

Untersuchungen zum Einfluss eines akuten Asthma bronchiale als Komorbidität auf den Krankheitsverlauf einer Influenza A Virus Infektion im Mausmodell

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

des Fachbereichs Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Nancy Candide Mounogou Kouassi
aus Libreville, Gabun

Hamburg, 2020

Alle Versuche und Auswertungen der vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von April 2015 bis Mai 2020 am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie (Direktor: Prof. Dr. Thomas Dobner, Fachbereich Biologie der Universität Hamburg) unter Betreuung von Prof. Dr. Gülşah Gabriel durchgeführt

Angenommen vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg am: 29.07.2020

Erstgutachterin: Prof. Dr. Gülşah Gabriel

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Julia Kehr

Tag der mündlichen Prüfung am: 11.12.2020

Mitglieder der Prüfungskommission: Prof. Dr. Julia Kehr
Prof. Dr. Gülşah Gabriel
Prof. Dr. Jörg Ganzhorn
Prof. Dr. Arp Schnittger

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1 Einleitung.....	1
1.1 Influenza A Viren	1
1.1.1 Taxonomie	1
1.1.2 Virionstruktur	1
1.1.3 Genomaufbau.....	3
1.1.4 Replikationszyklus von Influenza A Viren	5
1.1.5 Epidemiologie der Influenza A Viren im Menschen	6
1.1.5.1 Influenza-Epidemien.....	7
1.1.5.2 Influenza-Pandemien.....	7
1.1.6 2009 pandemische H1N1 Influenza (2009 pH1N1)	9
1.1.6.1 Epidemiologie der 2009 pH1N1 Influenza.....	9
1.1.6.2 Ursprung der 2009 pH1N1 Influenza.....	9
1.1.6.3 Pathogenese der 2009 pH1N1 Influenza.....	10
1.1.6.4 Asthma als Komorbidität für schweren Influenza Krankheitsverlauf.....	12
1.2 Asthma bronchiale	13
1.2.1 Asthma Prävalenz und Pathogenese	13
1.2.2 Allergisches Asthma und weitere Formen	15
1.2.3 Immunantwort bei Asthma bronchiale (pro- und anti-inflammatorische Faktoren)....	16
1.2.4 Prävention und Therapie.....	18
1.2.5 Geschlechtsunterschied im Asthma bronchiale.....	19
1.3 Tiermodelle in der Asthma und Influenza Komorbiditätsforschung.....	20
1.3.1 Das Mausmodell.....	21
1.3.2 Weitere Tiermodelle.....	22
1.3.3 Das Ovalbumin Allergen	23
1.3.4 Weitere Allergene	24
1.4 Zielsetzung der Arbeit	25
2 Material	26
2.1 Chemikalien	26
2.2 Puffer und Lösungen	27
2.3 Desinfektionsmittel	27
2.4 Verbrauchsmaterialien.....	28
2.5 Kits.....	29

Inhaltsverzeichnis

2.6	Enzyme und Zusätze	29
2.7	Zellkulturmedien & -zusatzstoffe	30
2.8	Eukaryotische Zelllinien.....	30
2.9	Virusstämme.....	31
2.10	Antikörper und Seren	31
2.11	Tiere.....	31
2.12	Zubehör für Tiere.....	32
2.13	Narkotika & Analgetika.....	32
2.14	Programme.....	32
2.15	Geräte und Werkzeug	33
3	Methoden.....	36
3.1	Molekularbiologische Methoden	36
3.1.1	Gesamt-RNA Isolierung	36
3.1.2	Hochdurchsatz-Sequenzierung (<i>High Throughput Sequencing</i>).....	36
3.1.3	Transkriptomanalyse der differentielle exprimierten Genen aus der Mauslungen.....	37
3.1.3.1	Visualisierung der Protein-Protein Interaktion mittels STRING und Cytoscape.....	37
3.1.3.2	Gen-Ontologie und KEGG Signalweg Analyse	37
3.1.4	Konzentrationsbestimmung von Immunglobulin mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA).....	38
3.1.5	Zytokinbestimmung mittels Multi-Analyt-Profilierung (<i>Multiplex-Immunoassay</i>)	38
3.1.6	Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA).....	39
3.2	Zellkulturmethoden.....	40
3.2.1	Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zelllinien	40
3.2.2	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	40
3.3	Virologische Methoden	41
3.3.1	Virusanzucht in eukaryotischen Zellen.....	41
3.3.2	Gewinnung von Erythrozyten aus Hühnervollblut	41
3.3.3	Hämagglutinationstest (HA-Test)	42
3.3.4	Virustiterbestimmung von Virusstocks, Organhomogenisaten oder Broncho-alveolärer Lavage mittels Plaquetest	42
3.4	Tierversuche	43
3.4.1	Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung und Infektion mit Influenza.....	44
3.4.2	Narkotisieren und Euthanasie von Mäusen	46
3.4.3	Intranasale Infektion und Kontrolle des Gewichtsverlustes und des Überlebens der Mäuse	46
3.4.4	Gewinnung von Probenmaterial	47

Inhaltsverzeichnis

3.4.4.1	Blutentnahme, Organentnahme	47
3.4.4.2	Bronchoalveoläre Lavage	47
3.4.5	Herstellung von Lungenhomogenisaten	48
3.4.6	Gesamte Zellzahlbestimmung im Bronchoalveoläre Lavage.....	48
3.4.7	Anti-IgE Antikörper Behandlung in asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen	48
3.5	Histologische Methoden	49
3.5.1	Präparation von Gewebeschnitten.....	49
3.5.2	Entparaffinierung und Rehydrierung von FFPE-Gewebeschnitten	50
3.5.3	Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE).....	51
3.5.4	Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS)	51
3.5.5	Immunhistochemische Färbung (ICH-P).....	52
3.6	Statistische Auswertungen	53
4	Ergebnisse.....	54
4.1	Etablierung eines weiblichen Asthma Mausmodells zur Untersuchung des Krankheitsverlaufs von Influenza	54
4.1.1	2009 pH1N1 Pathogenese in weiblichen asthmatischen Mausmodellen.....	55
4.1.1.1	Das C57BL/6 Modell	55
4.1.1.2	Das 1SB6F1 Modell.....	57
4.1.2	Lungenpathogenese in den weiblichen asthmatischen Mausmodellen	58
4.1.2.1	Lungentropismus im weiblichen asthmatischen Mausmodell.....	58
4.1.2.1.1	Das C57BL/6 Modell	59
4.1.2.1.2	Das 1SB6F1 Modell.....	60
4.1.2.2	Immunhistologie der Lunge im weiblichen asthmatischen Mausmodell.....	60
4.1.2.2.1	Das C57BL/6 Modell	61
4.1.2.2.2	Das 1SB6F1 Modell.....	63
4.1.3	Immunantwort in der Lunge von weiblichen asthmatischen Mäusen.....	65
4.1.3.1	Das C57BL/6 Modell	65
4.1.3.2	Das 1SB6F1 Modell.....	71
4.1.4	Zelluläre Infiltration in der Lunge von weiblichen asthmatischen Mäusen	76
4.1.4.1	Das C57BL/6 Modell	76
4.1.4.2	Das 1SB6F1 Modell.....	77
4.1.5	Allergische IgE Antwort in weiblichen asthmatischen Mausmodellen	79
4.1.5.1	Das C57BL/6 Modell	79
4.1.5.2	Das 1SB6F1 Modell.....	80
4.2	Geschlechtsspezifische Unterschiede im Asthma Mausmodell von Influenza	81

Inhaltsverzeichnis

4.2.1	2009 pH1N1 Pathogenese im männlichen asthmatischen Mausmodell	81
4.2.2	Lungentropismus im männlichen asthmatischen Mausmodell	82
4.2.3	Allergische IgE Antwort in männlichen asthmatischen Mausmodell.....	83
4.3	Transkriptomanalyse der Lunge im weiblichen Asthma Mausmodell von Influenza.....	85
4.3.1	Differentielle Genexpression und Protein-Protein-Interaktionsanalysen in weiblichen asthmatischen Mausmodellen	85
4.3.2	Expression von Interferon-stimulierenden Genen in weiblichen Asthma bronchiale Mausmodellen (ISGs)	90
4.3.3	Dysregulierte zelluläre Faktoren in weiblichen Asthma bronchiale Mausmodellen.....	92
4.4	OVA-spezifische IgE Depletion im weiblichen asthmatischen Mausmodell	95
5	Diskussion.....	97
5.1	Asthma als Komorbidität während der 2009 Influenza Pandemie	97
5.2	Asthmatische 1SB6F1 Mäuse zeigen eine erhöhte Pathogenität als die asthmatischen C57BL/6 Mäusen	98
5.3	Die virale Replikation beeinflusst nicht die Pathogenität in den asthmatischen Mäusen nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV	99
5.4	Asthmatischen C57BL/6 Mäusen zeigen eine niedrigere pro-inflammatorische Immunantwort als asthmatische 1SB6F1 Mäuse.....	101
5.5	Veränderte OVA-spezifische IgE Konzentration im asthmatischen Mäusen nach IAV Infektion	102
5.6	Männliche asthmatische 1SB6F1 Mäusen zeigen keinen Unterschied in der Pathogenität im Vergleich zu nicht-asthmatischen Mäusen	103
5.7	Asthmatische 1SB6F1 Mäuse zeigen erhöhte angeborene und humorale Immunantwort	104
5.8	Anti-IgE Behandlung führt zu erhöhter Pathogenität in asthmatischen C57BL/6 Mäusen	105
6	Zusammenfassung.....	107
7	Summary.....	108
8	Anhang.....	109
9	Literaturverzeichnis.....	116
10	Verzeichnisse der Abbildungen und Tabellen	126
10.1	Abbildungsverzeichnis.....	126
10.2	Tabellenverzeichnis	128
11	Abkürzungsverzeichnis	129
12	Veröffentlichungen, Vorträge und Posterpräsentationen	132
	Veröffentlichungen.....	132
	Weitere Veröffentlichungen während der Dissertation:	132
	Veröffentlichung vor der Dissertation.....	133
	Vorträge und Poster Präsentationen auf Fachtagungen.....	133

Inhaltsverzeichnis

13 Eidesstattliche Versicherung	134
Stipendium	135
Danksagung	136

1 Einleitung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss eines akuten Asthma bronchiale als Komorbidität auf den Krankheitsverlauf einer Influenza A Virus (IAV) Infektion (2009 pandemisches H1N1) im Mausmodell untersucht. Daher werden zunächst die Biologie und die Epidemiologie von IAV zusammengefasst. Es wird im Detail auf die Charakteristika der 2009 pandemischen H1N1 Influenza eingegangen. Darauf folgt eine Beschreibung der Eigenschaften sowie die Verbreitung und Pathogenese von Asthma bronchiale. Im letzten Teil werden Tiermodelle und die verschiedenen Allergene, die in der Asthma und Influenza Komorbiditätsforschung verwendet werden, vorgestellt.

1.1 Influenza A Viren

1.1.1 Taxonomie

Influenza A Viren gehören phylogenetisch zur Familie der Orthomyxoviridae und besitzen ein einzelsträngiges, negativ orientiertes und segmentiertes RNA Genom. Die Familie der Orthomyxoviridae gliedert sich in sieben Genera, die Influenza A, B, C und D Viren, die Thogotoviren, die Isaviren und die Quarjaviren (1,2). Aufgrund verschiedener molekularer Eigenschaften und der serologischen Charakteristika ihrer Nukleoproteine (NP) und Matrixproteine 1 und 2 (M1, M2), werden die Influenzaviren vier unterschiedlichen Gattungen zugeordnet, die als Typ A, B, C und D klassifiziert werden (3). In der vorliegenden Arbeit wird jedoch nur auf die IAV im Detail eingegangen.

Die IAV werden weiterhin anhand ihrer Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) in Subtypen klassifiziert. Es wurden bisher 19 HA (H1-H19) und 11 NA (N1-N11) Subtypen identifiziert und beschrieben, wobei H17, H18 und H19, sowie N10 und N11 bisher nur mittels Sequenzierung in Fledermausproben detektiert werden konnten (3,4,5). Bis auf die Subtypen H17-19 und N10-11 wurden bisher alle HA und NA Subtypen in wildlebenden Wasservögeln isoliert, deshalb gelten diese Tiere als das natürliche Reservoir von IAV. Zur Klassifizierung der Influenzaviren wird eine Standardnomenklatur verwendet. Der Name des Virus setzt sich aus dem Virus Genus, der Spezies, aus der es isoliert wurde (außer bei humanen Isolaten), dem Isolationsort, der Isolatnummer, dem Isolationsjahr und in Klammern, der HA und NA Subtyp zusammen. Ein Beispiel hierfür stellt das humane Isolat A/Hamburg/NY1580/2009 (H1N1) dar (6).

1.1.2 Virionstruktur

IAV gehören zu den umhüllten Viren, die ein RNA-Genom mit negativer Orientierung besitzen. Sie sind pleomorph und haben meist eine sphärische Form mit einer Größe von 80-120 nm im Durchmesser. Viruspartikel können jedoch besonders in klinischen Isolaten

Einleitung

auch in filamentöser Form bis zu 300 nm vorkommen. Die Morphologie der Virionen wird Studien zufolge von verschiedenen viralen und auch zellulären Determinanten bestimmt (3,7). Die Virionen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, welche sich aus der Zellmembran der Wirtszelle ableitet. Die Proteine HA, NA und M2 sind in die Oberfläche der Virushülle integriert, wobei das virale HA-Protein im vierfachen Verhältnis zu NA vorkommt. Die Innenseite des Viruspartikels wird von M1 Proteinen ausgekleidet.

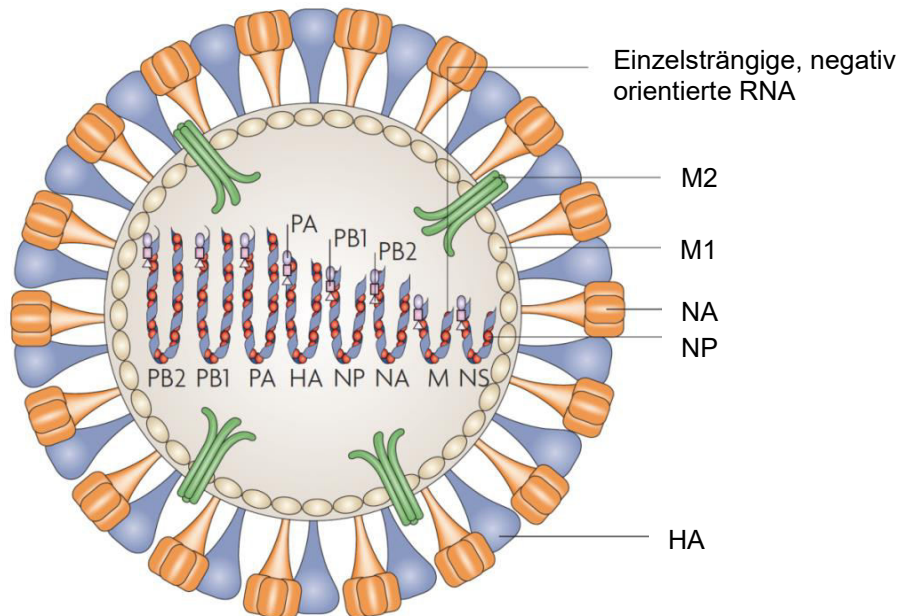


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Influenzaviruspartikels.

Das segmentierte negativ orientierte RNA Genom liegt im Inneren des IAV Partikels vor. In der Abbildung dargestellt ist die vRNA (blau), das NP (rot), sowie die drei assoziierten Polymeraseuntereinheiten, Polymeraseprotein (PA), Polymeraseprotein 1 und 2 (PB1 & PB2) (lila). Die Hülle des Virus besteht aus einer Lipiddoppelschicht, wobei diese im Inneren mit dem M1 Protein ausgekleidet ist. In die Hülle integriert sind das Ionenkanalprotein M2 (grün), sowie auf der Virionoberfläche die Glykoproteine HA (blau) und NA (orange), die hier allerdings nur repräsentativ und nicht im korrekten Verhältnis dargestellt sind (Modifiziert nach Nelson und Holmes 2007 (8)).

Im Virusinneren befindet sich das virale RNA (vRNA) Genom bestehend aus acht Genomsegmenten, die als virale Ribonukleoproteinkomplexe (vRNP) vorliegen. Diese Komplexe bestehen jeweils aus einem RNA-Segment, welches von mehreren Nukleoproteinmonomeren (NP) enkapsidiert ist und an welchem die Polymerase, bestehend aus dem basischen Polymeraseprotein 1 (PB1), dem basischen Polymeraseprotein 2 (PB2) und dem sauren Polymeraseprotein (PA) an den 5'- und 3'-Enden assoziiert ist. PB1, PB2 und PA enthalten Promotorsequenzen sowie Verpackungssignale (Abbildung 1) (9). Zusätzlich befindet sich im Inneren des Virions das Nicht-Struktur Protein 1 (NS1), sowie das Kernexportprotein oder Nicht-Struktur Protein 2 (NEP/NS2) (1).

1.1.3 Genomaufbau

Das Genom von Influenzaviren besteht aus acht unterschiedlich großen Segmenten negativorientierter, einzelsträngiger RNA, welche zusammen eine Genomgröße von 13,6 kb ergeben und kodieren nach heutigem Wissensstand für mindestens 18 virale Proteine (10,11). Die bisher bekannten viralen Proteine und ihre Funktionen werden in Tabelle 1 aufgeführt. Die vRNA Segmente werden über ihre gesamte Länge von Nukleoproteinmonomeren enkapsidiert. Dabei bilden die 3'- und 5'- Enden jedes Segments über komplementäre Sequenzen eine pfannenstiel-ähnliche Struktur oder doppelhelikale Haarnadel aus (12). Die Genomsegmente haben an ihren 3'- sowie 5'-Enden jeweils eine für Influenzaviren hochkonservierte, nichtkodierende Region, welche die regulatorischen Sequenzen für die Transkriptions- und Replikationspromotoren enthält. Zusätzlich enthält diese Region Sequenzen für die mRNA-Prozessierung, sowie für das Verpackungssignal (13). Für die Transkription und Replikation der viralen RNA benötigt das Virus eine RNA-abhängige RNA-Polymerase. Diese liegt im Viruspartikel bereits in Assoziation mit der RNA im vRNP vor. Dieser heterotrimäre Komplex besteht aus den basischen Polymeraseproteinen PB1 und PB2 sowie dem sauren Polymeraseprotein PA (14).

Tabelle 1: Die IAV Gensegmente, die jeweiligen Proteine und ihre Funktionen;
 Dargestellt sind die Gensegmente der IAV, ihre Größe und die dazugehörigen Proteine sowie ihre Funktionen (6,10,11,15,17,18,19,20,21,22).

Segment	Größe [bp]	Protein	Molekulargewicht [kDa]	Funktion des Proteins
1	2341	PB2	80	<ul style="list-style-type: none"> • Bestandteil des vRNP und Polymerasekomplexes • Erkennung und Bindung der 5'-Cap Bindestruktur zellulärer mRNA
		PB2-S1	55	<ul style="list-style-type: none"> • PB2, Splicingvariante: • Inhibitorischer Faktor von Rig-I abhängiger IFN Signalübertragung während einer IAV Infektion
2	2341	PB1	90	<ul style="list-style-type: none"> • Bestandteil des vRNP- und Polymerasekomplexes • RNA-abhängige RNA Polymerase, Elongation
		PB1-F2	10	<ul style="list-style-type: none"> • Regulator der Apoptose und der viralen Polymeraseaktivität
		PB1-N40	82	<ul style="list-style-type: none"> • Bisher unbekannte Funktion

Einleitung

3	2233	PA	83	<ul style="list-style-type: none"> • Bestandteil des vRNP • Polymerasekomplexes, Endonuklease- und Serinproteaseaktivität
		PA-X	29	<ul style="list-style-type: none"> • Beinhaltet Endonukleasedomäne von PA • Fusion mit Domäne des X-ORF • Modulation der Immunantwort des Wirtes
		PA-N155	62	• Bisher unbekannte Funktion
		PA-N182	60	• Bisher unbekannte Funktion
4	1778	HA	77	<ul style="list-style-type: none"> • Oberflächenglykoprotein, • Rezeptorbindung • Fusion und Hauptantigen für neutralisierende Antikörper
5	1565	NP	55	• Bestandteil des vRNP Komplexes, Bindung von RNA, Synthese von RNA und Kernimport von RNA
6	1413	NA	56	<ul style="list-style-type: none"> • Oberflächenglykoprotein • Sialidaseaktivität • Antigen für Antikörper
7	1027	M1	28	<ul style="list-style-type: none"> • vRNP-Interaktion und Kernexport • Abkospung und Virusfreisetzung
		M2	15	<ul style="list-style-type: none"> • Ionenkanal • Membranprotein • Vermittlung der Freisetzung von vRNPs ins Zytoplasma • Vermittlung des Viruszusammenbaus
		M42	11,4	• Unterstützung der effizienten Virusreplikation
8	890	NS1	26	<ul style="list-style-type: none"> • Protein mit multiplen Funktionen • Interferonantagonist • Regulator der zellulären Genexpression
		NEP (NS2)	11	<ul style="list-style-type: none"> • Kernexportprotein • Regulatorisches Protein • Rolle in vRNP-Export
		NS3	22,1	• Vermittelt <i>replicative gain-of-function</i>

1.1.4 Replikationszyklus von Influenza A Viren

Influenza A Viren binden über das HA-Protein an endständige Sialinsäure-Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle. Durch rezeptorvermittelte Endozytose werden die Vironen von der Oberfläche der Wirtszelle aufgenommen (Abbildung 2, Punkt 1). Im Zuge der Reifung des frühen Endosomens zum Lysosom findet eine Ansäuerung des Endosomeninneren statt. Dies führt zu einer Konformationsänderung des HAs, wodurch das Fusionspeptid in der HA2-Untereinheit des Proteins freigelegt wird und die Fusion der Virushüllmembran mit der Endosomenmembran vermittelt wird (Abbildung 2, Punkt 2) (22).

Gleichzeitig findet über den Protonenkanal M2 eine Ansäuerung des Inneren des Viruspartikels statt, wobei die vRNPs von dem Matrixprotein M1 dissoziieren, was die Freisetzung in das Zytoplasma erleichtert. Im Zytoplasma gelangen die vRNPs durch aktiven Transport über die Kernporen mit Hilfe von Importin- α Isoformen und Importin- β in den Zellkern (Abbildung 2, Punkt 3).

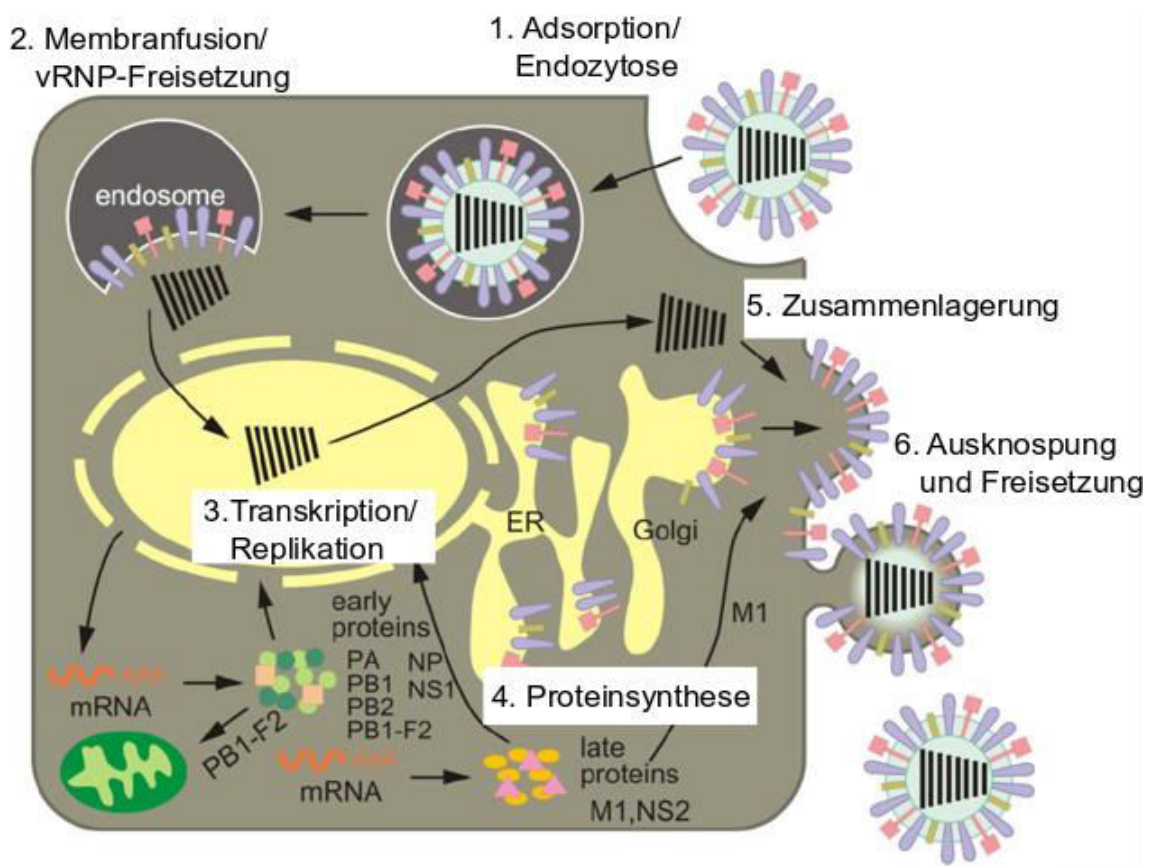


Abbildung 2: Replikationszyklus von IAV.

Der Replikationszyklus des IAV läuft in mehreren Schritten ab. Der erste Schritt besteht in der Adsorption (1) sowie der rezeptorvermittelten Endozytose zur Aufnahme des Virus in die Wirtszelle. Anschließend wird das Virus entpackt (2) und die vRNPs werden in den Zellkern transportiert. Es folgen die Transkription, Translation, Replikation (3) sowie Proteinsynthese der viralen Proteine (4), der Zusammenbau von Nachkommenviren (5) und deren Abknospung von der Wirtszelle (6) (Modifiziert nach Neumann et. al, 2009 (23)).

Einleitung

Im Zellkern kommt es zuerst zur Primärtranskription der vRNPs. Durch das sogenannte Cap-snatching spaltet der Polymerasekomplex die 5'-Cap Struktur von zellulären prä-mRNAs ab und überträgt die etwa 15 Nukleotide lange Strukturen als Primer für die mRNA-Synthese auf die vRNA (10). Die dabei synthetisierte virale mRNA wird aus dem Zellkern exportiert und im Zytoplasma translatiert (Abbildung 2, Punkt 4). Dabei erfolgt die Translation der nichtmembranassoziierten Proteine (PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 und M1) an freien Ribosomen. Hingegen werden die membranassoziierten Proteine HA, NA und M2 an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert. Diese gelangen anschließend über das ER und das Golgi-Netzwerk an die Zellmembran (Abbildung 2, Punkt 5). Die Proteine des Polymerasekomplexes sowie das NP und die Nicht-Strukturproteine 1 und 2 (NS1 und NS2) werden zurück in den Zellkern transportiert. Das NP enkapsidiert daraufhin sowohl die negativ orientierten vRNPs, als auch die positiv orientierten antigenomischen RNA Segmente (cRNA).

Sowohl an vRNPs assoziierte M1 Proteine als auch NS2, welches ein Kernexportsignal am N-Terminus besitzt, werden für den Export der vRNA aus dem Nukleus benötigt. Der genaue Ablauf des Verpackungsprozesses ist bisher nicht völlig erforscht, aber es scheint, dass die Interaktion von M1 mit der Zellmembran und den zytoplasmatischen Enden von HA und NA die Abknospung vermittelt. Die Freisetzung des Viruspartikels wird dabei durch die Abspaltung endständiger Sialinsäuren an der Zelloberfläche durch die Sialidase-Aktivität der NAs erleichtert (Abbildung 2, Punkt 6).

1.1.5 Epidemiologie der Influenza A Viren im Menschen

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt schwere IAV Infektionen weltweit jährlich auf 3 bis 5 Mio, welche 290 000 bis 650 000 Todesfälle zur Folge haben (24). Dabei treten Krankenhausaufenthalte und Tod hauptsächlich in den Risikogruppen auf. Pneumonie, Bronchitis, Nebenhöhleninfektion und Mittelohrentzündung sind Beispiele für Komplikationen nach einer akuten Influenza. Dazu kann eine Influenzavirus Infektion chronische Erkrankungen verschlimmern. Zu den Risikogruppen gehören schwangere Frauen, Kinder unter 2 Jahren, ältere Menschen über 65 Jahren, Kinder mit neurologischen Erkrankungen und Personen mit chronischen Erkrankungen (wie Asthma bronchiale, Herzerkrankungen) und Immunsupprimierte (wie HIV/AIDS, Krebspatienten in Chemo- oder Steroidtherapie) (25). Daher empfiehlt die WHO Impfungen für schwangere Frauen jedes Trimesters, für Kinder zwischen 6 Monaten und 5 Jahren, für Personen ab 65 Jahren, für Personen mit chronischen Erkrankungen und medizinisches Personal (24). In der gemäßigten Klimazone treten saisonale Influenza-Epidemien hauptsächlich im Herbst und Winter auf, wobei der Höhepunkt in den kalten Wintermonaten liegt (27,28). Hingegen in den tropischen und subtropischen Regionen kann die Influenza-Epidemie das ganze Jahr auftreten. Es wird

Einleitung

vermutet, dass die Saisonalität mit der Regenzeit in Verbindung steht. Allerdings fehlt bisher das detaillierte Verständnis zur Saisonalität von IAV in diesen Klimazonen (29,30,31). Durch die hohe Inzidenz und die relativ lange Krankheitsdauer, stellt die Influenzavirusinfektion, eine hohe finanzielle Belastung für die Wirtschaft dar. Das Robert Koch-Institut schätzte in seinem Bericht von 2018/2019 die Kosten wegen Arbeitsunfähigkeit aufgrund bestätigter saisonaler Influenzaerkrankungen auf 2,3 Millionen (31). Um die Menschen vor einer Infektion zu schützen, werden jährlich Impfungen gegen die jeweils zirkulierenden Virusstämme angeboten.

1.1.5.1 Influenza-Epidemien

Wildlebende Wasservögel stellen das natürliche Reservoir der IAV dar. Alle bisher isolierten und replikationsfähigen Subtypen von IAV konnten aus diesem Reservoir isoliert werden (3). Es kommt jedoch gelegentlich zur Transmission auf Wirte anderer Spezies, wie verschiedene Geflügelarten, aber auch Säuger wie Pferde, Schweine und Menschen (3,33), wobei Schweinen und Geflügel, als Zwischenwirte für die Transmission angesehen werden. Eine Infektion außerhalb des natürlichen Reservoirs kann zu einem Selektionsdruck führen, um eine Adaption an den neuen Wirt zu ermöglichen. Da die virale RNA-abhängige RNA Polymerase keine Korrekturmechanismen („*proofreading activity*“) besitzt, können Mutationen im viralen Genom entstehen (3). Dieses Phänomen wird als *Antigendrift* beschrieben. Besonders anfällig für solche Punktmutationen (*Antigendrift*) sind die beiden viralen Oberflächenproteine HA und NA, da diese dem höchsten Selektionsdruck durch Antikörper unterliegen (3). Dies kann zur Entstehung neuer IAV-Stämme beitragen (33). Durch diesen *Antigendrift* des Virus können die jährlichen Impfstoffe unwirksam und IAV Epidemien ausgelöst werden (34).

1.1.5.2 Influenza-Pandemien

Pandemien treten seltener als jährliche Epidemien auf und sind durch eine schnelle, änder- bzw. kontinentübergreifende Ausbreitung gekennzeichnet. Der Ausbruch einer neuen Pandemie stellt meistens die Einführung eines neuen HA-Subtyps in die jeweilige Population dar oder im Fall der „Russischen Grippe“ (1977) und der „Schweinegrippe“ (2009) die Wiedereinführung eines bereits aufgetretenen Subtyps. Die meisten Pandemien entstanden dabei durch Reassortierung (*Antigen shift*) verschiedener Viren. Wird eine neue Wirtszelle mit mindestens zwei IAV Subtypen infiziert, kann es zu einem Gensegmentaustausch zwischen den IAV Partikel, einer sogenannten Reassortierung führen. Dabei entstehen Viren mit neuen antigenischen Eigenschaften (35). Als eine weitere wichtige Grundvoraussetzung für eine Pandemie gilt zudem eine ausreichende Infektiosität des Virus damit es sich weltweit ausbreiten und zu hohen Morbiditäts- sowie Mortalitätsraten führen kann (36).

Einleitung

Weltweit erste und bis heute schwerwiegendste Influenza-Pandemie war die „Spanische Grippe“ im Jahr 1918, die vermutlich 20 bis 50 Millionen Todesopfer forderte. Besonders ungewöhnlich war bei dieser Pandemie die hohe Mortalitätsrate von 50 % in IAV Infizierten zwischen 20 und 40 Jahren, die im Normalfall keine Risikogruppe für die IAV Infektion darstellen (37). Während der Pandemie wurden in einigen Fällen massive intrapulmonale Blutungen sowie Lungenödeme beschrieben, die auf eine extrem hohe Virulenz dieses pandemischen Virus hinweisen (1).

Die genauen biologischen Eigenschaften und der Ursprung des Virus bleiben bis heute recht unbekannt. Grund dafür sind fehlende Virusisolate für genaue Untersuchungen. Obwohl die "Spanische Grippe" beim Ausbruch 1918/1919 nicht isoliert wurde, konnte die Genomsequenzen aus Lungengewebe von exhumierten Patienten bestimmt werden und zeigten ein aviär-ähnliches H1N1 Virus, welches in mehreren Proteinen, human-adaptierte Aminosäure Modifikationen aufweist (23). Obwohl das Virus in seiner Rezeptor-Bindungsstelle, Aminosäuren aus seinem aviären Vorläufer zeigt, war das HA in der Lage die humane Wirtzelle zu infizieren (39,40). Das Virus entstand vermutlich durch die Adaptation eines komplett-aviären IAV des Subtyp H1N1 an den Menschen (40).

Nach dem Ende der Pandemie zirkulierte das Virus in der humanen Bevölkerung bis es zur Reassortierung mit einem aviären H2N2 Virus kam, wobei die Gensegmente HA, NA und PB1 in das humane H1N1 Virus integriert wurden. Dieses humane H2N2 Virus löste in der südchinesischen Provinz Guizhou Anfang 1957, die „Asiatische Grippe“ mit ca. zwei Millionen Toten aus (42,43,24). Diese Pandemie forderte im Vergleich zur „Spanische Grippe“ deutlich weniger Opfern.

Eine weitere Pandemie des 20. Jahrhunderts, war die „Hong Kong Grippe“ im Jahr 1968. Das zirkulierende H2N2 Virus wurde durch ein neues Virus des Subtyps H3N2 ersetzt. Dieses Virus entstand ebenfalls aus einer Reassortierung des bereits zirkulierenden humanen H2N2 Virus mit einem derzeit nicht näher charakterisierten aviären H3 Virus. Dabei wurden die aviären Gensegmente HA und PB1 übernommen (23).

Anders als die bereits beschriebene Pandemie, ging der nächsten Pandemie, der „Russischer Grippe“ von 1977 keine Reassortierung voraus, vielmehr handelte es sich um die Wiedereinführung des H1N1 Subtyps (40). Diese Pandemie wurden von einem Virus verursacht, welches dem zirkulierenden H1N1 Virus aus den früher 1950iger Jahren sehr ähnelt (43). Dieses neue H1N1 Virus ersetzte nicht das bereits zirkulierende H3N2 und beide Viren zirkulieren bis heute in der humanen Population (23).

1.1.6 2009 pandemische H1N1 Influenza (2009 pH1N1)

1.1.6.1 Epidemiologie der 2009 pH1N1 Influenza

Mitte Februar 2009 traten erste Fälle der 2009 pH1N1 Influenza in Mexico auf (44). Bereits Ende April wurden in den USA die ersten Fälle des inzwischen identifizierten H1N1 Influenzastamms gemeldet. Am 25. April 2009 erklärte die WHO, dieses Virus als gesundheitliche Notlage von internationaler Tragweite. Am 29. April 2009 wurde von der WHO eine Influenza Pandemiestufe ausgerufen. Diese besagt, dass es vermehrt zu Mensch-zu-Mensch Übertragungen in mindestens zwei verschiedenen Staaten kommt (45). Der neue H1N1 Subtyp hatte sich bis Anfang Mai 2009 über elf Länder ausgebreitet. Die WHO gab ab August weltweit einen Rückgang der neu gemeldeten Fälle bekannt und setzte die Pandemiewarnstufe herab. Dadurch zeichnete sich auch der erste Höhepunkt von Infektionsfällen der 2009 Pandemie aus (46). Bis Oktober 2009 waren mindestens 80 Länder von der Pandemie betroffen und etwa 5000 Todesfälle bestätigt worden (46). Die höchste Anzahl der Infektionen mit 2009 pH1N1 Influenza wurde weltweit im Dezember gemeldet. Eineinhalb Jahre nach Ausbruch der Pandemie waren die neu auftretenden Infektionen vergleichbar zum saisonalen Auftreten von Influenza-Epidemien und die WHO deklarierte am 10. August 2010 das Ende der Pandemie (46). Anerkannte korrigierte Schätzungen der 2009 Pandemie-assoziierten Todesfälle lagen bei 105 700 bis 395 600 Menschen, wobei 46 000 bis 179 000 Todesfälle mit kardiovaskulären Komplikationen assoziiert waren (47). Die 2009 pH1N1 Influenzaviren zirkulieren weltweit parallel zu Influenzaviren des H3N2-Subtyps.

1.1.6.2 Ursprung der 2009 pH1N1 Influenza

Es konnte gezeigt werden, dass die neuen 2009 pH1N1 Influenzaviren eine Kombination von Gensegmenten tragen, die nie zuvor in porzinen oder humanen Influenzaviren beschrieben wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die neuen Influenzaviren Reassortanten aus vier verschiedenen Ursprungsstämmen sind. Die 2009 pH1N1 Influenzaviren entstand durch ein Reassortierungsereignis zwischen einer nordamerikanischen porzinen Tripelreassortante und einem eurasischen aviär-ähnlichen Schweinevirus (Abbildung 3) (48). Die Segmente der Polymeraseproteine PB2 und PA stammen aus einem nordamerikanischen aviären Influenzavirus, die des Polymeraseproteins PB1, aus einem humanen H3N2 Influenzavirus. Die Gensegmente HA, NP und NS hingegen stammen aus einem klassischen Schweine H1N1 Influenzavirus. NA und M stammen aus eurasischen Vogelinfluenza-ähnlichen Schweineviren (24,46,48).

Einleitung

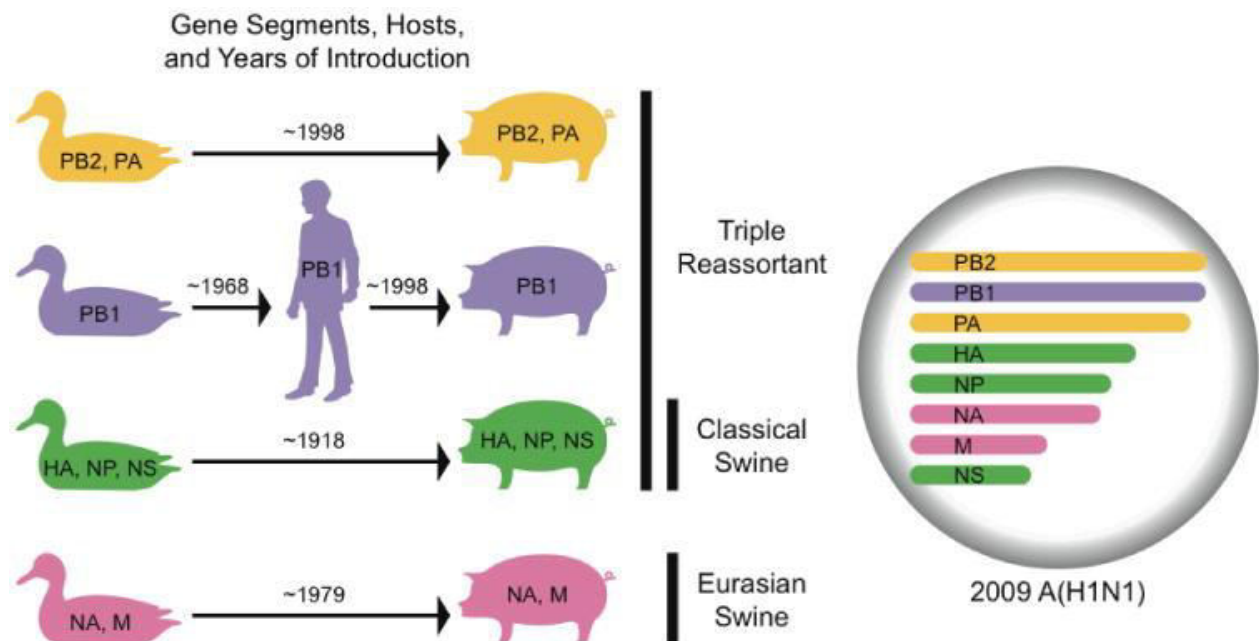


Abbildung 3: Ursprung und genetische Zusammensetzung der 2009 pH1N1 Influenzaviren.

Die vierfache Reassortante entstand vermutlich im Schwein und wurde von diesem auf den Menschen übertragen. Die Gensegmente PB2 und PA stammen aus einer nordamerikanischen Vogelinfluenzalinie, PB1 von humanen H3N2 Influenzaviren, HA, NP und NS hingegen von einem klassischen Schweineinfluenzaviren, NA und M stammen von eurasischen Vogelinfluenza-ähnlichen Schweineviren (48).

Die 2009 pH1N1 Influenzaviren haben keine der bekannten molekularen Eigenschaften von hochpathogenen Influenzaviren wie H5 und H7 Viren, außer dem Aminosäureaustausch von Asparaginsäure zu Glycin an Position 222 (D222G) im HA. Dieser Austausch verhindert den Wechsel für die Rezeptorbindungsspezifität des Virus von $\alpha 2,6$ zu $\alpha 2,3$ -verknüpft Sialinsäure (49). Diese Substitution wurde mit hoher Frequenz in Fällen mit schweren und fatalen Infektionsverläufen beobachtet.

1.1.6.3 Pathogenese der 2009 pH1N1 Influenza

Die 2009 pH1N1 Influenza war im Vergleich zu den jährlich auftretenden Influenzavirusinfektionen in vielen Punkten besonders. Zum einen verliefen die Krankheitsfälle überwiegend mild und beschränkten sich auf den Respirationstrakt (45). Zum anderen konnte die 2009 pH1N1 effizient von Mensch zu Mensch transmittieren, was die schnelle Ausbreitung der Pandemie erklären kann. Des Weiteren traten während der 2009 pH1N1 Influenza Pandemie vermehrt begleitenden Symptome, wie Erbrechen und Diarrhö auf, welche während der saisonalen Influenza nur selten beobachtet werden (45).

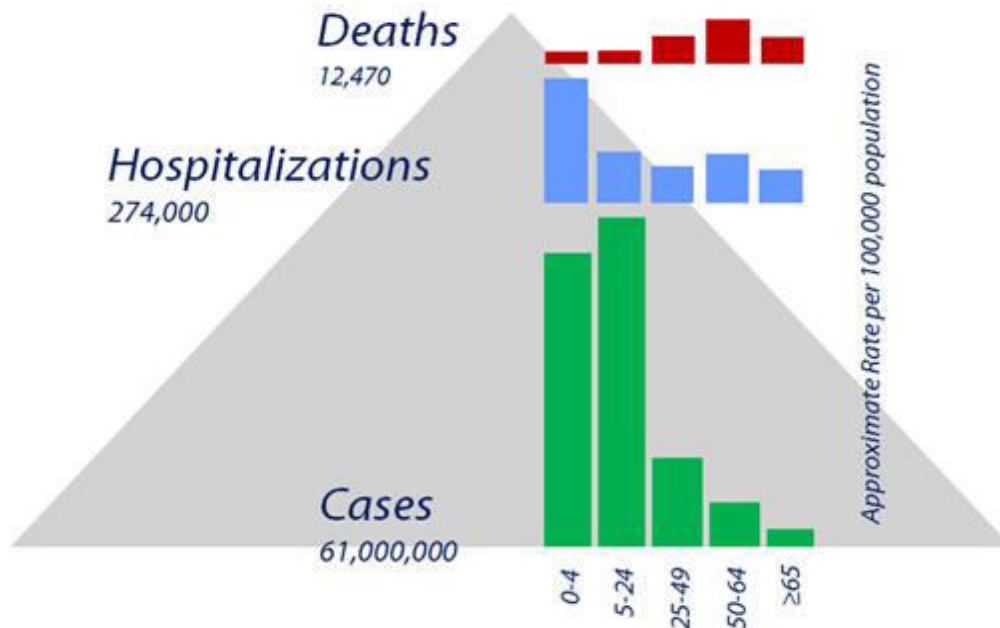


Abbildung 4: Die Eigenschaften der 2009 pH1N1 Influenzapandemie in der Population.

Approximativer Anteil von Fällen, Krankenhausaufenthalten und tödlichen Verläufen in der Bevölkerung während der 2009 H1N1 Influenzapandemie von 15 April 2009 bis 10 April 2010 (50).

Anders als bei der saisonale Influenza wurde bei der 2009 pH1N1 Pandemie eine hohe Inzidenz bei Kindern und jungen Erwachsenen bis 18 Jahre beobachtet (Abbildung 4) und im Vergleich zu der vorherigen saisonalen Influenza zeigte sich für Menschen über 65 hingegen kein erhöhtes Infektionsrisiko (46,49,50). Es wird spekuliert, dass ältere Menschen, geboren vor 1930, eine gewisse Teilimmunität gegen die 2009 Pandemie besitzen (45), basierend auf den Kontakt mit früher zirkulierenden H1N1 Viren (53,54,55). Während der 2009 pH1N1 zählten Menschen mit chronischen Lungen- und Herzerkrankungen, Diabetes oder supprimiertem Immunsystem zu den Risikogruppen für schwere Infektionsverläufe (56). Im Unterschied zu vorherigen Pandemien wurden schwangere Frauen und Menschen mit metabolischen Einschränkungen, wie Fettleibigkeit, ebenfalls als Risikogruppen eingestuft und wurden in den Impfeempfehlungen berücksichtigt (57). Die Virustiter in Patienten waren vergleichbar mit dem aus der saisonalen Influenza, aber bei schweren Verläufen wurde das Virus langsamer aus der Lunge beseitigt (58). Die schweren Verläufe der 2009 pH1N1 Influenza wiesen zudem Pneumonien auf, welche häufig eine künstliche Beatmung notwendig machten (59) und schwere Fälle der 2009 Pandemie waren oftmals mit einer bakteriellen Koinfektion der Lunge assoziiert, aber gehörte im Gegensatz zu früheren Pandemien, nicht zu den häufigsten Todesursachen (60).

Auffällig war zudem, dass in den Patienten länger Virus nachzuweisen war als bei schweren Fällen epidemischer Influenzavirusinfektionen. Auch proinflammatorische Zytokine, wie IL-6 waren im Krankheitsverlauf länger erhöht (61).

1.1.6.4 Asthma als Komorbidität für schweren Influenza Krankheitsverlauf

Es kann bei Asthmatikern, auch nach der Chronifizierung der Krankheit im Laufe des Lebens, immer wieder zu akuten Verschlechterung der Krankheit kommen, zu sogenannten Asthma-Exazerbationen. Verschiedene epidemiologische Studien konnten eine positive Korrelation zwischen Asthma-Exazerbation und grippalen Infekten feststellen (62). Es wurde bei 80-85% der untersuchten Kinder mit akutem Asthma-Exazerbation eine virale Infektion der Atemwege festgestellt (63,64). Obwohl bei Erwachsenen die Prävalenz für virale Infektionen nur bei 44% liegt, sind virale Infektionen dennoch der häufigste Grund für eine Asthma-Exazerbation (65). Interessanterweise zeigten zwei weitere Studien, dass Menschen mit schwerem Asthma am empfindlichsten gegenüber Infektionen sind und damit auch gegenüber Exazerbationen. Bei mehr als 75% der untersuchten schweren Asthmatikern wurde während einer Exazerbation eine virale Infektion der Atemwege festgestellt (66,67). Asthma wurde immer als Risikofaktor für schwere Influenza Infektionsverläufe angesehen. Asthmatiker wurden bereits vor der universellen Impfempfehlung für Influenza in den USA im Jahr 2010 als Risikogruppe eingestuft und für die Influenzaimpfung empfohlen (68). Diese Assoziation zwischen Asthma und Influenza wurde nochmal hervorgehoben während der 2009 Influenzapandemie. Die Asthmaprävalenz lag bei 6-18% in Kindern und Erwachsenen, die im Krankenhaus mit der saisonalen Influenza eingeliefert wurden und bei 14-30% während der 2009 Influenzapandemie (56,57). Die CDC und viele epidemiologische Studien konnten zeigen, dass Asthma bronchiale die häufigste Grunderkrankung im hospitalisierten Patienten mit dem 2009 Influenzavirus war (Abbildung 5) (47,59,60).

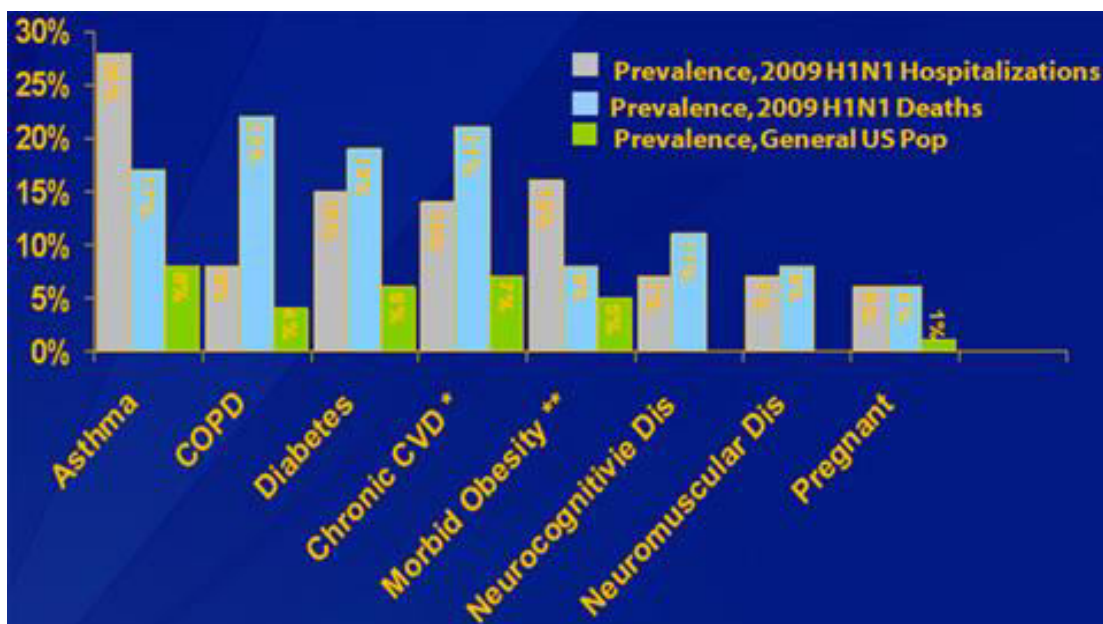


Abbildung 5: Prävalenz von Grunderkrankungen während der 2009 Influenzapandemie.

Grunderkrankungen bei Krankenhauspatienten und Patienten, die an 2009 pH1N1 gestorben sind, im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung (50).

Zudem wurde gezeigt, dass Kinder mit Asthma eine erhöhte Anfälligkeit für virale Infektionen mit dem 2009 pH1N1 Influenzavirus haben. Die Inzidenz von 2009 pH1N1 war signifikant höher in Kindern mit Asthma als in gesunden Kindern (72). Obwohl pädiatrische Patienten bei der Infektion mit 2009 pH1N1 ähnliche Symptome wie bei der saisonalen Grippe zeigten, wurden schwere Komplikationen wie Pneumonie und akutes Lungenversagen hauptsächlich in Kindern und jungen Erwachsenen bei Infektionen mit dem pandemischen Virus gemeldet (54,59).

1.2 Asthma bronchiale

1.2.1 Asthma Prävalenz und Pathogenese

Das Asthma bronchiale gehört zu den häufigsten chronischen Krankheiten weltweit. Besonders stark verbreitet ist es in Ländern mit sogenanntem „westlichen Lebensstil (73). Laut der *Global Initiative for Asthma* (GINA) leiden über 350 Millionen Menschen verschiedenen Alters, Geschlechts und ethnischer Hintergründe weltweit an Asthma. In einigen Ländern wie den USA, Kanada, Großbritannien, Irland, Neuseeland und auch Australien sind mit einer Prävalenz zwischen 14% und 18% betroffen (68,69). Obwohl die Anzahl der Asthmatiker in den letzten Jahren zurückgegangen ist, erwartet die WHO, bis 2025 eine weitere Zunahme um 100 Millionen Erkrankte weltweit. In Deutschland leiden über 8 Millionen Menschen an Asthma, wobei die Prävalenz in der Bevölkerung bei etwa 5 bis 7 % bei Erwachsenen und 10 bis 15% bei Kindern liegt. Das macht Asthma bronchiale auch zur häufigsten chronischen Erkrankung im Kindesalter. Jungen erkranken dabei doppelt so häufig wie Mädchen. Im Erwachsenenalter überwiegt dann der Anteil Frauen, die an Asthma erkranken (76). Während bei Kindern Asthma überwiegend allergisch bedingt ist, tritt bei ca. 30 bis 50% der Erwachsenen und älteren Menschen häufiger auch eine nicht-allergische (intrinsische) Form auf (76). Asthma stellt glücklicherweise mit 1% Todesfällen weltweit, eine seltene Todesursache dar. Die *Global Burden of Disease* schätzte im Jahr 2016 die Mortalität auf ungefähr 420 000 Menschen weltweit, es sind mehr als 1000 Todesfälle am Tag. Internationale Mortalitätsschätzungen sind auf die Länder limitiert, die vollständige Informationen über die Todesursachen geben können (77).

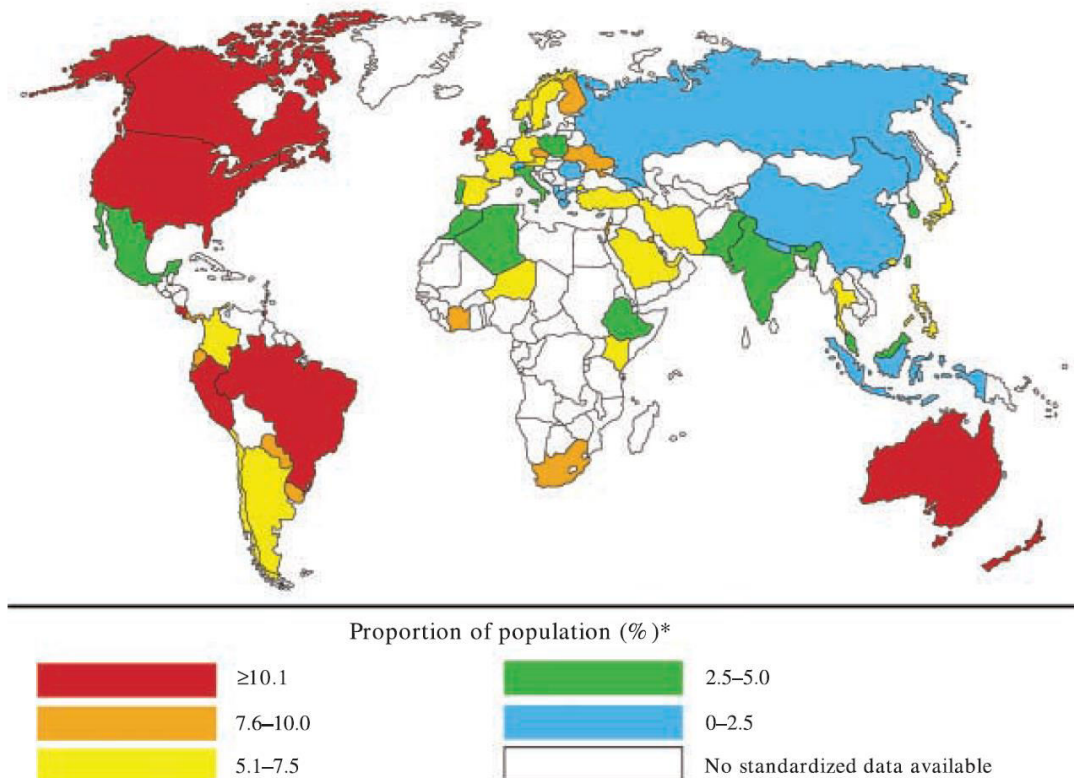


Abbildung 6: Weltweite Verteilung und Prävalenz von Asthma bronchiale.

Modifiziert nach Masoli et al. 2014 (74)

Asthma bronchiale kann nicht geheilt, aber medikamentös behandelt werden, um Patienten ein unbeschwertes Leben zu ermöglichen. Die Erkrankung stellt eine enorme Belastung für Gesundheitssysteme und Volkswirtschaften, durch Arbeitsausfälle, verminderte Produktivität oder frühzeitigen Ruhestand dar. Die jährlichen Kosten belaufen sich schätzungsweise auf ungefähr 20 Milliarden Euro in Europa und über 50 Milliarden Dollar in den USA (72,73). In Deutschland gehen schätzungsweise 70 000 Arbeitstage aufgrund von Asthma verloren.

Das Asthma bronchiale ist eine sehr heterogene und komplexe Erkrankung, die als chronische Entzündung der Atemwege, begleitet von einer Überempfindlichkeit (Hyperreagibilität) der Atemwege gegen Reize, definiert wird. Diese Atemwegshyperreagibilität (AHR) führt zu immer wiederkehrenden Episoden von Keuchen, Husten, Kurzatmigkeit, pfeifender Atmung und Luftnot. Die auftretenden Symptome können je nach Ausprägung und Schweregrad der Erkrankung stark schwanken (75,76). Die verschiedenen Asthma Phänotypen können unterschiedliche klinische Bilder zeigen. Obwohl das pathophysiologische Spektrum, welches zu den klinischen Symptomen von Asthma führen kann, sehr breit gefächert ist, teilen alle Formen gemeinsame Mechanismen, wie epitheliale und subepitheliale, immunologische, neuromuskuläre oder vaskuläre Veränderungen (82). Durch Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und

Einleitung

Wachstumsfaktoren sind diese zellulären Systeme miteinander vernetzt und beeinflussen sich gegenseitig.

Endogene Faktoren wie genetische Disposition, Atopie, bronchiale Hyperreagibilität, ethnische Zugehörigkeit, Geschlecht oder Adipositas können bei der Entstehung von Asthma eine wichtige Rolle spielen (83). Neben genetischen Faktoren spielen Umwelteinflüsse und Reizstoffe bei der Entwicklung und Manifestation des Asthmas eine große Rolle. Dabei haben Allergene, Infektionen, virale Infektionen im Kindesalter, Belastung durch Umweltschadstoffe sowie sozioökonomische Faktoren (z.B. ländliche Umgebung, geringe Familiengröße) einen großen Einfluss. Dabei wird zwischen zwei Haupt-Asthmaformen unterschieden: dem allergischen (extrinsischen) und dem nicht-allergischen (intrinsischen) Asthma (84).

1.2.2 Allergisches Asthma und weitere Formen

Asthma bronchiale ist eine sehr komplexe Erkrankung, mit unterschiedlichen Phänotypen. Generell wird Asthma aufgrund der Ursachen in das nicht-allergische intrinsische Asthma und das allergische extrinsische Asthma unterteilt.

Allergisches Asthma ist der häufigste Asthma Phänotyp. Hierbei lassen sich über 85% aller extrinsischen Asthmaerkrankungen auf allergische Faktoren wie Hausstaubmilbenkot, Gräser-, sowie Birkenpollen und Katzenallergene zurückführen (85). Atemwege, welche gegen ein bestimmtes Allergen sensibilisiert sind, reagieren besonders heftig auf Exposition, was zu einer Asthmaattacke führt.

Klinisch ist das allergische extrinsische Asthma bronchiale durch eine reversible Broncho-Obstruktion assoziiert mit Husten, Brustenge, Kurzatmigkeit, den Umbau der Atemwege, einer vermehrten Mukussekretion und Stenosenatmung (wheezing) charakterisiert. Diese Reaktionen werden durch eine Atemwegshyperreagibilität (AHR) ausgelöst (80). Diese Asthmaform ist meistens bei Kindern ausgeprägt. Allergisches Asthma geht mit einem erhöhten Serumspiegel des Allergen-spezifischen Immunglobulins E (IgE), sowie einer gesteigerten Anzahl T-Helfer-2 Lymphozyten (Th2) und eosinophilen Granulozyten einher.

Die weitere Hauptform von Asthma ist das nicht-allergische oder intrinsische Asthma. Dabei spielen, wie der Name sagt, Allergene keine Rolle. Weitere Faktoren, wie Zeitpunkt, schwere oder vorherrschende Art der Symptome und Vorerkrankungen helfen die Differentialdiagnose zu stellen. Asthmatiker weisen in allen diesen Formen eine normale IgE-Konzentration im Serum auf.

Eine Form davon ist das *"Adult-onset"* Eosinophile Asthma, welches in symptomatischen Phasen durch eine erhöhte Bluteosinophilie charakterisiert ist. Oft besteht zudem eine Eosinophile Sinusitis. Diese Form ist meist assoziiert mit Nasenpolypen und diese Patienten reagieren oft schlecht auf Kortikosteroide. Diese Form ist trotzdem Th2 dominiert (84).

Einleitung

Eine weitere Form ist das Belastungs- oder Anstrengungsasthma. Diese Form verläuft meist milder als die anderen Formen und tritt nur bei körperlicher Belastung auf. Die immunologischen- und Entzündungssignalwege sind bei dieser Form noch unklar, aber Patienten zeigen eine erhöhte Mastzellen Aktivierung und eine Th2 dominierende Immunantwort (84).

Weitere Formen sind z.B. Asthma mit Adipositas oder das neutrophile Asthma. Adipositas induziertes Asthma trifft häufiger Frauen und zeigt eine starke Symptomatik aber weniger eosinophile Entzündungen (84). Es wird vermutet, dass die Th2 Immunantwort bei dieser Form keine Rolle spielt, sondern der allgemein erhöhte proinflammatorische Status der Patienten (80,81).

Es gibt nicht sehr viele Daten über neutrophiles Asthma. Neutrophilie wurden in der letzten Jahren immer wieder mit schwerem Asthma in Verbindung gebracht (88). In Patienten finden sich eine erhöhte Anzahl von Neutrophilen im Sputum und es wird eine starke Verbindung mit der Interleukin 17 (IL-17) Immunantwort vermutet (89). Es konnte keine Assoziation mit AHR gezeigt werden (90).

1.2.3 Immunantwort bei Asthma bronchiale (pro- und anti-inflammatorische Faktoren)

Die grundlegenden immunologischen Mechanismen sind beim allergischen und nicht-allergischen Asthma ähnlich (91). In die erste Phase der Allergensensibilisierung werden Allergene von unreifen antigenpräsentierenden Zellen, dendritischen Zellen (DCs) aufgenommen und prozessiert. Inflammatorische Zytokine und Chemokine, die vom Epithel gebildet werden, verstärken die Reifung der DCs und führen zu deren Aktivierung. Die aktivierten DCs wandern zu den regionalen Lymphknoten und präsentieren Peptidfragmente des aufgenommenen Antigens über den Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) II auf ihrer Oberfläche den naiven T (Th0) Lymphozyten.

Die Interaktion zwischen diesen Zellen führt in Anwesenheit von IL-4 zur Differenzierung von Th2 Lymphozyten aus den naiven T-Zellen (92). Die ausdifferenzierten Th2-Zellen sezernieren ein spezifisches Set an Zytokinen, wie IL-4, IL-5 und IL-13, welche direkt auf die glatten Muskelzellen der Atemwege oder das Atemwegsepithel wirken (85).

Durch den Kontakt der Th2-Lymphozyten mit antigenspezifischen B-Lymphozyten (B-Zellen) werden die B-Zellen angeregt allergenspezifisches IgE zu produzieren. Dann bindet das IgE an hochaffine IgE-Oberflächenrezeptoren (FcεRI) von Effektorzellen wie Mastzellen und basophile Granulozyten (93). Ein zweiter Kontakt mit dem gleichen Allergen führt zur Bindung des IgE an den FcεRI-Rezeptor und zur Degranulation dieser Effektorzellen. Die IgE vermittelte Degranulation führt zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren, wie Histamin, Prostaglandinen, Leukotrien und reaktiver Sauerstoffspezies. Diese Mediatoren

Einleitung

erzielen die Kontraktion von glatter Muskulatur, Hypersekretion von Mukus und Vasodilatation. Vasodilatation und mikrovaskuläre Leckage führt dazu, dass Plasmaproteine in die Atemwege gelangen und Ödeme verursachen. Zudem können Plasmaproteine die *tight junctions* des Epitheliums überwinden, in den Atemwegslumen akkumulieren und so die mukoziliäre Reinigung stören (85). Plasmaproteine, Mukus, inflammatorische Zellen und abgestorbene Epithelzellen bilden eine viskose Plaque, die zur Atemwegsobstruktion führt (86).

Nach der IgE-vermittelten frühen Immunreaktion kommt es in der späten Phase zur Rekrutierung und Infiltration von Lymphozyten, Makrophagen sowie Granulozyten aus dem Blut in die Lunge. Charakteristisch für eine akute allergische Entzündung der Atemwege sind neben den Th2-Lymphozyten, die eosinophilen Granulozyten. Eine eosinophile Entzündungsreaktion wird hauptsächlich durch das Zytokin IL-5 vermittelt, welches von Th2-Lymphozyten und Mastzellen produziert wird und die Differenzierung sowie das Überleben der eosinophilen Granulozyten in der Peripherie fördert. Weitere Chemokine wie „*Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*“ (RANTES) und Eotaxine, die von Makrophagen, T-Lymphozyten, dem Epithel und eosinophilen Granulozyten produziert werden, dienen als chemotaktisch wirkende Mediatoren und steuern die Migration und Einwanderung der eosinophilen Granulozyten zum Ort der Entzündung (94). Dort tragen sie durch die Sekretion zytotoxischer Granulaproteine wie dem „*major basic protein*“ (MBP) und der eosinophilen Peroxidase (EPO) wesentlich zur Epithelschädigung und in der Folge zur Bronchokonstriktion und Entwicklung einer Atemwegshyperreagibilität bei (95).

Nach einer akuten Asthmaphase ist es wichtig, dass der Körper die Immunantwort herunterreguliert. Die Umstellung von den allergen-spezifischen T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen ist ein wichtiger Bestandteil einer normalen Immunantwort gegenüber Allergenen. Die Abschwächung der Immunantwort und die Induktion einer Toleranz gegenüber Allergenen werden regulatorischen T-Zellen (Tregs) zugeschrieben. Treg-Zellen sind durch ihre Koexpression von Transkriptionsfaktoren wie „*forkhead box protein*“ (Foxp3), CD4 und CD25 identifizierbar und sezernieren Zytokine, wie IL-10 und „*transforming growth factor beta*“ (TGF- β). Diese Zytokine induzieren die Suppression von DCs, inhibieren direkt die Th1, Th2 und Th17 Zellen, blockieren die allergen-spezifische IgE Antwort und die Induktion von IgG4, inhibieren Mastzellen, Basophile und Eosinophile und verhindert die Migration von T-Zellen in die Atemwege (96). Zusätzlich induziert TGF- β die Proliferation und Kollagensynthese in Lungenfibroblasten (97).

1.2.4 Prävention und Therapie

Die Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. und die Deutsche Atemwegsliga e.V., unter der Beteiligung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie e.V. und der Österreichischen Gesellschaft für Pneumologie, haben einen Leitfaden zu Diagnostik, Prävention und Therapie veröffentlicht (82).

Die Prävention wird in drei Kategorien unterteilt:

1. Die primäre Prävention: Das Ziel ist die Entwicklung der Erkrankung zu verhindern. Das Verständnis vom natürlichen Verlauf des Asthmas ist noch recht unvollkommen und die Gen-Umwelt-Interaktion sehr komplex. Deshalb ist es sinnvoll Präventionsmaßnahmen in der Umwelt von Kindern vorzunehmen, wie z.B. die Ernährung bei Säuglingen, Impfung für Kinder und Säuglinge mit erhöhtem Asthmarisiko, Vermeidung von Übergewicht bei Kindern und Vermeidung von aktiver und passiver Tabakrauchexposition.
2. Die sekundäre Prävention: Das Ziel ist die Vermeidung der Entwicklung von Asthma bei Kindern, die bereits an anderen Allergien leiden (Nahrungsmittelallergie oder Dermatitis). Eine sinnvolle Maßnahme ist die Reduktion der Exposition von möglichen Allergenen aber auch eine adäquate Therapie bei allergischer Rhinitis.
3. Die tertiäre Prävention: Diese zielt auf die Verhinderung der Verschlimmerung eines bereits bestehenden Asthmas und beinhaltet z.B. eine Umgebungssanierung sowie eine Pharmakotherapie (Tabelle 2).

Ziel der Asthmatherapie ist eine Kontrolle des Asthmas zu erreichen und möglichst andauernd zu erhalten. Eine adäquate Therapie erlaubt eine normale körperliche Belastung und erfordert nicht den Einsatz von Notfallsprays.

Asthmatikern mit mildem oder moderatem Asthma können die Symptome durch die Therapie mit Kortikosteroiden in den meisten Fällen kontrollieren (Tabelle 2) (98). Anders als schweres Asthma, welches durch anhaltende Beschwerden, häufige Exazerbationen sowie einer deutlichen Verschlechterung der Lungenfunktion durch die persistierende Atemwegsobstruktion gekennzeichnet ist. Patienten mit schwerem Asthma sprechen häufig schlecht auf die Behandlung mit Kortikosteroiden an. Daher benötigen sie neben hoch dosierten Kortikosteroiden in Kombination mit lang wirksamen β 2-Agonisten oft zusätzliche Medikamente wie Theophyllin oder Leukotrienantagonisten. Die Symptome und die zum Teil erheblichen Nebenwirkungen der Medikamente schränken die Lebensqualität der Patienten stark ein (98,99). Tabelle 2 fasst alle Therapiemöglichkeit zusammen.

Einleitung

Tabelle 2: Medikamentöse Asthma Therapie.

Bedarf- sowie Langzeittherapie für Asthmatiker. Modifiziert nach dem Leitfaden der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (51,52)

Bedarfstherapie	Wirkung
Schnell wirkende β_2 - Adrenergika	<ul style="list-style-type: none">• Bronchienerweiternde Wirkstoffe, als Dosieraerosol• Selektive Bindung an Beta2-Adrenozeptoren, entspannt die glatte Muskulatur in den Atemwegen
Dauertherapie	Wirkung
Inhalative Glucocorticoide	<ul style="list-style-type: none">• Wirken entzündungshemmend, antiallergisch und immunsuppressiv• Binden an den zytosolischen Glucocorticoidrezeptor• Klinischer Wirkeintritt erst nach einigen Tagen
Lang wirksame inhalative β_2 - Sympathomimetika	<ul style="list-style-type: none">• Bronchienerweiternde Wirkstoffe• Wegen Gefahr einer Tachyphylaxie nur zusammen mit Inhalativen Glucocorticoiden
Theophyllin	<ul style="list-style-type: none">• Retardtabletten• Entzündungshemmende, bronchien- und gefäßerweiternde Eigenschaften
Leukotrienrezeptor-Antagonist	<ul style="list-style-type: none">• Entzündungshemmend und antiallergisch• Binden an den CysLT1-Rezeptor und hemmen die Wirkungen der Entzündungsmediatoren, Cysteinyl-Leukotrienen.• Hemmt dadurch die Atemwegsverengung, die Schleimproduktion und die Rekrutierung von Entzündungszellen• Häufig oral bei Kindern eingesetzt
Monoklonale Antikörper Anti-IgE oder anti-IL-5	<ul style="list-style-type: none">• Spezifische Antikörper, die an das menschliche IgE oder IL-5 binden und inaktivieren

1.2.5 Geschlechtsunterschied im Asthma bronchiale

Es gibt in Asthma- und Allergierkrankungen einen Geschlechtsdimorphismus (Geschlechtsunterschied), welcher sich im Verlauf des Lebens verändert. Im Kindesalter, bis 10 Jahre, haben Jungen im Vergleich zu Mädchen eine erhöhte Prävalenz an Asthma und

Einleitung

Allergie zu leiden. Interessanterweise ändert sich während der Pubertät die Frequenz von Asthma und Allergie und wechselt von hoher Prävalenz in Jungen zu hoher Prävalenz im Mädchen. Im Erwachsenenalter ist die Asthmaprävalenz bei Frauen höher als bei Männern (101). Es wird vermutet, dass diese Geschlechtsunterschiede in der Asthmaentwicklung aufgrund von Geschlechtshormonen und anderen Faktoren, die wichtigen Signalwege in der Asthmapathogenese verändern können. Die hohe Prävalenz von Asthma in Jungen im Kindesalter ist bis heute unklar. Eine potentielle Erklärung wäre, dass das Wachstum der großen Lungengefäße im Vergleich zum Wachstum des Lungenparenchyms (verantwortlich für das tatsächliche Atmen) bei Jungen verzögert ist. Dieses Phänomen führt zu einer Verengung der Atemwege in der Lunge der Jungen im Vergleich zur Lunge der Mädchen (102). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Jungen im Vergleich zu Mädchen eine höhere Tendenz haben, Allergierkrankungen zu entwickeln. Diese Erkrankungen können sich durch eine erhöhte IgE-Immunität gegen verschiedene Allergene auszeichnen (103). Ein anderes Bild zeigt sich nach der Pubertät. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Asthmasymptome während des Menstruationszyklus, der Schwangerschaft, sowie der Menopause stark variieren. Schätzungsweise 30-40% der Frauen mit Asthma leiden an einer Verschlechterung der Symptome während der Prä- und Peri-menstruellen Phase ihres Zyklus (48,49). Während der Schwangerschaft und in der Menopause sind die bisherigen Daten diskordant. Es wird sowohl von einer Verschlechterung oder Verbesserung der Symptome berichtet (50,51).

1.3 Tiermodelle in der Asthma und Influenza Komorbiditätsforschung

Obwohl die Inzidenz von Asthma in den letzten 10 Jahren weltweit schnell gestiegen ist, ist die erfolgreiche Entwicklung und Einführung neuer Medikamente in der Asthmathherapie sehr limitiert. Asthma ist eine sehr komplexe Erkrankung mit verschiedenen klinischen Phänotypen in Kindern und Erwachsenen (Kapitel 1.2.1.), was die Forschung der verschiedenen Phänotypen erschwert. Wie bei anderen Erkrankungen, sind klinische und epidemiologische Studien essentiell für die Entwicklung neuer Therapien und adäquater Behandlungsplanung der Krankheit. Die Fähigkeit diese verschiedenen Phänotypen zu verstehen und zu untersuchen, stellt eine wichtige Aufgabe dar, welche nur mit Hilfe geeigneter Tiermodelle zu bewältigen ist. Es wurden Tiermodelle entwickelt, um die Mechanismen der Krankheit zu untersuchen, die Aktivität bestimmter Gene und zellulärer Signalwege zu bestimmen, sowie die Sicherheit neuer Medikamente vor der klinischen Studie zu testen (108). Viele Erkenntnisse über die Mechanismen bei Asthma, welche bis heute Verwendung finden, sind aus Daten von Tiermodellen abgeleitet (109). Dabei müssen genetische Faktoren und die Immunantwort im Tiermodell berücksichtigt werden.

Einleitung

In der Influenza Forschung stellen Tiermodelle eine essentielle Methode dar. Seit dem 20. Jahrhundert werden kleine Säugetiere für die Charakterisierung und Anzucht von Viren verwendet (110). Die Komplexität des Zusammenspiels zwischen viralen Faktoren und Wirtsfaktoren kann ausschließlich im kompletten Organismus untersucht werden (55,56).

Des Weiteren müssen sowohl antivirale Medikamente, als auch neue Impfstoffe vor der Anwendung im Menschen in Tiermodellen getestet und optimiert werden (57,58). Für eine Charakterisierung der Pathogenität und der Immunantwort einer Influenzavirusinfektion ist die Wahl des Tiermodells entscheidend. Dabei sollte wie bei Asthma, die klinische Ausprägung und die Immunantwort berücksichtigt werden. Asthma und Influenza sind zwei sehr komplexe Erkrankungen. Dies erschwert ein geeignetes Tiermodell zu finden, welche die klinischen Daten im Menschen widerspiegeln kann. Im Folgenden wird auf die wichtigsten Tiermodelle und deren Anwendung in der Asthma-Influenzaforschung eingegangen.

1.3.1 Das Mausmodell

Die Labormaus (*Mus musculus*) bietet zahlreiche Vorteile gegenüber anderen Tiermodellen. Seine Größe, die relativ niedrigen Kosten, die einfache Zucht und die kurze Trächtigkeitsdauer macht die Maus zu einem geeigneten und beliebten Säugermodell. Die Genetik der verwendeten Mäusestämme ist umfassend beschrieben und es steht ein umfangreiches Spektrum an immunologischen Reagenzien, Technologien zur genetischen Modifikation und Charakterisierung zur Verfügung. Durch Inzucht der Labormausstämme sind Versuche gut reproduzierbar, wobei die Vielzahl der verschiedenen Zuchtstämme nur bedingt die genetische Vielfalt in der Bevölkerung reflektieren kann (114). Zudem stellt die Verfügbarkeit zahlreicher Inzucht Mausstämme einen Vorteil da, aber es ist wichtig den adäquaten Mausstamm zu wählen.

In der Allergie- und Asthmaforschung gilt das Mausmodell als „Goldstandard“. In Mäusen ist IgE der primäre allergische Antikörper, deswegen ist diese Spezies geeignet, um die Rolle der humoralen Immunantwort während der Entwicklung von allergischem Asthma zu untersuchen (115). Zudem sind Mäuse in der Lage, nach Sensibilisierung gegenüber einem Allergen, eine eosinophil-basierte Atemwegsentzündung, eine vermehrte Mukusekretion und eine allergen-induzierte Atemwegshyperreagibilität (AHR) zu entwickeln. Sogar strukturelle Veränderungen in den Atemwegen kann im Modell von chronischem Asthma erreicht werden (116). Die Wahl des richtigen Mausstamms, um die eigene Fragestellung gezielt zu untersuchen, ist essentiell. Mausstämme wie DBA/2J sind für eine Infektion mit humanen Influenzaviren generell empfänglicher (117), aber resistent für die Entwicklung von allergen-induzierte Atemwegshyperreagibilität (118). Die Mausstämme BALB/c und C57BL/6 werden in der Asthma und Influenzaforschung am häufigsten verwendet. In der Asthmaforschung zeigen BALB/c Mäuse eine typische Th2-dominierte Immunantwort und

Einleitung

eine starke Induktion von allergischen Parametern, wie allergen-spezifische IgE, AHR und eosinophile-basierte Atemwegsentszündung. Im Vergleich zu BALB/c Mäusen, zeigen C57BL/6 Mäuse eine Th1-dominierte Immunantwort und Einschränkungen in der Entwicklung einer allergen-spezifischer Atemwegsimmunantwort, vor allem in der Entwicklung der allergen-spezifisch IgE Immunantwort. Interessanterweise zeigen die C57BL/6 Mäuse nach Ovalbumin *Challenge*, eine starke eosinophile Immunantwort in der bronchoalveolären Lavage (119).

Es konnte im Kontext von Influenza, gezeigt werden, dass die C57BL/6 Mäuse empfänglicher gegen 2009 pH1N1 sind, was mit einer gesenkten Zytokinantwort korreliert. Im Gegensatz dazu waren BALB/c Mäuse empfindlicher gegen hochpathogene IAV was mit einer erhöhten pro-inflammatorischen Immunantwort einhergeht (120). Zudem konnte die Wichtigkeit der genetischen Diversität im Mausmodell gezeigt werden, welche essentiell ist, um die genetische Vielfalt in Mensch und das Zusammenspiel mit einer viralen Infektion zu reflektieren. Es konnte gezeigt werden, dass allogene verpaarte Mäuse im Vergleich zu syngen verpaarten Mäusen schwerere Infektionsverläufe zeigen (67,68).

1.3.2 Weitere Tiermodelle

Obwohl heutzutage die Mehrzahl aller Untersuchungen in Bezug auf allergische Erkrankungen in Mäusen durchgeführt werden, waren Meerschweinchen sehr lange „Goldstandard“ für die Untersuchung von AHR und pulmonale Hypersensitivität (123).

Studien konnten zeigen, dass es viele Ähnlichkeiten zwischen dem Immunsystem von Menschen und Meerschweinchen gibt (124). Daher sind die Tiere heute noch ein beliebtes Modell in der biomedizinischen Forschung und werden deswegen in immunologischen Studien respiratorischer Infektionskrankheiten wie Influenza oder Asthma verwendet (70,71). Meerschweinchen sind in der Lage nach Behandlung mit einem cholinergen Agonisten, eine Hyperreaktivität und Sensibilität der Atemwege zu zeigen. Zudem können sich die unmittelbare und die spätere Phase der Atemwegsimmunreaktion nach einer Allergen *Challenge* sehr schnell bilden. Wichtige Argumente für das Meerschweinchen-Modell sind die Bildung von Eosinophil- als auch Neutrophil-basierende Atemwegsimmunantwort und die Bildung allergen-spezifischer IgG1 und IgE Antikörper (125). Allerdings, gibt es auch mehrere Nachteile Meerschweinchen als Tiermodell zu verwenden. Zum einen werden Meerschweinchen nicht wie Labormäuse durch Inzucht gezüchtet und daher kommt es auch innerhalb eines Stammes zu genetischen Unterschieden, welche die Reproduzierbarkeit der Daten erschwert und zudem sind sehr wenig spezies-spezifische Reagenzien verfügbar. Der größte Nachteil für die Asthmaforschung ist die Dominanz von IgG1 als anaphylaktisch-wirkender Antikörper, statt IgE (125). Obwohl Meerschweinchen empfänglich für eine Reihe von Influenzaviren sind, fehlen meist klinische Zeichen einer Erkrankung (111). Zudem

Einleitung

kommt es bei einer Infektion mit humanen Influenzaviren zur Virusreplikation im Respirationstrakt, begleitet von Mukusbildung. Diese Symptome kommen den Symptomen einer Asthmaerkrankung nahe und die daraus resultierenden Ergebnisse könne verfälscht sein (126).

Größere Tiere wie Halbaffen werden in der Influenza- und Asthmaforschung verwendet, aber sind aufgrund ihrer Größe und der hohen Kosten, nur bedingt geeignet.

1.3.3 Das Ovalbumin Allergen

Mäuse sind nicht in der Lage spontan allergische Atemwegsentszündung oder AHR zu entwickeln, deswegen ist es nötig artifiziell eine Asthma-ähnliche Reaktion in den Atemwegen hervorzurufen.

In den meisten Studien wurde Ovalbumin (OVA) verwendet um die Tiere zu sensibilisieren und um eine lokale allergische Reaktion zu provozieren. OVA ist das mengenmäßig häufigste Protein im Eiklar von Vogeleiern, es ist relativ günstig, ist schnell verfügbar, kann stark aufgereinigt werden, die Immundominanz seiner Epitope wurde ausgiebig untersucht und die rekombinanten Peptide generiert (127,128). Ovalbumin zeigt gegenüber anderen Allergenen viele Vorteile. Im Gegensatz zu anderen Allergenen ist aufgereinigtes OVA frei von Proteasen und Endotoxinen (127). Obwohl verschiedene Protokolle für die Entwicklung von Asthma etabliert wurden, existiert ein Basismodell, mit einer Sensibilisierungsphase und einer Provokationsphase. OVA wird standardmäßig durch multiple systemische Gabe kombiniert mit einem Adjuvant, meistens Aluminiumhydroxid, welches dafür bekannt ist, eine starke Th2-Immunantwort zu entwickeln (74,75). Adjuvant freie Protokolle sind auch effizient, aber eine höhere Anzahl von Expositionen ist nötig, um eine erfolgreiche Sensibilisierung zu erreichen (76,77). Die Sensibilisierungsphase ist gefolgt von einer *Challenge*-Phase oder Provokationsphase. Dabei wird OVA mehrmals mittels Aerosol oder intranasal appliziert. Diese OVA Gabe führt zur Induktion einer allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge, in Verbindung mit der Entwicklung einer Atemwegsüberempfindlichkeit (Hyperreaktivität), vermehrter Schleimproduktion und der Sekretion von allergen-spezifischem IgE (78,79).

Durch die wiederholte intraperitoneale Sensibilisierung und Aerosol Gabe von OVA kann in C57BL/6 Mäusen eine Ummodellierung der Atemweges hervorgerufen werden, welche ein Marker für chronisches Asthma darstellt (116). Andererseits führte eine sehr lange wiederholte Exposition zu OVA in manchen Mausstämmen wie BALB/c zu einer Toleranzreaktion in der Lunge, welche die Entwicklung der chronischen Atemwegsveränderung verhindert (134).

Obwohl OVA als Allergen auch Nachteile zeigt, wie z.B. die systemische intraperitoneale Gabe von OVA, welche als Route für Asthma nicht relevant ist und die Zugabe von Aluminiumhydroxid, ist es trotzdem der meist verwendete Allergen in der Asthmaforschung.

1.3.4 Weitere Allergene

In den letzten Jahren wurden weitere klinisch relevante Allergene in Mäusen und anderen Tiermodelle für die Untersuchung von Asthma verwendet. Es wurden Extrakte oder aufgereinigte Proteine abgeleitet von menschlichen Allergenen, wie Hausstaubmilben, Kakerlakenextrakt oder Pilzextrakt verwendet (87,88).

Die häufigsten Hausstaubmilbenarten und häufige Auslöser von Asthma sind *Dermatophagoides pteronyssinus* (137). Die Hausstaubmilben *Dermatophagoides pteronyssinus* sind komplexe Arthropoden, die sich von menschlichen Hautschuppen ernähren und im menschlichen Habitat zu finden sind. Um Hautschuppen zu verdauen, produzieren Hausstaubmilben Proteasen in ihrem Gastrointestinaltrakt, die anschließend mit dem Kot ausgeschieden werden. Der Kot von Hausstaubmilben beinhaltet die häufigsten Auslöser von allergischem Asthma weltweit (138). Das Hausstaubmilben Asthmodell induziert eine Th2-Immunantwort, charakterisiert durch Eosinophil-basierte Atemwegsentzündung, die Produktion von Th2 Zytokinen, Hausstaubmilben-spezifische IgE, Ummodellierung der Atemwege und Atemwegshyperreaktivität (139).

Ein weiteres verwendetes Allergen ist der Schimmelpilz, *Aspergillus fumigatus* aus der Gattung der Gießkannenschimmel (*Aspergillus*) in der Familie der Trichocomaceae. *Aspergillus fumigatus* ist in der Lage Allergien auszulösen, vor allem Asthma bronchiale oder auch eine bronchopulmonale Aspergillose, die sogenannte Farmerlunge (*farmer's lung*). Dieses Modell ist charakterisiert durch multiple Pilzexpositionen, die zur Asthma-Exazerbation führt. Dieses Modell führt zu einer erhöhten Rekrutierung von Eosinophilen und Lymphozyten sowie einer erhöhten IgE Produktion. Dabei kommt es nach mehreren Pilzexpositionen zur Umstrukturierung der Atemwege (135).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Es konnte eine positive Korrelation zwischen der Asthma-Exazerbation und grippalen Infekten festgestellt werden. Virale Infektionen wurden bei Kindern und Erwachsenen als der häufigste Grund für Asthma-Exazerbation detektiert (62-65). Diese Korrelation wurde noch einmal während der Influenza Pandemie 2009 hervorgehoben. Während der H1N1 Influenzapandemie von 2009, war Asthma eine der am häufigsten beobachteten Komorbiditäten von Patienten, die während dieser Pandemie hospitalisiert wurden (50). In den letzten Jahren wurden unterschiedliche Mausmodelle etabliert, um die Auswirkung von Asthma auf den Krankheitsverlauf einer Infektion, mit einem 2009 pandemischen Influenzavirus zu untersuchen. Erstaunlicherweise zeigten die unterschiedlichen Tierexperimente, dass die Immunantwort während einer Influenza Infektion, welche die Asthma-Exazerbation verursacht, den Wirt vor einem schweren Krankheitsverlauf zu schützen scheint. Dies widerspricht allerdings den klinischen Beobachtungen. Bis heute fehlt ein geeignetes Tiermodell, um die zugrundeliegenden Mechanismen und das gegenseitige Wechselspiel von Asthma bronchiale und IAV, das zu schweren Krankheitsverläufen führt, zu untersuchen.

Das Ziel dieser Arbeit ist in erster Linie, ein neues Mausmodell, welches die klinischen Daten reflektiert, zu etablieren, um die Auswirkungen von zugrundeliegendem *Asthma bronchiale* auf den Krankheitsverlauf einer Infektion mit pandemischen H1N1 IAV aufzuklären.

Es lassen sich drei übergeordnete Ziele der Arbeit formulieren:

1. Etablierung eines weiblichen Asthma Mausmodells zur Untersuchung des Krankheitsverlaufs von Influenza bei zugrundeliegendem akutem Asthma bronchiale.
2. Untersuchung der geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Asthma und Influenza Komorbiditätsforschung.
3. Mittels *Next Generation Sequencing* soll das Transkriptom der Lunge von Influenzavirus-infizierten, asthmatischen Mäusen im Gegensatz zu dem nicht-asthmatischen Mäusen analysiert werden, um eventuelle Unterschiede in der Genexpression zwischen beiden Gruppen zu identifizieren

2 Material

2.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Serva
Albumin from chicken egg white, grade V	Sigma-Aldrich
Albumin from chicken egg white, grade VI	Sigma-Aldrich
Avicel (mikrokristalline Cellulose)	FMC BioPolymer
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ethanol (EtOH)	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Eukitt	Kindler
Eosin-Y-Lösung	Merck
Glycerol "UltraPure™ Glycerol"	Invitrogen
Hämatoxylin	Shandon
Imject™ Alum Adjuvant	Thermo Fisher Scientific
Isopropanol (2-Propanol)	Fluka
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
Methanol (CH ₄ O)	ChemSolute
Natriumchlorid (NaCl)	Geyer Th. GmbH & Co.KG
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich
Ottix Plus	DiaPath
Ottix Shaper	DiaPath
Paraffin (niedrigschmelzend)	DCS
Paraformaldehyde (PFA; OH(CH ₂ O) _n H(n=8-100))	AppliChem
Perjodsäure	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Complete	ROCHE
Protease für IHC-P	Sigma-Aldrich
<i>RNAlater RNA Stabilization Reagent</i>	QIAGEN
Salzsäure (HCl)	Merck
Schiffsreagenz	Sigma-Aldrich
Triton-X-100	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Geyer Th. GmbH & Co.KG

Material

TrueBlue™ Peroxidase Substrate	KPL
Tween-20 (C58H114O26)	Serva
Wasser (H2O)	Millipore Anlage
Wasserstoffperoxid (H2O2)	Merck
Xylol	Merck

2.2 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
4 % PFA	4 % PFA in 1x PBS
Avicel-Lösung	2,5 % Avicel in dH ₂ O → Autoklavieren
Blocking-Puffer (IHC-P)	10 % Eselserum (Abcam) in 1x PBS
Natriumacetatlösung	0,05 M (pH 5,0 mit Eisessig)
1% Ovalbumin grade V-Lösung	1 % Albumin, grade V in PBS-PAA (1x)
Ovalbumin grade VI-Lösung	50 mg/mL Ovalbumin in dH ₂ O
Paraformaldehyd (PFA)	4 % PFA (AppliChem) in 1x PBS
PBS (10x)	26,8 mM KCl (Carl Roth) 17,6 mM KH ₂ PO ₄ (Merck) 1,37 M NaCl (Merck) 51,3 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (Merck) ad. 1 L ddH ₂ O → pH 7,4
PBS-Tween (0,05 %)	0,05 % Tween-20 in 1x PBS
Protease für IHC-P	0,1 % in 37°C PBS. Lagerung bei -20 °C.

2.3 Desinfektionsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Ethanol, vergällt	Geyer Th. GmbH & Co.KG
Pursept-A Xpress	SCHÜLKE & MAYR AG
Sterillium	Bode

2.4 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
6-Vertiefungsplatte, Zellkultur	Becton Dickinson
96-Vertiefungsplatte, V-Boden	NUNC
Applikatoren, steril	Böttger
DNA-ExitusPlus IF	Geyer Th. GmbH & Co.KG
EDTA Röhrchen 1,5 ml	KABE
EDTA-Kapillarblutentnahme-Röhrchen (200 µl)	KABE Labortechnik
Einbettkassetten für Histologie, Micro	Microm
Einmalspritzen TERUMO® U-100 Insulin (1 ml / 6 % Luer)	TERUMO Corporation
Einmalspritzen <i>Omnifix</i> ® (3 ml / Luer Lock Solo)	B. Braun Melsungen AG
Einmalspritzen <i>Omnifix</i> ® (10 ml / Luer Solo)	B. Braun Melsungen AG
Glasperlen (Ø 0,50-0,75 mm) für die RETSCH Labormühle	RETSCH
Kanülen (25G x 1“, 0,5 x 25 mm)	BD Microlance
Kanülen (21G x 1 1/2“)	
Kanülen (26 G x 3/8“, 0,45 x 10 mm)	BD Microlance
Kryokisten aus Pappe	Thermo Fischer Scientific
Kryoröhrchen, 1 ml und 2 ml	SARSTEDT
Mahlkugeln (rostfreier Stahl: Ø 2 mm) für die RETSCH Labormühle	RETSCH
Multifly Set (21G x 3/4“, 0,8 x 19 mm)	SARSTEDT
Pipettenspitzen, mit Filter	SARSTEDT
Pipettenspitzen, ohne Filter	Brandt
Reaktionsgefäße 1,5 ml/ 2 ml	SARSTEDT
SafeSeal Reagiergefäß mit Schraubverschluss und Dichtung	SARSTEDT
Skalpell, chirurgisch; Cutfix Figur 22	BRAUN
Serologische Pipette, steril, wattiert (5ml/10ml /25 ml)	SARSTEDT

Material

Schraubröhre (15ml/50 ml)	SARSTEDT
Zellkulturflaschen T25/T75/T125 mit Filterkappe	Becton Dickinson
Zellkulturplatte 60 mm/ 10 mm	Becton Dickinson
Dual Objektträger Zählkammer (<i>Dual-Chamber, Cell Counting Slides</i>)	Bio-Rad

2.5 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Avidin/Biotin Blocking Kit SP2001	Szabo-Scandic
CBA Flex Sets	BD Biosciences
RNase-Free DNase Set	QIAGEN
Innuprep RNA Minikit	Analytik Jena
High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies
Mouse Ovalbumin Specific IgE ELISA Kit	MyBiosource
ProcartaPlex Mix&Match Mouse PLEX	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific
SuperBlock T20 (TBS)	Pierce / Thermo Scientific
SuperScript® III	Invitrogen
TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2	Illumina Inc.

2.6 Enzyme und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
RNase-free DNase I	QIAGEN
RNase-free Buffer RDD	QIAGEN
<i>RiboLock RNase Inhibitor</i>	Thermo Fischer Scientific
SuperScript® III	Invitrogen
Trypsin-TPCK	Sigma-Aldrich

2.7 Zellkulturmedien & -zusatzstoffe

Bezeichnung	Hersteller
Albumin Lösung, bovin (BSA; 35 % in DPBS)	Sigma-Aldrich
Avicel Lösung	2,5 % Avicel in 1x PBS
Dulbecco's PBS (1x)	Sigma-Aldrich
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA
Infektionsmedium für MDCK	MEM 0,2 % BSA 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin und Streptomycin
Kryokonservierungsmedium für Zellen	FCS 10 % DMSO
L-Glutamin 200 mM	Sigma-Aldrich
Minimal Essential Medium (MEM)	Sigma-Aldrich
Modified Eagle Medium 2x (2x MEM)	Sigma-Aldrich
Penicillin und Streptomycin (P/S, 100x)	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA (1x)	PAA
Überlagerungsmedium für Plaque Tests	50 % Zweifach Medium für Plaque Test 50 % Avicel Lösung
Wachstumsmedium für MDCK	MEM 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin und Streptomycin
Zweifach Medium für Plaque Test	2x MEM 0,4 % BSA 2 % L-Glutamin 2 % Penicillin und Streptomycin

2.8 Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
MDCK II (Madin-Darby Canine Kidney Cells)	Cockerspaniel-Nierenzelllinie	Phillips Universität Marburg, Marburg Deutschland, Prof. Dr. Klenk

2.9 Virusstämme

Bezeichnung	Herkunft
A/Hamburg/NY1580/09 (2009 pH1N1) → HH15	Sigrid Baumgarte, Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, Deutschland (Gabriel <i>et al.</i> , 2011)

2.10 Antikörper und Seren

Bezeichnung	Quelle	Hersteller	Verdünnung
Anti-NP	monoklonal/ Maus	Abcam (ab43821)	1:1000 Plaquetest
Anti-Maus IgG-HRP	polyklonal/ Kaninchen	SouthernBiotech (6170-05)	1:2000 Plaquetest
Anti-FPV (A/FPV/Rostock/34 (H7N1))	polyklonal/ Kaninchen	Prof. Klenk, Institut für Virologie, Marburg, Deutschland	1:2000 Histologie
Anti-NP	Kaninchen	Thermo Fischer, PA5-32242	1:2000 Histologie
Anti-Kaninchen Biotin	Esel	Jackson ImmunoResearch, 711-066-152	1:200 Histologie
Eselserum	Esel	Abcam	10 %/ 2 % Histologie
Anti-IgE- RME-1	Monoklonal/ Ratte	Biologend	100 µg
Isotyp Kontrolle - Klon RTK2071	Monoklonal/ Ratte	Biologend	100 µg

2.11 Tiere

Spezies	Geschlecht	Spezifikation	Lieferant
Maus- C57BL/6	Weiblich	6 Wochen	Charles River
Maus- 1SB6F1	Weiblich	6-10 Wochen	Heinrich-Pette-Institut
Maus- 1SB6F1	Männlich	6-10 Wochen	Heinrich-Pette-Institut

2.12 Zubehör für Tiere

Bezeichnung	Quelle
IVC Käfig, Typ II lang	Tecniplast
Gebläseeinheit für IVC Gestell Blueline	Tecniplast
Standarddeckel, erhöht, Typ IV, DST 4 MS/50	Zoonlab
Erhaltungsfutter, Ratte/Maus Haltung	SSNIFF
Tränkflasche, Mäuse	Tecniplast
Tränkkappe 34 mm, Mäuse	Tecniplast
Maus Haus, rot-transparent	Tecniplast

2.13 Narkotika & Analgetika

Bezeichnung	Hersteller
Forene (Isofluran 100 %)	Abbott
Ketamin Gräub (100 mg/ml)	Albrecht
Natriumchlorid (0,9 % Lösung)	B. Braun Melsungen AG
Sedaxylan (Xylazin-Hydrochlorid, 20 mg/ml)	WDT

2.14 Programme

Bezeichnung	Hersteller
2100 Expert software	Agilent Technologies
Adobe Illustrator 2015 Release	Adobe Creative Cloud
Adobe Photoshop	Adobe Creative Cloud
Bio-Plex Manager™ 6.1 Standard Software	Bio-Rad
CBA Software - Accuri CFlow Software	BD Biosciences
CBA Software - FCAP Array	Soft Flow
<i>Cytoscape</i>	<i>Institute of Systems Biology</i>
GraphPad PRISM	Graphpad Software, Inc
Magellan™ - Data Analysis Software	Tecan Magellan Software

Material

Microsoft Office	Microsoft
Multi-Analyt-Profilierung Software	Bio-Rad
MyAssays: assay data analysis software	MyAssays
STRING 10.0 (<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>)	<i>European Molecular Biology Laboratory</i> (EMBL) und der Universität Zürich
Webgestalt	Zhang Lab.

2.15 Geräte und Werkzeug

Bezeichnung	Quelle
Aerosol Kammer	Forschungszentrum Borstel
Autoklav, feststehend	Schlumbohm
Agilent 2100 BioAnalyzer	Agilent Technologies
BioRad Luminex 200 System	Bio-Rad
Bio-Plex <i>Hand Held Magnetic Washer</i>	Bio-Rad
Chirurgische Feinpinzette	Fine Science Tools
Chirurgische Feinschere	Fine Science Tools
Chirurgische Standard-Pinzette	Fine Science Tools
CO ₂ Inkubator BBD6220	Thermo Scientific
CO ₂ Inkubator Heracell 150	Thermo Scientific
Durchlichtmikroskop	NIKON® <i>Eclipse 80i live</i>
Eismaschine, Flockeneis	Scotsman
Feinwaage Extend	Sartorius
Grant Instruments™ Mikrotiterplatten-Schüttler	Fisher Scientific
HiSeq 2500 System	Illumina Inc.
Isofluran Verdampfer "Vaporizer"	UNO
Knochenschere Bone Shears	Fine Science Tools

Material

Magnetrührer MR3001	Heidolph
Magnetrührer MR80	Heidolph
Mehrkanalpipette (8 Kanäle, 20-200 µl)	Brand
Mikrotiterplatten Lesegerät Tecan Safire2	Tecan
Mikrotom HM325	Microm
Mr. Frosty, Kryokonservierungscontainer	Nalgene
Paraffingießstation, EG1160	Leica
PARI TurboBoySX	PARI
PARI LL Vernebler	PARI
pH-Messgerät 766 Calimatic	Knick
Pipetten Eppendorf Reference (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Präzisionswaage ED224S	Sartorius
Präzisionswaage KB-2000-2NM	KERN
Reinstwassersystem Milli Q Aca	Millipore
Schüttelwasserbad SW-22	Julabo
Schüttler	Biosan
Schwingmühle MM400	RETSCH
Spektralphotometer Nanodrop 1000	Peqlab
TC20™ Automated Cell Counter	Bio-Rad
Sterilwerkbank Herasafe KS 12	Thermo Scientific
Sterilwerkbank Herasafe KS 18	Thermo Scientific
Trachealkanüle Ø 1.0mm, 15 mm	Hugo-Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH
Tierwaage	Kern

Material

Trockenschrank	Memmert
Vortex-Mixer 7-2020	neoLab
Wippschüttler	Biometra
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Gesamt-RNA Isolierung

Für die Transkriptom Analyse wurde die Gesamt-RNA aus murinen, in *RNAlater* fixierten Lungen isoliert. Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden die Lungen auf vier sterile 2 ml-O-Ring-Reaktionsgefäße mit 10 bis 15 sterilen Mahlkugeln aus rostfreiem Stahl (\varnothing 2 mm) überführt. Jedes Reaktionsgefäß enthielt etwa 50 mg der in *RNAlater* fixierten Lunge. Nach Zugabe von 900 μ l des Lysepuffers RL pro Reaktionsgefäß, wurden die Lungen für 6 min bei 30 Hz im 4°C-Raum in der Schwingmühle MM400 (RETSCH) homogenisiert. Die Überstände wurden anschließend vereinigt und 700 μ l davon für die Gesamt-RNA-Isolierung verwendet. Für die weitere Gesamt-RNA-Isolierung wurde, bis auf die DNase-I-Behandlung, nach Herstellerangaben vorgegangen („Protocol 1: *RNA extraction from tissue samples*“, Analytik Jena). Nach einem Waschschrift mit HS Puffer wurde die DNase-I-Behandlung durchgeführt (QIAGEN Kit). Dafür wurden 10 μ l DNase I in RDD Puffer verdünnt, auf die Säule gegeben und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit 500 μ l HS Puffer gewaschen.

Die aus den Lungen isolierte RNA wurde in 50 μ l RNase-freiem ddH₂O eluiert und mit 1U/ μ l Ribolock RNase Inhibitor (Thermo Fischer Scientific) versetzt. Die Konzentration von isolierter Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Spektralphotometers Nanodrop 1000 (Peqlab) nach Herstellerangaben bestimmt. Die isolierte Gesamt-RNA wurde aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.1.2 Hochdurchsatz-Sequenzierung (*High Throughput Sequencing*)

Zur Aufklärung neuer Mechanismen und Signaltransduktionswegen, welche eventuell den unterschiedlich schweren Krankheitsverlauf einer Influenzavirus Infektion bei zugrundeliegendem Asthma bronchiale erklären könnten, sollten Lungen von 2009 pH1N1-infizierten, akut asthmatischen Mäusen, einer Transkriptomanalyse unterzogen werden. Diese Analyse wurde in Kollaboration mit der *Next-Generation Sequencing* Technologie-Plattform von Prof. Adam Grundhoff am HPI durchgeführt. Hierfür wurden die Lungen von jeweils 3 Tieren pro Gruppe an Tag 3 und 6 p.i. entnommen und die Gesamt-RNA isoliert (Kapitel 3.1.1). Die RNA-Bibliothek-Herstellung, Qualitätskontrolle und anschließend die Gesamt-Transkriptom-*Shotgun*-Sequenzierung (RNA-seq) wurden in der *Next-Generation Sequencing* Technologie-Plattform durchgeführt. Dafür wurde 1 μ g der Gesamt-RNA für die Herstellung der Bibliothek nach Herstellerangaben (*TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2*, Illumina Inc.) verwendet. Größe und Qualität der RNA-Bibliothek wurden auf einem *BioAnalyzer High Sensitivity DNA Chip (High Sensitivity DNA Kit*, Agilent Technologies)

dargestellt. Die verdünnten RNA-Bibliotheken (2 nM) wurden anschließend mittels HiSeq 2500 System (Illumina) ungefähr 40-50 millionenfach pro Probe sequenziert.

3.1.3 Transkriptomanalyse der differentiell exprimierten Genen aus der Mauslungen

Die Gene Häufigkeit wurde mittels Salmon (v0.12.0) quantifiziert (140) und mit der Transkriptom-Referenz von Mäusen (GRCm38) von ENSEMBL (Version 97) verglichen und ermittelt. Die Daten wurden anschließend mittels *R package tximport* Software importiert (141). Die Normalisierung und die differentielle Genexpressionanalyse wurde mittels DESeq2 durchgeführt (142). Die Null-Varianz des statistischen Wald-Tests der DESeq2 Daten wurden neu geschätzt mittels der *R package fdrtool* (143), um der p-Wert zu kalkulieren. Es wurde ein MA-Plot zur Selektion von differentiell exprimierten Genen anhand des *Fold changes* angefertigt. Der Plot visualisiert die Unterschiede zwischen Messungen in zwei Proben, indem die Daten auf M- (*log ratio*) und A- (*mean average*) Skalen transformiert und dann diese Werte aufgetragen werden. Die differentiell exprimierten Genen wurden mit der Signifikanz von FDR (BH-angepasste p-Wert) $< 0,1$ und abhängig vom Analyse, $Log2FoldChange \geq 1$ oder ≤ -1 (Kapitel 4.3.2 und Kapitel 4.3.3) oder $Log2FoldChange \geq 2$ oder ≤ -2 (Kapitel 4.3.1). Die signifikanten dysregulierten Gene wurden anschließend mittels *Heatmaps* visualisiert, wobei die signifikanten hochregulierten Genen, Rot und die signifikanten herunterregulierten Gene, Blau dargestellt wurden (Kapitel 4.3) (144).

3.1.3.1 Visualisierung der Protein-Protein Interaktion mittels STRING und Cytoscape

Um mögliche Interaktionsnetzwerke aus der Analyse der Transkriptom der Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen herauszufinden, wurde mit dem Online Tool (www.string-db.org), vorhergesagte Protein-Protein-Interaktion Netzwerk ermittelt. Ein *confidence score* von 0,4 wurde für die Analyse verwendet. Die Daten wurden anschließend von STRING in das Software Cytoscape für weitere Visualisierung exportiert.

3.1.3.2 Gen-Ontologie und KEGG Signalweg Analyse

Um festzustellen, ob bekannte biologische Funktionen oder Prozesse in eine Liste von differentiell exprimierten Genen überrepräsentiert (enriched) sind, wurde der weit verbreiteter *Over Representation Analysis* (ORA) verwendet (145). Hierfür würde das Online Tool (www.webgestalt.org) verwendet (146). Die verwendeten Parameter wurden wie folgt angegeben:

- Minimum von Genen in jede Kategorie: 5
- Minimum von Genen in jede Kategorie: 2000
- FDR Methode: BH
- Signifikanzniveau: Top 5 oder Top 10

Die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway* (KEGG-Signalweg) Analyse wurde verwendet, um zu überprüfen in welchen komplexer Zellprozesse, Stoffwechselwegen oder Erkrankungen, die differentiell exprimierten Genen involviert sind. Hierfür wurde die Datenbank in das Online Tool STRING (www.string-db.org) verwendet.

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Immunglobulin mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA)

Nach einer erfolgreichen Sensibilisierung mit OVA lassen sich im Serum OVA-spezifische Immunglobuline nachweisen. Dies kann man sich zunutze machen, um zu überprüfen, ob die Sensibilisierungsreaktion stattgefunden hat und erfolgreich war. Dafür wurden die OVA-spezifischen Immunglobuline mittels Sandwich-ELISA gemessen. Bei einem enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) wird das nachzuweisende Antigen, in diesem Fall ein Zytokin, an einen spezifischen Erstantikörper gebunden, wobei dieser wiederum mit einem enzymgekoppelten Zweitantikörper detektiert werden kann. Bei der hier verwendeten Sandwich-Methode werden zwei Erstantikörper verwendet, wovon einer bereits an eine Mikrotiterplatte gebunden ist. Die Antigen-enthaltende Probe konnte nun auf der Mikrotiterplatte angereichert werden, um dann mit Hilfe eines weiteren Erstantikörpers nachgewiesen zu werden. Serumproben von infizierten und nicht-infizierten Mäusen wurden 3 und 6 Tage nach der Infektion, beziehungsweise 4 und 7 Tage nach der letzte OVA-Aerosol Behandlung, entnommen und analysiert. Die zu testenden Serumproben wurden entsprechend der zu erwarteten Immunglobulin Konzentration im Verdünnungspuffer verdünnt und 100 µl davon in Duplikaten auf die Platte aufgetragen. Dafür wurde ein OVA-spezifisches IgE ELISA Kit (EMELCA Bioscience) verwendet um die OVA-spezifische Immunglobuline nach Herstellerangaben nachzuweisen. Die absolute Mengenbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des aufgereinigten Antigens. Nach dem Abstoppen der Farbreaktion wurde die Absorption an einem Mikrotiterplatten Lesegerät (Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Für die Analyse wurde die *Magellan 7.1 Software* (Tecan) und *MyAssays: assay data analysis software* verwendet.

3.1.5 Zytokinbestimmung mittels Multi-Analyt-Profilierung (*Multiplex-Immunoassay*)

Um Unterschiede in der Expression einzelner Zytokine während der Immunantwort auf Asthma bronchiale bei eine zugrundeliegenden Influenzavirus Infektion zu untersuchen, wurden die Zytokin-Konzentrationen in Lungen von infizierten und nicht-infizierten asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels *Multiplex-Immunoassay* ermöglicht es eine gleichzeitige Erkennung

Methoden

und Quantifizierung von bis zu 100 sekretorischen Proteinen aus einem geringen Probenvolumen zu bestimmen. Diese Technologie verwendet magnetische Kugeln gekoppelt an diversen sekretorischen Proteinen.

In dieser Arbeit wurden die Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-17A, TNF- α und IFN- γ) aus dem Überstand von homogenisierten Lungen, 3 und 6 Tage nach der Infektion (Kapitel 0), mittels eines selbst-entworfenen *ProcartaPlex Mix&Match Mouse* (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) bestimmt. Teil der Lungen wurden entnommen, gewogen und in sterile 2 ml-O-Ring-Reaktionsgefäße mit sterilen Glasperlen (\emptyset 0,50-0,75 mm) (RETSCH) und 1 ml PBS (Sigma-Aldrich) überführt. Die Lungen wurden für 10 min bei 20 Hz im 4°C-Raum in der Schwingmühle MM400 (RETSCH) homogenisiert und anschließend für 10 min bei 16000 xg und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in einen sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, für 5 min bei 10000 xg und 4°C zentrifugiert und anschließend für die Messung verwendet. Die Zytokinbestimmung aus den Lungen Proben erfolgte nach Herstellerangaben („*Protocol: Serum and Plasma Samples.*“) und die Zytokine wurden in Duplikaten mit der BioRad[®] Luminex 200 Maschine (BioRad) gemessen.

3.1.6 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels *Cytometric Bead Array* (CBA)

Die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen aus BAL Flüssigkeit wurden mittels *Cytometric Bead Array* (CBA), in Zusammenarbeit mit unseren Kollaborateuren aus der Forschungszentrum Borstel, bestimmt. Theoretisch lassen sich die Konzentrationen von bis zu 30 verschiedenen Zytokinen aus einem 50 μ l Probe bestimmen.

In dieser Arbeit wurden BAL-Proben von asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen, die mit dem 2009 pH1N1 IAV infiziert wurden, mit der CBA-Technik untersucht. Als Kontrolle wurden nicht-infizierte asthmatische und nicht-asthmatische Mäuse verwendet. Dabei wurden kommerziell erhältliche Kits von der Firma BD Biosciences (CBA Flex Sets, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) verwendet.

Das Prinzip dieser Methode beruht auf mit Antikörpern beschichteten Latexpartikeln. Diese „Beads“ sind spezifisch für jedes Zytokin und unterscheiden sich sowohl in der Größe, als auch in der Eigenfluoreszenz. Mit Hilfe dieser Eigenschaften können die verschiedenen Bead-Populationen nach der Messung aufgetrennt werden. Nach der Zugabe der Proben bzw. der Standards binden die spezifischen Zytokine an den Beads und ein zweiter spezifischer mit Phycoerythrin (PE) konjugierter Antikörper wird hinzugegeben. Durch die Intensität der PE-Fluoreszenz der gebundenen sekundären Antikörper können die Konzentrationen der verschiedenen Zytokine berechnet werden. Für die Standards der Zytokine wurden zehn Verdünnungen verwendet, die einen Bereich von 0-2500 pg/ml abdecken. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers und wurde an

einem Durchflusszytometer (BD Accuri C6, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) realisiert. Zur Auswertung wurden Accuri CFlow Software (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) und FCAP Array (FCAP Array v3.0, Soft Flow, St. Louis Park, USA) verwendet.

3.2 Zellkulturmethoden

3.2.1 Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zelllinien

Um Zelllinien zu archivieren und stets auf junge Zellpassagen zurückgreifen zu können, können Zellen kryokonserviert werden. Um eukaryotische Zellen zu konservieren, wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin-EDTA (PAA) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und mittels Zentrifugation bei 1000 xg für 5 min bei 4°C pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet im vorgekühlten Kryokonservierungsmedium, bestehend aus FCS (PAA) und 10 % DMSO (Sigma-Aldrich) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden in Kryokonservierungscontainer „Mr. Frosty“ bei -80°C eingefroren, welche mit Hilfe von Isopropanol, ein langsames und kontrolliertes Einfrieren der Zellen, ermöglicht. Nach 16-24 h wurden die gefrorenen Zellen in den Kryoröhrchen in der Gasphase flüssigen Stickstoffs gelagert.

Um eingefrorene, archivierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und langsam im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Das aufgetaute, noch kühle Kryokonservierungsmedium mit den enthaltenen Zellen wurde mit aufgewärmtem Zellkulturmedium versetzt und bei 1000 xg für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen im aufgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 16-24 h wurden die DMSO Resten durch frisches Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen bis zu einer Konfluenz von 90-100 % bei 37°C, 5 % CO₂ und 96 % rH inkubiert.

3.2.2 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Wenn die Zellen eine 90-100 % Konfluenz erreicht haben, wurden sie weiter passagiert. Das Medium wurde abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden mit 1x PBS (Sigma-Aldrich) gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA (PAA), für 15-20 min bei 37°C, 5 % CO₂ und 96 % rH inkubiert bis die Zellen sich vollständig voneinander und vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst hatten. Nach dem Ablösen der Zellen vom Zellboden wurde das Trypsin-EDTA (PAA) durch FCS-haltiges Wachstumsmedium inaktiviert, darin resuspendiert und die Zellsuspension in einem definierten Verhältnis geteilt. Als Wachstumsmedium für MDCK-Zellen wurde MEM-Zellkulturmedium (Sigma-Aldrich) mit jeweils 10 % FCS, 1 % Penicillin und Streptomycin und 1 % L-Glutamin verwendet. Eine entsprechende Verdünnung der Zellen wurde dann in ein neues Kulturgefäß transferiert und mit Wachstumsmedium versetzt.

3.3 Virologische Methoden

3.3.1 Virusanzucht in eukaryotischen Zellen

In diese Arbeit wurde ein Influenzavirusisolat humanen Ursprungs verwendet. Um dieses Virus im Kontext von akutem Asthma bronchiale zu untersuchen, wurde ein Arbeitsstock hochgezogen. Um adaptive Mutationen zu minimieren, wurde das Virus im Säugerzellen hochgezogen. In dieser Arbeit wurden MDCK Zellen dafür verwendet.

Die MDCK Zellen wurden einen Tag vor der Infektion in 75 cm² Kulturflaschen so passagiert, dass am darauffolgenden Tag eine Konfluenz der Zellen von 90 % erreicht wurde. Die adhärennten Zellen wurden im nächsten Schritt zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit einer Virusverdünnung in 5 ml MDCK Infektionsmedium überlagert. Als Infektionsmedium für MDCK-Zellen wurde MEM-Zellkulturmedium (Sigma-Aldrich) mit jeweils 0,2 % Albumin Lösung, 1 % Penicillin und Streptomycin und 1 % L-Glutamin verwendet. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂ und 96 % rH, wobei alle 10 min die Zellkulturflasche zur optimalen Verteilung des Virus auf den Zellen, geschwenkt wurde. Im Anschluss erfolgten die Entfernung des Inokulums und eine Zugabe von MDCK Infektionsmedium mit 1µg/ml TPCK-Trypsin (Sigma-Aldrich). Das TPCK-Trypsin ist für Influenzaviren mit monobasischer Spaltstelle notwendig, da diese exogene Protease zur Spaltung des HA0 in die Untereinheiten HA1 und HA2 benötigt wird. Dies erlaubt multiple Replikationszyklen und somit eine effiziente Virusvermehrung in den infizierten Zellen. Die infizierten Zellen wurden bei den oben genannten Bedingungen inkubiert, bis ein Zytopathischer Effekt (CPE) von etwa 80 % sichtbar war. Um zu überprüfen, ob Viruspartikel im Überstand vorhanden sind, wurde einen Hämagglutinationstest (HA-Test) (Kapitel 3.3.3) durchgeführt. Wenn der HA-Titer hoch genug war, wurde der virushaltige Überstand der infizierten Zellen anschließend bei 1000 xg und 4°C für 5 min zentrifugiert um Zelltrümmer zu entfernen. Es folgte das Aliquotieren in Kryoröhrchen (à 200 µl) und die Einlagerung des neugewonnenen Virusstocks bei -80°C. Zur Bestimmung der Anzahl der infektiösen Viruspartikel wurde der Virustiter nach einmaligem Einfrieren mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen bestimmt (Kapitel 3.3.4). Diese Methode zur Anzucht von IAV in eukaryotischen Zellen wurde modifiziert nach Gaush *et al.* durchgeführt (147).

3.3.2 Gewinnung von Erythrozyten aus Hühnervollblut

Für die Aufreinigung der Erythrozyten aus Hühnervollblut erfolgte eine Versetzung des Hühnervollbluts mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung und eine 5-minütige Zentrifugation zur Auftrennung der Blutbestandteile bei 1000 xg bei 4°C. Es folgte jeweils eine Abtrennung des Blutüberstands, bestehend aus Serum und der Leukozyten- und Blutplättchenhaltigen Interphase, von den Erythrozyten. Das Serum und die Interphase wurden dabei nach dem

initialen Waschschrift mit 0,9 % NaCl verworfen. Die Waschschriffe wurden wiederholt, bis nach der Zentrifugation keine Interphase mehr sichtbar und der NaCl Überstand frei von Erythrozytentrümmern und hämolysierten Erythrozyten waren. Nach Entfernung des kompletten Überstandes erhielt man so eine 100 %-ige Erythrozytenlösung, die als Stammlösung für weitere Experimente verwendet wurde. Die 100 %-ige Erythrozytenlösung wurde zur Verwendung auf 1 % mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnt.

3.3.3 Hämagglutinationstest (HA-Test)

Influenzaviren besitzen die Fähigkeit an Erythrozyten zu binden. Dies geschieht aufgrund einer spezifischen Bindung des viralen Hämagglutinins (HA) an terminale Sialinsäuren auf Glykokonjugaten der Erythrozytenoberfläche. Aufgrund mehrfacher Bindungsmöglichkeiten eines Viruspartikels an Erythrozyten entsteht eine Quervernetzung der Viren mit den Erythrozyten (Hämagglutination). Mit Hilfe zunehmender Virusverdünnungen bei gleichbleibender Erythrozytenkonzentration lassen sich daher quantitative Aussagen über die Anzahl hämagglutinierender Partikel treffen. Der Titer der Hämagglutinationseinheit (HAU-Titer, *hemagglutination unit*) ist der reziproke Wert der Verdünnungsstufe bei der gerade noch eine Hämagglutination der Erythrozyten erkennbar ist. Mit Hilfe des HA-Tests lässt sich jedoch keine Unterscheidung zwischen infektiösen und nichtinfektiösen Partikeln oder Membrantrümmern treffen, da alle zur Hämagglutination beitragen. Ist kein HA in der Suspension enthalten, sedimentieren die Erythrozyten.

Der Hämagglutinationstest (HA-Test) wurde in 96-Vertiefungsplatten mit einem v-förmigen Boden durchgeführt. Zur Durchführung des HA-Tests wurden 50 µl 1x PBS in alle Vertiefung vorgelegt, außer in die erste Vertiefung. Aus 100 µl der unverdünnten Probe wurde in der jeweils ersten Vertiefung eine zweifach-Verdünnungsreihe erstellt. Danach wurden, ausgehend von der höchsten Verdünnungsstufe, in alle Vertiefungen 50 µl einer 1 %-igen Hühnererythrozytensuspension pipettiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis (max. 1 h) wurde der HAU-Titer bestimmt. Das virale Oberflächenprotein NA, welches eine Spaltung der HA-Rezeptorbindung katalysieren würde, ist bei 4°C nicht aktiv. Eine Hämagglutination war durch die gleichmäßige Verteilung der Erythrozyten zu erkennen, während nicht-agglutinierte Erythrozyten sedimentierten und distinkte Punkte (sog. "Knöpfchen") am Boden der Vertiefung bildeten.

3.3.4 Virustiterbestimmung von Virusstocks, Organhomogenisaten oder Broncho-alveolärer Lavage mittels Plaquetest

Zur Titerbestimmung infektiöser Viruspartikel in einer Virussuspension wird ein Plaquetest mit semi-viskosem Overlay verwendet (modifiziert nach Matrosovich *et al.*, 2006). MDCK Zellen wurden am Vortag in 6-Vertiefungsplatten, 1:3 ausgesät. Für die Titerbestimmung

Methoden

wurde eine 10-fach Verdünnungsreihe der Probe in PBS verwendet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit jeweils 333 µl der zu bestimmenden Virussuspension inokuliert. Es folgte eine Inkubation von 30 min bei 37°C im CO₂-Inkubator. Um das Austrocknen der Zellen zu verhindern wurden die Platten alle 10 min geschwenkt. Nach der Inkubation wurden 3 ml Avicel-*Overlay*-Medium versetzt mit 1 µg/ml TPCK-Trypsin (Sigma-Aldrich) in jede Plattenvertiefung gegeben. Das TPCK-Trypsin wird für die erfolgreiche Spaltung der HA dazugegeben. Die Kulturplatten wurden für 72 h bei 37°C im CO₂-Inkubator, ohne diese zu bewegen, inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde das Überlagerungsmedium entfernt und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und zur Fixierung für 30 min bei 4°C mit 4 %-igem PFA überschichtet. Detektiert werden Löcher, sogenannte Plaques im Zellrasen, diese gehen von infizierten Zellen während der Inokulation aus.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Virustiter mittels Immunfärbung des viralen NP Proteins bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und für 30 min mit 0,3 % Triton-X auf einem Wippschüttler permeabilisiert. Anschließend folgte eine Inkubation mit 500 µl Erstantikörper, ein Anti-NP Antikörper (Abcam), pro Vertiefung, bei RT für ca. 1 h auf einem Wippschüttler. Nach drei Waschschritten mit PBS-Tween (0,05 %) wurde für eine weitere Stunde mit 500 µl Zweitantikörper, ein Anti-Maus-IgG HRP-gekoppelter Antikörper (SouthernBiotech), einem Wippschüttler inkubiert. Beide Antikörper wurden für diese Arbeit mit einer Verdünnung von 1:1000 in Superblock-Puffer eingesetzt. Die Detektion erfolgte nach zwei Waschschritten mit dem HRP-Substrat enthaltenden True-Blue (KPL). Zur Berechnung des Titers in *plaque forming units* pro Milliliter (p.f.u./ml) werden die Plaques ausgezählt und die jeweiligen Verdünnungen einberechnet. Dabei wurde jeweils die letzte Vertiefung der Zellkulturplatte ausgewertet, in der noch Plaques zu detektieren waren.

3.4 Tierversuche

In der vorliegenden Arbeit wurde das Tiermodell der Maus verwendet. Die Ermittlung der Überlebensrate, des Gewichtsverlustes, des Lungentropismus, sowie die Immunantwort im Mausmodell erlauben einen Rückschluss auf die Auswirkung von *Asthma bronchiale* auf den Krankheitsverlauf einer Influenzavirus Infektion.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden unter Bedingungen der Biologischen Schutzstufe 2 (BSL-2 (*biosafety level 2*)) im Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie (HPI) in Hamburg nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens erfolgte unter der Genehmigungsnummer 27/15 durch die Behörde für Stadtentwicklung und Umwelt Hamburg. Die Tiere erhielten Wasser und Futter *ad libidum*. Die weiblichen C57BL/6J Mäuse

Methoden

im Alter von 6-8 Wochen wurden von Charles Rivers, Sulzfeld, erworben. Zudem wurde allogene 1SB6F1 Mäusen, im Alter von 6 bis 9 Wochen verwendet. Die Generierung der 1SB6F1 Mäuse in dem C57BL/6-Hintergrund erfolgte durch Prof. Dr. M. Bader und Prof. Dr. E. Hartmann (MDC, Berlin-Buch, Deutschland bzw. Institut für Biologie, Universität zu Lübeck, Deutschland). Weibliche und männliche 1SB6F1 Mäuse wurden am HPI in Hamburg gezüchtet. In folgendem Abschnitt werden alle Methoden, aus den *in vivo* Versuchen, beschrieben.

3.4.1 Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung und Infektion mit Influenza

In dieser Arbeit wurde ein *in vivo* Mausmodell für experimentelles akutes Asthma verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Standard-Modell zur Induktion einer allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge in Verbindung mit der Entwicklung einer Atemwegsüberempfindlichkeit (Hyperreaktivität), vermehrten Schleimproduktion und die Sekretion von allergiespezifischen IgE (116).

Voraussetzung für die Induktion einer allergischen Entzündung ist die Sensibilisierung gegenüber einem Fremdprotein. In dieser Arbeit wurde das Protein Ovalbumin (OVA), von Hühnereiern als Modellallergen verwendet. Die Sensibilisierung erfolgte durch drei intraperitoneale (i.p.) Injektionen von 10 µg Ovalbumin Grade VI (Sigma Aldrich) gelöst in 100 µl PBS mit 100 µl des Adjuvans Aluminiumhydroxid (Alum) (Thermo Fisher Scientific) versetzt. Die Mäuse wurden am Tag 1, 14 und 21 gegenüber OVA/Alum sensibilisiert (Abbildung 8).

Zur Etablierung einer lokalen akut-allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge wurden die Versuchstiere an Tag 26, 27 und 28 in einer luftdichten Kammer für 20 Minuten gegenüber einem 1 %-igen OVA-Aerosol (OVA Grade V gelöst in PBS, Sigma Aldrich) exponiert. Die OVA-Lösung wurde von einem Generator (PARI® TurboBoySX, Pari) vernebelt (Abbildung 7).

Methoden

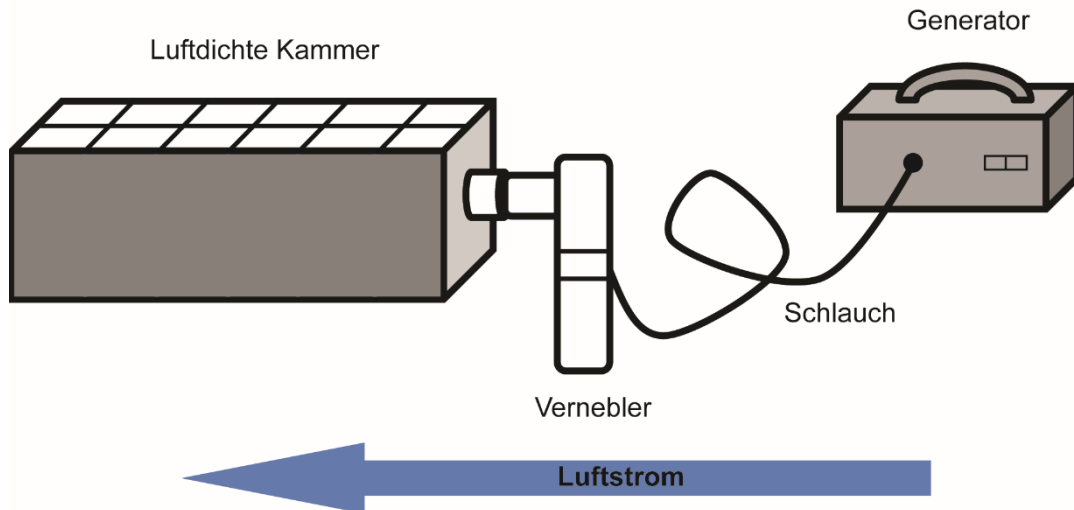


Abbildung 7: Versuchsaufbau zur Etablierung einer lokalen akut-allergischen Entzündungsreaktion im Maus.

Dargestellt ist ein PARI® TurboBoySX Inhalationsgerät, welches einen Luftstrom erzeugt, der durch den Schlauch an einen Vernebler gekoppelt ist. In dem Vernebler befindet sich eine 1 %-ige OVA-Grade V-Lösung. Durch den Luftstrom wird OVA-Aerosol erzeugt, welches direkt in die luftdichte Kammer gepumpt wird. In der luftdichten Kammer können bis zu 12 Mäusen, jede einzeln in einem Kompartiment gesetzt werden. Die Aerosol-Behandlung erfolgt für 20 min (illustriert von Nancy Mounogou Kouassi, 2020).

Durch virale Infektionen ausgelöste Exazerbationen zeichnen sich durch eine erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten in der Lunge aus und stehen unter Verdacht, einen schwereren Asthma Krankheitsverlauf auszulösen. Um diese Einfluss zu untersuchen, wurden die Tiere an Tag 29 (24 Stunden nach der letzten Antigenexposition) mit einem 2009 pandemischen H1N1 Virusisolat (A/Hamburg/NY1580/09) intranasal (i.n.) (Kapitel 3.4.1) infiziert oder erhielten als Kontrolle PBS intranasal (Abbildung 8).

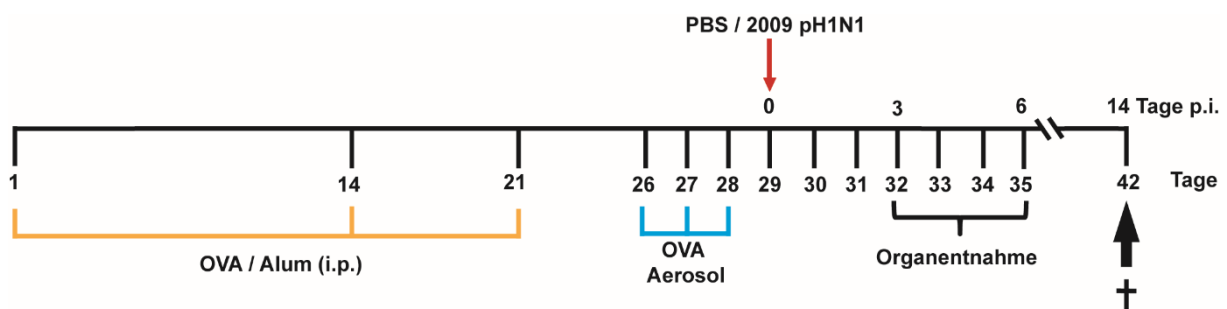


Abbildung 8: Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung und anschließender Influenzavirus Infektion.

Mäuse wurden durch drei intraperitoneale (i.p.) Injektionen des Modellallergens Ovalbumin/Aluminiumhydroxid (OVA/Alum) an Tag 1, 14 und 21 sensibilisiert. Anschließend folgte eine Exposition gegenüber einer 1 %-igen OVA-Aerosollösung an Tag 26, 27 und 28. Kontroll-Mäuse wurden gegenüber PBS sensibilisiert. Die Tiere wurden an Tag 29 mit dem 2009 pH1N1 (A/Hamburg/NY1580/09) Influenzavirus infiziert oder erhielten als Kontrolle PBS intranasal (i.n.). Über einen Zeitraum von 14 Tagen nach der Infektion wurden Gewichtsverlust, Überleben sowie Krankheitssymptome beobachtet und protokolliert. An Tag 3 und 6 nach der Infektion (p.i.)

Methoden

wurden zudem für nachfolgende Analysen die Mäuse euthanasiert, Organe entnommen und BAL gewonnen (illustriert von Nancy Mounogou Kouassi, 2020).

3.4.2 Narkotisieren und Euthanasie von Mäusen

Für die Infektion (Kapitel 3.4.1) von Mäusen wurde eine Anästhesie-Lösung mit 100 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin in 200 µl 0,9 %-iger NaCl-Lösung mittels einer 26G Kanüle intraperitoneal injiziert. Zuvor wurden den Tieren eine Inhalationsnarkose mit Isofluran mit Hilfe eines Isofluran Verdampfers (UNO) verabreicht.

Die finale Blutentnahme und die Entnahme von Organen erfolgten erst nach Tötung der Versuchstiere (Kapitel 3.4.4.1). Das Töten der Mäuse wurde mit zervikaler Dislokation, mittels Überstrecken durchgeführt, dieser ging zusätzlich eine Inhalationsnarkose mit Isofluran voraus.

Für die Durchführung der Bronchoalveolären Lavage (Kapitel 3.4.4.2) wurden die Tiere final geblutet. In diesem Fall war eine Tötung durch zervikale Dislokation nicht möglich aufgrund des benötigten Luftröhrenschnitts (Tracheotomie).

Erreichten die Tiere einen Gewichtsverlust von mehr als 25 % des Ausgangsgewichts oder wenn ein Tier offensichtliche Schmerzen hatte und/oder nicht mehr selbstständig fressen/trinken konnte, wurden die Tieren einer Inhalationsnarkose mit Isofluran unterzogen und anschließend mit zervikaler Dislokation mittels Überstrecken getötet.

3.4.3 Intranasale Infektion und Kontrolle des Gewichtsverlustes und des Überlebens der Mäuse

Für die intranasale Infektion mit Influenzaviren wurden die Tiere mit einer Anästhesie-Lösung (Kapitel 3.4.2) narkotisiert. Nach ca. 20 bis 30 min in tiefer Narkose wurden die Tiere mit 50 µl einer in 1x PBS verdünnten definierten Virusmenge intranasal infiziert. Kontrolle Tieren wurden intranasal 50 µl PBS verabreicht. Das Inokulum wurde langsam mit einer 100 µl Pipette (Eppendorf) über die Nasenlöcher den narkotisierten Tieren verabreicht. Die Atemfrequenz der infizierten Mäuse wurde überwacht und die Mäuse wurden in Narkose in eine stabile seitliche Position mit leicht erhöhtem Kopf gelagert, um ein Herauslaufen des Inokulums zu verhindern. Nach der Infektion wurden die Tiere über einen Zeitraum von 14 Tage täglich kontrolliert und gewogen. Gewichtsverlust, Überleben sowie Krankheitssymptome wurden beobachtet und protokolliert.

3.4.4 Gewinnung von Probenmaterial

In dieser Arbeit wurden verschiedene Proben für die Untersuchung der Auswirkung von Asthma bronchiale auf den Krankheitsverlauf einer Influenzavirus Infektion aus den Tieren entnommen. Serum Proben wurden für die IgE Antikörper Analyse verwendet. Lungen Proben wurden für Lungentropismus, Titerbestimmung, sowie für die Konzentrationsbestimmung von bestimmten Zytokinen verwendet. Zusätzlich wurden für die Analyse der Immunantwort, Bronchoalveoläre Lavage gewonnen.

3.4.4.1 Blutentnahme, Organentnahme

Während der durchgeführten Versuche wurden die Mäuse final geblutet. Nach einer Isoflurannarkose wurde retrobulbär (r.b.), mittels einer Kapillare, Blut entnommen und in EDTA-Röhrchen aufgefangen. Das Vollblut wurde bei 4°C für 10 min bei 1500 xg zentrifugiert, das überstehende Blutserum aliquotiert und für spätere Untersuchungen bei -80°C eingefroren. Nach der Blutentnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation euthanasiert und die Mäuse durch einen longitudinalen Schnitt die Bauch- und Brusthöhle geöffnet und Lunge entnommen. Der linke Lungenflügel wurde für histologische Untersuchungen (Kapitel 3.5) in 4 % PFA fixiert und gelagert. Der rechte Lungenflügel wurde zerkleinert und in zwei Röhrchen mit Schraubverschluss, gefüllt mit Glaskügelchen bei -80°C eingefroren. Diese Organproben wurden vor dem Einfrieren gewogen und nach dem Homogenisieren in PBS für die Virustiter-Bestimmung (Kapitel 3.3.4) oder für die Konzentrationsbestimmung von Zytokinen (Kapitel 3.1.4) verwendet.

3.4.4.2 Bronchoalveoläre Lavage

Bei einer Bronchoalveolären Lavage (BAL) werden Zellen, die in das bronchoalveoläre Lumen infiltriert sind, und die sich in diesem Kompartiment befindlichen Proteine herausgespült. Um die BAL durchzuführen, wurden die Tiere durch eine Isofluran-Narkose Überdosis getötet und die Trachea wurde freigelegt. Durch einen kleinen Schnitt wurde eine Trachealkanüle mit 1 mm Durchmesser (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus) eingeführt und mit Garn an der Trachea befestigt. Anschließend wurde ein Schlauch (Multifly Set (21G x 3/4", 0,8 x 19 mm), SARSTEDT) mit *Luer-Lock*-Verbindung an der Trachealkanüle befestigt. Am Vortag wurde eine Lösung mit einer Protease-Inhibitor Tablette in 100 ml PBS hergestellt und bei -4°C gelagert.

Über diese Kanüle wurde 1 ml eiskaltes PBS mit einem Protease-Inhibitor (*Complete*, Roche) in die Lunge injiziert und direkt wieder entnommen. Die BAL-Flüssigkeit wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die BAL-Flüssigkeit wurde gewogen und die Menge protokolliert. Nach der gesamten Zellzahlbestimmung (Kapitel 3.4.6) wurde die BAL für 5 min bei 500 xg und 4°C zentrifugiert und der zellfreie Überstand abgenommen. Der zellfreie

Überstand wurde bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert und die BAL-Zellen bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

3.4.5 Herstellung von Lungenhomogenisaten

Um die Virustiter in den Lungen infizierter Mäuse zu bestimmen, wurde ein Drittel der Lungen gewogen und zerkleinert und bei -80°C in Röhrchen mit Dichtungsringen mit eingefüllten Glaskügelchen eingefroren. Nach dem Auftauen des Organs wurde 1 ml 1x PBS zugegeben. Es folgte eine Homogenisierung der Organe in einer Labormühle bei 20 Hz und 4°C für 10 min. Anschließend wurden die Homogenisate bei 3000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert um Organteile zu pelletieren. Die neu generierten Überstände der Homogenisate wurden direkt für eine Bestimmung des Virustiters im Plaquetest verwendet (Kapitel 3.3.4), verbleibende Homogenisate wurden für eventuelle Wiederholungsversuche bei -80 °C gelagert.

3.4.6 Gesamte Zellzahlbestimmung im Bronchoalveoläre Lavage

Sowohl eine Influenzavirus Infektion als auch bronchiales Asthma sind in der Lage eine massive Zellinfiltration in der Lunge zu verursachen. Um diese zelluläre Infiltration zu untersuchen, wurde eine Bronchoalveoläre Lavage der Lungen der Tiere durchgeführt (Kapitel 3.4.4.2). Es wurden 10 µl der BAL-Flüssigkeit, 1:1 mit Trypanblau versetzt und davon 10 µl in eine Dual Objektträger Zählkammer (*cell counting slides*, Biorad) gegeben. Die gesamte Zellzahl, sowie die lebende Zellzahl wurden durch einen automatischen Zellzähler (BioRad) gezählt.

3.4.7 Anti-IgE Antikörper Behandlung in asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen

Um den Effekt von Immunglobulin E auf den Influenza Krankheitsverlauf im Mäusen zu untersuchen, wurden in weiblichen C57BL/6 Mäusen Asthma bronchiale nach Protokoll induziert und die Mäusen an Tag 29 mit 10^3 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert oder erhielten als Kontrolle PBS intranasal (Kapitel 3.4.1 und 3.4.3). Die Antikörper Behandlung erfolgte durch vier i.p. Injektion von 100 µg Antikörper gelöst in PBS. Die infizierten asthmatischen Mäuse erhielten i.p. am Tag 29, 30, 31 und 32, 100 µg anti-IgE Antikörper Lösung und die Asthma-Kontrolle Tieren, 100 µg des monoklonal Isotypkontrolle Antikörpers. Nach der Infektion und während der Zeit der Behandlung wurden die Tiere über einen Zeitraum von 14 Tage täglich kontrolliert und gewogen. Gewichtsverlust, Überleben sowie Krankheitssymptome wurden beobachtet und protokolliert.

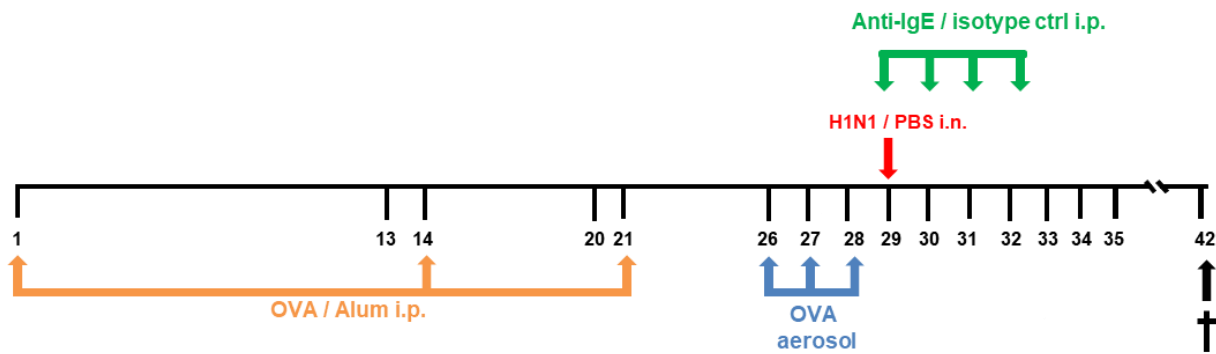


Abbildung 9: Protokoll zur Behandlung mit anti-IgE Antikörper in weiblichen asthmatischen C57BL/6 Mäusen

Asthma wurde in weiblichen C57BL/6 Mäusen nach Protokoll (Kapitel 3.4.1) induziert. Kontroll-Mäuse wurden gegenüber PBS sensibilisiert. Die Tiere wurden an Tag 29 mit dem 2009 pH1N1 (A/Hamburg/NY1580/09) Influenzavirus infiziert oder erhielten als Kontrolle PBS intranasal (i.n.). Die infizierten asthmatischen Mäuse erhielten an 4 Tage, vier intraperitoneale (i.p.) Injektionen des anti-IgE Antikörper und die asthmatische Isotypkontrolle Tieren erhielten Isotyp-Kontroll Antikörpern. Über einen Zeitraum von 14 Tagen nach der Infektion wurden Gewichtsverlust, Überleben sowie Krankheitssymptome beobachtet und protokolliert.

3.5 Histologische Methoden

Um den Effekt einer Influenzavirus Infektion auf die Lungenpathogenese von asthmatischen Mäusen zu untersuchen, wurden aus den entnommenen Lungen Gewebeschnitte angefertigt. Es wurde eine Hämatoxylin-Eosin- (HE), eine Perjodsäure-Schiff- (PAS), sowie eine immunhistochemische (IHC-P) Färbung durchgeführt. Die Aufnahmen der gefärbten Gewebeschnitte wurden mit Hilfe des Durchlichtmikroskop NIKON® *Eclipse 80i live* mit weit Feld gemacht. Die Bearbeitung der Bilder fand mit Adobe® *Photoshop*® CS6 (64 bit) statt.

3.5.1 Präparation von Gewebeschnitten

Die Fixierung der Gewebeproben erfolgte für mindestens zwei Wochen bei 4°C. Nach der vollständigen Fixierung der Gewebeproben von Mäusen in 4 % PFA, wurden die Proben in Paraffin eingebettet. Vor dem Einbetten wurden die Proben in 1x PBS gelagert, um den Proben das PFA zu entziehen. Die fixierten Lungen wurden in einem Gewebeeinfiltrationsautomaten mit aufsteigenden Konzentrationen Ethanol inkubiert, gefolgt von einer Xylol Behandlung, um die Proben zu entwässern. Im Anschluss wurden die Proben mit Paraffin infiltriert. Die verwendeten Schritte wurden wie folgt aufgeführt:

- Ethanol, 70 % für 1 h, bei RT
- Ethanol, 80 % für 1 h, bei RT
- Ethanol, 90 % für 1 h, bei RT
- Ethanol, 95 % für 1 h, bei RT

Methoden

- Ethanol, 100 % für 1 h, bei RT
- Ethanol, 100 % für 1,5 h, bei RT
- Xylol I für 1 h, bei RT
- Xylol II für 1 h, bei RT
- Paraffin Typ 3 für 1 h, bei 58°C
- Paraffin Typ 3 für 1 h, bei 58°C
- Paraffin Typ 3 für 1 h, bei 58°C

Nachfolgend wurden die Gewebeprobe in Paraffin eingebettet. Die Einbettung wurde mit Hilfe einer Paraffinausgießstation durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine Lagerung der Paraffinblöcke bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln bei RT. Um die Paraffinblöcke in Dünnschnitte weiterzuverarbeiten, wurden diese auf einer Kühlplatte für etwa 30 min auf ungefähr -12°C abgekühlt. Dies ermöglichte das Schneiden der Paraffinblöcke in 4 µm dicke Dünnschnitte. Die Herstellung der Schnitte erfolgte am Mikrotom, wobei die Gewebeschnitte direkt nach dem Schneiden zur Ausbreitung in ein Wasserbad mit 42°C überführt wurden. Anschließend wurden die Gewebeschnitte auf einen Objektträger aufgenommen und bei 37°C über Nacht getrocknet.

3.5.2 Entparaffinierung und Rehydrierung von FFPE-Gewebeschnitten

Die Schnitte auf den Objektträgern können bei RT bis zur Färbung gelagert werden und werden als FFPE-Gewebeschnitte (*formalin-fixed paraffin-embedded*) bezeichnet.

Vor einer histochemischen oder immunhistochemischen Färbung wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert und rehydriert. Dies wird mittels Xylol und absteigenden Alkoholkonzentrationen durchgeführt. Diese Schritte wurden nachfolgend durchgeführt:

- Paraffin Schnitte erhitzen im Brutschrank bei 56°C, für 25 min
- Xylol I, für 5 min, bei RT
- Xylol II, für 5 min, bei RT
- Ethanol I, 100 %, für 5 min
- Ethanol II, 100 %, 10x eintauchen
- Ethanol, 95 %, 10x eintauchen
- Ethanol, 90 %, 10x eintauchen
- Ethanol, 80 %, 10x eintauchen
- Ethanol, 70 %, 10x eintauchen
- Ethanol, 50 %, 10x eintauchen
- ddH₂O, für 2 min
- ddH₂O, für 2 min

3.5.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE)

Um unter dem Mikroskop zwischen Zellkern und Zytoplasma der einzelnen Zellen unterscheiden zu können, wurden Gewebeproben mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Das Hämatoxylin färbt hierbei saure und basophile Bausteine der Zelle, wie den Zellkern und das raue Endoplasmatische Retikulum blau bis violett an. Das Eosin hingegen ist in der Lage basische, auch genannt eosinophile Zellstrukturen, wie das Zytoplasma, Mitochondrien und das glatte Endoplasmatische Retikulum, rot zu färben. Die HE-Färbung wurde in den entparaffinierten FFPE-Gewebeschnitten durchgeführt. Die Schritte der durchgeführten Färbung sind nachfolgend beschrieben:

- H₂O, doppelt destilliert (dd) für 2 min
- Hämatoxylinlösung für 4 min
- fließendes Leitungswasser für ca. 10 s
- Lösung bestehend aus 97% Ethanol mit 3% HCl für 10 s
- fließendes Leitungswasser für 5 min
- Eosin-Lösung für 25 s

Nach der HE-Färbung, folgte eine Entwässerung der Proben mit Ethanol und Xylol. Die durchgeführten Schritte der Entwässerung von Gewebeproben sind nachfolgend beschrieben.

- Ottix Shaper, I 10x für wenige Sekunden eintauchen
- Ottix Shaper, II 10x für wenige Sekunden eintauchen
- Ottix Shaper, III 10x für wenige Sekunden eintauchen
- Ottix Shaper, IV für 5 min
- Ottix Plus, I 10x für wenige Sekunden eintauchen
- Ottix Plus, II 10x für wenige Sekunden eintauchen
- Ottix Plus, III 10x für wenige Sekunden eintauchen
- Ottix Plus, IV 10x für wenige Sekunden eintauchen
- Xylol 10x eintauchen,
- Xylol 10 min inkubieren

Es folgte eine Eindeckelung der Gewebeschnitte mit Eukitt und eine Lagerung bei RT im Dunkeln bis die Dünnschnitte mikroskopisch ausgewertet wurden.

3.5.4 Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS)

Das Prinzip dieser Färbung ist, dass die im Mukus vorkommenden 1,2 Glykole in unsubstituierten Polysacchariden, neutralen Mukopolysacchariden, Muko- und Glykoproteinen durch die Behandlung mit Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert werden. Diese Aldehydgruppen führen in Verbindung mit Schiffs-Reagenz zu einer Magenta-

Methoden

leuchtenden Farbreaktion. Dadurch lassen sich diese Mukusbestandteile spezifisch anfärben. Mit Hilfe der Perjodsäure-Schiff-Färbung (Sigma-Aldrich) lässt sich in den Atemwegen also eine Mukusproduktion nachweisen. Als Gegenfärbung wurde bei diesen Schnitten eine in Kapitel 3.5.3 beschriebene Hämatoxylin-Färbung durchgeführt. Die verwendeten Schritte wurden wie folgt durchgeführt:

- Perjodsäure-Lösung (Sigma-Aldrich 395-1), für 10 min, bei RT
- ddH₂O, für 5 min
- Schiffsreagenz-Lösung (Sigma-Aldrich 395-2016), für 20 min, bei RT
- Fließendes, warmes Leitungswasser für 5 min
- Hämatoxylin für 60s, bei RT
- fließendes Leitungswasser für 5 min

Nach der Färbung wurden die Schnitten mit Ottix Plus und Xylol dehydriert. Die durchgeführten Schritte der Entwässerung von Gewebeproben sind nachfolgend beschrieben:

- Ottix Plus, für 2 min
- Xylol I, für 5 min
- Xylol II, für 5 min

Nachdem die Schnitte an der Luft getrocknet waren, wurden sie Eukitt eingedeckelt und im Dunkeln bei RT bis die Dünnschnitte mikroskopisch ausgewertet wurden, gelagert.

3.5.5 Immunhistochemische Färbung (ICH-P)

Eine immunhistochemische Färbung ermöglicht eine Aussage über den Virustropismus in den Lungen von asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen, die mit dem 2009 pH1N1 IAV infiziert wurden. Die Detektion von virusinfizierten Zellen wurde in diese Arbeit in FFPE-Lungengewebeschnitten mittels immunhistochemischer Färbung durchgeführt. Um das IAV in den Schnitten nachweisen zu können, wurden entparaffinierte und dehydrierte Gewebeschnitte (Kapitel 3.5.2) verwendet..

Diese Schnitten wurden anschließend mit einem Citrat Plus Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, um einer Demaskierung des viralen Antigens zu gewährleisten.

Die verwendeten Programme waren die Folgenden:

- 16 min bei 850 Watt in der Mikrowelle
- 5 min bei 450 Watt in der Mikrowelle in einem *Citrat Plus Puffer*
- etwa 20 min Abkühlungszeit
- 5 min in 1x PBS waschen

Methoden

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase, welche zu einer hohen DAB-Hintergrundfärbung führen kann, wurden die Gewebeschnitte einer Methanolbehandlung mit 3 % H₂O₂ für 5 min bei RT unterzogen. Es folgte ein Waschschrift in 1x PBS für 5 min. Anschließend wurden das Avidin und Biotin, mittels Verwendung eines Avidin/Biotin Blocking Kits (Szabo-Scandic) für 15 min bei RT geblockt. Es folgten drei Waschschrift in 1x PBS für 5 min bei RT.

Die Gewebeschnitte wurden mit dem Primärantikörper, Kaninchen anti-NP (Thermo Fischer, PA5-32242), welcher 1:2000 in 1x PBS verdünnt wurde, für 75 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, anti-Kaninchen (Jackson ImmunoResearch, 711-066-152) inkubiert. Der Antikörper wurde dabei 1:200 in 1x PBS mit 2 % Eseserum verdünnt.

Anschließend wurden die Proben mit dem ZytoChemPlus (HRP) Broad Spectrum (DAB) Kit für 15 min bei RT inkubiert, um die Bindung des Streptavidin-HRP-Konjugats an den biotinylierten Sekundärantikörper zu gewährleisten. Die Gewebeschnitte wurden dreimal mit 1x PBS für 5 min bei RT gewaschen. Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers auszuschließen, erfolgte eine Inkubation mit 10 % Eseserum für 30 min bei RT. Die indirekte, immunhistochemische Färbung des viralen Antigens erfolgte durch die Zugabe des HRP-Substrats, 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Reaktion nach circa 5 min mit ddH₂O gestoppt. Um die lichtmikroskopische Untersuchung zu verbessern, wurde eine Hämatoxylin Gegenfärbung (Kapitel 3.5.3) durchgeführt. Die Objektträger wurden anschließend mit Eukitt eingedeckelt und im Dunkel bei RT gelagert.

3.6 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen der Daten erfolgten mit Hilfe der kommerziellen Statistiksoftware *GraphPad Prism* v.5.03 für Windows (Graphpad Software, Inc.) Eine statistische Signifikanz lag vor, wenn der p-Wert $\leq 0,05$ war. Die weitere Klassifizierung der statistischen Signifikanz wurde wie folgt gekennzeichnet: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Statistisch signifikante Unterschiede in den Überlebensraten zwischen nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen (Kapitel 3.4.3) wurden mittels Log-Rank (Mantel-Cox)-Test und den Daten der Kaplan-Meier-Überlebenskurven mit Hilfe von *GraphPad Prism* v.5.03 berechnet.

Die statistischen Signifikanzen aller restlichen Daten dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Student's-t-Tests unter Verwendung von *GraphPad Prism* v.5.03 ermittelt.

4 Ergebnisse

Alle nachfolgenden Ergebnisse wurden im Zuge der vorliegenden Doktorarbeit generiert. Die Ergebnisse wurden in drei verschiedene Kapitel unterteilt. Das erste Kapitel stellt die Etablierung eines weiblichen Asthma Mausmodells vor, um den Einfluss von Asthma auf den Krankheitsverlauf von Influenza zu untersuchen, das zweite Kapitel beschreibt die geschlechtsspezifischen Unterschiede, hinsichtlich der Pathogenese von Influenza im Asthma Mausmodell. Im letzten Kapitel wurde die Genexpression der Lungen, in zwei Mausmodellen von weiblichen asthmatischen Mäusen verglichen.

4.1 Etablierung eines weiblichen Asthma Mausmodells zur Untersuchung des Krankheitsverlaufs von Influenza

Während der H1N1 Influenzapandemie von 2009 war Asthma eine der am häufigsten beobachteten Komorbiditäten von Patienten, die während der Pandemie hospitalisiert wurden (148). Jedoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen, die zu dieser Beobachtung führen und das gegenseitige Wechselspiel von Asthma bronchiale und Influenzavirus Infektion, bis heute nur unzulänglich verstanden. Bisherige publizierte Asthma Mausmodelle zeigten einen protektiven Effekt von Asthma auf den Influenza Krankheitsverlauf, welches den klinischen Daten aus der H1N1 Influenzapandemie von 2009 widerspricht (Kapitel 1.1.6.4). Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Entwicklung und Etablierung eines geeigneten Tiermodells zur Untersuchung von Asthma bronchiale nach IAV Infektion, welches die klinischen Befunde widerspiegelt.

In dieser Arbeit wurden zwei weibliche Asthma Mausmodelle etabliert. Zum einen wurden weibliche C57BL/6 Mäuse verwendet, da bereits in vorherigen Untersuchungen von Asthma und Influenza, Inzucht Mausstämme wie BALB/c und C57BL/6 verwendet wurden (116,136). Als zweites Modell, basierend auf den Kenntnissen aus der Schwangerschafts- und Infektionsforschung, welche die wichtige Rolle der Allogenität in der Immunreaktion beschrieben haben (121,122). wurde die F1 Generation aus der Kreuzung von zwei Inzuchtstämmen generiert. Nämlich aus der Kreuzung von 129x1/SvJ Weibchen mit C57BL/6 Männchen. Diese allogene F1 Generation als Nachkommen zweier Inzuchtstämme wird im Folgenden als 1SB6F1 bezeichnet.

In dieser Arbeit wurden für beide Mausmodelle Protokolle für die Induktion eines allergischen Asthma bronchiale in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Borstel etabliert (145,146,147). Die Mäuse wurden gegenüber dem Modellallergen Ovalbumin/Aluminiumhydroxid sensibilisiert und anschließend gegenüber Ovalbumin (OVA)-Aerosollösung exponiert. Um den Einfluss von Asthma auf den Krankheitsverlauf von Influenza zu untersuchen, wurden die Tiere an Tag 29 mit dem 2009 pH1N1 IAV intranasal infiziert (Kapitel 3.4.1) und 14 Tage nach der Infektion wurde Gewichtsverlust und Überleben

protokolliert. Zudem wurden 3 und 6 Tage nach Infektion (p.i.), die Tieren euthanisiert und die Organe für weitere Analysen entnommen.

4.1.1 2009 pH1N1 Pathogenese in weiblichen asthmatischen Mausmodellen

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Auswirkungen von akutem Asthma bronchiale auf den Krankheitsverlauf einer Influenzavirus Infektion in den C57BL/6 und den 1SB6F1 Mausmodellen dargestellt.

4.1.1.1 Das C57BL/6 Modell

Als erstes wurde die Pathogenität und Virulenz des 2009 pH1N1 IAV in weiblichen asthmatischen C57BL/6 Mäusen untersucht. Dafür wurde Asthma bronchiale in weiblichen C57BL/6 Mäusen induziert und die nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen mit verschiedenen Dosen von 2009 pH1N1 IAV intranasal infiziert (Kapitel 3.4.1). Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden Gewichtsverlust und Überleben beobachtet und protokolliert. Die Pathogenität wurde mittels Überlebensraten der Mäuse (Abbildung 10B, D und F) und dem Gewichtsverlust (Abbildung 10A, C und E) dargestellt. In Abbildung 10 sind die Gewichtsverläufe und Überlebensraten von nicht-asthmatischen (2009 pH1N1) und asthmatischen (Asthma/2009 pH1N1) weiblichen C57BL/6 Mäusen, die mit 10^3 p.f.u. (Abbildung 10A und B), mit 10^5 p.f.u. (Abbildung 10C und D) und mit 10^6 p.f.u. (Abbildung 10E und F) des 2009 pH1N1 IAV infiziert wurden, dargestellt. Bei allen Experimenten konnte beobachtet werden, dass die Gewichtskurven von beiden Kontrollgruppen, PBS-Kontrolle und Asthma-Kontrolle über die Zeit ähnlich verlaufen. Die Kontrollgruppe mit asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen zeigte keine Unterschiede sowohl im Gewichtsverlust als auch in der Überlebensrate im Vergleich zu den PBS-Kontrolltieren (Abbildung 10). Hier konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Asthma bronchiale in den weiblichen C57BL/6 Mäusen keinen Einfluss auf den Gewichtsverlauf der Tiere hat. Nach Infektion mit 10^3 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV konnte kein signifikanter Unterschied in den Gewichtsverlusten zwischen infizierten nicht-asthmatischen und asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen gezeigt werden. Es konnte jedoch eine leichte Tendenz beobachtet werden, dass die infizierten nicht-asthmatischen Mäuse (2009 pH1N1) einen höheren Gewichtsverlust im Vergleich zu infizierten asthmatischen Mäusen (Asthma/2009 pH1N1) aufweisen (Abbildung 10A). Jedoch resultierte die Infektion in einer 100%-igen Überlebensrate (Abbildung 10B) sowohl in nicht-asthmatische als auch in asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen.

Ergebnisse

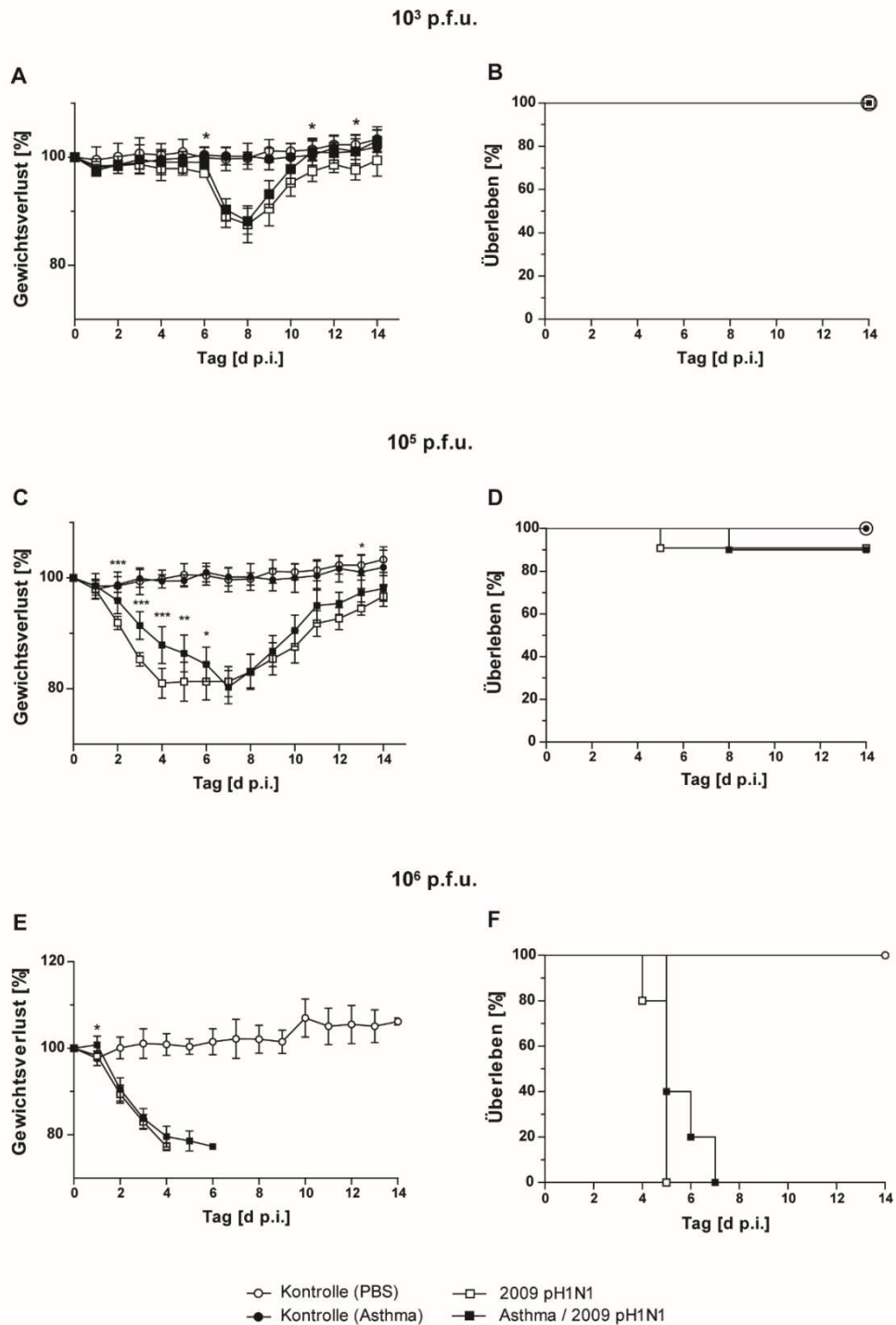


Abbildung 10: Gewichtsverläufe und Überlebensraten in nicht-asthmatischen und asthmatischen C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit verschiedenen Dosen von 2009 pH1N1 IAV.

Weibliche nicht-asthmatische (weißes Quadrat) und asthmatische (schwarzes Quadrat) C57BL/6 Mäuse wurden intranasal mit 10^3 p.f.u. ($n = 5$), 10^5 p.f.u. ($n = 10$) oder 10^6 p.f.u. ($n = 5$) des 2009 pH1N1 IAV infiziert. Gewichtsverläufe (A, C, E) und Überlebensraten (B, D, F) wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen nach der Infektion verfolgt. PBS-Kontrollen und Asthma-Kontroll Mäuse wurden mit PBS behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen, sowie die Gewichtsverläufe mit Standardabweichungen. Die statistische Relevanz der Ergebnisse wurde mithilfe des Student's t-Test in dem Programm GraphPad ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). In der Abbildung A, C und E werden nur die Signifikanz von 2009 pH1N1 vs. Asthma/2009 pH1N1 dargestellt.

Ergebnisse

Bei einer Infektion mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 zeigten die nicht-asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäuse einen höheren Gewichtsverlust als die asthmatischen C57BL/6 Mäuse. Dieser Unterschied im Gewichtsverlust ist an den Tagen 2 bis 4 signifikant und zeigte sich über den gesamte Zeitraum (Abbildung 10C). Zudem zeigte die Infektion eine Letalität von 10 % sowohl in den nicht-asthmatischen als auch in den asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen, aber führte zu einem früheren Tod der nicht-asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäuse am Tag 5 statt in den asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen an Tag 8 (Abbildung 10D). Die höchste Infektionsdosis von 10^6 p.f.u. zeigte in infizierten nicht-asthmatischen und asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen die größten Gewichtsverluste und endete für beide Gruppen zu 100 % letal. Es konnten keine Unterschiede in den Gewichtsverläufen beider Mausgruppen festgestellt werden, jedoch führte die Influenzavirus Infektion zu einem früheren Tod der nicht-asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen (2009 pH1N1) an Tag 5 statt in den asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen (Asthma/2009 pH1N1) an Tag 7 (Abbildung 10E und F). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Asthma in den C57BL/6 Mäusen zu einer niedrigeren Pathogenität nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV führt, im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen.

Basierend aus diesen Beobachtungen wurden für alle weiteren Experimente die Virusdosis 10^5 p.f.u. verwendet, da bei dieser Dosis ein signifikanter Effekt auf die Pathogenität beobachtet werden konnte, jedoch keine 100 % Letalität gezeigt wurde, was eine Organentnahme 3 und 6 Tag nach der Infektion möglich macht.

4.1.1.2 Das 1SB6F1 Modell

Um den Einfluss von Asthma bronchiale auf die Pathogenität von 2009 pH1N1 IAV in weiblichen 1SB6F1 Mäusen zu untersuchen, wurden basierend auf den vorherigen Ergebnissen aus den Experimenten mit weiblichen C57BL/6 Mäusen (Kapitel 4.1.1.1), weibliche asthmatische und nicht-asthmatische 1SB6F1 Mäuse mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert.

Bei dieser Infektionsdosis zeigten die infizierten weiblichen nicht-asthmatischen und asthmatischen 1SB6F1 Mäuse Gewichtsverluste von bis zu 80 % des Ausgangsgewichts. Wobei die Gewichtsverluste vergleichbar zwischen asthmatischen Mäusen (Asthma/2009 pH1N1) und nicht-asthmatischen Mäusen (2009 pH1N1) waren (Abbildung 11A).

Ergebnisse

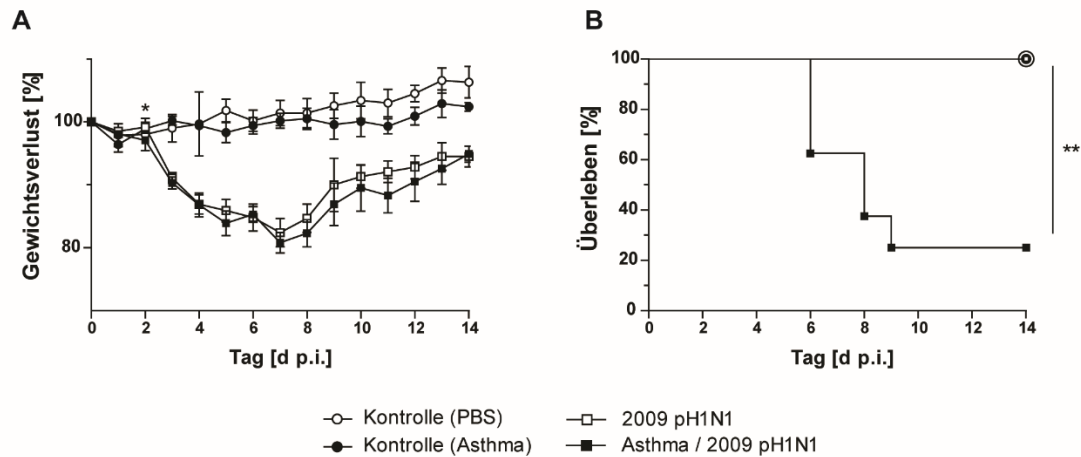


Abbildung 11: Pathogenität des 2009 pH1N1 IAV in nicht-asthmatischen und asthmatischen 1SB6F1 Mäusen.

Weibliche nicht-asthmatische (weißes Quadrat) und asthmatische (schwarzes Quadrat) 1SB6F1 Mäuse wurden intranasal mit 10^5 p.f.u. ($n = 8$) des 2009 pH1N1 IAV infiziert. Gewichtsverläufe (A) und Überlebensraten (B) wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen nach der Infektion verfolgt. PBS-Kontrolle und Asthma-Kontrolle Mäuse wurden mit PBS behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen, sowie die Gewichtsverläufe mit Standardabweichungen. Die statistische Relevanz der Ergebnisse wurde mithilfe des Student's t-Test in dem Programm GraphPad ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). In den Abbildungen werden nur die Signifikanz von 2009 pH1N1 vs. Asthma/2009 pH1N1 dargestellt.

Interessanterweise zeigten die asthmatischen weiblichen 1SB6F1 Mäuse (Asthma/2009 pH1N1), die mit dem 2009 pH1N1 IAV infiziert wurden, eine Letalität von bis zu 75 %. Vergleichsweise wiesen infizierte nicht-asthmatische Mäuse (2009 pH1N1) eine Überlebensrate von 100 % auf (Abbildung 11B). Die Infektion führte bei den infizierten asthmatischen weiblichen 1SB6F1 Mäusen zum Tod der Tiere zwischen Tag 6 und Tag 9 (Abbildung 11B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV zu einer erhöhten Pathogenität in den asthmatischen weiblichen 1SB6F1 (Asthma/2009 pH1N1) Mäusen im Vergleich mit den nicht-asthmatischen weiblichen 1SB6F1 (2009 pH1N1) Mäusen führt. Diese Daten spiegeln die klinischen Daten während der Influenza Pandemie 2009 wieder.

4.1.2 Lungenpathogenese in den weiblichen asthmatischen Mausmodellen

In den folgenden Abschnitten werden die Untersuchung des Lungentropismus, sowie die Ergebnisse der pathologischen Veränderungen der Lungen von weiblichen asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen während einer Influenzavirus Infektion vorgestellt.

4.1.2.1 Lungentropismus im weiblichen asthmatischen Mausmodell

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Unterschiede in der Pathogenität auf einen Unterschied in der Virusreplikation zurückzuführen sind, wurde die Viruslast in der Mauslunge untersucht. Die Viruslast wurde in der Lungen und der BAL-Flüssigkeit von

Ergebnisse

asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen, die mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert wurden, mittels Plaque Test bestimmt (Kapitel 3.3.4).

Dafür wurden die Tiere 3 und 6 Tage nach der Infektion final geblutet (Kapitel 3.4.4.1), BAL-Flüssigkeit aus der Lungen gewonnen (Kapitel 3.4.4.2), sowie ein Teil der Lungen entnommen und der Virustiter mittels Plaquetest (Kapitel 3.3.4) bestimmt. In den folgenden Kapiteln werden die viralen Titer von Lungenhomogenisaten sowie BAL-Flüssigkeiten nach Infektion in den beiden Modellen vorgestellt.

4.1.2.1.1 Das C57BL/6 Modell

Die Viruslast wurde zuerst in die Lungen und der BAL-Flüssigkeit von asthmatischen und nicht-asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen, 3 und 6 Tage nach der Infektion, bestimmt.

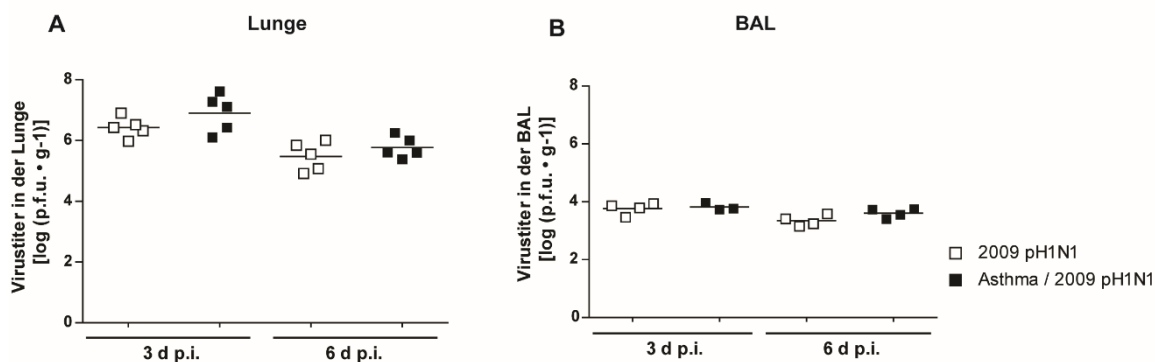


Abbildung 12: Virustiter in der Lunge und BAL von nicht-asthmatischen und asthmatischen C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV.

Nicht-asthmatische (weißes Quadrat) und asthmatische (schwarzes Quadrat) weibliche C57BL/6 Mäuse wurden intranasal mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert. An Tag 3 und 6 nach der Infektion wurden von drei bis fünf Tieren pro Gruppe BAL gewonnen und die Lungen entnommen. Der Virustiter wurden mittels Plaque Test bestimmt und in log (p.f.u./g) nach der Normalisierung des Virustiters mit dem Gewicht des Organstückes angegeben. Dargestellt sind die Lungentiter (A) und die BAL- Titer (B) der jeweiligen Tieren sowie die Mittelwerte.

Die Lungen infizierter C57BL/6 Mäuse (2009 pH1N1 und Asthma/2009 pH1N1) hatten an Tag 3 nach der Infektion einen höheren Virustiter als die Lungen der Mäuse an Tag 6 nach der Infektion. Es zeigte sich jedoch, dass sowohl 3 Tage p.i. als auch 6 Tage p.i. vergleichbar hohe Lungentiter in den nicht-asthmatischen und asthmatischen C57BL/6 Mäusen vorhanden waren, die mit 2009 pH1N1 infiziert wurden (Abbildung 12A).

Des Weiteren wurde die Viruslast in den BAL-Flüssigkeiten von infizierten C57BL/6 Mäusen (2009 pH1N1 und Asthma/2009 pH1N1) untersucht. Die infizierten nicht-asthmatischen und asthmatischen C57BL/6 Mäuse zeigten vergleichbar hohen Virustiter in der BAL-Flüssigkeit, 3 und 6 Tage nach Infektion (Abbildung 12B).

Ergebnisse

Diese Daten deuten darauf hin, dass die Unterschiede, die in die Mortalität zwischen infiziert nicht-asthmatischen und asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen beobachtet wurden, nicht auf eine vermehrte Virusreplikation in den Lungen zurückzuführen sind.

4.1.2.1.2 Das 1SB6F1 Modell

Die Viruslast wurde ebenfalls in die Lungen und der BAL-Flüssigkeit von asthmatischen und nicht-asthmatischen weiblichen 1SB6F1 Mäusen, 3 und 6 Tage nach der Infektion, bestimmt.

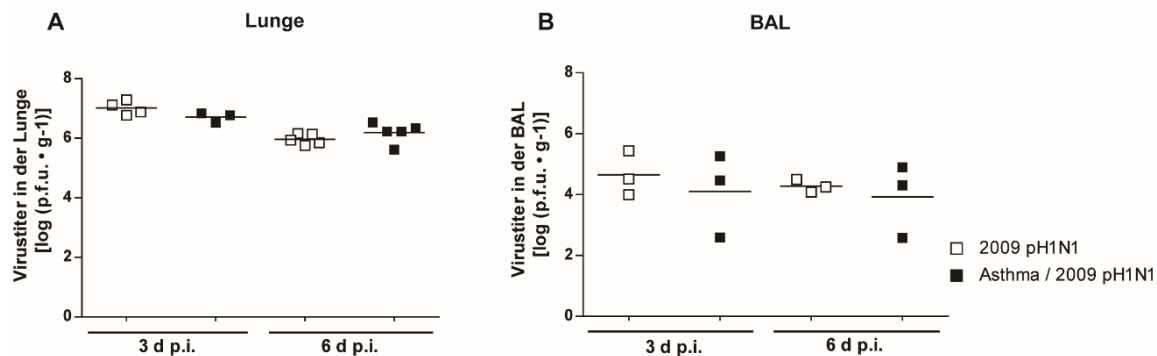


Abbildung 13: Virustiter in der Lunge und BAL von nicht-asthmatischen und asthmatischen 1SB6F1 Mäusen nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV.

Nicht-asthmatischen (weißes Quadrat) und asthmatische (schwarzes Quadrat) weiblichen 1SB6F1 Mäusen wurden intranasal mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert. An Tag 3 und 6 nach der Infektion wurden von drei bis fünf Tieren pro Gruppe, die BAL gewonnen und die Lungen entnommen. Die Virustiter wurden mittels Plaque Test bestimmt und in log (p.f.u./g) nach der Normalisierung des Virustiters mit dem Gewicht des Organstückes angegeben. Dargestellt sind die Lungentiter (A) und die BAL-Titer (B) der jeweiligen Tieren sowie die Mittelwerte.

Wie bei den weiblichen C57BL/6 Mäusen zeigten die infizierten nicht-asthmatischen (2009 pH1N1) und infizierten asthmatischen Mäusen (Asthma/2009 pH1N1) 3 Tage nach der Infektion vergleichbar hohe Titer in der Lunge.

Zudem konnte kein signifikanter Unterschied in der Viruslast zwischen Tag 3 und Tag 6 nach der Infektion festgestellt werden (Abbildung 13A). Diese Beobachtung wurde durch die Virustiter aus der BAL-Flüssigkeit bestätigt, obwohl die Viruslast in der BAL-Flüssigkeit in beiden Gruppen generell niedriger war im Vergleich zur Viruslast in den Lungen (Abbildung 13B). Diese Daten zeigen, dass die Unterschiede in der Mortalität zwischen infizierten nicht-asthmatischen und asthmatischen weiblichen 1SB6F1 Mäusen nicht auf eine vermehrte Virusreplikation in den Lungen zurückzuführen sind.

4.1.2.2 Immunhistologie der Lunge im weiblichen asthmatischen Mausmodell

Die Infektion mit Influenza Viren, sowie allergisches Asthma sind beides Erkrankungen des Respirationstrakts. Um den Einfluss von allergischem Asthma und eine darauffolgende Influenzavirus Infektion auf die Lunge zu untersuchen, wurden die Lungen von weiblichen asthmatischen Mäusen auf pathologische Veränderungen und Zelltropismus untersucht.

Ergebnisse

Wie bereits beschrieben wurden die Tiere einer Asthma Induktion unterzogen und mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert (Kapitel 3.4.1). Die Lungen wurden, 3 und 6 Tage nach der Infektion entnommen, mit Paraformaldehyd fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Dünnschnitte zur histologischen Untersuchung wurden daraufhin angefertigt (Kapitel 3.5.1). Um die pathologische Veränderung zu untersuchen, wurde eine Hämatoxylin-Eosin Färbung der Dünnschnitte (Kapitel 3.5.3) durchgeführt. Zudem wurde eine Per Jodsäure-Schiff-Färbung (PAS- Färbung) (Kapitel 3.5.4) vorgenommen, um den gebildeten Mukus zu färben, sowie eine Immunfärbung gegen das Influenza-Antigen NP (anti-NP, Kapitel 3.5.5). Die Mukus Hyperproduktion wird durch eine dunkle rosa Färbung erkennbar und die IAV Infektion durch eine braune Färbung des Antigens in den Gewebeschnitten erkennbar. In nachfolgender Abbildung 14 und Abbildung 15 sind Schnitte infizierter Mauslungen, gefärbt mit HE, PAS und gegen das Influenzavirus NP Protein, dargestellt.

4.1.2.2.1 Das C57BL/6 Modell

Als erstes wurde in den Mauslungen die zelluläre Infiltration und die pathologischen Veränderungen mittels HE-Färbung untersucht. Die Lungen der Asthma-Kontrolltieren zeigten eine erhöhte Infiltration im Vergleich zu den PBS-Kontrollgruppen. Es konnte eine vermehrte perivaskuläre und peribronchiale Infiltration in den Lungen der Asthma-Kontrolltiere gezeigt werden. Zudem konnte eine Verdickung der Epithelzellen rundum der Gefäße und der Bronchien beobachtet werden. Hierbei war deutlich zu erkennen, dass die Infiltration und die Epithelveränderungen der Lungen an Tag 6 p.i. im Vergleich zu Tag 3 p.i. deutlich ausgeprägter waren. Die nicht-asthmatischen und asthmatischen Tiere, die mit dem 2009 pH1N1 IAV infiziert wurden, zeigten 3 Tage nach der Infektion keine Unterschiede in der Infiltration oder der Struktur der Bronchien und alveolar Gewebe. Interessanterweise zeigten die nicht-asthmatische Mäuse 6 Tage nach der Infektion, erhöhte Infiltration in den Lungen im Vergleich zu den infizierten asthmatischen C57BL/6 Mäusen.

Ergebnisse

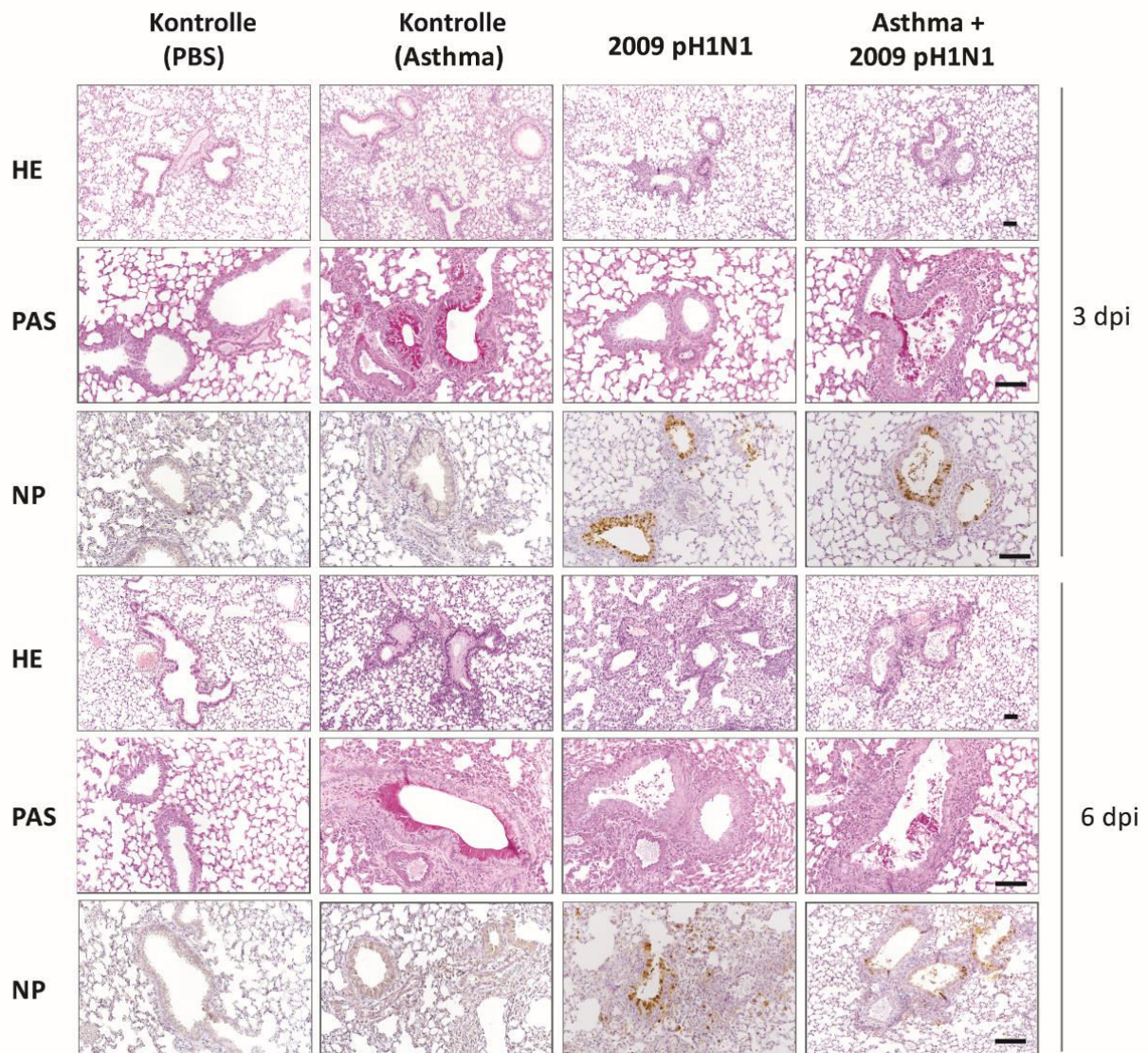


Abbildung 14: HE, PAS und immunohistochemische Färbung von C57BL/6 Mäuselungen nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV.

Asthmatische und nicht-asthmatische weibliche C57BL/6 Mäuse wurden mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert. Kontrolltiere erhielten PBS. Es wurden die Lungen entnommen, Gewebeschnitte angefertigt und die jeweilige Färbung durchgeführt. Dargestellt sind aus jeweils fünf Tieren repräsentative Aufnahmen der HE, PAS und gegen NP-gefärbten Lungen von Kontrolltieren (PBS und Asthma), sowie Lungen aus Tieren 3 und 6 Tage nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV. Die lichtmikroskopischen Bilder zeigen die Gewebeschnitte in einer 200-fachen Vergrößerung für HE und 400-fachen Vergrößerung für PAS und anti-NP. Die Skalierung entspricht 100 μ m.

Als zweites wurde die Mukus Hyperproduktion in den Atemwegen mittels PAS-Färbung untersucht. Hier wurden in der PBS-Kontrollgruppe und in infizierten nicht-asthmatischen Mäusen (2009 pH1N1) keine Mukus Hyperproduktion beobachtet, sowohl 3 als auch 6 Tage nach der Infektion. Die Asthma-Kontroll Mäuse zeigten 3 Tage nach PBS Gabe bzw. 4 Tage nach der letzten OVA Aerosol Challenge eine erhöhte Mukus Hyperproduktion, gekennzeichnet durch eine rosa Färbung, vor allem in den Goblet-Zellen der Bronchien und Bronchiole. Die Asthma-Kontroll Mäuse zeigten 6 Tage nach PBS Gabe eine Reduktion der Muskus Hyperproduktion in der Lungen Es konnte weniger Mukus in den Goblet-Zellen,

Ergebnisse

innerhalb des Epitheliums beobachtet werden, aber dafür könnte mehr sezernierten Mukus im Lumen der Bronchien und Bronchiole beobachtet werden. Nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV zeigten die asthmatischen C57BL/6 Mäuse eine deutliche Reduktion der Mukusproduktion in den Goblet-Zellen und dem Lumen im Vergleich zu den Asthma-Kontrollen Mäusen. Dieser Effekt war 6 Tage nach der Infektion deutlich ausgeprägter als 3 Tage p.i.. Es konnten zudem lysierte Mukus-positive Zellen in den Lumen der Atemwege beobachtet werden (Abbildung 14).

Als letztes wurde die Verteilung des Influenzavirus NP-Antigens in den Lungen mittels immunhistochemischer Färbung überprüft. Wie erwartet zeigten die PBS-Kontrollen und die Asthma-Kontrollen keine NP-positive Zellen. Es konnte 3 Tage p.i. in nicht-asthmatische und asthmatische C57BL/6 Mäusen zahlreiche NP-positive Zellen beobachtet werden. Die Infektion war nur auf die Epithelzellen begrenzt, was durch NP-positive Epithelzellen erkennbar war. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Anzahl der NP-positive Zellen zwischen den nicht-asthmatischen und den asthmatischen Mäusen beobachtet werden. Hingegen 6 Tage nach der Infektion konnte eine Verbreitung der Influenzavirus Infektion in nicht-asthmatischen Mäusen beobachtet werden. Es wurden sowohl in Epithelzellen, in alveolärem Gewebe als auch in Immunzellen, vermutlich Makrophagen, vermehrte NP-positive Zellen beobachtet. Interessanterweise zeigten die asthmatischen Mäuse (Asthma/2009 pH1N1) weniger NP-positive Zellen in den Epithelzellen und infiltrierten Zellen im Vergleich zu nicht-asthmatischen Mäusen (2009 pH1N1). Diese Beobachtung korreliert mit der erhöhten Pathogenität in den nicht-asthmatischen Mäusen nach Influenzavirus Infektion im Vergleich zu den asthmatischen Mäusen (Abbildung 14).

4.1.2.2.2 Das 1SB6F1 Modell

Ähnlich wie das vorherige Modell wurde in den 1SB6F1 Mäusen, HE, PAS und anti-NP Färbung auf Lungengewebeschnitte durchgeführt (Abbildung 15).

Die HE-Färbung zeigte eine erhöhte perivaskuläre und peribronchiale Infiltration sowie eine Verdickung der Mukosa in den Asthma-Kontrolltieren im Vergleich zu PBS-Kontrolltieren. Zudem konnte eine vermehrte Anzahl an Goblet-Zellen in dem Epithel der Asthma-Kontrolltiere beobachtet werden. Dies konnte sowohl 3 als auch 6 Tag p.i. beobachtet werden. Die Infektion mit 2009 pH1N1 führte zu einer deutlichen Erhöhung der Infiltration in den infizierten Gruppen (2009 pH1N1 und Asthma/2009 pH1N1) im Vergleich zu den Kontrolltieren. Zudem zeigten die infizierten asthmatischen Mäuse (Asthma/2009 pH1N1) mehr peribronchiale und perivaskuläre Infiltration als auch alveoläre Infiltration als die nicht-asthmatischen Mäuse (2009 pH1N1). Diese Unterschiede waren 6 Tag p.i. noch ausgeprägter als 3 Tage nach der Infektion.

Ergebnisse

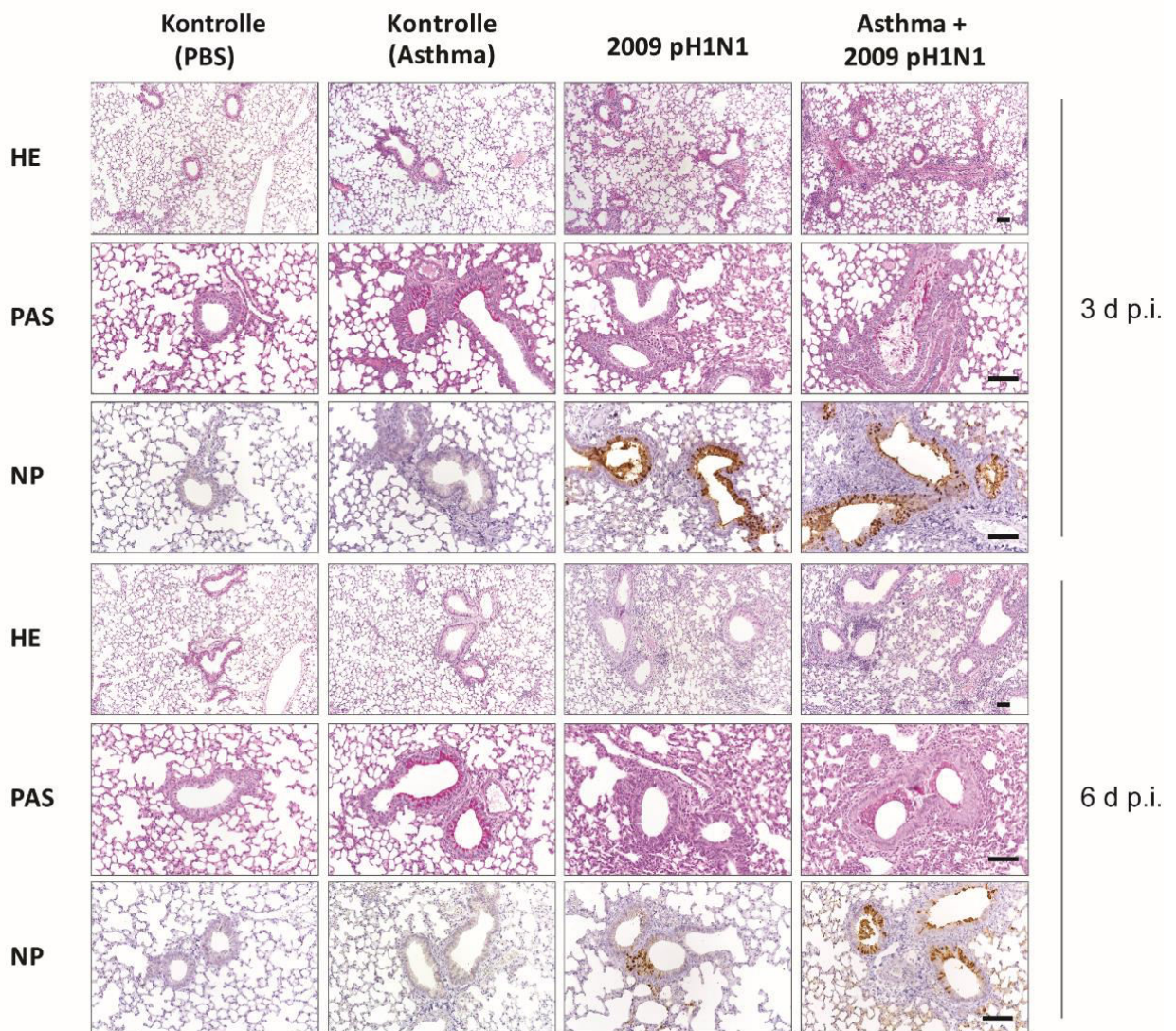


Abbildung 15: HE, PAS und immunohistochemische Färbung von 1SB6F1 Mäuselungen nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV.

Asthmatische und nicht-asthmatische weibliche 1SB6F1 Mäuse wurden mit 10^5 p.f.u des 2009 pH1N1 IAV infiziert. Kontrolltieren erhielten PBS. Jeweils fünf Tieren pro Gruppe wurden die Lungen entnommen, Gewebeschnitte angefertigt und die jeweilige Färbung durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der HE, PAS und gegen NP-gefärbten Lungen von Kontrolltieren (PBS und Asthma), sowie 3 und 6 Tage nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV. Die lichtmikroskopischen Bilder zeigen die Gewebeschnitte in einer 200-fachen Vergrößerung für HE und 400-fachen Vergrößerung für PAS und anti-NP. Die Skalierung entspricht 100 μ m.

Auch in diesem Modell wurde eine PAS-Färbung durchgeführt. Hier konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die PBS-Kontrollen und die infizierten nicht-asthmatischen Mäuse (2009 pH1N1) keine Mukus Hyperproduktion zeigten, sowohl 3 als auch 6 Tage nach Infektion. Wie erwartet zeigten die Asthma-Kontrolltiere 3 Tage nach PBS Gabe bzw. 4 Tage nach der letzten OVA Aerosol Challenge eine erhöhte Mukus Hyperproduktion in Goblet-Zellen. Dies war ebenfalls 6 Tag p.i. also 7 Tage nach der letzten OVA Aerosol Behandlung noch zu beobachten. Die infizierten asthmatischen Mäuse zeigten 3 und 6 Tage nach der Infektion

Ergebnisse

weniger Mukus Hyperproduktion als die Asthma-Kontrolltiere. Zudem konnte der zytopathische Effekt der Influenzavirus Infektion auf die Goblet-Zellen beobachtet werden, da vermehrte lysierte Mukus-positive Zellen und Immunzellen im Lumen der Atemwege beobachtet werden konnte. Interessanterweise konnte 6 Tage nach der Infektion eine erhöhte Mukus Hyperproduktion in den asthmatischen Mäusen im Vergleich zu 3 Tage nach der IAV Infektion beobachtet werden.

Die PBS-Kontrollen und die Asthma-Kontrolltiere zeigten, wie erwartet, in der anti-NP immunhistochemische Färbung keine NP-positive Zellen, sowohl 3 als auch 6 Tage nach Infektion. Die infizierten nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäuse zeigten 3 Tage p.i. eine ähnlich starke Influenzavirus Infektion in den Epithelzellen der Bronchien und Bronchiole, was durch NP-positive Zellen (braune Färbung) in den Epithelzellen erkennbar war. Hingegen zeigte sich zusätzlich eine starke Infektion des alveolaren Gewebes und Immunzellen, dargestellt durch die braune Färbung, an Tag 6 p.i., in den asthmatischen 1SB6F1 Mäusen. Diese erhöhte Anzahl an NP-positive Zellen in der Lungen von infizierten asthmatischen 1SB6F1 Mäusen korrelieren mit der erhöhten Pathogenität in den asthmatischen Mäusen nach Infektion mit dem 2009 pH1N1.

4.1.3 Immunantwort in der Lunge von weiblichen asthmatischen Mäusen

Neben der Virus Replikation in der Lunge, spielt ebenfalls die Immunantwort eine erhebliche Rolle im Krankheitsverlauf einer Influenzavirus Infektion. Um die Aktivierung des Immunsystems während einer Infektion mit 2009 pH1N1 IAV in beiden Asthma Mausmodellen zu charakterisieren, wurde die Proteinmenge ausgewählter Zytokine aus Lungenhomogenisat und BAL-Flüssigkeit 3 und 6 Tage nach IAV Infektion untersucht. Dafür wurde die Expression von Neutrophilenattraktoren, (*Keratinocyte chemoattractant* (KC)), pro-inflammatorisch wirkenden Zytokinen Interleukin-1 β , Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- α (IL-1 β , IL-6 und TNF α), des Th1-assoziierten Zytokins Interferon- γ (IFN- γ) und des Th17-assoziierten Zytokins Interleukin-17A (IL-17A), sowie von Th2- assoziierten Zytokinen Interleukin-4, 5 und 13 (IL-4, IL-5, IL-13) und von Interleukin-10 (IL-10) als anti-inflammatorisches Zytokin, mittels Multi-Analyt-Profilierung (Kapitel 3.1.4) und CBA (Kapitel 3.1.5) untersucht.

4.1.3.1 Das C57BL/6 Modell

Zuerst wurde die Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine, IL-1 β , IL-6 und TNF- α in den Lungenhomogenisaten 3 und 6 Tage nach der Infektion bestimmt (Abbildung 16A, B und C). Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Asthma zu einer Steigerung der IL-1 β Konzentration 3 Tage nach der Infektion in den Asthma-Kontrolltieren führt. Die IL-1 β Konzentration war in den asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen 3 Tage nach der

Ergebnisse

Infektion vergleichbar. Die IL-1 β Konzentration erhöhte sich in den infizierten nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen 6 Tage nach der Infektion, wobei eine leichte Reduktion der IL-1 β Konzentration in den Lungen von asthmatischen Mäusen ($152,1 \pm 14,64$ pg/ml/g⁻¹) im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen ($214,3 \pm 31,81$ pg/ml/g⁻¹) beobachtet werden konnte (Abbildung 16A).

Asthma führte in weiblichen C57BL/6 Mäusen zu einem leichten Anstieg der IL-6 Konzentration in den Asthma-Kontrolltieren sowohl 3 als auch 6 Tage nach Infektion. Die Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV führte zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6 Konzentration in den Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen im Vergleich zu den Asthma-Kontrolltieren. Interessanterweise zeigten die asthmatischen infizierten Mäuse (8496 ± 1405 pg/ml/g⁻¹) eine Reduktion der IL-6 Konzentrationslevel in der Lunge im Vergleich zu nicht-asthmatischen Mäusen (14729 ± 1685 pg/ml/g⁻¹) (Abbildung 16B). Die Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV führte zu keiner Erhöhung der TNF- α Konzentration in der Lunge von asthmatischen und nicht-asthmatischen C57BL/6 Mäusen. Interessanterweise wurde eine signifikante Reduktion der TNF- α Konzentrationslevel in der Lunge von asthmatischen Mäusen ($1353 \pm 17,8$ pg/ml/g⁻¹) 3 Tage nach Infektion im Vergleich zu den nicht-asthmatische Mäusen gemessen ($2498 \pm 211,3$ pg/ml/g⁻¹) (Abbildung 16C).

Eine 2009 pH1N1 Infektion führte zu einer Erhöhung der IFN- γ -Konzentrationslevel in der Lunge. Die asthmatischen C57BL/6 Mäuse (18521 ± 7472 pg/ml/g⁻¹) zeigten eine signifikante Reduktion der IFN- γ -Konzentration in den Lungenhomogenisaten 3 Tage p.i. im Vergleich zu nicht-asthmatischen (22166 ± 9455 pg/ml/g⁻¹) C57BL/6 Mäusen. Die IFN- γ -Konzentrationslevel waren 6 Tage p.i. in den infizierten Tieren im Vergleich zu 3 Tage p.i. signifikant erhöht., aber es konnte kein Unterschied zwischen asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen beobachtet werden (Abbildung 16D).

Weiterhin wurde die Th2 Immunantwort in den Lungen von C57BL/6 Mäusen untersucht. Dafür wurde die Konzentrationslevel von IL-4 und IL-13 in der Lungen gemessen (Abbildung 16E, F). Die Induktion von Asthma führte interessanterweise zu keiner Erhöhung der IL-4 Konzentration in der Lunge 3 Tage p.i.. Es konnte jedoch 3 Tage nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV eine leichte Erhöhung der Konzentrationslevel von IL-4 in den asthmatischen Mäusen im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen beobachtet werden. 6 Tage p.i. konnte eine Erhöhung der IL-4 Konzentrationslevel in den Lungen der infizierten Tieren im Vergleich zu 3 Tage p.i. beobachtet werden, jedoch war die Konzentration vergleichbar zwischen nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen (Abbildung 16E).

Ergebnisse

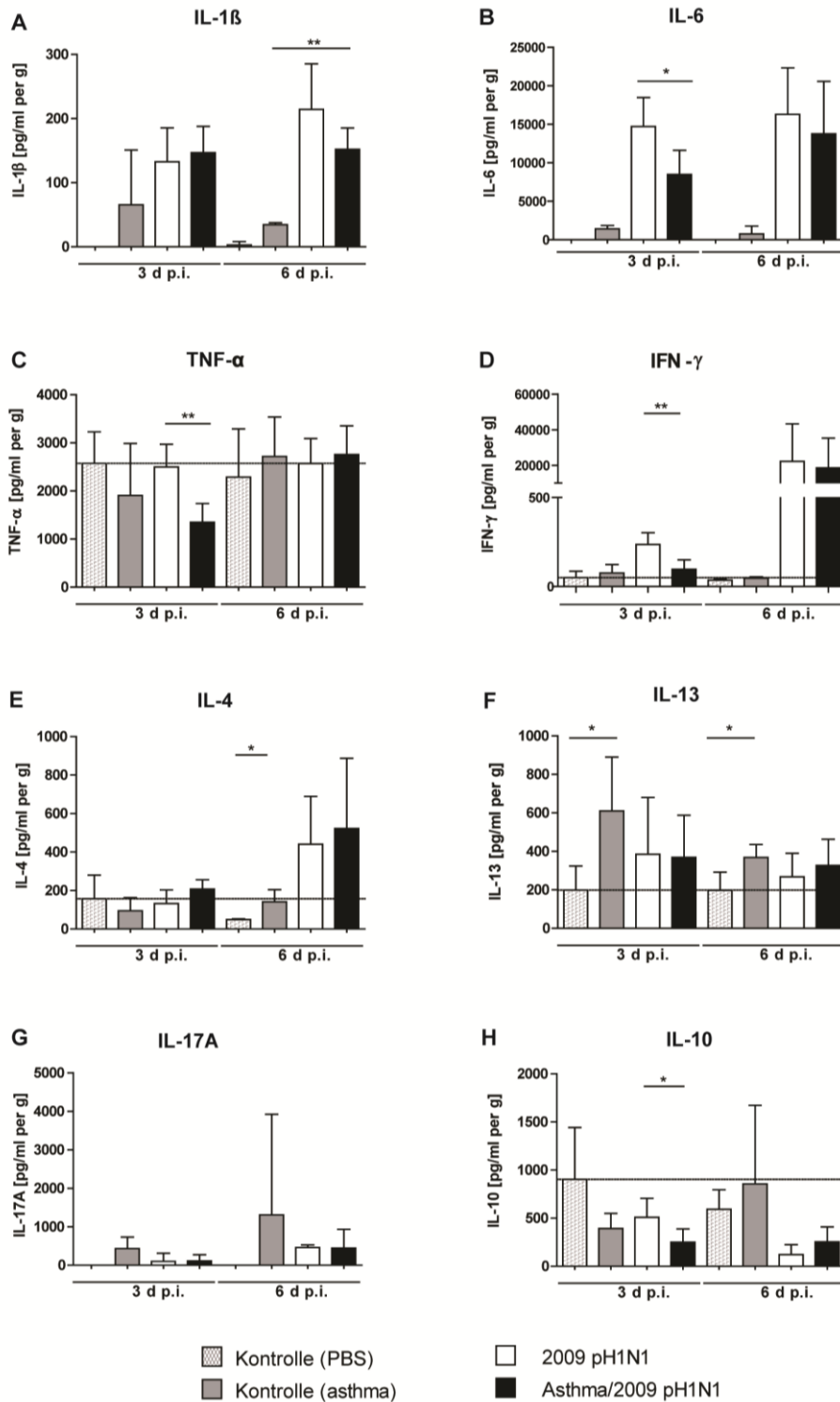


Abbildung 16: Konzentrationslevel von pro- und anti-inflammatorischen, Th1, Th2 und Th17 Zytokinen in den Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen C57BL/6 Mäusen.

Die Zytokin Konzentrationen wurde 3 und 6 Tage nach Infektion mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV in den Lungen von nicht-asthmatischen (weiße Balken) und asthmatischen (schwarze Balken) C57BL/6 Mäusen bestimmt. Kontrolliere erhielten intranasal PBS. Die quantitative Messung der Zytokinmengen wurde in den Lungenhomogenisatam im Duplikat mittels Multi-Analyt-Profilierung bestimmt. Dabei wurden die Mengen von pro-inflammatorische Zytokinen IL-1 β , IL-6 und TNF- α (A, B, C), des Th1-Zytokins IFN- γ (D), von Th2-Zytokinen IL-4 und IL-13 (E und F), des Th17-Zytokins IL-17A (G) und des anti-inflammatorische Zytokins IL-10 (H) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung von vier bis fünf Tieren pro Gruppe Die statistische Relevanz wurde durch einen Student's-t-Test ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Ergebnisse

Anders als bei IL-4, zeigten die Asthma-Kontrolltiere erhöhte IL-13 Konzentrationslevel 3 und 6 Tage p.i. im Vergleich zu PBS-Kontrolltieren. Die Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV führte zu einer Erhöhung der IL-13 Konzentration in der Lunge der infizierten Tiere im Vergleich zu den PBS-Kontrolltieren. Es konnte jedoch kein Unterschied 3 Tage nach Infektion zwischen den nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen beobachtet werden (Abbildung 16F).

Die Asthma-Kontrolltiere zeigten eine erhöhte IL-17A Konzentration in den Lungen im Vergleich zur PBS-Kontrolle, wobei 6 Tage p.i. nur ein Asthma-Kontrolltier erhöhte IL-17A Konzentrationslevel zeigte. Es konnte kein Unterschied in IL-17A Konzentrationsleveln in den Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen C57BL/6 Mäusen beobachtet werden (Abbildung 16G).

Zuletzt wurden IL-10 Expressionslevel in Lungenhomogenisaten bestimmt. Interessanterweise führte die Induktion von Asthma und die Infektion zu keiner Induktion der IL-10 Konzentrationslevel in den Lungen von C57BL/6 Tieren: Nach der Infektion mit dem 2009 pH1N1 zeigten die asthmatischen Mäusen ($250.9 \pm 61.14 \text{ pg/ml/g}^{-1}$) eine signifikant niedrigere IL-10 Konzentration in der Lunge im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen ($509.5 \pm 87.98 \text{ pg/ml/g}^{-1}$). 6 Tage p.i. zeigten die asthmatischen Mäuse ($252,7 \pm 70,26 \text{ pg/ml/g}^{-1}$) hingegen erhöhte IL-10 Konzentrationslevel im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen ($151,3 \pm 44,45 \text{ pg/ml/g}^{-1}$) (Abbildung 16H).

Zusammenfassend konnte eine allgemein reduzierte pro-inflammatorische sowie Th1 induzierte Immunantwort in den asthmatische C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen beobachtet werden (Abbildung 16A-D). Zudem konnte 3 Tage nach der Infektion eine niedrigere anti-inflammatorische Immunantwort in asthmatischen C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu nicht-asthmatischen Mäusen gezeigt werden (Abbildung 16H).

Da der Phänotyp des Asthma bronchiale und die dazugehörige Immunantwort sowie pathologische Veränderungen hauptsächlich in den Bronchien auftreten, wurden zusätzlich die Zytokin-Expressionslevel in der BAL-Flüssigkeit von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen 3 und 6 Tage nach Infektion mittels CBA bestimmt. Zu den gemessenen Zytokinen aus den Lungenhomogenisaten wurden zusätzlich die Th2 Zytokine, IL-5 und der Neutrophilenattraktoren, KC bestimmt (Abbildung 17).

Es konnte 3 Tage nach Infektion eine signifikante Erhöhung der IL-1 β Konzentrationslevel in der BAL-Flüssigkeit von infizierten asthmatischen Mäusen im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen beobachtet werden. Hingegen wurde 6 Tage p.i. eine vergleichbare IL-1 β Konzentration in den nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäuse beobachtet (Abbildung 17A). Die Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV führte zu einer Erhöhung der IL-6 Konzentration in der BAL-Flüssigkeit von nicht-asthmatischen und asthmatischen C57BL/6

Ergebnisse

Mäusen. Es konnte sowohl 3 als auch 6 Tage p.i. leicht reduzierte IL-6 Konzentrationslevel in asthmatischen Mäusen im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen beobachtet werden. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abbildung 17B). Die Induktion von Asthma alleine führte zu einer Erhöhung der TNF- α Konzentration in der BAL-Flüssigkeit. Die asthmatischen Tiere zeigten 3 Tage nach der Infektion leicht erhöhte TNF- α Konzentrationslevel in der BAL-Flüssigkeit im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen. Hingegen konnte 6 Tage p.i. eine leichte Reduktion in infizierten asthmatischen Mäusen im Vergleich zu den infizierten nicht-asthmatischen Mäusen gezeigt werden (Abbildung 17C).

Interessanterweise führte die Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV 3 Tage p.i. zu keiner Induktion der IFN- γ Expressionslevel in der BAL-Flüssigkeit von asthmatischen Mäusen. Hingegen zeigten 6 Tage p.i. die infizierten Tiere sehr hohe IFN- γ Expressionslevel in der BAL-Flüssigkeit. Es wurde eine signifikante Erhöhung der IFN- γ Konzentrationslevel 6 Tage p.i. in den nicht-asthmatischen Mäusen im Vergleich zu den asthmatischen Mäusen festgestellt (Abbildung 17D).

Wie erwartet führte die Induktion von Asthma zu erhöhten IL-4, IL-5 und IL-13 Konzentrationen (Th2 Immunantwort) in der BAL-Flüssigkeit von Asthma-Kontrolltieren und infizierten asthmatischen Mäusen (Abbildung 17E, F,G). Die asthmatischen Mäuse zeigten 3 und 6 Tage p.i. erhöhte IL-4 Konzentrationslevel in der BAL-Flüssigkeit im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen (Abbildung 17E). Die IL-5 Konzentration war höher in den asthmatischen Mäuse 3 Tage p.i. im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen. Es konnte hingegen 6 Tage p.i. eine Reduktion der IL-5 Konzentration in der BAL-Flüssigkeit der asthmatischen Mäusen beobachtet werden (Abbildung 17F).

Die IL-13 Konzentrationslevel waren 3 Tage p.i. in der BAL-Flüssigkeit von infizierten asthmatischen C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen erhöht. Die nicht-asthmatische und die asthmatische Mäuse zeigten 6 Tage p.i. vergleichbare IL-13 Konzentrationslevel in der BAL-Flüssigkeit (Abbildung 17G). Die Konzentration des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 war 6 Tage p.i. erhöht in den infizierten asthmatischen Mäusen im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen (Abbildung 17H)

Ergebnisse

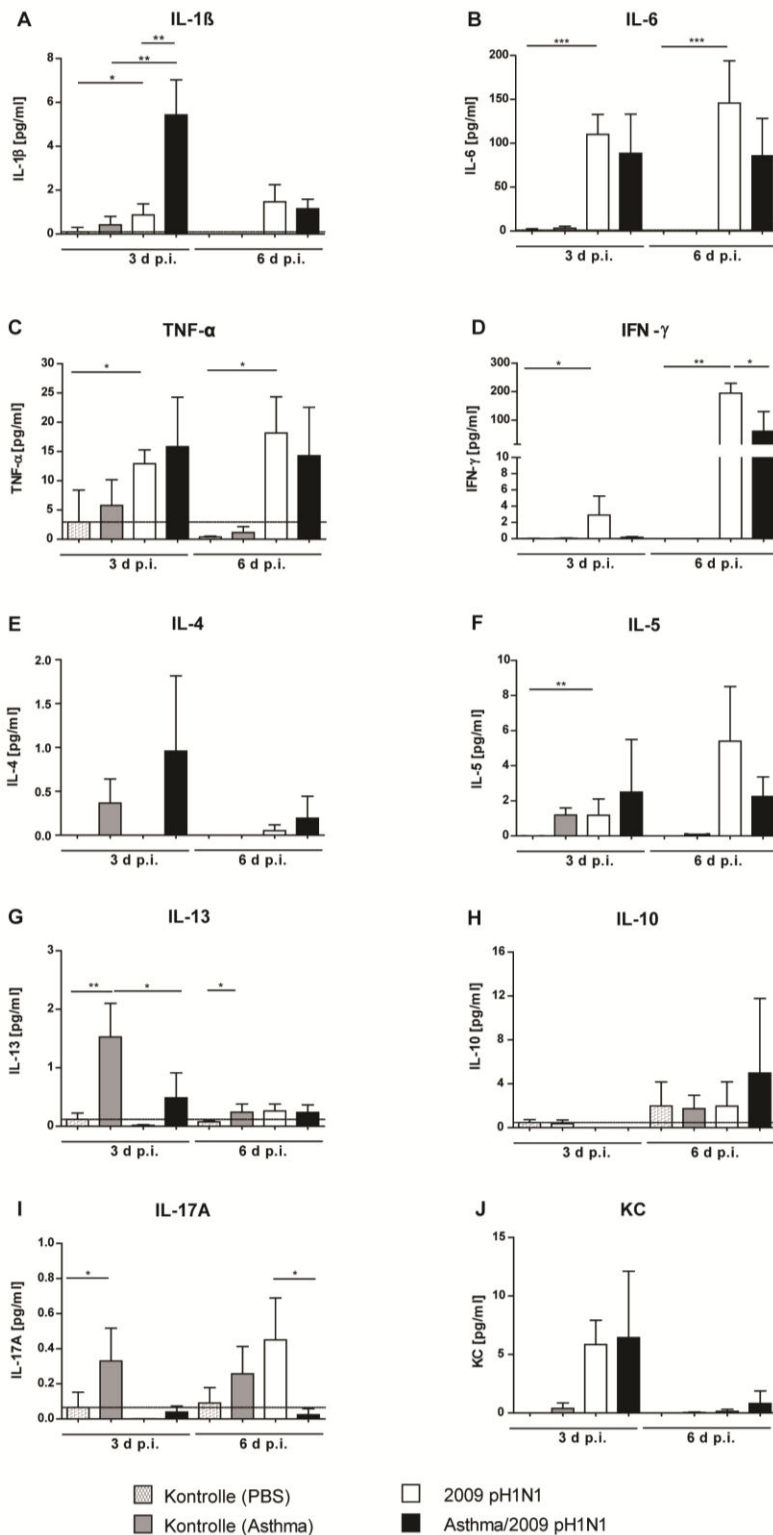


Abbildung 17: Konzentrationslevel von Zytokinen in der BAL-Flüssigkeit von nicht-asthmatischen und asthmatischen C57BL/6 Mäusen.

Die Zytokin Konzentrationen wurden 3 und 6 Tage in der BAL-Flüssigkeit von nicht-asthmatischen (weiße Balken) und asthmatischen (schwarze Balken) C57BL/6 Mäusen nach der Infektion mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV bestimmt. Kontrolltiere erhielten intranasal PBS. Die quantitative Messung der Zytokinmenge wurde in der BAL-Flüssigkeit in Duplikaten mittels CBA bestimmt. Dabei wurde pro-inflammatorische Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α (A, B, C), Th1-Zytokine IFN- γ (D), Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 (E, F, G), anti-inflammatorische Zytokine IL-10 (H), Th17-Zytokine IL-17A (I) und Neutrophilenattraktoren KC (J) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung von 3 Tieren pro Gruppe. Die statistische Relevanz wurde durch einen Student's-t-Test ermittelt (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001)

Ergebnisse

Die Induktion von Asthma führte zu einer signifikant erhöhten IL-17A Konzentration in der BAL-Flüssigkeit der Asthma-Kontrolltieren. Es konnte zudem 6 Tage p.i. eine signifikante Erhöhung der IL-17A Konzentration in der BAL-Flüssigkeit von nicht-asthmatischen Mäusen im Vergleich zu asthmatischen Mäusen gezeigt werden (Abbildung 17I). Zuletzt wurde die Konzentration der Neutrophilenattraktoren, KC in der BAL-Flüssigkeit bestimmt. Es konnte beobachtet werden, dass die KC Konzentration 3 Tage p.i. in infizierten Mäusen am höchsten war und die KC Konzentration vergleichbar in den asthmatischen Mäusen und den nicht-asthmatischen Mäusen war (Abbildung 17J).

Zusammenfassend konnte eine reduzierte pro-inflammatorische IL-1 β , IL-6, TNF- α und IFN- γ , sowie eine reduzierte anti-inflammatorische Immunantwort in der Lunge von asthmatischen C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen beobachtet werden. In der BAL-Flüssigkeit konnte eine Erhöhung der IL-1 β Konzentrationslevel aber eine Reduktion der IFN- γ und IL-17A Levels in den infizierten asthmatischen C57BL/6 Mäusen gemessen werden.

4.1.3.2 Das 1SB6F1 Modell

Die Th1, Th2, Th17, sowie die anti-inflammatorische Immunantwort in der Lungenhomogenisaten und die BAL-Flüssigkeit wurde ebenfalls im 1SB6F1 Mausmodell 3 und 6 Tage nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV bestimmt. Zusätzlich wurden die IL-5 und KC Konzentrationslevel in der BAL-Flüssigkeit mittels CBA bestimmt.

Zuerst wurde die pro-inflammatorische Immunantwort durch die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α in der Lunge bestimmt (Abbildung 18A, B, C). Die Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV führte zu einer Erhöhung der IL-1 β Konzentration in den Lungen, wobei 6 Tage p.i. die Konzentration noch höher waren im Vergleich zu 3 Tagen p.i. Die IL-1 β Konzentrationslevel waren 3 und 6 Tage p.i. vergleichbar in den nicht-asthmatischen Mäusen und asthmatischen Mäusen (Abbildung 18A). Es konnte zudem beobachtet werden, dass die Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV zu einer Erhöhung der IL-6 Konzentration in der Lunge der 1SB6F1 Mäuse führte (Abbildung 18B und C). Die IL-6 Konzentration war 3 Tage p.i. in den asthmatischen Mäusen leicht reduziert im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen. Jedoch zeigten die asthmatischen Mäuse eine erhöhte IL-6 Konzentration in der Lunge im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen (Abbildung 18B).

Die Infektion mit dem 2009 pH1N1 führte ebenfalls zu einer Erhöhung der TNF- α Konzentration in den Lungen von 1SB6F1 Mäusen. Es konnte eine leichte Reduktion der TNF- α Konzentration 3 Tage p.i. in den asthmatischen vs nicht-asthmatischen Mäusen beobachtet werden. 6 Tage p.i. wurde kein Unterschied zwischen den nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen beobachtet (Abbildung 18C). Die IAV Infektion führte zu einer Erhöhung der IFN- γ Konzentration in der Lunge 6 Tage p.i.. Es konnte kein Unterschied in

Ergebnisse

der IFN- γ Konzentration in den Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatische 1SB6F1 Mäusen beobachtet werden (Abbildung 18D).

Es wurde außerdem die Th2 Immunantwort in der Lunge untersucht. Hier zeigten die Asthma-Kontrolltiere erhöhte IL-4, IL-5 und IL-13 Konzentrationen in den Lungen im Vergleich zu den PBS-Kontrolltieren (Abbildung 18E, F und G). Die nicht-asthmatischen und asthmatischen 1SB6F1 Mäuse zeigten vergleichbar IL-4 Konzentrationslevel in der Lunge, 6 Tage nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV (Abbildung 18E). Die nicht-asthmatische und asthmatischen Mäuse zeigten sowohl 3 als auch 6 Tage p.i. vergleichbare IL-5 Konzentrationen in der Lunge nach der Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV (Abbildung 18F). Interessanterweise zeigten die asthmatischen Mäuse 6 Tage p.i. eine signifikant erhöhte IL-13 Konzentration in den Lungen im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen (Abbildung 18G).

Zusätzlich wurde der Effekt von regulatorische T-Zellen mittels IL-10 in den Lungen bestimmt. Die asthmatischen 1SB6F1 Mäuse zeigten 3 Tage nach Influenzainfektion niedrigere IL-10 Konzentrationen in den Lungen als die nicht-asthmatischen Mäuse. 6 Tage p.i. war die IL-10 Konzentration vergleichbar in beiden Gruppe (Abbildung 18H).

Zuletzt wurde die IL-17A Konzentration in den Lungen bestimmt (Abbildung 18I). Die nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäuse zeigten 3 Tage p.i. vergleichbare IL-17A Konzentrationen in den Lungen. Jedoch konnte 6 Tage nach der Infektion eine Reduktion der IL-17A Konzentration in den asthmatischen Mäusen im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen beobachtet werden (Abbildung 18I).

Ergebnisse

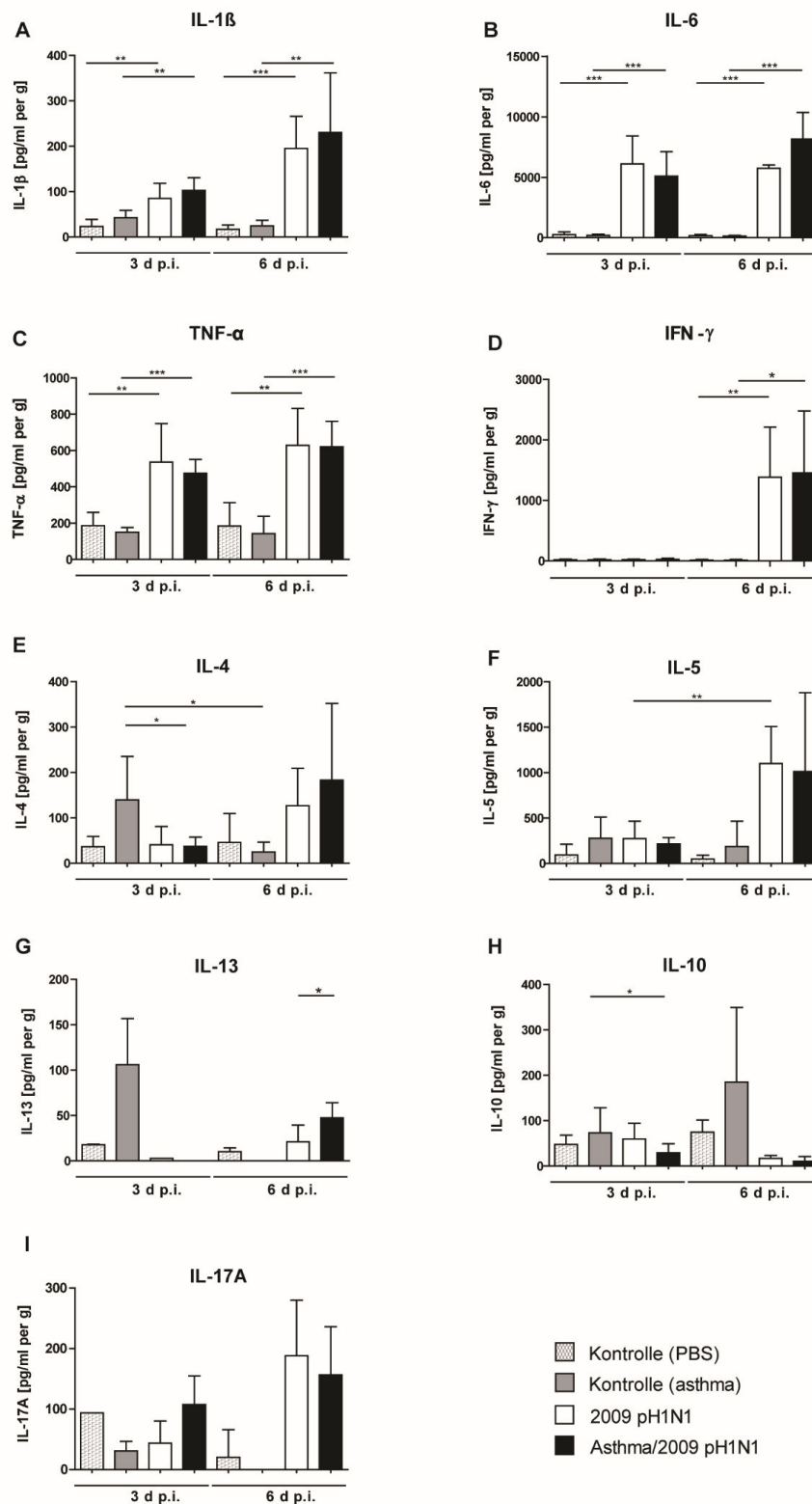


Abbildung 18: Konzentrationslevel von pro- und anti-inflammatorischen, Th1, Th2 Zytokinen und Th17 in den Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen 1SB6F1 Mäusen.

Die Zytokin Konzentrationen wurden 3 und 6 Tage in den Lungen von nicht-asthmatischen (weiße Balken) und asthmatischen (schwarze Balken) 1SB6F1 Mäusen nach der Infektion mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV bestimmt. Kontrolltiere erhielten intranasal PBS. Die quantitative Messung der Zytokinmengen wurde in den Lungenhomogenisaten in Duplikaten mittels Multi-Analyt-Profilierung bestimmt. Dabei wurden pro-inflammatorische Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α (A, B, C), Th1-Zytokine IFN- γ (D), Th2-Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 (E, F, G), anti-inflammatorische Zytokine IL-10 (H) und die Th17-Zytokine IL-17A (I) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung von fünf Tieren pro Gruppe. Die statistische Relevanz wurde durch einen Student's-t-Test ermittelt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Ergebnisse

In diesem neuartigen Asthma-Influenza Komorbidität Mausmodell wurde zudem die Immunantwort in der BAL-Flüssigkeit mittels CBA untersucht. In dieser Analyse lagen die Konzentrationen von pro-inflammatorischen- und Th1-Zytokinen (IL-1 β , IL-6, IFN- γ und TNF- α) in den Kontrolltieren unter dem Detektionslimit (Abbildung 19A, B, C, D). Es konnte eine erhöhte IL-1 β Konzentration in der BAL-Flüssigkeit von asthmatischen Mäusen 3 Tage p.i. beobachtet werden. Hier zeigte nur ein Tier eine gesteigerte IL-1 β Konzentration im Gegensatz zu den nicht-asthmatischen Mäusen. Jedoch war die IL-1 β Konzentration in der BAL-Flüssigkeit von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen 6 Tage p.i. ähnlich hoch (Abbildung 19A).

Die Infektion führte zu einer Erhöhung der IL-6 Konzentration in den nicht-asthmatischen und asthmatischen Tieren, wobei die asthmatischen Mäuse eine erhöhte IL-6 Konzentration 3 und 6 Tage p.i. in der BAL-Flüssigkeit im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen zeigten (Abbildung 19B). Die asthmatischen Mäuse zeigten eine erhöhte TNF- α Konzentration 3 und 6 Tage p.i. in der BAL-Flüssigkeit im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen (Abbildung 19C). Es konnte kein IFN- γ an Tag 3 nach der Infektion detektiert werden. Allerdings konnte eine gesteigerte IFN- γ Konzentration in der BAL-Flüssigkeit von asthmatischen Mäusen im Vergleich zu nicht-asthmatischen Mäusen beobachtet werden (Abbildung 19D).

Es konnte eine erhöhte Th2 Immunantwort (IL-4, IL-5 und IL-13) in der BAL-Flüssigkeit der Asthma-Kontrolltiere im Vergleich zu den PBS-Kontrolltieren beobachtet werden. Die asthmatischen Mäuse zeigten 3 und 6 Tage p.i. gesteigerte IL-4 und IL-13 Konzentrationen im Vergleich zu nicht-asthmatischen Tieren (Abbildung 19E und G). Anders als die anderen Th2 Zytokine, war die IL-5 Konzentration an Tag 6 p.i. ähnlich hoch in nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen (Abbildung 19F). Interessanterweise zeigten die asthmatischen Mäuse 3 Tage p.i. eine gesteigerte IL-10 Immunantwort in der BAL-Flüssigkeit im Vergleich zu nicht-asthmatischen Mäusen, bei welchen die IL-10 Konzentration unter dem Detektionslimit lag (Abbildung 19H).

Ergebnisse

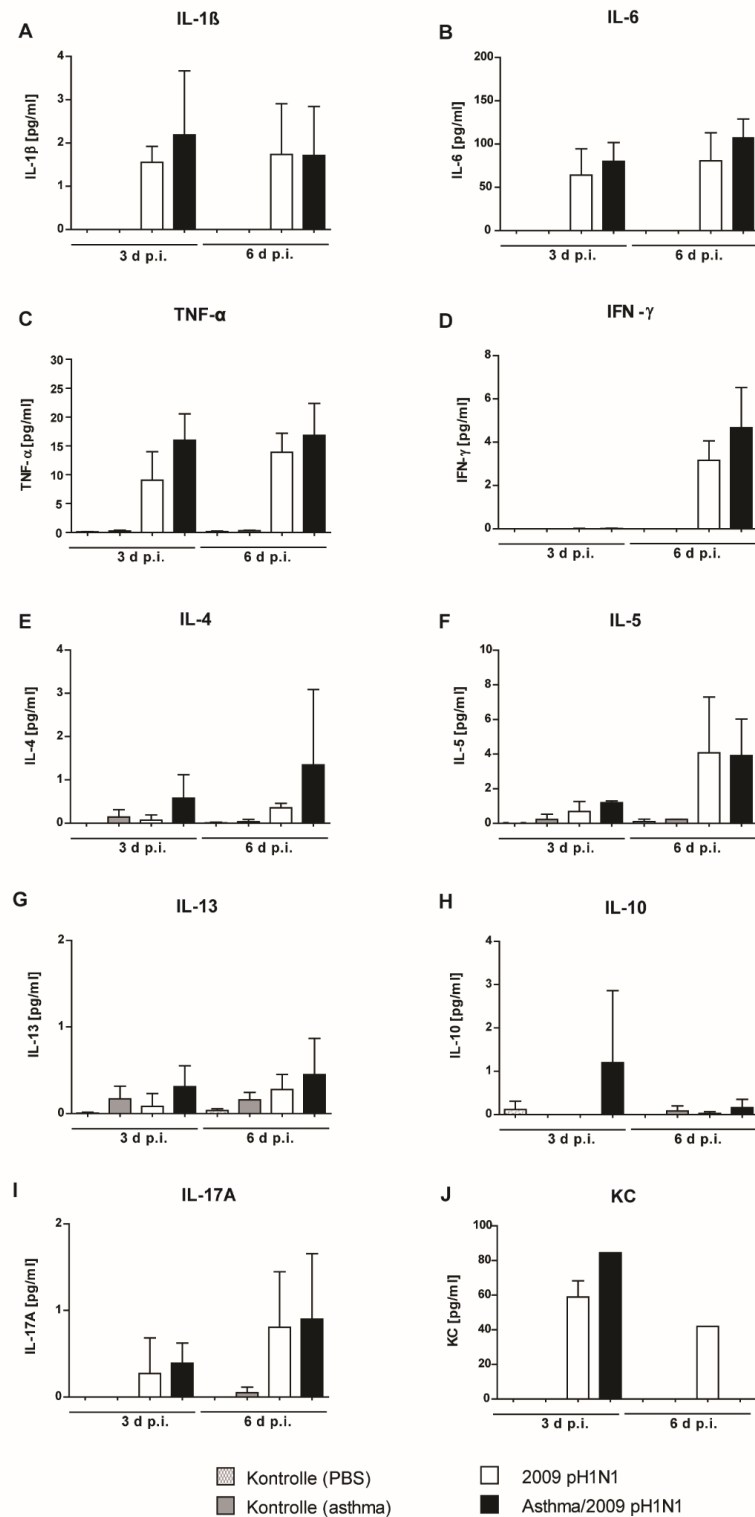


Abbildung 19: Konzentrationslevel von Zytokinen in BAL-Flüssigkeit von nicht-asthmatischen und asthmatischen 1SB6F1 Mäusen.

Die Zytokin Konzentration wurde 3 und 6 Tage in der BAL-Flüssigkeit von nicht-asthmatischen (weiße Balken) und asthmatischen (schwarze Balken) 1SB6F1 Mäusen nach der Infektion mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV bestimmt. Kontrolltiere erhielten intranasal PBS. Die quantitative Messung der Zytokinmengen wurden in den BAL-Flüssigkeit in Duplikaten mittels CBA bestimmt. Dabei wurden pro-inflammatorische Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α (A, B, C), Th1-Zytokine IFN- γ (D), Th2-Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 (E, F, G), anti-inflammatorische Zytokine IL-10 (H), Th17-Zytokine IL-17A (I) und Neutrophilenattraktoren KC (J) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung von drei Tieren pro Gruppe.

Ergebnisse

Obwohl dieser Unterschied nicht signifikant war, zeigten die asthmatischen Mäuse 3 Tage p.i. leicht höhere IL-17A Konzentrationslevel als die nicht-asthmatischen Mäuse. Die IL-17A Konzentration war in beide Gruppe 6 Tage p.i. ähnlich hoch (Abbildung 19I).

Zuletzt wurde die Konzentration der Neutrophilenattraktoren KC in der BAL-Flüssigkeit untersucht. Hier lag die KC Konzentration in den Kontrolltieren unter dem Detektionslimit. Die KC-Konzentrationen waren 3 Tage p.i. vergleichbar in den nicht-asthmatischen und asthmatischen Tieren. Interessanterweise zeigten die infizierten nicht-asthmatischen Mäuse 6 Tage p.i., gesteigerte KC-Werte in der BAL-Flüssigkeit, die KC Konzentration in den infizierten asthmatischen Mäuse unter dem Detektionslimit lag (Abbildung 19J).

Zusammenfassend konnte eine gesteigerte Tendenz der Th1 und Th2 Immunantwort in den asthmatischen Mäusen im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV beobachtet werden.

4.1.4 Zelluläre Infiltration in der Lunge von weiblichen asthmatischen Mäusen

Die Pathologie des Asthmas bronchiale sowie einer Influenzavirus Infektion führen zu einer zellulären Infiltration der Lungen. Es wurde die zelluläre Infiltration in den Lungen von weiblichen asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen, die mit dem 2009 pH1N1 IAV infiziert wurden, untersucht. Es wurden sowohl die C57BL/6 als auch die 1SB6F1 Mäuse untersucht. Zudem wurde die zelluläre Infiltration der Kontrolle (PBS) und Asthma-Kontrolltieren untersucht. Dafür wurde die Leukozyten Populationen in der BAL-Flüssigkeit der Tiere gezählt (Kapitel 3.4.6).

4.1.4.1 Das C57BL/6 Modell

Im C57BL/6 Modell zeigten die Asthma-Kontrolltiere, 3 Tage nach intranasaler PBS-Gabe, in der BAL-Flüssigkeit, eine leicht erhöhte gesamte Zellzahl von Leukozyten in der BAL-Flüssigkeit ($101,9 \times 10^4 \pm 25,16$ Zellen/ml) im Vergleich zu den PBS-Kontrolltieren ($66,45 \times 10^4 \pm 31,16$ Zellen/ml). Ähnlich zeigten die Asthma-Kontrolle Mäuse ($109,8 \times 10^4 \pm 49,89$ Zellen/ml), 6 Tage nach Infektion eine erhöhte gesamte Zellzahl in der BAL-Flüssigkeit im Vergleich zu PBS-Kontrolle Mäusen ($15,65 \times 10^4 \pm 3,478$ Zellen/ml). Hier wiesen zwei der vier Kontrolltiere (Asthma) 6 Tage nach PBS-Gabe, eine ähnliche gesamte Zellzahl aus BAL-Flüssigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) auf. Zudem sind diese Unterschiede zwischen Kontrolle (PBS) und Asthma-Kontrolle 3 und 6 Tage nach PBS-Gabe nicht signifikant (Abbildung 20).

Ergebnisse

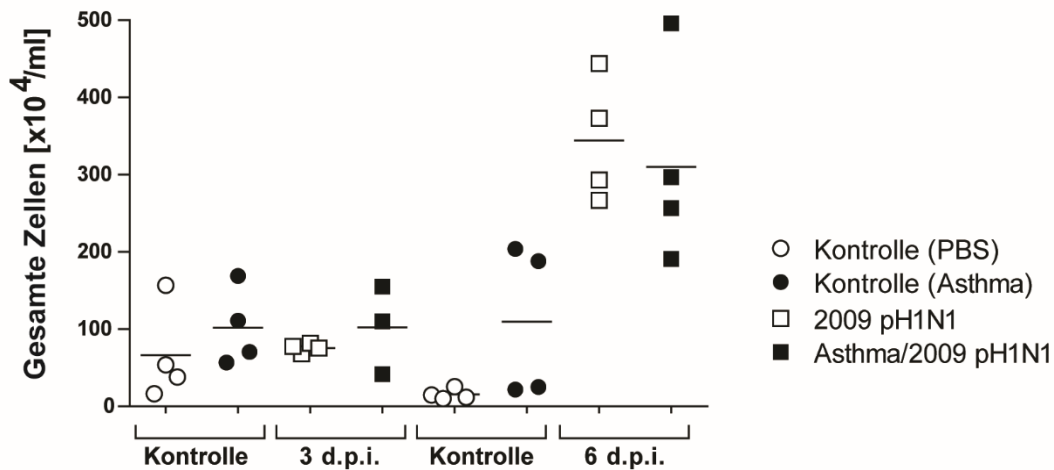


Abbildung 20: Einfluss von Asthma und Influenza auf die zelluläre Infiltration in den Lungen von weiblichen C57BL/6 Mäusen.

Nicht-asthmatische und asthmatische C57BL/6 Mäuse wurden intranasal mit 10^5 p.f.u./ml des 2009 pH1N1 IAV infiziert. An Tag 3 und 6 nach der Infektion (3 & 6 d p.i.) wurde von drei bis fünf Tieren pro Gruppe BAL gewonnen. Die gesamten lebenden Zellen wurde mittels eines automatischen Biorad® *counter* gezählt. Kontrolle (PBS) und Asthma-Kontrolle wurden mit PBS behandelt. Dargestellt ist die gesamte Zellzahl in der BAL der jeweiligen Tiere sowie die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen.

Drei Tage nach Infektion zeigten die infizierten asthmatischen C57BL/6 Mäuse (Asthma/2009 pH1N1) keinen Unterschied in der Gesamtzellzahl der BAL-Flüssigkeit im Vergleich zu nicht-asthmatischen C57BL/6 Mäusen (2009 pH1N1). Es konnte zudem kein signifikanter Unterschied zwischen den infizierten und den Kontrolltieren, 3 Tage nach Infektion festgestellt werden. Allerdings zeigten die infizierten nicht-asthmatischen und asthmatischen Tiere 6 Tage nach der Infektion, eine Erhöhung in der gesamten Zellzahl der BAL-Flüssigkeit im Vergleich zu 3 Tage nach der Infektion und im Vergleich zu den PBS-Kontrollen und Asthma-Kontrollen, 6 Tage nach der Infektion.

Die gesamte Leukozyten Zellzahl in infizierten nicht-asthmatischen Mäusen (2009 pH1N1) erreichte 6 Tage nach der Infektion einen Mittelwert von $344,25 \times 10^4 \pm 40,17$ Zellen/ml, wohingegen infizierte asthmatische Tiere (Asthma/2009 pH1N1), einen Mittelwert von $310,250 \times 10^4 \pm 65$ Zellen/ml erreichten (Abbildung 20). Zusammenfassend zeigten die asthmatischen C57BL/6 Mäusen vergleichbare zelluläre Infiltration in der BAL-Flüssigkeit als die nicht-asthmatischen Mäuse nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV.

4.1.4.2 Das 1SB6F1 Modell

Aus dem 1SB6F1 Modell wurden 3 und 6 Tage nach der Infektion bzw. 4 und 7 Tage nach der letzten Aerosol Behandlung BAL gewonnen und die gesamte Zellzahl bestimmt.

Die Asthma-Kontrolltiere zeigten 3 Tage nach intranasaler PBS Gabe in der BAL-Flüssigkeit eine signifikante erhöhte gesamte Zellzahl im Vergleich zu den PBS-Kontrolltieren. Die Asthma-Kontrolltiere zeigten eine gesamte Zellzahl von $91,70 \times 10^4 \pm 5,26$ Zellen/ml, wobei

Ergebnisse

die PBS-Kontrolltiere, eine gesamte Zellzahl von $19,03 \times 10^4 \pm 5,50$ Zellen/ml zeigten. Ebenfalls wurde 6 Tage nach PBS Gabe eine signifikante Erhöhung der gesamten Zellzahl in den Asthma-Kontrolltieren ($286 \times 10^4 \pm 80$ Zellen/ml) im Vergleich zu den PBS-Kontrolltieren ($11,2 \times 10^4 \pm 1,1$ Zellen/ml) beobachtet (Abbildung 16).

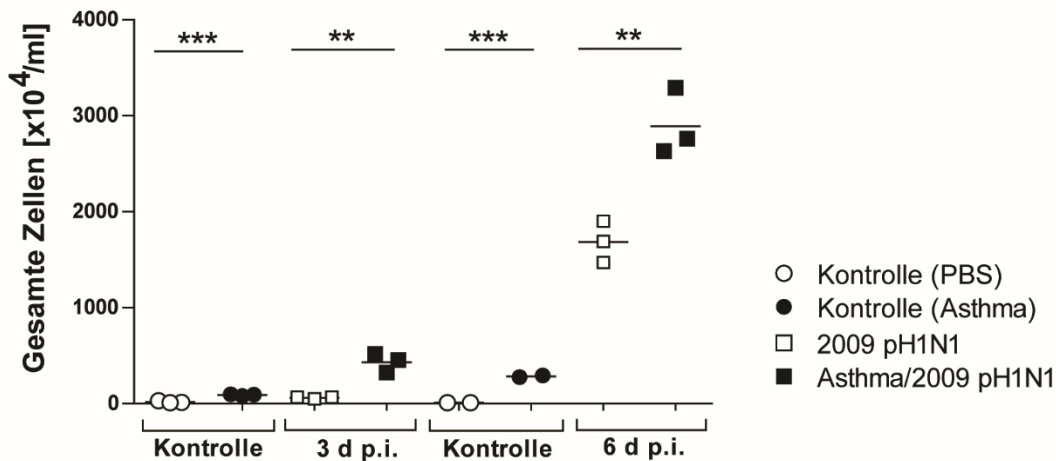


Abbildung 21: Einfluss von Asthma und Influenza auf die zelluläre Infiltration in den Lungen von weiblichen 1SB6F1 Mäusen.

Nicht-asthmatische und asthmatische 1SB6F1 Mäuse wurden intranasal mit 10^5 p.f.u./ml des 2009 pH1N1 IAV infiziert. An Tag 3 und 6 nach der Infektion (3 & 6 d p.i.) wurden von zwei bis drei Tieren pro Gruppe, die BAL gewonnen und die gesamten lebenden Zellen wurde mittels eines automatischen Biorad® counter gezählt. Kontrolle (PBS) und Asthma-Kontrolle wurden mit PBS behandelt. Dargestellt ist die gesamte Zellzahl der BAL der jeweiligen Tiere sowie die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen. Die statistische Relevanz der Ergebnisse wurde mithilfe des Student's t-Test in dem Programm GraphPad ermittelt (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Nach der Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV zeigten die infizierten nicht-asthmatischen (2009 pH1N1) und infizierten asthmatischen Mäuse (Asthma/2009 pH1N1) mehr Zellinfiltration bzw. eine signifikant erhöhte gesamte Zellzahl in der BAL-Flüssigkeit im Vergleich zu den nicht-infizierten PBS-Kontrolle und Asthma-Kontrolle. Dies wurde sowohl 3 Tage als auch 6 Tage nach der Infektion beobachtet. Zudem zeigten die infizierten asthmatischen Mäuse, (Asthma/2009 pH1N1) 3 Tage nach der Infektion eine signifikante Erhöhung ($432,7 \times 10^4 \pm 56,82$ Zellen/ml) der Zellinfiltration in der BAL-Flüssigkeit im Vergleich zu den infizierten nicht-asthmatischen Tieren, 2009 pH1N1 ($61,83 \times 10^4 \pm 56,82$ Zellen/ml). Diese gesteigerte Zellinfiltration wurde ebenfalls 6 Tage nach der Infektion beobachtet, wobei die gesamte Zellzahl in der BAL-Flüssigkeit von asthmatischen ($2893 \times 10^4 \pm 201,9$ Zellen/ml) und nicht-asthmatischen Mäusen ($1687 \times 10^4 \pm 124,1$ Zellen/ml) im Vergleich zu 3 Tage nach der Infektion signifikant erhöht war (Abbildung 16). Diese Daten korrelieren mit den histologischen Beobachtungen der Mauslungen im Kapitel 4.1.2.1.2.

4.1.5 Allergische IgE Antwort in weiblichen asthmatischen Mausmodellen

Um zu überprüfen, ob die Sensibilisierung gegenüber OVA erfolgreich stattgefunden hat und eine OVA-spezifische humorale Immunantwort erfolgreich induziert wurde, wurden im Serum OVA-spezifische IgE nachgewiesen. Es wurden Serum Proben von asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen, die mit dem 2009 pH1N1 IAV infiziert wurden, entnommen. Zudem wurden Serum Proben, von Kontrolltieren, die entweder mit PBS oder OVA behandelt wurden (Kapitel 3.4.1) entnommen. Dafür wurden die OVA-spezifischen IgE mittels Sandwich-ELISA gemessen (Kapitel 3.1.3).

4.1.5.1 Das C57BL/6 Modell

Als erstes wurden in den Serum Proben von C57BL/6 Mäusen OVA-spezifische IgE, 3 und 6 Tage nach der Infektion nachgewiesen. Es konnte beobachtet werden, dass die OVA-spezifische IgE Konzentrationen in den PBS-Kontrolltieren sowie in Tieren infiziert mit 2009 pH1N1 unter der Detektionsgrenze liegen.

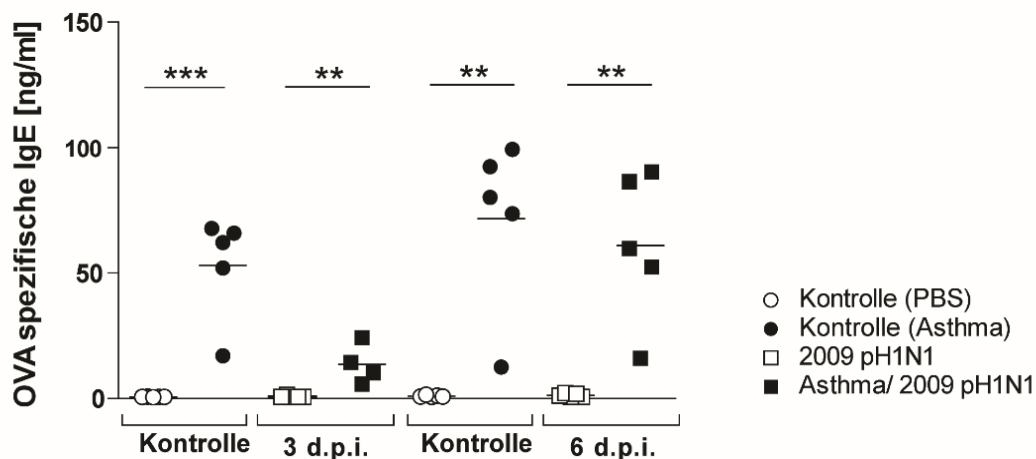


Abbildung 22: Konzentrationsbestimmung von OVA spezifischem IgE im Serum von nicht-asthmatischen und asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen.

Asthma bronchiale wurde in weiblichen C57BL/6 Mäusen mittels OVA induziert, Kontrolltiere wurden mit PBS behandelt. An Tag 29 wurden die Tiere intranasal mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert. PBS-Kontrolle und Asthma-Kontrolle Mäusen wurden mit PBS behandelt. An Tag 3 und 6 nach der Infektion (3 & 6 d p.i.) wurden von fünf Tieren pro Gruppe, Vollblut entnommen und Serum gewonnen. Dargestellt ist die OVA spezifische IgE Konzentration im Serum der jeweiligen Tiere sowie die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen. Die statistische Relevanz der Ergebnisse wurde mithilfe des Student's t-Test in dem Programm *GraphPad* ermittelt (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Asthma-Kontroll Mäuse zeigten 3 Tage nach Infektion eine signifikante erhöhte OVA-spezifische IgE Konzentration ($53,00 \pm 9,385$ ng/ml) im Serum im Vergleich zu den PBS Kontroll Tieren. Diese Beobachtung wurde ebenfalls 6 Tage nach der Infektion beobachtet, wobei die OVA-spezifische IgE Konzentration in den Asthma-Kontrolltieren, bis zu $71,63 \pm 15,45$ ng/ml stieg. Die asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäuse, die mit dem 2009

Ergebnisse

pH1N1 IAV infiziert wurden, zeigten 3 und 6 Tage nach der Infektion eine signifikante erhöhte IgE Konzentration im Vergleich zu den 2009 pH1N1 Mäusen. Zudem zeigten die infizierten asthmatischen Mäuse 3 Tage nach Infektion, eine signifikante Reduktion bis zu $13,72 \pm 3,931$ ng/ml in der OVA-spezifische IgE Konzentration im Vergleich zu den Asthma-Kontrolltieren. Interessanterweise zeigten infizierten asthmatischen Mäuse, 6 Tage nach der Infektion, eine signifikante erhöhte OVA-spezifische IgE Konzentration ($61,01 \pm 13,42$ ng/ml) als 3 Tage nach der Infektion ($13,72 \pm 3,931$ ng/ml). Die weiblichen asthmatischen C57BL/6 Mäuse zeigen nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV eine niedrigere IgE Konzentration 3 Tage p.i. und eine erhöhte IgE Konzentration 6 Tage p.i. im Vergleich zu den Asthma-Kontrolltieren.

4.1.5.2 Das 1SB6F1 Modell

Wie auch im C57BL/6 Modell wurde im 1SB6F1 Modell OVA-spezifische IgE, 3 und 6 Tage nach der Infektion nachgewiesen. In diesem Modell wurde ebenfalls beobachtet, dass die OVA-spezifische IgE Konzentration sowohl 3 als auch 6 Tage nach PBS Gabe, in der PBS-Kontrolltiere sowie in 2009 pH1N1 Tieren unter der Detektionsgrenze liegen.

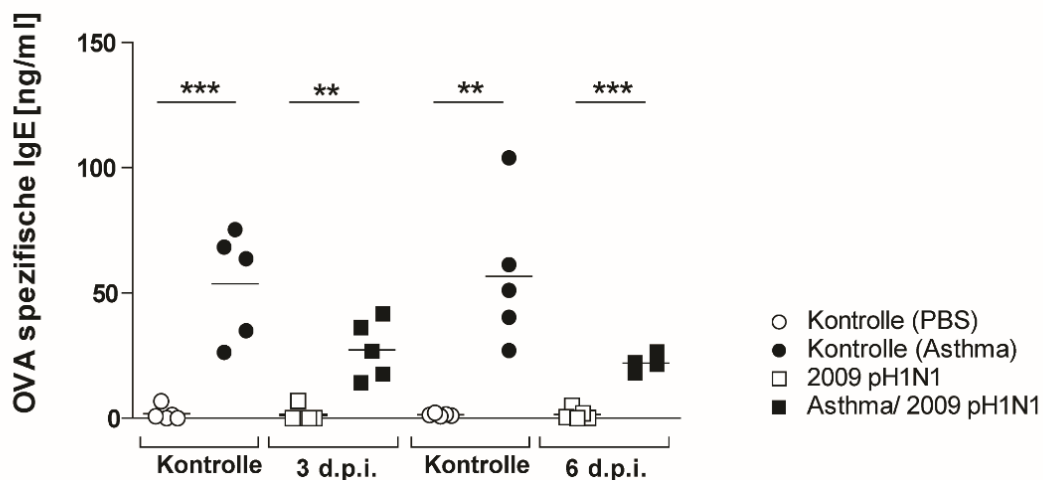


Abbildung 23: Konzentrationsbestimmung von OVA spezifischem IgE im Serum von nicht-asthmatischen und asthmatischen weiblichen 1SB6F1 Mäusen.

Asthma bronchiale wurde in weiblichen 1SB6F1 Mäusen mittels OVA induziert, Kontrolltiere wurden mit PBS behandelt. An Tag 29 wurden die Tiere intranasal mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert. PBS-Kontrolle und Asthma-Kontrolle Mäuse wurden mit PBS behandelt. An Tag 3 und 6 nach Infektion (3 & 6 d p.i.) wurden von fünf Tieren pro Gruppe Vollblut entnommen und Serum gewonnen. Dargestellt ist die OVA spezifische IgE Konzentration im Serum der jeweiligen Tiere sowie die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen. Die statistische Relevanz der Ergebnisse wurde mithilfe des Student's t-Test in dem Programm *GraphPad* ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Es konnte beobachtet werden, dass die Asthma-Kontroll Mäuse 3 Tage nach PBS Gabe eine signifikant erhöhte OVA-spezifische IgE Konzentration ($53,7 \pm 9,7$ ng/ml) zeigten als die

Ergebnisse

PBS-Kontrolle Mäuse. Wobei diese Erhöhung der OVA-spezifische IgE Konzentration bis zu 6 Tage nach PBS Gabe bzw. 7 Tage nach der letzten OVA Aerosol Behandlung anhielt ($56,73 \pm 13,9$ ng/ml). Die asthmatischen 1SB6F1 Mäuse, die mit dem 2009 pH1N1 IAV infiziert wurden, zeigten 3 Tage nach der Infektion eine signifikant erhöhte IgE Konzentration ($27,32 \pm 5,249$ ng/ml) im Vergleich zu den Mäusen infiziert mit 2009 pH1N1. Ebenfalls 6 Tage nach der Infektion wurde eine erhöhte IgE Konzentration in den asthmatischen 1SB6F1 Mäusen ($22,07 \pm 1,710$ ng/ml) im Vergleich zu nicht-asthmatischen Mäusen beobachtet.

Interessanterweise zeigten die infizierte asthmatische 1SB6F1 Mäuse eine ähnlich niedrige OVA-spezifische IgE Konzentration im Serum 3 und 6 Tage nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV (Abbildung 23). Zusammenfassend kann man sagen, dass die weiblichen asthmatischen 1SB6F1 Mäuse nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV eine niedrigere OVA spezifische IgE Konzentration im Vergleich zu den Asthma-Kontrolle Mäusen zeigten.

4.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Asthma Mausmodell von Influenza

Die Asthma Pathologie zeigt ein Geschlechtsunterschied, welcher sich im Verlauf des Lebens verändert. Demnach haben Jungen, bis 10 Jahre im Vergleich zu Mädchen eine erhöhte Prävalenz an Asthma und Allergie zu leiden. Dies ändert sich nach der Pubertät, von hoher Prävalenz in Jungen zu hoher Prävalenz im Mädchen. Um diese bereits bekannten Geschlechtsunterschiede bei Asthma in unserem Mausmodell zu untersuchen, wurden männliche asthmatische und nicht-asthmatische 1SB6F1 Mäuse mit dem 2009 pH1N1 IAV infiziert. In den folgenden Abschnitten werden die Pathogenese, die Untersuchung der Lungentropismus und die allergische IgE Immunantwort vorgestellt.

4.2.1 2009 pH1N1 Pathogenese im männlichen asthmatischen Mausmodell

Als erstes wurde die Pathogenität von 2009 pH1N1 IAV in männlichen 1SB6F1 Mäusen untersucht. Es wurde basierend auf den vorherigen Experimenten, asthmatische und nicht-asthmatische Tieren mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert und Gewichtsverläufe und Überleben über 14 Tage protokolliert.

Ergebnisse

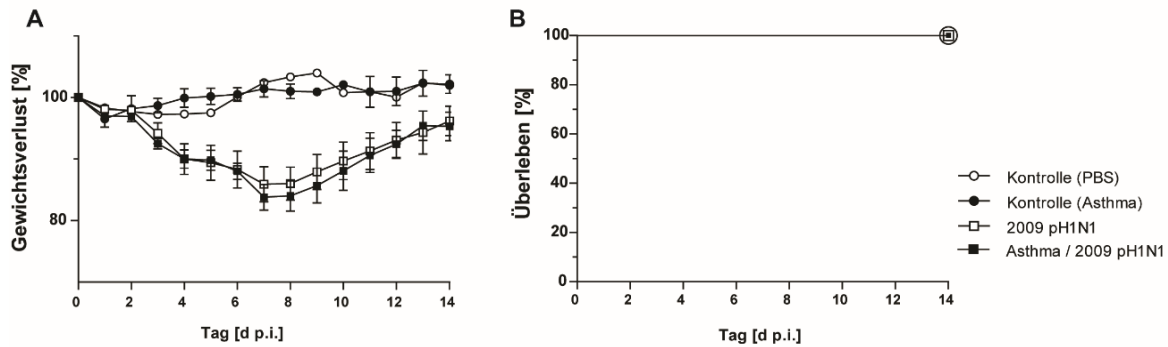


Abbildung 24: Pathogenität des 2009 pH1N1 IAV in männlichen nicht-asthmatischen und asthmatischen 1SB6F1 Mäusen

Männliche nicht-asthmatische (weiße Quadrat) und asthmatische (schwarze Quadrat) 1SB6F1 Mäuse wurden intranasal mit 10^5 p.f.u. ($n=5$) des 2009 pH1N1 infiziert. Gewichtsverläufe (A) und Überlebensraten (B) wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen nach der Infektion verfolgt. Kontrolle (PBS) und Asthma-Kontrolle Mäuse wurden mit PBS behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen, sowie die Gewichtsverläufe mit Standardabweichungen.

Es konnte beobachtet werden, dass die infizierten männlichen nicht-asthmatischen und asthmatischen 1SB6F1 Mäuse Gewichtsverluste von bis zu 20 % des Ausgangsgewichts aufwiesen. Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Gewichtsverlusten zwischen infizierte nicht-asthmatischen und asthmatischen männlichen C57B/6xSVJ129 Mäusen gezeigt werden (Abbildung 19A). Es konnte kein Unterschied in der Überlebensrate zwischen asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV beobachtet werden. Die Infektion führte zu 100%-igen Überlebensrate (Abbildung 19B) sowohl in nicht-asthmatischen als auch in asthmatischen männlichen 1SB6F1 Mäusen. Die Induktion von Asthma in der männlichen 1SB6F1 Mäusen zeigt keinen Einfluss auf die Pathogenität der 2009 pH1N1 IAV.

4.2.2 Lungentropismus im männlichen asthmatischen Mausmodell

Um den Lungentropismus in den asthmatischen männlichen Mäusen nach einer Influenza Infektion zu überprüfen, wurde die Viruslast in der Lunge und der BAL-Flüssigkeit von asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen, die mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert wurden, bestimmt. Dafür wurden die Lungen an Tag 3 und 6 Tage nach der Infektion entnommen und die BAL-Flüssigkeit aus den Lungen an Tag 3 nach der Infektion gewonnen (Kapitel 3.4.4.2). Die Viruslast wurde mittels Plaque Test (Kapitel 3.3.4) bestimmt.

Ergebnisse

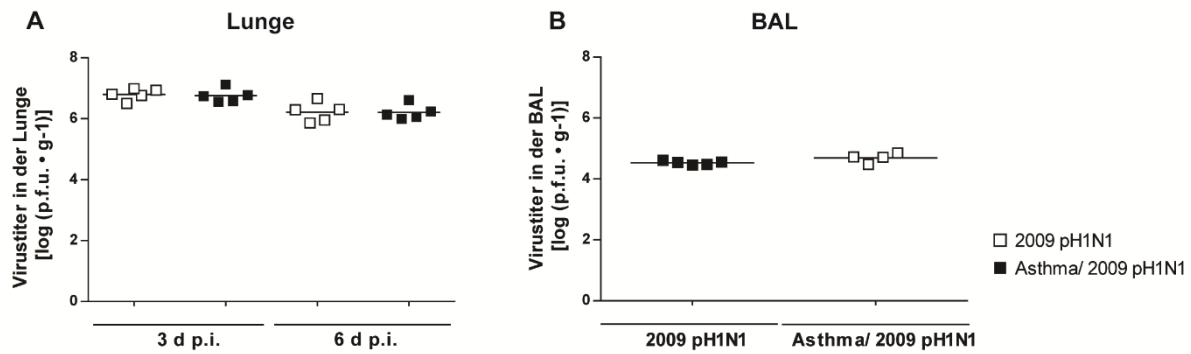


Abbildung 25: Virustiter in der Lunge und BAL von männlichen nicht-asthmatischen und asthmatischen 1SB6F1 Mäusen nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV.

Nicht-asthmatische (weißes Quadrat) und asthmatische (schwarzes Quadrat) männliche 1SB6F1 Mäuse wurden intranasal mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert. An Tag 3 und 6 nach der Infektion (3 & 6 d p.i.) wurde von fünf Tieren pro Gruppe, die Lungen entnommen und an Tag 3 die BAL gewonnen. Der Virustiter wurden mittels Plaque Test bestimmt und in \log (p.f.u./g) nach Normalisierung des Virustiters mit dem Gewicht des Organstückes angegeben. Dargestellt sind die Lungentiter (A) und die BAL-Titer (B) der jeweiligen Tiere sowie die Mittelwerte.

Es konnte beobachtet werden, dass die Lungen von asthmatischen und nicht-asthmatischen männlichen 1SB6F1 Mäusen 3 Tage nach der Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV eine leicht erhöhte Viruslast aufwiesen im Gegensatz zu asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen 6 Tage nach Infektion. Jedoch konnte kein Unterschied in den Virustitern zwischen asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen, sowohl 3 als auch 6 Tage nach der Infektion, beobachtet werden (Abbildung 20A).

Ebenfalls wurde 3 Tage nach der Infektion die Viruslast in der BAL-Flüssigkeit bestimmt. Hier konnte ebenso kein Unterschied in der Viruslast zwischen nicht-asthmatischen und asthmatischen männlichen 1SB6F1 Mäusen nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 beobachtet werden (Abbildung 20B). Es konnte kein Unterschied in der Viruslast zwischen den nicht-asthmatischen und die asthmatischen männlichen 1SB6F1 Mäusen beobachtet werden. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Pathogenität der Influenzainfektion in den männlichen 1SB6F1 Mäusen (Kapitel 1.2.1).

4.2.3 Allergische IgE Antwort in männlichen asthmatischen Mausmodell

Um die OVA-spezifische allergische Immunantwort in diesem Modell zu bestimmen und zu überprüfen, wurde die OVA-spezifische IgE Konzentration im Serum mittels ELISA bestimmt (Kapitel 3.1.3). Hier wurde beobachtet, dass die OVA-spezifische IgE Konzentration sowohl 3 als auch 6 Tage nach PBS Gabe, in den PBS-Kontrolltieren sowie in 2009 pH1N1 Tieren unter der Detektionsgrenze liegen.

Ergebnisse

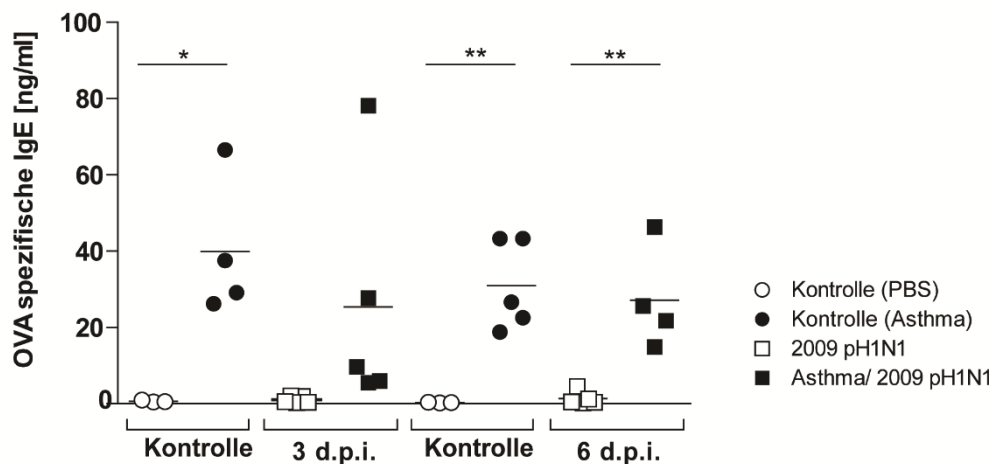


Abbildung 26: Konzentrationsbestimmung von OVA spezifischem IgE im Serum von nicht-asthmatischen und asthmatischen männlichen 1SB6F1 Mäusen.

Asthma bronchiale wurde in männlichen 1SB6F1 Mäusen mittels OVA induziert, Kontrolltiere wurden mit PBS behandelt. An Tag 29 wurden die Tiere intranasal mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert. PBS-Kontrolle und Asthma-Kontrolle Mäuse wurden mit PBS behandelt. An Tag 3 und 6 nach der Infektion (3 & 6 d.p.i.) wurden von drei bis fünf Tieren pro Gruppe, Vollblut entnommen und Serum gewonnen. Dargestellt ist die OVA spezifische IgE Konzentration im Serum der jeweiligen Tiere sowie die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen. Die statistische Relevanz der Ergebnisse wurde mithilfe des Student's t-Test in dem Programm GraphPad ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Wie erwartet zeigten die PBS-Kontrolltiere und die infizierten nicht-asthmatischen Mäuse, 3 und 6 Tage p.i., OVA spezifische IgE Konzentration unter dem Detektionslimit.

Die männlichen Asthma-Kontroll Mäuse zeigten 3 Tage p.i. bzw. 4 Tage nach der letzte OVA Aerosol Behandlung eine erhöhte OVA spezifische IgE Konzentration ($39,86 \pm 9,216$ ng/ml im Serum). Die OVA spezifische IgE Konzentration senkte sich auf ca. $30,92 \pm 5,2$ ng/ml 6 Tage p.i. bzw. 7 Tage nach der letzte OVA Aerosol Behandlung ab. Im Vergleich zeigten die asthmatischen 1SB6F1 Mäusen 3 Tage p.i. mit dem 2009 pH1N1 IAV eine niedrigere IgE Konzentration ($25,37 \pm 13,80$ ng/ml). Wobei hier nur ein Tier eine sehr hohe IgE Konzentration im Vergleich zu den anderen Tieren der infizierten asthmatischen Gruppe zeigte. Ebenfalls war 6 Tage p.i. die OVA spezifische IgE Konzentration in den infizierten asthmatischen Mäusen niedrig (Abbildung 26).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die männlichen asthmatischen 1SB6F1 Mäuse nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV eine niedrigere OVA spezifische IgE Konzentration im Vergleich zu den Asthma-Kontrolle Mäusen zeigten.

4.3 Transkriptomanalyse der Lunge im weiblichen Asthma Mausmodell von Influenza

Als letztes wurden beide Mausmodelle, das weibliche C57BL/6 Modell, welches die klinischen Daten nicht widerspiegelt und unser neues präklinisches weibliches 1SB6F1 Modell, welches die klinischen Daten widerspiegelt, verglichen.

Ziel dieser Analyse war es zum einen, mögliche Marker, die die beobachteten Unterschiede in der Pathogenität erklären können, zu enthüllen. Zum anderen könnten Gene oder Signalwege herausgefunden werden, welchen in die jeweiligen Modelle, unterschiedlich exprimiert wurden und somit höchstwahrscheinlich eine Rolle bei schweren Infektionsverläufen von asthmatischen Mäusen spielen können. Hierfür wurde die gesamte RNA aus den Lungen von jeweils drei weiblichen asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV sowie aus PBS und Asthma Kontrolltieren isoliert (Kapitel 3.1.1). Die RNA wurde anschließend sequenziert (Kapitel 3.1.2) und die Expression der differenziell exprimierten Gene mittels *HeatMaps*, Protein-Protein Interaktionen und Gen-Ontologie analysiert und verglichen (Kapitel 3.1.3).

4.3.1 Differentielle Genexpression und Protein-Protein-Interaktionsanalysen in weiblichen asthmatischen Mausmodellen

Um beide Mausmodelle zu vergleichen, wurden als erstes die signifikant differentiell exprimierten Gene innerhalb eines Modells verglichen und analysiert. Die Vergleiche erfolgten wie folgt:

1. Kontrolle (PBS) vs. Kontrolle (Asthma)
2. Kontrolle (PBS) vs. 2009 pH1N1
3. Kontrolle (PBS) vs. Asthma/2009 pH1N1
4. Kontrolle (Asthma) vs. Asthma/2009 pH1N1

Die Genexpression wurde anschließend aus mathematisch zusammengesetzten Proben aus drei Mäusen pro Gruppe dargestellt. Als letztes wurden alle Gruppen der weiblichen C57BL/6 und der weiblichen 1SB6F1 Mäuse miteinander verglichen. Um den gewonnenen Datensatz spezifischer und signifikanter darzustellen, wurde die obere und untere Grenze bei $\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq -2$ und $+2$ gesetzt und in einer *HeatMap* dargestellt (Kapitel 3.1.3). Die insgesamt 95 signifikant differentiell exprimierten Gene wurden entsprechend ihrer Expressionsprofile in 5 Cluster (A, B, C, D und E) unterteilt (Abbildung 27, Anhang Tabelle 4).

Der Cluster A (10,52% der Gene) zeigte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mausmodellen. In Cluster B (26,31% der Gene) konnte eine Erhöhung in der Expression von pro-inflammatorischen Chemokinen (u.a. Ccl7, Ccl2, Ccr5) in den infizierten C57BL/6 im

Ergebnisse

Vergleich zu den infizierten 1SB6F1 Mäusen aufgewiesen werden. Im Komorbidität Modell waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

Interessant waren die stark erhöhten Expressionslevel von 63,15% der Gene im Cluster C, D und E in asthmatischen 1SB6F1 Mäusen nach Infektion im Vergleich zu den infizierten asthmatischen C57BL/6 Mäusen (Abbildung 27). Eine Ausnahme dieser erhöhten Expressionsmuster stellte der Marker für regulatorische T-Zellen (Il2ra Gene) dar. Dieser wurde in asthmatischen 1SB6F1 Mäusen niedriger exprimiert als in asthmatischen C57BL/6 Mäusen.

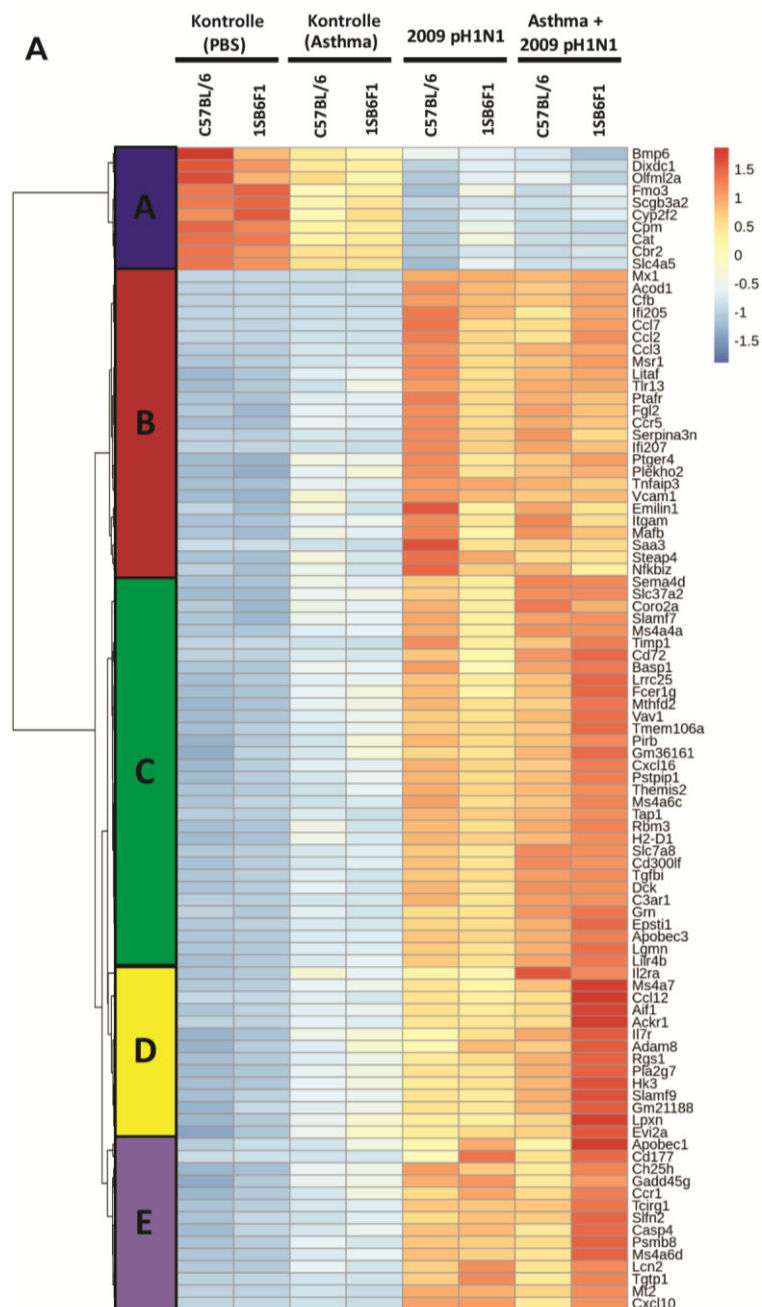


Abbildung 27: Expression von differentiell exprimierten Genen in der Lunge von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen 3 Tage nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV.

Die differentielle Expression von murinen Genen wurde in der Lunge 3 Tage p.i. mittels RNA-seq analysiert. Nicht-asthmatische und asthmatische Mäuse wurden mit 10^5 p.f.u des 2009 pH1N1 IAV infiziert. Kontrolltiere

Ergebnisse

erhielten PBS. Die *Heatmaps* zeigen die normalisierte Expression von differentiell exprimierten Genen. Die Gene wurden entsprechend ihrer Expressionsprofile in Cluster eingeteilt. Die höchsten Expressionslevel wurden in rot und die niedrigsten Expressionslevel in blau dargestellt. Gezeigt werden die Ergebnisse aus mathematisch zusammengesetzten Proben aus drei Mäusen pro Gruppe. Die obere und untere Grenze wurde auf $\log_2\text{Foldchange} \geq +2$ und -2 gesetzt.

Es konnte 6 Tage p.i. 26 differentiell exprimierte Gene, aufteilt in 3 Cluster (A, B und C), identifiziert werden (Anhang, Abbildung 36, Anhang Tabelle 7). Es konnte eine erhöhte Expression von Genen involviert in zelluläre Mechanismen, Chemokin Signalwege (Ccr5), Komplementsystem (C1qa, C1qb, C1qc) in den infizierten 1SB6F1 Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen gefunden werden. Allerdings wurde kein signifikanter Unterschied in den Expressionsmustern der asthmatischen Mäuse beider Modelle beobachtet (Anhang, Abbildung 36, Anhang Tabelle 7).

Wir haben uns für die weiteren Analysen auf die Cluster C, D und E fokussiert, da hier die größte signifikante Unterschied zwischen den asthmatischen infizierten Mäusen gezeigt wurden.

Als nächstes wurde überprüft, ob es innerhalb der Cluster (Cluster C, D und E) mögliche Interaktionspartner gibt, die eventuell signifikante Targets, für spätere Analyse- sowie Therapiemöglichkeiten enthüllen könnten. Hierfür wurde eine Protein-Protein-Interaktionsanalyse der Gene mittels des online Tools STRING 10.0 durchgeführt und die Interaktion weiter mittels der Software *Cytoscape* visualisiert (Kapitel 3.1.3.1). Basierend auf der zusammengefassten Interaktionsliste aus der STRING Analyse wurde eine Protein-Protein-Interaktions Mappe mittels *Cytoscape* herstellt, wobei Proteine mit keinem beschriebenen Interaktionspartner unten aufgelistet wurden (Abbildung 28).

Zwei Hauptcluster mit jeweils einem zentralen Protein wurden erkennbar, wobei die zentralen Proteine und ihre direkten Interaktionspartner farblich markiert wurden. Der erste Cluster (blau), wurde um die pro-inflammatorischen Chemokine Cxcl10 und der zweiten, um der hochaffine gamma Untereinheit der IgE-Rezeptor (Fcer1g) (rot) gezeichnet (Abbildung 28).

Eine Gen-Ontologie Analyse beider Cluster konnten zeigen, der blaue Cluster, mit der vermittelten angeborenen Immunantwort verknüpft ist und der rot markierte Cluster, mit der humoralen Immunität (Abbildung 28).

Die Daten lassen vermuten, dass die asthmatischen 1SB6F1 eine erhöhte angeborene und humorale Immunität 3 Tage nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV zeigen als die asthmatischen C57BL/6 Mäusen

Ergebnisse

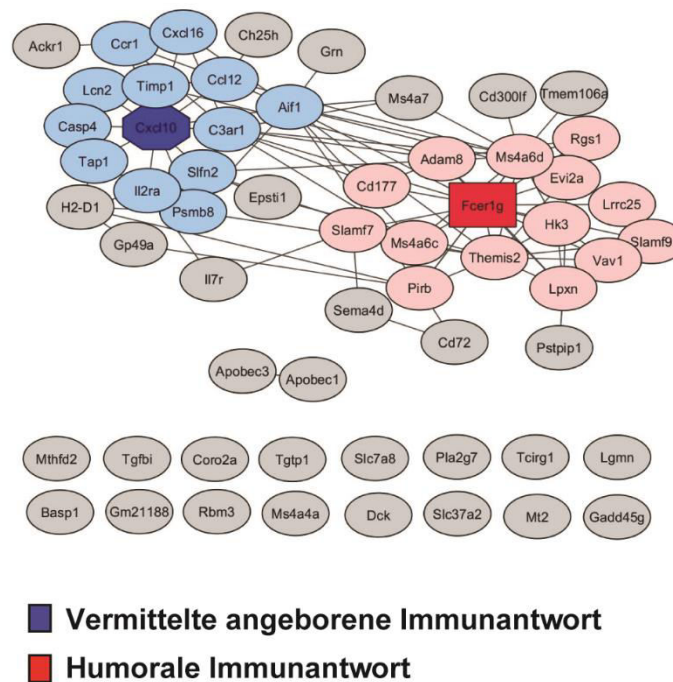


Abbildung 28: Protein-Protein Interaktion von differentiell exprimierten Genen von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen nach 2009 pH1N1 IAV Infektion.

Gezeigt ist das Proteine-Interaktionsnetzwerk der Cluster C, D und E aus der Analyse der differentiell exprimierten Gene 3 Tage nach Infektion. Das Netzwerk wurde mit Hilfe von STRING und Cytoscape hergestellt. Zwei Hauptcluster wurden offenbart und entsprechend unterschiedlich farbig markiert. Die zentralen Proteine wurden jeweils als Hexagone oder Rechteck markiert und die dazugehörigen erste Interaktionspartnern als hellblau bzw. rosa Ellipse markiert. Proteine mit keinem beschriebenen Interaktionspartner wurden unten aufgelistet.

Zusätzlich wurde eine Gen-Ontologie Analyse der Gene im Cluster C, D und E, mittels *Over Representation Analysis* (ORA) durchgeführt, um biologische Prozesse herauszufinden, in den die Gene beteiligt sind. Die Abbildung 29A zeigt die Top 10 Gen-Ontologie aus der Gene der Cluster C, D und E.

Alle Top 10 signifikante Gen-Ontologie in dieser Analyse waren assoziiert mit der allgemeinen Immunantwort, insbesondere der angeborenen Immunantwort, sowie der pro-inflammatorischen Immunantwort.

Die pro-inflammatorischen Chemokine, assoziiert mit der Abwehr gegen eine virale Infektion, wie Ccl10, Cxcl16, Ccl12 und Ccr1 waren dabei in den infizierten asthmatischen 1SB6F1 Mäusen hochreguliert im Vergleich zu den infizierten asthmatischen C57BL/6 Mäusen. Zudem waren Gene, die in der Leukozyten Migration in der Lungen beteiligt sind, was auch Teil einer gut funktionierenden Immunantwort ist, ebenfalls hochreguliert in die infizierten asthmatischen 1SB6F1 Mäusen (Abbildung 29A, Anhang Tabelle 5). Die Leukozyten Migration wurde ebenfalls in der oben gezeigte Histologie (Kapitel 4.1.2.2) und in der zellulären Infiltration (Kapitel 4.1.4) bestätigt.

Ergebnisse

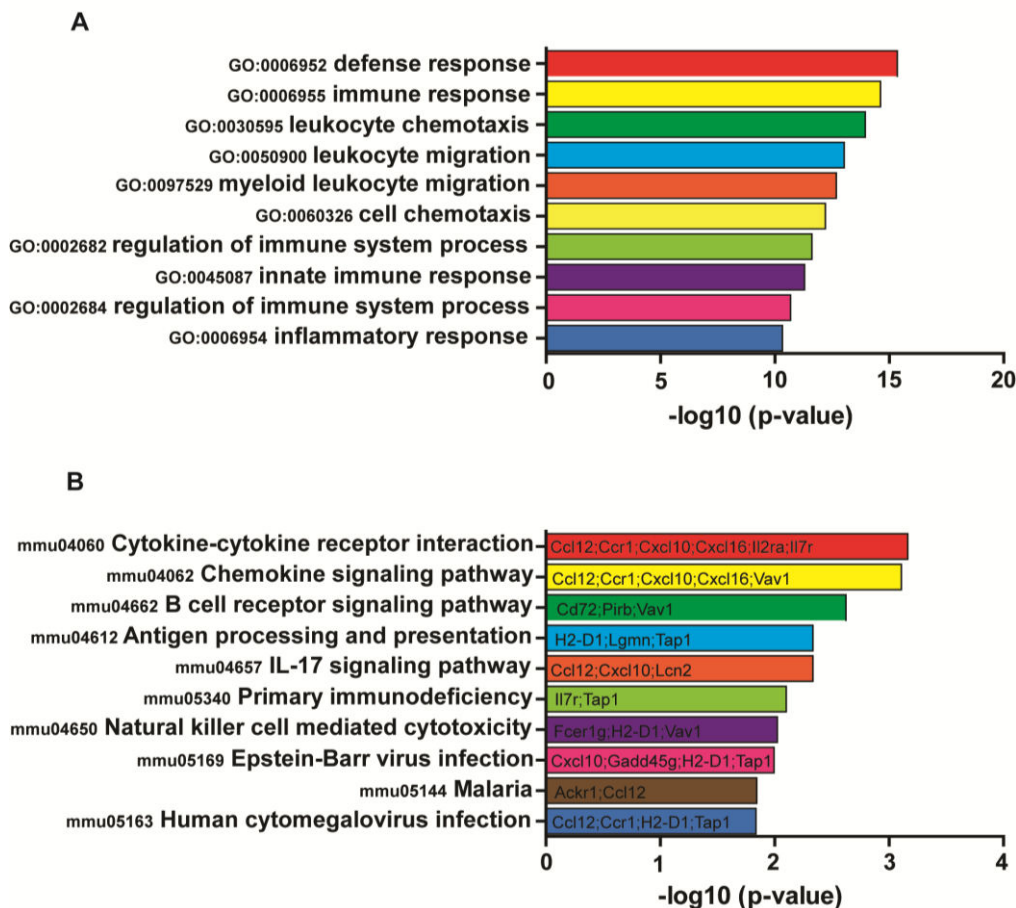


Abbildung 29: Gen-Ontologie und KEGG-Signalweg Analyse von signifikanten hochregulierten Genen im asthmatischen 1SB6F1 Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen 3 Tage p.i..

(A) Basierend auf den DEGs, sind die Top 10 angereicherte Gen-Ontologie für biologische Prozesse aus den differentiell exprimierten Genen aus den Clustern C, D und E 3 Tage nach der Infektion gezeigt. (B) Gezeigt ist der Top 10 der signifikanten KEGG-Signalwege von den Genen aus Cluster C, D und E, 3 Tage nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV. Diese Analyse wurde mittels *Webgestalt* Online Tool hergestellt. Die GO und die KEGG-Signalwege wurden entsprechend ihrer p-Werte gezeigt.

Als letztes wurde mittels der Datenbank KEGG, biologische Signalwege und Erkrankung bei den die Gene aus Cluster C, D und E involviert sind, untersucht (Abbildung 29B).

Hier wurden ebenfalls die Top 10 signifikanten hochregulierten KEGG-Signalwege in der asthmatischen 1SB6F1 Mäusen im Vergleich zu den asthmatischen C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV dargestellt (Abbildung 29B).

Wie erwartet, waren Zytokin-Zytokin Rezeptor Interaktion sowie Chemokin Signalwege (u.a. durch die Genen Cxcl10, Cxcl16, Ccl12, Ccr1, Il7r repräsentiert) in den asthmatische 1SB6F1 Mäusen im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen erhöht. Zudem konnten die B-Zell und Immunglobulin assoziierten Genen, wie Cd72 und Pirb, welche in den asthmatischen 1SB6F1 Mäusen erhöht waren, erkannt werden. Interessanterweise zeigte die KEGG-Analyse, dass die Gene Ccl12, Cxcl10 und Lcn2, Teil der IL-17 Signalwege sind. Diese waren ebenfalls in asthmatischen 1SB6F1 Mäusen nach der Infektion erhöht (Abbildung 29, Anhang Tabelle 6).

Ergebnisse

Zusammenfassend zeigen diese Daten eine erhöhte pro-inflammatorische Zytokin- und Chemokin- Expression, eine erhöhte Aktivierung der angeborene Immunantwort sowie eine erhöhte Immunglobulin-vermittelte Antwort in den 1SB6F1 Mäusen 3 Tage nach der Infektion mit dem 2009 pH1N1 im Vergleich zu den asthmatischen C57BL/6 Mäusen.

4.3.2 Expression von Interferon-stimulierenden Genen in weiblichen Asthma bronchiale Mausmodellen (ISGs)

Die allgemeine Transkriptomanalyse der Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen 3 Tage nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV (Kapitel 4.3.1) sowie die Gen-Ontologie und die KEGG-Signalweg Analyse (Kapitel 4.3.2) konnten signifikant erhöhte Expressionslevel von Genen, involviert in die Immunantwort und vor allem in die pro-inflammatorische Immunantwort, zeigen (Kapitel 4.3.1). Basierend auf diesen Erkenntnissen wollten wir den Effekt von Asthma und einer Infektion mit 2009 pH1N1 IAV auf den Genen der angeborenen Immunantwort mit antiviraler Aktivität aufklären.

Hierfür wurden die differentiell exprimierten Genen mit einer Liste von 82 Interferon-stimulierende Genen (ISG), mit bekannter Rolle in die angeborene Immunantwort verglichen (121,151,152). Die gewonnenen Daten aus beide Mausmodelle wurden ebenfalls miteinander verglichen und die signifikanten differentiell exprimierten Gene in *Heatmaps* basierend auf ihren Expressionsmustern zusammengeführt (Abbildung 30) Die Analysen zeigen ebenfalls die mathematischen zusammengeführten Ergebnisse aus drei Mäusen pro Gruppe (Abbildung 30 und Anhang, Abbildung 39). Es konnte interessanterweise eine stark erhöhte Expression von Genen der angeborenen Immunantwort 3 Tage p.i. in Asthma-Kontroll 1SB6F1 Mäusen im Vergleich zu Asthma-Kontroll C57BL/6 Mäusen beobachtet werden. Pro-inflammatorische Gene (u.a. Tnf, Il1b Ifnb1, Ifna4 und 5) und TLR-Signalwege Gene (z.B. Tlr1, 8 und 9) waren in Asthma-Kontrolle 1SB6F1 Mäusen stark hochreguliert (Abbildung 30A). Es konnte 6 Tage p.i. eine Erhöhung der T-Zell Aktivität, mit der erhöhten Expression von Cd4 und Cd8a Gene in den Asthma-Kontrolle 1SB6F1 Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen gezeigt werden (Anhang Abbildung 38A).

Diese Ergebnisse zeigen eine starke Induktion des angeborene Immunsystems bereits durch die Induktion von Asthma in den 1SB6F1 im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen (Abbildung 30A).

Ergebnisse

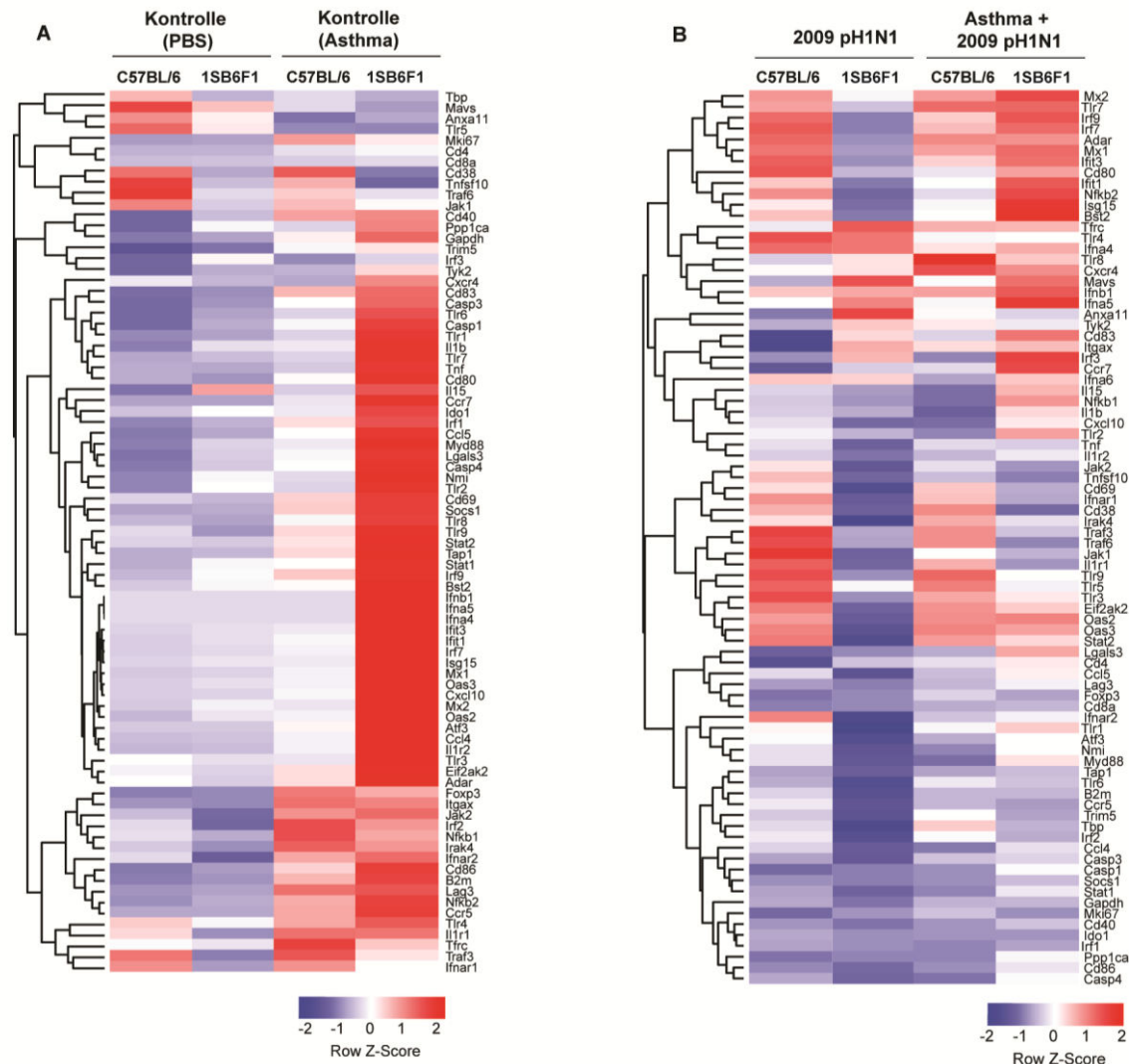


Abbildung 30: Expression von interferon-stimulierende Genen in den Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen 3 Tage nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV.

Die differentielle Expression von murinen ISGs wurde in der Lungen 3 Tage p.i. mittels RNA-seq analysiert. Nicht-asthmatische und asthmatische Mäuse wurden mit 10^5 p.f.u des 2009 pH1N1 IAV infiziert. Kontrolltiere erhielten PBS. Die *Heatmaps* zeigen die normalisierte Expression von differentiel exprimierten Genen der angeborenen Immunantwort mit antiviraler Aktivität. Die Gene wurden entsprechend ihrer Expressionsprofile in Cluster eingeteilt. Die höchsten Expressionslevel wurden im rot und die niedrigsten im blau dargestellt. Gezeigt werden die Ergebnisse aus mathematisch zusammengesetzter Probe aus drei Mäusen pro Gruppe. Die obere und untere Grenze für die Analyse wurde auf $\log_2\text{Foldchange} \geq +1$ und -1 gesetzt.

Nach der Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV (Abbildung 30B) konnte interessanterweise beobachtet werden, dass pro-inflammatorische Gene (u.a. Cxcl10, Il1b), Interferon-induzierte Gene (u.a. Isg15, Ifit1), NF- κ B (Nfkb1 und 2) sowie an NF- κ B-Signalwege beteiligte Gene (u.a. Mx1, Mx2, Irf3, Irf7, Mavs) in den asthmatischen 1SB6F1 Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen hochreguliert waren. Ebenfalls waren TLR-Signalwege (u.a. Lgals3 Tlr1, MyD88) in infizierten asthmatischen 1SB6F1 Mäusen hochreguliert im Vergleich zu asthmatischen C57BL/6 Mäusen.

Ergebnisse

Vergleicht man die nicht-asthmatischen und die asthmatischen C57BL/6 Mäuse, 3 Tag p.i. wurde ein ähnliches Expressionsmuster festgestellt, mit Ausnahme weniger Gene, die in den asthmatischen C57BL/6 Mäusen herunterreguliert sind (u.a. Cd80, Nfkb2, Tnfsf10, Ifnar2). Interessanterweise waren diese genannten Gene in unserem asthmatischen präklinischen Modell (1SB6F1) hochreguliert.

Diese Daten zeigen eine starke Induktion der angeborene Immunantwort, vor allem der antiviralen Immunantwort (NFkB- und Interferon-Signalwege) in unserem 1SB6F1 präklinischen Mausmodell im Vergleich zum C57BL/6 Mausmodell, welches die Wichtigkeit einer allogenen Immunantwort in der Pathogenese von asthmatische Mäusen nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV zeigt.

4.3.3 Dysregulierte zelluläre Faktoren in weiblichen Asthma bronchiale Mausmodellen

Alle bisherigen Daten konnten mehrere starke Unterschiede in der Pathogenität sowie der Immunantwort zwischen beiden Modellen zeigen. Um diese Unterschiede endgültig aufzuklären und somit auch zelluläre Faktoren herauszufinden, die diesen Unterschied in der Pathogenität erklären könnten, wurden nur die asthmatischen Mäuse der C57BL/6 Modell mit unserem präklinischen Mausmodell miteinander verglichen

Im Gegensatz zu den vorherigen Analysen, wurden hier die dysregulierten Gene aus den asthmatischen Lungen nicht vorher gegen Kontrolle (PBS) verglichen, um so die möglichen unterschiedlichen zellulären Faktoren zwischen den infizierten asthmatischen Mäusen gezielt zu filtern. Hierfür wurden ein MA-Plot angefertigt (Kapitel 3.1.3), wobei die Grenzen bei $\log_2\text{FoldChange} \geq -1$ und $+1$ gesetzt wurde, um die differentielle exprimierten Genen zwischen die infizierten asthmatischen C57BL/6 und die infizierten asthmatischen 1SB6F1 Mäuse zu visualisieren (Abbildung 31). Hierdurch konnte beobachtet werden, dass es keine großen Unterschiede in der Genexpression zelluläre Faktoren zwischen beiden Mausmodelle gibt (Abbildung 31).

Ergebnisse

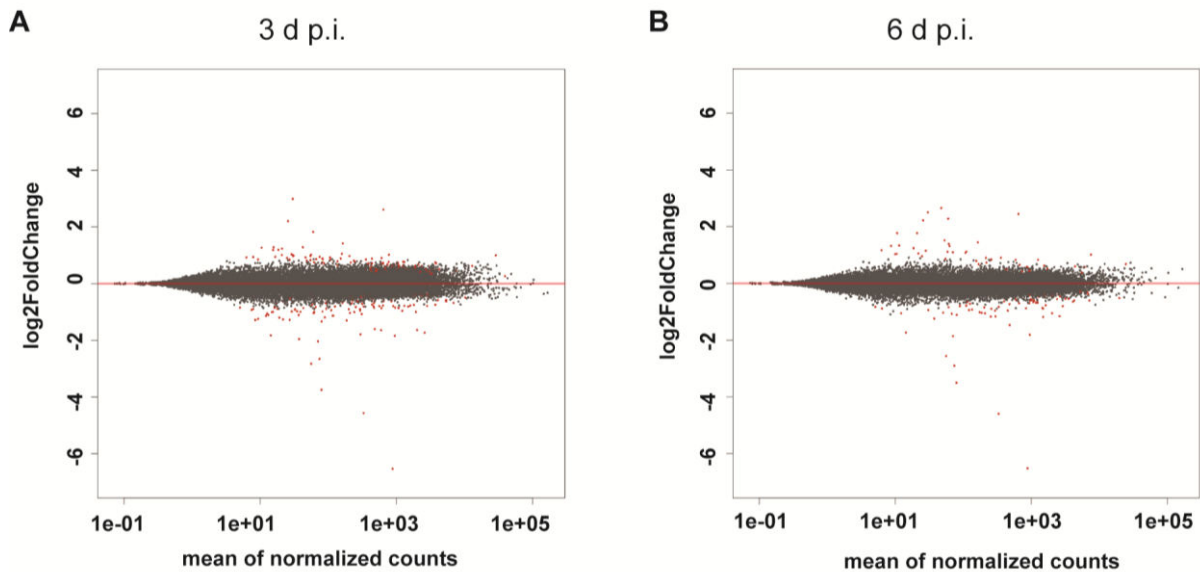


Abbildung 31: Differenziell regulierten Genen in asthmatischen C57BL/6 verglichen mit asthmatischen 1SB6F1 Mäusen nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV.

Die Lungen von asthmatischen C57BL/6 und 1SB6F1 Mäusen wurden 3 und 6 Tage nach Infektion mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV entnommen, die gesamte RNA isoliert und das Transkriptom sequenziert. Gezeigt sind MA-Plot Analyse der differenziell exprimierten Gene in infizierten asthmatischen C57BL/6 vs. C57BL6xSVJ129 Mäusen, 3 (A) und 6 (B) Tage p.i.. Die Mittelwerte der normalisierten gezählten Events ($n=3$ pro Gruppe) wurde gegen den log2FoldChange aufgetragen. Die markierten roten Punkte stellen signifikante dysregulierte Gene (Grenze bei log2FoldChange ≥ -1 & $+1$) dar.

Es wurde anschließend *Heatmaps* der unterschiedlichen differenziell exprimierten Genen zwischen infizierten asthmatischen C57BL/6 und infizierten asthmatischen 1SB6F1 Mäusen, 3 und 6 Tage p.i. hergestellt (Abbildung 32).

Es konnte gezeigt werden, dass 3 Tage p.i., 29 Gene signifikant dysreguliert in C57BL/6 Mäuse vs. 1SB6F1 Mäusen waren, davon waren 41,37% im C57BL/6 Mäusen hochreguliert (Cluster 1) und 58,62% im C57BL/6 Mäusen herunterreguliert (Cluster 2) (Abbildung 32A). Ähnlich 6 Tage p.i. konnte 30 signifikant dysregulierte Gene zwischen beiden Mausmodelle gezeigt werden, wobei 56,66% hochreguliert in C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu 1SB6F1 (Cluster 1) und 43,33% herunterreguliert (Cluster 2) (Abbildung 32B).

Die Immunglobulin Gene bildeten 3 Tage p.i., 6,89% alle dysregulierten Genen und 6 Tage p.i., 20% alle dysregulierten Genen. Zudem konnte man beobachten, dass die Immunglobulin-verwandten Gene, 3 Tage p.i. hochreguliert und 6 Tage p.i. herunterreguliert in den 1SB6F1 Mäusen vs. C57BL/6 Mäusen waren (Abbildung 32A und B). Diese Daten korrelieren mit den IgE Expressionsleveln im Serum (Kapitel 4.1.5) und die Ergebnisse der Analyse der differenziell exprimierten Gene (Kapitel 4.3.1).

Ergebnisse

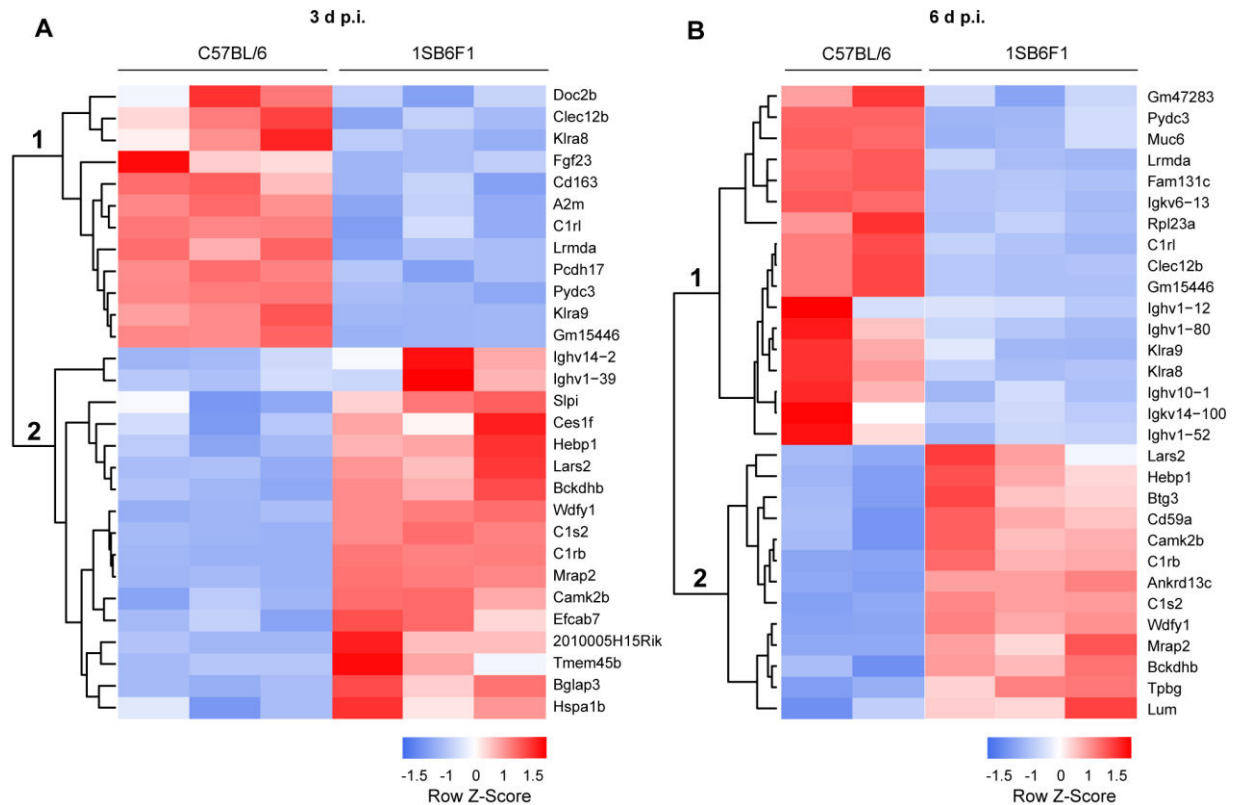


Abbildung 32: Expression von zellulären Faktoren in der Lunge von asthmatischen Mäusen nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV (A & B).

Vergleich von asthmatischen C57BL/6 und 1SB6F1 Mäusen nach Infektion mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV. Differentielle Expression von murinen zellulären Faktoren wurden mittels RNAseq analysiert. *Heatmaps* zeigen die normalisierte Expressionslevel der differenzielle Exprimierten Genen 3 und 6 Tage p.i.. Die Gene wurden entsprechend ihrer Expressionsprofile in Cluster eingeteilt. Die höchsten Expressionslevel wurden in rot und die niedrigsten in blau dargestellt. Die obere und untere Grenze wurde auf \log_2 Foldchange $\geq +1$ und -1 gesetzt.

Um zu untersuchen in welchen biologischen Vorgängen diese Gene über-exprimiert und beteiligt sind, wurden eine Gen-Ontologie Analyse für biologische Prozesse, mittels *Over Representation Analysis* (ORA) durchgeführt (Abbildung 33). Hier ist es wichtig zu erwähnen, dass alle Gene, die in den Immunglobulin Aufbau (Genen für die Immunglobulin schweren und leichten Ketten) involviert sind, von der Software für diese Gen-Ontologie nicht berücksichtigt wurden.

Es wurde gezeigt, dass die Gene, beteiligt in die Regulation der angeborene und der allgemeine Immunantwort in den infizierten asthmatischen 1SB6F1 Mäusen herunterreguliert waren im Vergleich zu den infizierten asthmatischen C57BL/6 Mäusen (Abbildung 33, Cluster 1). Zudem waren Gene, welchen mit der Regulierung der Proteinlokalisierung auf der Membran und der Peripherie assoziiert in den infizierten asthmatischen 1SB6F1 Mäusen hochreguliert im Vergleich zu den infizierten asthmatischen C57BL/6 Mäusen (Abbildung 33, Cluster 2). Hingegen 6 Tage p.i. zeigten die Gen-Ontologie (Anhang, Abbildung 30, Cluster 2) eine erhöhte Expression von Genen involviert in das Komplementsystem in den asthmatischen 1SB6F1 Mäusen im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen. Da die Immunglobulin-verwandten Gene nicht von der Gen-Ontologie Software erkannt wurde, war

Ergebnisse

der Anzahl an angegebenen Genen zu gering und die Gen-Ontologie des Cluster 1 könnte nicht ausgewertet werden (Anhang, Abbildung 30, Cluster 1).

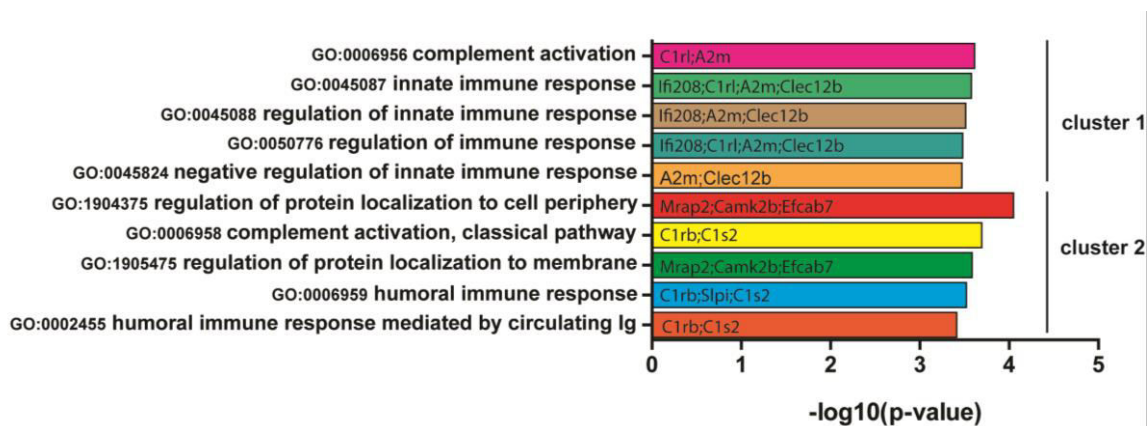


Abbildung 33: Gen-Ontologie für biologische Prozess von dysregulierten Genen in asthmatische Mäusen 3 Tage nach Influenza Infektion.

Weibliche asthmatische C57BL/6 und 1SB6F1 Mäusen wurden mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert. 3 und 6 Tage p.i. wurde aus drei Mäusen pro Gruppe die Lungen entnommen, RNA isoliert und das gesamte Transkriptom analysiert. Basierend auf den DEGs, sind die Top 5 angereicherten Gen-Ontologie für biologische Prozesse aus dem Vergleich von asthmatische C57BL/6 vs. asthmatische 1SB6F1 Mäusen nach der Infektion gezeigt. Die GO wurde entsprechend ihre p-Werte gezeigt.

Zusammenfassend lassen alle diese Ergebnisse auf grundlegende Unterschiede in der Immunantwort und der Immunglobulin-vermittelte Immunantwort zwischen beiden Mausmodellen zurückschließen. Die asthmatischen 1SB6F1 Mäuse weisen eine erhöhte Expression von Genen auf, die in die Immunantwort involviert sind.

4.4 OVA-spezifische IgE Depletion im weiblichen asthmatischen Mausmodell

Aus der OVA-spezifische allergische IgE Immunantwort (Kapitel 4.1.5), der differentiellen Genexpression (Kapitel 4.3.1), sowie der Analyse der zellulären Faktoren (Kapitel 4.3.4) konnten wir eine Dysregulation der IgE Expression 3 und 6 Tage p.i. in den asthmatischen 1SB6F1 Mäusen im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen feststellen. Dies lässt stark auf eine wichtige Rolle der IgE Expression in den asthmatischen Mauslungen als Faktor vermuten, der den Unterschied in der Pathogenität in den asthmatischen Mäusen beider Mausmodelle erklären könnte. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Protokoll etabliert, um in weiblichen asthmatischen C57BL/6 Mäusen, mit Hilfe eines anti-IgE Antikörpers, IgE zu depletieren. Anschließend wurden die asthmatischen Mäuse mit 10^3 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert (Kapitel 3.4.7). Ziel war die beobachtete erhöhte Pathogenität nach einer Influenzavirusinfektion in weiblichen asthmatischen 1SB6F1 Mäusen durch die IgE Depletion in C57BL/6 Mäusen zu zeigen.

Ergebnisse

Nach Asthma Induktion erhielten die Asthma-Kontrolltieren, Isotyp Antikörper als Kontrolle für die IgE Depletion. Man konnte beobachten, dass die Antikörper Behandlung bereits einen Effekt auf den Gewichtsverlust der Asthma-Isotypkontroll Mäuse zeigte, welche einen Gewichtsverlust von ca. 5% vom Ausgangsgewicht aufweisen.

Nach der Infektion zeigten die infizierten nicht-asthmatischen C57BL/6 Mäusen einen Gewichtsverlust von bis zu 17% vom Ausgangsgewicht (Abbildung 35A), aber wiesen eine Überlebensrate von 100% nach der Influenzainfektion auf (Abbildung 35B).

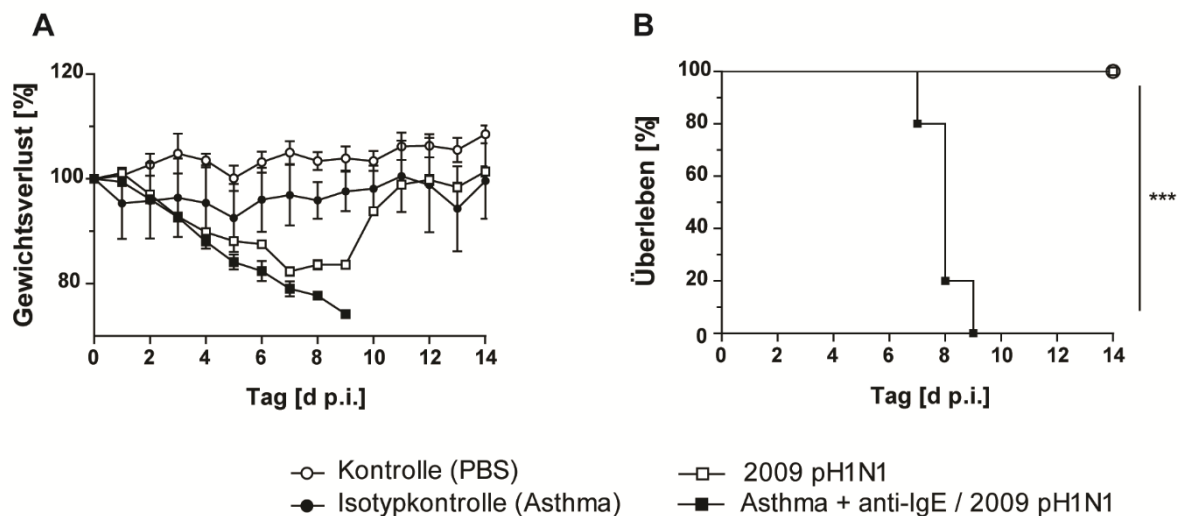


Abbildung 35: Effekt von anti-IgE Behandlung auf die Pathogenität des 2009 pH1N1 IAV in asthmatischen C57BL/6 Mäusen.

In weiblichen asthmatischen C57BL/6 Mäusen (schwarzes Quadrat) wurden eine anti-IgE Antikörper Behandlung i.p. durchgeführt. Die Asthma-Kontrolle Mäusen erhielten einen IgG Isotypkontrolle Antikörper als Kontrolle. Weiblichen nicht-asthmatischen (weißes Quadrat) und asthmatischen (schwarzes Quadrat) C57BL/6 Mäuse wurden intranasal mit 10^3 p.f.u. ($n = 5$) des 2009 pH1N1 infiziert. Gewichtsverläufe (A) und Überlebensraten (B) wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen nach der Infektion verfolgt. Kontrolle (PBS) und Asthma Isotypkontrolle Mäuse wurden mit PBS behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen, sowie die Gewichtsverläufe mit Standardabweichungen. Die statistische Relevanz der Ergebnisse wurde mithilfe des Student's t-Test in dem Programm GraphPad ermittelt (***) $p < 0,001$). In der Abbildung B wurde nur die Signifikanz von 2009 pH1N1 vs. Asthma+anti-IgE / 2009 pH1N1 dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass die infizierten asthmatischen C57BL/6 Mäuse, bei denen eine Anti-IgE Behandlung durchgeführt wurde, einen erhöhten Gewichtsverlust von bis 25% vom Ausgangsgewicht (Abbildung 35A) und eine 100%ige Letalität nach Influenzainfektion zeigten. Die Infektion führte bei den infizierten asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen zum Tod der Tiere zwischen Tag 7 und Tag 9 (Abbildung 35B).

Wir konnten durch die Behandlung mit dem anti-IgE Antikörper eine erhöhte Pathogenität in asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV erzielen. Diese Daten sprechen dafür, dass IgE eine schützende Wirkung auf die Influenza-induzierte Pathogenese im Mausmodell hat.

5 Diskussion

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse aus Kapitel 4, welche in C57BL/6 und 1SB6F1 Mausmodellen erworben wurden im Kontext der aktuellen Literatur kritisch diskutiert.

5.1 Asthma als Komorbidität während der 2009 Influenza Pandemie

Verschiedene epidemiologische Studien konnten eine positive Korrelation zwischen Asthma-Exazerbation und viralen Infektionen feststellen (62). Es wurde bei 80-85% der untersuchten Kinder mit akutem Asthma-Exazerbation eine virale Infektion der Atemwege detektiert (63,64). Es wurde festgestellt, dass respiratorische Viren die Hauptsache für Asthma Exazerbation im Kinder und Erwachsenen sind (153). Die CDC und mehreren epidemiologische Analyse haben gezeigt, dass Asthma die häufigste Komorbidität bei hospitalisierten Patienten während der 2009 Influenza Pandemie war (47,59,60). Zudem wurde gezeigt, dass Kinder mit Asthma eine erhöhte Anfälligkeit für die Infektion mit dem 2009 pH1N1 Influenzavirus haben. Die Inzidenz von 2009 pH1N1 war signifikant höher in Kindern mit Asthma als in gesunden Kindern (72). Interessanterweise zeigten zwei weitere Studien, dass Menschen mit schwerem Asthma am empfindlichsten gegenüber Infektionen sind und damit auch gegenüber Exazerbationen. Bei mehr als 75% der Fälle wurde bei Patienten mit schwerem Asthma während einer Exazerbation eine virale Infektion der Atemwege festgestellt (66,67).

Obwohl Asthma als Komorbidität für schweren Influenza Infektionsverlauf angesehen wird, gibt es mehrere widersprüchliche klinische Daten bezüglich der Korrelation von Asthma als Risiko für schwere Influenza Erkrankungsverläufe. Es wurde gezeigt, dass Patienten mit anderen respiratorischen Erkrankungen als Asthma und COPD ebenfalls mit schweren Infektionsverläufe assoziiert wurden (69). Vor allem Patienten mit Übergewicht (Adipositas) zeigten ein erhöhtes Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf bei einer Influenza Infektion (154). Im Vergleich hatten asthmatische Patienten, ein niedrigeres Risiko zu sterben. Dieser Befund wird oft in verschiedenen Publikationen verwendet, als Grundlage dass Asthmatiker ein geringeres Risiko zu sterben haben im Vergleich zu anderen Risiko-Patienten und gesunden Menschen.

Asthma ist eine heterogene Erkrankung mit verschiedenen Facetten und öfter treten unterschiedlichen pulmonalen Immunantworten in asthmatischen Patienten (155). Es ist deswegen wichtig die Mechanismen zu verstehen, welche das gegenseitige Zusammenspiel zwischen Asthma und Influenza erklären können. In dieser Arbeit konnte, nach unserem Wissensstand ein neues Mausmodell etabliert werden, welches die Klinik aus der 2009 H1N1 Influenza Pandemie widerspiegelt. Das allogene Mausmodell erlaubt es uns nun zu untersuchen, wieso bestimmte Patienten während der 2009 Influenza Pandemie schwere

Influenza Krankheitsverläufe zeigten im Vergleich zu anderen Asthmatischen Patienten. In den folgenden Abschnitten werden unsere beiden Mausmodelle (C57BL/6 und 1SB6F1) miteinander verglichen, um die Mechanismen zu verstehen, die diese Unterschiede erklären könnten.

5.2 Asthmatische 1SB6F1 Mäuse zeigen eine erhöhte Pathogenität als die asthmatischen C57BL/6 Mäusen

Andere publizierten in syngenen Mausmodellen, dass Asthma auf den Krankheitsverlauf von Influenza protektiv wird (156,157). Um die Pathogenität der 2009 pH1N1 IAV im Asthma Mausmodell zu untersuchen, wurde im weiblichen C57BL/6 und weiblichen 1SB6F1 Mäusen ein experimentelles allergisches Asthma induziert und die Mäuse anschließend mit einem 2009 pH1N1 IAV infiziert. Wir konnten zeigen, dass eine Infektion mit 10^5 p.f.u. der 2009 pH1N1 IAV zu einem erhöhten Gewichtsverlust in nicht-asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu asthmatischen Mäusen führt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass zwischen nicht-asthmatischen und asthmatischen C57BL/6 Mäusen kein Unterschied in der Mortalität war, wobei die nicht-asthmatischen Mäuse früher starben als die asthmatischen C57BL/6 Mäuse (Abbildung 10). Wir konnten zeigen, dass die asthmatischen C57BL/6 Mäuse resistent bzw. geschützt vor einer Influenzavirus Infektion im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen waren. Ähnliche Daten wurden in verschiedenen Asthma und Influenza Komorbiditätsmodellen beobachtet (156,157) *In vivo* konnte in verschiedenen Mausstämmen, wie C57BL/6 und BALB/c und mit verschiedenen Allergenen, u.a *Aspergillus fumigatus*, OVA oder HDM gezeigt werden, dass asthmatische Mäuse gegenüber einer Influenza Infektion geschützt waren (155,156,157). Dies widerspiegelt aber nicht die epidemiologischen Daten von Asthmatikern während der 2009 Influenza Pandemie. Vorherigen Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten die Wichtigkeit der genetischen Variabilität bzw. der Allogenetität in der Immunantwort im Mausmodell, um das Zusammenspiel von Infektionskrankheiten und der Immunantwort zu studieren (121,122). Basierend auf diesen Erkenntnissen konnte in dieser Arbeit ein neues allogenes 1SB6F1 Mausmodell etabliert. In unseren prä-klinischen 1SB6F1 Mausmodell konnten wir erhöhte Gewichtsverlust und erhöhte Mortalität in die asthmatischen Mäuse im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen nach der Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV beobachten (Abbildung 11). Die asthmatischen Mäuse zeigten eine erhöhte Pathogenität nach der Infektion im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen und spiegeln damit die Klinik wieder.

5.3 Die virale Replikation beeinflusst nicht die Pathogenität in den asthmatischen Mäusen nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV

Influenzaviren sind in der Lage direkt durch eine erhöhte Pathologie den Wirt zu schädigen. Dies kann durch eine erhöhte virale Replikation oder durch eine erhöhte pro-inflammatorische Immunantwort vermittelt werden. Um die virale Replikation in den C57BL/6 und den 1SB6F1 Mäusen zu untersuchen, wurde als erstes in Lungenhomogenisaten und in BAL-Flüssigkeit von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen, welche mit dem 2009 pH1N1 IAV infiziert wurden, die Viruslast mittels Plaques Test untersucht. Es konnte in der weiblichen C57BL/6 und im 1SB6F1 Mausmodell kein Unterschied in der Viruslast in der Lunge zwischen den nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV beobachtet werden (Abbildung 12, Abbildung 13). Wir könnten ebenfalls beobachten, dass die Virustiter in der BAL Flüssigkeit niedriger waren als in den Lungenhomogenisaten, was vermutlich an der Tatsache liegt, dass die gemessene Viruslast in der BAL nur aus der viralen Replikation im Bronchial- und Alveolargewebe vorkommt. Die Erhöhung der Pathogenität in den asthmatischen 1SB6F1 Mäusen korreliert nicht mit einer erhöhten Virus Replikation in den Lungen oder in der BAL- Flüssigkeit. Im Gegenteil wurde in mehreren Publikationen, mit Inzucht Mäusen (C57BL/6 und BALB/c) eine negative Korrelation zwischen Überleben und viraler Replikation gezeigt (155,154). Dies würde diesen Unterschied in der Pathogenität erklären, dass wir jedoch weder in unserem C57BL/6 Modell noch in unserem allogenen 1SB6F1 Modell beobachten konnten.

Es wurde bereits gezeigt, dass bei einer Infektion mit dem 2009 pH1N1 die Titerbestimmung aus den Lungenhomogenisaten keinen verlässlichen Parameter für die Korrelation mit der Virulenz in C57BL/6 Mäusen darstellt (156,157). Diese Daten lassen trotzdem vermuten, dass die virale Replikation die Pathogenität in den asthmatischen Mäusen nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV nicht beeinflusst. Respiratorische Viren sind die der Lage eine Asthma Exazerbation in Kindern und Erwachsenen zu induzieren (153). Eine Prospektive Studie während der 2009 Influenza Pandemie zeigte dass das 2009 pH1N1 IAV asthmatische Patienten bevorzugt infiziert als nicht-asthmatische und die Autoren vermuten, dass es möglicherweise aufgrund eine Beeinträchtigung oder Schädigung des bronchialen Epitheliums liegt (72).

Es wurde in C57BL/6 Mäusen und in unserem 1SB6F1 Mausmodell untersucht, ob Veränderungen in das Epithelium der Lungen, aufgrund der vorherigen Asthma Erkrankung oder die Pathogenität der 2009 pH1N1 im Mausmodell aufgetreten sind. Hierfür wurden Gewebeschnitt aus den Lungen von Kontrolltieren, sowie asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen nach der Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV angefertigt und mit HE, PAS gefärbt. Zusätzlich, um die infizierten Zellen in die Lungen zu visualisieren, wurden die

Discussion

Lungen gegen das NP des Influenzavirus gefärbt. Um eine mögliche Schädigung des Epitheliums zu quantifizieren, wurden ebenfalls die zellulären Infiltrationen der Lungen in der BAL-Flüssigkeit gemessen.

Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Virulenz der 2009 pH1N1 mit einer schweren alveolaren Schädigung, Inflammation und Pneumonie in Mäusen korreliert (158). Diese Eigenschaften wurden ebenfalls als Haupttodesursache unter Influenza Patienten während der 2009 Pandemie berichtet (160). Dies könnten wir auch in den nicht-asthmatischen C57BL/6 und 1SB6F1 Mäusen beobachten (Abbildung 14, Abbildung 15). Die weiblichen nicht-asthmatischen C57BL/6 Mäusen zeigten mehr Infiltration 6 Tage nach Infektion als die asthmatischen Mäuse (Abbildung 14). Dies wurde ebenfalls in die gemessene zelluläre Infiltration in der BAL-Flüssigkeit von C57BL/6 Mäusen beobachtet (Abbildung 20).

Das erhöhte Überleben in asthmatische C57BL/6 Mäusen könnte auf eine erhöhte Toleranz gegenüber einer Influenzavirus Infektion basiert sein. Dies könnte die Hypothese bestätigen, dass das erhöhte Überleben in den asthmatischen Mäusen vermittelt durch eine Toleranz gegenüber Epithelschädigung sein kann (157).

Hingegen zeigten die asthmatischen 1SB6F1 Mäuse eine erhöhte zelluläre Infiltration im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen. Diese Erhöhung der Infiltration wurde ebenfalls durch die zelluläre Infiltration in BAL-Flüssigkeiten bestätigt, wo wir eine signifikante Erhöhung der zellulären Infiltration in den asthmatischen 1SB6F1 Mäuse im Vergleich zu den nicht-asthmatischen beobachtet konnte (Abbildung 21). Nach der Infektion mit dem 2009 pH1N1 zeigten ebenfalls die asthmatischen 1SB6F1 Mäuse eine erhöhte zelluläre Infiltration im Vergleich zu den asthmatischen C57BL/6 Mäusen. Diese erhöhte zelluläre Infiltration könnte unter anderem durch eine erhöhte Produktion von Zytokinen und Chemokinen bedingt sein. Um dies endgültig aufzuklären, wäre eine differentielle Analyse der unterschiedlichen Immunzellen in der BAL-Flüssigkeit nötig.

Wir konnten beobachten, dass die Infektion zu einer Reduktion der Mukusproduzierenden Zellen in den asthmatischen C57BL/6 Mäuse führt. Interessanterweise steigt die Mukusproduktion in unserem präklinischen Modell 6 Tage nach Infektion, wobei die Mukusproduktion ähnlich zu den Asthma-Kontrolltieren war. Vergleicht man die Mukusproduktion zwischen den asthmatischen C57BL/6 Mäusen und den 1SB6F1 Mäusen nach Infektion, zeigten die asthmatischen 1SB6F1 Mäuse eine erhöhte Mukusproduktion als die asthmatischen C57BL/6 Mäuse. Dies widerspricht den Daten aus vorherigen Publikationen, die die Hypothese aufstellten, dass die Mukusproduktion als Antwort auf eine Influenza Infektion und/oder eine Asthma Erkrankung in asthmatische Patienten eine erhöhte Viruslast erfordert um einen Effekt zu sehen (156). Es konnte jedoch eine Erhöhung der Mukusproduktion in einem Asthma und Poly(I:C) Modell gezeigt werden (161). Als letztes konnten wir eine erhöhte Anzahl von NP-positiven Zellen in den Lungen von asthmatischen

1SB6F1 Mäusen im Vergleich zu nicht asthmatischen 1SB6F1 Mäusen beobachten. Dieser Befund konnte im Plaques Test der Lunge und der BAL-Flüssigkeit nicht bestätigt werden. Wir vermuten, dass die beobachteten NP-positiven Zellen keinen replikationsfähigen Viren darstellen. Unsere Studien lassen stark vermuten, dass die erhöhte Letalität in den asthmatischen 1SB6F1 Mäusen im Vergleich zu den asthmatischen C57BL/6 Mäusen, teilweise auf eine erhöhte zelluläre Infiltration und eine erhöhte Inflammation in den Lungen zurück zu führen ist. Tatsächlich konnten wir eine erhöhte perivaskuläre und peribronchiale Infiltration und alveoläre Schädigung in den infizierten asthmatischen 1SB6F1 Mäusen detektieren.

5.4 Asthmatischen C57BL/6 Mäusen zeigen eine niedrigere pro-inflammatorische Immunantwort als asthmatische 1SB6F1 Mäuse

Da wir keine Korrelation zwischen der Viruslast und dem Gewichtsverlust bzw. der Überlebensrate in den C57BL/6 und 1SB6F1 Mausmodellen beobachten konnten, vermuten wir, dass der Unterschied in der Letalität zwischen beiden Mausmodellen auf eine veränderte Immunantwort zurückzuführen ist. Hierfür wurden Zytokine und Chemokine in der Lunge und in der BAL-Flüssigkeit von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen an Tagen 3 und 6 nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV bestimmt. Die Messung der Zytokine wurden in vorheriger Arbeit in der Asthma und Influenza Komorbiditätsforschung ausschließlich aus der BAL-Flüssigkeit durchgeführt. Wir haben uns ebenfalls die Immunantwort der Lungen angeschaut. In diesem Abschnitt wird die Immunantwort beider Mausmodelle miteinander verglichen und in den Kontext der vorhandenen Literatur gesetzt. Die infizierten asthmatischen C57BL/6 Mäuse zeigten niedrigere IL-1 β , IL-6, TNF- α und IFN- γ Konzentrationslevel in den Lungen im Vergleich zu nicht-asthmatischen C57BL/6 Mäusen (Abbildung 16). Hingegen zeigten die asthmatischen Mäuse aus unserem präklinischen Modell eine leichte erhöhte pro-inflammatorische Immunantwort in den Lungen und in der BAL-Flüssigkeit, obwohl diese Unterschiede nicht signifikant waren (Abbildung 18, Abbildung 19). Die niedrigere pro-inflammatorische Immunantwort in den asthmatischen C57BL/6 Mäusen korreliert mit erhöhtem Überleben. Eine erhöhte IL-6-Expression beim Menschen korrelierte mit einer erhöhten Pathogenität während einer Influenza-Infektion (156,160). Dies korreliert mit unseren Befunden, dass Zytokine wie IL-6, TNF- α , IFN- γ in der Lunge oder in der BAL-Flüssigkeit von asthmatischen 1SB6F1-Mäusen leicht erhöht waren.

Hingegen zeigten die nicht-asthmatischen und asthmatischen C57BL/6 Mäuse vergleichbare IL-4 und IL-13 Konzentrationslevels in den Lungen (Abbildung 16). Da die Th2 Zytokine (IL-4 und IL-13) in den Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen C57BL/6 Mäusen

vergleichbaren waren, kann die Herunterregulierung der pro-inflammatorischen und Th1 Zytokine nicht auf eine Überexpression der Th2 Zytokine zurückgeführt werden. Interessanterweise war IL-13 in unseren präklinischen asthmatischen Mäusen an 6 Tagen p.i. im Vergleich zu nicht-asthmatischen Mäusen signifikant erhöht. Wir vermuten, dass diese erhöhte IL-13 Expression durch die beobachtete Mukus Hyperproduktion und die virusinduzierte Asthma-Exazerbation bedingt sein konnte. Es wird spekuliert dass anti-inflammatorische Zytokine wie das IL-10 als Antwort auf eine Epithel Beschädigung produziert werden (74). Die asthmatischen 1SB6F1 Mäusen zeigten 3 Tage p.i. höhere IL-10 Levels in der BAL-Flüssigkeit im Vergleich zu nicht-asthmatischen Mäusen. Diese Erhöhung konnte erst an Tag 6 p.i. in der BAL Flüssigkeit von infizierten asthmatischen C57BL/6 Mäusen beobachtet werden. Wir vermuten, dass die frühere IL-10 Expression in der BAL Flüssigkeit einen Indikator von erhöhten Epithelschädigungen im 1SB6F1 Modell im Vergleich zu dem C57BL/6 Mausmodell darstellt. In den Lungen beider Mausmodelle konnten niedrigere IL-10 Konzentrationen in den asthmatischen Mäusen im Vergleich zu nicht-asthmatischen Mäusen beobachtet werden. Wir spekulieren, dass in der gesamten Lunge andere Faktoren oder andere immunregulatorische Zytokine bei der Modellierung der Entzündung bei asthmatischen Mäusen eine Rolle spielen könnten.

5.5 Veränderte OVA-spezifische IgE Konzentration im asthmatischen Mäusen nach IAV Infektion

Aufgrund ihrer Kapazität der angeborenen Immunsystems zu steigern, sind Antikörper wichtige Komponenten der Aktivierung des Immunsystems. Levels von gesamten und allergen-spezifischen IgE im Serum wurde lange als Marker für atopisches Asthma und Asthma- Exazerbationen im Verbindung gebracht (74). Allergene fördern die Bildung von IgE und IgG1 und die systemischen Antikörperlevel können als Marker für die B-Zellenantwort in der primär lymphatischen Organe dienen (163). Wir untersuchten die OVA spezifischen IgE Level im Serum von C57BL/6 und 1SB6F1 Mäusen an den Tagen 3 und 6 nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV. Wir konnten zeigen, dass die Allergen Sensibilisierung und Challenge zu einer erhöhten IgE Produktion im Serum von asthmatischen C57BL/6 Mäusen und von 1SB6F1 Mäusen führte (Abbildung 22, Abbildung 23).

Die Infektion allein mit dem 2009 pH1N1 führte wie erwartet nicht zu einer erhöhten OVA spezifischen IgE Level im Serum. Wir konnten zudem beobachten, dass die Infektion in den asthmatischen C57BL/6 und 1SB6F1 Mäusen zu einer Reduktion der IgE Levels 3 Tage p.i. im Vergleich zu den Asthma-Kontrolltieren führte. Interessanterweise stieg die IgE Konzentration in den C57BL/6 Mäusen an Tag 6 p.i. nicht jedoch in unserem 1SB6F1 Mausmodell. Im Gegenteil war die IgE Konzentration niedriger als 3 Tage p.i. (Abbildung 23). Studien, welche einen Resistenz von asthmatischen Mäusen gegenüber einer Influenza

Infektion zeigten, zeigten ebenfalls eine erhöhte mukosale und systemische gesamte IgE Antwort während des gesamten Krankheitsverlaufs einer Infektion mit pandemischer Influenza (164). Dies korreliert mit unseren IgE Daten aus dem C57BL/6 Mausmodell, wo wir eine Erhöhung der IgE Konzentration im Serum 6 Tage p.i. beobachtet haben. Diese Daten sprechen für eine wichtige Rolle von IgE hinsichtlich des Krankheitsverlaufs. Es wurde gezeigt, dass Influenza ebenfalls in der Lage ist nicht-spezifisches IgE im Serum zu produzieren (165). Um die Rolle von IgE in Asthmatikern infiziert mit dem 2009 pH1N1 IAV endgültig aufzuklären, wäre es ebenfalls nötig die gesamte IgE Konzentration im Serum und im BAL zu untersuchen. Da die IgG1 und IgG2a im Verbindung mit IAV gebracht werden und die IgA Produktion Teil der mukosalen Immunantwort von Asthma und Influenza ist, könnte man zusätzlich als Kontrolle die IgG und IgA Konzentrationen im Serum und BAL überprüfen.

Eine andere Hypothese, die die erhöhte IgE Konzentration im Serum von Asthmatischer erklären könnte, wäre die Corticosteroid Gabe als Asthma-Behandlung. Es wurde gezeigt, dass eine Corticosteroid Gabe bei Asthmatischer zu einer Erhöhung der IgE Levels im Serum führt (163,164). Die epidemiologischen Daten von Asthmatischer während der 2009 pH1N1 waren nicht immer eindeutig in Bezug auf die Corticosteroid Gabe. Nach unseren Kenntnissen wurde ebenfalls kein direkter Effekt von Corticosteroid auf den Influenza Krankheitsverlauf gezeigt. Aber in diesem Kontext, könnten unseren Daten auf einen potentiell indirekten protektiven Effekt von Corticosteroiden durch die Erhöhung der IgE Konzentration im Serum auf den Influenza Krankheitsverlauf deuten. Es bedarf, um diese Hypothese zu bestätigen, weiteren Experimenten. Vergleicht man die C57BL/6 Maus mit unserem 1SB6F1 Mausmodell, lassen unsere Daten vermuten, dass allergen-spezifische IgE eine mögliche schützende Rolle gegenüber einer Influenza Infektion in Asthmatischer haben könnte.

5.6 Männliche asthmatische 1SB6F1 Mäusen zeigen keinen Unterschied in der Pathogenität im Vergleich zu nicht-asthmatischen Mäusen

Asthma- und Allergierkrankungen zeigen einen Geschlechtsdimorphismus. Es wurde gezeigt, dass im Kindesalter Jungen im Vergleich zu Mädchen eine erhöhte Asthma Prävalenz zeigen. Dies ändert sich aber nach der Pubertät von einer hohen Prävalenz in Jungen zu einer hohen Prävalenz im Mädchen. Im Erwachsenenalter ist die Asthmaprävalenz bei Frauen höher als bei Männern und Frauen sterben auch öfter an Asthma als Männer (101). Nach unserem Wissen, haben sich alle bisherigen Publikationen in Asthma und Komorbiditätsforschung auf weiblichen Mäusen fokussiert. Die Auswirkung von Asthma auf eine Influenza Infektion bei männlichen Mäusen ist bis heute unklar. Wir wollten in unserem

präklinischen Modell diesen Geschlechtsunterschied während einer Influenza Infektion untersuchen. Hierfür wurden in männlichen 1SB6F1 Mäusen, Asthma induziert und die Mäusen anschließend mit dem 2009 pH1N1 IAV infiziert.

Wir konnten kein Unterschied in der Mortalität zwischen männlichen asthmatischen und männlichen nicht-asthmatischen 1SB6F1 Mäusen beobachten, obwohl die asthmatischen Mäuse leicht mehr Gewicht verlieren als die nicht-asthmatischen Mäuse. Es konnte kein Unterschied in der Viruslast in den Lungen und in BAL-Flüssigkeiten zwischen männlichen asthmatischen und nicht-asthmatischen Mäusen beobachtet werden. Männliche asthmatische Mäuse scheinen vor einer Influenza Infektion geschützt zu werden, und dieser Schutz wird nicht durch eine verringerte Viruslast vermittelt. Zudem zeigen männliche asthmatische Mäusen eine ähnlich hohe IgE Konzentration im Serum an Tagen 3 und 6 nach einer Influenza Infektion. Es wird vermutet, dass Testosteron einen Einfluss auf die IgE Produktion hat (168), welches die beobachteten Geschlechtsunterschiede in den IgE Mengen erklären könnte. Es sind weitere Experimente erforderlich, um die Immunantwort bei asthmatischen männlichen Mäusen im Vergleich zu weiblichen Mäusen zu untersuchen. Es wäre zudem interessant, den Einfluss von Testosteron auf das Immunsystem bei asthmatischen männlichen Mäusen während einer Infektion mit 2009 pH1N1 IAV zu analysieren.

5.7 Asthmatische 1SB6F1 Mäuse zeigen erhöhte angeborene und humorale Immunantwort

Ein Ziel dieser Arbeit war es mögliche Signalwege oder zellulären Faktoren zu identifizieren, welche die Unterschiede in der Pathogenität zwischen asthmatischen C57BL/6 Mäusen und den allogenen 1SB6F1 Mäusen erklären könnten. Der Vergleich der Transkriptomanalyse der Lungen von C57BL/6 und 1SB6F1 Mäusen zeigte eine sehr hohe Anzahl von signifikant und differenziell exprimierten Genen. Daher wurde der Cut-off für die Signifikanz in unserer Analyse auf $\log_2\text{FoldChange} \leq -2$ oder ≥ 2 gesetzt. Dies könnte erklären, dass einige Gene, die am pro-inflammatorische Signalweg beteiligt sind, in dieser Analyse nicht vorhanden sind. Es konnte trotzdem an Tag 3 p.i. gezeigt werden, dass bei asthmatischen 1SB6F1 Mäusen im Vergleich zu asthmatischen C57BL/6-Mäusen eine erhöhte Expression an Genen beteiligt in der angeborene Immunantwort und Leukozyten-Chemotaxis zeigen. Die Leukozyten Migration in den Lungen ist Teil einer gut funktionierenden Immunantwort und ein wichtiger Pathogenitätsfaktor. Zusätzlich waren pro-inflammatorische Chemokine, assoziiert mit der Abwehr gegen eine virale Infektion im 1SB6F1 Model Tag 6 p.i. hochreguliert Eine Ausnahme dieser erhöhten Expressionsmuster stellte der Marker für regulatorische T-Zellen (Il2ra Gene) dar. Wir konnten ebenfalls in der Zytokinmessung beobachten, dass 3 Tage p.i. die Konzentration des anti-regulatorischen Zytokins IL-10 in

den Lungen, aber nicht in der BAL-Flüssigkeit von 1SB6F1 Mäusen reduziert war. Wir vermuten, dass in der Asthma und Influenza Komorbidität, die anti-inflammatorische Wirkung aufgrund von Epithel Schädigung am Bestens in der BAL-Flüssigkeit der Lungen gemessen wird. Es wäre interessant andere immunregulatorische Zytokine in der BAL-Flüssigkeit und/oder Lungen von asthmatischen Mäusen zu untersuchen.

Die Transkriptomanalyse von Interferon-stimulierenden Genen zeigte eine stark erhöhte Expression von pro-inflammatorischen und TLR-Signalwege Gene in Asthma-Kontrolle 1SB6F1 Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen. Wir könnten leider diese Erhöhung in der Zytokine Messung aus der BAL-Flüssigkeit und der Lungen nicht beobachten. Interessanterweise waren pro-inflammatorische Gene, Interferon-induzierte Gene und NF- κ B-Signalweg-beteiligte Gene in den asthmatischen 1SB6F1 Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen nach der Influenza Infektion hochreguliert. Wir konnten diese Erhöhung ebenfalls in der Zytokinkonzentration beobachten. Es wäre interessant, diese hochregulierten Genen in einer quantitativen Echtzeit-PCR oder *real-time quantitative PCR* zu untersuchen und zu bestätigen.

Darüber hinaus ergab der Vergleich von asthmatischen C57BL/6 und asthmatischen Mäusen aus unserem präklinischen Mausmodell einen wesentlichen Unterschied in der Expression des Immunglobulin-verwandten Gens während des Verlaufs der Influenza-Infektion. Die Immunglobulin-verwandten Gene waren in den 1SB6F1 Mäusen im Gegensatz zu dem C57BL/6 Mäusen an Tag 3 p.i. hochreguliert und an Tag 6 Tage herunterreguliert (Abbildung 32A und B). Diese Daten korrelieren mit den OVA spezifische IgE Expressionsleveln im Serum und sprechen für eine wichtige Rolle von Immunglobulin, besonders von IgE bei der Pathogenität von Influenza in asthmatischen Mäusen.

5.8 Anti-IgE Behandlung führt zu erhöhter Pathogenität in asthmatischen C57BL/6 Mäusen

Um die potentiell schützende Rolle von IgE in Asthmatikern nach einer Influenza zu untersuchen, wurde in weiblichen C57BL/6 Mäusen Asthma induziert. Anschließend wurden diese mit einem Anti-IgE Antikörper behandelt und infiziert. Wir konnten eine niedrige IgE Konzentration im Serum nach der Behandlung im Vergleich zu den Asthma-Kontrolltieren nachweisen. Wir spekulieren, dass eine Reduktion der allergenspezifischen IgE-Konzentration im Serum von asthmatischen Mäusen im Verlauf einer Influenza-Infektion die erhöhte Mortalität bei weiblichen asthmatischen Mäusen vermitteln könnte. Wir konnten zeigen, dass die Behandlung von asthmatischen C57BL/6 Mäusen mit einem Anti-IgE Antikörper zu einer erhöhten Pathogenität und Mortalität nach der Infektion mit dem 2009 pH1N1 führt. Dies lässt auf eine starke Korrelation zwischen der IgE-Konzentration im Serum

Discussion

und der erhöhten Pathogenität bei asthmatischen Mäusen vermuten. Verschiedene Faktoren, wie Geschlechtshormone oder Corticosteroide sind in der Lage, die IgE Level in asthmatischen Tieren und Menschen zu erhöhen. Die Untersuchung von Hormonen wie zum Beispiel das Testosteron in asthmatischen Mäusen könnte weitere Erkenntnisse über das Zusammenspiel zwischen IgE, Asthma und Influenza geben. Es sind noch weitere Experimente nötig, um die Rolle der IgE Expression und den zugrundeliegenden Mechanismen im Influenza Krankheitsverlauf bei Asthmatikern endgültig zu klären.

6 Zusammenfassung

Epidemiologische Analysen haben wiederholt gezeigt, dass Asthma die häufigste Komorbidität bei hospitalisierten Patienten während der 2009 Influenza Pandemie war (47,59,60). Obwohl Asthma als Komorbidität für einen schweren Influenza Infektionsverlauf angesehen wird, gibt es mehrere widersprüchliche klinische Daten bezüglich der Korrelation von Asthma und einem erhöhten Risiko für schwere Influenza Erkrankungsverläufe. In dieser Arbeit wurden zwei weibliche Asthma Mausmodelle etabliert, um die Auswirkungen von zugrundeliegendem Asthma bronchiale auf den Krankheitsverlauf einer Infektion mit pandemischen H1N1 Influenza A Virus (pH1N1 IAV) aufzuklären. Zum einen wurde ein syngenes weibliches C57BL/6 Mausmodell und zum anderen ein allogenes 1SB6F1 Mausmodell verwendet. Wir konnten im Gegensatz zu den asthmatischen C57BL/6 Mäusen, in unseren prä-klinischen 1SB6F1 Mausmodell einen erhöhten Gewichtsverlust und Mortalität im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen nach Infektion mit 2009 pH1N1 beobachten. Zudem zeigten asthmatische 1SB6F1 Mäuse erhöhte zelluläre Infiltration und Mukusproduktion im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen und den asthmatischen C57BL/6 Mäusen. Interessanterweise war die IgE Konzentration in unserem 1SB6F1 asthmatischen Mausmodell niedriger als in den asthmatischen C57BL/6. Transkriptomanalyse der Lungen nach Influenza Infektion zeigten, dass asthmatische 1SB6F1 Mäuse eine erhöhte angeborene und humorale Immunantwort, sowie hochregulierte pro-inflammatorische, Interferon-induzierte und NF- κ B-Signalweg-beteiligte Gene im Vergleich zu C57BL/6 Mäuse haben. Darüber hinaus wurde eine Dysregulierung der Immunglobulin-verwandten Gene in den 1SB6F1 Mäusen im Gegensatz zu dem C57BL/6 Mäusen. Außerdem führte die Behandlung von asthmatischen C57BL/6 Mäusen mit einem Anti-IgE Antikörper zu einer erhöhten Pathogenität und Mortalität nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV. Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit, nach unserem Wissensstand, ein neues allogenes 1SB6F1 Mausmodell etablieren, welches die Klinik der 2009 pH1N1 Influenza widerspiegelt. Das allogene Mausmodell erlaubt uns zu untersuchen, weshalb Asthmatiker eine Hochrisikogruppe für einen schweren Infektionsverlauf darstellen. Die allogenen asthmatischen 1SB6F1 Mäuse zeigen nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV eine erhöhte Pathogenität, sowie eine erhöhte angeborene, humorale und pro-inflammatorische Immunantwort im Vergleich zu den nicht-asthmatischen 1SB6F1 und asthmatischen C57BL/6 Mäusen. Unsere Studien deuten darauf hin, dass die erhöhte Letalität in asthmatischen 1SB6F1 Mäusen teilweise auf eine erhöhte zelluläre Infiltration und erhöhte Inflammation in den Lungen zurückzuführen ist. Zudem lassen die erhöhte Pathogenität und Mortalität in den infizierten asthmatischen C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit einem Anti-IgE Antikörper auf eine starke Korrelation zwischen der IgE-Konzentration im Serum und der erhöhten Pathogenität bei asthmatischen Mäusen schließen.

7 Summary

Epidemiological analyses have repeatedly shown that asthma was the most common comorbidity in hospitalized patients during the 2009 influenza pandemic (47,59,60). Although asthma is considered comorbidity for a severe influenza infection course, there are several conflicting clinical data on the correlation between asthma and an increased risk of severe influenza disease progression. In this work two female asthma mouse models were established to elucidate the effects of underlying bronchial asthma on the course of pandemic H1N1 influenza A virus (pH1N1 IAV) infection. A syngeneic female C57BL/6 mouse model and an allogeneic 1SB6F1 mouse model were used. In contrast to the asthmatic C57BL/6 mice, we observed an increased weight loss and mortality in our pre-clinical 1SB6F1 mouse model compared to the non-asthmatic mice after infection with 2009 pH1N1. In addition, asthmatic 1SB6F1 mice showed increased cellular infiltration and mucus production compared to the non-asthmatic mice and asthmatic C57BL/6 mice. Interestingly, the IgE concentration in our 1SB6F1 asthmatic mouse model was lower than in the asthmatic C57BL/6 mice. Transcriptome analysis of the lungs after influenza infection showed that asthmatic 1SB6F1 mice have an increased innate and humoral immune response, as well as upregulated genes involved in pro-inflammatory, interferon-induced and NF- κ B signaling pathway compared to C57BL/6 mice. In addition, a dysregulation of immunoglobulin-related genes was observed in the 1SB6F1 mice in contrast to the C57BL/6 mice. Furthermore, treatment of asthmatic C57BL/6 mice with an anti-IgE antibody resulted in increased pathogenicity and mortality after infection with 2009 pH1N1 IAV. In summary, to our knowledge, we were able to establish a new allogeneic 1SB6F1 mouse model that reflects the clinical finding during the 2009 pH1N1 influenza. The allogeneic mouse model allows us to investigate why asthmatics represent a high-risk group for a severe course of infection. The allogeneic asthmatic 1SB6F1 mice show increased pathogenicity and an enhanced innate, humoral and pro-inflammatory immune response after infection with 2009 pH1N1 IAV compared to the non-asthmatic 1SB6F1 and asthmatic C57BL/6 mice. Our studies suggest that the increased lethality in asthmatic 1SB6F1 mice is partially due to increased cellular infiltration and increased inflammation in the lungs. In addition, the increased pathogenicity and mortality in infected asthmatic C57BL/6 mice after treatment with an anti-IgE antibody suggests a strong correlation between serum IgE concentration and increased pathogenicity in asthmatic mice.

8 Anhang

Tabelle 3: Cluster vom Vergleich der differentiell exprimierten Genen in weiblichen Asthma bronchiale Mausmodellen 3 Tage p.i..

Die Gene wurden entsprechend ihrer Expression 3 Tage nach der Infektion im Cluster eingeteilt.

Cluster	Gene symbol
A	Bmp6, Cat, Cbr2, Cpm, Cyp2f2, Dixdc1, Fmo3, Olfm12a, Scgb3a2, Slc4a5
B	Acod1, Ccl2, Ccl3, Ccl7, Ccr5, Cfb, Emilin1, Fgl2, Ifi205, Ifi207, Itgam, Litaf, Mafk, Msr1, Mx1, Nfkbiz, Plekho2, Ptafr, Ptger4, Ptafr, Ptger4, Saa3, Serpina3n, Steap4, Tlr13, Tnfaip3, Vcam1
C	Sema4d, Slc37a2, Coro2a, Slamf7, Ms4a4a, Timp1, Cd72, Basp1, Lrrc25, Fcer1g, Mthfd2, Vav1, Tmem106a, Pirb, Gm36161, Cxcl16, Pstpip1, Themis2, Ms4a6c, Tap1, Rbm3, H2-D1, Slc7a8, Cd300lf, Tgfbi, Dck, C3ar1, Grn, Epsti1, Apobec3, Lgmn, Liltr4b
D	Il2ra, Ms4a7, Ccl12, Aif1, Ackr1, Il7r, Adam8, Rgs1, Pla2g7, Hk3, Slamf9, Gm21188, Lpxn, Evi2a
E	Apobec1, Cd177, Ch25h, Gadd45g, Ccr1, Tcirg1, Slfn2, Casp4, Psmb8, Ms4a6d, Lcn2, Tgtp1, Mt2, Cxcl10

Tabelle 4: Top 10 der Gen-Ontologien der Cluster C, D und E 3 Tage p.i. in der Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen.

Gen-Ontologien wurden mittels der Online Tool Webgestalt hergestellt.

GO	description	size	overlap	pValue	Gene symbol
GO 0006952	defense response	1361	23	4.44E-16	Ackr1;Adam8;Aif1;Apobec1;Apobec3;C3ar1;Casp4;Ccl12;Ccr1;Cd177;Cd300lf;Cxcl10;Cxcl16;Fcer1g;Il2ra;Lcn2;Pla2g7;Pstpip1;Slamf7;Tap1;Themis2;Timp1;Vav1
GO: 0006955	immune response	1293	22	2.44E-15	Adam8;Aif1;Apobec3;C3ar1;Casp4;Ccl12;Ccr1;Cd177;Cd300lf;Cxcl10;Cxcl16;Fcer1g;Il2ra;Il7r;Lcn2;Lpxn;Pirb;Pstpip1;Slamf7;Tap1;Themis2;Vav1
GO: 0030595	leukocyte chemotaxis	200	12	1.12E-14	Adam8;Aif1;C3ar1;Ccl12;Ccr1;Ch25h;Cxcl10;Cxcl16;Fcer1g;Lgmn;Pla2g7;Vav1
GO: 0050900	leukocyte migration	315	13	9.35E-14	Adam8;Aif1;C3ar1;Ccl12;Ccr1;Cd177;Ch25h;Cxcl10;Cxcl16;Fcer1g;Lgmn;Pla2g7;Vav1
GO: 0097529	myeloid leukocyte migration	187	11	2.07E-13	Adam8;Aif1;C3ar1;Ccl12;Ccr1;Cd177;Cxcl10;Fcer1g;Lgmn;Pla2g7;Vav1
GO: 0060326	cell chemotaxis	280	12	6.24E-13	Adam8;Aif1;C3ar1;Ccl12;Ccr1;Ch25h;Cxcl10;Cxcl16;Fcer1g;Lgmn;Pla2g7;Vav1

Anhang

GO: 0002682	regulation of immune system process	1230	19	2.44E-12	Adam8;Aif1;Apobec3;C3ar1;Ccl12;Ccr1;Cd177;Cd300lf;Cxcl10;Fcer1g;Il2ra;Il7r;Lgmn;Lpxn;Pla2g7;Slamf7;Tap1;Themis2;Vav1
GO: 0045087	innate immune response	665	15	5.14E-12	Adam8;Aif1;Apobec3;Casp4;Ccl12;Ccr1;Cd177;Cd300lf;Cxcl16;Fcer1g;Lcn2;Pstpip1;Slamf7;Tap1;Vav1
GO: 0002684	positive regulation of immune system process	879	16	2.09E-11	Adam8;Aif1;C3ar1;Ccl12;Ccr1;Cd177;Cd300lf;Cxcl10;Fcer1g;Il2ra;Il7r;Lgmn;Lpxn;Pla2g7;Themis2;Vav1
GO: 0006954	inflammatory response	640	14	4.69E-11	Ackr1;Adam8;Aif1;C3ar1;Casp4;Ccl12;Ccr1;Cxcl10;Fcer1g;Il2ra;Pla2g7;Pstpip1;Themis2;Timp1

Tabelle 5: Top 10 der KEGG pathway aus der Genen der Cluster C, D und E 3 Tage p.i
Die Analyse wurde mittels Online Tool STRING 10.1 durchgeführt.

geneSet	description	size	overlap	pValue	gene symbol
mmu04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	296	6	6.88E-04	Ccl12;Ccr1;Cxcl10;Cxcl16;Il2ra;Il7r
mmu04062	Chemokine signaling pathway	199	5	7.81E-04	Ccl12;Ccr1;Cxcl10;Cxcl16;Vav1
mmu04662	B cell receptor signaling pathway	72	3	0.00238	Cd72;Pirb;Vav1
mmu04612	Antigen processing and presentation	91	3	0.00463	H2-D1;Lgmn;Tap1
mmu04657	IL-17 signaling pathway	91	3	0.00463	Ccl12;Cxcl10;Lcn2
mmu05340	Primary immunodeficiency	36	2	0.00791	Il7r;Tap1
mmu04650	Natural killer cell mediated cytotoxicity	118	3	0.0095	Fcer1g;H2-D1;Vav1
mmu05169	Epstein-Barr virus infection	230	4	0.01015	Cxcl10;Gadd45g;H2-D1;Tap1
mmu05144	Malaria	49	2	0.01432	Ackr1;Ccl12
mmu05163	Human cytomegalovirus infection	256	4	0.0146	Ccl12;Ccr1;H2-D1;Tap1

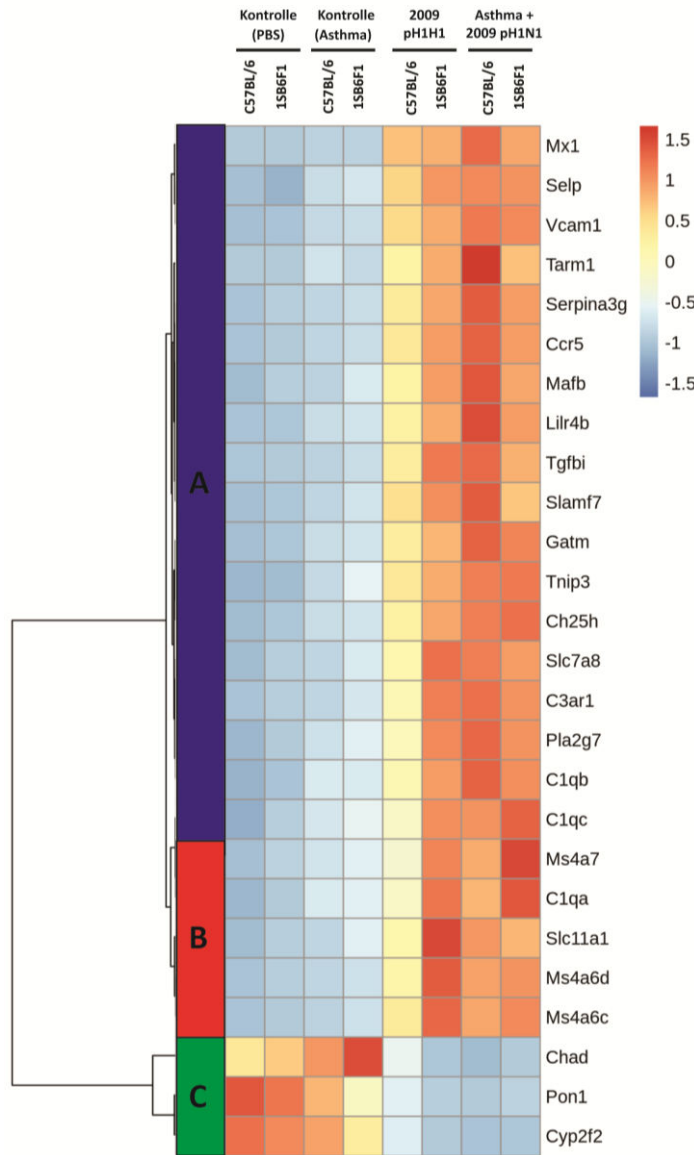


Abbildung 35: Expression vom differentiellen exprimierten Gene in der Lunge von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen 6 Tage nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV.

Die differentielle Expression von murine Gene wurde in der Lungen 6 Tage p.i. mittels RNA-seq analysiert. Nicht-asthmatische und asthmatische Mäuse wurden mit 10^5 p.f.u des 2009 pH1N1 IAV infiziert. Kontrolltieren erhielten PBS. Die *Heatmaps* zeigen die normalisierte Expression von differentiellen exprimierten Genen. Die Gene wurden entsprechend ihrer Expressionsprofile in Cluster eingeteilt. Die höchsten Expressionslevel wurden im rot und die niedrigsten im blau dargestellt. Gezeigt werden die Ergebnisse aus mathematisch zusammengesetzter Probe aus 3 Mäusen pro Gruppe. Die obere und untere Grenze wurde auf $\log_2\text{Foldchange} \geq +2$ und -2 gesetzt.

Tabelle 6: Vergleich differentielle exprimierten Genen in weiblichen Asthma bronchiale Mausmodellen.

Die Gene wurden entsprechend ihrer Expression 6 Tage nach der Infektion in Gruppen eingeteilt.

Cluster	Gensymbol
A	Mx1, Selp, Vcam1, Tarm1, Serpina3g, Ccr5, Mafb, Liltr4b, Tgfbi, Slamf7, Gatm, Tnip3, Ch25h, Slc7a8, C3ar1, Plag2g7, C1qb, C1qc
B	Ms4a7, C1qa, Slc11a1, Ms4a6d, Ms4a6c
C	Chad, Pon1, Cyp2f2

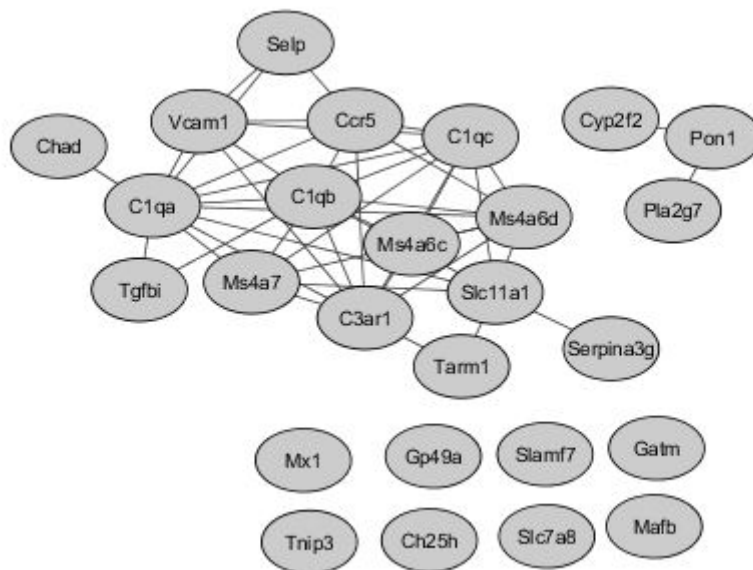


Abbildung 36: Protein-Protein Interaktion von differentiell exprimierten Genen von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen nach 2009 pH1N1 IAV Infektion.

Gezeigt ist das Proteine-Interaktionsnetzwerk aus der Analyse der differentiell exprimierten Gene 6 Tage nach Infektion. Das Netzwerk wurde mit Hilfe von STRING und Cytoscape hergestellt. Proteine mit keinem beschriebenen Interaktionspartner wurden unten aufgelistet.

Top 10 gene ontology - 6dpi

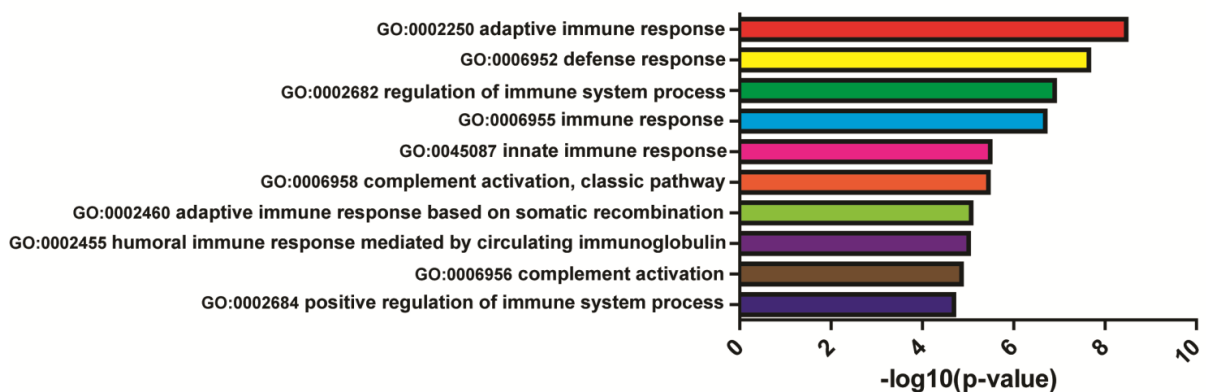


Abbildung 37: Gen-Ontologie für biologische Prozess von dysregulierten Genen in asthmatische Mäusen 6 Tage nach Influenza Infektion.

Weibliche asthmatische C57BL/6 und 1SB6F1 Mäusen wurden mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert. Am Tag 6 p.i. wurde aus drei Mäusen pro Gruppe die Lungen entnommen, RNA isoliert und das gesamte Transkriptom analysiert. Basierend auf den DEGs, sind die Top 10 angereicherten Gen-Ontologie für biologische Prozesse aus dem Vergleich von asthmatische C57BL/6 vs. asthmatische 1SB6F1 Mäusen nach der Infektion gezeigt. Die GO wurde entsprechend ihre p-Werte gezeigt.

Tabelle 7: Gen-Ontologien der Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen 6 Tage p.i..
Gen-Ontologien wurden mittels der Online Tool Webgestalt hergestellt.

GO	description	size	overlap	pValue	Gene symbol
GO: 0002250	adaptive immune response	397	8	3.45E-09	Slc11a1;C1qa;C1qc;C1qb;Slamf7;C3ar1;Serpina3g;Tarm1
GO: 0006952	defense response	1361	11	2.27E-08	Mx1;Pla2g7;Slc11a1;Selp;C1qa;C1qc;C1qb;Slamf7;C3ar1;Tarm1;Ccr5
GO: 0002682	regulation of immune system process	1230	10	1.27E-07	Pla2g7;Slc11a1;Selp;C1qa;C1qc;C1qb;Slamf7;C3ar1;Tarm1;Maf
GO: 0006955	immune response	1293	10	2.04E-07	Mx1;Slc11a1;C1qa;C1qc;C1qb;Slamf7;C3ar1;Serpina3g;Tarm1;Ccr5
GO: 0045087	innate immune response	665	7	3.26E-06	Mx1;Slc11a1;C1qa;C1qc;C1qb;Slamf7;Tarm1
GO: 0006958	complement activation, classical pathway	29	3	3.59E-06	C1qa;C1qc;C1qb
GO: 0002460	adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	279	5	8.55E-06	Slc11a1;C1qa;C1qc;C1qb;C3ar1
GO: 0002455	humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin	40	3	9.63E-06	C1qa;C1qc;C1qb
GO: 0006956	complement activation	45	3	1.38E-05	C1qa;C1qc;C1qb
GO: 0002684	positive regulation of immune system process	879	7	2.03E-05	Pla2g7;Slc11a1;Selp;C1qa;C1qc;C1qb;C3ar1

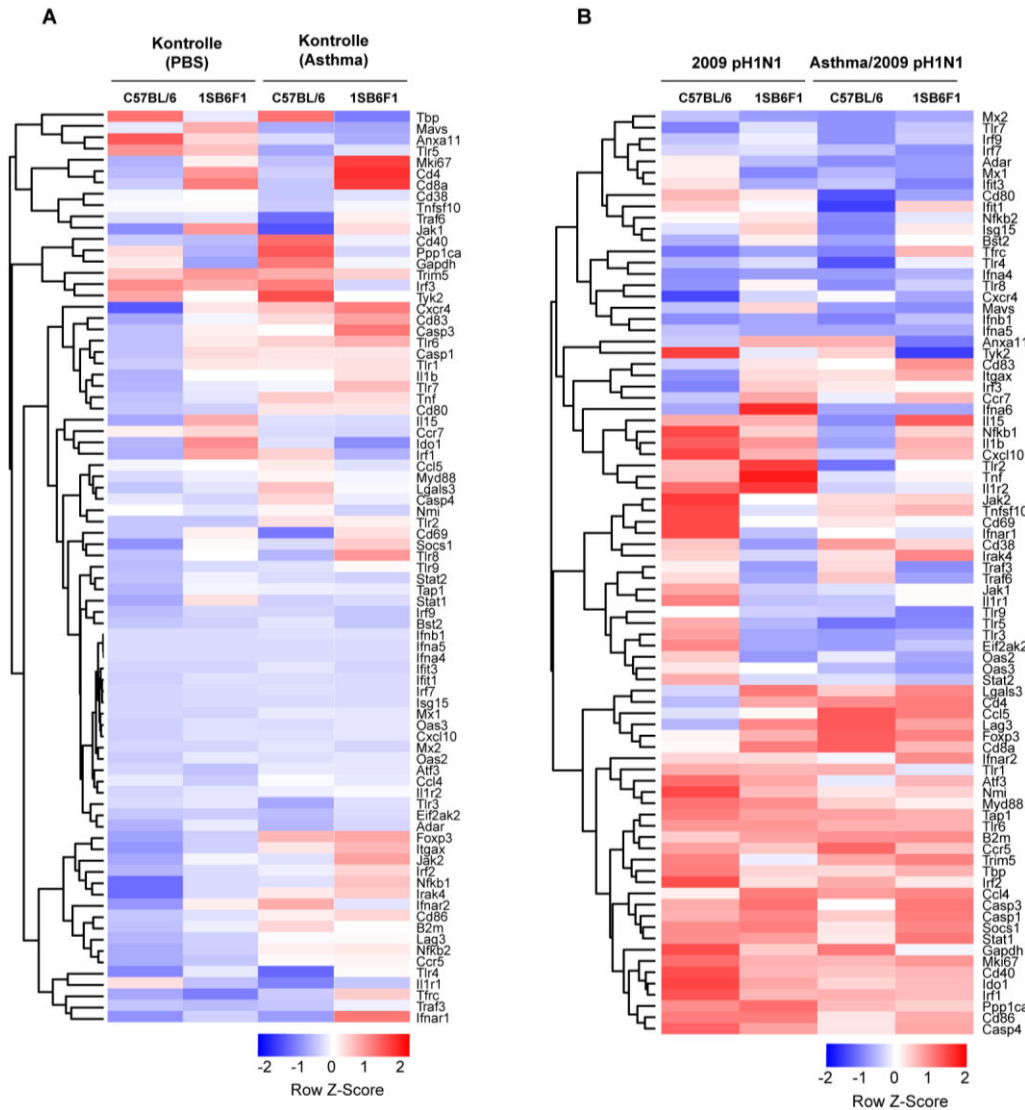


Abbildung 38: Expression von interferon-stimulierende Genen in den Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen 6 Tage nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV.

Die differentielle Expression von murine ISGs wurde in der Lungen 6 Tage p.i. mittels RNA-seq analysiert. Nicht-asthmatische und asthmatische Mäuse wurden mit 10^5 p.f.u des 2009 pH1N1 IAV infiziert. Kontrolltieren erhielten PBS. Die *Heatmaps* zeigen die normalisierte Expression von differentiellen exprimierten Genen der angeborenen Immunantwort mit antiviraler Aktivität. Die Gene wurden entsprechend ihrer Expressionsprofile in Cluster eingeteilt. Die höchsten Expressionslevel wurden im rot und die niedrigste im blau dargestellt. Gezeigt werden die Ergebnisse aus mathematisch zusammengesetzter Probe aus 3 Mäusen pro Gruppe. Die obere und untere Grenze wurde auf $\log_2\text{Foldchange} \geq +1$ und -1 gesetzt.

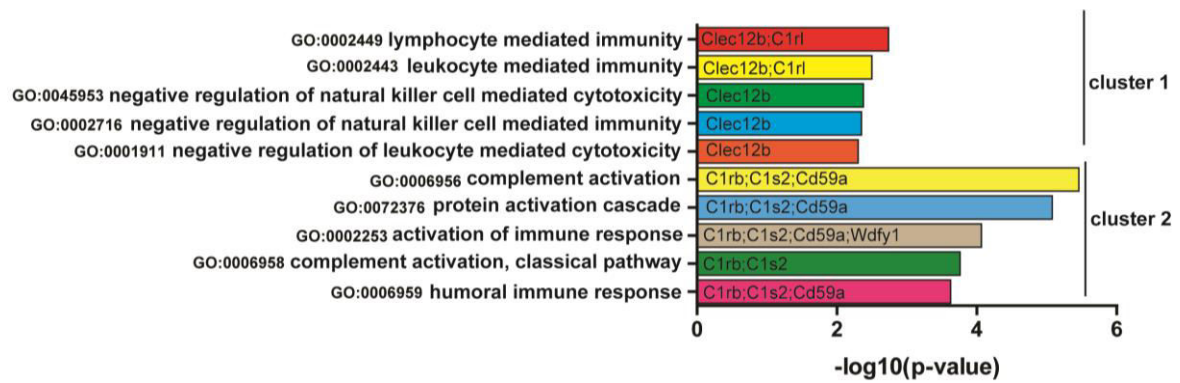


Abbildung 39: Gen-Ontologie für biologische Prozesse von dysregulierten Genen in asthmatischen Mäusen 6 Tage nach Influenza Infektion.

Weibliche asthmatische C57BL/6 und 1SB6F1 Mäuse wurden mit 10^5 p.f.u. des 2009 pH1N1 IAV infiziert. 6 Tage p.i. wurde aus 2 bis 3 Mäusen pro Gruppe die Lungen entnommen, RNA isoliert und das gesamte Transkriptom analysiert. Basierend auf die DEGs, sind die Top 5 angereicht Gen-Ontologie für biologische Prozesse aus dem Vergleich von asthmatische C57BL/6 vs. asthmatische 1SB6F1 Mäusen nach der Infektion gezeigt. Die GO aus der Gene der Cluster 1 wurden rot dargestellt. Die GO wurde entsprechend ihre p-Werte gezeigt.

9 Literaturverzeichnis

1. Knipe DM and PMH. *Fields Virology*. 5th ed. : Lippincott Williams and Wilkins. 2007;Vol. 2.
2. Presti RM, Zhao G, Beatty WL, Mihindikulasuriya KA, da Rosa AP, Popov VL, et al. Quarantfil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family Orthomyxoviridae. *J Virol* [Internet]. 2009;83(22):11599–606. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19726499>
3. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* [Internet]. 1992;56(1):152–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1579108>
4. Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012;109(11):4269–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22371588>
5. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013;9(10):e1003657. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130481>
6. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* [Internet]. 2008;26 Suppl 4:D49-53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19230160>
7. Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. *Virology* [Internet]. 2011;411(2):229–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21237476>
8. Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2007;8(3):196–205. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17262054>
9. Noda T, Kawaoka Y. Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions. *Rev Med Virol* [Internet]. 2010;20(6):380–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20853340>
10. Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters KA, Wills NM, Xiao YL, et al. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science (80-)* [Internet]. 2012;337(6091):199–204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745253>
11. Yamayoshi S, Watanabe M, Goto H, Kawaoka Y. Identification of a Novel Viral Protein Expressed from the PB2 Segment of Influenza A Virus. *J Virol* [Internet]. 2016;90(1):444–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26491155>
12. Flick R, Neumann G, Hoffmann E, Neumeier E, Hobom G. Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *RNA* [Internet]. 1996;2(10):1046–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8849780>
13. Naffakh N, Tomoiu A, Rameix-Welti MA, van der Werf S. Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2008;62:403–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18785841>
14. Area E, Martin-Benito J, Gastaminza P, Torreira E, Valpuesta JM, Carrascosa JL, et al. 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004;101(1):308–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14691253>
15. Wise HM, Hutchinson EC, Jagger BW, Stuart AD, Kang ZH, Robb N, et al. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS Pathog* [Internet]. 2012;8(11):e1002998. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23133386>
16. Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, et al. A novel influenza A

- virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* [Internet]. 2001;7(12):1306–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726970>
17. Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, Akkina R, Kawaoka Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol* [Internet]. 2013;87(5):2455–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23236060>
 18. Modrow SF U.; Schätzl, H. D. T. *Molekulare Virologie*. 2010;
 19. Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F, et al. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* [Internet]. 2009;458(7240):914–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19194459>
 20. Tauber S, Ligertwood Y, Quigg-Nicol M, Dutia BM, Elliott RM. Behaviour of influenza A viruses differentially expressing segment 2 gene products in vitro and in vivo. *J Gen Virol* [Internet]. 2012;93(Pt 4):840–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22190016>
 21. Selman M, Dankar SK, Forbes NE, Jia JJ, Brown EG. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2012;1(11):e42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26038410>
 22. Skehel JJ, Wiley DC. Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell*. 1998.
 23. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 2009.
 24. WHO. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
 25. CDC. <https://www.cdc.gov/flu/highrisk/index.htm>.
 26. Cauchemez S, Valleron AJ, Boëlle PY, Flahault A, Ferguson NM. Estimating the impact of school closure on influenza transmission from Sentinel data. *Nature*. 2008;
 27. Shaman J, Kohn M. Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;
 28. Tamerius JD, Shaman J, Alonso WJ, Bloom-Feshbach K, Uejio CK, Comrie A, et al. Environmental Predictors of Seasonal Influenza Epidemics across Temperate and Tropical Climates. *PLoS Pathog*. 2013;
 29. Lowen AC, Steel J. Roles of Humidity and Temperature in Shaping Influenza Seasonality. *J Virol*. 2014;
 30. Soebiyanto RP, Clara W, Jara J, Castillo L, Sorto OR, Marinero S, et al. The role of temperature and humidity on seasonal influenza in tropical areas: Guatemala, El Salvador and Panama, 2008-2013. *PLoS One*. 2014;
 31. RKI. https://www.rki.de/EN/Content/infections/epidemiology/inf_dis_Germany/influenza/summary_2018-19.html.
 32. Fouchier RAM, Munster VJ. Epidemiology of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds. *OIE Rev Sci Tech*. 2009;
 33. Belser JA, Szretter KJ, Katz JM, Tumpey TM. Chapter 2 Use of Animal Models to Understand the Pandemic Potential of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. *Advances in Virus Research*. 2009.
 34. Field EJ. *Influenza Pathogenesis and Control - Volume II*. Immunology. 2015.
 35. Treanor J. Influenza Vaccine - Outmaneuvering Antigenic Shift and Drift. *New England Journal of Medicine*. 2004.

Literaturverzeichnis

36. Compans RWO MBA (Ed. . Influenza Pathogenesis and Control. In: Springer. 2014. p. Volume I.
37. Simonsen L, Clarke MJ, Schonberger LB, Arden NH, Cox NJ, Fukuda K. Pandemic versus Epidemic Influenza Mortality: A Pattern of Changing Age Distribution. *J Infect Dis.* 1998;
38. Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, Stevens DJ, Xiao B, Ha Y, et al. The Structure and Receptor Binding Properties of the 1918 Influenza Hemagglutinin. *Science* (80-). 2004;
39. Stevens J, Corper AL, Basler CF, Taubenberger JK, Palese P, Wilson IA. Structure of the Uncleaved Human H1 Hemagglutinin from the Extinct 1918 Influenza Virus. *Science* (80-). 2004;
40. Taubenberger JK, Morens DM. Pandemic influenza - including a risk assessment of H5N1. *OIE Rev Sci Tech.* 2009;
41. Scholtissek C, Rohde W, Von Hoyningen V, Rott R. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology.* 1978;
42. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol.* 1989;
43. Nakajima K, Desselberger U, Palese P. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature.* 1978;
44. Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, Hanage WP, Van Kerkhove MD, Hollingsworth TD, et al. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): Early findings. *Science* (80-). 2009;
45. Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med.* 2009;
46. CDC. Situation updates - Pandemic (H1N1) 2009 [Internet]. Available from: <https://www.who.int/csr/disease/swineflu/updates/en/>
47. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng PY, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: A modelling study. *Lancet Infect Dis.* 2012;
48. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* (80-). 2009;
49. Puzelli S, Facchini M, de Marco MA, Palmieri A, Spagnolo D, Boros S, et al. Molecular surveillance of pandemic influenza A(H1N1) viruses circulating in Italy from May 2009 to February 2010: Association between haemagglutinin mutations and clinical outcome. *Eurosurveillance.* 2010;
50. CDC. <https://www.cdc.gov/h1n1flu/yearinreview/yir5.htm>.
51. Poggensee G, Gilsdorf A, Buda S, Eckmanns T, Claus H, Altmann D, et al. The first wave of pandemic influenza (H1N1) 2009 in Germany: From initiation to acceleration. *BMC Infect Dis.* 2010;
52. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Korbila IP, Kapaskelis A, Falagas ME. Age distribution of cases of 2009 (H1N1) pandemic influenza in comparison with seasonal influenza. *PLoS One.* 2011;
53. Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H, et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med.* 2009;
54. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, et al. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature.* 2009;

55. Verma N, Dimitrova M, Carter DM, Crevar CJ, Ross TM, Golding H, et al. Influenza Virus H1N1pdm09 Infections in the Young and Old: Evidence of Greater Antibody Diversity and Affinity for the Hemagglutinin Globular Head Domain (HA1 Domain) in the Elderly than in Young Adults and Children. *J Virol.* 2012;
56. van Kerkhove MD, Vandemaele KAH, Shinde V, Jaramillo-Gutierrez G, Koukounari A, Donnelly CA, et al. Risk factors for severe outcomes following 2009 influenza a (H1N1) infection: A global pooled analysis. *PLoS Med.* 2011;
57. Vaillant L, La Ruche G, Tarantola A, Barboza P. Epidemiology of fatal cases associated with pandemic H1N1 influenza 2009. *Euro Surveill.* 2009;
58. Peiris JSM, Hui KPY, Yen HL. Host response to influenza virus: Protection versus immunopathology. *Current Opinion in Immunology.* 2010.
59. Gill JR, Sheng ZM, Ely SF, Guinee DG, Beasley MB, Suh J, Deshpande C, Mollura DJ, Morens DM, Bray M, Travis WD TJ. Pulmonary pathologic findings of fatal 2009 pandemic influenza A/H1N1 viral infections. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;
60. Perez-Padilla R, De La Rosa-Zamboni D, Ponce De Leon S, Hernandez M, Quiñones-Falconi F, Bautista E, et al. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med.* 2009;
61. To KKW, Hung IFN, Li IWS, Lee K, Koo C, Yan W, et al. Delayed Clearance of Viral Load and Marked Cytokine Activation in Severe Cases of Pandemic H1N1 2009 Influenza Virus Infection. *Clin Infect Dis.* 2010;
62. Carlsen KH, Østaviik I, Leegaard J, Høg H. Respiratory virus infections and aeroallergens in acute bronchial asthma. *Arch Dis Child.* 1984;
63. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, et al. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ.* 1995;
64. Rakes GP, Arruda E, Ingram JM, Hoover GE, Zambrano JC, Hayden FG, et al. Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care: IgE and eosinophil analyses. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;
65. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *Br Med J.* 1993;
66. Wark PAB, Johnston SL, Moric I, Simpson JL, Hensley MJ, Gibson PG. Neutrophil degranulation and cell lysis is associated with clinical severity in virus-induced asthma. *Eur Respir J.* 2002;
67. Grissell T V., Powell H, Shafren DR, Boyle MJ, Hensley MJ, Jones PD, et al. Interleukin-10 gene expression in acute virus-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;
68. Fiore AE, Shay DK, Broder K, Iskander JK, Uyeki TM, Mootrey G, et al. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2009. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2009;
69. Nguyen-Van-Tam JS, Openshaw PJM, Hashim A, Gadd EM, Lim WS, Semple MG, et al. Risk factors for hospitalisation and poor outcome with pandemic A/H1N1 influenza: United Kingdom first wave (May-September 2009). *Thorax.* 2010;
70. Eriksson CO, Graham DA, Uyeki TM, Randolph AG. Risk factors for mechanical ventilation in U.S. children hospitalized with seasonal influenza and 2009 pandemic influenza A. *Pediatr Crit Care Med.* 2012;
71. Jain S, Kamimoto L, Bramley AM, Schmitz AM, Benoit SR, Louie J, et al. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. *N Engl J Med.* 2009;

72. Klopfer KM, Olenec JP, Lee WM, Liu G, Vrtis RF, Roberg KA, et al. Increased H1N1 infection rate in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;
73. Eder W, Ege MJ, Von Mutius E. The asthma epidemic. *New England Journal of Medicine.* 2006.
74. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: Executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2004.
75. Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention.*
76. Deutsche Lungenstiftung e.V. Asthma bronchiale- Häufigkeit [Internet]. Available from: <https://www.lungenaerzte-im-netz.de/krankheiten/asthma-bronchiale/haeufigkeit/>
77. GINA. The Global Asthma Report 2018 [Internet]. 2018. Available from: <http://www.globalasthmareport.org/burden/mortality.php>
78. Barnett SBL, Nurmagambetov TA. Costs of asthma in the United States: 2002-2007. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;
79. Böcking C, Renz H, Pfefferle PI. Prevalence and socio-economic relevance of allergies in Germany. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz.* 2012;
80. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *The Lancet.* 2008.
81. Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, et al. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;
82. E.V DG für P und B. S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma [Internet]. 2017. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-009l_S2k_Asthma_Diagnostik_Therapie_2017-11_1.pdf
83. Barnes PJ. Severe asthma: Advances in current management and future therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;
84. Wenzel SE. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches. *Nature Medicine.* 2012.
85. Romanet-Manent S, Charpin D, Magnan A, Lanteaume A, Vervloet D. Allergic vs nonallergic asthma: What makes the difference? *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2002;
86. Dixon AE, Pratley RE, Forgione PM, Kaminsky DA, Whittaker-Leclair LA, Griffes LA, et al. Effects of obesity and bariatric surgery on airway hyperresponsiveness, asthma control, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;
87. Holguin F, Bleecker ER, Busse WW, Calhoun WJ, Castro M, Erzurum SC, et al. Obesity and asthma: An association modified by age of asthma onset. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;
88. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;
89. Lajoie S, Lewkowich IP, Suzuki Y, Clark JR, Sproles AA, Dienger K, et al. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. *Nat Immunol.* 2010;
90. Woodruff PG, Khashayar R, Janson S, Janson S, Avila P, Boushey HA, et al. Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;

91. Holgate ST. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunol Rev.* 2011;
92. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature Medicine.* 2012.
93. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine.* 2012.
94. Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *New England Journal of Medicine.* 2001.
95. Kariyawasam HH, Robinson DS. The role of eosinophils in airway tissue remodelling in asthma. *Current Opinion in Immunology.* 2007.
96. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2011.
97. Wegmann M. The Role of Neutrophils and TH17 Cells in the Immunopathology of Severe Asthma. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2012;
98. Kian Fan Chung, Sally E. Wenzel, Jan L. Brozek, Andrew Bush, Mario Castro, Peter J. Sterk, Ian M. Adcock, Eric D. Bateman, Elisabeth H. Bel, Eugene R. Bleecker, Louis-Philippe Boulet, Christopher Brightling, Pascal Chanez, Sven-Erik Dahlen, Ratko Djukanov WGT. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J.* 2014;
99. Mishra A, Yao X, Levine SJ. From bedside to bench to clinic trials: Identifying new treatments for severe asthma. *DMM Dis Model Mech.* 2013;
100. M.R. E, N.W. B, T. H, P. O, S.L. J. The microbiology of asthma. *Nat Rev Microbiol.* 2012;
101. Chen Y, Stewart P, Johansen H, McRae L, Taylor G. Sex difference in hospitalization due to asthma in relation to age. *J Clin Epidemiol.* 2003;
102. Carey MA, Card JW, Voltz JW, Arbes SJ, Germolec DR, Korach KS, et al. It's all about sex: gender, lung development and lung disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2007.
103. Mohammad HR, Belgrave D, Kopec Harding K, Murray CS, Simpson A, Custovic A. Age, sex and the association between skin test responses and IgE titres with asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;
104. Shames RS, Heilbron DC, Janson SL, Kishiyama JL, Au DS, Adelman DC. Clinical differences among women with and without self-reported perimenstrual asthma. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 1998;
105. Pauli BD, Reid RL, Munt PW, Wigle RD, Forkert L. Influence of the menstrual cycle on airway function in asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis.* 1989;
106. Schatz M, Harden K, Forsythe A, Chilingar L, Hoffman C, Sperling W, et al. The course of asthma during pregnancy, post partum, and with successive pregnancies: A prospective analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 1988;
107. Juniper EF, Daniel EE, Roberts RS, Kline PA, Hargreave FE, Newhouse MT. Improvement in airway responsiveness and asthma severity during pregnancy: A prospective study. *Am Rev Respir Dis.* 1989;
108. Karol MH. Animal models of occupational asthma. *Eur Respir J.* 1994;
109. Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, et al. Murine models of asthma. *European Respiratory Journal.* 2003.
110. Bryant JL. Animal models in virology. In: *Source Book of Models for Biomedical Research.* 2008.
111. Bouvier NM, Lowen AC. Animal models for influenza virus pathogenesis and

- transmission. *Viruses*. 2010.
112. Beigel J, Bray M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Res*. 2008;
 113. Barnard DL. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*. 2009.
 114. Trammell RA, Toth LA. Genetic susceptibility and resistance to influenza infection and disease in humans and mice. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2008.
 115. Shin YS, Takeda K, Gelfand EW. Understanding asthma using animal models. *Allergy, Asthma and Immunology Research*. 2009.
 116. Wegmann M, Fehrenbach H, Fehrenbach A, Held T, Schramm C, Garn H, et al. Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005;
 117. Srivastava B, Błazejewska P, Heßmann M, Bruder D, Geffers R, Manuel S, et al. Host genetic background strongly influences the response to influenza a virus infections. *PLoS One*. 2009;
 118. Ewart SL, Kuperman D, Schadt E, Tankersley C, Grupe A, Shubitowski DM, et al. Quantitative trait loci controlling allergen-induced airway hyperresponsiveness in inbred mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;
 119. Morokata T, Ishikawa J, Ida K, Yamada T. C57BL/6 mice are more susceptible to antigen-induced pulmonary eosinophilia than BALB/c mice, irrespective of systemic T helper 1/T helper 2 responses. *Immunology*. 1999;
 120. Otte A, Gabriel G. 2009 pandemic H1N1 influenza A virus strains display differential pathogenicity in C57BL/6J but not BALB/c mice. *Virulence*. 2011;
 121. Engels G, Hierweger AM, Hoffmann J, Thieme R, Thiele S, Bertram S, et al. Pregnancy-Related Immune Adaptation Promotes the Emergence of Highly Virulent H1N1 Influenza Virus Strains in Allogeneically Pregnant Mice. *Cell Host Microbe*. 2017;
 122. Stanelle-Bertram S, Walendy-Gnirß K, Speiseder T, Thiele S, Asante IA, Dreier C, et al. Male offspring born to mildly ZIKV-infected mice are at risk of developing neurocognitive disorders in adulthood. *Nat Microbiol*. 2018;
 123. Noelpp B, Noelpp-Eschenhagen I. Das experimentelle asthma bronchiale des meerschweinchens: IV. Mitteilung: Zum modellcharakter des experimentellen meerschweincheuasthmas. *Int Arch Allergy Immunol*. 1952;
 124. Padilla-Carlin DJ, McMurray DN, Hickey AJ. The guinea pig as a model of infectious diseases. *Comparative Medicine*. 2008.
 125. Ricciardolo F, Nijkamp F, Rose V, Folkerts G. The Guinea Pig as an Animal Model for Asthma. *Curr Drug Targets*. 2008;
 126. Tang X, Chong KT. Histopathology and growth kinetics of influenza viruses (H1N1 and H3N2) in the upper and lower airways of guinea pigs. *J Gen Virol*. 2009;
 127. Fuchs B, Braun A. Improved Mouse Models of Allergy and Allergic Asthma - Chances Beyond Ovalbumin. *Curr Drug Targets*. 2008;
 128. Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol*. 1999;
 129. McKee AS, Munks MW, MacLeod MKL, Fleenor CJ, Van Rooijen N, Kappler JW, et al. Alum Induces Innate Immune Responses through Macrophage and Mast Cell Sensors, But These Sensors Are Not Required for Alum to Act As an Adjuvant for Specific Immunity. *J Immunol*. 2009;

130. Conrad ML, Yildirim AÖ, Sonar SS, Kiliç A, Sudowe S, Lunow M, et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy*. 2009;
131. Blyth DI, Pedrick MS, Savage TJ, Hessel EM, Fattah D. Lung Inflammation and Epithelial Changes in a Murine Model of Atopic Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;
132. Daubeuf F, Frossard N. Acute Asthma Models to Ovalbumin in the Mouse. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2013;
133. Wegmann M, Goggel R, Sel S, Erb KJ, Kalkbrenner F, et al. Effects of a low-molecular-weight CCR-3 antagonist on chronic experimental asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2007;36(1):61–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16917075>
134. Bates JHT, Rincon M, Irvin CG. Animal models of asthma. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* [Internet]. 2009 Sep;297(3):L401–10. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00027.2009>
135. Samarasinghe AE, Hoselton SA, Schuh JM. A comparison between intratracheal and inhalation delivery of *Aspergillus fumigatus* conidia in the development of fungal allergic asthma in C57BL/6 mice. *Fungal Biol*. 2011;
136. Lambert AL, Winsett DW, Costa DL, Selgrade MK, Gilmour MI. Transfer of allergic airway responses with serum and lymphocytes from rats sensitized to dust mite. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;
137. Cui Y. When mites attack: Domestic mites are not just allergens. *Parasites and Vectors*. 2014.
138. Debeuf N, Haspeslagh E, van Helden M, Hammad H, Lambrecht BN. Mouse Models of Asthma. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2016;
139. Plantinga M, Guilliams M, Vanheerswynghels M, Deswarte K, Branco-Madeira F, Toussaint W, et al. Conventional and Monocyte-Derived CD11b+ Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen. *Immunity*. 2013;
140. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods*. 2017;
141. Sonesson C, Love MI, Robinson MD. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Research*. 2015;
142. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;
143. Strimmer K. fdrtool: A versatile R package for estimating local and tail area-based false discovery rates. *Bioinformatics*. 2008;
144. <https://www.rdocumentation.org/packages/pheatmap/versions/1.0.12>.
145. Boyle EI, Weng S, Gollub J, Jin H, Botstein D, Cherry JM, et al. GO::TermFinder - Open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics*. 2004;
146. Liao Y, Wang J, Jaehnig EJ, Shi Z, Zhang B. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res*. 2019;
147. Gauth CR, Smith TF. Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells. *Appl Microbiol*. 1968;
148. Obuchi M, Adachi Y, Takizawa T, Sata T. Influenza A(H1N1)pdm09 virus and asthma.

- Front Microbiol [Internet]. 2013;4:307. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24133489>
149. Sel S, Wegmann M, Dicke T, Sel S, Henke W, Yildirim AO, et al. Effective prevention and therapy of experimental allergic asthma using a GATA-3-specific DNzyme. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2008;121(4):910-916 e5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18325571>
 150. Tollefsen E, Langhammer A, Romundstad P, Bjermer L, Johnsen R, Holmen TL. Female gender is associated with higher incidence and more stable respiratory symptoms during adolescence. *Respir Med*. 2006/11/07. 2007;101(5):896–902.
 151. Chang JJ, Woods M, Lindsay RJ, Doyle EH, Griesbeck M, Chan ES, et al. Higher expression of several interferon-stimulated genes in HIV-1-infected females after adjusting for the level of viral replication. *J Infect Dis*. 2013;
 152. Thiele S, Stanelle-Bertram S, Beck S, Kouassi NM, Zickler M, Müller M, et al. Cellular Importin- α 3 Expression Dynamics in the Lung Regulate Antiviral Response Pathways against Influenza A Virus Infection. *Cell Rep*. 2020;
 153. Papadopoulos NG, Christodoulou I, Rohde G, Agache I, Almqvist C, Bruno A, et al. Viruses and bacteria in acute asthma exacerbations - A GA 2LEN-DARE* systematic review. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011.
 154. Louie JK, Acosta M, Samuel MC, Schechter R, Vugia DJ, Harriman K, et al. A novel risk factor for a novel virus: Obesity and 2009 pandemic influenza a (H1N1). *Clin Infect Dis*. 2011;
 155. Samarasinghe AE, Melo RCN, Duan S, LeMessurier KS, Liedmann S, Surman SL, et al. Eosinophils Promote Antiviral Immunity in Mice Infected with Influenza A Virus. *J Immunol*. 2017;
 156. Samarasinghe AE, Woolard SN, Boyd KL, Hoselton SA, Schuh JM, Mccullers JA. The immune profile associated with acute allergic asthma accelerates clearance of influenza virus. *Immunol Cell Biol*. 2014;
 157. Furuya Y, Furuya AKM, Roberts S, Sanfilippo AM, Salmon SL, Metzger DW. Prevention of Influenza Virus-Induced Immunopathology by TGF- β Produced during Allergic Asthma. *PLoS Pathog*. 2015;
 158. Otte A, Sauter M, Daxer MA, McHardy AC, Klingel K, Gabriel G. Adaptive Mutations That Occurred during Circulation in Humans of H1N1 Influenza Virus in the 2009 Pandemic Enhance Virulence in Mice. *J Virol*. 2015;
 159. Otte A, Sauter M, Alleva L, Baumgarte S, Klingel K, Gabriel G. Differential host determinants contribute to the pathogenesis of 2009 pandemic H1N1 and human H5N1 influenza a viruses in experimental mouse models. *Am J Pathol*. 2011;
 160. Short KR, Kroeze EJBV, Fouchier RAM, Kuiken T. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Infectious Diseases*. 2014.
 161. Lunding LP, Webering S, Vock C, Behrends J, Wagner C, Hölscher C, et al. Poly(inosinic-cytidylic) Acid–Triggered Exacerbation of Experimental Asthma Depends on IL-17A Produced by NK Cells. *J Immunol*. 2015;
 162. Gao R, Bhatnagar J, Blau DM, Greer P, Rollin DC, Denison AM, et al. Cytokine and chemokine profiles in lung tissues from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1): Role of the host immune response in pathogenesis. *Am J Pathol*. 2013;
 163. Williams JW, Tjota MY, Sperling AI. The Contribution of Allergen-Specific IgG to the Development of Th2-Mediated Airway Inflammation. *J Allergy*. 2012;
 164. Doorley LA, LeMessurier KS, Iverson AR, Palipane M, Samarasinghe AE. Humoral immune responses during asthma and influenza co-morbidity in mice. *Immunobiology*.

Literaturverzeichnis

2017;

165. Brokstad KA, Davidsson Å, Eriksson JC, Rudblad S. Influenza specific serum IgE is present in non-allergic subjects. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2005.
166. Zieg, Lack, Harbeck, Gelfand, Leung. In vivo effects of glucocorticoids on IgE production. *J Allergy Clin Immunol*. 1994;
167. Posey WC, Nelson HS, Branch B, Pearlman DS. The effects of acute corticosteroid therapy for asthma on serum immunoglobulin levels. *J Allergy Clin Immunol*. 1978;
168. Fuseini H, Yung JA, Cephus JY, Zhang J, Goleniewska K, Polosukhin V V., et al. Testosterone Decreases House Dust Mite–Induced Type 2 and IL-17A–Mediated Airway Inflammation. *J Immunol*. 2018;

10 Verzeichnisse der Abbildungen und Tabellen

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Influenzaviruspartikels.	2
Abbildung 2: Replikationszyklus von IAV.	5
Abbildung 3: Ursprung und genetische Zusammensetzung der 2009 pH1N1 Influenzaviren.	10
Abbildung 4: Die Eigenschaften der 2009 pH1N1 Influenzapandemie in der Population.	11
Abbildung 5: Prävalenz von Grunderkrankungen während der 2009 Influenzapandemie.	12
Abbildung 6: Weltweite Verteilung und Prävalenz von Asthma bronchiale.	14
Abbildung 7: Versuchsaufbau zur Etablierung einer lokalen akut-allergischen Entzündungsreaktion im Maus.	45
Abbildung 8: Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung und anschließender Influenzavirus Infektion.	45
Abbildung 9: Protokoll zur Behandlung mit anti-IgE Antikörper in weiblichen asthmatischen C57BL/6 Mäusen.	49
Abbildung 10: Gewichtsverläufe und Überlebensraten in nicht-asthmatischen und asthmatischen C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit verschiedenen Dosen von 2009 pH1N1 IAV.	56
Abbildung 11: Pathogenität des 2009 pH1N1 IAV in nicht-asthmatischen und asthmatischen 1SB6F1 Mäusen.	58
Abbildung 12: Virustiter in der Lunge und BAL von nicht-asthmatischen und asthmatischen C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV.	59
Abbildung 13: Virustiter in der Lunge und BAL von nicht-asthmatischen und asthmatischen 1SB6F1 Mäusen nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV.	60
Abbildung 14: HE, PAS und immunohistochemische Färbung von C57BL/6 Mäuselungen nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV.	62
Abbildung 15: HE, PAS und immunohistochemische Färbung von 1SB6F1 Mäuselungen nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV.	64
Abbildung 16: Konzentrationslevel von pro- und anti-inflammatorischen, Th1, Th2 und Th17 Zytokinen in den Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen C57BL/6 Mäusen. ...	67
Abbildung 17: Konzentrationslevel von Zytokinen in der BAL-Flüssigkeit von nicht- asthmatischen und asthmatischen C57BL/6 Mäusen.	70

Verzeichnisse der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 18: Konzentrationslevel von pro- und anti-inflammatorischen, Th1, Th2 Zytokinen und Th17 in den Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen 1SB6F1 Mäusen.....	73
Abbildung 19: Konzentrationslevel von Zytokinen in BAL-Flüssigkeit von nicht-asthmatischen und asthmatischen 1SB6F1 Mäusen.....	75
Abbildung 20: Einfluss von Asthma und Influenza auf die zelluläre Infiltration in den Lungen von weiblichen C57BL/6 Mäusen.	77
Abbildung 21: Einfluss von Asthma und Influenza auf die zelluläre Infiltration in den Lungen von weiblichen 1SB6F1 Mäusen.	78
Abbildung 22: Konzentrationsbestimmung von OVA spezifischem IgE im Serum von nicht-asthmatischen und asthmatischen weiblichen C57BL/6 Mäusen.....	79
Abbildung 23: Konzentrationsbestimmung von OVA spezifischem IgE im Serum von nicht-asthmatischen und asthmatischen weiblichen 1SB6F1 Mäusen.....	80
Abbildung 24: Pathogenität des 2009 pH1N1 IAV in männlichen nicht-asthmatischen und asthmatischen 1SB6F1 Mäusen.....	82
Abbildung 25: Virustiter in der Lunge und BAL von männlichen nicht-asthmatischen und asthmatischen 1SB6F1 Mäusen nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV.....	83
Abbildung 26: Konzentrationsbestimmung von OVA spezifischem IgE im Serum von nicht-asthmatischen und asthmatischen männlichen 1SB6F1 Mäusen.	84
Abbildung 27: Expression von differentiell exprimierten Genen in der Lunge von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen 3 Tage nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV.....	86
Abbildung 28: Protein-Protein Interaktion von differentiell exprimierten Genen von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen nach 2009 pH1N1 IAV Infektion.....	88
Abbildung 29: Gen-Ontologie und KEGG-Signalweg Analyse von signifikanten hochregulierten Genen im asthmatischen 1SB6F1 Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen 3 Tage p.i.	89
Abbildung 30: Expression von interferon-stimulierende Genen in den Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen 3 Tage nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV.	91
Abbildung 31: Differentiell regulierten Genen in asthmatischen C57BL/6 verglichen mit asthmatischen 1SB6F1 Mäusen nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV.....	93
Abbildung 32: Expression von zellulären Faktoren in der Lungen von asthmatischen Mäusen nach Infektion mit 2009 pH1N1 IAV (A & B).	94
Abbildung 33: Gen-Ontologie für biologische Prozess von dysregulierten Genen in asthmatische Mäusen 3 Tage nach Influenza Infektion.	95
Abbildung 35: Effekt von anti-IgE Behandlung auf die Pathogenität des 2009 pH1N1 IAV in asthmatischen C57BL/6 Mäusen.....	96

Verzeichnisse der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 35: Expression vom differentiellen exprimierten Gene in der Lunge von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen 6 Tage nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV.	111
Abbildung 36:Protein-Protein Interaktion von differentiell exprimierten Genen von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen nach 2009 pH1N1 IAV Infektion.....	112
Abbildung 37:Gen-Ontologie für biologische Prozess von dysregulierten Genen in asthmatische Mäusen 6 Tage nach Influenza Infektion.	112
Abbildung 38: Expression von interferon-stimulierende Genen in den Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen 6 Tage nach Infektion mit dem 2009 pH1N1 IAV.	114
Abbildung 39: Gen-Ontologie für biologische Prozesse von dysregulierten Genen in asthmatischen Mäusen 6 Tage nach Influenza Infektion.	115

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die IAV Gensegmente, die jeweiligen Proteine und ihre Funktionen;	3
Tabelle 2: Medikamentöse Asthma Therapie.....	19
Tabelle 3: Cluster vom Vergleich der differentielle exprimierten Genen in weiblichen Asthma bronchiale Mausmodellen 3 Tage p.i.	109
Tabelle 4: Top 10 der Gen-Ontologien der Cluster C, D und E 3 Tage p.i. in der Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen.	109
Tabelle 5: Top 10 der KEGG pathway aus der Genen der Cluster C, D und E 3 Tage p.i....	110
Tabelle 6: Vergleich differentielle exprimierten Genen in weiblichen Asthma bronchiale Mausmodellen.	111
Tabelle 7: Gen-Ontologien der Lungen von nicht-asthmatischen und asthmatischen Mäusen 6 Tage p.i.	113

11 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
aa	amino acid; Aminosäure
AAAn	Poly (A)-Schwanz/ Polyadenylierung des 3' Endes von prä-mRNA
ad an/zu	an/zu
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintryphosphat
BAL	Bronchoalveolären Lavage
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
C-	Carboxyterminal / Carboxy-Terminus
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> ; Zentren zur Krankheitskontrolle und Prävention
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpe	<i>cytopathic effect</i> ; zytopathischer Effekt
cRNA	<i>copy RNA</i> ; komplementäre RNA
d	<i>day</i> ; Tag
d	Gramm
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's modified Eagles medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-NPT
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fötales Kälber Serum
FTH	Forschungstierhaltung
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
h	Stunde
H1-16	Hämagglutinin Subtypen H1 bis H16
H ₂	Wasserstoff
H ₂ O, dd	Doppelt destilliertes Wasser
HA-Test	Hämagglutinations Test
HA	Hämagglutinin

Abkürzungsverzeichnis

HA0	Vorläuferprotein des HA
HAU	<i>hemagglutination unit</i> ; Hämagglutinantionstiter
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
Hz	Hertz
IL-	Interleukin
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
IAV	Influenza A Virus
IHC-P	immunhistochemische Färbung für Paraffin eingebettete Proben
IFN	Interferon
k.A.	keine Angabe
kb	Kilobase
KC	<i>Keratinocyte chemoattractant</i>
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
log	Logarithmus
LPAIV	<i>low pathogenic avian influenza virus</i> ; niedrigpathogenes aviäres IAV
M	Molar
M1/ M2	Matrixprotein-1/ -2
multi-BCS	<i>multibasic cleavage site</i> ; multibasische Spaltstelle
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
MLD50	Maus letale Dosis 50
mM	Millimolar
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
mono-BCS	<i>monobasic cleavage site</i> ; monobasische Spaltstelle
mol	Stoffmenge
mRNA	messenger RNA
N-	Aminoterminal/ Amino-Terminus
N	Stickstoff
N1-N9	Neuraminidase Subtypen N1 bis N9
NA	Neuraminidase

Abkürzungsverzeichnis

NaCl	Natriumchlorid
NEP	<i>nuclear export protein</i> ; Nukleares Exportprotein
NLS	<i>nuclear localization signal</i> ; Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NS1/ NS3	Nichtstrukturprotein 1/ Nichtstrukturprotein 3
nt	Nukleotid
ORT	oberer Respirationstrakt
p.f.u.	<i>plaque forming units</i> ; Plaque bildende Einheiten, Angabe zum Virustiter
p.i.	<i>post infection</i> ; nach Infektion
PA	<i>polymerase acidic protein</i> ; Saures Polymeraseprotein
PAS	Perjodsäure-Schiff-Färbung
PB1	<i>polymerase basic protein 1</i> ; Basisches Polymeraseprotein 1
PB2	<i>polymerase basic protein 2</i> ; Basisches Polymeraseprotein 2
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pH1N1	pandemisches H1N1
rH	<i>relative humidity</i> ; relative Luftfeuchtigkeit (in %)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	<i>revolutions per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	<i>reverse transcription</i> ; Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SPF	<i>specific pathogen free</i> ; frei von spezifischen Pathogenen
TNF- α	<i>Tumornekrosefaktor-α</i>
U	<i>unit</i> ; Einheit der Enzymaktivität
u.a	unter anderem
URT	unterer Respirationstrakt
V	Volt
vRNA	virale RNA
vRNP	virales Ribonukleoprotein
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
xg	Erdbeschleunigung, Angabe der Zentrifugationsgeschwindigkeit

12 Veröffentlichungen, Vorträge und Posterpräsentationen

Veröffentlichungen

Teile der Ergebnisse aus vorliegender Arbeit werden in die folgende Publikation veröffentlicht:

Nancy Mounogou Kouassi, Swantje Thiele, Rebecca Bodenstein-Sgro, Michael Spohn, Sanamjeet Virdi, Daniela Indenbirken, Adam Grundhoff, Michael Wegmann and Gülşah Gabriel. „**Impact of Acute Asthma Exacerbation on Influenza Disease Development.**“
Manuskript in Vorbereitung.

Weitere Veröffentlichungen während der Dissertation:

Henning Jacobsen; Kerstin Walendy-Gnirß; Nilguen Tekin-Bubenheim; Isabel Ben-Batalla; Nikolaus Berenbrok; Lucas Scholl; Vinicius Pinho dos Reis; Annette Gries; Hanna Jania; **Nancy Mounogou-Kouassi**; Arne Duesedau; Gundula Pilnitz-Stolze; Aicha Jeridi; Ali Önder Yildirim; Helmut Fuchs; Valerie Gailus-Durner; Claudia Stoeger; Martin Hrabe de Angelis; Fiona Culley; Peter Openshaw; Jochen Behrends; Sonja Loges; Bianca Schneider; Guelsah Gabriel. „**Offspring born to influenza A virus infected pregnant mice show increased vulnerability to viral and bacterial infections.**“ *Manuskript eingereicht.*

Tuku B, Stanelle-Bertram S, Sellau J, Beck S, Bai T, **Mounogou Kouassi N**, Preuß A, Hoenow S, Renné T, Lotter H, Gabriel G. „**Testosterone Protects Against Severe Influenza by Reducing the Pro-Inflammatory Cytokine Response in the Murine Lung.**“
Front Immunol. 2020 Apr 22;11:697. doi: 10.3389/fimmu.2020.00697. eCollection 2020

Thiele, S., Stanelle-Bertram, S., Beck, S., **Mounogou Kouassi, N.**, Zickler, M., Müller, M., Tuku, B., Resa-Infante, P., van Riel, D., Alawi, M., Günther, T., Rother, F., Hügel, S., Reimering, S., McHardy, A., Grundhoff, A., Brune, W., Osterhaus, A., Bader, M., Hartmann, E., and Gabriel, G. **Cellular importin- α 3 expression dynamics in the lung regulate antiviral response pathways against influenza.** *Cell Rep. 2020 Apr 21;31(3):107549. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107549.*

Stanelle-Bertram S, Walendy-Gnirß K, Speiseder T, Thiele S, Asante IA, Dreier C, **Kouassi NM**, Preuß A, Pilnitz-Stolze G, Müller U, Thanisch S, Richter M, Scharrenberg R, Kraus V, Dörk R, Schau L, Herder V, Gerhauser I, Pfankuche VM, Käufer C, Waltl I, Moraes T, Sellau J, Hoenow S, Schmidt-Chanasit J, Jansen S, Schattling B, Ittrich H, Bartsch U, Renné T, Bartenschlager R, Arck P, Cadar D, Friese MA, Vapalahti O, Lotter H, Benites S, Rolling L, Gabriel M, Baumgärtner W, Morellini F, Hölter SM, Amarie O, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Löscher W, Calderon de Anda F, Gabriel G. „**Male offspring born to mildly ZIKV-infected mice are at risk of developing neurocognitive disorders in adulthood.**“ *Nat Microbiol. 2018 Oct;3(10):1161-1174. doi: 10.1038/s41564-018-0236-1. Epub 2018 Sep 10.*

Veröffentlichungen

Dou D, Hernández-Neuta I, Wang H, Östbye H, Qian X, Thiele S, Resa-Infante P, **Kouassi NM**, Sender V, Hentrich K, Mellroth P, Henriques-Normark B, Gabriel G, Nilsson M, Daniels R. „*Analysis of IAV Replication and Co-infection Dynamics by a Versatile RNA Viral Genome Labeling Method.*“ *Cell Rep.* 2017 Jul 5;20(1):251-263. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.021.

Veröffentlichung vor der Dissertation

Baumann J, **Kouassi NM**, Foni E, Klenk HD, Matrosovich M., „*H1N1 Swine Influenza Viruses Differ from Avian Precursors by a Higher pH Optimum of Membrane Fusion.*“ *J Virol.* 2015 Nov 25;90(3):1569-77. doi: 10.1128/JVI.02332-15. Print 2016 Feb 1.

Vorträge und Poster Präsentationen auf Fachtagungen

Nancy Mounogou Kouassi, Swantje Thiele, Patricia Resa-Infante, Stephanie Bertram, Gülşah Gabriel.

„Importin- α 3 Restricts Pandemic H1N1 Influenza A Virus Replication in the Mammalian Airway.“

Vortrag - *26th Annual Meeting of the Society for Virology, Münster/Germany, April 6th - 9th, 2016*

Nancy Mounogou Kouassi, Swantje Thiele, Patricia Resa-Infante, Stephanie Bertram, Gülşah Gabriel.

„Importin- α 3 Restricts Pandemic H1N1 Influenza A Virus Infection in the Mammalian Host.“

Poster- 5th International Influenza Meeting, Konferenz, Münster, Deutschland.

Nancy Mounogou Kouassi, Swantje Thiele, Patricia Resa-Infante, Stephanie Bertram, Gülşah Gabriel.

„Importin- α 3 Restricts Pandemic H1N1 Influenza A Virus Infection in the Mammalian Host.“

Poster- The 6th European Scientific Working group on influenza (ESWI) conference; Riga Latvia, September 10th – 13th 2017.

13 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die dem Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel:

Untersuchungen zum Einfluss eines akuten Asthma bronchiale als Komorbidität auf den Krankheitsverlauf einer Influenza A Virus Infektion im Mausmodell

selbst verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Hamburg, den 24.07.2020

Stipendium

Stipendium

Diese Arbeit wurde teilweise von der FAZIT-STIFTUNG Gemeinnützige Verlagsgesellschaft mbH gefördert.

05/2016 – 01/2018

Finanzierung durch die FAZIT-STIFTUNG

Danksagung

An erste Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Gülşah Gabriel für die Bereitstellung dieses hochinteressanten Forschungsprojekts bedanken. Ich verdanke Prof. Gabriel viele anregende Diskussionen, stetige Motivation, Hilfe und Rat in jeder Situation und stets ein offenes Ohr für wissenschaftliche Fragen. Darüber hinaus möchte ich für ihre offenes Ohr und große Unterstützung auch außerhalb des Labors bedanken. Als wissenschaftliche Frau und junge Mutter konnte ich immer auf die Unterstützung von Prof. Gabriel rechnen und dass weiß ich sehr zu schätzen. Merci beaucoup Gülşah !

Ich möchte mich ganz ehrlich bei unserer ehemaligen Kollegin Dr. Swantje Thiele für die exzellente Betreuung bedanken. Danke für die Hilfestellung während meinen ersten Schritten auf dem Weg zur Doktorarbeit, für die geduldige Beantwortung aller meiner Fragen, für die Hilfsbereitschaft, für das geduldige Korrekturlesen meinen Stipendiums Anträge, Poster und Vorträge. Ich möchte mich zudem für alle Erklärungen und das Fachwissen aber vor allem die unglaublichen sehr gute selbsterklärende Protokolle, die sie gerne mit mir teilte. Das habe ich nie als selbstverständlich hingegenommen. Danke liebe Swantje.

Dr. Stephanie Stanelle-Bertram möchte ich für die angeregten Diskussionen, die geduldige Beantwortung meiner Fragen, die Unterstützung und für die kritische Korrektur meine Doktorarbeit trotz der knapp bemessenen Zeit bedanken. Ich weiß sehr zu schätzen, dass Steffi stets ein offenes Ohr für mich hatte und auch wenn die Tage lange waren, die Stimmung in unserem Büro stets positiv war. Merci Steffi !

Prof. Dr. Gülşah Gabriel und Prof. Dr. Julia Kehr danke ich herzlich für die Bereitschaft zur schriftlichen Begutachtung dieser Arbeit. Prof. Dr. Jörg Ganzhorn, Prof. Dr. Thomas Dobner, Prof. Dr. Julia Kehr und Prof. Dr. Gülşah Gabriel möchte ich herzlich für die Übernahme der Prüfungskommission der Disputation danken.

Bei Berfin Tuku und Martin Zickler möchte ich mich in aller Form für die Korrektur von Teilen meiner Doktorarbeit bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Berfin Tuku, Dr. Carola Dreier und Dr. Géraline Engels für ihre Hilfe in allen Lebenslagen, für die aufbauenden Worte an trüben Tagen und für die vielen lustigen Stunden und geteilten Freuden und Lachen innerhalb und außerhalb des Instituts. Sie sind durch die Zeit im Hamburg zu sehr geschätzten Freundinnen geworden. Vielen Dank, dass Ihr da seid, Mädels.

Ein großes Dankeschön möchte ich an Annette Gries, Ulla Müller und Sandra Röse aussprechen, die mich bei unzähligen Tierexperimenten sowie darüber hinaus tatkräftig

Danksagung

unterstützt haben. Vielen Dank, dass ihr für mich neue Techniken gelernt haben und es mit sehr viele Freude und Motivation gemacht haben. Vielen Dank!

Für die Förderung und Finanzierung meiner Doktorarbeit möchte ich mich ganz herzlich bei der FAZIT-STIFTUNG bedanken. Zudem möchte ich mich bei Prof. Gabriel für den überaus fairen Aufstockungsvertrag, den ich erhalten habe, bedanken. Vielen Dank dafür.

Annette Gries und Gundula Pilnitz-Stolze möchte ich insbesondere für die hervorragende experimentelle Unterstützung bei den durchgeführten Versuchen bedanken.

Ich möchte mich ganz ehrlich bei PD Dr. Michael Wegmann und sein Team von Forschungszentrum Borstel, Leibniz Lungenzentrum, vor allem bei Dr. Rebecca Bodenstein-Sgró für die Hilfe bei der Etablierung des Asthma Mausmodelle am HPI, für die und die Bereitstellung von Materialien und Reagenzien bedanken. Ich möchte mich bei Franziska Beyersdorf und Linda Lang für die hervorragend technische Unterstützung.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Virale Zoonosen – One Health für die wundervollen Jahre der Zusammenarbeit, für die wissenschaftliche und auch unwissenschaftliche Unterhaltung bedanken. Ihr habt diese Zeit besonders gemacht. Dazu zählen natürlich auch unsere ehemaligen Labormitglieder, Dr. Swantje Thiele, Dr. Carola Dreier, Dr. Géraldine Engels, Dr. Ivy Asante. Ich bedanke mich zudem bei der Technologie-Plattform „Next Generation Sequencing“ und allen dahinter stehenden Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die Unterstützung der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptom-Analysen. Ich möchte mich ganz ehrlich bei Dr. Jens Bosse und Dr. Rudolph Reimer von der Technologieplattform Mikroskopie und Bildanalyse für die Einarbeitung ans Lichtmikroskop bedanken.

Ich danke meinen Eltern, die mich in meinem schulischen und beruflichen Werdegang bedingungslos unterstützt haben und in allen Situationen hinter mir stehen. Merci Papa et Maman.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Ehemann, Klein Nzondjou für seine unglaubliche Unterstützung und Liebe bedanken. Du hast immer an mich geglaubt und mich stets motiviert. Vielen Dank für die richtigen Wörter in die richtigen Momente. Ich danke dir, dass du mit viel Geduld meine Launen, insbesondere während des Schreibprozesses, ertragen hast. Merci

Ich widme meine Doktorarbeit, meine Tochter Zhuri Monica. Du gibst mir so viel Kraft und Liebe. Für dich werde hoffentlich immer, trotz doppelter Belastung, die Motivation und Kraft finden, erfolgreich zu sein. Je t'aime très fort ma puce!