiegeln die niedrigen, obwohl jedoch von HPIV3 nicht signifikant unterschiedlichen Proliferationswerte nach Stimulation durch UV-inaktivierte Viren der beiden anderen Gruppen in Zusammenhang mit der von B/HPIV3 und B/HPIV3-IP10 zu HPIV3 signifikant niedrigeren  $\text{IFN}\gamma$  Ausschüttungen eine schlechte primäre Stimulation aufgrund der eingeschränkten Replikation wieder. B/HPIV3 und B/HPIV3-IP10 sind attenuierte Viren. Somit lässt sich bei restringierter Replikation für diese Viren noch nicht vorraussagen, wann und wie schnell sie Zellen in der Lunge rekrutieren und aktivieren. Obwohl in dieser Arbeit für das B/HPIV3-IP10 Virus in vitro, bei einer den anderen Viren vergleichbaren Wachstumskinetik, gezeigt wurde, dass IP10 im B/HPIV3-IP10 Virus überexprimiert wird, hängt die Expression in vivo von der Replikation der Viren ab. Da die attenuierten Viren 200 bis 300 mal schlechter replizierten als HPIV3 ist es möglich, dass keine adäquate Stimulation des zellulären Immunsystems erfolgte, obwohl die Induktion vergleichbarer Neutralisationstiter diese Aussage zumindest relativieren muss [82].

Eine andere Studie benutzte 129/J (129) und C57BL/6J (B6) Mäuse, um die zelluläre und humorale Immunantwort zu evaluieren. Weiterhin wurden von diesen beiden Spezies durch Bestrahlung (950 Rad) und Knochenmarksrekonstitution Chimäre hergestellt, die das Verhältnis zwischen dem bestrahlungsresistenten Lungenepithel und dem Knochenmark untersuchte.

Es zeigte sich, dass die Lungenpathologie mit der Höhe des Virustiters, der für die 129 Mäuse 10 fach erhöht war, korrelierte. Der höhere Titer in diesen Tieren korrelierte mit höheren  $\text{IFN}\gamma$  Konzentrationen. Die  $\text{CD4}^+$  T-Zellen machten dabei den größten Teil der  $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden Zellen aus. Die Ursache für das bessere Viruswachstum in den 129 Mäusen kann entweder eine vererbte Eigenschaft des Lungenepithels (angeborene Immunantwort oder natürliche Resistenz) oder eine weniger effektive spezifische Immunantwort im Vergleich zu den B6 Mäusen sein. Versuche an Chimären zeigten, dass das zwischen den Tierspezies unterschiedlich empfindliche Lungenepithel der Hauptfaktor für das Viruswachstum ist. Auch zeigte sich, dass die Viruslast die  $\text{IFN}\gamma$  Sekretion und damit das Ausmaß der  $\text{CD4}^+$  T-Zell Stimulation beeinflusste, die während der primären Antwort in vivo stattfindet. Die humorale Antwort wich aber von dieser Beobachtung ab. Sowohl die Art als auch die Höhe der virusspezifischen Immunantwort ist offensichtlich im hämatopoetischen und lymphatischen Kompartiment determiniert und ist unabhängig von dem Viruswachstum und der  $\text{IFN}\gamma$  Sekretion, die mehr durch das Lungenepithel determiniert ist [83]. Somit sind die in dieser Arbeit beobachteten zellulären und humoralen

Antworten der B/HPIV3 und B/HPIV3-IP10 Gruppen nicht widersprüchlich, da trotz Attenuierung ein mit HPIV3 vergleichbarer Antikörpertiter induziert wurde, die IFN $\gamma$  Sekretion der PBMC jedoch weitgehend ausblieb. Es zeigt sich auch ein Trend zu einer niedrigeren Proliferationsrate der B/HPIV3 und B/HPIV3-IP10 Gruppen im Vergleich zu HPIV3 im UV-inaktivierten Virusstimulationsansatz, das das Ausbleiben einer IFN $\gamma$  Sekretion untermauert. Wünschenswert im Hinblick auf das Proliferationsergebnis im UV-inaktivierten Virusstimulationsansatz wäre eine größere Tieranzahl gewesen, um die Power beim statistischen Testen zu erhöhen. Die allgemeine Vorstellung, dass die Immunogenität von attenuierten Lebendimpfstoffen mit der Replikation der Impfviren korreliert, muss im Hinblick auf die spezifische Immunantwort zumindest teilweise differenziert betrachtet werden.

Hinsichtlich der ausgebliebenen IL-4 Antwort: Die IL-4 Antwort der PBMC nach Restimulation an Tag 21 zeigte nur an der Nachweisgrenze ermittelbare Werte in allen Gruppen. Dies ist konsistent mit mehreren Studien, die trotz Nachweis von IL-4 in der BAL keine IL-4 Produktion an allen Untersuchungstagen von Lymphozyten mediastinaler Lymphknoten nach Restimulation mit dem Sendai Virus zeigten [76, 83]. Die IL-4 Produktion in der Lunge ist auch in nasopharyngealen Aspiraten von Kleinkindern gezeigt worden, wo Parainfluenzaviren eine Th1 und Th2 Antwort induzierten [74]. Das immunologische Zytokinprofil scheint dabei in der Lunge entweder teils anders reguliert zu sein oder es muss ein sensitiveres Nachweisverfahren wie z.B. eine qPCR gewählt werden.

### 6.4 Histologie der Lungen

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war die Auswirkung der rekombinanten Viren auf die Lungenpathologie an Tag 5 nach Infektion. Dabei sollte die chemotaktische Potenz des IP10 und die Pathogenität der Viren untersucht werden. Vergleichbare Pathogenesestudien an F344 Ratten hatten gezeigt, dass die Überexpression des IP10 in diesen Ratten ein möglicher Faktor für den protektiven Effekt nach Sendaivirusinfektion darstellt [60]. Andere Studien konnten eine schnellere Virusklärung in F344 Ratten im Gegensatz zu BN-Ratten feststellen [84]. Weiterhin gibt es Studien, die einen Zusammenhang zwischen einer prädominanten Th2 Antwort und verstärkten pathologischen Lungenveränderung beschreiben und eine Th1 dominierte Antwort als protektiv darstellen [85].

Für die HPIV3-Gruppe waren wie für die B/HPIV3-Gruppe hyperplastisches Epithel und Zeichen einer Alveolitis mit zellulären Infiltraten in den Alveolen zu erkennen. Weiterhin

## Diskussion

konnten Zeichen einer Peribronchiolitis, fokale entzündliche Infiltrate und Zeichen einer interstitiellen Pneumonie beobachtet werden. Die HPIV3 Gruppe zeigte im Vergleich zur B/HPIV3-Gruppe eine eher diffuse, generalisierte Entzündungsreaktion. Aufgrund der Tierzahl zeigte sich für die HPIV3-Gruppe (n=4) keine Signifikanz zur Mock Gruppe i. H. auf die Zellzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen, obwohl die HPIV3 Werte mit den B/HPIV3-IP10 Werten (n=5) vergleichbar waren und die Varianz der HPIV3 Gruppe sogar geringer war als die B/HPIV3-IP10 Gruppe. Vergleichbare Ergebnisse zeigten Studien, die an mit HPIV3 infizierten Baumwollratten die histopathologische Dynamik der Erkrankung untersuchten. Dabei wurden Lungenschnitte an Tag 1-8, 10, 14 und 21 (Tag 1-7, 10, 14 für die Kontrolltiere) durchgeführt. Die Lungenschnitte der Kontrolltiere zeigten an allen Tagen zylindrisches Epithel mit basal angefärbten Zellkernen. Die Lamina propria und der interstitielle Raum war frei von zellulären Infiltraten, so wie es in dieser Arbeit für die B/HPIV3-IP10 und Mock-Gruppe beobachtet wurde. Das Lungengewebe mit HPIV3 infizierten Tieren zeigte innerhalb von zwei Tagen einen zytopathischen Effekt und Defekt der epithelialen Architektur. An Tag 5 konnten Infiltrationen perivaskulärer und peribronchialer Räume festgestellt werden. Die Infiltration war an Tag 7 nach Infektion am stärksten ausgeprägt [65].

In der Histologie konnte gezeigt werden, dass das IP10 sowohl einen chemotaktischen Effekt auf CD3<sup>+</sup> Zellen mit als einzige Gruppe signifikantem Unterschied zur Mock Gruppe als auch einen protektiven Charakter in Bezug auf akute pathologische Lungenveränderungen an Tag 5 nach Infektion hatte. CD3<sup>+</sup> Zellen wurden rekrutiert, ohne die Lungenmorphologie zu beeinflussen. Erstaunlicherweise zeigte die B/HPIV3-Gruppe eine starke Pathologie, die fokal sogar die des Wildtypvirus übertraf. Man hätte aufgrund der restringierten Replikation eine eher milde Reaktion erwartet, doch zeigt sich dies hier nur abschnittsweise. Die Antifibrotische und protektive Wirkung im Th1 Milieu ist in vielen Studien beschrieben worden und ist hier nur durch Überexpression des IP10 im Vergleich zu den beiden anderen Viren zu erklären [86, 87]

## 7. Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt die erfolgreiche Nutzung des reversen Genetik Systems für das Impfvirus B/HPIV3 im Hinblick auf die Einbringung eines immunmodulierenden Gens. Es wurde de novo von cDNA eine B/HPIV3 Mutante mit einer zusätzlichen IP10 Geneinheit, B/HPIV3-IP10, geschaffen. IP10 ist ein Chemokin, das bei viralen Atemwegsinfektionen eine schützende und immunstimulierende Wirkung ausübt. B/HPIV3-IP10 exprimierte erfolgreich das Protein und replizierte in vitro ebenso gut wie HPIV3.

B/HPIV3-IP10 wurde anschließend im Tierversuch evaluiert. In Baumwollratten wurde die Replikation, die Immunogenität und die Virulenz von B/HPIV3-IP10 im Vergleich zu B/HPIV3 und HPIV3 untersucht. Es zeigte sich, dass B/HPIV3 und B/HPIV3-IP10 wesentlich schlechter replizieren als HPIV3, wie es für attenuierte Impfviren erwartet wurde. Erfreulicherweise induzierten B/HPIV3 und B/HPIV3-IP10 trotz ihrer restringierten Replikation mit HPIV3 vergleichbare HPIV3-neutralisierende Antikörpertiter.

Im Hinblick auf die T-Zell Proliferation und IFN $\gamma$  Ausschüttung nach Restimulation zeigte B/HPIV3-IP10 einen Trend zu gesteigerter Immunogenität im Vergleich zu B/HPIV3. Die in einem einzigen Tierversuch gemessenen Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. HPIV3 zeigte im UV-inaktivierten Stimulationsansatz signifikant höhere Werte in der IFN $\gamma$  Ausschüttung, jedoch nicht in der T-Zell Proliferation.

In der Lungenhistologie zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Zahl CD3<sup>+</sup> Zellen in den Lungen von B/HPIV3-IP10 infizierten Tieren im Vergleich zur Mock Gruppe und ein Trend zu einem Anstieg im Vergleich zu B/HPIV3 infizierten Tieren. Insgesamt zeigten die Lungen von B/HPIV3-IP10 infizierten Tieren weniger pathologische Veränderungen als die Lungen von B/HPIV3 oder HPIV3 infizierten Tieren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass B/HPIV3-IP10 gut in vitro repliziert, in Baumwollratten jedoch deutlich attenuiert, aber dennoch mindestens so immunogen wie B/HPIV3 ist. Es gibt erste Anzeichen dafür, dass B/HPIV3-IP10 eventuell immunogener und weniger pathogen ist als B/HPIV3.

## 8. Anhang

### 8.1 Primer

Alle Primer sind in 5' --- 3' Richtung angegeben.

IP10-for

ggagcctgcaggATGAACCCGAGTGCTGTCCTCGTTTTCTGC

IP10-rew

GgagcctgcaggTACAGCACTGAGGTGATCGGCTTCTCTCTGG

Seq.-for

TCTGCctcatcttgctgagc

Seq.-rew

gatggccgctgactctgg

VR4 f an Position 18470 im Genom      GTACGCTTCGCACCTCGA

VR6 rew an Position 316 im Genom      GCTCTTTGCGCATGCTGC

### Für B/HPIV- IP10 Sequenzierung, nach der Rescue

Seq PCR forward acaagagaagagactggtttgga

Seq.80 f acttaggattaaagaactttaccgaaagg

Seq 175 rew tgccccggaataacagccc

Seq PCR reward tgcatctgttattgatggccaag

## 9. Literaturverzeichnis

1. Modrow, *Molekulare Virologie*. 1997. p. 3-5.
2. Brenner, S. and R.W. Horne, *A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses*. *Biochim Biophys Acta*, 1959. **34**: p. 103-10.
3. Heggeness, M.H., A. Scheid, and P.W. Choppin, *Conformation of the helical nucleocapsids of paramyxoviruses and vesicular stomatitis virus: reversible coiling and uncoiling induced by changes in salt concentration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(5): p. 2631-5.
4. B.N.Fields, *Virology*. 1985: p. 1305-1340.
5. Kingsbury, D.W. and R.W. Darlington, *Isolation and properties of Newcastle disease virus nucleocapsid*. *J Virol*, 1968. **2**(3): p. 248-55.
6. Buchholz, C.J., et al., *The conserved N-terminal region of Sendai virus nucleocapsid protein NP is required for nucleocapsid assembly*, in *J Virol*. 1993. p. 5803-12.
7. Curran, J., et al., *The hypervariable C-terminal tail of the Sendai paramyxovirus nucleocapsid protein is required for template function but not for RNA encapsidation*. *J Virol*, 1993. **67**(7): p. 4358-64.
8. Curran, J., *Reexamination of the Sendai virus P protein domains required for RNA synthesis: a possible supplemental role for the P protein*. *Virology*, 1996. **221**(1): p. 130-40.
9. Curran, J., T. Pelet, and D. Kolakofsky, *An acidic activation-like domain of the Sendai virus P protein is required for RNA synthesis and encapsidation*. *Virology*, 1994. **202**(2): p. 875-84.
10. Garcin, D., P. Latorre, and D. Kolakofsky, *Sendai virus C proteins counteract the interferon-mediated induction of an antiviral state*. *J Virol*, 1999. **73**(8): p. 6559-65.
11. Spriggs, M.K., P.R. Johnson, and P.L. Collins, *Sequence analysis of the matrix protein gene of human parainfluenza virus type 3: extensive sequence homology among paramyxoviruses*. *J Gen Virol*, 1987. **68 ( Pt 5)**: p. 1491-7.
12. Blumberg, B.M., et al., *Analysis of the Sendai virus M gene and protein*. *J Virol*, 1984. **52**(2): p. 656-63.
13. Cathomen, T., H.Y. Naim, and R. Cattaneo, *Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence*. *J Virol*, 1998. **72**(2): p. 1224-34.
14. Iwata, S., et al., *Assignment of disulfide bridges in the fusion glycoprotein of Sendai virus*. *J Virol*, 1994. **68**(5): p. 3200-6.
15. Lamb, R.A., R.G. Paterson, and T.S. Jardetzky, *Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures*. *Virology*, 2006. **344**(1): p. 30-7.
16. Skehel, J.J. and D.C. Wiley, *Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin*. *Annu Rev Biochem*, 2000. **69**: p. 531-69.
17. Baker, K.A., et al., *Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion*. *Mol Cell*, 1999. **3**(3): p. 309-19.
18. Lawrence, M.C., et al., *Structure of the haemagglutinin-neuraminidase from human parainfluenza virus type III*. *J Mol Biol*, 2004. **335**(5): p. 1343-57.
19. Crennell, S., et al., *Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase*. *Nat Struct Biol*, 2000. **7**(11): p. 1068-74.

20. Horikami, S.M., et al., *Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro*. J Virol, 1992. **66**(8): p. 4901-8.
21. Hamaguchi, M., et al., *Transcriptive complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex*. Virology, 1983. **128**(1): p. 105-17.
22. Markwell, M.A., L. Svennerholm, and J.C. Paulson, *Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(9): p. 5406-10.
23. Calain, P. and L. Roux, *The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4822-30.
24. Egelman, E.H., et al., *The Sendai virus nucleocapsid exists in at least four different helical states*. J Virol, 1989. **63**(5): p. 2233-43.
25. Irie, T. and T. Sakaguchi, [*Paramyxovirus budding*]. Uirusu, 2007. **57**(1): p. 1-7.
26. Reed, G., et al., *Epidemiology and clinical impact of parainfluenza virus infections in otherwise healthy infants and young children < 5 years old*. J Infect Dis, 1997. **175**(4): p. 807-13.
27. Glezen, W.P., et al., *Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children*. J Infect Dis, 1984. **150**(6): p. 851-7.
28. Mills, J.t., et al., *Experimental respiratory syncytial virus infection of adults. Possible mechanisms of resistance to infection and illness*. J Immunol, 1971. **107**(1): p. 123-30.
29. Prince, G.A., et al., *Enhancement of respiratory syncytial virus pulmonary pathology in cotton rats by prior intramuscular inoculation of formalin-inactivated virus*. J Virol, 1986. **57**(3): p. 721-8.
30. Kim, H.W., et al., *Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine*. Am J Epidemiol, 1969. **89**(4): p. 422-34.
31. Murphy, B.R., et al., *Dissociation between serum neutralizing and glycoprotein antibody responses of infants and children who received inactivated respiratory syncytial virus vaccine*. J Clin Microbiol, 1986. **24**(2): p. 197-202.
32. Connors, M., et al., *Pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of CD4+ T cells*. J Virol, 1992. **66**(12): p. 7444-51.
33. Graham, B.S., et al., *Priming immunization determines T helper cytokine mRNA expression patterns in lungs of mice challenged with respiratory syncytial virus*. J Immunol, 1993. **151**(4): p. 2032-40.
34. Murphy, B.R. and P.L. Collins, *Live-attenuated virus vaccines for respiratory syncytial and parainfluenza viruses: applications of reverse genetics*. J Clin Invest, 2002. **110**(1): p. 21-7.
35. Clements, M.L., et al., *Evaluation of bovine, cold-adapted human, and wild-type human parainfluenza type 3 viruses in adult volunteers and in chimpanzees*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(6): p. 1175-82.
36. Karron, R.A., et al., *A live human parainfluenza type 3 virus vaccine is attenuated and immunogenic in young infants*. Pediatr Infect Dis J, 2003. **22**(5): p. 394-405.
37. Belshe, R.B., et al., *Phase 2 evaluation of parainfluenza type 3 cold passage mutant 45 live attenuated vaccine in healthy children 6-18 months old*. J Infect Dis, 2004. **189**(3): p. 462-70.

38. Baily, J.E., et al., *Sequence determination and molecular analysis of two strains of bovine parainfluenza virus type 3 that are attenuated for primates*. Virus Genes, 2000. **20**(2): p. 173-82.
39. Greenberg, D.P., et al., *A bovine parainfluenza virus type 3 vaccine is safe and immunogenic in early infancy*. J Infect Dis, 2005. **191**(7): p. 1116-22.
40. Karron, R.A., et al., *Evaluation of a live attenuated bovine parainfluenza type 3 vaccine in two- to six-month-old infants*. Pediatr Infect Dis J, 1996. **15**(8): p. 650-4.
41. Schmidt, A.C., et al., *Bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins make an important contribution to the restricted replication of BPIV3 in primates*. J Virol, 2000. **74**(19): p. 8922-9.
42. Baily, J.E., et al., *A recombinant human parainfluenza virus type 3 (PIV3) in which the nucleocapsid N protein has been replaced by that of bovine PIV3 is attenuated in primates*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3188-95.
43. Skiadopoulos, M.H., et al., *Determinants of the host range restriction of replication of bovine parainfluenza virus type 3 in rhesus monkeys are polygenic*. J Virol, 2003. **77**(2): p. 1141-8.
44. Schnell, M.J., T. Mebatsion, and K.K. Conzelmann, *Infectious rabies viruses from cloned cDNA*. Embo J, 1994. **13**(18): p. 4195-203.
45. Baltimore, D., A.S. Huang, and M. Stampfer, *Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus, II. An RNA polymerase in the virion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **66**(2): p. 572-6.
46. Conzelmann, K.K., *Reverse genetics of mononegavirales*. Curr Top Microbiol Immunol, 2004. **283**: p. 1-41.
47. Bukreyev, A., et al., *More antibody with less antigen: can immunogenicity of attenuated live virus vaccines be improved?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16987-91.
48. Luster, A.D. and J.V. Ravetch, *Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10)*. J Exp Med, 1987. **166**(4): p. 1084-97.
49. Lindell, D.M., T.E. Lane, and N.W. Lukacs, *CXCL10/CXCR3-mediated responses promote immunity to respiratory syncytial virus infection by augmenting dendritic cell and CD8(+) T cell efficacy*. Eur J Immunol, 2008. **38**(8): p. 2168-79.
50. Korpi-Steiner, N.L., et al., *Human rhinovirus induces robust IP-10 release by monocytic cells, which is independent of viral replication but linked to type I interferon receptor ligation and STAT1 activation*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(6): p. 1364-74.
51. Baas, T., et al., *Genomic analysis reveals age-dependent innate immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus*. J Virol, 2008. **82**(19): p. 9465-76.
52. Zeremski, M., et al., *Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C*. Hepatology, 2008. **48**(5): p. 1440-50.
53. Tsunoda, I., et al., *Distinct roles for IP-10/CXCL10 in three animal models, Theiler's virus infection, EAE, and MHV infection, for multiple sclerosis: implication of differing roles for IP-10*. Mult Scler, 2004. **10**(1): p. 26-34.
54. Ellebedy, A.H. and R.J. Webby, *Influenza vaccines*. Vaccine, 2009. **27 Suppl 4**: p. D65-8.
55. Crowe, J.E., Jr., C.Y. Firestone, and B.R. Murphy, *Passively acquired antibodies suppress humoral but not cell-mediated immunity in mice immunized with live*

- attenuated respiratory syncytial virus vaccines*. J Immunol, 2001. **167**(7): p. 3910-8.
56. Schmidt, A.C., *Progress in respiratory virus vaccine development*. Semin Respir Crit Care Med, 2007. **28**(2): p. 243-52.
  57. Murphy, B.R., et al., *An update on approaches to the development of respiratory syncytial virus (RSV) and parainfluenza virus type 3 (PIV3) vaccines*. Virus Res, 1994. **32**(1): p. 13-36.
  58. Collins, R.A.K.a.P.L., *Parainfluenza viruses* Fields virology, Lippincott Williams and Wilkins (2007), 2007: p. pp. 1497–1526.
  59. Stein, R.T., et al., *Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years*. Lancet, 1999. **354**(9178): p. 541-5.
  60. Cai, X. and W.L. Castleman, *Early high expression of IP-10 in F344 rats resistant to Sendai virus-induced airway injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **285**(6): p. L1263-9.
  61. Skiadopoulos, M.H., et al., *Evaluation of the replication and immunogenicity of recombinant human parainfluenza virus type 3 vectors expressing up to three foreign glycoproteins*. Virology, 2002. **297**(1): p. 136-52.
  62. Bukreyev, A., et al., *Interferon gamma expressed by a recombinant respiratory syncytial virus attenuates virus replication in mice without compromising immunogenicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2367-72.
  63. Carpenter, J.A., et al., *Evidence for ADAR-induced hypermutation of the Drosophila sigma virus (Rhabdoviridae)*. BMC Genet, 2009. **10**: p. 75.
  64. Carlos, T.S., R. Fearn, and R.E. Randall, *Interferon-induced alterations in the pattern of parainfluenza virus 5 transcription and protein synthesis and the induction of virus inclusion bodies*. J Virol, 2005. **79**(22): p. 14112-21.
  65. Murphy, T.F., E.J. Dubovi, and W.A. Clyde, Jr., *The cotton rat as an experimental model of human parainfluenza virus type 3 disease*. Exp Lung Res, 1981. **2**(2): p. 97-109.
  66. Jones, B., et al., *Human PIV-2 recombinant Sendai virus (rSeV) elicits durable immunity and combines with two additional rSeVs to protect against hPIV-1, hPIV-2, hPIV-3, and RSV*. Vaccine, 2009. **27**(12): p. 1848-57.
  67. Porter, D.D., et al., *Pathogenesis of human parainfluenza virus 3 infection in two species of cotton rats: Sigmodon hispidus develops bronchiolitis, while Sigmodon fulviventer develops interstitial pneumonia*. J Virol, 1991. **65**(1): p. 103-11.
  68. Palermo, L.M., et al., *Human parainfluenza virus infection of the airway epithelium: viral hemagglutinin-neuraminidase regulates fusion protein activation and modulates infectivity*. J Virol, 2009. **83**(13): p. 6900-8.
  69. Ottolini, M.G., et al., *Semi-permissive replication and functional aspects of the immune response in a cotton rat model of human parainfluenza virus type 3 infection*. J Gen Virol, 1996. **77** ( Pt 8): p. 1739-43.
  70. Haller, A.A., et al., *Expression of the surface glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by bovine parainfluenza virus type 3, a novel attenuated virus vaccine vector*. J Virol, 2000. **74**(24): p. 11626-35.
  71. Rissoan, M.C., et al., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. Science, 1999. **283**(5405): p. 1183-6.
  72. Cella, M., et al., *Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 305-10.
  73. Kadowaki, N., et al., *Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 219-26.

74. Byeon, J.H., et al., *Comparison of cytokine responses in nasopharyngeal aspirates from children with viral lower respiratory tract infections*. Acta Paediatr, 2009. **98**(4): p. 725-30.
75. Veckman, V., et al., *TNF-alpha and IFN-alpha enhance influenza-A-virus-induced chemokine gene expression in human A549 lung epithelial cells*. Virology, 2006. **345**(1): p. 96-104.
76. Mo, X.Y., S.R. Sarawar, and P.C. Doherty, *Induction of cytokines in mice with parainfluenza pneumonia*. J Virol, 1995. **69**(2): p. 1288-91.
77. Bendriss-Vermare, N., et al., *Virus overrides the propensity of human CD40L-activated plasmacytoid dendritic cells to produce Th2 mediators through synergistic induction of IFN- $\gamma$  and Th1 chemokine production*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(4): p. 954-66.
78. Sieg, S., et al., *Infection and immunoregulation of T lymphocytes by parainfluenza virus type 3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6293-7.
79. Basaraba, R.J., et al., *Cell-to-cell contact not soluble factors mediate suppression of lymphocyte proliferation by bovine parainfluenza virus type 3*. Viral Immunol, 1994. **7**(3): p. 121-32.
80. Noone, C.M., et al., *Natural killer cells regulate T-cell proliferation during human parainfluenza virus type 3 infection*. J Virol, 2008. **82**(18): p. 9299-302.
81. Sieg, S., et al., *The role of interleukin-10 in the inhibition of T-cell proliferation and apoptosis mediated by parainfluenza virus type 3*. J Virol, 1996. **70**(7): p. 4845-8.
82. Miller, A.L., T.L. Bowlin, and N.W. Lukacs, *Respiratory syncytial virus-induced chemokine production: linking viral replication to chemokine production in vitro and in vivo*. J Infect Dis, 2004. **189**(8): p. 1419-30.
83. Mo, X.Y., et al., *Differential antigen burden modulates the gamma interferon but not the immunoglobulin response in mice that vary in susceptibility to Sendai virus pneumonia*. J Virol, 1995. **69**(9): p. 5592-8.
84. Sorden, S.D. and W.L. Castleman, *Virus-induced increases in airway mast cells in brown Norway rats are associated with enhanced pulmonary viral replication and persisting lymphocytic infiltration*. Exp Lung Res, 1995. **21**(2): p. 197-213.
85. Sorkness, R.L., et al., *Prevention of chronic postbronchiolitis airway sequelae with IFN-gamma treatment in rats*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(2): p. 705-10.
86. Wilson, M.S. and T.A. Wynn, *Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation*. Mucosal Immunol, 2009. **2**(2): p. 103-21.
87. Wynn, T.A., *Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(8): p. 583-94.

## 10. Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Alexander Schmidt für die Möglichkeit danken, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Großen Dank bin ich Henrick Schomacker verpflichtet, der mir geholfen hat, die ersten Arbeitsschritte zu erlernen und mich durchweg gut betreute. Dr. Michael Burwinkel bin ich sehr dankbar für die Hilfe bei den Experimenten und seine Leitung des Labors. Weiterhin danke sehr der liebevollen Unterstützung von Rita Strozynski, Loreen Kirchhof und Ruth Herrmann.

Dr. Christian Meisel und Claudia Sievers aus der Klinik für Immunologie standen mir zu allen Fragen der Immunologie zur Seite. Dafür möchte ich beiden ganz herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Loddenkemper aus dem Institut für Pathologie des Campus Benjamin Franklin danke ich für seine großzügige Hilfe und Rat bei der Interpretation der histologischen Schnitte.

## **11. Lebenslauf**

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

## 12. Veröffentlichungen

Poster presentation at ARVO annual meeting 2009: *Time-Dependent Inhibition of Inflammatory Angiogenesis*, F. Chaabo, S. Nakao, N. Lara-Castillo, S. Zandi, K. Noda, A. Hafezi-Moghadam. Angiogenesis Laboratory, Department of Ophthalmology, Massachusetts Eye & Ear Infirmary, Harvard Medical School, Boston, MA

*Nutrition & Metabolism* 2010, **7**:29: *Nutritional correlates and dynamics of diabetes in the Nile rat (Arvicanthis niloticus): a novel model for the metabolic syndrome and diet-induced type 2 diabetes*. Fadi Chaabo, Andrzej Pronczuk, Ekaterina Maslova, KC Hayes, Foster Biomedical Research Laboratory, Brandeis University, Waltham, MA

### **13. Erklärung**

„Ich, Fadi Chaabo, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Reverse Genetik und rekombinante Viren in der Impfstoffentwicklung selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 2010

Fadi Chaabo