

# **Einfluss der Typ I Interferone und IFN $\alpha$ Subtypen auf die retrovirale Friend Virus-Infektion**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

des Fachbereiches  
Biologie und Geografie  
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
**Nicole Gerlach**

aus Schwerte  
März 2007



Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulf Dittmer
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang-Ulrich Müller

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Bernd Sures

Tag der mündlichen Prüfung: 19.09.2007

**„Was wir wissen,  
ist ein Tropfen;  
was wir nicht wissen;  
ein Ozean**

Isaac Newton

## Inhalt

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1.	Die Immunantwort gegen ein Pathogen.....	1
1.2.	Einordnung und Funktion der Interferone.....	2
1.2.1.	Zytokine.....	2
1.2.2.	Die Entdeckung der Interferone.....	2
1.2.3.	Einteilung der Interferone.....	3
1.2.4.	Typ I Interferone.....	4
1.2.5.	Typ II Interferone.....	5
1.3.	Regulation der Typ I Interferon Induktion.....	6
1.4.	Interferon Typ I Rezeptor (IFNAR).....	9
1.5.	Die Interferon-induzierte Signalkaskade.....	10
1.6.	Die Interferon-induzierte antivirale Immunantwort.....	12
1.7.	Immunmodulatorische und antiproliferative Funktionen von Interferonen.....	14
1.8.	Unterschiedliche Wirkung der verschiedenen Interferone.....	15
1.9.	Pharmakologische Anwendungsgebiete.....	16
1.10.	Arteriviren.....	17
1.11.	Struktur von Arteriviren.....	17
1.12.	Replikationszyklus von LDV.....	18
1.13.	Immunantwort gegen LDV.....	19
1.14.	Die Entdeckung der Retroviren.....	21
1.15.	Weltweite Verbreitung von HIV.....	21
1.16.	Tiermodelle für Retroviren.....	23
1.17.	Virologische Grundlagen von Retroviren.....	24
1.17.1.	Struktur von Retroviren.....	24
1.17.2.	Replikationszyklus von Retroviren.....	27
1.17.3.	Klassifizierung muriner Leukämieviren.....	29
1.18.	Pathogenese des FV-Komplexes.....	30
1.19.	Immunität gegen eine FV-Infektion.....	31
1.20.	Krankheitsverläufe verschiedener Mausstämmen nach FV-Infektion.....	33
1.20.	Zielsetzung.....	36

<b>2.</b>	<b>Material</b> .....	<b>37</b>
2.1.	Geräte.....	37
2.2.	Verbrauchsmaterialien.....	38
2.3.	Versuchstiere.....	39
2.3.1.	Wildtyp Mausstämme.....	39
2.3.2.	Knockout ( <sup>-/-</sup> ) Mausstämme.....	39
2.4.	Chemikalien und Medien.....	40
2.5.	Zytokine.....	40
2.6.	Antibiotika.....	41
2.7.	Häufig verwendete Puffer und Medien.....	41
2.8.	Antikörper.....	44
2.9.	Tetramere.....	45
2.10.	Kommerzielle Standardtests.....	46
2.11.	Viren und Zelllinien.....	47
2.12.	Bakterien-Stämme.....	48
2.13.	Oligonukleotid Primer und Sonden.....	48
2.14.	Plasmide.....	50
<b>3.</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>53</b>
3.1.	Tierversuche.....	53
3.1.1.	Infektion.....	53
3.1.2.	Intraperitoneale Injektionen.....	53
3.1.3.	Injektion von IFN $\alpha$ .....	53
3.1.4.	Betäubung der Mäuse mit Isofluran <sup>®</sup> .....	53
3.1.5.	Blutentnahme.....	53
3.1.6.	Organentnahme.....	54
3.2.	<i>In vivo</i> Herstellung eines Friend Virus-Stocks.....	54
3.3.	Herstellung eines Friend Murine Leukemia Virus-Stocks <i>in vitro</i> .....	54
3.4.	Zellzahlbestimmung.....	55
3.5.	Zellkultur.....	55
3.5.1.	Kultivierung von Zellen.....	55

3.5.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	56
3.5.3.	Generierung und Kultur von murinen myeloiden Dendritischen Zellen.....	56
3.5.4.	Stimulation von uninfizierten Dendritischen Zellen mit Typ I Interferon.....	57
3.6.	Herstellung einer Milzzellsuspension und Lyse kernloser Zellen.....	57
3.7.	Nachweis von infektiösen Zellen in der Milz mit Hilfe des „Infectious Center Assay“ .....	57
3.8.	Nachweis von freiem Virus im Plasma (Virämie-Assay).....	58
3.9.	Interferon Inhibitions Assay.....	59
3.10.	Durchflusszytometrie.....	59
3.10.1.	Färbung von Oberflächenproteinen (CD).....	59
3.10.2.	Intrazelluläre Färbung von Granzym A und Granzym B.....	59
3.10.3.	Bestimmung der Prozentzahl von FV-infizierten Zellen im Blut.....	60
3.10.4.	Bestimmung von FV-infizierten Zellpopulationen in der Milz.....	60
3.10.5.	Tetramerfärbung.....	60
3.11.	Zytokinnachweis mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA).....	62
3.11.1.	IFN $\alpha$ / $\beta$ ELISA.....	62
3.11.2.	Nachweis der Produktion von GM-CSF und IL-4 in Zellkultur.....	62
3.12.	Bestimmung von FV-bindenden Antikörpern (ELISA).....	62
3.13.	Bakterienhaltung.....	64
3.14.	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	64
3.15.	Säulenaufreinigung von Plasmid-DNA.....	64
3.15.1.	Minipräparation.....	65
3.15.2.	Megapräparation.....	65
3.16.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	65
3.16.1.	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	65
3.16.2.	Fluorometrische Konzentrationsbestimmung von RNA.....	65
3.17.	Kalziumphosphat-Transfektion von 293T Zellen.....	66
3.18.	Arbeiten mit RNA.....	66
3.18.1.	Isolierung von Gesamt-RNA.....	66
3.18.2.	Real Time (Light Cycler/Roche) SybrGreen PCR.....	67

3.18.3.	Real Time TaqMan-PCR.....	69
3.19.	Generierung der Standards.....	70
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>71</b>
4.1	Antiviraler Effekt von IFN $\alpha$ und IFN $\beta$ <i>in vitro</i> .....	71
4.2.	Kinetik der IFN $\alpha$ und IFN $\beta$ Antwort nach FV-Infektion.....	72
4.3	Verlauf der akuten FV-Infektion in IFN $\beta$ - und IFNAR-defizienten Mäusen.....	74
4.4.	Therapie der akuten FV-Infektion mit humanem IFN $\alpha$ A/D.....	77
4.5.	Einfluss der IFN-Defizienz auf die Leukozyten in der akuten Infektion.....	81
4.6.	Einfluss einer IFN-Defizienz auf die chronische FV-Infektion.....	84
4.7.	Therapie der chronischen FV-Infektion mit IFN $\alpha$ .....	85
4.8.	Nachtrag.....	87
4.9.	Herstellung von Typ I IFN Subtypen <i>in vitro</i> .....	89
4.10.	Antivirale Aktivität der Typ I IFN Subtypen <i>in vitro</i> .....	90
4.11.	Kinetik der Typ I IFN Expression nach FV-Infektion.....	91
4.12.	Kinetik der FV-Replikation.....	93
4.13.	Therapie der akuten FV-Infektion mit IFN $\alpha$ Subtypen.....	94
4.14.	Immunmodulatorischer Einfluss der IFN $\alpha$ Subtypen.....	100
4.15.	Einfluss der IFN $\alpha$ Subtypen auf die TLR, RIG-I, PKR und OAS1a Expression in DCs.....	105
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>107</b>
5.1.	Rolle von Typ I Interferon bei Infektion mit Retroviren.....	107
5.2.	Einfluss von IFN $\alpha$ Subtypen auf die FV-Infektion.....	111
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>118</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>121</b>

<b>8.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>137</b>
8.1.	Abkürzungen.....	137
8.2.	Abbildungsverzeichnis.....	141
8.3.	Tabellenverzeichnis.....	143
	 <b>Publikation.....</b>	 <b>144</b>
	 <b>Danksagung.....</b>	 <b>145</b>
	 <b>Lebenslauf.....</b>	 <b>146</b>
	 <b>Erklärungen.....</b>	 <b>147</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Die Immunantwort gegen ein Pathogen

Bei Säugetieren gibt es zwei unterschiedliche Abwehrsysteme, die "angeborene" und die "erworbene" Immunantwort.

Die "natürliche oder angeborene" Immunantwort vermittelt in den Tieren einen unspezifischen Schutz gegen eine Infektion, sie wird sofort induziert und hält die Infektion so lange unter Kontrolle, bis die Lymphozyten als Effektorzellen der adaptiven (spezifischen) Immunität zu aktiven Effektorzellen herangereift sind. Viele Erreger werden durch die Effektorzellen der angeborenen Immunantwort, wie Monozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Granulozyten und Mastzellen abgetötet. Die "erworbene" Immunität ist spezifisch und wird durch die Zellpopulation der Lymphozyten vermittelt. Diese antigenspezifischen Zellen sind in der Lage verschiedene Effektorfunktionen im Kampf gegen eine Infektion, sowie ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Die Lymphozyten befinden sich in großer Anzahl im Blut, in der Lymphe und in den lymphoiden Geweben. Sie entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen der fötalen Leber bzw. des Knochenmarks. Es werden zwei Gruppen unterschieden: Die T-Zellen und die B-Zellen. Die B-Zellen entwickeln sich direkt aus den hämatopoetischen Stammzellen, während die T-Zellen vom Knochenmark bzw. der fötalen Leber in den Thymus wandern und dort ausreifen.

Anhand von Oberflächenmarkern (CD19, CD4, CD8) lassen sich die Lymphozytenpopulationen experimentell unterscheiden (Parnes 1989). B-Zellen tragen auf der Zelloberfläche das Molekül CD19. Bei T-Zellen gibt es zwei Populationen, die CD4<sup>+</sup> T-Zellen (T-Helferzellen) und die CD8<sup>+</sup> T-Zellen (zytotoxische T-Zellen, CTLs).

Mit den zwei Typen der Lymphozyten (T- und B-Zellen) lassen sich zwei Hauptmechanismen der erworbenen Immunantwort assoziieren, die humorale und die zelluläre Immunantwort. B-Zellen produzieren antigenspezifische Antikörper (Immunglobuline, Ig). Diese Antikörperantwort wird als humorale Immunantwort bezeichnet. Je nach Beschaffenheit des Antigens produzieren B-Zellen unabhängig oder abhängig von T-Zellen Antikörper. Greaves et al. (1973) beobachtete, dass Menschen, die keine T-Zellen besaßen, eine geringere Antikörperantwort aufwiesen. Chesnut und Grey (1986) zeigten, dass dieses Phänomen auf der Funktion von

bestimmten T-Zellen beruhte, die eine Regulation der humoralen Immunantwort innehaben. Die Funktion dieser T-Zellen besteht darin, die Aktivität von Effektorzellen zu regulieren. Daher heißen diese Zellen T-Helferzellen (Th-Zellen).

Die zelluläre Immunantwort wird auch von anderen T-Zellen, den sogenannten zytotoxischen T-Zellen (CTLs), vermittelt. Sie töten Virus-infizierte oder neoplastisch entartete Zellen durch direkten Zellkontakt. Die CTLs werden zusammen mit den B-Zellen als Effektor-Lymphozyten bezeichnet.

## **1.2. Einordnung und Funktion der Interferone**

### **1.2.1. Zytokine**

Der Begriff der Zytokine umfasst eine uneinheitliche Gruppe löslicher Proteine, die eine kurze Halbwertszeit aufweisen. Sie spielen eine Schlüsselrolle im angeborenen Immunsystem, indem sie das Zusammenwirken der immunologischen Effektorsysteme, also der zellulären und der humoralen Immunantwort regulieren und koordinieren. Die Mehrheit der Zytokine wird in immunologisch aktiven Zellen gebildet und von ihnen sezerniert. Ein besonderes Charakteristikum der Zytokine ist die pleiothrophe Wirkung, demnach kann ein und dasselbe Zytokin in zwei unterschiedlichen Zelltypen zwei unterschiedliche Reaktionen auslösen. Außerdem weisen verschiedene Zytokine die Fähigkeit auf dieselben Effekte in einer Zelle zu aktivieren. Diese Fähigkeit wird als „zytokine Redundanz“ bezeichnet.

Zu der Gruppe der Zytokine rechnet man heute neben den Interferonen, Interleukinen und Tumornekrosefaktoren auch die koloniestimulierenden Faktoren, die Chemokine und die „Transforming Growth Factors“ (TGF). Mittlerweile sind über 150 verschiedene Zytokine bekannt, von denen 21 gentechnisch hergestellt werden und Anwendung in der Therapie von Krankheiten finden.

### **1.2.2. Die Entdeckung der Interferone**

M. Hoskins, G. M. Findlay und F. MacCallum beschrieben 1935 das Phänomen der Interferenz: Versuchstiere, in die avirulente Gelbfiebereviren inokuliert wurden, waren in den folgenden 24 Stunden vor einer Infektion mit dem Wildtypvirus geschützt. Der Grund für diesen Schutz blieb lange Zeit ungeklärt, bis die Interferone 1957 von dem Briten Alick Isaacs und dem Schweizer Jean Lindenmann am National Institute for Medical Research in London entdeckt wurden (Isaacs und Lindenmann 1957). Sie

hatten von der Entdeckung einer Substanz berichtet, die von Influenza Viren infizierten Hühnerembryonalzellen freigesetzt wurde und ihrerseits anderes Gewebe vor Virusinfektionen schützen konnte. Diese Substanz wurde von den Wissenschaftlern mit Interferon (IFN) bezeichnet. Seit Anfang der 80iger Jahre erfolgten auch die ersten medizinischen Anwendungen (Strander et al. 1976). Im Labor von Charles Weissmann in Zürich gelang 1980 die Übertragung von menschlichen Interferon-Genen in Bakterien, dadurch ließen sich mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie Proteine in großen Mengen wirtschaftlich erzeugen (Nagata et al. 1980). Somit wird ab 1981 rekombinantes IFN $\alpha$ 2 als Therapeutikum bei verschiedenen Erkrankungen eingesetzt.

### **1.2.3. Einteilung der Interferone**

Die verschiedenen Interferone lassen in drei Gruppen einteilen:

#### **Typ I Interferon**

Interferon-alpha (IFN $\alpha$ ) (früher: Leukocyteninterferon)

Interferon-beta (IFN $\beta$ ) (früher: Fibroblasteninterferon)

Interferon-epsilon/tau (IFN $\epsilon/\tau$ )

Interferon-kappa (IFN $\kappa$ )

Interferon-omega (IFN $\omega$ ) (nur im Menschen)

Limitin (nur in der Maus)

#### **Typ II Interferon**

Interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) (früher: Immuninterferon)

#### **Typ III Interferon**

Interferon-lambda (IFN $\lambda$ )

Die verschiedenen Interferone der drei Interferongruppen unterscheiden sich sowohl durch ihren Aufbau, als auch durch die Zellen in denen sie gebildet werden. IFN $\alpha$  wird von Leukozyten und IFN $\beta$  von Bindegewebszellen (Fibroblasten) produziert. Sie werden zusammen mit IFN $\epsilon/\tau$ , IFN $\kappa$ , IFN $\omega$  und Limitin als Typ I Interferon bezeichnet. Das einzig bekannte Typ II Interferon ist IFN $\gamma$ , welches sich wiederum wesentlich in seinem Aufbau von den Typ I Interferonen unterscheidet. IFN $\gamma$  wird

ausschließlich von inflammatorischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie NK-Zellen gebildet. Zu den Typ III Interferonen wird IFN $\lambda$  gezählt, das im Menschen sowie bei anderen Säugetieren gefunden wurde. Einige frühere Bezeichnungen leiten sich von den Hauptproduzentenzellen beim Menschen ab.

Die drei Interferon-Gruppen kommen in jedem bisher untersuchten Wirbeltier vor. Alle Interferone sind artspezifisch, so ist z.B. ein tierisches IFN beim Menschen unwirksam und umgekehrt.

#### 1.2.4. Typ I Interferone

Das humane IFN $\alpha$  weist im Menschen 14 verschiedene Gene auf, eingeschlossen ein Pseudogen und zwei Gene, die für dasselbe Protein kodieren. Es existiert jedoch nur ein IFN $\beta$  Gen (Tab. 1.1).

Im Mausgenom existieren 14 IFN $\alpha$  Gene, zusätzlich liegen drei Pseudogene und ein IFN $\beta$  Gen vor (van Pesch et al. 2004). Allen Typ I IFN Genen fehlen Introns.

**Tab. 1.1: Humane und murine IFN $\alpha$ / $\beta$  Gene (van Pesch et al. 2004)**

IFN Klasse	Anzahl der Gene (Pseudogene) im Menschen	Anzahl der Gene (Pseudogene) in der Maus
INF- $\alpha$	13 (1)	14 (3)
IFN $\beta$	1 (0)	1 (0)
IFN $\omega$	1 (6)	-
Limitin		?
IFN $\kappa$	1 (0)	1 (0)
IFN $\epsilon$	1 (0)	1 (0)

Genetisch sind die Interferone beim Menschen auf Chromosom 9 und bei der Maus auf Chromosom 4 als Gencluster lokalisiert.

Es wird deshalb vermutet, dass die verschiedenen IFN $\alpha$  Gene durch Genduplikation entstanden sind. Die humanen IFN $\alpha$  Subtypen sind aus 165-166 Aminosäuren bzw. bei der Maus aus 166-167 Aminosäuren ohne Signalpeptid aufgebaut. Das Molekulargewicht liegt beim Menschen und der Maus zwischen 15-21kDa. Zehn der 14 IFN $\alpha$  Subtypen besitzen eine N-Glykosylierung (Asn-X-Ser/Thr).

IFN $\beta$  besteht beim Menschen aus 166, bei der Maus aus 161 Aminosäuren und ist an Asparagin 80 N-glykosyliert. Das Molekulargewicht beträgt 22kDa (Tab. 1.2). Zusätzlich weisen alle Typ I IFN eine enorme Säure- und Temperaturstabilität auf. So überstehen sie ein kurzzeitiges Erhitzen auf 100°C oder einen pH von zwei, ohne ihre biologische Aktivität zu verlieren.

Die Interferone weisen untereinander einen hohen Verwandtschaftsgrad auf. Dabei ist eine relativ große Homologie (ca. 80%) zwischen den IFN $\alpha$  Subtypen festzustellen. Eine geringere Homologie ist hingegen zwischen den IFN $\alpha$  Subtypen und den anderen Interferonen zu erkennen. So besitzt IFN $\alpha$  nur eine Homologie von 50% zu IFN $\beta$ .

**Tab. 1.2: Charakteristische Merkmale des humanen und murinen IFN $\alpha/\beta$**

	IFN $\alpha$		IFN $\beta$	
	Human	Murin	Human	Murin
<b>Chromosomenlokalisierung</b>	9	4	9	4
<b>Aminosäureanzahl</b>	165-166	166-167	166	161
<b>Molekulargewicht</b>	15-21kD	15-21kD	22kD	22kD
<b>Säurestabilität</b>	stabil	stabil	stabil	stabil
<b>Hitzestabilität</b>	stabil	stabil	stabil	stabil
<b>Glykolisierung</b>	-/+	-/+	+	+

### 1.2.5. Typ II Interferon

IFN $\gamma$ , auch als Typ II Interferon bezeichnet, besteht aus 146 Aminosäuren und liegt in der aktiven Form als Heterodimer vor. Im Gegensatz zu IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  wird IFN $\gamma$  von einem Exon enthaltenden Gen auf Chromosom 12 kodiert.

Typ I und Typ II Interferone zeigen keine strukturellen Homologien und binden an unterschiedliche Rezeptoren.

### 1.3. Regulation der Typ I Interferon Induktion

Das angeborene Immunsystem muss in der Lage sein, sofort auf jede durch Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen hervorgerufene Infektion zu reagieren. Dabei findet als erste Abwehrreaktion der angeborenen Immunantwort die Ausschüttung von IFN $\beta$  und IFN $\alpha$ 4 statt. Schlüsselereignis ist die Aktivierung des Interferon-regulierten Faktors 3 (IRF-3) und die Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Potente Induktoren sind die so genannten "Toll-Like-Rezeptoren" (TLR), die durch eine Vielzahl viraler und bakterieller Faktoren aktiviert werden. TLR gehören zu einer Gruppe von Rezeptoren, den PRPs („Pathogen Recognition Receptors“), die der Erkennung von hoch-konservierten Strukturen, die vielen Mikroorganismen gemeinsam sind, so genannten PAMPs („Pathogen-Associated Molecular Patterns“), dienen. Alle TLR sind Transmembranmoleküle, bestehend aus einer extrazellulären, Leucin-reichen Domäne (LRR=„Leucine Rich Repeat“) und einer intrazellulären TIR („Toll-Like (IL)-1 Receptor“) Domäne.

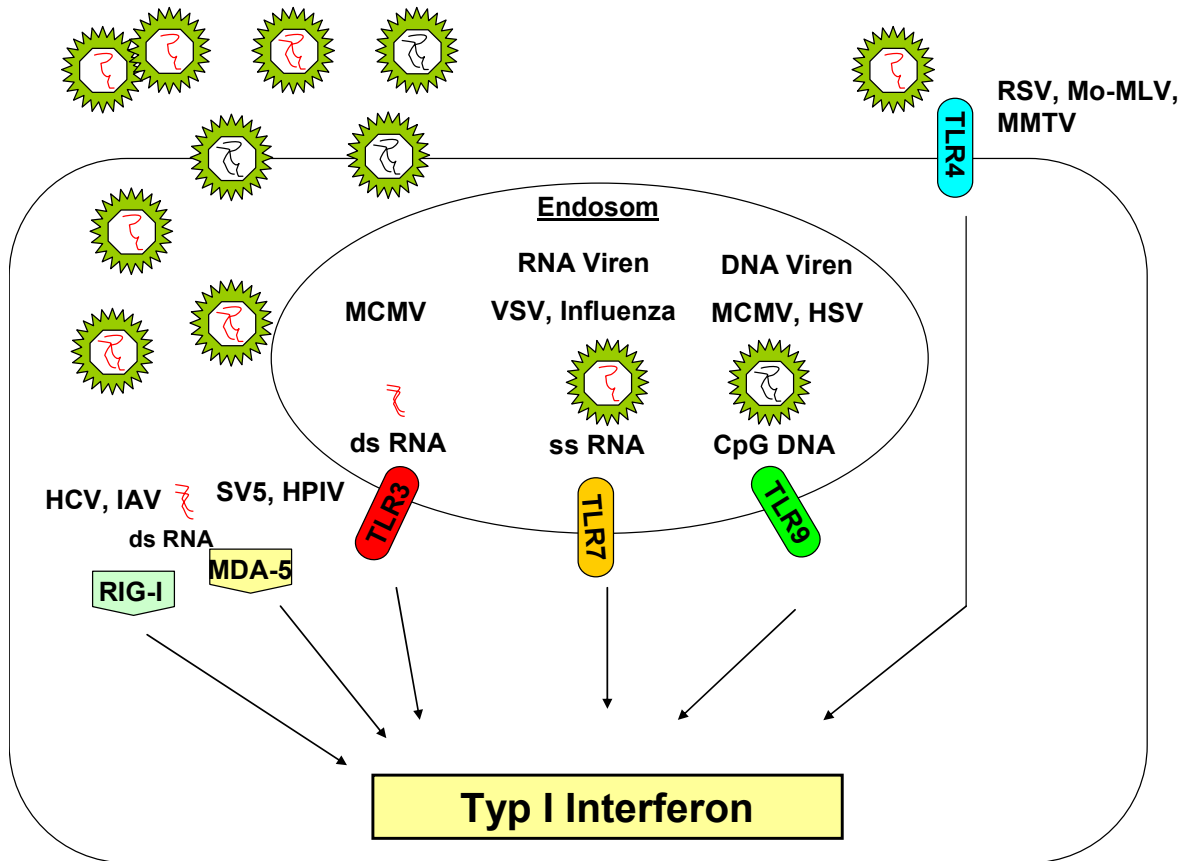
Bisher wurden 10 verschiedene Toll-Like-Rezeptoren im Menschen und 12 in der Maus identifiziert (Beutler 2004). Die verschiedenen TLRs sind unterschiedlich in der Zelle verteilt. TLR1, TLR2 und TLR4 werden auf der Zelloberfläche exprimiert, während TLR3, TLR7 und TLR9 in intrazellulären Kompartimenten wie Endosomen exprimiert werden (Ahmad-Nejad et al. 2002, Heil et al. 2003, Matsumoto et al. 2003, Latz et al. 2004).

Die folgenden Ausführungen fokussieren auf TLR3, 4, 7 und 9, die an der Erkennung viraler Infektionen beteiligt sind und zur Sekretion von Typ I Interferonen führen (Abb. 1.1). TLR3, 7 und 9 werden von Dendritischen Zellen (DCs) und B-Zellen exprimiert (Hornung et al. 2002). Plasmacytoide DCs (pDCs) exprimieren dabei lediglich TLR7 und TLR9, jedoch nicht TLR3 und TLR4, während myeloide DCs (mDCs) TLR3, TLR4 und TLR9 aufweisen (Colonna et al. 2004, Iwasaki und Medzhitov 2004, Liu 2005). B-Zellen hingegen exprimieren alle drei Rezeptoren (Hornung et al. 2002). Doppelsträngige RNA, die bei vielen Viren während der Replikation vorliegt, sowie das Homopolymer Polyinositolcytidinsäure (Poly (I:C)), ein synthetisch hergestelltes dsRNA Analogon, wird von TLR3 erkannt (Alexopoulou et al. 2001). TLR4 erkennt Lipid A oder LPS Komponenten von der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Für TLR4 konnte des Weiteren gezeigt werden, dass es das Fusionsprotein (F) des Respiratorischen Syncytialvirus (RSV), sowie das Oberflächenprotein (env) der Retroviren Moloney-Mäuseläukemievirus (Mo-MLV) und

Maus-Mammatumor-Virus (MMTV) erkennt. Bei TLR9 handelt es sich um einen Rezeptor, der bakterielle und virale DNA erkennt (Hemmi et al. 2000). TLR9 erkennt dabei spezifisch unmethylierte CpG-haltige Oligonukleotide (Bauer et al. 2001) Dies sind CG-Dinukleotide innerhalb einer bestimmten Sequenz, des so genannten CpG-Motivs. Diese unmethylierten CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN) kommen häufig in bakterieller DNA vor und wirken immunstimulatorisch (Krieg et al. 1995, 2002). Im menschlichen Genom hingegen sind CpG-Oligonukleotide selten und überwiegend methyliert.

TLR7 erkennt Ribonukleinsäure Homologe wie Imiquimod, Resiquimod (R-848) und Loxoribine (Jurk et al. 2002, Lee et al. 2003, Heil et al. 2004), sowie synthetische Einzelstrang RNA (ssRNA), deren Oligonukleotide reich an Guanosin oder Uridin sind. G/U-reiche ssRNA von Viren wie dem „Human Immunodeficiency Virus“ (HIV) und Influenza Virus induzieren IFN $\alpha$  durch TLR7 (Lund et al. 2001, Diebold et al. 2004, Heil et al. 2004).

Neben den drei Mitgliedern der Toll-Like-Rezeptorfamilie, die hauptsächlich in der Erkennung viraler Nukleinsäure involviert und in der endosomalen Membran lokalisiert sind, existieren zwei zytosolische Helikasen MDA-5 („Melanoma Differentiation Associated Gene 5“) und RIG-I („Retinoic Acid Inducible Gene I“) (Yoneyama et al. 2004), die essentiell für die Erkennung viraler Infektionen sind und ebenfalls IRF-3 aktivieren (Kato et al. 2005). RIG-I und MDA-5 spielen dabei eine entscheidende Rolle in der Erkennung von viralen Erregern und der anschließenden Induktion von Interferon in Zellen, die keine TLR aufweisen, da RIG-I und MDA-5 nicht nur in Zellen des Immunsystems, sondern auch in anderen Zelltypen exprimiert werden. Analog zum TLR3 erkennt MDA-5 ebenfalls dsRNA und Poly (I:C). Bei dem erst kürzlich beschriebenen Liganden für RIG-I handelt es sich um 5'-Triphosphat (3pRNA) (Hornung et al. 2006).



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Typ I Interferon Induktion durch Toll-Like-Rezeptoren, RIG-I und MDA-5**

TLR3, 7, 9, RIG-I und MDA-5 erkennen virale Nukleinsäure, während TLR4 virale Oberflächenproteine erkennt. Die Stimulierung dieser Rezeptoren führt zur Typ I IFN Produktion. Beispiele für Viren, die durch TLR, RIG-I und MDA-5 erkannt werden, sind dargestellt.

#### 1.4. Interferon Typ I Rezeptor (IFNAR)

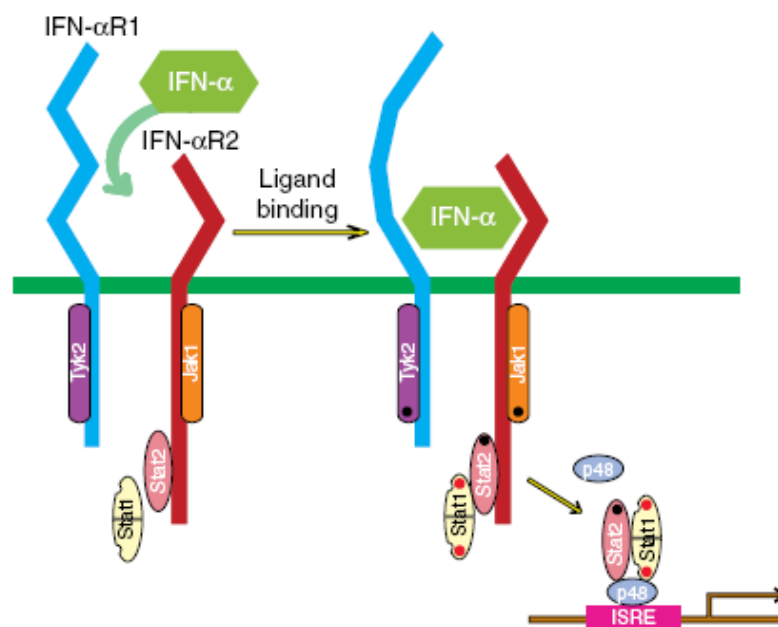
Alle Typ I Interferone binden an denselben Rezeptor und lösen eine Signalkaskade aus in der es zur Aktivierung der Januskinase (Jak), der Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT) und des Interferon-stimulierenden regulatorischen Elementes (ISRE) kommt.

Der Typ I IFN-Rezeptor wird aus zwei glykolysierten Hauptuntereinheiten gebildet, einer 110-130kDA alpha-Untereinheit (auch IFNAR1 genannt) und einer beta-Untereinheit (auch IFNAR2 genannt). Es existieren dabei zwei verschiedene Formen der beta Untereinheit, diese sind das Resultat von alternativem Splicing desselben Genes: eine lange Form (beta L Untereinheit) und eine kurze Form (beta S Untereinheit) mit einem Molekulargewicht von 100kDa bzw. 51kDa.

Bei Bindung eines Interferons assemblieren die Untereinheiten zu einem Komplex und lösen die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden aus (Abb. 1.2).

Der IFNAR wird auf fast jedem Zelltyp exprimiert, abhängig vom jeweiligen Zelltyp liegt die Anzahl der Rezeptoren jedoch zwischen 100 bis 5000 Kopien pro Zelle.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Interferone, einschließlich IFN $\beta$  mit sehr viel höherer Affinität an IFNAR2 binden als IFNAR1 (Cohen et al. 1995).



**Abb. 1.2: Schematische Abbildung des Typ I Interferon Komplexes**

Die Bindung von Typ I IFN an den IFNAR aktiviert die Signaltransduktionskaskaden über den Jak/STAT Weg. Die in der IFN-Kaskade involvierten STATs werden über die intrazelluläre Domäne des IFNAR2 aktiviert (Pestka et al. 2004).

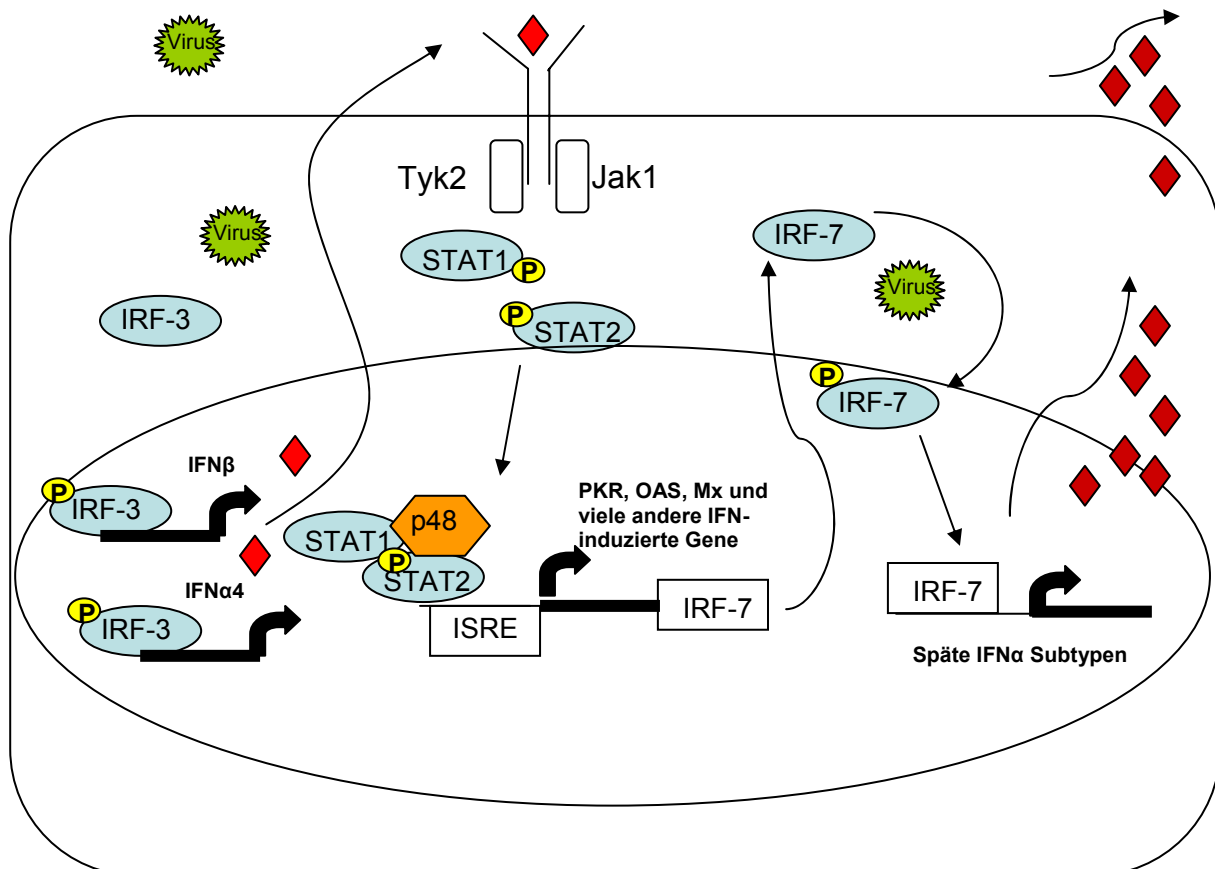
### 1.5. Die Interferon-induzierte Signalkaskade

Virale Infektion führen zur Aktivierung zellulärer Serinkinasen, deren Aktivierung zur Phosphorylierung von IRF-3 führen (Mori et al. 2004). Aktiviertes IRF-3 wiederum initiiert die Expression von IFNA4 in der Maus bzw. IFNA1 im Menschen sowie IFNB (Marie et al. 1998, Sato et al. 1998).

Die biologische Aktivität von IFN $\alpha/\beta$  wird schließlich initiiert durch die Bindung geringer Mengen IFN $\beta$  und IFN $\alpha_4$ , den so genannten frühen IFN, an den IFNAR. Vor der Stimulation sind die zytoplasmatischen Domänen des IFNAR1 und IFNAR2 mit der Tyrosinkinase Tyk2 (Colamonici et al. 1994) und der Januskinase Jak1 (Novick et al. 1994) assoziiert. Beide Untereinheiten besitzen ebenfalls noch Bindungsstellen für STAT-Proteine (Leonard und O'Shea 1998, Prejean und Colamonici 2000, Levy und Darnell 2002). Bei der Bindung von IFN $\alpha/\beta$  assoziieren die beiden Rezeptoruntereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 und ermöglichen somit die Transphosphorylierung und Aktivierung von Tyk2 und Jak1 (Novick et al. 1994). Tyk2 phosphoryliert wiederum Tyrosinreste (Tyr<sup>466</sup>) der zytosolischen Rezeptordomäne IFNAR1, welches die Bindung des STAT2 über seine SH2 Domäne ermöglicht (Yan et al. 1998). STAT2 wird anschließend durch Tyk2 am Tyrosinrest Tyr<sup>690</sup> phosphoryliert und dient nun als Plattform zur Rekrutierung von STAT1, dass im Anschluss ebenfalls an Tyr<sup>701</sup> phosphoryliert wird (Shuai et al. 1993). Der STAT1/STAT2-Heterodimer dissoziiert vom Rezeptor und gelangt in den Nukleus, assoziiert mit dem DNA-bindenden Protein p48 (Veals et al. 1992) aus der IRF-Familie („Interferon Response Factor“, auch IRF-9) und bildet einen Komplex, der als Interferon-stimulierter Genfaktor 3 (ISGF3) bezeichnet wird. Der ISGF3 Komplex bindet im Nukleus an Interferon-stimulierende regulatorische Elemente (ISREs) der DNA und vermittelt dadurch die Transkription verschiedener Interferon-induzierter Gene (ISG) (Prejean und Colamonici 2000, Lau und Horvath 2002), darunter IRF-7, welches im Gegensatz zu IRF-3 nicht konstitutiv exprimiert wird. (Harada et al. 1996, Marie et al. 1998, Sato et al. 1998). IRF-7 wird daraufhin über verschiedene Faktoren, wie z.B. über dsRNA von Viren oder den TLR7/TLR9 Liganden aktiviert (Kawai et al. 2004). Mit Hilfe von IRF-7 wird das IFN $\beta$ /IFN $\alpha_4$  Signal verstärkt (Hata et al. 2001) und die Expression der späten IFN $\alpha$  Gene induziert (Abb. 1.3) (Lu et al. 2000).

Während in fast allen Zellen der oben beschriebene Signalweg abläuft, wird in pDCs IRF-7 konstitutiv exprimiert und erlaubt den Zellen so, IFN bei Stimulation von TLR7

oder TLR9 sofort durch IRF-7 zu produzieren. Daher kann sehr schnell die Expression großer Mengen IFN $\alpha$  induziert werden. Diese Tatsache macht die pDCs zu der wichtigsten Quelle von IFN $\alpha$  und damit zu wichtigen Effektoren in der Immunantwort.



### Abb. 1.3: Schematische Darstellung des IFN $\alpha/\beta$ Signalwegs

Viren infizieren eine Zelle. Durch den Virus bzw. deren dsRNA wird zytoplasmatisches IRF-3 phosphoryliert. Aktiviertes IRF-3 transloziert in den Zellkern und induziert IFN $\beta$  und IFN $\alpha 4$  in der ersten Phase. In der zweiten Phase binden IFN $\beta$  und IFN $\alpha 4$  an den IFNAR und induzieren über den Jak/STAT Signalweg die Expression von IFN-stimulierenden Genen, darunter IRF-7. Über aktiviertes IRF-7 werden die späten IFN $\alpha$  Gene induziert (nach Harada et al. 1996, Marie et al. 1998, Sato et al. 1998).

## **1.6. Die Interferon-induzierte antivirale Immunantwort**

Die am besten charakterisierten IFN-induzierten Enzymen der antiviralen Immunantwort sind die dsRNA-abhängige Proteinkinase R (PKR), die 2,5-Oligoadenylatsynthetase, die Adenosin-Deaminase (ADAR) und das Mx-Protein. Diese Enzyme werden nun im Folgenden kurz beschrieben.

### **1. Proteinkinase R (PKR)**

Bei der IFN-induzierten dsRNA-abhängigen Proteinkinase R (PKR) handelt es sich um eine Serin-/Threoninkinase durch deren Aktivierung die Proteinsynthese (Translation) inhibiert wird. Das PKR Protein enthält dabei zwei Domänen, die N-terminale Domäne beinhaltet die dsRNA-bindende Stelle und die C-Terminale die katalytische Domäne. Im Normalzustand liegt die IFN-induzierte PKR in einer inaktiven Form vor, die Aktivierung wird jedoch bei Bindung von dsRNA oder anderen Polyanionen eingeleitet. Liegt die PKR im aktiven Zustand vor, handelt es sich um ein Dimer, wobei zwei Moleküle PKR ein Molekül dsRNA binden. Die aktive Form der PKR weist eine Reihe von wichtigen Funktionen in der Transkriptions- und Translationskontrolle auf. Die Hauptaufgabe der aktiven PKR besteht in der Phosphorylierung der alpha Untereinheit des eukaryotischen Translationsfaktors eIF2, was dessen Inaktivierung zur Folge hat.

Des Weiteren veranlasst die PKR die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, wodurch die Genexpression von Molekülen wie MHC-I („Major Histocompatibility Complex“), Chemokinen und FAS (Apoptose-Aktivator) induziert wird. Außerdem konnte die Beteiligung der PKR bei der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und p53 nachgewiesen werden (Goodbourn et al. 2000).

### **2. 2,5-Oligoadenylatsynthetase**

Die 2,5-Oligoadenylatsynthetase hemmt ebenfalls die Proteinsynthese. Sie bewirkt die Veresterung von bis zu fünf ATP-Resten zu Oligoadenylaten. Die 2,5-OA Moleküle binden mit hoher Affinität an die 2,5-OA abhängige RNA-Nuklease L (RNase L) und induzieren die Aktivierung über Dimerisation. Die Aktivierung der RNase L führt schließlich zur Degradierung einzelsträngiger RNA und damit sowohl zellulärer als auch viraler RNA (Silverman 1997).

### **3. ADAR**

Die Aktivierung der RNA-spezifischen Adenosin-Deaminase ADAR1 wird ebenfalls durch Interferone induziert. ADAR1 deaminiert bei dsRNA das Adenosin zu einem Inosin, dadurch kommt es zu veränderten Basenpaarungen. Das im Vergleich zum Transkript veränderte Template führt zu einer verminderten Stabilität der viralen RNA (Bass 1997)

### **4. Mx-Proteine**

Die Mx-Proteine wurden ursprünglich in Mäusen identifiziert, die gegen eine Infektion mit Influenza Viren resistent waren. Ihre Existenz wurde in allen bisher untersuchten Vertebraten nachgewiesen, einschließlich Mammalia, Vögel und Fische (Staehele et al. 1993, Arnheiter et al. 1996). Die Mx-Proteine sind hoch-konservierte 70-80kDa GTPasen und weisen Homologie zu Dynamin auf (Horisberger 1995, Arnheiter et al. 1996). Nach der Aktivierung der Mx-Proteine durch Interferone akkumulieren diese im Zytoplasma (Schneider-Schaulies et al. 1994, Schwemmle et al. 1995, Goodbourn et al. 2000), dort greifen die Mx Proteine in die Virusreplikation ein. Wahrscheinlich inhibieren sie dabei die Aktivität von viralen Polymerasen (Stranden et al. 1993).

Des Weiteren wurde eine Interaktion des Mx-Proteins mit dem viralen Nukleokapsid des Thogoto Virus beschrieben, wodurch der Import des Proteins in den Nukleus blockiert wurde (Kochs und Haller 1999).

### 1.7. Immunmodulatorische und antiproliferative Funktionen von Interferonen

Neben der Induktion von Proteinen mit direkten antiviralen Effekten, regulieren die Typ I Interferone mehrere Funktionen in der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Eine Hauptfunktion von Typ I IFN ist die Verstärkung der Zytotoxizität von NK-Zellen (Reiter 1993, Biron et al. 1999), indem die Expression von Perforin verstärkt wird (Mori et al. 1998, Kaser et al. 1999). IFN $\alpha/\beta$  stimulieren außerdem die Proliferation von NK-Zellen, offenbar durch die Induktion von IL-12 in Monozyten/Makrophagen (Ogasawara et al. 1998, Fawaz et al. 1999, Gosselin et al. 1999). Die Expression von MHC-Klasse I und costimulatorischen Molekülen, wie CD80, CD86 und CD40, wird durch IFN $\alpha/\beta$  verstärkt und die Fähigkeit von Zellen virale Antigene auf der Oberfläche zu präsentieren verbessert. Dadurch wird das Erkennen und Lysieren von Zielzellen durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen erleichtert (Boehm et al. 1997, Theofilopoulos et al. 2005).

Auf der anderen Seite hemmen Typ I IFN, insbesondere IFN $\beta$ , die IL-2, TNF- $\alpha$  und MHC-Klasse-II Moleküle Produktion und inhibieren somit u.a. die Antigenpräsentation durch Makrophagen. Gleichzeitig wird die Ausschüttung von IL-10 und TGF- $\beta$  induziert (Wang et al. 2000). Des Weiteren wurde beschrieben, dass Typ I IFN in der Lage sind naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren, das Überleben aktivierter CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen positiv zu beeinflussen, sowie die Entwicklung und Proliferation von B-Zellen zu fördern (Marrack et al. 1999, Theofilopoulos et al. 2005).

Typ I IFN kann außerdem die Differenzierung von pDCs in reife Antigen-präsentierende Zelle induzieren (Asselin-Paturel et al. 2001, Zuniga et al. 2004).

Neben den immunregulatorischen Eigenschaften gehören die IFN zu den wichtigsten antiproliferativ wirkenden Substanzen. Für IFN $\alpha$  wurde die Induktion von CDK-Inhibitoren, wie p21 und p27 beschrieben, welche zur Arretierung des Zellzyklus beim Übergang der G1- zur S-Phase führen (Mandal et al. 1998). Tumorsuppressorgene wie p53 werden durch IFN $\alpha$  aktiviert (Kumar und Atlas 1992), während die Expression der Protoonkogene *c-myc* und *c-fos* inhibiert werden (Einat et al. 1985). Auch die IFN-induzierte 2,5-Oligoadenylatsynthetase hat neben ihren antiviralen Eigenschaften (siehe 1.6.) Einfluss auf die Zellzykluskontrolle (Salzberg et al. 1997).

### 1.8. Unterschiedliche Wirkung der verschiedenen Interferone

Es ist unklar, warum allen Säugetiere eine evolutionär hoch konservierte Familie von Interferonen zur Verfügung steht, die alle über den gleichen Rezeptor ihre Wirkung ausüben. Jedes einzelne Interferon scheint dabei ein unterschiedliches Profil an Aktivitäten zu haben, welches in Abhängigkeit zum jeweiligen Zelltyp steht.

Es stellt sich daher die Frage nach dem Grund für diese enorme Vielfalt an Interferonen. Vermutlich liegt deren Bedeutung in der erforderlichen Anpassungsfähigkeit bei der Abwehr pathogener Erreger, die alle Subtypen essentiell und nicht austauschbar macht.

Da verschiedene Subtypen der Typ I IFN denselben Rezeptorkomplex aktivieren, jedoch unterschiedliche Antworten hervorrufen, scheinen unterschiedliche Ligand-Rezeptor-Interaktionen vorzuliegen und darauffolgende Signalkaskade unterschiedlich abzulaufen. Besonders ausgeprägte Unterschiede wurden dabei zwischen den IFN $\alpha$  Subtypen und IFN $\beta$  beobachtet. Tatsächlich sind die Bindungsstellen am IFNAR1 für IFN $\beta$  und einige IFN $\alpha$  Subtypen unterschiedlich (Deonarain et al. 2002). Während alle untersuchten Typ I IFN die extrazellulär-signalregulierten Proteinkinasen ERK1 und ERK2 aktivieren, konnte eine Stimulierung der c-Jun Kinase (JNK) nur nach einer IFN $\beta$  Stimulierung, aber nicht nach einer Stimulierung mit IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 2, IFN $\alpha$ 4, IFN $\alpha$ 5, IFN $\alpha$ 6 oder IFN $\alpha$ 9 detektiert werden (Cull et al. 2003). Umgekehrt wurde die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) p38 in J2E Zellen von allen IFN $\alpha$  Subtypen aktiviert, nicht jedoch von IFN $\beta$ .

Die unterschiedlich aktivierten Signalwege bei IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  führen schließlich zu verschieden induzierten Genen. Jedoch konnten auch zwischen den IFN $\alpha$  Subtypen deutliche Unterschiede gezeigt werden. Untersuchungen an humanen Dendritischen Zellen und T-Zellen zeigten nach der Stimulierung mit IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 2 und IFN $\alpha$ 21 eine Induktion der gleichen Gene, jedoch mit unterschiedlicher Transkriptionsstärke. Zudem lagen Abweichungen in der Tyrosin- oder Serin-Phosphorylierung bei verschiedenen STAT Molekülen vor (Hilkens et al. 2003).

Im Hinblick auf immunmodulatorische Funktionen von Interferonen konnten ebenfalls Unterschiede in der Effizienz verschiedener Subtypen beschrieben werden. So scheint IFN $\alpha$ 8 sehr potent, und IFN $\alpha$ 1 inaktiv bei der Induktion der B-Zell-Proliferation zu sein (Hibbert und Foster 1999). Außerdem wurde für IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4 und IFN $\alpha$ 9 bei

einer Infektion von Mäusen mit dem Zytomegalievirus (CMV) unterschiedliche antivirale Aktivitäten *in vivo* beschrieben (Yeow et al. 1998).

### **1.9. Pharmakologische Anwendungsgebiete**

Interferone weisen aufgrund ihres großen Wirkungsspektrums vielfältige Einsatzmöglichkeiten in der Therapie gegen Virus und Tumorerkrankungen auf. Seit mehreren Jahren wird IFN $\alpha$  zur Therapie der chronischen Hepatitis-B- sowie zur Therapie der akuten und chronischen Hepatitis-C-Infektion eingesetzt (Shoji et al. 1991). Darüber hinaus finden Interferone Anwendung in der onkologischen Therapie und zwar bei der sehr seltenen Haarzelleukämie, der chronisch myeloiden Leukämie, dem kutanen T-Zell Lymphom, dem Non-Hogkin-Lymphom und dem Nierenzellkarzinom (De Wit et al. 1988, Baron et al. 1991, Platanius et al. 1993).

Das im Verlauf der „Acquired Immunodeficiency Syndrom“ (AIDS)-Erkrankung auftretende Kaposi-Sarkom der Haut kann ebenfalls mit Interferon behandelt werden. IFN $\beta$  findet vor allem Anwendung bei schweren Viruserkrankungen (z.B. Virusenzephalitis, generalisierter Herpes zoster, „Severe Acute Respiratory Syndrome“ (SARS), Varizellen-Infektion bei immunsupprimierten Patienten). Außerdem wird IFN $\beta$  bei der Behandlung von Multipler Sklerose eingesetzt (Pestka et al. 2004).

Nachteile in der Interferon Therapie liegen jedoch in den zahlreichen Nebenwirkungen, wie lokale Hautreaktionen an den Injektionsstellen oder grippeähnlichen Symptomen mit Fieber, Müdigkeit und Gelenkschmerzen. Ein besonderes Augenmerk wird daher in der Zukunft vor allem darauf liegen, die schweren Nebenwirkungen zu minimieren und gleichzeitig die Wirkung zu verstärken. Nur eine begrenzte Anzahl an IFN Subtypen (vorwiegend HuIFN $\alpha$ 2) sind zur Therapie bei Virusinfektionen und Leukämien zugelassen. Neues Wissen über die biologischen Eigenschaften anderer Subtypen würde die Möglichkeiten zur Therapie bei Krankheiten weiter verbessern.

### 1.10. Arteriviren

Die Familie der Arteriviren beinhaltet nur eine Gattung, die ausschließlich tierpathogene Erreger umfasst (Tab. 1.3). Dazu gehören das equine Arteritisvirus (EAVF9), welches bei Pferden und Eseln eine persistierende asymptomatische Infektion induziert, das zu Spätaborten der Schweine führende „Porcine-Reproductive-and-Respiratory-Syndrom-Virus“ (PRRSV), das bei verschiedenen afrikanischen und asiatischen Affenarten vorkommende „Simian-Haemorrhagic-Fever-Virus“ (SHFV) und das Lactatdehydrogenase induzierende Virus (LDV), welches Mäuse infiziert.

Das Lactatdehydrogenase induzierende Virus (LDV) der Maus wurde das erste Mal 1960 von Riley et al. beschrieben. Transplantierte Maustumorzellen, welche mit dem Virus infiziert waren, verursachten dabei eine Veränderung der Blutkonzentration sowie verschiedener Enzyme, eingeschlossen der Lactatdehydrogenase (LDH), woher schließlich auch der Name des Virus abgeleitet wurde (Plagemann et al. 1962).

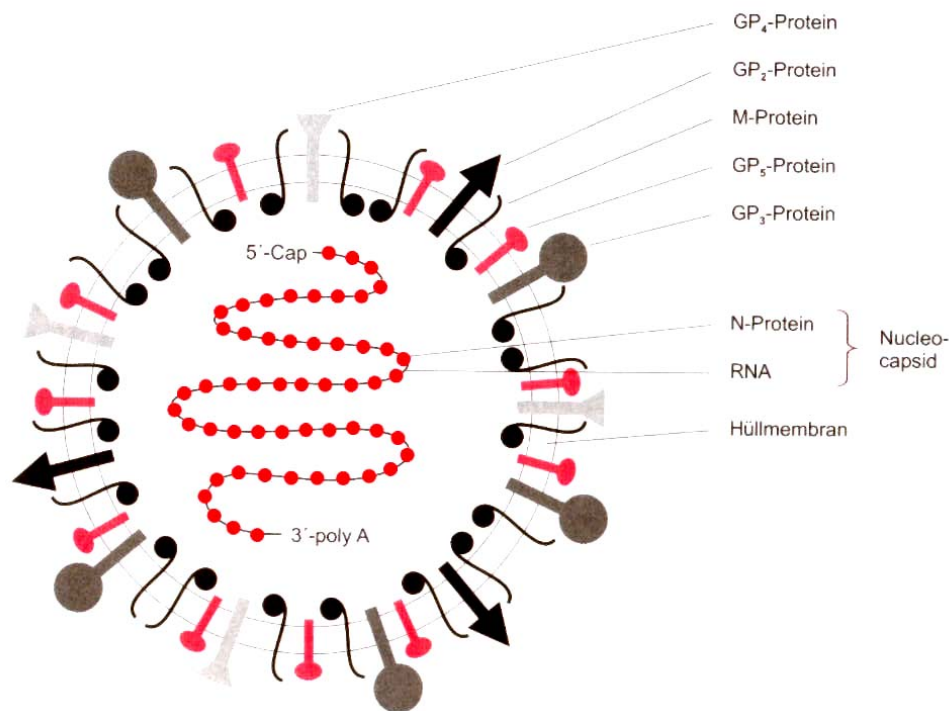
**Tab. 1.3: Charakteristische Vertreter der Arteriviren**

Genus	Tier
Arterivirus	Equines Arteritisvirus (EAV) Lactatdehydrogenase induzierendes Virus (LDV) der Maus Virus des seuchenhaften Spätaborts der Schweine Porcine-Reproductive-and-Respiratory-Syndrom-Virus, (PRRSV) Simian-Haemorrhagic-Fever-Virus (SHFV)

### 1.11. Struktur von Arteriviren

Die membranumhüllten Virionen der Arteriviren haben einen Durchmesser von 40-60nm und bestehen aus ikosaedrischen oder sphärischen Nukleokapsiden. In die Hüllmembran sind ein (beim Lactatdehydrogenase induzierenden Virus (LDV)), zwei (beim Erreger des equinen Arteritisvirus (EAV) und beim „Simian-Haemorrhagic-Fever-Virus“ (SHFV)) oder vier Glykoproteine (beim „Porcine-Reproductive-and-Respiratory-Syndrom-Virus“, (PRRSV)) eingelagert. Ein weiteres mit der Hüllmembran assoziiertes nichtglykosyliertes Protein ist das M-Protein, welches das Strukturprotein der Arteriviren mit dem höchsten Konservierungsgrad ist.

Das einzelsträngige RNA-Genom hat Plusstrangorientierung und liegt assoziiert mit dem phosphorylierten N-Proteinen (12-15kDa) als Nucleokapsid im Innern der Partikel vor (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Aufbau eines Arteriviruspartikels (Modrow et al. 2003)**

### 1.12. Replikationszyklus von LDV

LDV infiziert bevorzugt Makrophagen. Der LDV Rezeptor ist Trypsin-sensitiv und es handelt sich bei dem Rezeptor vermutlich um ein Ia Antigen (Cafruny 1989). Alle Replikationsschritte laufen im Zytoplasma der Zelle ab. Von der genomischen RNA werden zuerst die Polyproteine der Nichtstrukturproteine 1a und 1ab translatiert, welche die RNA-abhängige RNA-Polymerase enthält. Mit Hilfe der RNA-abhängigen Polymerase wird anschließend der Gegenstrang (negativ Orientierung) synthetisiert, wobei die genomische RNA als Matrize dient.

Im weiteren Verlauf des Replikationszyklus hat der Gegenstrang zwei Funktionen: Zum einen dient er als Matrize für die Synthese neuer Virusgenome und zum anderen für die Bildung subgenomischer mRNA-Spezies, von denen die verschiedenen Strukturproteine der Arteriviren translatiert werden. Alle subgenomischen mRNAs haben das gleiche 3'-Ende, welches auch dem des Virusgenoms entspricht, besitzen jedoch verschiedene Startpunkte, die sich in der

Genomregion zwischen dem Ende des Leserahmens für das Polyprotein 1 ab und dem 3'-Ende des Genoms befinden.

Am 5'-Ende weisen alle Moleküle eine einheitliche Sequenzabfolge auf, die Leader-RNA, die komplementär zum 3'-Ende des Negativstranges ist. Die Leader-Sequenz dient vermutlich als Primer für die subgenomischen mRNA-Spezies. Nahe ihrem 3'-Ende weist die Leader-Sequenz konservierte Basenfolgen (UCUAAAC) auf, die komplementären Sequenzen hierzu findet man an unterschiedlichen Stellen in der Negativstrang-RNA.

Schließlich findet die Verpackung der viralen RNA und der viralen Proteine zu kompletten Viren an der Plasmamembran und die anschließende Freisetzung neuer viraler Partikel statt.

### **1.13. Immunantwort gegen LDV**

LDV führt immer, unabhängig vom Mausstamm zu einer lebenslangen virämischen Infektion in der Maus (Rowson 1980). Maximale Titer von  $10^9$ - $10^{10}$  ID<sub>50</sub>/ml werden im Plasma schon 24-36h nach Infektion erreicht (Cafruny 1989). Ein Titer von  $10^4$  bis  $10^6$  ID<sub>50</sub>/ml wird schließlich lebenslang aufrechterhalten, da LDV in einer immer wieder neu gebildeten Subpopulation von Makrophagen repliziert und den Immunantworten des Wirtes entkommt.

Innerhalb einiger Tage nach der Infektion kommt es zunächst zu einer starken und kurz anhaltenden NK-Zell Aktivierung, die durch eine erhöhte IFN $\gamma$  Produktion charakterisiert ist. Weder die Aktivierung der NK-Zellen, noch die Sekretion von IFN $\gamma$  hat dabei einen Einfluß auf die frühe und schnelle Replikation von LDV (Koi et al. 1981).

Einhergehend mit der LDV-Infektion kommt es zu einer Aktivierung der B-Zellen (Coutelier et al. 1990, Bradley et al. 1991). Vor allem eine Titer-Erhöhung der IgG2a Subklasse sowie ein kurzzeitiger IgM Anstieg kann beobachtet werden. Der IgG Titer erhöht sich mit dem Fortschreiten der Infektion und erreicht im Allgemeinen einen 2-4fachen Wert einen Monat nach der Infektion im Vergleich zu uninfizierten Mäusen. (Cafruny und Plagemann 1982, Coutelier und Van Snick 1985, Coutelier et al. 1986, Hovinen et al. 1990, Li et al. 1990). Die Neutralisation von LDV durch Antikörper ist allerdings sehr ineffizient, vermutlich durch die Eigenschaften des glykolysierten Oberflächenproteins. Nur 30 Aminosäuren des Proteins werden auf der Oberfläche des Virions exponiert und diese Ektodomäne ist durch eine Glykolisierung mit

Polyactosaminglycan vor Antikörperbindungen geschützt (Faarberg und Plagemann 1995, Faarberg et al. 1995). Der genaue Mechanismus der polyklonalen Aktivierung der B-Zellen bei einer LDV-Infektion ist noch nicht bekannt. Nicht nur NK-Zellen und Antikörper können die LDV-Replikation nicht kontrollieren, sondern auch zytotoxische T-Zellen sind nicht in der Lage die Replikation effektiv zu hemmen (Even et al. 1995). Obwohl sie sehr schnell induziert werden, verschwinden sie 30 Tage nach der Infektion wieder und können in der persistierenden Infektion nicht wieder restimuliert werden (Plagemann et al. 1995). Zudem führt eine Infektion mit LDV zu einer Inhibition der Zytokinproduktion von IL-4 in Lymphknotenzellen und IL-1 in Makrophagen (Hayashi et al. 1991, Monteyne et al. 1993).

#### **1.14. Die Entdeckung der Retroviren**

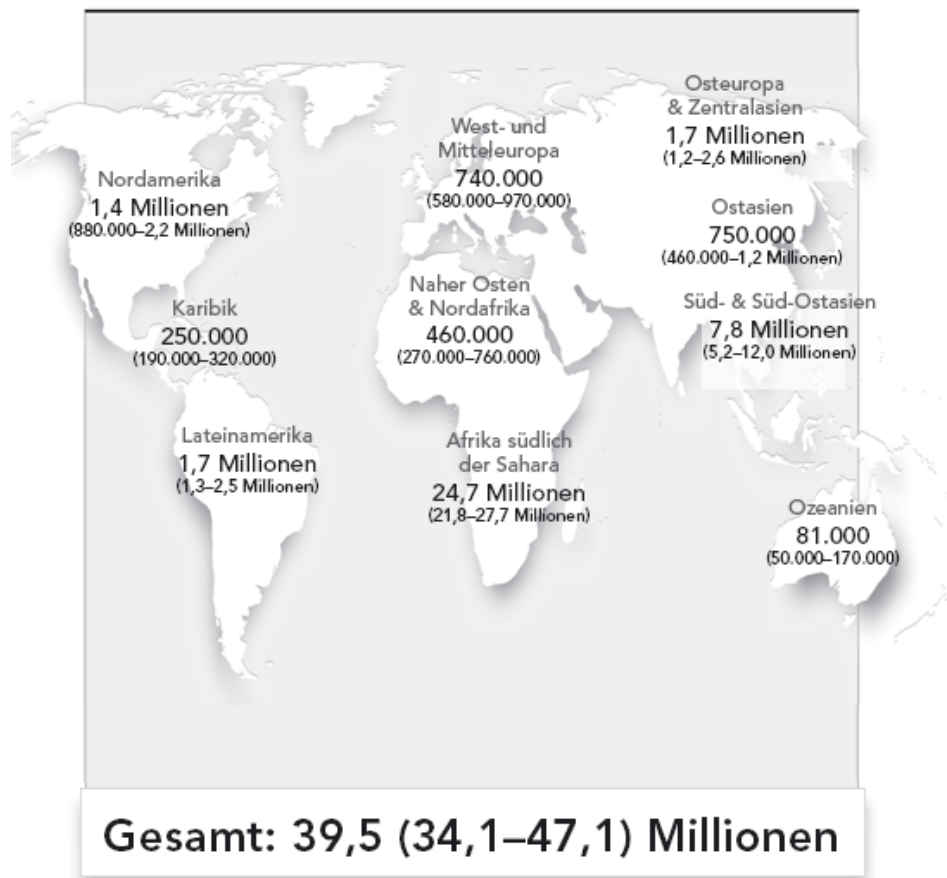
Retroviren wurden Anfang des 20. Jahrhunderts im Zuge der Erforschung von Tumorerkrankungen bei Hühnern entdeckt. Rous (1911) fand heraus, dass sich die Tumorerkrankung bei Verwendung zellfreier Extrakte aus Geflügelsarkomen auf gesunde Hühner übertragen lässt. Im Jahr 1911 wurde dann von Rous das erste onkogene Retrovirus, das „Rous Sarcoma Virus“ (RSV) identifiziert. In den darauf folgenden Jahren wurden eine Vielzahl von Retroviren entdeckt, darunter z.B. das „Simian Foemy Virus“ (SFV) (Enders und Peebles 1954), das Friend Murine Leukemia Virus“ (F-MuLV) (Friend 1957) und das „Feline Leukemia Virus“ (FeLV) (Jarrett et al. 1964).

Als erstes mit einer Erkrankung assoziiertes Retrovirus des Menschen wurden 1980 das „Human T-Cell Leukemia Virus-1“ (HTLV-1) isoliert (Gallo 1986). Etwa 2% der mit HTLV-1 infizierten Menschen entwickeln eine adulte T-Zell-Leukämie. Im Jahr 1983 wurde am Pasteur Institut in Paris ein bisher unbekanntes Retrovirus entdeckt (Barre-Sinoussi et al. 1983), welches 1984 von Brun-Vezinet et al. mit der 1981 beschriebenen „Acquired Immunodeficiency Syndrom“ (AIDS)-Erkrankung in Verbindung gebracht wurde. Bei einer AIDS-Erkrankung weisen die betroffenen Patienten einen schlechten Allgemeinzustand und verschiedene opportunistische Infektionen auf. Das Isolat von Barre-Sinoussi et al. (1983), sowie Isolate von Popovic et al. (1984) und Levy et al. (1984) wurden später unter der Bezeichnung „Human Immunodeficiency Virus Typ 1“ (HIV-1) zusammengefasst.

#### **1.15. Weltweite Verbreitung von HIV**

Seit den frühen achtziger Jahren haben sich nach Angaben des AIDS Programms der Vereinten Nationen (UNAIDS) weltweit ca. 40-50 Millionen Menschen mit HIV infiziert. An AIDS sind bis Ende 2005 ungefähr 23 Millionen Menschen verstorben, allein im Jahr 2006 sind 2,9 Millionen Menschen verstorben. Zurzeit sind etwa 39,5 Millionen Menschen infiziert - 2,6 Millionen mehr als 2004 und die Zahl der Neuinfektionen mit HIV betrug 2006 4,3 Millionen Menschen. Afrika südlich der Sahara trägt weiterhin die Hauptlast der weltweiten Epidemie. Zweidrittel (63%) aller Erwachsenen und Kinder mit HIV weltweit leben in Afrika südlich der Sahara (Abb. 1.5). In den letzten zwei Jahren stieg dabei die Anzahl der Menschen mit HIV in allen Regionen der Welt an. Die stärksten Zuwächse waren in Ostasien, in Osteuropa und

in Zentralasien zu beobachten (Quelle: UNAIDS Die AIDS Epidemie. Statusbericht: Dez. 2006. [http://data.unaids.org/pub/EpiReport/2006/2006\\_EpiUpdate\\_de.pdf](http://data.unaids.org/pub/EpiReport/2006/2006_EpiUpdate_de.pdf)).



**Abb. 1.5: Schätzung HIV-positiver Erwachsener und Kinder 2006**

Als 1983 HIV zum ersten Mal beschrieben wurde, begannen sofort die ersten Vakzinestudien zur Bekämpfung von HIV. Dennoch vermittelt keine der bis heute entwickelten Prototyp-Vakzinen einen Schutz vor der HIV-Infektion. Die HAART-Therapie („High Active Antiretrovirale Therapy“), welche zurzeit die einzige wirksame antiretrovirale Therapie dargestellt, ist außerdem nur einem geringen Teil der Weltbevölkerung (ca. 5% der HIV-Infizierten) zugänglich. Bei dieser Therapie handelt es sich um eine Kombinationstherapie, die aus mindestens drei verschiedenen Präparaten besteht. Nachteile dieser Therapie sind die hohen Kosten, die große Belastung der Patienten aufgrund der Nebenwirkungen der Präparate und die trotz Kombinationstherapie auftretende Resistenzbildung von HIV. Zudem kann durch HAART nur der Eintritt der HIV-Erkrankung zu AIDS verzögert werden, eine vollständige Heilung erfolgt nicht.

### 1.16. Tiermodelle für Retroviren

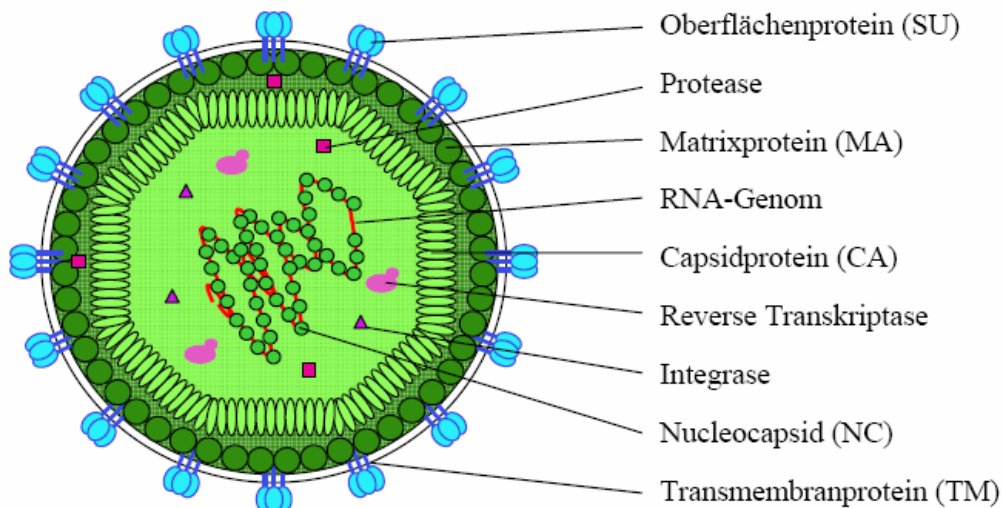
Ein Problem, welches bei der Erforschung von HIV-1 auftaucht, ist die begrenzte Anzahl an möglichen Tiermodellen. Nur Schimpansen lassen sich reproduzierbar mit HIV-1 infizieren. Jedoch replizieren die meisten HIV-1 Virusisolate in Schimpansen sehr schlecht und die Tiere entwickeln innerhalb einer Dekade nach Infektion keine AIDS-ähnliche Erkrankung. Hinzu kommt, dass ethische und finanzielle Gründe gegen Experimente mit Schimpansen sprechen. Viele Studien zur Untersuchung der Immunantwort gegen Immunodefizienzviren wurden daher in Rhesusmakaken mit dem verwandten „Simian Immunodeficiency Virus“ (SIV) durchgeführt. Die Probleme dieses Tiermodels sind die limitierte Anzahl an Affen, ihr heterogener genetischer Hintergrund, das geringe Wissen über die molekulare Immunologie von Affen und die geringe Möglichkeit, deren Immunsystem zu manipulieren. Daher sind Erkenntnisse über fundamentale Grundlagen der Retrovirusimmunologie im Mausmodell einfacher zu erlangen. Ein Vorteil des Mausmodells ist der genetisch definierte immunologische Hintergrund der Tiere, wobei kongene, transgene und „knockout“ Tiere von besonderer Bedeutung sind.

Weil Mäuse nicht mit HIV oder SIV infizierbar sind, muss ein anderes Retrovirus für die Forschung verwendet werden. Es gibt eine große Anzahl von onkogenen Retroviren in der Maus, jedoch induzieren sehr viele dieser Retroviren nur bei neugeborenen Mäusen eine Erkrankung, während sie bei erwachsenen Tieren apathogen sind. Das Friend Virus (FV) ist ein Retrovirus-Komplex, welches in erwachsenen Mäusen eine letale Erkrankung (Erythroleukämie) verursacht. Die genetischen und immunologischen Merkmale von FV sind intensiv in den letzten zwanzig Jahren untersucht worden (Hasenkrug und Chesebro 1997). Aufgrund der unterschiedlichen Pathogenese von FV im Gegensatz zu HIV oder SIV im Menschen oder Affen ist die FV-Infektion als Modell für pathologische Aspekte nicht geeignet. In der Phase einer FV-Infektion bzw. HIV- oder SIV-Infektion sind jedoch große Ähnlichkeiten in der Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem jeweiligen Virus zu beobachten (Dittmer und Hasenkrug 2001). Daher lassen sich die immunologischen Merkmale einer retroviralen Infektion gut am FV-Modell untersuchen. Das Friend Virus Mausmodell wurde in dieser Arbeit als Grundlagenmodell verwendet, um die Rolle von Typ I IFN in Retroviren zu untersuchen.

## 1.17. Virologische Grundlagen von Retroviren

### 1.17.1. Struktur von Retroviren

Die Familie der Retroviridae ist eine große und divergente Familie von umhüllten RNA-Viren, die einen Durchmesser von 80-100nm haben. Charakteristisches Merkmal aller Retroviren ist der Besitz des Enzyms Reverse-Transkriptase. Das Genom dieser Viren besteht aus einer linearen, einzelsträngigen, nicht segmentierten RNA positiver Polarität mit einer Größe von 7-12kb. Zwei positive einzelsträngige RNA-Moleküle bilden zusammen mit dem Nukleokapsidprotein und dem Reverse-Transkriptase-Molekül einen Ribonukleoproteinkomplex („Core“), der von einer Matrix und einer Hülle („Envelope“) umgeben ist. (Abb. 1.6)



**Abb. 1.6: Typischer Aufbau eines Orthoretrovirus**

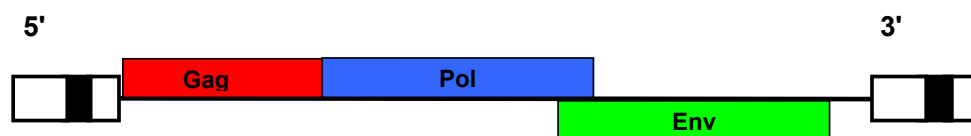
Alle Retroviren haben folgende Hauptgene gemeinsam:

- gag-Gen: Synthetisiert interne Strukturproteine (Matrix, Kapsid, Nukleoproteinstruktur)
- pol-Gen: Enthält die Informationen für die Enzyme Reverse-Transkriptase, Protease und Integrase.
- env-Gen: Synthetisiert die Oberflächen- und Transmembran-Komponenten des viralen Hüllproteins.

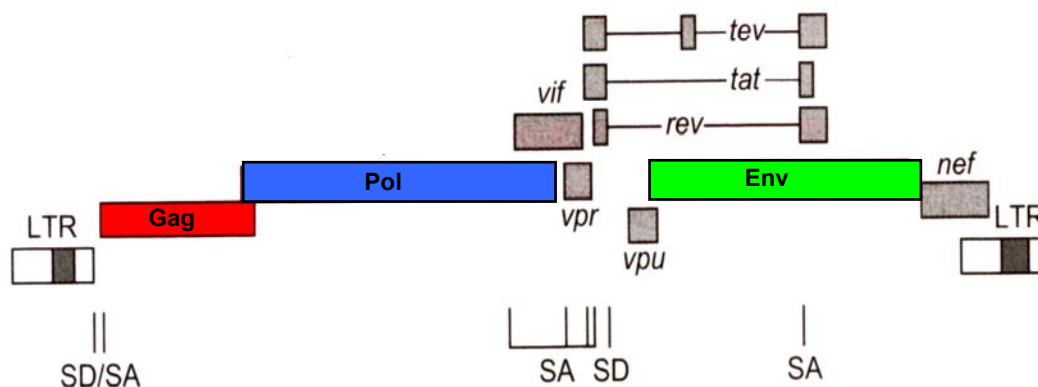
Die Familie der Retroviridae lässt sich in zwei Gruppen einteilen, den einfachen und den komplexen Retroviren.

Einfache Retroviren tragen nur die oben aufgeführten elementaren Gene (Abb. 1.7A), während komplexe Retroviren (z.B. HIV) zusätzlich noch eine Reihe von regulatorischen nicht-viralen Strukturproteinen besitzen (Abb. 1.7B).

### A: MuLV



### B: HIV



### Abb. 1.7: Aufbau von einfachen und komplexen Retroviren

A: Aufbau von einfachen Retroviren am Beispiel von MuLV

B: Aufbau von komplexen Retroviren am Beispiel von HIV

Die Gene gag, pol und env kodieren für alle Strukturproteine. Diese sind essentiell und in allen Retroviren vorhanden. Die Gene vif, vpr, vpu, rev, tat, nef kodieren für akzessorische und regulatorische Proteine (Coffin et al. 1997).

Vor allem bei Wirbeltieren sind Retroviren zu finden, bei denen sie für verschiedene Erkrankungen verantwortlich sind. Dazu gehören Tumorerkrankungen (z.B. HTLV-1), Immundefizienzen (z.B. HIV), neurologische Defekte bis hin zu inapparenten Infektionsverläufen. Die aktuelle, zur Zeit verbindliche Taxonomie durch das *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* unterteilt die Retroviren vor

allein aufgrund ihrer genetischen Verwandtschaftsverhältnisse wie folgt in zwei Unterfamilien und sieben Gattungen:

**Tab. 1.4: Taxonomie der Retroviridae (modifiziert nach Modrow et al. 2003)**

Unterfamilie	Gattung	Beispiele		Genom	Typ
		Mensch	Tier		
Orthoretroviren	$\alpha$ -Retrovirus		ALV (aviäre Leukoseviren) RSV (Rous-Sarkomavirus)	Simpel Simple	Exogen Exogen
	$\beta$ -Retrovirus		MMTV (Maus-Mammatumor Virus) MPMV (Mason-Pfizer-Affen-Virus)	Komplex* Simpel	Exogen/ Endogen Exogen
	$\gamma$ -Retrovirus		FelV (Felines Leukämievirus) Mo-MLV (Moloney-Mäuseleukämie-Virus) MuLV (Murines Leukämievirus)	Simpel Simpel Simpel	Exogen Exogen Exogen
	$\delta$ -Retrovirus	HTLV-I/HTLV-II (Humane T-cell leukemia virus) HRES-1	BLV (Bovines Leukosevirus)	Komplex komplex	Exogen Exogen
	$\epsilon$ -Retrovirus		Diverse Fischretroviren WDSV (Walleye Dermal Sarcoma Virus)	Komplex	Exogen
	Lentivirus	HIV-1/HIV-2 (Humane immunodeficiency virus)	SIV (Affenimmundefizienzvirus) FIV (Felines Immunodefizienzvirus)	Komplex Komplex komplex	Exogen Exogen Exogen
Spumaviren	Spumavirus		Feline Spumaviren Affenspumaviren Bovine Spumaviren Equine Spumaviren	komplex	

\*Für MMTV wurde 2005 ein zusätzliches, regulatorisches Protein beschrieben, damit ist MMTV das bislang einzig bekannte komplexe  $\beta$ -Retrovirus (Mertz et al. 2005).

Außerdem muss zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterschieden werden. Die exogenen Retroviren besitzen alle Informationen auf dem Genom, die für einen kompletten Infektionszyklus mit anschließender Partikelfreisetzung notwendig sind. So kann das Virus „aktiv“ verbreitet werden. Im Gegensatz dazu sind die endogenen Retroviren im Wirtsgenom integriert und können aufgrund von Gendefekten nur noch vertikal übertragen werden.

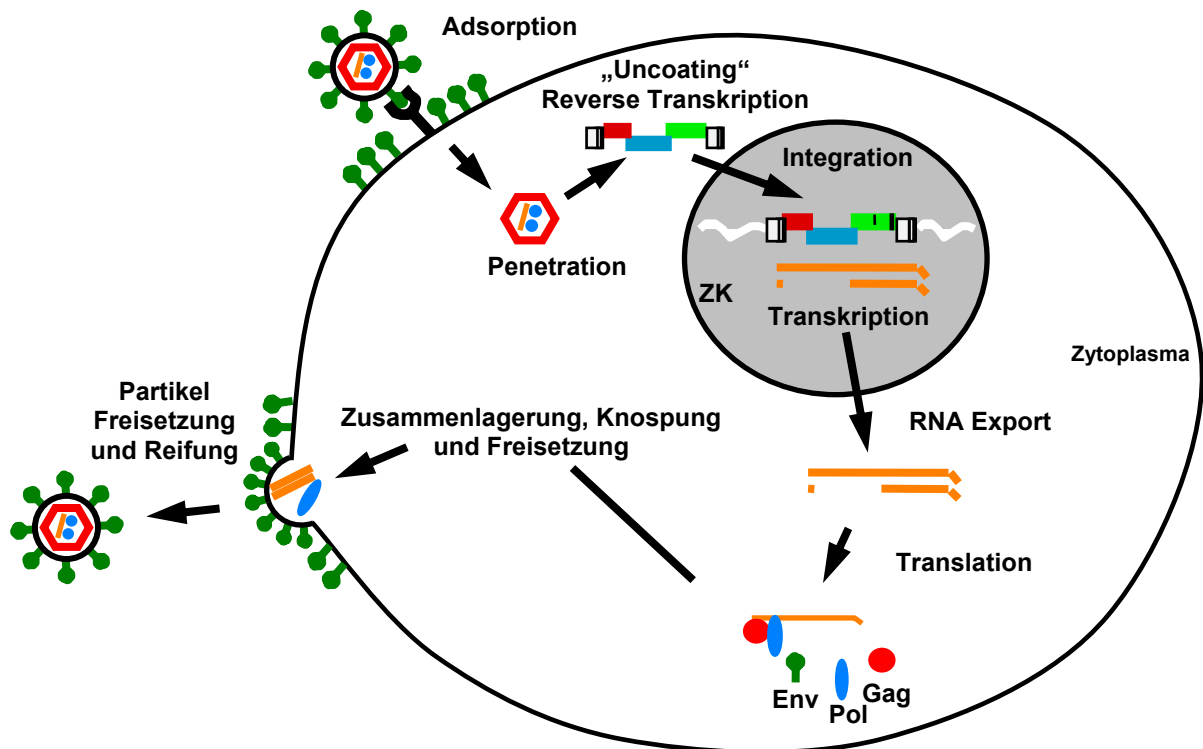
Bei Retroviren kann es zu Defekten im Genom kommen, die zum Verlust des produktiven Infektionszyklus führen können. Helferviren können diese Defekte komplementieren, so dass das defekte Retrovirus mit Hilfe des Helfervirus einen kompletten Infektionszyklus durchlaufen kann.

### **1.17.2. Replikationszyklus von Retroviren**

Die Replikation von murinen Leukämieviren (Abb. 1.8) ist typisch für Retroviren und lässt sich in folgende Abschnitte einteilen:

1. Bindung des Virions an seinen Rezeptor auf der Wirtszelloberfläche
2. Internalisierung der Core-Struktur in das Zytoplasma und Freisetzung der Virusnukleinsäure in der Zelle („Uncoating“)
3. Aktivierung der reversen Transkription mit Synthese der doppelsträngigen viralen DNA
4. Transport der DNA in den Zellkern
5. Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom
6. Transkription des Provirus durch die zelluläre oder virale Polymerase
7. Transport gespleißter und ungespleißter mRNA in das Zytoplasma und dortige Translation
8. Verpackung der viralen RNA und der viralen Proteine zu kompletten Viren an der Plasmamembran und anschließende Freisetzung neuer viraler Partikel

Die Replikation von murinen Leukämieviren ist nicht lytisch und findet in stabilen Virus-produzierenden Wirtszellen statt.



### Abb. 1.8: Der Replikationszyklus von Gammaretroviren

Nach der Adsorption des Virus an den zellulären Rezeptor und der Fusion mit der Zellmembran wird das Kapsid in das Zytoplasma, in dem die reverse Transkriptase stattfindet, freigelassen. Der Präintegrationskomplex wird in den Zellkern transportiert und als Provirus in das Genom der Wirtszelle integriert. Die Provirus-DNA wird im Zellkern transkribiert und die gebildete mRNA nach dem Export aus dem Zellkern im Zytoplasma translatiert. Im Anschluß erfolgt die Verpackung der viralen RNA und der viralen Proteine zu kompletten Viren an der Plasmamembran und anschließende Freisetzung neuer viraler Partikel (nach Linial 1999). ZK: Zellkern

### 1.17.3. Klassifizierung muriner Leukämie Viren

Die murinen Leukämieviren (MuLV) gehören zu den Gammaretroviren und sind daher simple Retroviren. Ursprünglich wurden murine Leukämieviren aus Mausstämmen isoliert, welche eine hohe Anzahl von Leukämieerkrankungen aufwiesen. Es wurden mehrere Virusisolate hergestellt, z.B. führte das Isolat von Goss und Moloney (1960) in infizierten Mäusen zu einer T-Zell Leukämie, während Isolate von Rauscher (1962) und Friend (1957) zu einer Erythroleukämie führten. Weitere Syndrome, die durch MuLV verursacht werden, sind MAIDS („Murine Acquired Immunodeficiency Syndrome“) und Sarkome oder Tumore (Hoatlin und Kabat 1995, Ruscetti 1995, Liang et al. 1996, Sourvinos et al. 2000).

Die Viren, die solche Krankheitsbilder in Mäusen verursachen, sind zum überwiegenden Teil eine Mischung aus defekten und kompletten Viren. Bei den kompletten Viren handelt es sich um nicht-pathogene aber replikationskompetente Viren, auch Helferviren genannt. Die defekten Viren sind pathogen aber nicht replikationskompetent. Bei einer Koinfektion einer Zelle mit beiden Viren können von dem defekten Virus mit Hilfe der Helferviren neue infektiöse Partikel gebildet werden.

**Tab. 1.5: Charakteristische Merkmale von murinen Retroviren (Finke und Acha-Orbea 2001)**

	<b>LB BM5</b>	<b>Friend</b>	<b>Moloney</b>	<b>Rauscher</b>	<b>MMTV</b>
Krankheitserreger	BM5def	SFFV	MMuLV	Rauscher	MMTV
Helfervirus abhängige Replikation	+	+	-	-	-
Resistenzgene	xid, scid, nu/nu, H-2 <sup>d</sup> , H-2 <sup>a</sup>	W,SI,Fv1-6, RFVL-3, H-2 <sup>b</sup>	Rmvl-3, nu/nu	Rv3	Mtv, scid, nu/u
Frühe Zielzellen	B-Zellen	Erythroblasten	Lymphocyten Thymocyten	Erythroblasten	B-Zellen
Maligne Tumore	T-Zell Lymphom B-Zell Lymphom	Erythroleukämie	T-Zell Lymphom, Sarkom	Erythroleukämie	Mammakarzinom, T-Zell Lymphom

### 1.18. Pathogenese des FV-Komplexes

Das Friend Virus (FV) ist ein muriner Retrovirus-Komplex. Der Komplex besteht aus zwei Retroviren: Dem replikationskompetenten "Friend Murine Leukemia Virus" (F-MuLV), ein in adulten Mäusen nicht-pathogenes Helfervirus, und dem replikationsinkompetenten aber pathogenen „Spleen Focus Forming Virus“ (SFFV) (Kabat 1989). Das SFFV besitzt größere Deletionen im gag-Gen, so dass keine viralen Partikel gebildet werden können. Erst eine Koinfektion der Wirtszellen durch beide Viren (F-MuLV und SFFV) führt zur Verpackung des SFFV in F-MuLV kodierte Viruspartikel und damit zur Verbreitung des SFFV. Durch diese Verbreitung des SFFV wird in den Mäusen eine Erythroleukämie verursacht. F-MuLV alleine ist in erwachsenen Mäusen apathogen, kann aber in neugeborenen Mäusen, welche kein voll ausgebildetes Immunsystem haben, eine Splenomegalie, Anämie und Erythroleukämie verursachen.

Der Rezeptor für F-MuLV und andere ekotrophe murine Leukämieviren ist Pit-1/2 ("Inorganic Phosphate Transporter"). Die Zielzellen sind daher Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Erythrozytenvorläuferzellen (Rodenburg et al. 2007).

Der Rezeptor für das SFFV ist unbekannt (D'Andrea et al. 1992). Nachdem das SFFV eine Zelle infiziert hat, wird ein defektes env kodiertes Glykoprotein gp55 an der Zelloberfläche exprimiert. Das Glykoprotein gp55 bindet an den Erythropoetin-Rezeptor (EPO-R) von kernhaltigen Erythrozytenvorläuferzellen, wodurch es ein konstitutives Mitogen für diese Zellen ist und eine polyklonale Proliferation induziert (Hoatlin et al. 1990, Hoatlin und Kabat 1995, Li et al. 1990). Diese Proliferation der Erythrozytenvorläuferzellen führt zu einer massiven Splenomegalie, bei der das Milzgewicht von FV suszeptiblen Mäusen innerhalb der ersten zwei Wochen nach Infektion auf das 10 bis 20fache des Normalgewichts ansteigt. Das Immunsystem dieser Mäuse ist nicht in der Lage, eine schützende Immunantwort gegen das FV auszubilden, so dass die Tiere 3-4 Wochen nach Infektion eine maligne Erythroleukämie entwickeln. Die entstandenen malignen Zellen besitzen zwei charakteristische Merkmale: Zum einen aktiviert das Provirus durch seine Integration ein zelluläres Onkogen der ets-Familie, zum anderen besitzen viele FV transformierte Zellen ein inaktiviertes p53 Tumorsuppressor-Gen (Kabat 1989).

### 1.19. Immunität gegen eine FV-Infektion

Ob ein Mausstamm nach der Infektion mit dem Friend Virus eine maligne Erythroleukämie entwickelt (FV-suszeptibler Mausstamm) oder das Virus nach einer vorübergehenden Splenomegalie kontrolliert werden kann (FV-resistenter Mausstamm), ist abhängig von der Virusdosis und dem genetischen Hintergrund der infizierten Maus.

Die Resistenz gegen FV wird durch eine Reihe von Genen vermittelt. Es gibt mindestens sechs Gene (Fv 1-6), die eine Resistenz auf nicht-immunologischer Grundlage induzieren (Stoye 1998) und mindestens vier Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, in der Maus als H-2 bezeichnet), die die zelluläre und humorale Immunantwort gegen das FV beeinflussen.

So sind C57BL/6 Mäuse, die den H-2<sup>b</sup> Haplotyp tragen, resistent gegen eine FV-induzierte Erythroleukämie, während z.B. B10.A Mäuse mit einem H-2<sup>a</sup> Haplotyp suszeptibel sind. Hinzu kommt, dass C57BL/6 Mäuse noch das nicht-immunologische Resistenzgen Fv-2 tragen, welches die polyklonale Zellaktivierung von Erythrozytenvorläuferzellen und die damit verbundene Splenomegalie limitiert (Hoatlin und Kabat 1995, Persons et al. 1999). Mäuse, welche das Fv-2<sup>s</sup> Allel tragen, exprimieren eine verkürzte Form der Tyrosinkinase Stk, die mit dem SFFV gp55 interagiert und somit zur polyklonalen Zellaktivierung führt (Nishigaki et al. 2001).

Zwischen den Mausstämmen mit dem H-2<sup>b</sup> und dem H-2<sup>a</sup> Haplotyp lassen sich eine Anzahl von kongenen Mausstämmen einordnen, welche unterschiedlich suszeptibel gegenüber einer FV-Infektion sind. Diese kongenen Mausstämme, welche sich nur in dem H-2 Genlokus unterscheiden, sind F1-Generationen aus der Verpaarung von H-2<sup>a</sup> und H-2<sup>b</sup> Haplotyp Mäusen. Aus der Verpaarung von A.BY x B10 entstehen Y10 Mäuse mit einem H-2<sup>b/b</sup> Haplotyp, welche resistent gegen eine FV-Infektion sind. Y10.A Mäuse mit dem Haplotyp H-2<sup>a/b</sup> aus der Kreuzung von A.BY x B.10A Mäusen sind hingegen FV-suszeptibel. Die H-2 Gene sind wichtig für die Präsentation von viralen T-Zell-Epitopen.

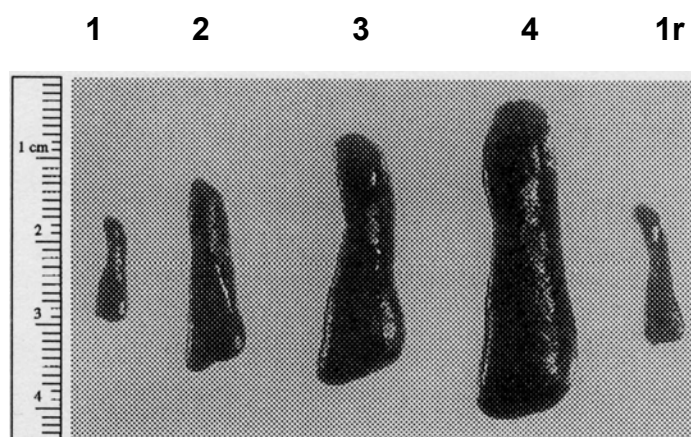
Der immunologische Schutz vor einer FV-induzierten Erythroleukämie in FV-resistenten Mäusen wird durch die Kombination von FV-spezifischen CTLs, T-Helferzellen und neutralisierenden Antikörpern vermittelt. Nur ein Bestandteil der Immunantwort (z.B. CTLs) reicht nicht aus, um einen Schutz zu erzeugen. Die Depletion von z.B. CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen in FV-resistenten Mäusen führt dazu, dass das Immunsystem dieser Tiere nicht mehr in der Lage ist, das Virus zu

kontrollieren. CD8<sup>+</sup> T-Zellen benutzen dabei hauptsächlich den Exocytoseweg um FV-infizierte Zellen zu eliminieren. Die Anwesenheit eines der drei am Exocytoseweg beteiligten zytotoxischen Molekülen Perforin, Granzym A oder B ist in der akuten Phase der Infektion ausreichend um die Virusreplikation zu hemmen (Zelinsky et al. 2004). FV-induzierte T<sub>reg</sub>-Zellen supprimieren jedoch die Funktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der chronischen Infektion, in dieser Phase der Infektion übernehmen vermutlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Kontrolle über den zytotoxischen Fas/FasL-Weg (Zelinsky et al. 2005). Eine weitere wichtige Rolle in der FV-Immunität spielt die Sekretion von Zytokinen. IL-6 und IL-10 defiziente Mäuse zeigen in der akuten Phase der Infektion eine höhere Viruslast (Strestik et al. 2001) und IFN $\gamma$  spielt eine zentrale Rolle in der akuten und chronischen Infektion (Dittmer et al. 2001, Stromnes et al. 2001).

Entscheidend für den Schutz vor einer Erythroleukämie ist neben der Anzahl an spezifischen T-Zellen und B-Zellen auch die Kinetik der spezifischen Immunantwort. So können in FV-infizierten Mäusen mit dem Haplotyp H-2<sup>a/b</sup> erst später als in FV infizierten Mäusen mit H-2<sup>b/b</sup> T-Helferzellen detektiert werden. Durch die verzögerte und schwächere Immunantwort in FV-suszeptiblen Mäusen kann sich das Virus stark vermehren, bevor das Immunsystem die Virusinfektion kontrollieren kann. Die Virus-induzierte Erkrankung ist zu diesem Zeitpunkt schon so weit vorangeschritten, dass ein vom Immunsystem vermittelter Schutz nicht mehr aufgebaut werden kann.

### 1.20. Krankheitsverläufe verschiedener Mausstämmen nach FV-Infektion

Der Krankheitsverlauf einer FV-infizierten Maus lässt sich anhand der Veränderung der Milzgröße (Splénomegalie) verfolgen. Die Viruslast in der Milz korreliert mit der Milzgröße, so dass anhand der Milzgröße Rückschlüsse über die Schwere der FV-induzierten Erkrankung gezogen werden können. Die Schwere der Splénomegalie wird in verschiedene Stufen eingeteilt (Abb. 1.9). So spiegelt die Milzgröße 1 (Milzgewicht von 0,1-0,2g) die Milz einer uninfizierten Maus wieder. Die Einteilung Milzgrößen 2-4 stellt die verschiedenen Stadien der Splénomegalie nach FV-Infektion dar.



**Abb. 1.9: Einteilung der unterschiedlichen Stadien einer Splénomegalie nach FV-Infektion (Hasenkrug et al. 1998)**

Die Milz einer uninfizierten Maus wiegt etwa 0,1-0,2g (Milzgröße 1). Die Einteilung der Milzgrößen 2-4 stellt die verschiedenen Stadien der Splénomegalie nach FV-Infektion dar. Folgende Milzgrößeneinteilungen entsprechen folgenden Gewichten: 1 < 0,5g, 1-2 = 0,5-0,6g, 2 = 0,6-0,8g, 2-3 = 0,8-1,2g, 3 = 1,2-1,7g und 4 > 1,7g. Die Milzgröße 1r bezeichnet die Milzgröße einer persistierend infizierten Maus (ca. 0,2-0,5g).

Eine Milzvergrößerung bis zu zwei Wochen nach Infektion wird als Splénomegalie definiert, welche durch die rasche polyklonale Erythroblastenproliferation (Zielzellen) entsteht. Bei einer Milzgröße von 3-4 wird ab dem Zeitpunkt 4 Wochen nach Infektion von einer Erythroleukämie gesprochen. Zu diesem Zeitpunkt treten FV-transformierte Zellen auf. Tiere, welche zu diesem Zeitpunkt eine Milzgröße von 3-4 aufweisen, sterben in der Regel an den Folgen der Erythroleukämie ab der 8ten Woche nach Infektion. Ist bei den FV-infizierten Tieren zum Zeitpunkt 4 Wochen nach Infektion eine Milzgröße kleiner 2 nachweisbar, so sind diese Mäuse nicht an einer Erythroleukämie erkrankt. Diese Mäuse haben eine normale Lebenserwartung, sind aber persistierend mit FV infiziert.

Im Folgenden sind die Krankheitsverläufe der in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme kurz umrissen (Hasenkrug und Chesebro 1997).

### **C57BL/6; (H-2<sup>b/b</sup>)**

Die Infektion von C57BL/6-Mäusen mit einer hohen Dosis von FV (>5000 SFFU; "Spleen Focus Forming Units") induziert in den ersten zwei Wochen eine leichte Splenomegalie (mindestens Verdopplung des Milzgewichtes), die sich danach zurückbildet. Die C57BL/6-Mäuse sind in der Lage, das Virus über das nicht-immunologische Fv-2 Gen und ihre effiziente FV-spezifische Immunantwort (MHC H-2<sup>b/b</sup>) zu kontrollieren. Die Tiere erkranken nicht an einer Erythroleukämie, bleiben aber lebenslang persistierend infiziert und haben eine normale Lebenserwartung (Van der Gaag und Axelrad 1990).

### **Y10-Mäuse; (H-2<sup>b/b</sup>)**

Die F1-Generation der Verpaarung von B10-Mäusen mit A.BY-Mäusen wird als Y10 bezeichnet. Diese Y10-Mäuse besitzen den MHC H-2<sup>b/b</sup> Haplotyp und sind FV-resistent. Anders als die C57BL/6 Mäuse kontrollieren diese Mäuse das FV nur über ihre effiziente Virus-spezifische Immunantwort. Y10-Mäuse besitzen keine vom Fv-2 Gen vermittelte genetische Resistenz gegen das FV.

Nach einer FV-Infektion entwickelt sich in Y10 Mäusen in den ersten zwei Wochen eine massive Splenomegalie (bis zu 25faches des normalen Milzgewichtes). In der zweiten bis dritten Woche nach Infektion bildet sich die Milzvergrößerung zurück. Die Milzgröße bleibt dennoch zeitlebens leicht vergrößert (bis 0,5g). Die Tiere sind persistent mit FV infiziert und haben aber eine normale Lebenserwartung.

### **Y10.A-Mäuse; (H-2<sup>a/b</sup>)**

Als Y10.A-Maus wird die (B.10A x A.BY) F1-Generation bezeichnet. Y10.A-Mäuse besitzen einen H-2<sup>a/b</sup> Haplotyp.

Y10.A-Mäuse zeigen denselben FV-induzierten Krankheitsverlauf wie Y10-Mäuse wenn sie mit geringer Virusdosis (<3000 SFFU) infiziert werden, entwickeln aber bei einer hohen Virusdosis (>3000 SFFU) zu >95% eine FV-induzierte Erythroleukämie. Die Mäuse sterben an den Folgen der Erythroleukämie etwa 10-12 Wochen nach Infektion. (Hasenkrug und Chesebro 1997, Miyazawa et al. 1988, Peterson et al. 2000). Aufgrund des heterozygoten H-2 Gens bildet sich die FV-spezifische

Immunantwort langsamer und schwächer aus als es bei den Y10-Mäusen mit dem Haplotyp H-2<sup>b/b</sup> zu beobachten ist. Diese Kinetik in Y10.A-Mäuse verschafft dem Virus einen Vorsprung vor der spezifischen Immunantwort, so dass das Immunsystem bei einer hohen Infektionsdosis nicht mehr in der Lage ist, die Infektion zu kontrollieren. Etwa drei bis vier Wochen nach Infektion bildet sich in Y10.A-Mäusen die FV-induzierte Erythroleukämie aus, die tödlich verläuft.

**Balb/c (H-2<sup>d/d</sup>)**

Balb/c-Mäuse (Haplotyp H-2<sup>d/d</sup>) haben im Gegensatz zu den H-2<sup>a/b</sup> Mäusen keine nachweisbare FV-spezifische Immunantwort, so dass geringste Dosen von FV zu einer Erythroleukämie und zum Tod führen.

### 1.21. Zielsetzung

Typ I Interferone (IFN), von denen im Mausgenom 14 IFN $\alpha$  Gene existieren, und ein IFN $\beta$  Gen werden in der Regel von virusinfizierten Zellen synthetisiert und von dort in die Umgebung abgegeben. IFN $\alpha/\beta$  sind für das Immunsystem von besonderer Bedeutung indem sie nicht nur antivirale, sondern auch immunmodulatorische und antiproliferative Wirkung besitzen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Rolle von Typ I Interferonen in einer retroviralen Infektion zu untersuchen. Es war zwar bekannt, dass IFN $\alpha$  *in vitro* nach einer „Human Immunodeficiency Virus Typ 1“ (HIV-1) Infektion peripherer mononuklearer Blutzellen gebildet wird und IFN $\alpha$  die Replikation von HIV-1 inhibiert, jedoch lagen kaum Informationen über die *in vivo* Funktion von Typ I IFN in der frühen Phase einer retroviralen Infektion vor. Ebenso lagen keine Erkenntnisse über die IFN $\alpha$  Konzentration direkt nach einer Infektion mit HIV vor. Als experimentelles Modell wurde daher das Friend Virus, ein Retrovirus der Maus, verwendet. Als erstes sollte die antivirale Aktivität von Typ I IFN *in vitro* sowie die Produktion nach einer FV-Infektion *in vivo* untersucht werden. Anschließend sollte mit Hilfe von „knockout“ Mäusen, die für den IFN-Rezeptor und IFN $\beta$  defizient waren, der Einfluss von IFN $\alpha/\beta$  auf den Infektionsverlauf analysiert werden. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob die Gabe von IFN $\alpha$  einen Schutz vor einer Retrovirus-induzierten Erkrankung vermitteln kann. Im zweiten Teil der Arbeit sollte nach der Etablierung einer antiviralen IFN-Therapie, der Einfluss verschiedener IFN Subtypen auf die FV-Infektion untersucht werden, sowie die antiviralen Wirkmechanismen von IFN $\alpha$  Subtypen aufgeklärt werden.

## 2. Material

### 2.1. Geräte

**Tab. 2.1: Verwendete Geräte**

Geräte	Hersteller
Auflichtmikroskop (Umkehrmikroskop) CK 2	Hund, Wetzlar
CO <sub>2</sub> Brutschrank	Thermo, Dreieich
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Pharmingen, Heidelberg
Gefrierschrank	LIEBHERR Comfort, Ochsenhausen
Heizblock	Grant, QBC
Kühlschrank	LIEBHERR Comfort, Ochsenhausen
LightCycler 1	Roche, Mannheim
Manuelle Pipetten	Eppendorf 10, 20 100, 200, 1000µl, Hamburg
Zählkammer nach Neubauer	BD, Heidelberg
Photometer	Gene Quant pro, Amersham Bioscience
Speed Vac SC 110	Savant
Thermocycler 60	Biomed
Wärmelampen	Phillips, Amsterdam
Werkbank	KOJAIR®, Meckenheim
Zentrifugen	Megafuge 1.0R Heraeus, München Centrifuge 5415 C, Eppendorf Biofuge fresco, Haraeus, München RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Sorvall

## 2.2. Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2.2: Verwendete Materialien**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
FACS-Röhrchen	BD, Heidelberg
5ml Einmalspritzen	B. Braun, Melsungen
10ml Einmalspritzen	B. Braun, Melsungen
G 23-Nadel	BD, Heidelberg
G 25-Nadel	BD, Heidelberg
G 27-Nadel	BD, Heidelberg
Light Cycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Microtest™, Zellkulturplatte, 96 Well, Flachplatte	Falcon BD, Heidelberg
Petrischalen für Gewebekulturen, Cellstar®	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pinzetten gebogen, spitz	Oehmen, Essen
Pinzetten gebogen	Oehmen, Essen
1ml Pipetten, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
5ml Pipetten, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
10ml Pipetten, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
25ml Pipetten, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
50ml Teströhrchen, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
25ml Teströhrchen, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
PS-96 K Mikroplatte U-Form	Greiner bio-one, Frickenhausen
Scheren	Oehmen, Essen
TC-6 Well Platte, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
TC-24 Well Platte, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen	Centrifuge Bottle, Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA

## 2.3. Versuchstiere

### 2.3.1. Wildtyp Mausstämme

- Balb/c :** Resistenzgene: H-2D<sup>d/d</sup>, Fv-2<sup>s/s</sup> Harlan  
Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland
- C57BL/6, (B6):** Resistenzgene H-2D<sup>b/b</sup>, Fv-2<sup>r/s</sup> Harlan  
Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland
- (C57BL/10xA.BY), F1 (Y10A):** Resistenzgene: H-2D<sup>a/b</sup>, Fv-2<sup>r/s</sup> eigene Zucht,  
Zentrales Tierlabor, Universitätsklinikum Essen
- (C57BL/10xA.BY), F1 (Y10):** Resistenzgene: H-2D<sup>b/b</sup>, Fv-2<sup>r/s</sup> eigene Zucht,  
Zentrales Tierlabor, Universitätsklinikum Essen

### 2.3.2. Knockout (<sup>-/-</sup>) Mausstämme

- IFNAR<sup>-/-</sup>:** Paul-Ehrlich-Institut, Langen (Müller et al. 1994)
- IFN $\beta$ <sup>-/-</sup>:** Paul-Ehrlich-Institut, Langen (Erlandsson et al. 1998)

Die „knockout“ Mausstämme wurden zehn Mal mit C57BL/6 Mäusen zurückgekreuzt.

Alle Tiere waren zum Versuchsbeginn mindestens acht Wochen alt. Alle Mäuse stammen aus einer speziell pathogenfreien (SPF) Tierzuchtanlage. Die Tiere wurden für die Dauer der Versuche unter SPF Bedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter. Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien der „Federation of European Laboratory Animal Science Association“ durchgeführt. Die Mäuse am Universitätsklinikum Essen wurden unter tierärztlicher Kontrolle gezüchtet.

## 2.4. Chemikalien und Medien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien und Medien von den Firmen Applichem (Darmstadt), Gibco (Karlsruhe), Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen.

3-Amino 4-Ethylencarbazole (AEC), Ammoniumchlorid, BSA (Rinderserum Eiweiß), Chloroform, DEPC, DMEM-Medium, Dextrose, N-N-Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid (DMSO), DNase I (Qiagen), Dinatriumhydrogenphosphat, EDTA, Essigsäure, Ethanol, FCS (Fötales Kälberserum (Biochrom KG)), Formalin (40 %), Glucose, L-Glutamin, Glycerin, Hefeextrakt, Heparin, Hepes, Hexadimethrine bromide (Polybrene A), Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydrogenkarbonat, Kalziumchlorid, LB-Agar (Luria/Miller), LB-Medium (Luria/Miller), Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat,  $\beta$ -Mercaptoethanol, NaEDTA, Natriumacetat, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Natriumpyruvat; Natronlauge, o- Phenolrot, Phenylenediamine (OPD), Pikrinsäure, Polyethylenglycol, RPMI-Medium, Salzsäure, Schwefelsäure, Streptavidin-FITC (Caltag), TRIzol (invitrogen), Trypsin, Trypton, Trypanblau, Tween 20, Uranylacetat, Wasserstoffperoxid, Zitronensäure

## 2.5. Zytokine

**Tab. 2.3: Verwendete Zytokine**

Zytokine	Hersteller
GM-CSF	Zelllinie NIH 3T3-GM-CSF von Dr. Blankenstein, Berlin
IL-4	Zelllinie NIH 3T3-IL-4 von Dr. Schmitt, Wien, Österreich
Mouse IFN $\beta$	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Universal Interferon- $\alpha$ (A/D)-recombinant-	PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, USA

## 2.6. Antibiotika

Penicillin-Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe

## 2.7. Häufig verwendete Puffer und Medien

Alle Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit zweifach destilliertem H<sub>2</sub>O angesetzt.

**Tab. 2.4: Puffer und Medien**

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>AEC Gebrauchslösung</b>	AEC-Stock-Lösung wurde 1:20 in 0,05M Natriumacetat angesetzt und die Reaktion mit 0,5µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /ml Lösung gestartet
<b>AEC-Stocklösung (4mg/ml)</b>	AEC-Tabletten in N-N-Dimethylformamid gelöst
<b>Bouin's Lösung</b>	75ml gesättigte Pikrinsäure 25ml 40% neutrales Formalin 5ml Essigsäure
<b>Einfriermedium</b>	20ml FCS 10ml Dimethylsulfoxid 20ml RPMI 1650
<b>FACS Puffer</b>	PBS 0,1% BSA 0,02% Natriumazid
<b>2 x HBS</b>	12mM Dextrose H <sub>2</sub> O 1,5mM Dinatriumhydrogenphosphat 50mM Hepes, pH 7,05

---

	10mM Kalziumchlorid 280mM Natriumchlorid $\Sigma$ 500ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> , pH 7,05
<b>Lysepuffer (für die Lysierung von Erythrozyten)</b>	0,5g KHCO <sub>3</sub> 1,85g NaEDTA 4,15g NH <sub>4</sub> Cl $\Sigma$ 500ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
<b>MACS Puffer (entgast)</b>	0,5% BSA 2mM EDTA $\Sigma$ 1l PBS
<b>Medium für Dendritische Zellen</b>	RPMI 1650 10% FCS 50 $\mu$ M 2-Mercaptoethanol 4mM L-Glutamin 1mM Natriumpyruvat 1% Penicillin/Streptomycin 5ng/ml GM-CSF (Überstand) 1ng/ml IL-4 (Überstand)
<b>Medium für 293T-Zellen</b>	DMEM 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin
<b>MuLV-ELISA: Coatingpuffer</b>	200mM Natriumkarbonat, pH 9,6
<b>MuIV-ELISA: Substratpuffer</b>	66mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O, pH 5,235 mM Zitronensäure
<b>PBBS</b>	0,14g CaCl <sub>2</sub> 1,0g Glukose 0,32 g KCl

---

---

	0,2g $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	0,2g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
	0,2g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
	1,15g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	7,2g $\text{NaCl}$
	1ml Phenolrot (1%)
	$\Sigma$ 1l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

---

<b>PBS</b>	1,5mM $\text{CaCl}_2$
	2,7mM $\text{KCl}$
	1,4mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	1mM $\text{MgCl}_2$
	137mM $\text{NaCl}$
	4,3mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
	$\Sigma$ 1l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

---

<b>TSB Puffer</b>	5ml Dimethylsulfoxid
	0,5g Hefeextrakt
	2ml 1M Magnesiumchlorid
	0,5g Natriumchlorid
	10g Polyethylenglycol
	1g Trypton
	$\Sigma$ 100ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ , pH 6,5

---

## 2.8. Antikörper

Die Antikörper wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von BD Pharmingen (Heidelberg) bezogen.

**Tab. 2.5: Antikörper für die Durchflusszytometrie**

<b>Epitop (Anti-Maus-)</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Klon</b>	<b>Bezugsquelle</b>
CD4	APC	RM4-5	
CD8a	APC	53-6.7	
	PerCp		
CD11b	FITC	M 1/70	
	PE		
	APC		
CD19	FITC	1D3	
	APC		
CD43	FITC	1B11	
CD49b/Pan-NK	PE	DX5	
CD69	PE	H1.2F3	
Granzym B	APC	G12	Caltag, San Francisco, CA, USA
IgG2b	FITC		Caltag, San Francisco, CA, USA
NK1.1	FITC	PK136	
TER119	PE	TER-119	eBioscience, San Diego, USA

**Tab. 2.6: Charakteristikum der Fluorochrome**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Absorption (nm)</b>	<b>Emission (nm)</b>
7- AAD	633	650
APC	633	660
CyChrome	488	670
FITC	488	525
PE	488	575
PerCP	488	670

**Tab. 2.7: Sonstige Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Horse Radish Peroxidase HRP gekoppelter Esel-anti-Maus IgG	Dianova, Hamburg
HRP gekoppelter Ziege-anti-Maus Immunoglobulin (bindet bevorzugt IgG, IgA und IGM)	Dako, Hamburg
Monoklonaler AK720: Maus-anti-MuLV env (Isotyp IgG2b)	Robertson et al. 1991
Monoklonaler AK34: Maus-anti-MuLV p15 (Isotyp IgG2b)	Chesebro et al. 1983
Monoklonaler AK34-Biotin: Maus-anti-MuLV p15 (Isotyp IgG2b)	
Monoklonaler AK Ratte-anti-Maus-IFNalpha	Sanbio, Beutelsbach
Monoklonaler AK Ziege-anti-Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg
Polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-Granzyme A (IgG Antiserum)	Antikörper von Dr. Simon, Freiburg

### 2.9. Tetramere

PE markierte MHC Klasse I H2-Db Tetramere spezifisch für FV GagL Peptid (Db-GagL tetramere), siehe auch Altman et al. (1996).

PE markierte MHC-Klasse II I-Ab Tetramere spezifisch für F-MuLV Env fn20 Peptid (Shimizu et al. 1994).

Die Tetramere (FV gag CD8<sup>+</sup> Epitop gPr80gag85-93 (Chen et al. 1996) und (F-MuLV env CD4<sup>+</sup> Epitop env122-141) wurde von K. Schepers und T. N. M. Schuhmacher zur Verfügung gestellt (Stromnes et al. 2002).

## 2.10. Kommerzielle Standardtests

**Tab. 2.8: Verwendete Standardtest**

<b>Standardtest</b>	<b>Bezugsquelle</b>
AmpliScribe™ T7, T3 und SP6 High Yield Transcription Kit, Epicentre® Biotechnologie	Madison, USA
Cytofix/Cytoperm Intracellular staining kit	BD Pharmingen, Heidelberg
Mouse Interferon Alpha ELISA	PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, USA
Mouse Interferon Beta ELISA	PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, USA
NucleoBond® EF Plasmid Purification	Macherey-Nagel, Düren
OptEIA Mouse GM-CSF ELISA	BD Pharmingen, Heidelberg
OptEIA Mouse IL-4 ELISA	BD Pharmingen, Heidelberg
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent und Kit	Invitrogen, Karlsruhe
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

## 2.11. Viren und Zelllinien

### Viren

**Friend Virus Komplex:** (Dittmer et al. 1999) Der verwendete FV Stock wurde aus infizierten Mäusen gewonnen (s. Methoden 3.2.)

**Friend Murine Leukämie Virus (Helfer-Virus):** (Dittmer et al. 1999)

Der verwendete Helfer Virus Stock wird von *Mus dunni* Zellen produziert. (s. Methode 3.3.)

**Tab. 2.9: Zelllinien**

Zelllinie	Bezugsquelle
GM-CSF Zelllinie	Zelllinie NIH 3T3-GM-CSF von Dr. Blankenstein, Berlin
IL-4 Zelllinie	Zelllinie NIH 3T3-IL-4 von Dr. Schmitt, Wien, AU
Mus dunni	Maus Fibroblasten Zelllinie (Lander und Chattopadhyay, 1984)
293T	Menschliche embryonale Nierenepithelzelllinie („Human Embryonic Kidney Cells“), beinhaltet DNA-Teile des menschlichen Adenovirus 5 und exprimiert das "SV40 large T-Antigen", welches die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem "SV40 origin of replication" ermöglicht. (Schein und Enders 1962)

## 2.12. Bakterien-Stämme

Der Bakterienstamm DH5 $\alpha$  wurde aufgrund seiner hohen Transformationseffizienz für die Transformation und für die Präparation größerer Mengen DNA verwendet.

**Tab. 2.10: Eigenschaft des verwendeten Bakterien-Stamms**

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
DH5 $\alpha$	recA1, endA1, gyrA96, Thi-1, hsdR17(rk $^-$ , m $_k^+$ ), supE44, relA1, $\Delta$ [argF- lacZYA]U169, $\Phi$ 80 $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15, $\lambda^-$ , F $^-$ )	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.13. Oligonukleotid Primer und Sonden

Sämtliche unmodifizierten Oligonukleotide wurden bei Hermann synthetisiert, wenn nicht anders vermerkt. Die Sonde für die Real-Time PCR wurde bei Biomers bestellt. Start, Schmelztemperatur und G+C Gehalt der verwendeten Primer bzw. Sonde, sowie die Länge des PCR-Amplifikats sind angegeben.

### Mm\_ $\beta$ -Actin (Miller et al. 2003)

Start	Tm	%GC	Primer 1	Start	Tm	%GC	Primer 2	Länge
700	60,1	40	aaatcgtgcgtgacatcaaa	881	59,4	45	caagaaggaaggctggaaaa	182

### F-MuLV env (Stromnes et al. 2001)

Start	Tm	%GC	Primer 1	Start	Tm	%GC	Primer 2	Länge
6658	62,1	66,7	aagtctccccccgcctcta	6781	62,5	57,14	agtgcttgtaagctccctgt	124

### F-MuLV env-spezifische Oligonukleotid-Sonde (Stromnes et al. 2001)

Start	Tm	%GC	
6678	63,0	54,0	(6FAM) actcccacatgattccccctcc (TAMRA)

**Mm\_RIG-I** (Rothenfusser et al. 2005)

Start	Tm	%GC	Primer 1	Start	Tm	%GC	Primer 2	Länge
1611	62,2	52,6	agagaattcggcaccagaa	1765	62,2	60	agctctcgctcggtctcatc	154

**Tab. 2.11: Verwendete Primer von Qiagen (Hilden)****Primer-Paar****Mm>Ifna1\_1\_SG** QuantiTect Primer Assay**Mm>Ifna4\_1\_SG** QuantiTect Primer Assay**Mm>Ifna6\_1\_SG** QuantiTect Primer Assay**Mm>Ifna9\_1\_SG** QuantiTect Primer Assay**Mm>Ifnb\_1\_SG** QuantiTect Primer Assay**Mm>Oas1a\_1\_SG** QuantiTect Primer Assay**Mm>Prkrir\_1\_SG** QuantiTect Primer Assay**Mm>Tlr3\_1\_SG** QuantiTect Primer Assay**Mm>Tlr4\_1\_SG** QuantiTect Primer Assay**Mm>Tlr7\_1\_SG** QuantiTect Primer Assay**Mm>Tlr9\_1\_SG** QuantiTect Primer Assay

Die Sequenzen der kommerzielle erhältlichen Primer von Qiagen wurden nicht angegeben.

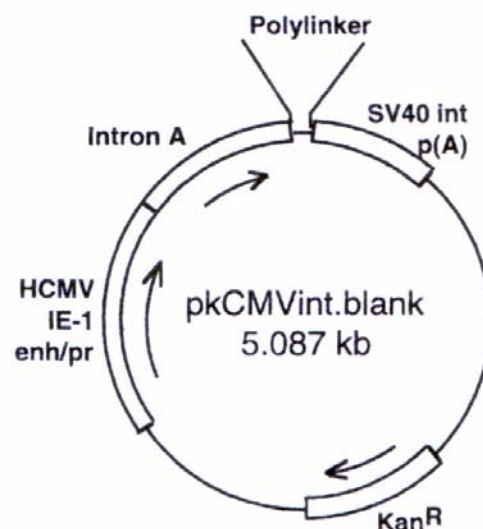
## 2.14. Plasmide

In dieser Arbeit wurden folgende Plasmide verwendet oder neu konstruiert:

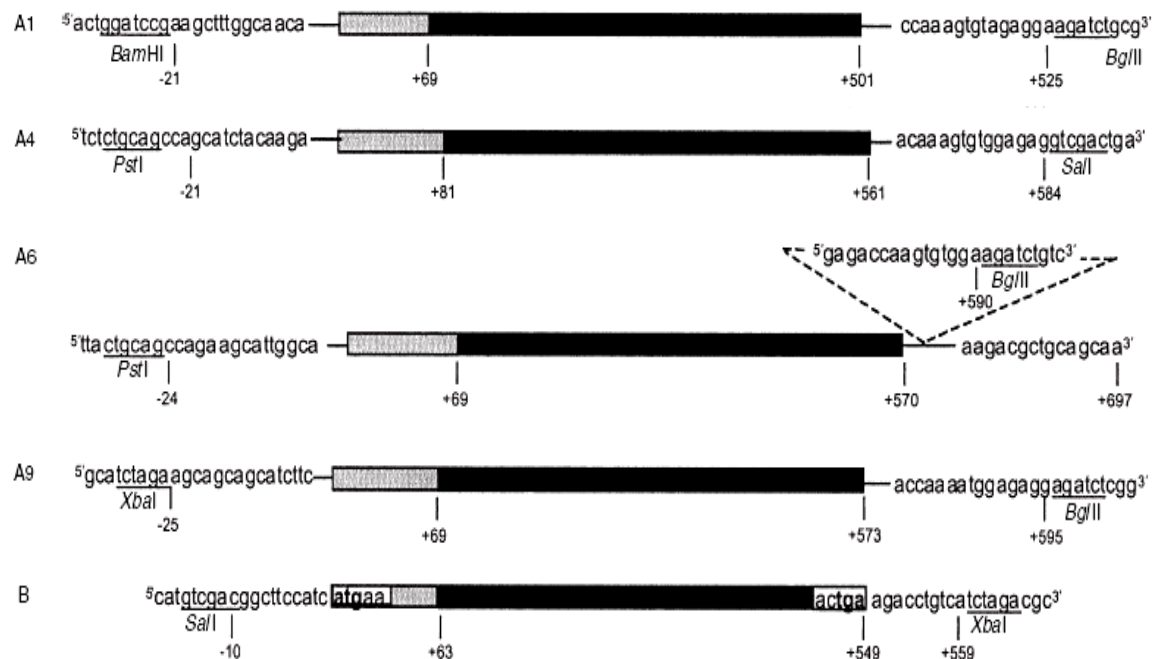
**Tab. 2.12: Eigenschaften der verwendeten Plasmide**

Plasmid	Charakteristikum	Bezugsquelle
pkCMVint.	Expressionsvektor mit SV40 ori, HCMV IE1 Enhancer/Promotor, SV40 int polyA Signal, HCMV intron, MHC, Kan <sup>r</sup>	Vical Inc., USA
pkCMVint.IFN $\alpha$ 1	basierend auf pkCMVint., enthält IFN $\alpha$ 1 Fragment -21 - +525bp	Yeow et al. 1998
pkCMVint.IFN $\alpha$ 4	basierend auf pkCMVint., enthält IFN $\alpha$ 4 Fragment -21 - +584bp	Yeow et al. 1998
pkCMVint.IFN $\alpha$ 6	Basierend auf pkCMVint., enthält IFN $\alpha$ 6 Fragment -24 - +590bp	Yeow et al. 1998
pkCMVint.IFN $\alpha$ 9	basierend auf pkCMVint., enthält IFN $\alpha$ 9 Fragment -25 - +595bp	Yeow et al. 1998
pkCMVint.IFN $\beta$	basierend auf pkCMVint., enthält IFN $\beta$ Fragment -10 - +559bp	Bartlett et al. 2003

**A**



## B



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Plasmids pkCMV und der enthaltenen Sequenzen der IFN $\alpha$  Subtypen-Gene.**

Der Mammalian Expressionsvektor pkCMV (Vical) (A) enthält die volle Länge der MuIFN Gene der Subtypen MuIFNA1, A4, A6 und A9, eingeschlossen der Signalsequenz (grau unterlegt) des reifen Proteins (B).

Der Expressionsvektor pkCMV wurde für die Transfektion der 293T Zellen verwendet. Das im Überstand enthaltene Interferon wurde für den IFN Inhibitions-Assay und für Therapieversuchen in Mäusen verwendet.

Tab. 2.13: Eigenschaften des neu konstruierten Plasmids

neu konstruiertes Plasmid	Charakteristikum	Bezugsquelle
pCRII-Topo F-MuLV	pUC origin, LacZ $\alpha$ Gen, T7 Promotor, SP6 Promotor, MHC, f1 origin, M13 Reverse und Forward primig site, Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , enthält F-MuLV env Fragment +6658 - +6781	pCRII-Topo: Invitrogen, Karlsruhe

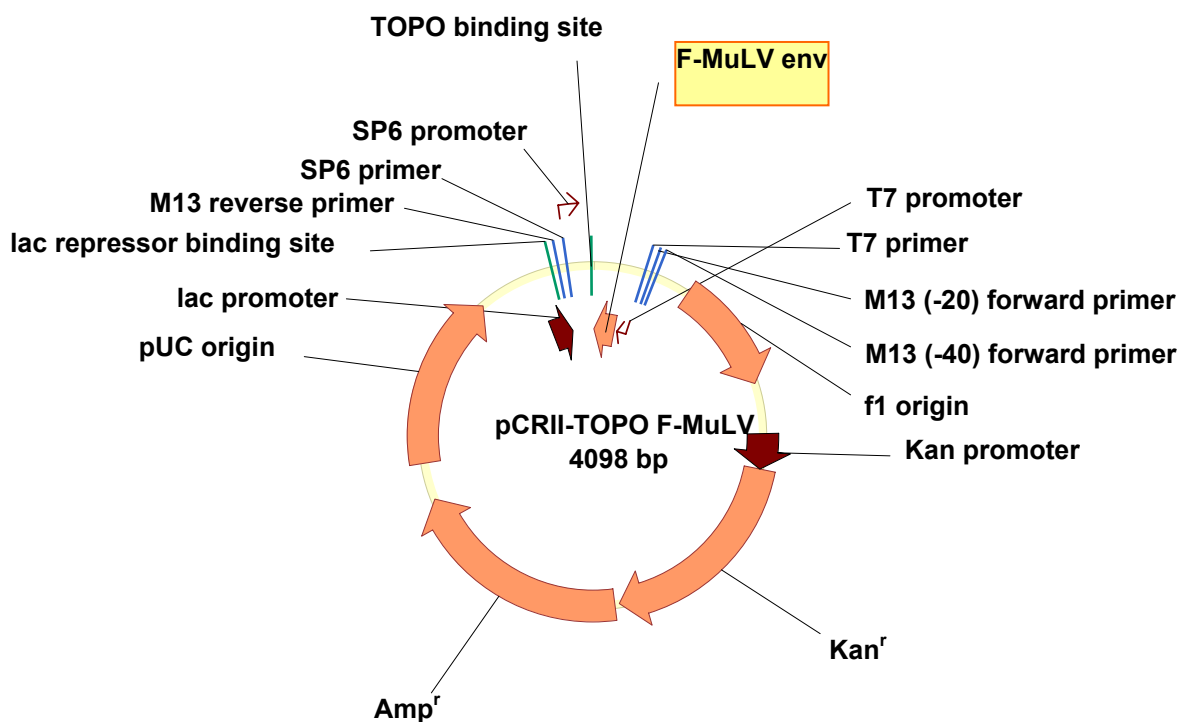


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des pCRII-Topo F-MuLV

Der pCRII-Topo F-MuLV diene als Standard für die FV Real-time PCR.

## **3. Methoden**

### **3.1. Tierversuche**

#### **3.1.1. Infektion**

Die Infektion der Mäuse mit dem Friend Virus wurde mit einer 0,5x25mm Kanüle intravenös (i.v.) in die laterale Schwanzvene durchgeführt. Dazu wurde der Virusstock mit sterilem PBS verdünnt. Es wurde mit 3000SFFU (LDV kontaminierter FV-Stock) oder mit 5000SFFU (LDV freier FV-Stock) pro Maus injiziert.

#### **3.1.2. Intraperitoneale Injektionen**

Für die Gabe von rekombinantem humanen IFN $\alpha$  (A/D), IFN $\alpha$  Subtypen und PBS wurde das jeweilige Zytokin in die Bauchhöhle (intraperitoneal, i.p.) der Maus injiziert. Bei der Injektion lag die Maus überspannt auf dem Rücken. Das Bauchfell war dabei gespannt, wodurch bei der Injektion keine inneren Organe verletzt werden konnten.

#### **3.1.3. Injektion von IFN $\alpha$**

Für die i.p. Injektion von IFN $\alpha$  Subtypen bzw. der Kontrolle (leerer Vektor) wurden Zellkulturüberstände von transfizierten 239T Zellen verwendet. Pro IFN-Injektion wurden 500 $\mu$ l 1x10<sup>5</sup>pg/ml verwendet. Die Injektion wurde mit einer 0,6x25mm Kanüle durchgeführt.

#### **3.1.4. Betäubung der Mäuse mit Isofluran<sup>®</sup>**

Für die retroorbitale Blutentnahme wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt. Dazu wurden die Tiere in einen Glastopf gesetzt, in dem sich ein mit Isofluran<sup>®</sup> getränktes Tuch befand. Sobald die Tiere eine flache Atmung aufwiesen, wurden die Tiere aus dem Isoflurantopf genommen.

#### **3.1.5. Blutentnahme**

Die Blutentnahme erfolgte retroorbital mit einer 3mm Glaskapillare. Zur Plasmagewinnung wurde eine mit Heparin beschichtete Glaskapillare verwendet und das Blut in einem 1,5ml Eppendorfgefäß, in dem 2,5Units Heparin vorgelegt waren, aufgefangen und auf Eis gestellt. Zur Serumgewinnung wurde eine unbeschichtete Glaskapillare verwendet und das aufgefangene Blut für 15-20min bei RT inkubiert.

Zur Plasma- und Serumgewinnung wurde das gewonnene Blut für 2min bzw. 15min bei 8000rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Plasma und Serum werden bei -80°C gelagert.

### **3.1.6. Organentnahme**

Zur Organentnahme wurden die Tiere mit Isofluran<sup>®</sup> betäubt, durch Genickbruch getötet und auf die rechte Seite gelegt. Die Haut der linken Flanke wurde mit einer Pinzette angehoben und mit einer Schere entfernt, so dass man durch die Peritonealmembran die inneren Organe sehen konnte. Die dunkelrote Milz liegt parallel zum letzten Rippenbogen. Direkt über der Milz wurde die Peritonealhaut angehoben und eine kleine Öffnung hinein geschnitten. Durch diese Öffnung wurde die Milz mit einer stumpfen Pinzette herausgehoben und die beiden Blutgefäße durchtrennt. Anschließend wurde die Milz in eine 6 well Platte mit 5ml PBBS auf Eis gelegt.

### **3.2. *In vivo* Herstellung eines Friend Virus-Stocks**

Das Friend Virus (FV) besteht aus zwei Viren, dem „Spleen Focus Forming Virus“ und dem „Friend Murine Leukemia Virus“ (s. Einleitung 1.18.). Der FV-Stock wurde aus infizierten Mäusen gewonnen. Dazu wurden Balb/c-Mäuse mit 1000-1500SFFU infiziert, nach neun Tagen getötet und aus den Milzen ein Milzzellhomogenat (10-20%) in PBBS mit 2mM EDTA hergestellt. Der Virusstock wurde bei -80°C gelagert. Zur Titration dieses Stocks wurden Y10.A Mäuse infiziert und den Tieren nach 14 Tagen die Milzen entnommen. Mit Hilfe der sogenannten Bouin's Lösung (Sigma) lassen sich maligne Zellhaufen, die durch die FV-Infektion entstehen, auf der Milz anfärben. Die Anzahl dieser ausgezählten Foci ergab die Viruskonzentration („Spleen Focus Forming Units“, SFFU).

### **3.3. Herstellung eines Friend Murine Leukemia Virus-Stocks *in vitro***

*Mus dunni* Zellen wurden in 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in 10ml RPMI Medium (10% FCS, Penicillin/Streptomycin) ausplattiert und anschließend 50µl Polybrene 0,8µg/ml zugegeben. Danach wurden die Zellen mit F-MuLV (MOI=1) Stock infiziert. Die Zellen wurden anschließend bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in RPMI Medium aufgenommen. Zur Überprüfung der Prozentzahl an infizierten *Mus dunni* Zellen

wurden diese mit AK720 und PE-gekoppelten Ziege-anti-Maus anti-IgG2b Antikörper für jeweils 30min inkubiert. Die Prozentzahl infizierter Zellen wurde anschließend im Durchflusszytometer bestimmt. Wenn die Zellen zu 50-100% infiziert waren, wurden diese in 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in 50ml RPMI Medium ausplattiert. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert, bis diese ca. 50-75% konfluent waren. Dann wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand geerntet, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die weitere Verwendung wurde die Aktivität des F-MuLV bestimmt. Der Test zur Bestimmung der Aktivität des F-MuLV-Stocks beruht auf dem Prinzip des „Infectious Center“-Tests (s. Methode 3.7.). Es wurde eine Verdünnungsreihe des Überstandes hergestellt und dieser dann auf *Mus dunni* Zellen gegeben. Nach drei Tagen Inkubation im Brutschrank wurde der Test ausgewertet.

### **3.4. Zellzahlbestimmung**

Für die Bestimmung von Zellzahlen wurden Einzelzellsuspension 1:2 oder 1:10 verdünnt, mit 0,4% Trypanblau (in PBS gelöst) versetzt und in einer Neubauerkammer gezählt. Trypanblau färbt tote Zellen an. Für die Zellzahlbestimmung wurden nur lebende Zellen gezählt.

### **3.5. Zellkultur**

#### **3.5.1. Kultivierung von Zellen**

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>/Luft-Gemisch.

Adhärent wachsende Zelllinien wurden in liegenden Kulturflaschen inkubiert. Zum Ernten und Verdünnen dieser Zellen wurde das verbrauchte Medium dekantiert, die Zellen mit 5%Trypsin-EDTA überschichtet und kurz im Brutschrank inkubiert bis sich ein Großteil der Zellen vom Boden ablöste. Dieser Prozess wurde anschließend mit 10ml kaltem Vollmedium gestoppt und die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (1200U/min 5min). Das so gewonnene Zellpellet wurde in 1ml Vollmedium gelöst und in neue Kulturflaschen ausgesät. In Suspension wachsende Zelllinien wurden stehend in Kulturflaschen inkubiert. Zum Ernten und Verdünnen dieser Zellen wurden sie abzentrifugiert.

### 3.5.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur längeren Lagerung von Zellkulturzellen wurden diese in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml wurden dazu in Einfriermedium (40% FCS, 10% DMSO und 50% RPMI-Medium) resuspendiert. Aliquots von 2ml wurden in Einfrier Röhrchen überführt und bei  $-20^\circ\text{C}$  für 2-3h eingefroren. Vor der Überführung der Zellen in den flüssigen Stickstoff wurden die Zellen über Nacht bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Zum Auftauen von Zellen wurden diese schnell im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut und sofort in 10ml aufgewärmtes Medium ( $37^\circ\text{C}$ ) überführt. Die Zellen wurden 10min bei 1200rpm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut mit Medium gewaschen, um das DMSO aus dem Medium gänzlich zu entfernen. Die Einzelzellsuspension wurde im Verhältnis 1/5 und 4/5 gesplittet, in kleine Zellkulturflaschen überführt und auf ein Endvolumen von 10ml mit RPMI-Medium aufgefüllt.

### 3.5.3. Generierung und Kultur von murinen myeloiden Dendritischen Zellen

Zur Gewinnung von Knochenmark für die Generierung Dendritischer Zellen wurden die Hinterbeine naiver Mäuse präpariert. Zunächst wurde die Maus durch Genickbruch getötet und mit Desinfektionsmittel (Terralin®) besprüht. Zur Präparation wurden in Alkohol desinfizierte chirurgische Scheren und Pinzetten benutzt. Das Fell wurde an den Beinen von der Muskulatur abgelöst und die Beine im Bereich der Hüftknochen abgetrennt. Die Füße wurden entfernt. Nach der Trennung von Ober- und Unterschenkelknochen wurden die Knochen von Muskeln und Sehnen befreit und die Epiphysenenden eröffnet. Durch die eröffneten Epiphysen konnte das Knochenmark aus Femur und Tibia mit Hilfe einer 5ml Spritze mit ca. 5ml sterilem DC-Medium und einer 23G Kanüle ausgespült werden. Der Inhalt der Markhöhle wurde in einem Greiner Röhrchen gesammelt. Um eine Zellsuspension herzustellen wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren durch eine 23G Kanüle gespritzt. Die Zellsuspension wurde anschließend in 50ml Röhrchen für 10min bei 1300U/min und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit 1ml neuem DC-Medium aufgefüllt, anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

In jede Petrischale wurden  $3 \times 10^6$  Stammzellen zu 10ml DC-Medium gegeben. Zur Kultivierung wurden dem Medium 5ng/ml GM-CSF (Überstand) und 1ng/ml IL-4 (Überstand) zugegeben.

Am nächsten Tag wurde pro Petrischale 10ml frisches DC-Medium zugegeben. Nach drei Tagen wurde pro Platte 10ml des alten DC-Mediums abgenommen, die Zellen abzentrifugiert, in 10ml frischem DC-Medium aufgenommen und wieder auf die Petrischale zurückgegeben. Nach sieben Tagen Kultur unter Standardbedingungen standen die Dendritischen Zellen für Experimente zur Verfügung.

#### **3.5.4. Stimulation von uninfizierten Dendritischen Zellen mit Typ I Interferon**

$4 \times 10^6$  Zellen pro 3ml DC-Medium wurden über Nacht mit  $2 \times 10^4$ pg IFN $\alpha$  Subtypen oder IFN $\beta$  stimuliert. Danach wurden die Zellen für weitere Experimente in TRIZOL aufgenommen und bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

#### **3.6. Herstellung einer Milzzellsuspension und Lyse kernloser Zellen**

Zur Herstellung einer Milzzellsuspension wurde die entnommene Milz in 5ml PBBS liegend durch ein Sieb zerrieben, die groben Bestandteile entfernt und die Einzelzellsuspension in ein Röhrchen überführt. Die Suspension wurde auf 10ml mit PBBS aufgefüllt, eine Zählprobe entnommen und die Zellen mit 1200rpm bei  $4^\circ\text{C}$  für 10min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde auf die jeweilige gewünschte Zellzahl pro ml mit RPMI-Medium eingestellt.

Wurde die Milzzellsuspension für eine durchflusszytometrische Untersuchung der Zellpopulationen verwendet, mit Ausnahme der Ter119 Färbung, so wurden die kernlosen Zellen mit Ammoniumchlorid lysiert. Dazu wurde die Milzzellsuspension mit 1200rpm bei  $4^\circ\text{C}$  für 10min zentrifugiert und das Zellpellet in 5ml 0,16M Ammoniumchlorid pH 7,2 aufgenommen. Nach 5min wurde die Einzelzellsuspension auf 10ml mit PBS aufgefüllt und eine Zählprobe entnommen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet auf die jeweilige Zellzahl pro ml mit RPMI-Medium eingestellt.

#### **3.7. Nachweis von infektiösen Zellen in der Milz mit Hilfe des „Infectious Center Assay“**

Die Anzahl FV-infektiöser Zellen in der Milz wurde mit diesem Test bestimmt. Dazu wurden am ersten Tag eine definierte Anzahl Indikatorzellen in eine 6 well Platte ( $6,6 \times 10^3$  Zellen/ml) ausgesät. Es wurden 3ml Indikatorzellsuspension pro well ausplattiert. Am nächsten Tag wurden zu den kultivierten Indikatorzellen die Milzzellen von FV-infizierten Mäusen auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt und eine

Verdünnungsreihe von  $10^6$  bis  $10^2$  hergestellt. Jeweils  $1 \times 10^6$ /ml bis  $1 \times 10^2$ /ml Zellen wurden auf die Indikatorzellen gegeben und drei Tage inkubiert. Die Inkubation fand bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  statt. Als Kontrolle des Tests wurden jeweils drei Wells mit F-MuLV und drei Wells ohne Virus mitgeführt. Bei der Kontrolle mit freiem Virus musste Polybrene A ( $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) hinzugegeben werden. Mit Hilfe von Polybrene A konnte das freie Virus besser an die Rezeptoren der Zelloberfläche binden (Toyoshima und Vogt 1969).

Nach drei Tagen wurde der Test ausgewertet. Dazu wurde das Medium dekantiert und die Zellen mit 95% Ethanol für 5-10min fixiert. Die fixierten Zellen wurden einmal mit PBS und einmal mit PBS/0,1% BSA gewaschen. Der erste Antikörper (AK720) wurde 1-2h bei RT inkubiert. Dazu wurden pro Well 600 $\mu\text{l}$  Hybridomaüberstand (AK720) verwendet. Anschließend wurden die Platten zweimal mit PBS/0,1% BSA gewaschen. Der zweite Antikörper (Ziege-anti-Maus IgG2b-HRP) wurde 1:400 in PBS/0,1% BSA verdünnt und jeweils 600 $\mu\text{l}$  pro Well pipettiert. Die Inkubation betrug 20min bei RT. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 2ml frisch angesetzte Substratlösung (AEC) pro Well zugegeben und 20min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dem Dekantieren, Waschen und Trocknen der Platten wurden die Foci gezählt. Die Anzahl an infektiösen Milzzellen wurde wie folgt berechnet:

Mittelwert der Foci pro Verdünnung und Vertiefung

X

Anzahl der Milzzellen pro Maus

= Anzahl infektiöser Milzzellen pro Maus

### 3.8. Nachweis von freiem Virus im Plasma (Virämie-Assay)

Der Virämie-Assay beruht auf demselben Prinzip wie der „Infectious Center Assay“ (s. Methode 3.7.), mit diesem Test wurde jedoch die freie Viruslast im Plasma bestimmt.

Am ersten Tag wurden  $0,75 \times 10^4$  *Mus dunni*-Zellen in 2ml RPMI pro Vertiefung einer 24 Well Platte ausgesät. Einen Tag später wurde zu den mit Polybrene A ( $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) vorbehandelten Indikatorzellen eine Verdünnungsreihe des Plasmas (1:222 bis 1:53946) hinzugegeben und drei Tage inkubiert. Die Inkubation fand bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  statt. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit Ethanol fixiert, mit dem F-MuLV

env-spezifischen monoklonalen Antikörper AK720 (200µl/well) gefärbt und mit dem Ziege-anti-Maus IgG2b-HRP Antikörper (200µl/well) und der Substratlösung AEC (500µl/well) entwickelt, um die Foci zu detektieren.

Als Kontrollen wurden jeweils drei wells mit F-MuLV und drei wells ohne Virus mitgeführt.

### **3.9. Interferon Inhibitions Assay**

*Mus dunni* Zellen wurden 24h mit Typ I Interferon vorbehandelt. Die Zellen wurden anschließend mit 50FFU F-MuLV B infiziert, über einen Zeitraum von vier Tagen kultiviert, mit Ethanol fixiert und mit dem F-MuLV-env spezifischen Antikörper AK720 gefärbt.

### **3.10. Durchflusszytometrie**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich einzelne Zellen oder Zellpopulationen aus einer heterogenen Zellpopulation analysieren. Dabei können spezielle Oberflächenstrukturen und intrazelluläre Proteine der Zellen identifiziert, charakterisiert und quantifiziert werden. Dazu wurden spezifische Fluorochrom-markierte Antikörper verwendet, die an Oberflächenproteine binden (Tab. 2.5). Die Fluoreszenzeigenschaften der Zellen wurden mit einem FACS Calibur von Becton Dickinson gemessen und mit CellQuest-Software analysiert.

#### **3.10.1. Färbung von Oberflächenproteinen (CD)**

Es wurden  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen aus dem Blut oder der Milz mit FACS-Puffer gewaschen, in 100µl FACS-Puffer und 0,5-2µl konjugiertem Antikörper aufgenommen und 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einmaligem Waschen in FACS-Puffer wurden die Zellen im Durchflusszytometer (FACS Calibur, Heidelberg) analysiert. Falls nicht anders angegeben, wurden alle Antikörper von Pharmingen (Heidelberg) bezogen.

#### **3.10.2. Intrazelluläre Färbung von Granzym A und Granzym B**

Für den Nachweis der intrazellulären Proteine GzmA und GzmB wurden zunächst die Oberflächenproteine (CD8, CD43) der Zellen markiert (s. Methode 3.10.1.). Nach einmaligem Waschen in FACS-Puffer, wurden GzmA und GzmB in den Zellen dann

nach dem Protokoll des Herstellers des Kits Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen) intrazellulär gefärbt.

### **3.10.3. Bestimmung der Prozentzahl von FV-infizierten Zellen im Blut**

Für die Bestimmung der Anzahl an FV-infizierten Zellen im Blut, wurden  $1 \times 10^6$  Zellen aus dem Blut mit dem Antikörper 34 (AK34) inkubiert. FV-infizierte Zellen exprimieren an der Oberfläche das glykolysierte FV gag-Protein, an welches der AK34 bindet. Der AK34 ist nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, so dass für die durchflusszytometrische Analyse ein zweiter Antikörper eingesetzt werden musste. Dieser zweite AK (anti-IgG2b-PE; monoklonaler Ziege-anti-Maus Antikörper) bindet an den AK34. Nach der Inkubation der Zellen aus dem Blut mit AK34 wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit anti-IgG2b-PE für 30min bei 4°C im Dunkeln. Nach erneutem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

### **3.10.4. Bestimmung von FV-infizierten Zellpopulationen in der Milz**

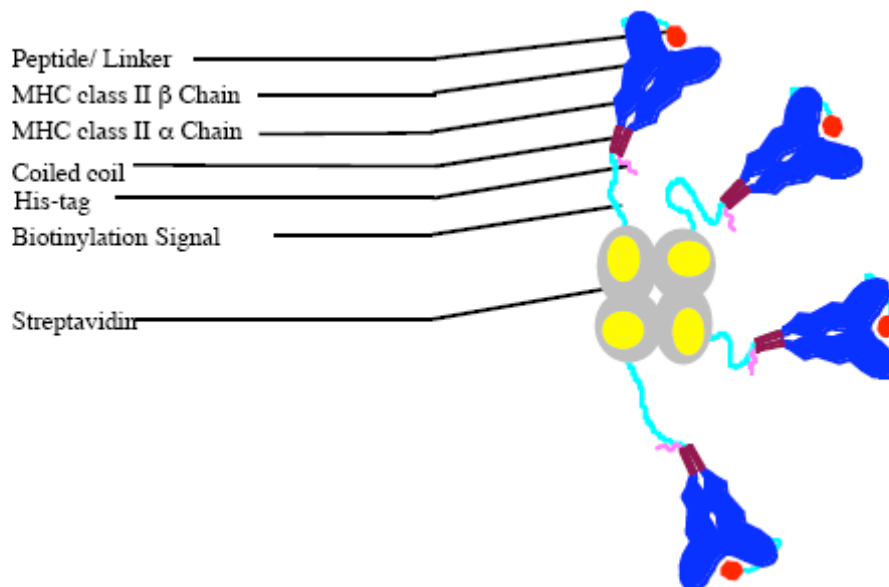
Mit dem Durchflusszytometer kann die Anzahl der infizierten Zellen in der Milz bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen einer Doppelfärbung unterzogen. Mit dem AK34/Avidin-PE wurde das an der Oberfläche exprimierte glykolysierte FV gag-Protein markiert. Mit dem Antikörper Ter119 wurde die Zellpopulation der Erythrozyten-Vorläuferzellen angefärbt. Für die durchflusszytometrische Färbung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz verwendet. Die Zellen wurden 30min bei 4°C mit AK34-Biotin inkubiert und danach zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Avidin-PE und dem Antikörper Ter119 für 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nachdem die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen wurden, wurde die Anzahl der FV-infizierten Zellen der Ter119 Zellpopulation mittels Durchflusszytometer bestimmt.

### **3.10.5. Tetramerfärbung**

Eine Methode, um Antigen-spezifische T-Zellen in einer T-Zellpopulation zu identifizieren und quantifizieren, ist die Tetramer-Färbung.

MHC Klasse I und II-Tetramere bestehen aus vier Peptid-MHC Klasse I bzw. II Komplexen, die über eine Biotin-Streptavidin-Bindung kovalent miteinander verknüpft sind. Der Komplex wird über konjugiertes PE im Durchflusszytometer visualisiert.

Die Methode beruht auf den Wechselwirkungen des Antigen-spezifischen T-Zellrezeptors mit den Peptid-bindenden MHC I bzw. II Komplexen.



**Abb. 3.1: Aufbau des Tetramers am Beispiel von MHC Klasse II Molekülen**

(Quelle: <http://www.nki.nl/nkidep/h7/Pictures>)

Für die Tetramerfärbung wurde eine Milzzellsuspension hergestellt und die kernlosen Zellen mittels Ammoniumchlorid (s. Methode 3.6.) lysiert. Die Milzzellen wurden gewaschen und  $5 \times 10^5$  Zellen (MHC-Klasse I Färbung) bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen (MHC-Klasse II Färbung) pro Färbung eingesetzt.

Für die MHC-Klasse I Färbung wurden die Zellen erneut gewaschen und in einem Volumen von 25 µl für 15 min bei RT gefärbt. Für die Dreifach-Färbung wurden 2,5 µl Tetramere mit den Antikörpern anti-CD8-APC und anti-CD43-FITC eingesetzt.

Bei der MHC-Klasse II Färbung wurden die Zellen nach dem Waschen mit RPMI-Medium mit 25 µl Tetramerverdünnung (1:10) für 2½ bis 3 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 5 µl Antikörperverdünnung von anti-MAC1-FITC (1:16) zusammen mit anti-CD4-APC (1:50) zu den 25 µl dazugegeben und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert.

Im Anschluß an beide Tetramer-Färbungen wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen innerhalb einer Stunde gemessen.

### **3.11. Zytokinnachweis mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA)**

#### **3.11.1. IFN $\alpha$ / $\beta$ ELISA**

Die Mikrotiterplatten für den IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  ELISA sind mit einem monoklonalen Antikörper gegen die zu untersuchende Substanz beschichtet (erster Antikörper). Zuerst wurden 100 $\mu$ l der Standardproben und der zu untersuchenden Proben aufgetragen, 1h inkubiert und überschüssige Bestandteile der Proben durch Waschschriffe entfernt. Gebundene Antigene werden mit einem zweiten IFN-spezifischen Antikörper über Nacht detektiert. Der zweite Antikörper ist mit der Horseradish Peroxidase (HRP) gekoppelt, die den Farbstoff TMB umsetzt, der mit dem ELISA-Reader photometrisch bei 450nm detektiert wird.

Durch das Mitführen von Standardproben bekannter Konzentration wurde eine Referenzgerade erstellt, mit der die Konzentration der Proben berechnet werden konnte. Der Leerwert, die Standardproben und die Proben wurden jeweils als Doppelwert gemessen.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurde den Mäusen Blut entnommen und das Serum bei -80°C eingefroren.

Die ELISA für IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  wurden mit einmal eingefrorenem unverdünntem oder 1:3 verdünntem Mäuseserum bzw. Zellkulturüberstand der transfizierten 293T Zellen durchgeführt.

Das Detektionslimit liegt bei dem IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  ELISA bei 12,5 pg/ml bzw. 15,6 pg/ml.

#### **3.11.2. Nachweis der Produktion von GM-CSF und IL-4 in Zellkultur**

Aus den Kulturflaschen der Zelllinie NIH 3T3-GM-CSF und NIH 3T3-IL-4 wurde nach 60 Stunden Kultivierung der Überstand abgenommen und mit kommerziellen ELISA-Kits (Mouse GM-CSF und Mouse IL-4 (BD Pharmingen, Heidelberg)) gemäß der Anleitung der Hersteller der Gehalt an GM-CSF und IL-4 quantifiziert.

### **3.12. Bestimmung von FV-bindenden Antikörpern (ELISA)**

Mit der Bestimmung von F-MuLV bindenden Antikörpern können gegen F-MuLV gebildete Antikörper nachgewiesen werden.

An den Boden einer 96 well-Rundplatte wurde über Nacht bei 4°C 100µl Virusantigen (0,5µg) in Coatingpuffer gebunden. Die Platten wurden 5x mit PBS/0,5 % Tween 20 gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen 30min bei RT mit 100µl/well PBS/10% FCS abgesättigt. Danach wurden 100µl der hergestellten Plasmaverdünnungen (1:10 bis 1:56250) in die wells gegeben und bei 4°C 1h inkubiert. Es erfolgte erneutes Waschen (5x) der Platte mit PBS/0,5% Tween 20. Es wurde von dem zweiten HRP-gekoppelten Esel-anti-Maus Ig Antikörper (Nachweis von Gesamt Ig) je 100µl/well 1h bei RT inkubiert. Nach 5x Waschen mit PBS/0,5% Tween 20 wurde die Substratreaktion mit o-Phenylenediamine (OPD) durchgeführt. Eine OPD-Tablette wurde in 10ml Substratpuffer gelöst und die Reaktion mit 10µl 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestartet. Von der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzten Substratlösung wurden 100µl/well ca. 15min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50µl konzentrierter Schwefellösung abgestoppt. Die Extinktion wurde bei einer OD von 490nm gemessen.

Für die Bestimmung des FV spezifischen Antikörpertiters wurde der dreifache OD-Wert der Plasmen von unifizierten Tieren als Grenze für eine positive Reaktion festgesetzt.

## Molekularbiologische Methoden

### 3.13. Bakterienhaltung

Die superhelikale Plasmid-DNA für die Klonierungen wurde in transformationskompetenten Bakterien des *E. coli* Stammes DH5 $\alpha$  (recA1, endA1, gyrA96, Thi-1, hsdR17(rk $^-$ , m $_k^+$ ), supE44, relA1,  $\Delta$ [argF-lacZYA]U169,  $\Phi$ 80 $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15,  $\lambda^-$ , F $^-$ ) vermehrt. Zum Vereinzeln von Bakterienkolonien wurden die Bakterien mit einer ausgeglühten Impföse auf Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C invertiert bebrütet.

Agarplatten und Flüssigmedium wurden wie folgt hergestellt:

Der LB-Agar wurde nach dem Autoklavieren unter Rühren auf 50°C abgekühlt und zur Selektion mit Kanamycin (50mg/l) versetzt. Die Platten wurden bei 4°C gelagert.

Für Flüssigkulturen wurde LB-Medium nach dem Autoklavieren mit Kanamycin versetzt und bei 37°C und ca. 200U/min für 12-18h bebrütet.

Zur dauerhaften Lagerung wurden 0,8ml Bakterienkultur mit 0,2ml Glycerol bei -80°C eingefroren.

### 3.14. Transformation von kompetenten *E. coli* mit Plasmid-DNA

5 $\mu$ l Plasmid-DNA wurden in 1,5ml Eppendorfgefäßen vorgelegt und für mindestens 5min mit 200 $\mu$ l frisch aufgetauten, kompetenten DH5 $\alpha$  Bakterien auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 $\mu$ l TSB Puffer und 20 $\mu$ l 20% Glucose zugeben. Dieser Ansatz wurde für 60min bei 37°C im Brutschrank geschüttelt. Im Anschluss wurden die Zellen bei 8000U/min herunterzentrifugiert und 450 $\mu$ l des Überstand verworfen. Im Restvolumen wurden die sedimentierten Zellen resuspendiert und auf einer LB-Kanamycin Platte ausplattiert. Nach 12-14h wurden einzelne Bakterienkolonien sichtbar und konnten für das Animpfen von Minikulturen (2ml) verwendet werden.

### 3.15. Säulenaufreinigung von Plasmid-DNA

Die Methode beruht auf der alkalischen Lyse mit anschließender Präzipitation von chromosomaler DNA und Proteinen. Die Plasmid-DNA wird anschließend in Anwesenheit einer hoher Konzentration chaotrophischer Salze an eine Membran gebunden. Die Elution erfolgt durch einen Puffer mit niedriger Salzkonzentration.

### 3.15.1 Minipräparation

DNA aus PCR-Produkten, die als Standard bei der qPCR eingesetzt werden sollten, wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

### 3.15.2. Megapräparation

Zur Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 30µl Flüssigkultur in 500ml Kanamycin-haltiges (50µg/ml) LB-Medium gegeben und in einem 1000ml Erlenmeyerkolben über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C angezchtet. Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem Macherey-Nagel NucleoBond® EF Plasmid Purification Mega Kit nach Angaben des Herstellers.

## 3.16. Konzentrationbestimmung von Nukleinsäuren

### 3.16.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde durch Messung der Extinktion bei 260nm in einer Quarzküvette bestimmt.

Die Konzentrationen wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration} = \text{Gesamtvolumen/Probenvolumen} \times F/1000 \times \text{Extinktion}_{(260\text{nm})} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Wobei der Faktor F 50 für doppelsträngige DNA

40 für doppelsträngige RNA

33 für einzelsträngige Oligonukleotide

beträgt.

### 3.16.2. Fluorometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Zur genauen Konzentrationbestimmung des RNA-Plasmids für den FV-Standard erfolgte eine Konzentrationsbestimmung mit dem Fluoreszenzfarbstoff RiboGreen® (Molecular Probes, NL) mit dem Light Cycler von Roche. Mit einem RNA-Standard (16S rRNA definierter Konzentration) und dem RiboGreen® Assay Reagenz wurde zunächst mit verschiedenen Verdünnungen des Standards eine Eichgerade im Bereich von 20ng/ml-1µg/ml erstellt und anhand dieser Eichgerade die RNA-Konzentration der zu untersuchenden Probe ermittelt. Die Proben aus der *in vitro*

Transkription wurden 1:150 verdünnt, um Werte im Konzentrationsbereich der Eichgerade zu erhalten.

### **3.17. Kalziumphosphat-Transfektion von 293T Zellen**

293T Zellen lassen sich besonders einfach mit Kalziumphosphat-Präzipitaten transfizieren (modifiziert nach Pear et al. 1993). Bei der Pufferherstellung ist die pH-Einstellung besonders wichtig, deshalb wurden zuvor die pH-Werte 7.0, 7.05 und 7.10 auf die Transfektionseffizienz hin überprüft.

Am Tag vor der Infektion wurden in 6cm Zellkulturschalen  $2 \times 10^6$  Zellen in 5ml DMEM mit 10% FCS ausgesät. Für jeden Ansatz wurden 15µg Plasmid-DNA mit H<sub>2</sub>O auf 500µl eingestellt und mit 62µl 2M CaCl<sub>2</sub> präzipitiert. Dieser Ansatz wurde anschließend in 500µl 2xHBS aufgenommen und sofort tropfenweise über die Zellkulturschale pipettiert. 7-10h nach der Transfektion wurde das Medium vorsichtig entfernt und 2ml DMEM mit 2% FCS zu den Zellen gegeben. 48h nach der Transfektion wurde der Überstand auf IFN $\alpha$  Subtypen bzw. IFN $\beta$  Konzentration mit dem ELISA untersucht.

### **3.18. Arbeiten mit RNA**

Bei allen Experimenten mit RNA ist RNase freies Arbeiten entscheidend: es wurden nur speziell RNase freie, sterile Lösungen, DEPC behandeltes Wasser und RNase-freie, gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Alle Arbeiten wurden einem separaten RNase freien Platz durchgeführt.

#### **3.18.1. Isolierung von Gesamt-RNA**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus vitalen Milzzellen und Dentritischen Zellen wurden  $5-10 \times 10^6$  Zellen in 1ml TRIZOL (Invitrogen) resuspendiert. Entsprechend dem Hersteller-Protokoll wurde die RNA aus der wässrigen Phase mit Isopropanol gefällt und danach mit 70% Ethanol gewaschen. Bei der Gewinnung der RNA für Realtime-PCR Analysen wurde ein DNase Verdau mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) zum Abbau genomischer DNA durchgeführt, um die Amplifikation genomischer Sequenzen zu vermeiden. Trotzdem wurden als Qualitätskontrolle von jeder Probe sogenannte „RT“ (Reverse Transkriptase)–Proben mitgeführt, Proben bei denen die RT nicht hinzugefügt wurde und somit nur kontaminierende DNA amplifiziert wird.

### 3.18.2. Real Time (Light Cycler/Roche) SybrGreen PCR

Die quantitative PCR (qPCR) dient der quantitativen Bestimmungen der Genexpression innerhalb einer DNA- bzw. cDNA-Probe. Die Bestimmung erfolgt dabei immer gegen ein Referenzgen; in diesem Fall wurde  $\beta$ -Actin verwendet. Die Menge des DNA-Amplifikats wird durch erhöhte Fluoreszenz bei der Einlagerung von SybrGreen in die dsDNA gemessen. Der Amplifikationszyklus, bei dem sich die Bildung eines Amplifikates zeigt, wird als  $C_T$  Wert bezeichnet und definiert die Kopienzahl des Gens in der Probe. Die qPCR wurde als One-Step-PCR durchgeführt. Bei der One-Step-PCR laufen sowohl reverse Transkription als auch PCR in demselben Reaktionsgefäß ab. Taq-DNA-Polymerasen und alle benötigten Primer und Reagenzien werden beim Ansetzen der Reaktion zusammengegeben. Während der Reversen-Transkriptase-Reaktion bei 52°C wird cDNA synthetisiert, die Taq-DNA-Polymerase ist unter diesen Bedingungen nur wenig aktiv. Nach der reversen Transkription bei 52°C wird dann die Temperatur auf 95°C erhöht, wodurch die Reverse-Transkriptase inaktiviert und durch die zunehmende Aktivität der Taq-DNA-Polymerase die cDNA amplifiziert wird.

Für die RT-PCR wurde das QuantiTect SYBR Green RT-PCR KIT (Qiagen, Hilden) verwendet. Indem QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix sind bereits Nukleotide, der PCR Puffer, SybrGreen sowie die Hotstart-Polymerase enthalten. Die Messung erfolgte in dem Light Cycler 2.0 von Roche.

Für die qPCR wurde die RNA aus Kapitel 3.18.1 1:10 verdünnt mit H<sub>2</sub>O eingesetzt.

Es wurde je Probe 20µl Ansätze in Duplikaten gemessen. Dazu wurde folgender Ansatz als Mastermix je Probe pipettiert:

10µl	2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix
0,2µl	Quanti Tect RT
4,0µl	Primer forward (Endkonzentration 1µM)
4,0µl	Primer reverse (Endkonzentration 1µM)
0,8µl	H <sub>2</sub> O
<hr/>	
1,0µl	RNA

Eine Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O wurde stets mitgeführt.

Die PCR wurde mit folgendem One-Step-Protokoll durchgeführt:

RT-Reaktion:	52°C	30min/1800 sec		
Inaktivierung RT				
Aktivierung Hot-Start	95°C	15min		
Cycling1	96°C	20sec	}	40x
	53°C	25sec		
	72°C	40sec		
	78°C	15sec		
Cycling2	96°C	20sec	}	1x
	53°C	25sec		
	72°C	40sec		

Die Temperaturänderungsrate lag bei 20°C/s.

Um die Spezifität der entstandenen Amplifikation zu überprüfen, wurde eine Schmelzpunktbestimmung der PCR-Produkte direkt nach der Amplifikation mit dem Light Cycler von Roche durchgeführt. Die PCR-Produkte schmelzen bei unterschiedlichen Temperaturen in Abhängigkeit der Zahl ihrer Basenpaare und ihres G/C-Gehaltes. Während dieses Vorganges denaturiert die amplifizierte DNA, interkaliertes SybrGreen wird freigesetzt und die Fluoreszenzsignale nehmen ab. Die gemessenen Schmelzpunkte sind analog zur Position der Banden in der Agarose-Gel-Elektrophorese, somit kann die Spezifität der Amplifikate gezeigt werden.

Dazu wurde die Temperatur in 0,5°C Schritten von 72°C ausgehend bis 94°C erhöht. Während des Schmelzprozesses wurde eine Temperaturänderungsrate von 0,1°C/s verwendet.

Die Auswertung der  $C_T$ -Werte erfolgte mit der Light Cycler Software 3.5.3. Die Quantifizierung der gesuchten Genexpression im Verhältnis zum Referenzgen wurde mit Excel durchgeführt.

Als Standard für die Quantifizierung wurde eine Verdünnungsreihe von  $\beta$ -Actin in einer Kopiezahl von  $10^2$  bis  $10^6$  Molekülen verwendet.

### 3.18.3. Real Time TaqMan-PCR

Neben dem Einsatz von SybrGreen besteht die Möglichkeit, eine spezielle fluoreszenzmakierte Oligonukleotid-Sonde zu verwenden, die zur Erhöhung der Spezifität beiträgt. Diese ist am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert und trägt am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat), der zusätzlich mit einem Phosphatrest blockiert ist. Bei Anregung der intakten Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488nm) wird deren Fluoreszenz durch die räumliche Nähe von Reporter-Farbstoff zum Quencher-Farbstoff durch einen Fluoreszenz-Energietransfer Energie (FRET) unterdrückt. Während der PCR hybridisieren Sonde und Primer gleichermaßen an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase kommt es zur Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, wobei die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen und die Emission des Reporters als Signal gemessen werden kann. Freie, nicht gebundene Sonde wird nicht hydrolysiert. Die Fluoreszenz des Reporters steigt entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes mit jedem Zyklus an.

#### 3.18.3.1. Two Step Taqman-PCR für die Quantifizierung von Friend Virus

Bei der Two-Step RT-PCR wird zunächst während der reversen Transkription die cDNA synthetisiert. Nach Abschluss der Reversen-Transkriptase-Reaktion wird dann ein Aliquot daraus entnommen und in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Der wesentliche Vorteil der zweistufigen RT-PCR liegt darin, dass die PCR optimiert werden kann, ohne dass die Reverse-Transkriptase-Reaktion beeinflusst wird.

##### 1. cDNA-Synthese

Zur Auffaltung der Sekundärstrukturen (intramolekulare H<sub>2</sub>-Brückenbindungen) wurden 10µl RNA mit 2,5µl antisense Primer 5min bei 70°C erhitzt und danach sofort wieder auf Eis gegeben. Folgender Mix wurde pro Probe pipettiert:

10µl	QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix
0,2µl	QuantiTect RT
3,8µl	RNase-freies H <sub>2</sub> O

---

5,0µl	Probe
-------	-------

Nun folgt die eigentliche cDNA-Synthese bei 50°C für 20min, die zum Schluss für 5min bei 94°C gestoppt wurde.

Eine Negativprobe bei H<sub>2</sub>O wurde stets mitgeführt.

## 2. RealTime PCR

In die Glaskapillaren wurde 1µl des forward Primers vorgelegt und dann 19µl des cDNA-Synthese Ansatzes zugegeben.

Aktivierung Hot-Start	95°C	15min		
Cycling	96°C	15sec	}	45x
	53°C	60sec		
Kühlung	4°C	30sec		

Die Temperaturänderungsrate lag bei 20°C/s.

### 3.19. Generierung der Standards

Voraussetzung für die Quantifizierung über Standards ist, dass der Standard die Sequenz der Ziel-DNA in bekannter Konzentration enthält.

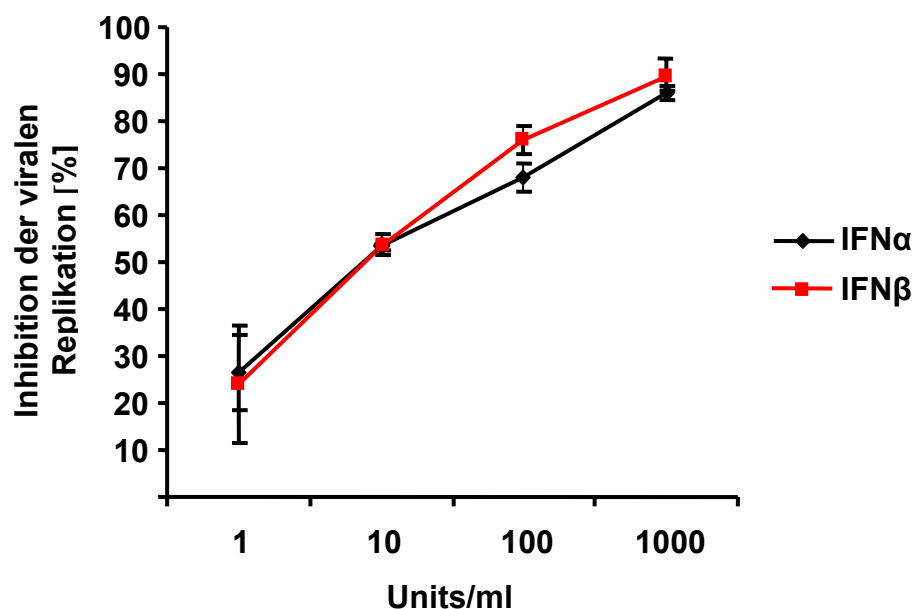
Für den  $\beta$ -Actin Standard wurde über eine RealTime PCR das spezifische Amplifikat gewonnen, aufgereinigt und photometrisch vermessen. Anschließend wurde dann die Kopienzahl in der Stammlösung berechnet und eine Verdünnungsreihe angesetzt.

Zur Generierung eines Standards für die absolute Quantifizierung der Friend Virus RNA wurde das Ziel-cDNA-Fragment in den pCRII-TOPO Vektor kloniert und dann mit dem AmpliScribe™ T7, T3 und SP6 High Yield transcription Kit *in vitro* in RNA transkribiert. Die Konzentration des RNA-Standard wurde mit dem RiboGreen® Quantitation Kit (Invitrogen, Karlsruhe) bestimmt und eine Verdünnungsreihe von  $4 \times 10^1$  bis  $4 \times 10^9$  Molekülen angesetzt. Die Detektionsgrenze betrug mindestens 40 RNA Kopien des Friend Virus.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Antiviraler Effekt von IFN $\alpha$ und IFN $\beta$ *in vitro*

Typ I Interferone wurden zunächst in Bezug auf ihre antiviralen Eigenschaften bei der retroviralen F-MuLV Infektion charakterisiert. Dafür wurden IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  auf die Inhibition der viralen Replikation von F-MuLV in *Mus dunni* Zellen getestet. Die Replikation von F-MuLV wurde sowohl von IFN $\alpha$  als auch von IFN $\beta$  dosisabhängig inhibiert. Hohe Konzentrationen an IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  (1000Units/ml) führten zu einer ca. 90%igen Reduktion der viralen Replikation (Abb. 4.1). IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  hemmten die Replikation von F-MuLV gleich effektiv. Da die Behandlung der *Mus dunni* Zellen mit IFN $\beta$  zu einer möglichen Produktion der sogenannten späten IFN $\alpha$  Subtypen (alle IFN $\alpha$  Subtypen außer IFN $\alpha$ 4) führt (s. Einleitung 1.5.), jedoch der antivirale Effekt von IFN $\beta$  selbst bestimmt werden sollte, wurde in einem weiteren Experiment nach IFN $\beta$  Gabe, IFN $\alpha$  durch Antikörper neutralisiert. Die Neutralisation von IFN $\alpha$  während der Behandlung mit IFN $\beta$  zeigte, dass der antivirale Effekt von IFN $\beta$  von einer möglichen IFN $\alpha$  Produktion der *Mus dunni* Zellen unabhabhängig war (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.1: Antiviraler Effekt von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  *in vitro***

*Mus dunni* Zellen wurden *in vitro* 24h mit steigenden IFN $\alpha$  oder IFN $\beta$  Konzentrationen (1 bis 1000U/ml) vorbehandelt. Die Inhibition der viralen Replikation wurde 4 Tage nach der Infektion der Zellen mit 50FFU F-MuLV bestimmt. Jede IFN $\alpha$ / $\beta$  Konzentration wurde als Doppelbestimmung gemessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

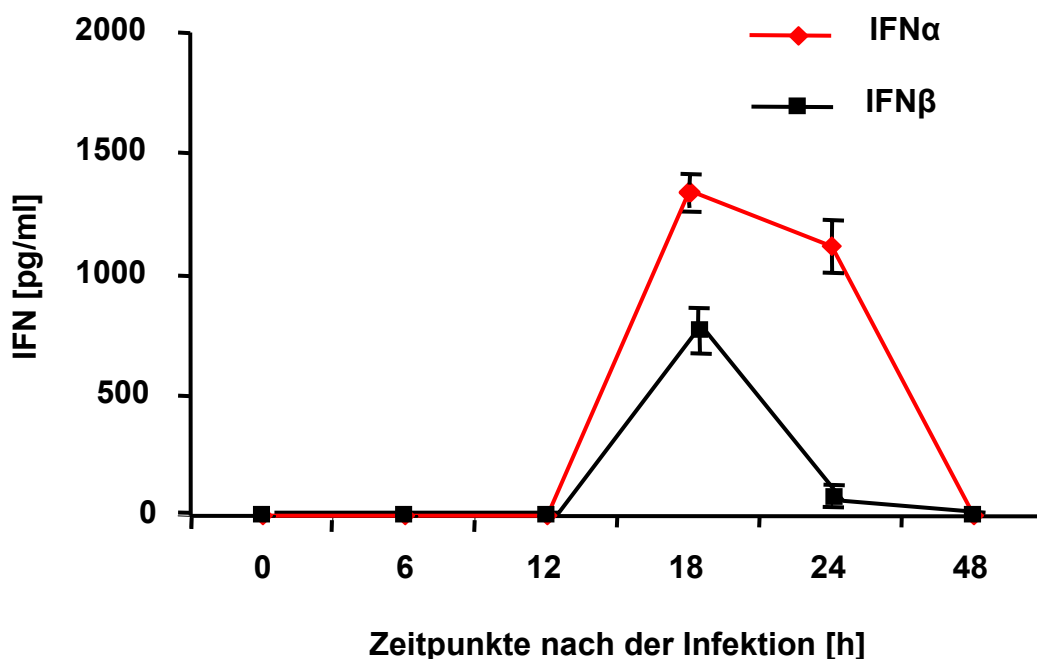
#### 4.2. Kinetik der IFN $\alpha$ und IFN $\beta$ Antwort nach FV-Infektion

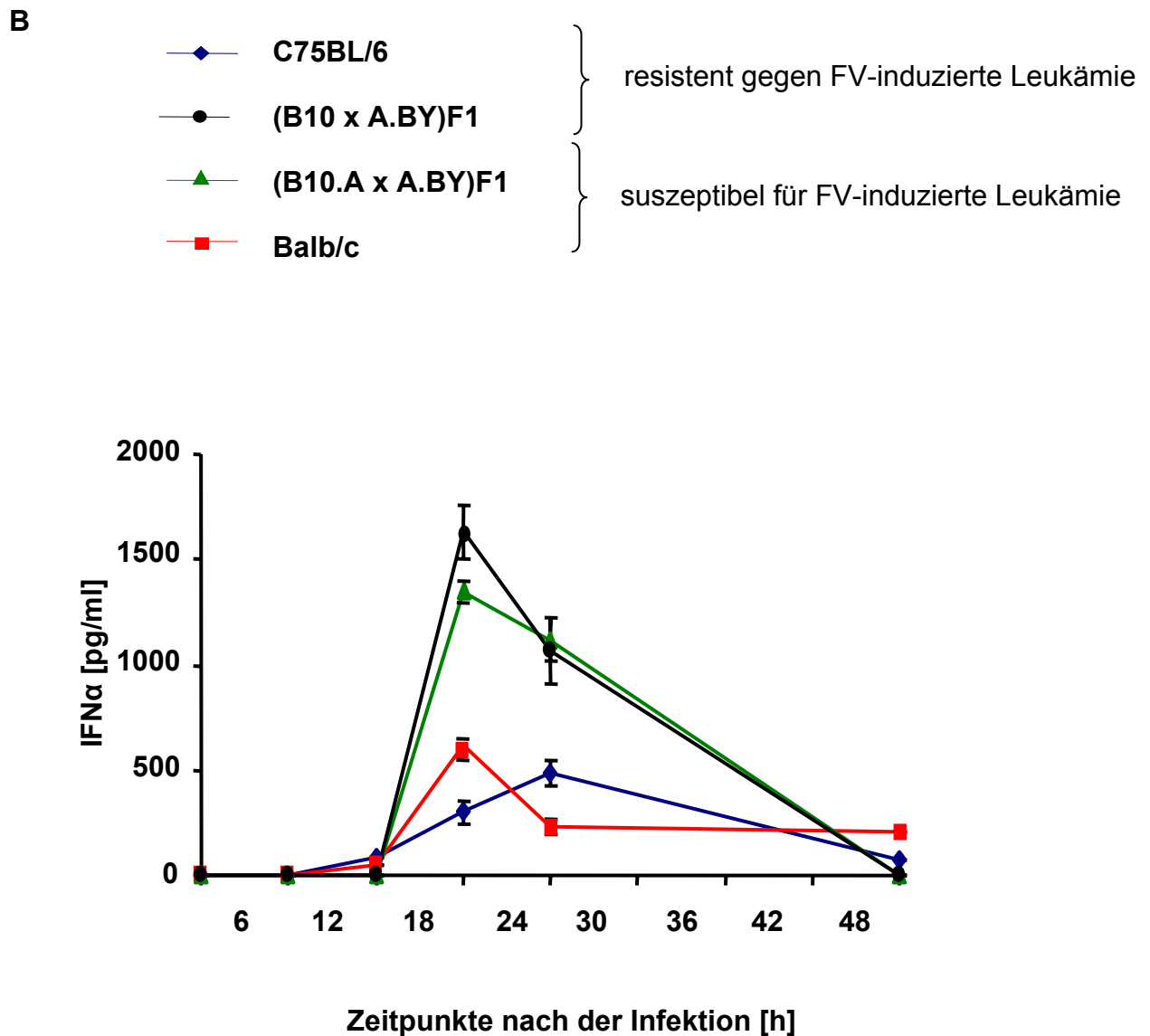
Typ I Interferone können grundsätzlich von sehr vielen Zelltypen produziert werden und werden nach viraler Infektion mit DNA- und RNA-Viren freigesetzt. Um die Rolle von Typ I IFN *in vivo* nach der FV-Infektion zu bestimmen, wurden IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  mittels ELISA im Serum von FV-infizierten Mäusen gemessen.

FV-suszeptible (B10.A x A.ByY) F<sub>1</sub> Mäuse zeigten eine schnelle Produktion von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  zwischen 12h und 24h nach der FV-Infektion (Abb. 4.2A). Eine maximale Konzentration sowohl von IFN $\alpha$  (Mittelwert=1351pg/ml) als auch IFN $\beta$  (Mittelwert=776pg/ml) wurde 18h nach der Infektion erreicht. Die Konzentration an produziertem IFN $\alpha$  war dabei doppelt so hoch im Vergleich zu IFN $\beta$  (Abb. 4.2A).

Mausstämme mit unterschiedlicher Suszeptibilität gegenüber der FV-Infektion wurden untersucht, um den Einfluss von IFN $\alpha$  auf die FV-Resistenz zu untersuchen. Maximale Konzentrationen von IFN $\alpha$  wurden 18h nach der Infektion in suszeptiblen (B10.A x A.BY)F<sub>1</sub> und Balb/c Mäusen (Mittelwert=613pg/ml), und nach 18h und 24h in den resistenten (B10 x A.BY)F<sub>1</sub> (Mittelwert=1630pg/ml) und C57BL/6 Mäusen (Mittelwert=485pg/ml) gefunden (Abb. 4.2B). Die Kinetik der IFN $\alpha$  Produktion war für jeden Mausstamm charakteristisch, korrelierten jedoch nicht mit der Suszeptibilität der Mäuse gegenüber der FV-induzierten Leukämie.

A





#### Abb. 4.2: Kinetik von IFN $\alpha$ und IFN $\beta$ nach FV-Infektion

Mäuse wurden mit FV infiziert und das Blut zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion gewonnen. Die IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  Konzentration wurde im Serum mittels ELISA bestimmt. Die Kinetik der IFN $\alpha$  Produktion wurde mit der IFN $\beta$  Produktion in suszeptiblen (B10.A x A. BY)F<sub>1</sub> Mäusen verglichen (A). Die Kinetik der IFN $\alpha$  Produktion wurde in zwei suszeptiblen und zwei resistenten Mausstämmen bestimmt (B). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung von vier Mäusen pro Gruppe.

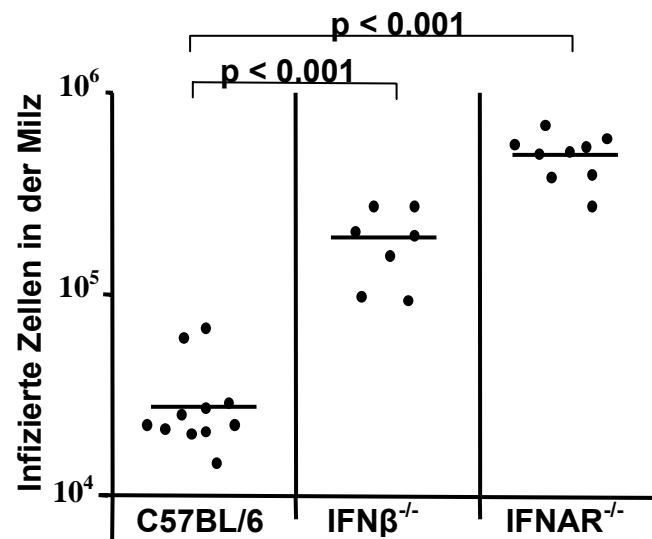
### 4.3. Verlauf der akuten FV-Infektion in IFN $\beta$ - und IFNAR-defizienten Mäusen

Nachdem *in vitro* der antivirale Effekt von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  gezeigt werden und die Freisetzung großer Mengen an Typ I IFN nach der Infektion mit FV beobachtet werden konnte, stellte sich die Frage nach der Bedeutung von Typ I Interferonen für die Resistenz von Mäusen gegen eine FV-induzierte Leukämie. Dazu wurden resistente C57BL/6 Wildtypmäuse und C57BL/6 Mäuse, die nicht mehr in der Lage waren IFN $\beta$  zu produzieren bzw. Mäuse denen der IFN $\alpha/\beta$ -Rezeptor (IFNAR) fehlte, mit FV infiziert. 11 Tage nach Infektion wurde die Viruslast im Blut und in der Milz in den Wildtyp C57/BL6 Mäusen mit den IFN $\beta$ - und IFNAR-defizienten Mäusen verglichen. In den IFN $\beta^{-/-}$  Mäusen konnten 11 Tage nach Infektion eine 10fach höhere Viruslast in der Milz im Vergleich zu den Wildtypmäusen festgestellt werden (Abb. 4.3A). Das Fehlen des IFNARs ergab sogar eine 15fach höhere Viruslast in der Milz als in den C57BL/6 Mäusen.

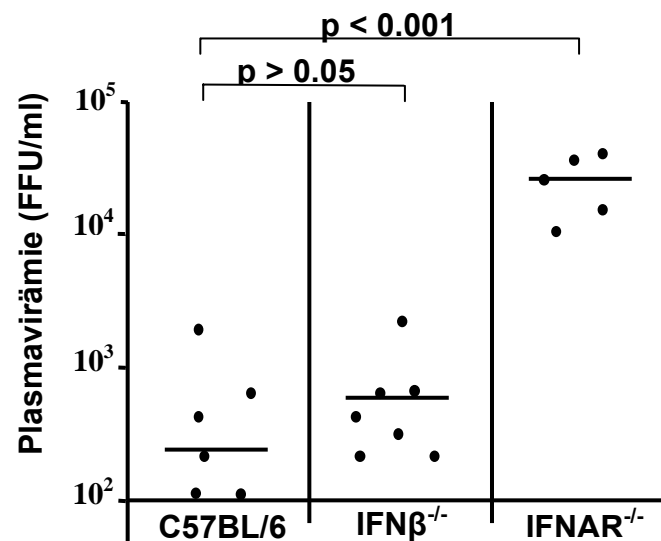
Ähnlich wie die Viruslast in der Milz zeigte die Viruslast im Plasma der IFNAR-defizienten Mäuse (Mittelwert= $2,6 \times 10^4$ SFFU) einen signifikanten höheren Wert als bei den Wildtypmäusen (Mittelwert= $2,3 \times 10^2$ SFFU). Dagegen wiesen die IFN $\beta^{-/-}$  Mäuse (Mittelwert= $7 \times 10^2$ SFFU) zwar eine leicht erhöhte Virämie verglichen zur Kontrollgruppe auf, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 4.3B).

Die Produktion der späten IFN $\alpha$  Subtypen wird initiiert durch die Bindung von IFN $\alpha 4$  und IFN $\beta$ , den so genannten frühen IFNs, an den IFNAR (Harada et al. 1996, Marie et al. 1998, Sato et al. 1998). Interessanterweise konnte 24h nach FV-Infektion eine IFN $\alpha$  Produktion in den IFN $\beta^{-/-}$  Mäusen nachgewiesen werden, die im Vergleich zu den C57BL/6 Kontrollmäusen nicht reduziert war (Abb. 4.4). Im Mittel betrug die IFN $\alpha$  Konzentration in den C57BL/6 364pg/ml und in den IFN $\beta^{-/-}$  Mäusen 428pg/ml. Im Gegensatz dazu sind IFNAR $^{-/-}$  Mäuse stark beeinträchtigt in ihrer IFN $\alpha$  Produktion, lediglich 58pg/ml IFN $\alpha$  konnten im Serum nachgewiesen werden. Dies könnte die unterschiedliche Suszeptibilität der beiden defizienten Mausstämme gegenüber der FV-Replikation erklären. Dieses Ergebnis zeigt deutlich die wichtige Rolle von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  während der akuten FV-Infektion in resistenten Mäusen.

A



B

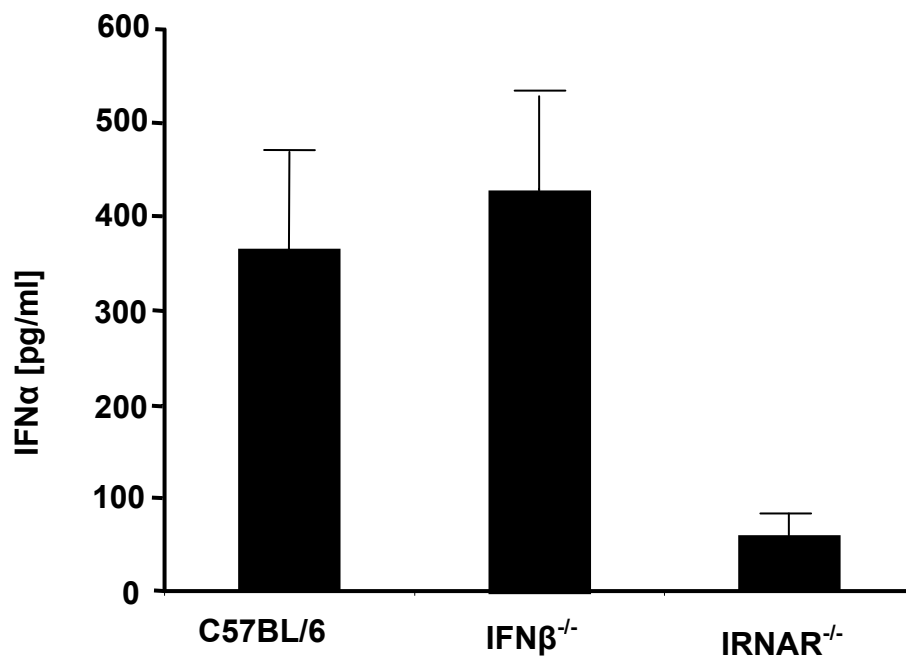


### Abb. 4.3: Die akute FV-Infektion in IFN $\beta$ - und IFNAR-defizienten Mäusen

C57BL/6 Wildtypmäuse, IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> und IFNAR<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit FV infiziert. Die Viruslast wurde 11 Tage nach der Infektion in der Milz (A) und im Plasma (B) bestimmt. Die Ergebnisse der „knockout“ Mäuse wurden mit denen der Wildtypmäuse verglichen.

Jeder Punkt repräsentiert eine einzelne Maus. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppe an. Unterschiede zwischen der Gruppe der infizierten Wildtypmäuse und den beiden „knockout“ Gruppen wurde mit Hilfe des Dunnett's Test analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt.

Legende: IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> = IFN $\beta$  „knockout“ Maus, IFNAR<sup>-/-</sup> = IFNAR „knockout“ Maus



**Abb. 4.4: IFN $\alpha$  Produktion nach FV-Infektion in IFN $\beta$ - und IFNAR-defizienten Mäusen**

Zum Zeitpunkt 24h nach Infektion wurde die Konzentration von IFN $\alpha$  im Serum der beiden „knockout“ Mäuse und der Kontrollmäuse durch ELISA bestimmt.

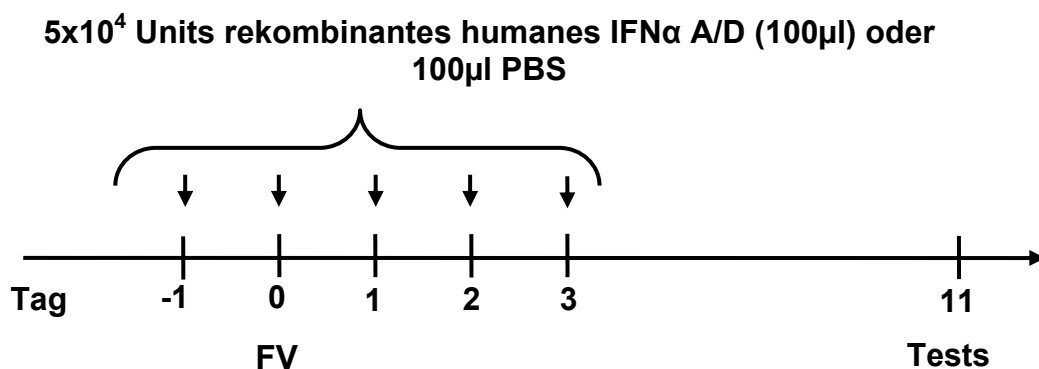
Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen von 4 Tieren pro Gruppe.

Legende: IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> = IFN $\beta$  „knockout“ Maus, IFNAR<sup>-/-</sup> = IFNAR „knockout“ Maus

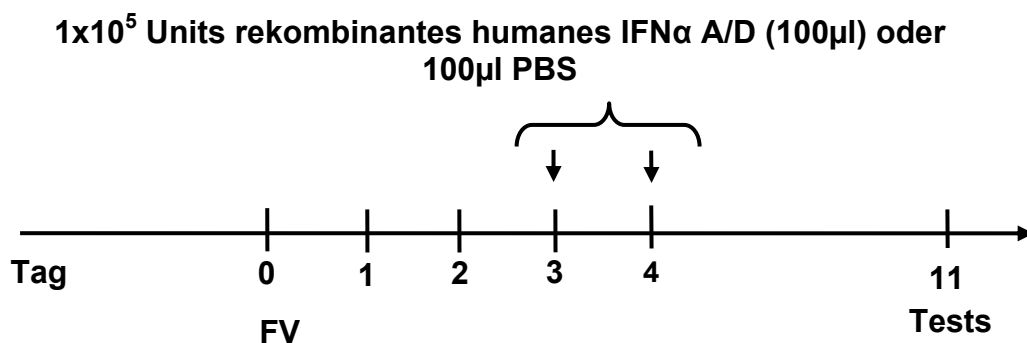
#### 4.4. Therapie der akuten FV-Infektion mit humanem IFN $\alpha$ A/D

Die Ergebnisse mit den „knockout“ Mäusen zeigen, dass IFN $\alpha$  einen entscheidenden Einfluss auf die Viruslast in der akuten FV-Infektion hat. Um den Effekt von exogenem IFN $\alpha$  zu untersuchen, wurden FV-suszeptible (B10.A x A.BY) $F_1$  Mäuse täglich von Tag -1 bis Tag +3 bzw. von Tag +3 bis Tag +4 nach FV-Infektion mit rekombinanten humanen IFN $\alpha$  A/D oder PBS als Kontrolle behandelt. 11 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und die Wirkung der IFN $\alpha$  Therapie anhand der Milzgröße und der Viruslast in der Milz und im Plasma bestimmt.

A



B



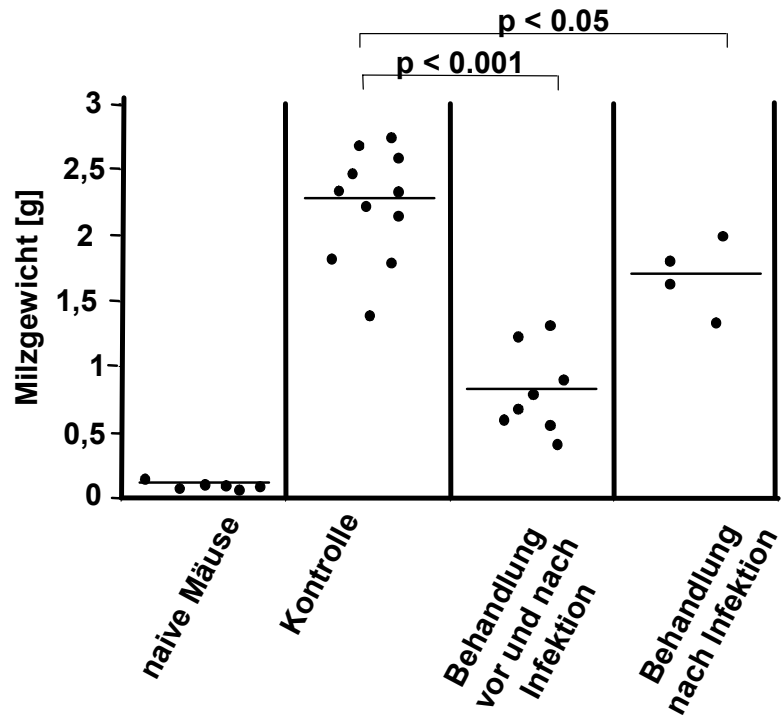
#### Abb. 4.5: Versuchsablauf der rekombinanten humanen IFN $\alpha$ A/D Gabe während der akuten FV-Infektion suszeptibler Mäuse

Den FV-suszeptiblen Mäusen wurden zu den Zeitpunkten -1 bis +3 Tage (A) bzw. +3 bis +4 Tage (B) nach FV-Infektion rekombinantes humanes IFN $\alpha$  A/D bzw. als Kontrolle PBS ip. injiziert. 11 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und das Milzgewicht, die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz und die Plasmavirämie bestimmt.

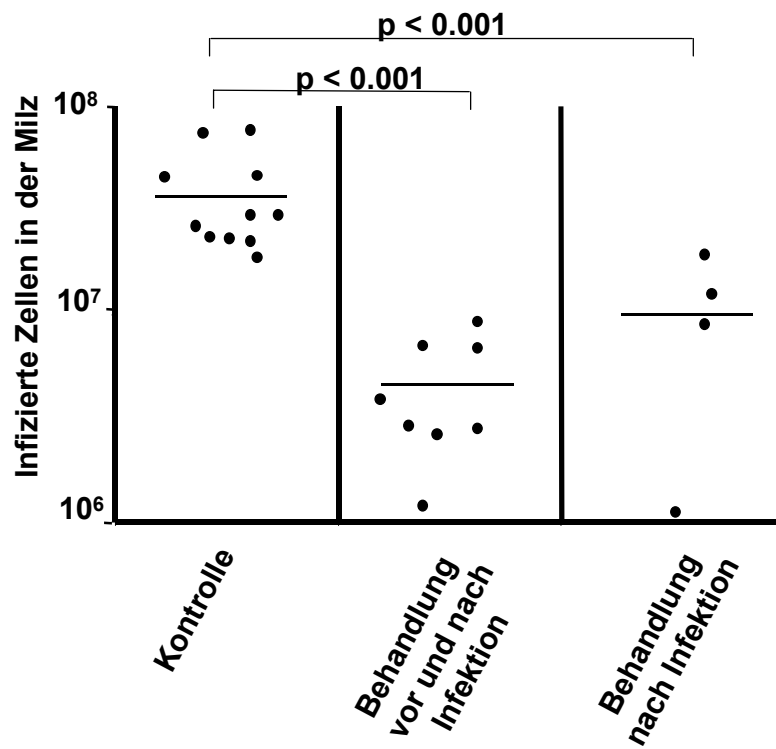
Zum Zeitpunkt 11 Tage nach Infektion wiesen infizierte, PBS-behandelte (B10.A x A.BY) $F_1$  Mäuse ein durchschnittliches Milzgewicht von 2,24g auf. Eine Behandlung mit IFN $\alpha$  1 Tag vor bis 3 Tage nach Infektion reduzierte die Splenomegalie um ca. 64%, das durchschnittliche Milzgewicht lag bei 0,82g. Mäuse, die mit IFN $\alpha$  erst am 3. und 4. Tag nach Infektion behandelt wurden, zeigten eine Reduktion des Milzgewichts um ca. 27% (Mittelwert=1,7 g) (Abb. 4.6A).

Um festzustellen, ob der Rückgang der Splenomegalie in den IFN $\alpha$  therapierten Mäusen mit der Reduzierung der Viruslast korrelierte, wurde die FV-Last im Plasma und in der Milz der behandelten Mäuse bestimmt. Es zeigte sich, dass die Anzahl an FV-infizierten Milzzellen in den Mäusen, welche mit IFN $\alpha$  vor und nach Infektion behandelt wurden, um das 10fache (Mittelwert= $4 \times 10^6$  SFFU) reduziert war. Eine Therapie nach Infektion führte hingegen zu einer 4fachen Verringerung der Viruslast in der Milz (Mittelwert= $9 \times 10^6$  SFFU) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Mittelwert= $3,9 \times 10^7$  SFFU). (Abb. 4.6B). In den infizierten, unbehandelten Mäusen wurden in der Milz somit signifikant mehr infektiöse Zellen als in den beiden IFN $\alpha$  therapierten Gruppen von Mäusen vorgefunden. Ein ähnlich signifikanter Unterschied wurde auch bei der Viruslast im Plasma gefunden (Abb. 4.6C). Infizierte, unbehandelte Mäuse wiesen im Mittel eine Plasmavirämie von  $1,4 \times 10^5$  FFU/ml auf. Eine Behandlung mit IFN $\alpha$  vor und nach Infektion reduzierte die Plasmavirämie um das 10fache (Mittelwert= $1,4 \times 10^4$  FFU/ml). Mäuse, die mit IFN $\alpha$  erst nach Infektion behandelt wurden, zeigten eine Reduktion um das 7fache (Mittelwert= $2 \times 10^4$  FFU/ml). Durch die Therapie mit Typ I IFN konnte die wichtige Rolle von IFN $\alpha$  in der FV-Immunität gezeigt werden. Um erfolgreich zu therapieren, musste jedoch zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion mit der Behandlung begonnen werden.

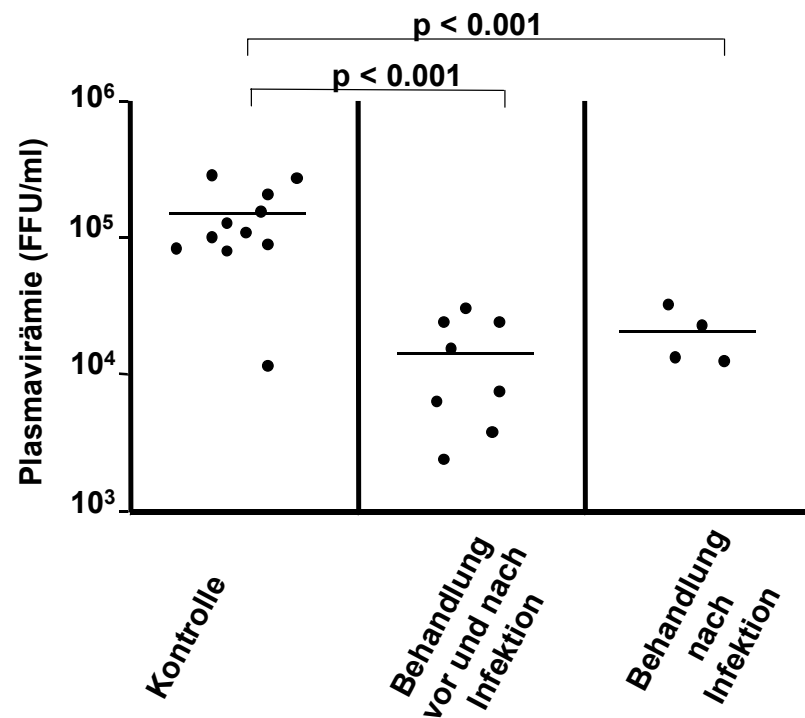
A



B



C



#### Abb. 4.6: IFN $\alpha$ Therapie in der akuten FV-Infektion

Der Versuchsablauf der IFN $\alpha$  Therapie ist in Abb. 4.5 dargestellt. Zum Zeitpunkt 11 Tage nach Infektion wurden der Krankheitsverlauf und die Viruslast analysiert. Die FV-induzierte Erkrankung wurde anhand des Milzgewichtes (A) dokumentiert und die Viruslast in der Milz (B) und im Blut (C) bestimmt.

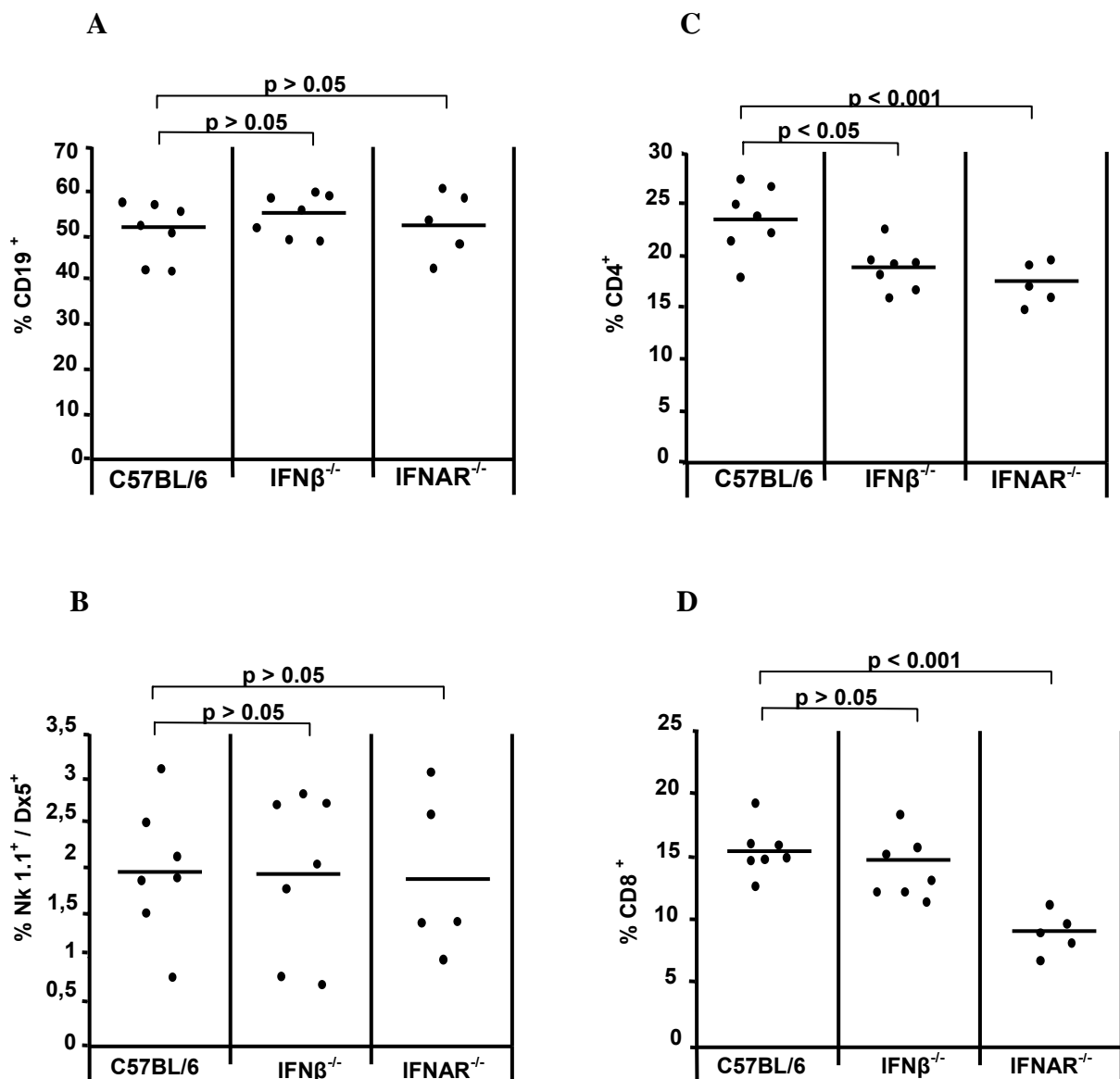
Jeder Punkt repräsentiert eine einzelne Maus. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppe an. Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den zwei IFN $\alpha$  behandelten Mausgruppen wurden mit Hilfe des Dunnett's Test analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt.

#### 4.5. Einfluss der IFN-Defizienz auf die Leukozyten in der akuten Infektion

In den vorherigen Experimenten zeigten Typ I IFN antivirale Effekte während der akuten FV-Infektion. Da für Typ I IFN zahlreiche immunregulatorische Effekte bekannt sind, stellte sich die Frage, ob der Effekt von Typ I IFN bei der FV-Infektion ausschließlich auf IFN $\alpha/\beta$ -induzierte antivirale Enzyme zurückzuführen war, oder ob IFN Typ I immunregulatorischen Einfluss auf die adaptive Immunantwort gegen FV hat. Dafür wurden CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> und NK-Zellen aus der Milz von IFN $\beta$ <sup>-/-</sup>, IFNAR<sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen durchflusszytometrisch untersucht. Keine Unterschiede in der Gesamtanzahl der Leukozyten wurden zwischen den naiven „knockout“ Mäusen und Wildtypmäusen beobachtet.

Zum Zeitpunkt 11 Tage nach der FV-Infektion wurden keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil von B-Zellen an Gesamtleukozyten zwischen den IFN $\beta$ <sup>-/-</sup>, IFNAR<sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen vorgefunden (Abb. 4.7A). Um zu untersuchen, ob in der akuten Phase der FV-Infektion die IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> bzw. IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen dennoch Unterschiede in Antikörpertitern aufwiesen, wurde ein Test auf F-MuLV-bindende Antikörper durchgeführt. Bei dem Test wurden FV-spezifische IgGesamt Antikörper im ELISA bestimmt. Zwischen den IFN $\beta$ <sup>-/-</sup>, IFNAR<sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen wurde kein Unterschied im Titer an FV-spezifischen Antikörper festgestellt (Abb. 4.8). Ebenfalls kein Unterschied zwischen den Gruppen konnte für NK-Zellen festgestellt werden (Abb. 4.7B). Dagegen wiesen die IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> (Mittelwert=18,5%) und IFNAR<sup>-/-</sup> (Mittelwert=17,4%) Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen C57BL/6 (Mittelwert=23,9%) einen statistisch signifikant geringeren Prozentsatz an CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf (Abb. 4.7C). Die Prozentzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen war in den IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen (Mittelwert=15%) ebenfalls signifikant geringer im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen (Mittelwert=9%) (Abb. 4.7D), allerdings zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei den IFN $\beta$ <sup>-/-</sup>. Zwischen den IFN $\beta$ <sup>-/-</sup>, IFNAR<sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen wurde kein signifikanter Unterschied in der Anzahl FV-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Typ I IFN einen immunmodulatorischen Einfluss auf T-Zellen in der akuten FV-Infektion ausüben.

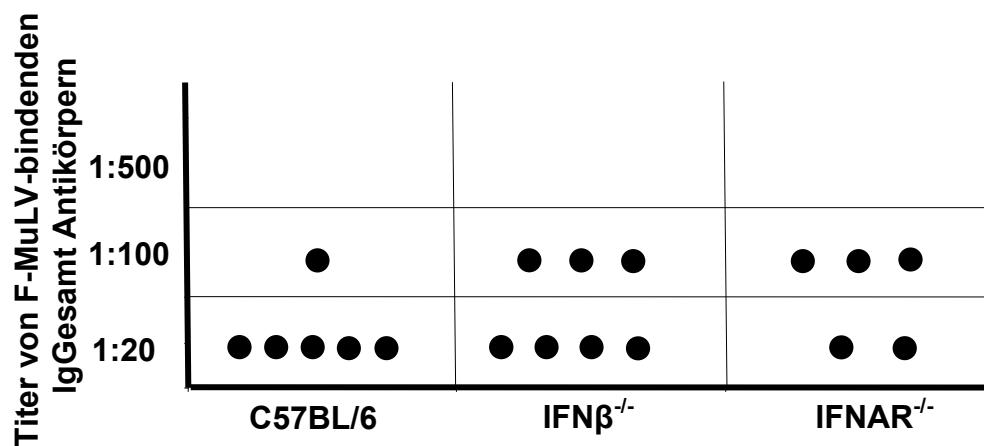


#### Abb. 4.7: B-, NK- und T-Zell Population in IFN $\beta$ - und IFNAR-defizienten Mäusen nach FV-Infektion

C57BL/6 Wildtypmäuse, IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> und IFNAR<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit FV infiziert. Zum Zeitpunkt 11 Tage nach der Infektion wurden die Milzzellen gewonnen und der prozentuale Anteil der CD19<sup>+</sup> (A), NK1.1<sup>+</sup>/DX5<sup>+</sup> (B), CD4<sup>+</sup> (C) und CD8<sup>+</sup> (D) Zellen an den Gesamtleukozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Um tote Zellen auszuschließen wurde der Farbstoff DAAD verwendet.

Jeder Punkt repräsentiert eine einzelne Maus. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppe an. Unterschiede zwischen der Gruppe der infizierten Wildtypmäuse und den beiden „knockout“ Gruppen wurden mit Hilfe des Dunnett's Test analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind in den jeweiligen Abbildungen dargestellt.

Legende: IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> = IFN $\beta$  „knockout“ Maus, IFNAR<sup>-/-</sup> = IFNAR „knockout“ Maus



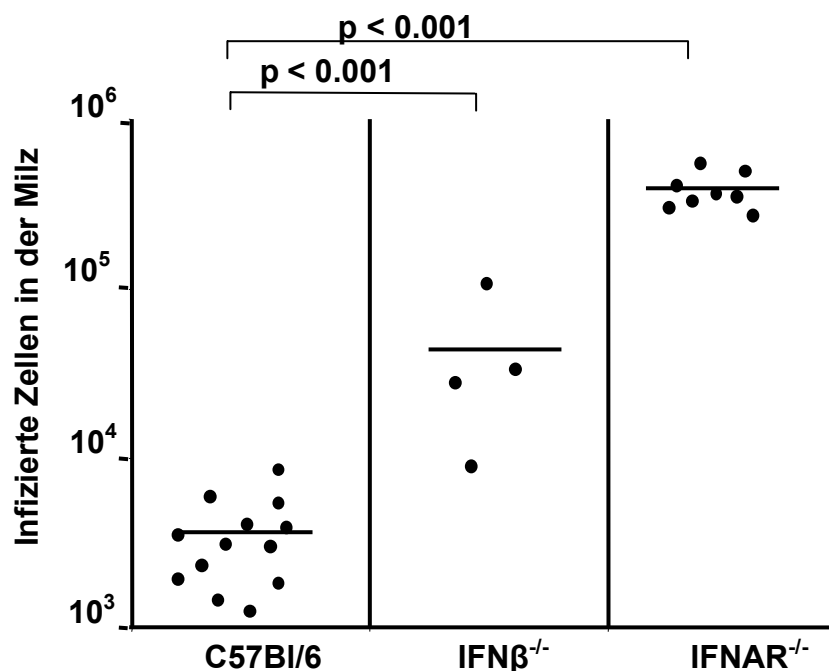
**Abb. 4.8: FV-bindende Antikörpertiter in IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> und IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen nach FV-Infektion**

C57BL/6 Wildtypmäuse, IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> und IFNAR<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit FV infiziert. Zum Zeitpunkt 11 Tage nach der Infektion wurden Plasmaproben gewonnen. Die Plasmen wurden zur Bestimmung der Titer von bindenden F-MuLV-spezifischen Antikörpern verwendet. Zur Bestimmung der Antikörpertiter wurde als Bezugswert der 3fache OD<sub>490nm</sub>-Absorptionswert von uninfizierten Tieren verwendet. Jeder Punkt stellt ein individuelles Tier dar.

Legende: IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> = IFN $\beta$  „knockout“ Maus, IFNAR<sup>-/-</sup> = IFNAR „knockout“ Maus

#### 4.6. Einfluss einer IFN-Defizienz auf die chronische FV-Infektion

Die zuvor durchgeführten Versuche zeigten einen sowohl direkten antiviralen als auch sekundären immunmodulatorischen Einfluss von Typ I IFN während der akuten FV-Infektion. Es stellte sich daher die Frage, welche Auswirkung das Fehlen von IFN auf die chronische FV-Infektion hat. C57BL/6 Mäuse, die resistent gegen eine FV-induzierte Leukämie sind, entwickeln eine chronische Infektion. 8 Wochen nach Infektion wurden bei IFN $\beta$ - und IFNAR-defizienten Mäuse die Anzahl der infizierten Zellen in der Milz bestimmt. Das Fehlen von IFN $\beta$  (Mittelwert=2,09x10<sup>4</sup>SFFU) und IFNAR (Mittelwert=3,9x10<sup>5</sup>SFFU) führte zu einer signifikant höheren Viruslast in der Milz im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen (Mittelwert=3,6x10<sup>3</sup>SFFU) (Abb. 4.9). Die Anzahl der infizierten Zellen in den Milzen lag somit bei den IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> Mäusen ca. 10fach und bei den IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen ca. 20fach höher als in den Wildtypmäusen. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss von Typ I IFN auf die akute Virämie einen direkten Einfluss auf die virale Last in der chronischen Infektion hat.



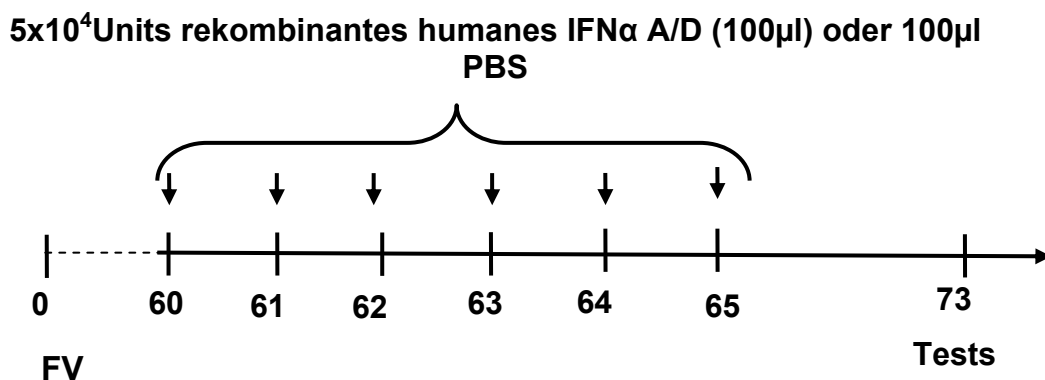
**Abb. 4.9: Persistierende FV-Infektion in IFN $\beta$ - und IFNAR- defizienten Mäusen**

C57BL/6 Wildtypmäuse, IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> und IFNAR<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit FV infiziert. Die Viruslast wurde 8 Wochen nach der Infektion in der Milz bestimmt. Die Ergebnisse der „knockout“ Mäuse wurden mit denen der Wildtypmäuse verglichen. Jeder Punkt repräsentiert eine einzelne Maus. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppe an. Unterschiede zwischen der Gruppe der infizierten Wildtypmäuse und den beiden „knockout“ Gruppen wurden mit Hilfe des Dunnett's Test analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind in der Abbildung dargestellt.

Legende: IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> = IFN $\beta$  „knockout“ Maus, IFNAR<sup>-/-</sup> = IFNAR „knockout“ Maus

#### 4.7. Therapie der chronischen FV-Infektion mit IFN $\alpha$

Im Abschnitt 4.4 wurden die Ergebnisse der erfolgreichen IFN $\alpha$  Therapie in suszeptiblen Mäusen in der akuten Phase der FV-Infektion gezeigt. Aufgrund dieser Ergebnisse und aus der Erkenntnis, dass das Fehlen von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  einen Einfluss auf den Verlauf der chronische Infektion hatte, stellte sich die Frage, ob sich IFN $\alpha$  auch als Therapeutikum in der chronischen Phase einer Retrovirusinfektion einsetzen lässt. Resistente (B10 x A.BY)F1 Mäuse wurden mit FV infiziert und in der chronischen Phase (8 Wochen nach Infektion) mit rekombinatem IFN $\alpha$  A/D therapiert. Als Kontrolle wurden Tiere nur mit PBS behandelt. Die Behandlung erfolgte durch 5 i.p. Injektionen zu den Zeitpunkten 60-65 Tage nach Infektion.

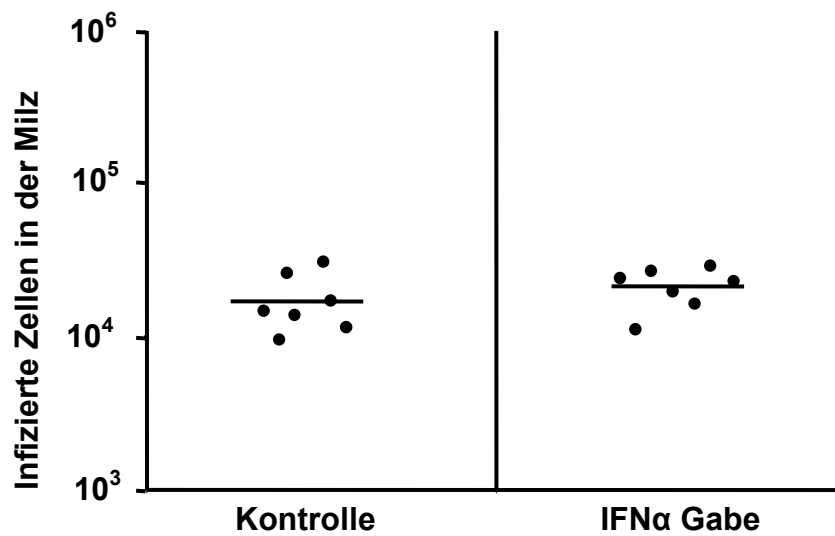


#### Abb. 4.10: Versuchsablauf der rekombinanten humanen IFN $\alpha$ A/D Gabe in der chronischen Phase der FV-Infektion

Den FV-resistenten Mäusen wurden zu den Zeitpunkten +60 bis +65 Tage nach der FV-Infektion rekombinantes humanes IFN $\alpha$  A/D bzw. als Kontrolle PBS i.p. injiziert. Am Tag 73 nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz bestimmt.

Das Ergebnis der retroviralen Therapie mit IFN $\alpha$  in der chronischen Infektion zeigte keine Reduktion der Anzahl infektiöser Zellen in der Milz im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Im Mittel lag bei den unbehandelten Mäusen die Gesamtzahl an FV-infizierten Milzzellen bei  $1,8 \times 10^4$  SFFU und in den IFN $\alpha$  therapierten Mäusen bei  $2,2 \times 10^4$  SFFU (Abb. 4.11).

Zusammenfassend war festzustellen, dass die Behandlung mit IFN $\alpha$  in der chronischen Phase zu keinem Therapieerfolg führte.



**Abb. 4.11: IFN $\alpha$  Therapie in der chronischen Phase der FV-Infektion**

Der Versuchsablauf der IFN $\alpha$  Therapie ist in Abb. 4.10 dargestellt. Zum Zeitpunkt 73 Tage nach der Infektion wurde die Viruslast analysiert. Jeder Punkt repräsentiert eine einzelne Maus. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppe an. Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der IFN $\alpha$  behandelten Mausgruppe wurden mit Hilfe des Dunnett's Test analysiert.

#### 4.8. Nachtrag

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde mit einem FV-Stock gearbeitet, der, wie sich später herausstellte, mit dem Lactatdehydrogenase-induzierenden Virus (LDV) kontaminiert war. Vermutlich wurde FV ursprünglich aus LDV-infizierten Mäusen isoliert. Dieses Virus verursacht eine lebenslange Virämie, ohne das dabei klinische Symptome auftreten. Deshalb sind zwangsläufig alle von LDV-infizierten Mäusen stammende Materialien, darunter FV-Virusstocks aus Milzhomogenat, mit diesem Virus kontaminiert. Der Nachweis von LDV ist sehr schwierig und erfolgt ausschließlich über das Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) im Plasma der Mäuse. Der LDH-Wert steigt um das 5-10fache 72h nach LDV-Infektion an (Rowson 1980) (Tab. 4.1).

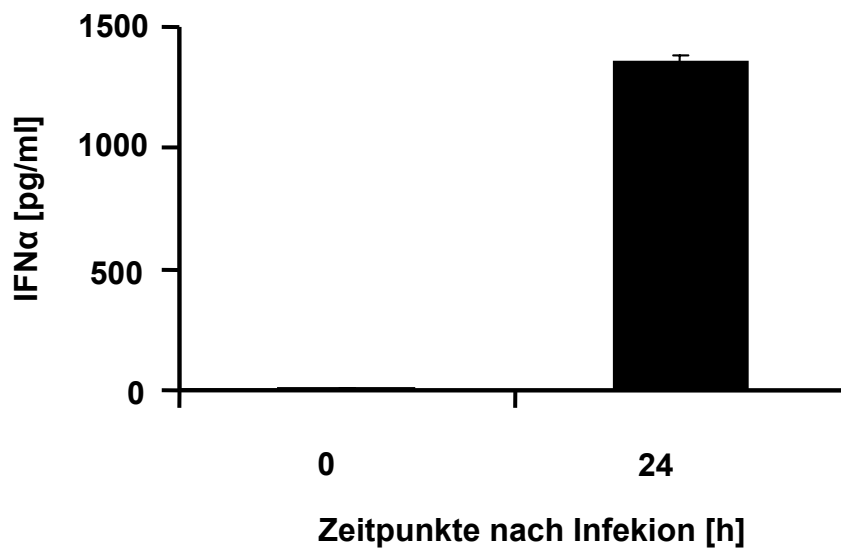
**Tab. 4.1: LDV-Nachweis in Mäusen, die mit dem kontaminierten FV-Stock infiziert wurden**

naive Mäuse	Infizierte Mäuse
392U/l	2558U/l
252U/l	2521U/l
450U/l	2241U/l
	2609U/l
	2580U/l
	2657U/l

Mit dem kontaminierten FV-Stock infizierte Mäuse wurden 4 Tage nach Infektion auf erhöhte LDH Aktivität im Plasma untersucht. In naiven Mäusen liegen LDH Plasmalevel bei 200-400 U/l (37°C). In LDV-infizierten Mäusen erhöht sich der LDH Level auf 1000-8000 U/l (du Buy und Johnson 1965).

Der gesicherte Nachweis über PCR ist noch nicht etabliert, weswegen bei Routinetests in Maushaltung nicht auf LDV getestet werden kann.

Für diese Arbeit war die Kontamination mit LDV von Bedeutung, da somit eine Koinfektion mit FV und LDV in den Mäusen vorlag. Die akute LDV Infektion führt zu einer starken IFN $\alpha$  Produktion im Serum (Abb. 4.12), so dass ein großer Teil der IFN $\alpha$  Produktion in den Mäusen auf diese Infektion zurückgeführt werden muss.



**Abb. 4.12: IFN $\alpha$  Produktion in LDV-infizierten (B10.A x A.BY) $F_1$  Mäusen**

(B10.A x A.BY) $F_1$  Mäuse wurden mit dem LDV-kontaminierten FV-Stock infiziert und das Blut 24h nach Infektion gewonnen. Die IFN $\alpha$  Konzentration wurde im Serum mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung von vier Mäusen pro Gruppe. IFN $\alpha$  ist nach Infektion mit dem LDV-freien Stock erst zu einem späteren Zeitpunkt mittels PCR organspezifisch nachweisbar.

Bei den Experimenten mit „knockout“ Mäusen und den IFN $\alpha$  Therapieexperimenten wurde dagegen die FV-spezifische Virusreplikation untersucht, wodurch die LDV-Kontamination keinen entscheidenden Einfluss auf die Aussagekraft der Versuche hatte.

Eine sichere Methode zur zuverlässigen Eliminierung von LDV aus kontaminierten Zellen erfolgt durch eine *in-vitro*-Kultivierung in embryonalen Fischer-Rattenzellen (FRE). Im Gegensatz zu LDV kann FV in dieser Zelllinie erfolgreich replizieren. Dadurch kann LDV über mehrere Passagen der Kultur ausverdünnt werden.

In dem zweiten Teil der Arbeit wurde mit diesem LDV-freien FV-Stock weitergearbeitet.

#### 4.9. Herstellung von Typ I IFN Subtypen *in vitro*

Im Abschnitt 4.1.1.-4.1.7. konnte der antivirale Effekt von Typ I IFN in der akuten FV-Infektion nachgewiesen werden. Dieser Effekt wurde sowohl durch antivirale Enzyme als auch durch immumodulatorische Effekte vermittelt. Die Gruppe der Typ I IFN weist im Menschen und in der Maus jedoch mehr als 10 verschiedene IFN $\alpha$  Subtypen auf, deren genaue Funktionen weitestgehend unbekannt sind (van Pesch et al. 2004). In früheren Experimenten wurde gezeigt, dass die verschiedenen Subtypen unterschiedliche Aktivitäten in Zytomegalievirus (MCMV) infizierten Mäusen aufwiesen (Yeow et al. 1998). Daher stellte sich die Frage, ob verschiedene IFN $\alpha$  Subtypen auch unterschiedliche antivirale Aktivität gegen Retroviren aufweisen. Die Typ I DNA Konstrukte für die Subtypen IFNA1, IFNA4, IFNA6 und IFNA9, sowie der leere Vektor („Blank“) wurden uns freundlicherweise von Frau Dr. Cassandra James überlassen. Diese Konstrukte wurden zunächst in kompetente *E. coli* transformiert, welche schließlich zur Aufarbeitung größerer Mengen DNA mittels Megapräparation kultiviert wurden. Um biologisch aktive IFN $\alpha$  Subtypen für die folgenden Versuche zu erhalten, wurde die aufgereinigte DNA in 293T Zellen transfiziert. Mittels IFN $\alpha$  ELISA wurde der Gehalt an Typ I IFN im Überstand der transfizierten Zellen 48h nach Transfektion bestimmt. Der kommerziell erhältliche IFN $\alpha$  ELISA (PBL) enthält Antikörper zur Detektierung aller vier oben genannten IFN $\alpha$  Subtypen, er detektiert ausschließlich aktives IFN $\alpha$ . 10-20pg/ml IFN $\alpha$  entsprechen ca. 1000U/ml biologisch aktives IFN (Garrison et al. 2002).

293T Zellen, die mit dem leeren Vektor („Blank“) transkribiert wurden, zeigten keine IFN $\alpha$  Produktion. Eine Typ I IFN Expression wurde hingegen für alle Subtypen nachgewiesen. Die Konzentration an produziertem IFN $\alpha$  betrug im Mittel für IFN $\alpha$ 1  $2,88 \times 10^5$ pg/ml, für IFN $\alpha$ 4  $4,14 \times 10^5$ pg/ml, für IFN $\alpha$  6  $2,33 \times 10^6$ pg/ml und für IFN $\alpha$ 9  $7,2 \times 10^5$ pg/ml (Tab. 4.2). Die Menge an produzierten IFN $\alpha$  Subtypen variierte maximal um das 2,6fache.

**Tab. 4.2: Konzentration der IFN $\alpha$  Subtypen im Überstand transfizierter 293T Zellen**

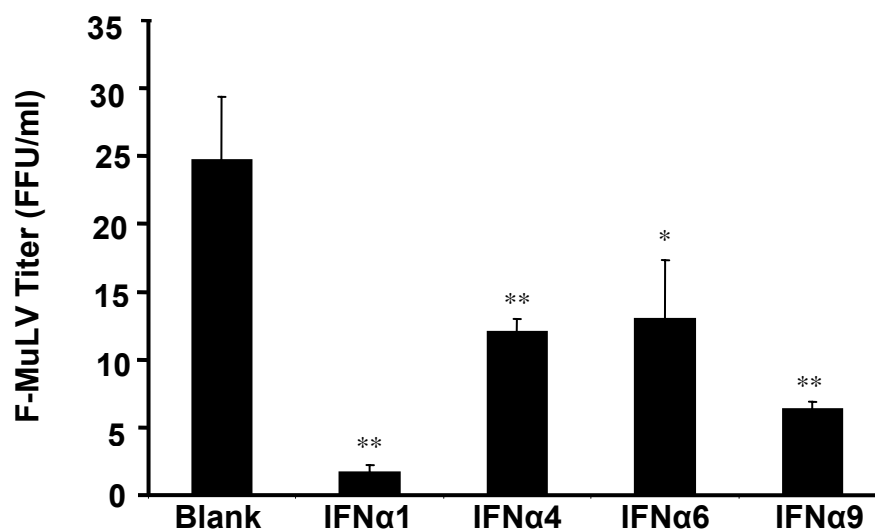
	IFN $\alpha$ 1	IFN $\alpha$ 4	IFN $\alpha$ 6	IFN $\alpha$ 9
	$2,32 \times 10^5$ pg/ml	$5,32 \times 10^5$ pg/ml	$2,9 \times 10^6$ pg/ml	$2,8 \times 10^5$ pg/ml
	$1,32 \times 10^5$ pg/ml	$1,70 \times 10^5$ pg/ml	$2,80 \times 10^6$ pg/ml	$1,38 \times 10^5$ pg/ml
	$5,00 \times 10^5$ pg/ml	$5,4 \times 10^5$ pg/ml	$1,29 \times 10^6$ pg/ml	$7,20 \times 10^5$ pg/ml
Mittelwert	$2,88 \times 10^5$ pg/ml	$4,14 \times 10^5$ pg/ml	$2,33 \times 10^6$ pg/ml	$3,79 \times 10^5$ pg/ml

#### 4.10. Antivirale Aktivität der Typ I IFN Subtypen *in vitro*

Die IFN $\alpha$  Subtypen IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4, IFN $\alpha$ 6 und IFN $\alpha$ 9 wurden zunächst in Bezug auf ihre antiviralen Eigenschaften bei der retroviralen F-MuLV Infektion von *Mus dunni* Zellen *in vitro* charakterisiert. Als Kontrolle erhielten *Mus dunni* Zellen Zellüberstand von 293T Zellen, die mit dem leeren Vektor („Blank“) transfiziert wurden. Da die F-MuLV infizierten Zellen das Virusantigen auf der Oberfläche tragen, können mit dem IC-Test die Anzahl der infizierten Zellen pro well bestimmt werden.

Die Replikation von F-MuLV wurde von allen getesteten IFN $\alpha$  Subtypen signifikant inhibiert, dennoch wiesen sie unterschiedliche antivirale Aktivitäten auf (Abb. 4.13). IFN $\alpha$ 1 war der effektivste Subtyp und führte zu einer ca. 11fachen Verringerung der F-MuLV Replikation. Eine Behandlung der *Mus dunni* Zellen mit IFN $\alpha$ 4 reduzierte die Replikation um das 2fache, IFN $\alpha$ 9 zeigte eine 4fache Reduktion des F-MuLV Titers. IFN $\alpha$ 6 wies die geringste antivirale Aktivität auf, der virale Titer wurde nur um das 1,8fache reduziert.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich die verschiedenen antiviralen Aktivitäten der IFN $\alpha$  Subtypen gegen F-MuLV *in vitro*.



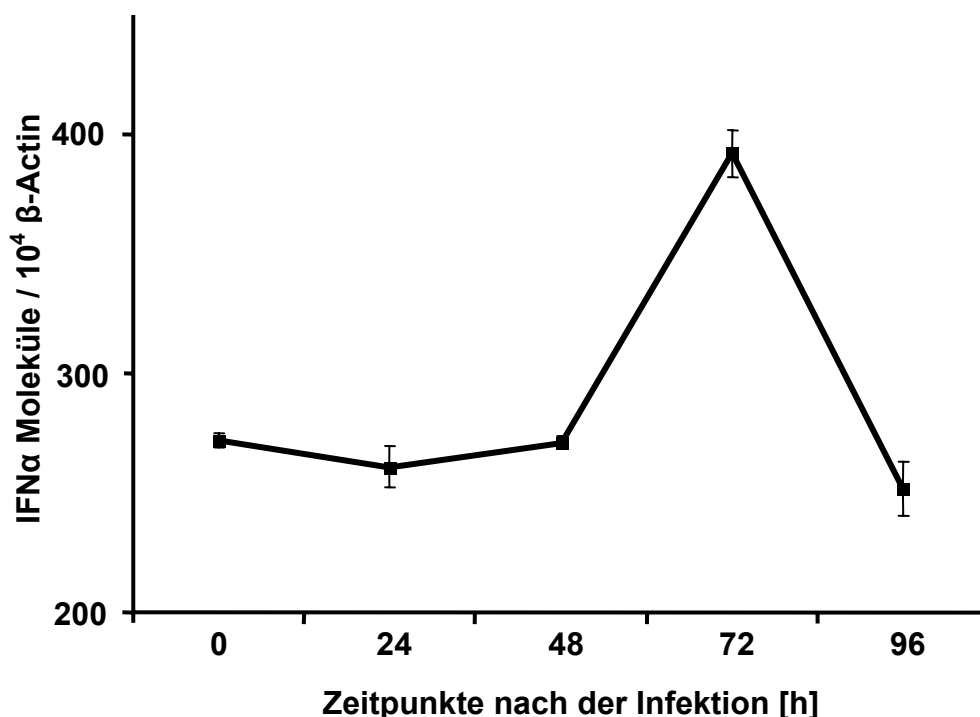
**Abb. 4.13: Antivirale Effekte der IFN $\alpha$  Subtypen *in vitro***

*Mus dunni* Zellen wurden *in vitro* 24h mit 500pg der IFN $\alpha$  Subtypen IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4, IFN $\alpha$ 6 und IFN $\alpha$ 9 vorbehandelt. Die Inhibition der viralen Replikation wurde 4 Tage nach der Infektion der Zellen mit 25FFU F-MuLV bestimmt. Die Inhibition jedes IFN $\alpha$  Subtyps und der „Blank“ wurden als Doppelbestimmung gemessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung von zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Unterschiede zwischen dem „Blank“ und den IFN $\alpha$  Subtypen wurden mit Hilfe des Dunnett's Test analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt als \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ .

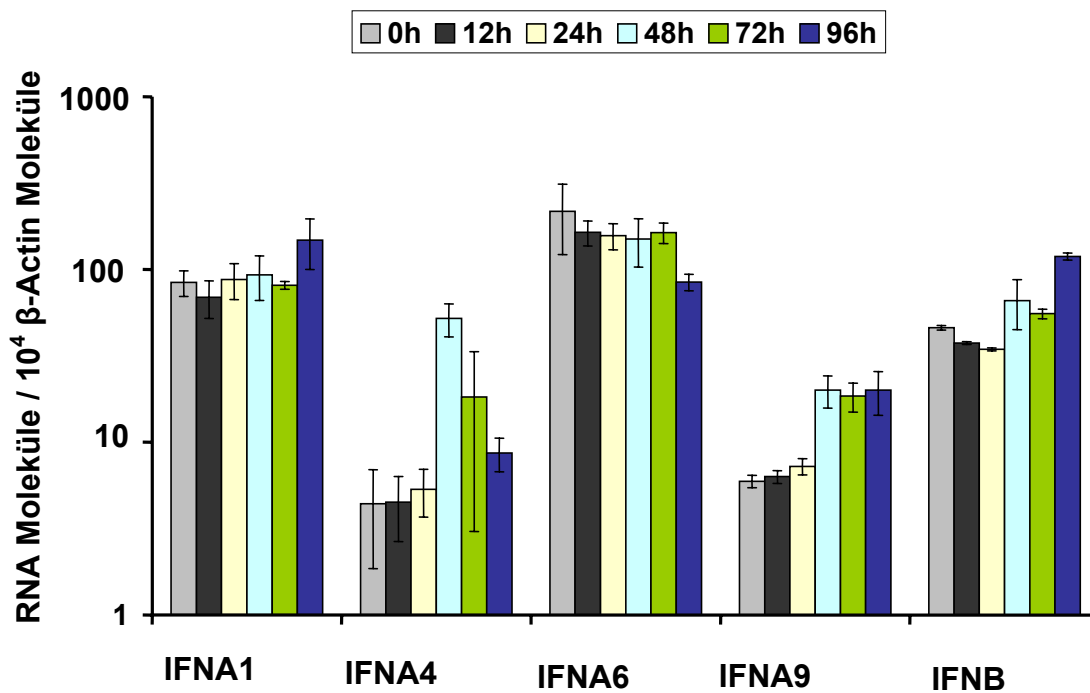
#### 4.11. Kinetik der Typ I Expression nach FV-Infektion

Nachdem *in vitro* der antivirale Effekt der IFN $\alpha$  Subtypen gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob diese IFN $\alpha$  Subtypen auch nach FV-Infektion in der Maus exprimiert werden. Zunächst wurde der mRNA Level von Gesamt-IFNA und anschließend für die Subtypen IFNA1, IFNA4, IFNA6 und IFNA9, sowie IFNB nach FV-Infektion in suszeptiblen (B10.A x A.BY)F1 Mäusen bestimmt. Es wurden Milzen aus uninfizierten und infizierten Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach FV-Infektion separiert und die mRNA aus dem Milzzellhomogenat isoliert. Die Menge der Gesamt-IFNA und der Subtypen IFNA1, IFNA4, IFNA6 IFNA9 und IFNB mRNA in der Milz wurde mit der Real-time PCR relativ zum „housekeeping gene“  $\beta$ -Actin bestimmt. FV-susceptible (B10.A x A.BY)F1 Mäuse zeigten 72h nach der FV-Infektion eine maximale Expression an Gesamt-IFNA (Abb. 4.14A). Maximale mRNA Level der Typ I IFN Subtypen wurden hingegen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion erreicht. Der mRNA-Level von IFNA4 erreichte 24h, von IFNA9 48h und von IFNB 96h nach Infektion sein Maximum. Die Gene für IFNA4 wurden nach Infektion 10fach, für IFNA9 4fach und für IFNB 3fach stärker transkribiert als in nicht-infizierten Tieren. Konstitutiv gebildete mRNA wurde von IFNA1 und IFNA6 detektiert, eine FV-Infektion verstärkte die Expression dieser Gene jedoch nicht (Abb. 4.14B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die FV-Infektion nicht zur Expression aller untersuchten Typ I IFN Gene führte.

A



B

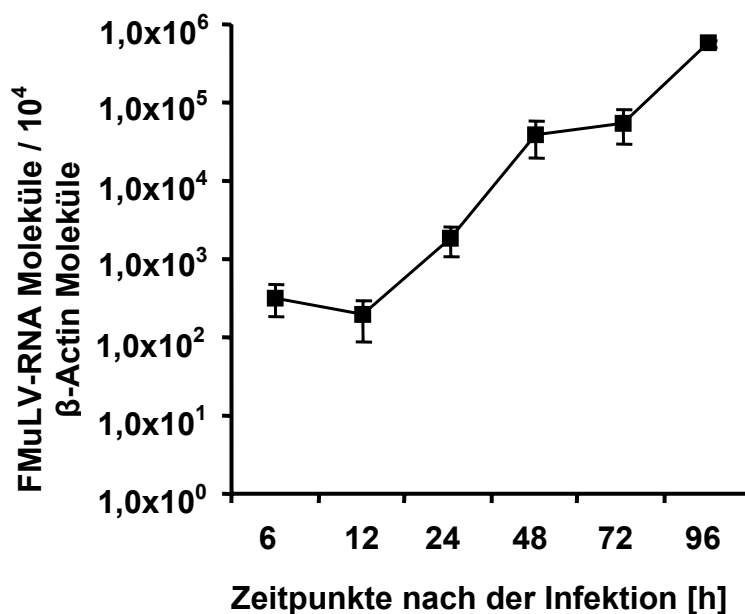


#### Abb. 4.14: Quantifizierung von mRNA für Gesamt-IFN und IFN Subtypen

(B10.A x A.BY)F1 Mäuse wurden mit 50000SFFU FV infiziert und die Milzzellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion gewonnen. Die RNA wurde in der Real-time PCR mit Primern für Gesamt-IFN (A) und für die Subtypen IFNA1, IFNA4, IFNA6, IFNA9 und IFNB amplifiziert. Die Quantität der Moleküle wurde relativ zum „housekeeping gene“  $\beta$ -Actin berechnet. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung von drei Tieren pro Zeitpunkt.

#### 4.12. Kinetik der FV-Replikation

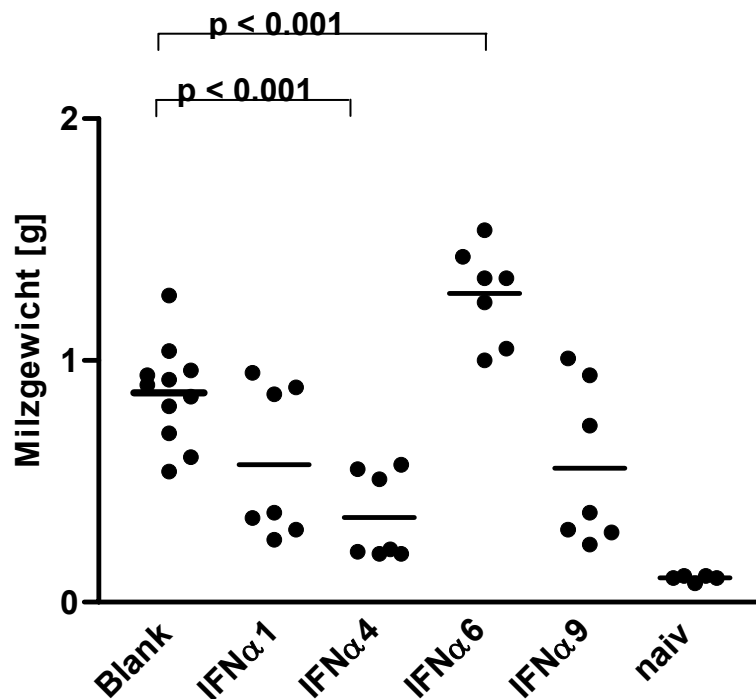
Um aufzuklären, ob die IFN $\alpha$  Subtypen Expression mit der FV-Replikation korreliert, wurde der Level an FV-RNA bestimmt. Es wurden Milzen aus uninfizierten und infizierten Tieren zu den angegebenen Zeitpunkten nach FV-Infektion separiert und die RNA aus dem Milzzellhomogenat isoliert. Die Menge der FV-RNA wurde mit der Real-time PCR relativ zum „housekeeping gene“  $\beta$ -Actin bestimmt. 6h nach FV-Infektion konnten 300 Kopien FV-RNA pro  $10^4$   $\beta$ -Actin Molekülen nachgewiesen werden (Abb. 4.15). Nach 12h konnte in der Milz der Mäuse eine exponentielle Replikation von FV nachgewiesen werden. Die Replikation ließ sich im Zeitintervall von 12h bis 48h nach Infektion mit der Funktionsgleichung  $f(x)=41e^{0,14x}$  beschreiben bei einem Bestimmtheitsmaß der Regression  $r^2$  von 0,99. Diese Ergebnisse zeigen, dass FV im Zeitintervall 12h bis 96h nach Infektion in der Milz stark repliziert.



**Abb. 4.15: Quantifizierung von FV-mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion**

Suszeptible (B10.A x A.BY)F1 Mäuse wurden mit 50000SFFU FV infiziert und die Milzzellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion gewonnen. Die RNA wurde in der Real-time PCR mit Primern für FV amplifiziert und die Quantität der Moleküle relativ zum „housekeeping gene“  $\beta$ -Actin berechnet. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung von drei Tieren pro Zeitpunkt.

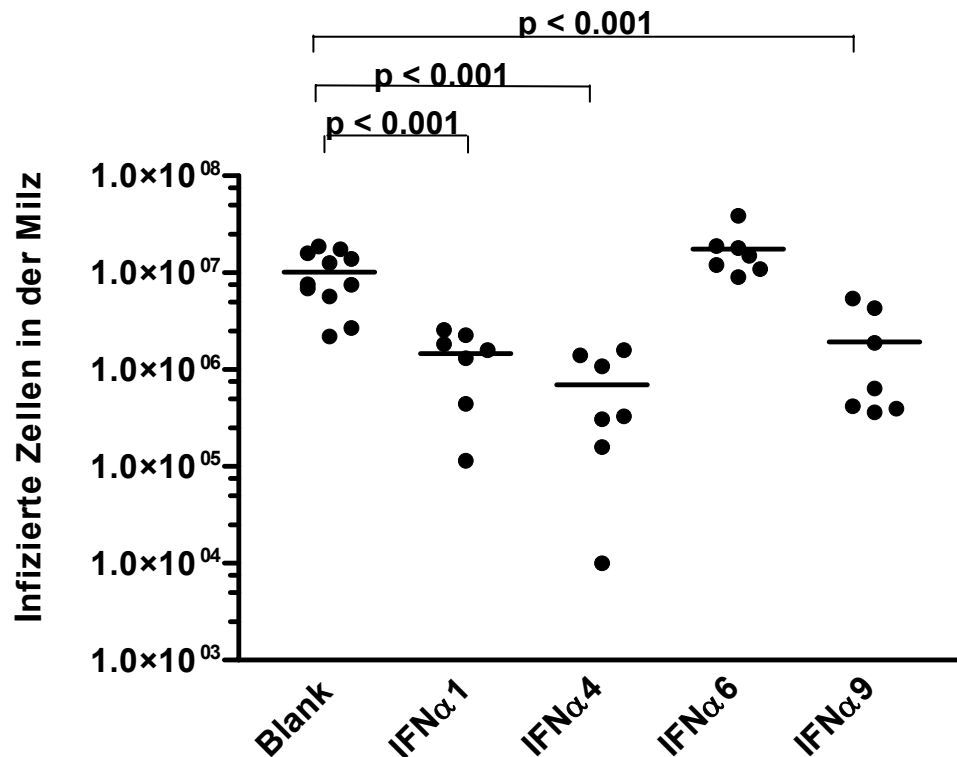




#### Abb. 4.17: Milzgewicht von FV-infizierten Mäusen nach IFN $\alpha$ Subtypen Therapie

Der Versuchsablauf der IFN $\alpha$  Therapie ist in Abb. 4.16 dargestellt. FV-susceptible Mäuse wurden mit FV infiziert und zum Zeitpunkt 10 Tage nach Infektion wurde die FV-induzierte Erkrankung anhand des Milzgewichts dokumentiert. Jeder Punkt repräsentiert eine einzelne Maus. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppe an. Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den vier IFN $\alpha$  Subtypen behandelten Mausgruppen wurden mit Hilfe des Dunnett's Test analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt.

Um festzustellen, ob die Splenomegalie in den IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4, IFN $\alpha$ 6 und IFN $\alpha$ 9 therapierten Mäusen mit der Viruslast korrelierte, wurde die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz und im Blut, sowie infizierter Ter119<sup>+</sup> Erythroblastenzellen in der Milz bestimmt. Infizierte Kontrolltiere („Blank“) wiesen im Mittel  $3,9 \times 10^7$  FV-infizierte Zellen in den Milzen auf. Eine Therapie mit IFN $\alpha$ 4 führte zu einer 50fachen Verringerung der Viruslast in der Milz (Mittelwert=  $7,0 \times 10^5$  SFFU). Mäuse, die mit IFN $\alpha$ 1 behandelt wurden, zeigten eine 7fache (Mittelwert= $1,45 \times 10^6$  SFFU) und nach IFN $\alpha$ 9 Behandlung eine 5fache (Mittelwert= $1,93 \times 10^6$  SFFU) Reduktion der Viruslast in der Milz. Eine Therapie mit IFN $\alpha$ 6 induzierte keine Veränderung der Viruslast in der Milz (Abb. 4.18).



**Abb. 4.18: Infizierte Zellen pro Milz von FV-infizierten Mäusen nach IFN $\alpha$  Subtypen Therapie**

Der Versuchsablauf der IFN $\alpha$  Therapie ist in Abb. 4.16 dargestellt. FV-suszeptible Mäuse wurden mit FV infiziert und zum Zeitpunkt 10 Tage nach der Infektion wurde die Anzahl der infizierten Zellen in der Milz mittels IC-Assay bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert eine einzelne Maus. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppe an. Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den vier IFN $\alpha$  Subtypen behandelten Mausgruppen wurden mit Hilfe des Dunnett's Test analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt.

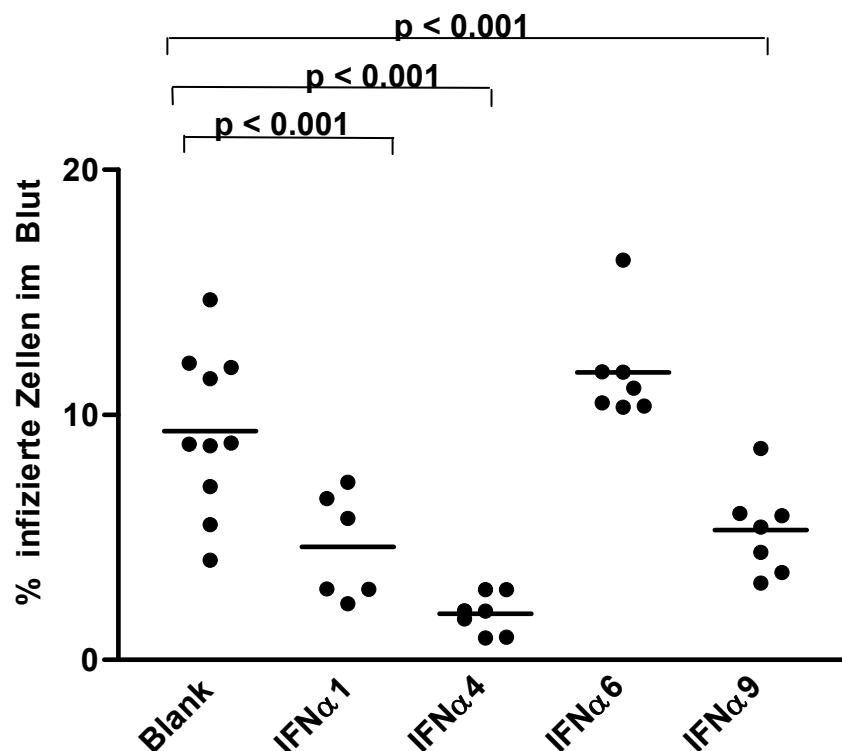
Ähnlich wie die Viruslast in der Milz exprimierten bei den IFN $\alpha$ 1 (Mittelwert=4,6%), IFN $\alpha$ 4 (Mittelwert=1,89%) und IFN $\alpha$ 9 (Mittelwert=5,29%) therapierten Mäuse signifikant mehr Zellen im Blut virale Antigene als bei den infizierten Kontrollmäusen (Mittelwert 9,3%). Dagegen wiesen IFN $\alpha$ 6 (Mittelwert=11,2%) therapierte Mäuse zwar eine leicht erhöhte Viruslast im Blut auf, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 4.19A). Unterschiede in der Viruslast zwischen den therapierten Gruppen sind in repräsentativen durchflusszytometrischen Bildern gezeigt (Abb. 4.19B).

Als weiterer Parameter des FV-induzierten Krankheitsverlaufs wurde die Anzahl Ter119<sup>+</sup> Erythroblastenzellen, den Hauptzielzellen des FV (Hasenkrug et al. 1998), die das glykolisierte FV Gag-Protein an der Oberfläche exprimierten, bestimmt. Zwischen den IFN $\alpha$ 1 (Mittelwert=7,0%), IFN $\alpha$ 6 (Mittelwert=11,7%) und IFN $\alpha$ 9 (Mittelwert=6,67%) therapierten Tieren wurde kein statistisch signifikanter Unterschied an infizierten Ter119<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert=10,6%) festgestellt, jedoch lag im Mittel die Anzahl infizierter Ter119<sup>+</sup> Zellen in IFN $\alpha$ 1 und IFN $\alpha$ 9 therapierten Mäusen niedriger.

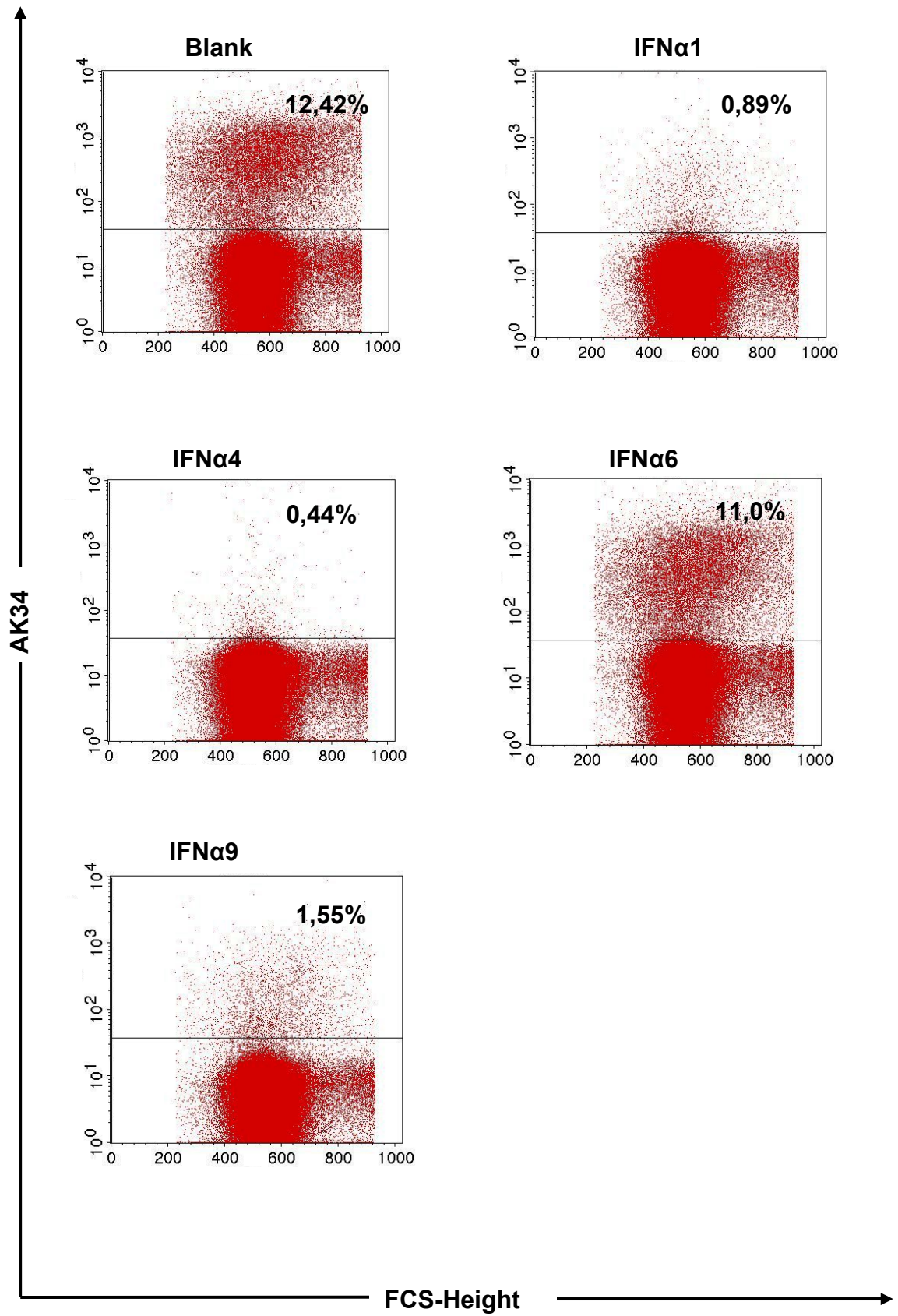
Lediglich IFN $\alpha$ 4 therapierte Mäuse (Mittelwert=3,3%) zeigten eine signifikante Reduktion an Ter119<sup>+</sup> Zellen, die virales Antigen exprimierten (Abb. 4.19C).

Die Therapie von Mäusen mit Typ I IFN Subtypen zeigte also deutlich die unterschiedlichen antiviralen Aktivitäten von IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4, IFN $\alpha$ 6 und IFN $\alpha$ 9 gegen FV. Am erfolgreichsten konnte mit IFN $\alpha$ 4 therapiert werden. IFN $\alpha$ 6 hingegen zeigte keine antivirale Aktivität gegen FV *in vivo*.

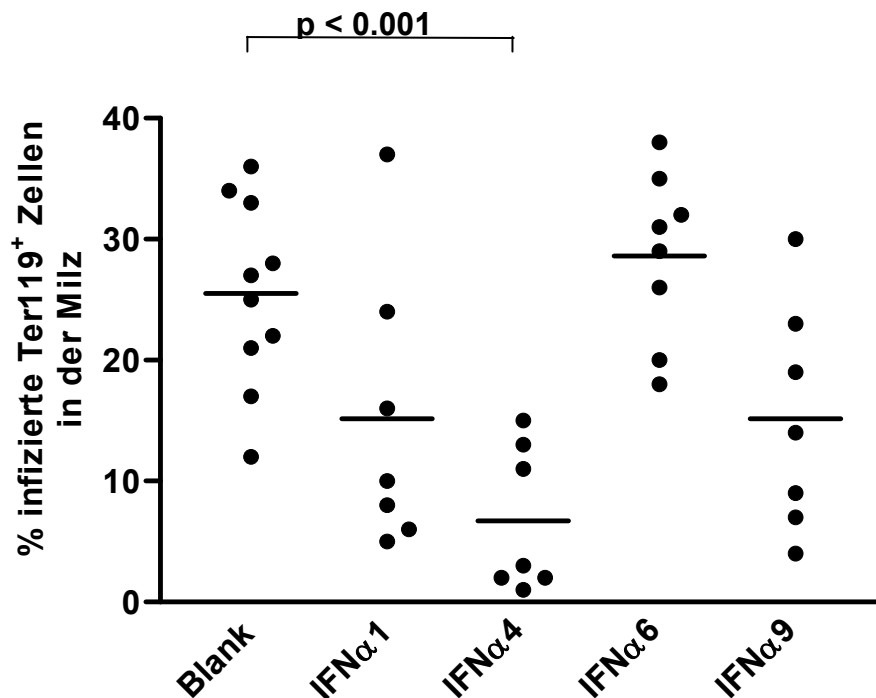
A



B



C



#### Abb. 4.19: Infizierte Zellen im Blut und infizierte Erythroblastenzellen in der Milz von FV-infizierten Mäusen nach IFN $\alpha$ Subtypen Therapie

Der Versuchsablauf der IFN $\alpha$  Therapie ist in Abb. 4.16 dargestellt. FV-suszeptible Mäuse wurden mit FV infiziert und zum Zeitpunkt 10 Tage nach der Infektion wurde die Viruslast analysiert. Die Prozentzahl der infizierten Zellen im Blut wurde durchflusszytometrisch bestimmt (A). Repräsentative durchflusszytometrische Bilder von infizierten Zellen im Blut, die das glykosylierte FV Gag-Protein an der Oberfläche exprimieren, sind in Abb. B gezeigt. Die Prozentzahl in der oberen Hälfte gibt die Prozentzahl infizierter Zellen im Blut an.

Die Prozentzahl lebender kernhaltiger Ter119<sup>+</sup> Zellen in der Milz wurden ebenfalls mittels Durchflusszytometer bestimmt (C).

Jeder Punkt repräsentiert eine einzelne Maus. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppe an. Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den vier IFN $\alpha$  Subtypen behandelten Mausgruppen wurden mit Hilfe des Dunnett's Test analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt.

#### 4.14. Immunmodulatorischer Einfluss der IFN $\alpha$ Subtypen

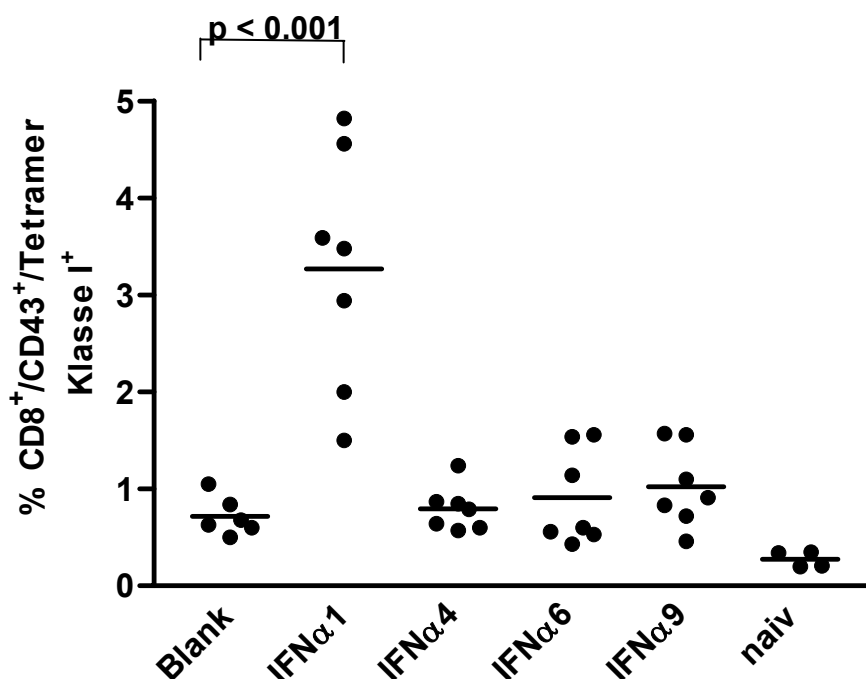
In den vorherigen Experimenten zeigten die verschiedenen IFN $\alpha$  Subtypen signifikante Unterschiede in ihrer antiviralen Aktivität während der akuten FV-Infektion. Da für Typ I IFN Subtypen unterschiedliche immunregulatorische Effekte bekannt sind, stellte sich die Frage, ob die verschiedenen antiviralen Effekte ausschließlich auf induzierte antivirale Enzyme zurückzuführen waren oder ob die IFN $\alpha$  Subtypen auch regulatorischen Einfluss auf die adaptive Immunantwort gegen FV hatten.

Dafür wurde ein direkter Nachweis FV-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels Tetramer Klasse I Technik und FV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels Tetramer Klasse II Technik durchgeführt. Des Weiteren wurde die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen aus der Milz von therapierten Mäusen und Kontrollmäusen durchflusszytometrisch untersucht.

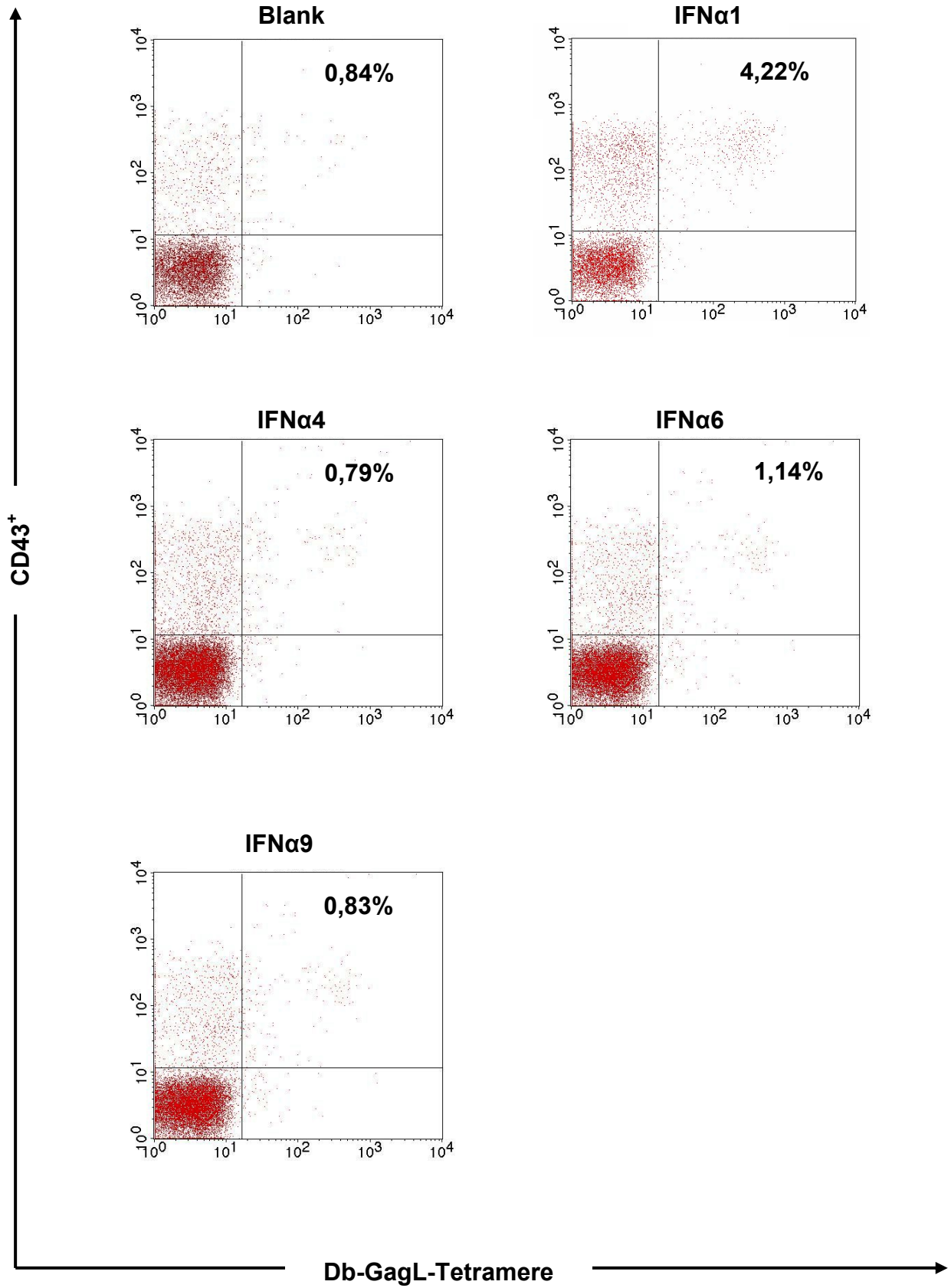
Zunächst wurde der Einfluss der IFN $\alpha$  Subtypen auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort untersucht. Zum Zeitpunkt 10 Tage nach Infektion wurden in IFN $\alpha$ 1 therapierten Mäusen (Mittelwert=3,3%) signifikant mehr aktivierte (CD43<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche Tetramer Klasse I positiv waren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert=0,7%), gemessen. Wie bei der Kontrollgruppe konnten bei den drei weiteren mit IFN $\alpha$  Subtypen behandelten Gruppen (IFN $\alpha$ 4, IFN $\alpha$ 6 und IFN $\alpha$ 9) nie mehr als 1,5% FV-spezifische aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen gemessen werden (Abb. 4.20A). Unterschiede in der Prozentzahl FV-spezifischer aktivierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen den therapierten Gruppen sind in repräsentativen durchflusszytometrischen Bildern gezeigt (Abb. 4.20B). Die Therapie führte hier also nicht zu einer Verstärkung der CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort. Aktivierte T-Zellen, die zytotoxische Funktionen ausüben, weisen in ihren Granula gelagerte Effektormoleküle wie Granzym A und B auf (Ebnet et al. 1991, Garcia-Sanz et al. 1990). Um die Anwesenheit von Granzym A und B in CD8<sup>+</sup> T-Zellen von FV-infizierten Mäusen intrazellulär nachzuweisen, wurden diese durchflusszytometrisch bestimmt. Zwischen den Gruppen konnten kein Unterschied im prozentualen Anteil der aktivierten (CD43<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die Granzym A und B produzierten, festgestellt werden. Im Mittel konnten Unterschiede in den IFN $\alpha$ 1 (Mittelwert=8,03%) und IFN $\alpha$ 4 (Mittelwert=10,1%) behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert=6,3%) für CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die den frühen Aktivierungsmarker CD69 exprimierten, festgestellt werden (Abb. 4.20C). Dieser war jedoch nicht statistisch signifikant. Als nächstes wurde untersucht, ob die IFN $\alpha$

Subtypen  $CD4^+$  T-Zellen induzierten. Im Mittel war die Prozentzahl der  $CD4^+$  T-Zellen, die Tetramer Klasse II positiv waren, der  $IFN\alpha 1$  (Mittelwert=0,94%),  $IFN\alpha 4$  (Mittelwert=1,02%) und  $IFN\alpha 9$  (Mittelwert=1,08%) behandelten Mäuse geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert=1,46%). Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 4.20D).

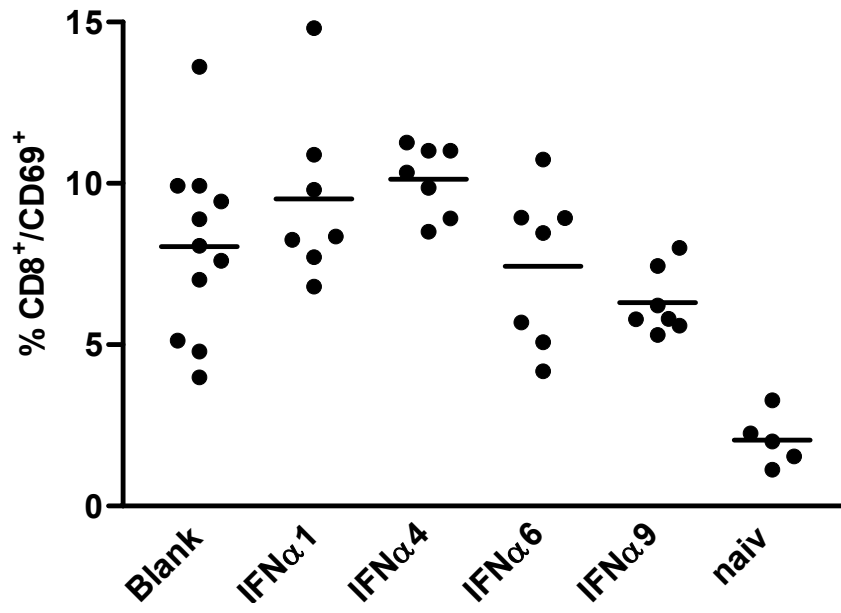
Des Weiteren wurde untersucht, ob die Behandlung mit  $IFN\alpha$  Subtypen zu einer Aktivierung von NK-Zellen führte.  $IFN\alpha 1$  (Mittelwert=1,85%),  $IFN\alpha 4$  (Mittelwert=2,39%) und  $IFN\alpha 9$  (Mittelwert=1,06%) behandelte Mäuse wiesen im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Mittelwert=0,26%) einen statistisch signifikant höheren prozentualen Anteil der  $NK1.1^+/CD69^+$  Zellen an den Gesamtleukozyten auf. Kein Unterschied konnte zwischen den  $IFN\alpha 6$  behandelten Mäusen für aktivierte NK-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. (Abb. 4.20E). Diese Ergebnisse zeigen, dass der  $IFN\alpha 1$  Subtyp FV-spezifische  $CD8^+$  T-Zellen verstärkt induziert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Subtypen  $IFN\alpha 1$ ,  $IFN\alpha 4$  und  $IFN\alpha 9$  zu einer Zunahme aktivierter NK-Zellen in der Milz führten.

**A**

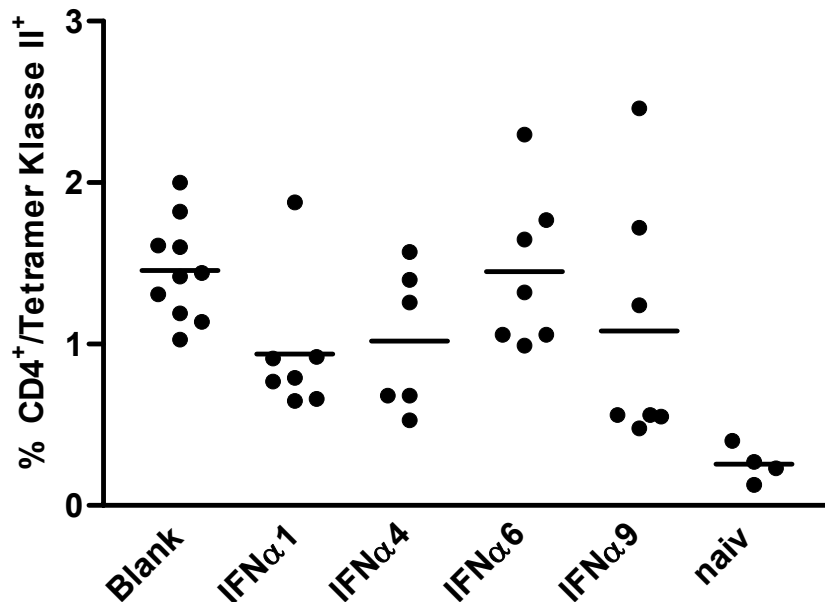
B



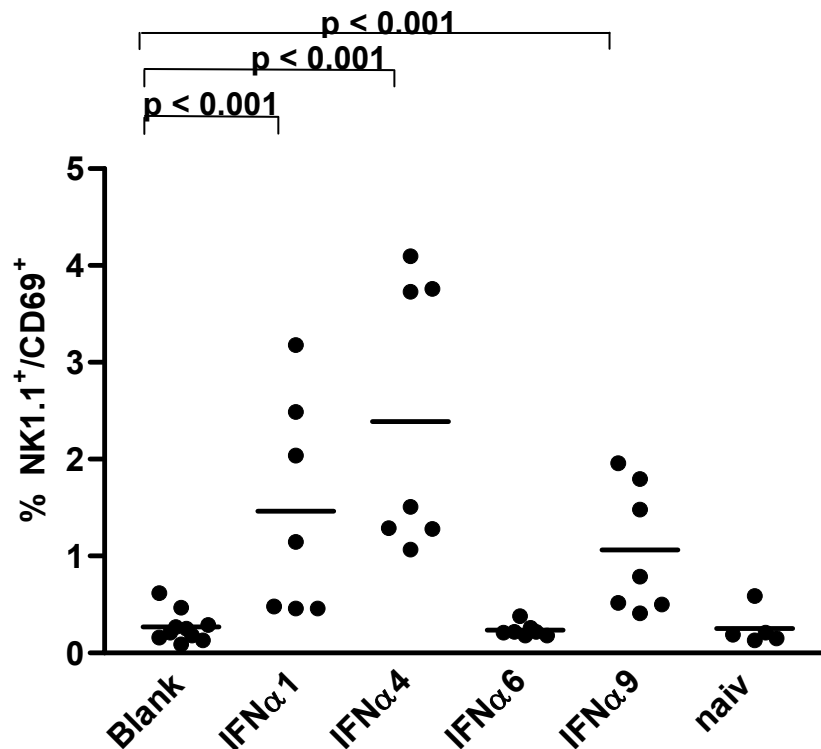
C



D



E



**Abb. 4.20: CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>- und NK<sup>+</sup>-Zell Analyse in IFN $\alpha$  Subtypen behandelten Mäusen während der akuten FV-Infektion**

Der Versuchsablauf der IFN $\alpha$  Therapie ist in Abb. 4.16 dargestellt. FV-suszeptible Mäuse wurden mit FV infiziert und zum Zeitpunkt 10 Tage nach der Infektion wurden die Milzzellen gewonnen. In Abb. A wurde der prozentuale Anteil an CD43<sup>+</sup> und Tetramer Klasse I<sup>+</sup> der CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Repräsentative durchflusszytometrische Bilder sind von FV-spezifischen aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt. Lebende, kernhaltige Milzzellen wurden mit anti-CD8 Antikörper, anti-CD43 Antikörpern und D<sup>b</sup>-GagL Tetrameren 10 Tagen nach Infektion gefärbt und „gegatete“ CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden analysiert. Die Prozentzahl im oberen rechten Quadranten der einzelnen Bilder gibt die Prozentzahl der CD43<sup>+</sup>/Tetramer Klasse I<sup>+</sup> Zellen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen an (B). Der prozentuale Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die den Aktivierungsmarker CD69<sup>+</sup> exprimieren (C) und der prozentuale Anteil an Tetramer Klasse II<sup>+</sup> der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt (D). Außerdem wurde der prozentuale Anteil der NK1.1<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> Zellen an den Gesamtleukozyten durchflusszytometrisch bestimmt (E). Um tote Zellen auszuschließen wurde der Farbstoff DAAD verwendet.

Jeder Punkt repräsentiert eine einzelne Maus. Die Querstriche geben jeweils die Mittelwerte der Gruppe an. Unterschiede zwischen der Gruppe der infizierten Kontrollmäuse und den IFN $\alpha$  Subtypen behandelten Gruppen wurden mit Hilfe des Dunnett's Test analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind in den jeweiligen Abbildungen dargestellt.

#### 4.15. Einfluss der IFN $\alpha$ Subtypen auf die TLR, RIG-I, PKR und OAS1a

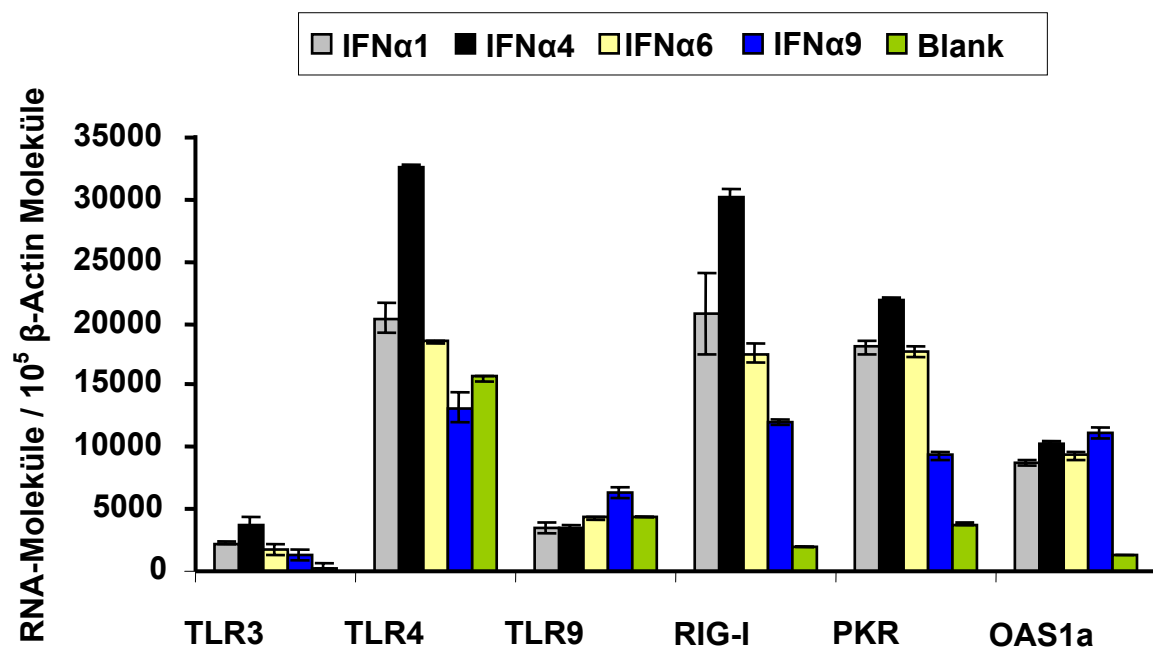
##### Expression in DCs

Dendritische Zellen sind die wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen (APC), sie spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Verarbeitung viraler Antigene sowie der Initiation der adaptiven Immunantwort. Die Erkennung viraler RNA/DNA und viraler Oberflächenproteine erfolgt nach einer Infektion u.a. durch TLR3, 4, 9 und RIG-I, die von myeloiden DCs (mDC) exprimiert werden. In Untersuchungen wurde gezeigt, dass die beiden murinen Leukämieviren Moloney-Mausleukämievirus (Mo-MLV) und Mammatumor-Virus (MMTV) von TLR3 und TLR4 erkannt werden (Rassa et al. 2002, Abujamra et al. 2006). FV enthält zudem CpG Sequenzen, die von TLR9, und mRNA im Cytoplasma, die von RIG-I erkannt werden könnten. Diese vier Rezeptoren könnten somit eine mögliche Rolle bei der FV-Infektion spielen. In früheren Experimenten wurde schon beschrieben, dass IFN $\alpha$  direkt in der Lage ist die Expression von TLRs und RIG-I zu regulieren. Um den Einfluss von IFN $\alpha$  Subtypen auf die mRNA-Expression der TLRs und RIG-I zu untersuchen, wurden DCs aus dem Knochenmark uninifizierter Tiere *in vitro* generiert. Die Behandlung der mDCs mit verschiedenen Subtypen führte zu einer Hochregulierung der TLR3 und RIG-I Transkripte, IFN $\alpha$ 4 war dabei am effektivsten und erhöhte die TLR3 Expression um das 12fache und die RIG-I Expression um das 15fache im Vergleich zur Kontrolle. Der TLR4 wurde nach IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4 und IFN $\alpha$ 6 Gabe, jedoch nicht durch IFN $\alpha$ 9 stärker exprimiert. Dagegen führte eine Behandlung der mDCs mit IFN $\alpha$ 9 ausschließlich zu einer erhöhten TLR9 Expression (1,5fach) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.21).

Da FV auch in mDCs repliziert, wurde neben den Rezeptoren zur Erkennung viraler Nukleinsäuren ebenfalls der Einfluss der Subtypen auf die Expression von zwei antiviralen Enzymen, PKR und OAS1a untersucht. Die Behandlung der DCs mit den Subtypen IFN $\alpha$ 1 und IFN $\alpha$ 6 führte zu einer 4,8fachen, IFN $\alpha$ 4 zu einer 6fachen und IFN $\alpha$ 9 zu einer 2,5fachen Hochregulation der PKR Transkripte. Die OAS1a wurde nach Behandlung der vier Subtypen ca. 7fach höher exprimiert.

Zusammenfassend war festzustellen, dass die IFN $\alpha$  Subtypen die Expression von TLRs und RIG-I in mDC unterschiedlich effizient verstärkten. Da die erhöhte Expression zu einer verstärkten proinflammatorischen Antwort führt, werden Immunzellen besser rekrutiert. Darüberhinaus führt jede Stimulierung der TLR zu einer Aktivierung der Zelle. In aktivierten Zellen wird die Transkription von viralen

LTR und dadurch die Expression viraler Proteine induziert, somit können virale Peptide Virus-spezifischen T-Zellen effektiver präsentiert werden (Bafica et al. 2004, Equils et al. 2001/2003). Die verstärkte Expression von TLR3 und TLR4 nach IFN $\alpha$ 1 und IFN $\alpha$ 4 Gabe korrelieren dabei gut mit der verstärkten Induktion von NK-Zellen und FV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach IFN $\alpha$ 1 Therapie bzw. der verstärkten NK-Zell Aktivierung nach IFN $\alpha$ 4 Therapie.



**Abb. 4.21: Expression von TLR3, TLR4, TLR9, RIG-I, PKR und OAS1a durch IFN $\alpha$  Subtypen**

Dendritische Zellen wurden aus dem Knochenmark mit IL-4 und GM-CSF kultiviert. Nach einer Woche wurden  $5 \times 10^5$  Zellen mit  $2 \times 10^4$  pg IFN $\alpha$  Subtypen stimuliert. Nach 24h wurde die TLR3, TLR4, TLR9, RIG-I, PKR und OAS1a mRNA Expression mittels Real-time PCR analysiert und die Quantität der Moleküle relativ zum „housekeeping gene“  $\beta$ -Actin berechnet. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung von Knochenmark-DCs aus zwei Tieren.

## 5. Diskussion

### 5.1 Rolle von Typ I Interferon bei Infektion mit Retroviren

Die angeborene Immunantwort bildet eine erste Verteidigungslinie gegen eingedrungene Erreger, wobei das Pathogen entweder eliminiert oder aber die Infektion bis zum Einsetzen der adaptiven Immunantwort kontrolliert wird. Während viraler Infektionen sind die Interferone die bedeutendsten Zytokine.  $\text{IFN}\alpha/\beta$  wird von den Zellen innerhalb weniger Stunden nach der Infektion produziert und verhindert auf autokrinem und parakrinem Weg die Replikation des Virus. So wurden z.B. in Mäusen, welche mit dem Encephalomyocarditis Virus (EMCV) infiziert wurden, maximale  $\text{IFN}\alpha$  Werte um 24h detektiert (Gaines et al. 1987). Im Friend Virus-Modell wurde im ersten Teil der Arbeit in verschiedenen Mausstämmen eine  $\text{IFN}\alpha$  Antwort mit maximalen  $\text{IFN}\alpha$  Konzentrationen entweder 18h oder 24h nach der Infektion im Serum gemessen (Abb. 4.2). Bei dem in diesem Teil der Arbeit verwendeten FV-Stock lag, wie sich später herausstellte, eine Kontamination mit dem Lactatdehydrogenase-induzierenden Virus (LDV) vor. Bei LDV handelt es sich um ein schnell replizierendes RNA-Virus, das vorwiegend in Makrophagen repliziert (Rowson und Mahy 1975). In mehreren Studien wurde die Produktion von  $\text{IFN}\alpha$  in Mäusen nach LDV-Infektion beschrieben (Evans und Riley 1968, du Buy et al. 1973, Koi et al. 1981). Hohe Konzentrationen von Typ I IFN wurden 24h nach LDV-Infektion erreicht, diese Daten korrelieren exakt mit den Werten, die nach Infektion mit dem kontaminierten FV-Stock detektiert wurden (Abb. 4.2).

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die LDV-Kontamination auf die IFN-Antwort hatte, wurde ein LDV freier FV-Stock hergestellt. Mit diesem Stock konnte eine  $\text{IFN}\alpha$  Induktion im Serum von Mäusen nach FV-Infektion nicht nachgewiesen werden, jedoch wurden  $\text{IFN}\alpha$  mRNA Transkripte zu einem späteren Zeitpunkt (72h) in Milzzellen detektiert (Abb. 4.14A). Dies weist auf eine lokale  $\text{IFN}\alpha$  Produktion am Ort der stärksten FV-Infektion, in der Milz, hin. Das lokal produzierte  $\text{IFN}\alpha$  wird vermutlich von Zellen in der direkten Umgebung schnell aufgenommen, so dass systemisches aktives  $\text{IFN}\alpha$  im Serum nicht nachgewiesen wurde. Nach Infektion mit dem murinen Retrovirus LP-BM5 MuLV, dem Erreger von murinem AIDS, konnte ebenfalls kein aktives Typ I IFN im Serum von Mäusen nachgewiesen werden, sondern ebenfalls nur mRNA Transkripte (Heng et al. 1996). Dies zeigt, dass murine Retroviren nur eine lokal begrenzte moderate IFN Antwort auslösen.

Kürzlich wurde gezeigt, dass Mäuse, deren plasmacytoide DCs (pDCs) depletiert wurden, nach LDV-Infektion keine IFN $\alpha$  Produktion im Serum mehr aufwiesen (Ammann, persönliche Mitteilung). Plasmacytoide DCs sind die Hauptproduzenten von IFN $\alpha$  und produzieren bis zu 10 pg/Zelle (Siegal et al. 1999). Demnach scheinen plasmacytoide DCs die entscheidende Rolle bei der IFN $\alpha$  Produktion nach LDV-Infektion zu spielen. Die spätere und moderate Produktion von IFN $\alpha$  nach der FV-Infektion lässt vermuten, dass pDCs bei der FV-induzierten IFN $\alpha$  Antwort nicht beteiligt sind.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, wie wichtig Interferone in der Kontrolle der Replikation vieler Viren sind. Dies konnte am besten anhand von Mäusen bewiesen werden, die durch das Fehlen eines funktionellen Typ I IFN Rezeptors keinen antiviralen Effekt von IFN mehr aufwiesen und dadurch nicht mehr in der Lage waren die Virusreplikation zu kontrollieren. Dazu gehörten u.a. das Vaccinia Virus (VV), Semliki Forest Virus (SFV), lymphocytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) (Müller et al. 1994) und Murray Valley Encephalitis Virus (MVE) (Lobigs et al. 2003). In Anlehnung an diese Studien konnten wir für die akute FV-Infektion zeigen, dass das Fehlen des Typ I IFN Rezeptors und die damit fehlende Interferon Funktion ebenfalls zu einer signifikant höheren viralen Last in der Milz und im Plasma der Mäuse führte (Abb. 4.3). Die zuvor aufgeführten Studien differenzieren jedoch nicht zwischen den Zytokinen IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ . IFN $\alpha$  besitzt nur etwa 50% Homologie zu IFN $\beta$  und bis jetzt ist noch nicht bekannt, in wie weit sich die Funktionen von IFN $\beta$  und IFN $\alpha$  bei der Virusabwehr unterscheiden (Oritani et al. 2001). Die Infektion von IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> mit FV ermöglichte es uns einen Einblick in die Rolle von IFN $\beta$  *in vivo* zu bekommen. Dabei konnten wir zeigen, dass die Viruslast in der Milz und im Plasma bei fehlendem IFN $\beta$  erhöht war. Im Vergleich zu den FV-infizierten IFNAR<sup>-/-</sup> waren die IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> jedoch weniger suszeptibel (Abb. 4.3). Die *in vivo* Experimente mit FV-infizierten „knockout“ Mäusen haben somit gezeigt, dass allein durch das Fehlen von IFN $\beta$  die Virusreplikation schlechter kontrolliert wird, fehlt die IFN Funktion jedoch gänzlich (von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ ) ist der Virustiter noch einmal deutlich erhöht. Unsere Ergebnisse stimmen dabei gut mit anderen Untersuchungen überein. Vaccinia Virus infizierte IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> zeigten ebenfalls eine erhöhte Suszeptibilität im Vergleich zu Wildtypmäusen (Deonarain et al. 2004), die jedoch niedriger ausfiel als in IFNAR<sup>-/-</sup> (van den Broeck et al. 1995). Die geringere FV-Replikation in den IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> verglichen zu den IFNAR<sup>-/-</sup> lässt sich dadurch begründen, dass in den IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> aktives IFN $\alpha$

vorgefunden wurde. (Abb. 4.4). Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass die gemessene IFN $\alpha$  Produktion in den IFN $\beta^{-/-}$  durch LDV und nicht durch FV induziert wurde.

In früheren *in vitro* Studien wurde dagegen gezeigt, dass Sendai Virus-infizierte embryonale Maus Fibroblasten von IFN $\beta$ -defizienten Mäusen nicht in der Lage waren, IFN $\alpha$  zu produzieren (Erlandsson et al. 1998). In dem daraus abgeleiteten Modell ließ sich die IFN-Antwort in zwei Phasen einteilen. In der frühen Phase kommt es nach der Erkennung einer viralen Infektion zur Expression von IFN $\beta$ . In der späten Phasen bindet das sezernierte IFN $\beta$  an den IFNAR, in der über den IFN $\beta$ -Signalweg stimulierte Gene exprimiert werden, u.a. antivirale Proteine und IRF-7. Die Aktivierung von IRF-7 führt weiterhin zu einer positiven Verstärkung der antiviralen Aktivität durch die Expression von IFN $\alpha$  Genen. Die Induktion der IFN $\alpha$  Subtypen in Fibroblasten ist somit ausschließlich IFN $\beta$  abhängig. *In vivo*, wo mehrere verschiedene Zelltypen IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  produzieren, scheint diese „feedback“ Regulation nicht zu gelten. Unser Ergebnis wird gestützt durch andere Studien, in denen IFN $\beta$  defiziente Mäuse nach Infektion mit UV-inaktivierten Herpes simplex Viren (HSV) ebenfalls beträchtliche Mengen an IFN $\alpha$  produzieren (Barchet et al. 2002). Eine mögliche Erklärung für die IFN $\beta$  unabhängige IFN $\alpha$  Produktion liegt in dem beschriebenen autokrinen IFN $\alpha$ 4 Loop. Dabei induziert eine virale Infektion nicht nur die Expression von IFN $\beta$ , sondern auch von IFN $\alpha$ 4, wodurch im nächsten Schritt durch den Jak/STAT Signalweg eine maximale Expression und Sekretion von IFN $\beta$  und der restlichen IFN $\alpha$  Gene stattfindet. Dieser positive „feedback loop“, der in der Zelle einen maximalen antiviralen Status aufbaut, wird also neben IFN $\beta$  ebenso durch den IFN $\alpha$ 4 Subtyp initiiert (Marié et al. 1998).

Trotz des gebildeten IFN $\alpha$  scheint IFN $\beta$  einen direkten entscheidenden Einfluss auf die Kontrolle der FV-Replikation auszuüben. Den direkten antiviralen Effekt von IFN $\beta$  auf FV fanden wir ebenfalls in Zellkultur vor (Abb. 4.1).

Untersuchungen mit dem Coxsackievirus B3 zeigten ebenfalls, dass im Gegensatz zu Wildtypmäusen, die eine intakte IFN $\beta$  Antwort haben, IFN $\beta^{-/-}$  Mäuse eine erhöhte Mortalität, sowie eine Runterregulation IFN-stimulierter Gene (2'-5'OAS, Mx) aufwiesen (Deonarain et al. 2000). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass IFN $\beta$  eine antivirale Antwort induziert, die sich möglicherweise von dem antiviralen Signalweg von IFN $\alpha$  unterscheidet (Shirazi und Pitha 1992). Unterschiedliche Signalspezifität wurden bestätigt durch Beobachtungen der unterschiedlichen

Wechselwirkungen von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  mit den beiden Rezeptoruntereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 (Lewerenz et al. 1998). Bei einem Alaninaustausche in IFNAR1 und IFNAR2 führte lediglich IFN $\beta$  zu einer Aktivierung der Signalkaskade, nicht jedoch IFN $\alpha$ . Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Bindung von IFN $\beta$  an IFNAR2 eine Teilaktivität hervorruft, während bei IFN $\alpha$  eine Bindung an beide Rezeptoruntereinheiten notwendig ist, um die Signalkaskade zu aktivieren (Russell-Harde et al. 1999). Diese Ergebnisse korrelieren mit der Beobachtung unterschiedlicher biologischer Aktivitäten von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  in der FV-Infektion.

Das Typ I IFN einen entscheidenden Einfluss auf die Kinetik der FV- Replikation haben, zeigen ebenso unsere Therapieerfolge mit IFN $\alpha$  (Abb. 4.6). In früheren Studien wurden Langzeittherapien (12 bis 25 Tage) mit IFN $\alpha$  bei FV-Infektionen oder murinem AIDS durchgeführt, in denen IFN $\alpha$  einen inhibitorischen Effekt auf die virale Replikation aufwies (Sidwell et al. 1993, 1995, Heng et al. 1996). Wir konnten dagegen zeigen, dass die Therapie mit IFN $\alpha$  über einen relativ kurzen Zeitraum von 5 Tagen einen ausreichend antiviralen Status induzierte, um eine Virus-induzierte Leukämie zu vermindern. Die Therapie von persistierend infizierten Tieren reduzierte die Viruslast hingegen nicht. (Abb. 4.11). Demnach scheint durch die Gabe von IFN $\alpha$  in der akuten Phase der Infektion die Virus-Wirt Balance reguliert zu werden, während spätere Gaben von IFN $\alpha$  keinen Einfluss mehr auf die dann etablierte Infektion haben.

IFN $\alpha$  kann dabei auf verschiedene Weise Einfluss auf die Virusreplikation nehmen; zum einen kann es direkt zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Immunantwort durch die Produktion antiviraler Enzyme die virale Replikation hemmen, andererseits hat es Einfluss auf die adaptive Immunantwort (Goodbourn et al. 2000). Wir konnten den direkten antiviralen Effekt von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  auf FV in Zellkultur nachweisen (Abb. 4.1), der höchstwahrscheinlich durch antivirale Enzyme vermittelt wurde. Außerdem konnten wir zeigen, dass in unserem FV-Modell sowohl die IFN $\beta^{-/-}$  als auch IFNAR $^{-/-}$  Mäuse einen geringeren prozentualen Anteil von T-Zellen an Gesamtleukozyten während der akuten FV-Infektion aufwiesen (Abb. 4.7C/D). Typ I IFN übt also einen positiven immunregulatorischen Effekt auf T-Zellen aus. Im Gegensatz dazu wurde beschrieben, dass durch eine DNA Vakzinierung mit dem Hepatitis B Oberflächenantigen (HBsAg) in IFN $\beta^{-/-}$  und IFNAR $^{-/-}$  doppelt so viele spezifische CD8 $^{+}$ -Zellen induziert wurden wie bei Wildtypmäusen (Dikopoulos et al. 2005). Diese Studie zeigt somit einen negativen Einfluss von Typ I IFN auf die spezifische CD8 $^{+}$  T-

Zellantworten. Vermutlich liegen unterschiedliche Resultate der Effekte von Typ I IFN auf T-Zellen vor, da der Einfluss zum einen in einer Infektion und zum anderen bei einer Vakzinierung untersucht wurde.

Bei dem Einfluss von Typ I IFN auf die spezifische T-Zellantwort lässt sich vermuten, dass Dendritische Zellen (DC) hierbei eine entscheidende Rolle spielen. DCs werden als Schlüsselfigur zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort angesehen. Zum Beispiel induziert Typ I IFN die Reifung von DCs (Le Boon und Tough 2002), welches für die Stimulation der T-Zellen von Bedeutung ist. Frühere *in vitro* Studien zeigen, dass DCs aus dem Knochenmark von IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen weniger kostimulatorische und MHC Klasse II Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, weswegen sie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen weniger effizient Peptide präsentieren können (Montoya et al. 2002). In Bezug auf diese früheren Untersuchungen lässt sich demnach schließen, dass in IFNβ<sup>-/-</sup> und IFNAR<sup>-/-</sup> die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen in geringerem Maße stattfindet, da die DCs weniger FV-Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren.

Die *in vivo* Experimente mit FV-infizierten „knockout Mäusen“, sowie die IFNα Therapieexperimente zeigen, dass Typ I IFN eine positive Rolle in der retroviralen Immunität spielt. Weiter konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass obwohl jeweils IFNα und IFNβ unabhängig antivirale Aktivität besitzen, sie nur in Kombination in der Lage sind ihre gesamte antiretrovirale Aktivität zu entfalten. Dieser antivirale Effekt wird offensichtlich sowohl durch IFN-induzierte Enzyme, als auch durch immunmodulatorische Eigenschaften von IFN vermittelt. Typ I IFN spielen demnach eine wichtige Rolle in der antiviralen Abwehr gegen Retroviren und könnten als Therapie Anwendung finden.

## **5.2 Einfluss von IFNα Subtypen auf die FV-Infektion**

Typ I IFN, die sich aus einer multigenen Familie von mehr als 10 Genen im Menschen und der Maus zusammensetzen, gehören zu den am intensivsten untersuchten antiviralen Interferonen im Bereich der klinischen Forschung. Sie werden zur Behandlung von Nierenzellkarzinomen, malignen Melanomen, multiplen Myelomen, karzinogenen Tumoren, verschiedenen Typen von Lymphomen und Leukämien, dem AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkom und viralen Infektionen wie Hepatitis B und C verwendet (de Wit et al. 1988, Baron et al. 1991, Ravaud und Dilhuydy 2005, Toniutto et al. 2006). Die Behandlung von humanen Krankheiten ist

jedoch auf den rekombinanten humanen IFN $\alpha$ 2 Subtyp (Roferon A® (Hoffman La Roche), Intron A® (Essex Pharma)) beschränkt. Kein anderer Subtyp wird bisher zur Therapie eingesetzt.

Aus *in vitro* Studien ist bekannt, dass IFN $\alpha$  die Replikation von HIV-1 inhibiert (Shirazi et al. 1992, 1993). Allerdings liegen keine Informationen über die verschiedenen biologischen Funktionen und antiviralen Aktivitäten der IFN $\alpha$  Subtypen in einer retroviralen Infektion wie HIV vor. Da in dieser Arbeit der antivirale Effekt von Typ I IFN in der akuten FV-Infektion nachgewiesen wurde, war das Ziel in diesem Teil der Arbeit, die biologischen Eigenschaften der verschiedenen Subtypen IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4, IFN $\alpha$ 6 und IFN $\alpha$ 9 im retroviralen FV-Modell zu untersuchen. Diese vier Subtypen wurden verwendet, da sie bestimmte charakteristische Merkmale besitzen und die größten Unterschiede innerhalb der IFN $\alpha$  Subtypen aufwiesen. Die Gene für IFNA1, A4 und A6 liegen zusammen als Cluster in einer 28kb Region auf dem murinen Chromosom 4, während das Gen für IFNA9 sich außerhalb dieses Gencluster befindet (Kelley und Pitha 1985). IFNA4 codiert für ein 161 AS großes, die anderen murinen Typ I IFN Subtypen hingegen für ein 166 AS großes Protein. Die Subtypen IFN $\alpha$ 1,  $\alpha$ 6 und  $\alpha$ 9 besitzen somit eine Homologie von 85-90% auf dem Aminosäurelevel, während IFN $\alpha$ 4 ca. 80% Homologie zu den anderen drei Peptiden aufweist (Tab. 5.1). Die unterschiedlichen Merkmale der vier verwendeten IFN $\alpha$  Subtypen sind ebenfalls im Sequenzvergleich der Interferone zu erkennen (Abb. 5.1) und weisen demnach Potential für biologische Variabilität innerhalb dieser Gruppe auf.

**Tab. 5.1: Vergleich von Homologie auf dem Aminosäurelevel der vier IFN $\alpha$  Subtypen [%]**

	IFN $\alpha$ 1	IFN $\alpha$ 4	IFN $\alpha$ 6	IFN $\alpha$ 9
IFN $\alpha$ 1	--	81	87	86
IFN $\alpha$ 4		--	80	79
IFN $\alpha$ 6			--	86
IFN $\alpha$ 9				--

	1				50
<b>IFN<math>\alpha</math>1</b>	CDLPQTHNLR	NKRALTLVQ	MRRLSPLSCL	KDRKDFGFPQ	EKVDAQQIKK
<b>IFN<math>\alpha</math>4</b>	CDLPHTYNLG	NKRALTVEE	MRRLPPLSCL	KDRKDFGFPL	EKVDNQQIQK
<b>IFN<math>\alpha</math>6</b>	CDLPQTHNLR	NKRALTLVK	MRRLSPLSCL	KDRKDFGFPQ	EKVGAQQIQE
<b>IFN<math>\alpha</math>9</b>	CDLPQTHNLR	NKKILTLLAQ	MRRLSPLSCL	KDRKDFGFPQ	EKVDAQQIQE
	51				100
<b>IFN<math>\alpha</math>1</b>	AQAIPVLSSEL	TQQILNIFTS	KDSSAAWNTT	LLDSFCNDLH	QQLNDLQGCL
<b>IFN<math>\alpha</math>4</b>	AQAIVLVRDL	TQQILNLFTS	KDLSATWNAT	LLDSFCNDLH	QQLNDLKACV
<b>IFN<math>\alpha</math>6</b>	AQAIPVLTTEL	TQQILALFTS	KDSSAAWNAT	LLDSFCNDLH	QQLNDLQGCL
<b>IFN<math>\alpha</math>9</b>	AQAIPVLSSEL	TQQILTIFTS	KDSSAAWNAT	LLDSFCTGLH	QQLNDLQGCL
	101				150
<b>IFN<math>\alpha</math>1</b>	MQQVGVEFP	LTQEDALLAV	RKYFHRITVY	LREKKHSPCA	WEVVRAEVWR
<b>IFN<math>\alpha</math>4</b>	MQEP-----P	LTQEDSLLAV	RTYFHRITVY	LRKKKHSICA	WEVIRAEVWR
<b>IFN<math>\alpha</math>6</b>	MQQVEIQALP	LTQEDSLLAV	RTYFHRITVF	LREKKHSPCA	WEVVRAEVWR
<b>IFN<math>\alpha</math>9</b>	MQLVGMKELP	LTQEDSQLAM	KKYFHRITVY	LREKKHSPCA	WEVVRAEVWR
	151		167		
<b>IFN<math>\alpha</math>1</b>	ALSSSANVLG	RLREEK-			
<b>IFN<math>\alpha</math>4</b>	ALSSSTNLLA	RLSEEKE			
<b>IFN<math>\alpha</math>6</b>	ALSSSAKLLA	RLNEDE-			
<b>IFN<math>\alpha</math>9</b>	ALSSSVNLLA	RLSEEKE			

**Abb. 5.1: Sequenzvergleich der IFN $\alpha$  Subtypen IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4, IFN $\alpha$ 6 und IFN $\alpha$ 9**

Rot gekennzeichnete Aminosäuren (AS) sind identisch, konservierte blau, ähnliche grün und nicht ähnliche schwarz markiert.

Alle vier IFN $\alpha$  Subtypen (IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4, IFN $\alpha$ 6 und IFN $\alpha$ 9) wiesen einen antiviralen Effekt gegen FV in Zellkultur auf, jedoch hemmte IFN $\alpha$ 1 die Infektion am effektivsten, während IFN $\alpha$ 6 am schwächsten die FV-Replikation inhibierte (Abb. 4.13). Harle et al. (2002) zeigte ebenfalls, dass alle vier IFN $\alpha$  Subtypen die Replikation von Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) *in vitro* hemmten. Im Gegensatz zur FV-Infektion, inhibierten IFN $\alpha$ 4 und IFN $\alpha$ 9 die HSV-1 Replikation am effektivsten, während IFN $\alpha$ 1 und IFN $\alpha$ 6 die geringste Effektivität aufwiesen. Für MCMV wurde hingegen beschrieben, dass es von den Subtypen IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4 und IFN $\alpha$ 9 inhibiert wird, jedoch nicht von IFN $\alpha$ 6 (Boyer und Beilharz, nicht publiziert). Diese Untersuchungen zeigen deutlich, dass die Subtypen unterschiedliche antivirale Aktivitäten gegen verschiedene Viren aufweisen. Erste Hinweise, die eine Erklärung für die unterschiedlichen Aktivitäten der Subtypen liefern, die ja alle an den gleichen Rezeptor binden, wurden von Cull et al. (2003) beschrieben. Nach Behandlung mit individuellen IFN $\alpha$  Subtypen wurden Unterschiede in der Aktivierung von STAT Molekülen in demselben Zelltyp festgestellt (Cull et al. 2003). STAT Moleküle sind Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription und dienen der Genregulation.

Folgernd führen unterschiedliche Aktivierungen von Signalkaskaden somit zur Expression verschiedener antiviraler Enzyme, die bei verschiedenen Virusinfektionen unterschiedlich aktiv sind.

Fasler-Kan et al. (1998) konnte zeigen, dass in Abhängigkeit vom Zelltyp verschiedene STAT-Moleküle durch IFN $\alpha$  Subtypen aktiviert wurden und stellte daher die These auf, dass die Wirkweise der IFN in Abhängigkeit von dem Zelltyp steht. Für *in vitro* Untersuchungen mit FV steht allerdings nur eine Zelllinie (*Mus dunni*) zur Verfügung, in denen FV repliziert. Die antivirale Aktivität der Subtypen gegen FV in Zellkultur konnten somit nur in einem Zelltyp untersucht werden.

Obwohl die Messungen der antiviralen Aktivität von IFN $\alpha$  Subtypen *in vitro* wichtige Hinweise über deren biologische Aktivitäten liefern, müssen letztlich *in vivo* Experimente durchgeführt werden, um ihre Wirkweise besser zu verstehen.

In der Maus wiesen die Subtypen IFN $\alpha$ 1 und IFN $\alpha$ 4 die größte antivirale Aktivität auf, während IFN $\alpha$ 6 die Viruslast sogar noch verstärkte (Abb. 4.18, 4.19).

Unterschiede von IFN $\alpha$  Subtypen nach IFN-DNA Vakzinierung wurden ebenfalls in MCMV infizierten Mäusen beschrieben. Die IFN $\alpha$ 1, A4 und A9 Subtypen reduzierten die lokale Replikation von MCMV im Tibiamuskel (Lawson et al. 1997, Yeow et al. 1998), während IFN $\alpha$ 6 die Viruslast in allen Zielorganen reduzierte (Cull et al. 2002). In der MCMV Infektion wurde ein negativer Effekt auf die Virusreplikation für die Subtypen IFN $\alpha$ 5 und IFN $\alpha$ 2 beschrieben (Cull et al. 2002), die wir nicht untersuchten. Unterschiede in der antiviralen Effektivität innerhalb der Subtypen wurden kürzlich auch für die Influenza-Replikation beschrieben. Die Subtypen IFN $\alpha$ 5 und IFN $\alpha$ 6 waren am effektivsten, während IFN $\alpha$ 1 sehr geringe Aktivität gegen Influenza aufwies. Diese Daten zeigen somit deutliche Wirkunterschiede der IFN $\alpha$  Subtypen *in vivo* hinsichtlich ihrer antiviralen Potenz gegen verschiedene Virusinfektionen. Experimente mit unterschiedlichen Viren sind daher notwendig, um eine optimale Therapie mit IFN $\alpha$  Subtypen zu entwickeln. Der alleinige therapeutische Einsatz von humanem IFN $\alpha$ 2 bei verschiedensten Virusinfektionen scheint daher nicht sinnvoll.

Die beschriebene Virusreduktion im FV-Modell durch eine Therapie mit IFN $\alpha$ 1 korrelierte mit der verstärkten Induktion von FV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. (Abb. 4.20A). Das CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen entscheidenden Einfluss bei der Kontrolle der FV-Replikation spielen, wurde schon früher in Vakzinestudien belegt. Vakzine induzierte FV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen schützten die Mäuse vor einer FV-induzierten

Erythroleukämie (Dittmer et al. 1999a, Dittmer et al. 1999b). Bei einer therapeutischen Behandlung mit CpG-ODN wurde die Virusreduktion in FV-infizierten Mäusen ebenfalls durch FV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt (Olbrich et al. 2002). Die Erkennung von CpG-ODNs erfolgt durch TLR9 auf DCs, was u.a. zur Sekretion von Typ I IFN führt. In dieser Studie wurde die Expression von IFN $\alpha$  nach CpG-Gabe nicht untersucht, dennoch lässt sich vermuten, dass die Verstärkung der spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort auf induziertes IFN $\alpha$ 1 zurückgeführt werden kann. Da CD8<sup>+</sup> spezifische T-Zellen auch bei anderen retroviralen Infektionen, wie HIV und HTLV eine wichtige Rolle spielen, ist die Therapie mit IFN $\alpha$  Subtypen auch bei humanpathogenen Viren interessant.

Die Subtypen IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4 und IFN $\alpha$ 9 verstärkten darüber hinaus die Induktion des frühen Aktivierungsmarker CD69, einem Transmembran C-Typ Lektin, auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 4.20C). Erst kürzlich wurde die genaue Funktion von CD69 beschrieben. Naive Lymphozyten zirkulieren kontinuierlich aus und in die lymphatischen Organe. Das Abwandern aus den lymphatischen Organen ist abhängig von dem Sphingosin-1-Phosphatrezeptor (S1P<sub>1</sub>). CD69 bildet einen Komplex mit S1P<sub>1</sub> und inhibiert die chemotaxische Funktion von S1P<sub>1</sub> (Shiow et al. 2006). FV-suszeptible Mäuse wurden mit FV infiziert und die Zellen wandern also aus den lymphatischen Organen nicht mehr ab. Damit lässt sich auch die erhöhte Anzahl von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach IFN $\alpha$  Subtypen Therapie in der Milz erklären, da die CD69<sup>+</sup> Zellen sich in der Milz anreichern. Diese Ergebnisse zeigen die wichtige Rolle der IFN $\alpha$  Subtypen IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4 und IFN $\alpha$ 9 für die Induktion und Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dagegen spielten die Subtypen bei der Induktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen keine Rolle (Abb. 4.20D). Zuvor durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass Typ I IFN nur schwache Induktoren von MHC-II auf Antigen-präsentierenden Zellen sind, die Expression von MHC-I hingegen deutlich verstärken. Antigen-präsentierende Zellen können durch die verstärkte MHC-I Expression CD8<sup>+</sup> T-Zellen effizienter Peptide exprimieren und diese damit besser aktivieren. Dies würde erklären, warum IFN $\alpha$  Subtypen CD8<sup>+</sup>, jedoch nicht CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren. Neben der Induktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen korrelierte die Reduktion der Viruslast ebenfalls mit der Induktion von NK-Zellen. Die Subtypen IFN $\alpha$ 1,  $\alpha$ 4 und  $\alpha$ 9 führten zu einer deutlich erhöhten Anzahl an aktivierten NK-Zellen in der Milz (Abb. 4.20E). Die wichtige Funktion der NK-Zellen bei der Abwehr von FV wurden schon beschrieben (Iwanami et al. 2001) und passt gut überein mit der vorgefunden Induktion von NK-Zellen in Korrelation mit der Reduktion

der Viruslast nach IFN $\alpha$  Subtypen Therapie. Unterschiedliche Eigenschaften individueller IFN $\alpha$  Subtypen bei der Aktivierung humaner NK-Zellen wurden in früheren Studien ebenfalls beschrieben (Verhagen et al. 2002). Humanes IFN $\alpha$ 2 war z.B. effektiver als IFN $\alpha$ 1 oder IFN $\alpha$ 4 in der Verstärkung der Zytotoxizität von NK-Zellen.

Da die Einleitung von T-Zellantworten eine der Hauptfunktionen von DCs als Antigen-präsentierende-Zellen ist, wurde zusätzlich die Rolle der IFN $\alpha$  Subtypen auf DCs untersucht. Von DCs ist bekannt, dass sie TLR3, 4 und 9 exprimieren. Die Erkennung mikrobieller Moleküle durch TLRs führt zur Aktivierung und Reifung von APCs. MHC-Moleküle und kostimulatorische Oberflächenmoleküle wie CD80 und CD86 werden hochreguliert und die reifen DCs wandern in die lymphatischen Organe, um dort mit den T-Zellen zu interagieren und sie zu aktivieren. Die Erkennung von Antigenen durch TLR unterstützt also indirekt die Stimulation und Expansion von T-Zellen.

Für TLR3 und TLR4 ist beschrieben, dass sie an der Erkennung viraler Antigene der murinen Retroviren MMTV und Mo-MuLV beteiligt sind (Rassa et al. 2002, Abujamra et al. 2006). TLR3 und TLR4 könnten somit ebenfalls bei der Erkennung von FV-Antigenen eine Rolle spielen. Da die IFN $\alpha$  Subtypen IFN $\alpha$ 1 und IFN $\alpha$ 4 die Expression von TLR3 und TLR4 in mDC am stärksten hochregulierten (Abb. 4.14B), erleichtert eine Behandlung der DCs mit diesen Subtypen das Erkennung viraler Antigene und letztendlich die Stimulierung von T-Zellen. Diese Daten korrelieren daher gut mit der verstärkten CD8<sup>+</sup> T-Zell Induktion nach IFN $\alpha$ 1 und IFN $\alpha$ 4 Therapie von FV-infizierten Mäusen.

Wie wichtig die Modulation der Immunantwort ist, zeigt die IFN $\alpha$  Expression im Vergleich zur Aktivität der IFN $\alpha$  Subtypen in einer Virusinfektion.

Die Regulation und Expression der IFN Typ I Genfamilie ist sehr komplex, so ist die Zusammensetzung der produzierten Interferone abhängig vom Zelltyp, dem Virus oder der TLR-Stimulation. Eine TLR9 Stimulation humaner pDCs induzierte die Expression aller IFN Typ I Subtypen, während nach einer TLR3 oder TLR4 Stimulation humaner mDCs vorwiegend IFN $\beta$  induziert wird (Coccia et al. 2004). Im FV-Modell konnten wir 48h nach Infektion nur IFN $\alpha$ 4 und zu einem späteren Zeitpunkt IFN $\alpha$ 9 und IFN $\beta$  detektieren (Abb. 4.14B). Obwohl IFN $\alpha$ 1 und IFN $\alpha$ 4 in den Therapieexperimenten die höchste antivirale Aktivität aufwiesen, wurde IFN $\alpha$ 1 überhaupt nicht exprimiert. Das Expressionsmuster der IFN $\alpha$  Subtypen nach FV-

Infektion zeigt somit, dass die Expression der Subtypen nicht mit der stärksten antiviralen Aktivität der Subtypen korreliert. Diese Daten belegen, dass es sinnvoll sein kann, trotz endogener IFN $\alpha$  Antwort nach einer Infektion, die Immunantwort durch eine gezielte Therapie mit ausgewählten IFN $\alpha$  Subtypen zu verstärken.

Die Ergebnisse der erfolgreichen IFN $\alpha$  Subtypen Therapie in der akuten Retrovirusinfektion im Mausmodell implizieren, dass der Einsatz von IFN $\alpha$  Subtypen eine interessante Immuntherapie für HIV und andere Virusinfektionen darstellt. Kürzlich konnte auch für ein anderes Virus, dem Hepatitis C Virus, gezeigt werden, dass IFN $\alpha$  Subtypen verschiedene Aktivitäten aufwiesen (Koyama et al. 2006), dieses wurde jedoch nur im Zellkulturmodell und nicht *in vivo* gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die deutlichen Unterschiede der antiviralen Aktivität der IFN $\alpha$  Subtypen in einer retroviralen Infektion beschrieben. Diese Daten verdeutlichen, dass nur der Einsatz des effektivsten Subtyps zu einer wirkungsvollen Therapie führt, wobei die antivirale Aktivität der IFN $\alpha$  Subtypen für jede Virusinfektion bestimmt werden muss.

Die zurzeit auf humanes IFN $\alpha$ 2 beruhende Behandlung von Virusinfektionen sollte daher in Zukunft durch den Einsatz weiterer Subtypen erweitert werden.

Die Evaluierung der antiviralen Wirkung humaner IFN $\alpha$  Subtypen gegen HIV und anderer Viren ist dringend erforderlich und wird höchstwahrscheinlich ebenso unterschiedliche biologische Aktivitäten der IFN $\alpha$  Subtypen ergeben, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurden.

## 6. Zusammenfassung

IFN $\alpha$ , von denen im Mausgenom 14 IFN $\alpha$  Gene existieren, und IFN $\beta$  gelten als zentrale Zytokine bei der Abwehr von Virusinfektionen. Die Relevanz von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  bei der Immunität gegen humanpathogenen Retroviren, wie HIV und HTLV ist aber weitestgehend unbekannt. Daher ist es wichtig grundlegende Wirkweisen von Typ I Interferonen in geeigneten Tiermodellen zu untersuchen. Die Infektion von Mäusen mit dem retroviralen Friend Virus Komplex (FV) wurde daher als Modell verwendet, um die Funktion von Typ I Interferonen zu untersuchen. Nach FV-Infektion von Mäusen konnten IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  mRNA Transkripte in der Milz nachgewiesen werden. Die wichtige Rolle von Typ I IFN in der frühen Immunantwort gegen FV wurde bei der Infektion von Mäusen mit einer Defizienz des Typ I IFN-Rezeptors oder IFN $\beta$  deutlich. Die Viruslast im Plasma und in der Milz war in beiden „knockout“ Mäusen höher im Vergleich zu Wildtypmäusen. Diese Unterschiede wurden durch die antiviralen Effekte von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  hervorgerufen, die höchstwahrscheinlich durch antivirale Enzyme als auch immunmodulatorische Effekte der Typ I IFN auf die T-Zell Antwort vermittelt wurden. Das Fehlen von IFNAR oder IFN $\beta$  erhöhte dabei nicht nur die Viruslast in der akuten, sondern auch in der chronischen Phase der FV-Infektion. Untersuchungen zum therapeutischen Einsatz von IFN $\alpha$  in der akuten Phase der Infektion zeigten deutlich die inhibitorische Wirkung von Typ I IFN auf die FV-Replikation. Die IFN $\alpha$  Therapie war am effektivsten, wenn mit der Behandlung vor oder sofort nach der Infektion begonnen wurde. In der chronischen Infektion konnte dagegen kein therapeutischer Effekt von IFN $\alpha$  nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen die wichtige Rolle von Typ I IFN in der frühen Immunabwehr gegen Retroviren.

Die Typ I IFN umfassen in der Maus jedoch 14 verschiedene IFN $\alpha$  Subtypen, die sich in ihrer biologischen Aktivität unterscheiden können. Im zweiten Teil der Arbeit wurden daher die Unterschiede in der antiviralen Effektivität der IFN $\alpha$  Subtypen IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4, IFN $\alpha$ 6 und IFN $\alpha$ 9 in der FV-Infektion, sowie die antiviralen Wirkmechanismen dieser IFN $\alpha$  Subtypen untersucht. Bei allen untersuchten Subtypen konnte ein inhibitorischer Effekt gegen FV *in vitro* nachgewiesen werden. Untersuchungen zur therapeutischen Gabe der IFN $\alpha$  Subtypen bei FV-infizierten Mäusen zeigten, dass die Subtypen IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4 und IFN $\alpha$ 9 zu einer unterschiedlich starken Reduktion der Viruslast im Blut und in der Milz von Mäusen

fürten. Die Reduktion der Viruslast nach IFN $\alpha$ 1 Therapie korrelierte mit der verstärkten Induktion FV-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen, während die geringere Viruslast in IFN $\alpha$ 4 und IFN $\alpha$ 9 behandelten Tieren ausschließlich mit der verstärkten Aktivierung von NK-Zellen in der Milz korrelierte. Die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen zeigen, dass es trotz endogener IFN $\alpha$  Antwort nach Infektion sinnvoll sein kann, die Immunantwort gegen Viren durch eine gezielte Therapie mit ausgewählten IFN $\alpha$  Subtypen zu verstärken.

Das Verständnis über die unterschiedlichen antiviralen Eigenschaften der IFN $\alpha$  Subtypen gegen Retroviren ermöglicht es, die zukünftige therapeutische Anwendung von IFN $\alpha$  Subtypen bei retroviralen Infektionen zu ermöglichen.

## Summary

IFN $\alpha$ , which includes 14 IFN $\alpha$  genes in the mouse, and IFN $\beta$  are the central cytokines in the defence against many viral infections. However, since there is no rodent animal model for the human immunodeficiency virus (HIV) the antiviral effect of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  in retroviral infections is not well characterized. In the current study we have used the Friend virus (FV) model to determine the activity of type I interferons against a murine retrovirus.

After FV infection of mice IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  mRNA transcripts could be detected in the spleen. The important role of type I IFN in the early immune defence against FV became evident when mice deficient in IFN type I receptor (IFNAR $^{-/-}$ ) or IFN $\beta$  (IFN $\beta$  $^{-/-}$ ) were infected. The levels of FV infection in plasma and in spleen were higher in both strains of knockout mice in comparison to C57BL/6 wild type mice. This difference was induced by an antiviral effect of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ , which was most likely mediated by antiviral enzymes as well as by an effect of these IFN on T cell responses. Interestingly, the lack of IFNAR and IFN $\beta$  enhanced viral loads during acute and chronic FV infection. Exogenous IFN $\alpha$  could be used therapeutically to reduce FV replication during acute but not chronic infection. These findings indicate that type I IFN plays an important role in the immediate antiviral defence against Friend retrovirus infection.

However, type I IFN comprises in the mouse of 14 different IFN $\alpha$  subtypes, which can vary in their biological activity. Thus, the goal of the second part was to determine the differences in the antiviral effects of the subtypes IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4, IFN $\alpha$ 6

and IFN $\alpha$ 9 in the FV-infection as well as to analyse the mode of action of these subtypes.

All tested subtypes showed an antiviral activity against FV *in vitro*. Treatment of FV-infected mice with the IFN $\alpha$  subtypes IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4 and IFN $\alpha$ 9 led to a reduction of varying strengths of the viral load. The decreased viral load after IFN $\alpha$ 1 treatment correlated with the increased induction of FV-specific CD8<sup>+</sup> T-cells and NK-cells, whereas the lower viral load in the IFN $\alpha$ 4 and IFN $\alpha$ 9 treated mice exclusively correlated with the activation of NK-cells in the spleen.

The results of the immunological investigations show, that despite an endogene IFN $\alpha$  response after infection, it may make sense to activate the immune response against viruses by a specific treatment with selected IFN $\alpha$  subtypes. The knowledge about the different antiviral properties of the IFN $\alpha$  subtypes against retroviruses can enable the clinical use of retroviral infections in future.

## 7. Literaturverzeichnis

**Abujamra A. L., R. A. Spanjaard, I. Akinsheye, X. Zhao, D. V. Faller, S. K. Ghosh.** 2006. Leukemia virus long terminal repeat activates NFkappaB pathway by a TLR3-dependent mechanism. *Virology*. **345**: 390-403

**Ahmad-Nejad P., H. Hacker, M. Rutz, S. Bauer, R. M. Vabulas, H. Wagner.** 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* **32**: 1985-1986

**Alexopoulou L., A. C. Holt, R. Medzhitov, R. A. Flavell.** 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. **18**: 732-738

**Altman J. D., P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael, M. M. Davis.** 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. **274**: 94-96. Erratum in: *Science* 1998. **280**:1821

**Arnheiter H., M. Frese, R. Kambadur, E. Meier, O. Haller.** 1996. Mx transgenic mice-animal models of health. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **206**: 119-147

**Asselin-Paturel C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere, G. Trinchieri.** 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol.* **2**: 1144-1150

**Bafica A., C. A. Scanga, M. Schito, D. Chaussabel, A. Sher.** 2004. Influence of coinfecting pathogens on HIV expression: evidence for a role of Toll-like receptors. *J. Immunol.* **172**: 7229-7234

**Barchet W., M. Cella, B. Odermatt, C. Asselin-Paturel, M. Colonna, U. Kalinke.** 2002. Virus-induced Interferon- $\alpha$  production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signalling *in vivo*. *J. Exp. Med.* **195**: 507-516

**Baron S., S. K. Tying, W. R. Fleischmann Jr., D. H. Coppenhaver, D. W. Niesel, G. R. Klimpel, G. J. Stanton, T. K. Hughes.** 1991. The interferons. Mechanisms of action and clinical applications. *JAMA*. **266**: 1375-1383

**Barre-Sinoussi F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nuxeyre, S. Chamaret, J. Grest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. **220**: 868-871

**Bartlett E. J., V. S. Cull, E. N. Mowe, J. P. Mansfield, C. M. James.** 2003. Optimization of naked DNA delivery for Interferon subtype immunotherapy in Cytomegalovirus infection. *Biol. Proced. Online*. **5**: 43-52

**Bass B. L.** 1997. RNA editing and hypermutation by adenosine deamination. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 157-162

- Bauer S., C. J. Kirschning, H. Hacker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner, G. B. Lipford.** 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **31:** 9237-9242
- Beutler B.** 2004. Interferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature.* **430:** 257-263
- Biron C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, T. P. Salazar-Mather.** 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* **17:** 189-220.
- Boehm U., T. Klamp, M. Groot, J. C. Howard.** 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* **15:** 749-795
- Bradley D. S., J. J. Broen, W. A. Cafruny.** 1991. Infection of SCID mice with lactate dehydrogenase-elevating virus stimulates B-cell activation. *Viral. Immunol.* **4:** 59-70
- Brun-Vezinet F., C. Rouzioux, L. Montagnier, S. Chamaret, J. Gruest, F. Barre-Sinoussi, D. Geroldi, J. C. Chermann, J. McCormick, S. Mitchell, et al.** 1984. Prevalence of antibodies to lymphadenopathy-associated retrovirus in African patients with AIDS. *Science.* **226:** 453-456
- Cafruny W. A.** 1989. Lactate dehydrogenase-elevating virus: biology and pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.* **17:** 107-119
- Cafruny W. A. und Plagemann P. G.** 1982. Immune response to lactate dehydrogenase-elevating virus: isolation of infectious virus-immunoglobulin G complexes and quantitation of specific antiviral immuno-globulin G response in wild-type and nude mice. *Infect. Immun.* **37:** 1001-1006
- Chen W., H. Qin, B. Chesebro, M. A. Cheever.** 1996. Identification of a gag-encoded cytotoxic T-lymphocyte epitope from FBL-3 leukemia shared by Friend, Moloney, and Rauscher murine leukemia virus-induced tumors. *J. Virol.* **70:** 7773-7782
- Chesebro B., W. Britt, L. Evans, K. Wehrly, J. Nishio, M. Cloyd.** 1983. Characterization of monoclonal antibodies reactive with murine leukemia viruses: use in analysis of strains of friend MCF and Friend ecotropic murine leukemia virus. *Virology.* **127:**134-148
- Chesnut R. W. und Grey H. M.** 1986. Antigen presentation by B cells and its significance in T-B interactions. *Adv. Immunol.* **39:** 51-94
- Coccia E. M, M. Severa, E. Giacomini, D. Monneron, M. E. Remoli, I. Julkunen, M. Cella, R. Lande, G. Uze.** 2004. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **34:** 796-805
- Cohen B., D. Novick, S. Barak, M. Rubinstein.** 1995. Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Mol. Cell Biol.* **15:** 4208-4214

- Colamonici O., H. Yan, P. Domanski, R. Handa, D. Smalley, J. Mullersman, M. Witte, K. Krishnan, J. Krolewski.** 1994. Direct binding to and tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of the type I interferon receptor by p135tyk2 tyrosine kinase. *Mol. Cell Biol.* **14**: 8133-8142
- Colonna M., G. Trinchieri, Y. J. Liu.** 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* **5**: 1219-1226
- Coutelier J. P. und Van Snick J.** 1985. Isotypically restricted activation of B lymphocytes by lactic dehydrogenase virus. *Eur. J. Immunol.* **15**: 250-255.
- Coutelier J. P., E. Van-Roost, P. Lambotte, J. Van-Snick.** 1986. The murine antibody response to lactate dehydrogenase-elevating virus. *J. Gen. Virol.* **67**: 1099-1108
- Coutelier J. P., P. G. Coulie, P. Wauters, H. Heremans, J. T. Van der Logt.** 1990. *In vivo* polyclonal B-lymphocyte activation elicited by murine viruses. *J. Virol.* **64**: 5383-5388
- Cull V. S., S. Broomfield, E. J. Bartlett, N. L. Brekalo, C. M. James.** 2002. Coimmunisation with type I IFN genes enhances protective immunity against cytomegalovirus and myocarditis in gB DNA-vaccinated mice. *Gene Ther.* **9**: 1369-1378.
- Cull V. S., P. A. Tilbrook, E. J. Bartlett, N. L. Brekalo, C. M. James.** 2003. Type I interferon differential therapy for erythroleukemia: specificity of STAT activation. *Blood.* **101**: 2727-2735
- D'Andrea A.D.** 1992. The interaction of the erythropoietin receptor and gp55. *Cancer Surv.* **15**: 19-36
- Deonarain R., A. Alcamí, M. Alexiou, M. J. Dallmann, D. R. Gewert, A. C. G. Porter.** 2000. Impaired antiviral response and alpha/beta interferon induction in mice lacking beta interferon. *J. Virol.* **74**: 3404-3409
- Deonarain R., D. C. Chan, L. C. Platanias, E. N. Fish.** 2002. Interferon-alpha/beta-receptor interactions: a complex story unfolding. *Curr. Pharm. Des.* **8**: 2131-2137
- Deonarain R., D. Cerullo, K. Fuse, P. P. Liu, E. N. Fish.** 2004. Protective role for interferon-beta in coxsackievirus B3 infection. *Circulation.* **110**: 3540-3543
- de Wit R., J. K. Schattenkerk, C. A. Boucher, P. J. Bakker, K. H. Veenhof, S. A. Danner.** 1988. Clinical and virological effects of high-dose recombinant interferon-alpha in disseminated AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Lancet.* **2**: 1214-1217
- Diebold S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, C. Reis e Sousa.** 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science.* **5**: 1529-1531

- Dikopoulos N., A. Bertoletti, A. Kroger, H. Hauser, R. Schirmbeck, J. Reimann.** 2005. Type I IFN negatively regulates CD8+ T cell responses through IL-10-producing CD4+ T regulatory 1 cells. *J. Immunol.* **174**: 99-109
- Dittmer U. und K. J. Hasenkrug.** 2001. Cellular and molecular mechanisms of vaccine-induced protection against retroviral infections. *Curr. Mol. Med.* **1**: 431-436
- Dittmer U., B. Race, K. J. Hasenkrug.** 1999. Kinetics of the development of protective immunity in mice vaccinated with a live attenuated retrovirus. *J. Virol.* **76**: 450-454
- Dittmer U., D. M. Brooks, K. J. Hasenkrug.** 1999. Requirement for multiple lymphocyte subsets in protection by a live attenuated vaccine against retroviral infection. *Nat. Med.* **5**: 189-193
- Dittmer U., K. E. Peterson, R. Messer, I. M. Stromnes, B. Race, K. J. Hasenkrug.** 2001. Role of interleukin-4 (IL-4), IL-12, and gamma interferon in primary and vaccine-primed immune responses to Friend retrovirus infection. *J. Virol.* **75**: 654-660
- Du Buy H. G. und Johnson M. L.** 1965. Some properties of the lactic dehydrogenase agent of mice. *J. Exp. Med.* **122**: 587-600
- Du Buy H., S. Baron, C. Uhlendorf, M. L. Johnson.** 1973. Role of interferon in murine lactic dehydrogenase virus infection, *in vivo* and *in vitro*. *Infect. Immun.* **8**: 977-984
- Ebnet K., J. Chluba-de Tapia, U. Hurtenbach, M. D. Kramer, M. M. Simon.** 1991. *In vivo* primed mouse T cells selectively express T cell-specific serine proteinase-1 and the proteinase-like molecules granzyme B and C. *Int. Immunol.* **3**: 9-19
- Einat M., D. Resnitzky, A. Kimchi.** 1985. Close link between reduction of c-myc expression by interferon and, G0/G1 arrest. *Nature.* 1985. **313**: 597-600
- Enders J. F. und Peebles T. C.** 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **86**: 277-286
- Equils O., E. Faure, L. Thomas, Y. Bulut, S. Trushin, M. Arditi.** 2001. Bacterial lipopolysaccharide activates HIV long terminal repeat through Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* **166**: 2342-2347
- Equils O., M. L. Schito, H. Karahashi, Z. Madak, A. Yarali, K. S. Michelsen, A. Sher, M. Arditi.** 2003. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR9 signaling results in HIV-long terminal repeat trans-activation and HIV replication in HIV-1 transgenic mouse spleen cells: implications of simultaneous activation of TLRs on HIV replication. *J. Immunol.* **170**: 5159-5164
- Erlandsson L., R. Blumenthal, M. L. Eloranta, H. Engel, G. Alm, S. Weiss, T. Leanderson.** 1998. Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Curr. Biol.* **12**: 223-226

- Evans R. und Riley V.** 1968. Circulating interferon in mice infected with the lactate dehydrogenase-elevating virus. *J. Gen. Virol.* **3**: 449-452
- Even C., R. R. Rowland, P. G. Plagemann.** 1995. Cytotoxic T cells are elicited during acute infection of mice with lactate dehydrogenase-elevating virus but disappear during the chronic phase of infection. *J. Virol.* **69**: 5666-5676
- Faarberg K. S. und Plagemann P. G.** 1995. Cell surface receptors for lactate dehydrogenase-elevating virus and their topography in membranes. *Virology.* **212**: 512-525
- Faarberg K. S., C. Even, G. A. Palmer, P. G. Plagemann.** 1995. Disulfide bond between two envelope proteins of lactate dehydrogenase-elevating virus are essential for virus infectivity. *J. Virol.* **69**: 613-617
- Fasler-Kan E., A. Pansky, M. Wiederkehr, M. Battegay, H. M. Heim.** 1998. Interferon-alpha activates signal transducers and activators of transcription 5 and 6 in Daudi cells. *Eur. J. Biochem.* **254**: 514-519
- Fawaz L. M. , E. Sharif-Askari, J. Menezes.** 1999. Up-regulation of NK cytotoxic activity via IL-15 induction by different viruses: a comparative study. *J. Immunol.* **15**: 4473-4480
- Findlay G. und MacCallum F.** 1937. An interference phenomenon in relation to yellow fever and other viruses. *J. Path. Bact.* **44**: 405-424
- Finke D. und Acha-Orbea H.** 2001. Immune response to murine and feline retroviruses. In: *Retroviral immunology: Immune response and restoration.* Pantaleo G. und Walker B. D. (eds.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 125-157
- Friend C.** 1957. Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *J. Exp. Med.* **105**: 307
- Gaines K. L., S. G. Kayes, G. L. Wilson.** 1987. Factors affecting the infection of the D variant of encephalomyocarditis virus in the B cells of C57BL/6J mice. *Diabetologica* **30**: 419-425
- Gallo R. C.** (1986). HTLV: the family of human T-lymphotropic retroviruses and their role in leukemia and AIDS. *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.* **3**: 265-267
- Garcia-Sanz J. A., H. R. MacDonald, D. E. Jenne, J. Tschopp, M. Nabholz.** 1990. Cell specificity of granzyme gene expression. *J. Immunol.* **145**: 3111-3118
- Garrison T. L., F. Hung, L. Izotova, T. Lavoie, F. V. Lee-Own.** 2002. ELISA measurements of interferons. *Bio. Techniques.* **33**: 98-100
- Goodbourn S., L. Didcock, R. E. Randall.** 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and viral countermeasures. *J. Gen. Virol.* **81**: 2341-2364

- Gosselin J., A. Tomolu, R. C. Gallo, L. Flamand.** 1999. Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response. *Blood*. **15**: 4210-4219
- Greaves M. F., J. J. T. Owe, M. C. Raff.** (1973). T and B Lymphocytes: Origins, properties and Roles in Immune Response. *Experpta Medica*, Amsterdam
- Harada H., M. Matsumoto, M. Sato, Y. Kashiwazaki, T. Kimura, M. Kitagawa, T. Yokochi, R. S. Tan, T. Takasugi, Y. Kadokawa, C. Schindler, R. D. Schreiber, S. Noguchi, T. Taniguchi.** 1996. Regulation of IFNalpha/beta genes: evidence for a dual function of the transcription factor complex ISGF3 in the production and action of IFNalpha/beta. *Genes Cells*. **11**: 995-1005
- Harle P., V. Cull, M. P. Agbaga, R. Silverman, B. R. Williams, C. James, D. J. Carr.** 2002. Differential effect of murine alpha/beta interferon transgenes on antagonization of herpes simplex virus type 1 replication. *J. Virol*. **76**: 6558-6567
- Hasenkrug K. J. und Chesebro B.** 1997. Immunity to retroviral infection: the Friend virus model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 7811-7816
- Hasenkrug K. J., D. M. Brooks, M. N. Robertson, R. V. Srinivas, B. Chesebro.** 1998. Immunoprotective determinants in Friend Murine Leukemia Virus envelope protein. *Virology*. **248**: 66-73
- Hata N., M. Sato, A. Takaoka, M. Asagiri, N. Tanaka, T. Taniguchi.** 2001. Constitutive IFNalpha/beta signal for efficient IFNalpha/beta gene induction by virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **285**: 518-525
- Hayashi T., H. Iwata, T. Hasegawa, M. Ozaki, H. Yamamoto, T. Onodera.** 1991. Decrease in neutrophil migration induced by endotoxin and suppression of interleukin-1 production by macrophages in lactic dehydrogenase virus-infected mice. *J. Comp. Pathol*. **104**: 161-170
- Heil F., P. Ahmad-Nejad, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, T. Gellert, H. Dietrich, G. Lipford, K. Takeda, S. Akira, H. Wagner, S. Bauer.** 2003. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol*. **33**: 2987-2997
- Heil F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, S. Bauer.** 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. **5**: 1526-1529
- Hemmi H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, S. Akira.** 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. **7**: 740-745
- Heng J. K. M., P. Price, C. M. Lai, M. W. Beilharz.** 1996. Alpha/beta interferons increase host resistance to murine AIDS. *J. Virol*. **70**: 4571-4582
- Hibbert L. und Foster G. R.** 1999. Human type I interferons differ greatly in their effects on the proliferation of primary B cells. *J. Interferon Cytokine Res*. **19**: 309-318

- Hilkens C. M., J. F. Schlaak, I. M. Kerr.** 2003. Differential responses to IFN $\alpha$  subtypes in human T cells and dendritic cells. *J. Immunol.* 2003. **171**: 5255-5263
- Hoatlin M. E. and Kabat D.** 1995. Host-range control of a retroviral disease: Friend erythroleukemia. *Trends Microbiol.* **3**: 51-57
- Hoatlin M. E., S. L. Kozak, F. Lilly, A. Chakraborti, C. A. Kozak, D. Kabat.** 1990. Activation of erythropoietin receptors by Friend viral gp55 and by erythropoietin and downmodulation by the murine Fv-2r resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 9985-9989
- Horisberger M. A.** 1995. Interferons, Mx genes, and resistance to influenza virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**: 67-71
- Hornung V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres, G. Hartmann.** 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* **1**: 4531-4537
- Hornung V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres, G. Hartmann.** 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science.* **10**: 994-997
- Hoskins M.** 1935. A protective action of neurotropic against viscerotropic yellow fever virus in *Macacus rhesus*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* **15**: 675-680
- Hovinen D. E., D. S. Bradley, W. A. Cafruny.** 1990. Analysis of immunoglobulin isotype blood levels, splenic B-cell phenotypes, and spleen cell immunoglobulin gene expression in mice infected with lactate dehydrogenase-elevating virus. *Viral. Immunol.* **3**: 27-40
- Isaacs A. und Lindenmann J.** 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc. RSoc. Lond. B. Biol. Sci.* **12**: 258-67
- Iwanami N., A. Niwa, Y. Yasutomi, N. Tabata, M. Miyazawa.** 2001. Role of natural killer cells in resistance against friend retrovirus-induced leukemia. *J. Virol.* **75**: 3152-5163
- Iwasaki A. und Medzhitov R.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**: 987-995
- Jarrett W. F. H., E. M. Crawford, W. B. Martin, and F. A. Davie.** 1964. A virus-like particle associated with leukaemia (lymphosarcoma). *Nature.* **202**: 567-568
- Jurk M., F. Heil, J. Vollmer, C. Schetter, A. M. Krieg, H. Wagner, G. Lipford, S. Bauer.** 2002. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat. Immunol.* **3**: 499
- Kabat D.** 1989. Molecular biology of Friend virus erythroleukemia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **148**: 1-42

- Kaser A., B. Enrich, O. Ludwiczek, W. Vogel, H. Tilg.** 1999. Interferon-alpha (IFNalpha) enhances cytotoxicity in healthy volunteers and chronic hepatitis C infection mainly by the perforin pathway. *Clin. Exp. Immunol.* **118**: 71-77
- Kato H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi, S. Akira.** 2005. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity.* **23**: 19-28
- Kawai T., S. Sato, k. J. Ishii, C. Coban H. Hemmi, M. Yamamoto, K. Terai, M. Matsuda, J. Inoue, S. Uematsu, O. Takeuchi, S. Akira.** 2004. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat. Immunol.* **10**:1061-1068
- Kelley K. A. und Pitha P. M.** 1985. Characterization of a mouse interferon gene locus I. Isolation of a cluster of four alpha interferon genes. *Nucleic Acids Res.* **13**: 805-823
- Kochs G. und Haller O.** 1999. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2**: 2982-2986
- Koi M., M. Saito, T. Ebina, N. Ishida.** 1981. Lactate dehydrogenase-elevating agent is responsible for interferon induction and enhancement of natural killer cell activity by inoculation of Ehrlich ascites carcinoma cells into mice. *Microbiol. Immunol.* **25**: 565-574.
- Koyama T., N. Sakamoto, Y. Tanabe, M. Nakagawa, Y. Itsui, Y. Takeda, S. Kakinuma, Y. Sekine, S. Maekawa, Y. Yanai, M. Kurimoto, M. Watanabe.** 2006. Divergent activities of interferon-alpha subtypes against intracellular hepatitis C virus replication. *Hepatology. Res.* **34**: 41-49
- Krieg A. M.** 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 709-760
- Krieg A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, D. M. Klinman.** 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* **6**: 546-549
- Kumar R. und Atlas I.** 1992. Interferon alpha induces the expression of retinoblastoma gene product in human Burkitt lymphoma Daudi cells: role in growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**: 6599-6603
- Lander M. R., S. K. Chattopadhyay.** 1984. A *Mus dunni* cell line that lacks sequences closely related to endogenous murine leukemia viruses and can be infected by ectropic, amphotropic, xenotropic, and mink cell focus-forming viruses. *J. Virol.* **52**: 695-698
- Latz E., A. Visintin, T. Espevik, D. T. Golenbock.** 2004. Mechanisms of TLR9 activation. *J. Endotoxin Res.* **10**: 406-412

- Lau J. F. und Horvath C. M.** 2002. Mechanisms of Type I interferon cell signaling and STAT-mediated transcriptional responses. *Mt. Sinai. J. Med.* **69**: 256-268
- Lawson C. M., W. S. Yeow, C. M. Lee, M. W. Beilharz.** *In vivo* expression of an interferon-alpha gene by intramuscular injection of naked DNA. *J. Interferon Cytokine Res.* **17**: 255-261
- Le Bon A. and Tough D. F.** 2002. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr. Opin. Immunol.* **14**: 432-436
- Lee J., T. H. Chuang, V. Redecke, L. She, P. M. Pitha, D. A. Carson, E. Raz, H. B. Cottam.** 2003. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: 6646-6651
- Leonard W. J. und O'Shea J. J.** 1998. Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 293-322
- Levy D. E. und Darnell J. E. Jr.** 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**: 651-662
- Levy J. A., A. D. Hoffman, S. M. Kramer, J. A. Landis, J. M. Shimabukuro, L. S. Oshiro.** 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science.* **225**: 840-842
- Lewerenz M., K. E. Mogensen, G. Uze.** 1998. Shared receptor components but distinct complexes for alpha and beta interferons. *J. Mol. Biol.* **282**: 585-599.
- Li J. P., A. D. D'Andrea, H. F. Lodish, D. Baltimore.** 1990. Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor. *Nature.* **343**: 762-764
- Li X., B. Hu, J. Harty, C. Even, P. G. Plegemann.** 1990. Polyclonal B cell activation of IgG2a and IgG2b production by infection of mice with lactate dehydrogenase-elevating virus is partly dependent on CD4+ lymphocytes. *Viral. Immunol.* **3**: 273-288.
- Liang B., J. Y. Wang, R. R. Watson.** 1996. Murine AIDS, a key to understanding retrovirus-induced immunodeficiency. *Viral. Immunol.* **9**: 225-239
- Liu Y. J.** 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* **23**: 275-306
- Linial M. L.** 1999. Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J. Virol.* **73**: 1747-1755
- Lobigs M., A. Müllbacher, A. Wang, M. Pavy, E. Lee.** 2003. Role of type I and type II interferon responses in recovery from infection with an encephalitic flavivirus. *J. Gen. Virol.* **84**: 567-572

- Lu R., W. C. Au, W. S. Yeow, N. Hageman, P. M. Pitha.** 2000. Regulation of the promoter activity of interferon regulatory factor-7 gene. Activation by interferon and silencing by hypermethylation. *J. Biol. Chem.* **41**: 31805-31812
- Lund J. M., L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N. C. Adams, N. W. Gale, A. Iwasaki, R. A. Flavell.** 2001. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **13**: 5598-5603
- Mandal M., D. Bandyopadhyay, T. M. Goepfert, R. Kumar.** 1998 Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21WAF1 and p27Kip1 that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK). *Oncogene.* **16**: 217-225
- Marie I., J. E. Durbin, D. E. Levy.** 1998. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* **16**: 6660-6669
- Marrack P., J. Kappler, T. Mitchell.** 1999. Type I interferons keep activated T cells alive. *J. Exp. Med.* **1**: 521-530
- Matsumoto M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, T. Seya.** 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* **15**: 3154-3162
- Mertz J. A., M. S. Simper, M. M. Lozano, S. M. Payne, J. P. Dudley.** 2005. Mouse mammary tumor virus encodes a self-regulatory RNA export protein and is a complex retrovirus. *J. Virol.* **79**: 14737-14747
- Miller S. A., A. J. Brown, M. C. Farach-Carson, C. B. Kirn-Safran.** 2003. HIP/ROL29 down-regulation accompanies terminal chondrocyt differentiation. *Differentiation.* **71**: 322-336
- Miyazawa M., J. Nishio, B. Chesebro.** 1988. Genetic control of a cell responsiveness to the Friend murine leukemia virus envelope antigen. Identification of class II loci of the H-2 as immune response genes. *J. Exp. Med.* **168**: 1587-1605
- Modrow S., F. Falke, U. Truyen.** 2003. *Molekulare Virologie.* Spektrum Verlag
- Moloney J. B.** 1960. Biological studies on a lymphoid leukemia virus extracted from sacroma 537 I. Origin and introductory investigations. *J. Natl. Cancer Inst.* **24**: 933
- Monteyne P., J. Van-Broeck, J. Van Snick, J. P. Coutelier.** 1993. Inhibition by lactate dehydrogenase-elevating virus of *in vivo* interleukin 4 production during immunization with keyhole limpet haemocyanin. *Cytokine.* **5**: 394-397
- Montoya M., G. Schiavoni, F. Mattei, I. Gresser, F. Belardelli, P. Borrow, D. F. Tough.** 2002. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood.* **99**: 3263-3271

- Mori S., A. Jewett, M. Cavalcanti, K. Murakami-Mori, S. Nakamura, B. Bonavida.** 1998. Differential regulation of human NK cell-associated gene expression following activation by IL-2, IFNalpha and PMA/ionomycin. *Int. J. Oncol.* **12**: 1165-1170
- Mori M., M. Yoneyama, T. Ito, K. Takahashi, F. Inagaki, T. Fujita.** 2004. Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J. Biol. Chem.* **12**: 9698-9702
- Müller U., U. Steinhoff, L. F. L. Reis, S. Hemmi, J. Pavlovic, R. M. Zinkernagel, M. Aguet.** 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science.* **264**: 1918-1920
- Nagata S., H. Taira, A. Hall, L. Johnsrud, M. Streuli, J. Ecsodi, W. Boll, K. Cantell, C. Weissmann.** 1980. Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Biotechnology.* **1992**: 299-303
- Nishigaki K., D. Thompson, C. Hanson, T. Yugawa, S. Ruscetti.** 2001. The envelope glycoprotein of Friend Spleen Focus-Forming Virus covalent interacts with and constitutively activates a truncated form of the receptor tyrosine kinase Stk. *J. Virol.* **75**: 7893-7903
- Novick D., B. Cohen, M. Rubinstein.** 1994. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell.* **6**: 391-400
- Olbrich A. R., S. Schimmer, K. Heeg, K. Schepers, T. N. Schumacher, U. Dittmer.** 2002. Effective postexposure treatment of retrovirus-induced disease with immunostimulatory DNA containing CpG motifs. *J. Virol.* **76**: 11397-11404
- Ogasawara K., K. Takeda, W. Hashimoto, M. Satoh, R. Okuyama, N. Yanai, M. Obinata, K. Kumagai, H. Takada, H. Hiraide, S. Seki.** 1998. Involvement of NK1+ T cells and their IFNgamma production in the generalized Shwartzman reaction. *J. Immunol.* **1**: 3522-3527
- Oritani K., P. W. Kincade, C. Zhang, Y. Tomiyama, Y. Matsuzawa.** 2001. Type I interferons and limitin: a comparison of structures, receptors, and functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* **12**: 337-348
- Parnes J. R.** 1989. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv. Immunol.* **44**: 265-311
- Pear W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott, D. Baltimore.** 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 8392-8396.
- Persons D. A., R. F. Paulson, M. R. Loyd, M. T. Herley, S. M. Bodner, A. Bernstein, P. H. Correll, P. A. Ney.** 1999. Fv2 encodes a truncated form of the Stk receptor tyrosine kinase. *Nat. Genet.* **23**: 159-165
- Pestka S., C. D. Krause, M. R. Walter.** 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* **202**: 8-32

- Peterson K. E., M. Iwashiro, K. J. Hasenkrug, B. Chesebro.** 2000. Major histocompatibility complex class I gene controls the generation of gamma interferon-producing CD4(+) and CD8(+) T cells important for recovery from friend retrovirus-induced leukemia. *J. Virol.* **74**: 5363-5367
- Plagemann P. G., M. Watanabe, H. E. Swim.** 1962. Plasma lactic dehydrogenase-elevating agent of mice: effect on levels of additional enzymes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**: 749-754
- Plagemann P. G., R. R. Rowland, C. Even, K. S. Faaberg.** 1995. Lactate dehydrogenase-elevating virus, an ideal persistent virus? *Springer Semin. Immunopathol.* **17**: 167-186
- Platanias L. C. und Golomb H. M.** 1993. Hairy cell leukaemia. *Baillieres Clin. Haematol.* **6**: 887-898
- Popovic M., M. G. Sarngadharan, E. Reax, R. C. Gallo.** (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science.* **224**: 497-500
- Prejean C. und Colamonici O. R.** 2000. Role of the cytoplasmic domains of the type I interferon receptor subunits in signaling. *Semin. Cancer Biol.* **10**: 83-92
- Rassa J. C, J. L. Meyers, Y. Zhang, R. Kudaravalli, S. R. Ross.** 2002. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 2281-2286.
- Rauscher F.** 1962. A virus-induced disease of mice characterized by erythropoiesis and lymphoid leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* **192**: 515-543
- Ravaud A. und Dilhuydy M. S.** 2005. Interferon alpha for the treatment of advanced renal cancer. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **5**: 749-762
- Reiter Z.** 1993. Interferon- $\alpha$  major regulator of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J. Interferon Res.* **13**: 247-257
- Riley V., F. Lilly, E. Huerto, D. Bardell.** 1960. Transmissible agent associated with 26 types of experimental mouse neoplasms. *Science.* **132**: 545-547
- Robertson M. N., M. Miyazawa, S. Mori, B. Caughey, L. H. Evans, S. F. Hayes, B. Chesebro.** 1991. Production of monoclonal antibodies reactive with a denatured form of the Friend murine leukemia virus gp70 envelope protein: use in a focal infectivity assay, immunohistochemical studies, electron microscopy and western blotting. *J. Virol. Methods.* **34**: 255-271
- Rodenburg M., M. Fischer, A. Engelmann, S. O. Harbers, M. Ziegler, J. Lohler, C. Stocking.** 2007. Importance of receptor usage, Fli1 activation, and mouse strain for the stem cell specificity of 10A1 murine leukemia virus leukemogenicity. *J. Virol.* **82**: 732-742

- Rothenfusser S., N. Goutagny, G. DiPerna, M. Gong, B. G. Monks, A. Schoenemeyer, M. Yamamoto, S. Akira, K. A. Fitzgerald.** 2005. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J. Immunol.* **175**: 5260-5268
- Rous P.** 1911. A sacroma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* **13**: 397-399
- Rowson K. E.** 1980. A new host species for lactic dehydrogenase virus. *Experientia.* **36**: 1066-1067
- Rowson K. E. und Mahy B. W.** 1975. Lactic dehydrogenase virus. *Virol. Monogr.* **13**: 1-121
- Ruscetti S. K.** 1995. Erythroleukaemia induction by the Friend spleen focus-forming virus. *Baillieres Clin. Haematol.* **8**: 225-247
- Russell-Harde D., T. C. Wagner, H. D. Perez, E. Croze.** 1999. Formation of a uniquely stable type I interferon receptor complex by interferon beta is dependent upon particular interactions between interferon beta and its receptor and independent of tyrosine phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**: 539-544
- Salzberg S., T. Hyman, H. Turm, Y. Kinar, Y. Schwartz, U. Nir, F. Lejbkowitz, E. Huberman.** 1997. Ectopic expression of 2-5A synthetase in myeloid cells induces growth arrest and facilitates the appearance of a myeloid differentiation marker. *Cancer Res.* **57**: 2732-2740
- Sato M., N. Hata, M. Asagiri, T. Nakaya, T. Taniguchi, N. Tanaka.** 1998. Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett.* **11**: 106-110
- Schein H. M. und Ender J. F.** 1962 : Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **48**: 1164-1172
- Schneider-Schaulies S., J. Schneider-Schaulies, A. Schuster, M. Bayer, J. Pavlovic, V. ter Meulen.** 1994. Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J. Virol.* **8**: 6910-6917
- Schwemmler M., K. C. Weining, M. F. Richter, B. Schumacher, P. Staeheli.** 1995. Vesicular stomatitis virus transcription inhibited by purified MxA protein. *Virology.* **10**: 545-554
- Shimizu T., H. Uenishi, Y. Teramura, M. Iwashiro, K. Kuribayashi, H. Tamamura, N. Fujii, H. Yamagishi.** 1994. Fine structure of a virus-encoded helper T-cell epitope expressed on FBL-3 tumor cells. *Virology.* **68**: 7704-7708
- Shiow L. R., D. B. Rosen, N. Brdickova, Y. Xu, J. An, L. L. Lanier, J. G. Cyster, M. Matloubian.** 2006. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature.* **440**: 540-544

- Shirazi Y. and Pitha P. M.** 1992. Alpha interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type-1 replication cycle. *J. Virol.* **66**: 1321-1328
- Shirazi Y. und Pitha P. M.** 1993. Interferon- $\alpha$ -mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 provirus synthesis in T-cells. *Virology* **193**: 303-312
- Shoji S., M. Kurata, A. Makita, H. Hosoi, T. Sakai, H. Takikawa, K. Miyake, M. Yamanaka, A. Kato.** 1991. Clinical study on long-term treatment of chronic hepatitis C with interferon. *Nippon. Shokakibyō. Gakkai. Zasshi.* **88**: 706-713
- Shuai K., A. Ziemiecki, A. F. Wilks, A. G. Harpur, H. B. Sadowski, M. Z. Gilman, J. E. Darnell.** 1993. Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature.* **9**: 580-583
- Sidwell R. W., J. D. Morrey, K. M. Okleberry, R. A. Burger, R. P. Warren.** 1993. Immunomodulator effects on the Friend Virus infection in genetically defined mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **23**: 432-446
- Sidwell R. W., R. P. Warren, K. M. Okleberry, R. A. Burger, J. D. Morrey.** 1995. Effect of combination of Interferon- $\alpha$  and Stavudine on Friend Virus infection in (B10.A x A.By) $F_1$  mice. *J. Infect. Dis.* **171**: 93-98
- Siegal F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, Y. J. Liu.** 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science.* **284**: 1835-1837
- Silverman, R. H.** 1997. 2–5A-dependent RNase L: a regulated endoribonuclease in the interferon system. In *Ribonucleases: Structure and Function*, 515-551. G. D'Alessio und J. F. Riordan (eds.). New York: Academic Press
- Sourvinos G., C. Tsatsanis, D. A. Spandidos.** 2000. Mechanisms of retrovirus-induced oncogenesis. *Folia. Biol. (Praha)* **46**: 226-232
- Staehele P., F. Pitossi, J. Pavlovic.** 1993. Mx proteins: GTPases with antiviral activity. *Trends Cell Biol.* **3**: 268-272
- Stoye J. P.** 1998. Fv1, the mouse retrovirus resistance gene. *Rev. Sci. Tech.* **17**: 269-277
- Stranden A. M., P. Staeheli, J. Pavlovic.** 1993. Function of the mouse Mx1 protein is inhibited by overexpression of the PB2 protein of influenza virus. *Virology.* **197**: 642-651
- Strander H., K. Cantell, G. Carlstrom, S. Ingimarsson, P. Jakobsson, U. Nilsson.** 1976. Acute infections in interferon-treated patients with osteosarcoma: preliminary report of a comparative study. *J. Infect. Dis.* **133**: 245-248
- Strestik B. D., A. R. Olbrich, K. J. Hasenkrug, U. Dittmer.** 2001. The role of IL-5, IL-6 and IL-10 in primary and vaccine-primed immune responses to infection with Friend retrovirus (Murine leukaemia virus). *J. Gen. Virol.* **82**: 1349-1354

- Stromnes I. M., U. Dittmer, T. N. M. Schumacher, K. Schepers, R. J. Messer, L. H. Evans, K. E. Peterson, B. Race, K. J. Hasenkrug.** 2002. Temporal effects of gamma Interferon deficiency on the course of Friend Retrovirus infection in mice. *J. Virol.* **76**: 2225-2232
- Theofilopoulos A. N., R. Baccala, B. Beutler, D. H. Kono.** 2005. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* **23**: 307-336
- Toniutto P., C. Fabris, M. Pirisi.** 2006. Antiviral treatment of hepatitis C. *Expert. Opin. Pharmacother.* **7**: 2025-2035
- Toyoshima K. und Vogt P. K.** 1969. Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology.* 1969. **38**: 414-426
- Van den Broek M. F., U. Müller, S. Huang, M. Aguet, R. M. Zinkernagel.** 1995. Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *J. Virol.* **69**: 4792-4796
- Van der Gaag H. C. und Axelrad A. A.** 1990. Friend virus replication in normal and immunosuppressed C57BL/6 mice. *Virology.* **177**: 837-839
- Van Pesch V., H. Lanaya, J. C. Renaud, T. Michiels.** 2004. Characterization of the murine alpha interferon gene family. *J Virol.* **78**: 8219-8228
- Veals S. A., C. Schindler, D. Leonard, X. Y. Fu, R. Aebersold, J. E. Darnell Jr., D. E. Levy.** 1992. Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol.* **12**: 3315-3324
- Verhagen A., I. R. Mackay, M. Rowley, M. Tymms.** 1990. Comparison of augmentation of human killer cell cytotoxicity by interferon-alpha subtypes. *Nat. immun. Cell Growth Regul.* **9**: 325-333
- Wang X., M. Chen, K. P. Wandinger, G. Williams, S. Dhib-Jalbut.** 2000. IFNbeta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: relevance to IFNbeta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis. *J. Immunol.* **165**: 548-557
- Yan H., F. Piazza, K. Krishnan, R. Pine, J. J. Krolewski.** 1998. Definition of the interferon-alpha receptor-binding domain on the TYK2 kinase. *J. Biol. Chem.* **13**: 4046-4051
- Yeow W. S., C. M. Lawson, M. W. Beilharz.** 1998. Antiviral activities of individual murine IFNalpha subtypes *in vivo*: intramuscular injection of IFN expression constructs reduces cytomegalovirus replication. *J. Immunol.* **160**: 2932-2939
- Yoneyama M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, T. Fujita.** 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* **5**: 730-737

**Zelinsky G., S. Balkow, S. Schimmer, K. Schepers, M. M. Simon, U. Dittmer.** 2004. Independent roles of perforin, granzymes, and Fas in the control of Friend retrovirus infection. *Virology*. **330**: 365-374

**Zelinsky G., S. J. Robertson, S. Schimmer, R. J. Messer, K. J. Hasenkrug, U. Dittmer.** 2005. CD8+ T-cell dysfunction due to cytolytic granule deficiency in persistent Friend retrovirus infection. *J. Virol.* **79**: 10619-10626.

**Zuniga E. I. , D. B. McGavern, J. L. Pruneda-Paz, C. Teng, M. B. Oldstone.** 2004. Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nat. Immunol.* **5**: 1227-1234

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
7AAD	7-Amino-Actinomycin D
Abb.	Abbildung
ADAR	Adenosindeaminase
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
AIDS	„Acquired Immune Deficiency Syndrome“
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zellen
APC-konjugiert	Allophycocyanin-konjugiert
Asn	Asparagin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CD	Lymphozytendifferenzierungsgruppe
CpG-ODN	Oligodesoxynukleotide mit CpG-Motiv
CTL	Zytotoxische T-Zellen
DC	Dendritische Zellen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelstrang-RNA
EAVF9	Equine Arteritisvirus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
Env	Hüllprotein
FACS	„Fluorescence Activated Cells Scanner“

---

	(Durchflusszytometer)
FCS	Fötale Kälberserum
FFU	„Focus Forming Units“
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
F-MuLV	„Friend Murine Leukemia Virus“
FV	Friend Virus
g	Gramm
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCV	Hepatitis C Virus
HAART	„Highly Active Antiretrovirale Therapy“
HIV-1	„Human Immunodeficiency Virus Typ 1“
HIV-2	„Human Immunodeficiency Virus Typ 2“
HRP	„Horse Radish Peroxidase“
HSV	Herpes simplex Virus
HTLV-1	„Human T-Cell Leukemia Virus-1“
IAV	Influenza A Virus
ID <sub>50</sub>	„Median Infective Dose“
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- $\alpha$ Rezeptor
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
IRF	Interferon-regulatorischer Faktor
ISDR	Interferon-sensitivitätsbestimmende Region
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
ISGF	Interferon-stimulierter Genfaktor
ISRE	Interferon-stimulierende regulatorische Elemente
i.v.	Intravenös
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton

---

I	Liter
LDV	Lactase-induzierendes Virus
LTR	„Long Terminal Repeat“
M	Molar
MCMV	Maus Zytomegalievirus
MDA-5	„Melanoma Differentiation Associated Gene 5“
mDCs	myeloide Dendritische Zelle
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
MMTV	Maus-Mammatumor-Virus
Mo-MuLV	Moloney-Mäuseläukemievirus
mRNA	„messenger RNA“
NFκB	„Nuclear Factor κB“
NK	Natürliche Killerzellen
OA	Oligoadenylate
OAS	Oligoadenylatsynthase
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodeoxynukleotid
PAMPs	„Pathogen-Associated Molecular Patterns“
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDC	plasmacytoide Dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
pH	$-\log [H^+]$
PKR	Proteinkinase R
Pol	Polymerase
Poly (I:C)	Polyinositolcytidinsäure
PRP	„Pathogen Recognition Receptors“
PRRS	„Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus“
qPCR	quantitative PCR

---

RIG-I	„Retinoic Acid Inducible Gene I“
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rpm	Umdrehung pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RSV	Respiratorisches Syncytialvirus
RT	Raumtemperatur
SARS	„Severe Acute Respiratory Syndrome“
Ser	Serin
SFFU	„Spleen Focus Forming Units“
SFV	Simian Foemy Virus
SHFV	„Simian Haemorrhagic Fever Virus“
SIV	„Simian Immunodeficiency Virus“
ssRNA	Einzelstrang-RNA
STAT	„Signal Transducer and Activator of Transcription“
SV5	Simian Parainfluenza Virus
Tab.	Tabelle
TGF	„Transforming Growth Factors“
Th	T-Helferzellen
Thr	Threonin
TIR	Toll-Like (IL)-1 Rezeptor
TLR	Toll-Like Rezeptor
Tm	Schmelztemperatur
TNF- $\alpha$	Tumornekrosfaktor- $\alpha$
Tyk	Tyrosinkinase
U	Units
u.a.	unter anderem
Vol.	Volumen
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
Y10.A	(B.10A x A.BY)F1-Generation
Y10	(B10 x A.BY)F1-Generation
z.B.	zum Beispiel

## 8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Schematische Darstellung der Typ I Interferon Induktion durch Toll-Like-Rezeptoren, RIG-I und MDA-5.....	8
Abbildung 1.2	Schematische Abbildung des Typ I Interferon Komplexes.....	9
Abbildung 1.3	Schematische Darstellung des IFN $\alpha$ / $\beta$ Signalwegs.....	11
Abbildung 1.4	Aufbau eines Arteriviruspartikels.....	18
Abbildung 1.5	Schätzung HIV-positiver Erwachsener und Kinder 2006.....	22
Abbildung 1.6	Typischer Aufbau eines Orthoretrovirus.....	24
Abbildung 1.7	Aufbau von einfachen und komplexen Retroviren.....	25
Abbildung 1.8	Der Replikationszyklus von Gammaretroviren.....	28
Abbildung 1.9	Einteilung der unterschiedlichen Stadien einer Splenomegalie nach FV-Infektion.....	33
Abbildung 2.1	Schematische Darstellung des Plasmids pkCMV und der enthaltenen Sequenzen der IFN $\alpha$ Subtypen-Gene.....	51
Abbildung 2.2	Schematische Darstellung des pCRII-Topo F-MuLV.....	52
Abbildung 3.1	Aufbau des Tetramers am Beispiel von MHC Klasse II Molekülen.....	61
Abbildung 4.1	Antiviraler Effekt von IFN $\alpha$ und IFN $\beta$ <i>in vitro</i> .....	71
Abbildung 4.2	Kinetik von IFN $\alpha$ und IFN $\beta$ nach FV-Infektion.....	73
Abbildung 4.3	Die akute FV-Infektion in IFN $\beta$ - und IFNAR-defizienten Mäusen.....	75
Abbildung 4.4	IFN $\alpha$ Produktion nach FV-Infektion in IFN $\beta$ - und IFNAR-defizienten Mäusen.....	76
Abbildung 4.5	Versuchsablauf der rekombinanten humanen IFN $\alpha$ A/D Gabe während der akuten FV-Infektion susceptibler Mäuse.....	77
Abbildung 4.6	IFN $\alpha$ Therapie in der akuten FV-Infektion.....	80
Abbildung 4.7	B-, NK- und T-Zell Population in IFN $\beta$ - und IFNAR-defizienten Mäusen nach FV-Infektion.....	82
Abbildung 4.8	FV-bindende Antikörpertiter in IFN $\beta$ <sup>-/-</sup> und IFNAR <sup>-/-</sup> Mäusen nach FV-Infektion.....	83
Abbildung 4.9	Persistierende FV-Infektion in IFN $\beta$ - und IFNAR- defizienten Mäusen.....	84
Abbildung 4.10	Versuchsablauf der rekombinanten humanen IFN $\alpha$ A/D in der	

---

	chronischen Phase der FV-Infektion.....	85
Abbildung 4.11	IFN $\alpha$ Therapie in der chronischen Phase der FV-Infektion.....	86
Abbildung 4.12	IFN $\alpha$ Produktion in LDV-infizierten (B10.A x A.BY)F <sub>1</sub> Mäusen...	88
Abbildung 4.13	Antivirale Effekte der IFN $\alpha$ Subtypen <i>in vitro</i> .....	90
Abbildung 4.14	Quantifizierung von mRNA für Gesamt-IFN $\alpha$ und IFN Subtypen.....	92
Abbildung 4.15	Quantifizierung von FV-mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion.....	93
Abbildung 4.16	Versuchsablauf der IFN $\alpha$ Subtypen Gabe während der akuten FV-Infektion susceptibler Mäuse.....	94
Abbildung 4.17	Milzgewicht von FV-infizierten Mäusen nach IFN $\alpha$ Subtypen Therapie.....	95
Abbildung 4.18	Infizierte Zellen pro Milz von FV-infizierten Mäusen nach IFN $\alpha$ Subtypen Therapie.....	96
Abbildung 4.19	Infizierte Zellen im Blut und infizierte Erythroblastenzellen in der Milz von FV-infizierten Mäusen nach IFN $\alpha$ Subtypen Therapie.....	99
Abbildung 4.20	CD8 <sup>+</sup> -, CD4 <sup>+</sup> - und NK <sup>+</sup> -Zell Analyse in IFN $\alpha$ Subtypen behandelten Mäusen während der akuten FV-Infektion.....	104
Abbildung 4.21	Expression von TLR3, TLR4, TLR9, RIG-I, PKR und OAS1a durch IFN $\alpha$ Subtypen.....	106
Abbildung 5.1	Sequenzvergleich der IFN $\alpha$ Subtypen IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 4, IFN $\alpha$ 6 und IFN $\alpha$ 9.....	113

### 8.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Humane und murine IFN $\alpha$ / $\beta$ Gene.....	4
Tabelle 1.2	Charakteristische Merkmale des humanen und murinen IFN $\alpha$ / $\beta$ ....	5
Tabelle 1.3	Charakteristische Vertreter der Arteriviren.....	17
Tabelle 1.4	Taxonomie der Retroviridae.....	26
Tabelle 1.5	Charakteristische Merkmale von murinen Retroviren.....	29
Tabelle 2.1	Verwendete Geräte.....	37
Tabelle 2.2	Verwendete Materialien.....	38
Tabelle 2.3	Verwendete Zytokine.....	40
Tabelle 2.4	Puffer und Medien.....	41
Tabelle 2.5	Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	45
Tabelle 2.6	Charakteristikum der Fluorochrome.....	45
Tabelle 2.7	Sonstige Antikörper.....	45
Tabelle 2.8	Verwendete Standardtest.....	46
Tabelle 2.9	Zelllinien.....	47
Tabelle 2.10	Eigenschaft des verwendeten Bakterien-Stamms.....	48
Tabelle 2.11	Verwendete Primer.....	49
Tabelle 2.12	Eigenschaften der verwendeten Plasmide.....	50
Tabelle 2.13	Eigenschaften des neu konstruierten Plasmids.....	52
Tabelle 4.1	LDV-Nachweis in Mäusen, die mit dem kontaminierten FV-Stock infiziert wurden.....	87
Tabelle 4.2	Konzentration der IFN $\alpha$ Subtypen im Überstand.....	89
Tabelle 5.1	Vergleich von Homologie auf dem Aminosäurelevel der vier IFN $\alpha$ Subtypen [%].....	112

## Publikation

**Gerlach N., S. Schimmer, S. Weiss, U. Kalinke, U. Dittmer.** 2006. Effects of type I Interferons on Friend retrovirus infection. *J. Virol.* **80**:3438-3444

## Danksagung

Ich danke an erster Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulf Dittmer für die gute Betreuung meiner Arbeit sowie die Gewährung großer wissenschaftlicher Freiräume. Durch ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft hat er maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. W.U. Müller danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern Kim Hasenkrug und Cassandra James bedanken.

Für die Einführung in die Real-time PCR danke ich Dr. Martin Trippler.

Bedanken möchte ich mich bei Delia Cosgrove, Frank Krux, Savita Nair, Simone Schimmer, Gennadiy Zelinskyy und Tanja Werner für die zahlreichen Hilfestellungen und das tolle Arbeitsklima. Ein besonderer Dank gilt Ina Frank für die zahlreichen (nicht immer) fachlichen Diskussionen und den Spass, den wir miteinander hatten.

Allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Virologie sei für die freundschaftlich-kollegiale Zusammenarbeit gedankt.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Roggendorf für die Möglichkeit in seinem Institut meine Arbeiten durchzuführen.

Großer Dank gilt dem Graduiertenkolleg1045/1, deren persönliches Engagement, die ständige Diskussionsbereitschaft, sowie praktischen Tipps mich von Anfang an beeindruckt und begleitet haben.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für die immerwährende Unterstützung bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Freund Sebastian, der tapfer alle meine Stimmungsschwankungen ertrug und mich immer wieder liebevoll aufbaute.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Geboren am: 19.11.1979  
Geburtsort: Schwerte  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1986-1990 Albert-Schweitzer-Grundschule, Schwerte  
1990-1999 Städt. Friedrich-Bährens-Gymnasium, Schwerte  
05/1999 Abitur

### Studium:

10/1999-09/2001 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum  
09/2001 Abschluss: Vordiplom  
10/2001-04/2003 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum mit  
Schwerpunkt: Zoologie, Ökologie, Mikrobiologie und  
Immunologie  
05/2002-07/2002 Praktikum am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin,  
Abteilung für Virologie (Dr. med. P. Borowski)  
05/2003-02/2004 Diplomarbeit an der Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl  
für Parasitologie  
Thema der Arbeit: Flagellumproteine von  
Trypanosomatiden

### Abschluss

04/2004 Diplom  
Studiumabschlussstipendium der Ruth und Gerd  
Massenberg-Stiftung

### Promotion:

Ab 07/2004 Promotionsstudium im Graduiertenkolleg 1045/1 (Thema:  
„Modulation von Wirtszellfunktionen zur Behandlung  
viraler und bakterieller Infektionen“) an der Universität  
Duisburg-Essen, Institut für Virologie (Prof. Dr. Ulf Dittmer)  
Thema: Einfluss der Typ I Interferone und IFN $\alpha$  Subtypen  
auf die retrovirale Friend Virus-Infektion.

Essen, den 20.03.07

---

Nicole Gerlach

## Erklärungen

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Ab. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Einfluss der Typ I Interferone und IFN $\alpha$  Subtypen auf die retrovirale Friend Virus-Infektion“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Nicole Gerlach befürworte.

Essen, den 20.03.07

---

Prof. Dr. U. Dittmer

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Ab. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst habe und mich keiner anderer als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 20.03.07

---

Nicole Gerlach

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Ab. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 20.03.07

---

Nicole Gerlach