

**Die Rolle von Interferon-beta bei der Influenzavirus Pneumonie:
Regulationswege und proapoptotische Effektormechanismen**

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Katrin Högner
aus Amberg

Gießen 2012

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
Direktor: Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Lohmeyer
Gutachter: Prof. Dr. John Ziebuhr

Tag der Disputation:
09.07.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Pathologie und Wirtsspektrum des Influenzavirus	- 1 -
1.2 Mikroanatomie der Lunge	- 4 -
1.3 Das mononukleäre Phagozytensystem der Lunge	- 5 -
1.4 Pulmonale Immunantwort nach Influenza Virus Infektion	- 7 -
1.5 Pathogen-induziertes akutes Lungenversagen (ARDS)	- 8 -
1.6 Mechanismen epithelialer Schädigung nach Influenzavirus Infektion	- 9 -
1.7 Das Interferonsystem	- 10 -
1.7.1 Interferone	- 10 -
1.7.2 Regulation der Typ I Interferone	- 10 -
1.7.3 Typ I Interferon induzierte Signalwege	- 12 -
1.8 TRAIL vermittelte Apoptose	- 13 -
2 Zielsetzung	- 17 -
3 Material und Methoden	- 18 -
3.1 Verwendung von humanem Material	- 18 -
3.2 Mauslinien	- 18 -
3.3 Virusstämme	- 19 -
3.4 Zellkulturmedien und Puffer	- 19 -
3.5 Gewinnung von primären Zellen	- 20 -
3.5.1 Isolation von primären murinen Alveolarmakrophagen	- 20 -
3.5.2 Isolation von primären murinen Typ II Alveolarepithelzellen	- 21 -
3.5.3 Isolation von primären humanen Alveolarmakrophagen	- 22 -
3.5.4 Isolation von primären humanen Typ II Alveolarepithelzellen	- 23 -
3.6 Herstellung eines Virusstocks	- 24 -
3.7 Titration des Virusstocks	- 24 -
3.8 <i>In vitro</i> Experimente	- 25 -
3.9 <i>In vivo</i> Experimente	- 26 -
3.9.1 Transplantation von murinen Knochenmarkszellen	- 26 -
3.9.2 Intratracheale und intraperitoneale Behandlung von Tieren	- 26 -

3.9.3 <i>In vivo</i> Auswertungen	- 27 -
3.10 Analyse der Genexpression	- 28 -
3.10.1 RNA Isolation	- 28 -
3.10.2 cDNA Synthese.....	- 29 -
3.10.3 Real time PCR	- 29 -
3.11 Analyse der Proteinexpression und -aktivität	- 31 -
3.11.1 Durchflusszytometrie (FACS).....	- 31 -
3.11.2 Western Blot	- 33 -
3.11.3 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	- 34 -
3.11.4 NF-κB Aktivitäts Test	- 34 -
3.12 Messung klinischer Parameter bei Tierexperimenten	- 34 -
3.12.1 Messung der alveolären Schrankenstörung bei Mäusen	- 34 -
3.13 Statistik.....	- 35 -
4 Ergebnisse	- 36 -
4.1 IFN-β induziert apoptotischen Lungenschaden nach Influenza Infektion	- 36 -
4.2 Alveolarmakrophagen sind die Hauptquelle von alveolärem IFN-β nach Influenzavirus Infektion.....	- 38 -
4.3 mAMΦ vermitteln die IFN-β abhängige Alveolarepithelzellapoptose.....	- 40 -
4.4 Analyse von mAMΦ-exprimierten proapoptotischen Faktoren nach Influenzavirus Infektion.....	- 41 -
4.5 IFN-β induziert die Expression des proapoptotischen Proteins TRAIL in mAMΦ	- 43 -
4.6 Analyse der in die Induktion von IFN-β involvierten intrazellulären Signalwege in mAMΦ	- 46 -
4.6.1 Influenzavirus Infektion aktiviert das Sensorprotein PKR in mAMΦ	- 46 -
4.6.2 PKR aktiviert den Transkriptionsfaktor NF-κB in mAMΦ	- 46 -
4.6.3 PKR-abhängig aktiviertes NF-κB reguliert die IFN-β Expression in mAMΦ	- 47 -
4.6.4 PKR abhängig aktiviertes NF-κB reguliert die IFN-β abhängige TRAIL Expression in mAMΦ	- 48 -
4.7 A/PR8 induziert die DR5 Rezeptor Expression IFN-β unabhängig.....	- 49 -
4.8 PKR und IFN-β-abhängig exprimiertes TRAIL induziert Apoptose in AEC... -	51 -
4.9 Die Rolle von mAMΦ-sezerniertem IFN-β in der Induktion des TRAIL- vermittelten Lungenschadens im Tiermodell	- 53 -

4.9.1 Evaluation eines Knochenmarkstransplantationsmodells	- 55 -
4.9.2 Untersuchung der Expression von TRAIL.....	- 57 -
4.9.3 Untersuchung der Rolle von Makrophagen-exprimiertem TRAIL in der Induktion der Alveolarepithelzellapoptose	- 59 -
4.9.4 Untersuchung der Barrierefunktion der Lunge in Influenzavirus- infizierten knochenmarkschimären Mäusen.....	- 60 -
4.10 Modell zur TRAIL-vermittelten Apoptose bei einer Influenzavirus Pneumonie	- 62 -
5 Diskussion.....	- 63 -
5.1 Intrazelluläre Signalwege zur Induktion von IFN- β	- 63 -
5.2 Die Rolle von Influenza Virus-induziertem IFN- β in der Wirtsabwehr und der Immunpathogenese	- 64 -
5.3 TRAIL als IFN- β -abhängig reguliertes Protein.....	- 66 -
5.4 TRAIL als proapoptotischer Faktor in der Influenzavirus <i>in vitro</i> Infektion....	- 67 -
5.5 Die Rolle der IFN- β /TRAIL Achse im <i>in vivo</i> Infektionsmodell.....	- 68 -
6 Zusammenfassung.....	- 71 -
7 Summary.....	- 72 -
Literaturverzeichnis.....	- 73 -
Veröffentlichungen.....	- 94 -
Danksagung	- 97 -
Eidesstattliche Versicherung	- 98 -

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DARSTELLUNG DES INFLUENZA A VIRUS.	- 1 -
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER IFN- β INDUKTION.	- 12 -
ABBILDUNG 3: TRAIL (Apo2L) UND SEINE REZEPTOREN.	- 14 -
ABBILDUNG 4: IFN- β SPIEGEL IN BALF UND LUNGENGeweBE NACH INFLUENZAVIRUS INFEKTION.	- 36 -
ABBILDUNG 5: IFN- β INDUZIERT APOPTOTISCHEN LUNGENSCHADEN NACH INFLUENZAVIRUS INFEKTION. ...	- 37 -
ABBILDUNG 6: IFN- β BEHANDLUNG VOR INFEKTION (TAG-1), ABER NICHT AM TAG 5 P.I. APPLIZIERTES IFN- β REDUZIERT DIE VIRUSLAST UND DEN LUNGENSCHADEN NACH INFLUENZAVIRUS INFEKTION.	- 38 -
ABBILDUNG 7: AM Φ PRODUZIEREN HÖHERE IFN- β MENGEN ALS AEC NACH INFLUENZAVIRUS INFEKTION.	- 39 -
ABBILDUNG 8: DIE EXPRESSION VON IFN- β WIRD ABHÄNGIG VOM VIRUSSTAMM IN MURINEN UND HUMANEN ALVEOLARMAKROPHAGEN INDUZIERT.	- 40 -
ABBILDUNG 9: REKOMBINANTES IFN- β INDUZIERT APOPTOSE IN EPITHELZELLEN NUR IN PRÄSENZ VON MAM Φ	- 41 -
ABBILDUNG 10: A/PR8 INDUZIERT DIE TRANSKRIPTION VON TRAIL IN MAM Φ	- 42 -
ABBILDUNG 11: DIE GENEXPRESSION VON TRAIL WIRD VIRUS-ABHÄNGIG IN MURINEN UND HUMANEN AM Φ INDUZIERT.	- 42 -
ABBILDUNG 12: OBERFLÄCHENEXPRESSION UND FREISETZUNG VON TRAIL AUS ALVEOLARMAKROPHAGEN VON PATIENTEN MIT PH1N1-INDUZIERTEM ARDS.	- 43 -
ABBILDUNG 13: REKOMBINANTES IFN- β INDUZIERT DIE EXPRESSION VON TRAIL IN AM Φ	- 44 -
ABBILDUNG 14: DIE EXPRESSION VON TRAIL IN MAM Φ WIRD UNTER INFEKTIONSBEDINGUNGEN IFN- β ABHÄNGIG REGULIERT.	- 45 -
ABBILDUNG 15: PKR WIRD NACH INFLUENZAVIRUS INFEKTION AKTIVIERT.	- 46 -
ABBILDUNG 16: PKR AKTIVIERT DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR NF- κ B NACH INFLUENZAVIRUS INFEKTION. .	- 47 -
ABBILDUNG 17: PKR- ABHÄNGIG AKTIVIERTES NF- κ B REGULIERT DIE IFN- β SEKRETION IN MAM Φ UNTER INFEKTIONSBEDINGUNGEN.	- 48 -
ABBILDUNG 18: PKR/NF- κ B-ABHÄNGIG SEZERNIERTES IFN- β REGULIERT DIE TRANSKRIPTION VON TRAIL IN MAM Φ	- 49 -
ABBILDUNG 19: DR5 WIRD IFN- β UNABHÄNGIG IN AEC UNTER INFEKTIONSBEDINGUNGEN REGULIERT.	- 50 -
ABBILDUNG 20: NP POSITIVE ZELLEN ZEIGEN EINE ERHÖHTE DR5 EXPRESSION NACH A/PR8 INFEKTION.	- 51 -
ABBILDUNG 21: MAM Φ -SEZERNIERTES TRAIL INDUZIERT APOPTOSE IN INFIZIERTEN UND NICHT-INFIZIERTEN AEC.	- 51 -
ABBILDUNG 22: PKR- ODER IFNAR- DEFIZIENZ REDUZIERT DIE TRAIL SEKRETION VON INFIZIERTEN AM Φ	- 52 -
ABBILDUNG 23: PKR-, IFNAR- ODER TRAIL-DEFIZIENZ IN MAM Φ ATTENUIERT DIE ALVEOLAREPITHELZELLAPOPTOSE.	- 53 -
ABBILDUNG 24: IFN- β INDUZIERT DIE SEKRETION VON TRAIL-VERMITTELTEM APOPTOTISCHEM LUNGENSCHADEN IN A/PR8-INFIZIERTEN MÄUSEN.	- 54 -
ABBILDUNG 25: DARSTELLUNG DER „GATING2 STRATEGIE UND DES ZELLAUSTAUSCHES NACH KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION.	- 56 -
ABBILDUNG 26: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSAUFBAUS.	- 57 -
ABBILDUNG 27: DIE ALVEOLÄRE EXPRESSION VON TRAIL IST ABHÄNGIG VON PKR UND IFNAR IN REKRUTIERTEN UND RESIDENTEN ALVEOLARMAKROPHAGEN.	- 58 -
ABBILDUNG 28: DIE APOPTOSE VON AEC IST ABHÄNGIG VON LEUKOZYTÄR EXPRIMIERTEM PKR, IFNAR UND TRAIL IN DER INFLUENZA VIRUS-PNEUMONIE.	- 59 -
ABBILDUNG 29: ALVEOLÄRE SCHRANKENFUNKTION DER LUNGE IN KNOCHENMARKSCHIMÄREN MÄUSEN NACH A/PR8-INFEKTION.	- 60 -
ABBILDUNG 30: PKR ^{-/-} -TRANSPLANTIERTE CHIMÄRE ZEIGEN EINE VERZÖGERTE ELIMINIERUNG DER VIRUSPARTIKEL IN DER BALF.	- 61 -
ABBILDUNG 31: DIE GEWICHTSKURVEN VON TRAIL ^{-/-} -TRANSPLANTIERTEN CHIMÄREN ZEIGEN EINEN ATTENUIERTEN VERLAUF DER A/PR8 PNEUMONIE.	- 62 -
ABBILDUNG 32: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SIGNALWEGE ZUR INDUKTION VON IFN- β -VERMITTELTER APOPTOSE VON ALVEOLAREPITHELZELLEN.	- 62 -
ABBILDUNG 33: MODEL DER TODESLIGANDEN VERMITTELTEN KONTROLLE DER SYSTEMISCHEN IMMUNANTWORT.	- 70 -

Abkürzungsverzeichnis

AEC 1	Alveolarepithelzellen Typ I
AEC 2	Alveolarepithelzellen Typ II
ALI	<i>Acute Lung Injury</i>
AMΦ	Alveolarmakrophagen
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin7
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
AU	<i>Arbitrary Units</i>
BAL(F)	Bronchoalveoläre Lavage (Flüssigkeit)
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	CC Chemokin Ligand
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CpG DNA	Cytosin-phosphatidyl-Guanin Desoxyribonukleinsäure
CRD	Cysteinreiche Domäne
DC	dendritische Zelle
DD	Todesdomäne
DISC	Todesinduzierender Signalkomplex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid Triphosphat
DR	<i>Death Receptor</i>
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF-2α	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2α
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ExMac	Exsudatmakrophagen
FACS	Durchflusszytometrie
FasL	Fas Ligand
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GPI	Glykophosphatidylinositol
h	Stunde
HA	Hämagglutinin

Abkürzungsverzeichnis

hAEC	humane Alveolarepithelzellen
hAMΦ	humane Alveolarmakrophagen
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon
IFNAR	Typ 1 Interferonrezeptor
IKK	Inhibitor von κB Kinase
IL	Interleukin
IPS-1	Interferon-beta Promotor Stimulator-1
IRF 3/7	Interferon regulatorischer Faktor 3/7
ISG	Interferon stimuliertes Gen
ISRE	Interferon stimuliertes response Element
IκB	Inhibitor von κB
LPS	Lipopolysaccharid
M1/2	Nukleoprotein 1/2
mA	Milliampere
mAB	monoklonaler Antikörper
MACS	<i>Magnetic Assisted Cell Sorting</i>
mAEC	murine Alveolarepithelzellen
mAMΦ	murine Alveolarmakrophagen
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein-1
MCP-3	Monozyten chemotaktisches Protein-3
MDA-5	Melanom Differenzierungs-assoziiertes Gen-5
MDCK	Madin Darby Canine Kidney Zellen
MDP	<i>Makrophage and Dendritic Cell Precursor</i>
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
min	Minuten
MIP	Makrophagen inhibitorisches Protein
ml	Milliliter
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
Mx	Myxovirus Resistenz Protein
Myd88	<i>Differentiation Primary Response Gene 88</i>
NA	Neuraminidase
NF-κB	Nuklear Faktor κ B
nM	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NS1/2	<i>Non-Struktural Protein 1/2</i>

Abkürzungsverzeichnis

OpG	Osteoprotegrin
PA	Polymerase A
pAB	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PB1/2	Polymerase B1/2
PB1-F2	Polymerase B1-F2
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDC	plasmazytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5.5	Phycoerythrin-Cyanin 5.5
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
pfu	<i>plaque forming unit</i>
p.i.	post Infektion
PKR	dsRNA abhängige Proteinkinase R
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
qPCR	quantitative PCR
RIG-I	Retinsäure induzierbares Gen 1
RNA	Ribonukleinsäure
RNAseL	Endoribonuklease L
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Runden pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Kulturmedium
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SP-A/B/C/D	Surfactant Protein A/B/C/D
ssRNA	einzelsträngige RNA
STAT 1/2	<i>Signal Transducer and Aktivator of Transkription 1/2</i>
TLR	<i>Toll like Rezeptor</i>
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
TRAIL-R	TRAIL Rezeptor
Tyk 2	Tyrosinkinase 2
UV	ultraviolett
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Pathologie und Wirtsspektrum des Influenzavirus

Influenzaviren sind zoonotische umhüllte Einzelstrang-RNA Viren aus der Familie der Orthomyxoviridae. Sie werden in Typ A, B und C klassifiziert, wobei nur die Typen A und B humane Infektionen verursachen. Sie werden subtypisiert aufgrund struktureller Unterschiede innerhalb der Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA). Das umhüllte Virus hat einen Durchmesser von 75-120nm und besitzt ein lineares einzelsträngiges segmentiertes RNA Genom (8 Segmente) mit negativer Polarität, welches 11 Proteine kodiert: Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), Nukleoprotein (NP), Matrix Protein 1 (M1) und 2 (M2), Non Struktural Protein 1 (NS1) und 2 (NS2), Polymerase A (PA), Polymerase B1 (PB1), Polymerase B1-F2 (PB1-F2), und Polymerase B2 (PB2). Die Segmente sind mit NP vollständig komplexiert [1], liegen mit den Polymerasen A, B1 und B2 assoziiert vor und werden als Ribonukleoproteine (RNP) bezeichnet. In der Lipidhülle sind die glykosylierten Oberflächenproteine HA, NA und M2 eingelagert. Das M1 Protein liegt der Innenseite der Hüllmembran an (Abb 1).

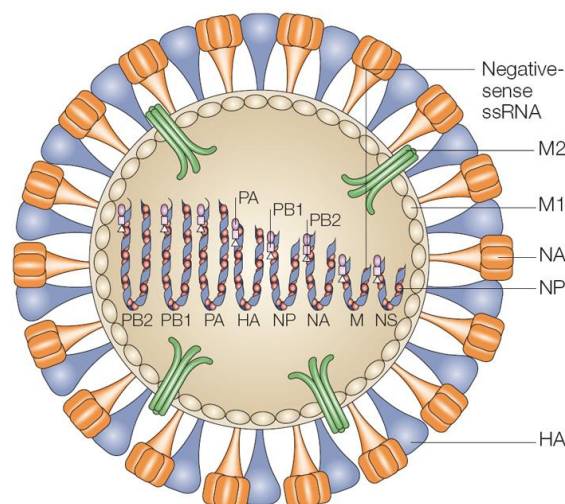


ABBILDUNG 1: DARSTELLUNG DES INFLUENZA A VIRUS.

Das umhüllte Virus enthält 8 einzelsträngige Gensegmente mit negativer Polarität, welches 11 Proteine kodiert: Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), Nukleoprotein (NP), Matrix Protein 1 (M1) und 2 (M2), Non Struktural Protein 1 (NS1) und 2 (NS2), Polymerase A (PA), Polymerase B1 (PB1), Polymerase B1-F2 (PB1-F2), und Polymerase B2 (PB2). Mit den Gensegmenten assoziiert sind NP, PA, PB1 und PB2. In die Lipidhülle sind die Proteine NA und HA sowie der Ionenkanal M2 eingelagert. Mit der Innenseite der Hüllmembran ist das M1 Protein assoziiert. Abbildung nach www.nature.com/scitable/content/schematic-diagram-of-an-influenza-A-virus-26874.

Influenza Viren verursachen fieberhafte Infekte der oberen Atemwege und bisweilen schwere Pneumonien, die des Öfteren mit bakteriellen Superinfektionen einhergehen [2]. Humanpathogene Influenza A Virus Stämme zeichnen sich durch große Unterschiede in ihren antigenen Eigenschaften aus, die auf einer besonders hohen Mutationsfrequenz und auf Genom-Neugruppierungen beruhen. Die hohe Mutationsfrequenz („antigenic drift“) beruht auf einer 10.000-fach höheren Replikationsfehlerrate im Vergleich mit humanen DNA Polymerasen, so dass gehäuft Punktmutationen entstehen [3, 4]. Neugruppierungen der segmentierten RNA („antigenic shift“) sind auf den Segmentcharakter des viralen Genoms zurückzuführen. Damit ist es möglich, dass sich die Segmente aus zwei unterschiedlichen Viruspartikeln während des Replikationszyklusses reassortieren, sofern eine Zelle von zwei unterschiedlichen Virusstämmen gleichzeitig infiziert wurde. Deshalb können Influenza-Pandemien auftreten, die auf primäre aviäre oder porcine Virusstämme zurückzuführen sind. Dafür charakteristisch sind eine schnelle Ausbreitung und eine erhöhte Pathogenität [5]. Allein im 20. Jahrhundert sind bisher vier große Pandemien aufgetreten. Die spanische Grippe, die 1918/1919 40 bis zu 50 Mio. Menschen das Leben kostete [6, 7], sowie 1957/1958 die asiatische Grippe, 1968/1969 die Hong Kong Grippe und 1977 die russische Grippe, die allerdings auf den Influenza Subtyp der Spanischen Grippe zurückzuführen ist. Desweiteren hatte die Pandemie von 1957 und 1968 nachweislich aviären Ursprung [8], was auch für die spanische Grippe diskutiert wird [9]. Die Vogelgrippe von 1997 und 2004 in Asien, bei der aviäre H5N1 Stämme auf Menschen überggesprungen sind, verursachte zwar massive Erkrankungen, war jedoch nicht von Mensch zu Mensch übertragbar. Diese Viren zeichneten sich durch eine erhöhte Affinität gegenüber Epithelzellen des unteren Respirationstraktes mit einer hohen Replikationsrate aus, was zu schweren primären Pneumonien führte [10].

Influenzaviren infizieren Epithelien des Nasenrachenraumes und der Bronchialschleimhaut. Nach Bindung des viralen Oberflächenmoleküls Hämagglutinin an epithelial exprimierte Sialinsäurereste erfolgt die Endozytose des Virus [11]. Im Verlauf der viralen Replikation im Zellinneren wird der Proteinbiosyntheseapparat der Wirtszelle ausschließlich für die Herstellung viraler Proteine genutzt, wodurch die zelleigene Proteintranslation gestört wird (zytopathischer Effekt) [12]. Zusätzlich werden zytotoxische Mediatoren freigesetzt, die zum Tod infizierter und auch nicht-infizierter Epithelzellen beitragen [13-15]. Die Infektion schädigt die Tracheal- und Bronchialschleimhaut, wodurch eine inflammatorische Reaktion durch spezifische

Erkennung viraler Strukturen induziert wird, die zur Transkription von Typ I Interferonen, Zytokinen und Chemokinen führt [11, 16-19]. Durch die Sekretion dieser inflammatorischen Mediatoren werden zunächst neutrophile Granulozyten und später hauptsächlich Exsudatmakrophagen und aktivierte T-Zellen rekrutiert [14, 19, 20]. Influenzavirus Infektionen treten hauptsächlich in den Wintermonaten auf. Als humanpathogene Influenzaviren, die saisonal Infektionen verursachen, gelten H3N2, H1N1 und Influenza B, wobei die Symptome wie Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen etwa 1 bis 5 Tage nach der Infektion gemeinsam mit respiratorischen Beschwerden auftreten. Die Mortalität einer Infektion mit saisonalen Influenzaviren unterliegt starken Schwankungen je nach Pathogenität des Erregers, wobei im Durchschnitt Influenzavirus Infektionen in Deutschland etwa 8-11.000 Todesfälle/Jahr verursachen (www.rki.de, Epidemiologisches Bulletin). Allerdings erkrankten in den USA etwa 50 Millionen Personen zwischen April und Mitte Dezember 2009 (Berechnungen des "Centers for Disease Control") am pandemischen Influenzavirus pH1N1. Zweihunderttausend Erkrankte mussten stationär behandelt werden, wobei etwa 10.000 Patienten verstarben. Das Alter von 86% der Patienten lag unterhalb des 65. Lebensjahres (www.cdc.gov/h1n1flu/estimates/April_December_12.htm), was sich auch in Deutschland widerspiegelte, da eine hohe pH1N1-induzierte Mortalität bei Kleinkindern und jungen Erwachsenen unter 29 Jahren auftrat [21, 22].

Gerade bei pandemischen Influenzaviren, die aviären oder porzinen Ursprung haben, treten häufig aufgrund der schnellen Virusausbreitung Infektionen des unteren Respirationstraktes auf, wodurch Alveolarepithelzellen Typ II und Typ I sowie Alveolarmakrophagen infiziert werden [23-25]. Dies konnte bei der „Spanischen Grippe“ 1918/19 und zuletzt während der Pandemie 2009/10 beobachtet werden [26]. Humane Infektionen mit aviären H5N1 Erregern, auch als Vogelgrippe bezeichnet, verursachen oft Infektionen des distalen Respirationstraktes und breiten sich systemisch aus, wobei die Letalität bei etwa 60% lag [27-29].

Dabei ist die Influenzavirus Pneumonie durch eine nekrotisierende Bronchiolitis mit neutrophilen und mononukleären Infiltraten sowie die Zerstörung des bronchiolären Epithels mit Ausbildung eines hämorrhagischen Lungenödems charakterisiert, was zur Entwicklung eines akuten Lungenschadens (ARDS) führen kann [23]. Diese schwere Gasaustauschstörung kann bis hin zum Multiorganversagen führen [30, 31]. Für diese schweren Verläufe sind zum einen Eigenschaften des Influenzavirus, wie starke Affinität des viralen Hämagglutinins zu Oberflächenmolekülen des Alveo-

larepithels, rasche Virusvermehrung, eine Suppression inflammatorischer Signalwege durch das virale Protein NS1 oder auch die proapoptotische Wirkung des PB1-F2, aber auch Wirtsfaktoren wie das Alter des Patienten verantwortlich [23, 25, 32-37]. Für die Behandlung stehen antivirale Substanzen (Oseltamivir, Zanamivir) zur Verfügung, deren Wirksamkeit aber begrenzt ist und für die ein hohes Potential der Resistenzentwicklung besteht [38, 39].

1.2 Mikroanatomie der Lunge

Die oberen Atemwege der Lunge sind durch zilienbesetzte und sekretorische Zellen ausgekleidet, wodurch eine mukoziliäre Reinigung als erste Wirtsabwehr gegen Fremdpartikel gewährleistet wird. Kuboidale Epithel- und sekretorische Clara-Zellen bilden die Bronchien und Bronchiolen. Im distalen Kompartiment der Lunge, dem Alveolarraum, finden sich Typ II Alveolarepithelzellen und Typ I Alveolarepithelzellen. Die flachen Typ I Alveolarepithelzellen sind als ausdifferenzierte Zellen für den Gasaustausch verantwortlich. Sie bilden gemeinsam mit den Endothelzellen und einer gemeinsamen Basalmembran die alveoläre Blut-Luft-Schranke. Typ II Alveolarepithelzellen haben sowohl regenerative als auch metabolische Funktionen [40]. Sie sind zum einen in der Lage sich selbst zu erneuern und zum anderen Typ I Alveolarepithelzellen zu ersetzen, wodurch sie neben den pluripotenten bronchoalveolären Stammzellen (BASC) als Progenitorzellen des Lungenepithels fungieren [41]. Die metabolische Hauptaufgabe ist die Produktion von Surfactant, welcher aus amphiphilen Phospholipiden und spezifischen Proteinen besteht [40, 42] und für eine Reduktion der Oberflächenspannung in den Alveolen verantwortlich ist, wodurch eine physikalische Expansion und gleichmäßige Entfaltung der Alveolen ermöglicht wird. Außerdem regulieren Epithelzellen durch aktiven und passiven Ionen- und Wassertransport den Flüssigkeitsgehalt der Lunge [42, 43]. Zuletzt haben sie gemeinsam mit residenten Alveolarmakrophagen und immigrierenden Immunzellen eine wichtige Funktion bei der Erkennung von Pathogenen und der Initiierung einer Immunreaktion [42, 44].

Da die pulmonale Barriere mit ihrer Oberfläche von ca. 200 m^2 in ständigem Kontakt mit der Umwelt steht, muss durch angeborene und erworbene Immunmechanismen gewährleistet sein, dass Noxen, wie auch bakterielle und virale Erreger, eliminiert werden und der Schaden begrenzt wird [45]. An den Schutzmechanismen sind zahl-

reiche Zellpopulationen beteiligt. Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, residente Alveolarmakrophagen und dendritische Zellen sowie aus der Zirkulation rekrutierte Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten spielen hier eine wichtige Rolle [44, 47]. Aufgrund des ständigen Kontaktes der Lunge mit inhalierten Noxen aus der Umwelt verfügt die Lunge über ein breites Arsenal antimikrobieller Abwehrmechanismen, die für eine effiziente Erregerelimination wichtig sind. Andererseits können Infektionen des Alveolarraumes aber auch aufgrund des engen Kontaktes mit dem Blutkreislauf zu systemischen Entzündungsprozessen und damit zum Multiorganversagen führen.

1.3 Das mononukleäre Phagozytensystem der Lunge

Monozyten und pre-DC sind myeloide mononukleäre Zellen, entstammen einem gemeinsamen Knochenmarksvorläufer (Monozyten/DC-Precursor, MDP) und zirkulieren im peripheren Blut [47-49]. GR1 hochexprimierende murine Blutmonozyten, auch als „inflammatorischen“ Monozyten bezeichnet, sind wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems und migrieren hauptsächlich CCL2/CCR2 (CC-Chemokin Ligand 2/CC-Chemokin Rezeptor 2) -abhängig an den Ort der Inflammation [50-53]. Sie exprimieren wichtige Adhäsionsmoleküle (β 1- und β 2-Integrine, Selektine), die für die Gewbsrekrutierung verantwortlich sind, verschiedene 'Pattern Recognition' Moleküle (PRRs) zur Erkennung von Erregern und Effektormoleküle wie Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [54]. Diese inflammatorischen Monozyten differenzieren in der Lunge über Intermediärstufen (sog. monocyte-derived dendritic cells oder TNF/iNOS-producing dendritic cells) entweder in inflammatorische CD11b⁺ dendritische Zellen [54, 55] oder in Exsudatmakrophagen aus [48]. Exsudatmakrophagen ersetzen im Verlauf der Inflammation schließlich den residenten Alveolarmakrophagenpool [55]. Ein kleiner Teil der zirkulierenden murinen Blutmonozyten ist GR1 niedrigexprimierend [47] und wird wahrscheinlich entsprechend aktueller Daten CCL2/CCR2-unabhängig und stattdessen CX₃C/CX₃CR1-abhängig in periphere Gewebe rekrutiert. Es wird auch spekuliert, dass sie für die CCR2-unabhängige Homöostase der residenten Alveolarmakrophagen verantwortlich sind und eine antiinflammatorische und geweberegenerative Funktion besitzen. Des Weiteren dienen sie im vaskulären Kompartiment der Lunge als Sentinelzellen für vaskuläre Inflammation [48, 56]. Damit haben zirkulierende Monozytenpopulationen neben ihrer Funktion als Progenitoren residenter und inflammatorisch rekrutierter Phagozyten wichtige

Funktionen in der Immunabwehr, der Regulation inflammatorischer Prozesse und in der Geweberegeneration [57]. Neben den peripheren Blutmonozyten zirkulieren auch pre-DC im peripheren Blut, welche konstitutiv den Pool der organ- und lymphknoten-residenten CD103⁺ migratorischen dendritischen Zellen ersetzen [48, 58-60].

Residente und rekrutierte alveoläre Makrophagen sind Zellen mit einem breiten Aufgabenspektrum und breitem Differenzierungspotential, die eine Schlüsselrolle in der Induktion pulmonaler Inflammation sowie in der Erregerelimination spielen, aber auch für die Auflösung der Inflammation verantwortlich sind, indem sie beispielsweise apoptotische Granulozyten phagozytieren [61-63]. Diese funktionellen Unterschiede sind erregerspezifisch und sind kompartmental und zeitlich eng reguliert, wobei die Makrophagen hierbei phänotypisch in „klassisch aktivierte“ pro-inflammatorische M1 Makrophagen oder „alternativ aktivierte“ antiinflammatorische, reparative M2 Makrophagen unterschieden werden [64, 65]. Die Ausbildung des Phänotyps wird durch verschiedene extrazelluläre Signale, wie Zytokine und Erregerbestandteile oder auch der Phagozytose von Pathogenen oder apoptotischen Granulozyten während des Infektionsverlaufes determiniert [57, 66].

Die dendritischen Zellen der Lunge besitzen ebenfalls ein breites Differenzierungspotential, wobei die Differenzierung aber im Vergleich mit Makrophagen stärker von der Vorläuferlinie determiniert wird [48]. Verschiedene myeloide „klassische“ oder „konventionelle“ dendritische Zellpopulationen (cDC) sind in die pulmonale Infektabwehr involviert [67, 68]. Zu nennen wären in Mäusen die CD11b⁺CX₃CR1⁺CD103⁻ dendritische Zellen (CD11b⁺ DC), die im Gewebe persistieren, aber auch bei einer Infektion CCR2-abhängig in die Lunge rekrutiert werden [71-73] und die Tip-DC, die ebenfalls CCR2-abhängig rekrutiert werden. Einige Autoren beschreiben eine wichtige pro-inflammatorische Wirtsabwehrfunktion der Tip-DC, die als unreife Population myeloider dendritischer Zellen nahe mit den Exsudatmakrophagen verwandt sind und deshalb als Intermediärpopulation gesehen werden kann [72, 73]. Außerdem existieren die residenten migratorischen CD103⁺Langerin⁺CD11b⁻ dendritischen Zellen (CD103⁺ DC), die sich sowohl in der Trachea, den Bronchien als auch den Alveolen befinden und aufgenommenes Fremdantigen nach Migration in die mediastinalen Lymphknoten naiven T-Zellen präsentieren [60]. *In vitro* und *in vivo* wurde die Rolle der CD103⁺ DC in der antiviralen Wirtsabwehr mehrfach belegt [52, 74-76], wohingegen ihre Bedeutung in der Immunantwort gegen bakterielle Infektionserreger weniger gut untersucht ist.

1.4 Pulmonale Immunantwort nach Influenza Virus Infektion

Das Atemwegs- und Alveolarepithel bildet die Grenzfläche der Atemwege und ist gemeinsam mit den residenten Immunzellen des mononukleären Phagozytensystems, speziell den residenten Alveolarmakrophagen, die erste Verteidigungslinie der angeborenen Immunität [16, 42, 44]. Diese Zellen können pathogen- spezifische molekulare Muster von eindringenden Mikroorganismen erkennen, die als „Pathogen-Associated Molecular Patterns“ (PAMPs) bezeichnet werden [77]. Neben den PAMPs, können aber „Danger Associated Molecular Patterns“ (DAMPs) erkannt werden, die durch inflammatorischen Gewebeschaden entstanden sind. Dazu exprimieren die Zellen hochkonservierte Rezeptoren, die als „Pattern Recognition Receptors“ (PRR) bezeichnet werden. Nach Bindung der PAMPs und DAMPs an diese Rezeptoren werden Signalwege aktiviert, die zunächst die angeborene und später im Verlauf der Infektion die erworbene Immunreaktion des Wirtes einleiten. An der Zelloberfläche oder endosomal werden 11 „Toll-like“-Rezeptoren (TLR) [78-82], die zytosolischen „Nucleotide Oligomerization Domain“ (NOD)-like Rezeptoren (NLR) [83, 84], die „RNA Helicases Retinoic Acid Inducible Gene-I“ (RIG-I)-like Rezeptoren (RLR) [17, 18, 85], die Proteinkinase R (PKR) [86-88] und zytosolische DNA Sensoren [89-91] exprimiert. Influenzaviren werden durch PKR und RIG-I/MDA-5 oder auch durch die endosomalen TLRs 3 und 7 erkannt, wohingegen Gram-positive Bakterien Erreger wie z.B. *Streptococcus pneumoniae* durch TLR2 und NLR erkannt werden. Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien wie z.B. *Klebsiella pneumoniae* dagegen wird durch das Sensorprotein TLR4 erkannt [16].

Die Bindung von PAMPs/DAMPs an PRRs aktiviert inflammatorische intrazelluläre Signalkaskaden, die am Ende zu einer Aktivierung von inflammatorischen Transkriptionsfaktoren führen. Zentrale proinflammatorische Transkriptionsfaktoren sind der nukleäre Faktor- κ B (NF- κ B) [92-95], der durch seine intrazelluläre Lokalisation und durch posttranslationale Modifikationen reguliert wird [96]. Weiterhin die „Interferon Regulatory Factors“ 3 und 7 (IRF3/7) [18, 95], deren Aktivierung für die Transkription von frühen inflammatorischen Mediatoren wie z.B. Typ I Interferonen (Typ I IFN), Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) oder Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) nötig ist [17, 97-101]. Durch die Freisetzung dieser frühen inflammatorischen Proteine werden weitere Zellen stimuliert, wodurch sich eine effiziente Immunantwort ausbildet [97]. Durch die Sekretion von Chemokinen, wie das Neutrophilen-Chemokin Interleukin-8 (IL-8) [102] oder das Monozyten-

Chemokin CC-Chemokin Ligand 2 (CCL2, MCP-1) [50, 51, 103] werden die korrespondierenden Zellen an den Ort der Infektion rekrutiert, was für die Eindämmung der Erregerinvasion und –replikation wichtig ist [52]. Die antigenspezifische Immunantwort wird durch die pulmonalen dendritischen Zellen initiiert, da sie nach Migration in die mediastinalen Lymphknoten mikrobielle Antigene prozessieren und naiven $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten präsentieren [74]. Diese durch die sezernierten inflammatorischen Chemokine und Zytokine definierte Immunantwort ist somit essentiell für die Erregerelimination. Allerdings wurde sie auch im Falle einer überschießenden Immunreaktion, wie sie für Infektionen mit dem hochpathogenen aviären H5N1 Influenzavirus beschrieben wurde, mit der Schädigung des Alveolarkompartimentes in Verbindung gebracht. Dieses Phänomen wurde in diesem Kontext als Zytokinsturm bezeichnet, da im Vergleich mit anderen Erregern hohe Mengen an Chemokinen und Zytokinen freigesetzt wurden [104].

1.5 Pathogen-induziertes akutes Lungenversagen (ARDS)

Das akute Lungenversagen (Acute Lung Injury, ALI) und seine extremste Form, das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), sind durch den akuten Beginn einer refraktären Hypoxämie, verbunden mit bilateralen nicht durch Linksherzversagen bedingten radiologischen Infiltraten charakterisiert. Der Quotient aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck und inspiratorischer Sauerstofffraktion (PaO_2/FiO_2 , Horowitz-Quotient) liegt bei ALI < 300 und bei ARDS < 200 [105]. Die Inzidenz liegt zwischen 30 und 74 je 100.000 Einwohner mit einer Mortalität zwischen 40-60% [105, 106]. Als häufigste Ursachen von ALI und ARDS gelten Pneumonie und pneumogene Sepsis. Allerdings kann ALI/ ARDS auch durch Lungenkontusion, Polytrauma, Massentransfusion, Fettembolie, Reperfusion, Inhalationstrauma und Magensaftaspiration verursacht werden [107]. Das ARDS verläuft meist progressiv in mehreren Stadien, die klinisch, histopathologisch und radiologisch unterschieden werden können. Zuerst, in der akuten Phase (ca. Tag 1-6), findet sich ein diffuser Alveolarschaden mit Schädigung von Endo- und Epithel und proteinreichem alveolären Lungenödem, passivem Einstrom von Erythrozyten und der Einwanderung von Neutrophilen. Fibrinreiche, hyaline Membranen bilden sich aufgrund von intraalveolärer Gerinnung aus. Dabei werden das Alveolarepithel und das Endothel durch Apoptose, also durch programmierten Zelltod, geschädigt. Apoptose wird dabei durch eine Vielzahl an Mechanis-

men induziert [105, 107-109], wobei hier ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren eine wichtige Rolle spielt. Diese werden lokal von Leukozyten, Epithelzellen oder Fibroblasten gebildet [61]. In der exsudativen Phase kommt es dann zur Deaktivierung von Surfactant und einem gehäuftem Auftreten bakterieller Translokation in die Zirkulation [110, 111]. Nach 7-14 Tagen folgt die subakute Phase, die durch proliferative Typ II Alveolarepithelzellen und damit beginnender Gewebereparatur sowie Ödem Resorption charakterisiert ist. Nach etwa 14 Tagen, in der chronischen Phase, löst sich schließlich das neutrophile Infiltrat auf, wobei in dieser Phase mononukleäre Zellen und Alveolarmakrophagen dominieren. Während es bei manchen Patienten zu einer vollständigen Ausheilung kommt, entwickeln andere aufgrund unkontrollierter Reparatur eine fibrosierende Alveolitis.

ARDS Patienten werden durch Volumenrestriktion oder durch Sauerstoffgabe und Beatmungstherapie behandelt. Jedoch birgt diese Behandlung auch Risiken, da sowohl die Hyperoxie ($\text{FiO}_2 > 0,6$) als auch die Überdruckbeatmung einen zusätzlichen Lungenschaden, der als „Ventilator-Induced Lung Injury“ (VILI) bezeichnet wird, verursachen kann. Aufgrund dieser Problematik wurde bereits eine Vielzahl an Therapien geprüft. Jedoch zeigte weder die Applikation von Glukokortikoiden, intraalveolärem Surfactant, inhalativem NO, aktiviertem Protein C, Antioxidantien und anti-inflammatorischen Substanzen einen positiven Effekt [112], weshalb eine spezifische Therapie des ARDS nicht vorhanden ist. Deshalb ist die Entwicklung neuer Therapieansätze neben der Behandlung mit antibiotischen/antiviralen Therapeutika auch unter dem Aspekt, dass die Erreger der Pneumonie häufig Resistenzen entwickeln, dringend erforderlich.

1.6 Mechanismen epithelialer Schädigung nach Influenzavirus Infektion

Ein Mechanismus der Schädigung des Lungenparenchyms stellt die Replikation des Virus selbst in der Wirtszelle dar. Das Influenza Virus kann neben den Epithelzellen des oberen als auch unteren Respirationstraktes zwar auch Alveolarmakrophagen infizieren [65, 114], eine effiziente Replikation des Virus jedoch findet aber hauptsächlich in Epithelzellen statt [114]. Dabei nutzt das Virus die Proteinsynthesemaschinerie der Wirtszelle, um ausschließlich virale Proteine zu synthetisieren (zytopathischer Effekt). Die Epithelzelle wird hierbei unwiederbringlich geschädigt, da Vorläufer-mRNAs der Wirtszelle zerstört und zelluläre mRNAs nicht mehr translatiert

werden [115]. Neben diesem zytolytischen Mechanismus werden auch apoptotische Signalwege in der infizierten Zelle induziert [116, 117]. Infizierte Zellen selbst zeigen die für den programmierten Zelltod charakteristische DNA Fragmentierung, Chromatin Kondensation, Veränderungen in der Zellmorphologie, Caspasenaktivierung und Bildung von Apoptosekörperchen [118]. In infizierten Zellen kann Apoptose durch die viralen Proteine NS1 [119], NA [120] und PB1-F2 [121] induziert werden. Prinzipiell stellt die virusinduzierte Apoptose einen Abwehrmechanismus der Zelle dar, um die Bildung neuer Viruspartikel einzudämmen. Allerdings wurde gezeigt, dass die Replikation des Virus bereits abgeschlossen ist, bis die Zelle den Apoptoseprozess vollständig durchlaufen hat [122]. Das virale Protein NS1 moduliert dazu zelluläre antiapoptotische Signalwege um initial eine effiziente Virusreplikation zu gewährleisten [123]. Zusätzlich zu der direkt durch das Virus verursachten Apoptose können auch die im Rahmen der Immunabwehr freigesetzten inflammatorischen Mediatoren wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder Zytokine die Apoptose sowohl infizierter, aber auch nicht-infizierter Epithelzellen verursachen [124].

1.7 Das Interferonsystem

1.7.1 Interferone

Interferone sind Zytokine mit antiviraler Aktivität, die lediglich in Vertebraten zu finden sind [125, 126]. Ihre antivirale Eigenschaft liegt in der Fähigkeit, nach Bindung an ihren Rezeptor die Transkription von direkt antiviral wirkenden Proteinen zu induzieren [126]. Interferone werden in Typ I, Typ II und Typ III Interferone unterteilt. Zu den Typ I Interferonen gehören IFN- α , IFN- β und die wenig untersuchten IFN- ω , IFN- κ und IFN- τ [127, 128]. Zu den Typ II Interferonen gehört IFN- γ [129-131] und zu den Typ III Interferonen werden IFN- λ 1-3 [132-134] gezählt. Typ I und III Interferone werden hauptsächlich von virusinfizierten Zellen sezerniert und vermitteln die erste Abwehrreaktion gegen Pathogene [135].

1.7.2 Regulation der Typ I Interferone

Pathogene Organismen werden über PRR durch das angeborene Immunsystem erkannt [136]. Diese aktivieren nach viraler Infektion über den klassischen Signalweg die Transkription von Typ I Interferonen. Insbesondere für plasmazytoide dendriti-

schen Zellen (pDC) wurde bisher eine Aktivierung über den Toll like Rezeptor (TLR) abhängigen Signalweg beschrieben [137]. Beim klassischen Signalweg dienen als PRR RIG-I, MDA-5 und Protein Kinase R (PKR) [138], die insbesondere virale RNA erkennen können. Nach Bindung an die RNA interagiert das Adaptorprotein Interferon-beta Promotor Stimulator-1 (IPS-1) [139] mit RIG-I oder MDA-5, wodurch weitere Kinasen aktiviert werden, die den Interferon regulatorischen Faktor-3 (IRF-3) phosphorylieren und damit aktivieren [140]. Dieser wandert als Dimer in den Zellkern und initiiert zusammen mit verschiedenen Transkriptionskoaktivatoren die IFN- β mRNA Synthese [141]. Nach dieser ersten Stimulation kommt es zur Expression des Transkriptionsfaktors Interferon-regulatorischer Faktor-7 (IRF-7), der in den meisten Zellen außer pDCs nur in sehr geringen Mengen konstitutiv exprimiert wird [142]. Es wurde gezeigt, dass nach Expression IRF-7 vergleichbar mit IRF-3 aktiviert wird und als Hauptregulator nun für die mRNA Synthese von IFN- β , aber auch von IFN- α Transkripten verantwortlich ist [143]. Desweiteren exprimieren einige Zellen des hämatopoetischen Systems wie cDCs Toll like Rezeptor 3 (TLR3) und erkennen virale RNA in endosomalen Kompartimenten. Die Bindung zwischen TLR3 und RNA führt dann ebenfalls über Adapterproteine zur Phosphorylierung von IRF-3 und damit zur Sekretion von IFN- β . Auch PKR agiert als Sensor, der dsRNA erkennen kann [138]. PKR, das hauptsächlich im Zytoplasma assoziiert mit Ribosomen vorliegt [126, 144], wird nach Bindung an RNA [144-146] durch Autophosphorylierung aktiviert [147], wobei zusätzlich bereits eine TLR abhängige Phosphorylierung nach LPS Stimulation beschrieben wurde [148]. PKR aktiviert nach Kontakt mit RNA den Transkriptionsfaktor Nuklear Faktor- κ B (NF- κ B), der ebenfalls an die Promotorregion von IFN- β bindet und zusammen mit aktiviertem IRF-3 und IRF-7, auch als „IFN- β Enhancosom“ bezeichnet, zu einer effizienten Transkription von IFN- β führt. NF- κ B liegt als Dimer im Zytoplasma vor, assoziiert mit dem Inhibitor I κ B (Inhibitor of κ B) vor. Durch Stimulation des Signalweges durch PKR wird die Kinase IKK (I κ B Kinase) aktiviert [138, 149]. In aktiver Form phosphoryliert sie den NF- κ B Inhibitor I κ B, der danach ubiquitiniert und proteasomal abgebaut wird [138, 150]. Nach Abbau des Inhibitors wird die Kernlokalisierungssequenz von NF- κ B frei und NF- κ B wird in den Zellkern transportiert.

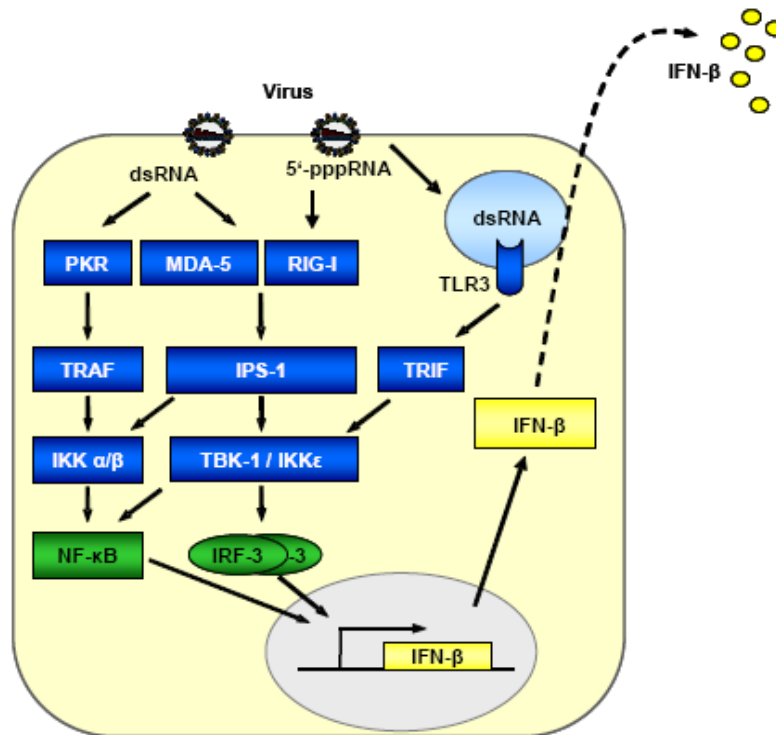


ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER IFN-β INDUKTION.

Doppelsträngige RNA (dsRNA) oder 5'triphosphorylierte RNA mit Doppelstrangcharakter (5'pppRNA) wird durch PKR, MDA-5, RIG-I oder endosomal durch TLR3 erkannt und aktiviert die Transkriptionsfaktoren NF-κB, IRF-3 und IRF-7 (nicht gezeigt), was zur Transkription von IFN-β führt. Abbildung modifiziert nach [151].

1.7.3 Typ I Interferon induzierte Signalwege

Sezernierte Typ I Interferone binden an den Typ I IFN-Rezeptor (IFNAR), der ubiquitär exprimiert ist. Dadurch verändert sich die Konformation des Rezeptors und es werden die Tyrosinkinase 2 (Tyk2) sowie der „Signal Transducer and Activator of Transcription 2“ (STAT2) rekrutiert. Dadurch wird der „Signal Transducer and Activator of Transcription 1“ (STAT1) phosphoryliert und bildet mit STAT2 ein Heterodimer [152-154], welches nach Bindung an IRF-9 [154] in den Zellkern wandert und an das „IFN-Stimulated Response Element“ (ISRE) von Promotoren anbindet. Mehrere 100 Gene, die als „Interferon Stimulated Genes“ (ISGs) bezeichnet werden, besitzen dieses Element und werden dadurch IFN-β abhängig transkribiert [155, 156]. Zu den bekanntesten direkt antiviral wirkenden Proteinen gehören Mx (Myxovirus Resistenz)-Protein, PKR und die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase. Mx interagiert bei Influenza A Infektion wahrscheinlich gemeinsam mit weiteren zellulären Faktoren [157, 158] mit der viralen Polymerase und dem Nukleoprotein, um die Transkription von

viraler RNA zu inhibieren [159]. Die 2'-5' Oligoadenylatsynthetase aktiviert die zelluläre Endoribonuklease RNaseL, welche dann die Spaltung von viralen, aber auch zellulären RNAs vermittelt, wodurch die Proteinsynthese gestoppt wird [160]. PKR phosphoryliert den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2 α (eIF-2 α) [144], wodurch die Virusmehrung durch Abschalten der Proteinsynthese eingeschränkt wird [161]. Neben den antiviralen Proteinen werden auch proapoptotische sowie inflammatorische Signalwege induziert.

1.8 TRAIL vermittelte Apoptose

Eine Rolle von IFN- β in der Transkription des pro-apoptotischen Zytokins „Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand“ (TRAIL/Apo2L) [162] wurde hauptsächlich in der Tumorbilogie beschrieben. Diese Daten zeigen, dass der anti-Tumor Effekt von IFN- β auf die Expression von TRAIL in Zellen des mononukleären Phagozytensystems zurückzuführen ist. Nach Bindung von TRAIL an seinen Rezeptor induziert es Apoptose in Tumorzellen über den extrinsischen Weg [163-165]. Im Kontext von Infektionen mit dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV) konnte ebenfalls ein Einfluss von IFN- β auf die TRAIL Expression in Makrophagen gezeigt werden [166]. TRAIL konnte darüber hinaus als wichtiger pathogenetischer Faktor im Influenzavirus-induzierten Lungenversagen bei Mäusen identifiziert werden [167]. Allerdings ist der Mechanismus der Regulation von TRAIL in diesem Zusammenhang nicht geklärt.

TRAIL (Apo2L) gehört neben Fas Ligand (FasL) und TNF- α zu der Tumor Nekrose-Faktor (TNF) Liganden Familie, die auch als „Death Ligands“ bezeichnet werden [168]. TRAIL konnte 1995 basierend auf seiner Sequenzhomologie zu FasL und TNF identifiziert und kloniert werden [168, 169]. Wie andere Mitglieder der TNF-Liganden Familie wird TRAIL primär als Typ-II Membranprotein von 33-35kDa exprimiert. Es setzt sich zusammen aus einer extrazellulären TNF-ähnlichen Domäne, einer transmembranösen Helix sowie einer kleinen zytoplasmatischen Domäne. Die extrazelluläre Domäne kann von der Zelloberfläche proteolytisch abgespalten werden [168]. Zusätzlich existiert eine Splicevariante, die sezerniert wird [170]. Für TRAIL wurde nachgewiesen, dass es in löslicher Form über den TRAIL-R2 nur mit limitierter Effizienz Apoptose auslöst, während es über TRAIL-R1 effektiv apoptotische Signale induziert. Membranständiges TRAIL dagegen vermag beide Rezeptoren mit vergleich-

barer Effizienz zu stimulieren [171, 172]. TRAIL, wie auch andere Mitglieder der TNF-Liganden Familie, besitzt eine typische β -Sandwich Struktur und bildet Homotrimere [173]. So können drei Rezeptormoleküle jeweils an der Grenzfläche zwischen zwei Untereinheiten des Homotrimers gebunden werden [174]. Eine Besonderheit von TRAIL ist das Vorhandensein eines Zinkions. Bisher ist TRAIL das einzige Mitglied der TNF- Liganden Familie, das ein Metallion enthält. Es ist essentiell für die trimere Stabilität und die Bioaktivität von TRAIL, denn Punktmutationen an der Bindestelle für Metallionen führen zur Ausbildung von Monomeren und Dimeren ohne biologische Aktivität [175]. Das humane und murine TRAIL weisen eine Sequenzhomologie von 65% auf [176].

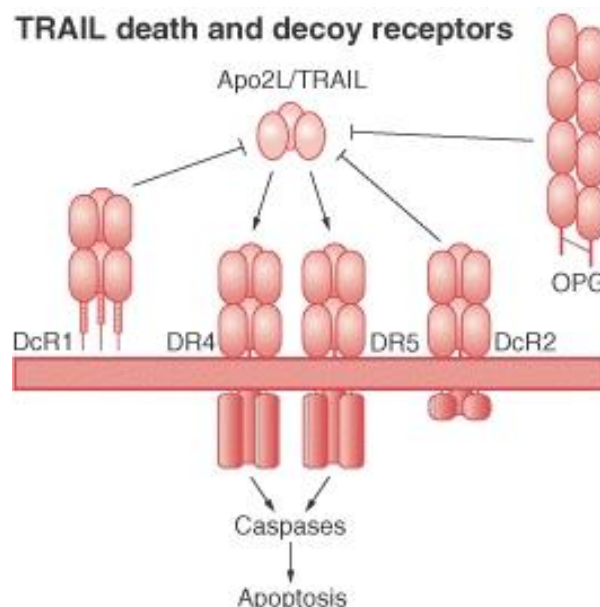


ABBILDUNG 3: TRAIL (APO2L) UND SEINE REZEPTOREN.

Das trimerisierte TRAIL kann an fünf Rezeptoren anbinden. TRAIL Rezeptor 1 (DR4) und TRAIL Rezeptor 2 (DR5) besitzen eine intrazelluläre Todesdomäne und können über die Aktivierung von Caspasen Apoptose in der Zelle induzieren. Die Decoy Rezeptoren TRAIL Rezeptor 3 (DcR1) und TRAIL Rezeptor 4 (DcR2) liegen membrangebunden aber ohne intrazelluläre Todesdomäne vor. Der fünfte Rezeptor ist das gelöste Osteoprotegrin (OPG). Abbildung nach [177].

Humanes TRAIL bindet an fünf unterschiedliche Rezeptoren der TNF-Rezeptor Superfamilie, wobei zwei proapoptotische sogenannte „Death Receptors“ (DR) und drei antiapoptotische Rezeptoren existieren. Die Rezeptoren TRAIL Rezeptor 1 (DR4) [178] und TRAIL Rezeptor 2 (DR5) [179-181] sind membranständig. Sie besitzen die für diese Rezeptoren typische zytoplasmatische „Death Domain“ (DD) und können nach Stimulation mit TRAIL apoptotische Signale weiterleiten. Wie alle Rezeptoren

der TNF-Rezeptor Superfamilie sind auch diese beiden Rezeptoren Typ-I Membranproteine, die eine extrazelluläre zysteinreiche Domäne (CRD) aufweisen. In der Maus dagegen existiert lediglich ein apoptoseinduzierender Rezeptor (DR5), der TRAIL aber mit einer dem humanen System vergleichbaren Affinität gegenüber DR4 und DR5 binden kann [182]. Die Rezeptoren TRAIL Rezeptor 3 (DcR1) [141, 144] und TRAIL Rezeptor 4 (DcR2) [184, 185] weisen in ihrer extrazellulären CRD eine signifikante Homologie zu TRAIL-Rezeptor 1 und 2 auf. Allerdings besitzt TRAIL-Rezeptor 4 nur eine verkürzte, funktionell inaktive Todesdomäne und dem TRAIL-Rezeptor 3 fehlt der zytoplasmatische Rezeptorteil völlig. TRAIL-Rezeptor 3 ist stattdessen über einen Glykophosphatidylinositol-Rest (GPI) in der Zellmembran verankert. Beide Rezeptoren sind damit zwar befähigt TRAIL zu binden, nicht aber apoptotische Signale in das Zellinnere weiterzuleiten. Wahrscheinlich wirken die Rezeptoren gegenüber DR4 und DR5 antagonistisch und nehmen damit die Funktion von sogenannten Decoy Rezeptoren ein. So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von TRAIL-Rezeptor 3 und 4 eine Resistenz der Zellen gegenüber TRAIL vermittelter Apoptose zur Folge hat, wohingegen die Entfernung dieser Rezeptoren von der Zelloberfläche zu einer Sensitivierung gegenüber TRAIL vermittelter Apoptose führt [180, 186]. Allerdings sind die Mechanismen, die den antiapoptotischen Effekten von TRAIL-Rezeptor 3 und 4 zugrunde liegen, derzeit noch nicht genau geklärt, da die Sensitivität der TRAIL vermittelten Apoptose nicht generell mit der Expression der Decoy Rezeptoren korreliert [187]. Der fünfte Rezeptor, an den TRAIL bindet, ist der lösliche Rezeptor Osteoprotegrin (OPG). Allerdings ist die Affinität von TRAIL zu diesem Rezeptor im Vergleich mit den übrigen gering. Über die physiologische Bedeutung dieser Interaktion ist bisher nur bekannt, dass über OPG die TRAIL-vermittelte Apoptose in Osteoblasten inhibiert wird [188].

Nach Bindung des Liganden an DR4 oder DR5 erfolgt eine Oligomerisierung trimerer Rezeptoreinheiten zu größeren Komplexen, wodurch das zytoplasmatische Adapterprotein TRADD über seine C-terminale Todesdomäne an die des Rezeptors bindet und oligomerisiert, was zur Rekrutierung der Initiatorcaspasen 8 und 10 führt, die an die N-terminale Effektordomäne von TRADD anbinden können [189-191]. Dieser Komplex wird als „Death Inducing Signalling Complex“ (DISC) bezeichnet. Nach Dimerisierung der Caspasen werden sie durch transkatalytische und autokatalytische Spaltung aktiviert [192], schließlich als aktivierte Initiatorcaspasen vom DISC freigesetzt und können proteolytisch konstitutiv als Proform exprimierte Effektorcaspasen

aktivieren [192-194]. In manchen Zelltypen kann die aktivierte Caspase-8 direkt die Effektorcaspase Caspase-3 aktivieren, in anderen Zelltypen dagegen muss das Signal über den intrinsischen Weg, also über das Mitochondrium amplifiziert werden [195, 196]. Dabei wird durch die aktivierte Caspase-8 das Protein Bax in der Mitochondrienmembran oligomerisiert [194], wodurch sich Poren bilden, durch die proapoptotische Mediatoren in das Zytoplasma gelangen können [196-198], was letzten Endes zur Aktivierung von Caspase-3 und Migration in den Nukleus beiträgt. Effektorcaspasen spalten bzw. aktivieren zelluläre Substratmoleküle. Als Substrate wurden Strukturproteine, Zelladhäsionsmoleküle, Interfilamentproteine, apoptotische Inhibitoren und Enzyme der DNA Reparatur beschrieben. Die Zahl der bekannten Substratmoleküle beläuft sich derzeit auf über 200 und steigt stetig an [199]. Für Caspase-3 wurden beispielsweise die nukleären Substrate PARP oder ICAD gefunden, die aktiv eine Rolle bei der DNA-Fragmentation sowie Chromatin Kondensation spielen [200].

2 Zielsetzung

Das akute Lungenversagen („Acute lung injury“, ALI) und seine extreme Manifestation, das „Acute Respiratory Distress Syndrome“ (ARDS) sind durch akuten Beginn einer refraktären Hypoxämie, verbunden mit bilateralen nicht kardiogen bedingten radiologischen Infiltraten charakterisiert. Die häufigsten Auslöser der ALI und des ARDS sind Pneumonie und pneumogene Sepsis. Da durch antibiotische/antivirale Therapeutika häufig eine Resistenzausbildung der Erreger verursacht wird, besteht ein Bedarf an der Entwicklung neuer Therapiestrategien. Auslöser der epithelialen Schädigung nach Influenza Infektion sind sowohl die Replikation des Virus selbst als auch die im Rahmen der Immunabwehr freigesetzten inflammatorischen Mediatoren wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder Zytokine, welche die Apoptose sowohl infizierter, aber auch nicht-infizierter Epithelzellen verursachen können. Als erste Abwehr gegen Pathogene werden Typ I Interferone gebildet. Sie limitieren die Virusreplikation, indem sie Zellen in einen antiviralen Zustand versetzen und vermitteln die Expression weiterer proinflammatorischer Zytokine. Erste Experimente zeigten, dass die durch Influenzaviren induzierte Expression des Typ I Interferons IFN- β mit einer deutlichen Induktion alveolarepithelialer Apoptose und alveolärer Schrankenstörung assoziiert war. Ziel der Studie war es deshalb, die detaillierten Signalwege und zellulären Interaktionspartner, welche dem Influenzavirus induzierten Lungenschaden zugrunde liegen, näher zu beleuchten, um letztendlich therapeutische Angriffspunkte zur Behandlung des virusassoziierten ALI/ARDS zu definieren.

Hierfür wurden *in vitro* Mono- und Kokulturerinfektionsmodelle primärer muriner und humaner Alveolarmakrophagen sowie Alveolarepithelzellen genutzt. Primäre murine Lungenzellpopulationen wurden aus Wildtyp oder gendefizienten Mäusen isoliert. Um die Rolle von durch Alveolarmakrophagen exprimierten Mediatoren in der Induktion epithelialer Apoptose spezifisch zu adressieren, wurden neben *in vivo* Infektionsversuchen mit Wildtyp und transgenen Mäusen auch knochenmarkschimäre Mäuse generiert und für *in vivo* Infektionsversuche verwendet, denen wichtige Apoptosemediatoren in myeloiden Zellen fehlen

3 Material und Methoden

3.1 Verwendung von humanem Material

Lavage Material und humanes Lobektomiematerial wurden im Rahmen der Biobank des Lungenzentrums der Universitäten Gießen und Marburg (UGMLC) nach schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten gesammelt. Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission lag vor (Az. 10/06).

3.2 Mauslinien

Linie	Bezeichnung	Quelle
C57BL/6	wildtyp, WT	Fa Charles River, Sulzfeld
B6.SJL-Ptprc ^a	Ly5.1	Fa Jackson, Sacramento
129/SvEv* <i>C57BL/6</i> <i>Eif2ak2</i> ^{tm1cwe}	<i>pkr</i> ^{-/-}	PD Dr. Jovan Pavlovic, Zürich
B6.129S2- <i>Ifnar1</i> ^{tmAgt}	<i>ifnar</i> ^{-/-}	Prof. Dr. Ulrich Kalinke, Hannover
B6.129Tnfsf10 ^{tmSdg}	<i>trail</i> ^{-/-}	Fa Amgen, München

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere unter SPF Bedingungen gehalten. Während der Versuche wurden IVC Bedingungen eingehalten. Für die Versuche wurden Tiere mit einem Versuchsalter von 8-12 Wochen verwendet, wobei sich die Versuchsgruppen in Alter und Geschlecht entsprachen. Die Tierversuche waren durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Az. 64/2007, 09/2009, 39/2011).

3.3 Virusstämme

Stamm	Bezeichnung	Beschreibung	Quelle
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	A/PR8	saisonal, maus-adaptiert	Prof. Dr. Stephan Pleschka, Gießen
A/Thailand/KAN-1/04 (H5N1)	A/H5N1	hochpathogen, aviär	Prof. Dr. Stephan Pleschka, Gießen
A/Hamburg/5/09 (pH1N1)	A/Hamburg	pandemisch	Dr. Mikhail Matrosovich, Marburg
A/Memphis/14/96-M (H1N1)	A/Memphis	saisonal	Dr. Mikhail Matrosovich, Marburg
A/X-31 (H3N2)	A/X-31	PR8 Hintergrund, H3N2 von saisonal kloniert	Prof. Dr. Stephan Pleschka, Gießen

3.4 Zellkulturmedien und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
AMΦ Infektionsmedium	RPMI 1640 (PAA), 0,2%BSA (Sigma), 1fach Penicillin/Streptomycin (PAA), 2µg/ml Trypsin-TBCK (Worthington)
AMΦ Medium	RPMI 1640 (PAA), 2%FCS (FCS Gold, PAA), 1fach Penicillin/Streptomycin (PAA)
Avicel Medium	2xMEM (Gibco), 1fach Penicillin/Streptomycin (PAA), 0,1% NaHCO ₃ (Sigma), 0,2% BSA (Sigma), 2µg/ml Trypsin-TPCK (Worthington), 1,25% Avicel (RC581, FMC Biopolymers)
DMEM/HEPES	DMEM high Glucose (PAA), 25mM HEPES (PAA)
Elektrophorese Puffer	25mM Tris (Roth), 250mM Glycin (Sigma), 0,1% (v/v) SDS (Sigma) in 1000ml H ₂ O
hAEC Infektionsmedium	HamsF12 (Biochrom), 0,2% BSA (Sigma), 1fach Penicillin/Streptomycin (PAA), 2,5µg/ml Amphotericin B (PAA), 2µg/ml Trypsin-TPCK (Worthington)
hAEC Medium	HamsF12 (Biochrom), 10%FCS (FCS Gold, PAA), 1fach Penicillin/Streptomycin, 2,5µg/ml Amphotericin B (PAA)
MACS/FACS Puffer	PBS ^{Mg-/Ca-} , 7,4% EDTA (Biochrom), 0,5% FCS (FCS Gold, PAA) pH 7,2

Bezeichnung	Zusammensetzung
mAEC Infektionsmedium	DMEM High Glucose (PAA), 25mM HEPES (Biochrom), 0,2% BSA (Sigma), 1fach Penicillin/Streptomycin (PAA), 2µg/ml Trypsin-TPCK (Worthington)
mAEC Medium	DMEM high Glucose (PAA), 25mM HEPES (PAA), 10%FCS (FCS Gold, PAA)/ 1-fach Penicillin/Streptomycin (PAA)
MDCK-II Infektionsmedium	DMEM High Glucose (PAA), 0,2% BSA (Sigma), 1fach Penicillin/Streptomycin (PAA), 2µg/ml Trypsin-TPCK (Worthington)
MDCK-II Medium	DMEM high Glucose (PAA), 10%FCS (FCS Gold, PAA)/ 1-fach Penicillin/Streptomycin (PAA)
NP-40 Lysepuffer	20mM Tris (pH7,5) (Sigma), 150mM NaCl (Merck), 1mM EDTA (pH 8,0) (Merck), 1mM EGTA (pH8,0) (Sigma), 0,5% NP40 (Sigma), 2mM Sodium Orthovanadat (pH 10,0) (Merck), Proteaseinhibitorcocktail (Roche)
PBS/EDTA	PBS ^{Mg²⁺/Ca²⁺} (PAA), 2mM EDTA (Biochrom)
PII Puffer	0,4g/l KCl (Merck), 1,11g/l Glucose (Sigma), 0,46g/l Na ₂ HPO ₄ (Merck), 1% HEPES (Biochrom), 0,28mM CaCl ₂ (Merck), 1,3mM MgSO ₄ (Sigma)
Transferpuffer	25mM Tris (Roth), 192mM Glycin (Sigma), 20% Methanol (Sigma), auffüllen auf 1000ml mit H ₂ O
Virusmedium	PBS ^{Mg²⁺/Ca²⁺} (PAA), 0,2%BSA (Sigma), 1fach Penicillin/Streptomycin (PAA)

3.5 Gewinnung von primären Zellen

3.5.1 Isolation von primären murinen Alveolarmakrophagen

Um primäre murine Alveolarmakrophagen (mAMΦ) aus Mauslungen zu isolieren wurden die Tiere getötet, die Trachea eröffnet und eine stumpfe Kanüle eingeführt und für die Durchführung einer bronchoalveolären Lavage (BAL) verwendet. Dabei wurde 10-mal mit jeweils 500µl PBS/EDTA lavagiert. Die Zellsuspension wurde zunächst zentrifugiert (1400rpm, 10min, 4°C), in 1ml AMΦ Medium resuspendiert, mit einer Neubauer Zählkammer unter Verwendung von 0,4% Trypanblau (Invitrogen) gezählt und zuletzt in Zellkulturplatten (BD) ausgesät. Für die Detektion von Proteinen oder der Messung von Apoptose wurden 24 „well“ Platten mit einer Zellzahl von

250.000 mAMΦ/well verwendet. Für die Bestimmung der Genexpression wurden 48 „well“ Platten mit einer Zellzahl von 125.000 mAMΦ/well eingesetzt. Nach 2h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5%CO₂) wurde das Medium gewechselt um nicht adhären Zellen zu entfernen, wodurch eine Reinheit von > 98% erreicht werden konnte. Diese wurde durchflusszytometrisch unter Verwendung eines Antikörpers gegen murines Siglec-F bestimmt.

3.5.2 Isolation von primären murinen Typ II Alveolarepithelzellen

Die Tiere wurden mit einer Überdosis Isofluran (Baxter) getötet und eine stumpfe Kanüle in die freipräparierte Trachea eingeführt, welche mit einem Faden (4/0, Ethicon) fixiert wurde. Danach wurde der Brustkorb eröffnet und eine Lungenperfusion mit 20ml HBSS (PAA) durchgeführt. Danach wurden über die fixierte Kanüle 1,5ml Dispase (50 Caseinolytic Units/ml, BD) sowie 0,5ml 1% low melting Agarose (Sigma) mit einer 1ml Spritze (B.Braun) in die Lunge gegeben, um Kontaminationen mit Zellen des oberen Respirationstraktes zu vermeiden. Im Anschluss an das Gelieren der Agarose im oberen Respirationstrakt wurde die Lunge entfernt, in HBSS (PAA) gewaschen und Fremdgewebe entfernt. Nach einer Inkubation der Lunge in 3,5ml Dispase (50 Caseinolytic Units/ml, BD) für 40min bei Raumtemperatur wurde diese in 7ml DMEM/HEPES/0,01% DNase (Serva) in eine Petrischale überführt und der Bronchialbaum entfernt. Die Zellsuspension wurde daraufhin 8-10 Minuten auf einem Schüttler (Heidolph) bei Raumtemperatur inkubiert und durch Scheren mit einer 10ml Pipette (BD) weiter vereinzelt. Nach dem Filtrieren durch einen 100µm (BD), 40µm (BD) und 20µm (Millipore) Filter und einem Zentrifugationsschritt (8min, 4°C, 800rpm) wurde das Zellpellet in 5ml mAEC Medium resuspendiert und mit einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Daraufhin wurde die Zellsuspension auf 10 Mio Zellen/ml eingestellt und mit biotinylierten Antikörpern gegen CD45 (BD Pharmingen), CD31 (BD Pharmingen) und CD 16/32 (BD Pharmingen) 30min bei 37°C zur Depletion von Leukozyten und Endothelzellen inkubiert. Hierbei wurde die Antikörpermenge wie folgt in µl berechnet:

Biotinylated α-mouse CD45	$\frac{\text{Zellzahl}}{1 \text{ Mio}} \times 0,45 \times 2$
Biotinylated α-mouse CD16/32	$\frac{\text{Zellzahl}}{1 \text{ Mio}} \times 0,45 \times 1,5$
Biotinylated α-mouse CD31	$\frac{\text{Zellzahl}}{1 \text{ Mio}} \times 0,2 \times 2$

Im nächsten Schritt wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit mAEC Medium ohne FCS in dem nachfolgend berechneten Volumen mAEC Medium ohne FCS (B) resuspendiert und mit der berechneten Menge an Streptavidin-gekoppelten magnetischen Beads (Dynabeads, Biotin Binder, Invitrogen) (C) 30min bei Raumtemperatur auf einem Rollator (Cat M. Zipper GmbH) inkubiert.

Die Menge der benötigten magnetischen Beads und Volumina wurde wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} A: & \frac{\text{Zellzahl}}{1 \text{ Mio}} \times 0,65 \\ B: & \frac{A}{3} \text{ ml} \\ C: & B \times 50\mu\text{l} \end{aligned}$$

Nachdem die Zellen 15min in einem magnetischen Separator (Magnetic particle concentrator, Dynal) platziert worden waren, wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, zentrifugiert (8min, 4°C, 800rpm) und in 2ml mAEC Medium resuspendiert, gezählt und in 24 „well“ Platten (BD) mit einer Zellzahl von 250.000mAEC/well ausgesät. Des Weiteren wurden für Kokulturrexperimente die mAEC auf der Unterseite von Transwells (8,0µm Porengröße, BD) mit 300.000 in 100µl ausgesät, welche nach 2h in 24 „well“ Platten mit 500µl Medium überführt wurden. Die Reinheit wurde durchflusszytometrisch mit einem Antikörper gegen Prosurfactant Protein C (Rb-X Hu pro-SP-C, Millipore), einem Typ II Alveolarepithelzellmarker, bestimmt, wobei Zellen mit einer Reinheit >90% verwendet wurden. Nach 2 Tagen erfolgte der erste Medienwechsel. Der Versuch wurde 4 bis 5 Tage nach Zellisolation bei ca. 90%iger Konfluenz durchgeführt.

3.5.3 Isolation von primären humanen Alveolarmakrophagen

Verwendet wurden primäre humane Alveolarmakrophagen (hAMΦ) von Patienten, welche aus diagnostischen Gründen bronchoskopiert und lavagiert worden waren und einen unauffälligen differentialzytologischen Befund zeigten (Makrophagenanteil > 95%; „gesunde Kontrollen“). Es wurden 250.000 hAMΦ in 24 „well“ Platten (BD) unter Verwendung des AMΦ Mediums ausgesät, welches nach 2h gewechselt wurde, um nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Humane AMΦ aus bronchoalveolären Lavagen von Patienten mit pandemischem H1N1 Influenzavirus-induziertem ARDS

und von Kontrollen wurden zu je 500.000 Zellen/12 well in AMΦ Medium mit 50% FCS 40min im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Danach wurden die adhären-ten Alveolarmakrophagen viermal mit PBS^{Mg-/Ca-} (PAA) gewaschen, wodurch eine Reinheit >90% erzielt wurde. Die Lavageflüssigkeit selbst wurde für Zytokinmessungen mit ELISA bei -80°C gelagert.

3.5.4 Isolation von primären humanen Typ II Alveolarepithelzellen

Distales gesundes Lungengewebe aus Tumor-Lobektomiepräparaten wurde nach schriftlicher Einwilligung der Patienten für die Aufreinigung der Zellen verwendet. Nach Waschen des Lungengewebes mit hAEC Medium und Zerkleinern mit einer Schere wurde es in 50-100ml PII Puffer/2,5% Dispase (Dispase II, Roche) 180min im Wasserbad (Julabo) bei 37°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen durch Scheren mit einer 10ml Pipette (BD) vereinzelt und über einen 100µm (BD), 40µm (BD) und zuletzt 20µm (Millipore) Filter gegeben. Das Filtrat wurde zentrifugiert (1500rpm, 20°C, 25min), das Zellpellet in 30ml PII/0,25% DNase (Serva) resuspendiert und 20ml Ficoll (Ficoll Paque, Plus, GE Healthcare) mit 15ml der Zellsuspension überschichtet. Nach dem Zentrifugieren (2500rpm, 15min, 20°C, ohne Bremse) konnte die Interphase abgenommen werden, welche auf 50ml mit PII/0,25% DNase (Serva) aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1500rpm, 20°C, 15min) wurde. Nach einem weiteren Waschschrift mit 50ml PII/0,25% DNase (Serva) wurde das Pellet in 2ml hAEC Medium gelöst, die Zellzahl bestimmt und auf 80µl/10Mio Zellen mit MACS Puffer eingestellt. 20µl CD45 MACS Beads (human CD45 Micro Beads, Miltenyi Biotech)/10Mio Zellen wurden hinzu pipettiert, um Leukozyten zu entfernen, und 15min bei 4°C inkubiert. Zwischenzeitlich wurde eine MACS Säule (Miltenyi Biotech) in einem magnetischen Separator (Miltenyi) mit MACS Puffer vorgewässert (MS<10 Mio Zellen 500µl; LS>10 Mio Zellen 3ml) und die Zellsuspension nach einmaligem Waschen in 5ml MACS Puffer mit einem Volumen von 500µl (MS) oder 3ml (LS) auf die Säule gegeben und 3 mal mit 500µl (MS) oder 1ml (LS) nachgespült. Die hAEC, die sich im Durchfluss befanden, wurden aufgefangen, mit hAEC Medium gewaschen und in 24 „well“ Platten (BD) mit einer Zellzahl von 250.000/well ausgesät. Die Reinheit der Zellen wurde durchflusszytometrisch mit einem α-human-EpCAM/CD326 Antikörper (Biolegend) als Epithelzellmarker bestimmt, wobei Zellen mit einer Rein-

heit >90% für die Versuche verwendet wurden. Der erste Medienwechsel erfolgte 48h nach Isolation. An Tag 4-5 nach Isolation (Konfluenz ca. 90%) wurde mit dem Experiment begonnen.

3.6 Herstellung eines Virusstocks

MDCK-II Zellen (Madin Darby Canine Kidney Cells) kultiviert in MDCK-II Medium, wurden 1:4 gesplittet und in T75 Flaschen (BD) ausgesät, über Nacht im Brutschrank bei (37°C; 5%CO₂) inkubiert und am folgenden Tag infiziert. Dazu wurde zunächst eine Virusverdünnung von MOI=0,01 (Multiplicity of Infection = $\frac{\text{Viruspartikel}}{\text{Zellzahl}}$) des originalen Virusstocks in 4ml Virusmedium hergestellt und auf die Zellen nach zweimaligem Waschen in 10ml PBS^{Mg+/Ca+} (PAA) gegeben. Nach 1h Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen mit 8ml MDCK-II Infektionsmedium überschichtet. Nach 48h wurde der Überstand abgenommen, zu 1ml aliquotiert und bei -80°C bis zur Titerbestimmung durch Plaque Assay gelagert.

3.7 Titration des Virusstocks

Einen Tag vor Infektion wurden MDCK-II Zellen mit einem Verhältnis von 1:3 mit 2ml MDCK-II Medium in 6 „well“ Platten ausgesät. Zur Infektion wurde eine 10-fach-Verdünnungsreihe der Virussuspension in Virusmedium angesetzt und je 1ml pro well nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS^{Mg+/Ca+} (PAA) eingesetzt. Nach 1h bei Raumtemperatur wurden 2ml Avicel Medium hinzugegeben. Nach zwei Tagen wurden die Zellen nach Abnehmen des Mediums mit 1ml 4% Paraformaldehyd (Sigma) 30min bei 4°C fixiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS^{Mg+/Ca+} (PAA) eine immunhistologische Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 1ml 0,3% Triton X 100 (Roth) permeabilisiert (15min, Raumtemperatur) und mit 0,5ml eines 1:1000 verdünnten α-Influenza NP Antikörpers (Meridian Life science) in PBS^{Mg+/Ca+} (PAA)/0,1%Tween 80 (Sigma)/10% Pferdeserum (PAA) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 2ml PBS^{Mg+/Ca+} (PAA)/0,05% Tween 80 (Sigma) wurden 0,5ml des 1:2000 verdünnten HRP- (Meerrettich-Peroxidase-) markierten Sekundärantikörpers (goat-α-mouse IgG-HRP, Santa Cruz)

dazugegeben und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS^{Mg⁺/Ca⁺} (PAA) wurde True Blue (KPL) als Substrat hinzugegeben. Nach etwa 20-30min konnten blau gefärbte Plaques ausgezählt und der Titer wie folgt berechnet werden:

$$\text{pfu (Plaque forming units)/ml} = \text{Mittelwert der gezählten Plaques} \times \text{Verdünnung}$$

3.8 *In vitro* Experimente

Die ausgesäten AMΦ wurden 24h nach Adhärenz und die AEC 4-5 Tage nach Isolation verwendet. Die Virusverdünnungen wurden auf eine MOI von 1 oder 0,1 in Virusmedium eingestellt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS^{Mg⁺/Ca⁺} (PAA) wurden die Zellen durch Zugabe der Virusverdünnung 1h bei Raumtemperatur infiziert. Danach wurde das Virusmedium abgenommen und das mit den Zellen korrespondierende Infektionsmedium zugegeben. Bei Kokultorexperimenten mit AMΦ und AEC wurde das AEC Infektionsmedium gewählt. Bei Verwendung von Inhibitoren wurden diese dem Infektionsmedium zugesetzt und optional 1h präinkubiert. Die verwendeten Inhibitoren sind nachstehender Tabelle zu entnehmen:

Inhibitor	Beschreibung	Behandlung	Hersteller
pAB-IFN-β	inhibitorischer IFN-β Antikörper IC ₅₀ =2,5IU/ml	Zugabe in Infektionsmedium	PBL
Jak/Stat Inhibitor I	ATP-kompetitive Inhibition von JAK1/JAK2 IC ₅₀ =1nM, JAK3 K _i =5nM, and Tyk2 IC ₅₀ =1 nM	1h Präinkubation und Zugabe in Infektionsmedium	Calbiochem
Bay 11-7082	Inhibition von IκBα Phosphorylierung IC ₅₀ =10 μM; NF-κB Aktivierung	1h Präinkubation und Zugabe in Infektionsmedium	Calbiochem

Außerdem wurde in einigen Experimenten rekombinantes murines IFN- β (PBL), rekombinantes murines TRAIL (R&D) oder Staurosporin (Sigma-Aldrich) in definierten Konzentrationen sowie ein Proteaseinhibitorcocktail (Sigma) 1:400 verdünnt dem jeweiligen Zellkulturmedium zugegeben. Je nach Fragestellung wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen entweder nach Waschen mit PBS^{Mg⁺/Ca⁺} (PAA) mit dem jeweiligen Lysepuffer lysiert (Western Blot; real time PCR) oder nach Trypsinierung (1-fach Trypsin/EDTA, PAA) für durchflusszytometrische Untersuchungen vorbereitet.

3.9 *In vivo* Experimente

3.9.1 Transplantation von murinen Knochenmarkszellen

Die Spendertiere wurden durch Genickbruch getötet und in 70% Ethanol (Fischer) gebadet und Femur, Tibia und Beckenknochen entfernt. Nach 30s Desinfektion in 70% Ethanol (Fischer) und einem Waschschrift in sterilem NaCl (0,9% NaCl, B. Braun) wurden die Knochen auf eine in NaCl (0,9% NaCl, B. Braun) getränkte Kompresse gelegt und mit einem Skalpell eröffnet. Die Knochen wurden mit RPMI (RPMI 1640, PAA)/10% FCS (FCS Gold, PAA) durchgespült und die Knochenmarkszellen durch einen 40 μ m Filter (BD) filtriert, zentrifugiert (1400rpm, Raumtemperatur, 10min) und einmal mit 50ml Leibovitz Medium (Gibco) gewaschen. Zehn Mio. Knochenmarkszellen suspendiert in 100 μ l Leibovitz Medium wurden für die Transplantation pro Tier verwendet. Die Empfängertiere wurden mit einer Energiedosis von 6 Gray mit dem Elektronenlinearbeschleuniger Clinac 600C (Varian) bestrahlt, wobei eine Röntgenbremsstrahlung von 6 Megavolt verwendet wurde. Den bestrahlten Tieren wurde direkt nach der Bestrahlung 100 μ l der Knochenmarkszellensuspension intravenös appliziert.

3.9.2 Intratracheale und intraperitoneale Behandlung von Tieren

Zur intratrachealen Instillation von Influenzaviren erhielten die Tiere eine Narkose. Die Prämedikation erfolgte mit Atropin (Atropin 0,5mg/ml, Dosierung Maus: 0,05mg/kg KGW; Ansatz: 1:10 verdünnt mit steriler 0,9% NaCl-Lösung, Applikation: subkutan, 27G Kanüle, pro 20g KGW Maus 0,02ml). Nach ca. 2 min erfolgte die Narkose mit Ketamin/Rompun in einer Mischung von 16 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%, Bayer GmbH, 20mg/ml; verdünnt mit steriler 0,9% NaCl Lösung auf

1:6,25) und von 100 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketavet, Pharmacia & Upjohn, 100mg/ml; verdünnt mit steriler 0,9% NaCl Lösung auf 1:5). In einer Mischspritze aufgezogen wurde ein Gesamtvolumen von 0,2 ml pro 20g Maus intraperitoneal über eine 29G Kanüle appliziert. Die Narkosetiefe wird durch Kompression der Schwanzspitze ermittelt. Es wurde eine Inzision in der Mitte des Halses bis zum Brustbein gesetzt und die Trachea vorsichtig freipräpariert. Mit einer Kanüle wurde unter dem ersten oder zweiten Trachealknorpel die Trachea eröffnet und ein Katheter (Abboth GmbH) eingeführt, durch den 70µl Virusverdünnung (500pfu in PBS^{-/-}) aufgezogen in einer Insulinspritze (B. Braun) langsam appliziert wurden. Nach Entfernen des Katheters wurde die Wunde mit zwei Einzelknopfnähten (Faden 6/0, Ethicon) verschlossen. Murines IFN-β (PBL) wurde mit einer Konzentration von 10000U/70µl in 0,1% BSA (Sigma) verwendet sowie ein inhibitorischer polyklonaler IFN-β Antikörper (PBL) mit einer Konzentration von 10000IU/70µl und jeweils intratracheal appliziert. Einhundert fünfzig µg eines neutralisierenden α-TRAIL Antikörpers (Biolegend) wurden mit einer Insulinspritze intraperitoneal injiziert.

3.9.3 *In vivo* Auswertungen

Nach der angegebenen Infektionsdauer wurden die Tiere unter tiefer Ketamin/ Rompun Narkose durch Ausbluten oder Blut frei-Perfusion getötet und die Proben gewonnen. Falls die alveoläre Schrankenstörung mittels FITC-Albumin Applikation gemessen werden sollte, wurde den Tieren 60min vor Tötung 100µl 10mg/ml FITC-Albumin (Sigma) in die Schwanzvene injiziert. Zur Blutentnahme wurde eine links-ventrikuläre Herzpunktion durchgeführt. Entnommenes Blut wurde in Eppendorf "Tubes" überführt, nach der Koagulation 15min bei 3500rpm zentrifugiert und das Serum für weitere Analysen aufbewahrt. Alternativ wurde das Blut in EDTA Röhrchen überführt und nach Lyse der Erythrozyten die Leukozyten für durchflusszytometrische Analysen verwendet. Im zweiten Schritt wurde nach Freipräparieren der Trachea eine Querinzision zwischen zwei Trachealspangen durchgeführt und eine stumpfe Kanüle eingeführt, die mit einem Faden (4/0, Ethicon) fixiert wurde, um eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) mit PBS/EDTA durchzuführen. Dabei wurde fraktioniert lavagiert. Für die erste Fraktion wurde mit je 300µl, 400µl und 500µl, für die zweite Fraktion 8mal mit 500µl lavagiert. Die BAL Flüssigkeit wurde anschließend zentrifugiert (10min, 1400rpm, 4°C) und die Überstände der ersten Fraktion aliquo-

tiert und für ELISA Messungen, Analyse der Totalproteinkonzentrationen oder gegebenenfalls FITC-Albumin Quotientenmessungen verwendet, wohingegen der Überstand der zweiten Fraktion verworfen wurde. Die Zellpellets beider Fraktionen wurden gepoolt und in 1000µl RPMI1640 (PAA)/10%FCS (PAA) resuspendiert. Im dritten Schritt wurden nach Entfernen des Brustbeines die mediastinalen Lymphknoten entfernt und 40min in 500µl Dispase (50 Caseinolytic Units/ml, BD) verdaut. Nachdem die Zellen mit einer Pipette vereinzelt und zentrifugiert wurden (10min, 1400rpm, 4°C), wurden auch diese zunächst in RPMI1640 (PAA)/10% FCS (PAA) resuspendiert. Um Lungenzellhomogenate herzustellen, wurde die pulmonale Strombahn mit 20ml HBSS (PAA) blutfrei perfundiert. Im Anschluss an die Perfusion wurden durch die bereits in der Trachea fixierte Kanüle 500µl Dispase (50 Caseinolytic Units/ml, BD) in die Lunge gegeben, die Kanüle entfernt und die Trachea mit einem Faden (6/0, Ethicon) verschlossen. Anschließend wurde die Lunge heraus präpariert, Fremdgewebe entfernt und 40min in 3,5ml Dispase (50 Caseinolytic Units/ml, BD) inkubiert oder für Zytokinmessungen direkt mechanisch mit einem elektronischen Homogenisator (TissueRuptor, Qiagen) zerkleinert und nach Zentrifugation (10min, 1400rpm, 4°C) der Überstand bei -80°C gelagert. Nach dem enzymatischen Verdau wurde die Lunge in Petrischalen in 7ml DMEM/HEPES/0,1% DNase (Serva) zerkleinert und nach 10min Inkubation auf einem Schüttler (Heidolph) vereinzelt. Nach Zentrifugation (10min, 1400rpm, 4°C) und Waschen mit mAEC Medium wurden die Zellen in 5ml mAEC Medium resuspendiert. Die gewonnenen Zellen wurden zur durchflusszytometrischen Charakterisierung oder zur Messung der Apoptoserate der Alveolarepithelzellen verwendet.

3.10 Analyse der Genexpression

3.10.1 RNA Isolation

Die Zellen aus Zellkulturexperimenten wurden nach Waschen mit PBS^{Mg⁺/Ca⁺} mit 350µl RLT Puffer (Qiagen) lysiert und die RNA unter Benutzung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerprotokoll isoliert. Die Qualität und Menge der RNA wurde mittels eines Nanovue Plus (GE Healthcare) gemessen. Nur die RNA mit einem A_{260/280} Verhältnis > als 1,9 und < als 2,1 wurden für die cDNA Synthese verwendet.

3.10.2 cDNA Synthese

Für die Synthese von cDNA wurden 250ng RNA in 13,5µl H₂O (Water Mol biol grade, 5 Prime GmbH) eingesetzt. Als Enzym wurde die MMLV-Reverse Transkriptase (Invitrogen) verwendet. Nachdem die RNA zunächst 5min auf 70°C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt wurde, wurden 11,5µl des PCR Mix hinzu pipettiert.

PCR Mix:

5x1st strand buffer (Invitrogen)	5µl
Dithiothreitol (DTT) (Invitrogen)	2,5µl
RNAse Inhibitor (RNAse Out, Invitrogen)	1µl
dNTPs (Invitrogen)	1µl
random hexamers (Invitrogen)	1,5µl
MMLV-Reverse Transkriptase (Invitrogen)	1µl

In einem Thermocycler (Peglab) wurden die Proben 1h bei 37°C inkubiert und die Enzyme durch Erhitzen auf 97°C für 5min inaktiviert. Danach wurde die cDNA 1:3 mit H₂O (Water Mol biol grade, 5 Prime GmbH) verdünnt und für quantitative real time PCR (qPCR) eingesetzt.

3.10.3 Real time PCR

Für die quantitative real time PCR (qPCR) wurde der Platinum SYBR Green Super Mix-UDG (Invitrogen) unter zusätzlicher Verwendung des ROX Referenz Farbstoffes zur Normalisierung eingesetzt. Die Reaktionen wurden mit einem Volumen von 25µl in 96 „well“ Platten (Applied biosystems) mit dem Step one plus (Applied biosystems) durchgeführt.

qPCR Mix

SYBR Green Mix (Invitrogen)	13µl
MgCl ₂ (Invitrogen)	1µl
Forward Primer	0,5µl
Reverse Primer	0,5µl
H ₂ O (5 Prime GmbH)	5µl
cDNA	5µl

PCR Bedingungen:

50°C 2min, 95°C 5min; 45x 95°C 5s, 60°C 5s, 72°C 10s; 72°C 10 min

Die Primer wurden mit dem Programm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) entwickelt und unter Benutzung des BlastN Algorithmus auf Spezifität überprüft, welche zusätzlich durch Schmelzkurvenanalyse und Auftragen des PCR Produktes auf ein 2%iges Agarosegel validiert wurde. Die verwendeten Primer sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
Murines Aktin	5'-ACCCTAAGGCCAACCGTGGC-3'	5'-CAGAGGCATACAGGGACAGCA-3'
Humanes Aktin	5'-CTGGGAGTGGGTGGAGGC-3'	5'-TCAACTGGTCTCAAGTCAGTG-3'
Murines TRAIL	5'-GAAGACCTCAGAAAGTGGC-3'	5'-GACCAGCTCTCCATTCTTA-3'
Humanes TRAIL	5'-GAGGTTGCAGTGGTGAGA-3'	5'-CCCCTGCTGGCAAGTCAA-3'
Murines IFN-β	5'-ACGTCTCCTGGATGAACTCCA-3'	5'-CAGTTGAGGACATCTCCACAG-3'
Humanes IFN-β	5'-CAGCAATTTTCAGTGTCAGAAGC-3'	5'-TCATCCTGTCCTTGAGGCAGT-3'
Murines DR5	5'-AAGTGTGTCTCCAAAACGG-3'	5'-AATGCACAGAGTTCGCACT-3'
Humanes DR5	5'-GGTTCAGCAAATGAAGGTG-3'	5'-GAGTCAAAGGGCACCAAGTC-3'

Aktin wurde hierbei als Referenzgen verwendet. Die Ergebnisse wurden entweder als delta (Δ) ct angegeben:

Delta ct = Δct = ct (Referenzgen) - ct (Gen)

oder als jeweiliger Faktor der Hoch- oder Herunterregulierung im Vergleich mit mock (kontrollbehandelten) Proben (Fold Induction):

ΔΔct = Δct (behandelt) – Δct (mock)

Fold Induction = 2^{ΔΔct}

3.11 Analyse der Proteinexpression und -aktivität

3.11.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Für die FACS Analyse wurden die Zellen mit 1% Paraformaldehyd (Sigma) 15min auf Eis fixiert. Nach Zentrifugation (1200rpm, 10min, 4°C) wurden sie in FACS Puffer resuspendiert und zur durchflusszytometrischen Analyse verwendet. Eine Ausnahme bildete die Messung der Apoptose unter Verwendung von Annexin-V-Alexa647, die ohne vorherige Fixierung durchgeführt wurde. Die Antikörpermischungen wurden in FACS Puffer oder für Apoptosefärbung in Annexinbinding Puffer (BD) angesetzt und jeweils 100.000 Zellen mit 20µl Antikörpermischung bei 4°C 20min gefärbt. Unspezifische Antikörperbindungen wurden durch die Zugabe von 10µl unspezifischem Immunoglobulin (Octagam, Octapharma) minimiert. Als Negativkontrollen wurden ungefärbte oder mit einer IgG Kontrolle gefärbte Zellen verwendet. Permeabilisiert wurde bei Bedarf 20min auf Eis mit 0,2% Saponin (Calbiochem), um intrazelluläre Proteine zu färben. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit FACS Puffer gegebenenfalls mit einem Sekundärantikörper gefärbt. Streptavidin gekoppelte Sekundärantikörper wurden mit einem Volumen von 5µl für 3min eingesetzt, gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichtete Sekundärantikörper dagegen mit einem Volumen von 20µl für 20min. Zur Abgrenzung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen wurden 70µl 20µg/ml Propidiumiodid (Roth) kurz vor der Messung zugesetzt. Nach erneutem zweimaligen Waschen und Resuspendieren in 200µl FACS Puffer wurden die gefärbten Zellen mittels eines FACSCanto Durchflusszytometers (BD Biosciences) analysiert. Die FACS Diva Software (BD) wurde zur Analyse der Daten verwendet. Überlagernde Histogramme wurden mit der WinMDI Software dargestellt. Die verwendeten Antikörper mit jeweiliger Verdünnung sind den folgenden Tabellen zu entnehmen.

Antikörper zur Messung von apoptotischen Zellen

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
α-CD31 FITC	1:100	BD Pharmingen
α-CD45 APC-Cy7	1:50	BD Pharmingen
α-CD326/EpCAM PE-Cy7	1:50	Biolegend
Annexin-V Alexa 647	1:100	Invitrogen
Propidiumiodid (PE)	1:3	Roth

Antikörper zur Bestimmung der TRAIL Expression in murinen Zellen

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper		
Purified Leaf rat α -mouse TRAIL	1:15	Biolegend
Leaf rat IgG2a Isotype	1:15	Biolegend
Sekundärantikörper		
donkey α -rat IgG Alexa 488	1:200	Invitrogen
goat α -rat IgG PE	1:200	Serotec

Antikörper zur Bestimmung der TRAIL Expression in humanen Zellen

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Mouse α -human TRAIL PE	1:50	BD Pharmingen
Mouse IgG1k Isotype control PE	1:50	BD Pharmingen

Antikörper zur Bestimmung der Koexpression von DR5 und Influenza-NP

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper		
Mouse α -Influenza-NP	1:100	Meridian Life sci-
Rat α -mouse DR5	1:50	R&D
Sekundärantikörper		
Goat α -mouse IgG Alexa 647	1:200	Invitrogen
Donkey α -rat IgG Alexa 488	1:200	Invitrogen

Antikörper zur Charakterisierung von Leukozytenpopulationen und Transplantationseffizienz

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
α -mouse-CD45.1 FITC	1:50	BD Pharmingen
α -mouse-CD45.1 PE	1:50	BD Pharmingen
α -mouse-CD45.2 APC-Cy7	1:50	Biolegend
α -mouse-SiglecF PE	1:50	BD Pharmingen
α -mouse-CD11c PE-Cy5.5	1:20	Invitrogen
α -mouse-GR1 PE-Cy7	1:10	Biolegend
α -mouse-CD3 ϵ APC	1:25	Biolegend
α -mouse-CD11c APC	1:20	Biolegend
α -mouse-MHC II FITC	1:100	BD Pharmingen
α -mouse-CD103 PE-Cy5.5	1:25	Biolegend
α -mouse-CD11b PE-Cy7	1:50	Biolegend
α -mouse-F4/80 APC	1:10	Invitrogen
α -mouse-B220 PE-Cy7	1:50	BD Pharmingen

3.11.2 Western Blot

Die Zellen wurden mit 40µl NP-40 Lysepuffer behandelt, 30min auf Eis gestellt, zentrifugiert (13000rpm, 15 min, 4°C), die Überstände abgenommen und deren Proteinkonzentration unter Benutzung des Dc Protein Assay Kits (Biorad) nach Herstellerprotokoll bei einer Wellenlänge von 650nm mit dem ELISA Reader UVmax (Bender Hobein) in einer 96 „well“ Platte (BD) bestimmt. 20µg Totalprotein wurden auf ein 10%iges SDS Gel aufgetragen und die Proteine unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen bei 80V, 40mA, 2,5h aufgetrennt. Nach der Elektrophorese (Equipment, Biorad) wurde auf eine Polyvinylidene Difluorid Membran (Amersham Hybond, GE Healthcare) bei 100V, 265mA 1h unter Benutzung des Transferpuffers bei 4°C geblottet (Equipment, Biorad). Nach dem Transfer wurde die Membran 1h in 5% Milch (Difco Skim milk, BD) in PBS^{Mg-/Ca-} (PAA)/0,05% Tween 20 (Sigma) bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Danach wurden die jeweiligen Primärantikörper in der angegebenen Konzentration (Tabelle unten) hinzugegeben und zunächst 30min auf einem Schüttler (Heidolph) bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 15min auf einem Schüttler (Heidolph) mit PBS^{Mg-/Ca-} (PAA)/0,05% Tween 20 (Sigma) gewaschen und danach der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper hinzugegeben, 1h inkubiert, dreimal gewaschen und die Banden durch ein Chemilumineszenzsystem (ECL plus; Amersham Pharmacia biotech) mit dem MicroChemi Chemilumineszenz-Imaging-System (Berthold technologies) detektiert und die Daten densitometrisch mit der GelQuant Software (AMPL Software) ausgewertet.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper		
Rabbit α-β-Aktin	1:1000	Biolegend
Rabbit α-IRF3	1:1000	Santa Cruz
Rabbit α-phospho-IRF3	1:1000	Cell Signaling
Rabbit α-IRF7	1:1000	Santa Cruz
Rabbit α-PKR	1:1000	Abcam
Rabbit α-phospho PKR	1:1000	Abcam
Rabbit α-cleaved Caspase-3	1:1000	Cell Signaling
Sekundärantikörper		
α-rabbit IgG-HRP	1:3000	Cell signaling

3.11.3 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

TRAIL und IFN- β Konzentrationen von Zellkulturüberständen oder BAL Proben wurden mit kommerziellen ELISA Kits (murines IFN- β : PBL; murines TRAIL: USCN, humanes TRAIL: R&D) bestimmt und das Protokoll nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden die Proben und Standards in die mit einem Antikörper gegen das Protein beschichtete 96 „well“ Platte pipettiert, nach Herstellerprotokoll inkubiert und mit einem automatischen Waschgerät (Tecan) gewaschen. Nach der Zugabe eines primären sowie eines sekundären Antikörpers und des Substrates wurde die optische Dichte bei der im Protokoll angegebenen Wellenlänge mit dem ELISA Reader UVmax (Bender Hobein) gemessen und durch die Berechnung einer Standardkurve mit dem Programm Soft Max Pro (Molecular devices) die Konzentration des Proteins in der Probe bestimmt.

3.11.4 NF- κ B Aktivitäts Test

Zur Messung der Aktivität von NF- κ B wurde der TransAM Assay p65 (Active Motif) nach Herstellerprotokoll verwendet. Hier wurden die Standards und die Proben, welche wie für einen Western Blot vorbereitet wurden, auf eine mit der p65 Konsensussequenz (5'-GGGACTTTCC-3') gecoateten 96 „well“ Platte aufgetragen, an die die aktive Form von p65 anbinden kann. Nach Zugabe eines Primärantikörpers, Waschschritten, Inkubation mit einem HRP-markiertem Sekundärantikörper und zuletzt der Zugabe eines Peroxidasesubstrates konnte die Aktivität mit dem ELISA Reader UVmax (Bender Hobein) durch die Berechnung einer Standardkurve mit dem Programm Soft Max Pro (Molecular devices) kalorimetrisch bestimmt werden.

3.12 Messung klinischer Parameter bei Tierexperimenten

3.12.1 Messung der alveolären Schrankenstörung bei Mäusen

Die alveoläre Schrankenstörung wurde durch die Messung der Totalproteinkonzentration in bronchoalveolären Lavagen bestimmt. Dazu wurde die Totalproteinkonzentration der ersten Fraktion der BAL der Tiere unter Benutzung des Dc Protein Assay Kits (Biorad) nach Herstellerprotokoll bei einer Wellenlänge von 650nm mit dem ELISA Reader UVmax (Bender Hobein) in einer 96 well Platte (BD) bestimmt. Durch das

Mitführen von Standards bekannter Konzentrationen und dem Berechnen einer Standardkurve wurde die Konzentration mit SoftMax Pro (Molecular devices) berechnet.

Als weitere Methode zur Detektion der alveolären Albumin-Leakage wurde die Menge von intravenös appliziertem FITC markiertem Albumin in der BALF in ein Verhältnis zu der im Serum vorhandenen Menge gesetzt. Dazu wurden die Serumproben (1:100 verdünnt) und die erste Fraktion der BALF (unverdünnt) in Duplikaten auf eine geschwärzte 96 „well“ Platte (Costar) aufgetragen und mit dem Fluorimeter FLX800 und der KC Junior Software (Biotec Instruments) die Fluoreszenzintensität (Filter Ex485/200 Emission 530/25) von FITC gemessen.

Die Werte wurden wie folgt berechnet:

$$\text{Arbitrary Units (AU)} = \frac{\text{Fluoreszenzintensität BAL}}{\text{Fluoreszenzintensität Serum}}$$

3.13 Statistik

Gepaarte Proben wurden unter Verwendung des zweiseitigen gepaarten T-Tests analysiert und für ungepaarte Proben wurde der studentische T-Test verwendet. Für Vergleiche mehrerer Versuchsgruppen untereinander wurde das statistische Programm R benutzt, wobei die statistische Signifikanz durch die Einweg-Varianzanalyse und anschließend Tukey-HSD post-hoc Test ermittelt wurde. Alle Daten werden als Mittelwert +/- Standardabweichung präsentiert und ein *p* Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 IFN- β induziert apoptotischen Lungenschaden nach Influenza Infektion

Um die Rolle von IFN- β bei der Induktion von apoptotischem Lungenschaden zu untersuchen, sollte zunächst überprüft werden, ob IFN- β als Antwort auf die Infektion mit dem mausadaptierten und damit für Mäuse hoch pathogenen H1N1 Influenzavirus A/Puerto Rico/8/34, nachfolgend mit A/PR8 abgekürzt, gebildet wird. Dazu wurden C57/BL6 (WT) Mäuse mit 500 pfu A/PR8 infiziert und die IFN- β Konzentrationen in der BALF und im Überstand von Lungenhomogenaten lavagierter Tiere bestimmt (Abbildung 4). IFN- β wurde bereits am d3 nach Infektion (p.i.) alveolär und interstitiell freigesetzt und persistierte in relevanten Mengen bis zum d7 p.i. im Lungengewebe.

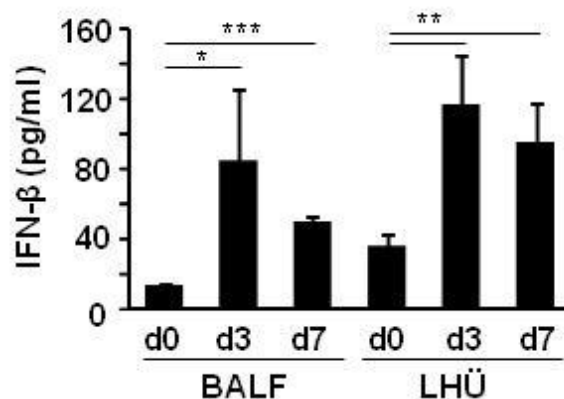


ABBILDUNG 4: IFN- β SPIEGEL IN BALF UND LUNGENGeweBE NACH INFLUENZA VIRUS INFEKTION.

WT Tiere wurden mit 500pfu A/PR8 infiziert und die IFN- β Konzentrationen unter Verwendung eines ELISA nach null (d0), drei (d3) und sieben (d7) Tagen in den bronchoalveolären Lavagen (BALF) sowie in den Überständen des Lungenhomogenates (LHÜ) gemessen. Die Daten geben den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von n=5 Tieren/Gruppe an. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Um den Einfluss von virusinduziertem IFN- β auf die Ausbildung von apoptotischem Lungenschaden zu untersuchen, wurden WT Tiere mit 500pfu A/PR8 infiziert und an Tag 5 nach Infektion entweder mit einem neutralisierenden IFN- β Antikörper oder umgekehrt mit exogen appliziertem rekombinanten IFN- β behandelt. An Tag 7 nach Infektion wurde die Zahl an apoptotischen Alveolarepithelzellen (AEC) durchflusszytometrisch unter Verwendung von Annexin-V als Apoptosemarker sowie der alveoläre Proteinübertritt anhand einer Totalproteinbestimmung in der BALF gemessen.

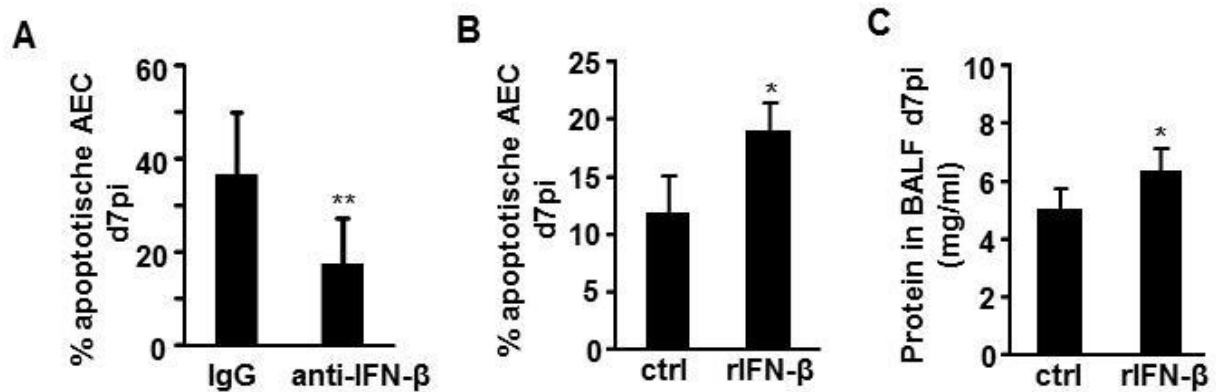


ABBILDUNG 5: IFN-β INDUZIERT APOPTOTISCHEN LUNGENSCHADEN NACH INFLUENZA VIRUS INFEKTION.

WT Tiere wurden mit 500pfu A/PR8 infiziert und an Tag 5 nach Infektion mit (A) 10.000IU eines polyklonalen IFN-β Antikörpers (anti-IFN-β) oder 10.000U rekombinantem murinen IFN-β (rIFN-β) (B, C) intratracheal behandelt. An Tag 7 nach Infektion wurde im Lungenhomogenat der prozentuale Anteil apoptotischer CD45⁺CD31⁺Propidiumiodid⁺EpCam⁺ Alveolarepithelzellen unter Verwendung des Apoptosemarkers Annexin-V durchflusszytometrisch gemessen (A, B) und in den Lavagen von IFN-β behandelten Tieren die Totalproteinkonzentration bestimmt (C). Die Daten geben den Mittelwert +/- Standardabweichung von n=5 Tieren/Gruppe an. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Durch die Neutralisation von IFN-β konnte der prozentuale Anteil an apoptotischen AEC reduziert werden (Abbildung 5A), wohingegen die Applikation von IFN-β eine gegenteilige Wirkung erzielte (Abbildung 5B) und zusätzlich die Barrierefunktion der Lunge verringerte (Abbildung 5C), was die proapoptotische Rolle von IFN-β und dessen Beitrag zum akutem Lungenschaden bei einer Influenzavirus Pneumonie belegt.

In der Literatur wird die Applikation von IFN-β als klassisches anti-virales Zytokin mit einer verringerten Virusreplikation und damit einem milderem Verlauf der Erkrankung in Verbindung gebracht [144, 160, 201]. Da dieser Effekt generell nach früher IFN-β Induktion [202] oder einer Vorbehandlung mit rekombinantem IFN-β beobachtet wurde [202, 203], sollte verglichen werden, ob möglicherweise früh im Infektionsverlauf wirksames von später appliziertem IFN-β in seiner Wirkungsweise abgegrenzt werden kann. Dazu wurden WT Tiere einen Tag vor Infektion oder 5 Tage nach Infektion mit IFN-β (10.000 IU/70μl) intratracheal behandelt und die Zahl an infektiösen Viruspartikeln an Tag 7 nach Infektion in Lavagen durch Plaque Assay bestimmt. Zusätzlich wurde aus den vorbehandelten Tieren die Totalproteinkonzentration in der BALF bestimmt.

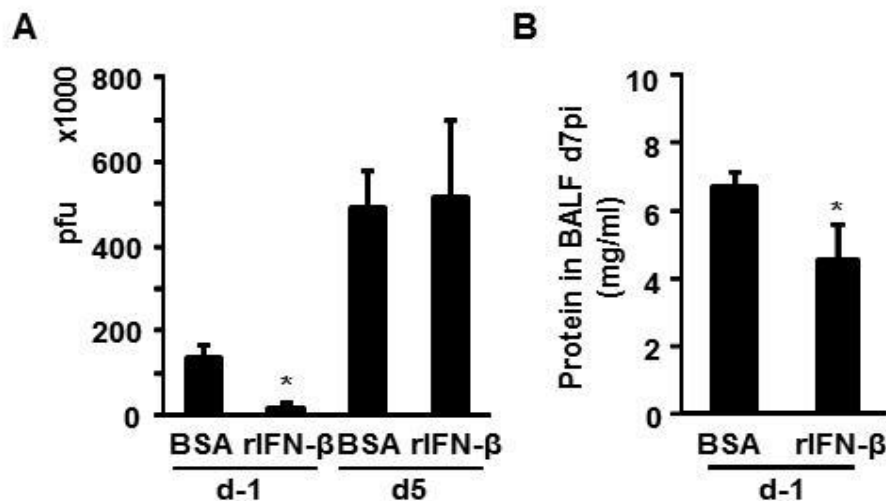


ABBILDUNG 6: IFN- β BEHANDLUNG VOR INFektion (TAG-1), ABER NICHT AM TAG 5 P.I. APPLIZIERTES IFN- β REDUZIERT DIE VIRUSLAST UND DEN LUNGENSCHADEN NACH INFLUENZA VIRUS-INFektion.

WT Tiere wurden mit 500pfu A/PR8 infiziert und an Tag -1 (d-1) oder Tag 5 (d5) nach Infektion mit 10.000 IU rekombinantem murinen IFN- β (rIFN- β) oder der Trägersubstanz PBS⁻/0.1% BSA als Kontrolle intratracheal behandelt. An Tag 7 nach Infektion wurde die Zahl an infektiösen Viruspartikeln (A) sowie die Totalproteinkonzentration (B) in der BALF bestimmt. Die Daten geben den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von n=5 Tieren/Gruppe an. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Es zeigte sich, dass die Vorbehandlung mit IFN- β zu einer verringerten Virenlast im Alveolarraum der Lunge führte (Abbildung 6A) und die Barrierefunktion der Lunge verbesserte (Abbildung 6B), wohingegen die späte Behandlung neben einem Beitrag zum apoptotischen Lungenschaden (Abbildung 5) keinerlei Einfluss auf die Zahl an infektiösen Viruspartikeln im Alveolarraum hatte (Abbildung 6A).

4.2 Alveolarmakrophagen sind die Hauptquelle von alveolärem IFN- β nach Influenzavirus Infektion

Um die zelluläre Quelle von IFN- β im Alveolarraum nach Influenzavirus Infektion zu identifizieren, wurden primäre residente murine Alveolarmakrophagen, im Folgenden mAM Φ abgekürzt, und primäre murine Alveolarepithelzellen (mAEC) aus WT Mäusen isoliert, *in vitro* mit A/PR8 infiziert und das in den Überstand abgegebene IFN- β mittels ELISA 16h nach Infektion quantifiziert. Hierbei sezernierten mAM Φ signifikant höhere Mengen IFN- β als mAEC (Abbildung 7).

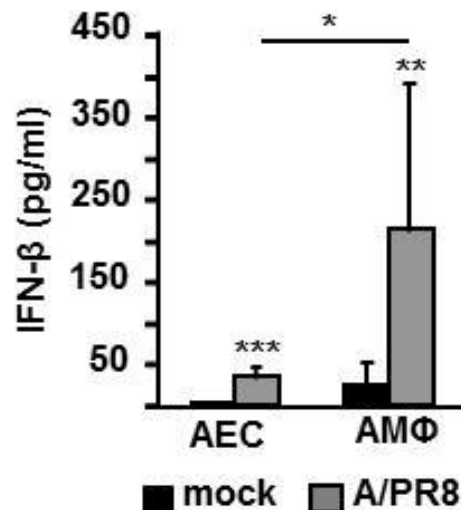


ABBILDUNG 7: AMΦ PRODUZIEREN HÖHERE IFN-β MENGEN ALS AEC NACH INFLUENZA VIRUS INFEKTION.

Isolierte mAMΦ und mAEC wurden *in vitro* mit einer MOI=0,1 A/PR8 infiziert. Die Konzentration von IFN-β wurde 16h p.i. in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- Standardabweichung von n=4-5 unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Um die Frage zu klären, ob und in welchem Ausmaß weitere Influenzavirus Stämme neben dem mausadaptierten A/PR8 die Expression von IFN-β induzieren, wurden mAMΦ mit den folgenden Influenza A Viren infiziert: A/Thailand/KAN-1/04, ein hochpathogenes aviäres Influenzavirus des H5N1 Subtyps, A/X-31, eine Reassortante des A/PR8 vom H3N2 Subtyp, welche in der Maus weniger pathogen ist als das isogene A/PR8 Virus, des Weiteren A/Memphis/14/96-M, ein saisonales H1N1 Virus und das pandemische H1N1 Isolat A/Hamburg/5/09. Da sich nach Infektion mit A/PR8 eine dosisabhängige Induktion von IFN-β auf mRNA Ebene zeigte, die nach 16h bei einer Infektionsdosis MOI=1 das Maximum erreichte und bis 24h nach Infektion persistierte (Abbildung 8A), wurden die mAMΦ unter Verwendung der übrigen Influenzavirus Stämme mit einer MOI=1 infiziert und die Transkription von IFN-β nach 16h und 24h durch qPCR quantifiziert. Die Induktion wurde dabei unter Verwendung von Aktin als Referenzgen und unter Berücksichtigung von zeitspezifischen nicht infizierten Kontrollen berechnet.

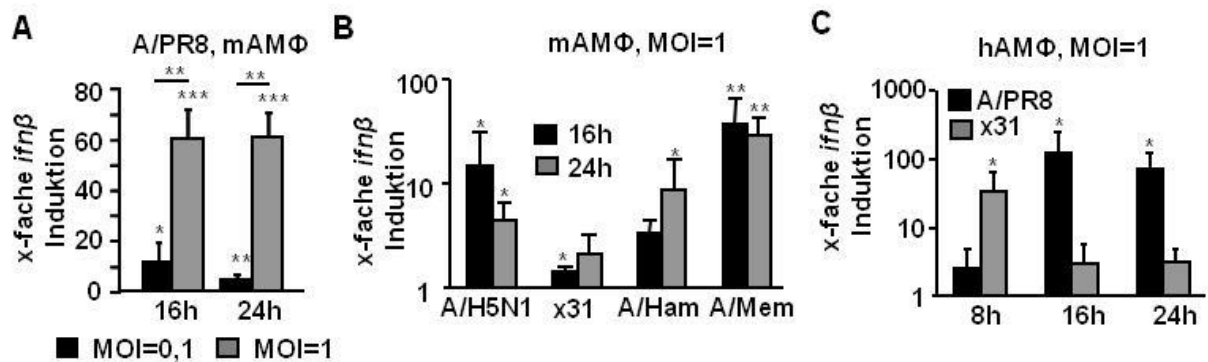


ABBILDUNG 8: DIE EXPRESSION VON IFN- β WIRD ABHÄNGIG VOM VIRUSSTAMM IN MURINEN UND HUMANEN ALVEOLARMAKROPHAGEN INDUZIERT.

Isolierte mAMΦ wurden in Kultur mit A/PR8 mit einer MOI=0,1 und MOI=1 infiziert und die Expression von IFN- β bestimmt (A). Isolierte mAMΦ wurden mit A/H5N1, x31, A/Hamburg (A/Ham) und A/Memphis (A/Mem) (MOI=1) infiziert und die Expression von IFN- β auf mRNA Ebene nach 16h und 24h mit qPCR gemessen und die x-fache Induktion von IFN- β ($2^{\Delta\Delta ct}$) kalkuliert (B). Isolierte hAMΦ wurden in Kultur mit A/PR8 und x31 (MOI=1) infiziert und IFN- β auf mRNA Ebene gemessen und die x-fache Induktion von IFN- β ($2^{\Delta\Delta ct}$) kalkuliert (C). Die x-fache Induktion ($2^{\Delta\Delta ct}$) wurde unter Verwendung von Aktin als Referenzen und Verwendung von zeitspezifischen nicht infizierten Kontrollen berechnet. Die Daten zeigen den Mittelwert der IFN- β Induktion +/- Standardabweichung von n=3 (A, B) oder 4-5 (C) unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Dabei wurde die IFN- β Expression unterschiedlich stark induziert. Das in der Maus hochpathogene A/PR8 erreichte eine maximale IFN- β Induktion von 60,1-fach, das hochpathogene aviäre Influenzavirus H5N1 ein Maximum von 14,2-fach und x31 die geringste Induktion mit 2,1-fach jeweils nach 16h. Auch die humanen Isolate A/Hamburg und A/Memphis konnten in mAMΦ die Expression der IFN- β mRNA induzieren, wobei hier das saisonale A/Memphis eine höhere Induktion als das pandemische A/Hamburg Isolat erreichte (Abbildung 8B). Auch primäre humane Alveolarmakrophagen exprimieren substantielle Mengen an IFN- β nach Infektion mit A/PR8 und x31 (MOI=1) nach 8h, 16h und 24h (Abbildung 8C).

4.3 mAMΦ vermitteln die IFN- β abhängige Alveolarepithelzellapoptose

Um die Frage zu adressieren, welche Signalmechanismen in IFN- β abhängige Alveolarepithelzell-(AEC) Apoptose involviert sind, sollte zunächst evaluiert werden, welche pulmonalen Zellpopulationen apoptotischen Lungenschaden IFN- β abhängig vermitteln. Um zu untersuchen, ob mAMΦ-sezerniertes IFN- β direkt apoptotisch auf die Epithelzellen wirkt oder ob mAMΦ diesen Effekt sekundär vermitteln, wurden isolierte mAEC *in*

vitro alleine oder in Kombination mit isolierten mAM Φ kultiviert und nach Stimulation mit rekombinantem murinen IFN- β (180 U/ml) die Zahl an apoptotischen AEC 24h nach Stimulation bestimmt (Abbildung 9A).

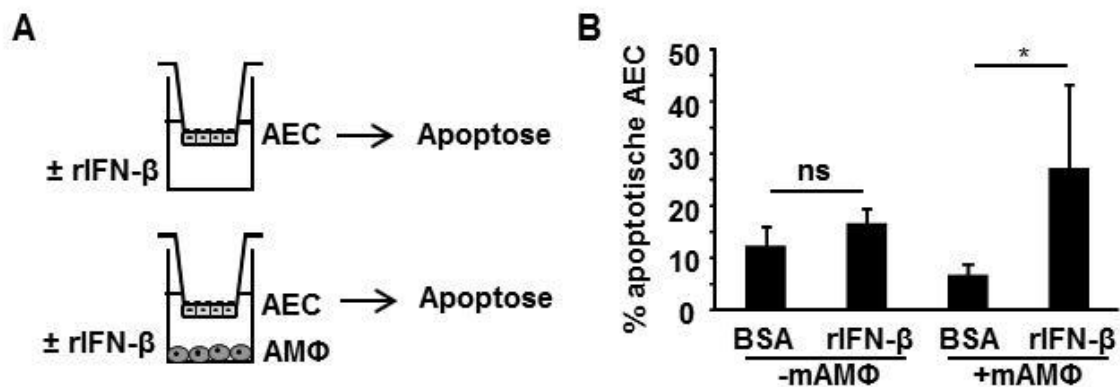


ABBILDUNG 9: REKOMBINANTES IFN- β INDUZIERT APOPTOSE IN EPITHELZELLEN NUR IN PRÄSENZ VON mAM Φ .

Isolierte mAEC wurden mono- oder mit isolierten mAM Φ kokultiviert und nach 24h die Apoptose nach Zugabe von 180U/ml IFN- β (rIFN- β) oder der BSA Kontrolle durchflusszytometrisch durch Zugabe von Annexin-V quantifiziert. Die Daten zeigen den Mittelwert der Annexin-V⁺/Propidiumiodid⁺ AEC +/- Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Da IFN- β in den mit mAM Φ kokultivierten mAEC, nicht jedoch in den monokultivierten mAEC Apoptose induzieren konnte (Abbildung 9B), lässt sich schlussfolgern, dass aus mAM Φ freigesetzte Mediatoren bei der IFN- β abhängigen Apoptoseinduktion in mAEC eine zentrale Rolle spielen.

4.4 Analyse von mAM Φ -exprimierten proapoptotischen Faktoren nach Influenzavirus Infektion

Als proapoptotische Faktoren, die nach Kontakt mit Pathogenen induziert werden, wurden insbesondere FasL oder TRAIL in der Literatur beschrieben [204]. Deshalb sollte zunächst untersucht werden, ob diese proapoptotischen Mediatoren nach Influenzavirus Infektion in mAM Φ reguliert werden. Dazu wurden mAM Φ aus WT Tieren isoliert und mit A/PR8 (MOI von 0,1 und 1) in Kultur infiziert. Durch qPCR wurde die Expression von TRAIL und FasL quantifiziert.

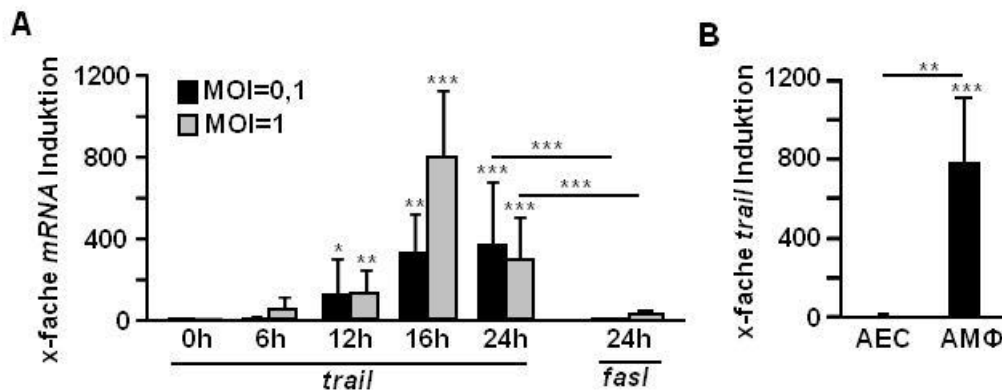


ABBILDUNG 10: A/PR8 INDUZIERT DIE TRANSKRIPTION VON TRAIL IN MAMΦ.

Isolierte mAMΦ wurden in Kultur mit A/PR8 (MOI=0,1 und MOI=1) infiziert und die Expression von TRAIL nach 0h, 6h, 12h, 16h oder 24h und von FasL nach 24h auf mRNA Ebene quantifiziert (A). Isolierte mAMΦ und murine Epithelzellen (mAEC) wurden mit A/PR8 (MOI=1) infiziert und die TRAIL Expression nach 16h bestimmt (B). Die x-fache Induktion ($2^{\Delta\Delta ct}$) wurde unter Verwendung von Aktin als Referenzgen und Verwendung von zeitspezifischen nicht infizierten Kontrollen kalkuliert. Die Daten zeigen den Mittelwert der mRNA Induktion +/- Standardabweichung von n=4-5 unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Es zeigte sich für TRAIL eine Infektionsdosis-abhängige Regulation, die ihr Maximum 16h p.i. erreichte, wohingegen die Transkription von FasL auch nach 24h nicht signifikant induziert wurde (Abbildung 10A). Zusätzlich zeigte der Vergleich zwischen infizierten murinen mAMΦ und Epithelzellen nach A/PR8 Infektion (MOI=1), dass lediglich die mAMΦ TRAIL als Antwort auf eine Influenza Virus-Infektion 16h nach Infektion ca. 800-fach hochregulieren (Abbildung 10B) und damit das mAMΦ-sezernierte proapoptotische Protein TRAIL als IFN-β-abhängiger Apoptose-Induktor in AEC in Betracht gezogen werden kann.

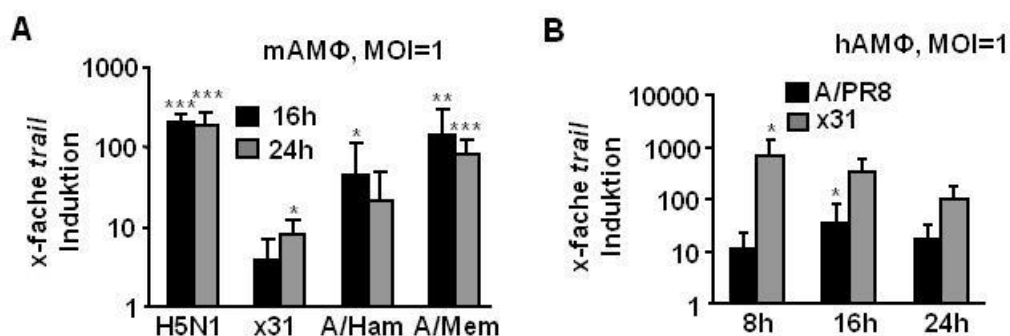


ABBILDUNG 11: DIE GENEXPRESSION VON TRAIL WIRD VIRUS-ABHÄNGIG IN MURINEN UND HUMANEN AMΦ INDUZIERT.

Isolierte mAMΦ wurden mit A/H5N1, X-31, A/Hamburg (A/Ham) und A/Memphis (A/Mem) (MOI=1) infiziert und die Expression von TRAIL auf mRNA Ebene nach 16h und 24h mit qPCR gemessen (A). hAMΦ wurden in Kultur mit A/PR8 und X-31 (MOI=1) infiziert und TRAIL auf mRNA Ebene nach 16h und 24h mit qPCR bestimmt (C). Die x-fache Induktion ($2^{\Delta\Delta ct}$) wurde unter Verwendung von Aktin als Referenzgen und Verwendung von zeitspezifischen nicht infizierten Kontrollen kalkuliert. Die Daten zeigen den Mittelwert der TRAIL Induktion +/- Standardabweichung von n=3 (A) oder 4-5 (B) unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Ein Hinweis auf eine IFN- β abhängige TRAIL Regulation ergab sich daraus, dass das Ausmaß der Induktion von TRAIL in mAM Φ nach Infektion mit unterschiedlichen Influenza A Stämmen (A/H5N1, x31, A/Memphis, A/Hamburg) mit dem der Induktion von IFN- β korrelierte (Abbildung 11A und vgl. 8A/B). Korrespondierende Ergebnisse konnten unter Verwendung von A/PR8 und x31 in humanen AM Φ erzielt werden (Abbildung 11B und vgl. 8C).

Insbesondere zeigten humane AM Φ , die aus der BALF von invasiv beatmeten Patienten mit pH1N1-induziertem ARDS isoliert wurden, eine erhöhte TRAIL Expression auf mRNA und Proteinebene im Vergleich zu AM Φ , die aus BALF mit unauffälligem differentialzytologischem Befund (AM Φ >90%) isoliert wurden (Abbildung 12A/B). Darüber hinaus war die Proteinkonzentration von löslichem TRAIL in der BALF von pH1N1 Patienten im Vergleich zu ARDS Patienten mit einer bakteriellen Pneumonie als Ursache signifikant erhöht (Abbildung 12C).

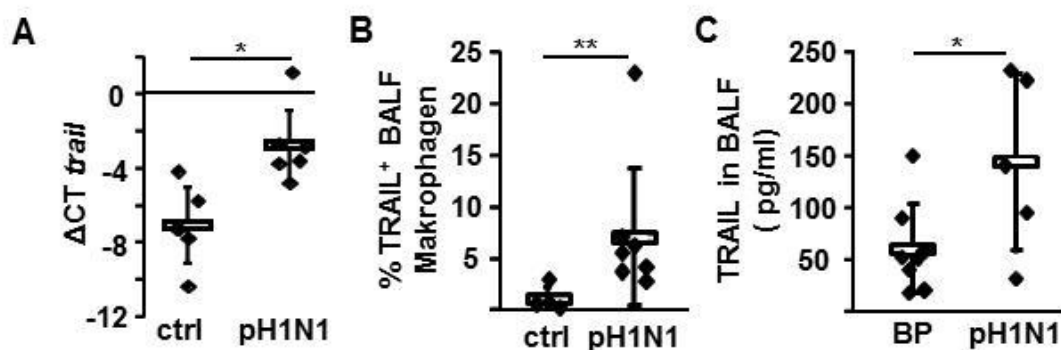


ABBILDUNG 12: OBERFLÄCHENEXPRESSION UND FREISETZUNG VON TRAIL AUS ALVEOLARMAKROPHAGEN VON PATIENTEN MIT PH1N1-INDUZIERTEM ARDS.

Alveolarmakrophagen wurden aus BALF von Patienten mit pH1N1-induziertem ARDS und BALF von Patienten mit unauffälligem differentialzytologischem Befund (*ctrl*) isoliert. Die TRAIL Expression wurde auf mRNA Ebene mittels qPCR bestimmt, wobei der ΔCT unter Verwendung von Aktin als Referenzgen berechnet wurde (A). Die Oberflächenexpression von TRAIL auf Alveolarmakrophagen wurde durchflußzytometrisch quantifiziert (B). Die TRAIL Konzentration in der BALF von Patienten mit pH1N1 oder bakteriell induziertem ARDS (BP) wurde mittels ELISA detektiert. Die Daten zeigen die Einzelwerte (Punkte) mit Mittelwert (Balken) +/- Standardabweichung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.5 IFN- β induziert die Expression des proapoptotischen Proteins TRAIL in mAM Φ

Da sowohl die Induktion von IFN- β als auch von TRAIL eine Virusstamm-spezifische Charakteristik mit einer ähnlichen Kinetik zeigte, sollte im nächsten Schritt überprüft

werden, ob die Induktion von TRAIL nach A/PR8 Infektion IFN- β abhängig verläuft. Dafür wurden isolierte mAM Φ *in vitro* mit 18U/ml oder 180U/ml rekombinantem murinem IFN- β stimuliert, was tatsächlich zu einer zeit- und dosisabhängigen Induktion von TRAIL auf mRNA Ebene nach 6h und 12h führte (Abbildung 13A), die auf Proteinebene mittels Oberflächenfärbung durchflusszytometrisch verifiziert werden konnte, wobei die mittlere Fluoreszenzintensität von TRAIL in A/PR8 infizierten mAM Φ mit den IFN- β stimulierten Zellen vergleichbar war (Abbildung 13B).

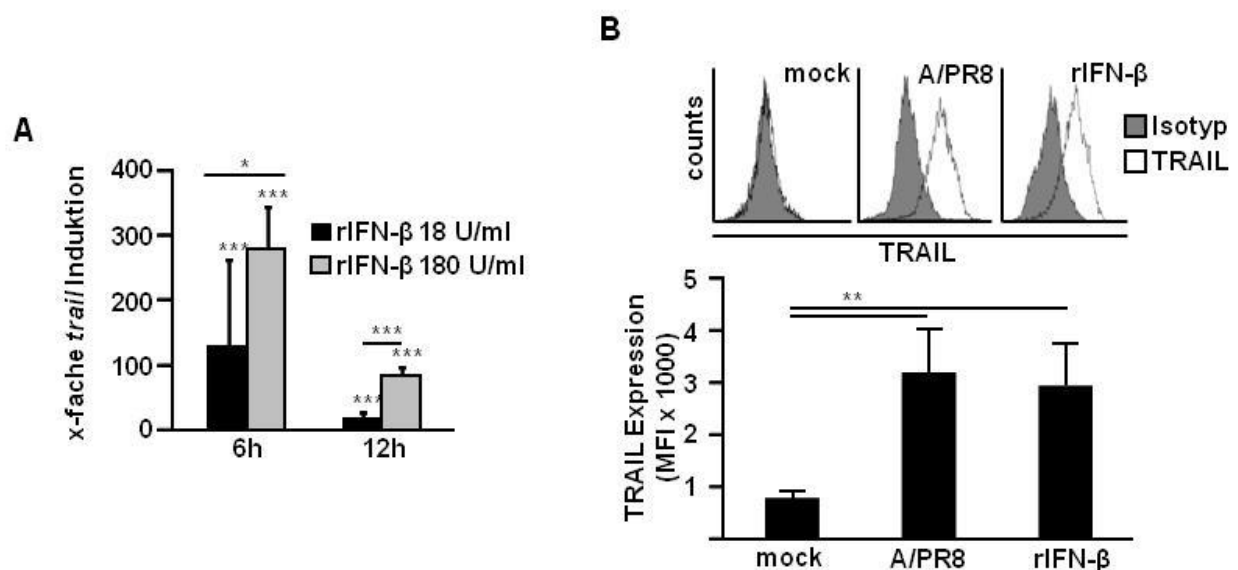


ABBILDUNG 13: REKOMBINANTES IFN- β INDUZIERT DIE EXPRESSION VON TRAIL IN AM Φ .

Isolierte mAM Φ wurden in Kultur mit 18U/ml oder 180U/ml rekombinantem IFN- β (rIFN- β) stimuliert und die x-fache Induktion der TRAIL mRNA Expression nach 6h sowie 12h quantifiziert. Die x-fache Induktion ($2^{\Delta\Delta Ct}$) wurde unter Verwendung von Aktin als Referenzgen und Verwendung von zeitspezifischen nicht infizierten Kontrollen kalkuliert (A). Isolierte mAM Φ wurden in Kultur mit einer MOI=0,1 A/PR8 oder mock-infiziert oder mit 180U/ml rekombinantem IFN- β stimuliert. Nach 24h wurde die Oberflächenexpression von TRAIL durchflusszytometrisch bestimmt. Die Daten zeigen entweder repräsentative Histogramme von Isotyp-Kontroll- oder TRAIL-gefärbten Zellen (B oben) oder die mittleren TRAIL-Fluoreszenzintensitäten (MFI) abzüglich der mittleren Isotyp-Fluoreszenzintensität (B unten). Die Daten zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von n=3 (A) oder 5 (B) unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Ob allerdings tatsächlich das von mAM Φ unter Infektionsbedingungen sezernierte IFN- β die Expression von TRAIL auto-/parakrin reguliert, sollte mit dem folgenden Experiment untersucht werden. Primäre mAM Φ wurden *in vitro* mit A/PR8 unter Verwendung einer MOI=0,1 oder MOI=1 infiziert, wobei die IFN- β -induzierte Signalkaskade an unterschiedlichen Punkten inhibiert wurde. Zur Inhibition von IFN- β selbst wurde dem Zellkulturmedium ein polyklonaler neutralisierender IFN- β Antikörper mit einer Konzentration

von 180IU/ml zugesetzt. Um die intrazelluläre IFN- β vermittelte Signalkaskade zu hemmen, wurden entweder mAM Φ aus Typ I Interferonrezeptor defizienten Mäusen (*ifnar*^{-/-}) verwendet oder dem Medium ein Jak/STAT Inhibitor (1500nM) zugegeben. Als Kontrolle wurde dem Medium anstelle der Inhibitoren ein unspezifischer Antikörper oder DMSO als Lösungsmittel des Inhibitors zugesetzt.

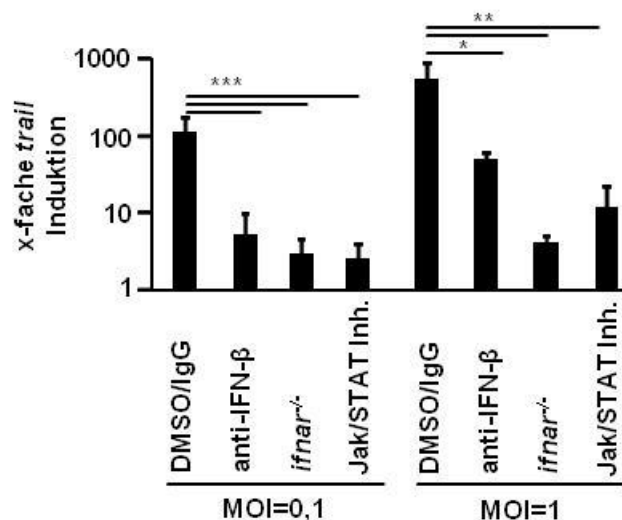


ABBILDUNG 14: DIE EXPRESSION VON TRAIL IN mAM Φ WIRD UNTER INFEKTIONSBEDINGUNGEN IFN- β ABHÄNGIG REGULIERT.

Isolierte WT oder Typ I Interferonrezeptor defiziente (*ifnar*^{-/-}) mAM Φ wurden mit einer MOI=0,1 und MOI=1 A/PR8 infiziert und DMSO in Kombination mit einer Isotypkontrolle (IgG), 180IU/ml eines polyklonalen Antikörpers gegen IFN- β (anti-IFN- β) oder ein Jak/Stat Inhibitor (Jak/STAT Inh., 1500nM) zugesetzt und die Genexpression von TRAIL bestimmt. Die x-fache Induktion ($2^{\Delta\Delta\text{act}}$) wurde unter Verwendung von Aktin als Referenzgen und Verwendung von zeitspezifischen nicht infizierten Kontrollen kalkuliert. Die Daten zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von n=4-5 unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001

Nach Analyse mittels qPCR konnte die autokrine Wirkung von unter Infektionsbedingungen gebildetem IFN- β auf die TRAIL Expression bestätigt werden, da sowohl die Zugabe des inhibitorischen IFN- β Antikörpers als auch das Fehlen des Typ I Interferonrezeptors und die Blockade der Jak/STAT Signalkaskade zu einer verminderten Induktion der TRAIL Transkription unter Verwendung beider Viruskonzentrationen führten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das unter Infektionsbedingungen gebildete IFN- β über das Binden an seinen Rezeptor und den damit aktivierten Jak/STAT Signalweg signifikant zur Hochregulation von TRAIL in mAM Φ beiträgt.

4.6 Analyse der in die Induktion von IFN- β involvierten intrazellulären Signalwege in mAM Φ

Nachdem die Relevanz von IFN- β für die Regulation von TRAIL gezeigt werden konnte, sollte die Frage geklärt werden, welche intrazellulären Signalwege in mAM Φ durch Influenzavirus Infektion induziert werden und für die IFN- β Freisetzung sowie sekundär für die Expression von TRAIL verantwortlich sind.

4.6.1 Influenzavirus Infektion aktiviert das Sensorprotein PKR in mAM Φ

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass PKR ein wichtiges Sensorprotein für RNA Viren darstellt [145]. Tatsächlich konnte die Aktivierung von PKR durch Phosphorylierung nach A/PR8 Infektion (MOI=0,1) in Zelllysaten von infizierten mAM Φ mittels Western Blot detektiert werden, wobei der Aktivierungsstatus 2h nach Infektion ein Maximum erreichte und bis 4h nach Infektion persistierte (Abbildung 15).

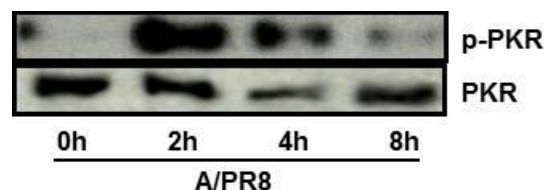


ABBILDUNG 15: PKR WIRD NACH INFLUENZAVIRUS INFEKTION AKTIVIERT.

Isolierte mAM Φ wurden *in vitro* mit einer MOI=0,1 A/PR8 infiziert und 0h, 2h, 4h und 8h nach Infektion lysiert. Ein Western Blot wurde unter Verwendung von Antikörpern gegen PKR und phospho-PKR (p-PKR) durchgeführt. Die Daten zeigen einen repräsentativen Western Blot aus drei unabhängigen Experimenten.

4.6.2 PKR aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B in mAM Φ

Im Folgeexperiment sollte untersucht werden, welche Transkriptionsfaktoren durch die A/PR8-abhängige Aktivierung von PKR induziert oder aktiviert werden. Dazu wurden mAM Φ aus WT und PKR-defizienten (*pk^r^{-/-}*) Mäusen mit einer MOI=0,1 infiziert und die NF- κ B Aktivität, die Phosphorylierung und damit Aktivierung von IRF-3 sowie die Expression von IRF-7 quantifiziert.

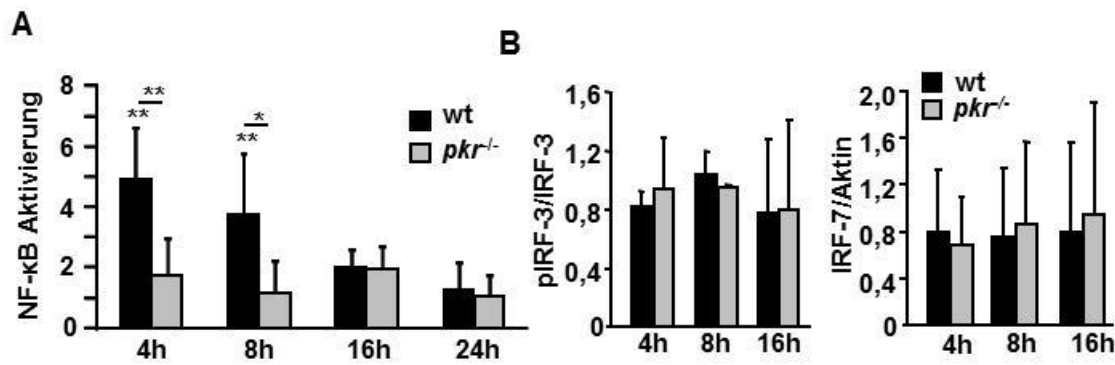


ABBILDUNG 16: PKR AKTIVIERT DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR NF-κB NACH INFLUENZA VIRUS-INFEKTION.

WT oder PKR-defiziente (*pkr*^{-/-}) mAMΦ wurden *in vitro* mit einer MOI=0,1 A/PR8 infiziert und 4h, 8h, 16h und 24h nach Infektion lysiert. Ein TransAM Assay wurde verwendet, um die Aktivierung der p65 Untereinheit von NF-κB zu bestimmen (A). Mittels Western Blot wurde die Aktivierung von IRF-3 durch Phosphorylierung (B) oder die Proteinexpression von IRF-7 im Vergleich zu Aktin densitometrisch bestimmt (C). Die Daten zeigen den Mittelwert +/- Standardabweichung von n=4 unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Die Induktion der NF-κB Aktivität war im Vergleich zu WT mAMΦ in PKR-defizienten mAMΦ drastisch verringert. 4h nach Infektion wurde in WT mAMΦ dabei die höchste Aktivierung detektiert (Abbildung 16A). Der Phosphorylierungsstatus von IRF-3 und die Expression von IRF-7 dagegen wiesen in WT und *pkr*^{-/-} mAMΦ keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 16B). Diese Daten zeigen, dass die Aktivierung von NF-κB als Antwort auf eine Infektion mit A/PR8 weitgehend in Abhängigkeit von PKR in mAMΦ erfolgt. IRF-3 und IRF-7, die in Influenza Virus-infizierten Epithelzellen zur Freisetzung von Typ I Interferonen beitragen [16], werden in A/PR8-infizierten mAMΦ dagegen nicht PKR-abhängig aktiviert.

4.6.3 PKR-abhängig aktiviertes NF-κB reguliert die IFN-β Expression in mAMΦ

Ob PKR die Expression von IFN-β steuert, sollte beantwortet werden, indem die Menge an sezerniertem IFN-β nach Infektion von WT mAMΦ Tieren mit *pkr*^{-/-} mAMΦ verglichen wurde. Die Rolle von NF-κB wurde unter Verwendung eines IKK Inhibitors untersucht, der die Aktivierung von NF-κB verhindert. Dazu wurden die isolierten mAMΦ nach Infektion mit A/PR8 (MOI=0,1) und mit einem IKK Inhibitor (25μM) oder mit DMSO als Kontrolle inkubiert und die IFN-β Konzentrationen 16h nach Infektion im Zellkulturüberstand gemessen.

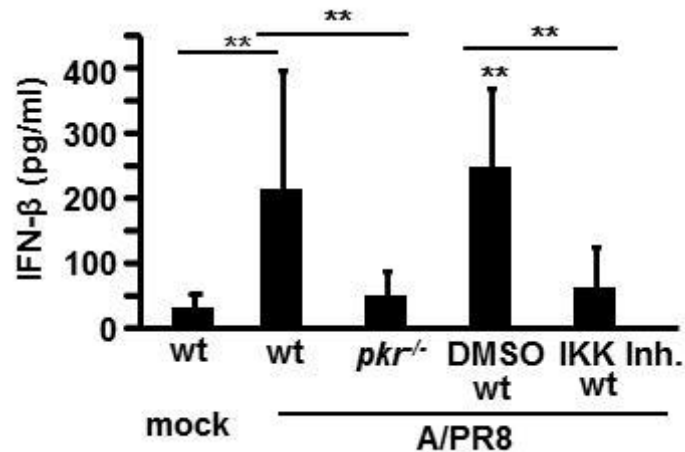


ABBILDUNG 17: PKR ABHÄNGIG AKTIVIERTES NF-κB REGULIERT DIE IFN-β SEKRETION IN mAMΦ UNTER INFEKTIONSBEDINGUNGEN.

WT oder PKR defiziente (*pk^r-/-*) mAMΦ wurden *in vitro* mit einer MOI=0,1 A/PR8 infiziert und DMSO als Lösungsmittel sowie ein IKK Inhibitor (IKK Inh.) mit einer Konzentration von 25μM zugegeben. 16h nach Infektion wurde die IFN-β Konzentration in den Zellkulturüberständen durch ELISA bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- Standardabweichung von n=4-5 unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Die virusabhängige IFN-β Bildung war sowohl in den Überständen von PKR-defizienten mAMΦ als auch nach Zusatz des IKK Inhibitors im Vergleich zu WT oder den DMSO behandelten mAMΦ signifikant verringert (Abbildung 17). Diese Daten belegen eine Schlüsselrolle von PKR-aktiviertem NF-κB bei der Typ I Interferonantwort nach Influenza Virus-Infektion in mAMΦ.

4.6.4 PKR abhängig aktiviertes NF-κB reguliert die IFN-β abhängige TRAIL Expression in mAMΦ

Um letztendlich zu zeigen, dass PKR-abhängig aktiviertes NF-κB über die Freisetzung von IFN-β die TRAIL-Expression in mAMΦ induziert, wurden WT oder *pk^r-/-* mAMΦ entweder in Gegenwart des IKK-Inhibitors oder neutralisierender anti-IFN-β Antikörper oder der jeweiligen Kontrollen mit IFN-β stimuliert oder mit A/PR8 infiziert. Wie erwartet fand sich 6h nach IFN-β Stimulation eine signifikante Induktion von TRAIL, die vergleichbar war mit der Induktion nach NF-κB Blockade oder unter PKR-Defizienz (Abbildung 18 graue Balkendiagramme). Unter Infektionsbedingungen hingegen führte sowohl die Inhibition von endogenem IFN-β, die Blockade der NF-κB-Aktivierung, sowie eine Defizienz von PKR zur signifikanten Reduktion der TRAIL Hochregulation in mAMΦ (Abbil-

dung 18 schwarze Balkendiagramme). Zusammen mit den zuvor gezeigten Daten belegt dies eine Influenza Virus-abhängige Signalkaskade in mAMΦ, welche zunächst die PKR-abhängige Aktivierung von NF-κB involviert, die zur Freisetzung von IFN-β führt. IFN-β induziert schließlich auto- und parakrin die Hochregulierung von TRAIL über den Typ I IFN Rezeptor (IFNAR) und den Jak/STAT Signalweg.

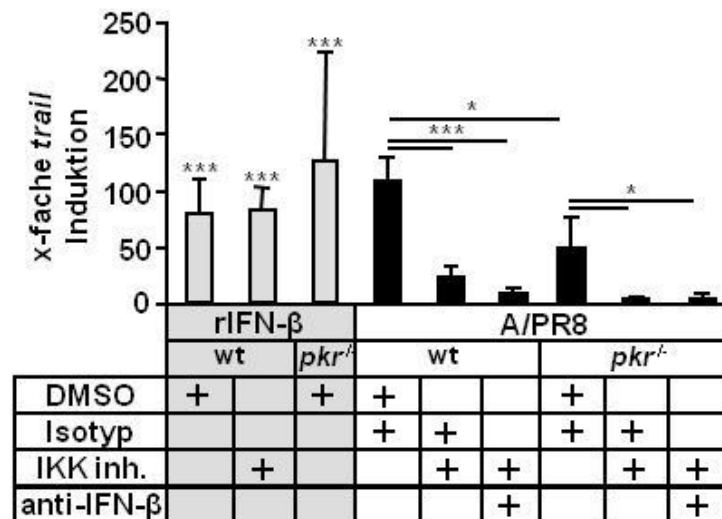


ABBILDUNG 18: PKR-/NF-κB-ABHÄNGIG SEZERNIERTES IFN-β REGULIERT DIE TRANSKRIPTION VON TRAIL IN mAMΦ.

WT oder PKR defiziente (*pkr*^{-/-}) mAMΦ wurden *in vitro* mit rekombinantem IFN-β (180U/ml) stimuliert oder mit einer MOI=0,1 A/PR8 infiziert und DMSO also Lösungsmittel (Kontrolle), ein IKK Inhibitor (IKK Inh.) mit einer Konzentration von 25μM, ein anti-IFN-β Antikörper mit einer Konzentration von 180IU/ml oder dessen Isotyp-Kontrolle dem Zellkulturmedium zugesetzt. 16h nach Infektion oder 6h nach IFN-β Stimulation wurde die Induktion von TRAIL auf mRNA Ebene ermittelt. Die x-fache Induktion ($2^{\Delta\Delta Ct}$) wurde unter Verwendung von Aktin als Referenzgen und Verwendung von zeitspezifischen nicht infizierten Kontrollen kalkuliert. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- Standardabweichung von n=3-5 unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

4.7 A/PR8 induziert die DR5 Rezeptor Expression IFN-β unabhängig

TRAIL bindet in murinen Zellen an seinen Rezeptor DR5, der intrazellulär das Apoptosignal in der Zielzelle vermittelt. Um zu überprüfen, ob die A/PR8-Infektion von AEC zu einer Hochregulation von DR5 führt, wurden murine AEC oder primäre humane AEC mit einer MOI=0,1 oder MOI=1 infiziert und die DR5 mRNA Expression analysiert. 48h p.i. fand sich eine signifikante Hochregulation sowohl in murinen als auch in humanen AEC (Abbildung 19A).

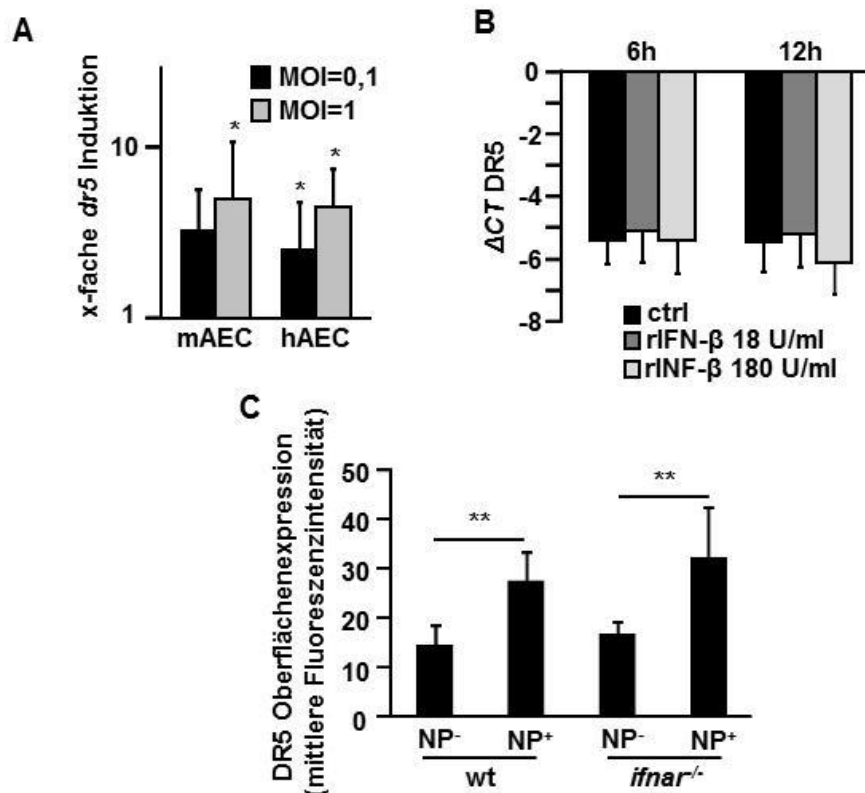


ABBILDUNG 19: DR5 WIRD IFN- β UNABHÄNGIG IN AEC UNTER INFEKTIONSBEDINGUNGEN REGULIERT.

Primäre murine (mAEC) oder humane AEC (hAEC) wurden *in vitro* mit einer MOI=0,1 und MOI=1 A/PR8 infiziert. 48h nach Infektion wurde die Expression von DR5 auf mRNA Ebene mittels qPCR detektiert und unter Verwendung von Aktin als Referenzgen und zeitspezifischen nicht infizierten Kontrollen die x-fache Induktion ($2^{\Delta\Delta ct}$) kalkuliert (A). Murine AEC wurden mit 18U/ml oder 180U/ml rekombinanten IFN- β (rIFN- β) stimuliert und die DR5 Expression nach 6h und 12h ermittelt und der Δct unter Verwendung von Aktin als Referenzgen kalkuliert (B). WT und *ifnar*^{-/-} Mäuse wurden mit 500pfu A/PR8 infiziert und die DR5 Expression auf CD45⁺CD31⁺EpCam⁺ AEC im Lungenhomogenat durchflußzytometrisch 5 Tage p.i. quantifiziert (C). Die Daten zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von n=5 unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Allerdings zeigte sich nach Stimulation mit 18U/ml und 180U/ml rekombinanten IFN- β auf mRNA Ebene nach 6h und 12h keine Induktion des DR5 Rezeptors in murinen AEC (Abbildung 19B) und die DR5 Oberflächenexpression in A/PR8-infizierten WT versus *ifnar*^{-/-} Mäusen war nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 19C). Somit konnte eine IFN- β abhängige Regulation des TRAIL Rezeptors auf AEC ausgeschlossen werden. DR5 war deutlich auf nicht-infizierten AEC exprimiert. Jedoch zeigten infizierte AEC eine signifikant höhere Oberflächenexpression des Rezeptors im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen, was durch eine Ko-Färbung mit einem spezifischem anti-Influenzavirus Nukleoprotein (NP) Antikörper durchflußzytometrisch in mit MOI=0,1 infizierten murinen AEC 48h p.i. detektiert werden konnte (Abbildung 19C und 20).

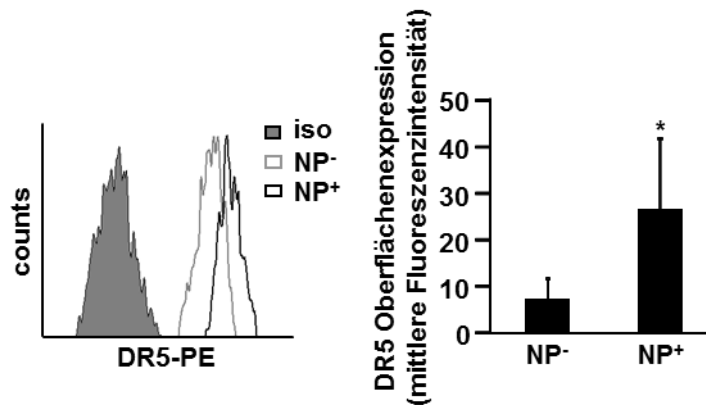


ABBILDUNG 20: NP POSITIVE ZELLEN ZEIGEN EINE ERHÖHTE DR5 EXPRESSION NACH A/PR8 INFektion.

mAEC wurden in Kultur mit einer MOI=0,1 A/PR8 infiziert und 48h p.i. die Expression von DR5 und Influenzavirus Nukleoprotein (NP) durchflusszytometrisch bestimmt. Als Negativkontrolle wurden isotypspezifische Antikörper (IgG) verwendet. Die Daten zeigen ein repräsentatives Histogramm der IgG, sowie DR5 gefärbten NP⁻ und NP⁺ AEC, sowie die Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität von DR5 abzüglich der mittleren Fluoreszenzintensität der IgG Kontrolle +/- Standardabweichung von n=4-5 unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

4.8 PKR und IFN- β -abhängig exprimiertes TRAIL induziert Apoptose in AEC

Um im nächsten Schritt zu überprüfen, ob von infizierten mAM Φ sezerniertes TRAIL Apoptose in nicht-infizierten oder infizierten AEC induzieren kann, wurden infizierte mAM Φ mit nicht-infizierten oder A/PR8-infizierten murinen AEC kokultiviert, wobei zusätzlich ein neutralisierender anti-TRAIL Antikörper zugesetzt wurde (Abbildung 21A).

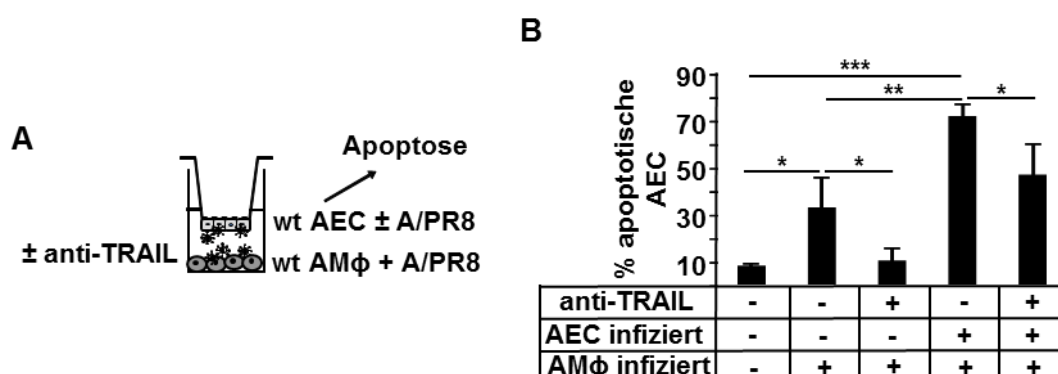


ABBILDUNG 21: MAM Φ -SEZERNIERTES TRAIL INDUZIERT APOPTOSE IN INFIZIERTEN UND NICHT-INFIZIERTEN AEC.

Murine AEC wurden mit murinen AM Φ kokultiviert, die AM Φ mit einer MOI=0,1 und die AEC mit einer MOI=0,01 A/PR8 in An- oder Abwesenheit eines anti-TRAIL Antikörpers (anti-TRAIL) oder dessen Isotypkontrolle infiziert. Nach 48h wurde die Zahl an apoptotischen Annexin-V⁺/Propidiumiodid⁻ mAEC durchflusszytometrisch gemessen (A). Die Daten zeigen den Mittelwert der prozentualen Anzahl an Annexin-V⁺/Propidiumiodid⁻ AEC +/- Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten (B). * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Signifikante Apoptose in mAEC wurde dabei bereits allein durch die Ko-Kultur mit infizierten mAMΦ induziert. Das Ausmaß der mAEC Apoptose stieg deutlich an, wenn diese zusätzlich A/PR8-infiziert waren. Die mAEC Apoptose konnte in beiden Fällen durch die Zugabe eines anti-TRAIL Antikörpers signifikant reduziert werden (Abbildung 21B). Diese Daten belegen die Relevanz von mAMΦ-sezerniertem TRAIL für die Ausbildung des Influenzavirus-induzierten apoptotischen Alveolarepithelzellschadens *in vitro*. Wie in Abbildung 22 gezeigt, sezernierten A/PR8-infizierte *pkc^{-/-}*, *ifnar^{-/-}* und *trail^{-/-}* mAMΦ signifikant weniger TRAIL in den Zellkulturüberstand als WT mAMΦ. Um die Relevanz dieser Signalmoleküle, welche zur Induktion von TRAIL in mAMΦ führen, für die Apoptose-Induktion in mAEC zu ermitteln, wurden WT, *pkc^{-/-}*, *ifnar^{-/-}* und *trail^{-/-}* mAMΦ in Kultur mit einer MOI=0,1 A/PR8 infiziert, mit nicht-infizierten WT mAEC kokultiviert und die Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 23A).

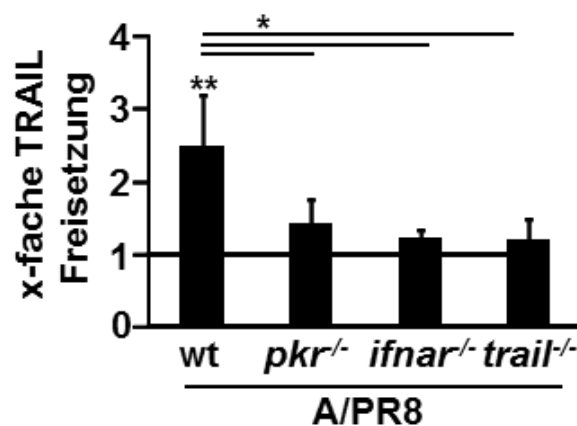


ABBILDUNG 22: PKC ODER IFNAR DEFIZIENZ REDUZIERT DIE TRAIL SEKRETION VON INFIZIERTEN AMΦ.

WT (wt), *pkc^{-/-}*, *ifnar^{-/-}* und *trail^{-/-}* AMΦ wurden in Kultur mit einer MOI=0,1 A/PR8 infiziert und die TRAIL Konzentrationen 48h p.i. in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die Induktion wurde berechnet, indem die Konzentration in den Überständen der infizierten Zellen durch die Konzentration in Überständen von nicht infizierten Zellen dividiert wurde. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- Standardabweichung von n=5 unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

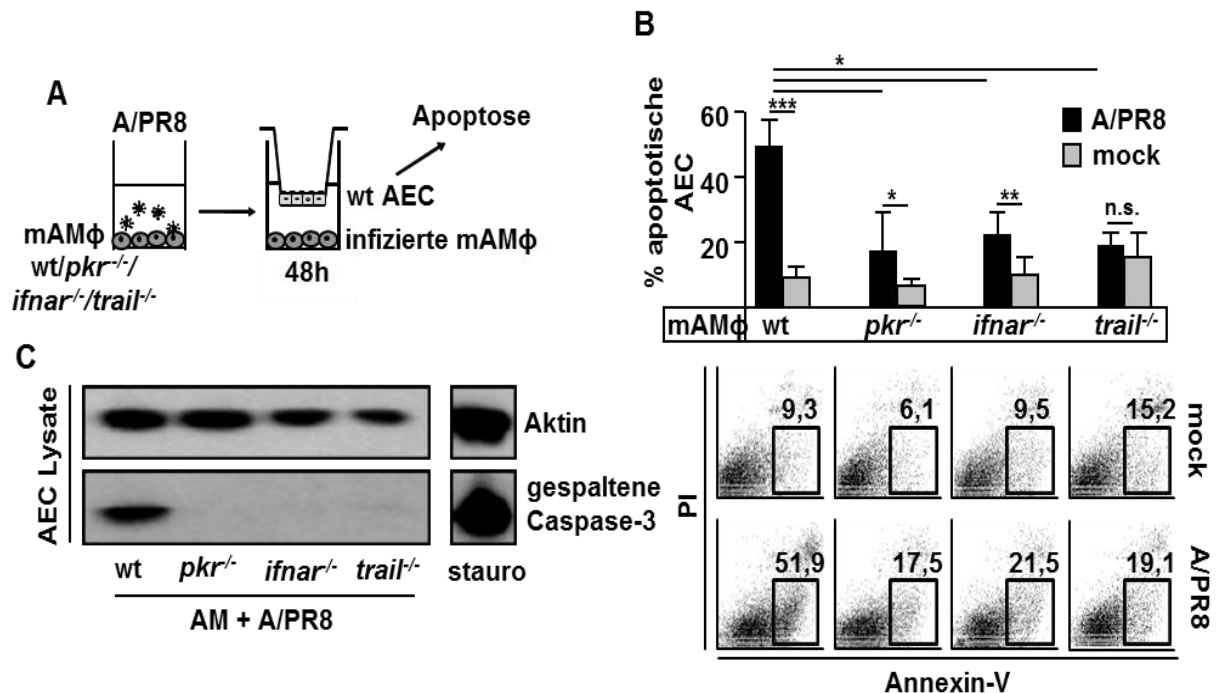


ABBILDUNG 23: PKR-, IFNAR- ODER TRAIL-DEFIZIENZ IN MAMΦ ATTENUIERT DIE ALVEOLAREPITHEL-ZELLAPOPTOSE.

mAMΦ wurden aus WT, PKR-, IFNAR- oder TRAIL-defizienten Mäusen isoliert und mit einer MOI=0,1 A/PR8 infiziert, danach mit WT AEC kokultiviert (A) und nach 48h die AEC Apoptoserate durchflusszytometrisch mit Annexin-V Färbung unter Ausschluss von Propidiumiodid⁺ (PI) Zellen bestimmt. Abgebildet sind repräsentative FACS Plots (B unten) und der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von n=5 unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (B oben). Mittels Western Blot wurde die Apoptoserate der mAEC durch Antikörper gegen gesplante Caspase-3 und Aktin als Ladekontrolle bestimmt. Die Daten zeigen einen repräsentativen Blot aus 3 unabhängigen Experimenten (C).

Es zeigte sich sowohl durch Quantifizierung der Annexin-V-Bindung als auch der Menge gesplanter Caspase-3 eine signifikante Reduktion der Apoptoserate in mAEC, wenn diese mit infizierten PKR-, IFNAR- oder TRAIL-defizienten im Vergleich zu WT mAMΦ kokultiviert wurden. Analog zu den oben genannten Daten zeigen diese Experimente, dass sowohl PKR als auch Typ I Interferon-induzierte Signalwege in mAMΦ signifikant zum apoptotischen Alveolarepithelzellschaden beitragen (Abbildung 23).

4.9 Die Rolle von mAMΦ-sezerniertem IFN-β in der Induktion des TRAIL-vermittelten Lungenschadens im Tiermodell

Im *in vivo* Infektionsmodell sollten die *in vitro* erarbeiteten mAEC Apoptose-Signalwege bestätigt werden. Abbildung 24 zeigt, dass die intratracheale Applikation von rekombinantem IFN-β in A/PR8-infizierten WT Mäusen die TRAIL-Konzentration in der BALF

induzierte (Abbildung 24A). Die systemische Gabe eines anti-TRAIL Antikörpers nach intratrachealer IFN- β Applikation reduzierte die prozentuale Anzahl an apoptotischen AEC im Lungenhomogenat (Abbildung 24B) sowie den infektionsassoziierten Lungenschaden (Abbildung 24C) am Tag 7 p.i. signifikant.

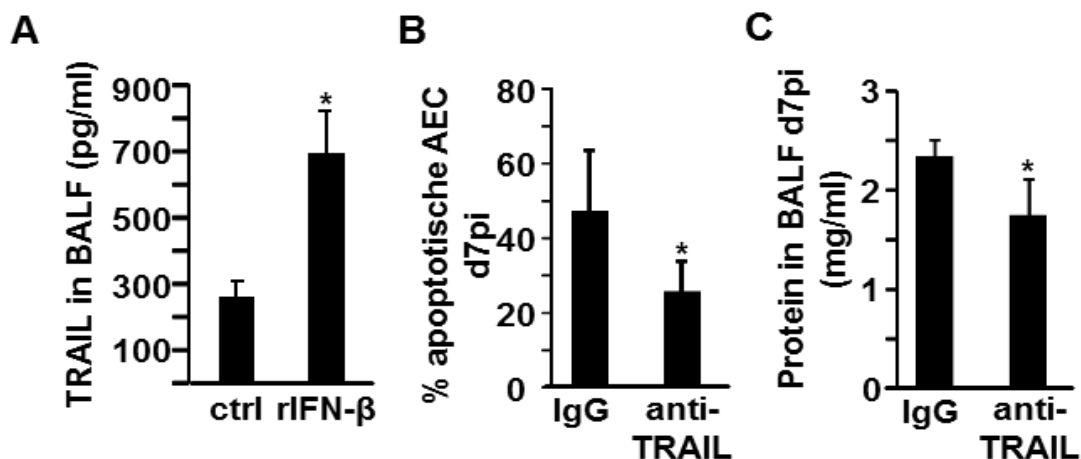


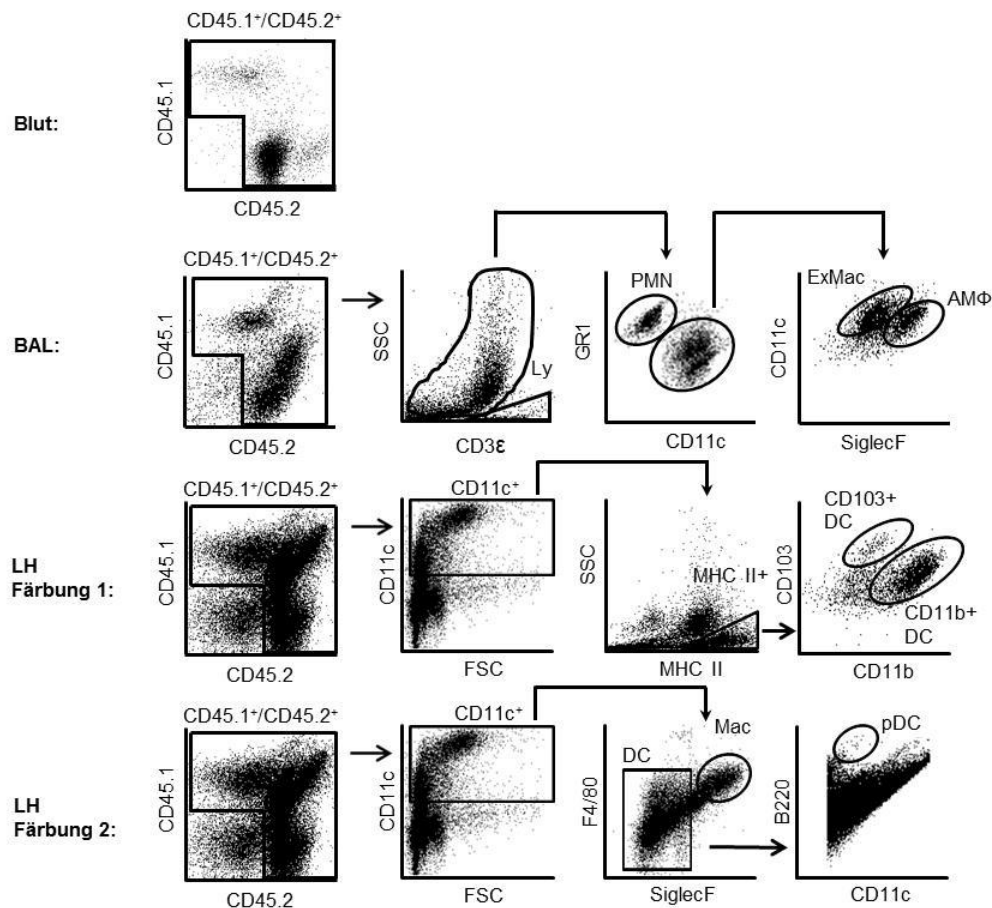
ABBILDUNG 24: IFN- β INDUZIERT DIE SEKRETION VON TRAIL-VERMITTELTEM APOPTOTISCHEM LUNGENSCHADEN IN A/PR8-INFIZIERTEN MÄUSEN.

WT Tiere wurden mit 500pfu A/PR8 infiziert und an Tag 5 p.i. mit 10.000U rekombinantem murinem IFN- β (rIFN- β) oder 0,1% BSA als Kontrolle (ctrl) intratracheal behandelt. An Tag 6 nach Infektion wurde die TRAIL Konzentration in der BALF mittels ELISA gemessen (A). WT Mäuse wurden mit 500pfu A/PR8 infiziert und an Tag 5 p.i. mit 10.000U rekombinantem murinem IFN- β intratracheal behandelt, wobei an Tag 3 und 5 nach Infektion zusätzlich 150 μ g eines anti-TRAIL Antikörpers oder dessen Isotyp-Kontrolle (IgG) intraperitoneal appliziert wurde. An Tag 7 p.i. wurde die prozentuale Zahl an Annexin-V⁺Propidiumiodid⁺CD45⁺CD31⁺Epcam⁺ AEC im Lungenhomogenat durchflusszytometrisch gemessen (B) und die Totalproteinkonzentration in der BALF bestimmt (C). Die Daten geben den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von n=5 Tieren/Gruppe an. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Im nächsten Schritt sollte die Rolle mononukleärer Phagozyten bei der PKR-abhängigen IFN- β Sekretion und dessen Einfluss auf den TRAIL-vermittelten apoptotischen Lungenschaden *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden zunächst knochenmarkschimäre Mäuse generiert.

4.9.1 Evaluation eines Knochenmarkstransplantationsmodells

Zur Evaluation des Modells wurden Ly5.1 Tiere als Empfängerermäuse verwendet, deren Leukozyten eine nicht funktionale Mutation des Panleukozytenmarkers CD45 (CD45.1) aufweisen. Alle weiteren eingesetzten Mauslinien exprimieren das CD45.2 Allel. Durch die Verwendung dieses Modells und spezifischer anti-CD45.1 und-CD45.2 Antikörper können Leukozyten von Spender und Empfänger durchflusszytometrisch unterschieden werden. Zwei Wochen, 4 Wochen, 8 Wochen und 12 Wochen nach letaler Bestrahlung von CD45.1⁺ Empfängerermäusen und Transplantation von CD45.2⁺ Spenderknochenmark, wurde der Austausch der Empfänger- durch Spenderleukozyten durchflusszytometrisch im peripheren Blut und in der Lunge überprüft, wobei eine differenzierte Analyse des Austausches verschiedener Leukozytensubpopulationen in der BALF und im Lungenzellhomogenat durchgeführt wurde. In den BALF-Leukozyten wurde der Austausch von Neutrophilen Granulozyten (PMN; GR1⁺), Exsudatmakrophagen (CD11c^{low}SiglecF⁻GR1⁺MHCII^{dim}), residenten AM ϕ (CD11c^{low}SiglecF⁺GR1⁺MHCII^{low}) und T-Lymphozyten (CD3 ϵ ⁺) bestimmt. Im Lungenhomogenat wurde zwischen interstitiellen Makrophagen (CD11c⁺SiglecF⁺F4/80⁺) und dendritischen Zellen wie pDCs (CD11c⁺SiglecF⁻MHCII⁺B220⁺), CD103⁺ DCs (CD11c⁺SiglecF⁻MHCII⁺CD103⁺) und CD11b⁺ DCs (CD11c⁺SiglecF⁻MHCII⁺CD11b⁺) unterschieden. Die „Gating“-Strategie ist in Abbildung 25 dargestellt. Die „gegateten“ Zellen wurden anschließend hinsichtlich ihrer Expression von CD45.1 und CD45.2 als Maß für den Zellaustausch analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 tabellarisch dargestellt.



% CD45.2 positive Leukozyten +/- Standardabweichung in Blut, BALF und Lungenhomogenat

		2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen
Blut	Gesamtleukozyten	84 +/- 3	83 +/- 5	90 +/- 5	91 +/- 1
BALF	residente Alveolarmakrophagen	1 +/- 1	32 +/- 20	84 +/- 11	86 +/- 14
	Exsudatmakrophagen	87 +/- 12	82 +/- 2	93 +/- 6	95 +/- 2
	Neutrophile	99 +/- 1	95 +/- 6	98 +/- 1	99 +/- 1
	T-Lymphozyten	89 +/- 9	36 +/- 3	43 +/- 9	63 +/- 4
Lungen-homogenat	interstitielle Makrophagen	38 +/- 1	70 +/- 9	78 +/- 12	86 +/- 9
	CD11b+ DC	52 +/- 3	93 +/- 5	98 +/- 1	96 +/- 4
	CD103+ DC	91 +/- 3	n.a.	99 +/- 1	89 +/- 7
	pDC	97 +/- 5	90 +/- 17	92 +/- 9	98 +/- 4

ABBILDUNG 25: DARSTELLUNG DER „GATING“ STRATEGIE UND DES ZELLAUSTAUSCHES NACH KNOCHENMARKS-TRANSPLANTATION

Blutleukozyten wurden hinsichtlich der CD45.1 und CD45.2 Expression analysiert. Aus den Zellen der BALF wurde der Anteil CD45.1 und CD45.2 positiver T-Lymphozyten (Ly; CD3ε⁺), Neutrophilen (PMN, GR1⁺), Exsudatmakrophagen (ExMac, CD11c⁺SiglecF⁺) und Alveolarmakrophagen (AMΦ, CD11c⁺SiglecF⁺) bestimmt. Im Lungenhomogenat (LH) wurden der Austausch von CD103⁺ (MHC II⁺CD103⁺) und CD11b⁺ (MHC II⁺CD11b⁺) dendritischen Zellen (DC) (Färbe-strategie 1) und der Austausch plasmazytoider DC (pDC, CD11c⁺B220⁺) und interstitieller Makrophagen (Mac, CD11c⁺F4/80⁺ SiglecF⁺) (Färbe-strategie 2) anhand der Expression von CD45.1 und CD45.2 bestimmt. Die Pfeile markieren die Zellpopulation, die weiter anhand von „Subgates“ analysiert wurde. Die Tabelle zeigt den prozentualen Austausch +/- Standardabweichung von n=4 Tieren/Zeitpunkt (unten). n.a. nicht analysiert.

Es zeigte sich ein nahezu kompletter Austausch der Blutleukozyten bereits nach 2 Wochen. In der Lavage und im Lungenhomogenat dagegen waren erst 8 Wochen nach Transplantation alle mononukleären Phagozyten-Populationen zu >90% ausgetauscht (Abbildung 25, Tabelle), weshalb die Mäuse für die nachfolgenden Infektionsexperimente 8 Wochen nach Transplantation verwendet wurden. Hieraus ergab sich der in Abbildung 26 dargestellte Versuchsaufbau.

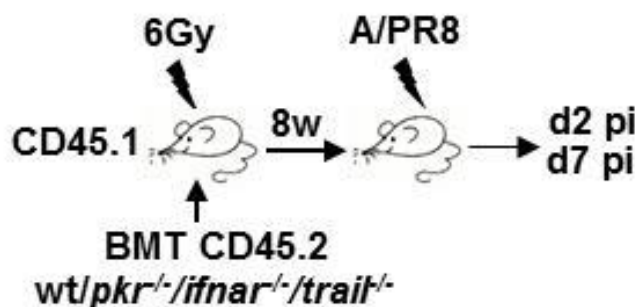


ABBILDUNG 26: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSAUFBAUS.

CD45.1 Mäuse wurden letal bestrahlt und mit Knochenmarkszellen (BM) von WT, *prk^{-/-}*, *ifnar^{-/-}* oder *trail^{-/-}* Mäusen transplantiert. Nach 8 Wochen (8w) wurden die Tiere mit 350pfu A/PR8 infiziert und an Tag 2 (d2) oder Tag 7 (d7) nach Infektion ausgewertet.

4.9.2 Untersuchung der Expression von TRAIL

Zunächst sollte im knochenmarkschimären Mausmodell überprüft werden, ob Phagozyten-exprimiertes PKR oder IFNAR die alveoläre Freisetzung von TRAIL nach *in vivo* Influenza Virus-Infektion vermittelt. Weiterhin wurde untersucht, ob die Expression von membrangebundenem TRAIL auf mononukleären Phagozyten in knochenmarkschimären Mäusen verringert war. Dazu wurden die knochenmarkschimären Mäuse (Spender: WT, PKR-, IFNAR- oder TRAIL- defizient; Empfänger: WT) wie in Abbildung 26 gezeigt, mit 350pfu A/PR8 infiziert und die Konzentration von TRAIL in der BALF sowie die TRAIL-Oberflächenexpression 2 Tage p.i. auf Subpopulationen mononukleärer Phagozyten bestimmt.

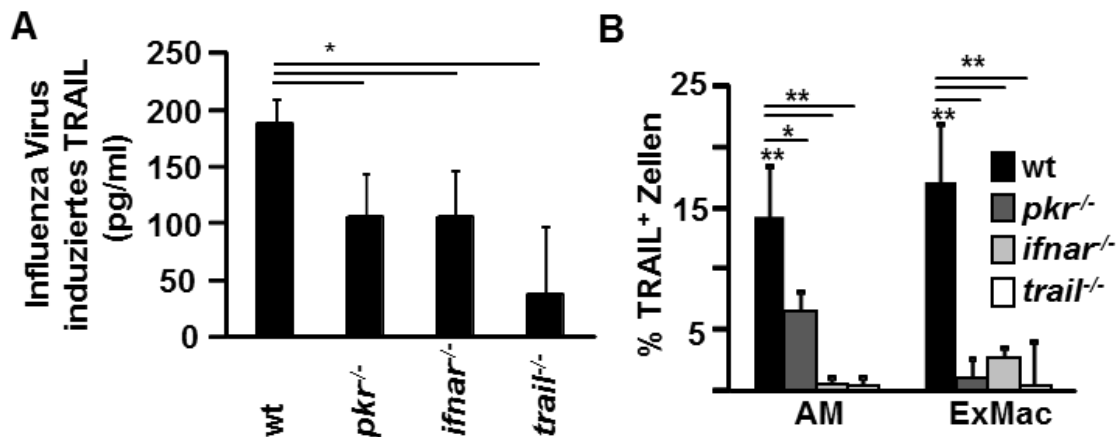


ABBILDUNG 27: DIE ALVEOLÄRE EXPRESSION VON TRAIL IST ABHÄNGIG VON PKR UND IFNAR IN REKRUTIERTEN UND RESIDENTEN ALVEOLARMAKROPHAGEN.

Knochenmarkschimäre Mäuse mit myeloiden Zellen des Genotyps WT, *pkr*^{-/-}, *ifnar*^{-/-} und *trail*^{-/-} wurden mit 350pfu A/PR8 infiziert und die Konzentration von TRAIL in der BALF durch ELISA (A) sowie die Expression von TRAIL auf residenten Alveolarmakrophagen (AMΦ) und rekrutierten Exsudatmakrophagen (Ex-Mac) an Tag 2 p.i. durchflusszytometrisch bestimmt (B). Die Daten zeigen den Mittelwert von 6 Tieren/Gruppe +/- Standardabweichung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Es zeigte sich eine infektionsabhängige TRAIL-Induktion in WT-transplantierten Tieren und eine signifikante Reduktion in Mäusen mit myeloider Defizienz von PKR, IFNAR oder TRAIL (Abbildung 27A). In der BALF zeigten sowohl Exsudatmakrophagen als auch mAMΦ nach Infektion eine erhöhte TRAIL Oberflächenexpression im Vergleich zu PBS behandelten WT-transplantierten Tieren (Exsudatmakrophagen: 1,0 +/- 1,6%; mAMΦ: 2 +/- 1,6 %, nicht gezeigt), die in den knockout-transplantierten Empfängern signifikant verringert vorlag (Abbildung 27B). Auf den übrigen analysierten myeloiden pulmonalen Leukozytenpopulationen, wie den neutrophilen Granulozyten, interstitiellen Makrophagen, den pDCs, CD103⁺ und CD11b⁺ dendritischen Zellen konnte TRAIL in infizierten Mäusen nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Durch die Verwendung der *pkr*^{-/-} und *ifnar*^{-/-} Chimären konnten somit *in vivo* die PKR- und IFN-β-Abhängigkeit der TRAIL Expression in mAMΦ sowie in alveolär rekrutierten Exsudatmakrophagen in der Influenzavirus Pneumonie bestätigt und rekrutierte und residente Makrophagen als primäre Quelle dieses pro-apoptotischen Faktors identifiziert werden.

4.9.3 Untersuchung der Rolle von Makrophagen-exprimiertem TRAIL in der Induktion der Alveolarepithelzellapoptose

Es wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die verminderte TRAIL Expression in chimären Mäusen mit PKR- und IFNAR-defizienten mAMΦ auch zu einer verringerten Apoptose und verbesserten Schrankenfunktion der Lunge führt. Dazu wurden die chimären Tiere mit A/PR8 infiziert und der Anteil apoptotischer AEC sowie die Menge gespaltener Caspase-3 an Tag 7 p.i. bestimmt.

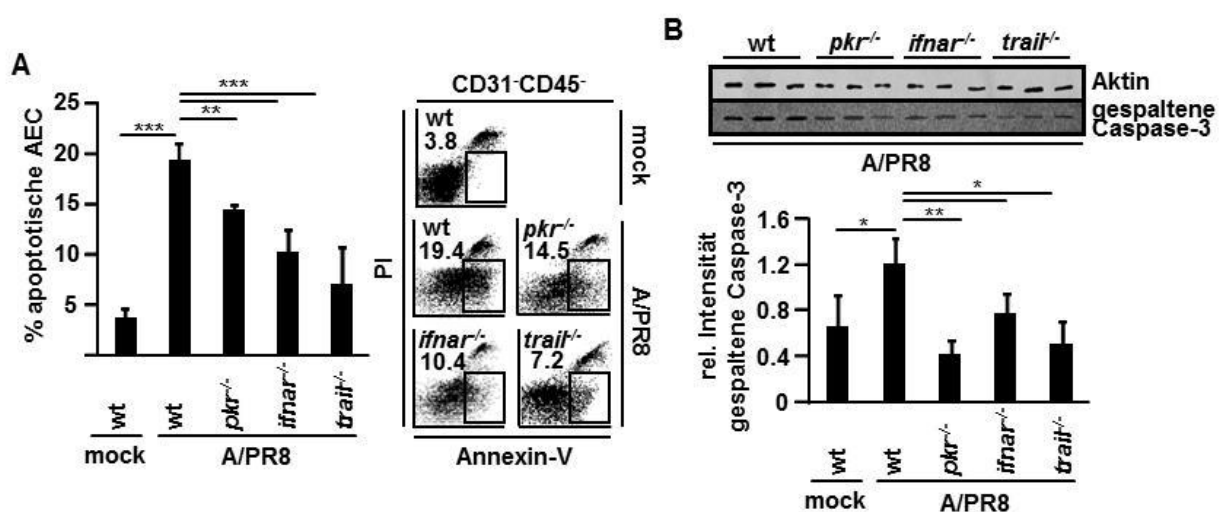


ABBILDUNG 28: DIE APOPTOSE VON AEC IST ABHÄNGIG VON LEUKOZYTÄR EXPRIERTEM PKR, IFNAR UND TRAIL IN DER INFLUENZAVIRUS PNEUMONIE.

Die Apoptoserate von CD45⁺CD31⁺EpCam⁺ Alveolarepithelzellen aus Lungenhomogenaten von mock-infizierten oder infizierten (A/PR8, 350pfu) chimären Mäusen wurden an Tag 7 nach Infektion durchflusszytometrisch unter Verwendung von Annexin-V und Propidiumiodid (PI) quantifiziert (A). AEC wurden an Tag 7 p.i. isoliert und die Expression von gespaltener Caspase-3 mittels Western Blot analysiert. Außerdem erfolgte eine densitometrische Auswertung unter Verwendung von Aktin als Referenz (B). Die Daten zeigen den Mittelwert von 6 Tieren/Gruppe +/- Standardabweichung. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Die Infektion mit A/PR8 induzierte signifikant Alveolarepithelzellapoptose in WT-transplantierten Kontroll-Mäusen. Die Zahl an Annexin-V⁺ Zellen stieg von 3,8% in PBS behandelten Tieren auf 19,4% in infizierten Tieren an. Dies war signifikant attenuiert in den Tieren, die mit *pk^r-/-*, *ifn^ar^{-/-}* oder *trail^{-/-}* Knochenmarkzellen transplantiert worden waren (Abbildung 28A, B). Damit konnten die bereits *in vitro* gezeigten Effekte der PKR vermittelten Sekretion von IFN-β in mAMΦ und dessen Potential über die Expression von TRAIL Apoptose in AEC zu induzieren auch *in vivo* bestätigt werden. Die Rolle der Influenzavirus-induzierten PKR-IFN-β-TRAIL Signalkaskade in der alveolären Schran-

kenfunktion, Morbidität und in der Wirtsabwehr von mAMΦ sollte im Weiteren untersucht werden.

4.9.4 Untersuchung der Barrierefunktion der Lunge in Influenzavirus-infizierten knochenmarkschimären Mäusen

Als Maß für die alveoläre Barrierefunktion der Lunge, die im Wesentlichen durch die Integrität der AEC determiniert ist, wurde der Übertritt FITC-markierten Albumins aus dem Gefäßbett in den Alveolarraum am Tag 7 p.i. (mock- oder A/PR8-infiziert) in knochenmarkschimären Mäusen bestimmt.

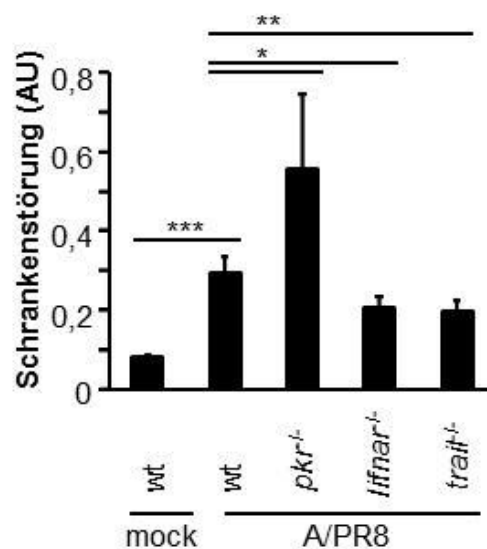


ABBILDUNG 29: ALVEOLÄRE SCHRANKENFUNKTION DER LUNGE IN KNOCHENMARKSCHIMÄREN MÄUSEN NACH A/PR8-INFEKTION.

WT, *pkr*^{-/-}, *ifnar*^{-/-} und *trail*^{-/-} chimäre Mäuse wurden mit 350pfu oder mock infiziert und der alveoläre Übertritt FITC-markierten, intravenös applizierten Albumins an Tag 7 p.i. bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert der AU (arbitrary units, FITC-Intensität Lavage/FITC-Intensität Serum) von 5-6 Tieren/Gruppe +/- Standardabweichung. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

Es zeigte sich ein signifikanter Verlust der alveolären Schrankenfunktion nach Infektion in WT-transplantierten Kontrolltieren im Vergleich zu mock-infizierten Tieren. Die fehlende Expression von leukozytärem IFNAR oder TRAIL resultierte in einer signifikanten Reduktion der alveolären Albuminleakage, wohingegen die fehlende PKR-Expression die Schrankenfunktion trotz reduzierter TRAIL-Konzentration in der BALF (Abbildung

27) verschlechterte (Abbildung 29). Um zu überprüfen, ob die reduzierte Schrankenfunktion in *pk^r*^{-/-}-transplantierten Chimären auf einer eingeschränkten Wirtsabwehrfunktion mit Persistenz von Influenza Viren im Alveolarraum beruhte, wurde die Viruskonzentration in der BALF infizierter Mäuse 7 Tage p.i. bestimmt.

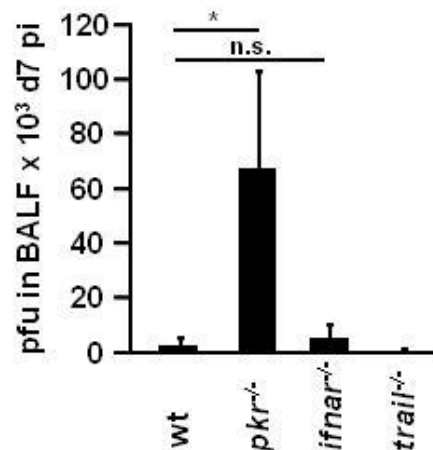


ABBILDUNG 30: PKR^{-/-}-TRANSPLANTIERTE CHIMÄRE ZEIGEN EINE VERZÖGERTE ELIMINIERUNG DER VIRUSPARTIKEL IN DER BALF.

WT, *pk^r*^{-/-}, *ifnar*^{-/-} und *trail*^{-/-} knochenmarkschimäre Mäuse wurden mit 350pfu A/PR8 infiziert und die Menge infektiöser Viruspartikeln in der BALF (pfu) durch Plaque Assay am Tag 7 p.i. bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert von 5-6 Tieren/Gruppe +/- Standardabweichung. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001, n.s. nicht signifikant.

Tatsächlich zeigten die *pk^r*^{-/-}-transplantierten Chimären eine deutlich reduzierte Virus-Clearance im Vergleich zu den WT Chimären, wohingegen die *ifnar*^{-/-} und *trail*^{-/-}-transplantierten Mäuse in der Lage sind, das Virus effizient zu beseitigen (Abbildung 30). Damit könnte die verschlechterte alveoläre Schrankenfunktion in den *pk^r*^{-/-}-transplantierten Mäusen auf eine höhere Zahl an infizierten AEC mit persistierendem zytopathischen Effekt zurückzuführen sein.

Zuletzt wurde die Rolle des Leukozyten-exprimierten TRAIL in der Induktion von Gewichtsverlust als Maß für die Morbidität nach Infektion evaluiert. Hierfür wurden die Tiere mit 350pfu A/PR8 infiziert und über 21 Tage täglich gewogen. Wie in Abbildung 31 gezeigt, waren die reduzierte Apoptoserate von AEC und die attenuierte alveoläre Schrankenstörung in *trail*^{-/-} im Vergleich zu WT-transplantierten chimären Mäusen mit einem signifikant reduzierten Gewichtsverlust assoziiert.

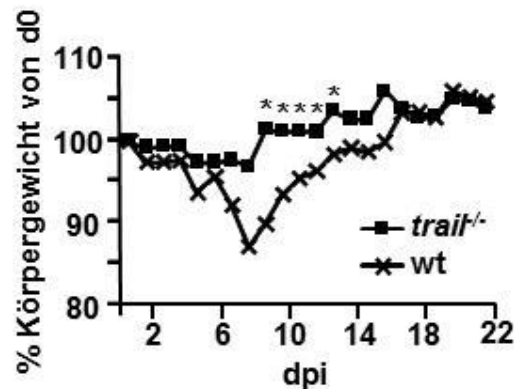


ABBILDUNG 31: DIE GEWICHTSKURVEN VON TRAIL^{-/-}-TRANSPLANTIERTEN CHIMÄREN ZEIGEN EINEN ATTENUIER-
TEN VERLAUF DER A/PR8 PNEUMONIE.

WT und *trail*^{-/-} knochenmarkschimäre Mäuse wurden mit 350pfu A/PR8 infiziert und täglich gewogen. Die Daten zeigen den Mittelwert des Gewichtes prozentual zum Ausgangsgewicht von 7-8 Tieren/Gruppe +/- Standardabweichung. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

4.10 Modell zur TRAIL-vermittelten Apoptose bei einer Influenzavirus Pneumonie

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Influenzavirus-induzierte Apoptose von AEC auf der Expression des Typ I Interferons IFN-β und von TRAIL in infizierten residenten und rekrutierten Alveolarmakrophagen beruht. TRAIL als Typ I Interferon-abhängiges Genprodukt wird durch einen PKR-NF-κB-abhängigen Signalweg induziert, der zur Freisetzung von IFN-β aus Alveolarmakrophagen führt, welches dann autokrin die Expression von TRAIL induziert. Der TRAIL-Rezeptor DR5 ist konstitutiv auf Alveolarepithelzellen exprimiert und wird in Influenza Virus-infiziertem Alveolarepithel IFN-β-unabhängig hochreguliert. Alveolarmakrophagen als primäre Quelle der pro-apoptotischen IFN-β-TRAIL-Signalkaskade tragen somit signifikant zum Influenzavirus-induzierten Lungenschaden (ALI) bei (Abbildung 32).

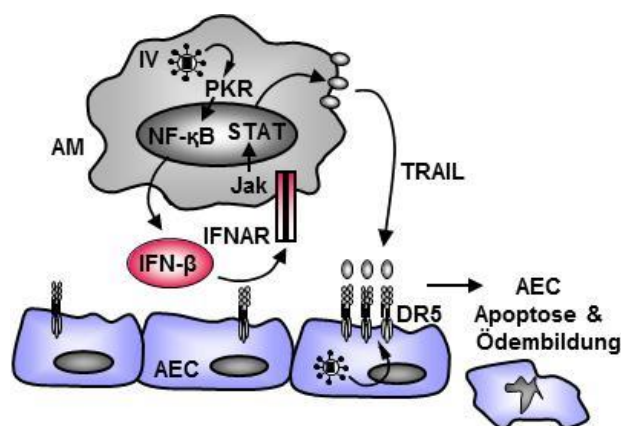


ABBILDUNG 32: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SIGNALWEGE ZUR INDUKTION VON IFN-β-VERMITTELT
APOPTOSE VON ALVEOLAREPITHELZELLEN.

5 Diskussion

Eine durch Influenzaviren verursachte Pneumonie ist durch Infektion von distalen Alveolarepithelzellen sowie Alveolarmakrophagen charakterisiert, die nicht selten zu akutem Lungenversagen führt. Eine schnelle und effiziente Immunantwort ist deshalb wichtig für das Eingrenzen des Lungenschadens. Auf der anderen Seite trägt aber eine überschießende Immunantwort neben direkt virusinduzierten zytopathischen Effekten zur Schädigung des Lungengewebes bei. In dieser Arbeit wird ein bisher unbekannter zytokinvermittelter Signalweg aufgedeckt, der das Alveolarepithel schädigt, wobei insbesondere infizierte Alveolarmakrophagen auf zellulärer Ebene involviert sind. Es konnte gezeigt werden, dass das von Alveolarmakrophagen PKR-/NF- κ B-abhängig sezernierte IFN- β über auto-/parakrine Wechselwirkung mit dem Typ I Interferonrezeptor zur Expression des proapoptotischen Effektorproteins TRAIL in Alveolarmakrophagen führt. TRAIL induziert die Apoptose Influenzavirus infizierter, aber auch nicht infizierter Alveolarepithelzellen und trägt damit signifikant zum apoptotischen Lungenschaden während einer Influenzavirus Pneumonie bei.

5.1 Intrazelluläre Signalwege zur Induktion von IFN- β

Es ist bekannt, dass die Sensorproteine RIG-I und MDA5 virale 5'-Triphosphat-RNA erkennen und binden können [17, 205], was in Epithelzellen über die indirekte Aktivierung von IRF-3 [139] zur Transkription von IFN- β führt, wobei gerade für Influenzaviren hauptsächlich RIG-I als Sensorprotein beschrieben wurde, welches das virale NS1 Protein erkennen kann [206]. Dabei aktivieren sowohl RIG-I als auch MDA5 IPS-1, was über die Aktivierung zweier IKK Kinasen (IKK ϵ , TBK-1) zu einer Phosphorylierung von IRF-3 führt [140]. Allerdings wurden diese Signalwege in Alveolarmakrophagen bisher nicht untersucht. Ein weiteres Sensorprotein für virale doppelsträngige RNA ist PKR, für das bereits nach Kontakt mit einem viralen RNA Analogon und mit viraler Doppelstrang-RNA [87, 88] eine Interaktion mit IKK beschrieben wurde. Diese führt zu einem degradativen Abbau der NF- κ B Inhibitoren I κ B α und I κ B β und damit zu einer Aktivierung von NF- κ B [138, 207], was neben der Aktivierung von IRF-3 und IRF-7 für eine effiziente IFN- β Bildung nötig ist. In der vorgelegten Arbeit wird eine PKR-abhängige NF- κ B Aktivierung durch Influenza Virus Infektion erstmals in Alveolarmakrophagen beschrieben,

da das Fehlen von PKR zu einer massiv verringerten NF- κ B Aktivität führte. Dagegen waren die Aktivität von IRF-3 und die Expression von IRF-7 durch PKR-Defizienz nicht beeinträchtigt, was auf einen für Alveolarmakrophagen spezifischen, strikt PKR-NF- κ B-abhängigen und IRF-unabhängigen Signalweg schließen lässt. Außerdem zeigte sich, dass PKR-abhängig aktiviertes NF- κ B in Alveolarmakrophagen ein zentraler Transkriptionsfaktor für die Induktion von Typ I Interferonen ist, da das Fehlen von PKR und damit die verringerte NF- κ B Aktivität sowie die Inhibition der Aktivierung von NF- κ B selbst zu einer drastisch verminderten Menge an sezerniertem IFN- β führte. Dies bestätigt Ergebnisse aus der Literatur, die in *pkr*^{-/-} murinen embryonalen Fibroblasten eine verringerte NF- κ B Aktivität nach Stimulation mit einem RNA Analogon und Infektion mit dem Vaccinia Virus zeigten, die sich auch auf eine verringerte IFN- β Bildung auswirkte [208, 209]. Die Bedeutung von PKR in Alveolarmakrophagen für die Wirtsabwehr bei der Influenzavirus Infektion wird außerdem dadurch unterstrichen, dass myeloide PKR-Defizienz im knochenmarkschimären Mausmodell zu einer ineffektiven Virusbeseitigung am Tag 7 p.i. führte. PKR wird nach Bindung an virale Ribonukleoproteinkomplexe (RNPs) durch Autophosphorylierung aktiviert. Dies führt zu einer schnellen Inhibition der zellulären Proteintranslation durch Phosphorylierung des eukaryotischen Protein Synthese Initiationsfaktor eIF2 α [144, 145], um die Virusreplikation effizient durch Abschalten der Proteintranslationsmaschinerie zu limitieren [161, 210]. Kürzlich wurde zusätzlich für PKR gezeigt, dass sie unabhängig von ihrer Kinaseaktivität, unter anderem auch in murinen Alveolarmakrophagen [148, 211], zu einer Aktivierung von NF- κ B führt. Ob die Bindung von viralen RNPs an PKR für die NF- κ B Aktivierung nötig ist oder ob PKR vielmehr eher als Signalvermittler in Alveolarmakrophagen fungiert, muss noch untersucht werden.

5.2 Die Rolle von Influenza Virus-induziertem IFN- β in der Wirtsabwehr und der Immunpathogenese

Typ I Interferone sind wichtige Komponenten der angeborenen Immunantwort gegen virale Infekte [212], durch deren autokrine Wirkung die Expression von direkt antiviral wirkenden Proteinen, wie das Mx (Myxovirus Resistenz)-Protein und die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase, eingeleitet wird. Gemeinsam mit PKR stoppen auch diese Proteine die Proteinsynthese infizierter Zellen, um die Virusreplikation zu minimieren [157-160], weshalb die Applikation von Typ I Interferonen als Strategie gegen Virusin-

fektionen eingesetzt wird. Derzeit sind diverse rekombinante Interferonpräparate oder interferoninduzierende Therapeutika auf dem Markt, die zur Behandlung von chronischen Viruserkrankungen wie z.B. Virushepatitis C, aber auch zur Immunstimulation bei Multipler Sklerose und Malignomen eingesetzt werden. Viele Studien zeigen, dass eine Vorbehandlung mit Typ I Interferonen in Tiermodellen nach Infektion die Virusreplikation von Influenzaviren vermindert und so zu einem mildereren Verlauf der Erkrankung führt [202, 203]. Zusätzlich zeigen Mäuse, die genetische Defekte im Typ I Interferonsignalweg haben, eine ineffiziente Beseitigung des Virus und eine um 50% erhöhte Mortalität im Vergleich mit C57BL/6 Wildtyp Tieren nach Influenzavirus Infektion [213, 214]. Da das Virus in infizierten *ifnar*^{-/-} knochenmarkschimären Mäusen effizient eliminiert werden konnte, scheinen Interferon-induzierte Signalwege in parenchymalen Lungenzellen als primäre Zielzellen der Infektion für die virale „Clearance“ essentiell zu sein, wohingegen diese Signalwege in myeloiden Zellen hierfür offensichtlich weniger relevant sind. Alveolarmakrophagen spielen zum einen eine wichtige Rolle als Hauptquelle von IFN- β nach Influenzavirus Infektion, da sie signifikant mehr IFN- β als Alveolarepithelzellen nach Infektion sezernierten. Zum anderen sind sie wichtige Effektorzellen, die IFN- β -abhängig Apoptose im infizierten und nicht infizierten Lungengewebe verursachen können. *In vitro* wurde dies dadurch belegt, dass nur in Präsenz von Alveolarmakrophagen durch die Zugabe von rekombinantem IFN- β Apoptose in Alveolarepithelzellen induziert wurde. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen positiven Effekte von IFN- β spekulieren wir, dass früh appliziertes oder früh induziertes IFN- β in seiner Wirkungsweise hinsichtlich antiviraler und proapoptotischer Effekte von spät im Infektionsverlauf appliziertem oder lang persistierendem IFN- β differenziert betrachtet werden muss. Dies bestätigte sich im *in vivo* Infektionsmodell, da durch eine Vorbehandlung mit IFN- β 24h vor Infektion die Viruslast im Alveolarraum sowie die alveoläre Proteinleakage vermindert werden konnte, wohingegen eine Behandlung an Tag 5 nach Infektion den apoptotischen Lungenschaden verschlechterte ohne Einfluss auf die Zahl an infektiösen Viruspartikeln zu nehmen. Zusätzlich wurde der umgekehrte Effekt nach Applikation eines inhibitorischen IFN- β Antikörpers beobachtet, womit tatsächlich ein zeitabhängiger Unterschied der IFN- β Effekte im Infektionsverlauf gezeigt werden konnte. Damit wirkt sich früh sezerniertes oder vor der Infektion appliziertes IFN- β positiv aus, wohingegen persistierendes oder spät (nach Elimination des Virus) appliziertes IFN- β eine zentrale Rolle bei der Induktion des Influenzavirus-induzierten apoptotischen Lungenschadens zu haben scheint. Die Applikation rekombinanter Typ I Interferonpräparate bei akuten re-

spiratorischen Virusinfektionen beim Menschen, wie es z.B. für SARS-CoV- oder Influenzavirus-induziertes ARDS aufgrund der verminderten Virenlast in unterschiedlichen Tiermodellen diskutiert wurde [213, 215, 216], sollte sich diesen Daten zufolge auf die frühe Phase der Infektion beschränken.

5.3 TRAIL als IFN- β -abhängig reguliertes Protein

Als proapoptotisches, IFN- β -abhängig reguliertes und von Alveolarmakrophagen sezerniertes Effektorprotein konnte das Zytokin TRAIL identifiziert werden. TRAIL wurde bisher hauptsächlich in der Tumorbilogie untersucht, wobei festgestellt wurde, dass es Apoptose selektiv in malignen Zellen induzieren kann [164]. Kürzlich konnte u.a. durch unsere Arbeitsgruppe die TRAIL-vermittelte Apoptose als Ursache für die Schädigung des Lungenepithels bei viralen Pneumonien identifiziert werden [14, 217], wobei die zellspezifischen Signalwege zur Induktion von TRAIL in Alveolarmakrophagen nicht untersucht wurden. Frühere Arbeiten zeigen eine IFN- β -abhängige TRAIL Expression in dendritischen Zellen, die selektiv Apoptose in Tumorzellen zu induzieren vermögen [163], sowie eine IFN- β -Abhängigkeit der TRAIL Regulation in peripheren Blutmonozyten [218]. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte hier gezeigt werden, dass TRAIL auch in Alveolarmakrophagen *in vivo* und *in vitro* IFN- β abhängig reguliert wird. Nach Stimulation von Alveolarmakrophagen mit rekombinantem IFN- β wurde TRAIL signifikant induziert. Weiterhin konnte die Hypothese einer IFN- β abhängigen TRAIL Expression nach viraler Infektion durch die Verwendung eines inhibitorischen Antikörpers gegen IFN- β und mittels Inhibition IFN- β -vermittelter Signalwege bewiesen werden. Dabei war eine größere Wirkung der Inhibitoren bei einer geringeren Infektionsdosis zu beobachten. *In vivo* wurden dieser Befund dadurch verifiziert, dass sowohl in den *ifnar*^{-/-} als auch in den *pkr*^{-/-} chimären Mäusen keine Expression von TRAIL auf der Oberfläche von residenten oder rekrutierten Alveolarmakrophagen detektiert werden konnte. Die in der Literatur beschriebene NF- κ B-Abhängigkeit der Expression von TRAIL nach Influenza Virus-Infektion kann dabei auf die verringerte IFN- β Ausschüttung zurückgeführt werden, die unter PKR-Defizienz oder nach Inhibition der Aktivierung von NF- κ B *in vitro* detektiert wurde. Eine zusätzliche Rolle von NF- κ B oder PKR downstream des Typ I Interferon Rezeptors für die TRAIL Expression in Alveolarmakrophagen konnte *in vitro* durch selektive Inhibition der in den IFNAR-induzierten Signalweg involvierten Mediatoren weitgehend ausgeschlossen werden.

Interessanterweise induzieren Influenzavirus Stämme unterschiedlicher Pathogenität TRAIL unterschiedlich stark. Das mausadaptierte A/PR8, das im Mausmodell hochpathogen ist, führte zu einer etwa 800-fachen Induktion auf mRNA Ebene, das aviäre H5N1 A/Thailand/KAN-1/04, das hochpathogen im Menschen ist und in der Maus zu einer schweren Pneumonie führt [219], induzierte in murinen Alveolarmakrophagen eine etwa 200 fache Hochregulation, wohingegen das beim Menschen und in der Maus schwach pathogene x-31 TRAIL nur etwa 8-fach induzierte. Außerdem korrelierte das Ausmaß der TRAIL-Induktion mit der Virus-induzierten IFN- β Hochregulation. Diese Daten deuten klar auf einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des IFN- β /TRAIL-vermittelten Lungenschadens und der Pathogenität eines Influenzavirus Stammes hin. Darüber hinaus beschreiben sie die Induktion der IFN- β /TRAIL Achse als neues Kriterium für die Pathogenität eines Influenzavirus und lassen auf einen Zusammenhang mit dem bei H5N1-infizierten Patienten beobachtetem Zytokin Sturm [220] schließen. Interessanterweise zeigten Alveolarmakrophagen von schwerst erkrankten Patienten mit pH1N1-induziertem ARDS eine signifikante Hochregulation der Oberflächenexpression von TRAIL sowie deutlich erhöhte TRAIL-Spiegel in der BALF im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Zusätzlich zeigt der Vergleich der TRAIL Konzentrationen von Patienten mit Influenzavirus-induziertem ARDS mit Lavagen von Patienten mit einer schweren, beatmungspflichtigen bakteriellen Pneumonie, dass TRAIL insbesondere bei virus-induziertem ARDS sezerniert wird. Zusammen mit publizierten Daten von Bem et al, welche eine ausgeprägte Expression von TRAIL in bronchoalveolären Lavagen RSV-infizierter Kinder zeigen konnten, sprechen diese Ergebnisse für eine v.a. viral regulierte Expression dieses proapoptotischen Zytokins [217].

5.4 TRAIL als proapoptotischer Faktor in der Influenzavirus *in vitro* Infektion

Die Wirkung von IFN- β nach Infektion auf Alveolarmakrophagen und deren Potential, TRAIL-abhängig Apoptose in Alveolarepithelzellen zu induzieren, wurde in einem Ko-Kulturmodell charakterisiert. Indem durch die Applikation eines inhibitorischen TRAIL Antikörpers nach Infektion von Alveolarmakrophagen in nicht infizierten sowie infizierten Epithelzellen die hohe Apoptoserate signifikant reduziert werden konnte, konnte die proapoptotische Rolle von TRAIL in diesem Kontext bestätigt werden. Eine Attenuierung der Alveolarepithelzellapoptose wurde außerdem in Zellen beobachtet, die mit infizierten *pkr*^{-/-}, *ifnar*^{-/-} oder *trail*^{-/-} Alveolarmakrophagen kokultiviert wurden. Damit führt

also eine verringerte IFN- β Sekretion (in *pkr*^{-/-} Alveolarmakrophagen), die Inhibition von IFN- β vermittelten Signalwegen (in *ifnar*^{-/-} Alveolarmakrophagen) sowie die Defizienz von TRAIL selbst in Alveolarmakrophagen, zu einer Verminderung der Alveolarepithelzellapoptose, was funktionell die Rolle der IFN- β /TRAIL Achse in diesem Kontext bestätigt. Eine sekundäre Infektion primär nicht infizierter Alveolarepithelzellen durch infizierte Alveolarmakrophagen ist hierbei auszuschließen, da der Replikationszyklus des A/PR8 Stammes in Alveolarmakrophagen trotz effizienter Infektion ($10,5 \pm 1,6\%$ bei MOI 0,1 und $42,5 \pm 7,6\%$ bei MOI 1; Daten nicht gezeigt) stets abortiv ohne Freisetzung neuer Viruspartikel verläuft (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde eine mögliche Infektion der Epithelzellen durch eine Influenza-Nukleoprotein Immunfluoreszenzfärbung ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Da die in der Literatur beschriebene selektive Apoptoseinduktion in malignen humanen Zellen neben der Induktion des Liganden TRAIL auch durch eine erhöhte Expression der TRAIL Rezeptoren DR4 und DR5 induziert werden kann [221], wurde überprüft, ob die Influenzavirus Infektion zu einer Hochregulation des DR5 auf Alveolarepithelzellen führt. DR5 wurde in infizierten murinen sowie humanen Alveolarepithelzellen IFN- β -unabhängig hochreguliert, fand sich aber auch auf nicht infizierten Zellen signifikant exprimiert. In der Tat zeigen die vorgelegten Daten eine deutliche Apoptose-Induktion auch *nicht*-infizierter Alveolarepithelzellen. Daraus kann geschlossen werden, dass durch die infektionsbedingte DR5 Hochregulation zwar eine Präferenz der TRAIL-induzierten Apoptose für infizierte Zellen determiniert wird, aber auch in uninfizierten Zellen TRAIL/DR5-abhängig Apoptose induziert wurde.

5.5 Die Rolle der IFN- β /TRAIL Achse im *in vivo* Infektionsmodell

Ein Hauptcharakteristikum des akuten Lungenschadens (ALI/ARDS) ist die Zerstörung von Alveolarepithel- und Endothelzellen, was einen Verlust der alveolären Schrankenfunktion zur Folge hat [222]. Im Falle einer Influenza Virus-Pneumonie wird das Lungenparenchym sowohl durch die Virusreplikation selbst als auch durch die wirtseigene Abwehrreaktion geschädigt [115-117]. Es konnte gezeigt werden, dass dies mit der Induktion von Apoptose in Alveolarepithelzellen einhergeht [220, 223, 107]. Während in vielen Studien dargelegt werden konnte, dass der apoptotische Gewebeschaden bei bakterieller Pneumonie oder im Modell des LPS-induzierten Lungenschadens primär durch den proapoptotischen Faktor Fas Ligand induziert wird [224, 225], konnte in der vorgelegten Arbeit keine Induktion von Fas Ligand in Virus-infizierten Alveolarmakro-

phagen beschrieben werden, während TRAIL signifikant induziert wurde. Dem proapoptotischen Zytokin TRAIL konnte in Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe bereits eine bedeutende Rolle in der Influenzavirus-induzierten epithelialen Schädigung zugeschrieben werden [14, 124]. TRAIL wird auf einer Vielzahl von Immunzellen wie T-Zellen, NK-Zellen, residenten Gewebsmakrophagen, dendritischen Zellen und zirkulierenden Blutmonozyten exprimiert [226]. Hierbei scheint NK- und T-Zell-exprimiertes TRAIL eine Funktion in der spezifischen antiviralen Immunantwort zu übernehmen. Ishikawa et al. legten dar, dass die Eliminierung von Influenzavirus in einem Mausmodell durch die Applikation eines neutralisierenden α -TRAIL Antikörpers reduziert wird [227]. Ebenso wurde gezeigt, dass $CD8^+$ T Zellen Influenzavirus infizierte Alveolarepithelzellen *in vivo* TRAIL-abhängig eliminieren [228]. Dies deutet darauf hin, dass Influenzavirus-induziertes TRAIL einen wichtigen Faktor zytotoxischer T Zellen (CTL) für die Kontrolle viraler Infektionen darstellt. Obwohl die hier vorgestellten Daten aus knochenmarkschimären Tieren für eine geringe Rolle Leukozyten-exprimierten TRAILS für die virale „Clearance“ sprechen, da *trail*^{-/-} knochenmarkstransplantierte Tiere keine Defekte in der Virusbeseitigung aufwiesen, schließen unsere Daten nicht vollständig aus, dass antigenspezifische T Zellen neben FasL, Granzym oder Perforin auch TRAIL nutzen, um spezifisch infizierte Zellen zu zerstören. Im Gegensatz dazu scheint das von Alveolarmakrophagen sezernierte TRAIL Alveolarepithelzellen eher unspezifisch zu eliminieren, da auch nicht infizierte, DR5 niedrig exprimierende Alveolarepithelzellen anfällig für TRAIL vermittelte Apoptose waren. Die reduzierte TRAIL Expression auf residenten und rekrutierten Alveolarmakrophagen in den *ifnar*^{-/-} knochenmarkschimären Mäusen bestätigt die IFN- β -Abhängigkeit der TRAIL-Expression in monozytären Zellen auch *in vivo*. Dabei war passend zu den *in vitro* Daten eine PKR-Abhängigkeit der TRAIL Expression zu beobachten, wobei myeloide PKR-Defizienz mit einer reduzierten TRAIL-Konzentration in der BALF und einer verringerten Anzahl apoptotischer Alveolarepithelzellen nach Influenzavirus Infektion einherging. Eine verbesserte Barrierefunktion der Lunge konnte jedoch nur bei den *ifnar*^{-/-} und *trail*^{-/-} chimären Mäuse gemessen werden, wohingegen *pkr*^{-/-} chimäre Mäuse trotz reduzierter TRAIL Expression und -Freisetzung eine Verschlechterung der Barrierefunktion zeigten. Dies kann auf die deutlich verzögerte Viruseliminierung zurückgeführt werden, die zu einem erhöhtem direkt virusvermittelten zytolytischen Schaden des Epithels führt. Insgesamt spricht dies dafür, dass Alveolarmakrophagen-sezerniertes TRAIL insbesondere bei ausgeprägter Rekrutierung von Exsudatmakrophagen, wie es bei der Influenzavirus Infektion der Fall ist, einen sig-

nifikanischen „Kollateralschaden“ des nicht infizierten Epithels verursacht, was sich auch zuletzt in den Gewichtsverläufen als Maß für die Morbidität infizierter Mäuse widerspiegelte, die in *trail*^{-/-} chimären Tieren deutlich attenuiert war.

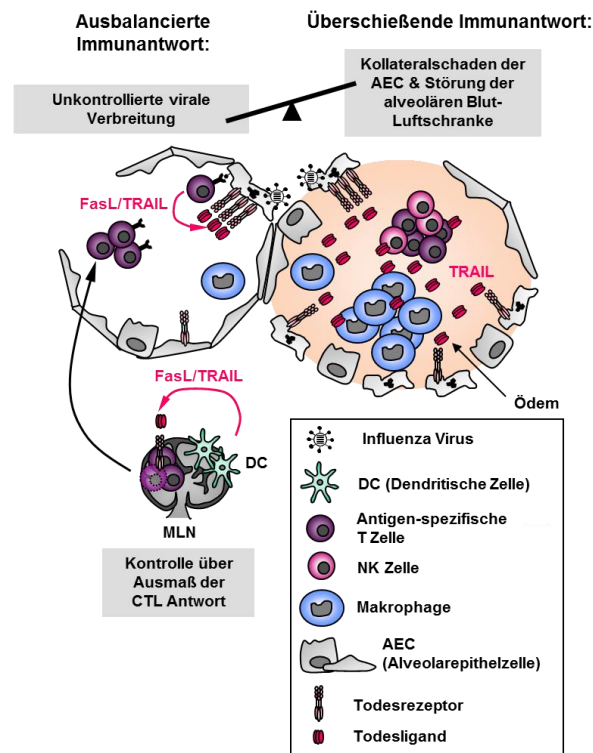


ABBILDUNG 33: MODEL DER TODESLIGANDEN VERMITTELTEN KONTROLLE DER SYSTEMISCHEN IMMUNANTWORT.

Während einer ausbalancierten Immunantwort werden die Todesliganden FasL und TRAIL von dendritischen Zellen in den Lymphknoten oder lokal in der Lunge sezerniert, wodurch antigen-spezifische CTLs generiert werden. Nur die Influenza Virus infizierten Alveolarepithelzellen erhöhen die Expression der Todesrezeptoren, wodurch sie spezifisch von CTLs erkannt und von diesen durch die Expression der Todesliganden eliminiert werden um die virale Ausbreitung einzuschränken. Allerdings werden bei einer überschießenden Immunantwort viele Immunzellen, wie Monozyten, NK Zellen oder T Zellen an den Ort der Entzündung rekrutiert, die hohe Mengen an TRAIL exprimieren, was zu einem Todesligand-abhängigem Kollateralschaden führt, da auch nicht infizierte Epithelzellen bereits Todesrezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren. Modifiziert nach [124].

Insgesamt konnten die hier präsentierten Daten eine neue Rolle von Typ I Interferonen bei der Induktion von apoptotischem Lungenschaden in der schweren Influenzavirus Pneumonie aufzeigen. Residente und rekrutierte Alveolarmakrophagen konnten hierbei als primäre Quelle von IFN- β -induziertem TRAIL identifiziert werden. Durch die Aufklärung der Signalwege, die in diese IFN- β -abhängige Makrophagen-Epithel Interaktion involviert sind, konnten neue therapeutische Zielstrukturen zur Attenuierung des Influenzavirus-induzierten Lungenschadens bei erhaltener antiviraler Wirtsabwehrfunktion definiert werden.

6 Zusammenfassung

Influenzaviren verursachen Lungenentzündungen im Menschen, die zu ALI/ARDS führen können. In der Literatur wurde eine überschießende Immunantwort mit einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen, wie auch Typ I Interferonen, mit der Schwere des Verlaufes einer Influenzapneumonie in Verbindung gebracht. In der vorliegenden Arbeit konnte in *in vitro* und *in vivo* Infektionsmodellen unter Nutzung knochenmarkschimärer Mäuse gezeigt werden, dass Alveolarmakrophagen eine primäre Quelle von IFN- β darstellen, welches auto-/parakrin über der Typ I Interferon-Rezeptor (IFNAR) die Expression des proapoptotischen Liganden „TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand“ (TRAIL) induziert. TRAIL vermittelt die Apoptose von Alveolarepithelzellen und trägt damit zur Ausbildung des Influenzavirus-induzierten Lungenschadens bei. TRAIL konnte außerdem in bronchoalveolären Lavagen und oberflächenexprimiert auf Alveolarmakrophagen von invasiv beatmeten ARDS Patienten nachgewiesen werden, die im Rahmen der H1N1 Pandemie 2009/10 an einer primären Influenzavirus Pneumonie erkrankten. Die Proteinkinase R (PKR) und PKR-abhängig aktiviertes NF- κ B wurden als zentrale Signalmoleküle identifiziert, die die Sekretion von IFN- β in Alveolarmakrophagen nach Infektion induzieren. TRAIL induzierte Apoptose sowohl in nicht-infizierten sowie in Influenzavirus-infizierten Alveolarepithelzellen in *in vitro* Kokulturmodellen, wobei die Induktion von Apoptose in Alveolarepithelzellen durch virusinfizierte Alveolarmakrophagen strikt von der PKR/IFN- β /TRAIL Achse abhängig ist. Der TRAIL-Rezeptor DR5 ist konstitutiv auf Alveolarepithelzellen exprimiert und wird in mit Influenzavirus infiziertem Alveolarepithel IFN- β -unabhängig hochreguliert. In knochenmarkschimären Mäusen, die diese Signalmoleküle weder in Alveolarmakrophagen noch in rekrutierten Exsudatmakrophagen exprimieren sowie nach Neutralisation von alveolär sezerniertem IFN- β und TRAIL war die Anzahl von apoptotischen Alveolarepithelzellen *in vivo* reduziert und der Lungenschaden nach Influenzavirus-Infektion signifikant attenuiert. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass von Alveolarmakrophagen sezernierte Typ I Interferone neben ihrer in der Literatur beschriebenen antiviralen Aktivität durch die TRAIL vermittelte Induktion von Apoptose in Alveolarepithelzellen zur Ausbildung des akuten Lungenschadens bei schwerer Influenzavirus Pneumonie beitragen. Therapeutisches Eingreifen in die IFN- β -TRAIL Achse könnte deshalb eine vielversprechende Strategie sein, um Influenzavirus-induziertes ARDS zu behandeln.

7 Summary

Influenza viruses cause pneumonia in humans with progression to lung failure and fatal outcome. Dysregulated release of cytokines including type I interferons (IFNs) has been attributed a crucial role in immune-mediated pulmonary injury during severe IV infection. Using *ex vivo* and *in vivo* IV infection models we demonstrated that alveolar macrophage-expressed IFN- β significantly contributes to IV-induced alveolar epithelial cell injury by autocrine induction of the pro-apoptotic TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Importantly, TRAIL was highly upregulated in AM of patients with pandemic H1N1 IV-induced lung failure. Elucidating the cell-specific underlying signalling pathways revealed that IV infection induced IFN- β release in AM in a protein kinase R- (PKR-) and NF- κ B-dependent way. Autocrine signalling via the macrophage type I IFN receptor (IFNAR) resulted in increased expression and release of TRAIL which induced apoptosis of IV-infected and non-infected AEC in *ex vivo* co-cultures, and AEC apoptosis induction was shown to be strictly dependent on the macrophage PKR/IFNAR/TRAIL axis. The TRAIL receptor DR5 was constitutively expressed on alveolar epithelial cells and upregulated upon IV infection in an IFN- β -independent way. Bone marrow chimeric mice lacking the involved signalling mediators in resident and lung-recruited AM and mice subjected to alveolar neutralization of IFN- β and TRAIL displayed reduced alveolar epithelial cell apoptosis and inhibiting TRAIL even an attenuated lung injury during severe IV pneumonia. Together, we demonstrated that macrophage-released type I IFNs, apart from their well-known antiviral properties, contribute to IV-induced AEC damage and lung injury by autocrine induction of the proapoptotic factor TRAIL. Therapeutic targeting of the macrophage IFN- β -TRAIL axis might therefore represent a promising strategy to attenuate IV-induced acute lung injury.

Literaturverzeichnis

- 1 Compans, R. W., H. Meier-Ewert and P. Palese (1974). "Assembly of lipid-containing viruses." J Supramol Struct **2**(2-4): 496-511.
- 2 Ballinger, M.N. and T.J. Standiford (2010). "Postinfluenza bacterial pneumonia: host defenses gone awry." J Interferon Cytokine Res **30**(9): 643-52.
- 3 Holland, J., K. Spindler, F. Horodyski, E. Grabau, S. Nichol and S. VandePol (1982). "Rapid evolution of RNA genomes." Science **215**(4540): 1577-85.
- 4 Steinhauer, D. A. and J. J. Holland (1987). "Rapid evolution of RNA viruses." Annu Rev Microbiol **41**: 409-33.
- 5 Herold, S. (2011). "[Pathogenesis, symptoms and treatment of virus influenza]." Pharm Unserer Zeit **40**(2): 115-119.
- 6 Johnson, N. P. and J. Mueller (2002). "Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic." Bull Hist Med **76**(1): 105-15.
- 7 Tumpey, T. M., C. F. Basler, P. V. Aguilar, H. Zeng, A. Solorzano, D. E. Swayne, N. J. Cox, J. M. Katz, J. K. Taubenberger, P. Palese and A. Garcia-Sastre (2005). "Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus." Science **310**(5745): 77-80.
- 8 Kawaoka, Y., S. Krauss and R. G. Webster (1989). "Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics." J Virol **63**(11): 4603-8.
- 9 Reid, A. H., T. G. Fanning, J. V. Hultin and J. K. Taubenberger (1999). "Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1651-6.
- 10 Claas, E. C., A. D. Osterhaus, R. van Beek, J. C. De Jong, G. F. Rimmelzwaan, D. A. Senne, S. Krauss, K. F. Shortridge and R. G. Webster (1998). "Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus." Lancet **351**(9101): 472-7.
- 11 Zhang, L., J. M. Katz, M. Gwinn, N. F. Dowling and M. J. Khoury (2009). "Systems-based candidate genes for human response to influenza infection." Infect Genet Evol **9**(6): 1148-1157.
- 12 Lyles, D. S. (2000). "Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNA viruses." Microbiol Mol Biol Rev **64**(4): 709-724.

- 13 Darwish, I., S. Mubareka and W. C. Liles (2011). "Immunomodulatory therapy for severe influenza." Expert Rev Anti Infect Ther **9**(7): 807-822.
- 14 Herold, S., M. Steinmueller, W. von Wulffen, L. Cakarova, R. Pinto, S. Pleschka, M. Mack, W. A. Kuziel, N. Corazza, T. Brunner, W. Seeger and J. Lohmeyer (2008). "Lung epithelial apoptosis in influenza virus pneumonia: the role of macrophage-expressed TNF-related apoptosis-inducing ligand." J Exp Med **205**(13): 3065-3077.
- 15 Teijaro, J. R., K. B. Walsh, S. Cahalan, D. M. Fremgen, E. Roberts, F. Scott, E. Martinborough, R. Peach, M. B. Oldstone and H. Rosen (2011). "Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection." Cell **146**(6): 980-991.
- 16 Opitz, B., V. van Laak, J. Eitel and N. Suttorp (2010). "Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung." Am J Respir Crit Care Med **181**(12): 1294-1309.
- 17 Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira and T. Fujita (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." Nat Immunol **5**(7): 730-737.
- 18 Opitz, B., A. Rejaibi, B. Dauber, J. Eckhard, M. Vinzing, B. Schmeck, S. Hippenstiel, N. Suttorp and T. Wolff (2007). "IFN β induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein." Cell Microbiol **9**(4): 930-938.
- 19 Hussell, T. and J. Goulding (2010). "Structured regulation of inflammation during respiratory viral infection." Lancet Infect Dis **10**(5): 360-366.
- 20 Mauad, T., L. A. Hajjar, G. D. Callegari, L. F. da Silva, D. Schout, F. R. Galas, V. A. Alves, D. M. Malheiros, J. O. Auler, Jr., A. F. Ferreira, M. R. Borsato, S. M. Bezerra, P. S. Gutierrez, E. T. Caldini, C. A. Pasqualucci, M. Dolhnikoff and P. H. Saldiva (2010). "Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection." Am J Respir Crit Care Med **181**(1): 72-79.
- 21 Poggensee, G., A. Gilsdorf, S. Buda, T. Eckmanns, H. Claus, D. Altmann, G. Krause and W. Haas (2010). "The first wave of pandemic influenza (H1N1) 2009 in Germany: from initiation to acceleration." BMC Infect Dis **10**: 155.

- 22 Tang, J. W., N. Shetty and T. T. Lam (2010). "Features of the new pandemic influenza A/H1N1/2009 virus: virology, epidemiology, clinical and public health aspects." Curr Opin Pulm Med **16**(3): 235-241.
- 23 Medina, R. A. and A. Garcia-Sastre (2011). "Influenza A viruses: new research developments." Nat Rev Microbiol **9**(8): 590-603.
- 24 Herold, S., W. von Wulffen, M. Steinmueller, S. Pleschka, W. A. Kuziel, M. Mack, M. Srivastava, W. Seeger, U. A. Maus and J. Lohmeyer (2006). "Alveolar epithelial cells direct monocyte transepithelial migration upon influenza virus infection: impact of chemokines and adhesion molecules." J Immunol **177**(3): 1817-1824.
- 25 Yu, W. C., R. W. Chan, J. Wang, E. A. Travanty, J. M. Nicholls, J. S. Peiris, R. J. Mason and M. C. Chan (2011). "Viral replication and innate host responses in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and H1N1 viruses." J Virol **85**(14): 6844-6855.
- 26 Watanabe, T. and Y. Kawaoka (2011). "Pathogenesis of the 1918 pandemic influenza virus." PLoS Pathog **7**(1): e1001218.
- 27 de Wit, E., Y. Kawaoka, M. D. de Jong and R. A. Fouchier (2008). "Pathogenicity of highly pathogenic avian influenza virus in mammals." Vaccine **26 Suppl 4**: D54-58.
- 28 Korteweg, C. and J. Gu (2008). "Pathology, molecular biology, and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) infection in humans." Am J Pathol **172**(5): 1155-1170.
- 29 Gambotto, A., S. M. Barratt-Boyes, M. D. de Jong, G. Neumann and Y. Kawaoka (2008). "Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus." Lancet **371**(9622): 1464-1475.
- 30 Funk, D. J., F. Siddiqui, K. Wiebe, R. R. Miller, 3rd, E. Bautista, E. Jimenez, K. Webster and A. Kumar (2010). "Practical lessons from the first outbreaks: clinical presentation, obstacles, and management strategies for severe pandemic (pH1N1) 2009 influenza pneumonitis." Crit Care Med **38**(4 Suppl): e30-37.
- 31 Jain, S., L. Kamimoto, A. M. Bramley, A. M. Schmitz, S. R. Benoit, J. Louie, D. E. Sugerman, J. K. Druckenmiller, K. A. Ritger, R. Chugh, S. Jasuja, M. Deutscher, S. Chen, J. D. Walker, J. S. Duchin, S. Lett, S. Soliva, E. V. Wells, D. Swerdlow, T. M. Uyeki, A. E. Fiore, S. J. Olsen, A. M. Fry, C. B. Bridges and L. Finelli (2009). "Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009." N Engl J Med **361**(20): 1935-1944.

- 32 Fukuyama, S. and Y. Kawaoka (2011). "The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors." Curr Opin Immunol **23**(4): 481-486.
- 33 Chen, H., X. Wen, K. K. To, P. Wang, H. Tse, J. F. Chan, H. W. Tsoi, K. S. Fung, C. W. Tse, R. A. Lee, K. H. Chan and K. Y. Yuen (2010). "Quasispecies of the D225G substitution in the hemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus from patients with severe disease in Hong Kong, China." J Infect Dis **201**(10): 1517-1521.
- 34 McAuley, J. L., J. E. Chipuk, K. L. Boyd, N. Van De Velde, D. R. Green and J. A. McCullers (2010). "PB1-F2 proteins from H5N1 and 20 century pandemic influenza viruses cause immunopathology." PLoS Pathog **6**(7): e1001014.
- 35 Baldanti, F., G. Campanini, A. Piralla, F. Rovida, A. Braschi, F. Mojoli, G. Iotti, M. Belliato, P. G. Conaldi, A. Arcadipane, E. Pariani, A. Zanetti, L. Minoli and V. Emmi (2011). "Severe outcome of influenza A/H1N1/09v infection associated with 222G/N polymorphisms in the haemagglutinin: a multicentre study." Clin Microbiol Infect **17**(8): 1166-1169.
- 36 Matrosovich, M., J. Stech and H. D. Klenk (2009). "Influenza receptors, polymerase and host range." Rev Sci Tech **28**(1): 203-217.
- 37 Chan, M. C., C. Y. Cheung, W. H. Chui, S. W. Tsao, J. M. Nicholls, Y. O. Chan, R. W. Chan, H. T. Long, L. L. Poon, Y. Guan and J. S. Peiris (2005). "Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells." Respir Res **6**: 135.
- 38 Pizzorno, A., Y. Abed and G. Boivin (2011). "Influenza drug resistance." Semin Respir Crit Care Med **32**(4): 409-422.
- 39 Kidd, I. M., J. Down, E. Nastouli, R. Shulman, P. R. Grant, D. C. Howell and M. Singer (2009). "H1N1 pneumonitis treated with intravenous zanamivir." Lancet **374**(9694): 1036.
- 40 Fehrenbach, H. (2001). "Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited." Respir Res **2**(1): 33-46.
- 41 Rock, J. R. and B. L. Hogan (2011). "Epithelial progenitor cells in lung development, maintenance, repair, and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **27**: 493-512.
- 42 Mason, R. J. (2006). "Biology of alveolar type II cells." Respirology **11** Suppl: S12-15.

- 43 Matthay, M. A., L. Robriquet and X. Fang (2005). "Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury." Proc Am Thorac Soc **2**(3): 206-213.
- 44 Hippenstiel, S., B. Opitz, B. Schmeck and N. Suttorp (2006). "Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction." Respir Res **7**: 97.
- 45 Parker, D. and A. Prince (2011). "Innate immunity in the respiratory epithelium." Am J Respir Cell Mol Biol **45**(2): 189-201.
- 46 Holt, P. G., D. H. Strickland, M. E. Wikstrom and F. L. Jahnsen (2008). "Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract." Nat Rev Immunol **8**(2): 142-152.
- 47 Geissmann, F., S. Jung and D. R. Littman (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." Immunity **19**(1): 71-82.
- 48 Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad and K. Ley (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science **327**(5966): 656-661.
- 49 Fogg, D. K., C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D. R. Littman, A. Cumanos and F. Geissmann (2006). "A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells." Science **311**(5757): 83-87.
- 50 Maus, U., S. Herold, H. Muth, R. Maus, L. Ermert, M. Ermert, N. Weissmann, S. Rosseau, W. Seeger, F. Grimminger and J. Lohmeyer (2001). "Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but up-regulate CD14." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **280**(1): L58-68.
- 51 Maus, U., J. Huwe, R. Maus, W. Seeger and J. Lohmeyer (2001). "Alveolar JE/MCP-1 and endotoxin synergize to provoke lung cytokine upregulation, sequential neutrophil and monocyte influx, and vascular leakage in mice." Am J Respir Crit Care Med **164**(3): 406-411.
- 52 Maus, U., J. Huwe, L. Ermert, M. Ermert, W. Seeger and J. Lohmeyer (2002). "Molecular pathways of monocyte emigration into the alveolar air space of intact mice." Am J Respir Crit Care Med **165**(1): 95-100.
- 53 Maus, U., K. von Grote, W. A. Kuziel, M. Mack, E. J. Miller, J. Cihak, M. Stangassinger, R. Maus, D. Schlondorff, W. Seeger and J. Lohmeyer (2002). "The role of CC chemokine receptor 2 in alveolar monocyte and neutrophil immigration in intact mice." Am J Respir Crit Care Med **166**(3): 268-273.

- 54 Serbina, N. V., T. Jia, T. M. Hohl and E. G. Pamer (2008). "Monocyte-mediated defense against microbial pathogens." Annu Rev Immunol **26**: 421-452.
- 55 Maus, U. A., S. Janzen, G. Wall, M. Srivastava, T. S. Blackwell, J. W. Christman, W. Seeger, T. Welte and J. Lohmeyer (2006). "Resident alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation." Am J Respir Cell Mol Biol **35**(2): 227-235.
- 56 Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau and F. Geissmann (2007). "Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior." Science **317**(5838): 666-670.
- 57 Herold, S., K. Mayer and J. Lohmeyer (2011). "Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair." Front. Immunol. **2**(65): 10.3389/fimmu.2011.00065.
- 58 Ginhoux, F., K. Liu, J. Helft, M. Bogunovic, M. Greter, D. Hashimoto, J. Price, N. Yin, J. Bromberg, S. A. Lira, E. R. Stanley, M. Nussenzweig and M. Merad (2009). "The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs." J Exp Med **206**(13): 3115-3130.
- 59 Varol, C., A. Vallon-Eberhard, E. Elinav, T. Aychek, Y. Shapira, H. Luche, H. J. Fehling, W. D. Hardt, G. Shakhar and S. Jung (2009). "Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions." Immunity **31**(3): 502-512.
- 60 Helft, J., F. Ginhoux, M. Bogunovic and M. Merad (2010). "Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice." Immunol Rev **234**(1): 55-75.
- 61 Rosseau, S., P. Hammerl, U. Maus, H. D. Walmrath, H. Schutte, F. Grimminger, W. Seeger and J. Lohmeyer (2000). "Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(1): L25-35.
- 62 Winter, C., K. Taut, M. Srivastava, F. Langer, M. Mack, D. E. Briles, J. C. Paton, R. Maus, T. Welte, M. D. Gunn and U. A. Maus (2007). "Lung-specific overexpression of CC chemokine ligand (CCL) 2 enhances the host defense to Streptococcus pneumoniae infection in mice: role of the CCL2-CCR2 axis." J Immunol **178**(9): 5828-5838.

- 63 Xu, F., D. Droemann, J. Rupp, H. Shen, X. Wu, T. Goldmann, S. Hippenstiel, P. Zabel and K. Dalhoff (2008). "Modulation of the inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in a model of acute lung tissue infection." Am J Respir Cell Mol Biol **39**(5): 522-529.
- 64 Mosser, D. M. and J. P. Edwards (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." Nat Rev Immunol **8**(12): 958-969.
- 65 Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol **3**(1): 23-35.
- 66 Cabanski, M., J. Wilhelm, Z. Zaslona, M. Steinmuller, L. Fink, W. Seeger and J. Lohmeyer (2009). "Genome-wide transcriptional profiling of mononuclear phagocytes recruited to mouse lungs in response to alveolar challenge with the TLR2 agonist Pam3CSK4." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(4): L608-618.
- 67 Lambrecht, B. N., J. B. Prins and H. C. Hoogsteden (2001). "Lung dendritic cells and host immunity to infection." Eur Respir J **18**(4): 692-704.
- 68 Legge, K. L. and T. J. Braciale (2003). "Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection." Immunity **18**(2): 265-277.
- 69 Lin, K. L., Y. Suzuki, H. Nakano, E. Ramsburg and M. D. Gunn (2008). "CCR2+ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality." J Immunol **180**(4): 2562-2572.
- 70 Osterholzer, J. J., T. Ames, T. Polak, J. Sonstein, B. B. Moore, S. W. Chensue, G. B. Toews and J. L. Curtis (2005). "CCR2 and CCR6, but not endothelial selectins, mediate the accumulation of immature dendritic cells within the lungs of mice in response to particulate antigen." J Immunol **175**(2): 874-883.
- 71 Osterholzer, J. J., G. H. Chen, M. A. Olszewski, J. L. Curtis, G. B. Huffnagle and G. B. Toews (2009). "Accumulation of CD11b+ lung dendritic cells in response to fungal infection results from the CCR2-mediated recruitment and differentiation of Ly-6Chigh monocytes." J Immunol **183**(12): 8044-8053.
- 72 Aldridge, J. R., Jr., C. E. Moseley, D. A. Boltz, N. J. Negovetich, C. Reynolds, J. Franks, S. A. Brown, P. C. Doherty, R. G. Webster and P. G. Thomas (2009). "TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(13): 5306-5311.

- 75 Hao, X., T. S. Kim and T. J. Braciale (2008). "Differential response of respiratory dendritic cell subsets to influenza virus infection." J Virol **82**(10): 4908-4919.
- 76 Kim, T. S. and T. J. Braciale (2009). "Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8+ T cell responses." PLoS One **4**(1): e4204.
- 77 Kawai, T. and S. Akira (2011). "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." Immunity **34**(5): 637-650.
- 78 Armstrong, L., A. R. Medford, K. M. Uppington, J. Robertson, I. R. Witherden, T. D. Tetley and A. B. Millar (2004). "Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **31**(2): 241-245.
- 79 Mayer, A. K., M. Muehmer, J. Mages, K. Gueinzus, C. Hess, K. Heeg, R. Bals, R. Lang and A. H. Dalpke (2007). "Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells." J Immunol **178**(5): 3134-3142.
- 80 Beutler, B. A. (2009). "TLRs and innate immunity." Blood **113**(7): 1399-1407.
- 81 Thorley, A. J., D. Grandolfo, E. Lim, P. Goldstraw, A. Young and T. D. Tetley (2011). "Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human lung--role of alveolar epithelial TLR expression and signalling." PLoS One **6**(7): e21827.
- 82 Maris, N. A., M. C. Dessing, A. F. de Vos, P. Bresser, J. S. van der Zee, H. M. Jansen, C. A. Spek and T. van der Poll (2006). "Toll-like receptor mRNA levels in alveolar macrophages after inhalation of endotoxin." Eur Respir J **28**(3): 622-626.
- 83 Opitz, B., S. Forster, A. C. Hocke, M. Maass, B. Schmeck, S. Hippenstiel, N. Suttorp and M. Krull (2005). "Nod1-mediated endothelial cell activation by Chlamydia pneumoniae." Circ Res **96**(3): 319-326.
- 84 Opitz, B., A. Puschel, B. Schmeck, A. C. Hocke, S. Rosseau, S. Hammerschmidt, R. R. Schumann, N. Suttorp and S. Hippenstiel (2004). "Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized Streptococcus pneumoniae." J Biol Chem **279**(35): 36426-36432.
- 85 Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira and T. Fujita (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." Nat Immunol **5**(7): 730-737.

- 86 Garcia, M. A., J. Gil, I. Ventoso, S. Guerra, E. Domingo, C. Rivas and M. Esteban (2006). "Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action." Microbiol Mol Biol Rev **70**(4): 1032-1060.
- 87 Dauber, B., L. Martinez-Sobrido, J. Schneider, R. Hai, Z. Waibler, U. Kalinke, A. Garcia-Sastre and T. Wolff (2009). "Influenza B virus ribonucleoprotein is a potent activator of the antiviral kinase PKR." PLoS Pathog **5**(6): e1000473.
- 88 Dauber, B. and T. Wolff (2009). "Activation of the Antiviral Kinase PKR and Viral Countermeasures." Viruses **1**(3): 523-544.
- 89 Koppe, U., K. Hogner, J. M. Doehn, H. C. Muller, M. Witzenrath, B. Gutbier, S. Bauer, T. Pribyl, S. Hammerschmidt, J. Lohmeyer, N. Suttorp, S. Herold and B. Opitz (2011). "Streptococcus pneumoniae Stimulates a STING- and IFN Regulatory Factor 3-Dependent Type I IFN Production in Macrophages, which Regulates RANTES Production in Macrophages, Cocultured Alveolar Epithelial Cells, and Mouse Lungs." J Immunol.
- 90 Vinzing, M., J. Eitel, J. Lippmann, A. C. Hocke, J. Zahlten, H. Slevogt, D. N'Guessan P, S. Gunther, B. Schmeck, S. Hippenstiel, A. Flieger, N. Suttorp and B. Opitz (2008). "NAIP and Ipaf control Legionella pneumophila replication in human cells." J Immunol **180**(10): 6808-6815.
- 91 Kumar, H., T. Kawai and S. Akira (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." Int Rev Immunol **30**(1): 16-34.
- 92 N'Guessan, P. D., S. Hippenstiel, M. O. Etouem, J. Zahlten, W. Beermann, D. Lindner, B. Opitz, M. Witzenrath, S. Rosseau, N. Suttorp and B. Schmeck (2006). "Streptococcus pneumoniae induced p38 MAPK- and NF-kappaB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(6): L1131-1138.
- 93 Pinto, R., S. Herold, L. Cakarova, K. Hoegner, J. Lohmeyer, O. Planz and S. Pleschka (2011). "Inhibition of influenza virus-induced NF-kappaB and Raf/MEK/ERK activation can reduce both virus titers and cytokine expression simultaneously in vitro and in vivo." Antiviral Res **92**(1): 45-56.
- 94 Schmeck, B., P. D. N'Guessan, M. Ollomang, J. Lorenz, J. Zahlten, B. Opitz, A. Flieger, N. Suttorp and S. Hippenstiel (2007). "Legionella pneumophila-induced NF-kappaB- and MAPK-dependent cytokine release by lung epithelial cells." Eur Respir J **29**(1): 25-33.

- 95 Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell **140**(6): 805-820.
- 96 Schmitz, M. L., I. Mattioli, H. Buss and M. Kracht (2004). "NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels." Chembiochem **5**(10): 1348-1358.
- 97 Strieter, R. M., J. A. Belperio and M. P. Keane (2003). "Host innate defenses in the lung: the role of cytokines." Curr Opin Infect Dis **16**(3): 193-198.
- 98 Vardarova, K., S. Scharf, F. Lang, B. Schmeck, B. Opitz, J. Eitel, A. C. Hocke, H. Slevogt, A. Flieger, S. Hippenstiel, N. Suttorp and D. N'Guessan P (2009). "PKC(alpha) and PKC(epsilon) differentially regulate Legionella pneumophila-induced GM-CSF." Eur Respir J **34**(5): 1171-1179.
- 99 Standiford, L. R., T. J. Standiford, M. J. Newstead, X. Zeng, M. N. Ballinger, M. A. Kovach, A. K. Reka and U. Bhan (2011). "Tlr4-Dependent Gm-Csf Protects against Lung Injury in Gram-Negative Bacterial Pneumonia." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.
- 100 Jacobs, R. F., D. R. Tabor, A. W. Burks and G. D. Campbell (1989). "Elevated interleukin-1 release by human alveolar macrophages during the adult respiratory distress syndrome." Am Rev Respir Dis **140**(6): 1686-1692.
- 101 Cabanski, M., M. Steinmuller, L. M. Marsh, E. Surdziel, W. Seeger and J. Lohmeyer (2008). "PKR regulates TLR2/TLR4-dependent signaling in murine alveolar macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol **38**(1): 26-31.
- 102 Strieter, R. M. (2002). "Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(4): L688-689.
- 103 Maus, U., S. Henning, H. Wenschuh, K. Mayer, W. Seeger and J. Lohmeyer (2002). "Role of endothelial MCP-1 in monocyte adhesion to inflamed human endothelium under physiological flow." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(6): H2584-2591.
- 104 Mizgerd, J. P. (2008). "Acute lower respiratory tract infection." N Engl J Med **358**(7): 716-727.
- 105 Ware, L. B. and M. A. 107 (2000). "The acute respiratory distress syndrome." N Engl J Med **342**(18): 1334-1349.
- 106 Rubenfeld, G. D. and M. S. Herridge (2007). "Epidemiology and outcomes of acute lung injury." Chest **131**(2): 554-562.

- 107 Matthay, M. A. and R. L. Zemans (2011). "The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment." Annu Rev Pathol **6**: 147-163.
- 108 Martin, T. R., N. Hagimoto, et al. (2005). "Apoptosis and epithelial injury in the lungs." Proc Am Thorac Soc **2**(3): 214-220.
- 109 Martin, T. R., M. Nakamura and G. Matute-Bello (2003). "The role of apoptosis in acute lung injury." Crit Care Med **31**(4 Suppl): S184-188.
- 110 Frerking, I., A. Gunther, W. Seeger and U. Pison (2001). "Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options." Intensive Care Med **27**(11): 1699-1717.
- 111 Kurahashi, K., O. Kajikawa, T. Sawa, M. Ohara, M. A. Gropper, D. W. Frank, T. R. Martin and J. P. Wiener-Kronish (1999). "Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia." J Clin Invest **104**(6): 743-750.
- 112 Cepkova, M. and M. A. Matthay (2006). "Pharmacotherapy of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome." J Intensive Care Med **21**(3): 119-143.
- 113 Ronni, T., T. Sareneva, J. Pirhonen and I. Julkunen (1995). "Activation of IFN-alpha, IFN-gamma, MxA, and IFN regulatory factor 1 genes in influenza A virus-infected human peripheral blood mononuclear cells." J Immunol **154**(6): 2764-74.
- 114 Lamb R., R.M. Krug. 1996. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe RM, Chanock MS et al., editors. Fields virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1353-96
- 115 Ebisawa, I. T., O. Kitamoto, Y. Takeuchi and M. Makino (1969). "Immunocytologic study of nasal epithelial cells in influenza." Am Rev Respir Dis **99**(4): 507-15.
- 116 Takizawa, T., S. Matsukawa, Y. Higuchi, S. Nakamura, Y. Nakanishi and R. Fukuda (1993). "Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells." J Gen Virol **74** (Pt 11): 2347-55.
- 117 Hinshaw, V. S., C. W. Olsen, N. Dybdahl-Sissoko and D. Evans (1994). "Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses." J Virol **68**(6): 3667-73.
- 118 Earnshaw, W. C., L. M. Martins and S. H. Kaufmann (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." Annu Rev Biochem **68**: 383-424.
- 119 Schultz-Cherry S., R. M. Krug V. S. Hinshaw. 1998. Induction of apoptosis by influenza virus. Semin Virol **8**:491-5

- 120 Morris, S. J., G. E. Price, J. M. Barnett, S. A. Hiscox, H. Smith and C. Sweet (1999). "Role of neuraminidase in influenza virus-induced apoptosis." J Gen Virol **80 (Pt 1)**: 137-46.
- 121 Zamarin, D., A. Garcia-Sastre, X. Xiao, R. Wang and P. Palese (2005). "Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1." PLoS Pathog **1**(1): e4.
- 122 Kurokawa, M., A. H. Koyama, S. Yasuoka and A. Adachi (1999). "Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication." Int J Mol Med **3**(5): 527-30.
- 123 Hale, B. G., D. Jackson, Y. H. Chen, R. A. Lamb and R. E. Randall (2006). "Influenza A virus NS1 protein binds p85beta and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(38): 14194-9.
- 124 Herold, S., S. Ludwig, S. Pleschka and T. Wolff (2012). "Apoptosis signaling in influenza virus propagation, innate host defense, and lung injury." J Leukoc Biol.
- 125 Isaacs, A. and J. Lindenmann (1987). "Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957." J Interferon Res **7**(5): 429-38.
- 126 Pestka, S., J. A. Langer, K. C. Zoon and C. E. Samuel (1987). "Interferons and their actions." Annu Rev Biochem **56**: 727-77.
- 127 Malmgaard, L. (2004). "Induction and regulation of IFNs during viral infections." J Interferon Cytokine Res **24**(8): 439-54.
- 128 Roberts, R. M., L. Liu, Q. Guo, D. Leaman and J. Bixby (1998). "The evolution of the type I interferons." J Interferon Cytokine Res **18**(10): 805-16.
- 129 Bach, E. A., M. Aguet and R. D. Schreiber (1997). "The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling." Annu Rev Immunol **15**: 563-91.
- 130 Ikeda, H., L. J. Old and R. D. Schreiber (2002). "The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting." Cytokine Growth Factor Rev **13**(2): 95-109.
- 131 Pestka, S. (1997). "The interferon receptors." Semin Oncol **24**(3 Suppl 9): S9-18-S9-40.
- 132 Kotenko, S. V., G. Gallagher, V. V. Baurin, A. Lewis-Antes, M. Shen, N. K. Shah, J. A. Langer, F. Sheikh, H. Dickensheets, et al. (2003). "IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex." Nat Immunol **4**(1): 69-77.

- 133 Sheppard, P., W. Kindsvogel, W. Xu, K. Henderson, S. Schlutsmeyer, T. E. Whitmore, R. Kuestner, U. Garrigues, C. Birks, et al. (2003). "IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R." Nat Immunol **4**(1): 63-8.
- 134 Vilcek, J. (2003). "Novel interferons." Nat Immunol **4**(1): 8-9.
- 135 van den Broek, M. F., U. Muller, S. Huang, M. Aguet and R. M. Zinkernagel (1995). "Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors." J Virol **69**(8): 4792-6.
- 136 Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway, Jr. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-7.
- 137 Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-95.
- 138 Kumar, A., J. Haque, J. Lacoste, J. Hiscott and B. R. Williams (1994). "Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6288-92.
- 139 Kawai, T., K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, K. J. Ishii, O. Takeuchi and S. Akira (2005). "IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction." Nat Immunol **6**(10): 981-8.
- 140 Fitzgerald, K. A., S. M. McWhirter, K. L. Faia, D. C. Rowe, E. Latz, D. T. Golenbock, A. J. Coyle, S. M. Liao and T. Maniatis (2003). "IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway." Nat Immunol **4**(5): 491-6.
- 141 Hiscott, J., P. Pitha, P. Genin, H. Nguyen, C. Heylbroeck, Y. Mamane, M. Algarte and R. Lin (1999). "Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor." J Interferon Cytokine Res **19**(1): 1-13.
- 142 Sato, M., H. Suemori, N. Hata, M. Asagiri, K. Ogasawara, K. Nakao, T. Nakaya, M. Katsuki, S. Noguchi, et al. (2000). "Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction." Immunity **13**(4): 539-48.
- 143 Samuelsson, C. V., S. Lienenklaus, P. P. Muller, R. Zawatzky, H. Hauser and S. Weiss (2005). "Transformation of mouse fibroblasts alters the induction pattern of type I IFNs after virus infection." Biochem Biophys Res Commun **335**(2): 584-9.
- 144 Samuel, C. E. (1993). "The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans." J Biol Chem **268**(11): 7603-6.

- 145 Clemens, M. J. and A. Elia (1997). "The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function." J Interferon Cytokine Res **17**(9): 503-24.
- 146 Proud, C. G. (1995). "PKR: a new name and new roles." Trends Biochem Sci **20**(6): 241-6.
- 147 Thomis, D. C. and C. E. Samuel (1995). "Mechanism of interferon action: characterization of the intermolecular autophosphorylation of PKR, the interferon-inducible, RNA-dependent protein kinase." J Virol **69**(8): 5195-8.
- 148 Cabanski, M., M. Steinmuller, L. M. Marsh, E. Surdziel, W. Seeger and J. Lohmeyer (2008). "PKR regulates TLR2/TLR4-dependent signaling in murine alveolar macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol **38**(1): 26-31.
- 149 Karin, M. (1999). "How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex." Oncogene **18**(49): 6867-74.
- 150 Offermann, M. K., J. Zimring, K. H. Mellits, M. K. Hagan, R. Shaw, R. M. Medford, M. B. Mathews, S. Goodbourn and R. Jagus (1995). "Activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase and induction of vascular cell adhesion molecule-1 by poly (I).poly (C) in endothelial cells." Eur J Biochem **232**(1): 28-36.
- 151 Haller, O., G. Kochs, et al. (2006). "The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses." Virology **344**(1): 119-130.
- 152 Precious, B., K. Childs, V. Fitzpatrick-Swallow, S. Goodbourn and R. E. Randall (2005). "Simian virus 5 V protein acts as an adaptor, linking DDB1 to STAT2, to facilitate the ubiquitination of STAT1." J Virol **79**(21): 13434-41.
- 153 Stancato, L. F., M. David, C. Carter-Su, A. C. Lerner and W. B. Pratt (1996). "Preassociation of STAT1 with STAT2 and STAT3 in separate signalling complexes prior to cytokine stimulation." J Biol Chem **271**(8): 4134-7.
- 154 Tang, X., J. S. Gao, Y. J. Guan, K. E. McLane, Z. L. Yuan, B. Ramratnam and Y. E. Chin (2007). "Acetylation-dependent signal transduction for type I interferon receptor." Cell **131**(1): 93-105.
- 155 de Veer, M. J., M. Holko, M. Frevel, E. Walker, S. Der, J. M. Paranjape, R. H. Silverman and B. R. Williams (2001). "Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays." J Leukoc Biol **69**(6): 912-20.
- 156 Der, S. D., A. Zhou, B. R. Williams and R. H. Silverman (1998). "Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15623-8.

- 157 Engelhardt, O. G., E. Ullrich, G. Kochs and O. Haller (2001). "Interferon-induced antiviral Mx1 GTPase is associated with components of the SUMO-1 system and promyelocytic leukemia protein nuclear bodies." Exp Cell Res **271**(2): 286-95.
- 158 Zurcher, T., J. Pavlovic and P. Staeheli (1992). "Nuclear localization of mouse Mx1 protein is necessary for inhibition of influenza virus." J Virol **66**(8): 5059-66.
- 159 Turan, K., M. Mibayashi, K. Sugiyama, S. Saito, A. Numajiri and K. Nagata (2004). "Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome." Nucleic Acids Res **32**(2): 643-52.
- 160 Clemens, M. J. and B. R. Williams (1978). "Inhibition of cell-free protein synthesis by pppA2'p5'A2'p5'A: a novel oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell extracts." Cell **13**(3): 565-72.
- 161 Roberts, W. K., A. Hovanessian, R. E. Brown, M. J. Clemens and I. M. Kerr (1976). "Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis." Nature **264**(5585): 477-80.
- 162 Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, H. Eto, K. Okumura and H. Yagita (1999). "Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs." J Exp Med **189**(9): 1451-60.
- 163 Liu, S., Y. Yu, M. Zhang, W. Wang and X. Cao (2001). "The involvement of TNF- α -related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN- β -stimulated human dendritic cells to tumor cells." J Immunol **166**(9): 5407-15.
- 164 Cretney, E., K. Takeda, H. Yagita, M. Glaccum, J. J. Peschon and M. J. Smyth (2002). "Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice." J Immunol **168**(3): 1356-61.
- 165 Griffith, T. S., S. R. Wiley, M. Z. Kubin, L. M. Sedger, C. R. Maliszewski and N. A. Fanger (1999). "Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL." J Exp Med **189**(8): 1343-54.
- 166 Huang, Y., A. Walstrom, L. Zhang, Y. Zhao, M. Cui, L. Ye and J. C. Zheng (2009). "Type I interferons and interferon regulatory factors regulate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected macrophages." PLoS One **4**(4): e5397.
- 167 Herold, S., M. Steinmueller, W. von Wulffen, L. Cakarova, R. Pinto, S. Pleschka, M. Mack, W. A. Kuziel, N. Corazza, et al. (2008). "Lung epithelial apoptosis in in-

- fluenza virus pneumonia: the role of macrophage-expressed TNF-related apoptosis-inducing ligand." J Exp Med **205**(13): 3065-77.
- 168 Wiley, S. R., K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." Immunity **3**(6): 673-82.
- 169 Pitti, R. M., S. A. Marsters, S. Ruppert, C. J. Donahue, A. Moore and A. Ashkenazi (1996). "Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family." J Biol Chem **271**(22): 12687-90.
- 170 Bouraless, S., D. M. Findlay and A. Evdokiou (2005). "Death to the bad guys: targeting cancer via Apo2L/TRAIL." Apoptosis **10**(1): 35-51.
- 171 Wajant, H., D. Moosmayer, T. Wuest, T. Bartke, E. Gerlach, U. Schonherr, N. Peters, P. Scheurich and K. Pfizenmaier (2001). "Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative." Oncogene **20**(30): 4101-6.
- 172 Muhlenbeck, F., P. Schneider, J. L. Bodmer, R. Schwenzer, A. Hauser, G. Schubert, P. Scheurich, D. Moosmayer, J. Tschopp, et al. (2000). "The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation." J Biol Chem **275**(41): 32208-13.
- 173 Hymowitz, S. G., M. P. O'Connell, M. H. Ultsch, A. Hurst, K. Totpal, A. Ashkenazi, A. M. de Vos and R. F. Kelley (2000). "A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL." Biochemistry **39**(4): 633-40.
- 174 Hymowitz, S. G., H. W. Christinger, G. Fuh, M. Ultsch, M. O'Connell, R. F. Kelley, A. Ashkenazi and A. M. de Vos (1999). "Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5." Mol Cell **4**(4): 563-71.
- 175 Bodmer, J. L., P. Schneider and J. Tschopp (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." Trends Biochem Sci **27**(1): 19-26.
- 176 Wang, S. and W. S. El-Deiry (2003). "TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors." Oncogene **22**(53): 8628-33.

- 177 Kufe, D. W., R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, et al. (2003). "Protein Domains Involved in Apoptosis Regulation." Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker.
- 178 Pan, G., K. O'Rourke, A. M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni and V. M. Dixit (1997). "The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." Science **276**(5309): 111-3.
- 179 Pan, G., J. Ni, Y. F. Wei, G. Yu, R. Gentz and V. M. Dixit (1997). "An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL." Science **277**(5327): 815-8.
- 180 Sheridan, J. P., S. A. Marsters, R. M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. L. Gray, K. Baker, et al. (1997). "Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors." Science **277**(5327): 818-21.
- 181 Walczak, H., M. A. Degli-Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, et al. (1997). "TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL." Embo J **16**(17): 5386-97.
- 182 Wu, G. S., T. F. Burns, Y. Zhan, E. S. Alnemri and W. S. El-Deiry (1999). "Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor." Cancer Res **59**(12): 2770-5.
- 183 MacFarlane, M., M. Ahmad, S. M. Srinivasula, T. Fernandes-Alnemri, G. M. Cohen and E. S. Alnemri (1997). "Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL." J Biol Chem **272**(41): 25417-20.
- 184 Degli-Esposti, M. A., W. C. Dougall, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, C. A. Smith and R. G. Goodwin (1997). "The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain." Immunity **7**(6): 813-20.
- 185 Marsters, S. A., J. P. Sheridan, R. M. Pitti, A. Huang, M. Skubatch, D. Baldwin, J. Yuan, A. Gurney, A. D. Goddard, et al. (1997). "A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain." Curr Biol **7**(12): 1003-6.
- 186 Wu, G. S., K. Kim and W. S. el-Deiry (2000). "KILLER/DR5, a novel DNA-damage inducible death receptor gene, links the p53-tumor suppressor to caspase activation and apoptotic death." Adv Exp Med Biol **465**: 143-51.

- 187 Kim, K., M. J. Fisher, S. Q. Xu and W. S. el-Deiry (2000). "Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells." Clin Cancer Res **6**(2): 335-46.
- 188 Emery, J. G., P. McDonnell, M. B. Burke, K. C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E. R. Appelbaum, C. Eichman, et al. (1998). "Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." J Biol Chem **273**(23): 14363-7.
- 189 Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, A. Tinel, H. LeBlanc, A. Virmani, P. Schow, A. Gazdar, J. Blenis, D. Arnott, et al. (2001). "Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8." J Biol Chem **276**(49): 46639-46.
- 190 Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, A. Chuntharapai, P. Schow, K. J. Kim and A. Ashkenazi (2000). "Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5." Immunity **12**(6): 611-20.
- 191 Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Krammer and M. E. Peter (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." Embo J **14**(22): 5579-88.
- 192 Boatright, K. M. and G. S. Salvesen (2003). "Mechanisms of caspase activation." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 725-31.
- 193 Donepudi, M., A. Mac Sweeney, C. Briand and M. G. Grutter (2003). "Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation." Mol Cell **11**(2): 543-9.
- 194 Wajant, H. (2003). "Death receptors." Essays Biochem **39**: 53-71.
- 195 Ozoren, N. and W. S. El-Deiry (2002). "Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL." Neoplasia **4**(6): 551-7.
- 196 Li, H., H. Zhu, C. J. Xu and J. Yuan (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." Cell **94**(4): 491-501.
- 197 Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter and X. Wang (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." Cell **94**(4): 481-90.
- 198 Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K. J. Oh and P. H. Schlesinger (2000). "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c." Cell Death Differ **7**(12): 1166-73.

- 199 Fischer, U., R. U. Janicke and K. Schulze-Osthoff (2003). "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates." Cell Death Differ **10**(1): 76-100.
- 200 Zhivotovsky, B. (2003). "Caspases: the enzymes of death." Essays Biochem **39**: 25-40.
- 201 Turan, K., M. Mibayashi, K. Sugiyama, S. Saito, A. Numajiri and K. Nagata (2004). "Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome." Nucleic Acids Res **32**(2): 643-52.
- 202 Szretter, K. J., S. Gangappa, J. A. Belser, H. Zeng, H. Chen, Y. Matsuoka, S. Sambhara, D. E. Swayne, T. M. Tumpey, et al. (2009). "Early control of H5N1 influenza virus replication by the type I interferon response in mice." J Virol **83**(11): 5825-34.
- 203 Grimm, D., P. Staeheli, M. Hufbauer, I. Koerner, L. Martinez-Sobrido, A. Solorzano, A. Garcia-Sastre, O. Haller and G. Kochs (2007). "Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(16): 6806-11.
- 204 Toews, G. B. (2001). "Cytokines and the lung." Eur Respir J Suppl **34**: 3s-17s.
- 205 Andrejeva, J., K. S. Childs, D. F. Young, T. S. Carlos, N. Stock, S. Goodbourn and R. E. Randall (2004). "The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17264-9.
- 206 Opitz, B., Rejaibi, A., Dauber, B., Eckhard, J., Vinzing, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Suttorp, N., and Wolff, T. (2007). IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. Cell Microbiol **9**: 930-938.
- 207 Zamanian-Daryoush, M., T. H. Mogensen, J. A. DiDonato and B. R. Williams (2000). "NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase." Mol Cell Biol **20**(4): 1278-90.
- 208 Gil, J., J. Alcami and M. Esteban (2000). "Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I kappa B kinase complex." Oncogene **19**(11): 1369-78.

- 209 Yang, Y. L., L. F. Reis, J. Pavlovic, A. Aguzzi, R. Schafer, A. Kumar, B. R. Williams, M. Aguet and C. Weissmann (1995). "Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase." Embo J **14**(24): 6095-106.
- 210 Garcia, M.A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C., and Esteban, M. (2006). Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to an-antiproliferative action. Microbiol Mol Biol Rev **70**: 1032-1060.
- 211 Bonnet, M.C., Weil, R., Dam, E., Hovanessian, A.G., and Meurs, E.F. (2000). PKR stimulates NF-kappaB irrespective of its kinase function by interacting with the IkappaB kinase complex. Molecular and cellular biology **20**: 4532-4542.
- 212 Garcia-Sastre, A., and Biron, C.A. (2006). Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. Science New York, NY **312**: 879-882.
- 213 Koerner, I., Kochs, G., Kalinke, U., Weiss, S., and Staeheli, P. (2007). Protective role of beta interferon in host defense against influenza A virus. Journal of virology **81**: 2025-2030.
- 214 Seo, S.U., Kwon, H.J., Ko, H.J., Byun, Y.H., Seong, B.L., Uematsu, S., Akira, S., and Kweon, M.N. (2011). Type I interferon signaling regulates Ly6C(hi) monocytes and neutrophils during acute viral pneumonia in mice. PLoS pathogens **7**: e1001304.
- 215 Hensley, L. E., L. E. Fritz, P. B. Jahrling, C. L. Karp, J. W. Huggins and T. W. Geisbert (2004). "Interferon-beta 1a and SARS coronavirus replication." Emerg Infect Dis **10**(2): 317-9.
- 216 Matzinger, S. R., T. D. Carroll, et al. (2011). "Exogenous IFN-alpha administration reduces influenza A virus replication in the lower respiratory tract of rhesus macaques." PLoS One **6**(12): e29255.
- 217 Bem, R. A., A. P. Bos, R. M. Wosten-van Asperen, M. Bruijn, R. Lutter, M. R. Sprick and J. B. van Woensel "Potential role of soluble TRAIL in epithelial injury in children with severe RSV infection." Am J Respir Cell Mol Biol **42**(6): 697-705.
- 218 Brincks, E.L., Kucaba, T.A., Legge, K.L., and Griffith, T.S. (2008). Influenza-induced expression of functional tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand on human peripheral blood mononuclear cells. Human immunology **69**: 634-646.
- 219 Otte, A., M. Sauter, L. Alleva, S. Baumgarte, K. Klingel and G. Gabriel "Differential host determinants contribute to the pathogenesis of 2009 pandemic H1N1

- p>and human H5N1 influenza A viruses in experimental mouse models."
- Am J Pathol
- 179**
- (1): 230-9.
- 220 Cheung, C. Y., L. L. Poon, A. S. Lau, W. Luk, Y. L. Lau, K. F. Shortridge, S. Gordon, Y. Guan and J. S. Peiris (2002). "Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease?" Lancet **360**(9348): 1831-7.
- 221 Sung, B., B. Park, et al. (2010). "Celastrol, a triterpene, enhances TRAIL-induced apoptosis through the down-regulation of cell survival proteins and up-regulation of death receptors." J Biol Chem **285**(15): 11498-11507.
- 222 Wang, H. M., M. Bodenstein and K. Markstaller (2008). "Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury." Eur Surg Res **40**(4): 305-16.
- 223 Finnberg, N., J. J. Gruber, P. Fei, D. Rudolph, A. Bric, S. H. Kim, T. F. Burns, H. Ajuha, R. Page, et al. (2005). "DR5 knockout mice are compromised in radiation-induced apoptosis." Mol Cell Biol **25**(5): 2000-13.
- 224 Kitamura, Y., S. Hashimoto, et al. (2001). "Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice." Am J Respir Crit Care Med **163**(3 Pt 1): 762-769.
- 225 Matute-Bello, G., C. W. Frevert, et al. (2001). "Fas/Fas ligand system mediates epithelial injury, but not pulmonary host defenses, in response to inhaled bacteria." Infect Immun **69**(9): 5768-5776.
- 226 Corazza, N., Kassahn, D., Jakob, S., Badmann, A., and Brunner, T. (2009). TRAIL-induced apoptosis: between tumor therapy and immunopathology. Annals of the New York Academy of Sciences **1171**: 50-58.
- 227 Ishikawa, E., Nakazawa, M., Yoshinari, M., and Minami, M. (2005). Role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune response to influenza virus infection in mice. Journal of virology **79**: 7658-7663.
- 228 Brincks, E. L., A. Katewa, T. A. Kucaba, T. S. Griffith and K. L. Legge (2008). "CD8 T cells utilize TRAIL to control influenza virus infection." J Immunol **181**(7): 4918-25.

Veröffentlichungen

- **Publikationen**

- 1 Ma W, Brenner D, Wang Z, Dauber B, Ehrhardt C, **Högner K**, Herold S, Ludwig S, Wolff T, Yu K, Richt JA, Planz O, Pleschka S (2010). „The NS segment of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) is sufficient to alter replication efficiency, cell tropism, and host range of an H7N1 HPAIV.” J Virol **84**(4):2122-33.
- 2 Herold S, Shafiei Tabar T, Janßen H, **Hoegner K**, Cabanski M, Lewe-Schlosser P, Albrecht J, Driever F, Vadasz I, Seeger W, Steinmueller M, Lohmeyer J. (2011). “Exudate macrophages attenuate lung injury by the release of IL-1 receptor antagonist in gram-negative pneumonia.” Am J Respir Crit Care Med **183**(10): 1380-90.
- 3 Pinto R, Herold S, Cakarova L, **Hoegner K**, Lohmeyer J, Planz O, Pleschka S. (2011). “Inhibition of influenza virus-induced NF-kappaB and Raf-MEK-ERK activation can reduce both virus titers and cytokine expression simultaneously in vitro and in vivo.” Antiviral Res **92**(1): 45-56.
- 4 Koppe U, **Högner K**, Witzenrath M, Bauer S, Hammerschmidt S, Suttorp N, Herold S, Opitz B. (2012). “Streptococcus pneumoniae infection of macrophages stimulates a STING- and IRF3-dependent type I interferon production, which regulates RANTES production by the infected macrophages and by co-cultured alveolar epithelial cells.” J Immunol **15**:188(2): 811-7.
- 5 Unkel B, **Hoegner K**, Clausen BE, Lewe-Schlosser P, Bodner J, Gattenloehner S, Janßen H, Seeger W, Lohmeyer J, Herold S. “Alveolar epithelial cells orchestrate lung dendritic cell antiviral functions by release of granulocyte-macrophage colony stimulating factor in influenza virus pneumonia.” Manuskript in Revision.
- 6 **Högner K**, Pleschka S, Wolff T, Gruber A, Kalinke U, Walmrath D, Bodner J, Gattenlöhner S, Lewe-Schlosser P, Matrosovich M, Seeger W, Lohmeyer J, Herold S. “Macrophage-expressed IFN- β mediates apoptotic alveolar epithelial injury in severe influenza virus pneumonia.” Manuskript in Revision.

- **Vorträge:**

- 1 Katrin Högner, Hermann Janßen, Stephan Pleschka, Jens Albrecht, Frank Driever, Werner Seeger, Juergen Lohmeyer und Susanne Herold

Die Expression von TRAIL ist IFN- β abhängig und führt zu Apoptose von alveolären Epithelzellen und zu einer Schrankenstörung bei der Influenza Pneumonie

DGP Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie, Borstel 2009

- 2 Katrin Högner, Hermann Janßen, Stephan Pleschka, Jens Albrecht, Frank Driever, Werner Seeger, Juergen Lohmeyer und Susanne Herold

Die Expression von TRAIL ist IFN- β abhängig und führt zu Apoptose von alveolären Epithelzellen und zu einer Schrankenstörung bei der Influenza Pneumonie

KIT, Köln 2010

- 3 Katrin Högner, Hermann Janßen, Stephan Pleschka, Jens Albrecht, Frank Driever, Werner Seeger, Juergen Lohmeyer und Susanne Herold

Die Expression von TRAIL ist IFN- β abhängig und führt zu Apoptose von alveolären Epithelzellen und zu einer Schrankenstörung bei der Influenza Pneumonie

DGP Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie, Berlin 2010

- 4 Katrin Högner, Hermann Janßen, Stephan Pleschka, Jens Albrecht, Frank Driever, Werner Seeger, Juergen Lohmeyer und Susanne Herold

Macrophage-expressed IFN- β mediates apoptotic alveolar epithelial injury in severe influenza virus pneumonia

Flu Research Net Meeting, Braunschweig 2011

- **Poster:**

- 1 Björn-Philipp Klope, Silke Schüle, **Katrin Högner**, Christian Brendel, Nina Wolfrum, Manuel Grez, Klaus Cichutek und Matthias Schweizer

Development of an SIVsmmPBj-derived three-plasmid vector system for gene-transfer of *gp91phox* into human monocytes

ESGCT, Rotterdam 2007

- 2 Björn-Philipp Klope, Silke Schüle, **Katrin Högner**, Christian Brendel, Manuel Grez, Matthias Schweizer und Klaus Cichutek

Gene transfer of *gp91phox* by an SIVsmmPBj-derived lentivector into monocytes from chronic granulomatous disease patients

ASGT, Boston 2008

- 3 **Katrin Högner**, Hermann Janßen, Stephan Pleschka, Jens Albrecht, Frank Driever, Werner Seeger, Juergen Lohmeyer und Susanne Herold

The expression of TRAIL is IFN- β dependent and mediates apoptosis of alveolar epithelial cells and barrier dysfunction in influenza virus pneumonia

ATS, New Orleans 2010

- 4 **Katrin Högner**, Hermann Janßen, Stephan Pleschka, Jens Albrecht, Frank Driever, Werner Seeger, Juergen Lohmeyer und Susanne Herold

The expression of TRAIL is IFN- β dependent and mediates apoptosis of alveolar epithelial cells and barrier dysfunction upon influenza virus pneumonia

14th ICI, Kobe 2010

- 5 Barbara Unkel, **Katrin Hoegner**, Werner Seeger, Jürgen Lohmeyer und Susanne Herold

Alveolar epithelial cells improve dendritic cell antiviral functions in severe influenza virus pneumonia by expression of GM-CSF

ATS, Denver 2011

- **Preise:**

Zweiter Preis für beste eingereichte Beiträge auf dem 10. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin für den Beitrag:

Die Expression von TRAIL ist IFN- β abhängig und führt zu Apoptose von alveolären Epithelzellen und zu einer Schrankenstörung bei der Influenza Pneumonie

KIT, Köln 2010

Danksagung

... ich danke Prof. Werner Seeger für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an der medizinischen Klinik II durchzuführen.

... ich danke Prof. Jürgen Lohmeyer und Dr. Susanne Herold für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Unterstützung. Insbesondere möchte ich für die zahlreichen Anregungen und Hinweise sowie die Bereitschaft zur Diskussion bei der Bearbeitung des Themas danken.

... ich danke den Kooperationspartnern Thorsten Wolff, Stephan Pleschka, Stephanie Plog, Achim D. Gruber, Ulrich Kalinke, Hans-Dieter Walmrath, Johannes Bodner, Stefan Gattenlöhner, Peter Lewe-Schlosser und Mikhail Matrosovich ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

... ich danke meinen Kollegen Dagmar Hensel, Rebecca Winkler, Julia Besselow, Margret Lohmeyer und Gudrun Biemer-Mansouri für die arbeitstechnische und vor allem auch moralische Unterstützung. Außerdem danke ich meinen Mitstreitern Jennifer Quantius, Christin Becker, Barbara Unkel, Oana Gottschald, Corinna Siegel und Balachandar Selvakumar für fachliche Diskussionen, die gemeinsame Zeit und den Spass im Labor.

... zuletzt möchte ich meiner Familie und allen Freunden für das jederzeit offene Ohr danken.

... vor allem danke ich Sebastian, der mir immer zur Seite stand und mich immer unterstützt hat.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Fernwald, den 1.8.2012

Katrin Högner