Interferon-α Subtypen modulieren Friend Retrovirus-spezifische $CD4^+$ T-Zell-Antworten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Rouven-Luca Kaiserling

aus Siegen

November 2020

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

1. Gutachter: PD Dr. Kathrin Sutter

2. Gutachter: Prof. Dr. Astrid Westendorf

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Katharina Fleischhauer

Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.2021

DuEPublico
Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN
Offen im Denken

ub | universitäts bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/74307
URN: urn:nbn:de:hbz:464-20210616-105425-5

Alle Rechte vorbehalten.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Das Immunsystem 1

1.1.1. Das angeborene Immunsystem 1

1.1.2. Das adaptive Immunsystem 4

1.2. Interferone 10

1.2.1. Induktion der Typ I Interferon-Produktion und Typ I Interferon-induzierte Signalwege 11

1.2.2. Antivirale Eigenschaften von Typ I Interferonen 13

1.2.3. Immunmodulatorische Eigenschaften von Typ I Interferonen 14

1.2.4. Antiproliferative Eigenschaften von Typ I Interferonen 15

1.2.5. Die verschiedenen IFNα Subtypen 15

1.2.6. Therapeutische Nutzung von IFNα 16

1.3. Retroviren 17

1.3.1. Aufbau von Retroviren 17

1.3.2. Replikationszyklus von Retroviren 18

1.3.3. Humanes Immundefizienz-Virus 20

1.3.4. Tiermodelle für Retrovirus-Infektionen 21

1.3.5. Pathogenese des Friend Virus 22

1.3.6. Immunantwort gegen eine Friend Virus-Infektion 23

1.4. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit 25

2. Material 26

2.1. Geräte 26

2.2. Verbrauchsmaterial 27

2.3. Chemikalien 29

2.4. Pufferlösungen 29

2.5. Nährmedien 30

2.6. Antikörper 32

2.6.1. Antikörper für Durchflusszytometrie 32

2.6.2. Sonstige Antikörper 33

2.7. Kommerzielle Standardtests 33

2.8. Rekombinante Zytokine 34

2.9. Versuchstiere ... 35
2.9.1. Wildtypmäuse ... 35
2.9.2. Transgene Mäuse ... 35
2.10. Viren ... 36
2.11. Zelllinien ... 36
2.12. Bakterien ... 37
2.13. Plasmide ... 37
2.14. Oligonukleotide ... 38
2.15. Software ... 38
3. Methoden ... 40
3.1. Zellkultur ... 40
3.1.1. Kultivierung von Zellen ... 40
3.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen ... 40
3.1.3. Zellzahlbestimmung ... 41
3.2. Herstellung von Interferonen ... 41
3.2.1. Vermehrung von IFNα Subtyp Plasmiden ... 41
3.2.2. Kalzium-Phosphat-Transfektion ... 42
3.2.3. Kultivierung von 293mIFNalpha11-Zellen ... 43
3.2.4. Bestimmung der Interferonaktivität mittels Mx/Rage7 Bioassay ... 43
3.3. *In vitro* Versuche mit primären Mauszellen ... 43
3.3.1. Organentnahme aus Mäusen ... 43
3.3.2. Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Organen ... 44
3.3.3. Generierung von DCs aus Knochenmarksstammzellen ... 44
3.3.4. Anreicherung bestimmter Zellpopulationen mittels MACS ... 45
3.3.5. *In vitro* Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen ... 46
3.3.6. Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tag-it Violet™ ... 47
3.3.7. *In vitro* $CD4^+$ T-Zell-Proliferationsassay ... 47
3.4. Herstellung von FV ... 48
3.4.1. *In vivo* Herstellung von FV ... 48
3.5. Nachweis von infektiösen Zellen mittels *Infectious center assay* ... 48
3.6. *In vivo* Versuche ... 49

3.6.1. Infektion mit FV ... 49
3.6.2. Intraperitoneale Injektion von IFNα ... 49
3.6.3. Infektion mit *Citrobacter rodentium* ... 49
3.6.4. Phänotypische Untersuchungen bei einer *C. rodentium*-Infektion ... 50
3.7. Durchflusszytometrie ... 51
3.7.1. Färbung von Oberflächenproteinen ... 52
3.7.2. Färbung zum Ausschluss toter Zellen ... 52
3.7.3. Färbung intrazellulärer Zytokine ... 53
3.8. Nachweis von Zytokinen ... 53
3.8.1. Quantifizierung von Zytokinen mittels *LEGENDplex*™ ... 53
3.8.2. Quantifizierung von Zytokinen mittels ELISA ... 54
3.9. Arbeiten mit RNA ... 55
3.9.1. Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA ... 55
3.9.2. Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion ... 55
4. Ergebnisse ... 58
4.1. Etablierung eines Friend Retrovirus-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Proliferationsassays 59
4.2. Verschiedene IFNα Subtypen zeigen diverse immunmodulatorische Effekte auf CD4⁺ T-Zellen *in vitro* ... 63
4.2.1. Verschiedene IFNα Subtypen zeigen diverse Effekte auf die CD4⁺ T-Zell-Proliferation *in vitro* ... 63
4.2.2. Verschiedene IFNα Subtypen zeigen diverse Effekte auf die Zytokinantwort von CD4⁺ T-Zellen *in vitro* ... 66
4.2.3. Verschiedene IFNα Subtypen verändern das Zytokinexpressionsmuster von CD4⁺ T Zellen ... 71
4.2.4. IFNα Subtypen haben keinen direkten Einfluss auf die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in verschiedene T-Zell-Subpopulationen ... 74
4.2.5. Dendritische Zellen vermitteln den Effekt der IFNα Subtypen auf die Zytokinantwort, aber nicht auf die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen ... 77
4.2.6. Verschiedene IFNα Subtypen beeinflussen die Zytokinexpression von DCs ... 81
4.2.7. Die IL-23-Expression der DCs beeinflusst die IL-17a-Expression der CD4⁺ T-Zellen ... 84
4.3. Effekt von IFNα Subtypen auf CD4⁺ T Zellen *in vivo* ... 87
4.3.1. IFNα Subtypen zeigen einen antiviralen, aber keinen immunmodulatorischen Effekt auf CD4⁺ T-Zellen bei einer FV-Infektion ... 87

4.3.2. IFNα Subtypen zeigen keinen immunmodulatorischen Effekt auf CD4⁺ T-Zellen bei einer *Citrobacter rodentium*-Infektion 92

5. Diskussion 100

5.1. Der antiproliferative Effekt von IFNα Subtypen 101

5.2. Der immunmodulatorische Effekt der IFNα Subtypen auf CD4⁺ T-Zellen 103

5.3. Der Effekt von IFNα Subtypen auf CD4⁺ T Zellen *in vivo* 109

6. Zusammenfassungen 111

6.1. Zusammenfassung 111

6.2. Summary 112

7. Literaturverzeichnis 113

8. Anhang 125

8.1. Abkürzungsverzeichnis 125

8.2. Abbildungsverzeichnis 133

8.3. Tabellenverzeichnis 135

8.4. Danksagung 136

8.5. Lebenslauf 137

8.6. Erklärungen 139

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein Körperabwehrsystem, das sowohl verantwortlich für die Abwehr von Pathogenen, als auch für die Eliminierung maligner Zellen wie z.B. Tumorzellen ist. Die Haut und Schleimhäute bilden zusammen mit verschiedenen chemischen Faktoren eine Barriere, die die Invasion von Pathogenen wie z.B. Viren, Bakterien, Parasiten oder Pilzen verhindert. Krankheitserreger, die diese Barriere durchbrechen, können durch das angeborene Immunsystem von Wirbellosen und Wirbeltieren schnell, jedoch unspezifisch eliminiert werden. Wirbeltiere entwickelten im Laufe der Evolution zusätzlich das adaptive Immunsystem. Dieses ermöglicht eine spezifische Immunantwort und ist über die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses in der Lage eine erneute Infektion mit dem gleichen Erreger schnell und effizient abzuwehren [134].

1.1.1. Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem kann eine schnelle aber unspezifische Immunantwort gegen eindringende Pathogene etablieren. Daran sind sowohl zelluläre, als auch humorale Mechanismen beteiligt. Auf der Oberfläche, in den Endosomen oder dem Cytosol bestimmter Immunzellen befinden sich die sogenannten Mustererkennenden Rezeptoren (*pathogen recognition receptor*; PRR) wie z.B. *Toll-like receptors* (TLRs), RIG-I (*retinoic acid inducible gene I*)-*like* Helikasen oder *cytosolic DNA sensors*, welche konservierte Strukturen von Erregern, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular pattern*; PAMP), wie z.B. virale Nukleinsäuren oder Lipopolysaccharide, erkennen. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie z.B. Interleukine, Interferone, Chemokine oder antimikrobieller Proteine, um weitere Immunreaktionen zu induzieren [181, 184]. Außerdem führt die Interaktion der PRRs mit den entsprechenden Liganden zur Internalisierung und Eliminierung des Pathogens (Phagozytose) durch Fresszellen [134].

1.1.1.1. Humorale Mechanismen des angeborenen Immunsystems

Zytokine und das Komplementsystem zählen zu den humoralen Komponenten des angeborenen Immunsystems. Zytokine sind Signalproteine, welche die Interaktion und

die Kommunikation zwischen Zellen steuern. Zu den Zytokinen zählen die Interferone (IFN), die Tumornekrosefaktoren (TNF), die Interleukine (IL) und verschiedene Chemokine. Diese werden von verschiedenen Zellen sezerniert und können autokrin, parakrin oder endokrin wirken. Zytokine werden häufig als Teil einer Proteinkaskade exprimiert, wobei die Expression eines Zytokins durch ein anderes stimuliert wird. Pro-inflammatorische Zytokine verstärken inflammatorische Reaktionen, während anti-inflammatorische Zytokine ihnen entgegen wirken [199]. Chemokine regulieren die Zellmigration durch Gewebe entlang ihres Konzentrationsgradienten [73]. Beim Komplementsystem handelt es sich um eine Proteinkaskade, die über drei verschiedene Signalwege Effektorproteine generiert. Diese Proteine fungieren zum einen als Anaphylatoxine und aktivieren bzw. rekrutieren Leukozyten zum Ort der Entzündung. Zum anderen wirken sie als Opsonine und markieren Pathogene für die Neutralisierung durch Immunzellen. Darüber hinaus können sie eine direkte Lyse von Pathogenen oder beschädigten Zellen induzieren [141].

1.1.1.2. Die Zellen des angeborenen Immunsystems

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören Natürliche Killerzellen (NK)- und NKT-Zellen, welche in der Lage sind infizierte Zellen oder Krebszellen direkt zu eliminieren [24]. Die Aktivierung von NK-Zellen wird über die Balance rezeptor-vermittelter, aktivierender und inhibitorischer Signale reguliert. Diese ermöglichen den NK-Zellen die Unterscheidung gesunder von infizierten bzw. transformierten Zellen [24]. Dabei können NK-Zellen über die Ausschüttung von Granzym und Perforin, über TRAIL (*Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*) oder über Fas-Fas Ligand-Bindung die Apoptose der Zielzelle induzieren. Außerdem produzieren aktivierte NK-Zellen pro-inflammatorische Zytokine wie IFNγ und TNFα, welche verschiedene Effekte auf Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems ausüben [24].

Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cell*; APC) wie dendritische Zellen (*dendritic cell*; DC), Makrophagen oder B-Zellen können ebenso wie Monozyten und Neutrophile, Eosinophile und Basophile Granulozyten Pathogene phagozytieren und neutralisieren. Diese Zellen werden als Phagozyten bezeichnet. Makrophagen sind langlebige Phagozyten und in verschiedenen Geweben lokalisiert [134]. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, abgestorbene Zellen, Zelltrümmer und Pathogene zu neutralisieren. Außerdem rekrutieren Makrophagen über die Ausschüttung pro-

inflammatorischer Zytokine weitere Immunzellen wie Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten zum Ort der Infektion [60, 186]. Als APCs sind Makrophagen in der Lage Pathogene über ihre PRRs zu erkennen, über Phagozytose aufzunehmen, abzubauen und deren Antigene auf ihrer Oberfläche über den sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*; MHC) zu präsentieren [118]. Die Antigenpräsentation ist eine wichtige Voraussetzung für die Induktion des adaptiven Immunsystems. Für diese Aufgabe sind DCs hoch spezialisiert. Sie sind nicht wie Makrophagen im Gewebe resident, sondern sind mobil und migrieren durch die sekundären lymphatischen Organe. Dort sind sie in der Lage T-Zellen effizient zu aktivieren [127]. DCs exprimieren in ihrer unreifen Form zunächst geringe Level an MHC-Molekülen und ko-stimulatorischen Rezeptoren wie CD80 und CD86, zeichnen sich allerdings durch eine hohe Phagozytoseaktivität aus [35, 97]. Das Erkennen und Aufnehmen von PAMPs über PRRs induziert die Reifung der DCs. Dieser Prozess führt zu einer Hochregulierung der Expression von MHC-Molekülen und ko-stimulatorischen Rezeptoren, die für die T-Zell-Aktivierung essenziell sind [35]. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen konventionellen DCs (cDCs) und plasmazytoiden DCs (pDCs) [188]. Für die Antigenpräsentation sind hauptsächlich die cDCs verantwortlich, welche höhere Level MHC- und ko-stimulatorische Moleküle exprimieren als pDCs [187]. Auch wenn sowohl cDCs, als auch pDCs in der Lage sind Antigene zu präsentieren [120], besteht die Hauptaufgabe der pDCs darin, große Mengen Typ I IFN (siehe 1.2) zu produzieren [157]. Dies wird insbesondere über das Erkennen viraler Nukleinsäuren induziert [69].

Grundsätzlich unterscheidet man drei verschiedene Mechanismen der Antigenpräsentation:

1) Die klassische Präsentation von Antigenen extrazellulärer aufgenommener Pathogene erfolgt über den MHCII-Komplex auf der Oberfläche von APCs. Nach der Phagozytose eines Pathogens wird es endosomal-lysosomal im MIIC (*MHC class II compartment*) abgebaut und zu Peptidfragmenten prozessiert. MHCII-Moleküle werden nach der Synthese ebenfalls in das MIIC transportiert und mit den Peptidfragmenten beladen. Anschließend wird der MHCII-Peptid-Komplex zur Zellmembran transportiert, naiven $CD4^+$ T-Zellen präsentiert und diese dadurch aktiviert [98].

2) Die klassische Antigenpräsentation nach einer Infektion mit intrazellulären Pathogenen, z.B. Viren, erfolgt über den MHCI-Komplex auf der Oberfläche fast aller

Körperzellen. Eine Virusinfektion induziert die Expression viraler Proteine in der Wirtszelle. Diese Proteine werden im Cytosol proteasomal abgebaut und zum endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert. Dort werden sie weiter prozessiert und die Peptidfragemente auf das MHCI-Molekül geladen. Der MHCI-Peptid-Komplex wird anschließend zur Zellmembran transportiert und zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen präsentiert [98].

3) Extrazelluläre Antigene können ebenfalls über den MHCI-Komplex von APCs präsentiert werden. Dieser Mechanismus, die sogenannte Kreuzpräsentation, dient der Aktivierung von naiven $CD8^+$ T-Zellen und ist somit die Grundvoraussetzung für die zytotoxische T-Zellantwort. Zunächst werden Antigene aufgenommen und ins Cytosol transportiert, wo sie proteasomal abgebaut werden. Im ER werden anschließend MHCI-Moleküle mit den Peptidfragmenten beladen und der MHCI-Peptid-Komplex auf der Oberfläche der APCs naiven $CD8^+$ T-Zellen präsentiert [98].

Durch die Aktivierung von T-Zellen stellen APCs eine wichtige Verbindung zwischen dem unspezifischen angeborenen und dem spezifischen adaptiven Immunsystem dar.

1.1.2. Das adaptive Immunsystem

Die Etablierung einer adaptiven Immunantwort dauert im Vergleich zur angeborenen Immunantwort länger, erlaubt allerdings eine spezifische Abwehr von Pathogenen. Außerdem ermöglicht es die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, wodurch eine schnelle und effektive Etablierung einer Immunanwort bei einer erneuten Infektion mit demselben Pathogen möglich ist. Die adaptive Immunanwort wird durch Lymphozyten vermittelt, die durch das Blut, die Lymphe und in lymphatischen Organen zirkulieren. Grundsätzlich unterscheidet man B-Zellen, die im Knochenmark gebildet werden und dort ausreifen, von T-Zellen, die ebenfalls im Knochenmark gebildet werden, aber im Thymus ausreifen [134]. Wie das angeborene, wird auch das adaptive Immunsystem in zelluläre und humorale Komponenten unterteilt.

1.1.2.1. Das humorale adaptive Immunsystem

Für die humorale adaptive Immunantwort sind B-Zellen verantwortlich, die spezifische Antikörper produzieren. Diese Proteine binden spezifisch an Antigene und können Pathogene entweder neutralisieren oder für die Phagozytose markieren. B-Zellen sind in der Lage Antigene über ihren B-Zell-Rezeptor (*B cell receptor*; BCR) zu erkennen

und aufzunehmen, welche anschließend internalisiert, prozessiert und über den MHCII-Komplex präsentiert werden. Daher zählen auch sie zu den professionellen APCs. Wird T-Zellen dasselbe Antigen, durch welches sie bereits aktiviert wurden, durch B-Zellen präsentiert, induzieren sie die Expansion von B-Zellen und die Differenzierung in B-Gedächtniszellen oder Antikörper-produzierende Plasmablasten bzw. Plasmazellen [134]. Die Aktivierung der B-Zellen ist auch T-Zell-unabhängig möglich, allerdings ist die Bindungsaffinität der Antikörper, welche nach der Aktivierung durch T-Zellen induziert werden, stärker [143].

1.1.2.2. Das zelluläre adaptive Immunsystem

Die zelluläre adaptive Immunantwort wird durch T-Zellen vermittelt. Diese Zellen werden im Knochenmark gebildet und migrieren in den Thymus. Dort reifen sie aus und entwickeln den T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*; TCR) sowie die Ko-Rezeptoren CD4 und CD8. Die zunächst $CD4^+/CD8^+$ doppelt-positiven T-Zellen durchlaufen eine Selektion, bei der die Zellen, deren TCR nicht in der Lage ist, ein Antigen zu erkennen, durch Apoptose abgebaut werden. In einem zweiten Selektionsschritt werden die Zellen aussortiert, deren TCR MHC-Komplexe mit Selbstpeptiden erkennen. Anschließend stellen die Zellen die Expression eines der beiden Ko-Rezeptoren ein und zirkulieren als naive $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen [151]. Naive T-Zellen exprimieren die Adhäsionsmoleküle CD62L und CCR7 auf ihrer Oberfläche, welche die Migration der Zellen in sekundäre lymphatische Organe steuern, wo sie durch APC-vermittelten Antigenkontakt aktiviert werden [19]. Nach der Aktivierung wird die Expression dieser Rezeptoren supprimiert und die Zellen zirkulieren durch die Peripherie [94].

Aktivierte T-Zellen differenzieren in sogenannte Effektor-T-Zellen. $CD8^+$ Effektor-T-Zellen sind zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T lymphocyte*, CTL). Ihre Aufgabe besteht darin, infizierte Körperzellen und Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. Dabei erkennt der TCR Peptide, die auf der Oberfläche von Körperzellen über den MHCI-Komplex präsentiert werden. Präsentiert der MHCI-Komplex z.B. ein Viruspeptid, zerstören CTLs diese Zelle. Dabei können CTLs über die Ausschüttung von Granzym und Perforin oder über Fas-FasL-Bindung die Apoptose der Zielzelle induzieren. Außerdem sezernieren CTLs pro-inflammatorische Zytokine wie TNFα, IL-2 und IFNγ [4].

Zu den $CD4^+$ Effektor-T-Zellen zählen sogenannte T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen (T_{reg}). Diese Effektorzellen sezernieren pro- und anti-inflammatorische

Zytokine und vermitteln eine adaptive Immunantwort gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Pathogene. Die meisten Effektor-T-Zellen sind kurzlebig, sodass ein Großteil dieser Zellen nach der Eliminierung des Pathogens in Apoptose geht. Etwa 5-10 % der Zellen allerdings überleben auch nach Abklingen der Immunantwort und bilden das sogenannte T-Zell-Gedächtnis [85]. Ein Teil dieser Zellen, die sogenannten zentralen Gedächtniszellen (*central memory T cell*; TCM) exprimieren CD62L und CCR7 und residieren in den lymphatischen Organen. Effektor-Gedächtniszellen (*effector memory T cell*; TEM) allerdings exprimieren diese Moleküle nicht und zirkulieren durch peripheres Gewebe [14]. T-Gedächtniszellen erlauben im Falle einer erneuten Infektion mit einem bereits bekannten Pathogen eine deutlich schnellere Expansion und effektivere Induktion der adaptiven Immunantwort als naive T-Zellen [71].

1.1.2.2.1. Aktivierung von naiven T-Zellen

Die Aktivierung naiver T-Zellen erfolgt in drei Schritten. Das erste Signal wird dabei über den TCR vermittelt. Der TCR ist ein Heterodimer aus einer α- und einer β-Untereinheit und erkennt Peptide, die über MHC-Komplexe präsentiert werden. Er ist mit dem CD3-Molekül assoziiert, was für die Signalweiterleitung essenziell ist. Zusätzlich wird der Kontakt zwischen T-Zelle und APC durch die Ko-Rezeptoren CD4 oder CD8 auf der Oberfläche naiver T-Zellen, welche an die MHC-Moleküle binden, stabilisiert [62].

Das zweite Signal ist die Ko-Stimulation über verschiedene Rezeptoren auf der Oberfläche von APCs, wie z.B. CD80 und CD86. Diese Rezeptoren binden an CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen und induzieren die Proliferation, die Sekretion von IL-2 und die gesteigerte Expression von CD25 [104, 117]. CD25 ist eine Kette des IL-2 Rezeptors und erhöht die Sensitivität der Zellen für IL-2, eines Wachstumsfaktors für T-Zellen, und induziert deren Proliferation und die Differenzierung [104].

Das dritte Signal, welches für die Differenzierung naiver T-Zellen in Effektorzellen benötigt wird, wird durch Zytokine bereitgestellt [117]. Für die Differenzierung in CTLs benötigen $CD8^+$ T-Zellen die Stimulation mit z.B. Typ I IFN oder IL-12 [33]. Die Differenzierung der $CD4^+$ T-Zellen kann, abhängig von verschiedenen Zytokinen, in verschiedene T-Helfer-Subpopulationen erfolgen. Eine schematische Darstellung der Aktivierung naiver T-Zellen ist in Abbildung 1-1 gezeigt.

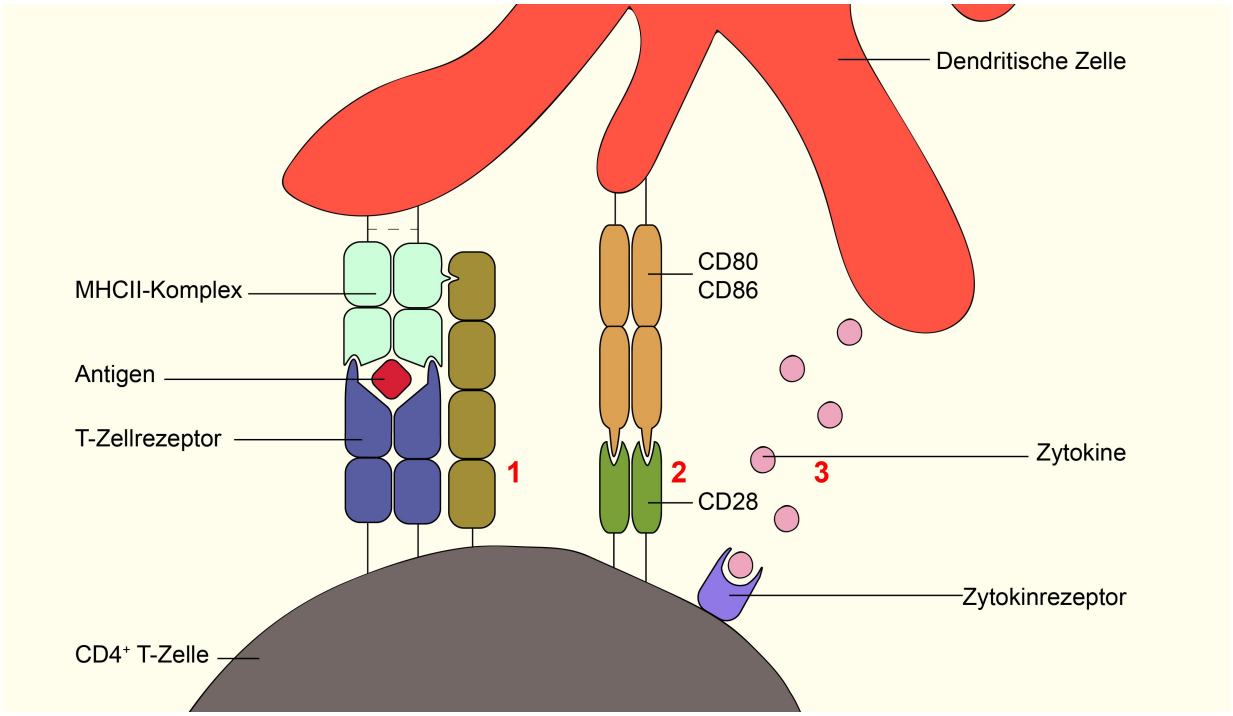


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch APCs.
Die Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen durch APCs (hier DC) erfolgt durch drei Signale: **1)** Ein Antigen wird über den MHCII-Peptid-Komplex auf APCs präsentiert und durch den TCR auf naiven CD4⁺ T-Zellen erkannt. Der TCR ist mit CD3 assoziiert, welches für die Signalweiterleitung essenziell ist (hier nicht gezeigt) **2)** Ko-stimulatorische Signale über Rezeptor-Interaktion **3)** Stimulation über verschiedene Zytokine, die initial von APCs sezerniert werden (Abbildung nach [134]).

1.1.2.2.2. CD4⁺ Effektor-T-Zellen

Die Aufgabe der CD4⁺ Effektor-T-Zellen ist es, durch die Sekretion verschiedener Zytokine oder durch Zell-Zell-Kontakt andere Zellen des Immunsystems und deren Effektorfunktionen zu koordinieren. T-Helferzellen sind in der Lage Zellen des angeborenen Immunsystems, B-Zellen und CTLs zu aktivieren oder zu mobilisieren. Regulatorische T-Zellen hingegen unterdrücken eine exzessive Immunantwort, um Immunpathologien zu verhindern. Aktivierte CD4⁺ T-Zellen differenzieren in unterschiedliche Subpopulationen der Effektorzellen, was eine sehr zielgerichtete Immunreaktion ermöglicht. Dabei bestimmt, neben den ko-stimulatorischen Signalen während der Aktivierung, insbesondere das Zytokinmilieu in welche Effektorzellen die naiven Zellen differenzieren. Initial sind Zellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere APCs, für die Expression der Zytokine verantwortlich, welche die Differenzierung steuern [114]. In Abbildung 1-2 ist eine Übersicht der Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in die verschiedenen Effektor-Subpopulationen gezeigt.

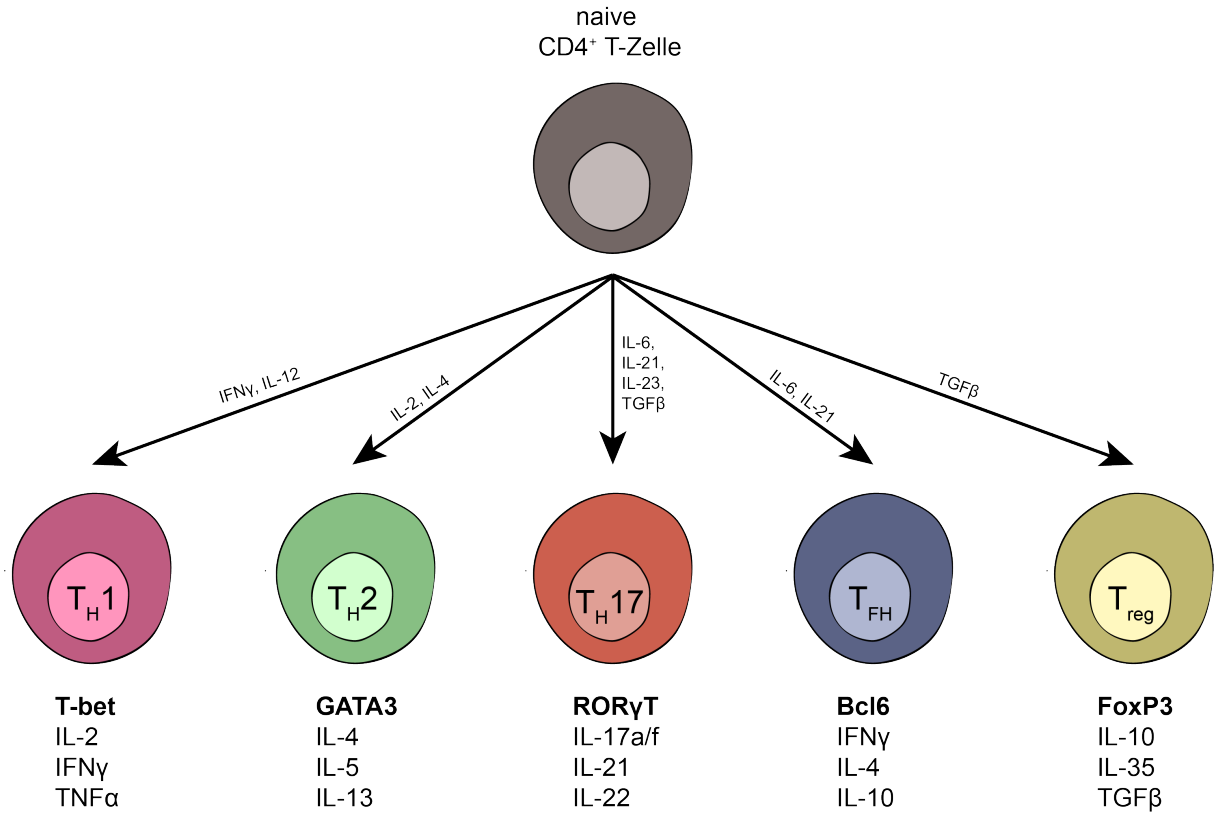


Abbildung 1-2: Schema der Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in verschiedene Effektor-T-Zellen.
Die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in verschiedene Effektor-Subpopulationen ist abhängig von der Stimulation mit verschiedenen Zytokinen. Diese induzieren über verschiedene Signalwege die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung regulieren (Abbildung nach [114]).

T_H1

T_H1-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene wie z.B. Viren oder intrazelluläre Bakterien [5]. Die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in T_H1-Zellen wird durch die Zytokine IFNγ und IL-12 induziert. IL-12 wird in großen Mengen von APCs sezerniert, was wiederum die IFNγ-Produktion in NK-Zellen stimuliert. IFNγ aktiviert über den STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*)-1-Signalweg die Expression des Haupt-Transkriptionsfaktors T-bet (*T-box expressed in T cells*). T-bet inhibiert die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in T_H2- und T_H17-Zellen und erhöht die Expression von IFNγ und des IL-12-Rezeptors. Somit verstärkt es zusätzlich die weitere T-bet Expression. IL-12 induziert den Transkriptionsfaktor STAT-4, welcher ebenfalls die IFNγ-Expression verstärkt und die Differenzierung in T_H1-Zellen begünstigt, sowie die Expression des Rezeptors IL-18Rα [114]. IL-12 und IL-18, welches von aktivierten APCs produziert wird, synergieren und induzieren die IFNγ-Expression unabhängig von der TCR-Aktivierung [36, 114]. Durch

die Expression von IFNγ, in Kombination mit der Interaktion von CD40 Ligand (CD40L) auf der Oberfläche von T-Zellen mit CD40 auf der Oberfläche von Makrophagen, sind T_H1-Zellen in der Lage Makrophagen zu aktivieren. Aktivierte Makrophagen besitzen eine erhöhte Effizienz aufgenommene Pathogene zu zerstören [134]. Außerdem produzieren T_H1-Zellen IL-2, was die Proliferation von $CD8^+$ T-Zellen und die $CD8^+$ T-Zell-Gedächtnisbildung begünstigt, und das pro-inflammatorische Zytokin TNFα [145, 191].

T_H2

T_H2-Zellen sind für die Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene (z.B. Parasiten) verantwortlich. IL-4 reguliert die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_H2-Zellen und induziert über den STAT-6-Signalweg die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 (*GATA Binding Protein 3*). Dieser Transkriptionsfaktor verstärkt die Expression von T_H2-Effektorzytokinen, begünstigt die Proliferation von T_H2-Zellen und inhibiert die Expression von T-bet und STAT-4 und somit die Differenzierung in T_H1-Zellen. Außerdem spielt IL-6 bei der T_H2-Differenzierung eine Rolle, da es die Expression von IL-4 stimuliert. Effektorzytokine von T_H2-Zellen sind IL-4, IL-5, und IL-13 [114]. Über diese induzieren T_H2-Zellen die Expression weiterer pro-inflammatorischer Zytokine, aktivieren eosinophile Granulozyten, erhöhen die Schleimsekretion und verstärken die humorale Immunantwort [21, 114].

T_H17

T_H17-Zellen sind T-Helferzellen, deren Immunantwort gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze gerichtet ist [114]. Der Hauptregulator bei der Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_H17-Zellen ist RORγT (*RAR (retinoic acid receptor)-related orphan receptor gamma T*). Die Differenzierung, induziert durch die Zytokine IL-6, IL-21, IL-23 und TGFβ, erfolgt in drei Schritten. Zunächst aktivieren IL-6 und TGFβ den Transkriptionsfaktor RORγT. Dieser induziert die Expression von IL-17a und IL-17f. TGFβ selbst ist nicht in der Lage die Expression von RORγT über den STAT-3-Signalweg zu induzieren. Daher sind für eine stabile T_H17-Antwort weitere Schritte durch die Stimulation mit IL-6, IL-21 und IL-23 in Kombination mit TGFβ notwendig. In der zweiten Phase der Differenzierung wird IL-21 für die Selbstamplifikation der T_H17-Zellen benötigt. In der dritten Phase, der Stabilisierungsphase, erfolgt die Expansion der Zellen durch die Stimulation mit IL-23. Der IL-23-Rezeptor wird durch IL-6 und IL-21 induziert, während die Hauptquelle für IL-23 APCs darstellen [114]. Die zentralen Effektormoleküle der T_H17-Zellen sind IL-17a, IL-17f, IL-21 und IL-22. IL-17 induziert

die Expression pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, welche weitere Immunzellen zum Ort der Infektion rekrutieren. IL-21 aktiviert T-Zellen, NK-Zellen und induziert die Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen. IL-22 stimuliert die Produktion antimikrobieller Peptide [114]. T_H17-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr auf Schleimhäuten [15], sind allerdings auch an Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Erkrankungen beteiligt [174].

T_{reg}

T_{regs} regulieren und unterdrücken die Immunantwort um Immunpathologien zu verhindern. Die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_{regs} erfolgt durch die Stimulation mit TGFβ, was STAT-5-abhängig zur Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (*Forkhead-Box-Protein P3*) führt [114]. Dieser Transkriptionsfaktor inhibiert die IL-2-Expression der Zellen, verstärkt aber gleichzeitig die konstitutive Expression der IL-2-Rezeptor-Untereinheit CD25 [80, 164]. So können T_{regs} schnell durch den Wachstumsfaktor IL-2 stimuliert werden. Es wird vermutet, dass sie dadurch große Mengen IL-2 konsumieren, welches anderen T-Zellen dann nicht mehr zur Verfügung steht, da diese erst durch die TCR-vermittelte Aktivierung CD25 exprimieren [58]. Durch den erhöhten IL-2-Konsum, die Expression anti-inflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-10, IL-35 oder TGFβ und die direkte Inhibition von T-Zellen und APCs durch Zellkontakt sind T_{regs} in der Lage die Proliferation von T-Zellen zu verhindern [19, 58]. Außerdem regulieren sie die Expression von MHC-Molekülen und ko-simulatorischen Rezeptoren auf der Oberfläche von APCs herunter und inhibieren somit die Aktivierung von T-Zellen [19].

T_{FH}

Follikuläre T-Helferzellen (T_{FH}) unterstützen die humorale Immunantwort durch die direkte Interaktion mit B-Zellen. T_{FH}-Zellen exprimieren Bcl6 (*B cell lymphoma protein 6*) und die Differenzierung dieser Zellen wird durch IL-6 und IL-21 über den STAT-3-Signalweg induziert. T_{FH}-Zellen stimulieren die Expression hoch affiner Antikörper und die Differenzierung antigenspezifischer B-Zellen in Plasmazellen bzw. B-Gedächtniszellen [114].

1.2. Interferone

Interferone sind eine Familie von pro-inflammatorischen Zytokinen, die in Typ I, Typ II und Typ III Interferone unterteilt wird. Zu den Typ I IFN gehören unter anderem IFNβ,

IFNε, IFNκ, sowie 14 (Maus) bzw. 12 (Mensch) verschiedene IFNα Subtypen. Sie haben antivirale, sowie immunmodulatorische und antiproliferative Eigenschaften [66]. Der einzige Vertreter der Typ II IFN ist IFNγ, welches von Lymphozyten exprimiert wird und die Makrophagenaktivität sowie die Antigenpräsentation verbessert [171]. Zu den Typ III IFN gehören die drei verschiedenen Subtypen IFNλ1, λ2 und λ3. Typ III IFN werden durch fast alle Arten von Zellen, insbesondere pDCs, produziert und wirken sowohl antiviral, als auch immunmodulatorisch [109].

1.2.1. Induktion der Typ I Interferon-Produktion und Typ I Interferon-induzierte Signalwege

Die Expression von Typ I IFN ist eine der ersten Reaktionen des Immunsystems auf eine Virusinfektion. Die Sekretion von Typ I IFN wird durch die Stimulation von cytosolischen, endosomalen oder auf der Zelloberfläche exprimierten PRRs induziert. Werden PAMPs, beispielsweise virale Nukleinsäuren, über z.B. RIG-I oder TLR7 erkannt, führt dies über verschiedene Signalwege zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren [124]. Die Transkriptionsfaktoren IRF (*Interferon regulatory factor*)3 und IRF7 spielen dabei eine besonders wichtige Rolle. IRF3 induziert die initiale Expression der Gene für *Ifnb* und *Ifna4*. Diese Typ I IFN aktivieren den Transkriptionsfaktor IRF7, was zur verstärkten Induktion der Typ I IFN-Expression führt [124]. Eine schematische Darstellung der Induktion der Typ I IFN-Expression und der Typ I IFN-induzierten Signalwege zur Expression von IFN-stimulierten Genen (ISG) ist in Abbildung 1-3 gezeigt.

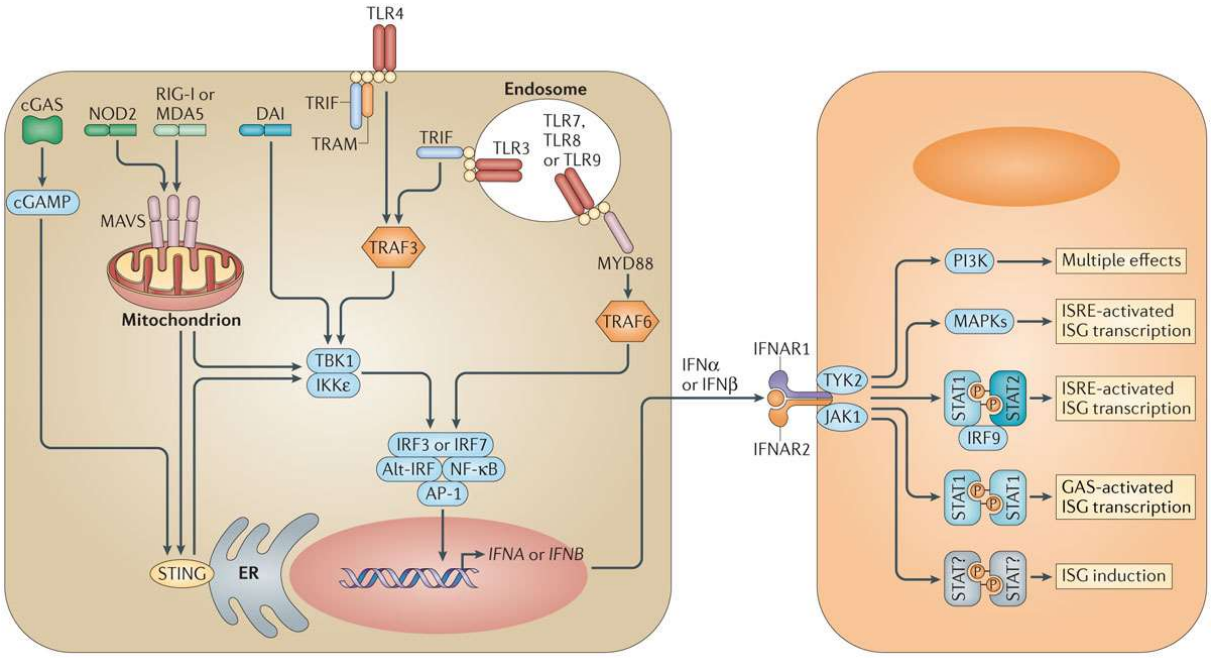


Abbildung 1-3: Typ I IFN-Induktion und Typ I IFN-induzierte Signalwege.
Die Erkennung von PAMPs über PRRs induziert die Expression der *Ifna*- und *Ifnb*-Gene. IFNα und IFNβ binden an den Rezeptor-Komplex (IFNAR), was im kanonischen Signalweg zu einer Phosphorylierung und der Dimerisierung von STAT-1 und STAT-2 führt. Diese bilden mit IRF9 einen Komplex, der an ISRE-Sequenzen in den Promotoren von ISGs bindet und deren Transkription induziert [124].

Durch die Bindung von IFNα oder IFNβ an den IFN-α/β-Rezeptor (IFNAR) werden bestimmte Signalwege induziert. Dieser Rezeptor ist ein Heterodimer aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 und ist ubiquitär exprimiert. Trotz der Bindung aller Typ I IFN an den gleichen Rezeptor, haben sie unterschiedliche biologische Funktionen [38]. Die Bindung des Liganden an den IFNAR-Komplex führt zur Aktivierung der mit IFNAR1 assoziierten Tyrosin-Kinase 2 (TYK2) und der mit IFNAR2 assoziierten Janus-Kinase 1 (JAK1). Diese phosphorylieren im kanonischen Signalweg die Moleküle STAT-1 und STAT-2, welche daraufhin dimerisieren und mit IRF9 den sogenannten *IFN-stimulated gene factor 3* (ISGF3) bilden. Dieser Komplex translozirt in den Nukleus, bindet an *IFN-stimulated response element*s (ISRE) im Promotorbereich verschiedener ISGs und induziert deren Transkription. Neben dem kanonischen JAK/STAT-Signalweg, ist die Induktion von ISGs ebenfalls über weitere Signalwege möglich [88].

1.2.2. Antivirale Eigenschaften von Typ I Interferonen

Die Stimulation mit Typ I IFN versetzt infizierte und benachbarte Zellen in einen antiviralen Zustand. Dieser zeichnet sich durch die Expression einer Vielzahl von ISGs aus, deren Produkte die Replikation und Verbreitung von Viren inhibieren können. Zu den am besten charakterisierten antiviralen ISG-Produkten gehören Myxovirus Resistenz (Mx)-Proteine, Proteinkinase R (PKR) und 2,5-Oligoadenylatsynthetase (OAS). Die Proteine APOBEC (*Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide*)3, Tetherin und TRIM (*Tripartite motif-containing protein*)5, die ebenfalls durch die Stimulation mit Typ I IFN induziert werden, gehören zu den sogenannten Restriktionsfaktoren. Diese Proteine blockieren die Virusreplikation, wobei verschiedene Restriktionsfaktoren unterschiedliche Schritte der Replikation inhibieren können [27].

PKR wird durch die Interaktion mit doppelsträngiger Ribonukleinsäure (dsRNA) aktiviert. Das Enzym phosphoryliert den zellulären Transkriptionsfaktor eIF2α (*eukaryotic translation initiation factor*), was die Translation von sowohl zellulären als auch viralen Proteinen inhibiert. Außerdem induziert PKR die Apoptose infizierter Zellen [178].

OAS-Enzyme werden ebenfalls durch dsRNA stimuliert und binden die monomere, inaktive Form der RNase L. Dies führt zur Dimerisierung und damit zur Aktivierung der RNase L, die zelluläre und virale RNA degradiert. OAS kann ebenfalls die Apoptose infizierter Zellen induzieren [156].

Mx-Proteine sind Guanosintriphosphatasen, deren Expression stark von der Induktion durch IFN abhängig ist. Diese Proteine binden virale Nukleocapsidproteine im Cytoplasma und blockieren so deren Translokation in den Nukleus. So wird die Virusreplikation inhibiert [17].

APOBEC3-Proteine induzieren Hypermutationen im viralen Genom und führen somit häufig zu Stop-Codons oder Nonsense-Mutationen, die die Virusreplikation abbrechen oder zur Synthese dysfunktionaler Proteine führen [50, 194]. Außerdem können ABOBEC3-Proteine die reverse Transkription von Retroviren sowie deren Integration in das Wirtsgenom inhibieren [194].

Tetherin ist an der Zellmembran lokalisiert und bindet an die Hülle von Retroviren, wodurch die Viruspartikel nicht freigesetzt werden können. Die festgehaltenen Viren werden anschließend internalisiert und endosomal abgebaut [194].

TRIM5 bindet retrovirale Capsidproteine und stört die Freisetzung der viralen RNA und

viraler Proteine in das Cytoplasma, sodass die reverse Transkription unterbunden wird [56].

1.2.3. Immunmodulatorische Eigenschaften von Typ I Interferonen

Typ I IFN können die angeborene sowie die adaptive Immunantwort modulieren. Sie verstärken die Differenzierung von Monozyten in DCs und die Expression von MHC-Molekülen sowie ko-stimulatorischer Rezeptoren wie z.B. CD80 und CD86 auf deren Oberfläche [131, 166]. Somit verbessern Typ I IFN die Antigenpräsentation und die Aktivierung von T-Zellen. Über die durch Typ I IFN-Stimulation erhöhte Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR7 migrieren DCs vermehrt in sekundäre Lymphgewebe [147, 163]. Auch erhöhen Typ I IFN die Sekretion der Chemokine CXCL9 und CXCL10, was T-Zellen ebenfalls in das Lymphgewebe rekrutiert, wo sie durch die DCs aktiviert werden [146]. Weiterhin verstärken Typ I IFN die Zytokinexpression von DCs, z.B. von IL-15, IL-12 oder IFNγ [59, 122, 131]. Eine verstärkte IL-15-Expression resultiert in einer verbesserten Proliferation, Zytotoxizität und IFNγ-Expression von NK-Zellen [112, 139]. Zusätzlich verstärken Typ I IFN die Polarisierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_H1-Zellen durch eine Erhöhung der IFNγ- und IL-12-Expression in DCs und IFNγ-Expression in NK-Zellen [29, 124], wohingegen die Differenzierung in T_H2-Zellen inhibiert wird [86]. Typ I IFN können bei der Aktivierung naiver $CD8^+$ T-Zellen das dritte Signal, nach der Antigenpräsentation und der Ko-Stimulation, liefern [32]. Auch in $CD8^+$ T-Zellen führen Typ I IFN zu einer gesteigerten Zytotoxizität und verstärkten Expression von IFNγ [32]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Typ I IFN die suppressive Funktion von T_{regs} inhibieren und somit zu einer verbesserten Kontrolle der Virusinfektion führen können [177]. Typ I IFN erhöhen auch die Aktivierung und Antikörperproduktion von B-Zellen und induzieren einen Isotypenwechsel der Antikörper [124]. Neben den stimulierenden Effekten der Typ I IFN auf DCs, NK-Zellen und T-Zellen, können diese ebenso inhibitorisch wirken. So wird einerseits durch die Stimulation mit Typ I IFN die IFNγ-Expression von T-Zellen und NK-Zellen über den STAT-4-Signalweg induziert. Aktiviert die Typ I IFN-Stimulation allerdings den STAT1-Signalweg, wird andererseits die Expression von IFNγ inhibiert [128, 138, 140].

1.2.4. Antiproliferative Eigenschaften von Typ I Interferonen

Durch ihre antiproliferativen Eigenschaften sind Typ I IFN in der Lage die zelluläre Proteinbiosynthese und damit ebenfalls die Verbreitung einer Virusinfektion oder die Transformation maligner Zellen im Wirtsorganismus zu inhibieren. Durch die Inhibition Cyclin-abhängiger Kinasen kann der Zellzyklus in verschiedenen Phasen, in den meisten Fällen der G1-Phase, arretiert und somit die Proliferation blockiert werden [11]. Außerdem können Typ I IFN über die Hochregulation pro-apoptotischer Proteine wie Fas, FasL und TRAIL die Sensitivität für pro-apoptotische Stimuli erhöhen [11]. Die antiproliferativen Eigenschaften unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Typ I IFN und sind abhängig vom Zelltyp [40, 161].

1.2.5. Die verschiedenen IFNα Subtypen

Die hoch konservierten IFNα Subtypen besitzen eine Sequenzhomologie von 75-99 % und binden den gleichen Rezeptor. Dennoch ist ihre Funktion nicht redundant, da sie unterschiedliche antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Eigenschaften besitzen [182]. Für die unterschiedlichen Aktivitäten gibt es verschiedene mögliche Erklärungen. Die IFNα Subtypen besitzen unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu beiden IFNAR-Untereinheiten, was auch deren antiproliferative Kapazität beeinflusst [103, 149]. Auch die Expressionsdichte der Rezeptoren beeinflusst die Bindung der IFNα Subtypen (Rezeptoravidität) [132]. Außerdem wurde eine Zelltyp-abhängige Expression verschiedener ISGs durch die Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen beobachtet [130]. Durch die Phosphorylierung unterschiedlicher STAT-Moleküle und MAP-Kinasen können IFNα Subtypen verschiedene Signalwege induzieren [31]. Die Unterschiede in der Rezeptorverbindung, Signalweiterleitung und Genexpression resultieren in diversen biologischen Aktivitäten wie z.B. antiproliferative und antivirale Effekte, als auch der Modulation von Immunzellfunktionen [40]. Allerdings unterscheiden sich die Effekte der Subtypen auf Immunzellen oder deren direkte antivirale Mechanismen, je nach Virustyp [66]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass andere IFNα Subtypen *in vitro* die Replikation des Influenza A Virus H3N2 inhibierten, als die HBV-Replikation [23, 121].

1.2.6. Therapeutische Nutzung von IFNα

Aufgrund ihrer starken antiviralen und immunmodulatorischen Eigenschaften besitzen Typ I IFN für die Therapie viraler Infektionen großes Potenzial. Faktisch wird IFNα heutzutage aber nur zur Behandlung einer chronischen Hepatitis B Virus (HBV)-Infektion eingesetzt. Dabei kommt subkutan injiziertes pegyliertes IFNα2 (PegIFNα2) zum Einsatz, welches eine verlängerte Halbwertszeit gegenüber Standard-IFN besitzt. Die genauen Wirkmechanismen der IFN-Therapie bei einer HBV-Infektion sind unbekannt. Allerdings weiß man, dass Typ I IFN in der Lage sind die Virusreplikation z.B. über die Induktion von APOBEC3 zu inhibieren und die Proliferation, die Aktivierung und die antivirale Kapazität von NK-Zellen zu verstärken [193]. Bis vor einiger Zeit gehörte IFNα außerdem, kombiniert mit dem Nukleosid-Analogon Ribavirin, zur Standard-Behandlung von Hepatitis C Virus (HCV)-Infektionen. Dabei inhibiert IFNα über die Induktion verschiedener ISGs wie PKR und OAS die Virusreplikation [51]. Außerdem wurde ein immunmodulatorischer Effekt von Peg-IFNα2 während einer HCV-Infektion festgestellt, allerdings zeigen verschiedene Studien kontroverse Ergebnisse in Bezug auf die Aktivierung von T-Zellen [96, 153]. Die IFN-basierte Therapie besitzt eine SVR (*sustained virological response*) von über 50 %, hat jedoch schwere Nebenwirkungen wie Fieber, Myalgie, Ermüdung, Kopfschmerzen, Übelkeit, Gelenkschmerzen, Depressionen, Hautausschlag, Neutropenie, Anämie und Thrombozytopenie [179]. Heutzutage wird empfohlen, wenn möglich, auf die therapeutische Gabe von IFN bei HCV-Infektionen zu verzichten, da verschiedene direkt antivirale Medikamente (*direct-acting antivirals*; DAA) verfügbar sind, die sowohl deutlich verträglicher sind, als auch die Therapiedauer verkürzen können [165, 169]. Aufgrund ihres starken antiviralen Potenzials werden Typ I IFN außerdem zur Behandlung von HIV-Infektionen in Betracht gezogen. Dabei wurde in klinischen Studien ein antiviraler Effekt durch die Behandlung mit dem einzigen klinisch zugelassenen Subtyp IFNα2 beschrieben [7, 9]. Allerdings konnte gezeigt werden, dass dieser Subtyp im Vergleich zu IFNα14 eine deutlich schwächere anti-HIV-Aktivität besitzt [102]. Daher spielt die Auswahl der Subtypen mit dem vielversprechendsten therapeutischen Effekt bei der Behandlung viraler Infektionen eine große Rolle. Des Weiteren wird IFNα bei der Therapie verschiedener Tumorerkrankungen wie z.B. Melanomen, chronisch-myeloischer Leukämie, Haarzellleukämie, follikulärer Lymphomen oder Kaposi-Sarkomen eingesetzt. IFNα inhibiert dabei die Proliferation der Tumorzellen, induziert deren Apoptose und verstärkt die Antitumoraktivität verschiedener Immunzellen [1].

1.3. Retroviren

Retroviren wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts zum ersten Mal beschrieben. Ellermann und Bang injizierten 1908 gesunden Hühnern zellfreie Filtrate von Tumormaterial erkrankter Hühner und konnten so eine Leukämie auslösen [47]. 1911 beschrieb Rous die Übertragung von Sarkomen über solche Ultrafiltrate und charakterisierte das Rous-Sarkoma-Virus [162]. In den folgenden Jahren wurden weitere Retroviren beschrieben, wie z.B. das *Simian foamy virus* (SFV) bei Primaten, das Feline Immundefizienzvirus (FIV) bei Katzen, das Friend Murine Leukämievirus (F-MuLV) bei Mäusen und das Simiane Immundefizienz-Virus (SIV) bei Rhesusmakaken [48, 55, 105, 148]. 1980 wurde das erste humanpathogene Retrovirus, das Humane T-lymphotrope Virus 1 (HTLV-1) entdeckt, welches in Menschen eine T-Zell-Leukämie auslösen kann [150]. Wenige Jahre später wurde das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) als Ursache für das erworbene Immundefizienz-Syndrom (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) identifiziert [10]. Retroviren können entgegen des üblichen Weges RNA in DNA transkribieren. Sie sind die einzigen Viren, die für die Replikation ihr Genom in das Wirtsgenom integrieren [49]. Durch virale Onkogene oder die Aktivierung zellulärer Onkogene können Retrovirusinfektionen zur Entwicklung von Tumoren führen [116]. Das menschliche Genom besteht zu etwa 8 % aus retroviraler DNA. Diese bezeichnet man als endogene Retroviren [74].

1.3.1. Aufbau von Retroviren

Retroviren sind behüllte Viren mit einem Durchmesser von 80-100 nm [170]. Die Virushülle besteht aus einer Doppellipidschicht, auf deren Innenseite Matrixproteine verankert sind. Eingebettet in die Membran befinden sich außerdem externe Glykoproteine, die an der Bindung des Viruspartikels an die Wirtszelle beteiligt sind. Die Virushülle umschließt das Viruscapsid. Darin befindet sich das Virusgenom, welches aus zwei RNA-Einzelsträngen (ssRNA) mit positiver Polarität und einer Größe von 7-12 kB besteht. Das Genom einfacher Retroviren der Genera α-, β-, γ-, δ-, und ε-Retroviren besteht aus den Genen *env*, *gag* und *pol*, die für Strukturproteine und Enzyme codieren. *Gag* codiert für gruppenspezifische Antigene (Matrixproteine, Capsidproteine und Nukleoproteine), *env* für die Hüllproteine und *pol* für die Enzyme reverse Transkriptase, Protease und Integrase. Diese Enzyme befinden sich ebenso wie das Genom im Capsid. Retroviren wie Spuma- und Lentiviren besitzen außerdem

Gene (z.B. *tat*, *nef*, *vif* und *vpu*), welche für regulatorische und akzessorische Proteine codieren [129]. In Abbildung 1-4 ist eine schematische Darstellung des Aufbaus von Retroviren gezeigt.

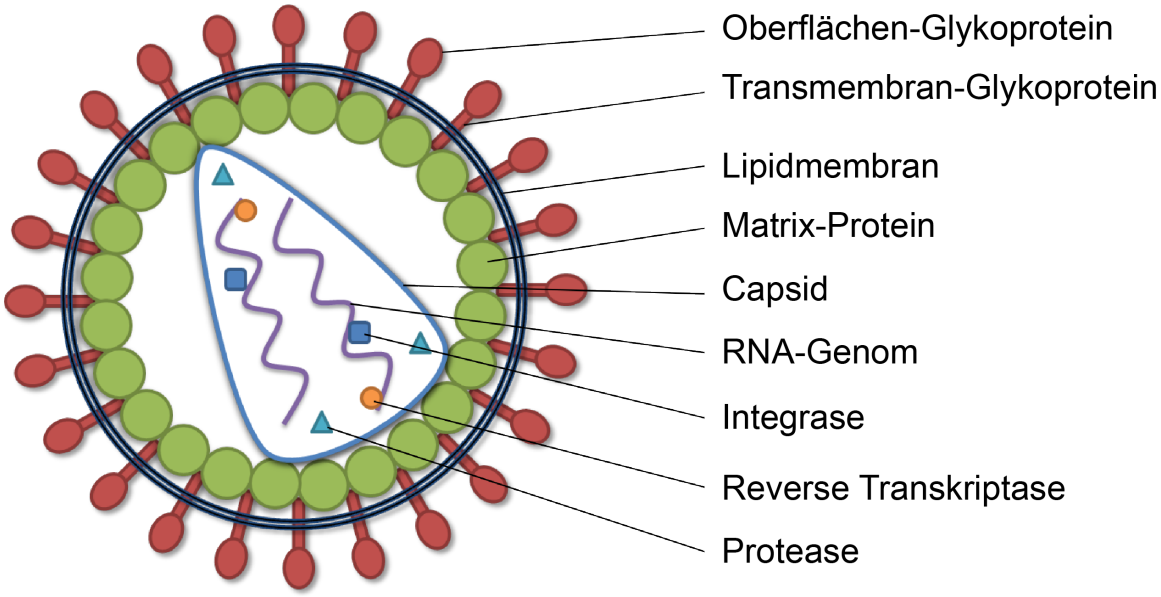


Abbildung 1-4: Aufbau von Retroviren.
Retroviren sind von einer Hülle umschlossen, in der Glykoproteine verankert sind, die an der Adsorption an die Wirtszelle beteiligt sind. Die Hülle umschließt das Capsid, in dem sich die virale ssRNA sowie die reverse Transkriptase, Protease und Integrase befinden. Das Genom aller Retroviren besteht aus den Genen *gag*, *pol* und *env*. (Verändert nach https://www.labome.com/method/Nucleic-Acid-Delivery-Lentiviral-and-Retroviral-Vectors.html)

1.3.2. Replikationszyklus von Retroviren

Die Replikation von Retroviren wird durch die Adsorption des Virus an die Wirtszelle induziert, wobei die retrovirusspezifischen Glykoproteine auf der Virusoberfläche an zelluläre Rezeptoren binden. Die virale Membran fusioniert anschließend mit der Membran der Wirtszelle und das Capsid wird in das Cytoplasma freigesetzt. Im Cytoplasma werden durch eine Konformationsänderung des Capsids die RNA sowie die Enzyme reverse Transkriptase, Integrase und Protease freigesetzt. Die reverse Transkriptase des Virus schreibt die ssRNA in dsDNA um. Dazu wird zunächst in 5´→3´ Richtung ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert und ein Hybrid aus RNA und DNA entsteht. Die reverse Transkriptase besitzt zusätzlich zur Polymerasefunktion eine RNase H-Funktion und baut den RNA-Anteil des Hybriden

ab. Anschließend wird komplementär zum DNA-Einzelstrang ein DNA-Doppelstrang synthetisiert. Der Doppelstrang, assoziiert mit den Proteinen, wird als sogenannter Präintegrationskomplex (PIC) in den Zellkern transportiert. Dort wird das dsDNA-Molekül in das Wirtsgenom integriert. Dazu entfernt das Enzym Integrase Nukleotide des viralen DNA-Strangs, sodass 5´-Überhänge entstehen und schneidet ebenfalls die zelluläre DNA. Anschließend integriert die Integrase die virale DNA in das Genom der Wirtszelle und die zellulären Reparatursysteme füllen die Lücken. Über die zelluläre RNA-Polymerase II wird das sogenannte integrierte Provirus in virale mRNA transkribiert und diese ins Cytoplasma transportiert. Die Ribosomen der Wirtszelle synthetisieren anschließend die viralen Proteine. Dabei werden die *env*-codierten Glykoproteine von Ribosomen am ER synthetisiert, über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert und in diese integriert. Gag und Gag/Pol-Vorläuferproteine werden von freien Ribosomen im Cytoplasma synthetisiert und akkumulieren an der Zellmembran. Durch den Kontakt mit ungespleißter viraler mRNA, die als neues virales Genom fungiert, stülpt sich die Zellmembran mitsamt der angelagerten Proteine um und schnürt neue Viruspartikel ab. Während dieses Prozesses, dem sogenannten *Budding*, beginnt die Reifung der Viren. Die Protease prozessiert dabei die Gag und Gag/Pol-Polyproteine in die reverse Transkriptase und die Integrase, sowie Matrix-, Capsid- und Nukleocapsidproteine. Mit Abschluss der Reifung entstehen infektiöse Viren [129]. In Abbildung 1-5 ist eine schematische Darstellung der Replikation von Retroviren gezeigt.

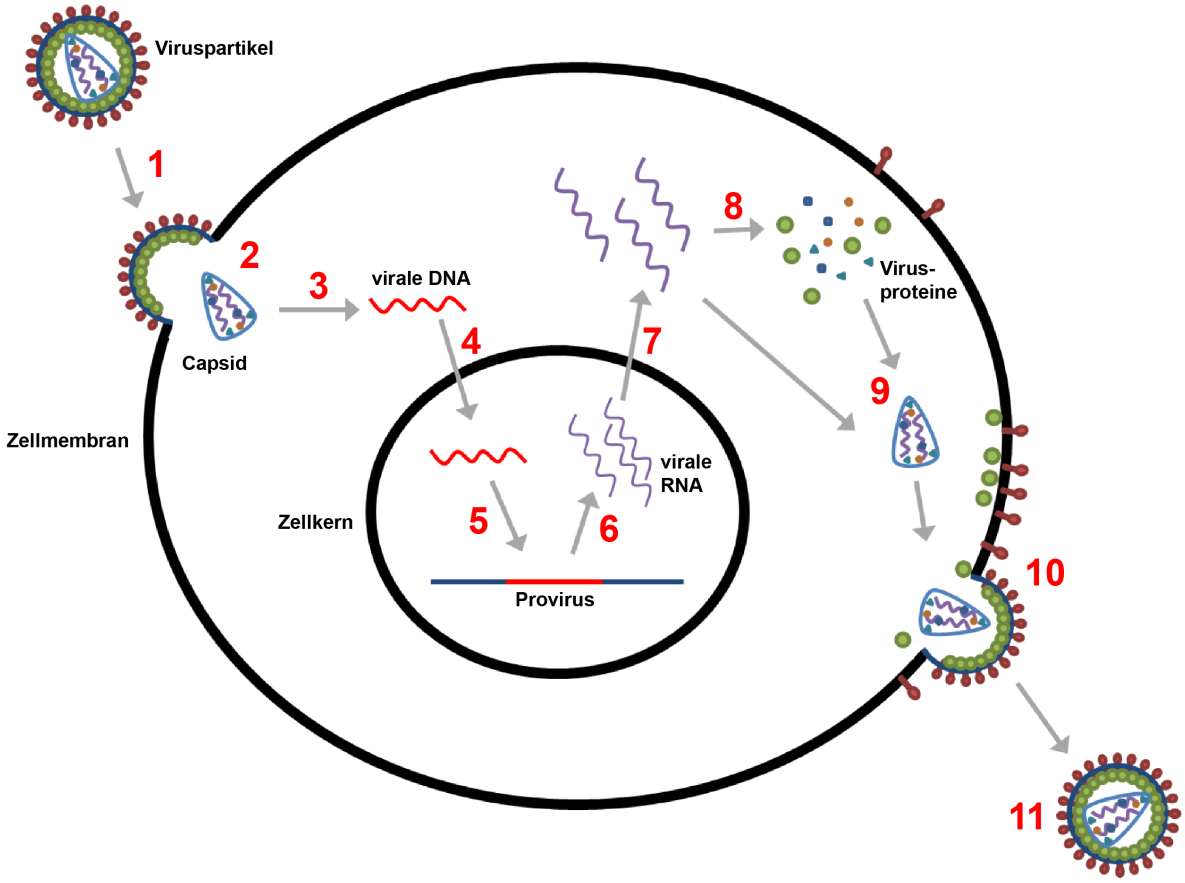


Abbildung 1-5: Replikationszyklus von Retroviren.
1) Adsorption des Virus an die Wirtszelle und Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran.
2) Freisetzung des Capsids in das Cytoplasma.
3) Reverse Transkription der ssRNA in dsDNA.
4) Transport des PIC in den Zellkern.
5) Integration des Virusgenoms in das Genom der Wirtszelle.
6) Transkription der DNA in mRNA.
7) Export der mRNA.
8) Proteinbiosynthese über zelluläre Ribosomen.
9) Verpacken neuer Viruspartikel.
10) *Budding* neuer Viruspartikel.
11) Reifung zu infektiösen Viruspartikeln.
(Verändert nach https://www.labome.com/method/Nucleic-Acid-Delivery-Lentiviral-and-Retroviral-Vectors.html)

1.3.3. Humanes Immundefizienz-Virus

Anfang der 1980er Jahre trat erstmals das erworbene Immundefiziensyndrom, kurz AIDS, auf [72]. 1983 wurde HIV als Auslöser dieser Krankheit identifiziert [10]. Die frühen Symptome einer akuten HIV-Infektion ähneln unter anderem mit Fieber, Müdigkeit und gastrointestinalen Beschwerden denen vieler anderer Virusinfektionen wie z.B. einer Influenza- oder Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion. Nach Abklingen der leichten Symptomatik folgt eine asymptomatische Phase, deren Dauer von zwei Jahren bis hin zu mehreren Dekaden reichen kann [63]. HIV infiziert primär T-

Helferzellen und diese werden sowohl durch eine Virus-induzierte Zytolyse, als auch die CTL-Antwort stark dezimiert [53]. Durch den irreversiblen Verlust der $CD4^+$ T-Zellen entwickelt sich im Laufe der Zeit eine immer gravierendere Immundefizienz. Dabei treten opportunistische Infektionen wie z.B. mit *Mycobacterium tuberculosis* oder Neoplasien wie z.B. Kaposi-Sarkome oder EBV-assoziierte B-Zell-Lymphome auf. Unbehandelt verläuft eine HIV-Infektion immer tödlich. Bis heute gibt es keinen wirksamen Impfstoff und keine Therapie, die zu einer kompletten Eliminierung der HIV-Infektion führen kann. Durch die kombinatorische Gabe verschiedener Wirkstoffe, der sogenannten cART (*combined antiretroviral therapy*) ist es allerdings möglich, den Ausbruch von AIDS zu unterdrücken. Dabei werden z.B. Nukleosid-, Nukleotid-, oder Nicht-Nukleosid-Analoga, sowie reverse Transkriptase-, Protease-, oder Integrase-Inhibitoren eingesetzt. Die Therapie inhibiert die Virusreplikation und kann zur Wiederherstellung der Funktionen des Immunsystems und dem Verschwinden der klinischen Symptome führen [63]. Allerdings ist neben den starken Nebenwirkungen die rapide Entwicklung von Resistenzen äußerst problematisch, da HIV aufgrund der fehlenden Korrekturfunktion der reversen Transkriptase eine hohe Mutationsrate besitzt [113, 183].

1.3.4. Tiermodelle für Retrovirus-Infektionen

Im Laufe jahrzehntelanger Forschung wurden viele Erkenntnisse über die Pathogenese und die Latenz nach der Integration von HIV in *in vitro* Zellkultursystemen gewonnen. Allerdings birgt der Einsatz von transformierten Zelllinien und Primärzellen einige Schwierigkeiten. So kann die Replikation von HIV in T-Zelllinien zu einer Anpassung der Virusreplikation an das Zellkultursystem und somit zu abweichenden Ergebnissen führen [52]. Aus diesem Grund ist der Einsatz von *in vivo* Systemen von großem Interesse. Für die HIV-Forschung stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung. Nur Schimpansen und Gibbons können direkt mit HIV infiziert werden, das Virus repliziert allerdings nur sehr schlecht und die Tiere entwickeln nur selten AIDS [115, 142, 144]. Eine Alternative ist daher die Infektion von Rhesusmakaken mit SIV, was zur Entwicklung einer Immundefizienz mit AIDS-ähnlichen Symptomen führt [106]. Allerdings erschweren die limitierte Anzahl der Versuchstiere und deren heterologer genetischer Hintergrund, begrenzte Möglichkeiten das Immunsystem zu manipulieren, sowie ethische, finanzielle und logistische Gründe die Forschung mit Primaten. Das Arbeiten mit Mausmodellen

hingegen ist unkompliziert und kongene Inzuchtstämme ermöglichen die einfachere Reproduktion der Ergebnisse. Mäuse können allerdings weder mit HIV, noch mit SIV infiziert werden. Aufgrund des gut definierten genetischen Hintergrunds und der Möglichkeiten das murine Immunsystem zu manipulieren ist es allerdings möglich, sogenannte humanisierte Mäuse zu generieren. Sie besitzen ein teilweise humanes Immunsystem und können mit HIV infiziert werden. Zur Generierung eines humanen Immunsystems wird immundefizienten SCID (*severe combined immundeficient*)-Mäusen humanes fötales Gewebematerial unter die Nierenkapsel transplantiert und hämatopoetische Stammzellen des Donors appliziert [123]. Allerdings ist die Abstoßung des Transplantats ein häufiges Problem. Auch wenn es Möglichkeiten gibt das Risiko dieser sogenannten *graft-versus-host disease* zu verringern [101], ist die Generierung dieser Mäuse mit einem hohen Kosten- und Zeitaufwand verbunden und ethisch umstritten, da humanes fötales Gewebe benötigt wird. Ein alternatives Modell für die Erforschung retroviraler Infektionen im Mausmodell ist das Friend Virus (FV). Während das FV in suszeptiblen Mäusen eine Splenomegalie und eine letale Erythroleukämie verursacht, entwickeln Mäuse, die resistent gegenüber der Virus-induzierten Erkrankung sind, eine chronische Virusinfektion. Obwohl sich die Pathologie der FV-Infektion in Mäusen von denen einer HIV-Infektion im Menschen unterscheidet, ist die Immunantwort sehr ähnlich. Da das FV-Modell sehr gut erforscht ist, eignet es sich zur Untersuchung der Interaktion des Immunsystems mit Retrovirus-Infektionen [42, 79].

1.3.5. Pathogenese des Friend Virus

Der FV-Komplex besteht aus dem pathogenen, aber replikations-inkompetenten SFFV (*spleen focus forming virus*) und dem apathogenen, replikationsfähigen F-MuLV. Durch ein defektes *gag*-Gen ist das SFFV nicht in der Lage virale Partikel zu bilden. Von daher ist die Infektion mit beiden Viren notwendig, damit die RNA des SFFV in F-MuLV-codierte Viruspartikel verpackt und das Virus verbreitet werden kann [43]. Eine Infektion mit F-MuLV allein ist in adulten Mäusen apathogen und führt lediglich in neugeborenen Mäusen zu Splenomegalie, Anämie und Erythroleukämie [55]. Die Zielzellen des FV-Komplexes während der akuten Infektion sind Erythrozyten, myeloide Zellen, B-Zellen und $CD4^+$ T-Zellen, während der persistenten Infektion hauptsächlich Makrophagen, sowie follikuläre B-Zellen und follikuläre $CD4^+$ T-Zellen [192].

Die Pathogenese wird durch die Infektion von Erythroblasten mit dem SFFV induziert, was zur Expression des *env*-codierten Glykoproteins gp55 auf der Zelloberfläche führt. Das Glykoprotein bindet an den Erythropoetin (EPO)-Rezeptor kernhaltiger Erythroblasten und induziert deren Expansion unabhängig von EPO [34, 93]. Die massive Proliferation erhöht die Anzahl der potenziellen Wirtszellen enorm. Im Anschluss wird das Virus in das Wirtszellgenom integriert. Dies geschieht in 95 % aller FV-transformierten Zellen am Lokus *spi-1* (*SFFV provial integration site-1*) [133]. Die Integration führt zur Überexpression des Transkriptionsfaktors PU.1, welcher die Tyrosin-Phosphatase SHP-1 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*) hochreguliert. Diese dephosphoryliert STAT-1 und inhibiert dadurch die Differenzierung der Erythroblasten. Die zusätzliche Inaktivierung des Tumorsuppressor-Gens p53 ermöglicht die uneingeschränkte Proliferation der transformierten Zellen [25]. Suszeptible Mäuse entwickeln eine schwere Splenomegalie und eine Erythroleukämie [43]. Anders als suszeptible Mausstämme, entwickeln Mäuse, die resistent gegenüber der Virus-induzierten Erkrankung sind, zwar eine akute Splenomegalie, können diese aber kontrollieren und entwickeln keine Erythroleukämie. Dennoch bleibt die Infektion persistent [43]. Dabei spielen die nicht-immunologischen Resistenzgene *Fv-1*-*Fv-6*, besonders *Fv-2*, eine Rolle. Zwar können Mäuse, die dieses Resistenzgen tragen, mit dem FV infiziert werden, allerdings blockiert *Fv-2* die durch das Glykoprotein gp55 induzierte Erythroblastose [84]. Als immunologische Faktoren spielen verschiedene H-2 Haplotypen (Regionen der MHC-Gene in der Maus) eine entscheidende Rolle. H-2D beeinflusst z.B. die Präsentation viraler Antigene für die CTL-Antwort, H-2A und H-2E für die $CD4^+$ T-Zell-Antwort [79]. Außerdem ist das Gen *APOBEC3/Rfv-3* (*recovery from Friend virus gene 3)* für die Produktion neutralisierender Antikörper gegen das FV essenziell [175].

1.3.6. Immunantwort gegen eine Friend Virus-Infektion

Zelluläre Immunantwort:

Während der frühen Phase, drei bis vier Tage nach einer FV-Infektion, spielen primär NK-Zellen eine wichtige Rolle. Sie reduzieren die Viruslast durch direkte Eliminierung infizierter Zellen über die Sekretion zytotoxischer Granula, Rezeptor-vermittelte Apoptose und sie sezernieren pro-inflammatorische Zytokine [110]. Anschließend expandieren $CD4^+$ T-Zellen, gefolgt von $CD8^+$ T-Zellen. $CD4^+$ T-Zellen unterstützen sowohl die Antikörperproduktion durch die Aktivierung von B-Zellen, als auch die $CD8^+$

T-Zell-Antwort [136, 180]. Außerdem sind sie in der Lage FV-infizierte Zellen direkt zu lysieren und die Virusreplikation über die Sekretion von IFNγ zu inhibieren [90]. $CD8^+$ T-Zellen sind essenziell für die Kontrolle einer FV-Infektion und expandieren besonders stark in der Milz und im Knochenmark [197]. Sie eliminieren FV-infizierte Zellen über die Sekretion zytotoxischer Granula und sezernieren pro-inflammatorische Zytokine [197]. In der späten Phase der akuten Infektion (zwei bis drei Wochen nach der Infektion) verlieren $CD8^+$ T-Zellen allerdings ihre zytotoxische Funktion und die Fähigkeit IFNγ und TNFα zu exprimieren. Dies ist unter anderem auf eine erhöhte Expression inhibitorischer Rezeptoren wie PD-1 auf der Oberfläche von $CD8^+$ T-Zellen zurückzuführen, deren Interaktion mit dem Liganden PD-L1 zur Dysfunktion führt [3, 198]. Außerdem werden die Zellen durch T_{regs}, deren Expansion ebenfalls durch die FV-Infektion induziert wird, und Myeloide Suppressorzellen (*myeloid derived suppressor cells,* MDSC) supprimiert [45, 197]. Diese sogenannte *T cell exhaustion* führt zu einer unvollständigen Eliminierung der FV-Infektion und zur Entwicklung der Chronizität [43].

Interferon-Behandlung während der FV-Infektion:

In der akuten Phase der Immunantwort gegen eine Infektion mit den meisten Viren wird initial die Expression von Typ I IFN induziert. Murine Retroviren supprimieren allerdings die Typ I IFN-Expression [108]. IFNα wird daher bei einer FV-Infektion nur schwach exprimiert und ist nicht systemisch im Serum nachweisbar [43]. Allerdings wurde in Milzzellen die verstärkte mRNA-Expression der IFNα Subtypen *Ifna4* und *Ifna9* nachgewiesen [61]. Die exogene Applikation der IFNα Subtypen α1, α4, α9 und α11, nicht aber α2, α5, α6 während der akuten FV-Infektion führte zu einer effizienten Reduktion der Viruslast. Die antivirale Kapazität von IFNα1 wurde dabei größtenteils über einen immunmodulatorischen Effekt auf $CD8^+$ T-Zellen vermittelt. IFNα11 verbesserte die Effektorfunktionen von NK-Zellen und zeigte auch einen direkten antiviralen Effekt über die Induktion antiviraler Enzyme [61, 65].

1.4. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Induktion von Typ I IFN ist eine unmittelbare Reaktion des Immunsystems auf eine Virusinfektion. Zu den Typ I IFN zählen zahlreiche verschiedene IFNα Subtypen, deren biologische Aktivitäten sich stark voneinander unterscheiden. Unter anderem sind dafür verschiedene Bindungsaffinitäten der Subtypen zum IFNAR, die Rezeptoravidität, die Induktion unterschiedlicher Signalwege, sowie Virus- und Zelltyp-spezifische Unterschiede verantwortlich. Mit seinen antiviralen, immunmodulatorischen und antiproliferativen Eigenschaften ist IFNα ein potenziell sehr wirkungsvolles Therapeutikum gegen Virusinfektionen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern die verschiedenen IFNα Subtypen die Proliferation und die Effektorfunktion von Retrovirus-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen beeinflussen. Dazu wurde ein Friend Retrovirus-spezifischer *in vitro* Proliferationsassay etabliert, um den Effekt verschiedener IFNα Subtypen auf die Proliferation und die Zytokinexpression von $CD4^+$ T-Zellen zu analysieren. Außerdem sollte mittels IFNAR-defizienter DCs untersucht werden, inwiefern die verschiedenen biologischen Effekte der IFNα Subtypen direkt oder indirekt auf die $CD4^+$ T-Zellen wirken. In verschiedenen *in vitro* T-Zell-Differenzierungen sollte der Einfluss verschiedener IFNα Subtypen auf die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in verschiedene T-Helfer-Subpopulationen untersucht werden. Zusätzlich sollten die *in vitro* beobachteten Effekte anschließend *in vivo* in zwei verschiedenen Mausmodellen (akute FV-Infektion; Infektion mit *Citrobacter rodentium*) untersucht werden.

2. Material

2.1. Geräte

Tabelle 2-1: Geräte

Geräte	Hersteller
-80°C Gefrierschrank MDF-U73V	Sanyo, München
Auflichtmikroskop LabA1 AX10	Zeiss, Oberkochen
BioSpectrometer® basic	Eppendorf, Hamburg
Automatische Multipipette Voyager 2	Integra Biosciences, Konstanz
CO_2 Brutschrank	Sanyo, München
CO_2 Brutschrank Galaxy 48R	New Brunswick/Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer FACSCanto™ II	BD, Heidelberg
Durchflusszytometer LSR II	BD, Heidelberg
Heizmischer Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Inverses Mikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar
Kühlgefrierkombination Comfort	Liebherr, Ochsenhausen
Manuelle Pipetten (2,5; 20; 200; 1000 µL)	StarLab, Hamburg
Mehrkanalpipetten (100; 300 µL)	StarLab, Hamburg
Multipette AutoRep E	Rainin, Mettler Toledo, Gießen
MojoSort™ Magnet	BioLegend, San Diego (USA)
MiniMACS™ Separator	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Multiplatten-Luminometer GloMax® - Multi Detection System	Promega, Mannheim
Neubauer Zählkammer	Hecht-Assistent, Sonderheim/Rhön
PCR System StepOne	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

PCR Werkbank AirClean 600	StarLab, Hamburg
pH-Meter FiveEasy F20	Mettler Toledo, Gießen
Pipettierhilfe Ergo One Fast	StarLab, Hamburg
Sicherheitswerkbank HeraSafe™	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Tube Roller	StarLab, Hamburg
Vortexmischer Genius 3	IKA Labortechnik, Staufen
Waage Scout Pro	Ohaus, Kirchheim
Wärmelampe	Philips, Amsterdam
Wasserheizbad GFL	Oehmen Labortechnik, Essen
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Avanti J-26Xpi	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Sorvall RC6Plus	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

2.2. Verbrauchsmaterial

Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Amicon Ultra-15, PLGC Ultracel-PL Membran (10, 50 kDa)	Merck-Millipore, Darmstadt
Bechergläser (50, 100, 200, 500 mL)	Schott, Mainz
Blunt Fill Sicherheitsaufziehkanülen	BD, Heidelberg
Einmalspritzen Discardit II (2 mL)	BD, Heidelberg
Erlenmeyerkolben (100, 200 mL)	Schott, Mainz
Feindosierungsspritzen Injekt®-F	B. Braun, Melsungen
FACS Röhrchen	BD, Heidelberg
Kanüle (G23, G25), steril	B. Braun, Melsungen

Kryotubes (2mL)	Greiner Bio One, Frickenhausen
MACS Säulen (MS)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Handschuhe Vasco Nitril	B. Braun, Melsungen
MacConkey-Nährböden Nr. 3	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Mikro-Schraubverschlussröhrchen, steril (1,5 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
MicroAmp® Fast Optical 48-Well Plate	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
MicroAmp® Fast Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Nunc Maxisorp Flachbodenplatten (96-Loch)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Pinzetten, chirurgisch	B. Braun, Melsungen
Pipetten, steril (5, 10, 25 mL)	Greiner Bio One, Frickenhausen
Pipettenspitzen, steril und unsteril (10, 20, 200, 300, 1000 µL)	StarLab, Hamburg
Pipettenspitzen, steril (300 µL)	Integra Biosciences, Konstanz
Reagenz-Reservoir (25 mL) (+ Einwegeinsätze)	Integra Biosciences, Konstanz
Reaktionsgefäße, steril (0,5, 1,5, 2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Scheren	B. Braun, Melsungen
U-Boden Platte, steril, 96-Loch	Greiner Bio One, Frickenhausen
Zellkulturflasche, steril (T25, T75, T175)	Greiner Bio One, Frickenhausen
Zellkulturplatte, steril (6-, 12-, 24-, 48-Loch)	Greiner Bio One, Frickenhausen
Zellkulturplatte, steril, 96-Loch	Corning Falcon™, Wiesbaden
Zellkulturplatte, weiß, 96-Loch, optisch	Greiner Bio One, Frickenhausen

Zellkultur Schale, steril, 100/20 mm	Greiner Bio One, Frickenhausen
Zellsiebe (30, 70 µm)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Zentrifugenröhrchen (15, 50 mL)	Greiner Bio One, Frickenhausen

2.3. Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien und Medien von den Firmen Applichem (Darmstadt), BD (Heidelberg), BioLegend (San Diego, USA), Invitrogen (Karlsruhe), InvivoGen (Toulouse, Frankreich), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma Aldrich (Darmstadt), und Thermo Fisher Scientific (Schwerte) bezogen.

2-(4-4-Hydroxyethal)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 3-Amino 4-Ethylcarbazol (AEC), 7-Aminoactinomycin (7-AAD), β-Mercaptoethanol, Brefeldin A (BFA), Calciumchlorid ($CaCl_2$), Dextrose, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dinatriumhydrogenphosphat, DMEM Medium, DNA/RNA *Shield* (Zymo Research, Freiburg), Essigsäure, Ethanol reinst, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (FVD), FACS *Clean*, FACS *Flow*, FACS *Rinse*, Formalin (40 %), Fötales Kälberserum (FCS), Glukose, IMDM-Medium, Ionomycin, Isofluran® (AbbVie, North Chicago (USA)), Kaliumchlorid, Kanamycinsulfat, LB-Agar Fast-Media® *Base Agar*, *Lysogeny broth* (LB-Medium), L-Glutamin, Natriumacetat, Natriumazid, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumpyruvat, N-N-Dimethylformamid, Paraformaldehyd (PFA, 4 %), Penicillin/Streptomycin (P/S), Phorbol 12-myristat-13-acetat (PMA), Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Pikrinsäure, Puromycin, Rinderserumalbumin (BSA), RPMI 1640 Medium, Schwefelsäure, SOC-Medium, Tag-it Violet™ (VT), Trypanblau, Tween-20, Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Zitronensäure

2.4. Pufferlösungen

Tabelle 2-3: Pufferlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
AEC Substratlösung	AEC Stocklösung wurde 1:20 in 0,05 M Natriumacetat angesetzt und die Reaktion

	durch die Zugabe von 30 % H_2O_2/mL Lösung (1:2.000) gestartet.
AEC Stocklösung	20 AEC-Tabletten wurden in 100 mL N-N-Dimethylformamid gelöst
Bouin´s Lösung	75 mL gesättigte Pikrinsäure 25 mL neutrales Formalin (40 %) 5 mL Essigsäure
ELISA *Assay diluent*	PBS 10 % FCS
ELISA Waschpuffer	PBS 0,05 % Tween-20
FACS Puffer	PBS 0,1% BSA 0,02 % Natriumazid
2 x HBS (*HEPES buffered saline*; pH 7,05)	16 g/L Natriumchlorid 0,74 g/L Kaliumchlorid 0,198 g/L Dinatriumhydrogenphosphat 2 g/L Dextrose 10 g/L HEPES ad 1L H_2O
MACS Puffer	PBS 0,5% BSA 2 mM EDTA
Natriumcarbonatpuffer (pH 9,6)	0,05 M Natriumcarbonat

2.5. Nährmedien

Tabelle 2-4: Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
DC Medium	RPMI 1640 10 % FCS

	1 % P/S
	1 mM Natriumpyruvat
	50 µM β-Mercaptoethanol
	1 ng/mL murines rekombinantes IL-4
	5 ng/mL murines rekombinantes GM-CSF
Einfriermedium	FCS
	10 % DMSO
Medium für 293mIFNalpha11-Zellen	DMEM
	10 % FCS
	1 % P/S
	2,5 µg/mL Puromycin
Medium für HEK293T-Zellen	DMEM
	10 % FCS
	1 % P/S
Medium für *Mus dunni*-Zellen	RPMI 1640
	10 % FCS
	1 % P/S
Medium für Mx/Rage7-Zellen	DMEM
	10 % FCS
	1 % P/S
	1 mM Natriumpyruvat
	50 µM β-Mercaptoethanol
Medium für Proliferationsassay	AIM-V
	10 % FCS
	1 % P/S
Medium für T-Zell-Differenzierung	DMEM
	10 % FCS
	1 % P/S
	50 µM β-Mercaptoethanol
PBBS	1 L PBS
	1 g Glukose

2.6. Antikörper

2.6.1. Antikörper für Durchflusszytometrie

Tabelle 2-5: Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper-Fluorochrom	Hersteller	Klon
Anti-CD4-PerCP	BioLegend, San Diego (USA)	GK1.5
Anti-CD4-FITC	BD, Heidelberg	GK1.5
Anti-CD11c-FITC	Thermo Fisher Scientific, Schwerte	N418
Anti-CD62L-PE-Cy7	BioLegend, San Diego (USA)	MEL-14
Anti-CD86-BV510	BioLegend, San Diego (USA)	GL-1
Anti-IFNγ-FITC	BioLegend, San Diego (USA)	XMG1.2
Anti-IFNγ-PE	BioLegend, San Diego (USA)	XMG1.2
Anti-IL-2-PE	BioLegend, San Diego (USA)	JES6-5H4
Anti-IL-2-PE-Cy7	BioLegend, San Diego (USA)	JES6-5H4
Anti-IL-13-PE-Cy7	Thermo Fisher Scientific, Schwerte	eBio13a
Anti-IL-17a-APC	Thermo Fisher Scientific, Schwerte	eBio17B7
Anti-TNFα-BV510	BioLegend, San Diego (USA)	MP6-XT22
Anti-IL-12/23p40-PE	BioLegend, San Diego (USA)	C15.6
Anti-TCR Vα2-PE	BioLegend, San Diego (USA)	B20.1
Anti-TCR Vα3.2-eF710	Thermo Fisher Scientific, Schwerte	RR3-16

2.6.2. Sonstige Antikörper

Tabelle 2-6: Sonstige Antikörper

Antikörper	Hersteller
AK720; monoklonaler Maus-anti-MuLV env (Isotyp IgG2b)	Aufgereinigt aus Hybridomazellüberstand
Hamster-anti-Maus CD28 (aufgereinigt)	BioLegend, San Diego (USA)
Hamster-anti-Maus CD3ε (aufgereinigt)	BioLegend, San Diego (USA)
IgG2b-HRP; monoklonaler Ziege-anti-Maus	Dianova, Hamburg
Ratte-anti-Maus IL-4	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Ratte-anti-Maus IFNγ	Miltenyi, Bergisch Gladbach

2.7. Kommerzielle Standardtests

Tabelle 2-7: Kommerzielle Standardtests

Bezeichnung	Hersteller
All-in-One® cDNA Synthesis Supermix	Bimake, Houston (USA)
CD62L *MicroBeads*, Maus	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Quick-RNA™ Miniprep Kit	Zymo Research, Freiburg
Fixation Buffer	BioLegend, San Diego (USA)
Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (10X)	BioLegend, San Diego (USA)
LEGENDplex™ Mouse Th Cytokine Panel (13-plex)	BioLegend, San Diego (USA)
MojoSort™ Mouse CD4 T Cell Isolation Kit	BioLegend, San Diego (USA)
Mouse IL-12 (p70) ELISA Max™ *Deluxe Set*	BioLegend, San Diego (USA)
Mouse IL-17A ELISA Max™ *Standard Set*	BioLegend, San Diego (USA)
Mouse IL-23 ELISA Max™ *Deluxe Set*	BioLegend, San Diego (USA)

Macherey-Nagel™ NucleoBond™ Xtra Maxi-Kit	Macherey-Nagel, Düren
Percoll™ *Solution*	GE Healthcare GmbH, Freiburg
PowerUp™ SYBR® Green MasterMix	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
RNAeasy® Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.8. Rekombinante Zytokine

Tabelle 2-8: Rekombinante Zytokine

Bezeichnung	Hersteller
Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor (GM-CSF), murin	Eigene Herstellung, gewonnen aus Zellkulturüberständen
IL-2, human	Miltenyi, Bergisch Gladbach
IL-4, murin	Peprotech
IFNα Subtypen (α1, α2, α4, α5, α6, α9, α11), murin	Eigene Herstellung, gewonnen aus Zellkulturüberständen
IFNα Subtypen (α1, α4, α11), murin	PBL Assay Science, New Jersey (USA)
IFNα2, murin	Sino Biological, Peking (China)
IL-6, murin	Peprotech
TGFβ, human	Peprotech
Universales IFNα, murin	PBL Assay Science, New Jersey (USA)

2.9. Versuchstiere

2.9.1. Wildtypmäuse

Tabelle 2-9: Wildtypmäuse

Bezeichnung	Beschreibung
Balb/c	Resistenzgene: H-$2^{d/d}$, FV-$2^{s/s}$ (Charles River)
C57BL/6	Resistenzgene: H-$2^{b/b}$, FV-$2^{r/r}$ (Harlan)
CB6F1	F1 Generation von einer weiblichen Balb/c Maus und einer männlichen C57BL/6 Maus Resistenzgene: H-$2^{b/d}$, FV-$2^{r/s}$

2.9.2. Transgene Mäuse

Tabelle 2-10: Transgene Mäuse

Bezeichnung	Beschreibung
EVa2TCRtg	TCR-transgene (TCRtg) Mäuse, die einen α/β-TCR exprimieren, der spezifisch für ein MHCII-restringiertes Epitop des FV $env_{122-141}$-Peptids ist (transgene β- und Vα2-Kette). Die Mäuse sind außerdem *Rag1*$^{-/-}$. Die Mäuse wurden freundlicherweise von George Kassiotis (*National Institute for Medical Research*, London, UK) zur Verfügung gestellt und haben den C57BL/6 Hintergrund.
EVa3 x CD45.1	F1 Generation von Eva3- und CD45.1-Mäusen. EVa3: TCRtg Mäuse, die einen α/β-TCR exprimieren, der spezifisch für ein MHCII-restringiertes Epitop des FV $env_{122-141}$-Peptids ist (transgene β- und Vα3.2- Kette). Die Eva3 Mäuse wurden freundlicherweise von George Kassiotis (*National Institute for Medical Research*, London, UK) zur Verfügung gestellt und haben den C57BL/6 Hintergrund.
CD8TCRtg x IFNAR$^{-/-}$	F2 Generation von CD8TCRtg (DbGagL TCR transgene Mäuse) und IFNAR$^{-/-}$ (IFNAR defiziente Mäuse). Genotyp:

CD8TCRtg (tg/tg); IFNAR$^{-/-}$.
Die Mäuse haben den C57BL/6 Hintergrund

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.

2.10. Viren

Tabelle 2-11: Viren

Bezeichnung	Beschreibung
FV-Komplex (FV)	Komplex bestehend aus SFFV und F-MuLV. Der verwendete Stock wurde aus infizierten Mäusen gewonnen [41].

2.11. Zelllinien

Tabelle 2-12: Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung
293mIFNalpha11	HEK293E Zellen mit pCEP-PU-IFN episomalem Vektor vom HZI Braunschweig.
HEK293T	Menschliche embryonale Nierenepithelzelle (*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 [172].
Mus dunni	Murine Firoblasten-Zelllinie [100]

Mx/Rage7	Virus-transformierte Zelllinie mit einem temperatur-induzierbarem Promotor, die *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) exprimieren können. Bereitgestellt vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig [16].

2.12. Bakterien

Tabelle 2-13: Bakterien

Bezeichnung	Beschreibung
5-alpha kompetente *Escherichia coli*	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Citrobacter rodentium (Stamm: ICC169)	Derivat des *C. rodentium* Stammes ICC168, der bei gleichbleibender Pathogenität über eine Nalidixin Resistenz verfügt [28]. Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Astrid Westendorf vom Institut für medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Essen

2.13. Plasmide

Tabelle 2-14: Plasmide

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bezugsquelle
pkCMVint.	Expressionsvektor mit SV40 ori, HCMV IE1 Enhancer/Promotor, SV40 int polyA Signal, HCMV intron, MHC, Kan_r	Vical Inc., USA
pkCMVint.IFNα1	basierend auf pkCMVint., enthält IFNα1 Fragment -21 bis +525 Basenpaare (bp)	[196]
pkCMVint.IFNα2	basierend auf pkCMVint., enthält IFNα2 Fragment -21 bis +596 bp	[196]

pkCMVint.IFNα4	basierend auf pkCMVint., enthält IFNα4 Fragment -21 bis +584 bp	[196]
pkCMVint.IFNα5	basierend auf pkCMVint., enthält IFNα5 Fragment -18 bis +593 bp	[196]
pkCMVint.IFNα6	Basierend auf pkCMVint., enthält IFNα6 Fragment -24 bis +590 bp	[196]
pkCMVint.IFNα9	basierend auf pkCMVint., enthält IFNα9 Fragment -25 bis +595 bp	[196]

2.14. Oligonukleotide

Tabelle 2-15: Oligonukleotide

Gen	Hybridisierungs-temperatur	Konzentration	Sequenz
Actb	53 °C	3´: 10 µM 5´: 10 µM	Fwd: caagaaggaaggctggaaaa Rev: aaatcgtgcgtgacatcaaa
Il17a	58°C	3´: 3 µM 5´: 9 µM	Fwd: gctccagaaggccctcagactacc Rev: ttccctccgcattgacacagc

2.15. Software

Tabelle 2-16: Software

Software	Entwickler
Adobe Illustrator	Adobe Systems, San Jose (USA)
Adobe Photoshop	Adobe Systems, San Jose (USA)
EndNote™	Clarivate Analytics, Philadelphia (USA)
FACS Diva Software	BD, Heidelberg
FlowJo Software	Tree Star (USA)
GraphPad PRISM	Graph Pad Software Inc., San Diego (USA)

LEGENDplex v8.0 Software	Vigene Tech, Carlisle (USA)
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, Redmont (USA)
StepOne Software v2.3	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Kultivierung von Zellen

Allgemein erfolgte die Zellkultur in einem CO_2 Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und mit einem 5 % CO_2/Luft-Gemisch. Die Kultivierung von Mx/Rage7-Zellen erfolgte bei 32 °C. Adhärente Zellen wurden liegend in Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Ernten und Verdünnen wurde das verbrauchte Medium entfernt und der Zellrasen mit PBS überschichtet um das restliche Medium zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 % Trypsin-EDTA überschichtet und abgelöst. Dieser Prozess wurde mit kaltem Vollmedium gestoppt und die Zellsuspension abzentrifugiert (300 x g, 8 min). Das Zellpellet wurde in Vollmedium resuspendiert und je nach Zelllinie in einem adäquaten Verhältnis in eine neue Kulturflasche ausgesät.

3.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren:

Für die Lagerung von Zellen über einen längeren Zeitraum wurden diese in FCS, versetzt mit 10% DMSO, in einem Stickstofftank eingefroren. DMSO diffundiert durch die Zellmembran, wo es das Wasser in der Zelle ersetzt. So erhält es die Löslichkeit der Zellen und verhindert die Bildung von Eiskristallen, welche die Zellstruktur zerstören würden. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 1 x 10^6 Zellen/mL in FCS (+10 % DMSO) über Nacht bei -80 °C in einem Gefrierbehälter mit 100 % Isopropanol gelagert, welcher ein kontrolliertes Einfrieren mit -1 °C pro Minute ermöglicht. Anschließend wurden die Zellen in einen Stickstofftank überführt.

Auftauen:

Um die im Stickstofftank gelagerten Zellen weiter kultivieren zu können, muss zunächst das DMSO aus dem Medium entfernt werden, da dieses für die Zellen toxisch ist. Hierfür wurden die Zellen zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in 10 mL Vollmedium aufgenommen und zentrifugiert (300 x g, 8 min). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in frischem Vollmedium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche mit dem entsprechenden Volumen Vollmedium ausgesät.

3.1.3. Zellzahlbestimmung

Die Anzahl und der Vitalitätszustand der Zellen in einer Zellsuspension wurden mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Eine erhöhte Membrandurchlässigkeit toter Zellen im Vergleich zu lebenden Zellen ermöglicht das Eindringen des Farbstoffs Trypanblau in tote Zellen. So können diese von Lebenden durch eine intensive Färbung unterschieden werden. Für die Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen, wurde eine geeignete Verdünnung der Zellen mit Trypanblau erstellt und mittels einer Neubauer-Zählkammer vier Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten ausgezählt. Jedes Quadrat besitzt eine Fläche von 0,04 mm^2 und eine Tiefe von 1 mm. Somit ergibt sich ein Volumen von 0,004 µL. Folgende Formel wurde für die Berechnung der Zellzahl benutzt:

$$\mathbf{C = n \times 10^4}$$

C = Zellzahl/mL

n = Mittelwert der gezählten Zellen

10^4 = Volumenrechnungsfaktor für 1mm^3

Die Gesamtzellzahl wurde durch Multiplikation der Zellzahl/mL mit dem Volumen berechnet.

3.2. Herstellung von Interferonen

3.2.1. Vermehrung von IFNα Subtyp Plasmiden

3.2.1.1. Retransformation

Für die Vermehrung von Plasmiden der IFNα Subtypen α1, α2, α4, α5, α6 und α9 wurden kompetente Bakterien auf Eis ausgetaut und 125 µL des Bakterienstocks mit 0,5 µg Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden mittels Hitzeschock bei 42 °C für 30 s transformiert und anschließend nach Zugabe von 250 µL SOC-Medium für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden auf LB-Agar-Platten (+50 µg/mL Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Selektion transformierter Bakterien erfolgte über ein Kanamycinresistenz-Gen.

3.2.1.2. Isolation der Plasmid-DNA

Einzelne Bakterienkulturen (siehe 3.2.1.1.) wurden ausgewählt und zum Animpfen einer 3 mL Vorkultur in LB-Medium (+50 µg/mL Kanamycin) verwendet. Nach 6-stündiger Inkubation unter Schütteln bei 37 °C wurde die Vorkultur in 1 L LB-Medium (+50 µg/mL Kanamycin) überführt. Die weitere Inkubation erfolge über Nacht. Die Plasmid-DNA wurde mittels Macherey-Nagel™ NucleoBond™ Xtra Maxi-Kit nach Herstellergaben isoliert.

3.2.1.3. Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem BioSpectrometer® basic der Firma Eppendorf.

3.2.2. Kalzium-Phosphat-Transfektion

Für die Transfektion von HEK293T-Zellen mit IFNα-Plasmid-DNA mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitat wurden am Vortag 1,6 x 10^6 HEK293T-Zellen in einer T175-Zellkulturflasche ausgesät. 1 h vor der Transfektion wurde das Medium der Zellen gegen frisches Vollmedium ausgetauscht. Für jeden Ansatz wurden 175 µg Plasmid-DNA und 310 µL 2 M $CaCl_2$ mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 2,5 mL aufgefüllt und gründlich vermischt. Anschließend wurde das Gemisch, unter Zuführung von Luft zur Blasenbildung, langsam auf 2,5 mL 2 x HBS getropft. Das Gemisch wurde dann, mit der Zellkulturflasche in aufrechter Position, langsam auf den HEK-293T-Zellrasen getropft. Nach ca. 8-stündiger Inkubation bei 37°C wurde das Medium entfernt und durch DMEM (+2 % FCS, +1 % P/S) ersetzt. Während der Kultivierung wurde das Medium regelmäßig gewechselt, bis sich die Zellen vom Boden der Flasche ablösten. Der Überstand wurde zentrifugiert (300 x g, 8 min) um Zellen und Zellschrott zu entfernen. Anschließend wurde das im Medium enthaltene FCS mittels Amicon Zentrifugen-Filtereinheiten (Porengröße 50 kDa) herausgefiltert und der Überstands mittels Amicon Zentrifugen-Filtereinheiten (Porengröße 10 kDa) einkonzentriert. Die Konzentration der IFNα Subtypen im Zellkulturüberstand wurde mittels Mx/Rage7 Bioassay (siehe 3.2.4.) bestimmt.

3.2.3. Kultivierung von 293mIFNalpha11-Zellen

Für die Herstellung des IFNα Subtyps α11 wurde die HEK-293E Zelllinie 293mIFNalpha11 in DMEM (+10 % FCS, +1 % P/S, +2,5 µg/mL Puromycin), wie in Kapitel 3.1.1. beschrieben, kultiviert und der Zellkulturüberstand gesammelt. Anschließend wurde mit diesem ebenso verfahren wie mit den in Kapitel 3.2.2. beschriebenen Zellkulturüberständen.

3.2.4. Bestimmung der Interferonaktivität mittels Mx/Rage7 Bioassay

Der Mx/Rage7 Bioassay ist eine virusfreie Methode zur Bestimmung der Konzentration verschiedener IFNα Subtypen. In dieser Fibroblastenzellinie aktivieren murine Typ I IFN den Mx1-Promotor, welcher eine CRE-Rekombinase reguliert. Über diese wird die Expression von eGFP aktiviert, welches durchflusszytometrisch quantifiziert werden kann und dessen Expression proportional zur IFNα-Konzentration ist [16]. Für die Bestimmung der IFNα-Konzentration im Zellkulturüberstand (siehe 3.2.2. und 3.2.3.) wurden 2 x 10^4 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte ausgesät und für 24 h bei 32°C inkubiert. Anschließend wurden in Mx/Rage7-Medium verschiedene Verdünnungen des Zellkulturüberstands, sowie eine Standardreihe mit kommerziell bezogenen IFNα Subtypen, vorbereitet. Nach der Inkubation wurde das Medium der Mx/Rage7-Zellen verworfen und durch die Verdünnungen ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37°C wurde das Medium gewechselt. Nach weiteren 48 h wurde das Medium verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µL Trypsin-EDTA von der Zellkulturplatte abgelöst und erneut mit PBS gewaschen. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen in mindestens 150 µL FACS-Puffer aufgenommen. Kurz vor der Messung wurden die toten Zellen mit 7-AAD angefärbt. Der Anteil eGFP-exprimierender Zellen wurde ermittelt und mithilfe der Standardreihe der kommerziell bezogenen IFNα Subtypen wurde die Konzentration der IFNα Subtypen im Zellkulturüberstand berechnet.

3.3. *In vitro* Versuche mit primären Mauszellen

3.3.1. Organentnahme aus Mäusen

Für die Entnahme von Organen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Die Tiere wurden auf dem Rücken liegend an den Extremitäten aufgespannt, die zervikalen, axilliären und inguinalen Lymphknoten entnommen und in PBS auf Eis

gelagert. Für die Entnahme der Milz wurde die Peritonealhaut eingeschnitten, die Milz von umliegendem Gewebe befreit, durch den Schnitt in der Peritonealhaut herausgenommen und die beiden Blutgefäße durchtrennt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die Milz in PBS auf Eis gelagert. Zur Gewinnung von Knochenmark wurden Femur und Tibia von umliegendem Gewebe befreit und in PBS auf Eis gelagert.

3.3.2. Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Organen

Milz- und Lymphknotenzellsuspension:

Für die Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Milz und Lymphknoten wurden die Organe mittels Stempel einer Einmalspritze durch ein Zellsieb (70 µm für *in vivo* Experimente und *in vitro* Proliferationsassay, 30 µm für *in vitro* Differenzierung) gedrückt. Das Zellsieb wurde anschließend mit PBS bzw. MACS-Puffer (bei anschließender $CD4^+$ T-Zell-Isolation) gespült und die Zellen mit PBS bzw. MACS-Puffer gewaschen (300 x g, 8 min)

Knochenmarkszellsspension:

Für die Herstellung einer Einzelzellsuspension aus dem Knochenmark wurden Femur und Tibia mit 5 mL PBS mittels einer 2 mL Einmalspritze und einer G23 Kanüle durch die geöffneten Epiphysen durchgespült und so das Knochenmark gewonnen. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (300 x g, 8 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in RPMI-Medium (+10 % FCS, + 1% P/S) aufgenommen.

3.3.3. Generierung von DCs aus Knochenmarksstammzellen

Für die Generierung von DCs wurde Knochenmark aus Femur und Tibia, wie in 3.3.2 beschrieben, entnommen. Das Zellpellet wurde in 30 mL DC-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann auf drei 10 cm Petrischalen verteilt und bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach 24 h wurden weitere 10 mL Medium pro Schale hinzugegeben. Nach weiteren 3-5 Tagen wurde das Medium gewechselt, indem 15 mL des Überstandes abgenommen und zentrifugiert wurden. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem DC Medium resuspendiert und wieder zu der Platte hinzugegeben. Nach insgesamt 7- 8 Tagen konnten die ausdifferenzierten DCs für Versuche verwendet werden.

3.3.4. Anreicherung bestimmter Zellpopulationen mittels MACS

Für die Isolation von $CD4^+$ T Zellen und naiven ($CD62L^+$) $CD4^+$ T-Zellen aus einer Milz- und Lymphknoten-Einzelzellsuspension wurde die MACS-Methode (*magnetic activated cell sorting*) angewandt. Bei dieser Methode werden bestimmte Oberflächenproteine von Zellen in einer Zellsuspension mit monoklonalen Antikörpern gebunden, die an magnetische Kügelchen, sogenannte *MicroBeads*, gekoppelt sind. Anschließend wird die Zellsuspension auf ferromagnetische Säulen oder in Röhrchen appliziert. Diese werden in einem Magneten platziert und die markierten Zellen werden somit durch ein Magnetfeld festgehalten. Die im Magneten befindlichen Säulen werden mit MACS Puffer durchgespült, bzw. die Röhrchen ausgegossen. So werden nicht-markierte Zellen ausgespült. Grundsätzlich unterscheidet man bei dieser Methode zwei unterschiedliche Prinzipien. Bei der negativen Selektion befinden sich die Zielzellen im Durchfluss, die *MicroBeads* sind also an monoklonale Antikörper gebunden, welche diverse Oberflächenmoleküle vieler Zellen binden, mit Ausnahme der Zielpopulation. Bei der positiven Selektion binden die Antikörper-gekoppelten *MicroBeads* an Oberflächenmoleküle der Zielpopulation. Diese werden also im Magnetfeld gehalten und können nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld eluiert werden. Die Reinheit der isolierten Zellpopulation kann anschließend durchflusszytometrisch überprüft werden.

3.3.4.1. Negative Selektion zur Isolierung von $CD4^+$ T Zellen

Für die Isolierung von $CD4^+$ T-Zellen wurde eine Einzelzellsuspension aus Milz und Lymphknoten hergestellt (siehe 3.3.2.). Anschließend wurde eine negative Selektion nach Herstellerangaben mit dem MojoSort™ *Mouse CD4 T Cell Isolation Kit* und dem MojoSort™ Magneten durchgeführt. Die isolierten Zellen wurden mit MACS-Puffer gewaschen und mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

3.3.4.2. Positive Selektion zur Isolierung naiver $CD4^+$ T Zellen

Für die Isolation naiver ($CD62L^+$) $CD4^+$ T-Zellen wurden zunächst $CD4^+$ T-Zellen, wie in 3.3.4.1 beschrieben, isoliert. Anschließend wurde eine positive Selektion nach Herstellerangaben mit CD62L *MicroBeads*, MACS Säulen (MS) und dem MiniMACS™ Separator durchgeführt.

3.3.5. *In vitro* Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen

Bei der *in vitro* Differenzierung naiver ($CD62L^+$) $CD4^+$ T Zellen (verändert nach einem Protokoll von Prof. Dr. Michael Lohoff, Marburg) werden diese mittels verschiedener Stimuli in verschiedene T-Helfer-Subpopulationen differenziert.

Hierfür wurden naive $CD4^+$ T Zellen aus einer Milz- und Lymphknotenzellsuspension angereichert (siehe 3.3.4.2.). Die Zellen wurden in DMEM (+10 % FCS, +1 % P/S, +50 µM β-Mercaptoethanol), versetzt mit 2,5 µg/mL anti-IL-4 Antikörper und 2,5 µg/mL anti-IFNγ Antikörper, aufgenommen. Anschließend wurden 1 x 10^5 Zellen/Well in einer zuvor mit anti-CD3ε beschichteten Nunc Maxisorp™ Flachbodenplatte ausgesät. Das Beschichten der Platte erfolgte zuvor mit 5 µg/mL anti-CD3ε Antikörper in Natriumcarbonat (0,05 M, pH 9,6) über Nacht bei 4 °C oder für min 1 h bei 37 °C. Nach einer Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 für 48 h wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt. Dieses enthielt, je nach Polarisierung, folgende Antikörper und Zytokine:

Tabelle 3-1: Antikörper und Zytokine für die *in vitro* Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen.

T_H2-Differenzierung	T_H17-Differenzierung
anti-CD28 Antikörper (4 µg/mL)	anti-CD28 Antikörper (4 µg/mL)
anti-IFNγ Antikörper (2,5 µg/mL)	anti-IFNγ Antikörper (2,5 µg/mL)
rm IL-4 (20 ng/mL)	anti-IL-4 Antikörper (2,5 µg/mL)
rm IL-6 (1 ng/mL)	rm IL-6 (40 ng/mL)
rh IL-2 (50 Units/mL)	rh TGF-β (1 ng/mL)

Die Antikörper anti-CD3ε und anti-CD28 führen zu einer unspezifischen Aktivierung der $CD4^+$ T-Zellen, während anti-IFNγ die unerwünschte Differenzierung in T_H1- und anti-IL-4 in T_H2-Zellen verhindert. Die jeweiligen Zytokine induzieren die gezielte Differenzierung der naiven Zellen in T_H2 bzw. in T_H17-Zellen. Nach weiterer Inkubation für 72 h wurden die Zellen mit 0,05 µg/mL PMA und 0,75 µg/mL Ionomycin restimuliert, was zu einer gesteigerten Zytokinproduktion führt. Außerdem wurden sie mit BFA (10 µg/mL) behandelt, um den vesikulären Proteintransport vom rauen ER zum Golgi-Apparat zu blockieren und somit für eine Akkumulation der Zytokine in der Zelle zu sorgen. Anschließend konnten die Zellen durchflusszytometrisch analysiert werden.

3.3.6. Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tag-it Violet™

Für die Überprüfung der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tag-it Violet™ (VT) markiert. Der Farbstoff dringt durch die Zellmembran in die Zellen ein und die Intensität halbiert sich mit jeder Zellteilung. Die Quantifizierung der Farbstoffintensität mittels Durchflusszytometrie gibt somit Aufschluss über die Proliferation dieser Zellen. Für die Färbung wurden maximal 1 x 10^8 Zellen/mL in RPMI (ohne Zusätze) mit 5 µM VT für 20 min bei 37 °C unter Schütteln gefärbt. Die Färbung wurde durch Zugabe des 14-fachen Volumens RPMI (+10 % FCS, +1 % P/S) gestoppt.

3.3.7. *In vitro* CD4⁺ T-Zell-Proliferationsassay

In einem Proliferationsassay wurde der Effekt verschiedener IFNα Subtypen auf CD4⁺ T-Zellen untersucht. Hierzu wurden CD4⁺ T-Zellen aus TCR-transgenen (tg) Mäusen isoliert und mit DCs ko-kultiviert. Die DCs wurden zuvor mit einem FV-spezifischen Peptid beladen. Der TCR der CD4⁺ T-Zellen ist spezifisch für dieses Peptid, was zu deren Antigen-spezifischer Aktivierung und deren Proliferation führt.
In Abbildung 3-1 ist eine schematische Darstellung des FV-antigenspezifischen CD4⁺ T-Zell-Proliferationsassay gezeigt.

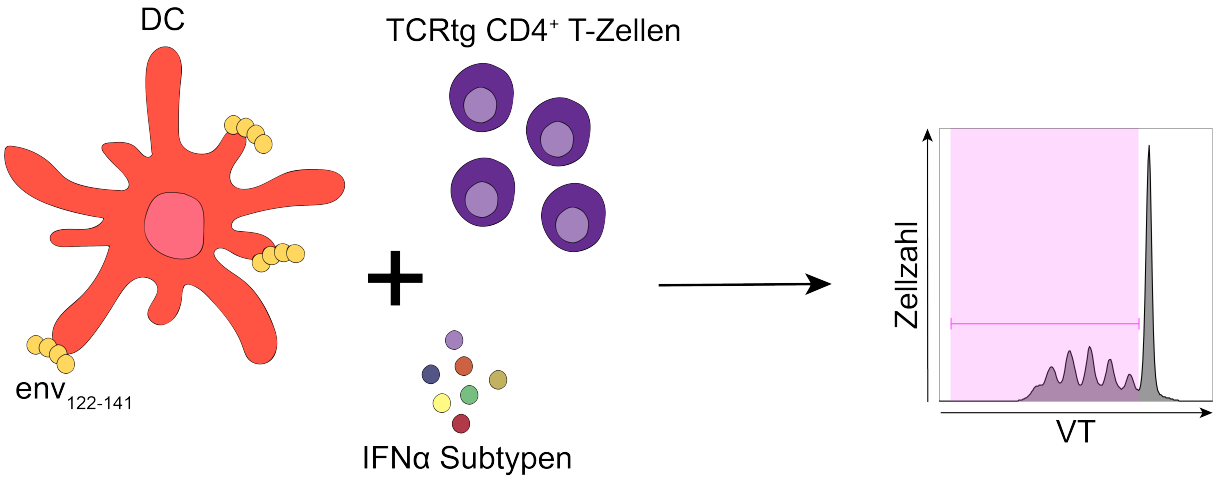


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung eines FV-antigenspezifischen CD4⁺ T-Zell-Proliferationsassays.

Zunächst wurden DCs mit 6,7 µg/mL $env_{122-141}$-Peptid für 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in AIM-V (+10 % FCS, +1 % P/S)

aufgenommen. $CD4^+$ T-Zellen wurden aus TCRtg Mäusen isoliert (siehe 3.3.4.1), mit dem VT-Fluoreszenzfarbstoff gefärbt (siehe 3.3.6) und ebenfalls in AIM-V (+10 % FCS, +1 % P/S) aufgenommen. Für den Standardansatz des Proliferationsassays wurden 1,7 x 10^5 $CD4^+$ T-Zellen mit 2 x 10^4 DCs in einer 96-Well-Zellkulturplatte bei einem Gesamtvolumen von 300 µL/Well (+/-IFNα Subtypen) für 72 h ko-kultiviert.

3.4. Herstellung von FV

3.4.1. *In vivo* Herstellung von FV

Die Herstellung des FV-Stocks erfolgte *in vivo*. Zu diesem Zweck wurden Balb/c-Mäuse mit 3.000 SFFU (*spleen focus forming units*) infiziert und nach 9 Tagen getötet. Die Milzen wurden entnommen und ein 15 %-iges Milzzellhomogenat in PBBS mit 2 mM EDTA hergestellt. Der Virusstock wurde bei -80 °C gelagert.

Für die Titration des Virusstocks wurden CB6F1-Mäuse infiziert, nach 14 Tagen getötet und die Milzen entnommen. Mithilfe von Bouin's Lösung, mit der maligne Zellhaufen auf der Milz angefärbt werden können, wurde über die Anzahl dieser Foci die Viruskonzentration bestimmt.

3.5. Nachweis von infektiösen Zellen mittels *Infectious center assay*

Die Anzahl FV-infizierter Zellen wurde mittels *Infectious center (IC) assay* ermittelt. Zu diesem Zweck wurden am Vortag 2 x 10^4 *Mus dunni*-Zellen in 2 mL RPMI (+10 % FCS, +1 % P/S) in 6-Well-Platten ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden von Milz-Einzelzellsuspensionen (siehe 3.3.2) Verdünnungsreihen (10^7-10^2) angefertigt. Von jeder Verdünnung wurde 1 mL zu der *Mus dunni*-Kultur hinzugegeben und für 72 h bei 37°C inkubiert. Durch Zell-Zell-Kontakt werden die *Mus dunni*-Zellen mit FV aus den Milzzellen infiziert. Dies führt zur Entstehung von *infectious centers*, Virusfoci.

Für die Visualisierung der Foci wurde das Medium verworfen und die Zellen mit Ethanol (96 %) für 15 min fixiert. Anschließend wurde das Ethanol entfernt und die Wells mit PBS + BSA (0,1 %) dreimal gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 700 µL Hybridomaüberstand des ersten Antikörpers (AK720) überschichtet und für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Hybridomaüberstand verworfen, die Zellen zweimal mit PBS + BSA (0,1 %) gewaschen und 700 µL des 1:400 in PBS + BSA (0,1 %) verdünnten Zweitantikörpers (*goat-anti-mouse* IgG2b-HRP) auf die Zellen gegeben. Der Zweitantikörper bindet kovalent an den AK720 und ist an eine

Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Nach 2 h Inkubation bei RT wurde die Antikörperlösung verworfen und die Platten zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 mL der frisch angesetzten AEC-Gebrauchslösung auf die Zellen gegeben und diese (ca. 15 min) im Dunkeln inkubiert, bis eine rötliche Färbung deutlich erkennbar war. Die HRP setzt das Substrat AEC enzymatisch um und wandelt es in ein unlösliches rotes Produkt um. Als letztes wurde das AEC entfernt und die Platten unter fließendem Wasser gewaschen. Die roten Virusfoci wurden gezählt und aus dem Mittelwert die Anzahl der infizierten Zellen pro 1 x 10^6 Zellen berechnet.

3.6. *In vivo* Versuche

3.6.1. Infektion mit FV

Die Infektion von C57BL/6 Mäusen mit dem Friend Virus erfolgte mit einer G25-Kanüle in die laterale Schwanzvene. Für die akute Infektion wurden 20.000 SFFU, verdünnt mit sterilem PBS, injiziert.

3.6.2. Intraperitoneale Injektion von IFNα

Die Behandlung der akut FV-infizierten bzw. akut *C. rodentium*-infizierten Mäuse mit IFNα Subtypen wurde ab Tag 5 (FV) bzw. ab Tag 3 (*C. rodentium*) nach der Infektion begonnen und bis Tag 9 täglich fortgeführt. Hierzu wurden Zellkulturüberstände von transfizierten HEK293T-Zellen (siehe 3.2.2) verwendet und somit 8.000 U IFNα in einem Volumen von 300 µL intraperitoneal injiziert. Um das Verletzungsrisiko der inneren Organe durch die Kanüle zu minimieren, wurden die Mäuse in Rückenlage gehalten und das Bauchfell gespannt.

3.6.3. Infektion mit *Citrobacter rodentium*

Vorbereitung der *C. rodentium*-Suspension:

Die Infektion von C57BL/6 Mäusen erfolgte mit 5 x 10^9 koloniebildenden Einheiten (*colony forming units*; CFU) von *C. rodentium*. Dazu wurden am Tag vor der Infektion 200 mL LB-Medium mit einer bakteriellen Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) über Nacht inkubiert. An nächsten Tag wurde die optische Dichte (OD) der Übernachtkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Bei einer OD von 0,71 wurde die Suspension zentrifugiert (1000 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand

wurde verworfen und die Bakterien in sterilem PBS suspendiert.

Für die Ermittlung der CFU-Konzentration in der Suspension wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe bis 10^{-9} mit sterilem PBS erstellt und die Verdünnungen von 10^{-5} bis 10^{-9} auf MacConkey-Agar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am folgenden Tag wurden die CFU von *C. rodentium* ausgezählt.

Infektion:

Für die Infektion wurden 100 µL der Bakteriensuspension (5 x 10^9 CFU von *C. rodentium*) C57BL/6 Mäusen über eine Schlundsonde verabreicht.

3.6.4. Phänotypische Untersuchungen bei einer *C. rodentium*-Infektion

Veränderung des Körpergewichts:

Das Körpergewicht der Mäuse wurde vor der Infektion, sowie an den Tagen 3-10 nach der Infektion bestimmt.

Bakterienlast im Kot:

Für die Bestimmung der Bakterienlast im Kot wurde an den Tagen 3, 5, 7 und 10 nach der Infektion Kot der Mäuse eingesammelt, gewogen und in PBS homogenisiert. Anschließend wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe der Suspension von 10^{-2} bis 10^{-6} in sterilem PBS erstellt und auf MacConkey-Agar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die CFU ausgezählt und mit dem Kotgewicht normalisiert.

Entnahme und Analyse des Colon:

Für phänotypische und histologische Analysen wurde der gesamte Colon entnommen und anschließend mit PBS durchgespült. Die Länge und das Gewicht des Colon wurden bestimmt. Für die PCR-Analyse wurde eine Biopsie des Colon entnommen und die RNA mithilfe des *RNAeasy® Fibrous Tissue Mini Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Für die Bestimmung der Zytokinexpression wurde eine weitere Colonbiopsie in 350 µL IMDM (+10 % FCS, +1 % P/S) aufgenommen und die Zytokinkonzentration im Überstand nach 6-stündiger Inkubation mittels ELISA analysiert. Der Colon wurde mit 4 % PFA für die histologische Befundung fixiert.

Die histologischen Befundungen wurden freundlicherweise von Robert Klopfleisch von der Freien Universität Berlin durchgeführt. Dazu wurde die Probe in Paraffin eingebettet und in 4 µm dicke Präparate geschnitten. Das Präparat wurde mit Hematoxylin und Eosin, sowie Ki-67 gefärbt und bei einer 40-fachen Vergrößerung

mikroskopisch analysiert. Der mittlere und der distale Abschnitt des Colon wurden nach folgenden Parametern beurteilt: Neutrophileninfiltration, Epithelschädigung, Hyperplasie, Entzündungszellinfiltration und Kryptenabszesse. Jeder der Parameter wurde nach folgenden Graden bewertet: 0 = keine Pathologie, 1 = milde Pathologie, 2 = moderate Pathologie, 3 = schwere Pathologie. Für die Auswertung wurden die Pathologiegrade des mittleren und des distalen Abschnitts addiert.

3.7. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, mit der Zellen individuell in einer heterogenen Einzelzellsuspension charakterisiert werden können. Dabei werden Zellen in einem Hüllstrom an einem Laserstrahl vorbeigeführt und die Lichtstreuung wird dabei von Detektoren erfasst. Die Detektion des Vorwärtsstreulichts (*forward scatter*, FSC), also des Streulichts in der Achse des Lichts, gibt Aufschluss über die Größe der Zellen. Ein Detektor für das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC), welches im 90° Winkel abgelenkt wird, misst die Granularität der Zellen. Mit einem optischen System aus Spiegeln und Filtern erlaubt die Durchflusszytometrie außerdem die Detektion von Fluoreszenzsignalen Fluorochrom-gekoppelter Antikörper. Diese können verwendet werden, um verschiedene Proteine bestimmter Zellen zu binden (Antigen-Antikörper-Reaktion) und diese zu markieren. Werden Elektronen verschiedener Fluorochrome von einem Laser bestimmter Wellenlänge exakt angeregt, werden sie auf ein höheres Energieniveau gehoben. Fallen die Elektronen wieder auf ihr Ursprungsniveau zurück, wird Energie in Form von Photonen frei. Die Verwendung von Fluorochromen unterschiedlicher Emissionsspektra erlaubt die Analyse mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig. Die detektierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zu der Menge der an die Zelle gebundenen Antikörper. So ist es möglich, die Expression verschiedener Moleküle quantitativ zu bestimmen. In Abbildung 3-2 ist die Funktionsweise eines Durchflusszytometers gezeigt.

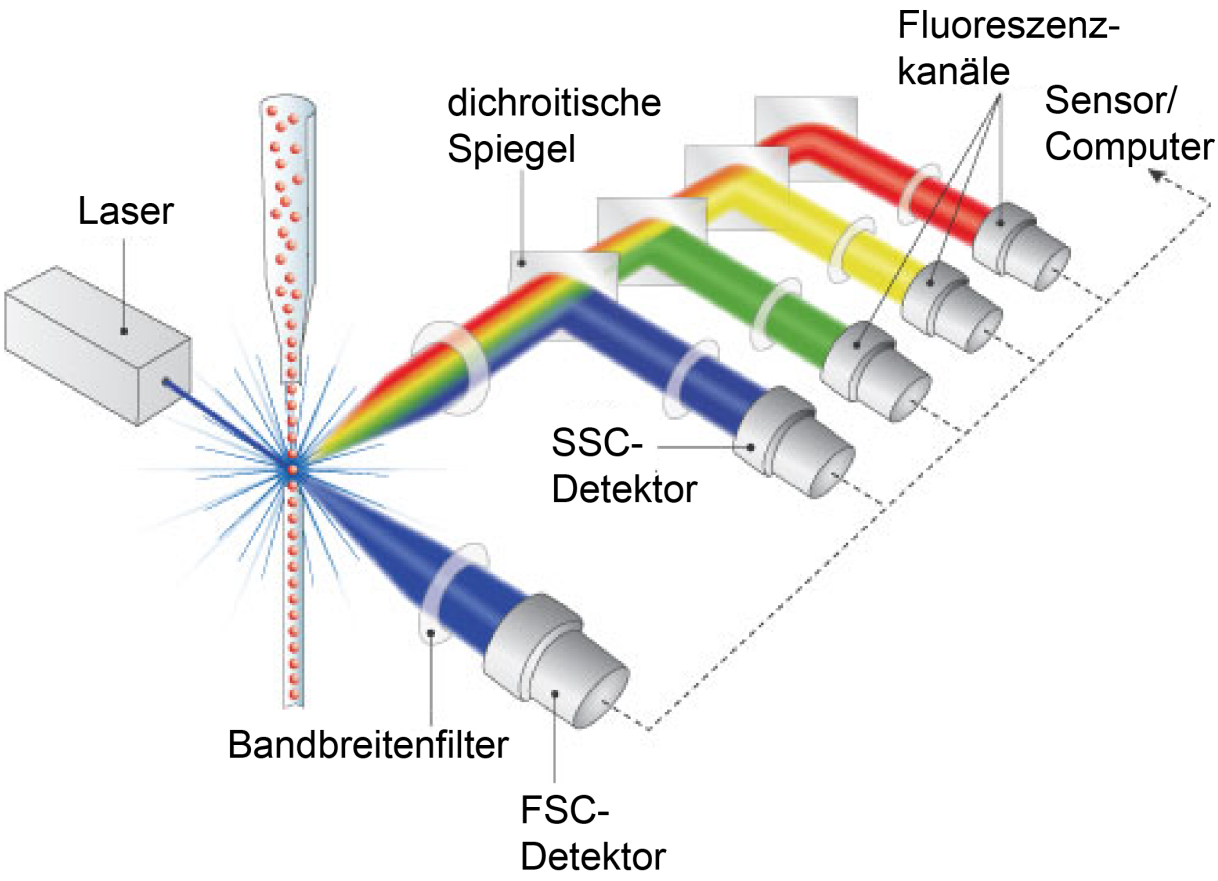


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers. **(**Verändert nach https://technical.sanguinebio.com/using-application-settings-to-standardize-flow-cytometry-results-across-experiments-and-instruments/**)**

3.7.1. Färbung von Oberflächenproteinen

Für die Antikörperfärbung von Oberflächenproteinen wurden die Zellen in einer Mikrotiterplatte bei 300 x g für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 50 µL FACS-Puffer, in denen mit verschiedenen Fluorochromen konjugierte Antikörper gegen bestimmte Oberflächenmoleküle verdünnt wurden, resuspendiert und für 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 150 µL FACS-Puffer gewaschen (300 x g, 3 min) und in mindestens 150 µL FACS-Puffer für die durchflusszytometrische Messung aufgenommen.

3.7.2. Färbung zum Ausschluss toter Zellen

Für die Unterscheidung vitaler und toter Zellen wurden diese, gleichzeitig mit der Färbung der Oberflächenproteine, mit FVD (*fixable viability dye*) gefärbt. Dieser Farbstoff ist nicht permeabel für die Membran lebender Zellen, durchdringt aber die

Membran toter Zellen. So können diese voneinander unterschieden werden. Auf demselben Prinzip basiert die Färbung toter Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD. Im Gegensatz zu FVD wurde 7-AAD allerdings kurz vor der Messung zu der Probe hinzugegeben.

3.7.3. Färbung intrazellulärer Zytokine

Für die Färbung intrazellulärer Zytokine mussten die Zellen zunächst zur Zytokinproduktion stimuliert und der Export der Zytokine aus der Zelle unterbunden werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen im Falle eines *in vitro* Proliferationsassays mit 2 µg/mL BFA für 4,5 h inkubiert. Für die Analyse der Zytokinproduktion *ex vivo* wurden die Zellen mit 10 µg/mL immobilisiertem αCD3, 2 µg/mL αCD28 und 2 µg/mL BFA für 5 h bei 37°C in RPMI (+10 % FCS, +1 % P/S, +50 µM β-mercaptoethanol) inkubiert. Die unspezifische Stimulation des TCR mit den Antikörpern führt zu einer gesteigerten Zytokinproduktion bereits stimulierter Zellen. Im Anschluss wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und die Oberflächenproteine, wie in 3.7.1. beschrieben, gefärbt. Die Zellen wurden schließlich mit dem Fixierungskit (BioLegend) nach Herstellerprotokoll fixiert und permeabilisiert. Die Permeabilisierung erlaubt das Eindringen der Antikörper in die Zelle und das Binden an intrazelluläre Proteine. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem entsprechenden Waschpuffer gewaschen (300 x g, 4 min) und die intrazellulären Proteine mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper, verdünnt in dem entsprechenden Waschpuffer, gefärbt. Schließlich wurden die Zellen einmal mit dem Waschpuffer und einmal mit FACS-Puffer gewaschen (300 x g, 4 min) und in mindestens 150 µL FACS-Puffer für die durchflusszytometrische Messung aufgenommen.

3.8. Nachweis von Zytokinen

3.8.1. Quantifizierung von Zytokinen mittels *LEGENDplex*™

Der *LEGENDplex*™ ist ein Immunassay zur parallelen Konzentrationsbestimmung mehrerer Zytokine in Zellkulturüberständen. Dabei kommen Kügelchen, sogenannte *Beads* von verschiedener Größe und verschiedener Allophycocyanin (APC)-Farbstoffintensität zum Einsatz. Die *Beads* sind mit monoklonalen Antikörpern gegen bestimmte Zytokine konjugiert und in der Lage diese Analyte in einer Probe zu binden.

Weitere, biotinylierte Sekundärantikörper binden ebenfalls spezifisch an die Analyte. Diese Antkörper werden mit einem Konjugat aus Strepavidin und dem Farbstoff Phycoerythrin (PE) markiert. Die Konzentration des Analyts kann schließlich proportional zu PE-Intensität mithilfe einer Standardkurve quantifiziert werden. Durch die verschiedenen *Bead*-Größen und APC-Intensitäten können so die *Beads* unterschieden und jedes Zytokin individuell analysiert werden.

Die Zytokinkonzentration im Überstand des Proliferationsassays wurde mittels *LEGENDplex*™ gemessen. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Berechnung der Zytokinkonzentration erfolgte mit der *LEGENDplex* v8.0 Software.

3.8.2. Quantifizierung von Zytokinen mittels ELISA

Neben dem *LEGENDplex*™ wurde ein *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) zur Bestimmung der Zytokinkonzentration in Zellkultur- und Darmbiopsie-Überständen verwendet. Bei einem Sandwich-ELISA sind monoklonale Antikörper auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Diese Antikörper binden das zu analysierende Protein im Überstand. Nach dem Entfernen ungebundener Proteine durch mehrfaches Waschen, wurde ein an HRP-gekoppelter polyklonaler Sekundärantikörper hinzugeben, der ebenfalls das Protein auf der Platte bindet. Nach weiteren Waschschritten zur Entfernung ungebundenen Konjugats, wurde Tetramethylbenzidin als Substratlösung hinzugegeben. Dieses wird vom Enzym HRP in ein blaues Produkt umgewandelt. Durch die Zugabe konzentrierter Schwefelsäure wird die enzymatische Reaktion gestoppt und die blaue Lösung färbt sich gelb. Die Absorption der Lösung wurde an einem Spektrometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und 570 nm gemessen und erlaubt über eine Standardkurve die Berechnung der Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand.

Der IL-12-, der IL-17a- und der IL-23-ELISA wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.9. Arbeiten mit RNA

3.9.1. Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden zunächst 1 x 10^6 Suspensionszellen bei 13.000 x g für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µL Lysepuffer des *Quick*-RNA™ Miniprep Kits resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Die anschließende Isolierung der RNA wurde mit dem *Quick*-RNA™ Miniprep Kit nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

3.9.2. Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*Real Time Polymerase Chain Reaction*), kurz qRT-PCR, ermöglicht die quantitative Analyse von PCR-Produkten in Echtzeit. Dabei wird die Emission des in die dsDNA interkalierenden Fluorochroms SYBR-Green I nach mehreren Zyklen aufgezeichnet. Eine Zunahme der emittierten Fluoreszenz und somit die Zunahme der dsDNA wird nach jedem Zyklus erfasst. Über die Korrelation mit der emittierten Fluoreszenz eines Referenzgens (hier: *Actb*) können unbekannte Mengen der Ziel-DNA quantifiziert werden. Bei der qRT-PCR werden zwei Verfahren unterschieden. Für die *One Step* qRT-PCR wird RNA als Ausgangsmaterial verwendet, welche in der Initialphase zu komplementärer DNA (*complementary DNA*, cDNA) transkribiert wird. Für die *Two Step* PCR wird die RNA zuvor in einer separaten reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss folgt die Amplifikationsphase, in welcher die cDNA mithilfe spezifischer Oligonukleotide und einer DNA-Polymerase aus Desoxynukleotidphosphaten synthetisiert wird. Der letzte Schritt ist die Analyse des spezifischen Schmelzpunkts, bei der die dsDNA in ssDNA denaturiert wird. Der Schmelzpunkt des Produkts gibt Aufschluss über Kontaminationen oder dimerisierte Oligonukleotide.

Für die qRT-PCR wurde der *PowerUp™ SYBR® Green MasterMix* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Ansätze wurden wie folgt zusammengesetzt:

10 µL PCR Mix (2x)
0,2 µL Reverse Transkriptase (nur bei der *One Step* PCR)
3´ Oligonukleotide (3 bzw.10 mM)
5´ Oligonukleotide (9 bzw. 10 mM)
Ad 19 µL mit H_2O

19 µL des Mastermix wurden pro Ansatz in eine 48-Well *MicroAmp*® Platte pipettiert und 1 µL der zu analysierenden RNA bzw. cDNA hinzugegeben. Für die Negativkontrolle wurde 1 µL H_2O anstatt der Nukleinsäure verwendet. Die Platte wurde kurz zentrifugiert, um alle Komponenten im unteren Teil des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt, um eine vorzeitige Reaktion der Enzyme zu unterbinden. Die qRT-PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 3-2: Protokoll für die qRT-PCR.

Phase	Temperatur	Dauer
Initialphase	48 °C (nur bei der *One Step* PCR)	30 min
	95 °C	10 min
Amplifikationsphase	95 °C	15 s
	53 °C (*Actb*), 58 °C (*Il17a*)	20 s
	72 °C	40 s
Schmelzpunktanalyse	94 °C	15 s
	60 °C	60 s
	95 °C	15 s
Kühlung	38 °C	60 s

Die Temperaturänderungsrate lag bei 20 °C/s, bei der Schmelzkurve bei 0,3 °C/s.

3.9.2.1. Überprüfung der RNA auf DNA-Kontaminationen (*One Step*)

Die *One Step* PCR wurde eingesetzt, um die RNA nach der Isolation auf eventuelle DNA-Kontaminationen zu überprüfen. Dazu wurde ein Mastermix mit und einer ohne Reverse Transkriptase für das Ziel-Gen *Actb* angesetzt. Die qRT-PCR wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Ist ein PCR-Produkt in den Proben mit RT zu erkennen, ist RNA nachweisbar. Wäre eine DNA-Kontamination vorhanden, würde ein PCR-Produkt ebenfalls in dem Ansatz nachgewiesen werden, in dem keine RT zugesetzt wurde. Bei der Feststellung einer Kontamination mit DNA wurde eine erneute Aufreinigung der RNA mit dem *Quick*-RNA™ Miniprep Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.9.2.2. cDNA Synthese

Für die Synthese von cDNA wurde eine reverse Transkription der isolierten mRNA mit dem *All-in-One® cDNA Synthesis Supermix* (Bimake) durchgeführt. Dazu wurde der Ansatz für 10 min. bei 25 °C, 30 min. bei 42 °C und 5 min. bei 85 °C inkubiert.

4. Ergebnisse

Als Teil des angeborenen Immunsystems spielen Typ I Interferone eine wichtige Rolle bei der Abwehr viraler Infektionen und werden unmittelbar nach einer Virusinfektion induziert. Zu den Typ I Interferonen zählen unter anderem IFNβ, IFNε, IFNκ, sowie 14 (Maus) bzw. 12 (Mensch) verschiedene IFNα Subtypen. Diese Subtypen sind hoch konserviert und binden an den gleichen Rezeptor, jedoch unterscheidet sich ihre biologische Funktion. Typ I IFN induzieren die Expression verschiedener ISGs, deren translatierte Produkte direkte und indirekte antivirale, aber auch immunmodulatorische und antiproliferative Eigenschaften besitzen [64].

Während einer FV-Infektion ist systemisch kein endogenes IFNα nachweisbar [64]. Allerdings führt die exogene Applikation von IFNα zu einer signifikanten Reduktion der Viruslast. Dies wird unter anderem über die Induktion verschiedener ISGs, wie z.B. den Restriktionsfaktor APOBEC3 erreicht [77]. Neben diesem direkten antiviralen Effekt zeigt die Behandlung mit verschiedenen Subtypen diverse immunmodulatorische Effekte. Beispielsweise korreliert die Reduktion der Viruslast mit der Aktivierung und der Verbesserung der Effektorfunktionen von NK-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen IFNα Subtypen [61, 65].

Die genaue immunmodulatorische Wirkung der verschiedenen IFNα Subtypen, insbesondere auf die Zellen des adaptiven Immunsystems, ist weitgehend unbekannt. In einer vorherigen Studie konnte *in vitro* ein Subtyp-spezifischer antiproliferativer Effekt auf $CD8^+$ T-Zellen gezeigt werden, welcher mit einer Erhöhung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine und der Sekretion des zytotoxischen Moleküls Granzym B korrelierte. Außerdem wurde gezeigt, dass die verschiedenen IFNα Subtypen die Expression von MHCII, ko-stimulatorischen Molekülen und Zytokinen in DCs verstärkten, was zu einer verbesserten Aktivierung und damit einer Verbesserung der Effektorfunktionen von $CD8^+$ T-Zellen führte [40]. Da allerdings wenig über die immunmodulatorischen Eigenschaften von IFNα auf $CD4^+$ T-Zellen bekannt ist, wurden in dieser Arbeit die unterschiedlichen Effekte verschiedener muriner IFNα Subtypen auf Virus-spezifische $CD4^+$ T-Zellen im Friend Retrovirus-Modell untersucht.

4.1. Etablierung eines Friend Retrovirus-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Proliferationsassays

Für die Untersuchung eines möglichen Effekts verschiedener IFNα Subtypen auf die Proliferation und die Effektorfunktionen Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen, wurde ein FV-spezifischer *in vitro* Proliferationsassay etabliert. Die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen wurde dabei über die DC-vermittelte Präsentation von verschiedenen FV-Antigenen initiiert. In einem der getesteten Ansätze wurden DCs mit dem FV-Peptid $env_{122-141}$ beladen und mit CD4⁺ T-Zellen aus CD4-TCRtg Mäusen, sogenannten EVa3-Mäusen, ko-kultiviert. Das $env_{122-141}$-Peptid im gp70-Glykoprotein von F-MuLV wurde als Epitop für die Erkennung von FV-induzierten FBL-3-Tumorzellen durch spezifische CD4⁺ T-Zellen identifiziert [89]. EVa3-Mäuse sind transgen für TCRα- und TCRβ-Ketten $env_{122-141}$-spezifischer CD4⁺ T-Zellen, erkennen daher dieses Peptid spezifisch [125]. In einem anderen Ansatz wurden die DCs mit einem Peptidpool aus neun verschiedenen FV-Peptiden beladen und mit CD4⁺ T-Zellen aus FV-infizierten C57BL/6-Mäusen ko-kultiviert. Dieser Peptidpool besteht aus drei gag-, einem pol- und fünf env-Peptiden. Diese wurden aus einem großen Pool synthetisierter 18-mer-Peptide, die die kompletten gag-, pol- und env-codierenden Regionen des FV-Genoms decken, ausgewählt. Es wurde gezeigt, dass diese neun Peptide von Virus-spezifischen CD4⁺ T-Zellen während der FV-Infektion erkannt werden [126]. Die CD4⁺ T-Zell-Proliferation wurde anhand der VT-Farbstoffintensität quantifiziert. Dieser Farbstoff dringt in die Zelle ein, bindet kovalent an intrazelluläre Proteine und wird bei jeder Zellteilung auf die Tochterzellen aufgeteilt. Proliferieren die Zellen, verringert sich somit die Farbstoffintensität. Diese Reduktion kann durchflusszytometrisch gemessen werden.

In Abbildung 4-1 ist der Anteil proliferierter CD4⁺ T-Zellen im Proliferationsassay gezeigt, denen entweder das $env_{122-141}$-Peptid oder der Peptidpool präsentiert wurde. Dabei wurden verschiedene Peptidkonzentrationen für das Beladen der DCs verwendet. Während die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen mit dem $env_{122-141}$-Peptid nach dreitägiger Ko-Kultur zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung auf über 50 % proliferierter Zellen führte, konnte nach der Ko-Kultur von CD4⁺ T-Zellen mit Peptidpool-beladenen DCs keine Proliferation beobachtet werden.

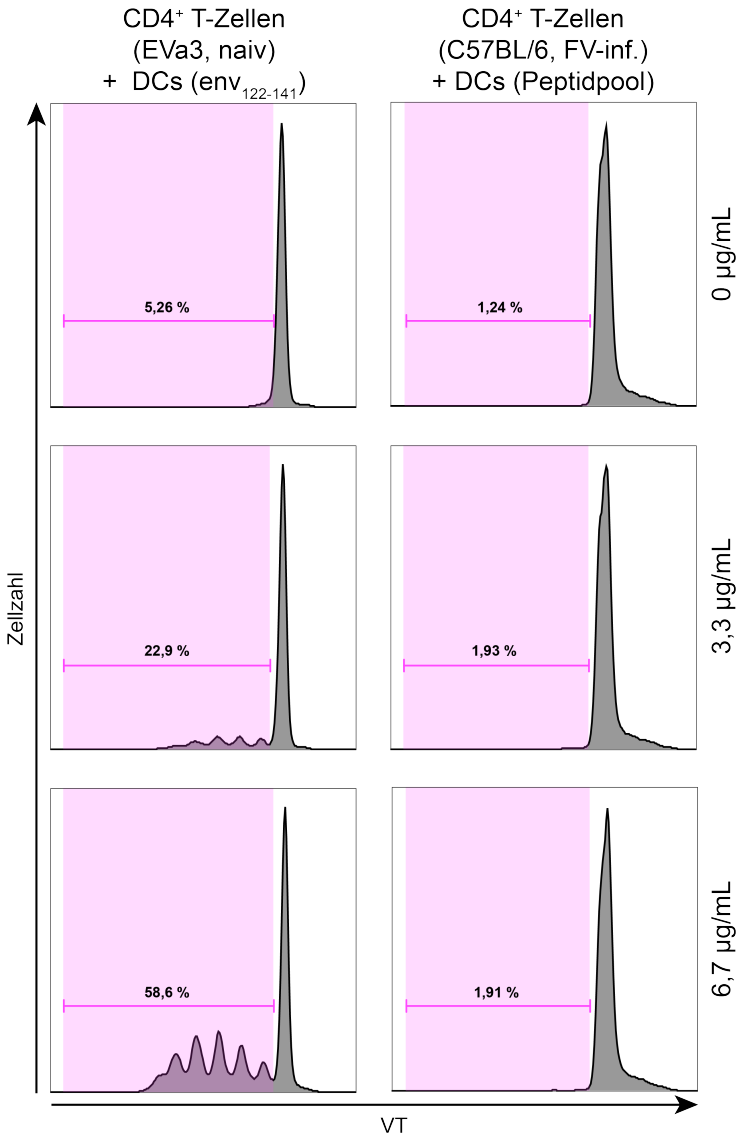


Abbildung 4-1: Vergleich verschiedener FV-Peptide zur Stimulation von CD4⁺ T-Zellen.
CD4⁺ T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten über Negativselektion isoliert und mit VT gefärbt. 500.000 CD4⁺ T-Zellen wurden mit je 50.000 DCs, beladen mit env$_{122-141}$-Peptid oder Peptidpool, für 72 h ko-kultiviert. Die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen wurde als Reduktion der Farbstoffintensität des VT durchflusszytometrisch gemessen. Repräsentative Histogramme für die Proliferation TCR-transgener CD4⁺ T-Zellen aus EVa3-Mäusen nach Präsentation des env$_{122-141}$-Peptids bzw. FV-infizierter CD4⁺ T-Zellen nach Präsentation eines Peptidpools in unterschiedlichen Konzentrationen sind gezeigt. Der bei der Negativkontrolle (DCs ohne Peptid) gezeigte Wert stellt das Basislevel der Reduktion der VT-Intensität dar.

In den folgenden Experimenten wurde daher das env$_{122-141}$-Peptid verwendet. Um die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen zu verstärken, wurden anti-CD28 Antikörper oder CD40L als ko-stimulierende Signale, sowie IL-2 als Wachtumsfaktor der Kultur beigefügt. Allerdings konnte keiner dieser Stimuli die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen im *in vitro* Proliferationsassay verstärken (Daten nicht gezeigt), sodass diese nicht weiter verwendet wurden.

Im Laufe der Etablierung des CD4⁺ T-Zell-Proliferationsassays wurde ein zusätzlicher Mausstamm bezogen, dessen TCR ebenfalls spezifisch für dasselbe FV-Peptid ist, wie der der EVa3-Mäuse. Es wurde bereits gezeigt, dass beim Mausstamm EVa2TCRtg, kurz EVa2, die *in vitro*-Stimulation mit dem env-Peptid zu einer deutlich stärkeren CD4⁺ T-Zell-Aktivierung (CD69-Expression) als bei EVa3-Mäusen führte. Außerdem sind die EVa2-Mäuse *Rag1*-defizient, um die endogene, nicht FV-spezifische TCR-Expression auszuschließen [125]. Im Folgenden wurde untersucht, ob im *in vitro* Proliferationsassay die FV-spezifische Aktivierung in den EVa2-Mäusen effizienter erfolgt als in den EVa3-Mäusen. Zunächst wurde dazu der Anteil FV-spezifischer Zellen in beiden Mausstämmen verglichen. Die Expression transgener Vα2- bzw. Vα3-Ketten des TCR liefert Aufschluss darüber, wie groß der Anteil FV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in der Gesamtpopulation der CD4⁺ T-Zellen ist. Die repräsentative quantitative Analyse TCR-transgener CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 4-2) zeigt, dass alle CD4⁺ T Zellen aus EVa2-Mäusen Vα2⁺, also FV-spezifisch sind. Die CD4⁺ Zellpopulation der EVa3-Mäuse hingegen zeigte lediglich ca. 13 % FV-spezifische T-Zellen (Vα3.2⁺).

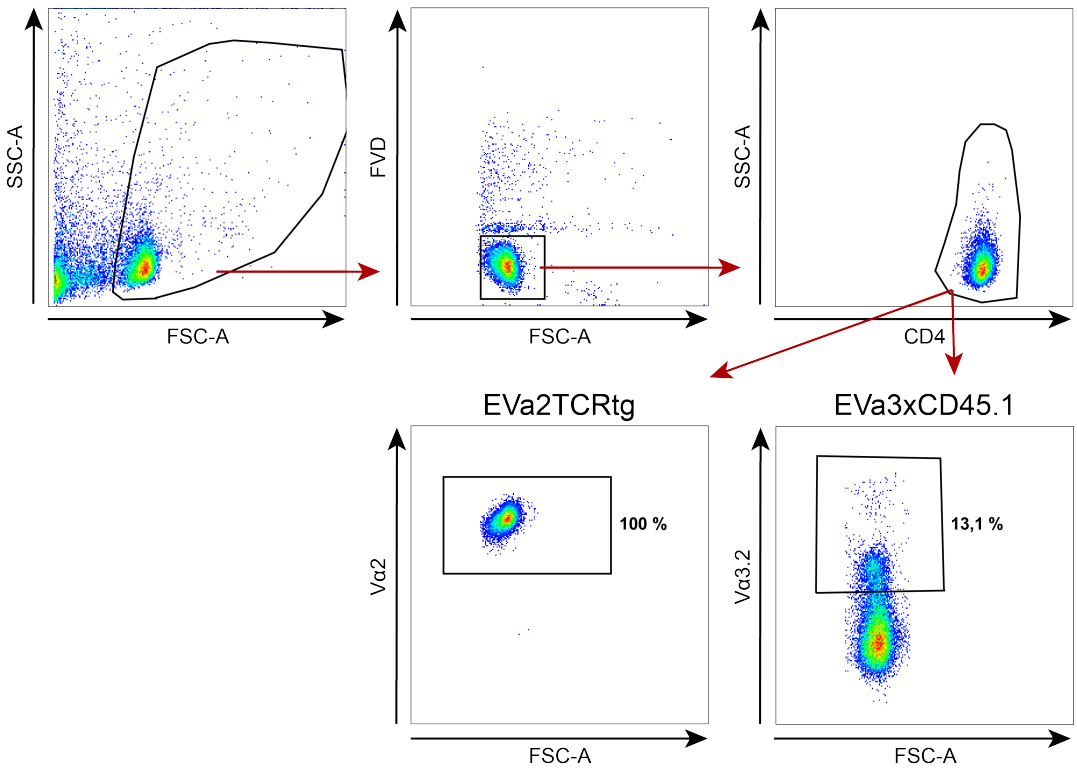
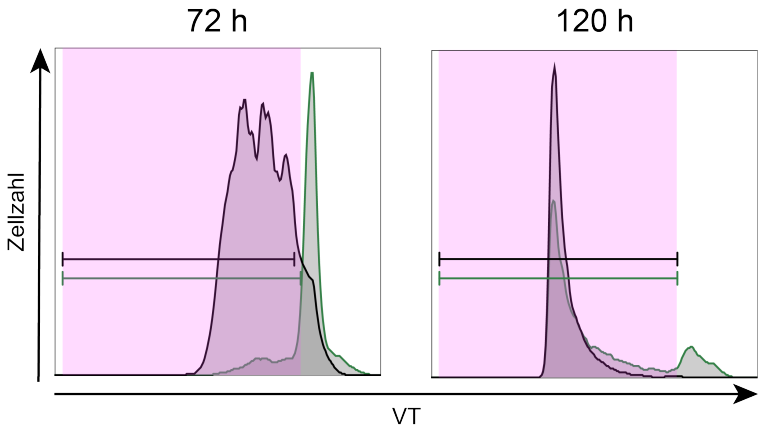


Abbildung 4-2: Quantifizierung transgener CD4⁺ T-Zellen aus EVa2- und EVa3-Mäusen.
CD4⁺ T-Zellen wurden aus der Milz von TCR-transgenen EVa2- und EVa3-Mäusen über Negativselektion isoliert und die Zellen nach einer Antikörperfärbung durchflusszytometrisch analysiert. Über Seitwärts- (SSC-A) und Vorwärtsstreulicht (FSC-A) wurden die Zellen entsprechend ihrer

Granularität und Größe sortiert und die Lymphozyten ausgewählt. Anschließend wurden die toten Zellen ausgeschlossen (FVD$^+$) und die Expression transgener Vα2- und Vα3.2-Ketten des TCR von CD4$^+$ T-Zellen analysiert. Repräsentative Dotplots der Analyse aus einem Versuch sind gezeigt.

Aufgrund des höheren Anteils FV-spezifischer CD4$^+$ T-Zellen in den EVa2-Mäusen und der stärkeren Aktivierung [125] durch die FV-Peptid-Stimulation wurde untersucht, ob die CD4$^+$ T-Zellen der EVa2-Mäuse im Proliferationsassay stärker proliferieren als die der EVa3-Mäuse.

In Abbildung 4-3 ist ein repräsentativer Vergleich der Proliferation FV-spezifischer CD4$^+$ T-Zellen aus EVa2-Mäusen mit denen aus EVa3-Mäusen im Proliferationsassay nach 72 h und 120 h Inkubation gezeigt. Bereits nach einer Inkubationszeit von 72 h proliferierten 89 % der CD4$^+$ T-Zellen aus EVa2-Mäusen. Bei den Zellen aus EVa3-Mäusen lag die Proliferation zu diesem Zeitpunkt nur bei 15 % aller CD4$^+$ T Zellen. Nach 120-stündiger Inkubation proliferierten die Zellen aus EVa2-Mäusen zu 100 %, die aus EVa3-Mäusen zu 85 %. Neben der höheren Sensitivität für das env-Peptid [125] trägt also vermutlich auch der deutlich höhere Anteil FV-spezifischer CD4$^+$ T-Zellen in den EVa2-Mäusen zu einer effizienteren Antigenerkennung bei und führte zu einer stärkeren CD4$^+$ T-Zell-Proliferation. Aus diesem Grund wurde für weitere Versuche das EVa2-Mausmodell verwendet.



	72 h	120 h
EVa2	89,2 %	99,5 %
EVa3	15,1 %	85,1 %

Abbildung 4-3: Vergleich der CD4$^+$ T-Zell-Proliferation in verschiedenen Modellen des CD4$^+$ T-Zell-Proliferationsassays.
CD4$^+$ T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von EVa2- bzw. EVa3-Mäusen über Negativselektion isoliert und mit VT gefärbt. 170.000 CD4$^+$ T Zellen wurden mit 20.000 DCs, beladen mit env$_{122\text{-}141}$-Peptid, für 72 h bzw. 120 h ko-kultiviert. Die Proliferation der CD4$^+$ T-Zellen wurde als Reduktion der Farbstoffintensität des VT durchflusszytometrisch gemessen. Repräsentative Histogramme vergleichen die Proliferation TCR-transgener CD4$^+$ T-Zellen aus EVa2-Mäusen (schwarz) mit der Proliferation TCR-transgener CD4$^+$ T-Zellen aus EVa3-Mäusen (grün). Rechts ist der repräsentative Anteil proliferierter Zellen gezeigt.

Für die weiteren Untersuchungen der Effekte von IFNα Subtypen auf die Proliferation und die Effektorfunktion von $CD4^+$ T-Zellen wurde der FV-spezifische Proliferationsassay mit $CD4^+$ T-Zellen aus Eva2-Mäusen und DCs, welche das FV-Peptid $env_{122-141}$ über den MHCII-Komplex präsentieren, durchgeführt.

4.2. Verschiedene IFNα Subtypen zeigen diverse immunmodulatorische Effekte auf $CD4^+$ T-Zellen *in vitro*

4.2.1. Verschiedene IFNα Subtypen zeigen diverse Effekte auf die $CD4^+$ T-Zell-Proliferation *in vitro*

Es ist bekannt, dass die verschiedenen IFNα Subtypen eine unterschiedliche biologische Aktivität haben. Die Effekte der IFNα Subtypen α1, α2, α4, α5, α6, α9 und α11 auf die $CD8^+$ T-Zell-Proliferation und deren Effektorfunktionen wurden bereits zuvor analysiert [40]. Um zu untersuchen, welchen Effekt diese verschiedenen IFNα Subtypen auf die Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen haben, wurden sie in verschiedenen Konzentrationen im etablierten $CD4^+$ T-Zell-Proliferationsassay (siehe 4.1) eingesetzt. So konnte zunächst eine Konzentration bestimmt werden, bei der sich subtypspezifische Effekte deutlich beschreiben lassen.

Abbildung 4-4 zeigt die durchflusszytometrische Analyse der Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen nach Stimulation mit den IFNα Subtypen α1, α2, α4, α5, α6, α9 oder α11 in Konzentrationen zwischen 0 und 15.300 Units/mL. Ohne die Zugabe von IFNα proliferierten 91 % der $CD4^+$ T-Zellen. Die Stimulation der $CD4^+$ T-Zellen mit IFNα9 führte bereits bei einer Konzentration von 189 Units/mL zu einer signifikanten Reduktion (56 %), wohingegen die Stimulation mit der gleichen Menge an IFNα4, α6 oder α11 nur zu einer tendenziellen Reduktion der Proliferation auf maximal 70 % proliferierter Zellen führte. Im Gegensatz dazu hatte eine Stimulation mit 189 Units/mL der Subtypen IFNα1, α2 oder α5 keinen Einfluss auf die Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen. Eine Erhöhung der IFNα-Konzentration auf 567 Units/mL reduzierte die Proliferation nach Stimulation mit IFNα4 oder α9 signifikant, mit IFNα6 oder α11 tendenziell auf unter 55 %. Nach einer Stimulation mit derselben Konzentration an IFNα1, α2 oder α5 proliferierten noch mindestens 73 % der $CD4^+$ T-Zellen. Die IFNα-Subtyp-abhängigen Unterschiede bestanden auch bei höheren Konzentrationen. Die Stimulation der Zellen im $CD4^+$ T-Zell-Proliferationsassay mit IFNα erfolgte in weiteren Experimenten mit einer Konzentration von 567 Units/mL, da bereits bei dieser

Konzentration deutlich unterschiedliche Effekte auf die CD4⁺ T-Zell-Proliferation zwischen den verschiedenen IFNα Subtypen erkennbar waren.

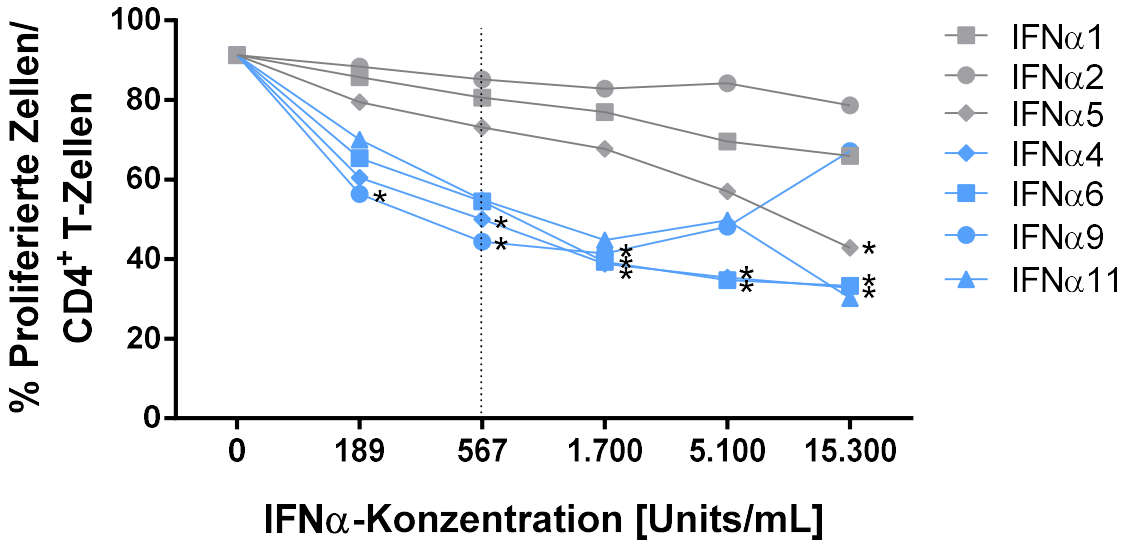


Abbildung 4-4: Analyse der CD4⁺ T-Zell-Proliferation nach konzentrationsabhängiger Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen.
CD4⁺ T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von EVa2-Mäusen über Negativselektion isoliert und mit VT gefärbt. 170.000 CD4⁺ T-Zellen wurden mit 20.000 DCs, beladen mit $env_{122-141}$-Peptid, für 72 h ko-kultiviert (+/-189-15.300 Units/mL IFNα Subtyp). Die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen wurde als Reduktion der Farbstoffintensität des VT durchflusszytometrisch gemessen und ist als Mittelwert aus n=4 Experimenten dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der unbehandelten Gruppe und den mit IFNα Subtypen behandelten Gruppen (grau/blau) wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison test* ermittelt. (* p<0,05)

Im folgenden Experiment wurde der Effekt der IFNα Subtypen auf die Proliferation und die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen nach einer Stimulation mit 567 Units/mL im etablierten Proliferationsassay untersucht.

Abbildung 4-5 (A) zeigt die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen nach der Stimulation mit den verschiedenen IFNα Subtypen. Ohne Stimulation mit IFNα proliferierten 89 % der CD4⁺ T-Zellen. Nach der Stimulation mit IFNα1, α2 oder α5 konnte keine signifikante Veränderung der Proliferation festgestellt werden. Die Stimulation mit IFNα4 (64 %), IFNα6 (68 %), IFNα9 (53 %) oder IFNα11 (58 %) hingegen, übte einen signifikanten antiproliferativen Effekt auf die CD4⁺ T-Zellen aus. Aufgrund dieser Ergebnisse können die IFNα Subtypen für den weiteren Verlauf dieser Arbeit in zwei Gruppen hinsichtlich ihres antiproliferativen Potenzials auf CD4⁺ T-Zellen unterteilt werden: IFNα1, α2 und α5 als nicht-antiproliferativ (grau) und IFNα4, α6, α9 und α11 als antiproliferativ (blau).

Zusätzlich wurde untersucht, ob die IFNα-Stimulation einen Effekt auf die Aktivierung der $CD4^+$ T-Zellen hat. Dazu wurde der Anteil $CD62L^-$ $CD4^+$ T-Zellen bestimmt (Abbildung 4-5 (B)). Die Expression des Zelladhäsionsproteins CD62L ist unter anderem ein Marker für die Unterscheidung aktivierter und naiver T-Zellen, da dieses in aktivierten T-Zellen supprimiert wird. Die Ko-Kultur von Virus-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen und Peptid-beladenen DCs führte bereits zu einer starken Aktivierung der $CD4^+$ T-Zellen (56 %). Die Stimulation mit den Subtypen IFNα2 (72 %), α9 (77 %) oder α11 (76 %) führte zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils aktivierter $CD4^+$ T-Zellen, verglichen mit der unstimulierten Gruppe. Die übrigen Subtypen führten zu einer tendenziell erhöhten Frequenz aktivierter Zellen (63-71 %). Allerdings waren keine starken Unterschiede zwischen den verschiedenen Subtypen zu beobachten. Um zu untersuchen, ob der antiproliferative Effekt der IFNα Subtypen abhängig von der Aktivierung der $CD4^+$ T-Zellen ist, wurde die Proliferation der aktivierten T-Zellen untersucht (Abbildung 4-5 (C)). Allgemein war die Proliferation der aktivierten $CD4^+$ T-Zellen etwas stärker als bei der Gesamtpopulation (vgl. Abbildung 4-5 (A)), allerdings unterschied sich der Effekt der IFNα Subtypen auf die Proliferation, relativ zur unstimulierten Gruppe, zwischen beiden Populationen nicht. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden daher die Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf die Gesamtpopulation der $CD4^+$ T-Zellen analysiert.

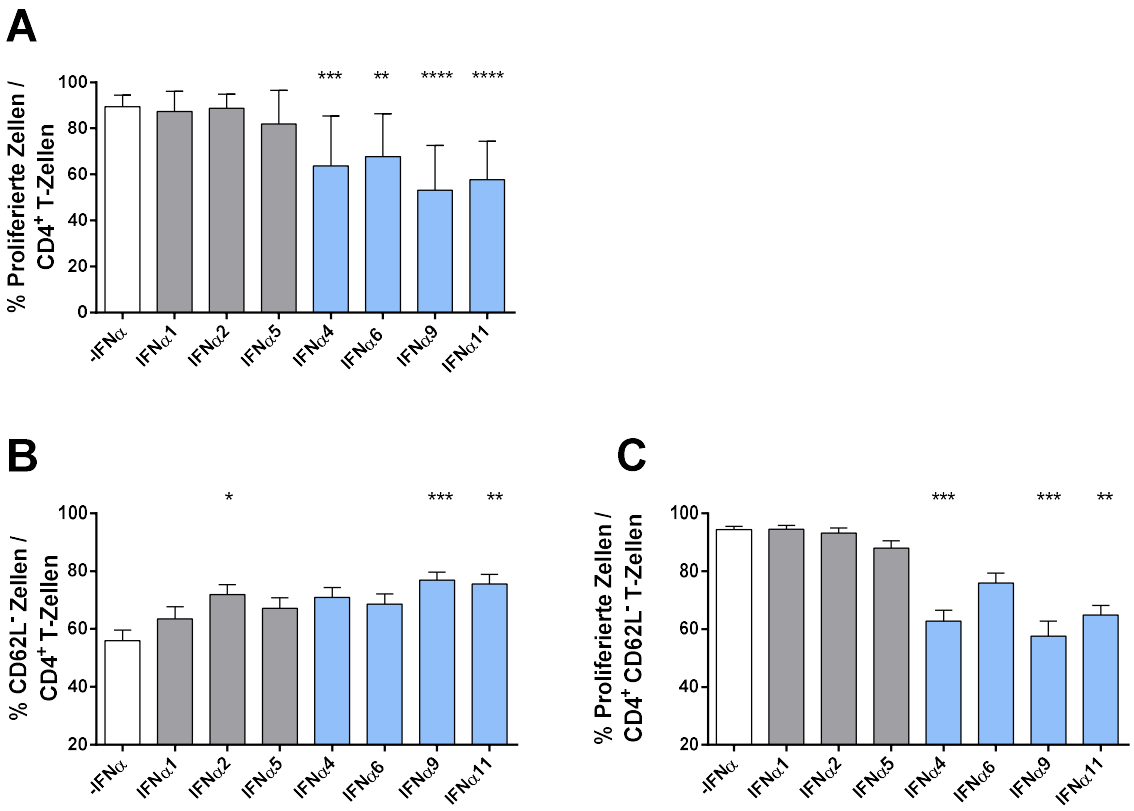


Abbildung 4-5: Analyse der Proliferation und der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen.
CD4⁺ T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von EVa2-Mäusen über Negativselektion isoliert und mit VT gefärbt. 170.000 CD4⁺ T-Zellen wurden mit 20.000 DCs, beladen mit $env_{122-141}$-Peptid, für 72 h ko-kultiviert (+/-567 Units/mL IFNα Subtyp). (A) Die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen wurde als Reduktion der Farbstoffintensität des VT durchflusszytometrisch gemessen und ist als Mittelwert und Standardabweichung (SD) aus n=16-19 Experimenten dargestellt. (B) Der prozentuale Anteil aktivierter ($CD62L^-$) CD4⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch gemessen und ist als Mittelwert und Standardabweichung (SD) aus n=12-15 Experimenten dargestellt. (C) Die Proliferation aktivierter ($CD62L^-$) CD4⁺ T-Zellen wurde als Reduktion der Farbstoffintensität des VT durchflusszytometrisch gemessen und ist als Mittelwert und Standardabweichung (SD) aus n=7-8 Experimenten dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der unbehandelten Gruppe (weiß) und den mit IFNα Subtypen behandelten Gruppen (grau/blau) wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison test* ermittelt. (* p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 **** p<0,0001)

4.2.2. Verschiedene IFNα Subtypen zeigen diverse Effekte auf die Zytokinantwort von CD4⁺ T-Zellen *in vitro*

Die Aktivierung von T-Helferzellen erfolgt durch drei verschiedene Signale. Das erste Signal ist die Erkennung eines Peptid-MHCII-Komplexes durch den TCR, gefolgt von der Ko-Stimulation über CD28 auf der Oberfläche naiver T-Zellen. Diese Signale induzieren die Zellproliferation und die IL-2-Expression [134]. Da bereits im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, dass verschiedene IFNα Subtypen unterschiedliche Effekte auf die Proliferation der Zellen haben, wurde im Folgenden auch der Anteil IL-2-exprimierender CD4⁺ T-Zellen nach IFNα Subtyp-Stimulation quantifiziert. Das dritte

für die T-Zell-Aktivierung benötigte Signal ist die Stimulation durch verschiedene Zytokine. Das Zytokinmilieu bestimmt dabei die Polarisierung der CD4⁺ T-Zellen und somit ihre Effektorfunktion [134]. Die verschiedenen T-Helfer-Subpopulationen zeigen charakteristische Zytokinexpressionsmuster. Bei einer Virusinfektion differenzieren naive CD4⁺ vorwiegend in T_H1-Zellen [176]. Daher wurden für die Analyse in diesem Virus-spezifischen Proliferationsassay, neben IL-2, die T_H1-Zell-assoziierten Zytokine IFNγ und TNFα nach der IFNα Subtyp-Stimulation untersucht [71]. Eine repräsentative Analyse der CD4⁺ T-Zellen, welche ein bestimmtes Zytokin exprimieren, ist in Abbildung 4-6 gezeigt.

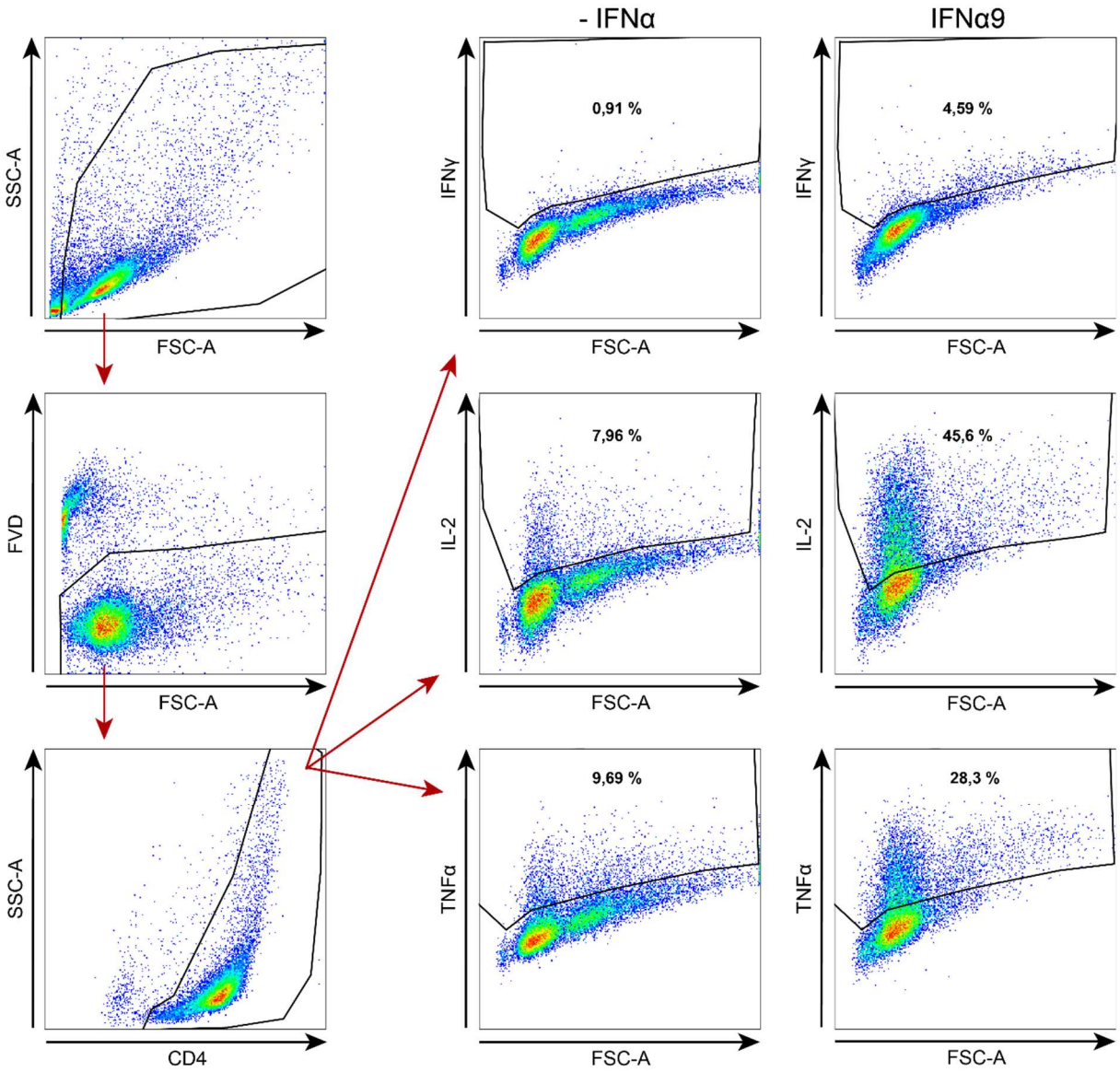


Abbildung 4-6: Repräsentative Gatingstrategie zur Analyse der Zytokinexpression von CD4⁺ T-Zellen im Proliferationsassay.
CD4⁺ T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von EVa2-Mäusen über Negativselektion isoliert und mit VT gefärbt. 170.000 CD4⁺ T-Zellen wurden mit 20.000 DCs, beladen mit $env_{122-141}$-Peptid, für 72 h

ko-kultiviert (+/-567 Units/mL IFNα Subtyp). Über Seitwärts- (SSC-A) und Vorwärtsstreulicht (FSC-A) wurden die Zellen entsprechend ihrer Granularität und Größe sortiert und die Lymphozyten ausgewählt. Anschließend wurden die toten Zellen ausgeschlossen (FVD^+) und die Expression von IFNγ, IL-2 und TNFα in $CD4^+$ T-Zellen analysiert. Der repräsentative Vergleich einer unstimulierten Probe mit einer IFNα9-stimulierten Probe ist gezeigt.

Die Stimulation mit den IFNα Subtypen α4, α6, α9 oder α11 erhöhte den Anteil der Zytokin-exprimierenden Zellen. Der Anteil $IFNγ^+$ Zellen wurde nach Stimulation mit den IFNα Subtypen α4, α6, α9 oder α11 tendenziell von durchschnittlich 2 % (unstimuliert) auf 3-5 % erhöht (Abbildung 4-7 (A)). IFNα9 und IFNα11 führten zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl IL-2-produzierender Zellen (IFNα9: 33 %, IFNα11: 32 %) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (7 %) (Abbildung 4-7 (B)). Dieser Effekt wurde auch auf die Anzahl TNFα-exprimierender Zellen beobachtet (-IFNα: 10 %, IFNα9: 22 %, IFNα11: 23 %) (Abbildung 4-7 (C)). Die Stimulation mit IFNα4 oder α6 führte zu einem tendenziell leicht erhöhten Anteil der $IL\text{-}2^+$ und $TNFα^+$ Zellen gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Im Gegensatz dazu hatte die Stimulation mit IFNα1, α2 oder α5 keinen Effekt auf den Anteil der Zellen die IFNγ, IL-2 oder TNFα exprimierten. Die Zytokinexpression pro Zelle (Mediane Fluoreszenzintensität, MFI) wurde durch die IFNα Subtyp-Stimulation generell nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Der Effekt auf die Anzahl $IFNγ^+$, $IL\text{-}2^+$ und $TNFα^+$ Zellen korrelierte signifikant mit dem antiproliferativen Effekt nach IFNα Subtyp-Stimulation (Abbildung 4-7 (D, E, F)). So erhöhten die Subtypen mit der stärksten antiproliferativen Kapazität, IFNα9 und IFNα11, auch gleichzeitig am effizientesten die Anzahl der Zellen, die diese T_H1-assoziierten Zytokine exprimierten.

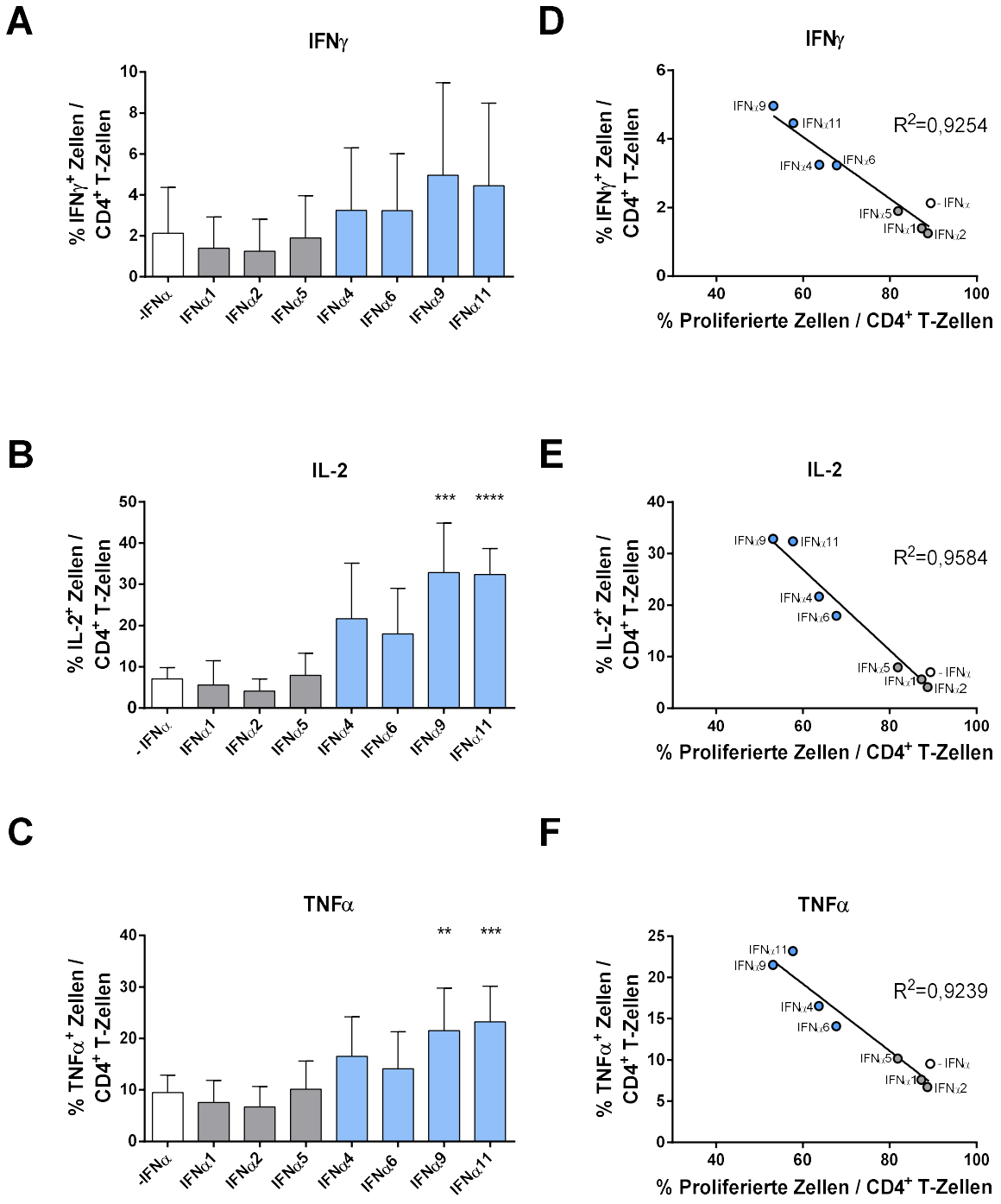


Abbildung 4-7: Analyse der Zytokinantwort von CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit IFNα Subtypen.
CD4⁺ T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von EVa2-Mäusen über Negativselektion isoliert und mit VT gefärbt. 170.000 CD4⁺ T-Zellen wurden mit 20.000 DCs, beladen mit $env_{122-141}$-Peptid, für 72 h ko-kultiviert (+/-567 Units/mL IFNα Subtyp). Die prozentualen Anteile (A) IFNγ-, (B) IL-2-, und (C) TNFα-exprimierender CD4⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch gemessen und sind als Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus n=10-15 Experimenten dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der unbehandelten Gruppe (weiß) und den mit IFNα Subtypen behandelten Gruppen (grau/blau) wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison test* ermittelt. (** p<0,01 *** p<0,001 **** p<0,0001) Die Korrelationen des Effekts der IFNα Subtypen auf die Proliferation mit deren Effekt auf die Anteile (D) IFNγ-, (E) IL-2-, und (F) TNFα-exprimierender Zellen sind als Mittelwerte aus n=10-15 Experimenten dargestellt. Statistisch signifikante Korrelationen wurden mittels *Pearson correlation test* analysiert.

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Effekte der verschiedenen IFNα Subtypen auf die $CD4^+$ T-Zellen zeitabhängig sind. Zu diesem Zweck wurden ein *in vitro* Proliferationsassay, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, durchgeführt und die Proliferation und die Zytokinantwort der $CD4^+$ T-Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h konnte noch keine Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen gemessen werden (Abbildung 4-8 (A)). Ohne die Stimulation mit IFNα ist zu diesem Zeitpunkt allerdings bereits eine hohe transiente Zunahme der Anzahl der IL-2- und TNFα-exprimierenden Zellen zu beobachten (Abbildung 4-8 (C, D)). Dabei wurde die Zytokinantwort durch die Stimulation mit einigen IFNα Subtypen nur leicht verstärkt. Nach 48-stündiger Inkubation proliferierten ohne IFNα-Stimulation durchschnittlich 46 % der $CD4^+$ T-Zellen. Bereits zu diesem Zeitpunkt beeinflusste die Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen die Proliferation deutlich. So hatten IFNα4 und α6, besonders aber IFNα9 und α11 einen starken antiproliferativen Effekt (37-14 %), während IFNα1, α2 und α5 die Proliferation nicht beeinflussten (Abbildung 4-8 (A)). Nach 48 h waren die IL-2- und TNFα-Expression ohne die Stimulation mit IFNα etwas geringer als nach 24 h, die IFNγ-Expression wurde allerdings leicht erhöht. Die Stimulation mit einigen IFNα Subtypen verstärkte die Anzahl der IFNγ-, IL-2- und TNFα-exprimierenden Zellen (Abbildung 4-8 (B-D)). Wie bereits in Abbildung 4-5 gezeigt, zeigten IFNα1, α2 und α5 nach 72 h keinen antiproliferativen Effekt (Abbildung 4-8 (A)). Tendenziell wirkten die Subtypen der anderen Gruppe, insbesondere IFNα9 und α11, auch hier stärker antiproliferativ. Die Stimulation mit diesen Subtypen führte auch zu einer erhöhten Anzahl der $IFN\gamma^+$, $IL\text{-}2^+$ und $TNF\alpha^+$ Zellen im Vergleich zur unstimulierten Gruppe (Abbildung 4-8 B-D)), was bereits in Abbildung 4-7 gezeigt werden konnte.

Zwar konnten bereits nach 48 h unterschiedliche Effekte der IFNα Subtypen auf die Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen und die Produktion von T_H1-Zytokinen beobachtet werden; nach 72 h waren die Unterschiede der Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf die Anzahl der IFNγ-, IL-2- und TNFα-exprimierenden Zellen jedoch größer und ein deutlicher antiproliferativer Effekt von IFNα4, α6, α9 und α11 konnte zu diesem Zeitpunkt gemessen werden.

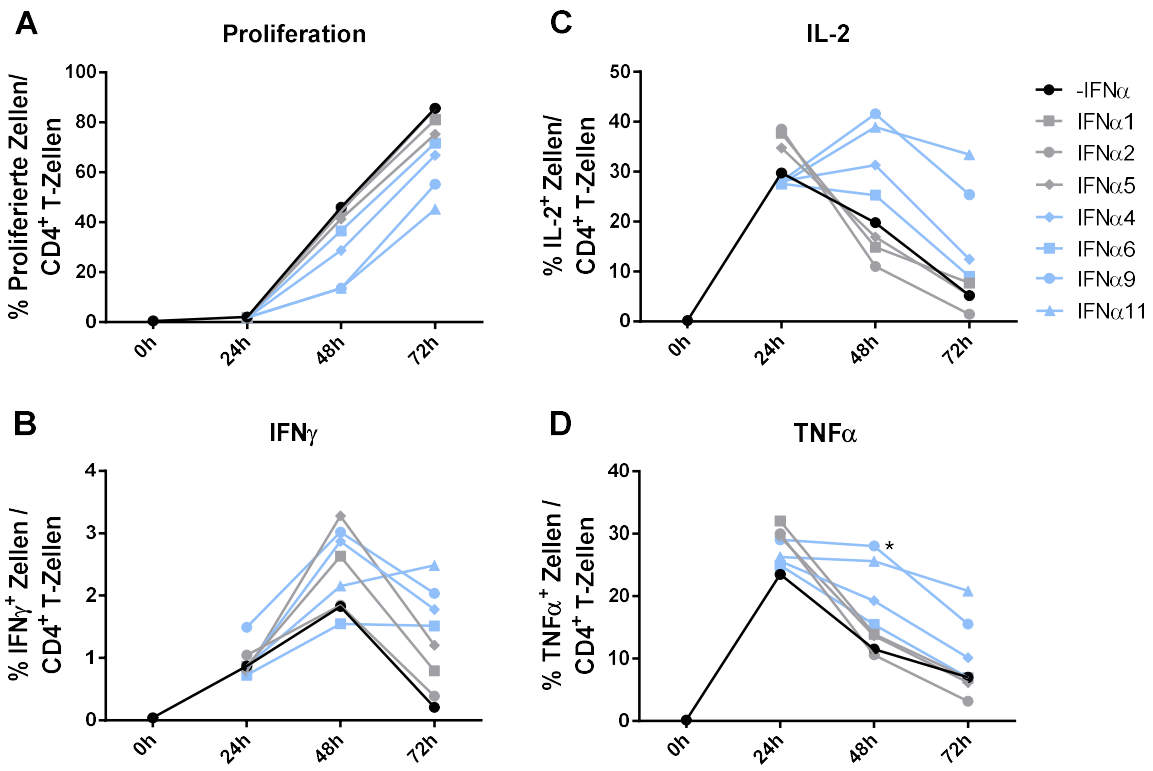


Abbildung 4-8: Kinetische Analyse der CD4⁺ T-Zell-Proliferation und der Zytokinantwort nach Stimulation mit IFNα Subtypen.
CD4⁺ T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von EVa2-Mäusen über Negativselektion isoliert und mit VT gefärbt. 170.000 CD4⁺ T-Zellen wurden mit 20.000 DCs, beladen mit $env_{122-141}$-Peptid, für 24 h, 48 h oder 72 h ko-kultiviert (+/-567 Units/mL IFNα Subtyp). (A) Die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen wurde als Reduktion der Farbstoffintensität des VT durchflusszytometrisch gemessen und ist als Mittelwert aus n=4 Experimenten dargestellt. Die prozentualen Anteile (B) IFNγ-, (C) IL-2-, und (D) TNFα-exprimierender CD4⁺ T-Zellen wurden durchflusszytometrisch gemessen und sind als Mittelwerte aus n=2-4 Experimenten dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der unbehandelten Gruppe (weiß) und den mit IFNα Subtypen behandelten Gruppen (grau/blau) wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison test* ermittelt. (* $p<0,05$)

4.2.3. Verschiedene IFNα Subtypen verändern das Zytokinexpressionsmuster von CD4⁺ T Zellen

Die in der Analyse der Zytokinantwort nach Stimulation mit IFNα Subtypen (Abbildung 4-7) gezeigten Daten stellen lediglich den Effekt der IFNα Subtypen auf die T_H1-Zytokinantwort dar. Im Folgenden wurde mittels *LEGENDplex*™ die Konzentration weiterer, nicht-T_H1-assoziierter Zytokine im Überstand des Proliferationsassays gemessen, um zu untersuchen, ob die verschiedenen IFNα Subtypen einen Effekt auf die Produktion anderer T-Zell-assoziierter Zytokine hat.

In Abbildung 4-9 ist der Effekt der IFNα Subtyp-Stimulation auf die Expression von IFNγ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17a, IL-17f, IL-21, IL-22 und TNFα im Überstand des *in vitro* CD4⁺ T-Zell-Proliferationsassays gezeigt. Beim Vergleich der

mit verschiedenen IFNα Subtypen stimulierten Gruppen untereinander fällt auf, dass die Stimulation mit den Subtypen IFNα1, α2 oder α5 die IL-17a-Konzentration um das bis zu 2,3-fache, verglichen mit der unstimulierten Gruppe, erhöhte (Abbildung 4-9 (I)). IFNα4, α6, α9 und α11 allerdings führten bis zu einer mehr als 10-fachen Reduktion der IL-17a-Konzentration. Auch die IL-17f- und IL-22-Konzentrationen wurden durch die Stimulation mit IFNα1, α2 oder α5 erhöht, gleichzeitig aber durch IFNα4, α6, α9 oder α11 verringert (Abbildung 4-9 (J, L)). Die IL-6-Konzentration wurde im Vergleich zur unstimulierten Gruppe durch die IFNα-Stimulation nicht verringert. Dennoch verstärkten die Subtypen IFNα1 und α2 die IL-6-Expression tendenziell und IFNα5 signifikant um das 1,7-fache (Abbildung 4-9 (E)). Die IFNα Subtypen α4, α6, α9 und α11 beeinflussten die IL-6-Konzentration nicht. Im Gegensatz dazu erhöhte die Stimulation mit den Subtypen IFNα4, α6, α9 oder α11 die IL-2-Expression fast auf das bis zu 2,3-fache der unstimulierten Kontrolle und somit stärker als IFNα1, α2 oder α5 (Abbildung 4-9 (B)). Dieses Ergebnis konvergiert mit der durchflusszytometrischen Analyse die zeigte, dass IFNα4, α6, α9 und α11 den Anteil IL-2-exprimierender Zellen erhöhten (vgl. Abbildung 4-7). Die Expression der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 lag zum Teil unter dem Detektionslimit, weshalb ein Effekt der IFNα Subtyp-Stimulation auf diese Zytokine nicht nachgewiesen werden konnte.

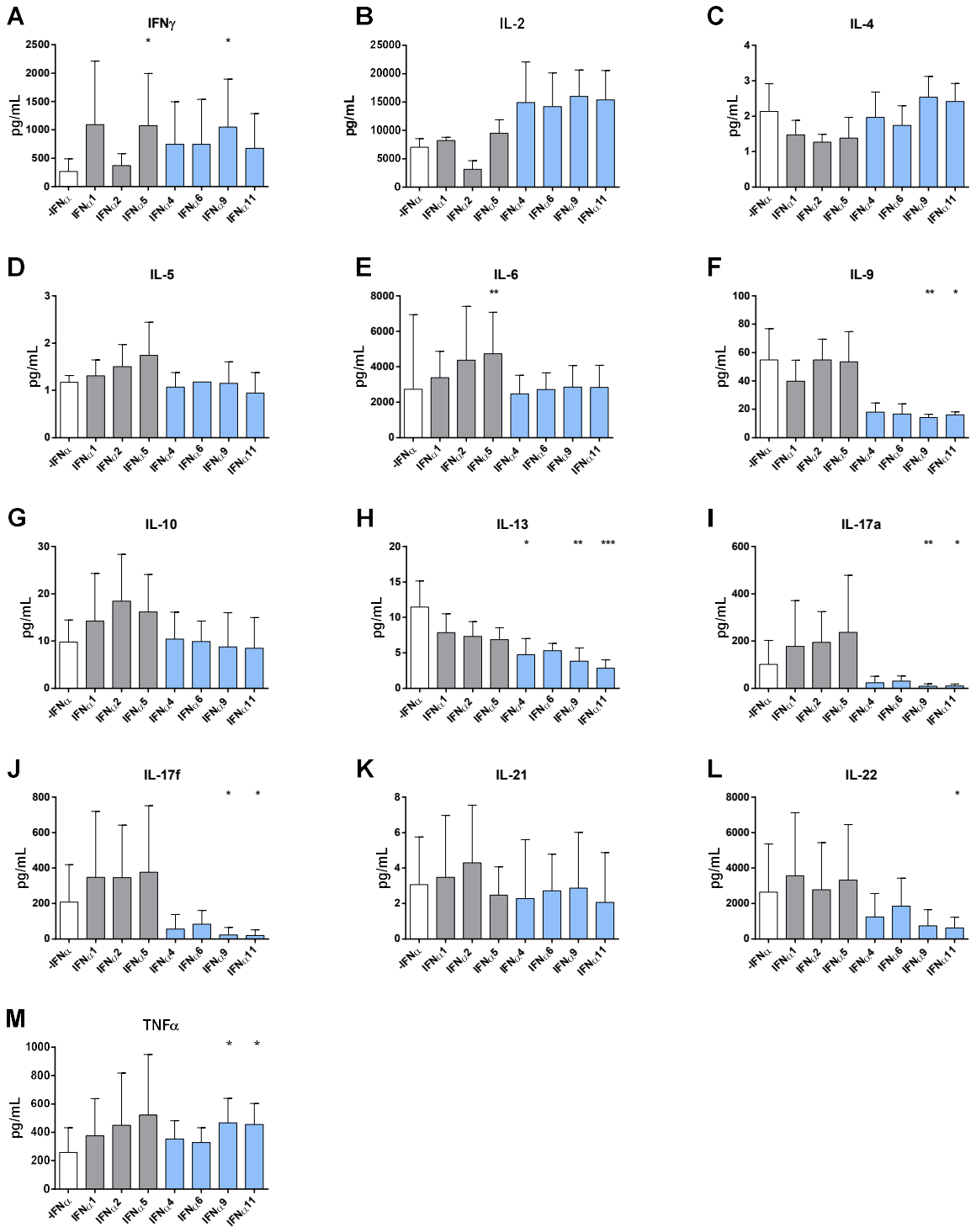


Abbildung 4-9: Analyse verschiedener Zytokinkonzentrationen im Überstand des EVa2-Proliferationsassays nach Stimulation mit IFNα Subtypen.
CD4⁺ T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von EVa2-Mäusen über Negativselektion isoliert und mit VT gefärbt. 170.000 CD4⁺ T-Zellen wurden mit 20.000 DCs, beladen mit $env_{122-141}$-Peptid, für 72 h ko-kultiviert (+/-567 Units/mL IFNα Subtyp). Die Konzentrationen von (A) IFNγ (B) IL-2 (C) IL-4 (D) IL-5 (E) IL-6 (F) IL-9 (G) IL-10 (H) IL-13 (I) IL-17a (J) IL-17f (K) IL-21 (L) IL-23 und (M) TNFα im Überstand wurden mittels *LEGENDplex*™ bestimmt und sind als Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus n=4-12 Experimenten dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der unbehandelten Gruppe (weiß) und den mit IFNα Subtypen behandelten Gruppen (grau/blau) wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison test* ermittelt. (* p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001)

Die Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen konnte die Expression unterschiedlicher Zytokine induzieren und gleichzeitig die Produktion anderer Zytokine inhibieren. IFNα1, α2 und α5 induzierten die Expression von Zytokinen, welche typischerweise von T_H17-Zellen sezerniert werden [21]. Im Gegensatz dazu zeigte die durchflusszytometrische Analyse in Abbildung 4-7, dass die Stimulation mit IFNα4, α6, α9 oder α11 zu einer Expansion der IFNγ- und TNFα-exprimierenden Zellen führte. Diese Zytokine werden typischerweise von T_H1-Zellen exprimiert. Anders als auf T_H1- und T_H17-Zytokine, konnte kein Effekt der IFNα Subtypen auf die Expression von T_H2-Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-13) beobachtet werden. Der Effekt auf das Zytokinexpressionsmuster führt zu der Frage, ob IFNα Subtypen einen Einfluss auf die Differenzierung von $CD4^+$ T-Zellen in verschiedene T-Helfer-Subpopulationen haben.

4.2.4. IFNα Subtypen haben keinen direkten Einfluss auf die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in verschiedene T-Zell-Subpopulationen

Basierend auf dem Effekt der IFNα Subtyp Stimulation auf das Zytokinexpressionsmuster im *in vitro* FV-spezifischen Proliferationsassay wurde die Hypothese aufgestellt, dass die IFNα Subtypen IFNα1, α2 und α5 die Differenzierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen in T_H17-Zellen beeinflussen. Im Folgenden wurde untersucht, ob dies ein direkter Effekt der IFNα Subtypen auf die $CD4^+$ T-Zellen ist. Dazu wurden naive ($CD62L^+$) $CD4^+$ T Zellen *in vitro* in T_H17-Zellen differenziert und währenddessen mit verschiedenen IFNα Subtypen stimuliert. Zur Kontrolle erfolgte die IFNα Stimulation ebenfalls während der Differenzierung in T_H2-Zellen, da die IFNα Subtypen IFNα1, α2 und α5 die Expression von T_H2-assoziierten Zytokinen im Proliferationsassay nicht induzierten (vgl. Abbildung 4-9). Abbildung 4-10 zeigt eine repräsentative Gatingstrategie zur Analyse der Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_H17- bzw. T_H2-Zellen. Die Analyse der T_H17-Zellen erfolgte durch die Quantifizierung der IL-17a-Expression, die der T_H2-Zellen über die Expression von IL-13.

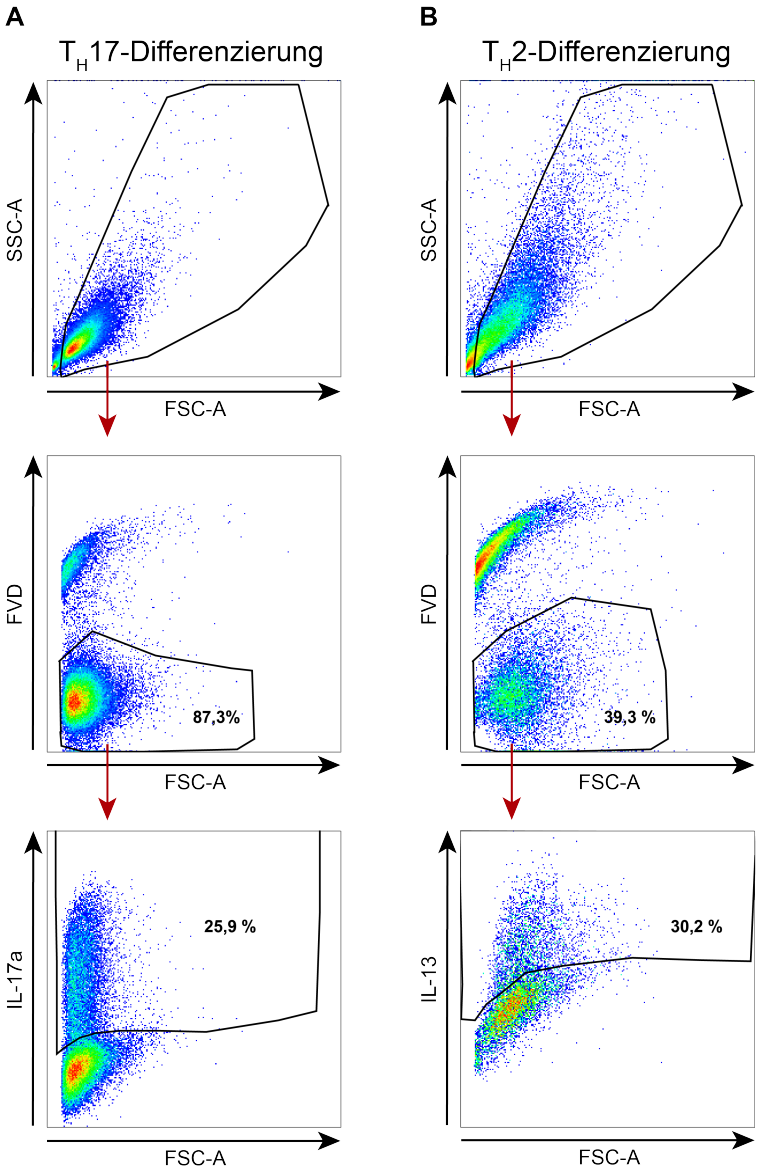


Abbildung 4-10: Repräsentative Analyse der *in vitro* Differenzierung naiver CD4$^+$ T Zellen in T$_H$17- und T$_H$2- Zellen.
CD62L$^+$ CD4$^+$ T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von C57BL/6-Mäusen über Negativselektion mit anschließender Positivselektion isoliert und mittels Antikörper- und Zytokincocktail *in vitro* differenziert (+/-680 Units/mL IFNα Subtyp). Über Seitwärts- (SSC-A) und Vorwärtsstreulicht (FSC-A) wurden die Zellen entsprechend ihrer Granularität und Größe sortiert und die Lymphozyten ausgewählt. Anschließend wurde in vitalen Zellen (FVD$^-$) die Expression von (A) IL-17a (T$_H$17-Zellen) und (B) IL-13 (T$_H$2-Zellen) analysiert.

Nach der *in vitro* T$_H$17-Differenzierung exprimierten 25 % der CD4$^+$ T-Zellen IL-17a. Die IFNα Stimulation hatte weder einen signifikanten Effekt auf den Anteil differenzierter Zellen (min. 23 %, max. 25 %), noch auf die IL-17a-Expression pro Zelle (MFI) relativ zur unstimulierten Gruppe (max. 1,3-fache Erhöhung) (Abbildung 4-11 (A, C)). Nach der T$_H$2-Differenzierung lag der Anteil IL-13-exprimierender CD4$^+$ T-Zellen bei 25 %. Wie zu erwarten hatte die zusätzliche Stimulation der Zellen mit verschiedenen IFNα Subtypen dabei keinen signifikanten Effekt auf den Anteil von

T_H2-Zellen in der Gesamtpopulation bzw. die IL-13 Expression pro Zelle relativ zur unstimulierten Gruppe (Abbildung 4-11 (B, D)).

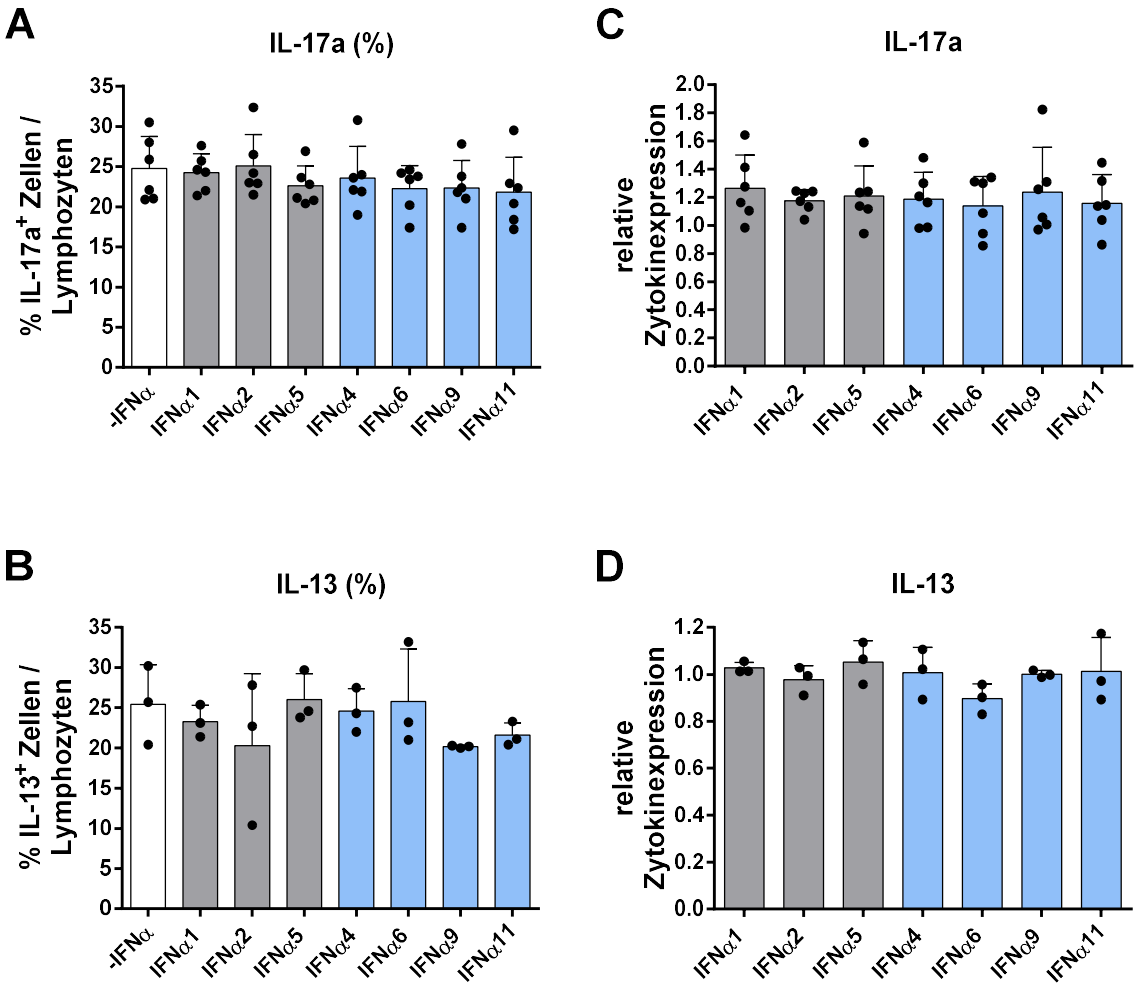


Abbildung 4-11: Analyse der *in vitro* Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in T_H17- und T_H2- Zellen nach Stimulation mit IFNα Subtypen.
CD62L⁺ CD4⁺ T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von C57BL/6-Mäusen über Negativselektion mit anschließender Positivselektion isoliert und mittels Antikörper- und Zytokincocktail *in vitro* differenziert (+/-680 Units/mL IFNα Subtyp). Die prozentualen Anteile (A) IL-17a-exprimierender T_H17-Zellen und (B) IL-13-exprimierender T_H2-Zellen sowie der relative Effekt der IFNα Subtyp Stimulation auf die (C) IL-17a- und (D) IL-13-Expression im Vergleich zur unstimulierten Gruppe wurden durchflusszytometrisch gemessen und sind als Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) für T_H2 (n=3) bzw. für T_H17 (n=6) Experimenten dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden in (A) und (B) zwischen der unstimulierten (weiß) und den mit IFNα Subtypen behandelten Gruppen (grau/blau) bzw. in (C) und (D) zwischen den Behandlungen mit verschiedenen IFNα Subtypen wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison test* ermittelt.

Trotz einer Erhöhung der Expression von IL-17a, IL-17f und IL-22 nach der Stimulation mit IFNα1, α2 oder α5 im Proliferationsassay (vgl. Abbildung 4-9), zeigt die IFNα Subtyp-Stimulation keinen direkten Einfluss auf die *in vitro* Differenzierung der CD4⁺

T-Zellen in T_H17-Zellen. Möglicherweise wird der Effekt der IFNα Subtypen auf die $CD4^+$ T-Zellen also nicht direkt, sondern indirekt über DCs vermittelt. Dazu wurde in folgenden Experimenten untersucht, welche Rolle die DCs bei der Vermittlung der Effekte von IFNα auf die $CD4^+$ T-Zellen spielen.

4.2.5. Dendritische Zellen vermitteln den Effekt der IFNα Subtypen auf die Zytokinantwort, aber nicht auf die Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die IFNα Subtypen direkt auf die Proliferation und Effektorfunktionen der $CD4^+$ T-Zellen wirken, oder ob deren Effekte über DCs vermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden $IFNAR^{-/-}$ DCs zur Antigenpräsentation im $CD4^+$ T-Zell-Proliferationsassay eingesetzt, sodass die Typ I IFN nur direkt auf die $CD4^+$ T-Zellen wirken und die Effektorfunktion der DCs nicht beeinflussen können.

Abbildung 4-12 (A) vergleicht die Proliferation zwischen $CD4^+$ T-Zellen in Ko-Kultur mit WT DCs (weiße Balken) oder $IFNAR^{-/-}$ DCs (schraffierte Balken). Im Abwesenheit von IFNα proliferierten die $CD4^+$ T-Zellen, die mit WT DCs ko-kultiviert wurden, signifikant stärker (89 %) als in einer Ko-Kultur mit $IFNAR^{-/-}$ DCs (68 %). Um den Effekt der IFNα Subtypen auf die Proliferation untersuchen zu können, wird die Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen in beiden Ko-Kulturen nach IFNα Subtyp-Stimulation in Abbildung 4-12 (B) daher relativ zur unstimulierten Probe der jeweiligen Gruppe (WT oder $IFNAR^{-/-}$ DCs) gezeigt. Ein antiproliferativer Effekt der IFNα Subtypen α4, α6, α9 und α11 ist sowohl in der Ko-Kultur mit WT DCs, als auch mit $IFNAR^{-/-}$ DCs zu beobachten. IFNα1, α2 oder α5 zeigten in keiner der Ko-Kulturen einen antiproliferativen Effekt. Daraus lässt sich schließen, dass der antiproliferative Effekt von IFNα4, α6, α9 und α11 direkt auf die $CD4^+$ T-Zellen wirkt und nicht über DCs vermittelt wird.

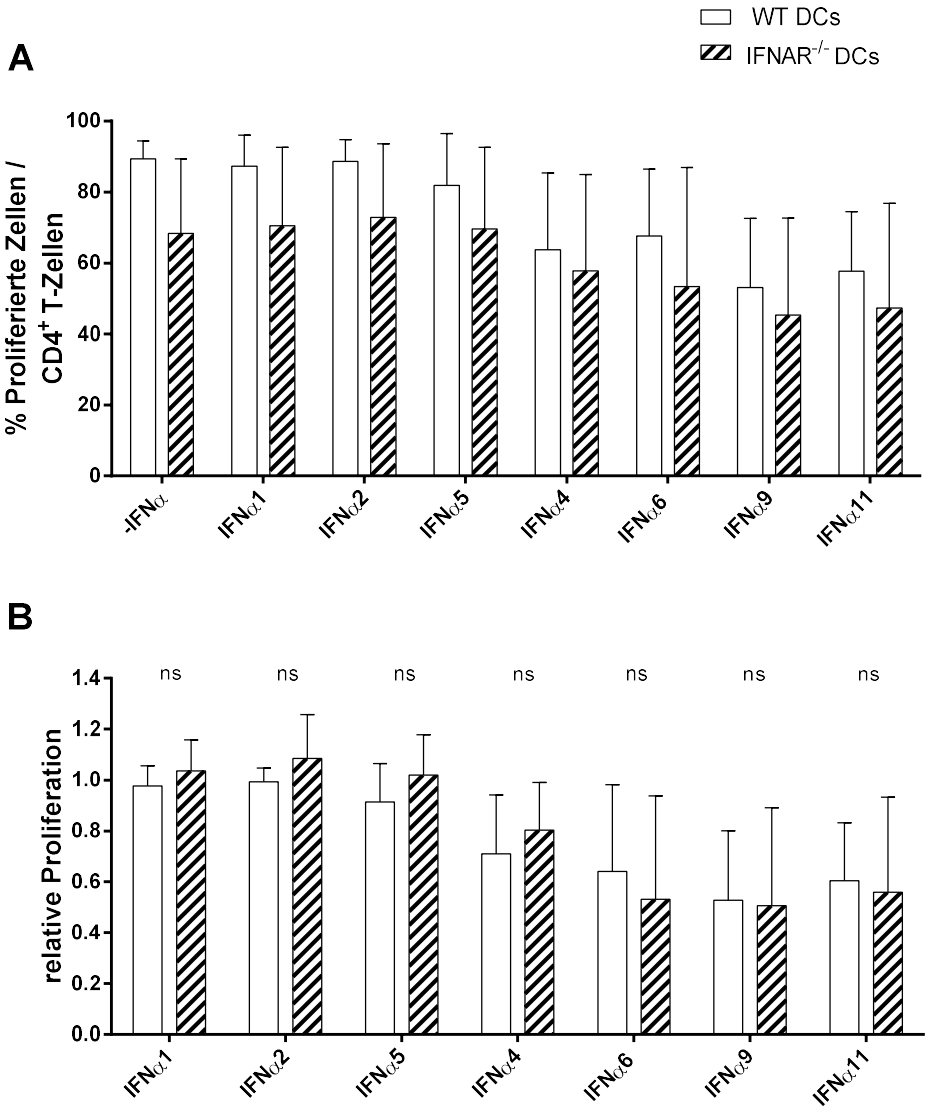


Abbildung 4-12: Vergleich direkter und indirekter Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen.
CD4⁺ T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von EVa2-Mäusen über Negativselektion isoliert und mit VT gefärbt. 170.000 CD4⁺ T-Zellen wurden mit 20.000 DCs (WT/IFNAR$^{-/-}$), beladen mit env$_{122-141}$-Peptid, für 72 h ko-kultiviert (+/-567 Units/mL IFNα Subtyp). Die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen wurde als Reduktion der Farbstoffintensität des VT durchflusszytometrisch gemessen und ist als Mittelwert und Standardabweichung (SD) aus n=6-19 Experimenten dargestellt. (A) Der prozentuale Anteil proliferierter CD4⁺ T-Zellen an der Gesamt-CD4⁺ T-Zell-Population nach der Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen in Ko-Kultur mit WT oder IFNAR$^{-/-}$ DCs und (B) die relative Proliferation der CD4⁺ T-Zellen nach der Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (WT oder IFNAR$^{-/-}$ DCs) sind gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der mit WT DCs ko-kultivierten und der mit IFNAR$^{-/-}$ DCs ko-kultivierten Gruppe in (B) wurden durch *Multiple t-tests* und den *Holm-Sidak test* ermittelt. (ns=nicht signifikant) (Die Position der Signifikanzsymbole wurde im Vergleich zur eingereichten Version korrigiert.)

Anschließend wurde untersucht, ob die IFNα Subtypen auch die Zytokinantwort der CD4⁺ T-Zellen direkt beeinflussen, oder ob dies durch eine IFN-Stimulation der DCs moduliert wird. Wie in Abbildung 4-13 (A) zu erkennen ist, führt die Ko-Kultur von CD4⁺

T-Zellen und IFNAR$^{-/-}$ DCs zu einer Induktion der untersuchten Zytokine (IFNγ, IL-2 und TNFα). Insgesamt war die Zytokinantwort in der Ko-Kultur mit IFNAR$^{-/-}$ DCs stärker als in den WT-Kontrollen. Daher wurde der Einfluss der IFNα Subtyp-Stimulation auf den Anteil der IFNγ-, IL-2- und TNFα-exprimierenden Zellen relativ zur jeweiligen unstimulierten Gruppe gezeigt (Abbildung 4-13 (B-D)). Dabei wurden die Ko-Kulturen von CD4$^+$ T-Zellen mit IFNAR$^{-/-}$ DCs und WT DCs miteinander verglichen. In der Ko-Kultur mit IFNAR$^{-/-}$ DCs hatte die Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen keinen Einfluss auf den Anteil Zytokin-produzierender CD4$^+$ T-Zellen. Die Stimulation mit den Subtypen IFNα4, α6, α9 oder α11 in der Ko-Kultur mit WT DCs erhöhte deren Anteil allerdings teilweise signifikant im Vergleich zur Ko-Kultur mit IFNAR$^{-/-}$ DCs. So resultiere die Stimulation mit IFNα11 in der WT-Kultur (weiße Balken) in einem dreifach erhöhten Anteil IL-2$^+$ CD4$^+$ T-Zellen gegenüber der Ko-Kultur mit IFNAR$^{-/-}$ DCs (schraffierte Balken).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen IFNα Subtypen die Proliferation von CD4$^+$ T-Zellen direkt beeinflussen, deren modulatorischer Effekt auf die Zytokinantwort der CD4$^+$ T-Zellen allerdings indirekt über DCs vermittelt wird.

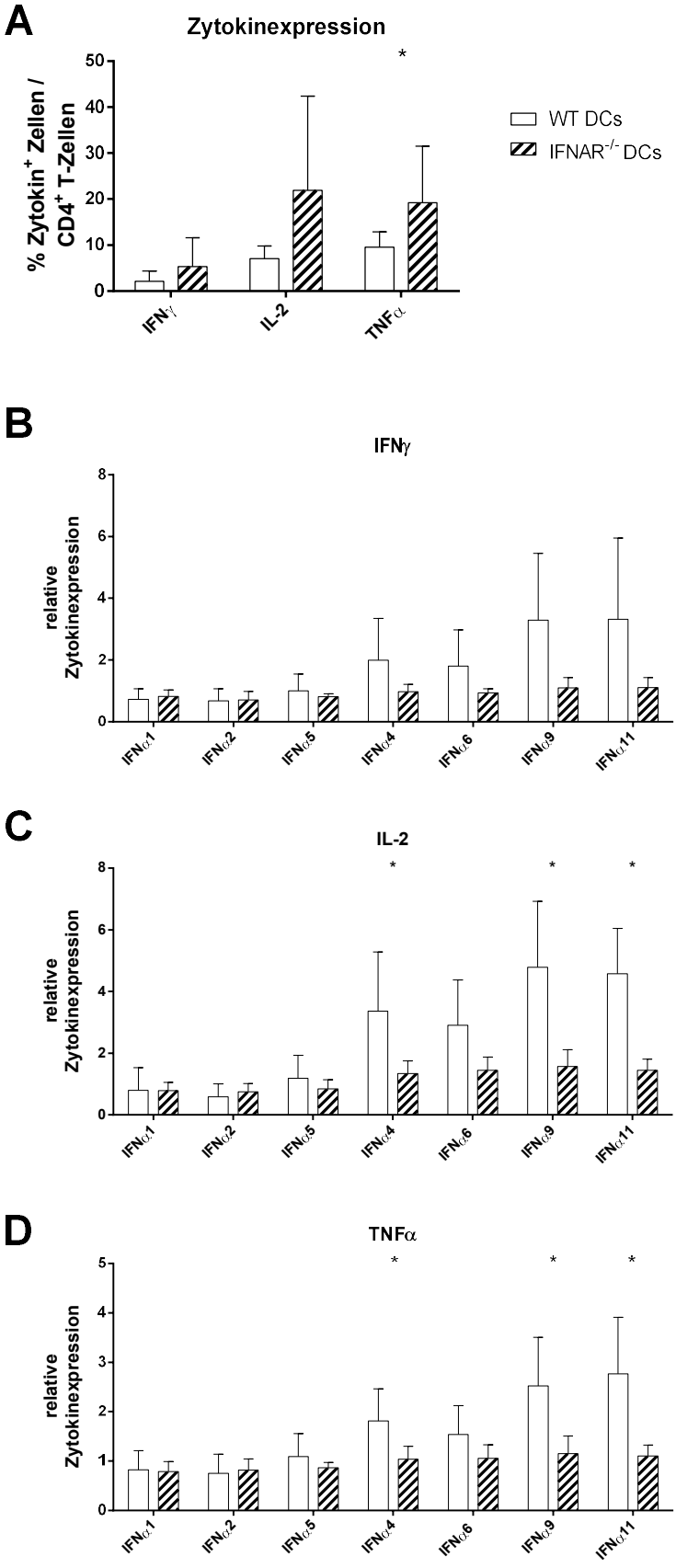


Abbildung 4-13: Vergleich direkter und indirekter Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf den Anteil IFNγ-, IL-2- und TNFα-exprimierender CD4⁺ T-Zellen
CD4⁺ T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von EVa2-Mäusen über Negativselektion isoliert und mit VT gefärbt. 170.000 CD4⁺ T-Zellen wurden mit 20.000 DCs (WT/IFNAR$^{-/-}$), beladen mit env$_{122-141}$-Peptid, für 72 h ko-kultiviert (+/-567 Units/mL IFNα Subtyp). (A) Die prozentualen Anteile IFNγ-, IL-2-,

und TNFα- exprimierender CD4⁺ T-Zellen an der Gesamt-CD4⁺ T-Zell-Population nach der Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen in Ko-Kultur mit WT oder IFNAR$^{-/-}$ DCs wurden durchflusszytometrisch gemessen und sind als Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus n=6-13 Experimenten dargestellt. (B-D) Gezeigt ist der relative Effekt der IFNα Subtyp Stimulation auf den prozentualen Anteil IFNγ-, IL-2-, und TNFα- exprimierender CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur unstimulierten Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der mit WT DCs ko-kultivierten und der mit IFNAR$^{-/-}$ DCs ko-kultivierten Gruppe wurden durch *Multiple t-tests* und den *Holm-Sidak test* ermittelt. (* $p<0,05$) (Die Position der Signifikanzsymbole wurde im Vergleich zur eingereichten Version korrigiert.)

4.2.6. Verschiedene IFNα Subtypen beeinflussen die Zytokinexpression von DCs

In Kapitel 4.2.3 wurde beschrieben, dass die Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen das Zytokinexpressionmuster von CD4⁺ T-Zellen beeinflussen kann. Allerdings hatte die direkte Stimulation der CD4⁺ T-Zellen auf den Anteil der IL-17a-exprimierenden Zellen (vgl. Abbildung 4-11), anders als auf die Proliferation (vgl. Abbildung 4-12), keinen Effekt. Da die Effekte der IFNα Subtypen auf die Zytokinantwort über DCs vermittelt wurden (vgl. Abbildung 4-13), sind diese möglicherweise auch für die Vermittlung des Effekts der IFNα Subtypen auf die IL-17a-Expression verantwortlich.

Zunächst sollte ausgeschlossen werden, dass das zuvor gemessene IL-17a (vgl. Abbildung 4-9) im Überstand der Ko-Kultur nach IFNα-Stimulation von DCs produziert wurde. Dazu wurden DCs für 24 h mit IFNα Subtypen stimuliert und die *Il17a*-mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR analysiert. Als Positivkontrolle wurde mRNA *in vitro* T_H17-differenzierter CD4⁺ T-Zellen (siehe 3.3.5) untersucht. In Abbildung 4-14 (A) ist deutlich zu erkennen, dass DCs keine *Il17a*-mRNA exprimieren. Auch die durchflusszytometrische Analyse zeigt repräsentativ, dass nach 24-stündiger Stimulation mit IFNα2 keine IL-17a-Expression in DCs nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4-14 (B)). Als Positivkontrolle (Abbildung 4-14 (C)) wurden *in vitro* differenzierte T_H17-Zellen verwendet.

Das im Proliferationsassay-Überstand nachgewiesene IL-17a wurde also nicht von DCs sezerniert, sondern von den CD4⁺ T-Zellen.

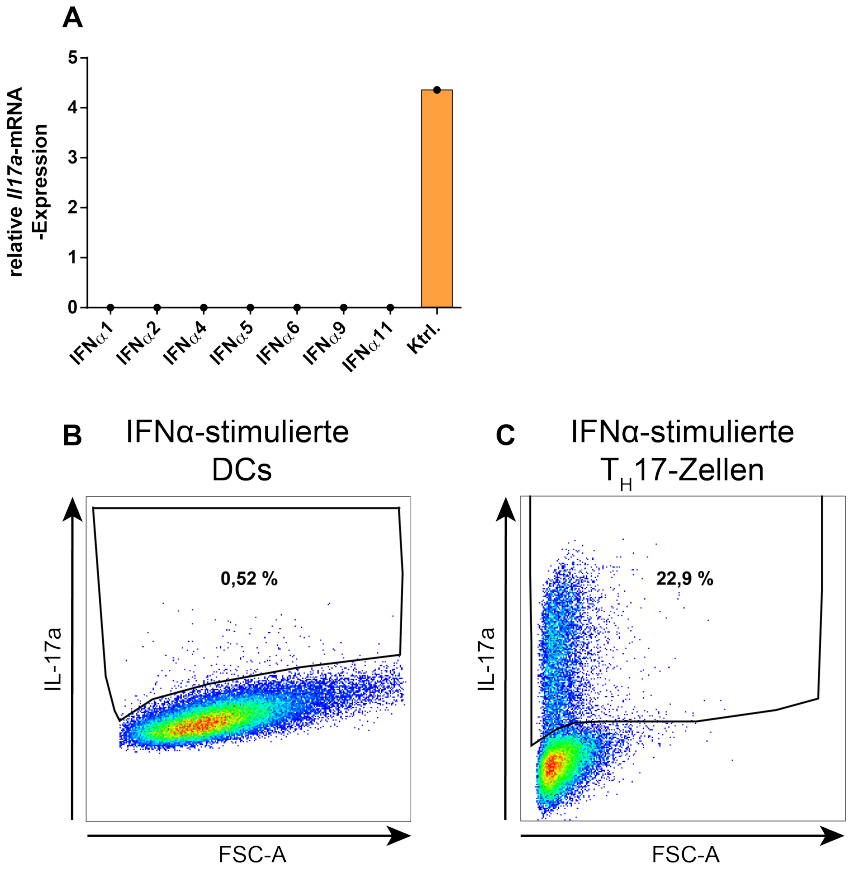


Abbildung 4-14: Analyse der IL-17a-Expression in DCs nach IFNα-Stimulation.
DCs wurden aus Knochenmarkszellen von C57BL/6-Mäusen generiert. 1x10^6 DCs wurden mit verschiedenen IFNα Subtypen in angepassten Konzentrationen für 24 h stimuliert. (A) qRT-PCR Analyse der *Il17a*-mRNA Expression nach Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen (3.000 Units/mL IFNα). Als Positivkontrolle (Ktrl.) wurde mRNA aus mit IFNα5 stimulierten, *in vitro*-differenzierten TH_{17}-Zellen verwendet (680 Units/mL IFNα). Gezeigt ist der relative Expressionsunterschied von *Il17a*-mRNA nach IFNα Subtyp-Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle aus n=1 Experiment. Repräsentative Dotplots eines durchflusszytometrischen Vergleichs der IL-17a-Expression von (B) DCs, stimuliert mit IFNα2 (10.000 Units/mL IFNα) und (C) *in vitro*-differenzierten T_H17-Zellen, stimuliert mit IFNα2 (567 Units/mL IFNα) sind gezeigt.

Aktivierte DCs sezernieren das Zytokin IL-23, ein Heterodimer, welches aus den Untereinheiten p19 und p40 besteht. Die Untereinheit p40 bildet außerdem zusammen mit p35 das heterodimere Zytokin IL-12, welches eine Rolle bei der Differenzierung naiver CD4$^+$ T-Zellen in T_H1-Zellen spielt [2, 92]. Neben IL-6, IL-21 und TGFβ ist IL-23 für die Differenzierung naiver CD4$^+$ T-Zellen in T_H17-Zellen verantwortlich [78, 152]. Um zu untersuchen, ob die Stimulation mit den verschiedenen IFNα Subtypen die IL-23-Expression beeinflusst, wurde die Induktion der gemeinsamen Untereinheit p40 in DCs analysiert. Dazu wurden DCs für 24 h mit den verschiedenen IFNα Subtypen stimuliert und die p40-Expression durchflusszytometrisch untersucht. Abbildung 4-15 (A) zeigt, dass die Stimulation mit den IFNα Subtypen α1, α2 oder α5 den Anteil p40-exprimierender DCs (14-15 %), verglichen mit der unstimulierten Gruppe (7 %),

tendenziell erhöhte. Auch die Stimulation mit IFNα9 führte zu einer Erhöhung des Anteils p40-exprimierender Zellen (12 %). Dieser Effekt konnte bei der Stimulation mit IFNα4, α6 oder α11 nicht beobachtet werden. Die Stimulation mit den Subtypen IFNα1, α2, α5 oder α9 erhöhte auch die Expression von IL-12/23p40 pro Zelle signifikant (MFI -IFN: 2682; IFNα1: 5089; IFNα2: 5713; IFNα5: 5222; IFNα9: 6629) (Abbildung 4-15 (B)), wohingegen auch hier die Stimulation mit IFNα4, α6 oder α11 keinen Einfluss auf die IL-12/23p40-Expression in DCs hatte.

Zusätzlich wurde analysiert, ob die Stimulation der DCs mit den verschiedenen IFNα Subtypen einen Effekt auf die Aktivierung der DCs hat, was durch die Expression des ko-stimulatorischen Moleküls CD86 quantifiziert wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass ohne die Stimulation mit IFNα Subtypen 20 % der DCs CD86 exprimierten. Durch die Stimulation mit den verschiedenen IFNα Subtypen wurde der Anteil aktivierter DCs auf 37-46 % und damit zum Teil signifikant erhöht (Abbildung 4-15 (C)). Dabei wurden keine starken Unterschiede des Effekts zwischen den verschiedenen IFNα Subtypen auf die Aktivierung beobachtet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation mit IFNα1, α2, α5 oder α9 die Expression der IL-12/IL-23 Untereinheit p40 erhöhte, was zu einer gesteigerten IL-17a-Expression in $CD4^+$ T-Zellen führen könnte.

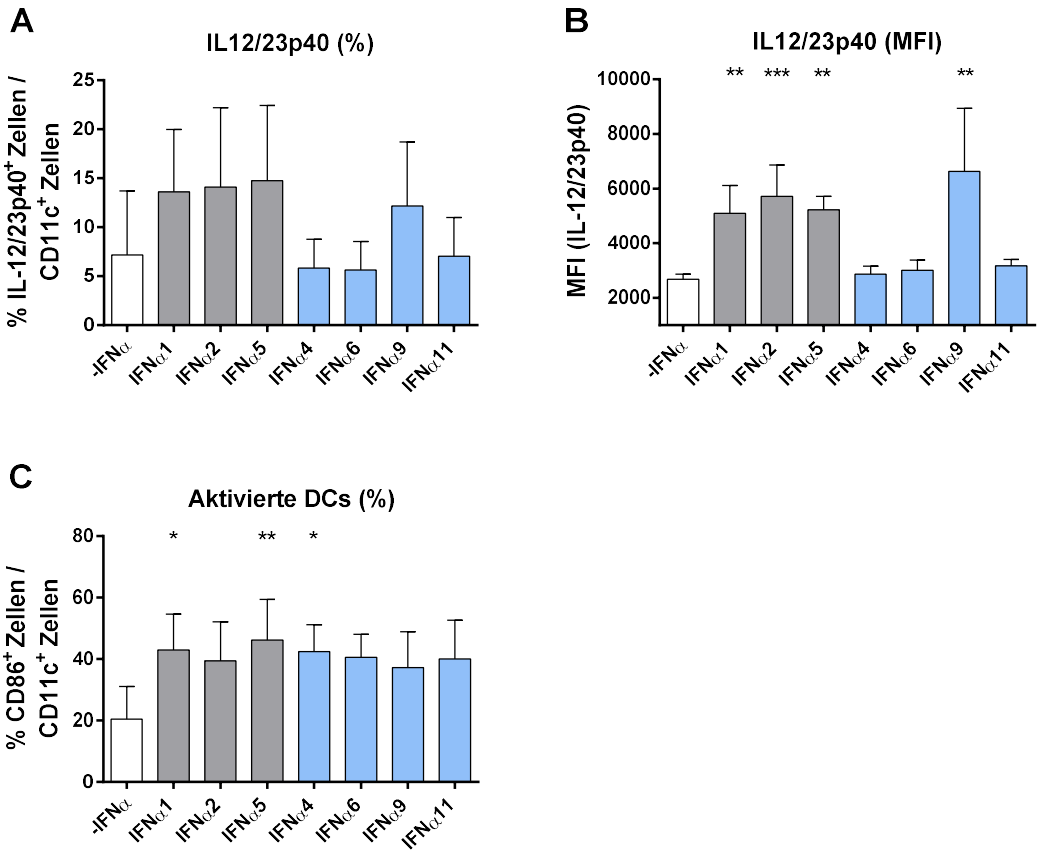


Abbildung 4-15: Analyse der IL-12/23p40-Expression in DCs nach IFNα Stimulation.
DCs wurden aus Knochenmarkszellen von C57BL/6-Mäusen generiert. 1x10^6 DCs wurden mit verschiedenen IFNα Subtypen in angepassten Konzentrationen für 24 h stimuliert (+/-10.000 Units/mL IFNα). (A) Der prozentuale Anteil IL12/23p40-exprimierender DCs und (B) die quantitative Expression (MFI) von IL12/23p40 in DCs und (C) die CD86-Expression als Aktivierungsmarker wurden durchflusszytometrisch gemessen und sind als Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus n=4-8 Experimenten dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der unbehandelten Gruppe (weiß) und den mit IFNα Subtypen behandelten Gruppen (grau/blau) wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison test* ermittelt. (* p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001)

4.2.7. Die IL-23-Expression der DCs beeinflusst die IL-17a-Expression der CD4+ T-Zellen

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die IFNα-Stimulation die IL-17a-Expression in CD4+ T-Zellen indirekt über die IL-23-Expression der DCs beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden die Konzentrationen von IL-17a und IL-23 im Überstand eines CD4+ T-Zell-Proliferationsassay nach verschiedenen Zeitpunkten ermittelt.

In Abbildung 4-16 wird die IL-23-Konzentration im Überstand des CD4+ T-Zell-Proliferationsassays nach 24 h, 48 h und 72 h gezeigt. Nach 24 h lag die IL-23 Konzentration ohne IFNα Stimulation bei durchschnittlich 64 pg/mL. Die Stimulation mit IFNα1, α2 oder α5 erhöhte die mittlere Konzentrationen auf das bis zu 4,6-fache (294 pg /mL), während IFNα4, α6, α9 oder α11 keine Erhöhung der IL-23-

Konzentration zeigten. Nach 48-stündiger Inkubation war in der unstimulierten Kontrolle und in den Proben nach Stimulation mit IFNα4, α6, α9 oder α11 ein Anstieg der IL-23-Konzentrationen zu verzeichnen, sodass sich die IL-23-Konzentrationen in den verschiedenen Stimulationsansätzen anglichen. Nach 72-stündiger Ko-Kultur wurde die IL-23-Konzentration ohne IFNα-Stimulation noch weiter erhöht (409 pg/mL). Die IL-23-Konzentrationen in den mit IFNα1, α2 oder α5 stimulierten Gruppen waren hingegen deutlich geringer als nach 48 h und lagen mit max. 81 pg/mL deutlich unter den mit IFNα4, α6, α9 oder α11 stimulierten Gruppen (164 pg/mL-371 pg/mL). Somit ist deutlich zu erkennen, dass die Expression von IL-23 durch die Stimulation mit den IFNα Subtypen IFNα1, α2 oder α5 früher induziert wurde als durch die Stimulation mit den Subtypen IFNα4, α6, α9 oder α11, bzw. ohne Stimulation. Die IL-23-Induktion in den mit IFNα1, α2 oder α5 stimulierten Zellen war allerdings transient, während diese nach Stimulation mit IFNα4, α6, α9 oder α11 über 72 h stetig anstieg.

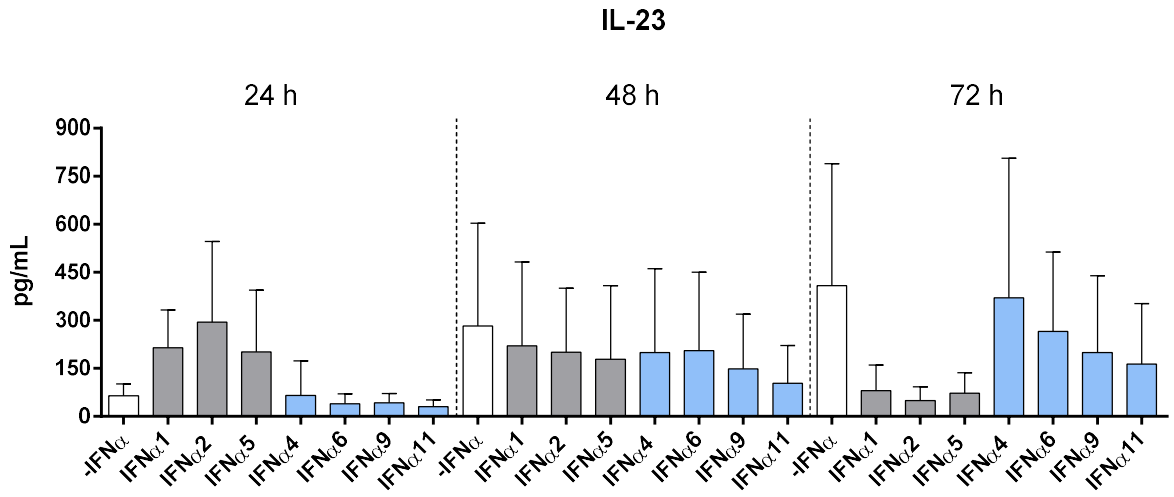


Abbildung 4-16: Kinetische Analyse der IL-23-Konzentration im CD4⁺ T-Zell-Proliferationsassay-Überstand nach Stimulation mit IFNα Subtypen.
CD4⁺ T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von EVa2-Mäusen über Negativselektion isoliert und mit VT gefärbt. 170.000 CD4⁺ T-Zellen wurden mit 20.000 DCs, beladen mit $env_{122-141}$-Peptid, für 24 h, 48 h oder 72 h ko-kultiviert (+/-567 Units/mL IFNα Subtyp). Die IL-23-Konzentration im Überstand der Ko-Kultur wurde mittels ELISA gemessen und ist als Mittelwert und Standardabweichung (SD) aus n=4 Experimenten dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der unbehandelten Gruppe (weiß) und den mit IFNα Subtypen behandelten Gruppen (grau/blau) wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison test* ermittelt.

Im nächsten Schritt wurde die IL-17a-Konzentration im Überstand des CD4⁺ T-Zell-Proliferationsassays zu verschiedenen Zeitpunkten (72 h, 96 h und 120 h) in An- und Abwesenheit der unterschiedlichen IFNα Subtypen analysiert (Abbildung 4-17). Nach

72-stündiger Inkubation war die IL-17a-Konzentration in den mit IFNα1 stimulierten Gruppe 77-fach (130 pg/mL) und der mit IFNα2 stimulierten Gruppen 60-fach (93 pg/mL) und damit signifikant erhöht, verglichen mit der unstimulierten Gruppe. Auch die Stimulation mit IFNα5 erhöhte die IL-17a-Konzentration um den Faktor 21 (36 pg /mL), während die Stimulation mit IFNα4, 6, 9 oder 11 zu keiner Induktion von IL-17a führten. Nach 96-stündiger Inkubation war die IL-17a-Konzentration in der mit IFNα1 stimulierten Gruppe 16-fach (106 pg/mL) und der mit IFNα2 stimulierten Gruppe 14-fach (114 pg/mL) und damit ebenfalls signifikant erhöht. In der mit IFNα5 stimulierten Gruppe war die Konzentration 2,5-fach und damit tendenziell erhöht, verglichen mit der unstimulierten Gruppe. Nach 120-stündiger Inkubation konnte auch eine geringe Erhöhung der IL-17a-Konzentration in den mit IFNα4 (41 pg/mL), IFNα6 (17 pg/mL) oder IFNα9 (18 pg/mL) stimulierten Ko-Kulturen beobachtet werden.

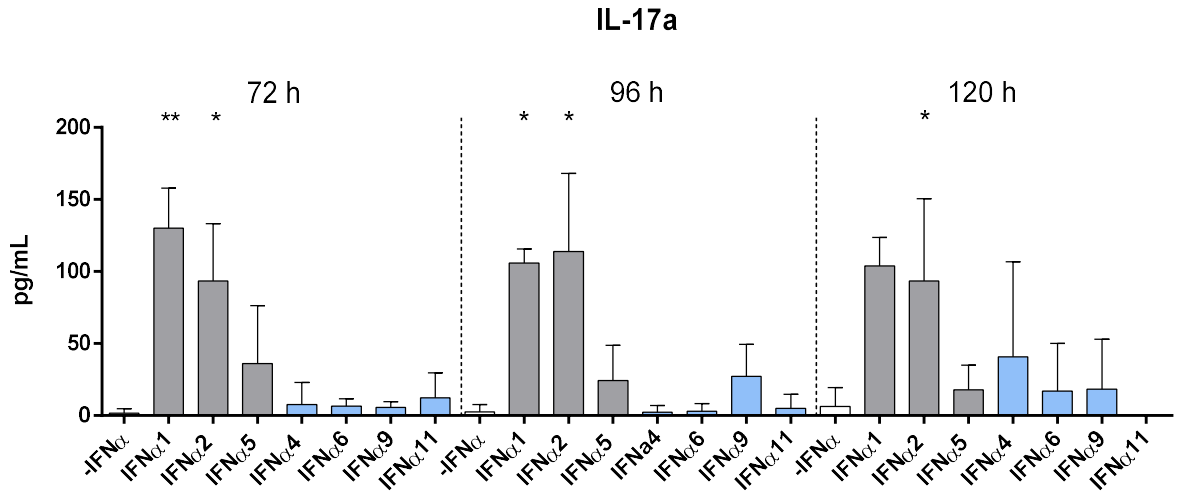


Abbildung 4-17: Kinetische Analyse der IL-17a-Konzentration im CD4⁺ T-Zell-Proliferationsassay-Überstand nach Stimulation mit IFNα Subtypen.
CD4⁺ T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von EVa2-Mäusen über Negativselektion isoliert und mit VT gefärbt. 170.000 CD4⁺ T-Zellen wurden mit 20.000 DCs, beladen mit $env_{122-141}$-Peptid, für 72 h, 96 h oder 120 h (+/-567 Units/mL IFNα Subtyp) ko-kultiviert. Die IL-17a-Konzentration im Überstand der Ko-Kultur wurde mittels ELISA gemessen und ist als Mittelwert und Standardabweichungen (SD) aus n=4 Experimenten dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der unbehandelten Gruppe (weiß) und den mit IFNα Subtypen behandelten Gruppen (grau/blau) wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison test* ermittelt. (* p<0,5 ** p<0,01)

Somit folgte die IL-17a-Expression tendenziell dem Muster der IL-23-Expression mit zeitlicher Verzögerung. Dies führt zu der Annahme, dass der Effekt der IFNα Subtyp-Stimulation auf die IL-17a-Expression der CD4⁺ T-Zellen und deren Differenzierung in

T_H17-Zellen zumindest teilweise über einen direkten Effekt der IFNα-Stimulation auf die IL-23-Expression der DCs vermittelt werden könnte.

Zusammenfassend konnte in dem etablierten *in vitro* FV-spezifischen $CD4^+$ T-Zell-Proliferationsassay gezeigt werden, dass die verschiedenen IFNα Subtypen diverse Effekte auf die Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen hatten, welche direkt mit der Zytokinantwort korrelierten. Dabei hatten die IFNα Subtypen IFNα4, α6, α9 und α11 eine antiproliferative Wirkung auf die $CD4^+$ T-Zellen; IFNα1, α2 und α5 hingegen nicht. Je nachdem ob die IFNα Subtypen zu der antiproliferativen oder der nicht-antiproliferativen Gruppe gehörten, induzierten sie ein bestimmtes Zytokinexpressionsmuster. So erhöhten die Subtypen IFNα4, α6, α9 und α11 die Expression von T_H1-assoziierten Zytokinen, IFNα1, α2 und α5 die Expression T_H17-assoziierter Zytokine.

4.3. Effekt von IFNα Subtypen auf $CD4^+$ T Zellen *in vivo*

4.3.1. IFNα Subtypen zeigen einen antiviralen, aber keinen immunmodulatorischen Effekt auf $CD4^+$ T-Zellen bei einer FV-Infektion

In vorherigen Studien wurde beschrieben, dass die Behandlung FV-infizierter Mäuse mit verschiedenen IFNα Subtypen die Viruslast unterschiedlich stark senkte. Dieser Effekt ist ein Zusammenspiel direkter antiviraler Effekte und immunmodulatorischer Eigenschaften der IFNα Subtypen. So wurde die Reduktion der Viruslast nach der Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen zusätzlich sowohl von NK- als auch $CD8^+$ T-Zellen vermittelt [61, 65]. *In vitro* konnte eine Verbesserung der Zytokinantwort von $CD8^+$ T-Zellen nach IFNα Subtyp-Stimulation gezeigt werden [40]. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit beschriebenen *in vitro* Analyse zeigten, dass die Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen auch die Proliferation und die Zytokinantwort von $CD4^+$ T-Zellen beeinflussen konnte.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die *in vitro* beschriebenen Effekte der IFNα Subtyp-Stimulation auf $CD4^+$ T-Zellen ebenfalls *in vivo* während einer akuten FV-Infektion beobachtet werden können. Dazu wurden, wie in Abbildung 4-18 (A) gezeigt, C57BL/6 Mäuse intravenös mit 20.000 SFFU FV infiziert. Während einer akuten FV-Infektion zeigen die aktivierten $CD4^+$ T-Zellen nach 10 Tagen die stärkste Expansion [119]. Aus diesem Grund wurden die Mäuse 10 Tage nach Infektion für die Analyse getötet. Im Verlauf des Experiments wurden die Tiere ab Tag 5 nach der Infektion

täglich mit 8.000 Units IFNα2, α4 oder α5 behandelt, da sich diese Subtypen in den vorherigen *in vitro* Analysen bereits stark voneinander unterschieden. So hatte IFNα4 einen starken antiproliferativen Effekt auf $CD4^+$ T-Zellen und verstärkte deren Expression von T_H1-assoziierten Zytokinen, während IFNα2 und α5 keinen Einfluss auf die Proliferation hatten, jedoch die Expression T_H17-assoziierter Zytokine verstärkten. Um zu untersuchen, ob die IFNα-Behandlung die Friend-Viruslast beeinflusst, wurde der Anteil infizierter Milzzellen mittels *IC-assay* bestimmt. Die Effekte der IFNα Subtyp-Behandlung auf die Anzahl der $CD4^+$ T-Zellen in Milz und Knochenmark, sowie auf das Zytokinprofil der Zellen wurden durchflusszytometrisch ermittelt.

In Abbildung 4-18 (B) ist die Viruslast in der Milz nach der Behandlung mit den IFNα Subtypen IFNα2, α4 oder α5 gezeigt. Die Applikation von IFNα2 und IFNα5 hatte keinen signifikanten Effekt auf die Viruslast. Die Behandlung mit IFNα4 führte zu einer signifikanten Reduktion um das 3,6-fache.

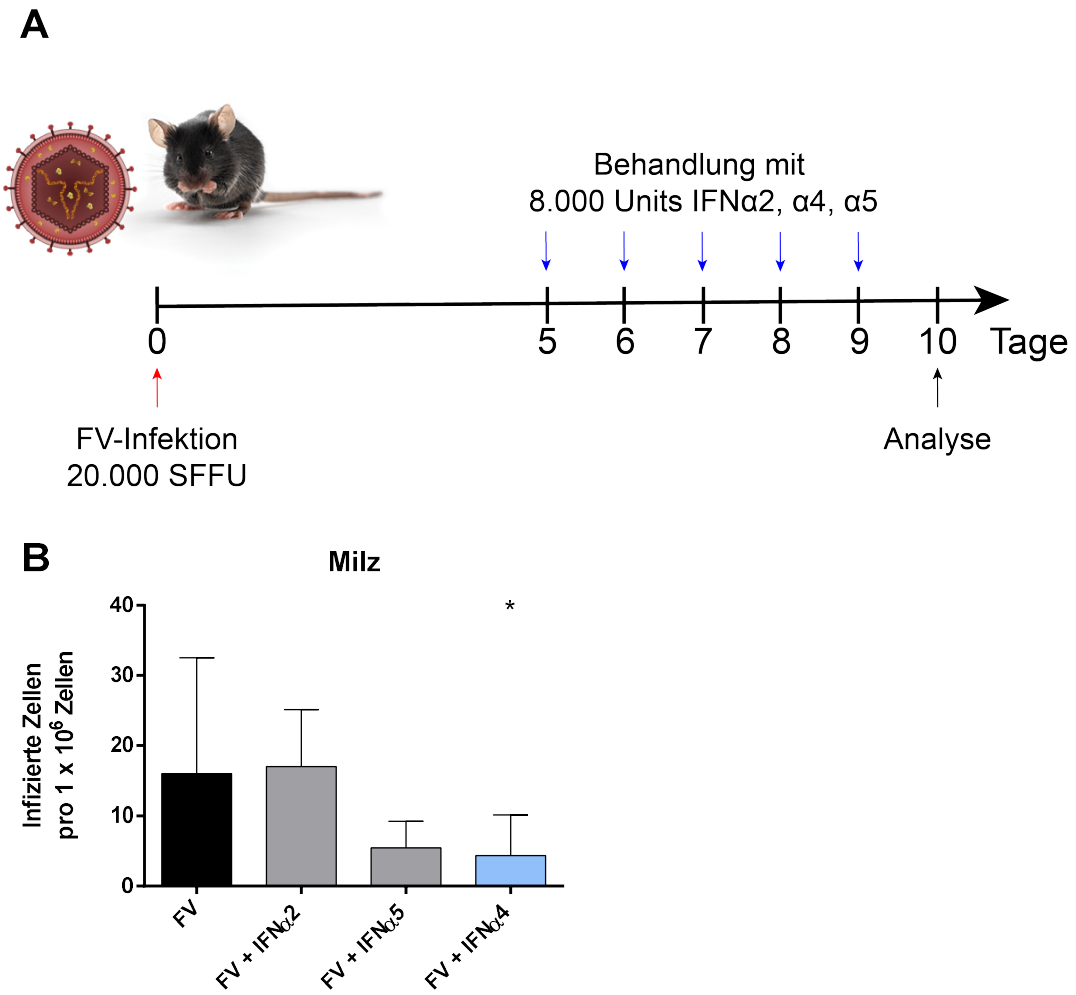


Abbildung 4-18: Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf die Infektion mit FV.
C57BL/6 Mäuse wurden mit 20.000 SFFU FV i.v. infiziert und an den Tagen 5 bis 9 nach Infektion täglich mit 8.000 Units der verschiedenen IFNα Subtypen i.p. behandelt. (A) Schematische Übersicht des Versuchsablaufs. (B) Die Viruslast in der Milz wurde 10 Tage nach der Infektion mittels *IC-assay* bestimmt und ist als Mittelwert und Standardabweichung (SD) aus n=6-11 Mäusen pro Gruppe dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der FV-infizierten, unbehandelten Gruppe (schwarz) und den FV-infizierten, mit IFNα Subtypen behandelten Gruppen (grau/blau), wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison test* ermittelt. (* p<0,5) (Abbildung des FV: Dr. J. A. Ross, Abbildung der Maus: https://www.criver.com/products-services/find-model/c57bl6-mouse?region=23)

Als nächstes wurde der Einfluss der IFNα Subtyp-Behandlung auf die Anzahl der $CD4^+$ T-Zellen in der Milz und im Knochenmark untersucht. In der Milz wurde bereits in den naiven Mäusen eine vergleichsweise hohe Anzahl $CD4^+$ T-Zellen gemessen (Abbildung 4-19 (A)). Die FV-Infektion führte hier zu keiner erhöhten von Anzahl $CD4^+$ T-Zellen. Sowohl in der Milz, als auch im Knochenmark konnte die Behandlung mit den IFNα Subtypen die Anzahl der $CD4^+$ T-Zellen während der FV-Infektion reduzieren. In der Milz sank die Zahl der $CD4^+$ T-Zellen signifikant von 8722 (FV) auf 5096 $CD4^+$ T-Zellen pro 10^6 Zellen nach IFNα2-Stimulation. Die Behandlung mit IFNα4 oder α5 reduzierte die Anzahl der $CD4^+$ T-Zellen nur minimal. Im Knochenmark wurde die

Anzahl der CD4⁺ T-Zellen durch die FV-Infektion signifikant um mehr als das 4-fache erhöht (Abbildung 4-19 (B)). Die Behandlung mit IFNα2 reduzierte die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen, verglichen mit der unbehandelten Gruppe (1135 pro 10^6 Zellen), um das 3,5-fache. Auch IFNα4 (481 pro 10^6 Zellen) und IFNα5 (641 pro 10^6 Zellen) reduzierten die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen tendenziell.

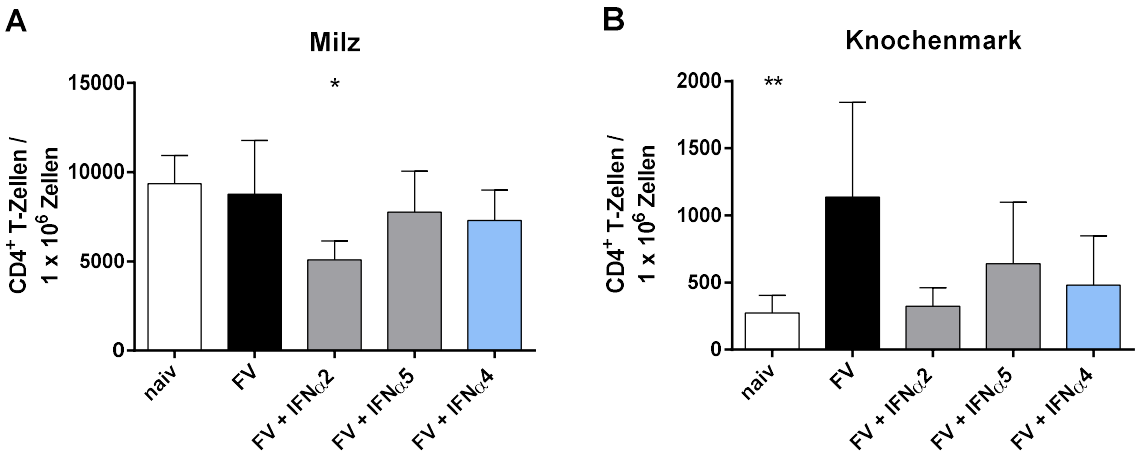


Abbildung 4-19: Analyse der Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf die Anzahl von CD4⁺ T-Zellen während einer akuten FV-Infektion.
C57BL/6 Mäuse wurden mit 20.000 SFFU FV i.v. infiziert und an den Tagen 5 bis 9 nach Infektion täglich mit 8.000 Units der verschiedenen IFNα Subtypen i.p. behandelt. Die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen (A) in der Milz (n=6-11) und (B) im Knochenmark (n=3-8) wurde 10 Tage nach der Infektion bestimmt und ist als Mittelwert und Standardabweichung (SD) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der FV-infizierten, unbehandelten Gruppe (schwarz) und den anderen Gruppen (FV-infiziert, mit IFNα Subtypen behandelt (grau/blau) und naiv (weiß)) wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison test* ermittelt. (* p<0,5 ** p<0,01)

Um zu untersuchen, ob die IFNα-Subtyp-Behandlung *in vivo* einen Effekt auf die Effektorfunktion der CD4⁺ T-Zellen hat, wurden der Anteil der IFNγ⁺ und der IL-17a⁺ CD4⁺ Zellen sowie die IFNγ- und die IL-17a-Expression (MFI) durchflusszytometrisch gemessen. Ein Effekt auf das Expressionsmuster dieser T_H1- bzw. T_H17-Schlüsselzytokine konnte *in vitro* beobachtet werden.

In der Milz konnte während der FV-Infektion kein Effekt der Behandlung mit den IFNα Subtypen IFNα2, α4 oder α5 auf den prozentualen Anteil der IFNγ⁺ oder IL-17a⁺ CD4⁺ T-Zellen oder die Expression dieser Zytokine (MFI) beobachtet werden (Abbildung 4-20 (A-D)). Im Knochenmark erhöhte die FV-Infektion den Anteil der IFNγ-produzierenden CD4⁺ T-Zellen signifikant (naiv: 3 %; FV: 17 %), allerdings zeigte die Behandlung mit den IFNα Subtypen auch dort keinen zusätzlichen Effekt auf den Anteil

der IFNγ⁺ oder IL-17a⁺ CD4⁺ T-Zellen oder die Expression dieser Zytokine (MFI) (Abbildung 4-20 (E-H)).

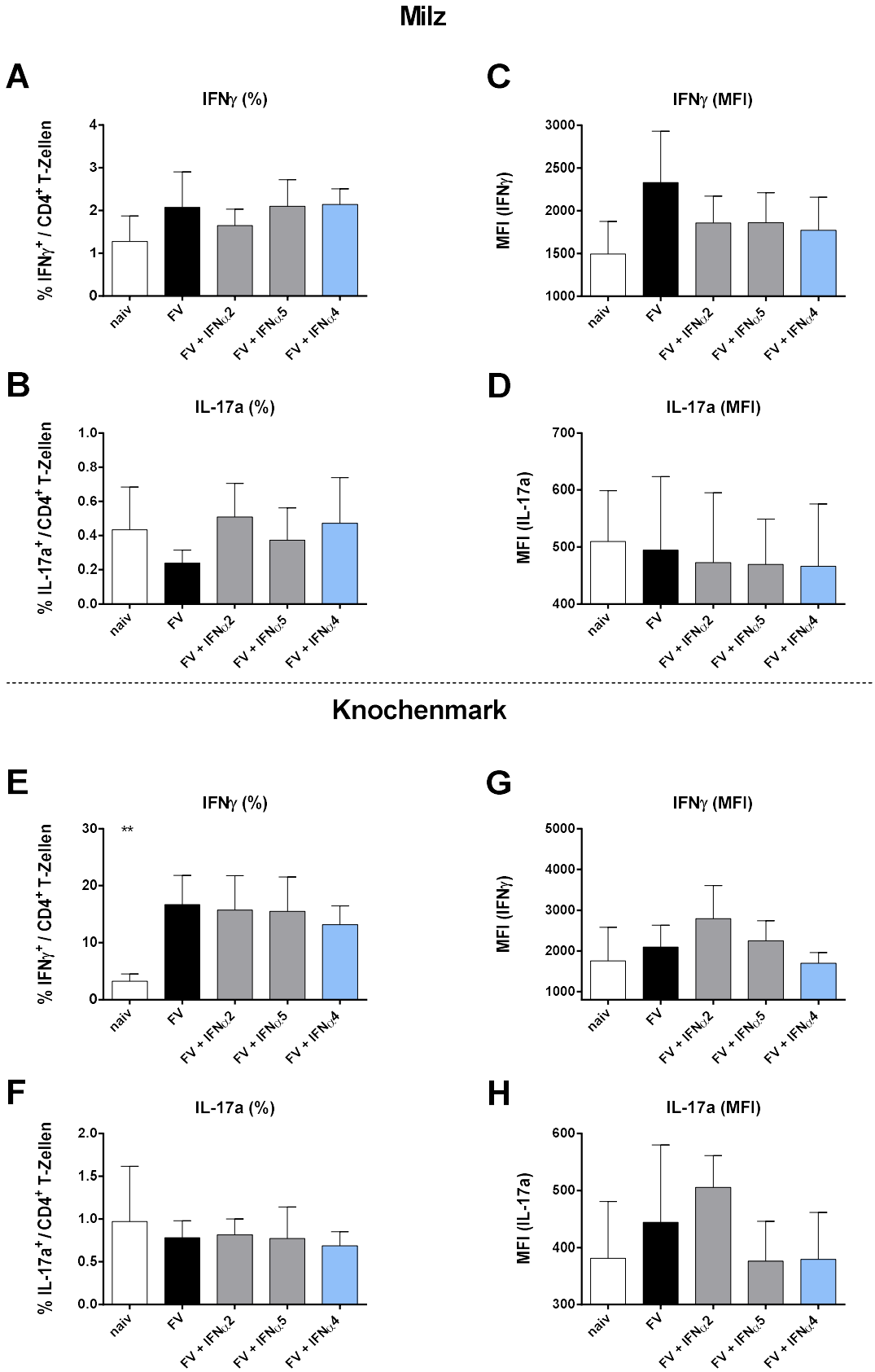


Abbildung 4-20: Analyse der Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf die Zytokinantwort von CD4⁺ T-Zellen in der Milz und im Knochenmark während einer akuten FV-Infektion.
C57BL/6 Mäuse wurden mit 20.000 SFFU FV i.v. infiziert und an den Tagen 5 bis 9 nach Infektion täglich mit 8.000 Units der verschiedenen IFNα Subtypen i.p. behandelt. Die prozentualen Anteile IFNγ- (A, E) bzw. IL-17a- (B, F) exprimierender Zellen und die Expression von IFNγ (C, G) bzw. IL-17a (D, H) in der Milz (n=6-11) und (B) im Knochenmark (n=3-8), quantifiziert durch den MFI, wurden 10 Tage nach der Infektion bestimmt und sind als Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der FV-infizierten, unbehandelten Gruppe (schwarz) und den anderen Gruppen (FV-infiziert, mit IFNα Subtypen behandelt (grau/blau) und naiv (weiß)) wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison Test* ermittelt. (** p<0,01)

Die Analyse der CD4⁺ T-Zell-Zytokinantwort während einer akuten FV-Infektion zeigt, dass die Behandlung mit den IFNα Subtypen IFNα2, α4 oder α5 keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl IFNγ- oder IL-17a-produzierender CD4⁺ T-Zellen hat. Auch die quantitative Zytokinexpression wurde nicht durch die IFNα-Stimulation beeinflusst. Eine Expansion IL-17a-exprimierender CD4⁺ T-Zellen, also T_H17-Zellen, nach der Stimulation mit IFNα2 oder α5 konnte nicht beobachtet werden. Ein Effekt der IFNα Subtypen, welche *in vitro* möglicherweise die Differenzierung von T_H17-Zellen beeinflussen konnten, wurde also *in vivo* nicht gezeigt.
Zusammenfassend zeigt die Analyse der IFNα Subtyp-Behandlung *in vivo*, dass die Stimulation mit IFNα4, nicht aber mit α2 oder α5 die Viruslast signifikant senken konnte. Dieser Effekt korrelierte nicht mit der Anzahl der CD4⁺ T-Zellen, welche durch die IFNα-Stimulation generell reduziert wurde. Einen deutlichen Effekt auf die Zytokinantwort und die mögliche Differenzierung von T_H17-Zellen, wie er *in vitro* beobachtet wurde, hatte die Behandlung von FV-infizierten Mäusen mit IFNα2, α4 oder α5 nicht.

4.3.2. IFNα Subtypen zeigen keinen immunmodulatorischen Effekt auf CD4⁺ T-Zellen bei einer *Citrobacter rodentium*-Infektion

Da die Behandlung der FV-infizierten Mäuse mit verschiedenen IFNα Subtypen keinen Effekt auf die Zytokinexpression von CD4⁺ T-Zellen zeigte, konnte die *in vitro* beobachtete Veränderung des Zytokinexpressionsmusters im FV-Mausmodell *in vivo* nicht bestätigt werden. Daher sollte der Einfluss der IFNα Subtypen auf die Differenzierung und die Zytokinantwort von CD4⁺ T-Zellen während der *C. rodentium*-Infektion untersucht werden, da in diesem Infektionsmodell insbesondere T_H17-Zellen von entscheidender Bedeutung sind [26].
Um zu untersuchen, inwiefern die Behandlung mit verschiedenen IFNα Subtypen die Pathologie der Infektion und die CD4⁺ T-Zell-Antwort beeinflussen, wurden C57BL/6

Mäuse mit *C. rodentium* infiziert und ab Tag 3 mit 8.000 Units IFNα2 oder α4 behandelt. Da die bakterielle Besiedelung des Colon nach 10 Tagen am stärksten ist [190], wurden die Mäuse nach 10-tägiger Infektion getötet und analysiert. In Abbildung 4-21 (A) ist eine Übersicht des Versuchsablaufs gezeigt.

Um zu untersuchen, ob die IFNα-Behandlung die Bakterienlast beeinflusst, wurde diese während der Behandlung im Kot bestimmt (Abbildung 4-21 (B)). Allgemein stieg die Bakterienlast im Kot bis zum 5. Tag nach der Infektion in allen Gruppen deutlich an. Nachdem nach Tag 7 allgemein ein leichter Rückgang der Bakterienlast beobachtet wurde, stieg diese an Tag 10 schließlich wieder an. Die stärksten Unterschiede zwischen den Gruppen waren an Tag 3 zu beobachten, allerdings wurde der Kot an diesem Tag vor dem Start der ersten IFNα-Behandlung analysiert. Daher wurde die Veränderung der Bakterienlast an den Tagen 5, 7 und 10 relativ zu Tag 3 mit und ohne IFNα Subtyp-Behandlung analysiert (Abbildung 4-21 (C)), um den Einfluss der IFNα Subtypen zu untersuchen. Diese Daten zeigen, dass die Bakterienlast in den mit IFNα4 oder IFNα2 behandelten Gruppen im Vergleich zu den unbehandelten Tieren geringer war und im Falle von IFNα4 war diese Reduktion auch signifikant (Tag 7).

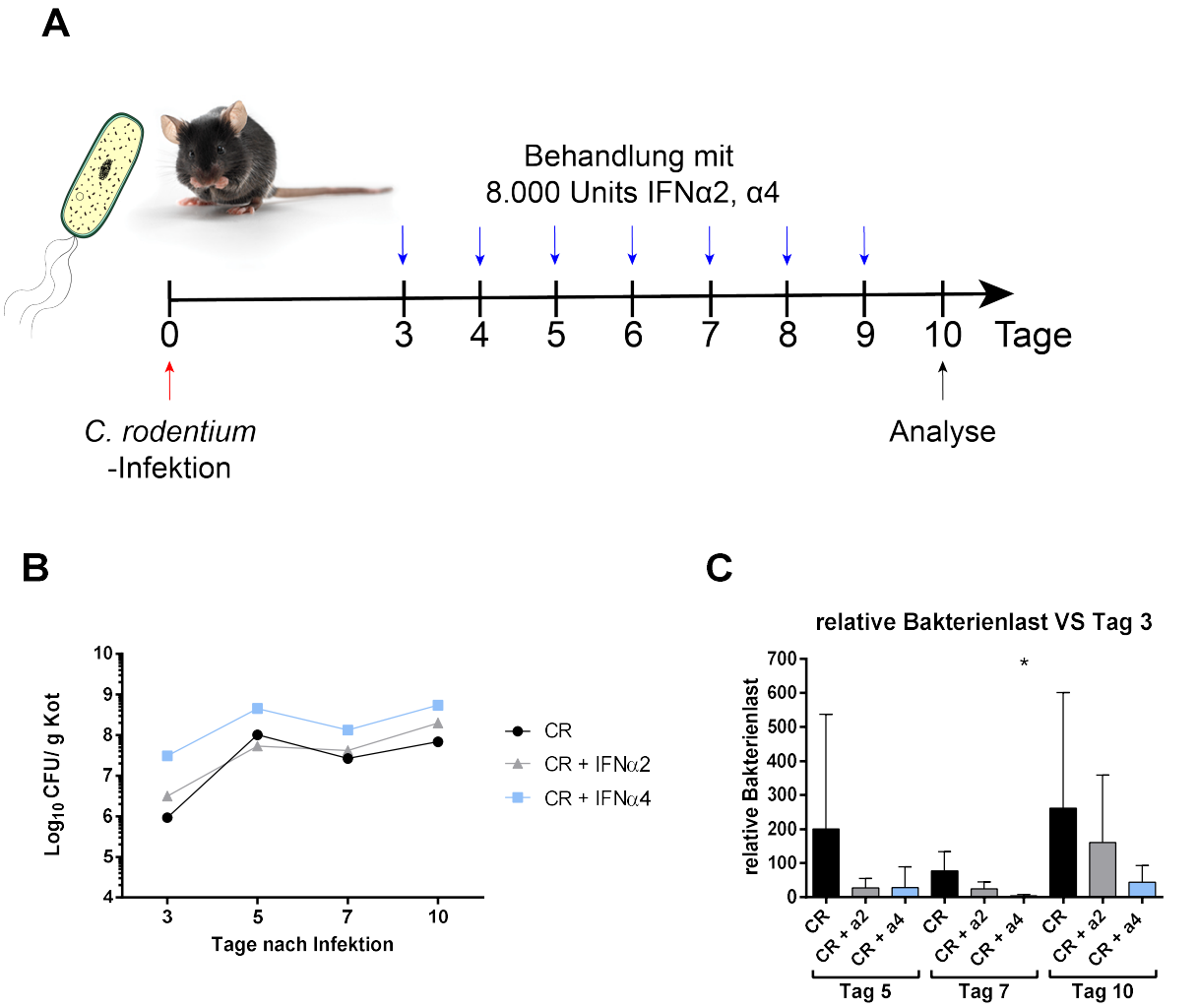


Abbildung 4-21: Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf die Infektion mit *C. rodentium*. C57BL/6 Mäuse wurden mit *C. rodentium* infiziert und an den Tagen 3 bis 9 nach Infektion täglich mit 8.000 Units der verschiedenen IFNα Subtypen i.p. behandelt. (A) Schematische Übersicht des Versuchsablaufs. (B) Die Bakterienlast im Kot wurde den Tagen 3, 5, 7 und 10 und (C) die Bakterienlast im Kot relativ zur Bakterienlast an Tag 3 (vor Beginn der IFNα-Behandlung) wurde an den Tagen 5, 7 und 10 nach der Infektion bestimmt und sind als Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus n=5-6 Mäusen pro Gruppe dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der infizierten, unbehandelten Gruppe (schwarz) und den infizierten, mit IFNα Subtypen behandelten Gruppen (grau/blau) wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison test* ermittelt. (* p<0,5) (Abbildung der Maus: https://www.criver.com/products-services/find-model/c57bl6-mouse?region=23) (IFNα5 wurde aus der Abbildung (A) entfernt, da es nicht verwendet wurde.)

Des Weiteren wurden untersucht, ob die Behandlung mit den IFNα Subtypen einen Effekt auf die Pathologie der Infektion hat. Dazu wurden das Körpergewicht, die Colonlänge, das Gewicht des Colons und das Milzgewicht bestimmt, sowie histologische Befundungen des Colons durchgeführt. In Abbildung 4-22 (A) ist das Körpergewicht der Mäuse im zeitlichen Verlauf gezeigt. Allgemein sank während der gesamten Zeit der Infektion in keinem Fall das Körpergewicht unter durchschnittlich 96 % des Ausgangs-Körpergewichts, also konnte weder ein Effekt der *C. rodentium*-

Infektion, noch der IFNα-Behandlung auf das Körpergewicht beobachtet werden. In Abbildung 4-22 (B) ist die durchschnittliche Länge des Colons nach zehntägiger Infektion gezeigt. Eine Verkürzung des Colons und eine Zunahme des Colongewichts sind phänotypische Merkmale einer *C. rodentium*-Infektion. Dabei wurde der Colon von durchschnittlich 89 mm in der naiven Gruppe durch die Infektion mit *C. rodentium* auf 82 mm verkürzt. Die Behandlung der infizierten Mäuse mit IFNα2 und IFNα4 hatte keinen Effekt auf die Colonlänge. Das Gewicht des Colons wurde durch die *C. rodentium*-Infektion um ca. 1/5 erhöht. Die Behandlung mit den IFNα Subtypen hatte keinen Effekt auf das Colongewicht (Abbildung 4-22 (C)). In Abbildung 4-22 (D) ist das Milzgewicht nach zehntägiger *C. rodentium*-Infektion gezeigt. Dabei führte die Infektion zu einer Erhöhung des Milzgewichts von durchschnittlich 55 mg (naiv) auf 81 mg. Die Behandlung mit IFNα2 erhöhte das Milzgewicht der infizierten Mäuse deutlich (143 mg), durch die Behandlung mit IFNα4 wurde es im Vergleich zur infizierten, unbehandelten Gruppe sogar mehr als verdoppelt (171 mg). Abbildung 4-22 (E) zeigt eine histologische Befundung des Colons nach zehntägiger *C. rodentium*-Infektion und Behandlung mit IFNα Subtypen. Dabei sind keine starken Unterschiede zwischen der infizierten, unbehandelten Gruppe und den mit IFNα behandelten Gruppen zu erkennen, allerdings reduzierte die Behandlung mit IFNα4 die Gesamtpathologie des Colon leicht. Es konnte gezeigt werden, dass die IFNα-Behandlung während einer *C. rodentium*-Infektion keinen Effekt auf die Länge oder das Gewicht des Colons hat, jedoch insbesondere die Behandlung mit IFNα4 zu einer deutlichen Vergrößerung der Milzen und einer leicht abgeschwächten Pathologie führte.

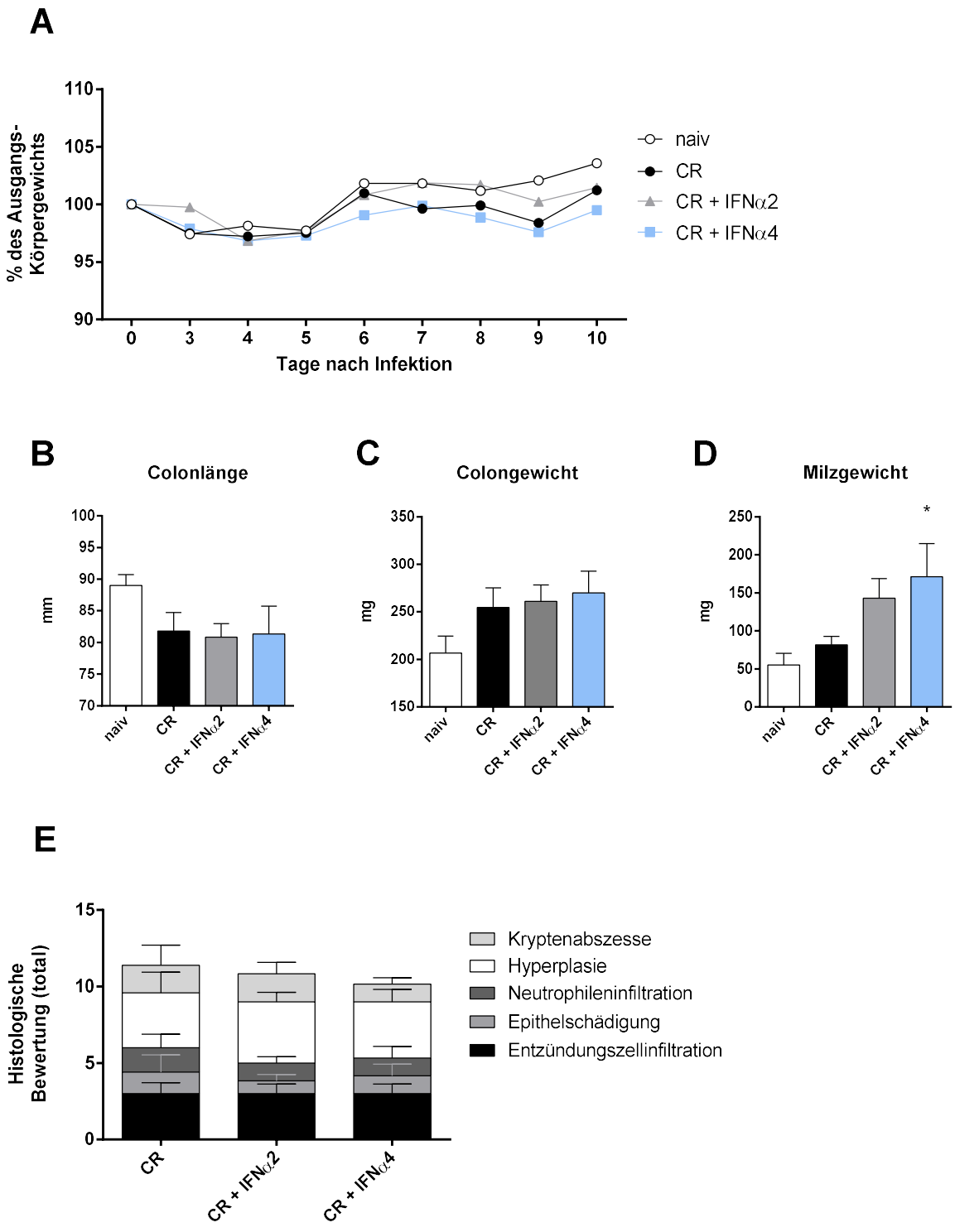


Abbildung 4-22: Phänotypische und histologische Untersuchung der Mäuse nach zehntägiger *C. rodentium* Infektion.
C57BL/6 Mäuse wurden mit *C. rodentium* infiziert und an den Tagen 3 bis 9 nach Infektion täglich mit 8.000 Units der verschiedenen IFNα Subtypen i.p. behandelt. (A) Verlauf des Körpergewichts ab Tag 3 nach der *C. rodentium*-Infektion im Vergleich zum Ausgangsgewicht vor der Infektion. Gezeigt sind die Mittelwerte aus n=3-6 Mäusen pro Gruppe. (B) Die Colonlänge, (C) das Colongewicht, (D) das Milzgewicht und (E) die Pathologie des Colon wurden 10 Tage nach der Infektion bestimmt und sind als Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus n=3-6 Mäusen pro Gruppe dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der *C. rodentium*-infizierten, unbehandelten Gruppe (schwarz) und den anderen Gruppen (CR-infiziert, mit IFNα Subtypen behandelt (grau/blau) naiv (weiß)) wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison Test* ermittelt. (* p<0,05)

Im Folgenden wurde die $CD4^+$ T-Zell-Antwort nach der Infektion und der IFNα-Behandlung analysiert. Dazu wurden die Anzahl der $CD4^+$ T-Zellen und der Anteil Zytokin-exprimierender $CD4^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert. Da in den *in vitro* Experimenten ein möglicher Effekt von IFNα2 auf die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_H17-Zellen beobachtet werden konnte, wurde in diesem Experiment der Anteil der IL-$17a^+$ Zellen bestimmt. T_H17-Zellen sind während einer *C. rodentium*-Infektion die wichtigsten Effektorzellen für die Eliminierung der Infektion [26]. Außerdem wurde der Anteil $IFN\gamma^+$ $CD4^+$ T-Zellen bestimmt, da auch T_H1-Zellen eine wichtige Rolle während der Infektion spielen [26].

Nach zehntägiger Infektion mit *C. rodentium* konnte mit 122.000 $CD4^+$ T-Zellen pro 10^6 Zellen keine Veränderung im Vergleich zur naiven Gruppe festgestellt werden. Die Behandlung mit IFNα2 verringerte die Anzahl tendenziell (81.911 $CD4^+$ T-Zellen pro 10^6 Zellen), die Behandlung mit IFNα4 signifikant auf 73.000 $CD4^+$ T-Zellen pro 10^6 Zellen (Abbildung 4-23 (A)). Der Anteil $IFN\gamma^+$ $CD4^+$ T-Zellen wurde durch die Infektion kaum erhöht (naiv: 0,6 % CR: 0,8 %), die Behandlung mit IFNα2 oder α4 (ca. 1,4 %) führte zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg des Anteils der $IFN\gamma^+$ $CD4^+$ Zellen, wobei zwischen den Subtypen kein Unterschied beobachtet werden konnte (Abbildung 4-23 (B)). Auch die IFNγ-Expression pro Zelle (MFI) zeigte keine signifikante Veränderung nach IFN-Behandlung (Abbildung 4-23 (D)). Die *C. rodentium*-Infektion erhöhte den Anteil der IL-$17a^+$ $CD4^+$ T-Zellen signifikant, verglichen mit der naiven Gruppe (naiv: 0,1 % CR: 0,6 %). Die Behandlung mit IFNα2 und IFNα4 hatte allerdings keinen Effekt auf den Anteil der IL-$17a^+$ $CD4^+$ T-Zellen (Abbildung 4-23 (C)). Auch die Expression von IL-17a pro Zelle wurde durch die IFNα-Behandlung nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 4-23 (E)). Die durchflusszytometrische Analyse der Zytokinantwort in der Milz während der *C. rodentium*-Infektion zeigte, dass die IFNα Behandlung die T_H17-Antwort nicht verstärkte, jedoch einen leichten Effekt auf die IFNγ-Antwort hatte. Dieser Effekt war jedoch nicht abhängig vom verwendeten IFNα Subtyp.

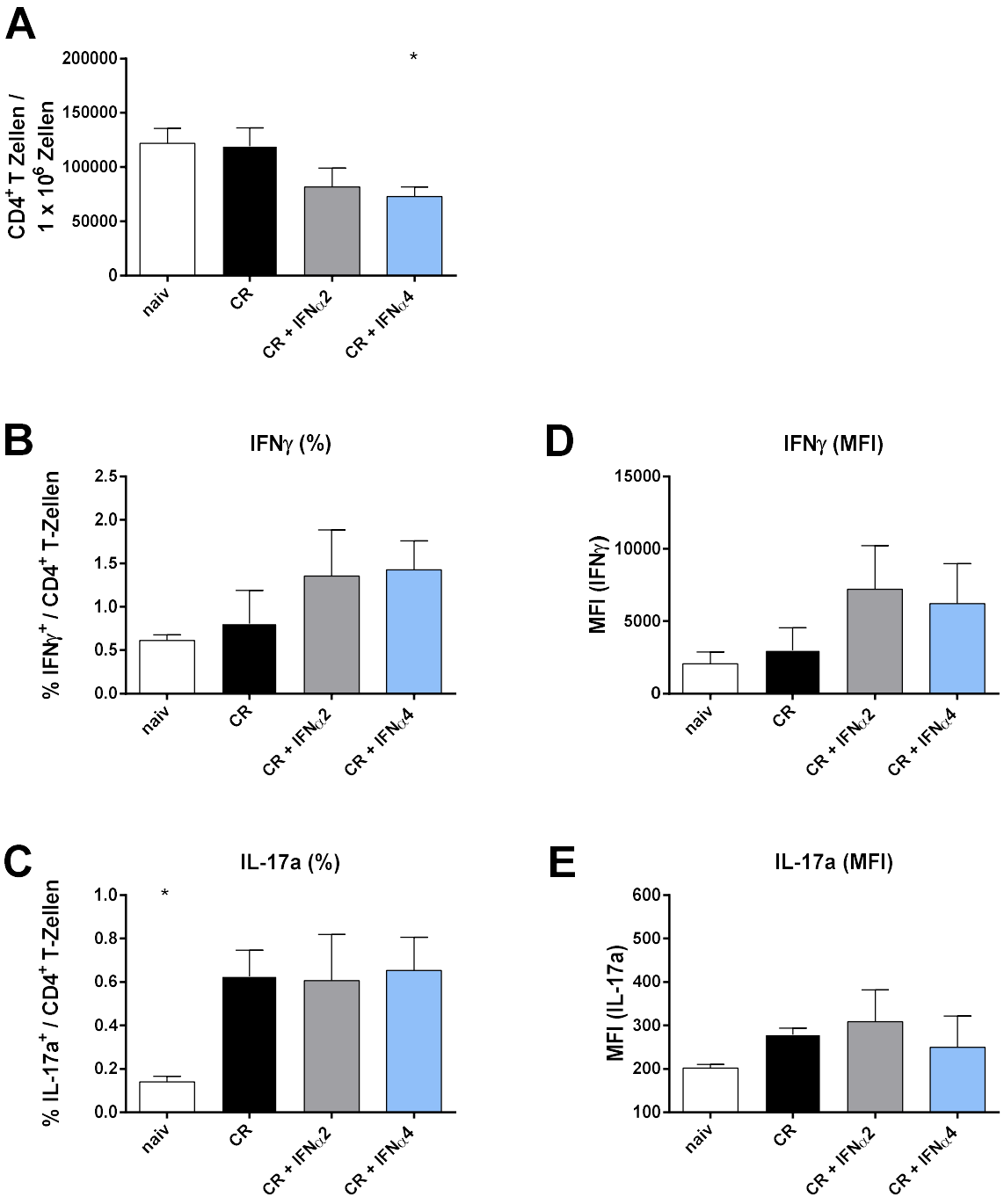


Abbildung 4-23: Analyse der Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf die Anzahl und die Zytokinantwort von CD4⁺ T-Zellen in der Milz während einer *C. rodentium*-Infektion.
C57BL/6 Mäuse wurden mit *C. rodentium* infiziert und an den Tagen 3 bis 9 nach Infektion täglich mit 8.000 Units der verschiedenen IFNα Subtypen i.p. behandelt. (A) Die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen und (B) der IFNγ- bzw. (C) IL-17a-exprimierenden Zellen sowie die Expression von (D) IFNγ bzw. (E) IL-17a, quantifiziert durch den MFI, wurden 10 Tage nach der Infektion in der Milz bestimmt und sind als Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus n=3-6 Mäusen pro Gruppe dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der *C. rodentium*-infizierten, unbehandelten Gruppe (schwarz) und den anderen Gruppen (CR-infiziert, mit IFNα Subtypen behandelt (grau/blau) naiv (weiß)) wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison Test* ermittelt. (* p<0,05)

Im Folgenden wurde die IL-17a-Konzentration im Colon mittels ELISA bestimmt. Abbildung 4-24 zeigt die Konzentrationen von IL-17a im Überstand der Colonbiopsie

von mit *C. rodentium* infizierten und mit IFN behandelten Mäusen nach 10 Tagen. In der mit IFNα4 behandelten Gruppe wurde die IL-17a-Konzentration signifikant reduziert, verglichen mit der infizierten, unbehandelten Gruppe. Die Behandlung mit IFNα2 reduzierte die IL-17a-Konzentration tendenziell.

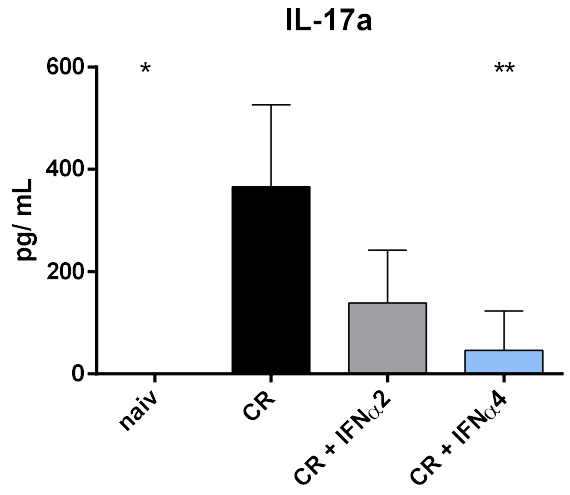


Abbildung 4-24: Analyse der Zytokinkonzentration nach der Behandlung mit verschiedenen IFNα Subtypen während einer *C. rodentium*-Infektion.
C57BL/6 Mäuse wurden mit *C. rodentium* infiziert und an den Tagen 3 bis 9 nach Infektion täglich mit 8.000 Units der verschiedenen IFNα Subtypen i.p. behandelt. Die IL-17a-Konzentration wurde im Überstand einer Colonbiopsie mittels ELISA gemessen und ist als Mittelwert und Standardabweichung (SD) n=3-6 Mäusen pro Gruppe dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der *C. rodentium*-infizierten, unbehandelten Gruppe (schwarz) und den anderen Gruppen (CR-infiziert, mit IFNα Subtypen behandelt (grau/blau) naiv (weiß)) wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und den *Dunn´s multiple comparison Test* ermittelt. (* $p<0,05$ ** $p<0,01$)

Wie auch bei der IFNα-Behandlung einer FV-Infektion, konnte bei einer *C. rodentium*-Infektion kein Zusammenhang zwischen der Behandlung mit verschiedenen IFNα-Subtypen und einer verbesserten T_H17-Antwort beobachtet werden. Allerdings führte die Behandlung mit IFNα4 zu einer leichten Verringerung der Bakterienlast im Kot und einer vergrößerten Milz, was mit einer leicht geringeren Ausprägung der Colonpathologie einherging.

5. Diskussion

Eine der ersten Reaktionen des Immunsystems auf eingedrungene Pathogene, insbesondere Viren, ist die Ausschüttung von Typ I IFN. Typ I IFN versetzen infizierte Zellen und deren benachbarte Zellen in einen antiviralen Zustand, in dem hunderte ISGs exprimiert werden. Deren translatierte Produkte besitzen antivirale, immunmodulatorische und antiproliferative Eigenschaften, welche die Virusreplikation direkt oder indirekt inhibieren und zur antiviralen Immunität beitragen. Zu den Typ I IFN zählt auch IFNα, von welchem, je nach Spezies, mehrere Subtypen unterschieden werden. Im Menschen gibt es 12 und in der Maus 14 unterschiedliche IFNα Subtypen. Obwohl all diese Subtypen, wie auch das ebenfalls zu den Typ I IFN gehörende IFNβ, an den gleichen Rezeptor binden, ist ihre biologische Funktion divers und nicht redundant. Dennoch ist die Relevanz der unterschiedlichen IFNα Subtypen, besonders für das adaptive Immunsystem, nicht hinreichend erforscht.

Es ist bekannt, dass Typ I IFN antiproliferativ wirken können. Allerdings kann es auch das Zellwachstum stimulieren und als drittes Signal bei der Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen fungieren [32]. So beeinflussen Typ I IFN die Proliferation und die Zytokinexpression von T-Zellen [29], jedoch ist ihre Rolle bei der Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in verschiedene T-Helfer-Subpopulationen kontrovers diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt verschiedener IFNα Subtypen auf die Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen in einem FV-spezifischen Proliferationsassay *in vitro* untersucht. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Stimulation von $CD4^+$ T-Zellen mit unterschiedlichen IFNα Subtypen einen Effekt auf die Expression von Zytokinen hat, welche mit verschiedenen T-Helferzell-Subpopulationen assoziiert werden. Der Einfluss von Typ I IFN auf die $CD4^+$ T-Zell-Proliferation, sowie ihre kontroverse Rolle bei der $CD4^+$ T-Zell-Differenzierung werden meist mit Zelltyp-spezifischen, zeitlichen und räumlichen Unterschieden, Unterschieden zwischen verschiedenen Infektionsmodellen sowie akuten und chronischen Infektionen erklärt [99]. Subtyp-spezifische Effekte auf die Proliferation und die Differenzierung von $CD4^+$ T-Zellen wurden bisher wenig untersucht. Möglicherweise könnten aber Erkenntnisse über die unterschiedlichen Effekte der verschiedenen IFNα Subtypen auf die Funktion der $CD4^+$ T-Zellen dabei helfen, Immuntherapien mit Typ I IFN für spezifische Infektionen zu entwickeln und deren klinische Wirkungen deutlich effizienter zu machen.

5.1. Der antiproliferative Effekt von IFNα Subtypen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt sieben verschiedener IFNα Subtypen auf die Proliferation muriner FV-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen untersucht (Abbildung 4-5 (A)). Dabei wurde beobachtet, dass sich diese Subtypen in zwei Gruppen unterteilen lassen. Eine der Gruppen, die IFNα Subtypen α4, α6, α9 und α11, wirkte antiproliferativ auf die $CD4^+$ T-Zellen, die Subtypen α1, α2 und α5 hingegen nicht. In einer Studie, in der der antiproliferative Effekt verschiedener muriner IFNα Subtypen auf FV-spezifische $CD8^+$ T-Zellen untersucht wurde, konnten Dickow *et al*. zeigen, dass dieselben Subtypen, welche auch in der vorliegenden Arbeit zur Stimulation verwendet wurden, ein unterschiedliches antiproliferatives Potenzial auf $CD8^+$ T-Zellen besaßen. Dabei wirkten ebenfalls die Subtypen IFNα4, α6, α9 und α11 stärker antiproliferativ. Die Subtypen IFNα1, α2 und α5 inhibierten die $CD8^+$ T-Zell-Proliferation allerdings auch deutlich stärker als es in der vorliegenden Arbeit bei $CD4^+$ T-Zellen der Fall war [40].

Typ I IFN sind in der Lage die Proliferation verschiedener Zellen zu inhibieren, indem sie Cyclin-abhängige Kinasen hemmen und so die Zellteilung, meistens in der G1-Phase, blockieren [11]. So wurde beschrieben, dass humanes IFNα2 die Proliferation der neuroendokrinen Tumorzelllinien BON und QGP1 hemmte [39]. Auch die Proliferation von sowohl hepatobiliären Zellen aus HCV-infizierten Patienten, als auch der Leberzelllinien PIL (*P53-immortalized-liver*)-2 und PIL-4 wurde durch die Stimulation mit dem klinisch zugelassenen IFNα Subtyp Peg-IFNα2 inhibiert [107]. Eine Studie, in der humane Zelllinien mit verschiedenen humanen IFNα Subtypen stimuliert wurden, zeigte ein unterschiedliches antiproliferatives Potenzial der Subtypen auf verschiedene Zelllinien. Dabei waren z.B. DAUDI-Zellen (B-Lymphoblasten-Zelllinie) sensitiver für den antiproliferativen Effekt der IFNα-Stimulation als SK-H-NA-Zellen (Hepatom-Zelllinie). Allerdings wurde beobachtet, dass auch der antiproliferative Effekt der Subtypen innerhalb der Zelllinien variierte. So besaßen die Subtypen IFNα8, α10 und α21 ein stärkeres antiproliferatives Potenzial als der Subtyp IFNα2 und universelle IFNα Hybriden [54]. Somit ist der antiproliferative Effekt von Typ I IFN sowohl vom stimulierten Zelltyp abhängig [54, 161], als auch von den verschiedenen Subtypen [54]. Obwohl bekannt ist, dass Typ I IFN antiproliferativ wirken können, wurde gezeigt, dass die Stimulation mit Typ I IFN ebenfalls zur Expansion von $CD8^+$ T-Zellen führen kann, indem es als drittes Signal für deren Aktivierung fungiert [32]. Dieser Effekt ist allerdings abhängig davon, ob die IFN-Stimulation der Stimulation des TCR vorausgeht oder folgt. Bereits über den TCR

aktivierte T-Zellen sind für die Stimulation mit Typ I IFN demnach weniger sensitiv als Zellen, die bereits vor der Aktivierung mit Typ I IFN stimuliert wurden [29]. Durch die Stimulation mit Typ I IFN wird der Eintritt der naiven T-Zellen in die Zellteilung verzögert. So konnte für humane $CD4^+$ T-Zellen gezeigt werden, dass IFNα vor allem auf naive $CD4^+$ T-Zellen antiproliferativ wirkt, nicht aber auf aktivierte [44]. Der antiproliferative Effekt von Typ I IFN wird über die Aktivierung von STAT-1 und STAT-2 vermittelt [20, 70]. Gil *et al.* konnten beobachten, dass die STAT-1-Expression, verglichen mit anderen STATs, in aktivierten $CD8^+$ T-Zellen herunterreguliert wurde [67]. In aktivierten $CD8^+$ T-Zellen erfolgte stattdessen die Induktion anderer STAT-Signalwege. Bei $CD8^+$ T-Zellen aus LCMV-infizierten Mäusen (LCMV Armstrong, Klon E350) wurde z.B. eine erhöhte STAT-4- und verringerte STAT-1-Expression beobachtet. So wurde durch die exogene Stimulation mit IFNα3 vermehrt STAT-4 phosphoryliert, was zu einer verstärkten Zellproliferation *ex vivo* führte [68]. Tanabe *et al*. konnten zeigen, dass in STAT-1-defizienten $CD4^+$ T-Zellen die Stimulation mit IFNβ STAT-3- und STAT-5-abhängige Signalwege induzierte und dadurch einen pro-proliferativen Effekt auf die Zellen hatte, während in WT Mäusen STAT-1 aktiviert und die Proliferation durch die IFNβ Stimulation inhibiert wurde [185].

Auch sind die verschiedenen IFNα Subtypen in der Lage unterschiedliche Signalwege zu induzieren. Cull *et al*. zeigten, dass die Stimulation von murinen J2E-Zellen mit sieben murinen Typ I IFN Subtypen deren Proliferation unterschiedlich stark inhibierte. Dabei wurde beobachtet, dass die unterschiedlichen STAT-Moleküle subtyp- und konzentrationsabhängig phosphoryliert wurden. So induzierten beispielsweise die Subtypen IFNα1, α2, α4 und α5 eine Tyrosin-Phosphorylierung von STAT-1 bei einer vergleichsweise niedrigen Konzentration; die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT-3 erfolgte bei dieser Konzentration durch die Stimulation mit IFNα1 und nur teilweise durch IFNα2, α4, α5 und IFNβ [31]. Im humanen System wurde beobachtet, dass die Stimulation von T-Zellen und DCs mit IFNα1 zu einer schwächeren STAT-1-Aktivierung führte als IFNα2 [83]. Dickow *et al.* konnten außerdem zeigen, dass der antiproliferative Effekt verschiedener muriner IFNα Subtypen auf $CD8^+$ T-Zellen mit der unterschiedlich starken Phosphorylierung von STAT-1 korrelierte [40]. Außerdem wurde beobachtet, dass IFNα und IFNβ unterschiedliche Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) aktivierten. So führte die Stimulation mit den humanen IFNα Subtypen α1, α2, α4, α5, α6 oder α9 zur Phosporylierung von p38, p42 und p44, die IFNβ-Stimulation hingegen zur Phosphorylierung von Raf-1, p42 und p44 [31]. Eine weitere Studie zeigte, dass die Stimulation von KAS-6/1-Zellen (humane Myelom-

Zelllinie) mit humanem IFNα2 zu einer starken Induktion der Proliferation führte, in anderen Zelllinien jedoch einen antiproliferativen Effekt hatte. Dabei wurde festgestellt, dass die Induktion unterschiedlicher MAPK-Signalwege für diesen diversen Effekt verantwortlich war [6].

Des Weiteren wird der unterschiedliche antiproliferative Effekt diverser IFN Subtypen über die unterschiedliche Bindungsaffinität zum IFNAR-Rezeptorkomplex vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene humane IFNα Subtypen unterschiedliche Bindungsaffinitäten zum Rezeptorkomplex haben, die direkt mit dem antiproliferativen Effekt auf humane WISH und OVCAR-3-Zellen korrelierten [103]. Dies konnte dadurch bestätigt werden, dass in zwei unterschiedlichen Zelllinien (WISH, 2fTGH) verschiedene IFNa2-Mutanten mit unterschiedlicher Rezeptorbindungsaffinität getestet wurden, deren antiproliferativer Effekt ebenfalls von der Bindungsaffinität abhängig war [91, 95]. Dabei war die Bindungsaffinität zu beiden IFNAR-Untereinheiten (IFNAR1/IFNAR2) entscheidend [95].

5.2. Der immunmodulatorische Effekt der IFNα Subtypen auf CD4⁺ T-Zellen

Neben dem Effekt der verschiedenen IFNα Subtypen auf die Proliferation FV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen, wurde in der vorliegenden Arbeit auch deren Einfluss auf die Effektorfunktion dieser Zellen analysiert. Dabei wurde beobachtet, dass der antiproliferative Effekt der Subtypen IFNα4, α6, α9 und α11 mit einer signifikanten Erhöhung des Anteils der IL-2- und TNFα-exprimierenden CD4⁺ T-Zellen sowie einem tendenziell erhöhten Anteil IFNγ-exprimierender CD4⁺ T-Zellen korrelierte (Abbildung 4-7). Die Expression dieser Zytokine ist mit T_H1-Zellen assoziiert [160]. In einer vergleichbaren Studie wurde der Effekt derselben IFNα Subtypen auf die Proliferation und die Effektorfunktion von CD8⁺ T-Zellen analysiert. Dort wurde ebenfalls eine Korrelation des antiproliferativen Potenzials einiger IFNα Subtypen mit der erhöhten TNFα-Expression bei CD8⁺ T-Zellen beobachtet [40]. Interessanterweise erhöhten in der vorliegenden Arbeit die übrigen IFNα Subtypen (IFNα1, α2 und α5), welche keinen antiproliferativen Effekt auf die CD4⁺ T-Zellen hatten, die Expression der T_H17-assoziierten Zytokine IL-17a, IL-17f und IL-22 (Abbildung 4-9 (I, J, L)). Bei der Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in T-Helfer-Zellen bestimmt das umgebende Zytokinmilieu, in welche der verschiedenen Subpopulationen die CD4⁺ T-Zellen differenzieren [200]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob auch die

Stimulation mit den verschiedenen murinen IFNα Subtypen die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in verschiedene T-Helfer-Subpopulationen regulieren kann. Dabei wurde beobachtet, dass die direkte Stimulation der CD4⁺ T-Zellen während der *in vitro* Differenzierung mit verschiedenen Typ I IFN Subtypen keinen Effekt auf die Differenzierung, quantifiziert durch die Expression des T_H17-assoziierten Zytokins IL-17a, hatte (Abbildung 4-11 (A, C)).

Die Rolle von Typ I IFN bei der Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in verschiedene T-Helfer-Subpopulationen ist kontrovers. So konnten Brinkmann *et al.* zeigen, dass die *in vitro*-Stimulation mit humanem IFNα8, während der Aktivierung durch anti-CD3 Antikörper, die Differenzierung von humanen CD4⁺ T-Zellen in T_H1-Zellen induzieren konnte [18]. Weiterhin beobachteten Rogge *et al.*, dass IFNα bzw. IFNβ nur im humanen und nicht im murinen System zu einer STAT-4-abhängigen Differenzierung in T_H1-Zellen führte [159]. Die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in T_H1-Zellen wird durch den Transkriptionsfaktor T-bet reguliert, welcher wiederum durch die Phosphorylierung von STAT-1 über IFNγ induziert wird. IL-12 phosphoryliert den STAT-4-Signalweg, was die IFNγ-Expression induziert und somit zu einem positiven Feedback für die weitere T-bet-Expression führt [114]. Verschiedene Studien zeigten, dass, entgegen der Beobachtungen von Rogge *et al.*, auch im murinen System STAT-4 durch die Stimulation mit Typ I IFN phosphoryliert wird [8, 12, 13, 140]. Allerdings ist die Phosphorylierung von STAT-4 geringer als im humanen System und wurde deshalb in älteren Studien, wie von Rogge *et al.*, nicht identifiziert [87]. Die transiente Phosphorylierung von STAT-4 durch Typ I IFN ist allerdings weder im murinen, noch im humanen System ausreichend, um die T_H1-Differenzierung zu induzieren [8, 12, 13]. Möglicherweise könnten Typ I IFN aber mit IL-12 synergieren um die T_H1-Differenzierung zu induzieren [155]. Eine Synergie von IL-12 und Typ I IFN, welche die T_H1-Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen verstärkte, konnte auch bei einer bakteriellen Infektion mit *Listeria monocytogenes* beobachtet werden [189]. Außerdem weist eine Studie darauf hin, dass Typ I IFN in Abwesenheit von IL-12 mit IL-18 synergieren könnte, um die IFNγ-Expression zu verstärken und so die T_H1-Antwort zu induzieren [168]. Auch für andere T-Helfer-Subpopulationen wurde eine Synergie von Typ I IFN mit verschiedenen Zytokinen zur Regulierung der T-Helferzell-Differenzierung beschrieben. So zeigten Nakamayada *et al.*, dass IFNα oder IFNβ in Synergie mit IL-6 an der Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in T_{FH}-Zellen beteiligt waren. Die Stimulation mit Typ I IFN induzierte die Expression des Transkriptionsfaktors Bcl6 über den STAT-1-Signalweg. Für die Induktion des T_{FH}-assoziierten Zytokins IL-21 war

allerdings eine Synergie von Typ I IFN mit IL-6 notwendig, sodass schließlich IL-6 und IL-21 die T_{FH}-Differenzierung über den STAT-3-Signalweg induzieren konnten [137].
In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der Effekt der Stimulation mit IFNα direkt die $CD4^+$ T-Zellen beeinflusste, oder ob deren Effekte über die Stimulation der DCs in der Ko-Kultur vermittelt wurden. In einem Experiment mit $IFNAR^{-/-}$ DCs wurde gezeigt, dass die Stimulation mit IFNα zwar direkt die Proliferation FV-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen beeinflusste (Abbildung 4-12 (B)), um die Zytokinantwort zu modulieren war es allerdings notwendig, dass die DCs in der Ko-Kultur mit $CD4^+$ T-Zellen ebenfalls mit IFNα stimuliert wurden (Abbildung 4-13 (B-D)).
Möglicherweise ist also die Typ I IFN-Stimulation der DCs für die Differenzierung essenziell, indem dies die Expression von Zytokinen induziert, welche die Differenzierung regulieren. Diese Hypothese wird durch verschiedene Studien gestützt. Die Stimulation von humanen DCs oder Monozyten mit IFNα2 oder IFNβ induzierte beispielsweise unter bestimmten Bedingungen die Expression der bioaktiven Form von IL-12, IL-12p70, welches die T_H1-Differenzierung reguliert [59, 81, 82]. Cella *et al.* beobachteten, dass durch Influenza Virus oder CD40-CD40L-Interaktion stimulierte pDCs IL-12 und Typ I IFN sezernierten und diese somit die T_H1-Differenzierung synergistisch induzierten [22]. Cucak *et al.* zeigen, dass die Stimulation von DCs mit IFNβ die Expression von IL-6 verstärkte und so die Differenzierung in T_{FH}-Zellen regulierte [30]. Außerdem wurde durch die IFNβ-Stimulation die CD86-Expression der DCs erhöhte [30], was auch in der vorliegenden Arbeit nach der Stimulation mit IFNα beobachtet wurde (Abbildung 4-15 (C)). Rincón *et al.* zeigten, dass IL-6, sezerniert von APCs, die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_H2-Zellen regulieren konnte, indem es die initiale IL-4-Sekretion, welches essentiell für die T_H2-Polarisierung ist, induzierte [158]. Diese Studien weisen auf eine allgemein starke Beteiligung der APCs an der T-Helferzell-Differenzierung hin, indem sie bestimmte Zytokine, wie z.B. IL-12 für die T_H1-Differenzierung, sezernieren. Zum anderen zeigten einige dieser Studien, dass DCs nach der Stimulation mit IFNα oder IFNβ, speziell über die IL-6-Sekretion, an der Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen beteiligt waren. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte IL-6-Expression nach der Stimulation der Ko-Kultur von DCs und $CD4^+$ T-Zellen mit den IFNα Subtypen α1, α2 oder α5 beobachtet, also denselben Subtypen, welche auch die Expression der T_H17-assoziierten Zytokine verstärkten (Abbildung 4-9 (I, J, L)). Es ist bekannt, dass IL-6 essenziell für die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_H17-Zellen ist [76]. So könnte also die Stimulation der Ko-Kultur von DCs und $CD4^+$ T-Zellen mit IFNα1, α2

oder α5 zu einer Erhöhung der IL-6-Expression und somit zur Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_H17-Zellen geführt haben. Es konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, dass das IL-17a von den DCs direkt nach IFN-Stimulation produziert wurde (Abbildung 4-14), weshalb das sezernierte IL-17a von den $CD4^+$ T-Zellen stammen musste. Das Zytokin IL-6 reguliert allerdings nicht nur die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_H17-Zellen, sondern auch in T_H2- und T_{FH}-Zellen. Insofern sind vermutlich weitere Faktoren an der Induktion der T_H17-Differenzierung beteiligt. Ein solcher Faktor konnte in einer Studie von Aggarwal *et al.* identifiziert werden. Die Stimulation von $CD4^+$ T-Zellen mit anti-CD3 Antikörper und dem Zellkulturüberstand aktivierter APCs induzierte eine erhöhte IL-17a-Expression in $CD4^+$ T-Zellen. Dabei wurde eine stark erhöhte IL-23-Konzentration infolge der DC-Aktivierung im Zellkulturüberstand bestimmt. So konnte gezeigt werden, dass von aktivierten DCs sezerniertes IL-23 die Differenzierung von $CD4^+$ T-Zellen in T_H17-Zellen regulierte [2]. In der vorliegenden Arbeit wurden DCs direkt mit verschiedenen IFNα Subtypen stimuliert und die Expression von IL-12/23p40, einer gemeinsamen Untereinheit von IL-12 und IL-23, analysiert. Somit konnte überprüft werden, ob auch in der vorliegenden Arbeit die IL-23-Expression in einem Zusammenhang mit der Expression T_H17-assoziierter Zytokine steht. Dabei führte die Stimulation mit IFNα1, α2, α5 oder α9 zu einer gesteigerten IL-12/23p40 Expression in DCs; IFNα4, α6, und α11 hingegen nicht (Abbildung 4-15 (A)). Da IFNα1, α2 und α5 auch in der Ko-Kultur von DCs und $CD4^+$ T-Zellen zu einer deutlichen Erhöhung der T_H17-Zytokinexpression führten (Abbildung 4-9 (I, J, L)), ist dieser Effekt möglicherweise auf eine Erhöhung der IL-23-Expression zurückzuführen. Diese Korrelation konnte in einer weiteren Analyse beobachtet werden. So wurde im Überstand eines Proliferationsassays durch die Stimulation mit den IFNα Subtypen α1, α2 oder α5 eine deutlich frühere Induktion der IL-23-Expression beobachtet, als durch die IFNα Subtypen α4, α6, α9 und α11 (Abbildung 4-16). Die Expression von IL-17a wurde zeitlich verzögert ebenfalls durch IFNα1, α2 und α5 früher induziert als nach der Stimulation mit IFNα4, α6, α9 und α11 und folgt somit dem gleichen Expressionsmuster wie die IL-23-Expression nach der Stimulation mit den IFNα Subtypen (Abbildung 4-17). Im Gegensatz dazu führte die IFNα9-Stimulation zu einer IL-12/23p40 Expression (Abbildung 4-15 (A, B)), vergleichbar mit der Expression nach der Stimulation mit IFNα1, α2 oder α5, ohne jedoch die IL-23- oder IL-17a-Expression früh zu induzieren. Möglicherweise zeigt die IL-12/23p40-Expression in diesem Fall die Expression von IL-12, eines der T_H1-assoziierten Zytokine. In dieser Arbeit wurde bereits zuvor beobachtet, dass die Stimulation mit

IFNα9 die Expression T_H1-assoziierter Zytokine induzierte (Abbildung 4-7).

Somit konnte gezeigt werden, dass IL-23 in dieser Arbeit möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der T_H17-Differenzierung spielte und dieses Zytokin von DCs exprimiert wurde (Abbildung 4-15 (A, B)). Auch Lombardi *et al.* beobachteten, dass die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_H1- bzw. T_H17-Zellen durch die Expression verschiedener Zytokine in DCs, z.B. IL-12 und IL-23, reguliert wurde [111]. Andererseits zeigten Harrington *et al.*, dass die Stimulation humaner naiver $CD4^+$ T-Zellen mit IL-23 zwar die T_H17-Differenzierung induzierte, die gleichzeitige zusätzliche Stimulation mit universellem IFNα oder IFNβ jedoch die Differenzierung in T_H17-Zellen reduzierte [78]. Auch im humanen Multiple Sklerose (MS)-Modell wurde beschrieben, dass die Stimulation mit IFNβ die T_H17-Differenzierung inhibierte [46, 154]. So wurde beobachtet, dass die Stimulation mit IFNβ die Expression von IL-23 in DCs herunterregulierte und außerdem die T_H17-Differenzierung der $CD4^+$ T-Zellen direkt inhibierte, indem es die Expression des Transkriptionsfaktors RORγt blockierte und die Expression des IL-23-Rezeptors herunterregulierte [154]. Eine Studie mit einem MS-Mausmodell bestätigte dies und zeigte, dass die Stimulation mit IFNβ die Expression von IL-23 in DCs inhibierte und somit die Expression des T_H17-assoziierte Zytokins IL-17a in $CD4^+$ T-Zellen reduzierte. Des Weiteren wurde in jener Studie eine Reduktion der IL-12-Expression in DCs und der Expression des T_H1-assoziierten Zytokins IFNγ in $CD4^+$ T-Zellen beobachtet [195]. Auch weitere Studien in Mäusen beschreiben, dass die Stimulation von DCs oder Makrophagen mit IFNα oder IFNβ die Induktion der T_H17-Antwort reduzierte [75, 173]. Andererseits beobachteten Santini *et al.*, dass mit IFNα stimulierte DCs die T_H17-Differenzierung über ihren Einfluss auf das Zytokinmilieu induzieren konnten. Mit IFNα2 stimulierte DCs wurden mit naiven $CD4^+$ T-Zellen, welche mit Staphylokokken-Enterotoxin A (SEA)-Antigen oder anti-CD3 Antikörper stimuliert wurden, ko-kultiviert. Eine verstärkte IL-23-Expression der DCs zeigte dabei einen deutlichen Einfluss auf die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_H17-Zellen [167].

Wie bereits erwähnt, wird die Rolle von Typ I IFN bei der Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in verschiedene T-Helfer-Subpopulationen kontrovers diskutiert. So zeigten beispielsweise einige der zuvor genannten Studien einen positiven Effekt der Typ I IFN-Stimulation auf die Differenzierung in T_H1- oder T_H17-Zellen, andere hingegen beschrieben einen inhibitorischen Effekt. Für diese Diversität sind vermutlich mehrere unterschiedliche Faktoren verantwortlich. Nagai *et al.* zeigten in einer Studie, dass der Zeitpunkt, zu dem DCs mit Typ I IFN stimuliert werden entscheidend ist, ob sie die

T_H1-Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen inhibieren oder induzieren. Wurden DCs während der Reifung mit IFNβ stimuliert, induzierten sie die T_H1-Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen, die mit SEA-Antigen aktiviert wurden. Die IFNβ-Stimulation während der Ko-Kultur antigenpräsentierender DCs mit den $CD4^+$ T-Zellen hingegen inhibierte die T_H1-Differenzierung [135]. Dies bestätigt zum einen, dass die Typ I IFN-Stimulation der DCs eine wichtige Rolle bei der T-Helferzell-Differenzierung spielt und zum anderen, dass der Zeitpunkt der Stimulation für den Effekt der Stimulation auf die Differenzierung entscheidend ist. Auch zeigten De Giovanni *et al.* im humanen Modell, dass die Infektion mit VSV (Vesikuläres Stomatitis-Virus) zu einer frühen Induktion von IFNα Subtypen und IFNβ führt, was wiederum die Expression von IL-6 in DCs verstärkte und somit die T_{FH}-Differenzierung induzierte. Im Gegensatz dazu, wurde durch die LCMV (Klon 13)-Infektion erst später die Typ I IFN-Expression induziert. Dabei wurde kein IL-6 exprimiert und statt der Differenzierung in T_{FH}-Zellen, wurde die T_H1-Differenzierung gefördert [37]. Diese Studie zeigt also, dass zeitliche Aspekte und die Infektion eine Rolle dabei spielten, welchen Effekt die Typ I IFN-Stimulation auf die T-Helferzell-Differenzierung hatten.

Viele der zuvor genannten Studien beschreiben, dass die Stimulation mit Typ I IFN die Differenzierung in T_H17-Zellen inhibiert. Garcin *et al.* beobachteten zwar eine verstärkte T_H1-Polarisierung von humanen $CD4^+$ T-Zellen in einer Ko-Kultur mit IFNα2- oder IFNβ-stimulierten DCs, jedoch überhaupt keinen Effekt auf die T_H17-Differenzierung. Sie vermuteten allerdings, dass die Stärke und Dauer des TCR-Signals für die Polarisierung entscheidend ist [57], da in der zuvor erwähnten Studie von Santini *et al.* [167], die Stimulation von DCs mit IFNα2 die Differenzierung in T_H17-Zellen induzierte. In der Ko-Kultur nach Santini *et al*. wurden die $CD4^+$ T-Zellen zusätzlich mit SEA-Antigen oder anti-CD3 Antikörper stimuliert, bei Garcin *et al*. erfolgte hingegen keine weitere Stimulation der $CD4^+$ T-Zellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nur einige der IFNα Subtypen die T_H17-Zytokinantwort inhibierten, andere Subtypen sie jedoch verstärkten (Abbildung 4-9 (I, J, L)). Auch in den zuvor genannten Studien wurden zum Teil verschiedene Typ I IFN verwendet. Neben der zeitlichen Abhängigkeit oder unterschiedlichen Infektionen bzw. Immunisierungen, sind die Effekte der Typ I IFN-Stimulation auf die $CD4^+$ T-Zell-Differenzierung also möglicherweise auch von den verschiedenen IFNα Subtypen abhängig. Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, besitzen verschiedene IFNα Subtypen unterschiedliche biologische Aktivitäten und sind in der Lage diverse STAT-Signalwege zu aktivieren [31]. Des Weiteren ist

bekannt, dass die Differenzierung naiver CD4$^+$ T-Zellen in verschiedene T-Helfer-Zell-Subpopulationen über die Phosphorylierung unterschiedlicher STAT-Moleküle reguliert wird. So wird beispielsweise die Differenzierung in T_H1-Zellen über STAT-1 und STAT-4 reguliert, die Differenzierung in T_H2-Zellen über STAT-6. Die T_H17-Differenzierung wird hingegen über den STAT-3-Signalweg induziert [78]. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung unterschiedlicher STATs durch die verschiedenen IFNα Subtypen und deren unterschiedliche Effekte auf die Differenzierung. Es ist auffällig, dass in der vorliegenden Arbeit diejenigen Subtypen zu einer verstärkten T_H1-Zytokinantwort führten, welche antiproliferativ wirkten. Sowohl für den antiproliferativen Effekt der IFNα Subtypen, als auch die T_H1-Differenzierung spielt die Aktivierung von STAT-1 eine Rolle. Stattdessen wurde die T_H17-Zytokinexpression durch jene Subtypen induziert, welche nicht antiproliferativ wirkten. Allerdings wurde die Phosphorylierung verschiedener STATs durch die Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen in dieser Arbeit nicht untersucht. Auch ist es unwahrscheinlich, dass lediglich die Aktivierung der entsprechenden STAT-Signalwege sowohl den Effekt auf die Proliferation, als auch auf die Differenzierung reguliert. Der Effekt auf die Proliferation wirkte nämlich direkt auf die CD4$^+$ T-Zellen (Abbildung 4-12 (B)), der Effekt auf die Zytokinexpression wurde allerdings über DCs vermittelt (Abbildung 4-13 (B-D)). In weiteren Experimenten sollte daher der Effekt der IFNα Subtypen auf die Phosphorylierung der STAT-Moleküle in T-Zellen und DCs untersucht werden. Möglicherweise stellt dies einen Zusammenhang zwischen dem antiproliferativen Effekt und dem Einfluss auf die Differenzierung her.

5.3. Der Effekt von IFNα Subtypen auf CD4$^+$ T Zellen *in vivo*

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem untersucht, ob sich die *in vitro* gezeigten Effekte der IFNα Subtyp-Stimulation auf die Expression T-Helferzell-assoziierter Zytokine von CD4$^+$ T-Zellen *in vivo* reproduzieren lassen. Zu diesem Zweck wurden Mäuse mit FV infiziert und mit verschiedenen IFNα Subtypen behandelt. Dabei wurden Subtypen verwendet, die bereits *in vitro* deutliche Unterschiede zeigten. So wirkte IFNα4 *in vitro* antiproliferativ und förderte die Expression T_H1-assoziierter Zytokine, während IFNα2 und α5 nicht antiproliferativ wirkten und die Expression T_H17-assoziierter Zytokine förderten.

Wie bereits in vorherigen Studien gezeigt wurde, wirkte IFNα4 auch hier signifikant

antiviral, IFNα2 und α5 hingegen nicht (Abbildung 4-18 (B)) [61, 65]. Auf die IFNγ- und IL-17a-Expression hatten die verwendeten IFNα Subtypen allerdings keinen signifikanten Effekt *in vivo* (Abbildung 4-20).

Des Weiteren wurde der Effekt der IFNα Behandlung auf die $CD4^+$ T-Zell-Antwort ebenfalls im *Citrobacter rodentium*-Modell untersucht, denn für die Eliminierung dieses Pathogens spielt neben der T_H1- auch die T_H17-Zell-Antwort eine große Rolle. Dabei haben insbesondere die T_H17-assoziierten Zytokine IL-17a und IL-17f wichtige Effektorfunktionen, indem sie beispielsweise Neutrophile rekrutieren [26]. Da in dieser Arbeit im FV-Modell gezeigt werden konnte, dass die Stimulation mit IFNα2 *in vitro* die T_H17-Antwort verstärkte, mit IFNα4 hingegen nicht, wurden mit *C. rodentium* infizierte Mäuse mit diesen Subtypen behandelt. Die Behandlung mit IFNα2 verstärkte die T_H17-Antwort allerdings auch bei der *C. rodentium*-Infektion nicht (Abbildung 4-23 (C, E) und Abbildung 4-24), anders als es *in vitro* im FV-Modell zu sehen war. Die Beobachtungen der *in vitro* Experimente ließen sich also *in vivo* in keinem der beiden Modelle reproduzieren.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass der antiproliferative Effekt verschiedener IFNα Subtypen *in vitro* mit der Effektorfunktion von T_H1-Zellen korrelierte. Interessanterweise scheint also ein Zusammenhang des Effekts der IFNα-Stimulation auf die Proliferation mit dem Einfluss auf die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in verschiedene T-Helferzell-Populationen zu bestehen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass für die Vermittlung des Effekts der IFNα-Subtypen auf die mögliche Differenzierung auch die Stimulation der DCs notwendig war. Insofern muss der Zusammenhang zwischen dem antiproliferativen Effekt und der Differenzierung weiter untersucht werden. Möglicherweise spielt allerdings die Aktivierung verschiedener STAT-Signalwege eine große Rolle.

6. Zusammenfassungen

6.1. Zusammenfassung

Die Typ I Interferon (IFN)-Expression ist eine der ersten Reaktionen des angeborenen Immunsystems auf eine Virusinfektion. Bei Typ I IFN handelt es sich um pleiotrope Zytokine, die die Expression hunderter verschiedener IFN-stimulierter Gene induzieren. Deren translatierte Produkte besitzen verschiedene antivirale, immunmodulatorische und antiproliferative Eigenschaften. Zu den Typ I IFN zählen unter anderem IFNβ und 12 (Mensch) bzw. 14 (Maus) unterschiedliche IFNα Subtypen. Die IFNα Subtypen und IFNβ binden zwar alle an denselben Rezeptor, besitzen jedoch unterschiedliche biologische Funktionen, welche unter anderem auf unterschiedliche Rezeptorbindungsaffinitäten, Rezeptoraviditäten und die Induktion unterschiedlicher Signalwege zurückzuführen sind, aber auch vom Zelltyp und vom Virustyp abhängen. In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die verschiedenen IFNα Subtypen diverse antivirale Eigenschaften besitzen und die NK-Zell-Antwort oder die $CD8^+$ T-Zell-Antwort verbessern können. Die Rolle der verschiedenen IFNα Subtypen auf die $CD4^+$ T-Zell-Antwort ist allerdings bisher nicht hinreichend erforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Effekt sieben verschiedener muriner IFNα Subtypen auf die Proliferation, die Differenzierung und die Effektorfunktionen von antigenspezifischen $CD4^+$ T-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein Friend Retrovirus (FV)-spezifischer $CD4^+$ T-Zell-Proliferationsassay etabliert, bei dem antigenspezifischen $CD4^+$ T-Zellen in An- oder Abwesenheit der IFNα Subtypen über dendritische Zellen (DC) ein FV-Peptid präsentiert wurde. Dabei wurde eine Korrelation des antiproliferativen Effekts der IFNα Subtypen α4, α6, α9 und α11 mit einer verbesserten Expression der T_H1-assoziierten Zytokine IFNγ, Interleukin (IL)-2 und Tumornekrosefaktor α beobachtet. Die übrigen Subtypen IFNα1, α2 und α5 hingegen wirkten nicht antiproliferativ und induzierten die Expression T_H17-assoziierter Zytokine wie IL-17a, IL-17f und IL-22. Außerdem wurde eine erhöhte Expression von IL-23, welches eine wichtige Rolle bei der T_H17-Differenzierung spielt, im Proliferationsassay gemessen und korrelierte mit der IL-17a-Expression der $CD4^+$ T-Zellen.

In dieser Arbeit zeigten die verschiedenen IFNα Subtypen diverse antiproliferative Effekte, welche mit deren Modulation der $CD4^+$ T-Effektorfunktion korrelierten. Diese Ergebnisse können dabei helfen die Rolle der IFNα Subtypen bei der Differenzierung

und der Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen besser zu verstehen um gezielte IFNα-Immuntherapien für Virusinfektionen zu entwickeln.

6.2. Summary

The expression of type I IFN is one of the first defense mechanisms of the innate immunity during viral infections. Type I IFN are pleiotropic cytokines which induce the expression of hundreds of IFN-stimulated genes. Their translated products have different antiviral, immunomodulatory and antiproliferative properties. Among others, the family of type I IFN comprises IFNβ as well as 12 (human) or 14 (mouse) different IFNα subtypes. Although IFNβ and all IFNα subtypes bind to the same receptor, they all have different biological effects, which is due to different receptor affinities, receptor avidities and the activation of different signaling pathways and depends on the type of cell or virus. It was previously shown that different IFNα subtypes have diverse antiviral effects and are able to modulate NK cell or $CD8^+$ T cell responses. However, the role of IFNα subtypes on $CD4^+$ T cell responses has not been investigated so far.

In the present work, the effect of seven different murine IFNα subtypes on the proliferation, differentiation and the effector function of antigen-specific $CD4^+$ T cells was analyzed. Therefore, a FV-specific $CD4^+$ T cell proliferation assay was established in which a FV-derived peptide was presented to antigen-specific $CD4^+$ T cells by DCs in the presence or absence of IFNα subtypes. A correlation between the antiproliferative effect of the IFNα subtypes α4, α6, α9 and α11 with an increased expression of the T_H1-associated cytokines IFNγ, IL-2 and TNFα was observed. The other subtypes IFNα1, α2 und α5 did not inhibit $CD4^+$ T cell proliferation and induced the expression of T_H17-associated cytokines IL-17a, IL-17f and IL-22. Moreover, an enhanced expression of IL-23, which is involved in T_H17 differentiation, was detected in the proliferation assay and thus correlated with the IL-17a expression of the $CD4^+$ T cells.

In the present study, the different IFNα subtypes showed an antiproliferative effect, correlating with the modulation of the $CD4^+$ T effector functions. These results could help to better understand the diverse effects of IFNα subtypes on the differentiation and the activation of $CD4^+$ T cells and to develop specialized IFNα-based immunotherapies against viral infections.

7. Literaturverzeichnis

1. Abdolvahab MH, Darvishi B, Zarei M, Majidzadeh-A K, Farahmand L (2020) Interferons: role in cancer therapy. Immunotherapy 12:833-855
2. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL (2003) Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. J Biol Chem 278:1910-1914
3. Akhmetzyanova I, Drabczyk M, Neff CP, Gibbert K, Dietze KK, Werner T, Liu J, Chen L, Lang KS, Palmer BE, Dittmer U, Zelinskyy G (2015) PD-L1 Expression on Retrovirus-Infected Cells Mediates Immune Escape from CD8+ T Cell Killing. PLoS Pathog 11:e1005224
4. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC (2006) Cytotoxic T cells. J Invest Dermatol 126:32-41
5. Annunziato F, Romagnani C, Romagnani S (2015) The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. J Allergy Clin Immunol 135:626-635
6. Arora T, Floyd-Smith G, Espy MJ, Jelinek DF (1999) Dissociation between IFN-alpha-induced anti-viral and growth signaling pathways. J Immunol 162:3289-3297
7. Asmuth DM, Murphy RL, Rosenkranz SL, Lertora JJ, Kottilil S, Cramer Y, Chan ES, Schooley RT, Rinaldo CR, Thielman N, Li XD, Wahl SM, Shore J, Janik J, Lempicki RA, Simpson Y, Pollard RB, Team ACTGA (2010) Safety, tolerability, and mechanisms of antiretroviral activity of pegylated interferon Alfa-2a in HIV-1-monoinfected participants: a phase II clinical trial. J Infect Dis 201:1686-1696
8. Athie-Morales V, Smits HH, Cantrell DA, Hilkens CM (2004) Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. J Immunol 172:61-69
9. Azzoni L, Foulkes AS, Papasavvas E, Mexas AM, Lynn KM, Mounzer K, Tebas P, Jacobson JM, Frank I, Busch MP, Deeks SG, Carrington M, O'Doherty U, Kostman J, Montaner LJ (2013) Pegylated Interferon alfa-2a monotherapy results in suppression of HIV type 1 replication and decreased cell-associated HIV DNA integration. J Infect Dis 207:213-222
10. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 220:868-871
11. Bekisz J, Baron S, Balinsky C, Morrow A, Zoon KC (2010) Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon. Pharmaceuticals (Basel) 3:994-1015
12. Berenson LS, Farrar JD, Murphy TL, Murphy KM (2004) Frontline: absence of functional STAT4 activation despite detectable tyrosine phosphorylation induced by murine IFN-alpha. Eur J Immunol 34:2365-2374
13. Berenson LS, Gavrieli M, Farrar JD, Murphy TL, Murphy KM (2006) Distinct characteristics of murine STAT4 activation in response to IL-12 and IFN-alpha. J Immunol 177:5195-5203
14. Bjorkdahl O, Barber KA, Brett SJ, Daly MG, Plumpton C, Elshourbagy NA, Tite JP, Thomsen LL (2003) Characterization of CC-chemokine receptor 7 expression on murine T cells in lymphoid tissues. Immunology 110:170-179
15. Blaschitz C, Raffatellu M (2010) Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. J Clin Immunol 30:196-203
16. Bollati-Fogolin M, Muller W (2005) Virus free, cell-based assay for the quantification of murine type I interferons. J Immunol Methods 306:169-175

17. Boo KH, Yang JS (2010) Intrinsic cellular defenses against virus infection by antiviral type I interferon. Yonsei Med J 51:9-17
18. Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH (1993) Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. J Exp Med 178:1655-1663
19. Broere F, Apasov SG, Sitkovsky M, Eden Wv (2011) T cell subsets and T cell-mediated immunity.
20. Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE, Jr. (1996) Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. Proc Natl Acad Sci U S A 93:7673-7678
21. Caza T, Landas S (2015) Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets. Biomed Res Int 2015:521957
22. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M (2000) Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. Nat Immunol 1:305-310
23. Chen J, Li Y, Lai F, Wang Y, Sutter K, Dittmer U, Ye J, Zai W, Liu M, Shen F, Wu M, Hu K, Li B, Lu M, Zhang X, Zhang J, Li J, Chen Q, Yuan Z (2020) Functional Comparison of IFN-alpha Subtypes Reveals Potent HBV Suppression by a Concerted Action of IFN-alpha and -gamma Signaling. Hepatology
24. Chester C, Fritsch K, Kohrt HE (2015) Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Co-stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy. Front Immunol 6:601
25. Cmarik J, Ruscetti S (2010) Friend Spleen Focus-Forming Virus Activates the Tyrosine Kinase sf-Stk and the Transcription Factor PU.1 to Cause a Multi-Stage Erythroleukemia in Mice. Viruses 2:2235-2257
26. Collins JW, Keeney KM, Crepin VF, Rathinam VA, Fitzgerald KA, Finlay BB, Frankel G (2014) Citrobacter rodentium: infection, inflammation and the microbiota. Nat Rev Microbiol 12:612-623
27. Colomer-Lluch M, Ruiz A, Moris A, Prado JG (2018) Restriction Factors: From Intrinsic Viral Restriction to Shaping Cellular Immunity Against HIV-1. Front Immunol 9:2876
28. Crepin VF, Collins JW, Habibzay M, Frankel G (2016) Citrobacter rodentium mouse model of bacterial infection. Nat Protoc 11:1851-1876
29. Crouse J, Kalinke U, Oxenius A (2015) Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. Nat Rev Immunol 15:231-242
30. Cucak H, Yrlid U, Reizis B, Kalinke U, Johansson-Lindbom B (2009) Type I interferon signaling in dendritic cells stimulates the development of lymph-node-resident T follicular helper cells. Immunity 31:491-501
31. Cull VS, Tilbrook PA, Bartlett EJ, Brekalo NL, James CM (2003) Type I interferon differential therapy for erythroleukemia: specificity of STAT activation. Blood 101:2727-2735
32. Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF (2005) Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. J Immunol 174:4465-4469
33. Curtsinger JM, Mescher MF (2010) Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. Curr Opin Immunol 22:333-340
34. D'Andrea AD (1992) The interaction of the erythropoietin receptor and gp55. Cancer Surv 15:19-36

35. Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T (2014) Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. EMBO J 33:1104-1116
36. Daroff RB, Aminoff MJ (2014) Encyclopedia of the neurological sciences. Academic press
37. De Giovanni M, Cutillo V, Giladi A, Sala E, Maganuco CG, Medaglia C, Di Lucia P, Bono E, Cristofani C, Consolo E, Giustini L, Fiore A, Eickhoff S, Kastenmüller W, Amit I, Kuka M, Iannacone M (2020) Spatiotemporal regulation of type I interferon expression determines the antiviral polarization of CD4(+) T cells. Nat Immunol 21:321-330
38. de Weerd NA, Nguyen T (2012) The interferons and their receptors--distribution and regulation. Immunol Cell Biol 90:483-491
39. Detjen KM, Welzel M, Farwig K, Brembeck FH, Kaiser A, Riecken EO, Wiedenmann B, Rosewicz S (2000) Molecular mechanism of interferon alfa-mediated growth inhibition in human neuroendocrine tumor cells. Gastroenterology 118:735-748
40. Dickow J, Francois S, Kaiserling RL, Malyshkina A, Drexler I, Westendorf AM, Lang KS, Santiago ML, Dittmer U, Sutter K (2019) Diverse Immunomodulatory Effects of Individual IFNalpha Subtypes on Virus-Specific CD8(+) T Cell Responses. Front Immunol 10:2255
41. Dittmer U, Race B, Hasenkrug KJ (1999) Kinetics of the development of protective immunity in mice vaccinated with a live attenuated retrovirus. J Virol 73:8435-8440
42. Dittmer U, Hasenkrug KJ (2001) Cellular and molecular mechanisms of vaccine-induced protection against retroviral infections. Curr Mol Med 1:431-436
43. Dittmer U, Sutter K, Kassiotis G, Zelinskyy G, Banki Z, Stoiber H, Santiago ML, Hasenkrug KJ (2019) Friend retrovirus studies reveal complex interactions between intrinsic, innate and adaptive immunity. FEMS Microbiol Rev 43:435-456
44. Dondi E, Rogge L, Lutfalla G, Uze G, Pellegrini S (2003) Down-modulation of responses to type I IFN upon T cell activation. J Immunol 170:749-756
45. Drabczyk-Pluta M, Werner T, Hoffmann D, Leng Q, Chen L, Dittmer U, Zelinskyy G (2017) Granulocytic myeloid-derived suppressor cells suppress virus-specific CD8(+) T cell responses during acute Friend retrovirus infection. Retrovirology 14:42
46. Durelli L, Conti L, Clerico M, Boselli D, Contessa G, Ripellino P, Ferrero B, Eid P, Novelli F (2009) T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. Annals of neurology 65:499-509
47. Ellermann V, Bang O (1909) Experimentelle Leukämie bei Hühnern. II. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 63:231-272
48. Enders JF, Peebles TC (1954) Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. Proc Soc Exp Biol Med 86:277-286
49. Engelman A, Cherepanov P (2014) Retroviral Integrase Structure and DNA Recombination Mechanism. Microbiol Spectr 2
50. Fan J, Ma G, Nosaka K, Tanabe J, Satou Y, Koito A, Wain-Hobson S, Vartanian JP, Matsuoka M (2010) APOBEC3G generates nonsense mutations in human T-cell leukemia virus type 1 proviral genomes in vivo. J Virol 84:7278-7287
51. Feld JJ, Hoofnagle JH (2005) Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. Nature 436:967-972

52. Ferguson MR, Rojo DR, von Lindern JJ, O'Brien WA (2002) HIV-1 replication cycle. Clin Lab Med 22:611-635
53. Fevrier M, Dorgham K, Rebollo A (2011) CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis. Viruses 3:586-612
54. Fish EN, Banerjee K, Stebbing N (1983) Human leukocyte interferon subtypes have different antiproliferative and antiviral activities on human cells. Biochemical and biophysical research communications 112:537-546
55. Friend C (1957) Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. J Exp Med 105:307-318
56. Ganser-Pornillos BK, Pornillos O (2019) Restriction of HIV-1 and other retroviruses by TRIM5. Nat Rev Microbiol 17:546-556
57. Garcin G, Bordat Y, Chuchana P, Monneron D, Law HK, Piehler J, Uzé G (2013) Differential activity of type I interferon subtypes for dendritic cell differentiation. PLoS One 8:e58465
58. Gasteiger G, Kastenmuller W (2012) Foxp3+ Regulatory T-cells and IL-2: The Moirai of T-cell Fates? Front Immunol 3:179
59. Gautier G, Humbert M, Deauvieau F, Scuiller M, Hiscott J, Bates EE, Trinchieri G, Caux C, Garrone P (2005) A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. J Exp Med 201:1435-1446
60. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. Science 327:656-661
61. Gerlach N, Gibbert K, Alter C, Nair S, Zelinskyy G, James CM, Dittmer U (2009) Anti-retroviral effects of type I IFN subtypes in vivo. Eur J Immunol 39:136-146
62. Germain RN (2001) The T cell receptor for antigen: signaling and ligand discrimination. J Biol Chem 276:35223-35226
63. German Advisory Committee Blood SAoPTbB (2016) Human Immunodeficiency Virus (HIV). Transfus Med Hemother 43:203-222
64. Gibbert K, Dittmer U (2011) Distinct antiviral activities of IFN-alpha subtypes. Immunotherapy 3:813-816
65. Gibbert K, Joedicke JJ, Meryk A, Trilling M, Francois S, Duppach J, Kraft A, Lang KS, Dittmer U (2012) Interferon-alpha subtype 11 activates NK cells and enables control of retroviral infection. PLoS Pathog 8:e1002868
66. Gibbert K, Schlaak JF, Yang D, Dittmer U (2013) IFN-alpha subtypes: distinct biological activities in anti-viral therapy. Br J Pharmacol 168:1048-1058
67. Gil MP, Salomon R, Louten J, Biron CA (2006) Modulation of STAT1 protein levels: a mechanism shaping CD8 T-cell responses in vivo. Blood 107:987-993
68. Gil MP, Ploquin MJ, Watford WT, Lee SH, Kim K, Wang X, Kanno Y, O'Shea JJ, Biron CA (2012) Regulating type 1 IFN effects in CD8 T cells during viral infections: changing STAT4 and STAT1 expression for function. Blood 120:3718-3728
69. Gilliet M, Cao W, Liu YJ (2008) Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. Nat Rev Immunol 8:594-606
70. Gimeno R, Lee CK, Schindler C, Levy DE (2005) Stat1 and Stat2 but not Stat3 arbitrate contradictory growth signals elicited by alpha/beta interferon in T lymphocytes. Mol Cell Biol 25:5456-5465
71. Golubovskaya V, Wu L (2016) Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. Cancers (Basel) 8

72. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med 305:1425-1431
73. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD (2014) Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. Annu Rev Immunol 32:659-702
74. Griffiths DJ (2001) Endogenous retroviruses in the human genome sequence. Genome Biol 2:REVIEWS1017
75. Guo B, Chang EY, Cheng G (2008) The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. The Journal of clinical investigation 118:1680-1690
76. Harbour SN, DiToro DF, Witte SJ, Zindl CL, Gao M, Schoeb TR, Jones GW, Jones SA, Hatton RD, Weaver CT (2020) TH17 cells require ongoing classic IL-6 receptor signaling to retain transcriptional and functional identity. Sci Immunol 5
77. Harper MS, Barrett BS, Smith DS, Li SX, Gibbert K, Dittmer U, Hasenkrug KJ, Santiago ML (2013) IFN-alpha treatment inhibits acute Friend retrovirus replication primarily through the antiviral effector molecule Apobec3. J Immunol 190:1583-1590
78. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol 6:1123-1132
79. Hasenkrug KJ, Chesebro B (1997) Immunity to retroviral infection: the Friend virus model. Proc Natl Acad Sci U S A 94:7811-7816
80. Hench VK, Su L (2011) Regulation of IL-2 gene expression by Siva and FOXP3 in human T cells. BMC Immunol 12:54
81. Hermann P, Rubio M, Nakajima T, Delespesse G, Sarfati M (1998) IFN-alpha priming of human monocytes differentially regulates gram-positive and gram-negative bacteria-induced IL-10 release and selectively enhances IL-12p70, CD80, and MHC class I expression. J Immunol 161:2011-2018
82. Heystek HC, den Drijver B, Kapsenberg ML, van Lier RA, de Jong EC (2003) Type I IFNs differentially modulate IL-12p70 production by human dendritic cells depending on the maturation status of the cells and counteract IFN-gamma-mediated signaling. Clin Immunol 107:170-177
83. Hilkens CMU, Schlaak JF, Kerr IM (2003) Differential Responses to IFN-α Subtypes in Human T Cells and Dendritic Cells. The Journal of Immunology 171:5255-5263
84. Hoatlin ME, Kabat D (1995) Host-range control of a retroviral disease: Friend erythroleukemia. Trends Microbiol 3:51-57
85. Hobbs SJ, Nolz JC (2017) Regulation of T Cell Trafficking by Enzymatic Synthesis of O-Glycans. Front Immunol 8:600
86. Huber JP, Ramos HJ, Gill MA, Farrar JD (2010) Cutting Edge: Type I IFN Reverses Human Th2 Commitment and Stability by Suppressing GATA3. The Journal of Immunology 185:813-817
87. Huber JP, Farrar JD (2011) Regulation of effector and memory T-cell functions by type I interferon. Immunology 132:466-474
88. Ivashkiv LB, Donlin LT (2014) Regulation of type I interferon responses. Nat Rev Immunol 14:36-49
89. Iwashiro M, Kondo T, Shimizu T, Yamagishi H, Takahashi K, Matsubayashi Y, Masuda T, Otaka A, Fujii N, Ishimoto A, et al. (1993) Multiplicity of virus-

encoded helper T-cell epitopes expressed on FBL-3 tumor cells. J Virol 67:4533-4542
90. Iwashiro M, Peterson K, Messer RJ, Stromnes IM, Hasenkrug KJ (2001) CD4(+) T cells and gamma interferon in the long-term control of persistent friend retrovirus infection. J Virol 75:52-60
91. Jaks E, Gavutis M, Uzé G, Martal J, Piehler J (2007) Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. J Mol Biol 366:525-539
92. Jensen SS, Gad M (2010) Differential induction of inflammatory cytokines by dendritic cells treated with novel TLR-agonist and cytokine based cocktails: targeting dendritic cells in autoimmunity. J Inflamm (Lond) 7:37
93. Kabat D (1989) Molecular biology of Friend viral erythroleukemia. Curr Top Microbiol Immunol 148:1-42
94. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R (2002) Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. Nat Rev Immunol 2:251-262
95. Kalie E, Jaitin DA, Podoplelova Y, Piehler J, Schreiber G (2008) The stability of the ternary interferon-receptor complex rather than the affinity to the individual subunits dictates differential biological activities. J Biol Chem 283:32925-32936
96. Kamal SM, Ismail A, Graham CS, He Q, Rasenack JW, Peters T, Tawil AA, Fehr JJ, Khalifa Kel S, Madwar MM, Koziel MJ (2004) Pegylated interferon alpha therapy in acute hepatitis C: relation to hepatitis C virus-specific T cell response kinetics. Hepatology 39:1721-1731
97. Kim MK, Kim J (2019) Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. RSC Advances 9:11230-11238
98. Kotsias F, Cebrian I, Alloatti A (2019) Antigen processing and presentation. Int Rev Cell Mol Biol 348:69-121
99. Kuka M, De Giovanni M, Iannacone M (2019) The role of type I interferons in CD4(+) T cell differentiation. Immunol Lett 215:19-23
100. Lander MR, Chattopadhyay SK (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
101. Lavender KJ, Pang WW, Messer RJ, Duley AK, Race B, Phillips K, Scott D, Peterson KE, Chan CK, Dittmer U, Dudek T, Allen TM, Weissman IL, Hasenkrug KJ (2013) BLT-humanized C57BL/6 Rag2-/-gammac-/-CD47-/- mice are resistant to GVHD and develop B- and T-cell immunity to HIV infection. Blood 122:4013-4020
102. Lavender KJ, Gibbert K, Peterson KE, Van Dis E, Francois S, Woods T, Messer RJ, Gawanbacht A, Muller JA, Munch J, Phillips K, Race B, Harper MS, Guo K, Lee EJ, Trilling M, Hengel H, Piehler J, Verheyen J, Wilson CC, Santiago ML, Hasenkrug KJ, Dittmer U (2016) Interferon Alpha Subtype-Specific Suppression of HIV-1 Infection In Vivo. J Virol 90:6001-6013
103. Lavoie TB, Kalie E, Crisafulli-Cabatu S, Abramovich R, DiGioia G, Moolchan K, Pestka S, Schreiber G (2011) Binding and activity of all human alpha interferon subtypes. Cytokine 56:282-289
104. Letourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O (2009) IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. J Allergy Clin Immunol 123:758-762

105. Letvin NL, Eaton KA, Aldrich WR, Sehgal PK, Blake BJ, Schlossman SF, King NW, Hunt RD (1983) Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys. Proc Natl Acad Sci U S A 80:2718-2722
106. Letvin NL, Daniel MD, Sehgal PK, Desrosiers RC, Hunt RD, Waldron LM, MacKey JJ, Schmidt DK, Chalifoux LV, King NW (1985) Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. Science 230:71-73
107. Lim R, Knight B, Patel K, McHutchison JG, Yeoh GC, Olynyk JK (2006) Antiproliferative effects of interferon alpha on hepatic progenitor cells in vitro and in vivo. Hepatology 43:1074-1083
108. Lin AH, Burrascano C, Pettersson PL, Ibanez CE, Gruber HE, Jolly DJ (2014) Blockade of type I interferon (IFN) production by retroviral replicating vectors and reduced tumor cell responses to IFN likely contribute to tumor selectivity. J Virol 88:10066-10077
109. Lins Ferreira V, Borba H, Bonetti A, Leonart L, Pontarolo R (2018) Cytokines and Interferons: Types and Functions.
110. Littwitz E, Francois S, Dittmer U, Gibbert K (2013) Distinct roles of NK cells in viral immunity during different phases of acute Friend retrovirus infection. Retrovirology 10:127
111. Lombardi V, Van Overtvelt L, Horiot S, Moingeon P (2009) Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or TLR8 induce the sequential production of Il-10, IFN-gamma, and IL-17A by naive CD4+ T cells. J Immunol 182:3372-3379
112. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A (2007) Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. Immunity 26:503-517
113. Lucas S, Nelson AM (2015) HIV and the spectrum of human disease. J Pathol 235:229-241
114. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B (2012) CD4(+)T cells: differentiation and functions. Clin Dev Immunol 2012:925135
115. Lusso P, Markham PD, Ranki A, Earl P, Moss B, Dorner F, Gallo RC, Krohn KJ (1988) Cell-mediated immune response toward viral envelope and core antigens in gibbon apes (Hylobates lar) chronically infected with human immunodeficiency virus-1. The Journal of Immunology 141:2467-2473
116. Maeda N, Fan H, Yoshikai Y (2008) Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. Reviews in Medical Virology 18:387-405
117. Manikwar P, Kiptoo P, Badawi AH, Buyuktimkin B, Siahaan TJ (2012) Antigen-specific blocking of CD4-specific immunological synapse formation using BPI and current therapies for autoimmune diseases. Med Res Rev 32:727-764
118. Mantegazza AR, Magalhaes JG, Amigorena S, Marks MS (2013) Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. Traffic 14:135-152
119. Manzke N, Akhmetzyanova I, Hasenkrug KJ, Trilling M, Zelinskyy G, Dittmer U (2013) CD4+ T cells develop antiretroviral cytotoxic activity in the absence of regulatory T cells and CD8+ T cells. J Virol 87:6306-6313
120. Mathan TS, Figdor CG, Buschow SI (2013) Human plasmacytoid dendritic cells: from molecules to intercellular communication network. Front Immunol 4:372
121. Matos ADR, Wunderlich K, Schloer S, Schughart K, Geffers R, Seders M, Witt M, Christersson A, Wiewrodt R, Wiebe K, Barth P, Hocke A, Hippenstiel S, Honzke K, Dittmer U, Sutter K, Rescher U, Rodionycheva S, Matera N, Ludwig S, Brunotte L (2019) Antiviral potential of human IFN-alpha subtypes against influenza A H3N2 infection in human lung explants reveals subtype-specific activities. Emerg Microbes Infect 8:1763-1776

122. Mattei F, Schiavoni G, Belardelli F, Tough DF (2001) IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. J Immunol 167:1179-1187
123. McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL (1988) The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. Science 241:1632-1639
124. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A (2015) Type I interferons in infectious disease. Nat Rev Immunol 15:87-103
125. Merkenschlager J, Ploquin MJ, Eksmond U, Andargachew R, Thorborn G, Filby A, Pepper M, Evavold B, Kassiotis G (2016) Stepwise B-cell-dependent expansion of T helper clonotypes diversifies the T-cell response. Nat Commun 7:10281
126. Messer RJ, Lavender KJ, Hasenkrug KJ (2014) Mice of the resistant H-2(b) haplotype mount broad CD4(+) T cell responses against 9 distinct Friend virus epitopes. Virology 456-457:139-144
127. Mildner A, Jung S (2014) Development and function of dendritic cell subsets. Immunity 40:642-656
128. Miyagi T, Gil MP, Wang X, Louten J, Chu WM, Biron CA (2007) High basal STAT4 balanced by STAT1 induction to control type 1 interferon effects in natural killer cells. J Exp Med 204:2383-2396
129. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H (2010) Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag
130. Moll HP, Maier T, Zommer A, Lavoie T, Brostjan C (2011) The differential activity of interferon-alpha subtypes is consistent among distinct target genes and cell types. Cytokine 53:52-59
131. Montoya M, Schiavoni G, Mattei F, Gresser I, Belardelli F, Borrow P, Tough DF (2002) Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. Blood 99:3263-3271
132. Moraga I, Harari D, Schreiber G, Uze G, Pellegrini S (2009) Receptor density is key to the alpha2/beta interferon differential activities. Mol Cell Biol 29:4778-4787
133. Moreau-Gachelin F, Tavitian A, Tambourin P (1988) Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. Nature 331:277-280
134. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C (2008) Janeway's immunobiology, 7th edn. Garland Science, New York
135. Nagai T, Devergne O, Mueller TF, Perkins DL, van Seventer JM, van Seventer GA (2003) Timing of IFN-beta exposure during human dendritic cell maturation and naive Th cell stimulation has contrasting effects on Th1 subset generation: a role for IFN-beta-mediated regulation of IL-12 family cytokines and IL-18 in naive Th cell differentiation. J Immunol 171:5233-5243
136. Nair SR, Zelinskyy G, Schimmer S, Gerlach N, Kassiotis G, Dittmer U (2010) Mechanisms of control of acute Friend virus infection by CD4+ T helper cells and their functional impairment by regulatory T cells. J Gen Virol 91:440-451
137. Nakayamada S, Poholek AC, Lu KT, Takahashi H, Kato M, Iwata S, Hirahara K, Cannons JL, Schwartzberg PL, Vahedi G, Sun HW, Kanno Y, O'Shea JJ (2014) Type I IFN induces binding of STAT1 to Bcl6: divergent roles of STAT family transcription factors in the T follicular helper cell genetic program. J Immunol 192:2156-2166
138. Nguyen KB, Cousens LP, Doughty LA, Pien GC, Durbin JE, Biron CA (2000) Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. Nat Immunol 1:70-76

139. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei X-q, Liew FY, Caligiuri MA, Durbin JE, Biron CA (2002) Coordinated and Distinct Roles for IFN-αβ, IL-12, and IL-15 Regulation of NK Cell Responses to Viral Infection. The Journal of Immunology 169:4279-4287
140. Nguyen KB, Watford WT, Salomon R, Hofmann SR, Pien GC, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Biron CA (2002) Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. Science 297:2063-2066
141. Noris M, Remuzzi G (2013) Overview of complement activation and regulation. Semin Nephrol 33:479-492
142. Novembre FJ, de Rosayro J, Nidtha S, O'Neil SP, Gibson TR, Evans-Strickfaden T, Hart CE, McClure HM (2001) Rapid CD4(+) T-cell loss induced by human immunodeficiency virus type 1(NC) in uninfected and previously infected chimpanzees. J Virol 75:1533-1539
143. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM (2015) The generation of antibody-secreting plasma cells. Nat Rev Immunol 15:160-171
144. O'Neil SP, Novembre FJ, Hill AB, Suwyn C, Hart CE, Evans-Strickfaden T, Anderson DC, deRosayro J, Herndon JG, Saucier M, McClure HM (2000) Progressive infection in a subset of HIV-1-positive chimpanzees. J Infect Dis 182:1051-1062
145. Osugi Y, Hara J, Tagawa S, Takai K, Hosoi G, Matsuda Y, Ohta H, Fujisaki H, Kobayashi M, Sakata N, Kawa-Ha K, Okada S, Tawa A (1997) Cytokine Production Regulating Th1 and Th2 Cytokines in Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. Blood 89:4100-4103
146. Padovan E, Spagnoli GC, Ferrantini M, Heberer M (2002) IFN-alpha2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8+ effector T cells. J Leukoc Biol 71:669-676
147. Parlato S, Santini SM, Lapenta C, Di Pucchio T, Logozzi M, Spada M, Giammarioli AM, Malorni W, Fais S, Belardelli F (2001) Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. Blood 98:3022-3029
148. Pedersen NC, Ho EW, Brown ML, Yamamoto JK (1987) Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. Science 235:790-793
149. Piehler J, Thomas C, Garcia KC, Schreiber G (2012) Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation. Immunol Rev 250:317-334
150. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC (1980) Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A 77:7415-7419
151. Püschel GP, Kühn H, Kietzmann T, Höhne W, Christ B (2011) Taschenlehrbuch Biochemie. Georg Thieme Verlag
152. Qin H, Wang L, Feng T, Elson CO, Niyongere SA, Lee SJ, Reynolds SL, Weaver CT, Roarty K, Serra R, Benveniste EN, Cong Y (2009) TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. J Immunol 183:97-105
153. Rahman F, Heller T, Sobao Y, Mizukoshi E, Nascimbeni M, Alter H, Herrine S, Hoofnagle J, Liang TJ, Rehermann B (2004) Effects of antiviral therapy on the cellular immune response in acute hepatitis C. Hepatology 40:87-97

154. Ramgolam VS, Sha Y, Jin J, Zhang X, Markovic-Plese S (2009) IFN-beta inhibits human Th17 cell differentiation. J Immunol 183:5418-5427
155. Ramos HJ, Davis AM, George TC, Farrar JD (2007) IFN-alpha is not sufficient to drive Th1 development due to lack of stable T-bet expression. J Immunol 179:3792-3803
156. Randall RE, Goodbourn S (2008) Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. J Gen Virol 89:1-47
157. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V (2011) Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. Annu Rev Immunol 29:163-183
158. Rincón M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA (1997) Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. J Exp Med 185:461-469
159. Rogge L, D'Ambrosio D, Biffi M, Penna G, Minetti LJ, Presky DH, Adorini L, Sinigaglia F (1998) The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs. J Immunol 161:6567-6574
160. Romagnani S (2000) T-cell subsets (Th1 versus Th2). Ann Allergy Asthma Immunol 85:9-18; quiz 18, 21
161. Roos G, Leanderson T, Lundgren E (1984) Interferon-induced cell cycle changes in human hematopoietic cell lines and fresh leukemic cells. Cancer Res 44:2358-2362
162. Rous P (1911) A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. J Exp Med 13:397-411
163. Rouzaut A, Garasa S, Teijeira A, Gonzalez I, Martinez-Forero I, Suarez N, Larrea E, Alfaro C, Palazon A, Dubrot J, Hervas-Stubbs S, Melero I (2010) Dendritic cells adhere to and transmigrate across lymphatic endothelium in response to IFN-alpha. Eur J Immunol 40:3054-3063
164. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol 155:1151-1164
165. Sandmann L, Schulte B, Manns MP, Maasoumy B (2019) Treatment of Chronic Hepatitis C: Efficacy, Side Effects and Complications. Visceral Medicine 35:161-170
166. Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T, Belardelli F (2000) Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. J Exp Med 191:1777-1788
167. Santini SM, Lapenta C, Donati S, Spadaro F, Belardelli F, Ferrantini M (2011) Interferon-α-conditioned human monocytes combine a Th1-orienting attitude with the induction of autologous Th17 responses: role of IL-23 and IL-12. PLoS One 6:e17364
168. Sareneva T, Matikainen S, Kurimoto M, Julkunen I (1998) Influenza A virus-induced IFN-alpha/beta and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma gene expression in human T cells. J Immunol 160:6032-6038
169. Sarrazin C, Berg T, Buggisch P, Dollinger MM, Hinrichsen H, Hofer H, Hüppe D, Manns MP, Mauss S, Petersen J, Simon KG, van Thiel I, Wedemeyer H, Zeuzem S (2015) Aktuelle Empfehlung zur Therapie der chronischen Hepatitis C. Z Gastroenterol 53:320-334
170. Saxena SK, Chitti SVP (2016) Molecular Biology and Pathogenesis of Retroviruses.

171. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J Leukoc Biol 75:163-189
172. Shein HM, Enders JF (1962) Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. Proc Natl Acad Sci U S A 48:1164-1172
173. Shinohara ML, Kim JH, Garcia VA, Cantor H (2008) Engagement of the type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin. Immunity 29:68-78
174. Singh RP, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi DT, Wong DT, Hahn BH, Hossain A (2014) Th17 cells in inflammation and autoimmunity. Autoimmun Rev 13:1174-1181
175. Smith DS, Guo K, Barrett BS, Heilman KJ, Evans LH, Hasenkrug KJ, Greene WC, Santiago ML (2011) Noninfectious retrovirus particles drive the APOBEC3/Rfv3 dependent neutralizing antibody response. PLoS Pathog 7:e1002284
176. Snell LM, Osokine I, Yamada DH, De la Fuente JR, Elsaesser HJ, Brooks DG (2016) Overcoming CD4 Th1 Cell Fate Restrictions to Sustain Antiviral CD8 T Cells and Control Persistent Virus Infection. Cell Rep 16:3286-3296
177. Srivastava S, Koch MA, Pepper M, Campbell DJ (2014) Type I interferons directly inhibit regulatory T cells to allow optimal antiviral T cell responses during acute LCMV infection. J Exp Med 211:961-974
178. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem 67:227-264
179. Sung H, Chang M, Saab S (2011) Management of Hepatitis C Antiviral Therapy Adverse Effects. Curr Hepat Rep 10:33-40
180. Super HJ, Brooks D, Hasenkrug K, Chesebro B (1998) Requirement for CD4(+) T cells in the Friend murine retrovirus neutralizing antibody response: evidence for functional T cells in genetic low-recovery mice. J Virol 72:9400-9403
181. Suresh R, Mosser DM (2013) Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. Adv Physiol Educ 37:284-291
182. Sutter K, Dickow J, Dittmer U (2018) Interferon alpha subtypes in HIV infection. Cytokine Growth Factor Rev 40:13-18
183. Svarovskaia ES, Cheslock SR, Zhang WH, Hu WS, Pathak VK (2003) Retroviral mutation rates and reverse transcriptase fidelity. Front Biosci 8:d117-134
184. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. Cell 140:805-820
185. Tanabe Y, Nishibori T, Su L, Arduini RM, Baker DP, David M (2005) Cutting edge: role of STAT1, STAT3, and STAT5 in IFN-alpha beta responses in T lymphocytes. J Immunol 174:609-613
186. Varol C, Mildner A, Jung S (2015) Macrophages: development and tissue specialization. Annu Rev Immunol 33:643-675
187. Villadangos JA, Young L (2008) Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. Immunity 29:352-361
188. Waisman A, Lukas D, Clausen BE, Yogev N (2017) Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. Semin Immunopathol 39:153-163
189. Way SS, Havenar-Daughton C, Kolumam GA, Orgun NN, Murali-Krishna K (2007) IL-12 and type-I IFN synergize for IFN-gamma production by CD4 T cells, whereas neither are required for IFN-gamma production by CD8 T cells after Listeria monocytogenes infection. J Immunol 178:4498-4505

190. Wiles S, Clare S, Harker J, Huett A, Young D, Dougan G, Frankel G (2004) Organ specificity, colonization and clearance dynamics in vivo following oral challenges with the murine pathogen Citrobacter rodentium. Cell Microbiol 6:963-972
191. Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ (2006) Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. Nature 441:890-893
192. Windmann S, Otto L, Hrycak CP, Malyshkina A, Bongard N, David P, Gunzer M, Dittmer U, Bayer W (2019) Infection of B Cell Follicle-Resident Cells by Friend Retrovirus Occurs during Acute Infection and Is Maintained during Viral Persistence. mBio 10
193. Woo ASJ, Kwok R, Ahmed T (2017) Alpha-interferon treatment in hepatitis B. Ann Transl Med 5:159
194. Yan N, Chen ZJ (2012) Intrinsic antiviral immunity. Nat Immunol 13:214-222
195. Yen JH, Kong W, Hooper KM, Emig F, Rahbari KM, Kuo PC, Scofield BA, Ganea D (2015) Differential effects of IFN-β on IL-12, IL-23, and IL-10 expression in TLR-stimulated dendritic cells. J Leukoc Biol 98:689-702
196. Yeow WS, Lawson CM, Beilharz MW (1998) Antiviral activities of individual murine IFN-alpha subtypes in vivo: intramuscular injection of IFN expression constructs reduces cytomegalovirus replication. J Immunol 160:2932-2939
197. Zelinskyy G, Dietze KK, Husecken YP, Schimmer S, Nair S, Werner T, Gibbert K, Kershaw O, Gruber AD, Sparwasser T, Dittmer U (2009) The regulatory T-cell response during acute retroviral infection is locally defined and controls the magnitude and duration of the virus-specific cytotoxic T-cell response. Blood 114:3199-3207
198. Zelinskyy G, Myers L, Dietze KK, Gibbert K, Roggendorf M, Liu J, Lu M, Kraft AR, Teichgraber V, Hasenkrug KJ, Dittmer U (2011) Virus-specific CD8+ T cells upregulate programmed death-1 expression during acute friend retrovirus infection but are highly cytotoxic and control virus replication. J Immunol 187:3730-3737
199. Zhang JM, An J (2007) Cytokines, inflammation, and pain. Int Anesthesiol Clin 45:27-37
200. Zhu J, Yamane H, Paul WE (2010) Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. Annual Review of Immunology 28:445-489

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
A	
Actb	Gen für β-Actin
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AIDS	Erworbenes Immundefizienz Syndrom (engl. *acquired immunodeficieny syndrome*)
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle (engl. a*ntigen presenting cell*)
APOBEC3	engl. *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3*
B	
Bcl6	engl. *B cell lymphoma protein 6*
BCR	B-Zell-Rezeptor (engl. *B cell receptor*)
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumin*)
bzw.	beziehungsweise
C	
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cART	engl. *combined antiretroviral therapy*
CCL	Chemokinrezeptor-Ligand
CCR	Chemokinrezeptor

CD	Nomenklatur für Zelloberflächenmoleküle (engl. *cluster of differentiation*)
cDC	konventionelle DC (engl. *conventional dendritic cell*)
cDNA	komplementäre DNA (engl. *complementary DNA*)
CFU	koloniebildenden Einheiten (engl. *colony forming units)*
CR	*Citrobacter rodentium*
CTL	Zytotoxischer T-Lymhozyt (engl. *cytotoxic T lymphocyte*)
CXCR	Chemokinrezeptor
D	
DAA	direkt antivirale Medikamente (engl. *direct-acting antivirals*)
DAUDI	B-Lymphoblasten-Zelllinie
DC	Dendritische Zelle (engl. *dendritic cell*)
DMEM	*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunokleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*)
ds	doppelsträngig
E	
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. e*thylenediaminetetraacetic acid*)
eGFP	engl. *enhanced green fluorescent protein*
eIF2α	engl. *eukaryotic initiation factor 2 alpha*
ELISA	engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*
env	Retrovirus-spezifisches Gen für Glykoproteine (engl. *envelope*)
EPO	Erythropoeitin
ER	Endoplasmatisches Retikulum

F

FACS	engl. *fluorescence activated cell sorting*
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fötales Kälberserum (engl. *fetal calf serum*)
FIV	Felines Immundefizienzvirus
F-MuLV	Friend murines Leukämie Virus
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*)
FV	Friend Retrovirus
FVD	Lebend-Tot-Farbstoff (engl. *fixable viability dye*)
fwd	engl. *forward*

G

g	Gramm
g	Gravitation
gag	Retrovirus-spezifisches Gen für gruppenspezifisches Antigen
GATA3	engl. *GATA Binding Protein 3*
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor (engl. *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*)

H

h	Stunde
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung (engl. *HEPES buffered saline*)
HBV	Hepatitis B Virus
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HRP	Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*)
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
I	
IC	engl. *infectious center*
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon-α/β-Rezeptor
IL	Interleukin
IRF	engl. *interferon regulatory factor*
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
ISGF3	engl. *interferon-stimulated gene factor 3*
ISRE	engl. *Interferon stimulated response element*
i.v.	intravenös
J	
JAK	Janus-Kinase
J2E	Erythroide Zelllinie
K	
kb	Kilobase
L	
L	Liter
LB	engl. *lysogeny broth*
LCMV	Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus
M	
µ	mikro
m	milli
M	Molar

MIIC	engl. *MHC class II compartment*
MACS	engl. *magnetic activated cell sorting*
MAPK	Mitogen-aktivierten Proteinkinasen
MDSC	engl. *myeloid derived suppressor cells*
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*)
min	Minuten
mRNA	engl. *messenger RNA*
MS	Multiple Sklerose
Mx	Myxovirus Resistenzproteine
N	
n	nano
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
O	
OAS	2,5-Oligoadenylatsynthetase
OD	optische Dichte
OVCAR-3	humane Ovarialzelllinie
P	
PAMP	pathogenassoziierte molekulare Muster (engl. *pathogen associated molecular patterns*)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. *phospate buffered saline*)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*)
PE	Phycoerythrin
Peg-IFN	Pegyliertes IFN

PerCP	engl. *Peridinin-chlorophyll-protein complex*
PD-1	engl. *Programmed cell death protein 1*
pDC	plasmazytoide DC (engl. *plasmacytoid dendritic cell*)
PD-L1	engl. *programmed cell death 1 ligand 1*
pH	negative dekadische Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration (lat. *potentia Hydrogenii*)
PIC	Präintegrationskomplex (engl. *pre-integration complex*)
PIL	Leberzelllinie (engl. *P53-immortalized-liver*)
PKR	Proteinkinase R
pol	Retrovirus-spezifisches Gen für die Polymerase
PRR	Mustererkennende Rezeptoren (engl. *pathogen recognition receptor*)
P/S	Penicillin/Streptomycin
Q	
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR (engl. *real-time quantitative PCR*)
R	
Rfv-3	engl. *recovery from Friend virus gene 3*
RAR	engl. *retinoic acid receptor*
Rev	engl. *reverse*
RIG-I	engl. *retinoic acid inducible gene I*
RNA	Ribonukleinsäure
RORγT	engl. *RAR (retinoic acid receptor)-related orphan receptor gamma T*
S	
s	Sekunden
SCID	engl. *severe combined immundeficient*

SD	Standardabweichung (engl. *standard deviation*)
SEA	Staphylokokken-Enterotoxin A
SFFU	engl. *spleen focus forming unit*
SFFV	engl. *spleen focus forming virus*
SFV	engl. *simian foamy virus*
SHP-1	*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
SK-H-NA	Hepatom-Zelllinie
SOC	engl. *super optimal broth with catabolite repression*
SPF	speziell pathogenfrei
spi-1	*SFFV provial integration site-1*
ss	einzelsträngig
SSC	Seitwärtstreulicht (engl. *sideward scatter*)
STAT	engl. *signal transducers and activators of transcription*
SVR	engl. *sustained virological response*
T	
T-bet	engl. *T-box expressed in T cells*
TCM	zentrale T-Gedächtniszellen (engl. *central memory T cells*)
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl. *T cell receptor*)
TCRtg	TCR-transgen
TEM	Effektor-T-Gedächtniszellen (engl. *effector memory T cells*)
T_{FH}	Follikuläre T-Helferzelle
TGF	engl. *Transforming growth factor*
T_H	T-Helferzelle
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (engl. *Toll-like receptor*)

TNF	Tumornekrosefaktor
T_{reg}	Regulatorische T-Zelle
TRAIL	engl. *tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing* ligand
TRIM	engl. *tripartite motif-containing protein*
TYK	Tyrosin-Kinase
V	
VSV	Vesikuläres Stomatitis-Virus
VT	Tag-it Violet™
W	
WISH	humane Embryonalzelllinie

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch APCs. 7
Abbildung 1-2: Schema der Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in verschiedene Effektor-T-Zellen. 8
Abbildung 1-3: Typ I IFN-Induktion und Typ I IFN-induzierte Signalwege. 12
Abbildung 1-4: Aufbau von Retroviren. 18
Abbildung 1-5: Replikationszyklus von Retroviren. 20
Abbildung 3-1: Schematische Darstellung eines FV-antigenspezifischen CD4⁺ T-Zell-Proliferationsassays. 47
Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers. 52
Abbildung 4-1: Vergleich verschiedener FV-Peptide zur Stimulation von CD4⁺ T-Zellen. 60
Abbildung 4-2: Quantifizierung transgener CD4⁺ T-Zellen aus EVa2- und EVa3-Mäusen. 61
Abbildung 4-3: Vergleich der CD4⁺ T-Zell-Proliferation in verschiedenen Modellen des CD4⁺ T-Zell-Proliferationsassays. 62
Abbildung 4-4: Analyse der CD4⁺ T-Zell-Proliferation nach konzentrationsabhängiger Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen. 64
Abbildung 4-5: Analyse der Proliferation und der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen IFNα Subtypen. 66
Abbildung 4-6: Repräsentative Gatingstrategie zur Analyse der Zytokinexpression von CD4⁺ T-Zellen im Proliferationsassay. 67
Abbildung 4-7: Analyse der Zytokinantwort von CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit IFNα Subtypen 69
Abbildung 4-8: Kinetische Analyse der CD4⁺ T-Zell-Proliferation und der Zytokinantwort nach Stimulation mit IFNα Subtypen. 71
Abbildung 4-9: Analyse verschiedener Zytokinkonzentrationen im Überstand des EVa2-Proliferationsassays nach Stimulation mit IFNα Subtypen. 73
Abbildung 4-10: Repräsentative Analyse der *in vitro* Differenzierung naiver CD4⁺ T Zellen in T_H17- und T_H2- Zellen. 75
Abbildung 4-11: Analyse der *in vitro* Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in T_H17- und T_H2- Zellen nach Stimulation mit IFNα Subtypen. 76

Abbildung 4-12: Vergleich direkter und indirekter Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen. 78
Abbildung 4-13: Vergleich direkter und indirekter Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf den Anteil IFNγ-, IL-2- und TNFα-exprimierender CD4⁺ T-Zellen..... 80
Abbildung 4-14: Analyse der IL-17a-Expression in DCs nach IFNα-Stimulation. 82
Abbildung 4-15: Analyse der IL-12/23p40-Expression in DCs nach IFNα Stimulation. 84
Abbildung 4-16: Kinetische Analyse der IL-23-Konzentration im CD4⁺ T-Zell-Proliferationsassay-Überstand nach Stimulation mit IFNα Subtypen..... 85
Abbildung 4-17: Kinetische Analyse der IL-17a-Konzentration im CD4⁺ T-Zell-Proliferationsassay-Überstand nach Stimulation mit IFNα Subtypen..... 86
Abbildung 4-18: Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf die Infektion mit FV. 89
Abbildung 4-19: Analyse der Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf die Anzahl von CD4⁺ T-Zellen während einer akuten FV-Infektion. 90
Abbildung 4-20: Analyse der Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf die Zytokinantwort von CD4⁺ T-Zellen in der Milz und im Knochenmark während einer akuten FV-Infektion. 92
Abbildung 4-21: Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf die Infektion mit *C. rodentium*..... 94
Abbildung 4-22: Phänotypische und histologische Untersuchung der Mäuse nach zehntägiger *C. rodentium* Infektion..... 96
Abbildung 4-23: Analyse der Effekte verschiedener IFNα Subtypen auf die Anzahl und die Zytokinantwort von CD4⁺ T-Zellen in der Milz während einer *C. rodentium*-Infektion. 98
Abbildung 4-24: Analyse der Zytokinkonzentration nach der Behandlung mit verschiedenen IFNα Subtypen während einer *C. rodentium*-Infektion..... 99

8.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Geräte ... 26
Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterial ... 27
Tabelle 2-3: Pufferlösungen ... 29
Tabelle 2-4: Nährmedien ... 30
Tabelle 2-5: Antikörper für Durchflusszytometrie ... 32
Tabelle 2-6: Sonstige Antikörper ... 33
Tabelle 2-7: Kommerzielle Standardtests ... 33
Tabelle 2-8: Rekombinante Zytokine ... 34
Tabelle 2-9: Wildtypmäuse ... 35
Tabelle 2-10: Transgene Mäuse ... 35
Tabelle 2-11: Viren ... 36
Tabelle 2-12: Zelllinien ... 36
Tabelle 2-13: Bakterien ... 37
Tabelle 2-14: Plasmide ... 37
Tabelle 2-15: Oligonukleotide ... 38
Tabelle 2-16: Software ... 38
Tabelle 3-1: Antikörper und Zytokine für die *in vitro* Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen ... 46
Tabelle 3-2: Protokoll für die qRT-PCR. ... 56

8.4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei euch allen herzlichst bedanken. Ganz besonders bei Kathrin und Ulf dafür, dass ich am Institut für Virologie promovieren durfte. Liebe Kathrin, dir gilt ganz besonderer Dank für die unschätzbar wertvollen Ideen und die Unterstützung. Danke, dass du dir immer Zeit genommen hast und ein offenes Ohr hattest.

Liebe AG Sutter: "It's very important to like the people you work with, otherwise life [and] your job is gonna be quite miserable." - Elon Musk.
In diesem Sinne, vielen Dank für die tatkräftige Hilfe, die netten Gespräche und die tolle Zeit mit euch.

Liebe AG Dittmer, ich danke euch für die oft sehr tatkräftige Unterstützung.

Ich möchte Prof. Astrid Westendorf und Vittoria Palmieri für die große Unterstützung beim *Citrobacter rodentium*-Versuch danken.

Einen herzlichen Dank auch den Korrekturleserinnen und Korrekturlesern.

Und zu guter Letzt danke ich meiner Ehefrau Julia. Danke, dass du mich immer unterstützt, mir den Rücken stärkst und mich immer aufmunterst.

8.5. Lebenslauf

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

8.6. Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zu Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____ _____

Rouven-Luca Kaiserling

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie 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/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____ _____

Rouven-Luca Kaiserling

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema “Interferon-α Subtypen modulieren Friend Retrovirus-spezifische CD4+ T-Zell-Antworten“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Rouven-Luca Kaiserling befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

_____

Name des Mitglieds der Universität Duisburg-Essen in Druckbuchstaben

Essen, den _____ _____

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen