

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar – Direktor: Prof. Dr. Roland M. Schmid

Funktion von IRF3 und IRF7 im Infektionsmodell mit murinem Zytomegalievirus

Christian Steinberg

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation

1. Priv.-Doz. Dr. A. Krug
2. Univ.-Prof. Dr. H. Schätzl
3. Prof. Dr. U. Koszinowski

Die Dissertation wurde am 04.06.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.09.2008 angenommen.

meinen Eltern in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. EINLEITUNG	1
1.1 IRFs: zentrale Transkriptionsfaktoren für die Induktion von Typ I IFN	1
1.2 Zytokine der antiviralen Immunantwort	7
1.3 Das MCMV-Infektionsmodell	12
1.4 Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit	16
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Material	17
2.1.1 Zelllinien, Viren, Bakterien.....	17
2.1.2 Medien, Reagentien, Antikörper.....	17
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	23
2.2 Methoden	26
2.2.1 Zelllinien und Primärzellen.....	26
2.2.2 Viren.....	30
2.2.3 Tierversuche.....	32
2.2.4 Molekularbiologische Methoden	33
2.2.5 Immunologische Methoden.....	43
3. ERGEBNISSE	50
3.1 Funktion von IRF1, IRF3 und IRF7 für die Interferoninduktion durch MCMV in myeloiden DC	50
3.2 Kinetik der Typ I IFN Antwort nach MCMV-Infektion in IRF3 ^{-/-} , IRF7 ^{-/-} und IRF3/7 ^{-/-} Mäusen	54
3.3 Kinetik der IFN- γ und IL-12p40 Produktion in MCMV-infizierten WT und IRF- Knockout Mäusen	55
3.4 Funktion von IRF3 und IRF7 für die frühe systemische Zytokinantwort im MCMV Infektionsmodell	58

3.5 Einfluß von IRF3 und IRF7 auf die transkriptionelle Regulation der frühen Zytokinexpression in Milz und Leber bei der MCMV-Infektion	60
3.6 Vergleich der Aktivierung dendritischer Zellen (WT, IRF3 ^{-/-} , IRF7 ^{-/-}) durch MCMV	63
3.7 Bedeutung von IRF3 und IRF7 für die NK-Zellfunktion bei MCMV-Infektion	67
<i>Vergleich der CD69 Expression und IFN-γ Produktion in NK-Zellen MCMV-infizierter WT, IRF3^{-/-}, IRF7^{-/-} Mäuse</i>	<i>67</i>
<i>Analyse der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen ex vivo in MCMV-infizierten WT und IRF7^{-/-} Mäusen</i>	<i>73</i>
3.8 Einfluß von IRF3 und IRF7 auf Morbidität, Mortalität und Virusreplikation im MCMV-Modell	75
3.10 Untersuchung der Rolle von IFN- λ als antiviraler Faktor bei systemischer MCMV-Infektion	79
4. DISKUSSION	82
5. ZUSAMMENFASSUNG	95
LITERATURVERZEICHNIS	98
EIGENE PUBLIKATIONEN	109
DANKSAGUNG	110
LEBENS LAUF	111

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
γ	gamma
λ	lambda
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
^{51}Cr	Chromium, radioaktives Chrom
A	Adenin
A_{260}	Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm
Ab	<i>antibody</i> , Antikörper
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-)-Schwefelsäure
APC	Allophycocyanin
APC	antigenpräsentierende Zelle
armen.	armenisch
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BD	Becton Dickinson
bio	biotinyliert
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CH	Schweiz
chin.	chinesisch
CHO	<i>chinese hamster ovarian cells</i>
cm^2	Quadratcentimeter
CO_2	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CT	<i>cycle threshold</i>
CTL	<i>cytolysis</i> , Zytolyse
D	Deutschland
DC	<i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DK	Dänemark
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
D-MEM	Dulbecco's MEM
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'triphosphat
dsRAD	doppelstränge RNA spezifische Adenosin Deaminase
DTT	Dithiotreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
E:T	<i>effector-target ratio</i> , Verhältnis Effektorzellen zu Zielzellen
EDTA	Ethylendiamintetracetat

ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
et al.	und andere
FACS	<i>fluorescence activated cell-sorting</i> , Durchflußzytometrie
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fötales Rinderserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
g	Gramm
GMCSF	Granulozyten-/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-2-peperazinethansulfonsäure
HRP	<i>horse-radish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSV-1	Herpes simplex Virus Typ 1
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i> , induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase
IP-10	Chemokin CXCL-10
IPTG	Isopropyl-βD-thiogalactopyranosid
IRAK1	<i>IL-1R-associated kinase</i>
IRF	Interferon regulierender Faktor
J	Japan
JAK	Janus Kinase
K	Kalium
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria Bertoni
Lsg.	Lösung
M	Molar
MACS	<i>magnetic cell sorting</i> , Magnetische Zellsortierung
mCi	Milli Curie
MCMV	murines Zytomegalievirus
MEFs	murine embryonale Fibroblasten
MEM	Modified Eagle Medium
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mol	Mol
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
n	Nano

N	Normal
N/A	<i>not available/applicable</i> , nicht verfügbar/anwendbar
Na	Natrium
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NCS	<i>newborn calf serum</i> , Neugeborenes Kälber Serum
NDV	<i>Newcastle Disease Virus</i> , Newcastle-Krankheit Virus
NEAA	<i>non-essential amino acids</i> , nicht-essentielle Aminosäuren
ng	Nanogramm
NKT-Zelle	natürliche Killer T-Zelle
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NL	Niederlande
nm	Nanometer
NP40	Nonylphenoxypolyethoxyethanol
Nr.	Nummer
O/N	<i>over night</i> , über Nacht
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>plaque forming unit</i> , plaquebildende Einheit
pg	Pikogramm
p. i.	<i>post infectionem</i> , nach Infektion
PI	Propidiumiodid
Poly I:C	<i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>
qRT-PCR	quantitative Real-time PCR
RD	<i>reagent diluent</i> , Reaktionspuffer für ELISA
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time PCR
SA	Streptavidin
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
STAT	<i>Signal Transduction and Activation of Transcription</i>
syr.	syrisch
TA	Thymidin-Adenin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TRAF6	<i>TNFR-associated factor 6</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-β</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween [®] 20	Polyethylenglykol-sorbitan-monolaurat
U	<i>unit</i> , Einheit

u.a.	unter anderem
ÜS	Überstand
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
Z	Zellen
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Virusinfektionen gehören zu den weltweit häufigsten Infektionskrankheiten und stellen aufgrund ihres intrazellulären Tropismus und ihrer Immunevasions-Mechanismen eine besondere Herausforderung für das Immunsystem dar. Bei einer Erstinfektion werden Viruserkennung und antivirale Mechanismen zunächst von Zellen des unspezifischen Immunsystems vermittelt. Die Viruserkennung erfolgt dabei mit Hilfe spezifischer Rezeptoren, deren Aktivierung zur Induktion von antiviralen Interferonen (IFN) und inflammatorischen Zytokinen führt. Diese üben direkte antivirale und immunregulatorische Funktionen aus. Eine suffiziente Viruserkennung und intakte Zytokinproduktion durch das unspezifische Immunsystem ist die Voraussetzung für die Einschränkung der Virusdissemination in der Frühphase der Infektion und die nachfolgende Aktivierung der adaptiven Immunantwort.

In der vorliegenden Arbeit wurden antivirale Mechanismen der unspezifischen Immunität in einem akuten Mausinfektionsmodell mit dem Mauspathogen murines Zytomegalievirus (MCMV) untersucht. Dendritische Zellen (DC) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind die wichtigsten Zelltypen in der Frühphase der Virusinfektion. Die initiale Viruserkennung erfolgt vor allem durch DC mit Hilfe von Mustererkennungsrezeptoren (Toll-like-Rezeptoren und zytosolische RNA-bindende Helikasen). Zu den wichtigen Zytokinen in dieser Phase zählen die antiviral wirksamen Interferone und proinflammatorische Zytokine und Chemokine, insbesondere IL-12, IL-18, IL-15, MIP-1 α u. a. Einleitend soll zunächst ein Überblick über die IFN-regulierenden Faktoren (IRFs) als zentrale Transkriptionsfaktoren zur IFN-Induktion gegeben und die theoretischen Grundlagen des verwendeten MCMV-Infektionsmodells erörtert werden.

1.1 IRFs: zentrale Transkriptionsfaktoren für die Induktion von Typ I IFN

Die Viruserkennung durch das angeborene Immunsystem erfolgt auf molekularer Ebene über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs). Diese Rezeptoren erkennen phylogenetisch konservierte molekulare Komponenten von Mikroben und Viren, die als „pathogenassoziierte molekulare Muster“ (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) bezeichnet und vom Pathogen während seines gesamten Lebenszyklus expri-

miert werden. Im Falle der Viren erkennen diese Rezeptoren intrazelluläre virale RNA oder virale DNA. PRRs werden konstitutiv exprimiert, und unterliegen im Gegensatz zu Immunglobulinen, T-Zellrezeptoren und MHC-Proteinen keiner somatischen Rekombination. An der Viruserkennung durch das unspezifische Immunsystem sind sowohl die Toll-like Rezeptoren (TLRs) als auch die zytosolischen RNA-bindende Helikasen „*retinoic acid inducible gene 1*“ (RIG-I) und „*melanoma differentiation-associated gene 5*“ (Mda-5) beteiligt (Akira et al. 2006, Kawai et al. 2006, Kawai et al. 2007)

Die Induktion von Typ I IFN nach Aktivierung von TLRs oder zytosolischen RNA-bindende Helikasen wird durch IFN-regulierende Faktoren (IRFs) reguliert. IRFs repräsentieren eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, zu deren Zielgenen neben Typ I IFN auch zahlreiche andere Gene mit immunologischen Funktionen gehören (z. B. Chemokine, Interleukine). Derzeit sind im Säugerorganismus neun verschiedene IRFs bekannt mit teils stimulierender teils inhibierender Wirkung auf die Genexpression. Im inaktiven Zustand sind IRFs überwiegend im Zytoplasma lokalisiert (Honda et al. 2006). Die IRF-Proteine haben mehrere funktionelle Domänen. Von besonderer Bedeutung ist dabei zum einen die N-terminale DNA-Bindungsdomäne (DBD) aus ca. 120 Aminosäuren. Diese bilden ein sogenanntes Helix-Turn-Helix-Motif, das DNA-Konsensussequenzen, die als IFN-stimulierte Antwortelemente (*IFN-stimulated response elements*, ISRE) bezeichnet werden, erkennt und bindet. Am C-Terminus befindet sich eine IRF-Assoziationsdomäne (IAD), die Homo-/Heterodimerisierung und regulatorische Funktionen vermittelt (Eroshkin et al. 1999). Die Aktivierung der IRFs erfolgt durch C-terminale Phosphorylierung, die zur Bildung von Homodimeren oder Heterodimeren mit nachfolgender Translokation in den Nukleus führt. IRF3, IRF4, IRF5 und IRF7 besitzen eine Transaktivierungsdomäne, die im unstimulierten Zustand durch intramolekulare autoinhibitorische Strukturen geblockt ist (Brass et al. 1996, Lin et al. 1999b, Lin et al. 2000, Au et al. 2001, Barnes et al. 2002).

Im Rahmen der antiviralen Immunantwort konnte insbesondere für IRF3 und IRF7, aber auch für IRF1 und IRF5 Funktionen für die Induktion von IFN- α - β Genen nachgewiesen werden (Mamane et al. 1999, Taniguchi et al. 2001, Honda et al. 2006).

1999b). Inaktive IRF3 Monomere unterliegen einer ständigen aktiven Translokation zwischen Zellkern und Zytoplasma, die über zwei konstitutiv aktive funktionelle Regionen im IRF3-Protein vermittelt wird. Die Aminosäuresequenzen dieser Regionen fungieren dabei als nukleäres Lokalisationsignal (NLS) und als nukleäre Exportsequenz (NES) (Abb.2) und interagieren mit zytoplasmatischen und nukleären Transportproteinen (Yoneyama et al. 1998, Kumar et al. 2000). In der uninfizierten Zelle dominiert der Export aus dem Zellkern, so daß inaktives IRF3 fast ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert ist (Kumar et al. 2000). Durch Phosphorylierung C-terminaler spezifischer Serinreste wird IRF3 aktiviert und reguliert (Lin et al. 1999b, Suhara et al. 2000, Servant et al. 2003, Mori et al. 2004, Abe et al. 2005). Die Aktivierung von IRF3 (Abb. 1) erfolgt in zytoplasmatischen wie TLR-abhängigen Signalwegen primär über die TANK-bindende Kinase 1 (TBK-1) (McWhirter et al. 2004). Bei zytoplasmischer und TLR3-TRIF vermittelter Viruserkennung ist an der IRF3-Aktivierung neben TBK-1 auch IKK ϵ (Sharma et al. 2003, Fitzgerald et al. 2003, Hemmi et al. 2004) beteiligt. Aktiviertes IRF3 bildet Homodimere oder Heterodimere mit IRF7 (Lin et al. 1999b, Lin et al. 2000, Au et al. 2001). Diese Dimere assoziieren nach Translokation in den Nukleus mit den Koaktivatoren CREB-bindendes Protein (CBP) und p300 (Yoneyama et al. 1998), was zur nukleären Retention von IRF3 und Hemmung des NES vermittelten Exportes in das Zytoplasma führt (Yoneyama et al. 1998, Lin et al. 1999b). Im Gegensatz zu IRF7 besitzt phosphoryliertes IRF3 keine intrinsische Transkriptionsaktivität, sondern induziert erst nach Assoziation mit CBP/p300 die Transkription von Zielgenen (Yang et al. 2002). Zielgene des Holokomplexes aus IRF3 und CBP/p300 sind u. a. Typ I IFN (IFN- β , IFN- α 4) (Sakaguchi et al. 2003) und Chemokine (CXCL9, CXCL10 und CCL5) (Lin et al. 1999a, Nakaya et al. 2001). Die IRF3-vermittelte Genexpression soll dabei durch die Art der Dimerisierung beeinflusst sein, indem das IRF3-Homodimer vor allem das Chemokin CXCL10 und das IRF3/IRF7-Heterodimer IFN- β und in geringerem Maße IFN- α 4 induziert (Honda et Taniguchi 2006). Eine isolierte Bedeutung von IRF3 für die antivirale IFN-Antwort konnte *in vivo* für die Infektion mit EMCV und *in vitro* in NDV infizierten MEFs nachgewiesen werden (Sato et al. 2000). In dendritischen Zellen ist die Bedeutung von IRF3 für die IFN-Induktion in den einzelnen Subpopulationen unterschiedlich. Während die IFN-Induktion in plasmazytoiden und myeloiden DC vollständig unabhängig von IRF3 ist, zeigen IRF3-defiziente murine embryonale Fibroblasten (MEFs) auf mRNA-Ebene für IFN- α eine mäßige und für IFN- β eine ausgeprägte Reduktion auf verschiedene virale Stimuli (Honda et al. 2005). Die Bedeutung von IRF3 für die Induktion von Typ I IFN bei der MCMV-Infektion wurde bislang nicht untersucht.

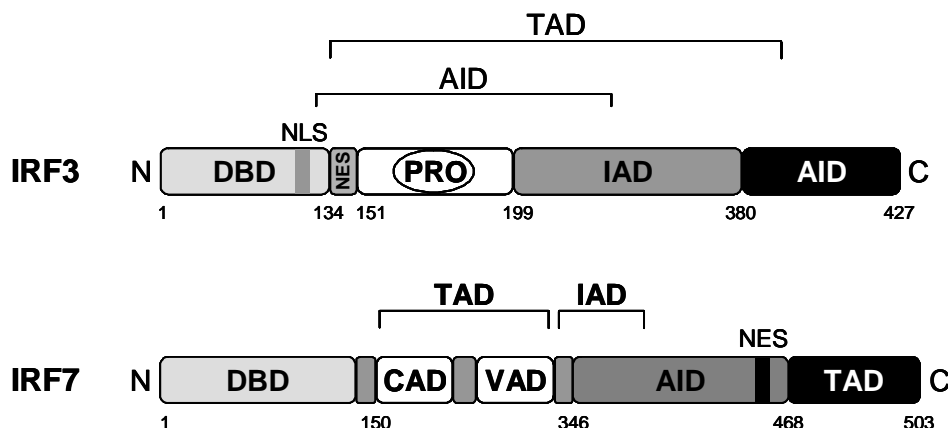


Abb. 2. Schematische Darstellung von IRF3 und IRF7.

DBD = DNA-Bindungsdomäne; AID = Autoinhibitorische Domäne; TAD = Transaktivierungsdomäne; IAD = IRF-Assoziationsdomäne; PRO = prolinreiche Sequenz; CAD = konstitutiv aktive Domäne; VAD = virusaktivierte Domäne; NLS = nukleäres Lokalisationssignal; NES = nukleäre Exportsequenz

IRF7 zeigt von allen anderen IRFs auf Sequenzebene die größte Homologie zu IRF3 (Nguyen et al. 1997). Ähnlich wie bei IRF3 sind auch bei IRF7 mehrere regulatorische Domänen zu unterscheiden. IRF7 besitzt eine zweigeteilte Transaktivierungsdomäne, die eine einzelne autoinhibitorische Domäne (AID) einschließt (Abb. 2) (Marie et al. 2000). In dem dem N-Terminus benachbarten Abschnitt der Transaktivierungsdomäne sind eine konstitutiv aktive Domäne (CAD) und eine virus-aktivierte Domäne (VAD) zu unterscheiden (Abb. 2) (Lin et al. 2000). Innerhalb der autoinhibitorischen Domäne wurde eine NES-Sequenz identifiziert (Abb. 2) (Lin et al. 2000), deren Beteiligung am Export aus dem Zellkern bislang jedoch nicht eindeutig geklärt ist (Marie et al. 2000). Die IRF-Assoziationsdomäne überlappt teilweise mit der AID (Lin et al. 2000).

Im Gegensatz zu IRF3 muß IRF7 in den meisten Zellen erst durch Typ I IFN induziert werden, das bei Virusinfektionen oder bestimmten bakteriellen Infektionen produziert wird. Eine stark konstitutive IRF7-Expression findet sich ausschließlich in plasmazytoiden DC (Izaguirre et al. 2003, Kerkmann et al. 2003). Dieses Ergebnis konnte in eigenen Untersuchungen für murine plasmazytoide DC bestätigt werden. Durch alternatives Spleißen mit Deletion von Sequenzabschnitten der Transaktivierungsdomäne entstehen in murinen Zellen drei Isoformen von IRF7 (IRF7 α , IRF7 β , IRF7 γ) mit unterschiedlich starker Transkriptionsaktivität für Typ I IFN. IRF7 γ besitzt keine Transaktivierungsfunktion und inhibiert die IFN-Induktion durch IRF7 α und IRF7 β (Marie et al. 2000). Die Regulierung der IRF7-Expression erfolgt auf zwei Ebenen. Auf Transkriptionsebene wird IRF7 durch Typ I IFN oder Lipopolysaccharid (LPS)

induziert. Die Regulierung der Transaktivierungsfunktion erfolgt im Rahmen der virusinduzierten Aktivierung von IRF7. Diese besteht in einer Phosphorylierung spezifischer C-terminaler Serinreste (tenOever et al. 2004, Caillaud et al. 2005), was zur Hemmung der autinhibitorischen Domäne und stabilen Homodimerisierung oder Heterodimerisierung mit IRF3 führt (Marie et al. 2000, Lin et al. 2000a). Phosphoryliertes IRF7 akkumuliert daraufhin im Zellkern und aktiviert die Transkription von IFN α und IFN β (Marie et al. 2000). Im Gegensatz zu IRF3 besitzt IRF7 eine intrinsische Transkriptionsaktivität, die durch Interaktion mit den Koaktivatoren CBP/p300 zusätzlich gesteigert wird (Yang et al. 2003). Die IRF7-Aktivierung erfolgt über MyD88-abhängige und –unabhängige Signalwege. Eine MyD88-unabhängige Aktivierung von IRF7 konnte für den RIG-I/Mda-5-Signalweg und den TRIF-abhängigen Signalweg gezeigt werden (Sharma et al. 2003, Kawai et al. 2005). Für die TLR/MyD88-vermittelte Aktivierung von IRF7 wurden in verschiedenen Studien eine direkte Interaktion zwischen MyD88 und TRAF6 mit IRF7 nachgewiesen, die zur Entstehung eines supramolekularen Komplexes unter Beteiligung von IRAK-1/IRAK-4 führt (Honda et al. 2004, Kawai et al. 2004). Es wurde gezeigt, daß IRAK-1, IKK α und Osteopontin-i an der Phosphorylierung von IRF7 essentiell auf bisher nicht eindeutig geklärte Weise beteiligt sind (Uematsu et al. 2005, Hoshino et al. 2006, Shinohara et al. 2006). Eine weiterer wichtiger Faktor zur Aktivierung von IRF7 aber auch IRF3 ist TRAF3, das mit MyD88 und IRAK1 interagiert (Oganesyan et al. 2006, Hacker et al. 2006). Honda et al. (2005) konnten zeigen, daß IRF7 sowohl in MyD88-abhängigen als auch in MyD88–unabhängigen Signalwegen der zentrale Transkriptionsfaktor für die Induktion von IFN- α und IFN- β in plasmazytoiden DC und myeloiden DC ist. IRF7-Defizienz führt auf transkriptioneller Ebene und Proteinebene zum vollständigen Verlust der Typ I IFN-Antwort auf verschiedene Viren (HSV, VSV, EMCV). Daraus resultiert eine deutlich gesteigerte Mortalität bei systemischen Infektionen mit HSV und EMCV. Darüber hinaus beeinträchtigt das Fehlen von IRF7 die Induktion einer spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort, die u. a. durch Typ I IFN unterstützt wird. Zusammenfassend ergibt sich für IRF7 die Rolle eines „*master regulator*“ (Honda et al. 2005) für die Induktion von Typ I IFN und IFN-induzierten Genen, die sowohl für die unspezifische als auch für die adaptive Immunität eine wichtige Rolle spielen. Die Bedeutung von IRF7 bei der systemischen MCMV-Infektion wurde bisher noch nicht untersucht.

Die Rolle von **IRF1** und **IRF5** als Transkriptionsfaktoren für die Induktion von Typ I IFN ist zelltypspezifisch. IRF1 ist essentiell zur Induktion von IFN- β im TLR9-Signalweg von mye-

loiden DC und Makrophagen. Dabei kommt es zur direkten Interaktion zwischen IRF1 mit MyD88 und IRAK1 (Negishi et al. 2006, Schmitz et al. 2007). Eine antivirale Rolle für IRF1 wurde für die Infektion mit modifiziertem Vaccinia Virus Ankara (MVA) und die Infektion mit murinem γ -Herpesvirus 68 (MHV-68) gezeigt (Schmitz et al. 2007).

IRF5 ist essentiell für die TLR/MyD88-vermittelte Induktion von inflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-12p40 und TNF- α) in Makrophagen, myeloiden DC und plasmazytoiden DC. Dabei zeigt IRF5 ähnlich wie IRF7 eine direkte Interaktion mit MyD88 und TRAF6 (Takaoka et al. 2005). Eine IRF5-abhängige Produktion von Typ I IFN konnte in Milzmakrophagen VSV- oder HSV-1-infizierter Mäuse gezeigt werden (Yanai et al. 2007).

1.2 Zytokine der antiviralen Immunantwort

IFN- α /IFN- β (Typ I IFN)

Typ I Interferone sind die zentralen Zytokine der antiviralen Immunantwort und werden im Rahmen einer Virusinfektion induziert (Garcia-Sastre et al. 2006, Stetson et Medzhitov 2006b). Die zentralen Typ I Interferone sind IFN- α und IFN- β , während IFN- ϵ , - κ , und IFN- ω , - eine untergeordnete Rolle spielen. Typ I IFN kann durch Virusinfektion in nahezu allen Zellen eines Säugerorganismus induziert werden (Takaoka et al. 2006), und repräsentiert dadurch einen universellen Schutzmechanismus im Rahmen der antiviralen Immunantwort. Dabei vermittelt sezerniertes IFN antivirale Effekte in autokriner, parakriner und endokriner Weise. Antivirale Effekte in Nicht-Immunzellen zielen primär auf Hemmung der Virusreplikation oder Apoptoseinduktion ab (Stark et al. 1998). Die zelluläre Blockierung der Virusreplikation erfolgt über Effektorproteine. Zu den klassisch unspezifischen Effektorproteinen gehören die 2'-5'-Oligoadenylatsynthase (OAS) und die durch doppelsträngige RNA (dsRNA) aktivierte Proteinkinase R (PKR). OAS aktiviert über 2'-5'-Oligoadenylat die zelluläre RNaseL mit nachfolgender Degradation viraler und zellulärer RNA (Stark et al. 1998). PKR hingegen bewirkt eine vollständige Translationsblockade für zelluläre und virale mRNA. Spezifisch protektive Effekte gegen Influenza und VSV konnten für die Mx Proteine nachgewiesen werden (Arnheiter et al. 1990, Pavlovic et al. 1993).

Neben direkten protektiven Effekten reguliert und koordiniert Typ I IFN auch die Funktion verschiedener Zellpopulationen des Immunsystems wie NK-Zellen (Lee et al. 2000, Nguyen

et al. 2000), CD8⁺ T-Zellen (Le Bon et al. 2003), DC (Dalod et al. 2003) und B-Lymphozyten. Die Signaltransduktion von Typ I IFN erfolgt über den gemeinsamen IFN- α / β Rezeptor, der aus zwei verschiedenen Untereinheiten (IFNAR1 und IFNAR2) besteht. Bindung von Typ I IFN an die Rezeptoruntereinheiten führt zur Dimerisierung und Einleitung der Signaltransduktion durch Autophosphorylierung der Janus aktivierten Kinasen TYK2 und JAK1, die konstitutiv mit den Rezeptoruntereinheiten assoziiert sind und verschiedene STAT Proteine aktivieren. Im klassischen Signalweg zur Induktion IFN-abhängiger Gene assoziieren sich aktiviertes STAT1 und STAT2 zusammen mit IRF9 zu einem Transkriptionskomplex (ISGF3), der nach Kerntranslokation an ISREs in der Promotorregion von IFN-induzierbaren Genen bindet (Platanias et al. 2005). Für die positive Feedback-Regulation von Typ I IFN im Rahmen einer Virusinfektion wird von Honda und Taniguchi (2006) ein zweistufiges Modell vorgeschlagen. Initial führt dabei die Aktivierung von gering konstitutiv exprimiertem IRF7 zur Induktion geringer Mengen von IFN- α / β und Chemokinen. Dieses initial gebildete IFN bindet in auto- und parakriner Weise an den IFN- α / β Rezeptor und induziert über die beschriebene Signaltransduktion das volle Spektrum der IFN-induzierbaren Gene und die zweite Welle von Typ I IFN.

IFN- γ (Typ II IFN)

Im Gegensatz zu Typ I IFN wird IFN- γ nicht von allen virusinfizierten Zellen allgemein, sondern von spezialisierten Zellen des Immunsystems (NK-Zellen, T-Zellen, NKT-Zellen, Makrophagen) gebildet (Boehm et al. 1997). Die Signaltransduktion wird ähnlich wie bei Typ I IFN über einen heterodimeren Transmembranrezeptor vermittelt, der aus den Untereinheiten IFNGR1 (α -Kette) und IFNGR2 (β -Kette) besteht (Bach et al. 1997, Pestka et al. 1997). Jede Untereinheit ist dabei konstitutiv mit einer Januskinase assoziiert – IFNGR1 mit JAK1 und IFNGR2 mit JAK2 (Igarashi et al. 1994). Bindung eines IFN- γ -Homodimers an zwei α -Ketten führt zur α -Dimerisierung mit nachfolgender Rekrutierung der β -Ketten und Bildung eines Doppelheterodimers (Greenlund et al. 1993). Die assoziierten JAK-Kinasen phosphorylieren daraufhin spezifische Tyrosinreste im zytosolischen Teil der α -Ketten, die daraufhin STAT1 und STAT2 aktivieren. Im klassischen IFN- γ Signalweg assoziiert aktiviertes STAT1 zu einem Homodimer. Dieser auch als gamma-aktivierender Faktor (GAF) bezeichnete Transkriptionskomplex bindet nach Translokation in den Nukleus an gamma-aktivierende Stellen (GAS) in der Promotorregion von IFN- γ induzierbaren Genen (Boehm et al. 1997,

Takaoka et al. 2006). GAS-induzierte Gene sind vor allem Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie (IRF1, IRF2, IRF8, IRF9) sowie das Klasse II Transaktivator Protein (CIITA) (Boehm et al. 1997). Von zentraler Bedeutung ist dabei IRF1, das durch Induktion klassischer antiviraler Proteine die direkte antivirale Wirkung von IFN- γ vermittelt. IRF1-induzierte Effektorproteine sind in diesem Zusammenhang PKR, dsRNA spezifische Adenosin-Deaminase (dsRAD) und induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase. (iNOS) (Boehm et al. 1997). Eine antivirale Wirkung von NO konnte bei Herpes simplex Infektionen (Karupiah et al. 1993) und MCMV Infektionen (Tay et al. 1997, Noda et al. 2001) beobachtet werden. Verschiedene Zytokine sind an der Regulation der IFN- γ -Expression beteiligt. Neben einem positiven Auto-feedback erfolgt die Induktion von IFN- γ vor allem durch IL-12 (Trinchieri et al. 2003) und IL-18 (Gracie et al. 2003). IL-12 und IFN- γ induzieren sich dabei in reziproker Weise (Yoshida et al. 1994, Lederer et al. 1996).

IFN- λ (Typ III IFN)

Neben Typ I und Typ II IFN ist seit einigen Jahren auch die Gruppe der ebenfalls antiviral wirksamen Typ III Interferone bekannt. Sie umfaßt IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A) und IFN- λ 3 (IL-28B), die zur Familie der IL-10-verwandten Zytokine gehören. In der Maus konnten bislang nur orthologe Gene für IFN- λ 2 und IFN- λ 3 identifiziert werden (Bartlett et al. 2005). Alle drei λ -Interferone binden an einen identischen heterodimeren Rezeptor, der aus der IL10R2-(IL-10R β , CRF2-4) Untereinheit des IL-10 Rezeptors und der IFN- λ -spezifischen Untereinheit IFNLR1 (IL-28R α , CRF2-12) besteht (Kotenko et al. 2003, Sheppard et al. 2003). Die IL10R1-Untereinheit zeigt eine ubiquitäre Expression, wohingegen die IFNLR1 nur von bestimmten Zelltypen exprimiert wird. Zu diesen zählen vor allem gastrointestinale Tumorzelllinien (Meager et al. 2005) aber auch DC (Melchjorsen et al. 2006).

Rezeptoraktivierung führt zur Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges mit Phosphorylierung von STAT1 bis STAT5 (Kotenko et al. 2003, Dumoutier et al. 2004). Wie Typ I IFN induziert auch die IFN- λ -vermittelte Signaltransduktion die Assoziation des ISGF3 Transkriptionskomplexes und Expression von 2'-5'-OAS und MxA Protein (Jordan et al. 2007). Dabei zeigt die Kinetik der IFN- λ -vermittelten STAT1/STAT2-Phosphorylierung und Transkription von IFN-stimulierten Genen (ISGs) jedoch Unterschiede zu Typ I IFN (Marcello et al. 2006). Die Aktivierung des IFN- λ -Rezeptors resultiert außerdem in einer Phosphorylierung von

MAP-Kinasen und Akt, was die Involvierung weiterer Signalwege nahelegt (Brand et al. 2005).

λ -Interferone gehören zu den durch IFN- α / β induzierbaren Genen, können aber auch durch TLR-Liganden oder direkt durch Viren induziert werden (Coccia et al. 2004). Die Regulation von IFN- λ weist große Ähnlichkeiten zu Typ I IFN auf und erfolgt primär transkriptionell. Dabei sind IRF3 und NF- κ B als Transkriptionsfaktoren auch für die Expression von IFN- λ von Bedeutung (Onoguchi et al. 2007). Mehrere Studien konnten eine IFN- λ Induktion auf mRNA-Ebene nach Stimulation mit verschiedenen RNA- und DNA-Viren nachweisen. (Kotenko et al. 2003, Sheppard et al. 2003, Coccia et al. 2004, Brand et al. 2005, Osterlund et al. 2005, Ank et al. 2006, Melchjorsen et al. 2006). Dabei lassen Untersuchungen auf mRNA Ebene vermuten, daß IFN- λ vor allem von DC-Populationen produziert wird (Coccia et al. 2004, Osterlund et al. 2005, Melchjorsen et al. 2006). Antivirale Effekt von IFN- λ auf verschiedene Zelllinien konnten gegenüber EMCV (Ank et al. 2006, Kotenko et al. 2002), VSV (Kotenko et al. 2002), Hepatitis B Virus (Robek et al. 2005) und Hepatitis C Virus Genotyp 1 und 2a (Robek et al. 2005, Marcello et al. 2006) gezeigt werden. Eine protektive Wirkung von IFN- λ auf Primärzellen wurde von Osterlund et al. (2005) für Influenza A-infizierte humane myeloide DC nachgewiesen. Eine antivirale Wirkung von IFN- λ *in vivo* wurde bei intranasaler Infektion mit IFN- λ -exprimierenden Vacciniaviren (Bartlett et al. 2005) sowie bei lokaler und systemischer HSV-2 Infektion (Ank et al. 2006) gezeigt. Nur unzureichend ist bislang die Rolle von IFN- λ im Rahmen einer CMV-Infektion untersucht. Brand et al. (2005) konnten zeigen, daß IFN- λ Kolonepithelzellen vor HCMV-Infektion schützt und auch im Kolon MCMV-infizierter Mäuse induziert wird.

IL-12 und IL-18

Neben verschiedenen Interferontypen spielen bei einigen Virusinfektionen auch die proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IL-18 eine wichtige Rolle und beeinflussen dabei die unspezifische und adaptive Immunantwort. Das bioaktive IL-12p70 ist ein heterodimeres Zytokin und entsteht durch Assoziation einer 35 kD (IL-12p35) und einer 40 kD (IL-12p40) schweren Untereinheit (Kobayashi et al. 1989). Die IL-12-vermittelte Signaltransduktion erfolgt über einen heterodimeren Rezeptor (IL-12R β 1/IL-12R β 2), der vor allem auf aktivierten T-Zellen und NK-Zellen exprimiert wird und zur Aktivierung des JAK-STAT Signalweges

führt (Presky et al. 1996). Dabei erfordern die spezifisch IL-12-vermittelten intrazellulären Effekte die Aktivierung von STAT4 (Thierfelder et al. 1996, Kaplan et al. 1996). IL-12 Produktion im Rahmen einer Virusinfektion konnte für MCMV (Orange et al. 1996a, Orange et al. 1996b) und Influenza Virus (Monteiro et al. 1998) nachgewiesen und erfolgt primär durch plasmazytoide DC (Dalod et al. 2002). Entscheidend für die Bildung von IL-12p70 ist funktionelles STAT1. Für optimale IL-12p70 Konzentrationen ist zudem endogenes Typ I IFN erforderlich, das die intrazelluläre Akkumulation von IL-12p35 bewirkt (Gautier et al. 2005). Grundsätzlich ist Typ I IFN für die Produktion von IL-12p70 jedoch nicht essentiell, da IFN- γ und womöglich auch IFN- λ durch STAT1 Phosphorylierung das Fehlen von Typ I IFN teilweise kompensieren können. Zur biologischen Funktion von IL-12 bei Virusinfektionen zählt die Induktion von IFN- γ in NK-Zellen und die Differenzierung IFN- γ -produzierender Th1-Zellen (Trinchieri 2003). Die Regulation der IL-12-Expression ist komplex und für die bioaktive Form und die einzelnen Untereinheiten unterschiedlich. Die Induktion von bioaktivem IL-12p70 durch mikrobielle oder T-Zell-generierte Stimuli kann dabei durch IFN- γ und vor allem durch IL-4 erheblich gesteigert werden (Hochrein et al. 2000). Rein inhibitorisch auf die IL-12-Induktion wirken IL-10 und TGF- β (Trinchieri 2003). Der regulierende Effekt von Interferon- α / β auf die IL-12-Bildung ist zeit- und dosisabhängig und für die einzelnen IL-12-Untereinheiten unterschiedlich. Während niedrige bis mittlere Dosen an Typ I IFN IL-12p35 und bioaktives IL-12p70 induzieren (Gautier et al. 2005), wirken höhere Dosen vor allem auf IL-12p40 hemmend (Cousens et al. 1997, McRae et al. 1998, Nagai et al. 2003). IL-12p35 und IL-12p40 werden transkriptionell reguliert. Während für IL-12p35 eine konstitutive Expression in den meisten Zellen belegt ist, muß IL-12p40 erst induziert werden und wird nur von Zellen exprimiert, die auch bioaktives IL-12p70 sezernieren (Trinchieri 2003).

IL-18 wird als 24 kD schweres inaktives Vorläuferpeptid (pro-IL-18) von einem breiten Spektrum verschiedenster Zelltypen exprimiert (Gracie et al. 2003). Erst die enzymatische Spaltung durch intrazelluläre Caspase-1 überführt pro-IL-18 in das 18 kD schwere biologisch aktive IL-18 (Ghayur et al. 1997, Gu et al. 1997). Die IL-18 vermittelte Signaltransduktion erfolgt über einen heterodimeren Rezeptor (Torigoe et al. 1997, Hoshino et al. 1999), der ähnlich den TLRs MyD88 und IRAK rekrutiert (Adachi et al. 1998, Kanakaraj et al. 1999) und in einer NF- κ B Aktivierung resultiert (Matsumoto et al. 1997). STAT4 scheint auch im Signalweg für IL-18 eine wichtige Rolle für die Induktion von IFN- γ zu spielen (Nakahira et al.

2002). Zu den biologischen Funktionen von IL-18 gehören die Induktion von IFN- γ in NK- und Th₁-Zellen (Micallef et al. 1996, Yoshimoto et al. 1998) und die Stimulation der Reifung und Steigerung der Zytotoxizität von T- und NK-Zellen (Dao et al. 1998).

1.3 Das MCMV-Infektionsmodell

Das murine Zytomegalievirus (MCMV) ist ein mauspathogenes β -Herpesvirus mit 50 % Gen-Homologie (Rawlinson et al. 1996, Brocchieri et al. 2005) zum humanen Zytomegalievirus (HCMV), das klinisch als Erreger intrauteriner Infektionen und opportunistischer Infektionen bei Immunsuppression (Organtransplantation, HIV) von großer Bedeutung ist (Hirsch 2005). Da HCMV und MCMV eine auffällige Homologie auf molekularer und biologischer Ebene besitzen, eignet sich MCMV in besonderer Weise als Modell für die Infektion des Menschen. Kennzeichen von MCMV sind ein Tropismus für hämatopoetisches Gewebe und die großen Kopfspeicheldrüsen sowie ein langsamer Replikationszyklus. Die horizontale Übertragung in der Maus erfolgt vor allem durch Bisse. Zur Untersuchung antiviraler Mechanismen der unspezifischen Immunantwort bietet sich das MCMV-Infektionsmodell aus verschiedenen Gründen an. An der IFN-Antwort auf MCMV sind TLR-abhängige und TLR-unabhängige Signalwege beteiligt, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion dominieren. Das MCMV-Modell ist bislang zudem das einzige virale Infektionsmodell, in dem eine signifikante Rolle für einen TLR *in vivo*, nämlich TLR9, während der unspezifischen antiviralen Immunantwort gezeigt wurde (Krug et al. 2004, Tabeta et al. 2004). Darüber hinaus ist das MCMV-Modell ein Musterbeispiel für eine NK-Zell-kontrollierte Virusinfektion. Die MCMV-Infektion in der Maus ist auf diese Weise ein geeignetes Modell, um die Bedeutung und Interaktion der zentralen Zytokine (Interferone, proinflammatorische Zytokine, Chemokine) und zellulären Elemente (DC, NK-Zellen) des unspezifischen Immunsystems bei der Virusabwehr zu untersuchen.

Die Virulenz des murinen Zytomegalievirus hängt ganz entscheidend vom Virustyp ab. In Zelllinien vermehrtes MCMV hat bei gleicher Dosis eine geringere Virulenz als aus Speicheldrüsen gewonnenes MCMV (SG-MCMV) (Krmptotic et al. 2003). Im Verlauf einer systemischen SG-MCMV-Infektion kommt es zur Virämie und Dissemination in multiple Organe (Milz, Leber, Lunge, Speicheldrüsen). Dabei repliziert das Virus in der Frühphase der Infekti-

on vor allem in Leber, Milz und Lunge. Entscheidend für die Letalität in der Frühphase der Infektion sind dabei das Ausmaß der akuten Leberinsuffizienz oder die respiratorische Insuffizienz infolge der viralen Hepatitis bzw. Pneumonie (Katzenstein et al. 1983, Shanley et al. 1993). Wie bei jeder Erstinfektion mit einem fremden Pathogen greifen auch bei der MCMV-Infektion zunächst Mechanismen der unspezifischen Immunität. Die spezifische Th₁ und Th₂ vermittelte Immunantwort setzt erst ab dem 6. - 7. Tag nach Infektion ein. Im Infektionsmodell der vorliegenden Arbeit wurde die frühe unspezifische Immunantwort auf MCMV untersucht. Das Überleben der Maus bei einer systemischen MCMV-Infektion hängt innerhalb der ersten Woche von Mechanismen der unspezifischen Immunantwort ab. Diese gliedert sich in drei Phasen (Abb. 3): Initial führt die Viruserkennung durch Aktivierung von TLR9 in plasmazytoiden DC und anderen DC-Subpopulationen vor allem in Milz und Leber zur Freisetzung von großen Mengen an Typ I IFN (IFN- α und IFN- β) und proinflammatorischen Zytokinen (IL-12, IL-6). Die in dieser Phase sezernierten Interferone und Zytokine werden auch also sogenannte „frühe Zytokine“ (*early cytokines*) bezeichnet und erreichen 36 - 40 Stunden nach der Infektion ihre Höchstkonzentration im Serum (Orange et al. 1996b, Ruzek et al. 1997). Neben direkten IFN-vermittelten antiviralen Effekten auf zellulärer Ebene induzieren diese frühen Zytokine die zweite Phase, die durch eine unspezifische NK-Zellaktivität und -expansion gekennzeichnet ist und die ersten beiden Tage andauert. Zwischen dem 4. und 6. Tag erfolgt dann in C57BL/6 Mäusen die spezifische Expansion von Ly49H⁺ NK-Zellen (Dokun et al. 2001). Die Kontrolle der Virusreplikation erfolgt in den ersten 72 Stunden nach Infektion hauptsächlich durch DC und NK-Zellen. Die wichtigsten Zytokine in diesem Zeitraum sind Typ I IFN, IL-12 und IFN- γ .

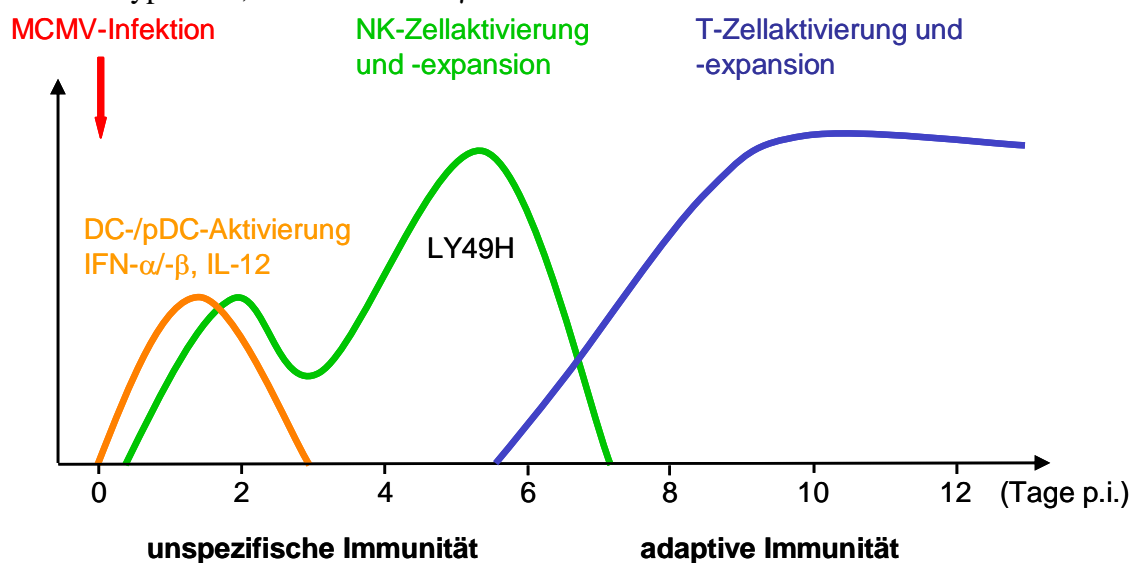


Abb. 3. Kinetik der Immunantwort bei der MCMV-Infektion.

Bedeutung dendritischer Zellen und Typ I IFN in der Frühphase einer MCMV-Infektion

Verschiedene DC-Subpopulationen sind an der antiviralen Immunantwort auf MCMV beteiligt. Als Hauptproduzenten von IFN- α / β und IL-12 bei der MCMV-Infektion wurden plasmazytoide DC identifiziert (Dalod et al. 2002, Krug et al. 2004), deren Aktivität die initiale Immunantwort dominiert. Plasmazytoide DC detektieren MCMV über TLR9/MyD88 und reagieren daraufhin mit einer massiven Produktion von Typ I IFN und proinflammatorischem IL-12. Dabei bewirkt Typ I IFN durch bisher ungeklärte Mechanismen die Akkumulation von plasmazytoiden DC in der Milz und verstärkt so durch einen positiven Feedback-Mechanismus die lokale IFN-Antwort (Dalod et al. 2003). Unter Einfluß von Typ I IFN reifen plasmazytoide DC und konventionelle DC-Populationen aus, was die Voraussetzung für potente Antigenpräsentation und Induktion der spezifischen Immunantwort ist (Dalod et al. 2003). Das Fehlen von TLR9 bzw. MyD88 reduziert die Aktivität der plasmazytoiden DC und der konventionellen DC, die ebenfalls IL-12 produzieren und führt zu einer starken Beeinträchtigung der initialen Immunantwort auf MCMV. Dies manifestiert sich in einer deutlichen Reduktion der maximalen Serumkonzentrationen von IFN- α und IL-12 zum Zeitpunkt 36 h nach Infektion, einer verminderten Aktivierung verschiedener DC-Populationen und einer gestörten NK-Zellfunktion zu diesem Zeitpunkt (Krug et al. 2004). In TLR9 $^{-/-}$ oder MyD88 $^{-/-}$ Mäusen auf C57BL/6-Hintergrund führt dies zu einer verminderten Viruskontrolle mit signifikant erhöhten Virustitern in der Milz im Vergleich zu WT C57BL/6 Mäusen (Krug et al. 2004, Tabeta et al. 2004) und signifikant erhöhter Letalität (Tabeta et al. 2004, Delale et al. 2005).

Neben den plasmazytoiden DC sind auch andere DC-Subpopulationen an der frühen Immunantwort auf MCMV beteiligt. So produzieren myeloide DC nach Infektion mit MCMV Typ I IFN, IL-12 und IL-18, wobei die IFN-Induktion in diesen Zellen TLR9-unabhängig ist (Andoniou et al. 2005). An der NK-Zellaktivierung sind plasmazytoide DC (Dalod et al. 2003), myeloide DC (Andoniou et al. 2005) und CD8 α^+ DC (Andrews et al. 2003) beteiligt. Ob es sich dabei um eine redundante oder sequentielle NK-Zellaktivierung handelt, kann derzeit noch nicht abschließend beurteilt werden. Die antigenspezifische Aktivierung von CD8 $^+$ T-Zellen und Induktion einer MCMV-spezifischen Th $_1$ -Antwort erfolgt primär durch CD8 α^+ DC aus der Milz, die eine ausgeprägte Fähigkeit zur Kreuzpräsentation von exogenen Antigenen haben (Schnorrer et al. 2006, Dudziak et al. 2007). Auf Einzelzellebene findet eine pro-

duktive MCMV-Infektion von Immunzellen zu diesem Zeitpunkt vor allem in CD8 α^+ DC und Makrophagen statt (Dalod et al. 2003).

Bedeutung von NK-Zellen

Das MCMV-Infektionsmodell ist ein Musterbeispiel für virale Infektionskontrolle durch NK-Zellen (Yokoyama et al. 2002, Scalzo et al. 2002). Eine intakte NK-Zellfunktion ist entscheidend für die Suppression der Virusreplikation in der Frühphase der MCMV-Infektion. Auch beim Menschen spielen NK-Zellen für die antivirale Immunabwehr bei verschiedenen Herpesvirusinfektionen eine entscheidende Rolle (Orange et al. 2006b). NK-Zelldepletion vor oder während der frühen Infektion führt in normalerweise resistenten Mausstämmen wie C57BL/6 zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber MCMV mit höheren Virustitern in Lunge, Leber und Milz sowie gesteigerter Mortalität (Bukowski et al. 1984, Welsh et al. 1994, Orange et al. 1995). Die dosisabhängige Empfindlichkeit eines Mausstammes gegenüber MCMV ist dabei an die Expression oder das Fehlen des NK-Zellrezeptors Ly49H gekoppelt (Brown et al. 2001, Lee et al. 2001). Ly49H ist ein aktivierender Oberflächenrezeptor auf NK-Zellen von C57BL/6 Mäusen und erkennt das MCMV-Protein m157, das strukturell zur Gruppe der MHC-Klasse I-ähnlichen Molekülen gehört. Bindung von m157 durch Ly49H aktiviert die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber m157-positiven Zellen sowie die Sekretion von IFN- γ und proinflammatorischen Chemokinen (Arase et al. 2002, Smith et al. 2002). Ly49H $^+$ NK-Zellen sind essentiell für die MCMV-Eliminierung in infizierten Organen von C57BL/6 Mäusen (Daniels et al. 2001).

An der NK-Zellaktivierung in der Frühphase einer MCMV-Infektion sind myeloide DC, CD8 α^+ DC sowie plasmazytoide DC beteiligt (Dalod et al. 2003, Andrews et al. 2003, Andoniou et al. 2005). Die Aktivierung der Zytotoxizität erfordert die Sekretion von Typ I IFN (Orange et al. 1996b, Granucci et al. 2004, Andoniou et al. 2005) und zumindest *in vitro* die Aktivierung des NKG2D-Rezeptors durch NKG2D-Liganden, die von myeloiden DC exprimiert werden (Andoniou et al. 2005). Die IFN- γ Produktion in NK-Zellen wird durch IL-12 und IL-18 induziert (Orange et al. 1995, Orange et al. 1996a, Andoniou et al. 2005). Die NK-Zell-vermittelte lokale MCMV-Kontrolle weist organspezifische Unterschiede auf. So ist die Virussuppression in der Leber IFN- γ abhängig, erfolgt in der Milz jedoch primär durch perforinvermittelte Zytotoxizität (Orange et al. 1995, Tay et al. 1997, Brown et al. 1997). IFN- γ wird in der Leber durch IL-12, in der Milz durch IL-12 und IL-18 induziert. Das Fehlen von

IL-12 führt zu einer drastischen Reduktion der IFN- γ -Konzentration in Leber, Milz und Serum und geht mit erhöhter Mortalität von IL-12p35^{-/-} Mäusen einher. Im Gegensatz dazu führt das Fehlen von IL-18 zwar zu niedrigeren IFN- γ Werten in Serum und Milz, beeinflusst jedoch Mortalität und MCMV-Titer in der Milz nicht (Pien et al. 2000).

1.4 Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit

Ausgangspunkte der Arbeit waren die Publikationen von Ishii et al. (2006) und Stetson et Medzhitov (2006a), die analog zu den RNA-bindenden Helikasen RIG-I/Mda-5 die Existenz eines zytosolischen DNA-Sensors nahelegen, der nach Stimulation mit doppelsträngiger DNA über TBK1 zur Aktivierung von IRF-3 führt und in MEFs, Makrophagen, myeloiden DC und plasmazytoiden DC Typ I IFN induziert. Es ist anzunehmen, daß dieser putative zytosolische DNA-Sensor auch von MCMV-DNA aktiviert wird und für die MyD88-unabhängige Induktion von Typ I IFN verantwortlich ist. Die Arbeit von Stetson et Medzhitov (2006a) zeigt, daß die Induktion von Typ I IFN durch intrazelluläre DNA über diesen putativen DNA-Sensor IRF3-abhängig ist. Demgegenüber stehen die Ergebnisse von (Honda et al. 2005), die IRF7 als zentralen Transkriptionsfaktor der TLR/MyD88-abhängigen und TLR/MyD88-unabhängigen Induktion von Typ I IFN nach Virusinfektion beschreiben. Um vor diesem Hintergrund den spezifischen Beitrag von IRF3 und IRF7 zur Immunantwort auf MCMV *in vivo* zu klären sollten in der vorliegenden Dissertation folgende Punkte untersucht werden:

- Rolle von IRF3 und IRF7 bei der Induktion von antiviralem IFN und proinflammatorischen Zytokinen in den ersten 36 h bzw. 72 h der MCMV-Infektion
- Bedeutung von IRF3 und IRF7 für die zelluläre Aktivierung von zytokinproduzierenden Zellen in der Frühphase der MCMV-Infektion
- Bedeutung von IRF7 für die NK-Zellzytotoxizität
- Einfluß von IRF3 und IRF7 auf die organspezifische Viruskontrolle und das Überleben bei der MCMV-Infektion

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien, Viren, Bakterien

Zelllinien

Bezeichnung	ATCC-Nr.	Organismus	Morphologie
NIH/3T3	CRL-1658 TM	<i>Mus musculus</i>	Fibroblast
L-929	CCL-1 TM	<i>Mus musculus</i>	Fibroblast
YAC-1	TIB-160 TM	<i>Mus musculus</i>	Lymphoblast

Viren

Die nachfolgend aufgelisteten Viren wurden für verschiedene *in vitro* und *in vivo* Experimente verwendet: Tissue Culture-MCMV (TC-MCMV), Salivary Gland-MCMV (SG-MCMV; Smith Stamm), rekombinantes vesikuläres Stomatitis Virus (VSV) (Krug et al. 2003) sowie Newcastle Disease Virus (NDV; Ulster Stamm). Das NDV wurde von Prof. Dr. Volker Schirmacher (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) bereitgestellt. Die anderen Viren wurden *in vivo* oder in NIH/3T3- bzw. BHK-Zellen vermehrt.

Bakterien

Für Klonierungszwecke wurden TOP10TM chemokompetente *E. coli* verwendet, die Bestandteil des Klonierungsreaktionssystems TOPO TA-Cloning[®] sind.

2.1.2 Medien, Reagentien, Antikörper

PCR- Primer

Bezeichnung	Sequenz	Gene Bank Code/ Produktgröße
β-Actin +	5'-GGA GAA GAG CTA TGA GCT GCC T-3'	NM_007393.1 (203 bp)
β-Actin -	5'-GTG GTA CCA CCA GAC AAC ACT-3'	
IRF3 P1	5'-GAA CCT CGG AGT TAT CCC GAA GG-3'	(350 bp/450 bp)
IRF3 P2	5'-GTT TGA GTT ATC CCT GCA CTT GGG-3'	

IRF3 P3	5'-TCG TGC TTT ACG CTA TCG CCG CTC CCG ATT-3'	
IRF7 P1	5'-GTG GTA CCC AGT CCT GCC CTC TTT ATA ATC T-3'	
IRF7 P2	5'-TCG TGC TTT ACG GTA TCG CCG CTC CCG C-3'	(200 bp/300 bp)
IRF7 P3	5'-AGT AGA TCC AAG CTC CCG GCT AAG TTC GTA C-3'	
M54 +	5'-ATC ATC CGT TGC ATC TCG TTG-3'	(246 bp)
M54 -	5'-CGC CAG TCT GTA TCC GTC CAT-3'	

qRT-PCR Primer

Bezeichnung	Sequenz	Gene Bank Code/ Produktgröße
Cyclophilin A +	5'-ATG GTC AAC CCC ACC GTG T-3'	XR_004644.1
Cyclophilin A -	5'-TTC TGC TGT CTT TGG AAC TTT GTC-3'	(100 bp)
IFN- α +	5'-CTC CTA GAC TCA K TG TGC A-3'	NM_010502.1
IFN- α -	5'-ACA CAG TGA TSC TGT GGA A-3'	(147 bp)
IFN- β +	5'-AGC CCT CTC CAT CAA CTA TAA G-3'	NM_010510.1
IFN- β -	5'-GAG GTT GAT CTT TCC ATT CAG-3'	(99 bp)
IFN- γ +	5'-CAG CAA CAA CAT AAG CGT CA-3'	NM_008337.1
IFN- γ -	5'-CCT CAA ACT TGG CAA TAC TCA-3'	(100 bp)
IFN- λ 2 +	5'-CAA AGG ATT GCC ACA TTG CTC-3'	NM_177396.1
IFN- λ 2 -	5'-TTC TCA AGC AGC CTC TTC TC-3'	(99 bp)
IL-12p35 +	5'-ATG GTG AAG ACG GCC AGA GA-3'	NM_008351.1
IL-12p35 -	5'-CCA GTG GTA AAC AGG TCT TCA ATG- 3'	(114 bp)
IL-12p40 +	5'-ACT TGA AGT TCA ACA TCA AGA GCA GTA G-3'	NM_008352.1
IL-12p40 -	5'-TAC TTC TCA TAG TCC CTT TGG TCC AG-3'	(117 bp)
IL-23p19 +	5'-CAG CAG CTC TCT CGG AAT-3'	NM_031252.1
IL-23p19 -	5'-ACA ACC ATC TTC ACA CTG GAT ACG-3'	(134 bp)
IP-10 +	5'-GAA TCC GGA ATC TAA GAC CAT CAA-3'	NM_021274.1
IP-10 -	5'-GTG CGT GGC TTC ACT CCA GT-3'	(91 bp)
M54 +	5'-ATC ATC CGT TGC ATC TCG TTG-3'	(246 bp)
M54 -	5'-CGC CAG TCT GTA TCC GTC CAT-3'	

Alle Primer für PCR und quantitative RT-PCR (qRT-PCR) wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg, D) bezogen. Die Primersequenzen sind in 5' – 3' Richtung angegeben. Die Angabe „+“ bezeichnet dabei den Sense-Primer, der Antisense-Primer ist durch das Symbol „-“ gekennzeichnet. Bei den qRT-PCR Primern für IFN- α handelt es sich um so genannte Konsensusprimer. Durch einzelne variable Basen entsteht ein Primergemisch mit dem möglichst viele der dreizehn bekannten IFN- α Subtypen erfaßt werden sollen. Die verwendeten Konsensusprimer werden von MWG-Biotech auf der Grundlage des Codes der *International Union of Biochemistry* (IUB) konzipiert: K = G, T; S = G, C

Reagentien für molekularbiologische Methoden

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
1 kb DNA ladder	NEB, Frankfurt (D)
100 bp DNA ladder	NEB, Frankfurt (D)
10x DNase I Puffer	Ambion, Darmstadt (D)
10x PCR Puffer	Inivitrogen, Karlsruhe (D)
10x Puffer EcoRI	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
5x FS Puffer	Gibco, Karlsruhe (D)
Agarose	Inivitrogen, Karlsruhe (D)
Chloroform	Merck, Darmstadt (D)
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
DNase I (2U/ μ l)	Ambion, Darmstadt (D)
DNeasy [®] Blood and Tissue Reaktionssystem	Qiagen, Hilden (D)
dNTPs	Promega, Mannheim (D)
DTT 0,1 M	Gibco, Karlsruhe (D)
EcoRI (10 U/ μ l)	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
EDTA (0.5 M)	Gibco Karlsruhe (D)
Ethanol (100 %)	Merck, Darmstadt (D)
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Inivitrogen, Karlsruhe (D)
GlycoBlue (15mg/ml)	Ambion, Darmstadt (D)
H ₂ O ultra pure DNase + RNase frei	Gibco Karlsruhe (D)
IPTG	Promega, Mannheim (D)
Isopropanol	Merck, Darmstadt (D)
MgCl ₂ (50 mM)	Inivitrogen, Karlsruhe (D)
Oligo (dT) ₁₅	Promega, Mannheim (D)
Orange G (6x)	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Proteinase K (200 mg/ml)	Roth, Karlsruhe (D)
QIAprep [®] Miniprep Reaktionssystem	Qiagen, Hilden (D)
RNase OUT [®] (40 U/ μ l)	Inivitrogen, Karlsruhe (D)

S.O.C-Medium	Invitrogen, Karlsruhe (D)
SuperScript II reverse Transcriptase™ (200 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe (D)
SYBR Green 2x Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt (D)
Taq DNA Polymerase (5U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe (D)
TOPO TA-Klonierungsreagenzsystem	Invitrogen, Karlsruhe (D)
TRIzol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe (D)
X-gal in DMF (40mg/ml)	Promega, Mannheim (D)

FACS-Reagentien

Antikörper	Spezies-Isotyp	Klon-Nr.
Anti-B220-PE/-Biotin	Ratte IgG _{2a} , κ	RA3-6B2
Anti-BST2-FITC	Ratte IgG ₁ , κ	120G8*
Anti-CD11b-FITC	Ratte IgG _{2b} , κ	M1/70
Anti-CD11c-FITC/-APC/-Biotin	Armen. Hamster IgG ₁ , λ2	HL3
Anti-CD16/-CD32	Ratte IgG _{2b}	2.4G2
Anti-CD3ε-FITC/-APC	Armen. Hamster IgG ₁ , κ	145-2C11
Anti-CD69-PE	Armen. Hamster IgG ₁ , λ3	H1.2F3
Anti-CD86-PE	Ratte IgG _{2a} , κ	GL1
Anti-DX5-PE	Ratte IgM, κ	DX5
Anti-IFN-γ-FITC	Ratte IgG ₁ , κ	XMG1.2
Anti-NK-1.1-APC	Maus IgG _{2a} , κ	PK136
Anti-Rae-1-PE (pan-spezifisch)	Ratte IgG _{2a}	186107
Anti-Siglec H-Biotin	Ratte IgG _{2b}	440c [‡]
CFSE	10 mM Stock	Invitrogen, Karlsruhe (D)
Counting Beads		Caltag, Burlingame (USA)
Propidiumiodid (1mg/ml)	Endkonz.: 200 μg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptavidin-APC	N/A	Molec. Probes, Karlsruhe
TO-PRO-3 Iodid	Endkonz.: 10 - 30 nM	Molec. Probes, Karlsruhe

* (Asselin-Paturel et al. 2003)

‡ (Blasius et al. 2004)

Die FACS-Antikörper wurden, sofern nicht anders angegeben, von BD Pharmingen™ (Heidelberg, D) bezogen. Anti-Rae-1-PE wurde von R&D Systems (Wiesbaden, D), Anti-IFN-γ-FITC von eBioscience (San Diego, USA) bezogen. Anti-Siglec H und Anti-BST2 wurden aus dem Überstand von 120G8- und 440c-Hybridomazellen gewonnen. Die FACS-Antikörper wurden bis auf wenige Ausnahmen in einer Endkonzentration von 1 - 5 μg/ml eingesetzt. In

abweichender Endkonzentration wurden eingesetzt: Anti-CD11b-PE (500 ng/ml), Anti-BST2-FITC (1:400), Anti-Siglec H-Biotin (100 ng/ml) und Anti-Rae-1-PE (7 µg/ml).

ELISA-Antikörper, ELISA-Reaktionssysteme, rekombinante Zytokine

Antikörper/Zytokin – Klon-Nr.	Spezies-Isotyp	Hersteller/Bezug
IFN-α		
Anti-Mouse Interferon-α (Capture) – RMMA-1	Ratte IgG ₁	PBL, Piscataway (USA)
Anti-Mouse Interferon-α (Detection) – polyklonal	Kaninchen	PBL
IFN-αA rekombinant, murin		Hycult, Uden (NL)
IFN-β		
Anti-Mouse Interferon-β neutralizing (Capture) – 8.S.415	Ratte IgG ₁	US-Biological, Swampscott (USA)
Anti-Mouse Interferon-β (Detection) – polyklonal	Kaninchen	PBL
IFN-β rekombinant, murin		PBL
IL-12p40		
Mouse IL-12 (p40/p70) (Capture) – C15.6	Ratte IgG ₁	BD Pharmingen™
Anti-Mouse IL-12 (p40/p70)-Biotin (Detection) – C17.8	Ratte IgG _{2a}	BD Pharmingen™
IL-12p40 rekombinant, murin		BD Pharmingen™
IFN-γ Reaktionssystem		
Capture-Ab (720µg/ml)	Ratte	Kat.-Nr.: DY485
Detection-Ab-Biotin (72 µg/ml)	Ziege	R&D
IFN-γ rekombinant, murin (60 ng/ml)		
Streptavidin-HRP		
IFN-λ2 Reaktionssystem		
Capture-Ab (180 µg/ml)	Ratte	Kat.-Nr.: DY1789
Detection-Ab-Biotin (45 µg/ml)	Ratte	R&D
IFN-λ rekombinant, murin (120 ng/ml)		
Streptavidin-HRP		
IL-12p70 Reaktionssystem		
Capture-Ab (720 µg/ml)	Ratte	Kat.-Nr.: DY419
Detection-Ab-Biotin (72 µg/ml)	Ziege	R&D
IL-12p70 rekombinant, murin (60 ng/ml)		
Streptavidin-HRP		
Donkey Anti-Rabbit HRP	Esel	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire (UK)
Streptavidin-HRP	N/A	Amersham, Piscataway (USA)

IFN- α A rekombinant, murin	PBL
IFN- λ 2 (= IL-28A) rekombinant, murin	PeptoTech, Rocky-Hill, (USA)
IL-2 rekombinant, murin	R&D

Reagentien für Zell- und Bakterienkultur

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe (D)
Bacto-Tryptone	BD, Heidelberg (D)
Bacto-Yeast Extract	BD, Heidelberg (D)
Carboxymethylcellulose C-4888	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
CpG 1668 (50 μ M)	MWG-Biotech, Ebersberg (D)
CpG 2216 (50 μ M)	MWG-Biotech, Ebersberg (D)
Crystal Violet	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
D-MEM high Glucose (+ L-Glutamine)	Gibco, Karlsruhe (D)
EDTA	Fluka, Seelze (D)
FBS	Biochrom, Berlin (D)
Glutamax 100x (200 mM)	Gibco, Karlsruhe (D)
H ₂ O Ultra Pure	Biochrom, Berlin (D)
HEPES	Gibco, Karlsruhe (D)
LB-Agar	Roth, Karlsruhe (D)
MEM (10x)	Gibco, Karlsruhe (D)
β -Mercaptoethanol (14,3 M)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Natriumpyruvat 100mM	PAA, Cölbe (D)
NCS	Gibco, Karlsruhe (D)
Non-essential Amino Acids (100x)	PAA, Cölbe (D)
PBS	PAA, Cölbe (D)
Penicillin-Streptomycin	PAA, Cölbe (D)
Poly I:C (2 mg/ml in 0,09 % NaCl-Lsg.)	Amersham, Piscataway (USA)
Red Cell Lysis Buffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
RPMI 1640	PAA, Cölbe (D)
Trypsin-EDTA (1x)	PAA, Cölbe (D)

Sonstige Reagentien

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
ABTS (ELISA-Substrat)	Roche, Basel (CH)
BSA (Fraktion V pH = 7,0)	Serva, Heidelberg (D)
Citronensäure	Roth, Karlsruhe (D)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt (D)

Formaldehydlösung (35 %)	Roth, Karlsruhe (D)
H ₂ SO ₄ 2 N	Roth, Karlsruhe (D)
HCl 1 N und HCl 6 N	Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid (5 M)	Merck, Darmstadt (D)
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt (D)
Percoll Separating Solution (1,124 g/ml)	Biochrom, Berlin (D)
Saponin	Roth, Karlsruhe (D)
Sodium azide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Sodium chloride	Fluka, Seelze (D)
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Fluka, Seelze (D)
TMB-Substrat-Lsg (A+B)	R&D, Wiesbaden (D)
Tris	Roth, Karlsruhe (D)
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)

2.1.3 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen mit destilliertem Wasser angesetzt, das über die Apotheke des Klinikums rechts der Isar bezogen wurde. Das verwendete PBS (PAA) war frei von Ca²⁺/Mg²⁺-Ionen und hatte einen pH von 7,2 - 7,4. Zur Einstellung des pH-Wertes wurden wässrige Natriumhydroxidlösung (5 N) und Salzsäure unterschiedlicher Molarität (1 M oder 6 M) verwendet.

Puffer und Lösungen für FACS/MACS/ELISA

50x ABTS	ABTS in PBS auf 50 mg/ml einstellen
FACS-Puffer	PBS 2 % (v/v) FBS 0,01 % (v/v) NaN ₃
MACS-Puffer	PBS 10 % (v/v) FBS 1 mM EDTA
Fixierungspuffer	PBS 2 % (w/v) PFA
Permeabilisierungspuffer	0,5 % (w/v) Saponin 5 % (v/v) FBS 10 mM HEPES 0,02 % (v/v) NaN ₃

ELISA-Beschichtungspuffer	0,1 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH = 9,0
ELISA-Waschpuffer	PBS 0,05 % (v/v) Tween [®] 20
ELISA-Blockpuffer	PBS 10 % (v/v) FBS
ELISA-Verdünnungspuffer	PBS 10 % (v/v) FBS 0,05 % (v/v) Tween [®] 20
ELISA ABTS-Substrat	0,1 M Citronensäure pH = 4,2 0,02 % (v/v) ABTS (50 mg/ml) 1 Promille (v/v) H ₂ O ₂ (30 %)
Peroxidase-Stopplösung	1 % SDS (w/v)
ELISA-Reagent Diluent (RD)	150 mM NaCl 20 mM Tris 0,1 % (w/v) BSA 0,05 % (v/v) Tween [®] 20 pH = 7,2 – 7,4

Lösungen für die Molekularbiologie

12x Elektrophoreseauftragepuffer	10 % (v/v) Bromphenolblaulösung (0,9 %) 10 % (v/v) Xylencyanollösung (0,9 %) 60 % (v/v) Glycerol (85 %) 20 % (v/v) 3 mM EDTA
DNA-Marker	45 % (v/v) DNA-Leiter 45 % (v/v) Elektrophoreseauftragepuffer (12x) 10 % (v/v) H ₂ O nukleasefrei
50x TAE-Puffer	2 M Tris 100 mM EDTA 5,71 % (v/v) Essigsäure (100 %) pH = 8,5
TE-Puffer	0,5 M Tris 0,5 M EDTA pH = 8,0

Lyse-Puffer	100 mM Tris-HCl 5 mM EDTA 200 mM NaCl 0,2 % (w/v) SDS pH = 8,5
-------------	--

Lösungen für zellbiologische Verfahren

Kristall-Violettlösung	0,5 % (w/v) Kristall-Violett 0,8 % (w/v) NaCl 5 % (v/v) Formaldehyd (35 %) 50 % (v/v) Ethanol (100 %)
Plaqueassay-Overlay	1,5 % (w/v) Carboxymethylcellulose 5 % (v/v) FBS 10 % (v/v) 10x MEM 100 U/ml Penicillin – 200 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 0,5 % (v/v) NEAA 5 % (v/v) NaHCO ₃ (7,5 %) H ₂ O Ultra pure

Medien für die Zellkultur

DC-Vollmedium	RPMI 1640 10 % (v/v) FBS 100 U/ml Penicillin G – 200 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 1 % (v/v) NEAA 50 µM β-Mercaptoethanol
L929-/YAC-1-Medium	RPMI 1640 10 % (v/v) FBS 100 U/ml Penicillin G – 200 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 1 % (v/v) NEAA
MEF-Medium	D-MEM high Glucose (4,5 g/l Glucose, 3,97 mM L-Glutamin) 10 % (v/v) FBS 100 U/ml Penicillin G – 200 µg/ml Streptomycin 1,5 g/l Natriumbicarbonat 1 mM Natriumpyruvat 1 % (v/v) NEAA
NIH/3T3-Medium	D-MEM high Glucose

	(4,5 g/l Glucose, 3,97 mM L-Glutamin) 5 % (v/v) NCS 100 U/ml Penicillin G – 200 µg/ml Streptomycin 1,5 g/l Natriumbicarbonat
Spülmedium	RPMI 1640 5 % (v/v) FBS
Einfriermedium	75 % (v/v) FBS 10 % (v/v) DMSO 15 % (v/v) entsprechendes Zellkulturmedium
Trypsin-EDTA (1x)	gebrauchsfertig von PAA: 0,5 mg/ml Trypsin 0,22 mg/ml EDTA PBS ohne Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -Ionen

Medien für die Bakterienkultur

Als Selektionsmarker für LB-Festagar und -flüssigmedium wurde Ampicillin mit der Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

LB-Medium	1 % (w/v) Trypton/Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 171 mM Natriumchlorid pH = 7,4
LB-Festagar	3,5 % (w/v) LB-Agar pH-Wert = 7,3 - 7,4
Ampicillin	Stammlösung: 100 mg/ml Lösen des Ampicillin Natriumsalzes in Aqua dest. und Sterilfiltration durch einen 0,2 µm Spritzenfilter; Zusatz mit Endkonzentration 100 µg/ml

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien und Primärzellen

Zellkultur der Zelllinien und Kryokonservierung von Zellen

Alle Zelllinien und Primärzellen wurden bei 37 °C, 90 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Zur Passagierung adhärenter Zellen wurden diese kurz mit

Trypsin-EDTA-Stammlösung (s. Puffer und Lösungen) inkubiert, anschließend in frischem Medium resuspendiert und in entsprechender Verdünnung in neue Kulturflaschen/-schalen umgesetzt. Alle Zentrifugationsschritte wurden sofern nicht anders angegeben mit einer Eppendorf-Zellkulturzentrifuge 5810 R (Rotor: 17,4 cm; Eppendorf, Hamburg, D) durchgeführt. NIH/3T3 Zellen wurden in NIH/3T3-Medium in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert und etwa alle 2 - 3 Tage bei vollständiger Konfluenz 1:3 passagiert. L929-Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert und zweimal wöchentlich 1:10 bis 1:20 passagiert. YAC-1 Zellen wurden in 10 cm Petrischalen kultiviert und alle 2 Tage 1:10 geteilt. Für beide Zelllinien wurde das L929-/YAC-1-Medium verwendet. Zur Kryokonservierung wurden Zellen in 1 ml Einfriermedium in 1,2 ml Kryoröhrchen zunächst bei – 80 °C in einer Styroporbox graduell abgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Generierung und Kultivierung von MEFs

Die Kultivierung von MEFs erfolgte in MEF-Medium. Zur Generierung der MEFs wurden schwangere C57/BL6 WT Weibchen an Tag 14 der Gestation mit CO₂ euthanasiert. Aus dem Uterus wurden die Embryonen isoliert und von Eihäuten und Plazenta befreit. Nach Abtrennung des Kopfes und vorsichtigem Entfernen von Leber und Milz wurden die Embryonen mit einem Skalpell zerkleinert und jeweils in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde das Gewebe mit Trypsin-EDTA-Stammlösung (5 ml/Embryo) für 40 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mehrfach durch eine 20 ml Spritze mit einer 20 G Kanüle gezogen. Der Trypsinverdau wurde durch Zugabe von 5 ml MEF-Medium gestoppt. Unverdautes Gewebe und Debris wurden durch einen Zentrifugationsschritt (1700 rpm, 10 min, 4 °C) und mehrminütige Sedimentation auf Eis abgetrennt. Jeweils 5 ml Zellsuspension wurden schließlich zusammen mit 5 ml vorgewärmtem MEF-Medium in einer 10 cm-Zellkulturschale ausplattiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (Zellpassage 0). Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, nicht adhärente Zellen wurden durch Ausspülen der Schalen mit PBS entfernt. Bei 80 - 90 % Konfluenz wurden die MEFs einmal durch 1:3 Teilung expandiert (Zellpassage 1), um dann nach Wiedererreichen von 80 - 90 % Konfluenz in flüssigem Stickstoff kryokonserviert zu werden (Zellpassage 2).

Generierung von GMCSF-DC aus Knochenmark

GMCSF-DC wurden aus dem Knochenmark von WT und Knockout-Mäusen generiert. Hierzu wurden Femur und Tibia entnommen und das Knochenmark mit Hilfe einer Spritze und 27

G Kanüle mit Spülmedium in eine Petrischale ausgespült. Anschließend erfolgte eine Erythrozytenlyse mit 2 ml Ammoniumchlorid-Lösung (8,3 g/l NH₄Cl + 0,01 M Tris-HCl). Zur Generierung der GMCSF-DC wurden 0,5 x 10⁶ Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 10 ml DC-Vollmedium in 10 cm-Petrischalen ausgesät. GMCSF-Überstand aus der Kultur von J558L-Zellen (stabil transfiziert mit GMCSF) wurde in einer Endkonzentration von 2 % (v/v) zugegeben. Am dritten Tag wurde den Kulturen 10 ml frisches Medium zugefügt und das Gesamtvolumen mit 2 % (v/v) frischem GMCSF supplementiert. Nach 5 Tagen in Kultur wurden die Zellen 1:2 passagiert und in einem Gesamtvolumen von 20 ml Medium mit 2 % (v/v) GMCSF weiterkultiviert. Am 7. Tag wurden die Zellen geerntet. Locker adhärente Zellen wurden dabei mit 0,5 mM EDTA (in PBS) abgelöst. Der Phänotyp der GMCSF-DC wurde durchflußzytometrisch nach Färbung mit Anti-CD11b-, Anti-CD11c-Antikörper im FACS überprüft (CD11b⁺CD11c⁺: 60 – 80 %). IRF3 oder IRF7 Defizienz beeinflusste den Prozentsatz von GMCSF-generierten dendritischen Zellen nicht. (Abb. 4):

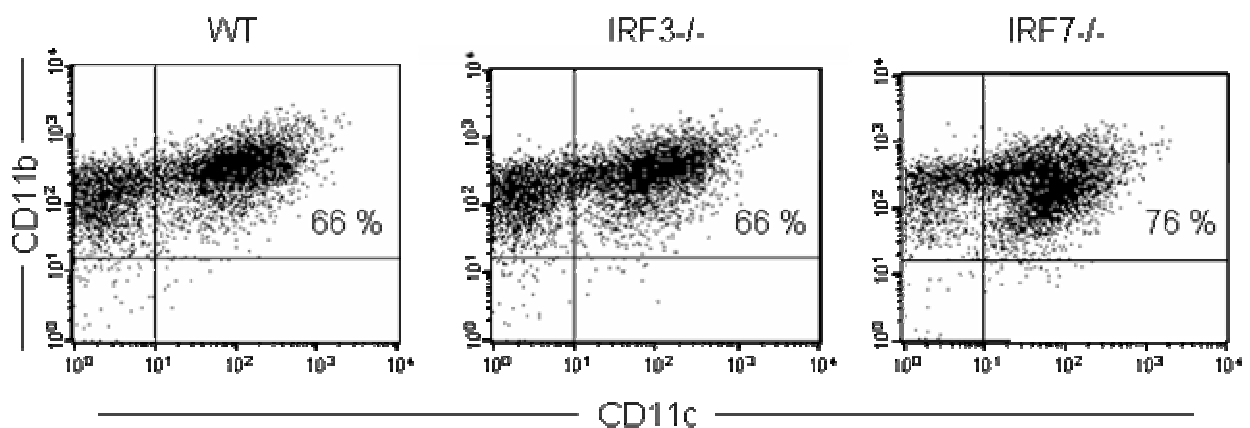


Abb. 4. GMCSF-DC nach 7 d Kultur. FACS-Färbung mit Anti-CD11b-FITC und Anti-CD11c-APC

Isolation der Splenozyten und hepatischen Leukozyten ex vivo

Zur Gewinnung von Splenozyten wurde die Milz entnommen und zur Herstellung einer Einzelzellsuspension durch ein 70 µm Zellsieb passiert. Zum Durchspülen des Zellsiebes wurde RPMI/5 % (v/v) FBS verwendet. Nach Zentrifugation (1500 rpm, 5 min, 4 °C) erfolgte eine Erythrozytenlyse mit 2 ml Ammoniumchlorid-Lösung (8,3 g/l NH₄Cl + 0,01 M Tris-HCl).

Bei der Isolation von Leberleukozyten wurde die Leber zunächst *in situ* mit kaltem PBS perfundiert. Dazu wurden 3 ml PBS in die Vena portae injiziert und das Organ mit Druck durchgespült. Auf diese Weise konnte bereits ein Großteil des intrahepatischen Blutes entfernt werden. Dann wurde die Leber entnommen und durch ein 100 µm Zellsieb passiert. Nach Zentrifugation (1300 rpm, 5 min, 4 °C) der Zellsuspension wurde das Pellet in 5 ml RPMI/10 % (v/v) FBS resuspendiert. Die Leberleukozyten wurden dann durch Hinzufügen von 2,1 ml Percoll mit anschließender Zentrifugation (2000 rpm, 15 min, RT) von den Hepatozyten abgetrennt (Leukozyten im Pellet).

Isolation von NK Zellen durch MACS (Magnetic Cell Sorting)

Versuchstieren wurde zunächst die Milz entnommen und die Splenozyten wie beschrieben isoliert. Anschließend wurden die Zellen mit Anti-DX5-Beads, einem Pan-NK-Zellmarker, nach Herstellerangaben markiert und die NK-Zellen entsprechend Herstellerprotokoll auf einer magnetisierten LS-Separationssäule angereichert und mit MACS-Puffer eluiert. Die Reinheit der DX5-positiven Zellen wurde durchflußzytometrisch nach Färbung mit Antikörpern gegen DX5, CD3ε und NK1.1 evaluiert. NK-Zellen können mit dieser Färbung als DX5⁺CD3ε⁻ bzw. DX5⁺NK1.1⁺ Zellpopulation definiert werden. Der Reinheitsgrad der isolierten DX5⁺ Zellen betrug 60 – 84 % und ist beispielhaft in (Abb. 5) dargestellt (Zellen aus Region R4). Für nachfolgende Applikationen wurde die Zahl der DX5⁺ Zellen entsprechend der FACS-Analyse angeglichen.

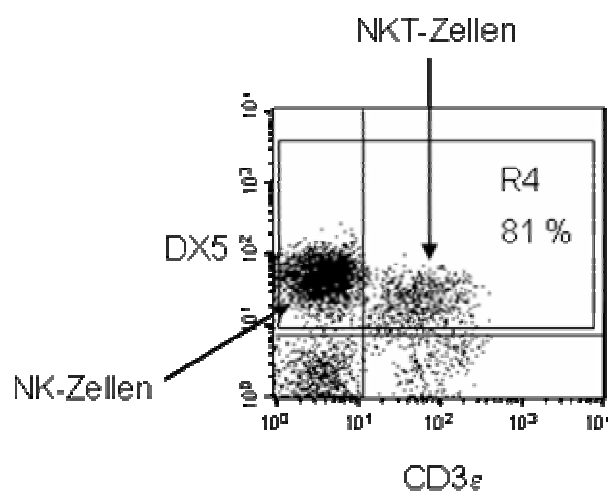


Abb. 5. Isolation von NK-Zellen durch MACS. FACS-Färbung mit Anti-DX5-PE und Anti-CD3ε-FITC.

2.2.2 Viren

Herstellung von TC-MCMV auf NIH/3T3-Zellen

Um eine ausreichende Zahl von NIH/3T3-Zellen infizieren zu können wurde zunächst Inokulum erzeugt. Dazu wurden NIH/3T3 in 75 cm² Kulturflaschen kultiviert und bei 100 % Konfluenz mit 0,1 MOI TC-MCMV infiziert. Die infizierten Zellen waren nach ca. 3 - 4 Tagen vollständig zytopathisch, so daß der Überstand geerntet und nach Abtrennung des zellulären Debris durch Zentrifugation (4000 rpm, 15 min, 4 °C) zur Weiterverarbeitung verwendet werden konnte oder bei – 80 °C eingelagert wurde. Zur Herstellung des TC-MCMV Stocks wurden NIH/3T3-Zellen erst in 75 cm² Kulturflaschen expandiert und dann in 15 cm-Zellkulturschalen in einem Gesamtvolumen von 25 ml ausplattiert. Die Infektion erfolgte bei vollständiger Konfluenz durch Zugabe von 3 ml MCMV-Inokulum. Die Platten wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ weiterkultiviert. Bei weitgehend vollständiger Lyse des Zellrasens wurde der Virusüberstand geerntet. Die nachfolgenden Zentrifugationsschritte wurden in einer Ultrazentrifuge (Typ Avanti J-25, Rotor JA 14; Beckman Coulter, Krefeld, D) durchgeführt. Im ersten Schritt (4000 rpm, 30 min, 4 °C) wurde Debris abgetrennt. Anschließend wurde das Virus pelletiert (10.000 rpm, 3 h, 4 °C). Das Viruspellet wurde dann je nach Pelletgröße mit (300 - 800 µl) NIH/3T3-Medium bedeckt. Über Nacht wurde das Pellet auf Eis im Kühlschrank gelöst, am nächsten Tag im Dounce-Gewebehomogenisator homogenisiert und das aliquotierte Virus anschließend bei – 80 °C gelagert. Der Virustiter wurde in einem Plaqueassay auf MEFs ermittelt.

Herstellung von SG-MCMV Virusstock

Zur Generierung von SG-MCMV Virusstock wurden 25 BALB/c Weibchen im Alter von 4 Wochen mit 1×10^4 PFU SG-MCMV in einem Gesamtvolumen von 300 µl durch intraperitoneale Injektion infiziert. 2 Wochen nach Infektion wurden die Tiere mit CO₂ euthanasiert und die Glandulae submandibulares entnommen. Die Speicheldrüsen wurden dann in kaltes Medium (D-MEM high Glucose/10 % (v/v) FBS) aufgenommen und im Dounce-Gewebehomogenisator auf Eis homogenisiert. Das zusammengeführte Homogenisat der Drüsen wurde anschließend in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten (2000 rpm, 10 min, 4 °C) mit anschließender Passage durch ein 100 µm Zellsieb von unzerkleinerten Geweberesten befreit, aliquotiert und bei – 80 °C eingefroren. Der Virustiter wurde in einem Plaqueassay auf MEFs ermittelt.

Plaqueassay auf MEFs

Virustiter infizierter Organe oder Titer des Virusstocks wurden in einem Plaqueassay auf MEFs ermittelt. Bei diesem Verfahren wird der Virustiter nach Auswertung in der Einheit „*plaque-forming units* pro ml“ (PFU/ml) bzw. PFU/100 mg Organgewicht angegeben. Hierzu wurden kultivierte MEFs bei 80 - 90 % Konfluenz in 48-Lochplatten ausplattiert. In jede Vertiefung wurden dabei 5×10^4 Zellen in einem Volumen von 200 μ l gegeben. Nach Inkubation über Nacht bildeten die MEFs am nächsten Tag einen vollständig konfluenten, einschichtigen Zellrasen.

Virusinfizierte Lebern oder Milzen wurden in autoklavierten Dounce-Gewebehomogenisatoren auf Eis zerkleinert. Das Homogenisat wurde dann in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit kaltem MEF-Medium auf ein Gesamtvolumen von 10 ml (Leber) bzw. 6 ml (Milz) aufgefüllt. Zur Abtrennung von Debris wurde der Überstand zunächst für 15 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Ein zweiter Zentrifugationsschritt erfolgte in einer Tischzentrifuge (Heraeus, Hanau – D) bei 3500 rpm für 10 min und 4 °C (Rotor 8,5 cm). 500 μ l des Überstandes wurden als Ausgangspunkt einer Virusverdünnungsreihe in eine 48-Lochplatte pipettiert. Bei der Virusverdünnung wurden serielle 1:10 Verdünnungen in Triplikaten erzeugt. Dazu wurden in den einzelnen Verdünnungstufen jeweils 450 μ l MEF-Medium vorgelegt. Ausgehend vom unverdünnten Homogenisat wurden mit einer Multikanalpipette je 50 μ l Homogenisat in die erste Verdünnungsstufe übertragen und sorgfältig gemischt. Aus dieser Verdünnungsstufe wurden dann 50 μ l Inokulum in die nächste Verdünnungsstufe übertragen usw. Alle Schritte der Virusverdünnung erfolgten auf Eis. Für den Organplaqueassay wurden serielle 1:10 Verdünnungen bis 1:10⁵ generiert. Aus jeder Verdünnungsstufe wurden anschließend mit einer Multikanalpipette 200 μ l Inokulum auf die ausplattierten MEFs übertragen. Durch die nachfolgende Zentrifugation (2000 rpm, 30 min, 20 °C) wurde das Virus in besseren Kontakt mit dem Zellrasen gebracht (*centrifugal enhancement*) (Hudson et al. 1988). Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden Medium und Inokulum von den MEFs mit einer Multikanalpipette abgenommen und die MEFs mit einem Carboxmethylcellulose-Overlay (s. Puffer, Lösungen, Medien) überschichtet. Verdünnungsreihen für SG-MCMV bzw. TC-MCMV wurden in der gleichen Weise hergestellt. Als Ausgangsverdünnung wurde eine 1:100 Verdünnung gewählt, die in einem Gesamtvolumen von 1 ml erzeugt wurde. Die höchste Verdünnungsstufe war 1:10⁷. Der Zentrifugationsschritt entfiel. Die Platten wurden für 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend

mikroskopisch ausgewertet. Der Virustiter für infizierte Organe wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Virustiter (PFU/ml)} = \text{Mittelwert der Plaques} \times \text{Verdünnungsstufe} \times 2$$

$$\text{Virustiter (PFU/100 mg Gewebe)} = \frac{\text{Virustiter (PFU/ml)} \times \text{Volumen Organhomogenisat (ml)}}{\text{Organgewicht (mg)}} \times 100$$

Die Detektionsschwelle des Plaqueassays betrug für 100 mg Milzgewicht 4 PFU, für 100 mg Lebergewicht 6,6 PFU.

Infektion von NIH/3T3-Zellen mit TC-MCMV zur Herstellung viraler cDNA

Zur Amplifizierung des viralen M54-Gens wurden NIH/3T3 Zellen mit 1 MOI MCMV-WT infiziert und anschließend für 20 Minuten bei 2000 rpm und 20 °C zentrifugiert, wodurch die Infektion etwa den Faktor 10 verstärkt wurde (Hudson et al. 1988). Die Zellen wurden dann bei 37 °C und 5 % CO₂ für 6 Stunden inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurde aus den infizierten NIH/3T3-Zellen RNA nach dem TRIZOL-Protokoll (s. unten) isoliert und dann in cDNA umgeschrieben.

2.2.3 Tierversuche

WT C57BL/6 sowie Balb/c Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld, D) oder Harlan Winkelmann (Borchen, D) bezogen. IRF^{3^{-/-}} (IRF3^{-/-}) und IRF^{7^{-/-}} (IRF7^{-/-}) Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund wurden ursprünglich vom RIKEN BioResource Center (Ibaraki, J) mit freundlicher Genehmigung von Prof. Tadatsugo Taniguchi und Dr. Kenya Honda bezogen und weitergezüchtet. Ebenfalls aus eigener Zucht stammen die IRF^{3^{-/-}7^{-/-}} (IRF3/7^{-/-}) Mäuse. Die IRF^{1^{-/-}} (IRF1^{-/-}) Mäuse erhielt das Labor von Dr. Frank Schmitz (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, TU München). Die Haltung der Mäuse und die Tierversuche erfolgten entsprechend den geltenden Tierversuchsbestimmungen.

Infektionsexperimente in vivo

Für die Infektionsexperimente wurden Mäuse ähnlichen Alters verwendet und sofern nicht anders angegeben mit 5 x 10⁵ PFU SG-MCMV in einem Gesamtvolumen von 400 µl intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden vor der Infektion und nach Beendigung des Experimentes

gewogen, um den infektionsbedingten Gewichtsverlust zu dokumentieren. Die Mäuse wurden am Versuchsende oder vorzeitig bei Erreichen der Abbruchkriterien mit CO₂ euthanasiert. Für Blutabnahmen wurde die Vena saphena parva der Mäuse punktiert. Postmortal wurde das Blut nach Durchtrennung der Vena cava inferior aus dem Thorax pipettiert und Milz und Leber entnommen. Für die Überlebensexperimente wurden Mäuse ähnlichen Alters mit 1×10^5 PFU SG-MCMV in einem Gesamtvolumen von 400 µl intraperitoneal infiziert und über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Mäuse, die bei den Überlebensexperimenten wegen Vorliegen von Abbruchkriterien vorzeitig euthanasiert werden mußten, wurden als infektionsbedingte Sterbeereignisse dokumentiert.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

Genotypisierung transgener Mäuse: DNA-Isolation

Zur Genotypisierung von Knockout-Mäusen wurde DNA aus dem Mausschwanz isoliert. Zuchttieren wurde hierzu ein kleines Stück der Schwanzspitze abgeschnitten. Bei Versuchstieren wurde *post mortem* ein ca. 8 - 10 mm langes Schwanzstück entnommen. Zum Proteinverdau wurde das Schwanzgewebe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl Lyse-Puffer und Proteinase K (100 µg/ml) gegeben und über Nacht in einem Thermoschüttler bei 55 °C und 350 rpm inkubiert. Die Proben wurden am Folgetag für 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die DNA wurde mit 500 µl Isopropanol präzipitiert. Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurde die DNA aus dem Isopropanol entnommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und getrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wurde dann in 50 µl TE-Puffer im Thermoschüttler bei 55 °C und 450 rpm gelöst. Die Lagerung erfolgte bei + 4 °C oder bei - 20 °C.

Genotypisierungs-PCR

Zur Genotypisierung der IRF3^{-/-}, IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäuse wurden PCR-Primer gemäß den Empfehlungen des RIKEN-Institutes verwendet (s. Seiten 17 - 18). Für jeden Genlocus wurden dabei drei Primer verwendet, die unterschiedlich große PCR-Produkte für Wildtyp (IRF3: 350 bp; IRF7: 300 bp) oder Knockout-Status (IRF3: 450 bp; IRF7: 200 bp) ergaben, so daß innerhalb einer Probe Homo- oder Heterozygotie für das Zielgen bestimmt werden konnte. Abb. 6 zeigt beispielhaft das Ergebnis der Genotypisierungs-PCR. Für alle in den Experimenten eingesetzten Tiere wurde der Genotyp überprüft.

Tab. 1. Genotypisierungs-PCR für IRF3; 25 µl Reaktionsansatz

Reagenz	Endkonzentration	PCR-Bedingungen	
H ₂ O	anteilig	1. Anfangsdenaturierung	94 °C – 3'
10x PCR-Puffer	1x	2. Denaturierung	94 °C – 30''
MgCl ₂	3 mM	3. Oligo-Hybridisierung	60 °C – 30''
dNTPs	200 µM	4. Elongation	72 °C – 1'
IRF3 Primer 1	500 nM	Schritte 2 - 4 32 x wiederholen	
IRF3 Primer 2	500 nM	5. Abschlußelongation	72 °C – 5'
IRF3 Primer 3	500 nM		
Taq DNA-Polymerase	2,5 U		
DNA (unverdünnt)	1 µl		

Tab. 2. Genotypisierungs-PCR für IRF7; 25 µl Reaktionsansatz

Reagenz	Endkonzentration	PCR-Bedingungen	
H ₂ O	anteilig	1. Anfangsdenaturierung	94 °C – 3'
10x PCR-Puffer	1x	2. Denaturierung	94 °C – 30''
MgCl ₂	3 mM	3. Oligo-Hybridisierung	60 °C – 30''
dNTPs	200 µM	4. Elongation	72 °C – 1'
IRF3 Primer 1	500 nM	Schritte 2 - 4 35 x wiederholen	
IRF3 Primer 2	500 nM	5. Abschlußelongation	72 °C – 5'
IRF3 Primer 3	500 nM		
Taq DNA-Polymerase	2,5 U		
DNA	1 µl		

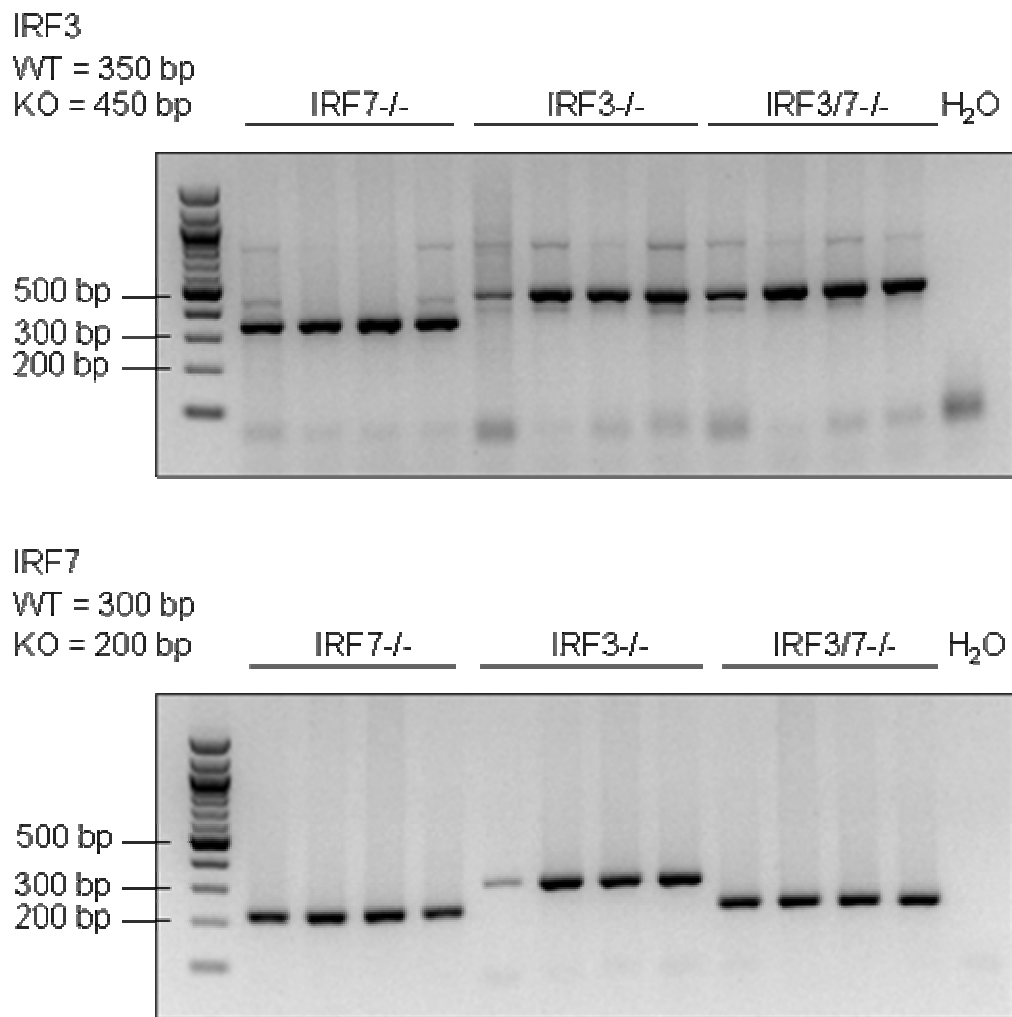


Abb. 6. Genotypisierungs-PCR für IRF3 und IRF7. 2 %iges Agarosegel, 100 bp DNA-Leiter; Gelelektrophorese bei 90 mV.

RNA-Isolation aus Gewebe

Für Genexpressionsstudien mittels qRT-PCR wurde Gesamt-RNA aus Leber und Milz MCMV-infizierter Mäuse isoliert. In flüssigem Stickstoff schockgefrorene Gewebeproben aus Leber und Milz wurden in jeweils 1 ml TRIzol aufgenommen und mit dem Silent Crusher (Heidolph, Schwabach, D) auf Eis homogenisiert. Die RNA-Isolation erfolgte gemäß dem TRIzol-Protokoll (Invitrogen). Zur Stabilisierung der RNA wurde den Proben vor Präzipitation 10 µg GlycoBlue entsprechend Herstellerangaben zugegeben. Die isolierte RNA wurde in 90 µl nukleasefreiem H₂O bei 55 °C für 10 min gelöst und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Zur Entfernung genomischer Rest-DNA aus dem Reaktionsansatz wurde die RNA mit DNase I behandelt. In einen 40 µl Ansatz wurden dabei 4 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Der DNA-Verdau erfolgte für 20 min bei 37 °C. Anschließend wurde die DNase I nach Zugabe von 3,3 µl 25 mM EDTA durch 15 minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert.

Tab. 3. DNase I-Behandlung: 40 µl Ansatz

Reagenz	Endkonzentration
DNase I	8 U (gesamt)
10x DNase I Puffer	1x
Gesamt-RNA	4 µg
H ₂ O	anteilig

Zur Kontrolle der DNase I-Behandlung und zum Ausschluß einer RNA-Degradation folgte ein RNA-Kontrollgel (1,5 % Agarose). Aus jedem Ansatz wurden 20 µl RNA zusammen mit 4 µl 6x Orange G aufgetragen und bei 90 mV elektrophoretisch aufgetrennt. So konnten die 18 S- und 28 S-Bande der intakten ribosomalen RNA (rRNA) nachgewiesen werden.

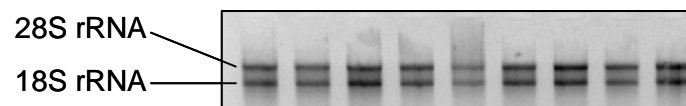


Abb. 7. RNA-Kontrollgel. 1,5 %iges Agarosegel; Gelelektrophorese bei 90 mV.

cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese ausgehend von DNase I behandelter RNA erfolgte nach dem Protokoll für die reverse Transkriptase SuperScript II[™]. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 21 µl. Im ersten Schritt wurden 11 µl DNase I behandelte RNA zusammen mit einem Oligo (dT)₁₅ Primer und dNTPs für 5 min bei 65 °C inkubiert. Im zweiten Reaktionsschritt wurden dann alle übrigen Reagentien bis auf die reverse Transkriptase hinzugegeben und für 2 min bei 42 °C inkubiert. Erst dann wurde die reverse Transkriptase SuperScript II hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 50 min bei 42 °C inkubiert. Durch anschließende Erhitzung auf 70 °C für 15 min wurde die reverse Transkriptase inaktiviert. Die cDNA wurde 1:5 in nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei – 80 °C gelagert.

Tab. 4. SuperScript II™ cDNA-Synthese; 21 µl Ansatz

Reagenz	Endkonzentration
Oligo (dT) ₁₅	500 µg/ml
dNTP Mix	0,5 mM
5x FS Puffer	1x
0,1 M DTT	0,1 mM
Rnase OUT	40 U
SuperScript II™	200 U

Zur Überprüfung der cDNA-Synthese und Ausschluß einer Kontamination durch genomische DNA wurde eine β -Actin-PCR der cDNA-Proben durchgeführt. Genomische DNA würde hier ein größeres PCR-Produkt ergeben. Als zusätzliche Kontrolle wurde DNase I behandelte RNA in entsprechender Verdünnung wie die cDNA in die qRT-PCR eingesetzt. Der qRT-PCR-Ansatz war 25 µl bestehend aus 5 µl cDNA und 20 µl Reagentien:

Tab. 5. β -Actin-PCR; 25 µl Reaktionsansatz

Reagenz	Endkonzentration	PCR-Bedingungen
H ₂ O	anteilig	1. Anfangsdenaturierung 94 °C – 3'
10x PCR-Puffer	1x	2. Denaturierung 94 °C – 30''
MgCl ₂	3 mM	3. Oligo-Hybridisierung 60 °C – 30''
dNTPs	200 µM	4. Elongation 72 °C – 30''
β -Actin sense Primer	500 nM	Schritte 2 - 4 35 x wiederholen
β -Actin antisense Primer	500 nM	5. Abschlußelongation 72 °C – 7'
Taq DNA-Polymerase	2,5 U	
cDNA	5 µl	

qRT-PCR für Genexpressionstudien

Die Genexpression in Leber und Milz infizierter Mäuse wurde auf RNA-Ebene mit qRT-PCR (TaqMan-PCR) untersucht. Die spezifischen Primer wurden im Materialteil beschrieben und alle in einer Endkonzentration von 500 nM eingesetzt. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR Green verwendet, das in die PCR-Produkte eingebaut wird. Der 25 µl Reaktionsansatz wurde nach dem Protokoll der Firma Applied Biosystems pipettiert und die qRT-PCR im TaqMan 7700 ABI PRISM® (Applied Biosystems) durchgeführt.

Tab. 6. qRT-PCR; 25 µl Reaktionsansatz

Reagenz	Endkonzentration
2x SYBR Green Mastermix	8 U
Sense Primer	500 nM
Antisense Primer	500 nM
H ₂ O	anteilig
cDNA	5 µl

Die Auswertung der Messung erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode (CT = cycle time) (Livak et al. 2001). Bei dieser Methode wird das Fluoreszenzsignal des Zielgens mit dem Fluoreszenzsignal eines nicht regulierten endogenen Kontrollgens (= *housekeeping gene*) verglichen. In der vorliegenden Arbeit wurde Cyclophilin A als endogene Kontrolle verwendet. Die Signaldifferenz zwischen Zielgen und Kontrollgen ergibt den ΔCT -Wert. Die Vergleichbarkeit der einzelnen Proben wird durch Normierung der ΔCT -Werte auf einen willkürlich festgelegten Nullwert erreicht und ergibt die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte. Die relative mRNA-Menge einer Probe errechnet sich dann über die Formel $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

Zur Vergleichbarkeit der PCR-Effizienz für verschiedene Gene wurden für eine Reihe der zu untersuchenden Gene relative Standardkurven durch cDNA-Verdünnungen erstellt. Wie aus Abb. 7 ersichtlich weisen die Standardkurven (hier Cyclophilin A, IFN- α und IFN- β dargestellt) weitgehend ähnliche Steigungen und damit im Vergleich einen ähnlichen Effizienzgrad auf.

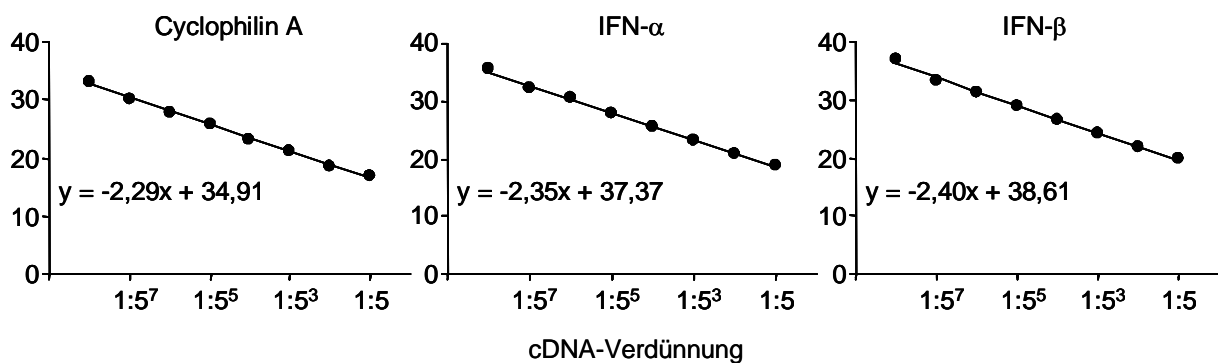


Abb. 7. qRT-PCR: Relative Standardkurven für Cyclophilin A, IFN- α , IFN- β .

Isolation der MCMV-DNA aus virusinfiziertem Gewebe

Zur Bestimmung der MCMV-Kopienzahl mittels qRT-PCR wurde aus den Lebern und Milzen virusinfizierter Mäuse Gesamt-DNA mit dem DNeasy® Blood & Tissue Reaktionssystem (Quiagen, Hilden, D) entsprechend den Herstellerangaben isoliert und mit H₂O eine Konzentration von 10 ng/μl eingestellt. Die virale DNA wurde zunächst qualitativ in einer Standard-PCR durch Amplifizierung einer spezifischen Sequenz des M54-Gens nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente cDNA aus einer Testinfektion von NIH/3T3 Zellen mit 10 MOI MCMV

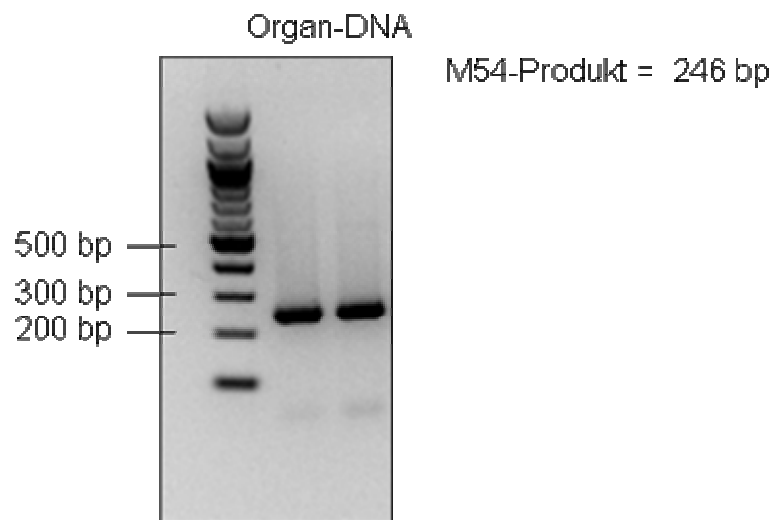


Abb. 8. M-54-PCR. 2 %iges Agarosegel, 100 bp DNA-Leiter. Gelelektrophorese bei 90 mV.

Tab. 7. M54-PCR; 25 μl Reaktionsansatz

Reagenz	Endkonzentration	PCR-Bedingungen
H ₂ O	anteilig	1. Anfangsdenaturierung 94 °C – 3'
10x PCR-Puffer	1x	2. Denaturierung 94 °C – 30''
MgCl ₂	3 mM	3. Oligo-Hybridisierung 60 °C – 30''
dNTPs	200 μM	4. Elongation 72 °C – 45''
DMSO	5 %	Schritte 2 - 4 35 x wiederholen
M54 sense Primer	500 nM	5. Abschlußelongation 72 °C – 7'
M54 antisense Primer	500 nM	
Taq DNA-Polymerase	2,5 U	
DNA	50 ng	

Herstellung des M54-Plasmides zur Quantifizierung der MCMV-Kopien

Zur absoluten Bestimmung der Viruslast in MCMV-infizierten Lebern und Milzen wurde die virale Kopienzahl durch qRT-PCR ermittelt. Als Zielprodukt wurde eine spezifische Sequenz des MCMV M54-Gens ausgewählt, das die virale DNA-Polymerase kodiert.

Zunächst wurde ein Plasmid mit dem M54-PCR-Produkt hergestellt. Dazu wurde das M54-PCR-Produkt durch TA-Klonierung in den pCR2.1[®]-TOPO[®]-Vektor entsprechend dem Protokoll des Herstellers eingefügt. Nach Transformation von chemokompetenten TOP10 Zellen erfolgt die Anzucht von rekombinanten Bakterienkulturen auf LB/Ampicillin-Agar. Die Isolation der Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* erfolgte mit Hilfe des QIAprep[®]-Plasmidisolationsreaktionssystems (Quiagen, Hilden, D) entsprechend Herstellerangaben. Die Konzentration der eluierten Plasmid-DNA wurde spektrophotometrisch durch Extinktion bei 260 nm bestimmt, Proteinkontamination durch Extinktion bei 280 nm detektiert. Für reine Plasmid-DNA sollte das Extinktionsverhältnis A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Zur Identifikation des richtigen Klonen wurde ein Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI durchgeführt. Bei erfolgreicher Transformation mußten durch diese Behandlung zwei DNA Fragmente im Gel sichtbar sein: das Insertionsprodukt M54 mit einer Größe von 246 bp und der Vektor mit einer Größe von 3,9 kb. Der Kontrollverdau wurde als 20 µl Ansatz pipettiert. Dieser enthielt insgesamt 1 µg DNA zusammen mit 2 µl 10x EcoRI Puffer, 1 µl EcoRI und H₂O. Der Reaktionsansatz wurde 2 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Als Marker wurden eine 1 kb und eine 100 bp DNA-Leiter verwendet.

Nach Identifizierung des richtigen Klonen wurde dieser zur Herstellung eines Glycerolstocks in einer Flüssigkultur über Nacht expandiert. Dazu wurden die Bakterien in einer 1:1000 Verdünnung in 4 ml LB/Ampicillin-Flüssigmedium angeimpft und 14 - 15 h wie oben beschrieben inkubiert. Am nächsten Tag wurden dann 600 µl der expandierten und aufgeschüttelten Bakterien mit 400 µl sterilem Glycerol 50 % in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß vermischt und bei – 80 °C eingefroren.

Absolute Quantifizierung der Viruslast infizierter Organe mittels qRT-PCR

Die Kopienzahl einer gegebenen Plasmidkonzentration errechnet sich nach folgenden Überlegungen:

Durchschnittliche molare Masse eines doppelsträngigen Basenpaares = 660 g/mol. 1 mol enthält 6×10^{23} Moleküle.

$$\begin{aligned} \text{Molare Masse des Plasmides (g/mol)} &= \text{Plasmidgröße (bp)} \times 660 \text{ g/mol} \\ \text{Stoffmenge (mol/}\mu\text{l)} &= \frac{\text{Konzentration der Plasmidlösung (g/}\mu\text{l)}}{\text{molare Masse des Plasmides (g/mol)}} \\ \text{Kopienzahl pro/}\mu\text{l Plasmidlösung} &= \text{Stoffmenge des Plasmides (mol/}\mu\text{l)} \times 6 \times 10^{23} \end{aligned}$$

Für das M54-Plasmid ergibt sich daher:

$$\begin{aligned} \text{Größe des M54-Plasmides} &= 3900 \text{ bp (TOPO}^{\text{®}}\text{-Vektor)} + 246 \text{ bp (M54-Insert)} \\ &= 4146 \text{ bp} \end{aligned}$$

$$\text{Konzentration der Plasmidlösung} = 67,18 \mu\text{g/ml} = 6,72 \times 10^{-10} \text{ g/}\mu\text{l}$$

$$\begin{aligned} \text{Molare Masse des M54-Plasmides} &= 4146 \text{ bp} \times 660 \text{ g/mol} \\ &= 2,73636 \times 10^6 \text{ g/mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Stoffmenge der M54-Plasmidlösung} &= 6,72 \times 10^{-10} \text{ g/}\mu\text{l} \times (2,73636 \times 10^6 \text{ g/mol})^{-1} \\ &= 2,46 \times 10^{-14} \text{ mol/}\mu\text{l} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kopienzahl/}\mu\text{l} &= 2,46 \times 10^{-14} \text{ mol/}\mu\text{l} \times 6 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1} \\ &= 1,47 \times 10^{10} \text{ Moleküle/}\mu\text{l} \end{aligned}$$

Für die qRT-PCR wurden jeweils 50 ng Organ-DNA in Duplikaten eingesetzt. Als Quantifizierungsstandard wurde das M54-Plasmid in Triplikaten und Log-Verdünnungsstufen ausgehend von 10^8 Kopien bis 10^1 Kopie eingesetzt. Dabei wurden die Verdünnungen so gewählt, daß die gewünschte Kopienzahl in 5 μl enthalten war. Der Reaktionsansatz für Proben und Standard betrug 25 μl :

Tab. 8. M54 qRT-PCR; 25 µl Reaktionsansatz

Reagenz	Endkonzentration
2x SYBR Green Mastermix	1 x
M54 sense Primer	500 nM
M54 antisense Primer	500 nM
H ₂ O	anteilig
DNA	50 ng
<i>Oder</i>	
Plasmidstandard	5 µl pro Verdünnungsstufe

Die qRT-PCR wurde in einem Taqman[®] ABI PRISM[™] 7700 bei einer Annealing-Temperatur von 60 °C durchgeführt. Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe (CT > 40). Abb. 9 zeigt das repräsentative Ergebnis der Standardkurve. Bei linearer Auftragung der CT Werte gegen die Verdünnungsstufe ist die Steigung ein Maß für die PCR-Effizienz. Diese berechnet sich nach der Formel: $\text{Effizienz (E)} = 10^{(-1/m)}$, wobei m die Steigung der Standardkurve ist (Rasmussen 2001). Bei der hier vorliegenden Steigung von -3,45 beträgt die PCR-Effizienz 1,95 (= 97,5 %).

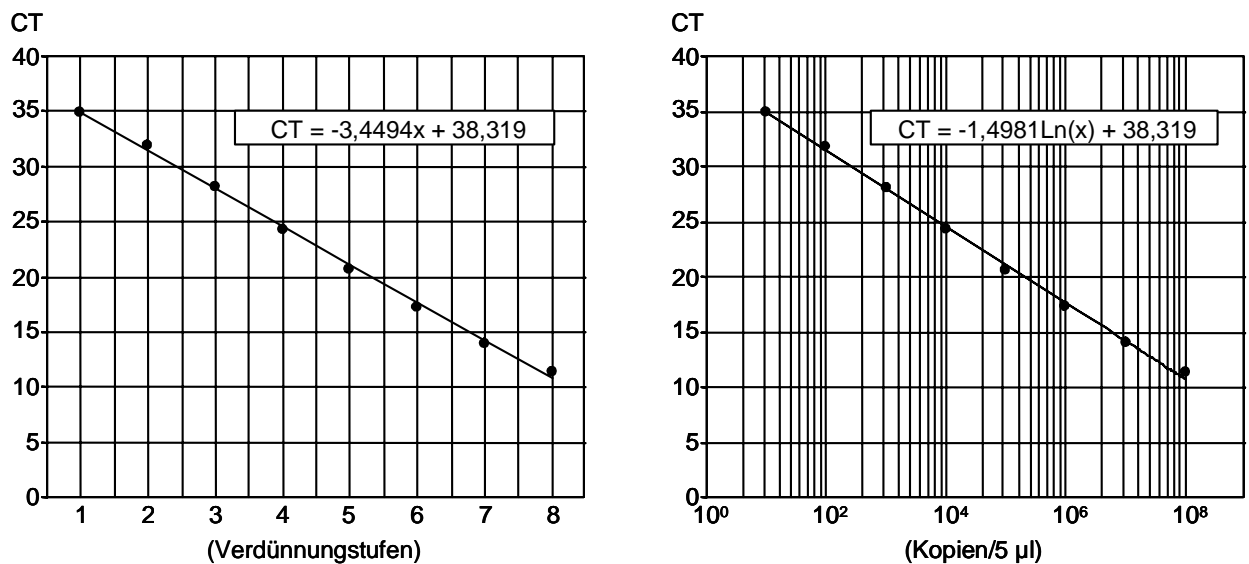


Abb. 9. M54-Plasmidstandardkurve in linearer und logarithmischer Auftragung.

Durch logarithmische Auftragung der CT Werte gegen die Verdünnungsstufe ergibt sich aus der Geradengleichung die Funktion zur Berechnung der Kopienzahl (x):

$$x = -1,4981 \ln(x) + 38,319$$
$$\ln(x) = \frac{CT - 38,319}{-1,4981}$$
$$x = e^{\left[\frac{CT - 38,319}{-1,4981} \right]}$$

Unter methodischen Aspekten ist die Aussage des Plaqueassay stärker zu bewerten, da mit dieser Methode bioaktives, d. h. infektiöses Virus erfaßt wird. Die absolute Quantifizierung der MCMV-Kopien besitzt methodisch zwar die größere Exaktheit und geringere Fehleranfälligkeit in der Auswertung, liefert jedoch keine Aussagen über die Bioaktivität der Viruspartikel. So können mit diesem Verfahren defekte Viruspartikel nicht von aktivem Virus unterschieden werden. In unseren Experimenten beobachteten wir jedoch weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse aus dem Plaqueassay und aus dem qRT-PCR-Nachweis der Kopienzahl des MCMV-Genoms.

2.2.5 Immunologische Methoden

In vitro Stimulation von GMCSF-DC mit MCMV und NDV

GMCSF-DC wurden mit DC-Vollmedium auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Pro Stimulationsbedingung wurden jeweils 2×10^5 GMCSF-DC in 200 μ l Gesamtvolumen in einer 96-Loch-Platte eingesetzt. Die GMCSF-DC wurden mit MCMV \pm UV in den Dosen 10 MOI, 2 MOI, 0,4 MOI und 0,08 MOI infiziert und mit NDV in den Dosen 50 HAU/ml, 10 HAU/ml, 2 HAU/ml, 0,4 HAU/ml. Zur Inaktivierung von MCMV wurde der Überstand mit UV-Licht ($0,5 \text{ J/cm}^2$) auf Eis bestrahlt (UV-Crosslinker, UVP, Cambridge, GB). Die Zellen wurden für 24 h stimuliert, anschließend wurden die zellfreien Überstände für ELISA geerntet.

L929-Bioassay für Typ I IFN

Aus dem Serum SG-MCMV-infizierter Mäuse wurde die antivirale Aktivität von Typ I IFN in einem Bioassay mit L929-Fibroblasten bestimmt. Hierzu wurden L929-Fibroblasten in 96-Loch-Flachbodenplatten ausgesät (100 μ l/Vertiefung einer 10^5 Zellen/ml Zellsuspension) und für 20 - 24 h inkubiert. Zur Inaktivierung von Viruspartikeln im Serum wurde dieses 1:20

verdünnt in PBS mit UV-Licht (1 J/cm^2) auf Eis bestrahlt und anschließend in 96-Loch-Rundbodenplatten seriell 1:2 verdünnt (zwölf Verdünnungen insgesamt). Die Ausgangsverdünnung des Mausserums war dabei 1:40 in Medium. Zur Quantifizierung des Typ I IFN im Serum wurde eine Standardreihe aus rekombinantem murinen IFN- α (PBL) erstellt. Der IFN-Standard wurde ausgehend von 125 U/ml ebenfalls seriell 1:2 bis auf eine Konzentration von 0,06 U/ml verdünnt. Um den spezifischen antiviralen Effekt von IFN- β zu ermitteln, wurde das Mausserum in einem zweiten Bioassay mit einem IFN- β neutralisierenden Antikörper in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ (Rat Anti-Mouse Interferon- β neutralizing, US Biological) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Erst dann erfolgte die serielle Serumverdünnung. Zum Ausschluß einer unspezifischen IFN-Bindung wurden in gleicher Weise ein IFN- α Standard, sowie ein rekombinanter IFN- β Standard (Ausgangskonzentration 125 U/ml) und ein IFN- γ Standard (Ausgangskonzentration 1 ng/ml) mit dem IFN- β neutralisierenden Antikörper behandelt. Eine Kreuzreaktion des IFN- β neutralisierenden Antikörpers mit rekombinantem IFN- γ wurde zusätzlich mittels ELISA ausgeschlossen.

Nach Abnahme des Mediums von den L929-Zellen wurden jeweils 100 μl /Vertiefung Proben, IFN-Standards und Kontrollen auf die Zellen gegeben und diese für weitere 20 - 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Überstände von den L929-Zellen abgenommen und 100 μl /Vertiefung einer VSV-Suspension mit einer Konzentration von 10^4 PFU/ml zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend für weitere 40 h inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle des zytopathischen Effekts wurde der Virusüberstand von den Zellen abgenommen und diese mit 200 μl /well einer Kristallviolett-Lösung gefärbt. Bei protektivem antiviralem Effekt ließ sich ein intakter Zellrasen homogen anfärben. Die Konzentration an Typ I IFN im Mausserum wurde über die IFN- α Standardreihe berechnet, indem die niedrigste Verdünnungsstufe des Standards mit vollständig protektivem Effekt mit der höchsten protektiven Serumverdünnung multipliziert wurde.

Zytokin-ELISA

Der ELISA für IFN- γ , IFN- λ , IL-12p70 wurde nach dem Protokoll des Herstellers (R&D) durchgeführt. Nach eigenem Protokoll wurden der ELISA für IFN- α , IFN- β und IL-12p40 durchgeführt (s. Tab. 9). Die photometrische Messung zur Bestimmung der OD erfolgte mit Hilfe eines Mikrotiterphotometers (Photometer Multiskan EX – VWR, Darmstadt, D). Zur Auswertung wurde die Software Ascent 2.6 (VWR) benutzt.

Tab. 9: Reaktionsansätze für Zytokin-ELISA

IFN-α	Konz./Verdünnung	Lösung	Inkubation	Volumen
Capture-Antikörper	1:500	Beschichtungspuffer	3 h RT	50 μ l
Block		10 % FBS in PBS	1 - 1,5 RT	200 μ l
Serum	1:2	Verdünnungspuffer	O/N +4 °C	50 μ l
Zellkultur-Überstand	1:2	Verdünnungspuffer	O/N +4 °C	50 μ l
Höchststandard	1000 U/ml	Verdünnungspuffer	O/N +4 °C	50 μ l
Detektionsantikörper	1:400	Verdünnungspuffer	2 h RT	50 μ l
Donkey-HRP	1:2000	Verdünnungspuffer	1 h RT	50 μ l
Substrat: ABTS	1:50	ABTS-Substrat-Lsg.		100 μ l
Stop-Lösung		1 % SDS-Lösung	–	100 μ l

IFN-β	Konz./Verdünnung	Lösung	Inkubation	Volumen
Capture-Antikörper	1:500	Beschichtungspuffer	3 h RT	50 μ l
Block		10 % FBS in PBS	1 - 1,5 RT	200 μ l
Serum	1:2	Verdünnungspuffer	O/N +4 °C	50 μ l
Zellkultur-Überstand	1:2	Verdünnungspuffer	O/N +4 °C	50 μ l
Höchststandard	1000 U/ml	Verdünnungspuffer	O/N +4 °C	50 μ l
Detektionsantikörper	1:40	Verdünnungspuffer	2 h RT	50 μ l
Donkey-HRP	1:2000	Verdünnungspuffer	1 h RT	50 μ l
Substrat: ABTS	1:50	ABTS-Substrat-Lsg.		100 μ l
Stop-Lösung		1 % SDS-Lösung	–	100 μ l

IL-12p40	Konz./Verdünnung	Lösung	Inkubation	Volumen
Capture-Antikörper	1:1000	Beschichtungspuffer	3 h RT	50 μ l
Block		10 % FBS in PBS	1 - 1,5 RT	200 μ l
Serum	1:50	Verdünnungspuffer	O/N +4 °C	50 μ l
Zellkultur-Überstand	1:80 bis 1:100	Verdünnungspuffer	O/N +4 °C	50 μ l
Höchststandard	8000 pg/ml	Verdünnungspuffer	O/N +4 °C	50 μ l
Detektionsantikörper	1:1000	Verdünnungspuffer	2 h RT	50 μ l
SA-HRP ¹	1:2000 – 1:4000	Verdünnungspuffer	1 h RT	50 μ l
Substrat: ABTS	1 mg/ml	ABTS-Substrat-Lsg.		100 μ l
Stop-Lösung		1 % SDS-Lösung	–	100 μ l

¹ Hersteller: Amersham; je nach Charge unterschiedliche Endverdünnungen

Durchflußzytometrie (FACS)

Bei der Färbung von Zelloberflächenmarkern wurden zwischen 2×10^5 und 5×10^5 Zellen pro Färbung eingesetzt. Dazu wurden 20 μl Zelluspension in FACS-Puffer zusammen mit 20 μl Färbelösung bestehend aus Fc-Block (Anti-Maus FcR2/CD32-Antikörper) und FACS-Antikörpern in einer 96-Loch-Rundbodenplatte für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zweimal gewaschen (200 μl FACS-Puffer/Vertiefung + Zentrifugation: 1500 rpm, 5 min, 4 °C). Zur Messung wurden die Zellen in 100 - 150 μl FACS-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 5 μl einer Propidiumiodid-Lösung (200 $\mu\text{g/ml}$) kurz vor der Messung konnten tote Zellen (= Propidiumiodid positiv) ausgeschlossen werden.

Bei der Intrazellulärfärbung von IFN- γ wurden 6 - 8 $\times 10^6$ Zellen/Ansatz eingesetzt. Nach der Oberflächenfärbung (10 min auf Eis) wurden die Zellen mit 2 % PFA fixiert (20 min RT), anschließend mit Saponin-Puffer permeabilisiert (20 min RT), dann intrazellulär gefärbt mit Anti-IFN- γ -FITC (20 min RT) und zweimal mit Saponin-Puffer und einmal mit PBS gewaschen. Die Messung und Auswertung wurde mit dem FACSCalibur (BD) und der CellQuest 5.2.1-Software (BD) durchgeführt.

NK-Zell-Zytotoxizitätsassays

⁵¹Cr-Release-Assay

Der ⁵¹Cr-Assay ist die Standardmethode zur Bestimmung der NK-Zell Zytotoxizität. Als Zielzellen wurden YAC-1 Zellen verwendet. YAC-1 exprimieren NKG2D-Liganden aus der Familie der Rae-1 Proteine und können dadurch von aktivierten NK-Zellen erkannt werden. NK Zellen wurden aus der Milz von SG-MCMV infizierten WT und IRF7^{-/-} Mäusen (5×10^5 PFU i.p.) isoliert und der Reinheitsgrad im FACS (Färbung mit Anti-CD3 ϵ -FITC, Anti-DX5-PE und Anti-NK1.1-APC) bestimmt. Nach Korrektur für den Prozentsatz der CD3 ϵ ⁻DX5⁺NK1.1⁺ Zellen wurde die NK-Zellkonzentration auf 1×10^6 /ml eingestellt. Jeweils 1×10^6 Zielzellen wurden mit ⁵¹Cr markiert. Dazu wurden die Zielzellen abzentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand bis auf 30 μl abgesaugt. Nach Zugabe von 70 μl Chromium (1 mCi/ml verdünnt in Medium) wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, dabei alle 15 min resuspendiert. Nach drei Waschschritten mit RPMI (2 \times 800 rpm, 10 min, RT und 1 \times 1200 rpm, 10 min RT) wurden die Zielzellen auf eine Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml in Kulturmedium eingestellt. In einer 96-Loch-Rundbodenplatte wurden die

NK-Zellen in Triplikaten ausgehend von 2×10^5 Z/pro Vertiefung seriell 1:2 verdünnt. Durch Zugabe von jeweils 5×10^3 Zielzellen pro Vertiefung entstanden unterschiedliche Verhältnisse von Effektor- zu Zielzellen. Durch 5 min Zentrifugation bei 500 rpm und RT wurden NK-Zellen und Zielzellen miteinander in Kontakt gebracht. Für Totallyse wurden Zielzellen mit 1 % NP40 behandelt. Die Platten wurden dann 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde jeweils 50 µl Überstand geerntet und zur Messung in einen Gamma-Zähler (Packard Top-Count-NXT C384V00) gegeben. Die Spontanlyse betrug weniger als 15 % der Totallyse. Die spezifische Lyse (%) errechnete sich nach folgender Formel:

$$\frac{(\text{experimentell ermittelte Lyse} - \text{Spontanlyse})}{(\text{Totallyse} - \text{Spontanlyse})} \times 100 \%$$

CFSE-basierter Zytotoxizitätsassay

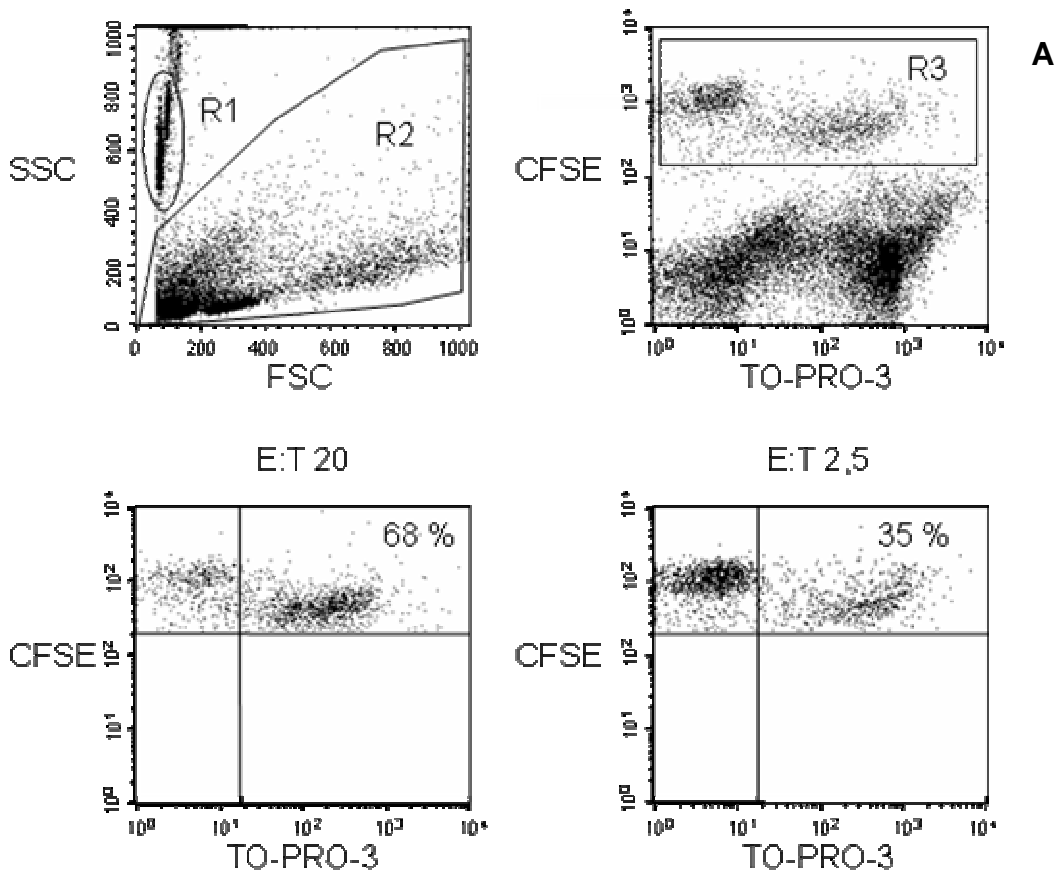
Als Alternativmethode zum Standard ^{51}Cr -Assay wurde ein durchflußzytometrisches Verfahren zur Detektion der Zytotoxizität der NK-Zellen etabliert, das auf der Färbung der Zielzellen mit CFSE basiert. CFSE-basierte Zytotoxizitätsassays wurden bereits in der Literatur beschrieben (Lecoeur et al. 2001, Jedema et al. 2004)

NK-Zellen wurden wie zuvor beschrieben aus der Milz isoliert. Die YAC-1-Zielzellen wurden mit 2,5 µM CFSE markiert. Unterschiedliche Verhältnisse von Effektor- zu Zielzellen wurden in Triplikaten nach dem oben beschriebenen Prinzip in 96-Loch-Rundbodenplatten erzeugt. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 500 rpm und RT wurden NK-Zellen und Zielzellen miteinander in Kontakt gebracht und anschließend für 4 h bei 37 °C inkubiert. Zum Abbruch der Zytolysetätigkeit durch die NK-Zellen wurden die Mikrotiterplatten auf Eis platziert. Die einheitliche Zählung der nicht lysierten Zielzellen erfolgte durch Zugabe von jeweils 20.000 Zähl-Beads pro Probe kurz vor der FACS-Messung. Lysierte Zellen wurden durch Zugabe von TO-PRO-3 Iodid in einer Endkonzentration von 10 - 30 nM identifiziert.

Abb. 10 A erläutert die Gatingstrategie und das Prinzip zur Ermittlung der spezifischen Lyse. Bei den verwendeten Zähl-Beads handelt es sich um ein Gemisch zweier Bead-Typen (A und B) mit nahezu identischem FSC-Signal jedoch unterschiedlichen SSC-Signalen. Bei Darstellung des SSC-Signals gegen das FSC-Signal stellen sich beide Bead-Typen als streifige Populationen dar (Region 1) und können gegenüber Debris und Zellen abgegrenzt werden (Region

2). Als Kontrolle einer akkuraten Zählung empfiehlt der Hersteller die Überprüfung des Verhältnisses der gezählten A- und B-Beads wie beschrieben. Zur Standardisierung der Messung wurden insgesamt 5000 Beads der Region R1 gezählt. Zur Auswertung des CFSE- und TO-PRO-3-Fluoreszenzsignals wurde das Analysefenster auf alle Zellen unter Ausschluß der Beads gesetzt (Region 2). Die Zielzellen stellen sich als CFSE-hochpositive Population dar (Region 3). Viable Zielzellen sind CFSE-positiv und TO-PRO-3-negativ, lysierte Zielzellen sind doppelt positiv für CFSE und TO-PRO-3. Die spezifische Lyse (%) errechnet sich demnach als: Experimentelle Lyse (%) – Spontanlyse (%).

Mit dem CFSE-basierten Zytotoxizitätsassay wurden ähnliche Lyseraten erzielt wie mit dem ⁵¹Cr-Release-Assay (Abb. 10 B). Die Spontanlyse lag bei 5 %. Aufgrund der guten Übereinstimmung mit dem ⁵¹Cr-Release-Assay wurde dieser Assay zur Überprüfung der Ergebnisse aus vorangegangenen Zytotoxizitätsexperimenten eingesetzt.



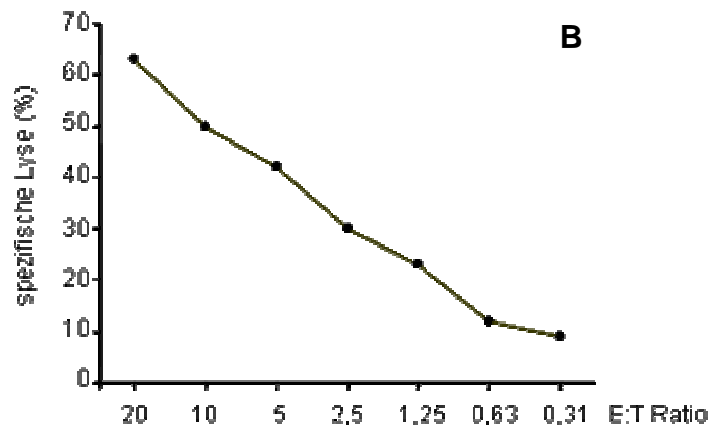


Abb. 10. CFSE-basierter Zytotoxizitätsassay. (A) Region 1 = Counting Beads, Region 2 = alle Zellen, Region 3 = Zielzellen (CFSE⁺TO-PRO-3^{+/−}). (B) Darstellung der spezifischen Lyse von CFSE-markierten YAC-1-Zielzellen bei verschiedenen Effektor-Zielzellen-Verhältnissen.

Statistische Analyse

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse sofern nicht anders bezeichnet als arithmetisches Mittel angegeben. Die statistische Streuung der Ergebnisse wird als Standardfehler des Mittelwertes (SEM, *standard error of mean*) dargestellt und errechnet sich nach folgender Formel mit n = Stichprobenumfang und SD = Standardabweichung:

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Zur Prüfung auf statistische Signifikanz wurde ein zweiseitiger Student-t-Test für unpaarige Stichproben durchgeführt und mit der Statistikfunktion des Programmes Microsoft Excel berechnet. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen und graphisch durch das Symbol „*“ gekennzeichnet. Zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede in den Überlebensexperimenten wurde der Log-Rank-Test durchgeführt und mit dem Programm Graphpad Prism 5.0 (STATCON, Witzhausen – D) berechnet. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Funktion von IRF1, IRF3 und IRF7 für die Interferoninduktion durch MCMV in myeloiden DC

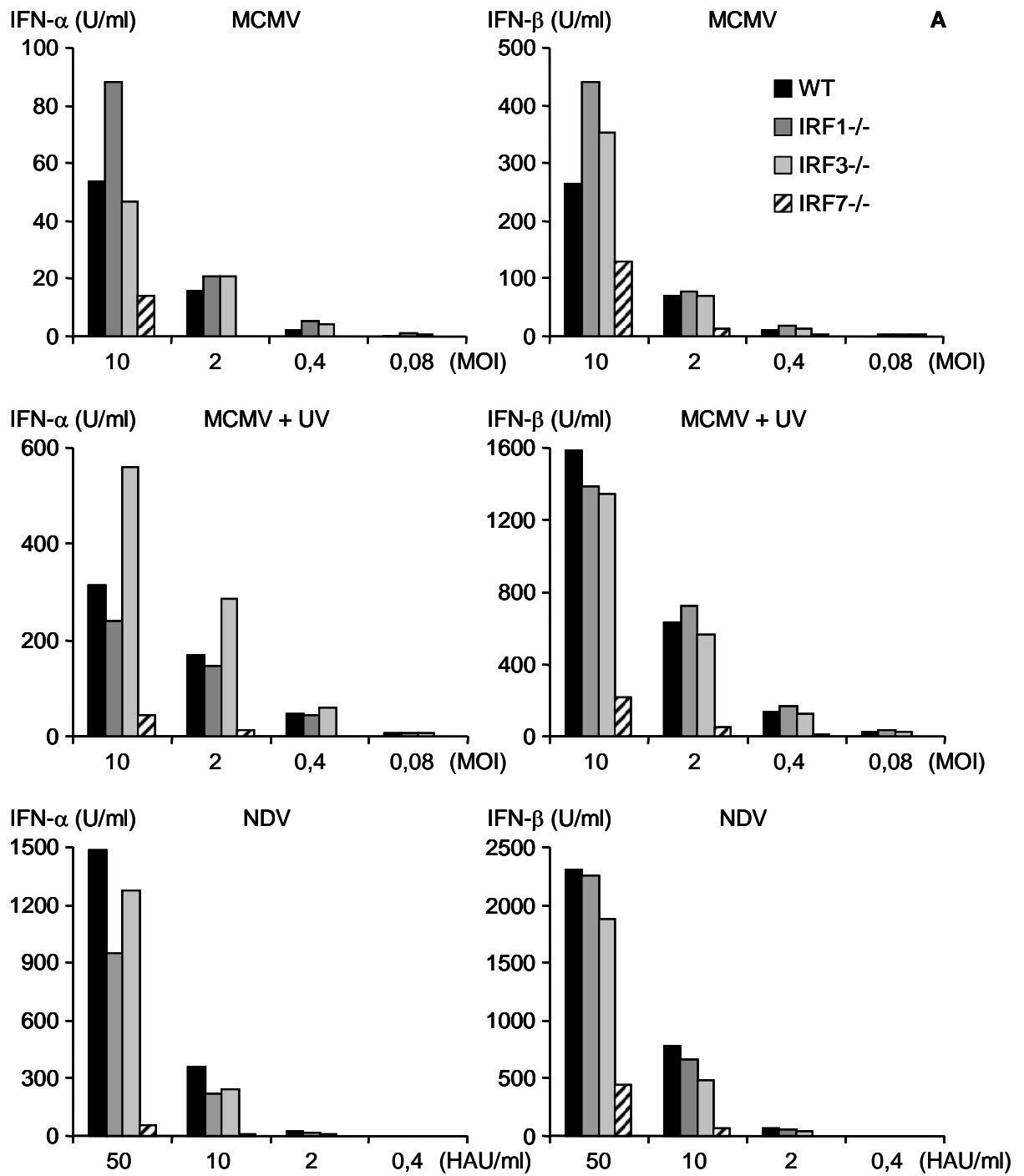
Die Bedeutung von IRF3 und IRF7 als zentrale Transkriptionsfaktoren in der Signaltransduktion für die Induktion von Typ I IFN im Kontext einer Virusinfektion wurde durch die Studien von Sato et al. (2000) und Honda et al. (2005) eindrucksvoll belegt. Wie bereits zuvor beschrieben kann bei einer systemischen MCMV-Infektion eine biphasische IFN-Antwort beobachtet werden, die initial nach 36 Stunden TLR9/MyD88-abhängig und pDC-vermittelt ist und nach 48 Stunden MyD88-unabhängig ist (Delale et al. 2005, Krug et al. 2004). Für die MyD88-unabhängige IFN-Antwort wird die Existenz eines zytosolischen DNA-Sensors postuliert, dessen Signalweg IRF3 abhängig sein soll (Ishii et al. 2006, Stetson et Medzhitov 2006a).

Vor dem Hintergrund dieser Datenlage sollte zunächst die Rolle von IRF3 und zusätzlich von IRF1 und IRF7 für die MyD88-unabhängige IFN-Antwort auf MCMV-Infektion *in vitro* untersucht werden. Dazu wurden GMCSF-DC aus dem Knochenmark von C57BL/6 WT sowie IRF1^{-/-}, IRF3^{-/-} und IRF7^{-/-} Mäusen generiert und mit unbehandeltem oder UV-inaktiviertem MCMV sowie NDV in den angegebenen MOI stimuliert. Die UV-Bestrahlung des MCMV hemmt die Transkription und Replikation des viralen Genoms. Das Einzelstrang-RNA-Virus NDV wird von der zytosolischen RNA-Helikase RIG-I erkannt und diente in diesem Versuchsaufbau als Positivkontrolle.

Nach 24 h Inkubation wurden im Überstand IFN- α , IFN- β und IFN- λ im ELISA gemessen. Für alle Viren konnten dosisabhängige Effekte der Typ I IFN-Antwort in WT und Knockout (KO) DC gezeigt werden (Abb. 11 A). Die UV-Inaktivierung von MCMV führte in WT und KO DC zur einer deutlich gesteigerten Produktion von IFN- α und IFN- β im Vergleich zum unbehandelten Virus. IRF1^{-/-} und IRF3^{-/-} DC zeigten gegenüber WT DC nach Stimulation mit aktivem MCMV oder UV-inaktiviertem MCMV keinen Unterschied in der IFN- α oder IFN- β Produktion. Es zeigte sich eine klare IRF7-Abhängigkeit der Induktion von Typ I IFN *in vitro* für Stimulation mit MCMV und NDV. Interessanterweise war in IRF7^{-/-} DC bei Stimulation mit hohen Virusdosen eine tendentiell dosisabhängige IFN- α / β Restantwort zu be-

obachten mit insgesamt höheren Werten für IFN- β . Aktives MCMV (10 MOI) induzierte in IRF7^{-/-} DC 26 % der IFN- α und 14 % der IFN- β Konzentrationen, die im Überstand von WT-DC meßbar waren. Stimulation mit UV-inaktiviertem MCMV resultierte in etwa 14 % der IFN- α / β Werte von WT-DC. Auch in IRF7^{-/-} DC war eine gesteigerte Typ I IFN-Induktion nach UV-Inaktivierung von MCMV meßbar, der für IFN- α deutlicher ausgeprägt war als für IFN- β . Die Induktion von IFN- λ 2 war unabhängig von IRF1 und IRF3 und zeigte sich deutlich reduziert in IRF7^{-/-} DC. UV-Inaktivierung von MCMV steigerte auch die IFN- λ 2 Induktion in WT und IRFKO Zellen (Abb. 11 B)

Die Ergebnisse dieses Experimentes demonstrierten eine IRF1- und IRF3-unabhängige Induktion von Typ I IFN und IFN- λ 2 in GMCSF-DC nach Infektion mit MCMV und NDV. Beide virale Stimuli führten zu einer deutlich reduzierten, aber insbesondere bei höherer MOI nicht vollständig aufgehobenen Expression von Typ I IFN und IFN- λ 2 in IRF7-defizienten DC. Bei der IRF7-unabhängigen residuellen IFN-Produktion dominierte IFN- β . Im Gegensatz zu den hier gezeigten Daten wurde eine signifikante IRF7-unabhängige IFN-Antwort in der Publikation von Honda et al. (2005), in der HSV, VSV, EMCV und synthetische TLR-Liganden als Stimuli eingesetzt wurden, nicht beobachtet. Im Unterschied zur Typ I IFN Induktion durch zytosolische DNA, ist die Typ I IFN Expression nach Infektion mit MCMV nicht IRF3-abhängig, sondern wird vor allem durch IRF7 aber auch durch IRF7-unabhängige Faktoren vermittelt.



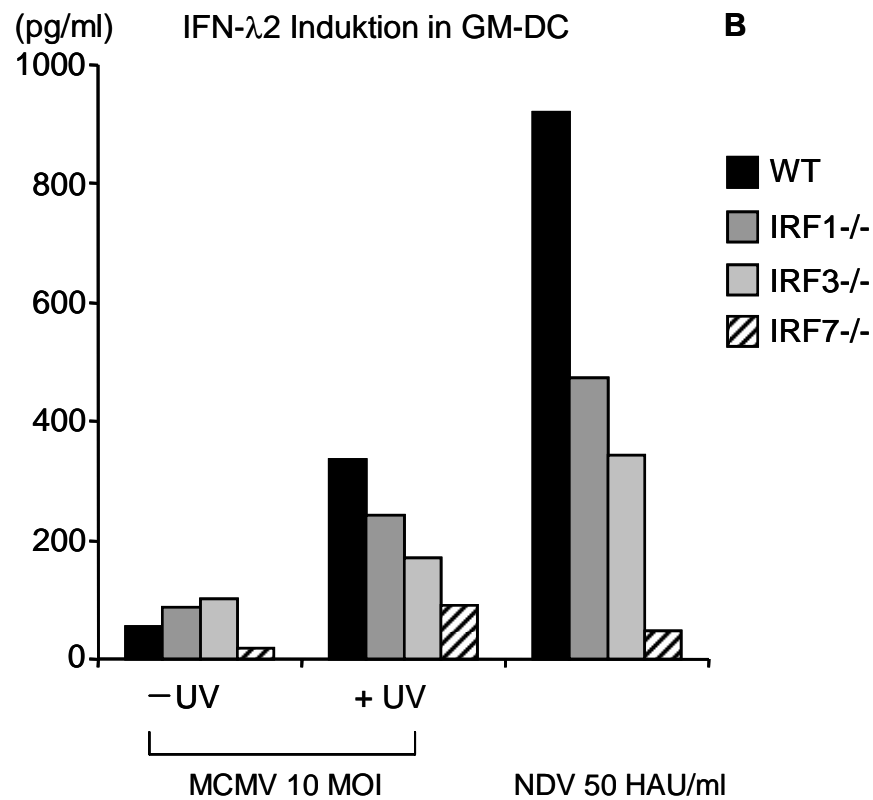


Abbildung 11. Stimulation von myeloiden DC mit MCMV und NDV.

GMCSF-DC wurden aus dem Knochenmark von C57BL/6 WT, IRF1^{-/-}, IRF3^{-/-} und IRF7^{-/-} Mäusen generiert und für 24 h mit MCMV, UV-inaktiviertem MCMV und NDV in den angegebenen MOI bzw. HAU/ml stimuliert. Die Konzentration von IFN- α und IFN- β (A) sowie IFN- λ (B) wurde im Überstand der stimulierten GMCSF-DC mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte von jeweils 2 Mäusen pro Gruppe.

3.2 Kinetik der Typ I IFN Antwort nach MCMV-Infektion in IRF3^{-/-}, IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäusen

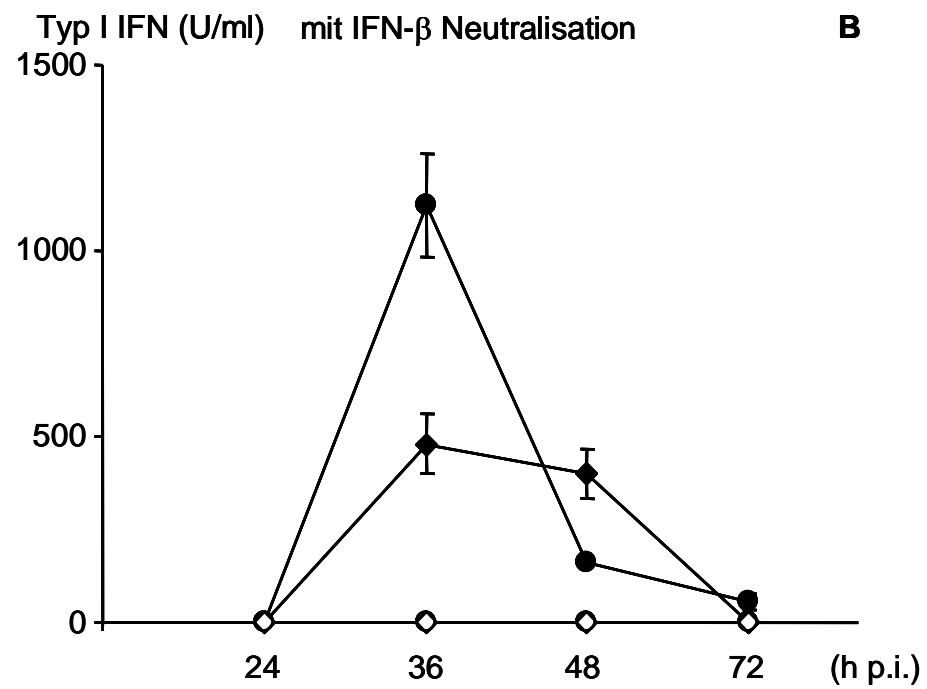
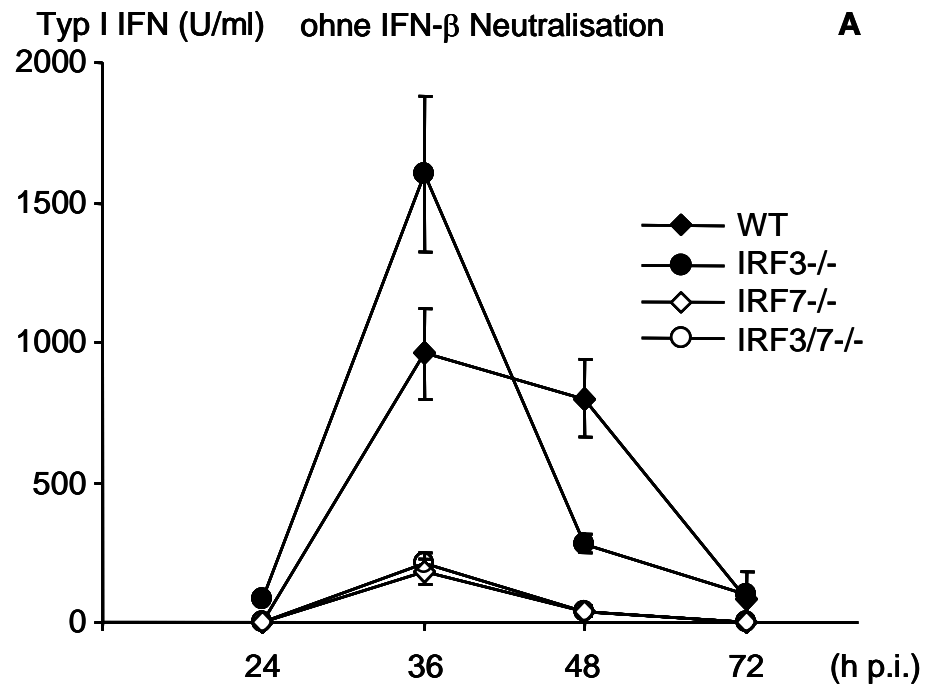
Zur Untersuchung der Funktion von IRF3 und IRF7 für die MCMV-induzierte Typ I IFN Sekretion *in vivo* wurde die Typ I IFN-Bioaktivität im Serum in einem Bioassay bestimmt, der sich die Hemmung des zytopathischen Effekts von VSV auf MEFs durch Typ I IFN zunutze macht. Der spezifische Beitrag von IFN- β zur Typ I IFN Aktivität des Serums wurde durch Neutralisation des IFN- β im Serum durch Inkubation mit einem spezifischen Anti-IFN- β Antikörper ermittelt. Da die Typ I IFN Produktion in der frühen Phase (36 h) TLR9-abhängig und pDC-vermittelt ist, während sie in der späten Phase (48 h) TLR9-unabhängig und durch andere Zellen vermittelt ist, wurde zunächst die Kinetik der systemischen Typ I IFN Antwort in WT und KO Mäusen verglichen.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurde WT, IRF3^{-/-}, IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäusen Blut abgenommen und die Typ I IFN Aktivität im Serum gemessen (Abb. 12 A). Wie für WT Mäuse in der Literatur beschrieben, konnte auch in unseren Experimenten in allen Mausstämmen nach 36 h die höchste Konzentration für Typ I IFN im Serum gemessen werden. In IRF3^{-/-} Mäusen wurden konstant höhere Konzentrationen Typ I IFN als in WT Mäusen gemessen. Die IFN-Produktion in IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} zeigte sich erwartungsgemäß stark supprimiert, war jedoch nicht vollständig eliminiert. 36 h nach Infektion war eine schwache IFN-Antwort meßbar, die bereits 12 h später vollständig abgeklungen war. Diese IRF7-unabhängige IFN-Produktion bestätigte die Ergebnisse der zuvor beschriebenen *in vitro* Experimente. Der deckungsgleiche Kurvenverlauf für IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäuse zeigte dabei, daß die verbleibende IFN-Produktion unabhängig von IRF3 und IRF7 ist, so daß eine spezifische Funktion von IRF3 für die MCMV-induzierte systemische Typ I IFN Antwort *in vivo* ausgeschlossen werden kann. Durch Neutralisation von IFN- β wurde die in IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäusen meßbare residuelle Typ I IFN Aktivität vollständig aufgehoben (Abb. 12 B). Somit wird während der MCMV-Infektion *in vivo* ausschließlich IFN- β unabhängig von IRF3 und IRF7 produziert. Die Typ I IFN-Konzentration im Serum von WT und IRF3^{-/-} Mäusen zeigte nach IFN- β Neutralisation nur eine geringfügige Reduktion. Die IFN-Antwort auf MCMV in WT und IRF3^{-/-} Mäusen ist daher vor allem durch IFN- α dominiert, das IRF7-abhängig produziert wird.

3.3 Kinetik der IFN- γ und IL-12p40 Produktion in MCMV-infizierten WT und IRF-Knockout Mäusen

Neben Typ I IFN konnten in der Vergangenheit auch für IFN- γ (= Typ II IFN) antivirale Effekte bei der MCMV Infektion nachgewiesen werden. (Grundy et al. 1982, Orange et al. 1995) Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von IRF3 und IRF7 auf die IFN- γ Produktion im Rahmen einer MCMV-Infektion wurde IFN- γ im Serum mittels ELISA bestimmt. Bei WT und IRF3^{-/-} Mäusen erreichten die Serumkonzentrationen zwischen 36 h und 48 h nach Infektion ein Plateau mit etwas höheren Werten für die IRF3^{-/-} Mäuse. In IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäusen wurde der Serumspitzenwert 36 h nach Infektion erzielt und war in IRF7^{-/-} Mäusen 6-fach, in IRF3/7 Tieren 3,5-fach höher als in WT Mäusen (Abb. 12 C). IFN- γ wird bei einer MCMV-Infektion im wesentlichen durch IL-12 und IL-18 induziert, wobei IL-12 für die IFN- γ Induktion essentiell ist. Abb. 12 D stellt den Verlauf der IL-12p40 Konzentration im Serum über die genannten Zeitpunkte dar. Die IL-12p40 Serumkonzentrationen stiegen nach 24 h rasch an, um 36 h nach Infektion ihren Maximalwert zu erreichen und dann stark abzufallen. Passend zur IFN- γ Produktion erreichten auch die IL-12p40 Konzentrationen von IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäusen höhere Spitzenwerte als in WT und IRF3^{-/-} Tieren. Im Vergleich zu IFN- γ waren die Unterschiede allerdings weniger markant.

Zusammenfassend ergibt sich eine deutliche IRF7 Abhängigkeit für die Induktion von Typ I Interferon bei MCMV Infektion *in vivo*. Die systemische IFN-Antwort in den ersten 72 Stunden wird von IFN- α dominiert. IRF7-Defizienz resultiert *in vivo* in einer vollständigen Suppression der IFN- α Produktion und einer geringen IFN- β Restproduktion, die IRF3- und IRF7-unabhängig ist. Gleichzeitig findet sich in IRF7- und IRF3/7-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen eine deutlich erhöhte IFN- γ Induktion, die mit ebenfalls erhöhten IL-12-Konzentrationen im Serum einhergeht.



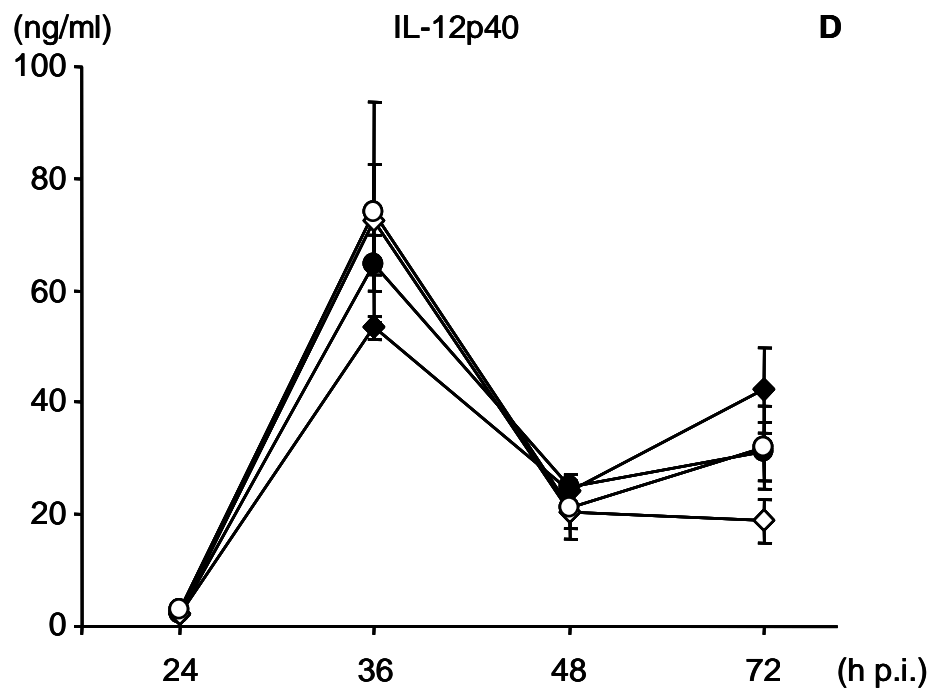
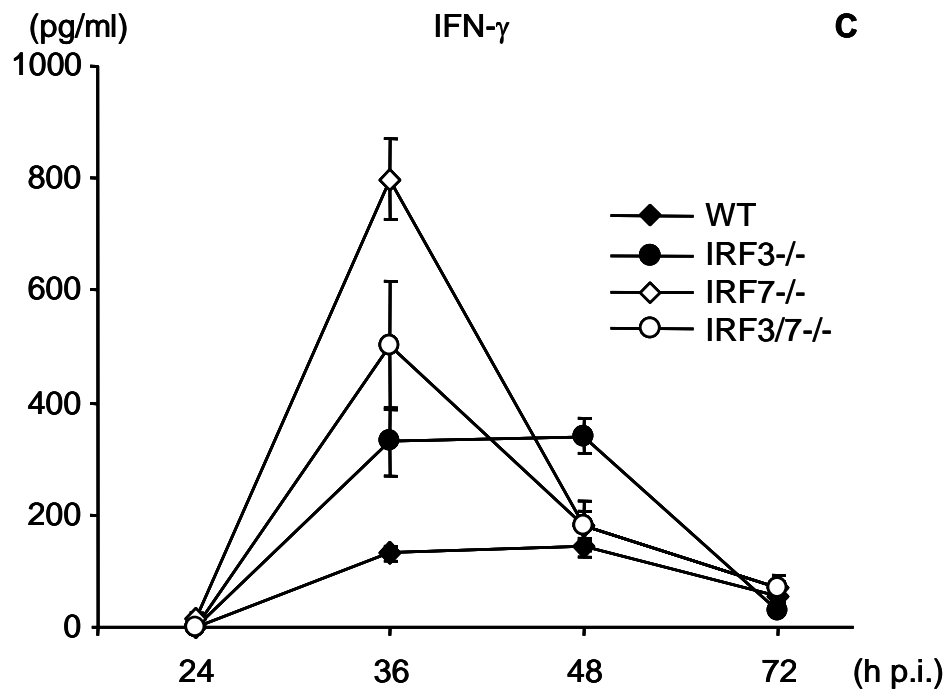


Abbildung 12. Kinetik der Zytokinantwort bei MCMV-Infektion.

C57BL/6 WT, IRF3^{-/-}, IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäuse (jeweils n = 4) wurden mit MCMV i. p. infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Typ I IFN im Serum im Bioassay quantifiziert ohne (A) und mit (B) vorheriger Neutralisation von IFN- β im Serum durch Vorinkubation mit Anti-IFN- β -Antikörper. Die Serumkonzentrationen von IFN- γ (C) und IL-12p40 (D) wurden im ELISA gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4 Mäusen aus einem von insgesamt 3 unabhängigen Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

3.4 Funktion von IRF3 und IRF7 für die frühe systemische Zytokinantwort im MCMV-Infektionsmodell

Auf der Basis der Zeitabhängigkeit der systemischen Zytokinantwort im MCMV-Modell wurde der Zeitpunkt der höchsten Zytokinkonzentrationen im Serum (36 h nach MCMV-Infektion) gewählt, um IFN- α , - β , - γ , - λ 2, IL-12p40 und IL-12p70 im Serum der verschiedenen Mausstämme mittels ELISA zu bestimmen und die Ergebnisse statistisch auszuwerten. C57BL/6 WT, IRF3-/- und IRF7-/- Mäuse wurden mit SG-MCMV intraperitoneal infiziert und 36 h nach Infektion zur Entnahme von Serum und Bestimmung der Serumzytokine im ELISA euthanasiert. Abb. 13 zeigt einen repräsentativen Überblick über das Serumzytokinmuster zu diesem Zeitpunkt nach Infektion. Im Hinblick auf IFN- α und IFN- λ 2 ergab sich eine signifikante IRF7-Abhängigkeit, da beide Interferone im Serum IRF7-defizienter Mäuse im ELISA nicht meßbar waren. Im Fall von IFN- λ 2 lag dabei die Detektionsschwelle bei 62,5 pg/ml, so daß niedrigere Konzentrationen mit diesem ELISA nicht erfaßt werden konnten. Die IFN- β -Induktion in IRF7-/- Mäusen blieb unbeeinträchtigt und ergab vergleichbare Werte wie bei WT Mäusen. IRF3-/- Mäuse reagierten auf die MCMV Infektion mit signifikant erhöhten Serumkonzentrationen von IFN- α , IFN- β und IFN- λ 2 im Vergleich zu WT und IRF7-/- Mäusen.

Die höchsten Serumkonzentrationen von IFN- γ wurden in IRF7-/- Mäusen erreicht. Sowohl IRF7-/- als auch IRF3-/- Mäuse zeigten signifikant höhere Werte für IFN- γ als WT Tiere. Die signifikant höheren IFN- γ Konzentrationen korrelierten mit ebenfalls signifikant höheren Serumwerten für IL-12p40 und bioaktivem IL-12p70 in IRF7-/- Mäusen. IRF3-/- Mäuse erreichten ebenfalls signifikant höhere Serumwerte für IL-12p70. Es konnte somit eine signifikant verstärkte Induktion von IL-12 und IFN- γ bei IRF7-Defizienz bestätigt werden.

Für IFN- α wurden im L929-Bioassay und im ELISA unterschiedliche Konzentrationen zum Zeitpunkt 36 h nach Infektion gemessen. Im Bioassay wurden dabei deutlich höhere Werte erreicht. Diese Unterschiede sind vor allem darauf zurückzuführen, daß der Bioassay alle dreizehn IFN- α -Subtypen über einen einheitlichen Rezeptor erfaßt. Die im ELISA verwendeten Antikörper binden dagegen nur wenige IFN- α -Subtypen.

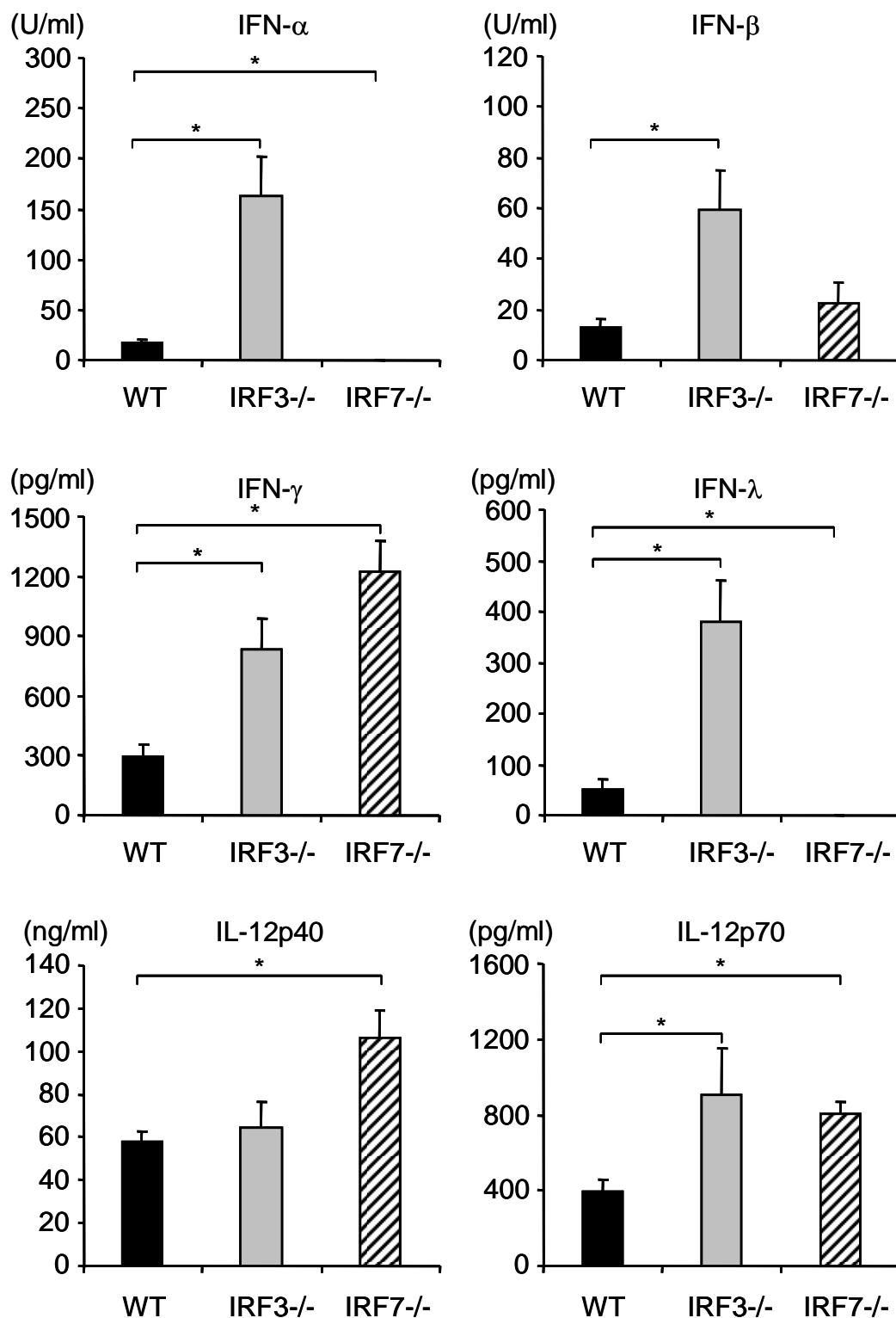


Abb. 13. Zytokine im Serum 36 h Stunden nach Infektion mit MCMV.

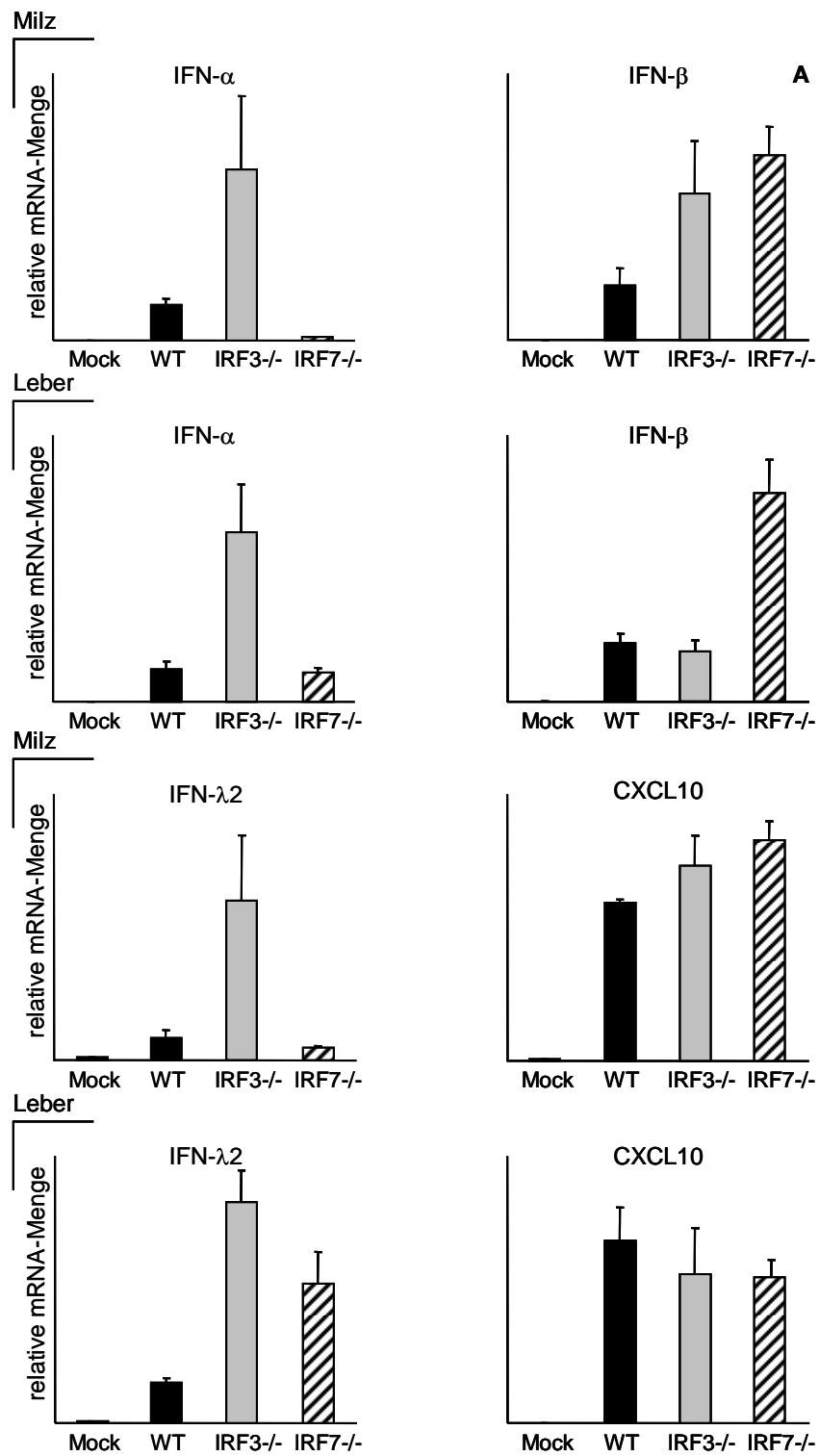
C57BL/6 WT (n = 15), IRF3^{-/-} (n = 10), IRF7^{-/-} (n = 15) Mäuse wurden mit MCMV i. p. infiziert. Blutabnahme nach 36 h zur Quantifizierung von Serumzytokinen per ELISA (A - F). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM aus insgesamt sieben unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 - 4 Mäusen pro Experiment abgebildet. Statistisch signifikante Unterschiede wurden bei p < 0,05 angenommen und durch * gekennzeichnet.

3.5 Einfluss von IRF3 und IRF7 auf die transkriptionelle Regulation der frühen Zytokinexpression in Milz und Leber bei der MCMV-Infektion

Die frühen Serumzytokine und andere proinflammatorische Zytokine wurden in Genexpressionsstudien auf organspezifische transkriptionelle Regulation in Milz und Leber hin untersucht. Dazu wurde 36 h nach Infektion RNA aus Milz und Leber isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Die relative quantitative Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode und Normierung der Genexpression auf das Expressionsniveau der uninfizierten Kontrolle.

In Übereinstimmung mit den im ELISA gemessenen Serumzytokinen war die Transkription von IFN- α und IFN- $\lambda 2$ in der Milz von IRF7 $^{-/-}$ Mäusen reduziert, während die Transkription von IFN- β sogar erhöht war. In der Leber von IRF7 $^{-/-}$ Mäusen war jedoch keine Reduktion der IFN- α / $\lambda 2$ Transkription nachweisbar (Abb. 14 A). Für IFN- γ und IL-12p40 war die Transkription in Milz und Leber von IRF7 $^{-/-}$ Mäusen gegenüber WT Mäusen stark gesteigert. IL-12p35 zeigte in der Leber von IRF7 $^{-/-}$ Mäusen eine verstärkte Transkription gegenüber WT Mäusen. In der Milz war IL-12p35 in allen Mausstämmen trotz Infektion nicht hochreguliert. Die Transkription von IL-23p19 in der Milz war in IRF7 $^{-/-}$ Mäusen gegenüber WT und IRF3 $^{-/-}$ Mäusen gesteigert, in der Leber jedoch in allen Mausstämmen gleich (Abb. 14 B). IRF3 $^{-/-}$ Mäuse zeigten gegenüber WT Mäusen eine verstärkte Transkription von IFN- α und IFN- $\lambda 2$ in Milz und Leber. In der Milz war die Transkription von IFN- γ und IL-12p40, in der Leber die Transkription von IL-12p35 in IRF3 $^{-/-}$ Mäusen gegenüber WT Mäusen gesteigert. CXCL10 zeigte für alle Mausstämmen ein einheitliches Transkriptionsniveau in Milz und Leber (Abb. 14 B).

Zusammenfassend ergibt sich für IRF7 $^{-/-}$ Mäuse eine reduzierte Transkription von IFN- α und IFN- $\lambda 2$ in der Milz sowie eine gesteigerte Transkription von IFN- β in Milz und Leber. In beiden Organen ist IFN- γ und IL-12p40 gegenüber WT Mäusen stärker induziert. IRF3 $^{-/-}$ Mäuse zeigen in der Milz eine gesteigerte Transkription aller frühen Zytokine. Die relativen mRNA Mengen in den Organen – insbesondere in der Milz – korrelieren dabei mit den Konzentrationen der Zytokine im Serum und spiegeln diese Unterschiede auf transkriptioneller Ebene wider.



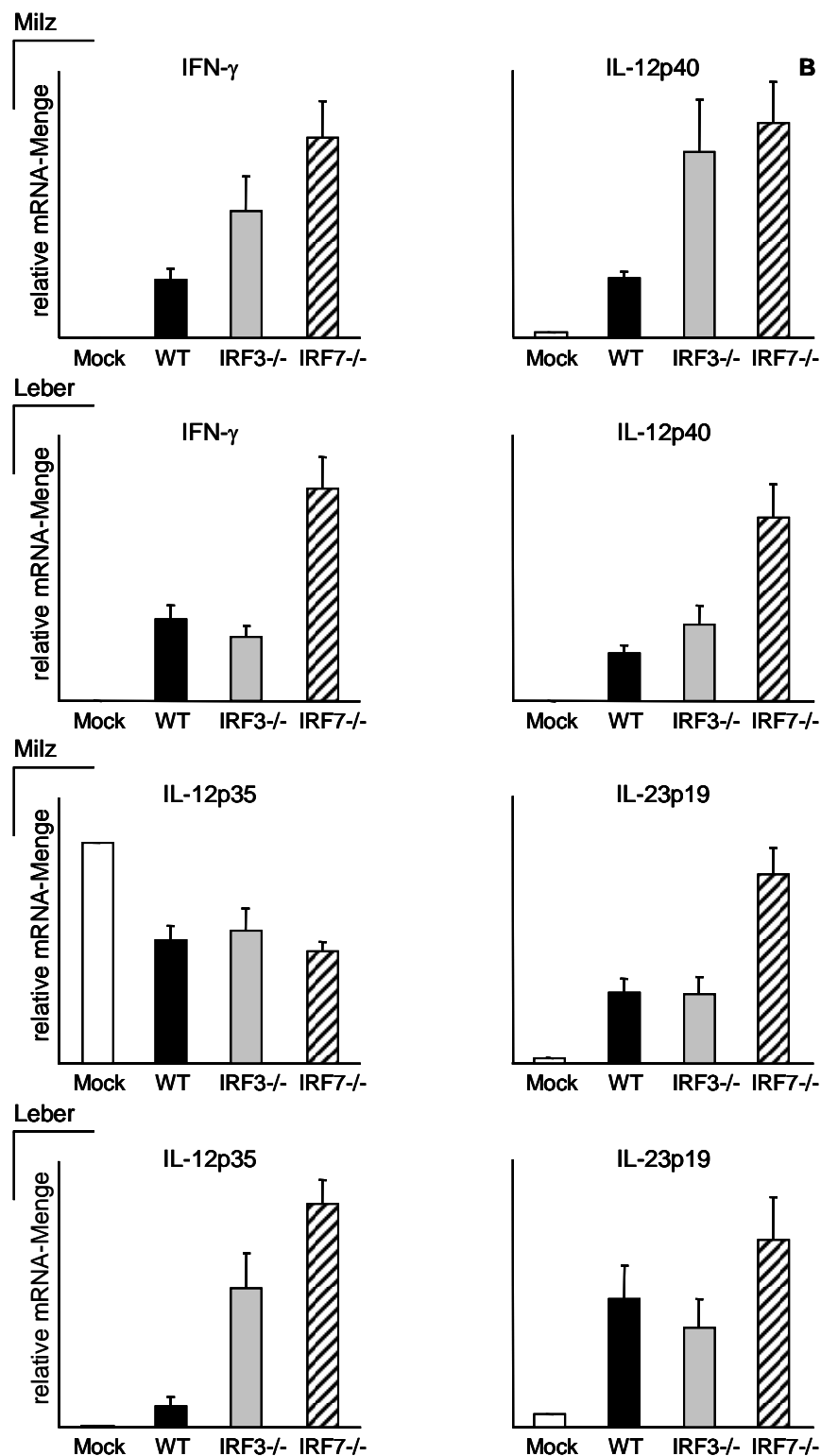


Abb. 14. Zytokinexpression auf mRNA-Ebene in Milz und Leber 36 Stunden nach Infektion mit MCMV. Gesamt-RNA wurde aus Leber und Milz infizierter C57BL/6 WT, IRF3^{-/-} und IRF7^{-/-} Mäuse sowie einer mock-infizierten WT Kontrollmaus isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die relativen mRNA-Mengen für Typ I IFN, IFN- λ 2 und CXCL10 (A) sowie für IFN- γ , IL-12p40, IL-12p35 und IL-23p19 (B) (normalisiert auf Cyclophilin A als *housekeeping*-Gen) wurden durch qRT-PCR quantifiziert und als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 - 4 Mäusen abgebildet. Es ist eines von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichem Ergebnis dargestellt.

3.6 Vergleich der Aktivierung dendritischer Zellen (WT, IRF3^{-/-}, IRF7^{-/-}) durch MCMV

Sowohl für die pDC als auch für die konventionellen DC-Populationen wurde im MCMV-Modell eine von Typ I IFN abhängige Expression kostimulatorischer Moleküle beschrieben. Um die beobachteten Unterschiede im Zytokinmuster mit der zellulären Aktivierung von dendritischen Zellen und anderen zytokinproduzierenden Zellen im Rahmen einer MCMV Infektion in Zusammenhang zu bringen, wurde die Expression kostimulatorischer Moleküle in Splenozyten und Leberleukozyten, die 36 h nach Infektion gewonnen wurden, durchflußzytometrisch gemessen. Im Hinblick auf die zelluläre Aktivierung lag der Fokus auf DC-Subpopulationen, die zu diesem Zeitpunkt der MCMV-Infektion die Hauptproduzenten von Typ I IFN und IL-12p70 sind.

Abb. 15 veranschaulicht die Gatingstrategie zur Selektion der Zellpopulationen. Viable Zellen wurden morphologisch durch Größe (FSC, forward scatter) und Granularität (SSC, side-ward scatter) (Region 1, Abb. 15 A) und fehlende PI-Aufnahme (Region 2 Abb.15 B) charakterisiert und durch Verknüpfung der Regionen R1 und R2 erfaßt. Zur Identifizierung der unterschiedlichen DC-Subpopulation wurden Splenozyten und Leberleukozyten mit Antikörpern gegen CD11b und CD11c gefärbt. Als Pan-DC-Marker wird CD11c von allen dendritischen Zellen exprimiert, weist jedoch ein unterschiedliches Expressionsniveau zwischen den einzelnen Subpopulationen auf (Region 4, Abb. 15 C). Innerhalb der DCs können myeloide DC (mDC) als CD11b⁺CD11c⁺ Zellen identifiziert werden. CD11b⁻CD11c⁺ DC beinhalten die CD8α⁺ „lymphoiden“ DC und die pDC. CD11b⁺CD11c⁻ Zellen umfassen vor allem Makrophagen. (Region 3). pDC wurden durch Färbung mit Antikörpern gegen BST2 und Siglec H als doppelt positive Zellen definiert (Region 5, Abb. 15 D).

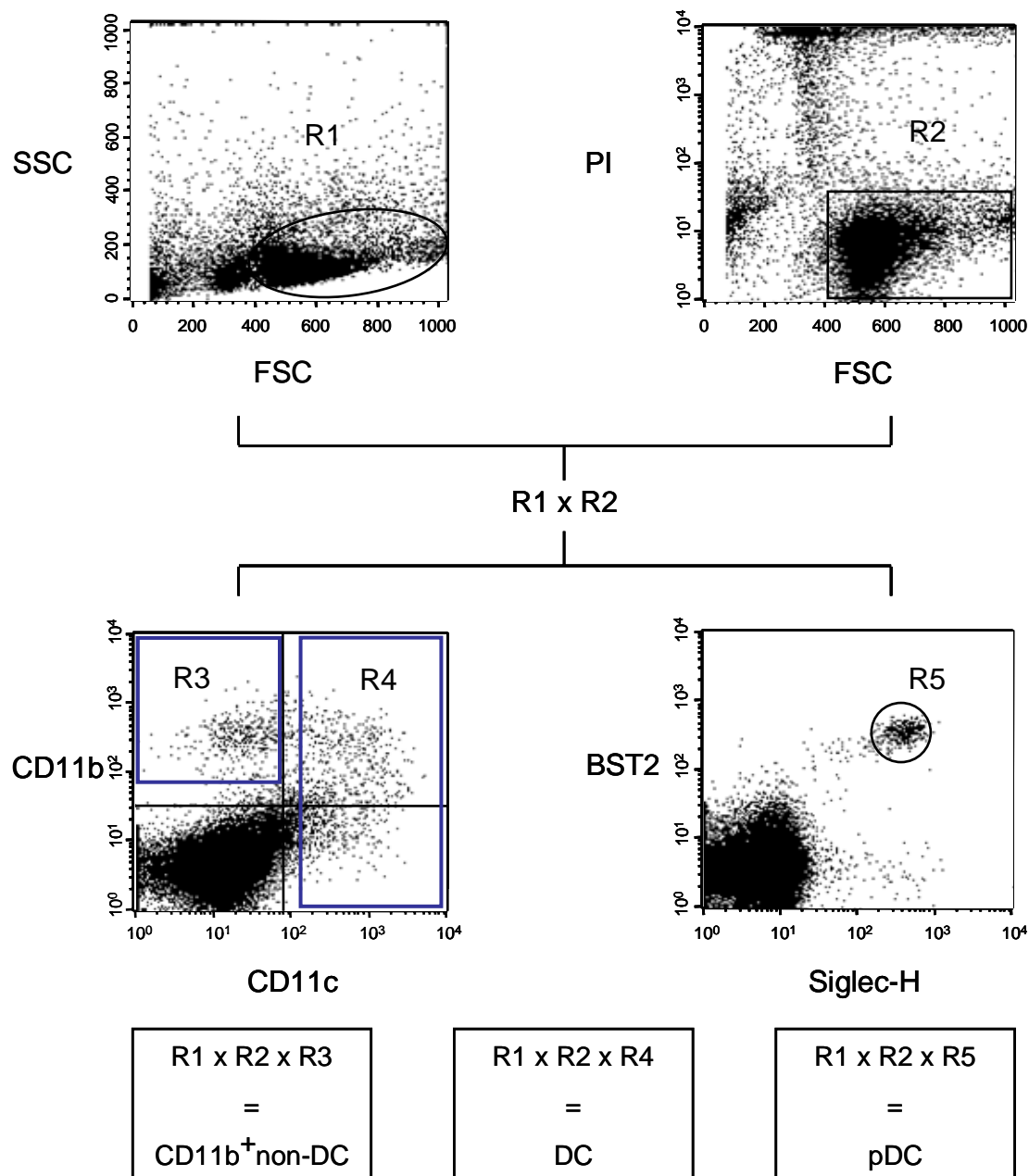


Abb. 15. Durchflußzytometrische Analyse der DC-Populationen und Makrophagen in der Milz.

Splenozyten von C57BL/6 WT, IRF3^{-/-} und IRF7^{-/-} Mäusen wurden 36 h nach MCMV-Infektion isoliert und für die durchflußzytometrische Analyse mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Zur Ermittlung der Viabilität wurden morphologische Parameter (Vorwärts-/Seitwärtsscatter) und fehlende Anfärbbarkeit mit Propidiumiodid herangezogen. Durch Färbung mit Anti-CD11b-FITC und Anti-CD11c-APC konnten DC (CD11c⁺CD11b^{+/-}) gegenüber Makrophagen und anderen myeloiden Zellen (CD11c⁻CD11b⁺) abgegrenzt werden. Die Subpopulation der pDC wurde durch Färbung mit Anti-BST2-FITC und Anti-Siglec H-APC identifiziert.

Durch Verknüpfung der entsprechenden Regionen konnte die spezifische Aktivierung der verschiedenen Zellpopulation anhand der CD86 Expression gemessen werden. Die Analysefenster in Punktdiagrammen und Histogrammen wurden so gewählt, daß weniger als 1 % der Zellen aus der ungefärbten Kontrolle FL-2 positiv waren. Zur statistischen Auswertung der zellulären Aktivierung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI, *mean fluorescence intensity*) der CD86 Expression auf den verschiedenen Zellpopulationen ermittelt (Tab. 10).

Bei den DC insgesamt sowie bei den pDC und CD11b⁺ Makrophagen aus der Milz zeigte sich kein Unterschied in der CD86 Expression zwischen WT, IRF3^{-/-} und IRF7^{-/-} Mäusen (Abb. 16). In einem Experiment wurde zudem die zelluläre Aktivierung von Leberleukozyten untersucht. Hier zeigte sich die Tendenz zu einer niedrigeren CD86 Expression in IRF7^{-/-} DC und Makrophagen der Leber ohne statistische Signifikanz. Es zeigt sich also ein einheitliches Aktivierungsniveau für DC, plasmazytoide DC und CD11b⁺ Makrophagen aus der Milz von WT, IRF3^{-/-} und IRF7^{-/-} Mäusen (Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten). Die geringfügigen Unterschiede in den Zellpopulationen der Leber waren nicht signifikant.

	WT	IRF3^{-/-}	IRF7^{-/-}
<i>Milz</i>			
pDC	116 ± 11	111 ± 8	117 ± 13
DC	142 ± 10	141 ± 10	143 ± 12
non-DC CD11b ⁺	106 ± 8	113 ± 11	96 ± 5
<i>Leber</i>			
pDC	47 ± 4	48 ± 5	42 ± 4
DC	142 ± 31	107 ± 8	59 ± 4
non-DC CD11b ⁺	103 ± 5	129 ± 23	77 ± 2

Tab. 10. MFI der CD86-Expression in DC und CD11b⁺ non-DC aus Milz und Leber

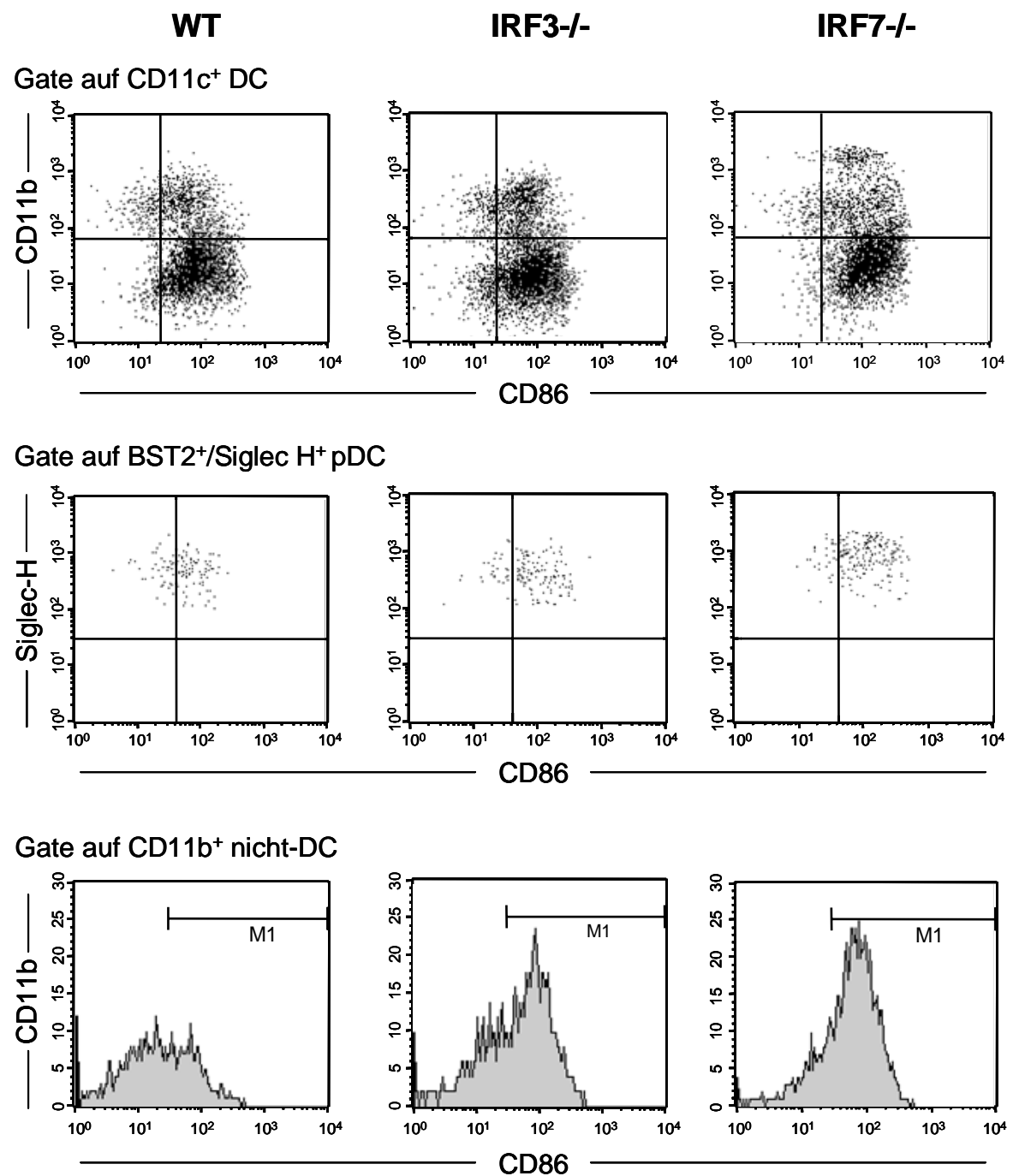


Abb. 16. Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf DC und Makrophagen der Milz 36 Stunden nach MCMV-Infektion.

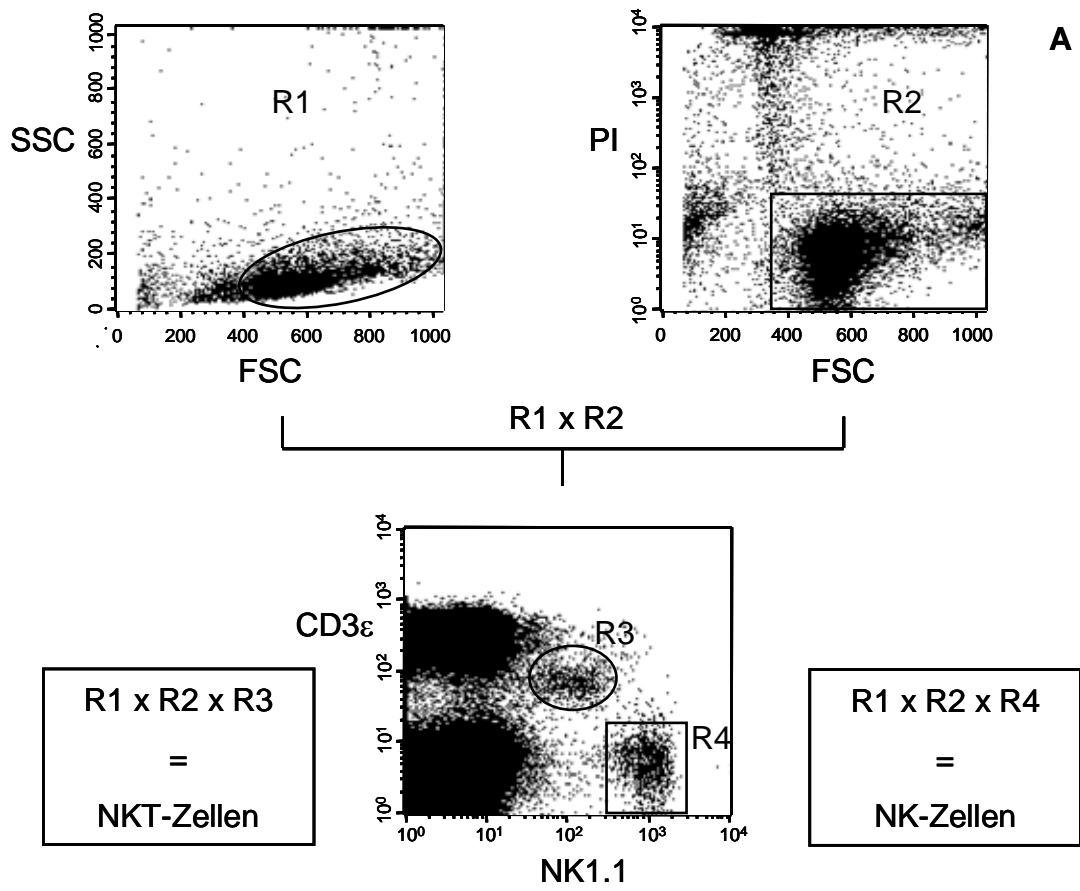
Milzzellen wurden aus C57BL/6 WT, IRF3^{-/-} und IRF7^{-/-} Mäusen 36 Stunden nach Infektion mit MCMV isoliert und mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern Anti-CD11c-APC, Anti-CD11b-FITC und Anti-CD86-PE oder mit den Antikörpern Anti-BST2-FITC, Anti-Siglec H und Anti-CD86 gefärbt. Die Analysefenster wurden so gesetzt wie in Abb. 15 gezeigt. Dargestellt ist die Expression von CD86 in den verschiedenen Zellpopulationen. Die Gates wurden so gewählt, daß der Anteil der FL2-positiven Zellen in der Negativkontrolle unter 1 % lag. Abgebildet ist das Ergebnis aus einem von vier unabhängigen Experimenten mit 3 bis 4 Mäusen pro Gruppe.

3.7 Bedeutung von IRF3 und IRF7 für die NK-Zellfunktion bei MCMV-Infektion

Die Kontrolle der Virusreplikation und das Überleben innerhalb der ersten Woche nach Infektion mit MCMV hängen in entscheidendem Maße von einer suffizienten NK-Zellantwort ab. Dabei umfassen die antiviralen NK-Zellfunktionen vor allem die Sekretion von IFN- γ und Zytolyse virusinfizierter Zellen. Da die Analyse der Serumzytokine und der transkriptionellen Regulation der Zytokinproduktion in Milz und Leber bereits eine deutlich höhere IFN- γ Produktion in IRF7^{-/-} Mäusen gezeigt hatte, wurde nun untersucht, ob IFN- γ von NK-Zellen oder anderen Zellen produziert wird.

Vergleich der CD69 Expression und IFN- γ Produktion in NK-Zellen MCMV-infizierter WT, IRF3^{-/-}, IRF7^{-/-} Mäuse

Splenozyten und Leberleukozyten wurden 36 h nach MCMV-Infektion wie beschrieben isoliert. Die Gatingstrategie zur Identifikation der NK-Zellen ist in Abb. 17 A dargestellt. Lebende Zellen wurden durch Verknüpfung der Regionen R1 und R2 eingegrenzt. Durch Färbung mit Antikörpern gegen CD3 ϵ und NK1.1 können NK-Zellen als CD3 ϵ ⁻NK1.1⁺ Zellen identifiziert und dadurch von T-Zellen (CD3 ϵ ⁺NK1.1⁻) und NKT-Zellen (CD3 ϵ ⁺NK1.1^{+/-}) abgegrenzt werden, die ebenfalls zur IFN- γ Bildung befähigt sind. Die NK-Zellaktivierung wurde durch die Expression von CD69 erfaßt, einem frühen Aktivierungsmarker mit hoher Sensitivität. Der Anteil aktivierter NK Zellen in der Milz ließ keine relevanten Unterschiede zwischen WT, IRF3^{-/-} und IRF7^{-/-} Mäusen erkennen und lag zwischen 70 - 89 % (Abb. 17 B). Die mittlere Fluoreszenzintensität der CD69 Expression zeigte ebenfalls keine Unterschiede. Die Analyse der NK-Zellen aus der Leber zeigte eine signifikant höhere NK-Zellaktivierung in IRF7^{-/-} Mäusen als in WT und IRF3^{-/-} Mäusen. Der Anteil CD69⁺ NK Zellen in IRF7^{-/-} Tieren betrug 66,8 % (\pm 1,8 %) gegenüber 33,3 % \pm (3,0 %) in WT und 27,1 % (\pm 5,9 %) in IRF3^{-/-} Mäusen (Abb. 17 B). Die Aktivierung der NKT-Zellen wurde ebenfalls über die Expression von CD69 erfaßt. NKT-Zellen aus Milz und Leber waren mehrheitlich aktiviert ohne relevante Unterschiede zwischen den Organen oder Mausgruppen (Abb. 17 C).



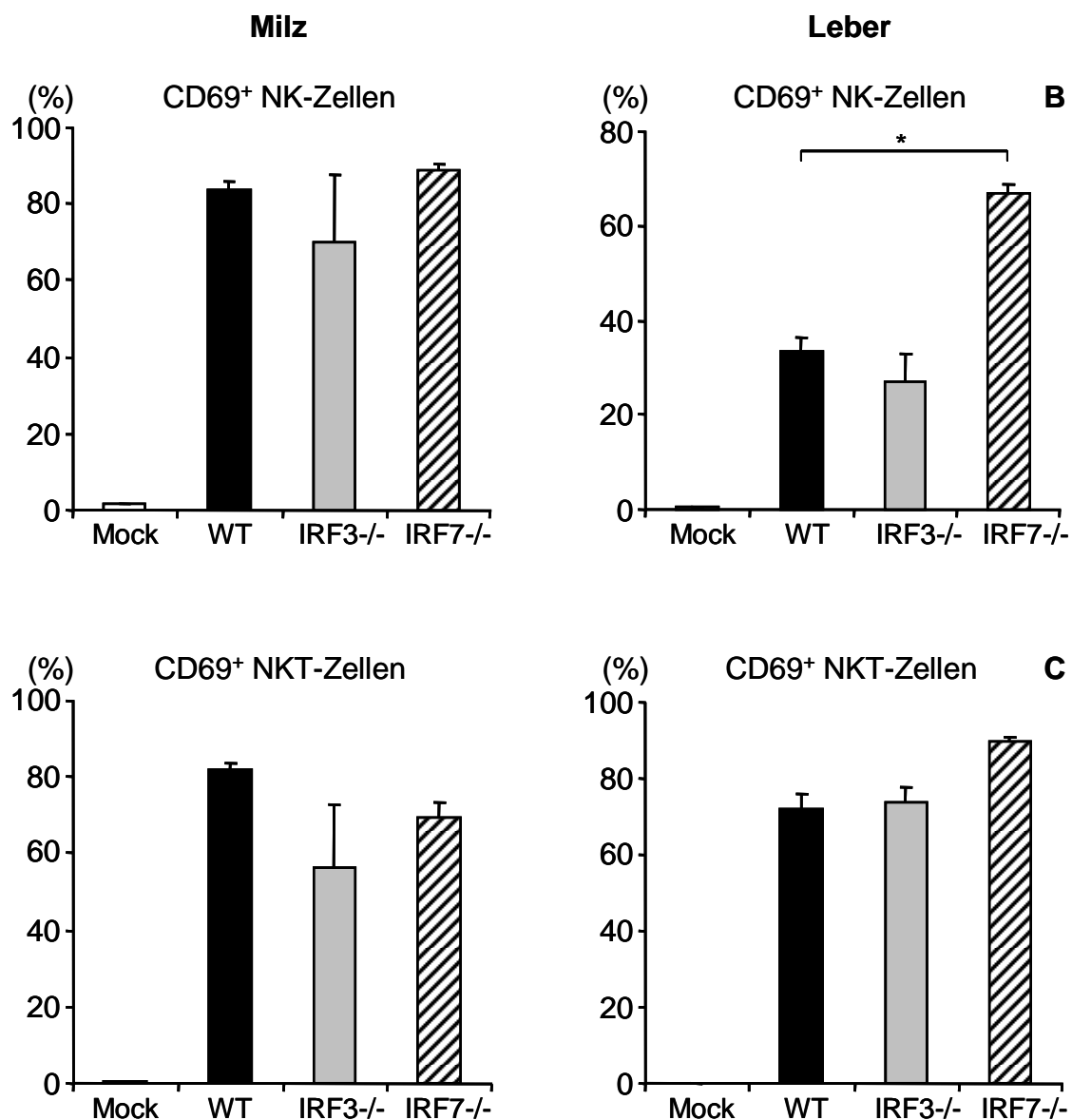


Abb. 17. Expression von CD69 in NK-Zellen und NKT-Zellen von Milz und Leber 36 Stunden nach MCMV-Infektion.

Milzzellen oder Leberleukozyten wurden 36 h nach Infektion mit MCMV aus WT, IRF3^{-/-} und IRF7^{-/-} Mäusen isoliert. Durch Färbung viabler (PI-negativer) Splenozyten mit Anti-CD3 ϵ -FITC und Anti-NK1.1-APC wurden NK-Zellen (CD3 ϵ ⁻NK1.1⁺), NKT-Zellen (CD3 ϵ ⁺NK1.1⁺) und T-Lymphozyten (CD3 ϵ ⁺NK1.1⁻) identifiziert. (A). Die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 in CD3 ϵ ⁻NK1.1⁺ NK-Zellen aus Milz und Leber wurde durchflußzytometrisch durch Färbung mit Anti-CD69-PE bestimmt (B und C) Dargestellt ist der Prozentsatz der CD69-exprimierenden NK-Zellen (B) und NKT-Zellen (C) in den verschiedenen Mausstämmen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 - 4 Mäusen eines repräsentativen Experiments von insgesamt 4 Versuchen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ angenommen und durch * gekennzeichnet.

Die IFN- γ Produktion in NK-Zellen wurde durch Intrazellulärfärbung mit einem IFN- γ -spezifischen Antikörper nachgewiesen. Zur Identifikation der IFN- γ produzierenden Zellpopulation erfolgte eine Färbung mit Antikörpern gegen die Zelloberflächenmarker DX5 und CD3 ϵ . Abb. 18 A demonstriert die Gatingstrategie zur Darstellung IFN- γ produzierender Zellen. Aufgrund der notwendigen Permeabilisierung der Zellmembran für die Intrazellulärfärbung konnte PI nicht verwendet werden, so daß die Zellviabilität nur über morphologische Parameter (Größe und Granularität) festgelegt werden konnte (R1). Innerhalb der viablen Zellen wurden NK-Zellen als DX5⁺CD3 ϵ ⁻ Population identifiziert (Region R5). Der Prozentsatz IFN- γ bildender NK-Zellen lag in der Milz mit 57,9 % \pm 1,6 % in IRF7^{-/-} Mäusen deutlich höher als in WT (21,4 % \pm 1,9) und IRF3^{-/-} Mäusen (33,2 % \pm 9,1). Auch in der Leber war der Anteil IFN- γ ⁺ NK-Zellen mit 13,1 % (\pm 0,7 %) in IRF7^{-/-} Mäusen höher als in WT (6,1 % \pm 0,5 %) und IRF3^{-/-} Mäusen (3,9 % \pm 0,4 %) (Abb. 18 B + C).

Um die NK-Zellen als eindeutige Hauptproduzenten der IFN- γ Bildung in diesem Infektionsmodell identifizieren zu können, wurde zusätzlich der Beitrag von anderen Zellen mit Potential zur IFN- γ Produktion untersucht. Neben NK Zellen kommen 36 h nach MCMV-Infektion vor allem NKT-Zellen und Makrophagen für die IFN- γ Bildung in Betracht. Trotz der ausgeprägten CD69 Expression trugen die NKT-Zellen zum Zeitpunkt der durchflußzytometrischen Analyse nur in geringem Umfang zur IFN- γ Produktion bei. Der Anteil an IFN- γ ⁺ NKT Zellen war in Milz und Leber gering und wies keine relevanten Unterschiede zwischen den Mausstämmen auf. So waren in der Milz durchschnittlich nur 3 - 5,7 % der NKT-Zellen IFN- γ ⁺. In der Leber lag der Prozentsatz der IFN- γ bildenden NKT-Zellen zwischen 5,5 - 7,3 % (\pm 1 - 3,8) und war damit dem Anteil IFN- γ ⁺ NK Zellen von WT und IRF3^{-/-} Mäusen vergleichbar. In der Gesamtpopulation der CD3 ϵ positiven Zellen sowie in der Gesamtpopulation der nicht-NK-Zellen, die auch die Makrophagen umfaßt, betrug der Anteil IFN- γ positiver Zellen in WT und KO Mäusen durchschnittlich unter 1 %. Somit konnten NK-Zellen als Hauptproduzenten von IFN- γ bei der MCMV-Infektion bestätigt werden. Andere potentiell IFN- γ bildende Zellpopulationen wie NKT Zellen leisteten zu diesem frühen Zeitpunkt einer MCMV-Infektion keinen nennenswerten Beitrag zur IFN- γ Produktion. Die aufgezeigten Unterschiede in den IFN- γ Serumkonzentrationen zwischen WT, IRF3^{-/-} und IRF7^{-/-} Mäusen waren unabhängig vom Aktivierungsniveau der NK-Zellen in der Milz und korrelierten mit dem Anteil IFN- γ ⁺ NK-Zellen. Dieser war in IRF7^{-/-} Mäusen gegenüber WT und IRF3^{-/-} Tieren signifi-

kant erhöht und bildete somit das zelluläre Korrelat der ebenfalls signifikant höheren IFN- γ Konzentration im Serum. Die Untersuchung der NK-Zellen aus der Leber zeigte ebenfalls eine gesteigerte IFN- γ Produktion in NK-Zellen von IRF7 $^{-/-}$ Mäusen.

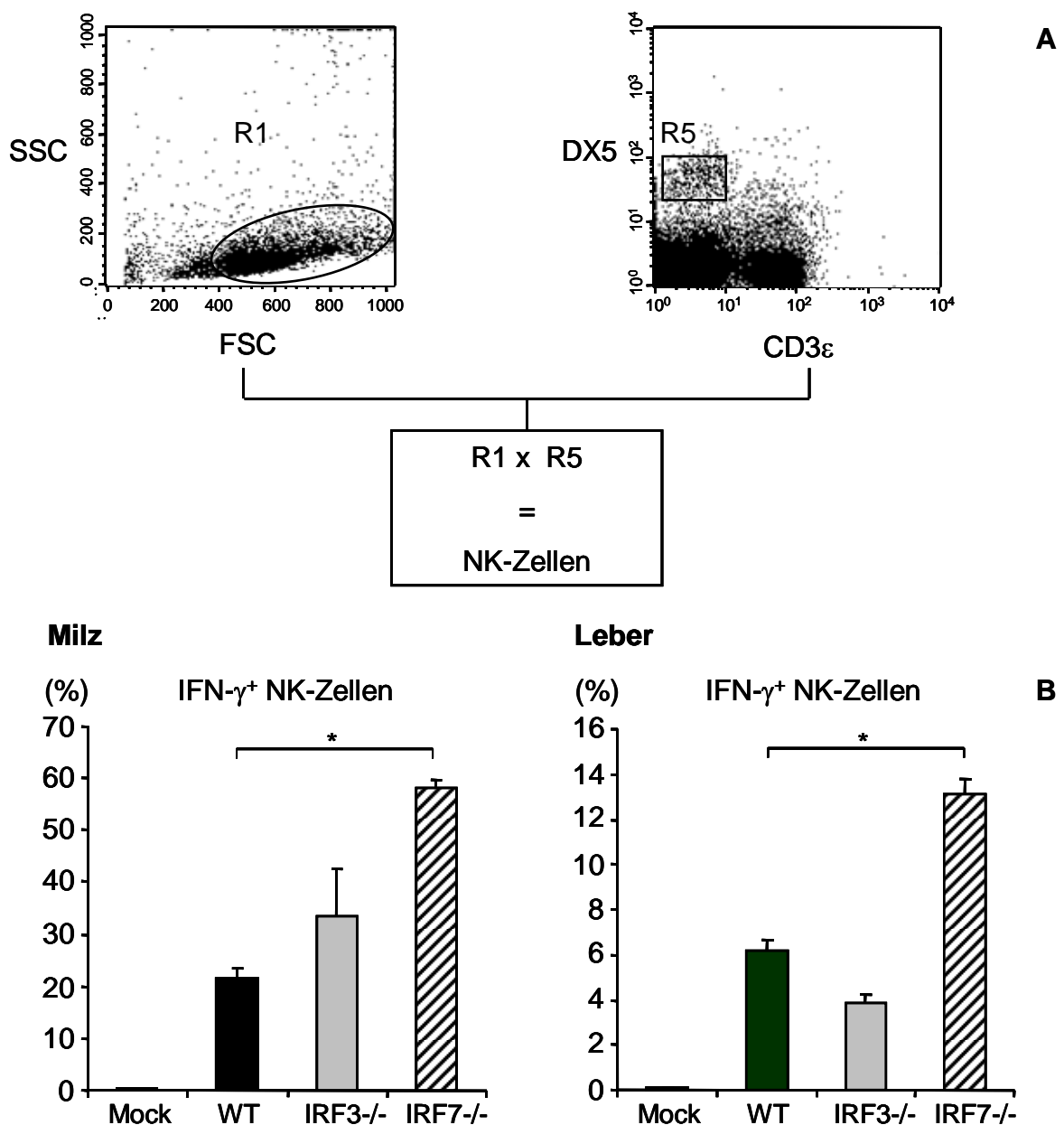
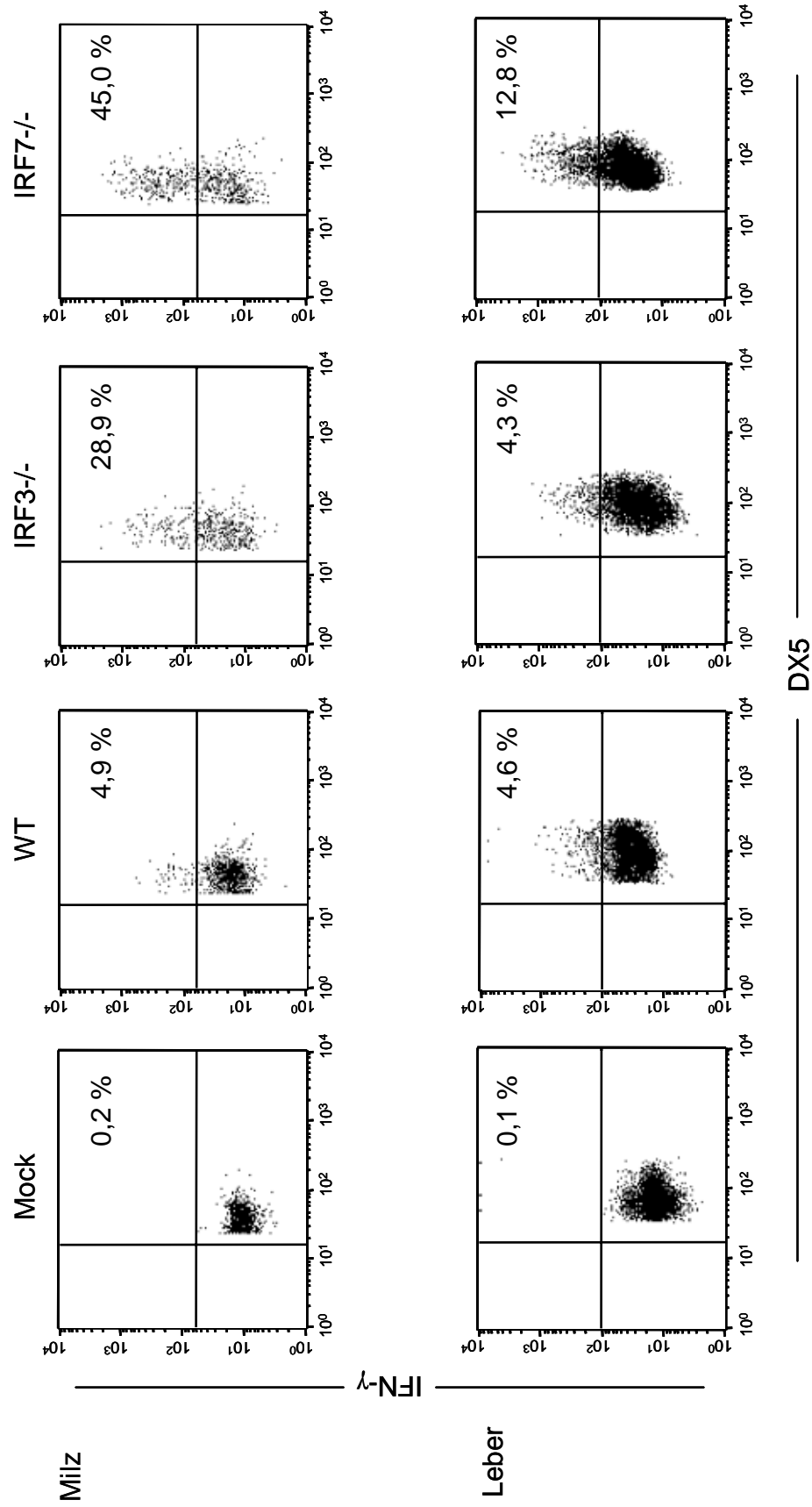


Abb. 18. Expression von IFN- γ in NK-Zellen von Milz und Leber 36 h nach MCMV-Infektion. Milzzellen oder Leberleukozyten wurden 36 h nach Infektion mit MCMV aus WT, IRF3 $^{-/-}$ und IRF7 $^{-/-}$ Mäusen isoliert. NK-Zellen wurden durch Färbung mit Anti-CD3 ϵ -APC und Anti-DX5-PE als CD3 ϵ^+ /DX5 $^+$ Zellen identifiziert (A). Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die bereits mit Antikörpern gegen Zelloberflächenantigene markierten Zellen mit Anti-IFN- γ -FITC inkubiert. Der Anteil IFN- γ positiver CD3 ϵ^+ /DX5 $^+$ NK-Zellen in Milz und Leber wurde durchflußzytometrisch bestimmt (B). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 - 4 Mäusen eines repräsentativen Experiments von insgesamt vier Versuchen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ angenommen und durch * gekennzeichnet. In (C) sind Punktdiagramme aus einem Experiment beispielhaft dargestellt (DX5-PE versus IFN- γ -FITC-Expression, Analysefenster auf CD3 ϵ^+ /DX5 $^+$ NK-Zellen).



Analyse der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen ex vivo in MCMV-infizierten WT und IRF7^{-/-} Mäusen

Die Zytotoxizität der NK-Zellen bei der MCMV-Infektion hängt stark von Typ I IFN ab (Orange et al. 1996a, Orange et al. 1996b, Andoniou et al. 2005). Zur Untersuchung der Rolle von IRF7 für die NK-Zellzytotoxizität, wurden WT C57BL/6 und IRF7^{-/-} Mäuse mit SG-MCMV infiziert. 36 h nach Infektion wurden die NK-Zellen aus der Milz isoliert und die Zytotoxizität *ex vivo* in einem 4 h ⁵¹Cr-Assay mit YAC-1-Zellen als Zielzellen bei unterschiedlichen Effektor:Zielzell-Verhältnissen ermittelt. YAC-1 Zellen exprimieren ähnlich wie z. B. myeloide DC im MCMV-Modell in vivo den Liganden für NKG2D und können dadurch von aktivierten NK-Zellen erkannt werden. Die Aktivierung der aus den infizierten Mäusen isolierten NK-Zellen wurde vor Einsatz in den Zytolyse-Assay durchflußzytometrisch durch Nachweis der CD69 Expression auf CD3 ϵ ⁻NK1.1⁺ Zellen überprüft. Die spezifische Lyse der Zielzellen wurde als Prozentsatz angegeben, die Spontanlyse betrug durchschnittlich 12,4 %. Ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Experimenten ist in Abbildung 19 dargestellt. Relevante Unterschiede in der Zytotoxizität von NK-Zellen aus WT oder IRF7^{-/-} Mäusen konnten nicht festgestellt werden. Einzelne IRF7^{-/-} Mäuse wiesen eine leicht verminderte NK-Zellzytotoxizität gegenüber WT Tieren auf. Dies läßt den Schluß zu, daß IRF7-Defizienz trotz der deutliche reduzierten Typ I IFN Antwort in IRF7^{-/-} Mäusen nicht zu einer wesentlichen Beeinträchtigung der Zytolysefähigkeit von NK-Zellen führt.

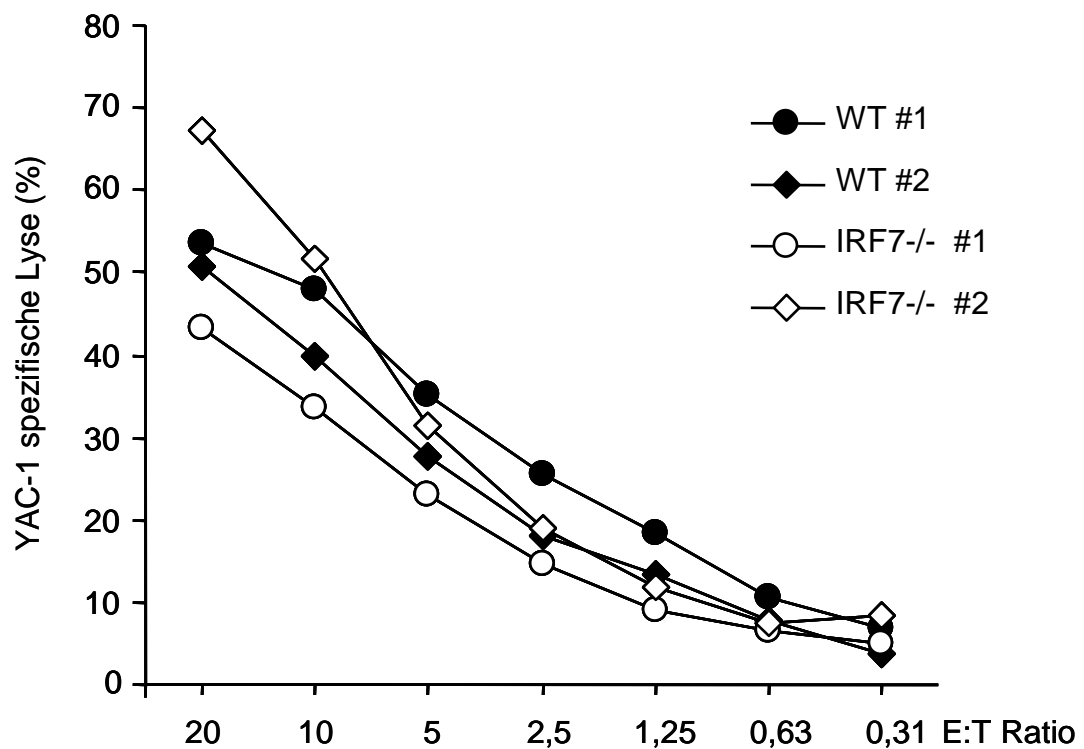


Abb. 19. Zytolytische Aktivität der NK-Zellen ex vivo 36 Stunden nach MCMV-Infektion.

C57BL/6 WT und IRF7^{-/-} Mäuse wurden mit MCMV i. p. infiziert. Nach 36 h wurden die NK-Zellen aus der Milz isoliert. Die Zytotoxizität der isolierten NK-Zellen wurde in einem Standard ⁵¹Cr-Release-Assay mit YAC-1-Zellen als Zielzellen ermittelt. Abgebildet ist eines von drei unabhängigen Experimenten mit n = 2 pro Gruppe.

3.8 Einfluss von IRF3 und IRF7 auf Morbidität, Mortalität und Virusreplikation im MCMV-Modell

C57BL/6 WT sowie IRF3^{-/-}, IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäuse (n = 4 pro Gruppe) wurden mit SG-MCMV intraperitoneal für insgesamt 72 h infiziert. Zur Dokumentation des klinischen Verlaufs wurde der Gewichtsverlust herangezogen, als makroskopisches Entzündungszeichen wurde die Hepatosplenomegalie nach 72 h miteinander verglichen. Im Verlauf der MCMV-Infektion war in allen Mausgruppen ein deutlicher Gewichtsverlust zu beobachten, der zwischen 15 - 18 % des Ausgangsgewichtes betrug. Unterschiede zwischen WT und KO-Mäusen konnten dabei nicht festgestellt werden. Auch die Hepatosplenomegalie der Tiere ließ keine relevanten Unterschiede zwischen WT und Knockout-Mäusen erkennen. Das Milzgewicht nach 72 h Infektion betrug durchschnittlich um 53 - 61 mg ($\pm 8 - 15$), das Lebergewicht lag im Mittel bei 770 - 890 mg ($\pm 31 - 85$).

Zur Quantifizierung der Virustiter wurden die Tiere nach 72 h euthanasiert und Leber und Milz entnommen. Die MCMV-Titer in Leber und Milz wurden im Plaqueassay bestimmt und die Viruslast in PFU pro 100 mg Gewebe angegeben. Beim Vergleich der MCMV-Titer in den verschiedenen Mausstämmen in der Leber waren keine signifikanten Unterschiede zwischen WT ($1,2 \pm 0,13 \times 10^6$), IRF3^{-/-} ($0,8 \pm 0,13 \times 10^6$), IRF7^{-/-} ($1,4 \pm 0,35 \times 10^6$) und IRF3/7^{-/-} ($0,9 \pm 0,57 \times 10^6$) Mäusen festzustellen. Verglichen mit WT Mäusen konnten geringfügig niedrigere Titer in der Leber der IRF3^{-/-} Mäuse beobachtet werden. Die MCMV-Titer in der Milz waren in IRF7^{-/-} Mäusen gegenüber WT-Mäusen geringfügig, aber dennoch signifikant erhöht und erreichten 4,6-fach höhere Werte. In IRF3/7^{-/-} Mäusen war der Milztiter 2,8-fach im Vergleich zu WT Tieren erhöht. Zwischen IRF3^{-/-} und WT Mäusen bestand kein Unterschied (Abb. 20 A + B).

Zur Unterstützung der Daten aus dem Plaqueassay wurde die Viruslast der infizierten Organe auch anhand der Kopienzahl des viralen Genoms gemessen. Hierzu wurde aus Leber und Milz Gesamt-DNA isoliert, die sowohl genomische Wirts-DNA als auch virale DNA enthielt. Virale DNA wurde durch Amplifizierung einer spezifischen Sequenz des viralen M54 Gens nachgewiesen. Die Quantifizierung der Viruskopien erfolgte dann durch qRT-PCR anhand einer Standardkurve und wurde in Kopienzahl pro 50 ng Organ-DNA angegeben (Abb. 20 C + D). Entsprechend dem Ergebnis aus dem Plaqueassay zeigten sich nur geringe Unterschiede in

der viralen Kopienzahl in der Milz und der Leber zwischen den verschiedenen Mausstämmen (Abb. 20 C + D). Die im Plaqueassay bestimmten Virustiter und mittels qRT-PCR quantifizierte Anzahl der MCMV-Kopien zeigten übereinstimmend eine geringfügig höhere Viruslast in der Milz von IRF7^{-/-} Mäusen. Die beobachteten Unterschiede erreichten aber in den insgesamt drei durchgeführten Experimenten nicht mehr als eine Logstufe. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als der ausgeprägte Defekt in der Typ I IFN-Antwort auf MCMV sich nicht wie erwartet in wesentlich höheren Virustitern auswirkte. Offensichtlich wird die defekte Typ I IFN-Produktion in IRF7-defizienten Mäusen durch vermehrte IFN- γ Expression der NK-Zellen und unbeeinträchtigte zytotoxische Aktivität der NK-Zellen kompensiert, so daß im Gegensatz zu anderen viralen Infektionsmodellen eine effektive Kontrolle der MCMV-Replikation auch in Abwesenheit von IRF7 möglich ist.

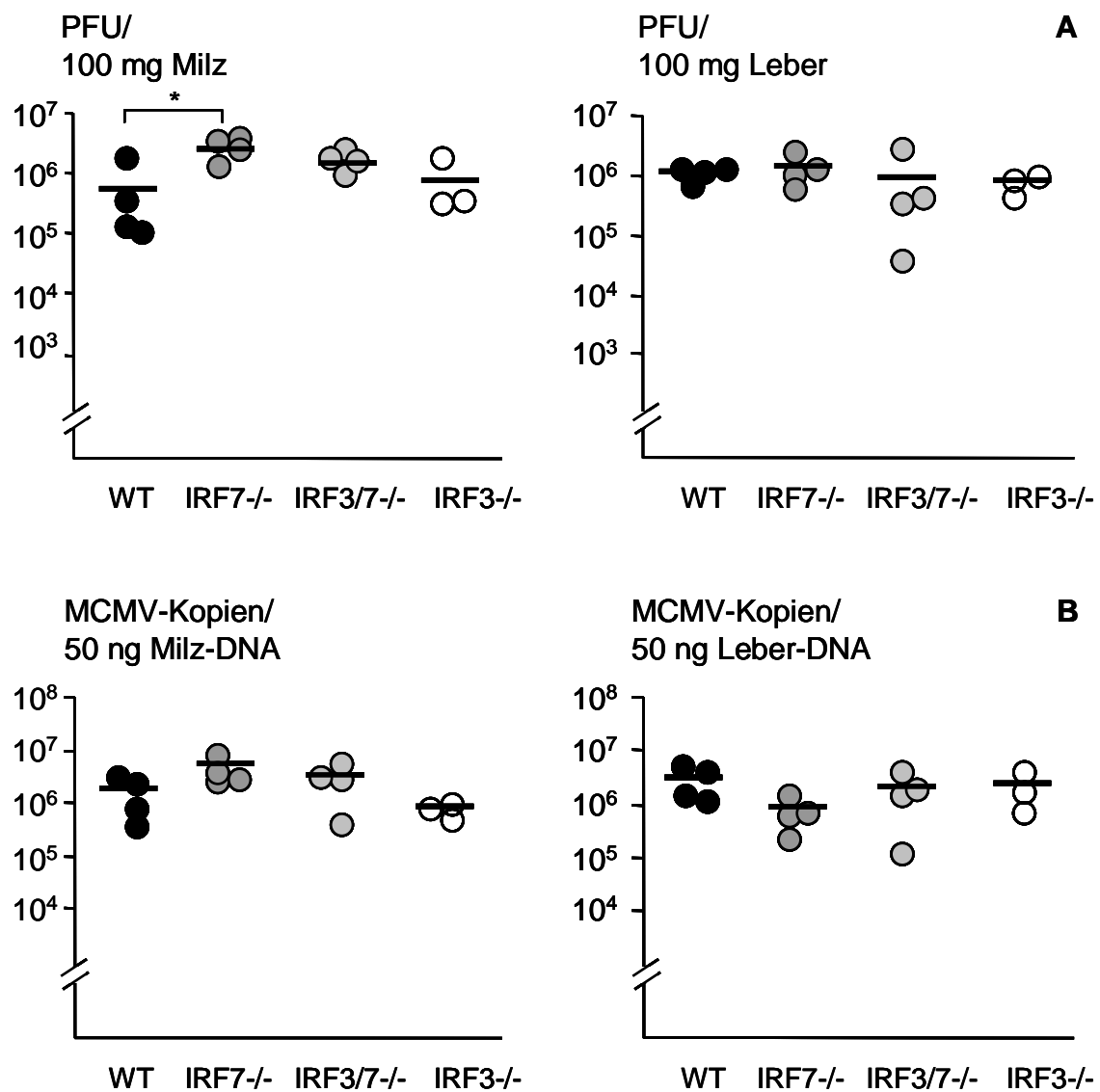


Abbildung 20. MCMV-Titer in Leber und Milz 3 Tage nach Infektion.

C57BL/6 WT, IRF3^{-/-}, IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäuse (jeweils n = 3 oder n = 4) wurden mit MCMV i.p. infiziert. 72 h nach Infektion wurden die MCMV-Titer in Leber und Milz im Plaqueassay (A) sowie die MCMV-Kopienzahl in Leber und Milz mittels qRT-PCR (B) bestimmt. Die Symbole kennzeichnen die Werte der einzelnen Tiere (n = 4 oder n = 3). Der Gruppenmittelwert ist als Querstrich dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet (p < 0,05). Ein repräsentatives Experiment von 3 unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

3.9 Bedeutung von IRF3 und IRF7 für das Überleben bei der MCMV-Infektion

Zur Untersuchung der Bedeutung von IRF3 und IRF7 für die Mortalität bei systemischer MCMV-Infektion wurden C57BL/6 WT, IRF3^{-/-}, IRF7^{-/-}, IRF3/7^{-/-} und BALB/c Mäuse intraperitoneal mit SG-MCMV infiziert und das Überleben der Mäuse für einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen dokumentiert (Abb. 21). Die C57BL/6 WT und IRF3^{-/-} Mäuse überlebten zu hundert Prozent. In der Gruppe der BALB/c Mäuse verstarben alle Tiere innerhalb der ersten 5 Tage nach Infektion. Von den IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäusen überlebten 57 % aller Tiere. Der beobachtete Unterschied im Überleben von WT und BALB/c Mäusen war in Übereinstimmung mit der Literatur deutlich signifikant ($p = 0,0001$). Im direkten Vergleich zwischen WT und IRF7^{-/-} Mäusen ($p = 0,0453$) sowie zwischen WT und IRF3/7^{-/-} Mäusen ($p = 0,0442$) wurden zwar ebenfalls signifikante Unterschiede festgestellt, die jedoch deutlich geringer ausfielen. Die Mortalität von IRF3/7^{-/-} Mäusen bei MCMV-Infektion war gegenüber BALB/c Mäusen signifikant niedriger ($p = 0,0198$). Zwischen IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäusen bestanden keine Unterschiede in der Mortalität. Zusammenfassend wird aus diesen Daten ersichtlich, daß IRF3 für das Überleben bei der systemischen MCMV-Infektion keine Rolle spielt. Das Fehlen von IRF7 wirkt sich bei der MCMV-Infektion trotz der defekten Typ I IFN-Produktion weit weniger stark aus als erwartet und führt erst ab der zweiten Infektionswoche zu einer erhöhten Mortalität. Mehrheitlich überleben die IRF7^{-/-} bzw. IRF3/7^{-/-} Mäuse dabei jedoch die Infektion. Im Gegensatz zu den BALB/c Mäusen zeigen die IRF7^{-/-} bzw. IRF3/7^{-/-} Mäuse somit keinen ausgeprägten Phänotyp bei der MCMV-Infektion.

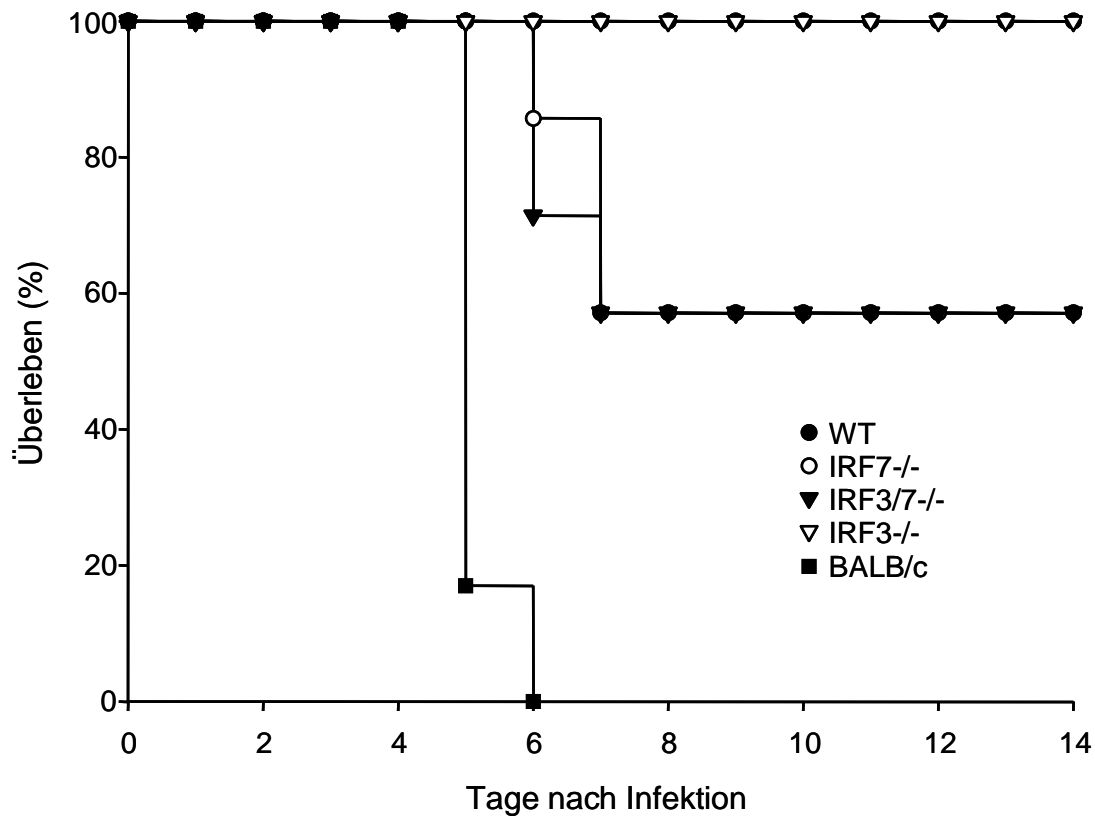


Abb. 21. Untersuchung zur Bedeutung von IRF3 und IRF7 für das Überleben bei MCMV-Infektion.

WT, BALB/c, IRF3^{-/-}, IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäuse (n = 6 - 8 pro Gruppe) wurden mit MCMV i. p. infiziert und das Überleben für einen Zeitraum von 14 Tagen dokumentiert. Ein repräsentatives Experiment von 3 unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

3.10 Untersuchung der Rolle von IFN- λ als antiviraler Faktor bei systemischer MCMV-Infektion

Im Rahmen einer Virusinfektion wird neben Typ I IFN und IFN- γ auch IFN- λ (= Typ III IFN) induziert, für das ebenfalls antivirale Effekte vor allem bei der Infektion mit RNA-Viren beschrieben wurden. Die antivirale Wirkung von IFN- λ (= Typ III IFN) auf DNA-Viren ist bisher nur unzureichend untersucht worden und zur Rolle von IFN- λ bei systemischer MCMV-Infektion liegen bislang noch keine Daten vor. *In vitro* konnte die Induktion von IFN- λ 2 in GM-CSF-DC nach Stimulation mit MCMV gezeigt werden (s. Abb. 11 B). *In vivo* wurde die IFN- λ Expression während der MCMV-Infektion ähnlich reguliert wie die IFN- α Produktion. Zur Abklärung einer antiviralen Funktion von IFN- λ in der Frühphase der systemischen

MCMV-Infektion wurden *in vivo* Experimente durchgeführt, in denen der Einfluß von IFN- λ auf die IFN- γ Bildung und die organspezifische Viruskontrolle untersucht wurde. Dafür wurden C57BL/6 WT Mäuse 6 h vor der Infektion mit MCMV einer systemischen Vorbehandlung durch Injektion von 10 μ g rekombinanten IFN- λ 2 bzw. PBS in der Kontrollgruppe unterzogen. Die Mäuse wurden dann mit SG-MCMV infiziert. Zu definierten Zeitpunkten erfolgten Blutabnahmen für die Messung der IFN- γ Konzentration im Serum. Nach 72 h wurden die Tiere euthanasiert und die Viruslast in Leber und Milz mit den zuvor beschriebenen Methoden in Plaqueassay und RT-PCR ermittelt. Als makroskopisches Zeichen des Krankheitsverlaufes wurden die Gewichtsabnahme über die Infektionsdauer sowie post mortem die Hepatosplenomegalie der Mäuse dokumentiert. Gewichtsverlust und Organomegalie war unabhängig von der Art der Vorbehandlung. PBS-behandelte Mäuse verloren durchschnittlich 9,9 %, IFN- λ 2-behandelte Mäuse 12,3 % ihres Körpergewichts nach 72 h Infektion. Im Organgewicht post mortem bestanden zwischen der PBS-Gruppe (Milz 59 mg \pm 8, Leber 870 mg \pm 27) und der IFN- λ 2-Gruppe (Milz 56 mg \pm 9, Leber 880 mg \pm 33) ebenfalls keine Unterschiede.

Vorbehandlung mit IFN- λ 2 steigerte die IFN- γ Bildung nach MCMV-Infektion und resultierte 48 h nach Infektion in einer signifikant höheren IFN- γ -Serumkonzentration gegenüber PBS-vorbehandelten Tieren (Abb. 22 A). Dieser Unterschied ließ sich nicht durch eine verstärkte IL-12p40 Induktion bei IFN- λ 2 Vorbehandlung erklären, da die Konzentration von IL-12p40 zu allen Zeitpunkten keine relevanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen zeigte (Abb. 22 B). Die MCMV-Kontrolle in Milz und Leber blieb durch die Vorbehandlung mit IFN- λ 2 unbeeinflusst. Im Plaqueassay wurden für mit PBS und IFN- λ 2 vorbehandelte Mäuse gleiche MCMV-Titer in Leber und Milz gemessen. In beiden Gruppen waren die Virustiter in der Leber im Vergleich zur Milz leicht erhöht (Abb. 22 B + C). Die Quantifizierung der viralen Kopienzahl mittels qRT-PCR zeigte in Übereinstimmung mit dem Plaqueassay insgesamt keinen Unterschied zwischen PBS- und IFN- λ 2-Vorbehandlung (Abb. 22 C + D). Anhand dieser Daten wird ersichtlich, daß IFN- λ 2 die IFN- γ Bildung nach MCMV-Infektion im Vergleich zu unbehandelten Mäusen zusätzlich steigert, dabei jedoch IL-12 als klassischen IFN-Stimulus nicht beeinflusst. Ein antiviraler Effekt von IFN- λ 2 war in diesen Experimenten nicht erkennbar.

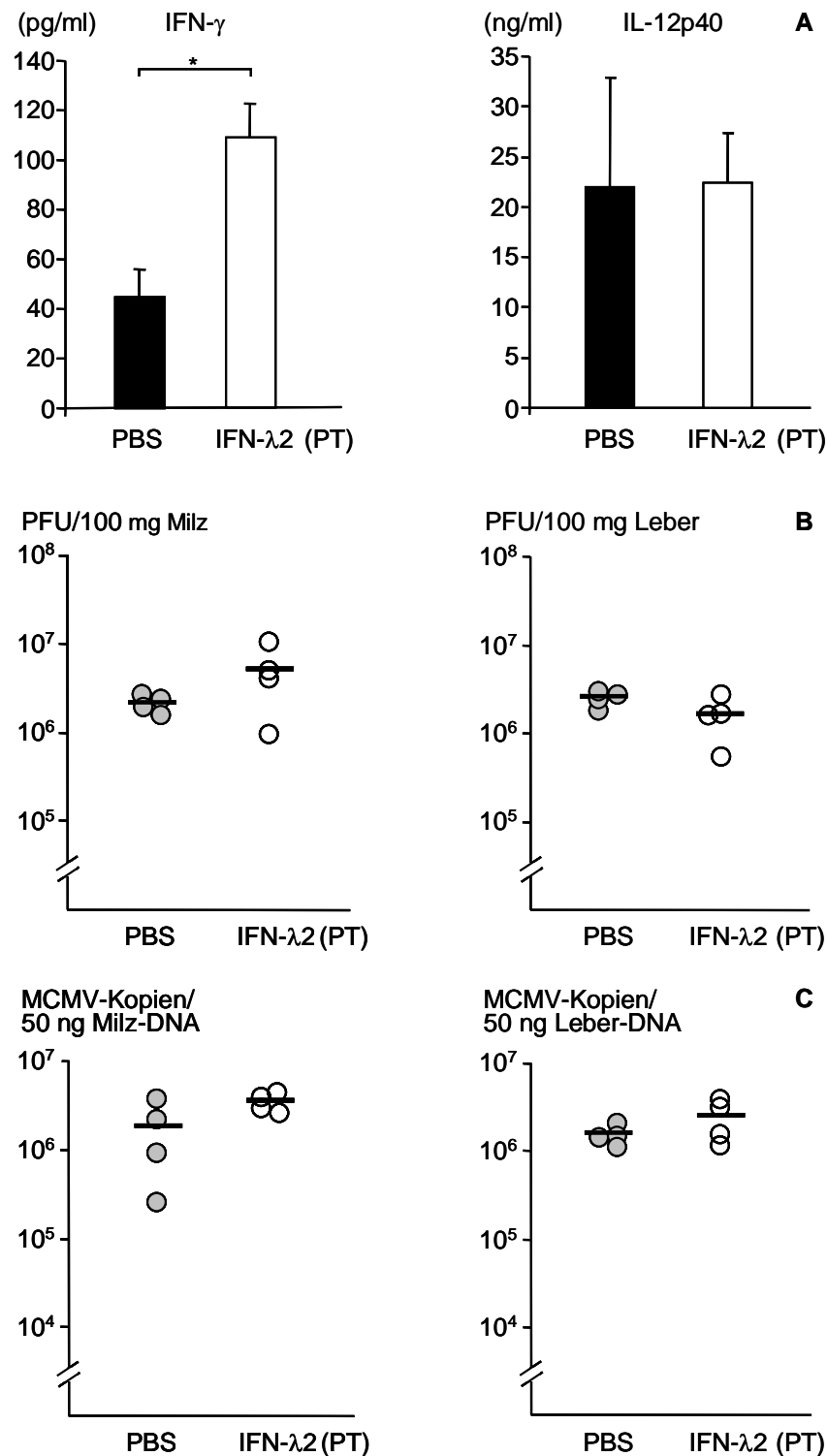


Abb. 22. Auswirkung von IFN-λ2 auf die Zytokinantwort und Virustiter bei Infektion mit MCMV. C57BL/6 WT Mäuse erhielten 6 h vor Infektion mit MCMV 10 µg rekombinantes IFN-λ2 bzw. PBS i. p. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (24 h, 36 h, 48 h und 72 h) wurden die Serumkonzentrationen von IFN-γ und IL-12p40 (A) im ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM mit n = 4 pro Gruppe dargestellt und zeigen eines von drei unabhängigen Experimenten. Die Bestimmung der Virustiter durch Plaqueassay (B) bzw. die Quantifizierung der MCMV-Kopienzahl (C) in Milz und Leber erfolgte 72 h nach Infektion. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die Symbole entsprechen den Werten der einzelnen Mäuse. Der Gruppenmittelwert ist als Querstrich dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet (p < 0,05).

4. Diskussion

IFN-Produktion gehört zu den zentralen antiviralen Mechanismen, die nach Viruserkennung über TLRs oder die zytosolischen RNA-bindenden Helikasen RIG-I und Mda-5 ausgelöst werden. In TLR-abhängigen und –unabhängigen Signalwegen sind dabei IRF7 und IRF3 die essentiellen Transkriptionsfaktoren, die die Induktion von Typ I IFN regulieren (Honda et Taniguchi 2006). In der vorliegenden Dissertation wurde die Rolle von IRF3 und IRF7 bei der systemischen MCMV-Infektion im Hinblick auf die antivirale Typ I IFN- und Zytokinantwort, die NK-Zellaktivierung sowie die organspezifische Viruskontrolle und Mortalität untersucht.

Bei der systemischen MCMV-Infektion ist eine biphasische Typ I IFN-Antwort zu beobachten. Diese ist in den ersten 36 h nach Infektion TLR9-abhängig und wird von plasmazytoiden DC vermittelt. Nach 48 h ist eine TLR9/MyD88-unabhängige Typ I IFN-Produktion zu beobachten (Krug et al. 2004, Delale et al. 2005). In myeloiden DC wie auch in den meisten anderen Zelltypen dominiert bei einer Infektion mit RNA-Viren die TLR-unabhängige Typ I IFN-Induktion, die eine Viruserkennung durch die zytosolischen RNA-bindenden Helikasen RIG-I und Mda-5 voraussetzt (Kato et al. 2005, Barchet et al. 2005). Die Arbeiten von Ishii et al. (2006) und Stetson et Medzhitov (2006a) lassen analog zu den RNA-bindenden Helikasen RIG-I und Mda-5 die Existenz eines zytosolischen DNA-Sensors vermuten, der nach Stimulation mit dsDNA über TBK1 zur Aktivierung von IRF-3 führt und in MEFs, Makrophagen, myeloiden DC und plasmazytoiden DC Typ I IFN induziert. Kürzlich wurde der DNA-abhängige Aktivator von IRFs (DAI) als erster zytosolischer DNA-Sensor identifiziert (Takaoka et al. 2007). Die Aktivierung von DAI durch dsDNA führt dabei durch Interaktion mit TBK1 und direkt mit IRF3 zur Aktivierung von IRF3 mit nachfolgender Induktion von Typ I IFN, insbesondere IFN- β . Eine DAI-vermittelte Viruserkennung wurde in Fibroblasten und Makrophagen nach Infektion mit Vaccinia Virus oder HSV-1 nachgewiesene. Die Existenz weiterer zytosolischer DNA-Sensoren sowie die Frage nach einer virus- und zelltypspezifischen Funktion von DAI sind bislang ungeklärt.

Ein Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Annahme, daß der zytosolische DNA-Rezeptor von MCMV-DNA aktiviert wird und für die TLR9-/MyD88-unabhängige Induktion von Typ I IFN verantwortlich ist. Es wurde gezeigt, daß die Typ I IFN-Induktion durch intrazelluläre

DNA über den zytosolischen DNA-Rezeptor durch IRF3 vermittelt ist (Ishii et al. 2006, Stetson et Medzhitov 2006a). Wir untersuchten daher die spezifische Funktion von IRF3 für die Typ I IFN Antwort auf MCMV *in vitro* und *in vivo* mit dem Ziel, daraus Rückschlüsse auf den möglichen Beitrag des DNA-Rezeptors DAI für die Induktion von Typ I IFN durch MCMV und die Auslösung der antiviralen Immunantwort gegen MCMV zu ziehen. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, ausgehend von den Ergebnissen von Honda et al. (2005), die für IRF7 die Funktion eines „*Master-Regulator*“ der Typ I IFN-Induktion beschrieben haben, die Rolle von IRF7 im MCMV-Modell zu untersuchen, insbesondere im Hinblick auf die Induktion von Typ I IFN und proinflammatorischen Zytokinen, auf die NK-Zellaktivierung sowie auf die Kontrolle der Virusreplikation und das Überleben der Mäuse.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die Induktion von Typ I IFN und IFN- λ 2 in myeloiden DC nach Infektion mit MCMV und NDV IRF1- und IRF3-unabhängig ist. In IRF7-defizienten DC war die Produktion von Typ I IFN und IFN- λ 2 stark reduziert, jedoch nicht vollständig aufgehoben (Abb. 11). Bei der IRF7-unabhängigen residuellen IFN-Produktion dominierte IFN- β . Im Gegensatz zu den Daten dieser Arbeit wurde eine signifikante IRF7-unabhängige IFN-Antwort der myeloiden DC in der Publikation von (Honda et al. 2005), in der HSV, VSV, EMCV und synthetische TLR-Liganden als Stimuli eingesetzt wurden, nicht beobachtet. Im Unterschied zur Typ I IFN-Induktion durch zytosolische DNA war die Typ I IFN-Produktion nach Infektion mit MCMV nicht IRF3-abhängig, sondern wurde vor allem durch IRF7 aber auch durch IRF7-unabhängige Faktoren vermittelt. Auch *in vivo* wurde eine geringe residuelle Typ I IFN-Produktion in IRF7^{-/-} Mäusen bei systemischer Infektion mit MCMV beobachtet (Abb. 12). Die Kinetik der systemischen IFN-Antwort war dabei in IRF7^{-/-} und IRF3^{7/-} Mäusen identisch und die residuelle IFN- β -Produktion war sowohl IRF7- als auch IRF3-unabhängig. Somit kann eine essentielle Funktion von IRF3 für die systemische IFN-Antwort bei der MCMV-Infektion ausgeschlossen werden. Eine wesentliche Beteiligung des DNA-Sensors DAI an der Typ I IFN Induktion während der MCMV-Infektion wird damit unwahrscheinlicher. Durch Neutralisation von IFN- β im Bioassay wurde gezeigt, daß in IRF7^{-/-} und IRF3^{7/-} Mäusen während der MCMV-Infektion ausschließlich IFN- β produziert wird. Die Typ I IFN-Aktivität im Serum von WT und IRF3^{-/-} wurde durch Neutralisation von IFN- β nur geringfügig reduziert. Dies zeigt, daß die IFN-Antwort auf MCMV in WT und IRF3^{-/-} Mäusen von IFN- α dominiert wird, das IRF7-abhängig produziert wird.

Die verbleibende IFN- β -Antwort in IRF7 $^{-/-}$ und IRF3/7 $^{-/-}$ Mäusen wirft die Frage nach einer Beteiligung anderer IRFs an der MCMV-induzierten IFN-Induktion auf. Für IRF1 wurde bereits eine essentielle Rolle für die Induktion von IFN- β im TLR9/MyD88-abhängigen Signalweg von myeloiden DC und Makrophagen gezeigt (Negishi et al. 2006, Schmitz et al. 2007) und IRF1-vermittelte antivirale Effekte gegen die DNA-Viren MVA und MHV-68 nachgewiesen (Schmitz et al. 2007). Keine Daten liegen bislang zum Einfluß von IRF1 auf die MCMV-induzierte systemische IFN-Antwort vor. Die Generierung von IRF1/3/7 $^{-/-}$ Mäusen wäre eine Möglichkeit, um die residuelle IFN- β -Produktion in IRF7 $^{-/-}$ und IRF3/7 $^{-/-}$ Mäusen auf eine mögliche IRF1-Abhängigkeit hin zu untersuchen.

Im Zusammenhang mit der MCMV-induzierten IFN-Produktion ebenfalls nicht untersucht ist die Rolle von IRF5. IRF5 wird konstitutiv vor allem in B-Zellen und DC exprimiert, kann jedoch durch Typ I IFN in den meisten anderen Zelltypen induziert werden (Barnes et al. 2001). Eine Aktivierung von IRF5 *in vitro* wurde bislang für die Infektion mit NDV, VSV und HSV-1 nachgewiesen (Barnes et al. 2001, Barnes et al. 2002). Aktiviertes IRF5 induziert IFN- α und IFN- β , wobei IRF5 und IRF7 unterschiedliche IFN- α -Subtypen induzieren (Barnes et al. 2001, Barnes et al. 2002). Eine antivirale Wirkung von IRF5 *in vivo* mit IRF5-abhängiger Typ I IFN-Produktion bei VSV- und HSV-1-Infektion wurde kürzlich von (Yanai et al. 2007) gezeigt. Auf zellulärer Ebene ist dabei die Typ I IFN-Induktion in Milzmakrophagen IRF5-abhängig (Yanai et al. 2007), in plasmazytoiden DC und MEFs hingegen IRF5-unabhängig (Takaoka et al. 2005, Yanai et al. 2007).

Neben IRF1 und IRF5 ist auch eine Beteiligung von IRF8 an der MCMV-induzierten IFN-Antwort vorstellbar. IRF8 wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert und ist sowohl in inaktivierten als auch in aktivierten Zellen primär im Nukleus lokalisiert (Tailor et al. 2007). Vorangegangene Studien zeigten eine essentielle Rolle von IRF8 für die Entwicklung von plasmazytoiden DC und CD8 α^+ DC, was in IRF8 $^{-/-}$ Mäusen zum weitgehenden Verlust dieser beiden DC-Subpopulationen und einer defekten Produktion von IFN- α und IL-12p40 führt (Schiavoni et al. 2002, Tamura et al. 2005) Im Rahmen der virusinduzierten IFN-Produktion ist IRF8 entscheidend an der durch die positive Feedback-Schleife vermittelten zweiten Phase der Typ I IFN-Produktion in plasmazytoiden und myeloiden DC beteiligt. Dieser Effekt ist virusunspezifisch und erfolgt zumindest teilweise durch eine IRF8-vermittelte verlängerte Anlagerung der RNA-Polymerase II an die Promoterregion von Typ I IFN-Genen

(Tailor et al. 2007). Zur Rolle von IRF8 für die MCMV-induzierte IFN-Produktion *in vivo* liegen bislang keine Daten vor.

Neben der Beteiligung anderer IRFs könnte die residuelle IFN- β -Produktion in IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäusen auch auf IRF-unabhängige Signalwege zur IFN-Induktion zurückzuführen sein. Eine IRF-unabhängige Induktion von IFN- β wurde in Osteoklastenvorläuferzellen beschrieben. In diesen Zellen kann IFN- β über den Liganden des Rezeptoraktivators von NF- κ B (*receptor activator of NF- κ B ligand*, RANKL), ein Protein der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie, via c-Fos-Expression induziert werden. Die RANKL-vermittelte IFN- β -Induktion ist dabei auch in IRF3/9^{-/-} Osteoklastenvorläuferzellen nachweisbar (Takayanagi et al. 2002).

Zu den zentralen antiviralen Zytokinen während der frühen MCMV-Infektion gehört IFN- γ (= Typ II IFN). Die antiviralen Effekte von IFN- γ im MCMV-Modell sind durch zahlreiche Publikationen belegt (Lucin et al. 1992, Lucin et al. 1994, Orange et al. 1995, Presti et al. 1998). Im Rahmen der MCMV-Infektion wird IFN- γ bereits früh durch IL-12 und IL-18 induziert und erreicht 36 h nach Infektion seine maximale Konzentration im Serum (Orange et al. 1996b, Ruzek et al. 1997). In Übereinstimmung mit der Literatur wurden die maximale IFN- γ - und IL-12p40-Konzentrationen im Serum 36 h nach Infektion gemessen. Die maximale IFN- γ -Konzentration im Serum von IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäusen war gegenüber WT Mäusen signifikant erhöht. Auch in IRF3^{-/-} Mäusen war die IFN- γ -Produktion 36 h nach Infektion gegenüber WT Mäusen signifikant erhöht. Der gesteigerten IFN- γ Produktion in IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} sowie IRF3^{-/-} Mäusen liegt eine erhöhte IL-12p70-Sekretion zugrunde.

Ein Erklärungsansatz für die gesteigerte IL-12p70-Sekretion in IRF7^{-/-} Mäusen könnte die defekte Typ I IFN-Antwort in diesen Mäusen sein. Bereits in früheren Studien wurde für Typ I IFN eine dosisabhängige, spezifische Hemmung der IL-12p70-Sekretion in Splenozyten bzw. DC nachgewiesen (Cousens et al. 1997, McRae et al. 1998, Dzionek et al. 2002) Die Depletion von plasmazytoiden DC und die damit verbundene reduzierte Typ I IFN-Bildung führt zu einer gesteigerten Produktion von IL-12p70 und IFN- γ bei MCMV-Infektion (Krug et al. 2004). Dalod et al. (2002) zeigten, daß plasmazytoide DC bei der MCMV-Infektion über Typ I IFN die IL-12-p70-Sekretion in myeloiden DC hemmen und dieser Effekt in IFN $\alpha\beta$ R^{-/-}

Mäusen aufgehoben ist. Der inhibierende Effekt von Typ I IFN wird dabei über STAT1 vermittelt (Nguyen et al. 2000, Dalod et al. 2002). Zusätzlich führt Typ I IFN dazu, daß T- und NK-Zellen gegenüber IL-12 refraktär werden (Nguyen et al. 2000).

Ein anderes Beispiel für die virusassoziierte inhibierende Wirkung von Typ I IFN auf die IL-12-Sekretion ist die Infektion mit dem lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV). LCMV induziert in immunkompetenten Mäusen zwar IFN- α / β , führt jedoch in der Frühphase der Infektion nicht zur Bildung von IL-12 und IFN- γ (Orange et al. 1996, Nguyen et al. 2000). Durch Neutralisation der IFN- α / β -Effekte über blockierende Antikörper oder Verwendung von IFN $\alpha\beta$ R $^{-/-}$ Mäusen wird auch bei einer Infektion mit LCMV bioaktives IL-12p70 und IFN- γ in messbarer Konzentration freigesetzt (Cousens et al. 1997). Die Dosisabhängigkeit der IL-12-aktivierenden oder -inhibierenden Wirkung von Typ I IFN zeigt sich darin, daß endogenes Typ I IFN in niedriger bis mittlerer Dosis zur Sekretion von IL-12p70 erforderlich ist, während hohe Dosen Typ I IFN hemmend auf die IL-12p70-Produktion wirken (Gautier et al. 2005). Die residuelle IFN- β -Produktion in IRF7 $^{-/-}$ und IRF3/7 $^{-/-}$ Mäusen ist für eine effektive IL-12p70-Sekretion offenbar ausreichend, während die hohe Konzentrationen von IFN- α , die bei Infektion von WT-Mäusen mit MCMV entstehen, die IL-12p70-Produktion hemmen.

Die Bedeutung von IRF3 für die antivirale Typ I IFN-Antwort ist virus- und zelltypspezifisch (Sato et al. 2000, Honda et al. 2005). So zeigen IRF3 $^{-/-}$ Mäuse eine starke reduzierte Typ I IFN-Produktion und eine erhöhte Mortalität bei EMCV-Infektion (Sato et al. 2000). Die Zytokinbestimmung aus den MCMV-Infektionsexperimenten dieser Arbeit ergab dagegen für IRF3 $^{-/-}$ Mäuse sogar signifikant höhere Konzentrationen von Typ I IFN, IFN- γ , IFN- λ 2 und IL-12p70 gegenüber WT Mäusen. Die IRF3 $^{-/-}$ Mäuse zeigten ähnliche Virustiter in den Organen wie die WT Mäuse. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß IRF3 für die Produktion von Typ I IFN und proinflammatorischen Zytokinen im MCMV-Modell *in vivo* nicht notwendig ist. Dies bedeutet auch, daß der von Stetson et Medzhitov (2006a) und Ishii et al. (2006) beschriebene putative zytosolische DNA-Rezeptor entweder nicht an der MCMV-Erkennung beteiligt ist oder neben IRF3 auch IRF7 aktiviert. Eine IRF7-Aktivierung durch den zytosolischen DNA-Rezeptor, die in den bisher veröffentlichten Studien jedoch nicht

gezeigt wurde, wäre insofern naheliegend, als TBK1/IKK ϵ sowohl IRF3 als auch IRF7 aktivieren kann (Sharma et al. 2003, Kawai et al. 2005).

Andere Zytokine mit IFN- γ induzierender Wirkung sind IL-18, IL-23 und IL-27, deren Einfluß auf die IFN- γ -Produktion bei Fehlen von IRF3 oder IRF7 in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurde. Zwar ist IL-18 bei MCMV-Infektion entscheidend für die Induktion von IFN- γ in NK-Zellen durch myeloide DC (Andoniou et al. 2005), insgesamt scheint die IFN- γ induzierende Wirkung von IL-18 aber in diesem Infektionsmodell im Gegensatz zu IL-12 redundant zu sein. Das Fehlen von IL-18 führt zwar zu niedrigeren IFN- γ -Konzentrationen in Serum und Milz, beeinflußt die Mortalität und den MCMV-Titer in der Milz jedoch nicht (Pien et al. 2000). Die IFN- γ Induktion durch IL-23 und IL-27 wurde bislang nur in naiven T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen beschrieben (Oppmann et al. 2000, Pflanz et al. 2002).

Das charakteristische Zytokinmuster im Serum, das sich in MCMV-infizierten IRF3 $^{-/-}$ und IRF7 $^{-/-}$ Mäusen 36 h nach Infektion zeigt, korrelierte insbesondere in der Milz mit der transkriptionellen Regulation dieser Zytokine. In IRF7 $^{-/-}$ Mäusen war die Transkription von IFN- α und IFN- λ 2 in der Milz stark reduziert, in der Leber hingegen war keine signifikante Reduktion der IFN- α / λ 2-Transkription nachweisbar. Die IFN- β -Transkription war in beiden Organen in IRF7 $^{-/-}$ im Vergleich zu WT Mäusen eher gesteigert. In beiden Organen war die Transkription von IFN- γ , IL-12p40 und IL-23p19 in IRF7 $^{-/-}$ gegenüber WT Mäusen stärker induziert. Im Gegensatz zur Literatur (Nakaya et al. 2001, Sakaguchi et al. 2003) war die Transkription des Chemokins CXCL10 in Milz und Leber IRF3-unabhängig. In diesem Zusammenhang zeigt eine aktuelle Studie in humanen Endothelzellen (Buttmann et al. 2007), daß in diesem Zellsystem IRF1 und IRF2 die essentiellen Transkriptionsfaktoren für die CXCL10-Expression sind. Die in der Literatur beschriebene Rolle von IRF3 für die CXCL10-Induktion scheint im MCMV-Infektionsmodell redundant sein.

Für plasmazytoide DC, myeloide DC und CD8 α^+ DC wurde eine Typ I IFN-abhängige Expression kostimulatorischer Moleküle im MCMV-Infektionsmodell beschrieben (Dalod et al. 2003). Die durchflußzytometrischen Untersuchungen zur CD86-Expression von plasmazytoiden DC, myeloiden DC und CD11b $^+$ Makrophagen zeigten aber für alle Mausstämme ein einheitliches Aktivierungsniveau in der Milz. In der Leber war die CD86-Expression von myeloiden DC und CD11b $^+$ Makrophagen in IRF7 $^{-/-}$ Mäusen gegenüber WT Mäusen geringfü-

gig niedriger. Im Gegensatz zu Dalod et al. (2003), die IFN $\alpha\beta$ -Rezeptor-/- Mäuse verwendeten, ist die residuelle IFN- β -Produktion in IRF7-/- Mäusen offensichtlich für eine adäquate Aktivierung von DC-Populationen und Makrophagen ausreichend.

Das Überleben in der ersten Woche nach MCMV-Infektion ist an eine intakte NK-Zellfunktion gebunden. Die Aktivierung der NK-Zellzytotoxizität erfolgt dabei durch Typ I IFN (Orange et al. 1996b, Granucci et al. 2004, Andoniou et al. 2005) und Zell-Zell-Interaktionen zwischen DC und NK-Zellen (Andoniou et al. 2005). Aufgrund ihrer Eigenschaft als Hauptproduzenten von Typ I IFN und Beteiligung an der IL-12-Sekretion (neben CD11b⁺ und CD8 α ⁺ DC) in den ersten 36 h einer MCMV-Infektion werden plasmazytoide DC als wichtige Zellpopulation zur NK-Zellaktivierung angesehen (Dalod et al. 2003). Defekte in der TLR9/MyD88-vermittelten Typ I IFN- und IL-12-Produktion korrelieren mit einer gestörten NK-Zell-Aktivierung, die sich in einer reduzierten IFN- γ -Produktion (Krug et al. 2004, Tabeta et al. 2004, Delale et al. 2005) und einer verminderten zytotoxischen Aktivität niederschlägt (Krug et al. 2004). In TLR9-/- und MyD88-/- Mäusen kommt es daher zu signifikant erhöhten MCMV-Titern in Milz und Leber (Krug et al. 2004, Tabeta et al. 2004, Delale et al. 2005). Die Arbeit von Andoniou et al. (2005) zeigt jedoch, daß auch myeloide DC eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der NK-Zellzytotoxizität spielen. Myeloide DC vermitteln dies durch die Produktion von Typ I IFN, das in diesen Zellen TLR9/MyD88-unabhängig induziert wird und durch die Expression von NKG2D-Liganden, die den NKG2D-Rezeptor auf der Oberfläche von NK-Zellen aktivieren. Adoptiver Transfer von MCMV-aktivierten myeloiden DC in MCMV-empfindliche BALB/c Mäuse führt zu signifikant niedrigeren Virustitern in der Milz.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die NK-Zellzytotoxizität der IRF7-/- Mäuse 36 h nach der MCMV-Infektion trotz der stark reduzierten Typ I IFN-Produktion unbeeinträchtigt war. Die Untersuchungen zur Zytotoxizität der NK-Zellen in einem 4 h ⁵¹Cr-Release-Assay mit YAC-1-Zielzellen zeigte keine relevanten Unterschiede in der Zytolysefähigkeit von NK-Zellen aus der Milz von WT oder IRF7-/- Mäusen. Dies läßt den Schluß zu, daß die residuelle IFN- β -Produktion in IRF7-defizienten Mäusen für eine suffiziente Zytolysefähigkeit der NK-Zellen ausreichend ist. Ebenso war die CD69-Expression der aus der Milz isolierten NK-Zellen durch das Fehlen von IRF7 nicht wesentlich beeinträchtigt. In Übereinstimmung mit der Literatur (Orange et al. 1995) wurden in allen Mausstämmen die NK-Zellen

als Hauptproduzenten von IFN- γ bestätigt. NKT-Zellen und andere potentiell IFN- γ bildende Zellpopulationen leisteten in den Experimenten dieser Arbeit zu diesem frühen Zeitpunkt keinen nennenswerten Beitrag zur IFN- γ -Produktion (van Dommelen et al. 2003, Loh et al. 2005). In Korrelation mit den höheren IFN- γ -Konzentrationen im Serum war der Prozentsatz IFN- γ bildender NK-Zellen in Milz und Leber in IRF7^{-/-} Mäusen signifikant höher als in WT Mäusen

Die Kontrolle der MCMV-Replikation in Leber und Milz erfolgt innerhalb der ersten 5 bis 6 Tage nach Infektion durch NK-Zellen. In den ersten 72 h der MCMV-Infektion erfolgt die Virussuppression in der Leber vor allem durch lokal von NK-Zellen gebildetes IFN- γ , in der Milz hingegen durch perforinvermittelte Zytotoxizität (Orange et al. 1996b, Tay et al. 1997, Brown et al. 1997). Eine jüngere Studie von Loh et al. (2005) zeigt hingegen, daß in beiden Organen sowohl IFN- γ als auch perforinvermittelte Zytotoxizität zur Kontrolle der Virusreplikation erforderlich sind.

Überraschenderweise beeinflusste der ausgeprägte Defekt in der Typ I IFN-Antwort auf MCMV in IRF7^{-/-} Mäusen die lokale Viruskontrolle weit weniger als erwartet. Die Bestimmung der MCMV-Titer im Plaqueassay zeigte in den verschiedenen Mausstämmen keinen relevanten Titerunterschied in der Leber. In der Milz waren die MCMV-Titer in IRF7^{-/-} Mäusen geringfügig, aber dennoch signifikant gegenüber WT-Mäusen erhöht. In IRF3/7^{-/-} Mäusen war der Milztiter gegenüber WT Mäusen ebenfalls erhöht. Kein Unterschied im MCMV-Titer in der Milz bestand zwischen WT und IRF3^{-/-} Mäusen. Auch die absolute Quantifizierung der MCMV-Kopienzahl mittels qRT-PCR zeigte übereinstimmend zum Plaqueassay eine geringfügig erhöhte Viruslast in der Milz von IRF7^{-/-} Mäusen. Die beobachteten Unterschiede erreichten aber in den insgesamt drei durchgeführten Experimenten nicht mehr als eine Logstufe. Ob eine niedrigere MCMV-Dosis zu deutlicheren Titerunterschieden in der Milz zwischen WT und IRF7^{-/-} bzw. IRF3/7^{-/-} Mäusen führt, muß in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Offensichtlich wird die defekte Typ I IFN Produktion in IRF7-defizienten Mäusen durch vermehrte IFN- γ Expression der NK-Zellen und eine unbeeinträchtigte zytotoxische Aktivität der NK-Zellen teilweise kompensiert, so daß im Gegensatz zu anderen viralen Infektionsmodellen (HSV-1, EMCV; Honda et al. 2005) eine relativ effektive Kontrolle der MCMV-Replikation auch in Abwesenheit von IRF7 möglich ist.

Die Mortalität der IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäuse nach Infektion mit MCMV war signifikant höher verglichen mit WT-Mäusen (Abb. 21). Im Vergleich zu den MCMV-empfindlichen BALB/c Mäusen fielen diese Unterschiede jedoch deutlich geringer aus und der direkte Vergleich zwischen BALB/c und IRF3/7^{-/-} Mäusen bewies eine signifikant höhere Mortalität für die BALB/c Mäuse. Das Fehlen von IRF7 mit dem daraus resultierenden Defekt in der Produktion von Typ I IFN beeinflusst somit das Überleben bei MCMV-Infektion deutlich weniger als das Fehlen von Ly49H auf NK-Zellen in BALB/c Mäusen. WT und IRF3^{-/-} Mäuse zeigten bei der verabreichten MCMV-Dosis eine vollständige Resistenz. Analog zur lokalen Viruskontrolle in Leber und Milz wurden auch im Überleben keine Unterschiede zwischen IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäusen festgestellt, so daß eine spezifische Funktion von IRF3 für die Kontrolle der Viruslast in infizierten Organen und das Überleben bei MCMV-Infektion ausgeschlossen werden kann.

Zur Rolle von Typ I IFN für das Überleben von Mäusen auf C57BL/6 Hintergrund bei MCMV-Infektion liegen bislang keine Daten vor. Zur Auswirkung der IFN $\alpha\beta$ -Rezeptor-Defizienz auf die organbezogenen Virustiter und das Überleben bei MCMV-Infektion wurden bislang nur Daten von Mäusen auf Sv129-Hintergrund publiziert (Presti et al. 1998, Gil et al. 2001). Dieser Mausstamm exprimiert jedoch kein Ly49H und zeigt daher gegenüber MCMV keine virusspezifische Ly49H-vermittelte NK-Zellaktivität. Zur definitiven Abklärung der Bedeutung von Typ I IFN für das Überleben und die organspezifische Viruskontrolle bei MCMV-Infektion in Gegenwart Ly49H-positiver NK-Zellen werden in einer nachfolgenden Arbeit Experimente mit IFN $\alpha\beta$ -Rezeptor^{-/-} Mäusen (IFN $\alpha\beta$ R^{-/-}) auf C57BL/6-Hintergrund durchgeführt, in denen die IFN- α / β -vermittelte Signaltransduktion aufgehoben ist.

Im Gegensatz zu den von Honda et al. (2005) publizierten Daten, die bei der systemischen Infektion mit HSV-1 eine signifikant höhere Mortalität in IRF7^{-/-} Mäusen als in MyD88^{-/-} Mäusen beobachteten, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für IRF7^{-/-} Mäuse bei der systemischen MCMV-Infektion mit verschiedenen Virusdosen einen gering ausgeprägten Phänotyp. Dagegen wurde eine hohe Mortalität von MyD88^{-/-} Mäusen im MCMV-Modell beobachtet (Krug et al. 2004, Tabeta et al. 2004). Das Fehlen von MyD88 oder TLR9 führt neben einer defekten IFN- α -Produktion auch zu einer stark reduzierten IL-12-Bildung und damit zu einer verminderten NK-Zellaktivität, die für die hohe Mortalität der MyD88^{-/-} Mäuse verantwortlich sein und den Unterschied zu IRF7-defizienten Mäusen erklären könnte.

Die Mortalitätsunterschiede zwischen WT Mäusen und IRF7^{-/-} bzw. IRF3/7^{-/-} Mäusen manifestierten sich erst 6 bis 7 Tage nach Infektion. Zu diesem Zeitpunkt ist bereits eine spezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen MCMV nachweisbar (Karrer et al. 2003), die in IRF7^{-/-} Mäusen defekt sein könnte. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, daß IFN- α eine entscheidende Rolle für die spezifische Expansion, das Überleben und die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen im Rahmen einer Virusinfektion spielt (Le Bon et al. 2003, Aichele et al. 2006, Le Bon et al. 2006). Honda et al. (2005) konnten zeigen, daß die durch Immunisierung mit Ovalbumin und CpG-A ausgelöste spezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort in Abwesenheit von IRF7 deutlich schwächer ausfällt. Zur Bedeutung von IFN- α für die Expansion der Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im MCMV-Modell wurden bislang jedoch keine Daten publiziert. Ob der Verlust von IFN- α in IRF7^{-/-} Mäusen zu einer gestörten T-Zellantwort bei der MCMV-Infektion führt und somit Ursache für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen höheren Mortalität gegenüber WT Mäusen ist, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Neben der Induktion von IFN- α / β und IFN- γ führen verschiedene Virusinfektionen auch zur Induktion von IFN- λ (Kotenko et al. 2003, Sheppard et al. 2003, Coccia et al. 2004, Osterlund et al. 2005, Ank et al. 2006), das aufgrund seines spezifischen Rezeptorsystems und seiner antiviralen Wirkung als Typ III IFN klassifiziert wird. Bei systemischer MCMV-Infektion wird IFN- λ in Kolonepithelzellen von infizierten Mäusen induziert (Brand et al. 2005). Antivirale Effekte von IFN- λ *in vivo* wurde in einem intranasalen Infektionsmodell mit IFN- λ exprimierenden Vacciniaviren (Bartlett et al. 2005) sowie bei vaginaler und systemischer Infektion mit HSV-2 gezeigt (Ank et al. 2006). Ausgehend von der hier beobachteten IFN- λ 2-Induktion in MCMV-infizierten GMCSF-DC (Abb. 11 B) und *in vivo* nach MCMV-Infektion wurden Experimente zur Untersuchung des Einflusses von IFN- λ 2 auf die IFN- γ Bildung und organspezifische Viruskontrolle bei der systemischen MCMV-Infektion durchgeführt. Die Vorbehandlung der Mäuse mit IFN- λ 2 führte 48 h nach Infektion zu einer signifikant höheren IFN- γ -Konzentration im Serum im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein ähnlicher Effekt wurde von Ank et al. (2006) bei Infektion mit HSV-2 beobachtet. Trotz der gesteigerten IFN- γ -Konzentration zeigten die MCMV-Titer in Leber und Milz nach IFN- λ 2-Vorbehandlung jedoch keinen Unterschied zur Kontrollgruppe, so daß ein antiviraler Effekt von IFN- λ 2 auf MCMV in diesem experimentellen System nicht nachweisbar war. Im Gegensatz zum IFN-

α - β -Rezeptor wird IFNLR1, die spezifische Untereinheit des IFN- λ -Rezeptors, nicht von allen Zelltypen exprimiert (Uze et al. 2007). *In vitro* ist das Expressionsniveau des IFNLR1 der limitierende Faktor für die Sensitivität von Zelllinien gegenüber IFN- λ und in unstimulierten humanen Monozyten wird IFNLR1 erst durch differenzierungsfördernde Zytokine induziert (Mennechet et al. 2006). Der offenbar je nach Virusinfektion unterschiedliche antivirale Effekt von IFN- λ könnte somit zumindest teilweise auf Unterschiede in der Rezeptorinduktion durch verschiedene Viren zurückzuführen sein.

HCMV ist als Erreger von pränatalen Infektionen und opportunistischen Infektionen bei Immunsuppression (Organ-/Knochenmarktransplantation, AIDS) von großer klinischer Bedeutung. Eine wirkungsvolle medikamentöse Therapie steht zwar zur Verfügung, ist jedoch vor allem bei Langzeitanwendung durch Virusresistenz und ausgeprägte Nebenwirkungen limitiert (Biron et al. 2006). Mit der zellulären Immuntherapie durch adoptiven Transfer HCMV-spezifischer T-Zellen (Moss et al. 2005), existiert ein Behandlungsverfahren, das bislang jedoch noch keine breite Anwendung erfahren hat. Die aktuelle Datenlage erlaubt noch keine eindeutige Positionierung dieses Verfahrens. Die Entwicklung neuer Therapiestrategien und Medikamente erfordert ein umfassendes Verständnis der Virusbiologie und der Immunantwort bei einer HCMV-Infektion, zu dem Studien im MCMV-Modell entscheidend beigetragen haben. Im MCMV-Infektionsmodell wird die unspezifische Immunantwort während der ersten Woche von IFN-produzierenden Zellen und NK-Zellen dominiert. Aufgrund der meist asymptomatisch verlaufenden Primärinfektion wird diese Infektionsphase beim Menschen in der Regel nicht erfaßt. Fallstudien von Patienten mit isolierten NK-Zelldefekten zeigen jedoch eine auffällige Häufung von Herpesvirus-Infektionen, darunter auch HCMV, was eine essentielle Rolle von NK-Zellen für die Immunantwort gegen HCMV nahelegt (Orange et al. 2006).

Die zentrale Bedeutung von Typ I IFN für die antivirale Immunantwort im Menschen zeigt sich am Beispiel von Patienten mit kompletter STAT1-Defizienz. Bei diesen Patienten ist die klassische Typ I IFN-vermittelte Signaltransduktion, die zur Bildung des ISGF3 führt, aufgehoben. Klinisch manifestiert sich dies in rezidivierenden disseminierten HSV-1-Infektionen mit Beginn im Kleinkindalter (Dupuis et al. 2003) Im Zusammenhang mit der antiviralen Immunantwort ist die Rolle von Mustererkennungsrezeptoren und ihren nachgeschalteten Signalproteinen im humanen System noch weitgehend unklar. Selektive Defekte von IRFs,

den zentralen Transkriptionsfaktoren zur Induktion von Typ I IFN, sind bislang nicht bekannt. Mit der Entdeckung der IRAK-4-Defizienz wurde vor wenigen Jahren der erste Immundefekt mit direkter Beteiligung der TLR-Signalwege beschrieben (Picard et al. 2003). Klinisch fallen diese Patienten durch in der frühen Kindheit beginnende rezidivierende Infektionen mit gram-positiven, pyogenen Bakterien auf, wobei *S. pneumoniae* und *S. aureus* die häufigsten Erreger sind. Die spontane Besserung der Infektanfälligkeit mit fortschreitendem Alter deutet auf eine zunehmende Effizienz kompensatorischer Mechanismen des Immunsystems hin (Ku et al. 2005). Gegenüber den meisten anderen Bakterien sowie Viren, Pilzen und Parasiten zeigen Patienten mit IRAK-4-Defizienz eine normale Resistenz. Auf zellulärer Ebene führt IRAK-4-Defizienz zu einem Verlust der TLR7, TLR8 und TLR9-vermittelten Induktion von Typ I IFN und IFN- λ . Hingegen ist die Produktion von IFN- α - β und IFN- λ in mononukleären Leukozyten und Fibroblasten von IRAK-4-defizienten Patienten nach Infektion mit verschiedenen DNA- und RNA-Viren sowie nach Stimulation mit TLR3- und TLR4-Liganden weitgehend normal (Yang et al. 2005). Die normale IFN-Antwort auf virale Stimuli deckt sich klinisch mit dem normalen Verlauf von typischen Virusinfektionen des Kindes- und Erwachsenenalters in Patienten mit IRAK-4-Defekt. Diese Daten legen den Schluß nahe, daß die virusinduzierte systemische IFN-Induktion im Menschen durch IRAK4-unabhängige Signalwege wie z. B. die von RIG-I/Mda-5 bzw. DAI oder anderen unbekanntem zytosolischen DNA-Sensoren vermittelten Signalwege kompensiert werden kann.

Ermutigende Daten liegen bereits zum therapeutischen Einsatz von synthetischen TLR-Liganden bei lokalen Virusinfektionen vor. Im Rahmen der vaginalen Infektion mit HSV-2 wurde in Mäusen durch lokale Vorbehandlung mit dem TLR9-Liganden CpG-Oligodeoxynukleotid (CpG-ODN) 1826 (Ashkar et al. 2003, Shen et al. 2006) und dem TLR3-Liganden Poly I:C (Ashkar et al. 2004) ein protektiver Effekt gegenüber HSV-2 gezeigt. Dieser protektive Effekt ist IFN-abhängig und wird von eingewanderten plasmazytoïden DC vermittelt (Lund et al. 2006, Shen et al. 2006), die im Falle von CpG-ODN 1826 über den TLR9/MyD88-Signalweg aktiviert werden (Shen et al. 2006). Imiquimod, ein synthetischer TLR7-Ligand (Hemmi et al. 2002), wird bereits seit einigen Jahren zur Behandlung der von humane Papillomaviren (HPV)-assoziierten Condylomata acuminata eingesetzt (Edwards et al. 1998, Beutner et al. 1998a + b). Unter der topischen Imiquimodbehandlung ist dabei innerhalb der Hautläsion eine gesteigerte Transkription von Typ I und Typ II IFN sowie von inflammatorischen Zytokinen zu beobachten (Tyring et al. 1998). Jüngere Studien deuten an,

daß TLRs als Zielstrukturen für eine adjuvante Immuntherapie auch bei der HCMV-Infektion eine klinische Bedeutung erlangen könnten. So steigert Pentraxin 3, ein antimikrobielles Polypeptid, bei MCMV-Infektion TLR2/TLR3/TLR4-abhängig die IFN- α , IFN- γ und IL-12-Produktion in myeloiden DC bzw. Splenozyten sowie die antivirale NK-Zell- und T-Zellantwort. Pentraxin 3 hemmt dadurch die MCMV-Infektion und die MCMV-Reaktivierung *in vivo* (Bozza et al. 2006). In einer aktuellen Arbeit von (Bozza et al. 2007) wurde für das immunmodulatorische Peptid Thymosin α 1 ein protektiver Effekt gegenüber MCMV nachgewiesen. Thymosin 1α induziert TLR9/MyD88-abhängig antivirale Zytokine und steigert die IFN- γ -Produktion in NK-Zellen und CD4⁺ T-Zellen. Zusätzlich zu den murinen Daten wurde in einer aktuellen klinischen Studie erstmals ein antiviraler Effekt von Thymosin 1α bei der HCMV-Infektion nach Organtransplantation nachgewiesen (Ji et al. 2007). Diese Ergebnisse deuten einen neuen immuntherapeutischen Ansatz an, der sich als Adjuvans zusätzlich zur konventionellen virostatistischen Therapie etablieren könnte. Eine gezielte pharmakologische Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF7 oder IRF3 durch spezifische synthetische Liganden viraler Erkennungsrezeptoren mit der daraus resultierenden IFN-Induktion könnte einen neuen immuntherapeutischen Ansatz für die Behandlung der CMV-Infektion ergeben.

5. Zusammenfassung

Viruserkennung durch Toll-like Rezeptoren (TLRs) sowie die zytosolischen RNA-bindenden Helikasen *Retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I) und *melanoma differentiation antigen 5* (Mda5) und den zytosolischen DNA-Sensor *DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors* (DAI) führt zur Induktion der antiviral wirksamen Typ I Interferone (IFN). Dabei sind die IFN-regulierenden Faktoren IRF3 und IRF7 die zentralen Transkriptionsfaktoren zur Induktion von Typ I IFN. Bei der systemischen Infektion mit murinem Zytomegalievirus (MCMV) ist eine biphasische Typ I IFN-Antwort zu beobachten, die in den ersten 36 h nach Infektion von dem endosomalen DNA-Erkennungsrezeptor TLR9 abhängig ist und von plasmazytoiden dendritischen Zellen (DC) vermittelt wird. Nach 48 h ist eine TLR9/MyD88-unabhängige Typ I IFN-Produktion zu beobachten. Da in myeloiden DC wie auch in den meisten anderen Zelltypen die TLR-unabhängige IFN-Produktion dominiert, ist eine Beteiligung eines weiteren intrazellulären DNA-Sensors, wie zum Beispiel DAI, naheliegend. Im Gegensatz zur Typ I IFN Induktion in plasmazytoiden DC, die IRF3-unabhängig erfolgt und durch Interaktion von MyD88 mit IRF7 vermittelt ist, ist für die Typ I IFN Induktion durch den dsDNA-bindenden Rezeptor DAI eine direkte Interaktion mit IRF3 notwendig. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war daher, die Funktion von IRF3 und IRF7 für die Typ I IFN Antwort und die Viruskontrolle während der MCMV-Infektion zu untersuchen mit dem Ziel, aus den Ergebnissen Rückschlüsse auf den Beitrag der verschiedenen Viruserkennungs-Rezeptoren und Signalwege zu ziehen.

In der vorliegenden Dissertation wurde die Rolle von IRF3 und IRF7 bei der systemischen MCMV-Infektion im Hinblick auf die antivirale Typ I IFN- und Zytokinantwort, die NK-Zell-Aktivierung, die organspezifische Viruskontrolle und das Überleben untersucht. In Übereinstimmung mit der Literatur wurden die maximalen Serumkonzentrationen von Typ I IFN und inflammatorischen Zytokinen 36 h nach Infektion mit MCMV gemessen und die höchsten Virustiter in infizierten Organen 72 h nach Infektion beobachtet. Die zentralen antiviralen Zytokine in der frühen Immunantwort auf MCMV waren dabei Typ I IFN und IFN- γ . Letzteres wurde zu diesem frühen Zeitpunkt in allen Mausgruppen fast ausschließlich von NK-Zellen produziert.

Beim Vergleich der IRF3^{-/-} Mäuse mit den Wildtyp-Mäusen zeigte sich zunächst, daß IRF3 im MCMV-Infektionsmodell für die Produktion von Typ I IFN und inflammatorischen Zyto-

kinen sowie die lokale Kontrolle der Virusreplikation und das Überleben nicht notwendig ist. Die Beteiligung des DNA-Sensors DAI, für den eine IRF3-abhängige Typ I IFN Induktion *in vitro* gezeigt wurde, ist somit fraglich.

Das Fehlen von IRF7 führte dagegen in MCMV-infizierten IRF7^{-/-} Mäusen zum vollständigen Verlust der IFN- α -Antwort zu frühen und späteren Zeitpunkten nach Infektion. Überraschenderweise wurde in den IRF7^{-/-} Mäusen jedoch eine residuelle, IRF3-unabhängige Produktion von IFN- β beobachtet. Die verbleibende IFN- β Produktion scheint die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen, die durch Typ I IFN entscheidend verstärkt wird, ausreichend zu unterstützen, da keine relevanten Unterschiede in der Zytolysefähigkeit von NK-Zellen aus WT und IRF7^{-/-} Mäusen feststellbar waren. Im Rahmen der frühen Zytokinantwort auf MCMV (36 h nach Infektion) wurde zudem im Serum von IRF7^{-/-} Mäusen eine im Vergleich zu WT Mäusen signifikant höhere IFN- γ und IL-12p70-Produktion gemessen und dies auch auf transkriptioneller Ebene bestätigt. Der Anteil der IFN- γ -produzierenden NK-Zellen war ebenfalls in IRF7-Mäusen signifikant höher als in WT-Mäusen. Die gesteigerte IFN- γ - und IL-12p70-Produktion in IRF7-defizienten Mäusen erklärt sich dadurch, daß Typ I IFN eine dosisabhängige hemmende Wirkung auf die IL-12p70-Produktion ausübt. IL-12p70 wiederum ist im Rahmen der MCMV-Infektion das zentrale Zytokin für die Induktion der IFN- γ -Produktion durch NK-Zellen. Folge der fehlenden IFN- α -Produktion in IRF7^{-/-} Mäusen ist somit eine enthemmte IL-12p70-Sekretion mit konsekutiv gesteigerter IFN- γ -Produktion der NK-Zellen.

Der ausgeprägte Defekt in der Typ I IFN-Antwort in IRF7^{-/-} Mäusen beeinflusste die lokale Viruskontrolle weit weniger als erwartet. IRF7^{-/-} Mäuse zeigten nur in der Milz nicht jedoch in der Leber signifikant höhere Virustiter als WT Mäuse. Dabei erreichten die beobachteten Unterschiede nicht mehr als eine Logstufe. Offensichtlich wird die defekte Typ I IFN Produktion in IRF7-defizienten Mäusen durch die vermehrte IFN- γ Expression der NK-Zellen und eine unbeeinträchtigte zytotoxische Aktivität der NK-Zellen teilweise kompensiert, so daß im Gegensatz zu anderen viralen Infektionsmodellen eine relativ effektive Kontrolle der MCMV-Replikation auch in Abwesenheit von IRF7 möglich ist. Hinsichtlich des Überlebens bei der systemischen MCMV-Infektion war die Mortalität in IRF7^{-/-} und IRF3/7^{-/-} Mäusen signifikant höher als in WT-Mäusen. Dabei fielen diese Unterschiede im Vergleich zu den MCMV-empfindlichen BALB/c Mäusen jedoch deutlich geringer aus und es zeigte sich im direkten Vergleich zwischen BALB/c und IRF3/7^{-/-} Mäusen eine signifikant höhere Mortalität für die

BALB/c Mäuse. Das Fehlen von IRF7 mit dem daraus resultierenden Defekt in der Produktion von Typ I IFN beeinflusst somit das Überleben bei der MCMV-Infektion deutlich weniger als das Fehlen von Ly49H auf NK-Zellen in BALB/c Mäusen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erweitern das Verständnis der Funktion von IRF3 und IRF7 für die Induktion antiviraler Zytokine im Rahmen der frühen angeborenen Immunantwort bei einer akuten systemischen Herpesvirus-Infektion am Beispiel der Infektion mit MCMV. Die Typ I IFN-Antwort wird bei der MCMV-Infektion von IFN- α dominiert, das IRF7-abhängig produziert wird. Entscheidend für das Überleben in der ersten Woche einer MCMV-Infektion ist jedoch eine effektive NK-Zellaktivität, die in diesem Modell weitgehend unabhängig von IFN- α und somit auch von IRF7 ist. Zur Unterstützung der NK-Zellzytotoxizität, bei der Typ I Interferone eine wichtige Rolle spielen, genügen offensichtlich geringe Mengen an IFN- β , die auch in Abwesenheit von IRF7 und IRF3 gebildet werden. Die IFN- γ -Produktion durch NK-Zellen ist in Abwesenheit von IFN- α sogar signifikant gesteigert. Dadurch wird der ausgeprägte Defekt in der Typ I Interferon Produktion in Abwesenheit von IRF7 teilweise kompensiert, so daß das Fehlen von IRF7 zwar zu einer signifikant erhöhten Viruslast und Mortalität führt, die aber deutlich geringer als ursprünglich erwartet ausfällt.

Neue therapeutische Ansätze, die auf einer Aktivierung der unspezifischen antiviralen Immunantwort zum Beispiel durch synthetische Liganden viraler Erkennungsrezeptoren basieren, sollten daher die Auswirkung der Rezeptor-Stimulation auf die verschiedenen Komponenten der zu behandelnden Virusinfektion *in vivo* – Induktion von Typ I IFN und proinflammatorischen Zytokinen, DC-Aktivierung, NK-Zellaktivierung – berücksichtigen, um diese gezielt und mit maximaler Wirkung verstärken zu können. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, daß bei der akuten Infektion mit Zytomegalievirus oder bei der CMV-Reaktivierung im Rahmen einer Immunsuppression insbesondere eine Verstärkung der NK-Zellaktivität therapeutisch wirksam sein könnte.

Literaturverzeichnis

- Abe, T., Hemmi, H., Miyamoto, H., Moriishi, K., Tamura, S., Takaku, H., Akira, S., and Matsuura, Y.** (2005). Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J. Virol.* 79, 2847-2858.
- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S.** (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity.* 9, 143-150.
- Aichele, P., Unsoeld, H., Koschella, M., Schweier, O., Kalinke, U., and Vucikuj, S.** (2006). CD8 T cells specific for lymphocytic choriomeningitis virus require type I IFN receptor for clonal expansion. *J. Immunol.* 176, 4525-4529.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O.** (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Andoniou, C. E., van Dommelen, S. L., Voigt, V., Andrews, D. M., Brizard, G., Asselin-Paturel, C., Delale, T., Stacey, K. J., Trinchieri, G., and gli-Esposti, M. A.** (2005). Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. *Nat. Immunol.* 6, 1011-1019.
- Andrews, D. M., Scalzo, A. A., Yokoyama, W. M., Smyth, M. J., and gli-Esposti, M. A.** (2003). Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. *Nat. Immunol.* 4, 175-181.
- Ank, N., West, H., Bartholdy, C., Eriksson, K., Thomsen, A. R., and Paludan, S. R.** (2006). Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J. Virol.* 80, 4501-4509.
- Arase, H., Mocarski, E. S., Campbell, A. E., Hill, A. B., and Lanier, L. L.** (2002). Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296, 1323-1326.
- Arnheiter, H. and Meier, E.** (1990). Mx proteins: antiviral proteins by chance or by necessity? *New Biol.* 2, 851-857.
- Ashkar, A. A., Bauer, S., Mitchell, W. J., Vieira, J., and Rosenthal, K. L.** (2003). Local delivery of CpG oligodeoxynucleotides induces rapid changes in the genital mucosa and inhibits replication, but not entry, of herpes simplex virus type 2. *J. Virol.* 77, 8948-8956.
- Ashkar, A. A., Yao, X. D., Gill, N., Sajic, D., Patrick, A. J., and Rosenthal, K. L.** (2004). Toll-like receptor (TLR)-3, but not TLR4, agonist protects against genital herpes infection in the absence of inflammation seen with CpG DNA. *J. Infect. Dis.* 190, 1841-1849.
- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, J. J., Briere, F., and Trinchieri, G.** (2003). Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J. Immunol.* 171, 6466-6477.
- Au, W. C., Moore, P. A., Lowther, W., Juang, Y. T., and Pitha, P. M.** (1995). Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 11657-11661.
- Au, W. C., Yeow, W. S., and Pitha, P. M.** (2001). Analysis of functional domains of interferon regulatory factor 7 and its association with IRF-3. *Virology* 280, 273-282.
- Bach, E. A., Aguet, M., and Schreiber, R. D.** (1997). The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 563-591.
- Barchet, W., Krug, A., Cella, M., Newby, C., Fischer, J. A., Dzionek, A., Pekosz, A., and Colonna, M.** (2005). Dendritic cells respond to influenza virus through. *Eur. J. Immunol.* 35, 236-242.
- Barnes, B. J., Kellum, M. J., Field, A. E., and Pitha, P. M.** (2002). Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes. *Mol. Cell Biol.* 22, 5721-5740.
- Barnes, B. J., Moore, P. A., and Pitha, P. M.** (2001). Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. *J. Biol. Chem.* 276, 23382-23390.
- Bartlett, N. W., Buttigieg, K., Kotenko, S. V., and Smith, G. L.** (2005). Murine interferon lambdas (type III interferons) exhibit potent anti-

ral activity in vivo in a poxvirus infection model. *J. Gen. Virol.* 86, 1589-1596.

Beutner, K. R., Spruance, S. L., Hougham, A. J., Fox, T. L., Owens, M. L., and Douglas, J. M., Jr. (1998a). Treatment of genital warts with an immune-response modifier (imiquimod). *J. Am. Acad. Dermatol.* 38, 230-239.

Beutner, K. R., Tying, S. K., Trofatter, K. F., Jr., Douglas, J. M., Jr., Spruance, S., Owens, M. L., Fox, T. L., Hougham, A. J., and Schmitt, K. A. (1998b). Imiquimod, a patient-applied immune-response modifier for treatment of external genital warts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 789-794.

Biron, K. K. (2006). Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* 71, 154-163.

Blasius, A., Vermi, W., Krug, A., Facchetti, F., Cella, M., and Colonna, M. (2004). A cell-surface molecule selectively expressed on murine natural interferon-producing cells that blocks secretion of interferon-alpha. *Blood* 103, 4201-4206.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 749-795.

Bozza, S., Bistoni, F., Gaziano, R., Pitzurra, L., Zelante, T., Bonifazi, P., Perruccio, K., Bellocchio, S., Neri, M., Iorio, A. M., Salvatori, G., De, S. R., Calvitti, M., Doni, A., Garlanda, C., Mantovani, A., and Romani, L. (2006). Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation. *Blood* 108, 3387-3396.

Bozza, S., Gaziano, R., Bonifazi, P., Zelante, T., Pitzurra, L., Montagnoli, C., Moretti, S., Castonari, R., Sinibaldi, P., Rasi, G., Garaci, E., Bistoni, F., and Romani, L. (2007). Thymosin {alpha}1 activates the TLR9/MyD88/IRF7-dependent murine cytomegalovirus sensing for induction of anti-viral responses in vivo. *Int. Immunol.* 19, 1261-1270.

Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., Zitzmann, K., Eichhorst, S. T., Otte, J. M., Diebold, J., Diepolder, H., Adler, B., Auernhammer, C. J., Goke, B., and Dambacher, J. (2005). IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 289, G960-G968.

Brass, A. L., Kehrli, E., Eisenbeis, C. F., Storb, U., and Singh, H. (1996). Pip, a lymphoid-restricted IRF, contains a regulatory domain that is

important for autoinhibition and ternary complex formation with the Ets factor PU.1. *Genes Dev.* 10, 2335-2347.

Brocchieri, L., Kledal, T. N., Karlin, S., and Mocarski, E. S. (2005). Predicting coding potential from genome sequence: application to betaherpesviruses infecting rats and mice. *J. Virol.* 79, 7570-7596.

Brown, M. G., Dokun, A. O., Heusel, J. W., Smith, H. R., Beckman, D. L., Blattenberger, E. A., Dubbelde, C. E., Stone, L. R., Scalzo, A. A., and Yokoyama, W. M. (2001). Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 292, 934-937.

Brown, M. G., Scalzo, A. A., Matsumoto, K., and Yokoyama, W. M. (1997). The natural killer gene complex: a genetic basis for understanding natural killer cell function and innate immunity. *Immunol. Rev.* 155, 53-65.

Bukowski, J. F., Woda, B. A., and Welsh, R. M. (1984). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J. Virol.* 52, 119-128.

Buttmann, M., Berberich-Siebelt, F., Serfling, E., and Rieckmann, P. (2007). Interferon-beta is a potent inducer of interferon regulatory factor-1/2-dependent IP-10/CXCL10 expression in primary human endothelial cells. *J. Vasc. Res.* 44, 51-60.

Caillaud, A., Hovanessian, A. G., Levy, D. E., and Marie, I. J. (2005). Regulatory serine residues mediate phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent activation of interferon regulatory factor 7. *J. Biol. Chem.* 280, 17671-17677.

Coccia, E. M., Severa, M., Giacomini, E., Monneron, D., Remoli, M. E., Julkunen, I., Cella, M., Lande, R., and Uze, G. (2004). Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 796-805.

Cousens, L. P., Orange, J. S., Su, H. C., and Biron, C. A. (1997). Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 634-639.

Dalod, M., Hamilton, T., Salomon, R., Salazar-Mather, T. P., Henry, S. C., Hamilton, J. D., and Biron, C. A. (2003). Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation

by interferon alpha/beta. *J. Exp. Med.* 197, 885-898.

Dalod, M., Salazar-Mather, T. P., Malmgaard, L., Lewis, C., Sselin-Paturel, C., Briere, F., Trinchieri, G., and Biron, C. A. (2002). Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J. Exp. Med.* 195, 517-528.

Daniels, K. A., Devora, G., Lai, W. C., O'Donnell, C. L., Bennett, M., and Welsh, R. M. (2001). Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J. Exp. Med.* 194, 29-44.

Dao, T., Mehal, W. Z., and Crispe, I. N. (1998). IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells. *J. Immunol.* 161, 2217-2222.

Delale, T., Paquin, A., Sselin-Paturel, C., Dalod, M., Brizard, G., Bates, E. E., Kastner, P., Chan, S., Akira, S., Vicari, A., Biron, C. A., Trinchieri, G., and Briere, F. (2005). MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN-alpha release and initiation of immune responses in vivo. *J. Immunol.* 175, 6723-6732.

Dokun, A. O., Kim, S., Smith, H. R., Kang, H. S., Chu, D. T., and Yokoyama, W. M. (2001). Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat. Immunol.* 2, 951-956.

Dudziak, D., Kamphorst, A. O., Heidkamp, G. F., Buchholz, V. R., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H. W., Park, C. G., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315, 107-111.

Dumoutier, L., Tounsi, A., Michiels, T., Sommereyns, C., Kotenko, S. V., and Renauld, J. C. (2004). Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 32269-32274.

Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I. Z., Al-Jumaah, S., Yang, K., Chapgier, A., Eidenschenk, C., Eid, P., Al, G. A., Tufenkeji, H., Frayha, H., Al-Gazlan, S., Al-Rayes, H., Schreiber, R. D., Gresser, I., and Casanova, J. L. (2003). Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat. Genet.* 33, 388-391.

Dzionic, A., Inagaki, Y., Okawa, K., Nagafune, J., Rock, J., Sohma, Y., Winkels, G., Zysk, M., Yamaguchi, Y., and Schmitz, J. (2002). Plas-

macytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum. Immunol.* 63, 1133-1148.

Edwards, L., Ferenczy, A., Eron, L., Baker, D., Owens, M. L., Fox, T. L., Hougham, A. J., and Schmitt, K. A. (1998). Self-administered topical 5% imiquimod cream for external anogenital warts. HPV Study Group. Human PapillomaVirus. *Arch. Dermatol.* 134, 25-30.

Eroshkin, A. and Mushegian, A. (1999). Conserved transactivation domain shared by interferon regulatory factors and Smad morphogens. *J. Mol. Med.* 77, 403-405.

Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M., and Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 491-496.

Garcia-Sastre, A. and Biron, C. A. (2006). Type I interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science* 312, 879-882.

Gautier, G., Humbert, M., Deauevieu, F., Scuiller, M., Hiscott, J., Bates, E. E., Trinchieri, G., Caux, C., and 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.

Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., Wong, W., Kamen, R., Tracey, D., and Allen, H. (1997). Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* 386, 619-623.

Gil, M. P., Bohn, E., O'Guin, A. K., Ramana, C. V., Levine, B., Stark, G. R., Virgin, H. W., and Schreiber, R. D. (2001). Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 6680-6685.

Gracie, J. A., Robertson, S. E., and McInnes, I. B. (2003). Interleukin-18. *J. Leukoc. Biol.* 73, 213-224.

Granucci, F., Zanoni, I., Pavelka, N., van Domelen, S. L., Andoniou, C. E., Belardelli, F., gli Esposti, M. A., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2004). A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. *J. Exp. Med.* 200, 287-295.

- Greenlund, A. C., Schreiber, R. D., Goeddel, D. V., and Pennica, D.** (1993). Interferon-gamma induces receptor dimerization in solution and on cells. *J. Biol. Chem.* 268, 18103-18110.
- Grundy, J. E., Trapman, J., Allan, J. E., Shellam, G. R., and Melief, C. J.** (1982). Evidence for a protective role of interferon in resistance to murine cytomegalovirus and its control by non-H-2-linked genes. *Infect. Immun.* 37, 143-150.
- Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., Ku, G., Hsiao, K., Fleming, M. A., Hayashi, N., Higashino, K., Okamura, H., Nakanishi, K., Kurimoto, M., Tanimoto, T., Flavell, R. A., Sato, V., Harding, M. W., Livingston, D. J., and Su, M. S.** (1997). Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* 275, 206-209.
- Hacker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L. C., Wang, G. G., Kamps, M. P., Raz, E., Wagner, H., Hacker, G., Mann, M., and Karin, M.** (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439, 204-207.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S.** (2002). Small antiviral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 3, 196-200.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., and Akira, S.** (2004). The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J. Exp. Med.* 199, 1641-1650.
- Hochrein, H., O'Keeffe, M., Luft, T., Vandenaabeele, S., Grumont, R. J., Maraskovsky, E., and Shortman, K.** (2000). Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 192, 823-833.
- Honda, K. and Taniguchi, T.** (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 644-658.
- Honda, K., Yanai, H., Mizutani, T., Negishi, H., Shimada, N., Suzuki, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yeh, W. C., and Taniguchi, T.** (2004). Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15416-15421.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., and Taniguchi, T.** (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772-777.
- Hoshino, K., Sugiyama, T., Matsumoto, M., Tanaka, T., Saito, M., Hemmi, H., Ohara, O., Akira, S., and Kaisho, T.** (2006). IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature* 440, 949-953.
- Hoshino, K., Tsutsui, H., Kawai, T., Takeda, K., Nakanishi, K., Takeda, Y., and Akira, S.** (1999). Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. *J. Immunol.* 162, 5041-5044.
- Hudson, J. B.** (1988). Further studies on the mechanism of centrifugal enhancement of cytomegalovirus infectivity. *J. Virol. Methods* 19, 97-108.
- Igarashi, K., Garotta, G., Ozmen, L., Ziemiecki, A., Wilks, A. F., Harpur, A. G., Larner, A. C., and Finbloom, D. S.** (1994). Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 14333-14336.
- Ishii, K. J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., Sato, S., Yamamoto, M., Uematsu, S., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S.** (2006). A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat. Immunol.* 7, 40-48.
- Izaguirre, A., Barnes, B. J., Amrute, S., Yeow, W. S., Megjugorac, N., Dai, J., Feng, D., Chung, E., Pitha, P. M., and Fitzgerald-Bocarsly, P.** (2003). Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 74, 1125-1138.
- Jedema, I., van der Werff, N. M., Barge, R. M., Willemze, R., and Falkenburg, J. H.** (2004). New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population. *Blood* 103, 2677-2682.
- Ji, S. M., Li, L. S., Sun, Q. Q., Chen, J. S., Sha, G. Z., and Liu, Z. H.** (2007). Immunoregulation of thymosin alpha 1 treatment of cytomegalovirus

infection accompanied with acute respiratory distress syndrome after renal transplantation. *Transplant. Proc.* 39, 115-119.

Jordan, W. J., Eskdale, J., Srinivas, S., Pekarek, V., Kelner, D., Rodia, M., and Gallagher, G. (2007). Human interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29) modulates the Th1/Th2 response. *Genes Immun.*

Kanakaraj, P., Ngo, K., Wu, Y., Angulo, A., Ghazal, P., Harris, C. A., Siekierka, J. J., Peterson, P. A., and Fung-Leung, W. P. (1999). Defective interleukin (IL)-18-mediated natural killer and T helper cell type 1 responses in IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-deficient mice. *J. Exp. Med.* 189, 1129-1138.

Kaplan, M. H., Sun, Y. L., Hoey, T., and Grusby, M. J. (1996). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382, 174-177.

Karrer, U., Sierro, S., Wagner, M., Oxenius, A., Hengel, H., Koszinowski, U. H., Phillips, R. E., and Klenerman, P. (2003). Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8+ T cells over time. *J. Immunol.* 170, 2022-2029.

Karupiah, G., Xie, Q. W., Buller, R. M., Nathan, C., Duarte, C., and MacMicking, J. D. (1993). Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* 261, 1445-1448.

Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*. 23, 19-28.

Katzenstein, D. A., Yu, G. S., and Jordan, M. C. (1983). Lethal infection with murine cytomegalovirus after early viral replication in the spleen. *J. Infect. Dis.* 148, 406-411.

Kawai, T. and Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* 7, 131-137.

Kawai, T. and Akira, S. (2007). Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J. Biochem. (Tokyo)* 141, 137-145.

Kawai, T., Sato, S., Ishii, K. J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., Uematsu, S., Takeuchi, O., and Akira, S. (2004). Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct inter-

action of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat. Immunol.* 5, 1061-1068.

Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* 6, 981-988.

Kerkmann, M., Rothenfusser, S., Hornung, V., Towarowski, A., Wagner, M., Sarris, A., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2003). Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 170, 4465-4474.

Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170, 827-845.

Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N. K., Langer, J. A., Sheikh, F., Dickensheets, H., and Donnelly, R. P. (2003). IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4, 69-77.

Krmpotic, A., Bubic, I., Polic, B., Lucin, P., and Jonjic, S. (2003). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes. Infect.* 5, 1263-1277.

Krug, A., French, A. R., Barchet, W., Fischer, J. A., Dzionek, A., Pingel, J. T., Orihuela, M. M., Akira, S., Yokoyama, W. M., and Colonna, M. (2004). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity*. 21, 107-119.

Krug, A., Veeraswamy, R., Pekosz, A., Kanagawa, O., Unanue, E. R., Colonna, M., and Cella, M. (2003). Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *J. Exp. Med.* 197, 899-906.

Ku, C. L., Yang, K., Bustamante, J., Puel, A., von, B. H., Santos, O. F., Lawrence, T., Chang, H. H., Al-Mousa, H., Picard, C., and Casanova, J. L. (2005). Inherited disorders of human Toll-like receptor signaling: immunological implications. *Immunol. Rev.* 203, 10-20.

- Kumar, K. P., McBride, K. M., Weaver, B. K., Dingwall, C., and Reich, N. C.** (2000). Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1. *Mol. Cell Biol.* 20, 4159-4168.
- Le, Bon, A., Durand, V., Kamphuis, E., Thompson, C., Bulfone-Paus, S., Rossmann, C., Kallinke, U., and Tough, D. F.** (2006). Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming. *J. Immunol.* 176, 4682-4689.
- Le, Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D. F.** (2003). Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.* 4, 1009-1015.
- Lecoeur, H., Fevrier, M., Garcia, S., Riviere, Y., and Gougeon, M. L.** (2001). A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 253, 177-187.
- Lederer, J. A., Perez, V. L., DesRoches, L., Kim, S. M., Abbas, A. K., and Lichtman, A. H.** (1996). Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation. *J. Exp. Med.* 184, 397-406.
- Lee, C. K., Rao, D. T., Gertner, R., Gimeno, R., Frey, A. B., and Levy, D. E.** (2000). Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function. *J. Immunol.* 165, 3571-3577.
- Lee, S. H., Girard, S., Macina, D., Busa, M., Zafer, A., Belouchi, A., Gros, P., and Vidal, S. M.** (2001). Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nat. Genet.* 28, 42-45.
- Lin, R., Heylbroeck, C., Genin, P., Pitha, P. M., and Hiscott, J.** (1999a). Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription. *Mol. Cell Biol.* 19, 959-966.
- Lin, R., Mamane, Y., and Hiscott, J.** (1999b). Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol. Cell Biol.* 19, 2465-2474.
- Lin, R., Mamane, Y., and Hiscott, J.** (2000). Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection. *J. Biol. Chem.* 275, 34320-34327.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Loh, J., Chu, D. T., O'Guin, A. K., Yokoyama, W. M., and Virgin, H. W.** (2005). Natural killer cells utilize both perforin and gamma interferon to regulate murine cytomegalovirus infection in the spleen and liver. *J. Virol.* 79, 661-667.
- Lucin, P., Jonjic, S., Messerle, M., Polic, B., Hengel, H., and Koszinowski, U. H.** (1994). Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon-gamma and tumour necrosis factor. *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 1), 101-110.
- Lucin, P., Pavic, I., Polic, B., Jonjic, S., and Koszinowski, U. H.** (1992). Gamma interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *J. Virol.* 66, 1977-1984.
- Lund, J. M., Linehan, M. M., Iijima, N., and Iwasaki, A.** (2006). Cutting Edge: Plasmacytoid dendritic cells provide innate immune protection against mucosal viral infection in situ. *J. Immunol.* 177, 7510-7514.
- Mamane, Y., Heylbroeck, C., Genin, P., Algarte, M., Servant, M. J., LePage, C., DeLuca, C., Kwon, H., Lin, R., and Hiscott, J.** (1999). Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* 237, 1-14.
- Marcello, T., Grakoui, A., Barba-Spaeth, G., Machlin, E. S., Kotenko, S. V., MacDonald, M. R., and Rice, C. M.** (2006). Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* 131, 1887-1898.
- Marie, I., Smith, E., Prakash, A., and Levy, D. E.** (2000). Phosphorylation-induced dimerization of interferon regulatory factor 7 unmasks DNA binding and a bipartite transactivation domain. *Mol. Cell Biol.* 20, 8803-8814.
- Matsumoto, S., Tsuji-Takayama, K., Aizawa, Y., Koide, K., Takeuchi, M., Ohta, T., and Kurimoto, M.** (1997). Interleukin-18 activates NF-kappaB in murine T helper type 1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 454-457.
- McRae, B. L., Semnani, R. T., Hayes, M. P., and van Seventer, G. A.** (1998). Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. *J. Immunol.* 160, 4298-4304.

- McWhirter, S. M., Fitzgerald, K. A., Rosains, J., Rowe, D. C., Golenbock, D. T., and Maniatis, T.** (2004). IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 233-238.
- Meager, A., Visvalingam, K., Dilger, P., Bryan, D., and Wadhwa, M.** (2005). Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons. *Cytokine* 31, 109-118.
- Melchjorsen, J., Siren, J., Julkunen, I., Paludan, S. R., and Matikainen, S.** (2006). Induction of cytokine expression by herpes simplex virus in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells is dependent on virus replication and is counteracted by ICP27 targeting NF-kappaB and IRF-3. *J. Gen. Virol.* 87, 1099-1108.
- Mennechet, F. J. and Uze, G.** (2006). Interferon-lambda-treated dendritic cells specifically induce proliferation of FOXP3-expressing suppressor T cells. *Blood* 107, 4417-4423.
- Micallef, M. J., Ohtsuki, T., Kohno, K., Tanabe, F., Ushio, S., Namba, M., Tanimoto, T., Torigoe, K., Fujii, M., Ikeda, M., Fukuda, S., and Kurimoto, M.** (1996). Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur. J. Immunol.* 26, 1647-1651.
- Monteiro, J. M., Harvey, C., and Trinchieri, G.** (1998). Role of interleukin-12 in primary influenza virus infection. *J. Virol.* 72, 4825-4831.
- Mori, M., Yoneyama, M., Ito, T., Takahashi, K., Inagaki, F., and Fujita, T.** (2004). Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J. Biol. Chem.* 279, 9698-9702.
- Moss, P. and Rickinson, A.** (2005). Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 9-20.
- Nagai, T., Devergne, O., Mueller, T. F., Perkins, D. L., van Seventer, J. M., and van Seventer, G. A.** (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.
- Nakahira, M., Ahn, H. J., Park, W. R., Gao, P., Tomura, M., Park, C. S., Hamaoka, T., Ohta, T., Kurimoto, M., and Fujiwara, H.** (2002). Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1. *J. Immunol.* 168, 1146-1153.
- Nakaya, T., Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Suemori, H., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T.** (2001). Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 1150-1156.
- Negishi, H., Fujita, Y., Yanai, H., Sakaguchi, S., Ouyang, X., Shinohara, M., Takayanagi, H., Ohba, Y., Taniguchi, T., and Honda, K.** (2006). Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 15136-15141.
- Nguyen, H., Hiscott, J., and Pitha, P. M.** (1997). The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8, 293-312.
- Nguyen, K. B., Cousens, L. P., Doughty, L. A., Pien, G. C., Durbin, J. E., and Biron, C. A.** (2000). Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nat. Immunol.* 1, 70-76.
- Noda, S., Tanaka, K., Sawamura, S., Sasaki, M., Matsumoto, T., Mikami, K., Aiba, Y., Hasegawa, H., Kawabe, N., and Koga, Y.** (2001). Role of nitric oxide synthase type 2 in acute infection with murine cytomegalovirus. *J. Immunol.* 166, 3533-3541.
- Oganesyan, G., Saha, S. K., Guo, B., He, J. Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A., and Cheng, G.** (2006). Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439, 208-211.
- Onoguchi, K., Yoneyama, M., Takemura, A., Akira, S., Taniguchi, T., Namiki, H., and Fujita, T.** (2007). Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J. Biol. Chem.* 282, 7576-7581.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F., and Kastelein, R. A.** (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 13, 715-725.

- Orange, J. S.** (2006). Human natural killer cell deficiencies. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 6, 399-409.
- Orange, J. S. and Biron, C. A.** (1996a). An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J. Immunol.* 156, 1138-1142.
- Orange, J. S. and Biron, C. A.** (1996b). Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* 156, 4746-4756.
- Orange, J. S., Wang, B., Terhorst, C., and Biron, C. A.** (1995). Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J. Exp. Med.* 182, 1045-1056.
- Osterlund, P., Veckman, V., Siren, J., Klucher, K. M., Hiscott, J., Matikainen, S., and Julkunen, I.** (2005). Gene expression and antiviral activity of alpha/beta interferons and interleukin-29 in virus-infected human myeloid dendritic cells. *J. Virol.* 79, 9608-9617.
- Pavlovic, J., Schroder, A., Blank, A., Pitossi, F., and Staeheli, P.** (1993). Mx proteins: GTPases involved in the interferon-induced antiviral state. *Ciba Found. Symp.* 176, 233-243.
- Pestka, S., Kotenko, S. V., Muthukumar, G., Izotova, L. S., Cook, J. R., and Garotta, G.** (1997). The interferon gamma (IFN-gamma) receptor: a paradigm for the multichain cytokine receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8, 189-206.
- Pflanz, S., Timans, J. C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Wagner, J. L., To, W., Zurawski, S., McClanahan, T. K., Gorman, D. M., Bazan, J. F., de Waal, M. R., Rennick, D., and Kastelein, R. A.** (2002). IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity.* 16, 779-790.
- Picard, C., Puel, A., Bonnet, M., Ku, C. L., Bustamante, J., Yang, K., Soudais, C., Dupuis, S., Feinberg, J., Fieschi, C., Elbim, C., Hitchcock, R., Lammas, D., Davies, G., Al-Ghonaim, A., Al-Rayes, H., Al-Jumaah, S., Al-Hajjar, S., Al-Mohsen, I. Z., Frayha, H. H., Rucker, R., Hawn, T. R., Aderem, A., Tufenkeji, H., Hara-guchi, S., Day, N. K., Good, R. A., Gougerot-Pocidallo, M. A., Ozinsky, A., and Casanova, J. L.** (2003). Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 299, 2076-2079.
- Pien, G. C., Satoskar, A. R., Takeda, K., Akira, S., and Biron, C. A.** (2000). Cutting edge: selective IL-18 requirements for induction of compartmental IFN-gamma responses during viral infection. *J. Immunol.* 165, 4787-4791.
- Platanias, L. C.** (2005). Introduction: interferon signals: what is classical and what is nonclassical? *J. Interferon Cytokine Res.* 25, 732.
- Presky, D. H., Yang, H., Minetti, L. J., Chua, A. O., Nabavi, N., Wu, C. Y., Gately, M. K., and Gubler, U.** (1996). A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 14002-14007.
- Presti, R. M., Pollock, J. L., Dal Canto, A. J., O'Guin, A. K., and Virgin, H. W.** (1998). Interferon gamma regulates acute and latent murine cytomegalovirus infection and chronic disease of the great vessels. *J. Exp. Med.* 188, 577-588.
- Rawlinson, W. D., Farrell, H. E., and Barrell, B. G.** (1996). Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 70, 8833-8849.
- Robek, M. D., Boyd, B. S., and Chisari, F. V.** (2005). Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *J. Virol.* 79, 3851-3854.
- Ruzek, M. C., Miller, A. H., Opal, S. M., Pearce, B. D., and Biron, C. A.** (1997). Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *J. Exp. Med.* 185, 1185-1192.
- Sakaguchi, S., Negishi, H., Asagiri, M., Nakajima, C., Mizutani, T., Takaoka, A., Honda, K., and Taniguchi, T.** (2003). Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 860-866.
- Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Nakaya, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N.** (1998). Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett.* 441, 106-110.
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T.**

- (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α / β gene induction. *Immunity*. 13, 539-548.
- Scalzo, A. A.** (2002). Successful control of viruses by NK cells--a balance of opposing forces? *Trends Microbiol.* 10, 470-474.
- Schiavoni, G., Mattei, F., Sestili, P., Borghi, P., Venditti, M., Morse, H. C., III, Belardelli, F., and Gabriele, L.** (2002). ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8 α (+) dendritic cells. *J. Exp. Med.* 196, 1415-1425.
- Schmitz, F., Heit, A., Guggemoos, S., Krug, A., Mages, J., Schiemann, M., Adler, H., Drexler, I., Haas, T., Lang, R., and Wagner, H.** (2007). Interferon-regulatory-factor 1 controls Toll-like receptor 9-mediated IFN- β production in myeloid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 315-327.
- Schnorrer, P., Behrens, G. M., Wilson, N. S., Pooley, J. L., Smith, C. M., El-Sukkari, D., Davey, G., Kupresanin, F., Li, M., Maraskovsky, E., Belz, G. T., Carbone, F. R., Shortman, K., Heath, W. R., and Villadangos, J. A.** (2006). The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 10729-10734.
- Servant, M. J., Grandvaux, N., tenOever, B. R., Duguay, D., Lin, R., and Hiscott, J.** (2003). Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA. *J. Biol. Chem.* 278, 9441-9447.
- Shanley, J. D., Biczak, L., and Forman, S. J.** (1993). Acute murine cytomegalovirus infection induces lethal hepatitis. *J. Infect. Dis.* 167, 264-269.
- Sharma, S., tenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R., and Hiscott, J.** (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300, 1148-1151.
- Shen, H. and Iwasaki, A.** (2006). A crucial role for plasmacytoid dendritic cells in antiviral protection by CpG ODN-based vaginal microbicide. *J. Clin. Invest* 116, 2237-2243.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T. E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., Ostrander, C., Dong, D., Shin, J., Presnell, S., Fox, B., Haldeman, B., Cooper, E., Taft, D., Gilbert, T., Grant, F. J., Tackett, M., Krivan, W., McKnight, G., Clegg, C., Foster, D., and Klucher, K. M.** (2003). IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* 4, 63-68.
- Shinohara, M. L., Lu, L., Bu, J., Werneck, M. B., Kobayashi, K. S., Glimcher, L. H., and Cantor, H.** (2006). Osteopontin expression is essential for interferon- α production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Immunol.* 7, 498-506.
- Smith, H. R., Heusel, J. W., Mehta, I. K., Kim, S., Dorner, B. G., Naidenko, O. V., Iizuka, K., Furukawa, H., Beckman, D. L., Pingel, J. T., Scalzo, A. A., Fremont, D. H., and Yokoyama, W. M.** (2002). Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 8826-8831.
- Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H., and Schreiber, R. D.** (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227-264.
- Stetson, D. B. and Medzhitov, R.** (2006a). Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity*. 24, 93-103.
- Stetson, D. B. and Medzhitov, R.** (2006b). Type I interferons in host defense. *Immunity*. 25, 373-381.
- Suhara, W., Yoneyama, M., Iwamura, T., Yoshimura, S., Tamura, K., Namiki, H., Aimoto, S., and Fujita, T.** (2000). Analyses of virus-induced homomeric and heteromeric protein associations between IRF-3 and coactivator CBP/p300. *J. Biochem. (Tokyo)* 128, 301-307.
- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., and Beutler, B.** (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 3516-3521.
- Taylor, P., Tamura, T., Kong, H. J., Kubota, T., Kubota, M., Borghi, P., Gabriele, L., and Ozato, K.** (2007). The Feedback Phase of Type I Interferon Induction in Dendritic Cells Requires Interferon Regulatory Factor 8. *Immunity*.
- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M. K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y., and Taniguchi, T.** (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501-505.

- Takaoka, A. and Yanai, H.** (2006). Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol.* 8, 907-922.
- Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T. W., and Taniguchi, T.** (2005). Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434, 243-249.
- Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki, T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., Wagner, E. F., and Taniguchi, T.** (2002). RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 416, 744-749.
- Tamura, T., Taylor, P., Yamaoka, K., Kong, H. J., Tsujimura, H., O'Shea, J. J., Singh, H., and Ozato, K.** (2005). IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity. *J. Immunol.* 174, 2573-2581.
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., and Tanaka, N.** (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 623-655.
- Tay, C. H. and Welsh, R. M.** (1997). Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J. Virol.* 71, 267-275.
- tenOever, B. R., Sharma, S., Zou, W., Sun, Q., Grandvaux, N., Julkunen, I., Hemmi, H., Yamamoto, M., Akira, S., Yeh, W. C., Lin, R., and Hiscott, J.** (2004). Activation of TBK1 and IKKvarepsilon kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity. *J. Virol.* 78, 10636-10649.
- Thierfelder, W. E., van Deursen, J. M., Yamamoto, K., Tripp, R. A., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Sangster, M. Y., Vignali, D. A., Doherty, P. C., Grosveld, G. C., and Ihle, J. N.** (1996). Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382, 171-174.
- Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Kobayashi, S., Taniai, M., Kunikata, T., Murakami, T., Sanou, O., Kojima, H., Fujii, M., Ohta, T., Ikeda, M., Ikegami, H., and Kurimoto, M.** (1997). Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 25737-25742.
- Trinchieri, G.** (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 133-146.
- Tyring, S. K., Arany, I., Stanley, M. A., Tomai, M. A., Miller, R. L., Smith, M. H., McDermott, D. J., and Slade, H. B.** (1998). A randomized, controlled, molecular study of condylomata acuminata clearance during treatment with imiquimod. *J. Infect. Dis.* 178, 551-555.
- Uematsu, S., Sato, S., Yamamoto, M., Hirotsu, T., Kato, H., Takeshita, F., Matsuda, M., Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S.** (2005). Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction. *J. Exp. Med.* 201, 915-923.
- Uze, G. and Monneron, D.** (2007). IL-28 and IL-29: Newcomers to the interferon family. *Biochimie.*
- van Dommelen, S. L., Tabarias, H. A., Smyth, M. J., and gli-Esposti, M. A.** (2003). Activation of natural killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells. *J. Virol.* 77, 1877-1884.
- Welsh, R. M., O'Donnell, C. L., and Shultz, L. D.** (1994). Antiviral activity of NK 1.1+ natural killer cells in C57BL/6 scid mice infected with murine cytomegalovirus. *Nat. Immun.* 13, 239-245.
- Yanai, H., Chen, H. M., Inuzuka, T., Kondo, S., Mak, T. W., Takaoka, A., Honda, K., and Taniguchi, T.** (2007). Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 3402-3407.
- Yang, H., Lin, C. H., Ma, G., Baffi, M. O., and Wathélet, M. G.** (2003). Interferon regulatory factor-7 synergizes with other transcription factors through multiple interactions with p300/CBP coactivators. *J. Biol. Chem.* 278, 15495-15504.
- Yang, K., Puel, A., Zhang, S., Eidenschenk, C., Ku, C. L., Casrouge, A., Picard, C., von, B. H., Senechal, B., Plancoulaine, S., Al-Hajjar, S., Al-Ghonaïm, A., Marodi, L., Davidson, D., Speert, D., Roifman, C., Garty, B. Z., Ozinsky, A., Barrat, F. J., Coffman, R. L., Miller, R. L., Li, X., Lebon, P., Rodriguez-Gallego, C., Chapel, H., Geissmann, F., Jouanguy, E., and Casanova, J. L.** (2005). Human TLR-7-, -8-, and -9-mediated induction of IFN- α /beta and - λ is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. *Immunity.* 23, 465-478.

Yokoyama, W. M. and Scalzo, A. A. (2002). Natural killer cell activation receptors in innate immunity to infection. *Microbes. Infect.* 4, 1513-1521.

Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E., and Fujita, T. (1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J.* 17, 1087-1095.

Yoshida, A., Koide, Y., Uchijima, M., and Yoshida, T. O. (1994). IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 857-861.

Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S., and Nakanishi, K. (1998). IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J. Immunol.* 161, 3400-3407.

Buchbeiträge:

Hirsch, M. S. (2005). Cytomegalovirus and Human Herpesvirus Types 6, 7, and 8. In: Kasper, D. L., Braunwald, E., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L. eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 16th Edition, Volume I. McGraw-Hill. New York, Chicago, Toronto. ISBN 0-07-139141-X. pp 1040-1053.

Rasmussen, R. (2001): Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, and Nakagawara, K, eds. *Rapid Cycle Realtime PCR, Methods and Applications* Springer Press, Heidelberg. ISBN 3-540-66736-9. pp 21-34

Eigene Publikationen

Steinberg C⁺, Eisenächer K⁺, Gross O, Reindl W, Schmitz F, Ruland J, Krug A (2009*). The IRF7-dependent type I IFN response is not essential for early resistance against MCMV infection.

*zur Veröffentlichung im European Journal of Immunology angenommen (01/2009)

⁺contributed equally

Savarese E, **Steinberg C**, Pawar RD, Reindl W, Akira S, Anders HJ, Krug A (2008). Requirement of toll-like receptor 7 for pristane-induced production of autoantibodies and development of murine lupus nephritis.

Arthritis Rheum. Mar 27, 58(4): 1107-1115

Gross O, Grupp C, **Steinberg C**, Zimmermann S, Strasser D, Hanneschlager N, Reindl W, Jonsson H, Huo H, Littman DR, Peschel C, Yokoyama WM, Krug A, Ruland J (2008). Multiple ITAM-coupled NK cell receptors engage the Bcl10/Malt1 complex via Carma1 for NF- κ B and MAPK activation to selectively control cytokine production.

Blood. Jan 11. [Epub ahead of print]

Eisenächer K⁺, **Steinberg C⁺**, Reindl W, Krug A. (2007). The role of viral nucleic acid recognition in dendritic cells for innate and adaptive antiviral immunity.

Immunobiology. 212(9-10):701-14. Review.

⁺contributed equally

Danksagung

Bei Frau PD Dr. Anne Krug bedanke ich mich ganz ausdrücklich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Überlassung des spannenden Themas. Bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. Krug auch für die intensive Betreuung beim Erstellen dieser Arbeit und für die geduldige und sehr engagierte Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten sowie ihre stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und das Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Mit Ihrer Begeisterungsfähigkeit für Wissenschaft hat sie auch bei mir nachhaltiges Interesse für wissenschaftliches Arbeiten und insbesondere für die Immunologie geweckt.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Wolfgang Reindl, der meine Arbeit ebenfalls mitbetreut hat, mir bei methodischen Schwierigkeiten oder inhaltlichen Fragen wertvolle Anregungen gegeben hat und stets ein offenes Ohr für auftretende Probleme hatte.

Herrn Dr. Olaf Groß aus der III. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts d. Isar danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Radioaktivarbeiten zum ^{51}Cr -Release-Assay.

Herrn Dr. Frank Schmitz aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der TU München danke ich für die Bereitstellung von IRF1-/- Mäusen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Tadatsugo Taniguchi und Dr. Kenya Honda, Institut für Immunologie der Medizinischen Fakultät der Universität Tokio, für die freundliche Bereitstellung der IRF3-/- und IRF7-/- Mäuse.

Bei den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe (Wibke Ballhorn, Katharina Eisenächer, Bernadette Grohs, Emina Savarese) bedanke ich mich für das kollegiale Arbeitsklima und die Hilfe bei der Einweisung in die grundlegenden Techniken der Laborarbeit.

Ein großer Dank gilt meiner Freundin für die Geduld, die sie über die gesamte Zeit dieser Doktorarbeit aufgebracht hat, und die liebevolle Unterstützung aus der Ferne.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten und mein Interesse und meine Neugierde für ganz verschiedene Bereiche stets gefördert haben. Ihnen beiden und meiner Schwester danke ich ganz ausdrücklich für die aufmunternden Worte in den schwierigen Phasen dieser Arbeit.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Christian Markus Steinberg
Geburtsdatum: 15.01.1979
Geburtsort: Bonn-Duisdorf
Famlienstand: ledig

SCHULAUSBILDUNG & ZIVILDIENTST

1985 - 1989 Katholische Gemeinschaftsgrundschule St.-Josef Bonn-Beuel
1989 - 1998 Kardinal-Frings-Gymnasium Bonn-Beuel
Abschluß: Abitur
1998 - 1999 Zivildienst (Johanniterkrankenhaus Bonn)

HOCHSCHULAUSBILDUNG

1999 - 2005 Medizinstudium in Bonn, Lausanne, München
2005 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Arzt

PROMOTION

2005 - 2007 Medizinische Doktorarbeit bei Frau PD Dr. Anne Krug
II. Medizinische Klinik – Klinikum rechts d. Isar – TU München
Direktor: Prof. Dr. Roland M. Schmid
Thema: Funktion von IRF3 und IRF7 im Infektionsmodell mit murinem Zytomegalievirus

Sherbrooke, 10.05.2008

Christian Steinberg