

**JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT  
FRANKFURT AM MAIN**

**ZUR ROLLE DER TYP I INTERFERONE IN DER  
ABWEHR VON VIRALEN INFEKTIONEN DES  
ZENTRALEN NERVENSYSTEMS**

**VON**

**CLAUDIA N. DETJE**

**Zur Rolle der Typ I Interferone in der Abwehr von viralen  
Infektionen des zentralen Nervensystems**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaft

vorgelegt beim Fachbereich

Chemie, Biochemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Claudia N. Detje

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2007

(D30)

Die Untersuchungen der vorliegenden Doktorarbeit wurden von April 2004 bis Juli 2007 im Arbeitskreis Immunologie von Dr. Ulrich Kalinke am Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe in Langen durchgeführt.

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. Robert Tampé

2. Gutachter: Prof. Dr. Johannes Löwer

Datum der Disputation: 22. November 2007

Meiner Mutter

# 1 INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>                                                    | <b>5</b>  |
| <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>                                                          | <b>10</b> |
| <b>1 EINLEITUNG .....</b>                                                             | <b>12</b> |
| <b>1.1 Virusinfektionen und Antivirale Mechanismen des Immunsystems .....</b>         | <b>12</b> |
| <b>1.2 Das zentrale Nervensystem .....</b>                                            | <b>19</b> |
| <b>1.3 Immunologische Vorgänge im zentralen Nervensystem .....</b>                    | <b>22</b> |
| 1.3.1 Viraler Neurotropismus und Eintrittsstellen in das zentrale Nervensystem.....   | 24        |
| 1.3.2 Antivirale Mechanismen im ZNS und virusinduzierte neuronale Schäden im ZNS..... | 26        |
| <b>1.4 Typ I Interferone im zentralen Nervensystem .....</b>                          | <b>29</b> |
| <b>2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>                                                 | <b>31</b> |
| <b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>                                                  | <b>33</b> |
| <b>3.1 Materialien .....</b>                                                          | <b>33</b> |
| 3.1.1 Geräte.....                                                                     | 33        |
| 3.1.2 Verbrauchsmittel und sonstige Materialien.....                                  | 36        |
| 3.1.3 Chemikalien, Lösungsmittel und Fertigpuffer .....                               | 39        |
| 3.1.4 Medien und Medienzusätze .....                                                  | 44        |
| 3.1.5 Enzyme .....                                                                    | 44        |
| 3.1.6 Restriktionsenzyme.....                                                         | 45        |
| 3.1.7 Kits .....                                                                      | 45        |
| 3.1.8 Oligonukleotide .....                                                           | 46        |
| 3.1.9 Antikörper.....                                                                 | 47        |
| 3.1.10 Zelllinien.....                                                                | 47        |
| 3.1.11 Mauslinien .....                                                               | 48        |
| 3.1.12 Virusstamm.....                                                                | 48        |
| 3.1.13 Puffer, Stocklösungen und Medien.....                                          | 48        |
| <b>3.2 Methoden.....</b>                                                              | <b>55</b> |

|          |                                                                 |    |
|----------|-----------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1    | Molekularbiologische Methoden .....                             | 55 |
| 3.2.1.1  | Fällung von Nukleinsäure .....                                  | 55 |
| 3.2.1.2  | Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen ..... | 55 |
| 3.2.1.3  | Präparation von genomischer DNA .....                           | 56 |
| 3.2.1.4  | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....                           | 57 |
| 3.2.1.5  | Restriktionsverdau von DNA .....                                | 58 |
| 3.2.1.6  | Agarose-Gelelektrophorese .....                                 | 58 |
| 3.2.1.7  | Radioaktiver Southern Blot .....                                | 59 |
| 3.2.1.8  | Radioaktive Markierung der Southern Blot-Sonde .....            | 60 |
| 3.2.1.9  | Entfernung der Southern Blot Sonde .....                        | 60 |
| 3.2.1.10 | <i>Elektrophoretic Gel Mobility Shift Assay (EMSA)</i> .....    | 60 |
| 3.2.2    | Zellkulturtechniken .....                                       | 61 |
| 3.2.2.1  | Arbeiten mit Zellkulturen .....                                 | 61 |
| 3.2.2.2  | Kulturbedingungen für eukaryontische Zellen .....               | 62 |
| 3.2.2.3  | Passagieren von Zellen .....                                    | 62 |
| 3.2.2.4  | Einfrieren von Zellen .....                                     | 62 |
| 3.2.2.5  | Lagerung von Zellen .....                                       | 63 |
| 3.2.2.6  | Auftauen von Zellen .....                                       | 63 |
| 3.2.2.7  | Zellzahlbestimmung .....                                        | 63 |
| 3.2.3    | Tierexperimentelle Techniken .....                              | 64 |
| 3.2.3.1  | Maushaltung .....                                               | 64 |
| 3.2.3.2  | Mauszucht und –screening .....                                  | 64 |
| 3.2.3.3  | Mausnarkose .....                                               | 64 |
| 3.2.3.4  | Maustötung .....                                                | 65 |
| 3.2.3.5  | Retroorbitale Blutentnahme .....                                | 65 |
| 3.2.3.6  | Virusinfektion von Mäusen .....                                 | 65 |
| 3.2.3.7  | Perfusion .....                                                 | 66 |
| 3.2.4    | Histologische Techniken .....                                   | 66 |
| 3.2.5    | Immunologische und virologische Techniken .....                 | 66 |
| 3.2.5.1  | Anzucht von Vesikulärem Stomatitis Virus .....                  | 66 |
| 3.2.5.2  | VSV-Neutralisationstest .....                                   | 67 |
| 3.2.5.3  | Bestimmung von Virustitern (Plaque-Assay) .....                 | 67 |
| 3.2.5.4  | Durchflusszytometrie .....                                      | 68 |
| 3.2.5.5  | Antikörperfärbung von Zellen .....                              | 69 |
| 3.2.5.6  | Western Blot .....                                              | 69 |
| 3.2.5.7  | Entfernung der Antikörperbindung vom Western Blot .....         | 70 |
| 3.2.5.8  | Herstellung von Hirnhomogenaten für ELISA .....                 | 70 |
| 3.2.5.9  | Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....                 | 70 |
| 3.2.5.10 | Fraktionierte Zellextraktion .....                              | 71 |

|            |                                                                                                                                                                                 |            |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4</b>   | <b>ERGEBNISSE</b> .....                                                                                                                                                         | <b>72</b>  |
| <b>4.1</b> | <b>Ein neues Mausmodell zum Studium der Rolle der Typ I Interferone im zentralen Nervensystem</b> .....                                                                         | <b>72</b>  |
| 4.1.1      | Generierung und Charakterisierung einer gentechnisch veränderten Mauslinie mit einer gewebespezifischen Deletion des Typ I Interferonrezeptors im zentralen Nervensystems ..... | 72         |
| 4.1.1.1    | Charakterisierung der NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Maus über Southern Blot Analyse .....                                                                    | 77         |
| 4.1.1.2    | Charakterisierung der NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Maus über PCR.....                                                                                       | 78         |
| 4.1.1.3    | Genotypisierung der NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Mäuse.....                                                                                                 | 80         |
| <b>4.2</b> | <b>VSV-Infektionen von NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen</b> .....                                                                                           | <b>81</b>  |
| 4.2.1      | NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Mäuse zeigen nach intranasaler Infektion mit VSV einen veränderten Krankheitsverlauf.....                                      | 81         |
| 4.2.2      | NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Mäuse zeigen erhöhte Virustiter im zentralen Nervensystem aber nicht in den peripheren Organen .....                           | 83         |
| 4.2.3      | VSV infizierte NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Mäuse zeigen wie C57BL/6 Mäuse systemische Interferontiter .....                                                | 84         |
| 4.2.4      | VSV infizierte NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Mäuse zeigen normale Antikörperantworten.....                                                                   | 88         |
| 4.2.5      | NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Mäuse unterscheiden sich nach Infektion mit VSV von Wildtyp Mäusen in der T-Zell-infiltration .....                            | 90         |
| 4.2.6      | Zytotoxische T-Zellen spielen keine direkte Rolle in der Pathogenese von VSV .....                                                                                              | 92         |
| 4.2.7      | Virusvermehrung ist in VSV infizierten C57BL/6 Mäusen auf das Riechhirn beschränkt.....                                                                                         | 93         |
| 4.2.8      | NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Mäuse zeigen nach intravenöser VSV-Infektion den gleichen Krankheitsverlauf wie nach intranasaler Infektion.....               | 96         |
| <b>5</b>   | <b>DISKUSSION</b> .....                                                                                                                                                         | <b>98</b>  |
| <b>5.1</b> | <b>NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse zeigen spezifische IFNAR-Deletion im zentralen Nervensystem</b> .....                                                    | <b>98</b>  |
| <b>5.2</b> | <b>NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer Infektion mit Vesikulärem Stomatitis Virus</b> .....                    | <b>100</b> |
| <b>5.3</b> | <b>NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse zeigen in der Peripherie ähnliche Typ I IFN Titer wie C57BL/6 Mäuse</b> .....                                            | <b>102</b> |
| <b>5.4</b> | <b>Die Lymphozyten-Infiltration Korrespondiert mit der Ausbreitung von VSV innerhalb des ZNS</b> .....                                                                          | <b>104</b> |

|            |                                                                                                      |            |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>5.5</b> | <b>IFN-abhängige Mechanismen verhindern die Ausbreitung neurotroper Viren innerhalb des ZNS.....</b> | <b>106</b> |
| <b>6</b>   | <b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>                                                                     | <b>112</b> |
| <b>7</b>   | <b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>                                                     | <b>127</b> |
| <b>7.1</b> | <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                                                                   | <b>127</b> |
| <b>7.2</b> | <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                                                                     | <b>128</b> |
|            | <b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>                                                               | <b>I</b>   |
|            | <b>DANKSAGUNG.....</b>                                                                               | <b>II</b>  |
|            | <b>VORTRÄGE, POSTERBEITRÄGE UND PUBLIKATIONEN.....</b>                                               | <b>IV</b>  |
|            | <b>Vorträge.....</b>                                                                                 | <b>IV</b>  |
|            | <b>Posterbeiträge .....</b>                                                                          | <b>IV</b>  |
|            | <b>Publikationen .....</b>                                                                           | <b>IV</b>  |
|            | <b>LEBENS LAUF.....</b>                                                                              | <b>V</b>   |



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                    |                                            |
|--------------------|--------------------------------------------|
| 2'5'-OAS           | 2'5'-Oligoadenylatsynthase                 |
| Abb.               | Abbildung                                  |
| abs.               | absolut                                    |
| AIDS               | <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> |
| APC                | antigenpräsentierende Zelle                |
| BHK                | <i>Baby Hamster Kidney Cells</i>           |
| bp                 | Basenpaar                                  |
| BSA                | Bovines Serumalbumin                       |
| CD                 | <i>Cluster of Differentiation</i>          |
| Cre                | <i>Causes Recombination</i>                |
| d.h.               | das heißt                                  |
| dCTP               | 2'Desoxycytosin-5'-triphosphat             |
| ddH <sub>2</sub> O | doppeltdestiliertes Wasser                 |
| DEPC               | Diethylpyrocarbonat                        |
| DMSO               | Dimethylsulfoxid                           |
| DNA                | Desoxyribonukleinsäure                     |
| DNase              | Desoxyribonuklease                         |
| dNTP               | 2'Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat       |
| DTT                | Dithiothreitol                             |
| EAE                | experimentelle Autoimmunencephalomyelitis  |

---

|             |                                                      |
|-------------|------------------------------------------------------|
| ECL         | <i>Enhanced Chemoluminescence</i>                    |
| EDTA        | Ethylendiamintetraessigsäure                         |
| EGTA        | 2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure |
| ELISA       | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>             |
| EMSA        | <i>Electrophoretic Gel Mobility Shift Assay</i>      |
| FACS        | <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>           |
| FCS         | Fetales Kälberserum                                  |
| flox        | <i>Flanked by loxP</i>                               |
| g           | Gramm                                                |
| g           | Erdbeschleunigung                                    |
| GAPDH       | Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase              |
| h           | Stunde                                               |
| H & E       | Hämatoxylin-Eosin                                    |
| HCMV        | Humanes Cytomegalievirus                             |
| HEPES       | [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure   |
| HRP         | Meerrettich-Peroxidase                               |
| HSV         | <i>Herpes simplex Virus</i>                          |
| <i>i.n.</i> | intranasal                                           |
| <i>i.p.</i> | intraperitoneal                                      |
| <i>i.v.</i> | intravenös                                           |
| IFN         | Interferon                                           |
| IFNAR       | Typ I Interferonrezeptor                             |
| IFNGR       | Interferon- $\gamma$ -Rezeptor                       |

---

|      |                                       |
|------|---------------------------------------|
| IgA  | Immunglobulin A                       |
| IgD  | Immunglobulin D                       |
| IgE  | Immunglobulin E                       |
| IgG  | Immunglobulin G                       |
| IgM  | Immunglobulin M                       |
| IL   | Interleukin                           |
| iNOS | induzierbare Stickstoffoxidsynthetase |
| IRF  | <i>Interferon Responds Factor</i>     |
| J    | Joule                                 |
| Jak  | Janus Tyrosinkinase                   |
| k    | kilo-                                 |
| k.A. | keine Angaben                         |
| kb   | Kilobasenpaar                         |
| LCMV | Lymphozytäres Choriomeningitisvirus   |
| lox  | <i>Locus of Crossingover</i>          |
| Lsg. | Lösung                                |
| LSR  | <i>Life Science Research</i>          |
| m    | milli-                                |
| μ    | micro-                                |
| MEM  | <i>Minimal Essential Medium</i>       |
| MHC  | Haupthistokompatibilitätskomplexe     |
| MHV  | Maushepatitisvirus                    |
| MMTV | Maus-Mammatumovirus                   |

---

|           |                                                                      |
|-----------|----------------------------------------------------------------------|
| MOI       | <i>Multiplicity of Infection</i>                                     |
| n         | nano-                                                                |
| ND        | <i>Not Detected</i>                                                  |
| NesCre    | Nestin-Cre                                                           |
| NK Zellen | natürliche Killerzellen                                              |
| NOD       | <i>Nucleotide Binding Oligomerization Domain</i>                     |
| OMP       | <i>Olfactory Marker Protein</i>                                      |
| ORN       | olfaktorische Rezeptorneuronen                                       |
| p         | piko-                                                                |
| p.a.      | <i>pro analysi</i>                                                   |
| PAMP      | <i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>                         |
| PBS       | Phosphat gepufferte Salzlösung                                       |
| PCR       | Polymerasekettenreaktion                                             |
| pDC       | plasmacytoide dendritische Zelle                                     |
| PEI       | Paul-Ehrlich-Institut                                                |
| PFA       | Paraformaldehyd                                                      |
| pfu       | <i>Plaque Forming Unit</i>                                           |
| PMSF      | Phenylmethylsulfonylfluorid                                          |
| Poly-dIdC | Polydesoxyinosidphosphat-Desoxycytidinphosphat                       |
| PRR       | <i>Pattern Recognition Receptor</i>                                  |
| ®         | registrierte Schutzmarke                                             |
| RANTES    | <i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i> |
| RIG       | <i>Retinoic-Acid-Inducible Gene</i>                                  |

---

|            |                                                           |
|------------|-----------------------------------------------------------|
| RNA        | Ribonukleinsäure                                          |
| RSV        | Respiratorisches Synzytial-Virus                          |
| RT         | Reverse Transkriptase                                     |
| s.o.       | siehe oben                                                |
| SDS        | Natriumdodecylsulfat                                      |
| SOCS1      | <i>Suppressor of Cytokine Signaling 1</i>                 |
| SPF        | spezifisch pathogenfrei                                   |
| STAT       | <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> |
| ™          | <i>trade mark</i>                                         |
| TBE        | Tris-Borat-EDTA-Puffer                                    |
| TE         | Tris-EDTA                                                 |
| TEMED      | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin                        |
| tGPT-mucin | Glycosylphosphatidylinositolmucin                         |
| TK         | Thymidinkinase                                            |
| TLR        | Toll-ähnliche Rezeptoren                                  |
| TMB        | Tetramethylbenzidin                                       |
| TMEV       | Theiler Murines Encephalomyelitis Virus                   |
| Tris       | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                           |
| vergl.     | vergleiche                                                |
| VSV        | Vesikuläres Stomatitis Virus                              |
| WT         | Wildtyp                                                   |
| z.B.       | zum Beispiel                                              |
| ZNS        | zentrales Nervensystem                                    |

## ZUSAMMENFASSUNG

Das zentrale Nervensystem (ZNS) bildet eine einzigartige Umgebung für Immunantworten, da Neuronen eine essentielle und in weiten Teilen nicht-erneuerbare Zellpopulation bilden. Virale Infektionen des ZNS und lokale anti-virale Immunantworten können zu dem Verlust von Neuronen und somit zu katastrophalen Erkrankungen führen. Unter normalen Bedingungen ist das ZNS weitgehend von der Kontrolle durch das Immunsystem ausgeschlossen. In diesem Zusammenhang wurde das ZNS oft auch als „immunprivilegiert“ bezeichnet. Dieses Konzept musste in den letzten Jahren revidiert werden, da es sich gezeigt hat, dass das ZNS nicht völlig vom Immungeschehen isoliert ist.

Wichtige Mediatoren antiviraler Immunantworten sind die Typ I Interferone (IFN). Die verschiedenen Typ I IFN binden an einen gemeinsamen Rezeptor, den Typ I Interferonrezeptor (IFNAR). Die Bedeutung von Typ I IFN Antworten für die Kontrolle viraler Infektionen wurde besonders eindrucksvoll mit IFNAR-defizienten Mäusen (IFNAR<sup>-/-</sup>) gezeigt. Nach Infektion mit dem neurotrophen Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) führt das Fehlen des IFNAR zu einer stark erhöhten Empfänglichkeit für tödlich verlaufende Infektionen. In allen Organen und besonders im ZNS von VSV infizierten IFNAR<sup>-/-</sup> Tieren fanden sich stark erhöhte Virusmengen.

Um zu untersuchen, ob die VSV-Infektion des zentralen Nervensystems in IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen in erster Linie auf ein Versagen der peripheren Immunität oder des IFN-Systems innerhalb des ZNS zurückzuführen ist, wurden mittels der Cre loxP Technologie Mäuse hergestellt, die auf allen peripheren Zellen IFNAR exprimieren, während die Neuronen des ZNS IFNAR defizient sind (NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flx/flx</sup>).

Nach intranasaler VSV Infektion zeigten NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flx/flx</sup> Mäuse zunächst keine Krankheitssymptome. Nach 5 bis 6 Tagen traten aber aufsteigende und halbseitige Lähmungen auf, so dass die infizierten Tiere verstärkt im Kreis liefen und schließlich verstarben. Im Vergleich dazu verstarben IFNAR<sup>-/-</sup> Mäuse bereits nach 2 bis 3 Tagen während normale C57BL/6 Tiere nach Infektion keine Symptome zeigten und

überlebten. Der beobachtete Krankheitsverlauf lässt in den IFNAR<sup>-/-</sup> Mäuse auf ein Multiorganversagen als Todesursache schließen. 3 und 6 Tage nach Infektion konnte in den Organen von C57BL/6 Tieren kein Virus reisoliert werden. In den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Tieren fanden sich zum Todeszeitpunkt nur im Gehirn Viruspartikel, während alle anderen Organe virusfrei waren. Die Virustiter im Hirn waren im Vergleich zu den IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen 10- bis 100-fach erhöht. In den anderen Organen und im Blut sind keine Viruspartikel nachweisbar. Dieser Befund deutete gemeinsam mit den beobachteten Krankheitsverläufen auf eine neuropathologische Symptomatik hin, bei der es wahrscheinlich zu einer VSV-Infektion des Hirnstammes kam.

Die Analyse einzelner Regionen des ZNS zeigte in IFNAR<sup>-/-</sup> Tieren, dass 2 Tage nach Infektion in allen Regionen des ZNS signifikante Virusmengen zu finden waren. In den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> und den C57BL/6 Tieren fanden sich zu diesem Zeitpunkt nur im Riechhirn (*Bulbus olfactorius*) signifikante Virustiter. In den C57BL/6 Tieren blieb das Virus auf diese Region beschränkt und wurde dort innerhalb von 6 Tagen eliminiert. In den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Tieren kam es in den folgenden Tagen jedoch zu einer fortschreitenden Infektion des ZNS, und auch das Großhirn, das Kleinhirn, der Hirnstamm und das Rückenmark zeigten hohe Virustiter.

In der Induktion peripherer Immunantworten unterschieden sich NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> und C57BL/6 Mäuse nicht. In den WT Tieren kam es im Gegensatz zu den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> und IFNAR<sup>-/-</sup> Tieren innerhalb von 48 Stunden nach Infektion im Riechhirn zu einer Typ I IFN abhängigen Phosphorylierung von STAT-1, einer Komponente des IFNAR-Signaltransduktionsweges. Alles deutet darauf hin, dass die Induktion geringer Mengen Typ I IFN innerhalb des Riechhirns notwendig ist, um Immunantworten zu aktivieren, die ein Übergreifen der Virusinfektion auf andere Regionen des ZNS verhindern.

Eine funktionierende Immunität in der Peripherie und die Blut-Hirn-Schranke scheinen nicht ausreichend zu sein, um eine Infektion des ZNS mit VSV zu verhindern. Stattdessen muss es zur Aktivierung von IFN-abhängigen Mechanismen innerhalb des *Riechhirns* kommen, die ein Übergreifen der VSV Infektion auf andere Hirnregionen verhindert und zur Elimination von VSV im Riechhirn beiträgt.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 VIRUSINFEKTIONEN UND ANTIVIRALE MECHANISMEN DES IMMUNSYSTEMS

Infektionskrankheiten werden in der Regel von Erregern aus den Gruppen der Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten verursacht. Viele verschiedene Infektionskrankheiten können das Überleben des Menschen bedrohen. In unseren Breiten sind Infektionen durch Viren und Bakterien von großer Bedeutung, wobei nach Entdeckung der Antibiotika die Gefährdung durch bakterielle Infektionen zunächst abgenommen hatte. Heute stellen Infektionen mit multiresistenten Bakterien, die zurzeit insbesondere in Krankenhäusern vermehrt auftreten, ein ernst zu nehmendes Problem dar.

Unter den Virusinfektionen finden sich Erkrankungen wie ein harmloser Schnupfen, viele Kinderkrankheiten wie Masern, Mumps und Röteln, die Grippe (Influenza), AIDS oder die virale Hepatitis. Einige Viren sind so verbreitet, dass man von einer fast vollständigen Durchseuchung der Bevölkerung sprechen kann. So sind je nach Alter bis zu 100% der deutschen Bevölkerung mit dem *Herpes simplex* Virus infiziert (Liedtke et al., 1993).

Viele Viren zeigen einen Neurotropismus, d.h. sie sind in der Lage bevorzugt neuronale Gewebe zu infizieren. Aber nur in seltenen Fällen kommt es nach einer peripheren Infektion mit einem neurotrophen Virus tatsächlich zu einer Infektion des zentralen Nervensystems (ZNS) und somit zu einer Meningitis oder gar Enzephalitis. Zu den weit verbreiteten neurotrophen Viren gehört unter anderem das oft fälschlicherweise als harmlos geltende Masernvirus (*Morbilli Virus*). In den meisten Fällen verläuft eine Maserninfektion komplikationslos. Bemerkenswerter Weise kommt es bei 50% der Maserninfektionen zu enzephalografisch messbaren Leitungsstörungen im ZNS, die sich z.B. durch erhöhte Lichtempfindlichkeit der Patienten klinisch manifestieren und in der Regel ohne weitere Folgen bleiben. In einem von tausend Fällen kommt es aber zu einer Masernenzephalitis, die meist tödlich verläuft (Hänninen et al., 1980).

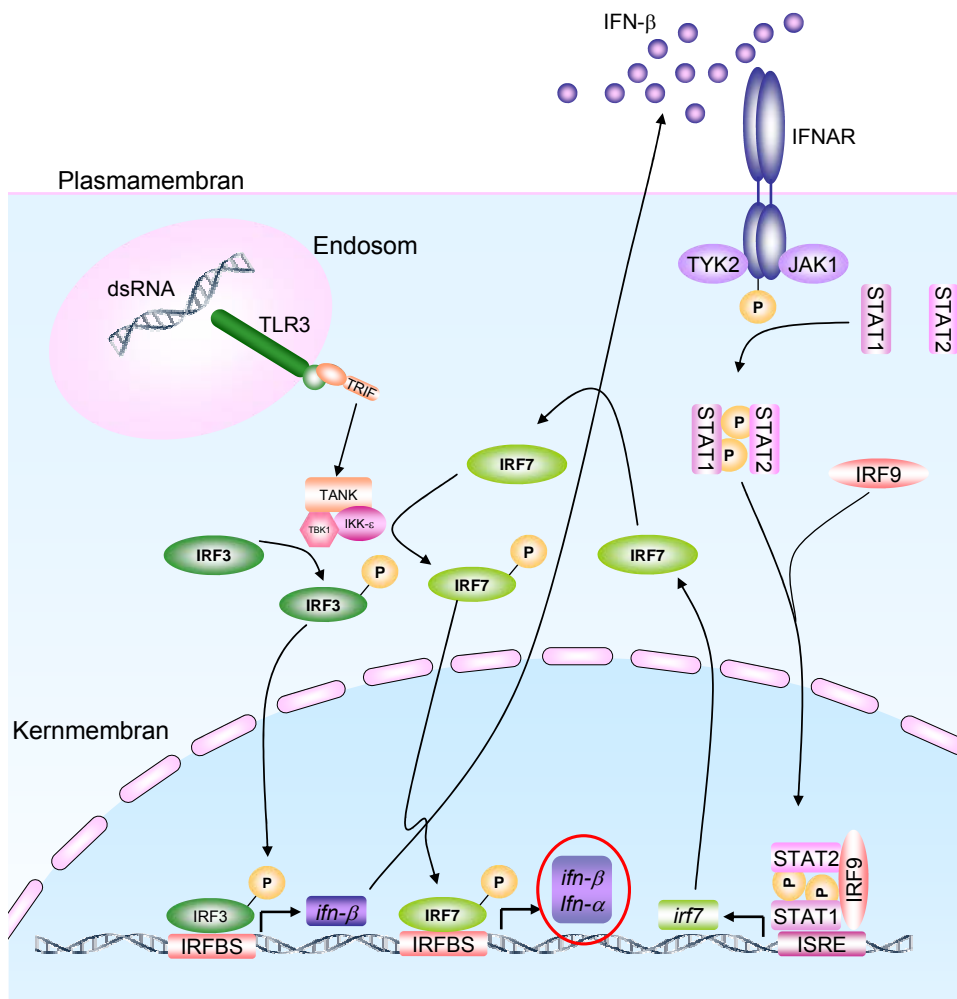


Um eine virale Infektion zu bekämpfen, muss das Immunsystem wahrnehmen, dass eine gefährliche Virusinfektion vorliegt. Dies geschieht in der Regel über Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP – *Pathogen Associated Molecular Pattern*), die von genetisch determinierten Rezeptoren, den *Pathogen Recognition Receptors* (PRR), erkannt werden. Typische PAMPs sind Lipopolysaccharid (LPS) aus den Zellwänden Gram-negativer Bakterien, oder virale einzel- und doppelsträngige RNA und prokaryontische DNA. Zu den PRR gehören die auf der Zelloberfläche oder auf extrazellulären Kompartimenten exprimierte Toll-ähnliche Rezeptoren, die intrazellulären NOD-ähnlichen Rezeptoren (*Nucleotide Binding Oligomerization Domain*) und die RIG-ähnlichen Helikasen (*Retinoic-Acid-Inducible Protein*). Die Erkennung von PAMPs durch PRRs führt über unterschiedliche Signalwege zur Aktivierung von Zellen der angeborenen Immunität. Zu den am besten charakterisierten Vertretern der PRRs gehören die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) (*Tabelle 2.1*). TLR1 bis 7 und 9 kommen sowohl in der Maus als auch im Menschen vor. TLR8 und 10 ist nur im Menschen funktional und TLR11 bis 13 wurden nur in der Maus nachgewiesen (Akira und Takeda, 2004; Beutler, 2003).

Tabelle 2.1: Liganden der Toll-ähnlichen Rezeptoren (nach Akira et al., 2006)

|                             | Spezies                         | Stimulierter TLR |
|-----------------------------|---------------------------------|------------------|
| <b>Bakterien</b>            |                                 |                  |
| LPS                         | Gram-negative Bakterien         | TLR4             |
| Diacyllipopeptide           | Mycoplasmen                     | TLR6/TLR2        |
| Triacyllipopeptide          | Bakterien und Mycobakterien     | TLR1/TLR2        |
| Lipoteichonsäure            | Gruppe B <i>Streptococcus</i>   | TLR6/TLR2        |
| Peptidoglycan               | Gram-positive Bakterien         | TLR2             |
| Porine                      | <i>Neisseria</i>                | TLR2             |
| Lipoarabinomannan           | Mycobakterien                   | TLR2             |
| Flagellin                   | Bakterien mit Flagellen         | TLR5             |
| CpG-DNA                     | Bakterien und Mycobakterien     | TLR9             |
| ??                          | Uropathogene Bakterien          | TLR11            |
| <b>Pilze</b>                |                                 |                  |
| Zyosan                      | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | TLR6/TLR2        |
| Phospholipomannan           | <i>Candida albicans</i>         | TLR2             |
| Mannan                      | <i>Candida albicans</i>         | TLR4             |
| Glucuronoxylomannan         | <i>Cryptococcus neoformans</i>  | TLR2 und TLR4    |
| <b>Parasiten</b>            |                                 |                  |
| tGPI-mutin                  | Trypanosoma                     | TLR2             |
| Glycoinositolphospholipide  | Trypanosoma                     | TLR4             |
| Hemozoin                    | Plasmodium                      | TLR9             |
| Profillin-ähnliche Moleküle | <i>Toxoplasma gondii</i>        | TLR11            |
| <b>Viren</b>                |                                 |                  |
| DNA                         | Viren                           | TLR9             |
| Doppelstrang RNA            | Viren                           | TLR3             |
| Einzelstrang RNA            | RNA-Viren                       | TLR7 und TLR8    |
| Hüllproteine                | RSV, MMTV                       | TLR4             |
| Hämagglutininprotein        | Mobilivirus                     | TLR2             |
| ??                          | HCMV, HSV1                      | TLR2             |
| <b>Wirt</b>                 |                                 |                  |
| Hsp60/70                    |                                 | TLR4             |
| Fibrinogen                  |                                 | TLR4             |

Die Aktivierung von TLRs kann unter anderem zur Ausschüttung von Typ I Interferonen (IFN) führen. Ein möglicher Mechanismus zur Aktivierung der IFN-Produktion über TLRs ist in **Abb. 2.1** am Beispiel von TLR3 gezeigt. Über Aktivierung von TLR3 kommt es zur schnellen Aktivierung von IRF3 (*Interferon Regulatory Factor*), das in den Zellkern transloziert und dort die Expression von IFN- $\beta$  aktiviert. IFN- $\beta$  wird sekretiert und bindet para- und autokrin an den Typ I Interferonrezeptor (*Feedback loop*). Über den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg kommt es letztlich zur Expression von IRF7, das wiederum durch TLR-aktivierte Faktoren phosphoryliert wird und die Expression von IFN- $\alpha$  und weiterem IFN- $\beta$  initiiert (Akira et al., 2006; Decker et al., 2005).



**Abb. 2.1: Induktion der Expression von IFN- $\alpha/\beta$  nach TLR-Aktivierung.** Typ I Interferone werden nach TLR-Aktivierung durch ein Zusammenspiel des TLR-Signaltransduktionsweges und des IFN *Feedback loops* induziert.

Nach einer Infektion wird zunächst die angeborene Immunität aktiviert, die schnell aber Antigen-unspezifisch, agiert. Ein initialer Schritt bei der Aktivierung der angeborenen Immunität ist die Induktion von Typ I IFN. Bei Typ I IFN handelt es sich um eine Gruppe von immunologischen Botenstoffen, die Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK Zellen) und das Komplementsystem aktivieren. Sie wurden 1957 bei Studien zur Virusinterferenz als ein von Zellen gebildetes Agens entdeckt, das mit der Virusvermehrung interferiert (Isaacs und Lindenmann, 1957). Man unterscheidet heute auf Grund ihrer Primärsequenz zwei Familien von Interferonen: IFN- $\alpha/\beta/\omega$  (Typ I IFN) und IFN- $\gamma$  (Typ II IFN) (Chen et al., 2004; Pestka et al., 2004). IFN- $\alpha/\beta/\omega$  binden an einen gemeinsamen Rezeptor, den Typ I Interferonrezeptor (IFNAR), während IFN- $\gamma$  an einen davon unabhängigen Rezeptor, den Interferon- $\gamma$  -Rezeptor (IFNGR) bindet. Typ I IFN gehört zu den Klasse II Zytokinen, die als gemeinsames Strukturmerkmal fünf  $\alpha$ -Helices aufweisen. Die Typ I IFN werden von einer Multigenfamilie kodiert. In der Maus finden sich mindestens 11 IFN- $\alpha$  Isoformen und ein IFN- $\beta$ . IFN- $\alpha$  agiert als Monomer, wohingegen IFN- $\beta$  wahrscheinlich als Homodimer wirkt (Samuel, 2001).

Der gemeinsame IFNAR ist ein Heterodimer aus der IFNAR-1 und der IFNAR-2 Untereinheit und gehört somit zu den Klasse II Zytokinrezeptoren (Lutfalla et al., 1992; Lutfalla und Uze, 1994; Kotenko und Langer, 2004). Beide Untereinheiten partizipieren an der Ligandenbindung und der intrazellulären Signaltransduktion. Die IFNAR-1 Untereinheit hat im Vergleich zu IFNAR-2 nur eine geringe Bindungsaffinität zu Interferonen. Durch Dimerisierung mit IFNAR-1 verstärkt sich die Affinität von IFNAR-2 zu den Interferonen um ein Vielfaches. Die IFNAR-2 Kette existiert in verschiedenen Spleißvarianten und spielt in der differenzierten Signalbildung eine Rolle (Cutrone und Langer, 1997). Die Signaltransduktion wird über die Phosphorylierung von IFNAR-1 vermittelt (Constantinescu et al., 1995). Die Wichtigkeit der IFNAR-1 Kette in der IFN vermittelten Signaltransduktion wurde dramatisch durch die Generierung von IFNAR-1 Knockoutmäusen (IFNAR<sup>-/-</sup>) gezeigt. Mäuse ohne IFNAR-1 Kette zeigen eine stark erhöhte Sensitivität für Infektionen mit dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV). So läuft in IFNAR<sup>-/-</sup> Tieren eine Infektion mit nur wenigen Viruspartikeln tödlich, während Wildtyp-Tiere eine Infektion mit bis zu  $10^8$  Viruspartikel überleben (Müller et al., 1994; van den Broek et al., 1995).

In der Zellkultur sind praktisch alle Zellen in der Lage, nach Virusinfektionen Typ I IFN zu exprimieren. Ein spezieller Typ dendritischer Zellen, die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC), sind darauf spezialisiert nach verschiedenen Virusinfektionen besonders große Mengen an Typ I Interferon zu produzieren (Barchet et al., 2002; Fitzgerald-Bocarsly, 2002; Colonna et al., 2004; Colonna et al., 2004). Typ I IFN kann die Synthese von über 300 zellulären Proteinen modulieren (de Veer et al., 2001). Als proinflammatorische Zytokine sind die Interferone zur Initiierung antiviraler und antibakterieller Aktivitäten wichtig. So vermindern sie die Virusvermehrung indem sie z.B. über die 2'5'-Oligoadenylatsynthase (2'5'-OAS) die virale Proteinsynthese hemmen (Samuel, 2001). In der Immunabwehr bilden die Typ I IFN eine Brücke zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität. Neben der Abwehr viraler Infektionen haben Typ I IFN durch Modulation des Zellzyklus und durch die Induktion pro-apoptotischer Gene einen Einfluss auf die Regulation des Zellwachstums (Goodbourn et al., 2000; Samuel, 2001).

Die Expression von Typ I IFN ist streng reguliert, da sich eine dauerhafte Ausschüttung von Typ I IFN negativ auf den Wirtsorganismus auswirken kann. In adulten Tieren kann es bei unverminderter Ausschüttung von Typ I IFN zur Induktion von Autoimmunerkrankungen kommen (Marshak-Rothstein, 2006). Daher gibt es eine Reihe inhibitorischer Mechanismen, die die Typ I Interferonproduktion kontrollieren (Review siehe (Liew et al., 2005). Ein besonders wichtiger Faktor zur Kontrolle von Typ I IFN ist der *Suppressor of Cytokine Signaling 1* (SOCS1), der mit IFNAR-1 interagiert (Fenner et al., 2006).

Nach einer Infektion wird parallel zu der angeborenen Immunität auch das adaptive Immunsystem aktiviert, das aber erst nach einigen Tagen seine volle Aktivität entfaltet.

Die Hauptbestandteile des adaptiven Immunsystems sind B-Zell- und T-Zell-vermittelte Immunantworten. B-Zellen oder B-Lymphozyten entwickeln sich im Knochenmark. Von anderen Zellen unterscheiden sie sich durch die Expression membrangebundener Immunglobuline (Antikörper), die als B-Zellrezeptoren die Erkennung von Antigenen vermitteln. Ein Großteil der  $1,5 \times 10^5$  Rezeptoren auf einer einzelnen B-Zelle hat die gleiche Spezifität. Nach Stimulation einer naiven reifen B-Zelle kommt es zu einer massiven Zellteilung und somit zur Expansion des B-Zellklons. Die B-Zellen differenzieren

zu Plasmazellen und zu Gedächtnis-B-Zellen. Plasmazellen haben eine geringere Dichte an B-Zellrezeptoren auf ihrer Oberfläche und sezernieren große Mengen an löslichen Antikörpern, deren Spezifität dem jeweiligen B-Zellrezeptor entspricht. Man unterscheidet verschiedene Antikörperklassen (Isotypen): IgA, IgE, IgD, IgM sowie verschiedene Subklassen von IgG. Die pentameren IgM Antikörper sind die ersten Immunglobuline, die nach Infektion sekretiert werden. Danach erfolgt ein Subklassenwechsel zu IgG, dem häufigsten Immunglobulin im Serum (Janeway, Jr. et al., 2005).

Ähnlich wie B-Zellen entstehen auch T-Zellen aus pluripotenten somatischen Stammzellen im Knochenmark, durchlaufen aber die entscheidenden Reifungsschritte im Thymus. Wie B-Zellen exprimieren T-Zellen auf ihrer Zelloberfläche Antigen-spezifische T-Zellrezeptoren (TCR). Im Gegensatz zum B-Zellrezeptor ist der T-Zellrezeptor nicht in der Lage freies Antigen zu erkennen. Stattdessen erkennen T-Zellrezeptoren Antigenfragmente nur im Zusammenhang mit den Selbst-Haupthistokompatibilitätskomplexen der Klasse I oder II (MHC I oder MHC II). MHC I Moleküle werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert, wohingegen MHC II nur auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen zu finden ist. Bei den T-Zellen unterscheidet man verschiedene Typen, unter denen die wichtigsten die CD4-positive T-Zellen (T-Helferzellen) und CD8-positive T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) sind. Diese beiden T-Zellsubtypen unterscheiden sich dadurch, dass sie neben dem T-Zellrezeptor den CD8 oder CD4 Korezeptor exprimieren. CD4-positive T-Zellen sind MHC Klasse II restringiert. Nach ihrer Aktivierung beginnen sich die CD4-positive T-Zellen massiv zu teilen. T-Helferzellen sekretieren verschiedene Zytokine, die eine Rolle bei der Aktivierung von B-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und anderen Zellen des Immunsystems spielen. CD8-positive T-Zellen hingegen sind MHC Klasse I restringiert. Nach ihrer Aktivierung kommt es ebenfalls zur Expansion und zur Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen. Im Vergleich zu T-Helferzellen sezernieren sie nur geringere Mengen Zytokine, und sie sind in der Lage, veränderte oder infizierte Zellen zu erkennen und anschließend zu eliminieren (Goldsby et al., 2003; Janeway, Jr. et al., 2005).

Bei vielen Virusinfektionen werden virusspezifische Antikörper gebildet, die die Virusverbreitung vermindern und eine Reinfektionen verhindern. Für die endgültige Elimi-

nierung von Viren sind vor allem zelluläre Mechanismen wichtig: Infizierte Zellen werden durch zytotoxische T-Zellen oder durch NK-Zellen, die durch T-Helferzellen aktiviert wurden, eliminiert.

Die hier beschriebenen Mechanismen gelten primär für antivirale Aktivitäten in der Körperperipherie, während im zentralen Nervensystem andere, weniger gut verstandene Mechanismen eine Rolle zur Kontrolle von Virusinfektionen spielen (vergl. 2.3.2).

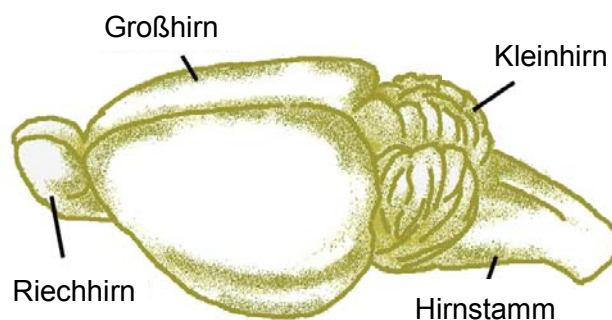
## 2.2 DAS ZENTRALE NERVENSYSTEM

Das Nervensystem höherer Organismen wird anatomisch und strukturell in das zentrale Nervensystem (ZNS) und das periphere Nervensystem (PNS) unterschieden. Das ZNS besteht aus dem Gehirn, dem Rückenmark, den Spinalganglien und den Wurzelzellen. Das ZNS erfüllt verschiedene Aufgaben: Es dient der Integration und Verarbeitung von Reizen, die über afferente Bahnen von innerhalb und außerhalb des Organismus zugeleitet werden. Des Weiteren koordiniert es sämtliche motorischen Leistungen des Gesamtorganismus und reguliert dabei alle Abstimmungsvorgänge zwischen den Organen, einschließlich hormoneller Vorgänge.

Das ZNS liegt geschützt innerhalb knöcherner Strukturen (Schädel und Wirbelsäule) und ist von den so genannten Hirnhäuten umgeben (Meningen). Zwischen den Meningen und dem Gehirn bzw. dem Rückenmark befindet sich der Liquorraum, der mit Hirnwasser (*Liquor cerebrospinalis* oder CSF) gefüllt ist. Die Nährstoffversorgung des Gehirns wird wie bei allen anderen Organen durch das Blut gewährleistet. Allerdings ist der Stoffaustausch zwischen Blut und Gehirn bzw. dem Blut und dem CSF für die meisten Stoffe mit Ausnahme von Sauerstoff, Kohlendioxid, und Wasser durch die Blut-Hirn-Schranke mehr oder weniger stark reguliert. Die Blut-Hirn-Schranke besteht aus Endothelzellen, die durch *Tight Junctions* miteinander verbunden sind und somit die parazelluläre Diffusion hydrophiler Moleküle einschränkt. Die Blut-Hirn-Schranke stellt im Gehirn ein physiologisches Mikromilieu ein, das für eine geordnete Funktion des Gehirns notwendig ist (Engelhardt, 2006; Kniesel und Wolburg, 2000). Metabolisch wichtige Stoffe wie Glukose oder Aminosäuren können durch spezifische Transportmechanismen die Blut-Hirn-Schranke passieren, während die meisten anderen Proteine die

Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können (Silbernagl und Despopoulos, 1990; Klinke und Silbernagl, 1996).

Anatomisch lässt sich das Gehirn in vier Großregionen unterteilen. In das Großhirn (*Cerebrum*), das Kleinhirn (*Cerebellum*), den Hirnstamm (*Truncus cerebri*) und das Riechhirn (*Bulbus olfactorius*). Das Riechhirn ist beim Menschen relativ klein, dagegen ist es in der Maus sehr deutlich entwickelt. Der Hirnstamm bildet die Verbindung zwischen dem Rückenmark und dem Gehirn. Er ist für die allgemeinen Lebensfunktionen zuständig wie z.B. der Kontrolle der Atmung, der Herzfrequenz und des Blutdrucks. Dagegen findet über das Kleinhirn die Kontrolle motorischer Bewegungen statt.

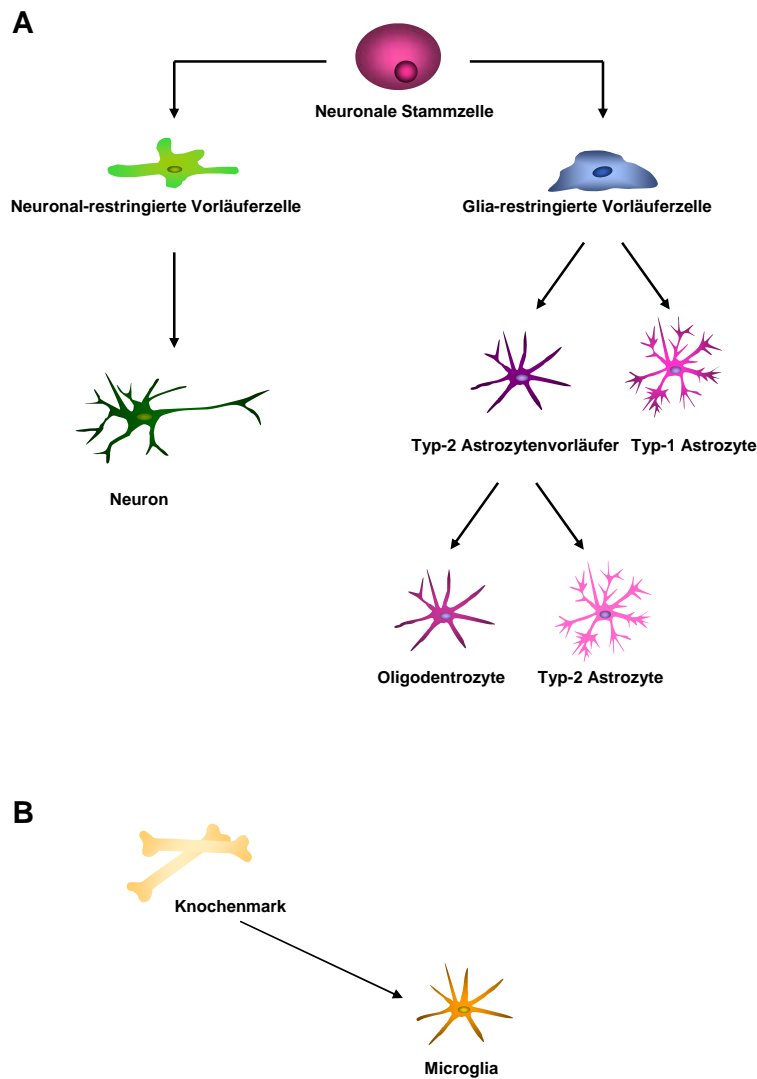


**Abb. 2.2: Die vier Großregionen eines Maushirns.** Ähnlich wie das menschliche Gehirn lässt sich das Maushirn anatomisch in die vier Großregionen *Riechhirn*, *Großhirn*, *Kleinhirn* und *Hirnstamm* unterteilen. Abbildung verändert nach Prof. R. Granger, University of California, Irvine (<http://www.ics.uci.edu/~granger/brainareas.html> (13.07.07)).

Hauptsächlich besteht das zentrale Nervensystem aus vier Zelltypen: den Neuronen, Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia. Hinzu kommen noch die Ventrikel-auskleidenden Ependymzellen und gefäßbildende Zellen. Neuronen haben die Aufgabe der Reizweiterleitung und -verarbeitung aus der Peripherie ins ZNS und innerhalb des ZNS. Oligodendrozyten sind Myelin-produzierende Zellen, die man an den Axonen der Neuronen findet. Myelin isoliert die Axone von dem umgebenden Milieu und erhöht dadurch die Geschwindigkeit der elektrischen Reizweiterleitung. Astrozyten oder auch Astroglia bilden die Mehrheit der Gliazellen. Man findet sie ebenfalls in der Nähe der Neuronen. Sie sind maßgeblich an der Flüssigkeitsregulation im ZNS beteiligt und für den lokalen Metabolismus von Toxinen, Neurotransmittern und neuroprotektiven Fakto-



ren verantwortlich. Im Gegensatz zu den anderen Zelltypen des ZNS entwickeln sich Mikroglia nicht aus neuronalen Stammzellen, sondern gehören zu den myeloiden Zellen. Sie wandern aus dem Knochenmark über die Blutgefäße ins ZNS ein und übernehmen im ZNS die Funktion von Makrophagen (Junqueira et al., 2002; Welsch und Sobotta, 2003).



**Abb. 2.3: Die vier Hauptzelltypen im Zentralnervensystem und ihre Herkunft.** (A) Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten haben einen gemeinsamen Ursprung und entwickeln sich aus neuronalen Stammzellen, die während der Embryogenese im Neuralrohr entstehen. (B) Mikroglia hingegen sind mesodermalen Ursprungs und entwickeln sich aus monozytären Vorläuferzellen im Knochenmark. Sie wandern erst später ins zentrale Nervensystem ein (Junqueira et al., 2002; Welsch und Sobotta, 2003).

### **2.3 IMMUNOLOGISCHE VORGÄNGE IM ZENTRALEN NERVEN-SYSTEM**

In der Literatur wird das Gehirn häufig als „immunprivilegiert“, also als eine von den Immunfunktionen des Organismus ausgenommene Region beschrieben. Dies wurde mit der Beobachtung Medawars begründet, der zeigte, dass es im Gehirn nach Allo- oder Xenotransplantation zu keinen Abstoßungsreaktionen kommt, wenn nicht gleichzeitig in der Peripherie mit dem entsprechenden Transplantat immunisiert wird. Daraus lässt sich schließen, dass das Immunsystem im ZNS nur eingeschränkt aktiv ist und sich nicht oder nur sehr schwer aktivieren lässt, wenn Antigen nur im ZNS vorhanden ist. Werden dagegen Antigene ebenfalls in der Peripherie präsentiert, kommt es auch im ZNS zur Induktion von Immunantworten (Medawar, 1948). Der Begriff „immunprivilegiert“ wurde später durch Billingham und Boswell geprägt (Billingham und Boswell, 1953). Schon vor dem Begriff Immunprivileg wurde der Begriff der Blut-Hirn-Schranke verwendet. Er geht auf Beobachtungen von Paul Ehrlich zurück, der zeigte, dass sich nach intravenöser Gabe von gefärbten Aminen alle Organe außer dem Hirn anfärbten (Ehrlich, 1885; Ehrlich, 1886). Der Begriff Blut-Hirn-Schranke wurde etwa 30 Jahre später von Ehrlichs Schüler Edwin Goldmann eingeführt (Goldmann, 1913). In der Literatur sind die Begriffe des Immunprivilegs und der Blut-Hirn-Schranke eng miteinander verbunden. Zunächst wurde das Immunprivileg durch die Abgrenzung des Gehirns mittels der Blut-Hirn-Schranke von dem Blutkreislauf und der Lymphe erklärt. Diese Hypothese konnte jedoch nicht aufrechterhalten werden, da nach und nach auch andere immunprivilegierte Regionen des Körpers beschrieben wurden, die ihrerseits keine morphologisch erkennbare Abgrenzung zum Blutkreislauf bzw. Lymphe aufwiesen (z.B. die Hoden, der schwangere Uterus, die Backentasche des Hamster). Das Immunprivileg ist keine generelle Eigenschaft des ZNS, sondern ist auf bestimmte Bereiche des Gehirns reduziert. Die parenchymatischen Gewebe sind immunprivilegiert, wohingegen die Hirnhäute (Meningen), Ventrikel und der Choroidplexus davon ausgenommen sind (Galea et al., 2007). Später zeigten Streilein et al., dass das Immunprivileg ein Ergebnis des Zusammenspiels von verschiedenen anatomischen, physiologischen und immunregulatorischen Prozessen ist, die gemeinsam die Erkennung durch das Immunsystem beschränken und immunvermittelte entzündliche Reaktionen inhibieren (Nieder Korn, 2006; Streilein, 2003).

In den 80er Jahren wurde gezeigt, dass sich das zentrale Nervensystem und das Immunsystem gegenseitig beeinflussen können (Besedovsky und del Rey, 1996) und so die gedachte Trennung von ZNS und Immunsystem nicht mehr aufrecht gehalten werden konnte. Diese Arbeiten legten nahe, dass spezialisierte Mechanismen, die den Schutz des ZNS vor potentiell gefährlichen Mikroorganismen und Viren gewährleisten, existieren und gleichzeitig das ZNS vor den Gefahren einer aktiven Immunantwort schützen. Wie in allen anderen Geweben sind für die Induktion von Immunantworten im ZNS antigenpräsentierende Zellen (APC), antigen-spezifische Lymphozyten und über Lymph- und Blutgefäße der Zugang zu Lymphknoten oder Milz notwendig. Das setzt voraus, dass die Immunzellen die Blut-Hirn-Schranke passieren können. Gleichzeitig müssen die parenchymalen Zellen des ZNS durch Zytokine und andere Mediatoren eine Mikroumgebung bilden, die eine Immunaktivierung ermöglicht.

Klassische antigenpräsentierende Zellen (APC) sind in der Regel nicht im ZNS zu finden (Hart und Fabre, 1981; Perry et al., 1985). Stattdessen findet man die aus dem Knochenmark stammenden Mikrogliazellen (Mikroglia), die innerhalb des ZNS die Aufgaben von Makrophagen übernehmen. Wie konventionelle APC exprimieren sie Toll-ähnliche-Rezeptoren (TLR) und MHC I und MHC II (Guillemin und Brew, 2004). Bisher ist es jedoch ungeklärt, ob aktivierte Mikroglia das ZNS verlassen, um in lymphatischen Geweben Antigen zu präsentieren und so Antigen-spezifische Immunantworten zu initiieren. Die Frage, ob es ZNS-endemische dendritische Zellen (DC) gibt, wird derzeit kontrovers diskutiert. Es ist jedoch klar, dass myeloide DC in den Meningen und im Hirnwasser vorkommen (McMenamin, 1999). Immunglobuline können die intakte Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden, während T-Zellen in der Lage sind, das ZNS zu infiltrieren. Bei einer starken immunologischen Reaktion in der Peripherie kann es zu einer vermehrten T-Zell-Infiltration in das ZNS kommen, ohne dass das ZNS direkt von der Entzündung betroffen ist. Untersuchungen zeigten, dass nur aktivierte T-Zellen in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Im nicht-entzündeten ZNS sterben diese T-Zellen jedoch schnell durch Apoptose ab oder sie verlassen das ZNS wieder (vergl. **Abb. 2.5A**) (Hickey, 2001; Griffin, 2003). Für B-Zellen konnte lange nicht abschließend geklärt werden, ob sie in das gesunde ZNS einwandern. Heute vermutet man, dass aktivierte B-Zellen, ähnlich wie aktivierte T-Zellen, das gesunde ZNS auf der Suche nach Antigen infiltrieren und es dann wieder verlassen oder im ZNS ab-

sterben. Es ist jedoch unbestritten, dass B-Zellen während inflammatorischer Prozesse in das Gehirn einwandern und dort aktiv werden können. Meistens findet man während inflammatorischer Prozesse Immunglobuline im ZNS. Dies gilt als ein Indiz für eine geöffnete Blut-Hirn-Schranke (Hickey, 2001; Knopf et al., 1998).

### **2.3.1 VIRALER NEUROTROPISMUS UND EINTRITTSSTELLEN IN DAS ZENTRALE NERVENSYSTEM**

Viele neurologische Krankheiten, von denen man heute weiß, dass sie viralen Ursprungs sind, waren bereits seit der Antike und dem Mittelalter bekannt (z.B. Tollwut, Kinderlähmung oder Gelbfieber). Man wusste, dass diese Krankheiten ansteckend sind und die Krankheitssymptome wiesen darauf hin, dass auch das Gehirn betroffen ist. So wurde bereits 1888 durch Cantini die neuronale Ausbreitung des Tollwuterregers gezeigt (Gosztonyi und Koprowski, 2001). Infiziert ein Virus bevorzugt Zellen des ZNS, spricht man von einem neurotrophen Virus. Unter Virustropismus versteht man die Präferenz bestimmter Viren, ausgewählt Gewebe oder Zelltypen zu infizieren, während andere Gewebe oder Zelltypen nicht betroffen sind. Tropismen werden über mindestens vier Parameter gesteuert, (i) die Expression von Rezeptoren für den Zelleintritt auf bestimmten Geweben oder Zelltypen (*susceptibility*), (ii) die Expression intrazellulärer Genprodukte, die für eine vollständige Infektion bzw. Virusreplikation benötigt werden (*permissivity*), (iii) die räumliche Zugänglichkeit von Zellen für das Virus (*accessibility*) und (iv) die lokale Umgehung immunologischer Abwehrmechanismen (*evasion*) (Flint et al., 2004). Neurotrope Viren sind definiert als Viren, die bevorzugt in Zellen des Nervensystems replizieren. Unter den neurotrophen Viren unterscheidet man Viren, die Neuronen infizieren (z.B. Herpes simplex Virus, Rabiesvirus und das West Nil Virus), Viren, die Mikroglia infizieren (z.B. HIV) sowie Viren, die Oligodendrozyten befallen (z.B. JC Virus) (Griffin, 2003). Der Prototyp für neurotrope Viren im Mausmodell ist das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV). VSV ist eng mit dem Tollwutvirus verwandt und gehört als negativ-Einzelstrang RNA Virus zur Gattung *Vesiculovirus* und zur Familie der *Rhabdoviridae* (Dietzschold et al., 1996).



**Abb. 2.4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von VSV.** Das Virus zeigt eine *bullet-shaped* Morphologie und ist etwa 170 nm lang und 70 nm im Durchmesser (Dietzschold et al., 1996). Originalaufnahme von F.A. Murphy, School of Veterinary Medicine, University of California Davis, USA.

VSV kodiert bei einer Gesamtgröße des Genoms von 11,161 kb für 5 Gene (N, L, P, M, und G). Das Hüllglycoprotein G ist für die Bindung des Virus an einen Zelloberflächenrezeptor und die Fusion des Virus mit der endosomalen Membran verantwortlich (van den Pol et al., 2002). Es ist auch das Hauptantigen, gegen das antivirale Antikörperantworten gerichtet sind.

Es existieren verschiedene Serotypen von VSV, unter anderem das experimentell genutzte VSV Serotyp Indiana (VSV-IND). Das natürliche Verbreitungsgebiet von VSV schließt Nord- und Teile Südamerikas ein. VSV hat ein breites Wirtsspektrum vom Säugetier über Vögel bis zu Insekten. Hauptwirte sind Pferde, Rinder und Schweine. In diesen Tieren verursacht VSV eine Erkrankung, die durch vesikuläre Läsionen im Maul charakterisiert ist, die den Symptomen der Maul- und Klauenseuche ähneln. Infizierte Menschen entwickeln Grippe-ähnliche Symptome. Mäuse können eine intravenöse (*i.v.*) Infektion bis zu einer Dosis von  $10^8$  pfu überstehen. Auf Grund des Neurotropismus führt eine intranasale (*i.n.*) Infektion mit mehr als  $10^4$  pfu bzw. mehr als  $10^8$  pfu *i.v.* in der Regel zu einer letalen Enzephalitis. Schon frühe Arbeiten deuteten auf den Neurotropismus von VSV hin (Andersson et al., 1993; Sabin und Olitsky, 1937). Das Virus gelangt über die Infektion der olfaktorischen Rezeptorneuronen der Nase in das ZNS und breitet sich dann weiter aus (Plakhov et al., 1995; Reiss et al., 1998).

Eine typische Eintrittspforte für Viren in das ZNS sind periphere Nerven. *Herpes simplex* Virus (HSV) kann retrograd entlang der Axone wandern und so in den

Temporallappen, einem Teil des Großhirns, gelangen. Für HSV und andere Viren konnte gezeigt werden, dass die Riechnerven eine gute Eintrittspforte darstellen. Über die Riechnerven gelangen die Viren in das Riechhirn und somit in das ZNS. Die olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) stellen eine Verlängerung des ZNS in die Peripherie dar (Anderson, 2001). Die Soma der ORN sitzen in den Neuroepithelien der Nase und ihre Axone reichen bis in das Riechhirn. ORN haben unter den Rezeptorneuronen einzigartige Eigenschaften, (i) sie exponieren die Rezeptoren direkt an die Umwelt, um flüchtige chemische Substanzen zu detektieren, (ii) sie können exogene Substanzen aufnehmen und diese transsynaptisch in das ZNS transportieren (iii) und wie Epithelzellen haben ORN eine relativ kurze Halbwertszeit von ungefähr 90 Tagen und die Möglichkeit zur Regeneration. Diese Eigenschaften fehlen anderen neuronalen Zellen (Mori et al., 2005; Schwob et al., 2001).

### **2.3.2 ANTIVIRALE MECHANISMEN IM ZNS UND VIRUSINDUZIERTE NEURONALE SCHÄDEN IM ZNS**

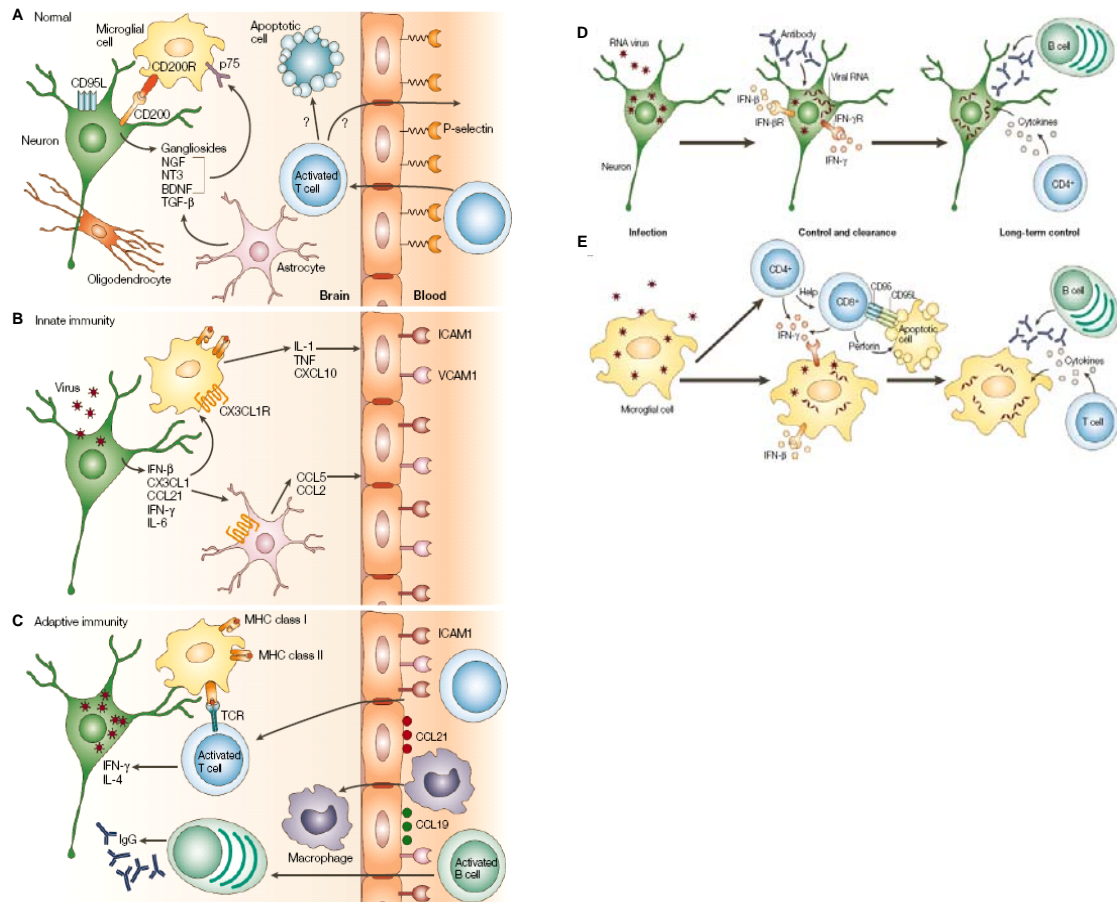
Die meisten neurotrophen Viren befallen Zellen der Leptomeningen an der Oberfläche des Gehirns und verursachen dort eine Meningitis. Es handelt sich dabei meist nicht um ernsthafte Erkrankungen, da dabei erneuerbare Zellen des ZNS betroffen sind, die für das Immunsystem leicht zugänglich sind. Seltener, aber mit schwerwiegenderen Folgen, sind Infektionen von Neuronen, da es sich bei Neuronen um hoch differenzierte und langlebige Zellen handelt, deren Verlust schwerwiegende pathologische Folgen haben kann. Andere Zielzellen innerhalb des ZNS stellen die verschiedenen Gliazelltypen (Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten) dar, die unterstützende Funktionen haben. So führt die Infektion von Oligodendrozyten zu einem Abbau der Myelinscheiden um die Axone, und es kommt zu einer akuten oder chronischen demyelinisierenden Erkrankung. Astrozyten übernehmen nicht nur Stoffwechselfunktionen im ZNS, sondern haben auch eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke. Ihre Infektion führt zu einer indirekten Schädigung der Neuronen.

Im gesunden, nicht-infizierten Hirn finden sich in der Regel keine immunologischen Aktivitäten. Die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke exprimieren nur eine geringe Menge an Adhäsionsmolekülen (P-Selektine), was die Durchgängigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Immunzellen erschwert. Die Neuronen produzieren lokal

Neurotrophine und exprimieren das Oberflächenmolekül CD200, das mit dem Rezeptor CD200R auf Mikroglia interagiert. Durch die Interaktion von CD200 und CD200R werden Mikroglia im inaktiviertem Zustand gehalten (Hoek et al., 2000). Astrozyten produzieren unter anderem das anti-inflammatorische Zytokin TGF- $\beta$  (Abb. 2.5A). Werden Neuronen oder das ZNS infiziert, erfolgt eine schnelle Immunantwort. Unter den zuerst produzierten Zytokinen finden sich die Typ I IFN. Sowohl Mikroglia als auch Neuronen sind in der Lage, Typ I IFN zu produzieren (Delhaye et al., 2006; Sandberg et al., 1994). Virusinfizierte Neuronen aktivieren benachbarte Astrozyten und Mikroglia über diverse Zytokine und Chemokine, zu denen unter anderem IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 sowie Fraktalkin (CX3CL1) gehören (Chapman et al., 2000). Zusätzlich wird CD200 auf den Neuronen herunterreguliert, wodurch es zu einem Ende der CD200/CD200R Interaktion kommt und die Mikroglia aktiviert werden. Aktivierte Mikroglia und Astrozyten produzieren wiederum proinflammatorische Zytokine und Chemokine. Es kommt zu einer Hochregulation der MHC-Moleküle auf Mikroglia sowie zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (ICAM1/VCAM1) (Abb. 2.5B). Das ermöglicht Zellen der adaptiven Immunabwehr verstärkt in das ZNS einzuwandern, um dort aktiv zu werden (Abb. 2.5C) (Griffin, 2003). Man geht davon aus, dass Antigenpräsentation nicht im ZNS stattfindet, sondern hauptsächlich in sekundären lymphatischen Organen erfolgt. Aktivierte T-Zellen (CD4-positiv und CD8-positiv), die in das Gehirn gelangen und dort kein passendes Antigen vorfinden, verlassen das ZNS wieder oder sterben durch Apoptose (siehe Abb. 2.5A). Treffen die aktivierten T-Zellen jedoch auf das für ihren TCR spezifische Antigen, verbleiben sie im ZNS. Neben aktivierten T-Zellen findet man bei inflammatorischen Vorgängen auch alle anderen Komponenten der zellulären Immunabwehr im ZNS (NK-Zellen, B-Zellen und Monozyten/Makrophagen).

Wie in der Peripherie ist die Eliminierung der Viren im ZNS ein mehrstufiger Prozess: er beinhaltet die Inhibition der Virusausbreitung von Zelle zu Zelle, die Entfernung freier Viren im Blut und im Interzellularraum, sowie die Eliminierung virusinfizierter Zellen bzw. die dauerhafte Unterdrückung der Virusreplikation. Es ist von Vorteil, wenn antivirale Aktivitäten innerhalb des ZNS nicht zur Zerstörung von Neuronen führen. Bei Infektionen mit verschiedenen RNA-kodierten Viren wie Rabiesvirus, Theilers

Murines Enzephalomyelitis Virus (TMEV) und Maushepatitisvirus (MHV) ist bekannt, dass antivirale Aktivitäten hauptsächlich von Antikörpern vermittelt werden (**Abb. 2.5D**).



**Abb. 2.5: Veränderungen im ZNS während einer antiviralen Immunantwort und mögliche Mechanismen zur Eliminierung des Virus.** Im ZNS kommt es im Vergleich zum gesunden Hirn (A) nach Virusinfektion zu zahlreichen Veränderungen durch die angeborene (B) und adaptive Immunabwehr (C). Zur Viruseliminierung in infizierten Neuronen (D) und Gliazellen (E) gibt es verschiedene Mechanismen. (Griffin, 2003).

Virusneutralisierende Antikörper sind meist direkt gegen virale Oberflächenproteine gerichtet und inhibieren die Virusreplikation (Hooper et al., 1998). Oft ist die Viruseliminierung unvollständig, und virale RNA kann lebenslang nachgewiesen werden. Daher ist eine ständige Kontrolle der Viren durch das Immunsystem notwendig (Tschen et al., 2002; Tyor et al., 1992). In den meisten Fällen richten sich die Aktivitäten zytotoxischer T-Zellen nicht gegen infizierte Neuronen. Bei Infektionen von Mäusen mit dem Lymphozytären Chorimeningitisvirus (LCMV) zeigte sich, dass sich die



Viruselimination durch zytotoxische T-Zellen für den Wirt nachteilig auswirken kann: LCMV infiziert unter anderem Neuronen des ZNS. Während des tödlichen Krankheitsverlaufs kommt es zu einer Choriomeningitis, die von CD8-positive T-Zellen vermittelt wird. Werden die zytotoxischen T-Zellen mit Antikörpern depletiert, kommt es nicht zur Ausbildung der Choriomeningitis und die Mäuse überleben (Oehen et al., 1991).

Dem Gegenüber sind für die Eliminierung von virusinfizierten Gliazellen zytotoxische T-Zell vermittelte Aktivitäten ein geeignetes Mittel, da Gliazellen leicht zu regenerieren sind und der Verlust der Zellen keine schwerwiegenden Folgen hat (Abb. 2.5E) (Griffin, 2003).

## 2.4 TYP I INTERFERONE IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM

Wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, sind plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) wichtige Typ I IFN Produzenten in der Peripherie. Im ZNS konnten pDC bisher nur im CSF von Patienten mit ZNS-Infektionen nachgewiesen werden. Myeloide DC konnten auch in parenchymatischen Geweben des ZNS gefunden werden (McMahon et al., 2006). Für die schnelle Bildung von Typ I IFN in pDC spielt die konstitutive Expression von IRF7 eine wichtige Rolle (siehe 2.1) (Sato et al., 2000). Im ZNS finden sich aber weder pDC noch andere Zellen, die konstitutiv IRF7 exprimieren und somit die Rolle der pDC übernehmen könnten. Stattdessen wurde über *in situ* Hybridisierung gezeigt, dass nach Virusinfektion Typ I IFN hauptsächlich durch Parenchymalzellen gebildet wird. Zu den IFN-Produzenten gehörten sowohl F4/80 positive Zellen (Makrophagen und Mikroglia), Ependymzellen, bei denen es sich um Gliazellen handelt, die die abschließende Schicht zur CSF bilden, und Neuronen. Alle Zellen des ZNS, inklusive der Neuronen, können auf Typ I IFN reagieren (Delhayé et al., 2006).

Im ZNS kann IFN- $\alpha$  neben anti-inflammatorischen Funktionen (Trottier, Jr. et al., 2005) auch toxische Effekte haben. Die hirnspezifische Überexpression von IFN- $\alpha$  in Mäusen führt zu einer fortschreitenden Enzephalopathie mit zunehmenden Calciumeinlagerungen, Entzündungen, Gliose und verursacht letztendlich Neurodegeneration und den Tod (Akwa et al., 1998). Diese Symptome entsprechen dem sehr seltenen, genetisch manifestierten Aicardi-Goutières-Syndrom. Betroffene mit dieser Krankheit zeigen

neben fortschreitender Calciumeinlagerung im Gehirn erhöhte IFN- $\alpha$  Level in der Cerebralflüssigkeit (Campbell et al., 1999; Crow et al., 2003).

Es ist unstrittig, dass Typ I IFN eine Rolle in der ZNS-Immunität spielen. So hat IFN- $\beta$  eine verzögernde Wirkung auf den Krankheitsverlauf der schubförmigen Form der Autoimmunkrankheit Multiple Sklerose (MS) und wird auch therapeutisch eingesetzt (Billiau et al., 2004; Clanet et al., 2004; Prinz et al., 2007). Welche Rolle die Typ I IFN bei Virusinfektionen im ZNS spielen, ist bisher jedoch nicht hinreichend geklärt.

### **3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT**

Bei einer peripheren Infektion mit neurotrophen Viren kommt es nur selten zu einer Meningitis oder gar Enzephalitis. Bisher wurde dieser Umstand dadurch erklärt, dass antivirale Aktivitäten in der Peripherie die Virusvermehrung inhibieren, so dass das ZNS gar nicht erst infiziert wird. Des Weiteren wird angenommen, dass es Mechanismen gibt, die das ZNS vor viralen Infektionen schützen. Es ist aber unklar, ob alleine die Blut-Hirn-Schranke den Zugang von Viren in das zentrale Nervensystem (ZNS) limitiert, oder ob lokale Immunantworten eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Virusreplikation und Verbreitung spielen.

Wichtige Mechanismen zur Induktion von antiviralen Aktivitäten in der Peripherie werden über Typ I Interferone (IFN) vermittelt. Diese werden unter anderem nach Virusinfektionen gebildet und sichern das initiale Überleben bis zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems und der Viruselimination. Typ I IFN bindet an den Typ I Interferonrezeptor (IFNAR). Bleibt die Interferonproduktion oder die IFNAR-vermittelte Signaltransduktion aus, sterben Mäuse innerhalb weniger Tage an einer Infektion mit niedrigsten Dosen des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob virale Infektionen des ZNS auf ein Versagen der peripheren Immunität oder ein Versagen des zentralnervösen Immunsystems zurückzuführen ist.

Da Typ I IFN bei der Bekämpfung von Virusinfektionen in der Peripherie eine entscheidende Rolle spielen kann, ist es möglich, dass es auch im ZNS eine wichtige Funktion hat. Bisher konnte dies aber nicht experimentell belegt werden.

Um die Rolle von Typ I IFN im ZNS zu untersuchen, wurde auf der Basis der Cre loxP Technologie ein Mausmodell hergestellt, bei dem selektiv nur Zellen im ZNS eine IFNAR-Deletion aufweisen, während Zellen außerhalb des ZNS den IFNAR exprimieren.

Zunächst sollte das neue Mausmodell genetisch charakterisiert werden und anschließend in Infektionsversuchen mit VSV, einem Modell für neurotrope Viren, phänotypisch analysiert werden. Dabei wurde in erster Linie der Frage nachgegangen, ob die IFN-abhängige Inhibition neurotroper Viren innerhalb oder außerhalb des ZNS stattfindet. Da die wenigen Kenntnisse zu antiviralen Immunantworten im ZNS primär auf *in vitro* Experimenten mit neuronalen Zelllinien oder primären Neuronen beruhen, bietet sich in dieser Arbeit erstmals die Möglichkeit, die Rolle von Typ I IFN im ZNS in einem *in vivo* Modell zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit ist es, zu einem besseren Verständnis antiviraler Mechanismen im ZNS beizutragen.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 MATERIALIEN

#### 4.1.1 GERÄTE

*Tabelle 4.1: Übersicht verwendeter Geräte*

| <b>Gerät</b>                                                               | <b>Bezeichnung</b>   | <b>Hersteller</b>                     |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|
| Autoklav                                                                   |                      | KSG Sterilisatoren GmbH,<br>Olching   |
| UV-Bestrahlungsgerät                                                       | Crosslinker CL1      | Herolab GmbH, Wiesloch                |
| CO <sub>2</sub> - Begasungsbrutschrank                                     | Cytoperm             | Heraeus, Hanau                        |
| Durchflusszytometer                                                        | LSRII                | Becton Dickinson GmbH,<br>Heidelberg  |
| Einfrierbox                                                                | Mr. Frosty           | Nunc, Karlsruhe                       |
| Einkanalpipette                                                            | Multipette plus 4981 | Eppendorf AG, Hamburg                 |
| Einkanalpipetten 0,5-10 µl,<br>2-20 µl, 10-100µl, 50-200 µl,<br>100-1000µl | Reference variabel   | Eppendorf AG, Hamburg                 |
| ELISA-Reader                                                               | Sunrise              | Tecan Deutschland GmbH,<br>Crailsheim |
| Trans-Blot SD Semi-Dry<br>Transfer Cell                                    |                      | Bio-Rad, München                      |
| Entwicklermaschine                                                         | Curix 60             | Agfa, Köln                            |

| <b>Gerät</b>                                      | <b>Bezeichnung</b>                   | <b>Hersteller</b>                                    |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------|
| FasPrep Homogenisator                             |                                      | MP Biomedicals, Straßburg,<br>Frankreich             |
| Lumi Imager F1                                    |                                      | Boehringer, Mannheim                                 |
| Handstückzähler                                   |                                      | IVO, Villingen-<br>Schwenningen                      |
| Heizblock mit Schüttelfunk-<br>tion (Thermomixer) | Eppendorf 5437,<br>Eppendorf compact | Eppendorf AG, Hamburg                                |
| Hybrisierungsöfen                                 | Hybridisierer HB 1D                  | Barloworld Scientific Ltd.,<br>Stone, Großbritannien |
| Injektionskäfig                                   |                                      | Harnischmacher, Kassel                               |
| Kühl- und Gefrierschränke<br>(4°C und -20°C)      |                                      | Liebherr, Biberach an der<br>Riss                    |
| Kühlzentrifuge                                    | Varifuge 3.0R                        | Heraeus Sepatech, Osterode<br>am Harz                |
| Magnetrührer                                      | RCT Basic                            | IKA Werke GmbH & Co.<br>KG, Staufen                  |
| Mehrkanalpipetten                                 | Research multi 3114                  | Eppendorf AG, Hamburg                                |
| Mikroskop                                         | Axiovert25,                          | Zeiss, Jena                                          |
| Mikroskop                                         | Axiolab,                             | Zeiss, Jena                                          |
| Mikrowelle                                        | 9025E                                | Privileg, Fürth                                      |
| Membranpumpe                                      |                                      | Vacubrand GmbH & Co,<br>Wertheim                     |

| <b>Gerät</b>             | <b>Bezeichnung</b>         | <b>Hersteller</b>                         |
|--------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|
| PCR-Cycler               | Peltier Thermal Cycler 200 | MJ Research, Waltham, MA, USA             |
| pH-Meter                 | 761 Calimatic              | Knick, Egelsbach                          |
| Phosphoimaging System    | Storm 820                  | Molecular Dynamics, Krefeld               |
| Pipettierhilfe           | PIPETBOY acu               | Integra Biosciences, Chur, Schweiz        |
| Reagenzglasschüttler     |                            | VWR International GmbH, Darmstadt         |
| Rührfische               |                            | VWR International GmbH, Darmstadt         |
| Spannungsgerät           | Power Pac 300              | Bio-Rad, München                          |
| Spektralphotometer       | Ultraspec 3000             | Pharmacia Biotech                         |
| Sterilbank               | Steril Gard II Advance     | The Baker Company                         |
| Tiefkühlschränke (-80°C) |                            | New Brunswick Scientific, Nürtingen       |
| Tischzentrifuge          | Megafuge 1.0               | Heraeus Sepatech, Osterode am Harz        |
| Tischzentrifuge          | Biofuge fresco             | Heraeus Sepatech, Osterode am Harz        |
| Ultraschallbad           | Sonorex RK 100             | Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin |

| <b>Gerät</b>                         | <b>Bezeichnung</b> | <b>Hersteller</b>                              |
|--------------------------------------|--------------------|------------------------------------------------|
| Ultraschall-Homogenisator            | Sonopuls           | Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin      |
| Vacuumblotter                        | Model 785          | Bio-Rad, München                               |
| Vakuumpumpe                          | Vacunsafe          | IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz         |
| Waage                                | LP 820             | Sartorius AG, Göttingen                        |
| Wasserbad                            |                    | Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel |
| Wasserbad mit integriertem Schüttler |                    | Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel |

#### 4.1.2 VERBRAUCHSMITTEL UND SONSTIGE MATERIALIEN

*Tabelle 4.2: Übersicht verwendeter Verbrauchsmittel*

| <b>Verbrauchsmittel</b>                                | <b>Hersteller</b>   |
|--------------------------------------------------------|---------------------|
| 1 ml Spritzen mit integrierter Nadel (Insulinspritzen) | Braun, Melsungen    |
| 5 ml Einmalspritzen                                    | Braun, Melsungen    |
| 50 ml Einmalspritze                                    | Braun, Melsungen    |
| Bechergläser, verschiedene Größen                      | Schott, Mainz       |
| Butterfly                                              | Sarstedt, Nümbrecht |



---

| <b>Verbrauchsmittel</b>                                          | <b>Hersteller</b>                 |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Combitips (1 ml, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)              | Eppendorf AG, Hamburg             |
| Deckgläschen                                                     | VWR International GmbH, Darmstadt |
| Dreiwegehahn                                                     | Braun, Melsungen                  |
| Drigalskyspatel                                                  | VWR International GmbH, Darmstadt |
| Einfriergefäß                                                    | Nunc, Karlsruhe                   |
| Einmal-OP-Mundschutz Coldex                                      | Procter & Gamble, Schwalbach      |
| Einweghandschuhe aus Latex, Manufix Sensitiv                     | Braun, Melsungen                  |
| Einweghandschuhe, TNT Blue Nitril                                | Ansell, Aalst, Belgien            |
| Einwegkanülen, verschiedene Größen                               | Braun, Melsungen                  |
| Erlenmayerkolben                                                 | Schott, Mainz                     |
| FACS-Röhrchen (Polystyren)                                       | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |
| Glasflaschen mit Schraubdeckel 1000 ml, 500 ml, 100 ml und 10 ml | Schott, Mainz                     |
| Glas mit Deckel                                                  | Schott, Mainz                     |
| Glasstäbe                                                        | VWR International GmbH, Darmstadt |
| Heidelberger Verlängerung                                        | Braun, Melsungen                  |
| Kanülensammler Medibox                                           | Braun, Melsungen                  |

---

---

| <b>Verbrauchsmittel</b>                                                   | <b>Hersteller</b>                        |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Lysing Matrix D                                                           | MP Biomedicals, Straßburg,<br>Frankreich |
| MACS Säulen, LS                                                           | Miltanyi, Bergisch-Gladbach              |
| Microspin-Säulen S-200                                                    | GE Healthcare, Freiburg                  |
| Mikroliterreaktionsgefäß, 0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml                            | Eppendorf AG, Hamburg                    |
| Neubauer-Zählkammer                                                       | Labor Optik                              |
| Nitrocellulosemembran Protran                                             | Schleicher und Schuell, Dassel           |
| Nitrozellulosemembran Hybond XL                                           | GE Healthcare, Freiburg                  |
| Parafilm „M“                                                              | American National Can, Chicago, USA      |
| Pasteurpipetten                                                           | VWR International GmbH, Darmstadt        |
| PCR Platten twin tec PCR Plate 96                                         | Eppendorf AG, Hamburg                    |
| PCR Reaktionsgefäße                                                       | ABgene, Hamburg                          |
| PCR Reaktionsgefäß-Strips, 8er und 12er                                   | ABgene, Hamburg                          |
| Phase Lock Gel light, 2 ml, 15 ml, 50 ml                                  | Eppendorf AG, Hamburg                    |
| Pipettenspitzen, blau, gelb und weiß                                      | Eppendorf AG, Hamburg                    |
| Pipettenspitzen, gestopft (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) | Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf  |
| Plastikpipetten 50 ml, 25 ml, 10 ml, 5 ml                                 | Grainer BioOne, Essen                    |
| Präparationsbesteck                                                       | Hauptner/Herberholz, Solingen            |

---

| <b>Verbrauchsmittel</b>                          | <b>Hersteller</b>                 |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Rasierklingen Apollo                             | Herkenrath, Solingen              |
| Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml                 | Grainer BioOne, Essen             |
| Röntgenfilm (Hyperfilm M Enveloped)              | GE Healthcare, Freiburg           |
| Spritzenvorsatzfilter Qualilab 0,22 µm & 0,45 µm | VWR International GmbH, Darmstadt |
| Standzylinder                                    | Schott, Mainz                     |
| Steritop Filter GP 0,22 µm                       | Millipore GmbH, Schwalbach        |
| Whatman-Papier                                   | Whatman GmbH, Dassel              |
| Zellkulturflaschen, T175                         | Grainer BioOne, Essen             |
| Zellkulturplatten, 6 well, 24 well, 96 well      | TPP, Trasadingen, Schweiz         |
| Zellschaber                                      | Grainer BioOne, Essen             |
| Zellsiebe Filicon, 70 µm                         | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |

### 4.1.3 CHEMIKALIEN, LÖSUNGSMITTEL UND FERTIGPUFFER

*Tabelle 4.3: Übersicht verwendeter Chemikalien, Lösungsmittel und Fertigpuffer*

| <b>Chemikalien,Lösungsmittel und Fertigpuffer</b> | <b>Hersteller</b>              |
|---------------------------------------------------|--------------------------------|
| 0,5 M EDTA                                        | PEI Medienküche, Langen        |
| 1 kb DNA Leiter                                   | New England Biolabs, Frankfurt |
| 1 M HEPES                                         | PEI Medienküche, Langen        |

---

| <b>Chemikalien,Lösungsmittel und Fertigpuffer</b>  | <b>Hersteller</b>                |
|----------------------------------------------------|----------------------------------|
| 100 bp DNA Leiter                                  | New England Biolabs, Frankfurt   |
| 10x PBS ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$ | PEI Medienküche, Langen          |
| 10x TBE                                            | PEI Medienküche, Langen          |
| 1x PBS ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$  | PEI Medienküche, Langen          |
| 1x PBS ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$  | Gibco, Karlsruhe                 |
| 20x SSC                                            | PEI Medienküche, Langen          |
| Agarose                                            | Invitrogen, Karlsruhe            |
| Ammoniumacetat                                     | Merck KGaA, Darmstadt            |
| Ampicillin                                         | Merck KGaA, Darmstadt            |
| Bovines Serumalbumin (BSA)                         | Sigma-Aldrich, München           |
| Bromphenolblau                                     | Bio-Rad, München                 |
| Chlorophorm, p.a.                                  | Merck KGaA, Darmstadt            |
| Complete Mini Protease Inhibitor                   | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Desderman                                          | Schülkes & Mayr, Norderstedt     |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC)                         | Sigma-Aldrich, München           |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                            | Sigma-Aldrich, München           |
| Dithiotreitol (DTT)                                | Sigma-Aldrich, München           |
| DNA Polymerase I                                   | New England Biolabs, Frankfurt   |

---

---

| <b>Chemikalien,Lösungsmittel und Fertigpuffer</b> | <b>Hersteller</b>                           |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| dNTP                                              | New England Biolabs, Frankfurt              |
| EcoPol Puffer                                     | New England Biolabs, Frankfurt              |
| EDTA                                              | Merck KGaA, Darmstadt                       |
| EGTA                                              | Merck KGaA, Darmstadt                       |
| Entwickler und Fixierer                           | Agfa, Köln                                  |
| Essigsäure                                        | Merck KGaA, Darmstadt                       |
| Ethanol, p.a.                                     | Merck KGaA, Darmstadt                       |
| Ethidiumbromid                                    | Merck KGaA, Darmstadt                       |
| ExpressHyp™ Hybridization Solution                | Clontech, St-Germain-en-Laye,<br>Frankreich |
| FACS Lysing Solution                              | Becton Dickinson GmbH, Heidel-<br>berg      |
| FACS Clean                                        | Becton Dickinson GmbH, Heidel-<br>berg      |
| FACS Flow                                         | PEI Medienküche, Langen                     |
| FACS Rinse                                        | Becton Dickinson GmbH, Heidel-<br>berg      |
| Ficoll                                            | Biochrom, Berlin                            |
| Formaldehydlösung, 37%                            | Merck KGaA, Darmstadt                       |
| Glycerin                                          | Merck KGaA, Darmstadt                       |

---

---

| <b>Chemikalien,Lösungsmittel und Fertigpuffer</b> | <b>Hersteller</b>                                            |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Glycin                                            | Sigma-Aldrich, München                                       |
| Glycogen                                          | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim                             |
| Interferon- $\gamma$                              | Life Technologies Inc., Karlsruhe                            |
| Isoamylalkohol                                    | Merck KGaA, Darmstadt                                        |
| Isofluran                                         | Baxter, München                                              |
| Isopropanol, p.a.                                 | Merck KGaA, Darmstadt                                        |
| Isotonische Natriumchloridlösung (0,9%)           | PEI Medienküche, Langen                                      |
| Kaliumchlorid                                     | Merck KGaA, Darmstadt                                        |
| Ketamin                                           | Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte (WDT), Garbsen |
| Klenow-Fragment                                   | New England Biolabs, Frankfurt                               |
| Kristallviolett                                   | Sigma-Aldrich, München                                       |
| Methanol                                          | Merck KGaA, Darmstadt                                        |
| Methylcellulose (Methocel MC)                     | Sigma-Aldrich, München                                       |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin                  | Eurobio, Les Ulis Cedex, Frankreich                          |
| Natriumacetat                                     | Merck KGaA, Darmstadt                                        |
| Natriumazid                                       | Merck KGaA, Darmstadt                                        |
| Natriumchlorid                                    | Merck KGaA, Darmstadt                                        |

---

---

| <b>Chemikalien,Lösungsmittel und Fertigpuffer</b> | <b>Hersteller</b>                     |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Natriumdodecylsulfat (SDS), 10%ige Lösung         | Merck KGaA, Darmstadt                 |
| Natriumorthovanadat                               | Sigma-Aldrich, München                |
| NP40                                              | Sigma-Aldrich, München                |
| Paraformaldehyd (PFA)                             | Merck KGaA, Darmstadt                 |
| Phenol, Tris equilibriert pH 8.0                  | Sigma-Aldrich, München                |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)                | Sigma-Aldrich, München                |
| Poly-dIdC                                         | Sigma-Aldrich, München                |
| Ponceau-Rot                                       | Sigma-Aldrich, München                |
| Redivue™ <sup>32</sup> P-dCTP                     | GE Healthcare, Freiburg               |
| Rompun® TS (Xylazin)                              | Bayer AG, Leverkusen                  |
| Rotiphorese® Gel 40 (29:1)                        | Carl Roth GmbH & Co. KG,<br>Karlsruhe |
| Salzsäure, rauchend                               | Merck KGaA, Darmstadt                 |
| Streptomycin                                      | Gibco, Karlsruhe                      |
| Terralin Liquid                                   | Schülkes & Mayr, Norderstedt          |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)            | Merck KGaA, Darmstadt                 |
| Triton X-100                                      | Sigma-Aldrich, München                |
| Trypanblau-Lösung                                 | Gibco, Karlsruhe                      |
| Tween                                             | Merck KGaA, Darmstadt                 |

---

| <b>Chemikalien,Lösungsmittel und Fertigpuffer</b>  | <b>Hersteller</b>      |
|----------------------------------------------------|------------------------|
| Wasserstoffperoxid                                 | Merck KGaA, Darmstadt  |
| Xylencyanol                                        | Sigma-Aldrich, München |
| Zyklodestwasser (ddH <sub>2</sub> O), autoklaviert | PEI, Medienküche       |

#### 4.1.4 MEDIEN UND MEDIENZUSÄTZE

*Tabelle 4.4: Übersicht verwendeter Medien und Medienzusätze*

| <b>Medium</b>                  | <b>Hersteller</b> |
|--------------------------------|-------------------|
| MEM Earle's                    | Biochrom, Berlin  |
| 10x MEM                        | Gibco, Karlsruhe  |
| DMEM                           | Biochrom, Berlin  |
| GlutaMAX                       | Gibco, Karlsruhe  |
| Fetales Kälberserum (FCS)      | Biochrom, Berlin  |
| Natriumbicarbonatlösung (7,5%) | Gibco, Karlsruhe  |

#### 4.1.5 ENZYME

*Tabelle 4.5: Übersicht verwendeter Enzyme*

| <b>Enzyme</b>         | <b>Hersteller</b>       |
|-----------------------|-------------------------|
| Taq DNA Polymerase    | Qiagen, Hilden          |
| Proteinase K          | Roche, Mannheim         |
| 2,5 M Trypsin-Melnick | Medienküche PEI, Langen |



### 4.1.6 RESTRIKTIONSENZYME

Tabelle 4.6: Übersicht verwendeter Restriktionsenzyme

| Enzyme  | Restriktionsstelle                           | Hersteller                     |
|---------|----------------------------------------------|--------------------------------|
| EcoRI   | G <sup>▼</sup> AATTC<br>CTTAA <sup>▲</sup> G | New England Biolabs, Frankfurt |
| HindIII | A <sup>▼</sup> AGCTT<br>TTCGA <sup>▲</sup> A | New England Biolabs, Frankfurt |

Die Restriktionsenzyme wurden mit einem passenden Puffer geliefert und verwendet.

### 4.1.7 KITS

Tabelle 4.7: Übersicht verwendeter Kits

| Kits                                | Funktion                                                                               | Hersteller                                   |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Rediprime II Prime Labelling System | Random Radioaktive Markierung von Southern Blot Sonden                                 | GE Healthcare, Freiburg                      |
| Qiagen Plasmid Maxi Kit             | Aufreinigung von Plasmid DNA                                                           | Qiagen, Hilden                               |
| PCR Purification Kit                | Aufreinigung von PCR Produkten.                                                        | Qiagen, Hilden                               |
| IFN- $\alpha$ ELISA Kit             | Quantifizierung von IFN $\alpha$ in Seren, Zellkulturüberständen und Gewebehomogenaten | PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, USA |
| IFN- $\beta$ ELISA Kit              | Quantifizierung von IFN $\beta$ in Seren, Zellkulturüberständen und Gewebehomogenaten  | PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, USA |

| <b>Kits</b>     | <b>Funktion</b>                   | <b>Hersteller</b>            |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Renaissance-Kit | Chemolumineszenz für Western Blot | NEN Life Science, Boston USA |

#### 4.1.8 OLIGONUKLEOTIDE

Alle Oligonukleotide (*Primer*) wurden HPLC aufgereinigt von Sigma-Genosys in Steinheim bezogen.

*Tabelle 4.8: Übersicht verwendeter Oligonukleotide*

| <b>Oligomere</b> | <b>Sequenz</b>                         | <b>PCR/<br/>Verwendung</b>                             |
|------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| ΔExon10 fwd      | GGT TAA GCT CCT TGC TGC TAT CTG G      | Deletion des Exon 10 im IFNAR-Lokus                    |
| ΔExon10 rev      | TTG GAG ATG CAA TCT GCT ACT CAG C      |                                                        |
| Exon11 fwd       | GAA AGC TAG AGC TGG AGA TGC AGG G      | Amplifikation der Southern Blot Sonde                  |
| Exon11 rev       | GGA AGG GAC CTG AAT AGT GCC G          |                                                        |
| NesPr1           | CGC TTC CGC TGG GTC ACT GTC G          | Nachweis des NesCre Transgens                          |
| CRE3             | TCG TTG CAT CGA CCG GTA ATG CAG GC     |                                                        |
| IFN-U745         | CAG GCC ACT CTG CAT TTC CTC            | Nachweis einer loxP-Sequenz bzw. Nachweis des WT-Lokus |
| do2loxp          | CTT TTT GGA TCG ATC CAT AAC TTC G      |                                                        |
| do2Ex10-3'       | CTT TTT GGA TAT CAA GAA AGC AAA T      |                                                        |
| M67a             | ACG TCG ACA <u>TTT CCC GTA AAT</u> CTG | Für STAT-1 Gelshift-Assay                              |
| M67b             | CAG TCA GAT <u>TTA CGG GAA</u> ATG TCG |                                                        |

### 4.1.9 ANTIKÖRPER

Tabelle 4.9: *Verwendete Antikörper*

| Antikörper                                               | Verwendungszweck          | Hersteller                                   |
|----------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------|
| CD3                                                      | Histologie                | Serotec                                      |
| Mac-3                                                    | Histologie                | BD - Pharmingen, Heidelberg                  |
| rat anti mouse IgG <sub>2a,κ</sub> CD4-PE                | FACS                      | BD - Pharmingen, Heidelberg                  |
| rat anti mouse IgG <sub>2b</sub> CD8a-PE-Cy5             | FACS                      | Caltag Laboratories, Hamburg                 |
| anti CD8 mAk GK 2.43                                     | depletierender Antikörper | Harlan, Indianapolis, USA                    |
| anti phosphoSTAT-1 Tyr <sup>701</sup><br>(aus Kaninchen) | Western Blot              | Cell Signaling Technologies, Beverly, USA    |
| HRP-konjugierter Antikörper<br>(Schwein anti Kaninchen)  | Sekundärer Antikörper     | Dako, Glostrup, Dänemark                     |
| polyklonaler anti STAT-1<br>(C-136) (aus Kaninchen)      | Western Blot              | Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Heidelberg |

### 4.1.10 ZELLINIEN

Tabelle 4.10: *Verwendete Zelllinien*

| Zelllinie | Herkunft                           |
|-----------|------------------------------------|
| BHK-21    | <i>Baby hamster kidney</i>         |
| HeLa-S3   | humane Zervix-Karzinom-Zellen      |
| Vero      | <i>African green monkey kidney</i> |



---

|                            |                                                                                                                                     |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5x DNA-Ladepuffer:         | 30% Glycerin<br>0,125% Bromphenolblau<br>0,125% Xylencyanol<br>ddH <sub>2</sub> O                                                   |
| DEPC-Wasser:               | 1% DEPC wurden in ddH <sub>2</sub> O gegeben und das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend autoklaviert. |
| Lysepuffer:                | 100 mM Tris-HCl, pH 8,5<br>5 mM EDTA<br>0,2% SDS<br>200 mM NaCl<br>100 µg/ml Proteinase K                                           |
| Chloroform/Isoamylalkohol: | Chloroform und Isoamylalkohol wurden in einem Verhältnis von 24:1 (v/v) gemischt.                                                   |
| 10 M Ammoniumacetat:       | 10 M Ammoniumacetat in ddH <sub>2</sub> O                                                                                           |
| 3 M Natriumacetat, pH 5,2: | 3 M Natriumacetat in ddH <sub>2</sub> O,<br>der pH-Wert wird mit Eisessig eingestellt.                                              |
| <b>Für Southern Blot:</b>  |                                                                                                                                     |
| Ethidiumbromidbad:         | 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 0,5x TBE                                                                                                |
| Denaturierungslösung:      | 0,25 M HCl                                                                                                                          |
| Depurinierungslösung:      | 0,5 M NaOH,<br>0,5 M NaCl                                                                                                           |

Equilibrierungspuffer: 0,5 M Tris-HCl, pH 7.4  
0,5 M NaCl

Waschpuffer 1: 2x SSC  
0,05% SDS

Waschpuffer 2: 0,1x SSC  
0,1% SDS

Lösung zur Entfernung der  
Southernblotsonde 0,5% SDS in ddH<sub>2</sub>O

### **Für EMSA**

Oligo-Puffer 10 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM KCl  
20 mM Tris-HCl, pH 7,5

Shift-Puffer 100 mM HEPES, pH 7,9  
20 % Ficoll  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
200 mM KCl  
0,5 mM EGTA  
2,5 mM EDTA

### **Für virologische, immunologische und zellbiologische Methoden**

Verozell-/BHK- Medium: MEM mit 5% FCS und 1% Glutamax

HeLa-Medium DMEM mit 10% FCS, 1% Penicillin und 1% Streptomycin

Einfriermedium: 10% DMSO in 1x MEM

**Zur Bestimmung von Neutralisierenden Antikörpern und Virustitern:**

2% Methylcellulose: 15 g Methocel MC werden in 750 ml ddH<sub>2</sub>O über Nacht bei 4°C unter Rühren gelöst und anschließend autoklaviert.

1% Methylcellulose-Lösung in  
1x MEM: Für 100 ml:  
50 ml 2% Methylcellulose  
10 ml 10x MEM  
5,86 ml Natriumbicarbonatlösung (7,5%)  
2,5 ml 1M HEPES  
31,6 ml steriles ddH<sub>2</sub>O

Kristallviolett-Lösung: 5 g Kristallviolett  
50 ml Formaldehydlösung (30%)  
0,5 l Ethanol  
8 g NaCl  
ad 1 l mit ddH<sub>2</sub>O

**Für Western Blot:**

6x SDS Probenpuffer: 350 mM Tris-HCl  
30% Glycerol  
10% SDS  
0,6 M DTT  
0,012% Bromphenolblau, pH 6,8

Laufpuffer für PAGE: 25 mM Tris-HCl  
192 mM Glycin  
0,1% SDS

---

|                               |                                                                                             |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ponceau-Rot-Lösung:           | 0,25 g Ponceau-Rot<br>150 ml Essigsäure<br>400 ml Methanol<br>ad 1 l mit ddH <sub>2</sub> O |
| Transferpuffer:               | 48 mM Tris<br>39 mM Glycin<br>0,01 % SDS<br>20 % Methanol                                   |
| TBS:                          | 3g Tris, pH 7,4<br>8 g NaCl<br>0,2 g KCl<br>ad 1 l mit ddH <sub>2</sub> O                   |
| TBS-T:                        | TBS<br>0,2 % Tween                                                                          |
| SDS/β-Mercaptoethanol-Puffer: | 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8<br>2 % SDS<br>0,7 % β-Mercaptoethanol                              |



**Zellextraktion**

|                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|
| Gesamtzellextraktionspuffer: | 50 mM Tris-HCl, pH 7,4       |
|                              | 280 mM NaCl                  |
|                              | 0,5 % NP40                   |
|                              | 0,2 mM EDTA                  |
|                              | 2 mM EGTA                    |
|                              | 10 % Glycerol                |
|                              | 50 mM NaF                    |
|                              | 10 mM Glycerolphosphat       |
|                              | 1 mM Natriumorthovanadat     |
|                              | 1 mM DTT                     |
|                              | 0,1 mM PMSF                  |
|                              | Complete Proteaseinhibitoren |

**Sonstiges:**

|                           |                                                                                                                                                                                              |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Langzeitnarkoselösung:    | 1 ml Ketamin 10%                                                                                                                                                                             |
|                           | 0.25 ml Rompun 2%                                                                                                                                                                            |
|                           | 5 ml sterile 0,9% NaCl-Lösung                                                                                                                                                                |
| Hirnhomogenatpuffer:      | 20 mM Tris/HCl pH 7.3                                                                                                                                                                        |
|                           | 140 mM NaCl                                                                                                                                                                                  |
|                           | 0.5% Triton X-100,                                                                                                                                                                           |
|                           | 1 Tablette Complete Mini Proteaseinhibitoren                                                                                                                                                 |
|                           | 2 mM Natriumorthovanadat (Natriumorthovanadat<br>und Complete Mini wurde erst unmittelbar vor<br>Verwendung hinzugegeben.)                                                                   |
| 4% PFA-Lösung (Formalin): | 40 g PFA werden in 1 l PBS bei 70°C gelöst. Sollte<br>die Lösung nicht klar sein, werden ein paar Tropfen<br>Natronlauge hinzugegeben. Aliquotiert wurde<br>das Formalin bei -20°C gelagert. |

Fixierlösung (FACS): 10 g PFA werden in 1 l PBS bei 70°C gelöst.

FACS-Puffer: 10 g BSA  
0,15 g Natriumazid  
20 mM EDTA  
ad 500 ml mit PBS  
Puffer wurde steril filtriert.

MACS-Puffer: 1x PBS  
0,5% BSA  
Puffer wurde steril filtriert und entgast.

## 4.2 METHODEN

### 4.2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

#### 4.2.1.1 FÄLLUNG VON NUKLEINSÄURE

##### 4.2.1.1.1 Fällung mit Ethanol

Ein Volumen DNA in ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer gelöst wurde mit 1 µl Glycogen, 2 ½ Volumen kaltem Ethanol abs. (-20°C) und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 versetzt, kurz gemischt und für mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 4°C für 30 min bei 16000 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit kaltem 70% Ethanol (v/v) gewaschen. Die Proben wurden erneut für 5 min bei 16000 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das DNA-Pellet dann für etwa 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen Wasser bzw. TE-Puffer resuspendiert.

##### 4.2.1.1.2 Fällung mit Isopropanol

Ein Volumen DNA in ddH<sub>2</sub>O oder 1x TE-Puffer gelöst, wurde mit einem ¾ Volumen Isopropanol versetzt, kurz gemischt und für 30 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 70% Ethanol (v/v) gewaschen. Die Proben wurden erneut für 5 min bei 16000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde für etwa 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen Wasser bzw. TE-Puffer resuspendiert.

#### 4.2.1.2 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREKONZENTRATIONEN

Nukleinsäuren werden bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Die Absorption wurde in Quarzküvetten gemessen, da diese das UV-Licht nicht absorbieren. Nach Herstellung einer geeigneten Verdünnung der isolierten DNA in Aqua dest. wurde diese gegen einen Referenzwert (ddH<sub>2</sub>O) bei 260 nm und 280 nm gemessen. Zur Konzentrationsbestimmung diente der Wert bei 260 nm, welcher mit dem Extinktionskoeffizienten der DNA ( $\epsilon = 50$ ) und dem Verdünnungsfaktor multipliziert und anschließend

durch den Faktor 1000 geteilt wurde. Daraus ergibt sich die Konzentration der DNA in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### 4.2.1.3 PRÄPARATION VON GENOMISCHER DNA

#### 4.2.1.3.1 Präparation von genomischer DNA aus Schwanzgewebe mittels Qiagen DNeasy Tissue Kit

Die Isolation von genomischer DNA zur routinemäßigen Bestimmung des Genotyps transgener Mäuse wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits der Fa. Qiagen durchgeführt. Das Kit wurde gemäß Herstellerangaben verwendet.

#### 4.2.1.3.2 Präparation von genomischer DNA aus Organen mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Die isolierten Mausorgane wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Mörser pulverisiert. Das pulverisierte Gewebe wurde in 10 ml Lysepuffer gegeben und Proteinase K (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Endkonzentration) hinzugegeben. Das Lysat wurde für 3 Stunden oder über Nacht bei 50°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert.

Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lysat in ein 50 ml *Phase Lock Tube* überführt und ein gleiches Volumen Tris-equilibriertes Phenol hinzugegeben. Die Proben wurden vorsichtig invertiert und anschließend für 5 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert. Dabei kommt es zur Phasentrennung, bei der die untere, organische Phase durch ein Gelkissen von der oberen, wässrigen Phase getrennt ist. Anschließend wurde ein weiteres Volumen Phenol hinzugegeben und die Extraktion wiederholt.

Die obere wässrige Phase wurde in ein neues *Phase Lock Tube* überführt und je  $\frac{1}{2}$  Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) und  $\frac{1}{2}$  Volumen Phenol hinzugegeben. Die Proben wurden erneut vorsichtig gemischt und bei 1500 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Extraktion wurde noch zweimal mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol in einem frischen *Phase Lock Tube* wiederholt. Nach der letzten Extraktion wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß über-

führt. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,2 Volumen 10 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol abs. gefällt. Das Präzipitat wurde für 30 min bei 1500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Zur vollständigen Lösung wurde die DNA für 24 bis 48 Stunden im Kühlraum bei 4°C geschüttelt.

#### 4.2.1.4 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein *in vitro*-Verfahren, das die Amplifizierung definierter Nucleinsäure-Bereiche ermöglicht. Für die Reaktion werden hitzebeständige Polymerasen eingesetzt. Als DNA-Polymerase wurde entweder Taq oder HotStarTaq verwendet. Im Gegensatz zur Taq muss die HotStarTaq erst durch Inkubation von 15 Minuten bei 94°C hitzeaktiviert werden.

Für einen Reaktionsansatz mit 50 µl Gesamtvolumen wurden die folgenden Zusammensetzungen und PCR-Cyclerprogramme verwendet:

5 µl 10x PCR-Puffer (Qiagen)

5 µl 5'-Primer (5 µM)

5 µl 3'-Primer (5µM)

2 µl dNTP-Mix (je 10 mM)

3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Qiagen)

13 µl 5x Q-Solution (Qiagen)

0,2 µl Taq (5 units/µl)

11,8 µl ddH<sub>2</sub>O

5 µl DNA-Lösung (über DNeasy Tissue Kit aufgereinigt)

Tabelle 4.12: Schema PCR-Programm

| Temperatur | Zeit   | Zyklen |                                                 |
|------------|--------|--------|-------------------------------------------------|
| 94°C       | 4 Min  | 1      |                                                 |
| 94°C       | 30 s   | } 35   | Denaturierung der doppelsträngigen Matrizen-DNA |
| 58°C       | 30 s   |        | Hybridisierung der Oligonukleotide              |
| 72°C       | 60 s   |        | Synthese des Doppelstrangs                      |
| 72°C       | 10 Min | 1      |                                                 |

Alle Parameter der PCR müssen für jede Reaktion optimiert werden.

#### 4.2.1.5 RESTRIKTIONSVERDAU VON DNA

Restriktionsendonukleasen spalten Phosphodiesterbindungen an spezifischen, meist palindromischen Erkennungssequenzen. Man unterscheidet Restriktionsendonukleasen vom Typ I, II und III. In der Molekularbiologie werden hauptsächlich Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, bei denen die Erkennungsstelle auch der Schnittstelle entspricht. Für den Southern Blot wurden 20 µg genomische DNA mit 14 µl Enzym (140 *units*) in dem zugehörigen Puffer verdaut.

#### 4.2.1.6 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

DNA-Fragmente können mit Hilfe eines Agarosegels entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch die negativ geladenen Phosphatreste der DNA wandert diese im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode.

Kleinere DNA-Fragmente können im elektrischen Feld im Vergleich zu größeren die Gelmatrix schneller durchlaufen. Diese Eigenschaft wird zur Auftrennung nach Größe genutzt.

Für den Nachweis und Auftrennung von DNA wurden Agarosegele unterschiedlicher Konzentrationen verwendet. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TBE-Puffer unter Erwärmung gelöst. Für den anschließenden Nachweis der DNA im Agarosegel wurden 2,2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugesetzt. Vor dem Auftragen wurden 10 µl DNA-Lösung mit 2 µl 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Der Probenpuffer enthielt Glycerin, der die DNA-Lösung beschwert, sie dadurch zum Taschenboden bringt und ihre Diffusion aus den Taschen verhindert.

An die Elektrophoresekammer wurde, wenn nicht anders beschrieben, eine Spannung von 110 Volt angelegt und das Agarosegel nach ca. 45 min. unter dem UV-Licht fotografiert. Aufgrund der Interkalierung des fluoreszierenden Ethidiumbromids erschien im UV-Licht an der Stelle der DNA eine leuchtende Bande. Mit dem ebenfalls auf das Gel aufgetragenen Größenstandard war eine Zuordnung der Bande zu einer bestimmten Größe möglich.

#### **4.2.1.7 RADIOAKTIVER SOUTHERN BLOT**

Beim Southern Blot handelt es sich um eine 1975 von Edwin Southern entwickelte Methode zum Nachweis einer bestimmten Gensequenz in einem komplexen DNA-Gemisch (z.B. genomische DNA), ohne dass sämtliche Sequenzen des Gemisches bekannt sein müssen. Hierzu findet ein Transfer von DNA aus einem Agarosegel auf eine Trägermembran mittels Vakuum statt (*blotting*). Die übertragene DNA wird dann mit einer sequenzspezifischen radioaktivmarkierten Sonde hybridisiert und über einen Röntgenfilm detektiert.

Für den Southern Blot wurden 20 µg genomische DNA spezifisch mit Restriktionsendonukleasen verdaut und anschließend über Nacht bei 35 Volt in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Am nächsten Morgen wurde das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und fotografiert. Im Anschluss wurde das Gel für 15 min. in 0,25 M HCl geschwenkt, was dazu führt, dass die DNA depurinieren wird. Danach wurde das Gel kurz gewässert und für 30 min. in Denaturierungspuffer geschwenkt. Nach erneutem Wässern und 15 min. schwenken in Neutralisierungspuffer wurde die DNA im Vakuumblotter bei einem Unterdruck von 3,5- 4 mmHg für 90 min. auf die Nylonmembran übertragen. Nach der

Übertragung der DNA wurde diese unter 0,12 J UV-Licht mit der Membran quervernetzt.

Die Membran wurde dann für mindestens eine Stunde bei 60°C im 30 ml *ExpressHyb Buffer* prähybridisiert. Während dessen wurde 20 ng der Southern Blot-Sonde mit Hilfe des *Rediprime Labelling Systems* (vergl. 4.2.1.8) radioaktiv markiert und nach Denaturierung zur Membran hinzugegeben. Die Sonde wurde dann mit der Membran über Nacht bei 60°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran bei Raumtemperatur mit dem Waschpuffer 1 für 30-40 Minuten gewaschen. Dabei wurde der Puffer mehrmals gewechselt. Im Anschluss wurde der Southern Blot für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Waschpuffer 2 gewaschen, wobei der Puffer einmal ausgetauscht wurde. Danach erfolgte für 10 min. ein Waschschrift mit Waschpuffer 2 bei 58°C im Schüttelwasserbad.

Anschließend wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt, ein Röntgenfilm aufgelegt und die Kassette bei -70°C gelagert. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte nach 1-2 Wochen.

#### **4.2.1.8 RADIOAKTIVE MARKIERUNG DER SOUTHERN BLOT-SONDE**

Die 20 ng der Southern Blot-Sonde wurden mit dem *Rediprime II Random Prime Labeling Systems* und radioaktiv markiertem dCTP nach Herstellerangaben markiert. Die Syntheszeit der Sonde wurde auf 30 Minuten erhöht. Freie Nukleotide wurden von der markierten DNA-Sonde chromatographisch durch 3-minütige Zentrifugation bei 700 x g in Microspinsäulen abgetrennt.

#### **4.2.1.9 ENTFERNUNG DER SOUTHERN BLOT SONDE**

Zur Entfernung der Sonde wurde der hybridisierte Southern Blot für 10 Minuten in einer 90-100°C heißen 0,5%igen SDS-Lösung inkubiert und anschließend erneut prähybridisiert und mit markierter Sonde hybridisiert.

#### **4.2.1.10 ELEKTROPHORETIC GEL MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)**

Für DNA-Bindestudien wurden doppelsträngige Oligonukleotide mit singulären Binde-sequenzen (M67a/b) verwendet. Für die Hybridisierung wurden die komplementären



Oligonukleotide in Oligo-Puffer aufgenommen, 5 min. bei 95°C erhitzt und anschließend langsam bis auf Raumtemperatur abgekühlt.

Für die Sonden-Herstellung wurden die 5'-ACGT-3'- bzw. 5'-CAGT-3'-Übergänge bei M67a/b mit radioaktiv markierten Nukleotiden in einer durch Klenow-Polymerase katalysierten Reaktion aufgefüllt. Dazu wurden 0,1 ng doppelsträngige Oligonukleotide und je 8 µl der vier [<sup>32</sup>P]-markierten dNTP in Konzentrationen von 3 mM bei spezifischen Aktivitäten von 370 MBq/ml mit 1 µl Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (Aktivität pro Reaktion 5 U) in 50 µl EcoPol-Puffer bei Raumtemperatur für 25 min. inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde durch 5-minütige Inkubation von 1 µl einer wässrigen Lösung bestehend aus je 6,5 mM der vier nicht-radioaktiven dNTP und nachfolgend 1 µl einer 0,5 M EDTA-Lösung gestoppt. Freie Nukleotide wurden von der markierten DNA-Sonde chromatographisch durch 3-minütige Zentrifugation bei 700 x g in Microspinsäulen abgetrennt.

In jeder Shift-Reaktion wurden 4,5 µl Zellextrakt mit 1 µl der radioaktiv-markierten DNA-Probe, 1 µl einer Polydesoxyinosidphosphatdesoxycytidinphosphat-Lösung (Poly-dIdC, mittlere Länge ca. 800 bp) der Konzentration 2 mg/ml, 4 µl H<sub>2</sub>O und 2,5 µl Shift-Puffer für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Die gebildeten Protein-DNA-Komplexe wurden in nativen, äquilibrierten 4,8%igen Polyacrylamidgelen, bestehend aus Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 40 in 0,25-fachem TBE bei 400 V und 4°C für 90 min. aufgetrennt (Fried und Crothers, 1981). Gebundene Radioaktivität wurde in den Vakuum-getrockneten Gelen mit Hilfe des Phospho-Imagers Storm 820 detektiert.

## **4.2.2 ZELLKULTURTECHNIKEN**

### **4.2.2.1 ARBEITEN MIT ZELLKULTUREN**

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer sterilen Werkbank mit vertikaler Luftströmung durchgeführt. Die Arbeitsfläche und die benutzten Geräte wurden vor und nach dem Arbeiten mit Terralin Liquid desinfiziert. Es wurden neben Einwegverbrauchsmaterialien nur autoklavierte oder steril filtrierte Lösungen oder Medien

verwendet. Vor dem Beginn der Arbeit wurden alle Lösungen und Medien auf 37°C vorgewärmt.

#### **4.2.2.2 KULTURBEDINGUNGEN FÜR EUKARYONTISCHE ZELLEN**

BHK, HeLa und Vero-Zellen wurden bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchte kultiviert.

#### **4.2.2.3 PASSAGIEREN VON ZELLEN**

Wenn die Zellen in der Zellkulturflasche eine Konfluenz von etwa 80% erreicht haben, sollten sie passagiert werden. Die Zellen wurden zunächst in PBS gewaschen. Dies dient dazu Calciumionen die sich im Medium befinden zu entfernen, da diese bei Zugabe von Trypsin Komplexbildungen vollziehen, wodurch sich die Zellen nicht von der Zellkulturflasche lösen können. Nach dem Entfernen der Calciumionen wurden die Zellen mit ca. 5 ml Trypsin (0,5 %) abgelöst. Mit Medium wurde nun auf ein geeignetes Volumen aufgefüllt (in der Regel 10 ml) und je nachdem in welchem Verhältnis passagiert wird, Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium überführt. Wurden die Zellen beispielsweise 1:10 passagiert, wurde bei einem Volumen von 10 ml, 1 ml der Zellen in einer frischen Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium weitergeführt.

#### **4.2.2.4 EINFRIEREN VON ZELLEN**

Die Zellen werden für die Lagerung im Stickstoff in Medium mit 10% DMSO eingefroren. DMSO diffundiert durch die Zellmembran und ersetzt das Wasser innerhalb der Zelle. So wird verhindert, dass sich Eiskristalle beim Einfriervorgang bilden können, welche die Zellstruktur zerstören würden.

Zum Einfrieren wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in PBS gewaschen, danach wurden diese trypsinisiert, in Medium resuspendiert und anschließend für 3 min. bei 300 x g. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in dem Einfriermedium resuspendiert und im entsprechenden Volumen eingefroren. Aus einer T175 Zellkulturflasche erhielt man bei einer Konfluenz von 80% etwa drei Nunc Gefäße à 1 ml. Die Zellen werden in einer Einfrierbox, die ein langsames Absinken der

Temperatur von 1°C/Stunde ermöglicht, auf -80°C gelagert und konnten nach einigen Tagen in den flüssigen Stickstoff gegeben werden.

#### **4.2.2.5 LAGERUNG VON ZELLEN**

Zellen können mehrere Jahre in einem speziellen Einfriermedium in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert werden.

#### **4.2.2.6 AUFTAUEN VON ZELLEN**

Bevor die in Medium mit 10% DMSO eingefrorenen Zellen wieder in Kultur genommen werden können, muss zunächst das DMSO aus dem Medium entfernt werden. Hierfür wurden die Zellen mit 5 ml Medium in ein Zentrifugenröhrchen aufgenommen und für 3 min. bei 300 x g. zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, werden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche gegeben. Mit Medium wurde auf das entsprechende Volumen aufgefüllt.

#### **4.2.2.7 ZELLZAHLBESTIMMUNG**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer und gab zudem Auskunft über den Vitalitätszustand der Zellen. Hierzu wurde ein Vitalitätstest durchgeführt, der auf der Tatsache beruhte, dass tote Zellen eine veränderte Membranpermeabilität aufweisen. Farbstoffe, die nicht die Membran lebender Zellen passieren können, gelangen jedoch in tote Zellen hinein. Hierfür verwendet man zum Beispiel Trypanblau. Beim Auszählen der Zellen ist darauf zu achten, keine Zellaggregate auszuzählen, da dies die Genauigkeit der Zählung beeinflussen kann.

Die Zellsuspension wurde mit Trypanblau seriell in log<sub>2</sub> Stufen verdünnt. Eine entsprechende Verdünnung wird auf die Neubauer-Zählkammer gegeben und vier Großquadrate à 16 Kleinquadraten ausgezählt. Zellen, die auf einer der Linien der angrenzenden Quadrate liegen, sollten nicht doppelt gezählt werden.

Da jedes ausgezählte Quadrat eine Fläche von 0,04 mm<sup>2</sup> besitzt und eine Tiefe von 1 mm aufweist, ergibt sich ein Volumen von 0,004 µl. Die ermittelte Zellzahl wird daher mit 10<sup>4</sup> und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt nach der unten angegebenen Formel:

$$C = N \cdot V \cdot 10^4 \quad (4.1)$$

$C$  = Zellen pro ml

$N$  = Mittelwert der gezählten Zellen

$V$  = Verdünnungsfaktor

$10^4$  = Kammerfaktor für  $1 \text{ mm}^2$

### **4.2.3 TIEREXPERIMENTELLE TECHNIKEN**

Alle Mausexperimente wurden entsprechend der gesetzlichen Leitlinien zur Durchführung von Tierversuchen durchgeführt.

#### **4.2.3.1 MAUSHALTUNG**

Alle Mauslinien wurden unter SPF-Bedingung im S1 Bereich der zentralen Tierhaltung des Paul-Ehrlich-Institut gezüchtet und gehalten. Zu Beginn eines Experiments wurden die Mäuse in den experimentellen Mausraum (S2) transferiert. In beiden Räumen sitzen die Mäuse in einzelbelüfteten Käfigen in gleichgeschlechtlichen Gruppen von bis zu 5 Tieren. Nur zu Zuchtzwecken wurden auch gegenschlechtliche Gruppen gehalten.

#### **4.2.3.2 MAUSZUCHT UND –SCREENING**

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten transgenen Mäuse wurden im Paul-Ehrlich-Institut von Dorothea Kreuz gezüchtet. C57BL/6 Mäuse wurden über die Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln bezogen. Die Genotypen wurden über PCR verifiziert.

#### **4.2.3.3 MAUSNARKOSE**

##### **4.2.3.3.1 Kurzzeitinhalationsnarkose**

Zur Kurzzeitinhalationsnarkose wurde in ein Glas mit Deckel 1-2 ml Isofluran gegeben und mit etwas Zellstoff überdeckt. Die Maus wurde in das Glas gegeben und bis zur

Narkose beobachtet. Nach dem Herausnehmen der Mäuse blieben sie noch etwa 30 Sekunden in Narkose.

#### 4.2.3.3.2 Langzeitnarkose

Den Mäusen wurden pro 10 g Körpergewicht 100 µl Ketamin/Rompun *i.p.* gespritzt. Nach einer Inkubation von etwa 15 Minuten lagen die Mäuse in Vollnarkose (Überprüfung des Zwischenzehenreflexes).

#### 4.2.3.4 MAUSTÖTUNG

Die Mäuse wurden mit Isofluran betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet.

#### 4.2.3.5 RETROORBITALE BLUTENTNAHME

Die Mäuse wurden mittels Isofluran für kurze Zeit betäubt. Dabei wurde die Atmung der Mäuse genau überwacht, um einen Atemstillstand zu vermeiden. Durch festes Halten der Maus im Nacken wurde das Blut gestaut und die Augen traten hervor. Die Pasteur-Pipette wurde von vorn seitlich hinter das Auge geführt. Durch mechanisches Drehen der Pipette wurde eine Läsion an der Augenvene gesetzt, welche einen Blutsog in die Pipette bewirkte. Pro Blutung wurde ein Volumen von 100 bis 200 µl Blut abgenommen.

#### 4.2.3.6 VIRUSINFEKTION VON MÄUSEN

##### 4.2.3.6.1 Intranasale Infektion

Zur intranasalen Infektion wurden die Mäuse in Vollnarkose gelegt (siehe 4.2.3.3.2) und anschließend das in PBS verdünnte Virus in einem Gesamtvolumen von 10 µl vorsichtig in die Nase pipettiert.

##### 4.2.3.6.2 Intravenöse Infektion

Um eine intravenöse Injektion in die Schwanzvene zu erleichtern, wurden die Mäuse ca. 10 min unter Rotlicht aufgewärmt. Die Menge des zu injizierenden Virus wurde in 200 µl PBS 0,1% BSA pro Maus gelöst. Die Maus wurde in einer Röhre fixiert, die den

Schwanz leicht zugänglich machte. Die Kanüle wurde in einem sehr flachen Winkel in die Schwanzvene eingeführt und der Spritzeninhalt injiziert.

#### **4.2.3.7 PERFUSION**

Die Mäuse wurden zunächst mit Ketamin/Rompun anästhesiert (siehe 4.2.3.3.2) und anschließend auf dem Präparierblock aufgespannt und der Thorax geöffnet. In den linken unteren Ventrikel wird über eine *Butterfly*-Kanüle ein Zugang gelegt, über den 0,9%ige NaCl-Lösung in die Maus geleitet wurde. In den rechten unteren Ventrikel wurde mit einer Schere in kleines Loch hinein geschnitten, über welches das Blut ablaufen kann. Die NaCl-Lösung wurde mittels Gravitation in die Maus geleitet und durch den verbleibenden Herzschlag in alle Organe gepumpt und diese so von dem Blut befreit.

#### **4.2.4 HISTOLOGISCHE TECHNIKEN**

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Histologien wurden aus Formalin-fixierten Organen am Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen erstellt (Gruppe Dr. M. Prinz). Hierfür wurden die Gewebe in Paraffin eingebettet, geschnitten, anschließend H&E sowie anti Mac-3 für Macrophagen oder anti CD3 Antikörpern für T-Zellen gefärbt (Prinz et al., 2006).

#### **4.2.5 IMMUNOLOGISCHE UND VIROLOGISCHE TECHNIKEN**

##### **4.2.5.1 ANZUCHT VON VESIKULÄREM STOMATITIS VIRUS**

In T175 Zellkulturflaschen wurden BHK Zellen zu konfluenten Monolayern wachsen gelassen. Das Medium wurde entfernt und VSV in einer MOI 0,1 in 3 ml MEM mit 2% FCS zu den Zellen gegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden weitere 27 ml Medium hinzugegeben und die Zellen für 48 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird das Medium abgenommen und Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 300 x g für 6 Minuten entfernt.

#### 4.2.5.2 VSV-NEUTRALISATIONSTEST

Der VSV Neutralisationstest dient dazu, VSV-neutralisierende Antikörper (IgG und IgM) aus Seren nachzuweisen. Dazu wurden zunächst in 96-well Flachbodenzellkulturplatten je 100 µl einer Verozellsuspension ( $2 \times 10^5$  Zellen/ml in Medium) gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Zum unabhängigen Nachweis von IgG wurden vorhandene IgM-Moleküle durch Reduktion mit  $\beta$ -Mercaptoethanol zerstört. Hierzu wurden 10 µl Serum mit 10 µl 280 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol bei Raumtemperatur vorbehandelt. Die vorbehandelten und nicht vorbehandelten Seren wurden mit Medium 1:20 bzw. 1:40 vorverdünnt und für 30 Minuten bei 56°C inkubiert. Dabei wurden die Bausteine des Komplementsystems hitzeinaktiviert. Zu 100 µl der verdünnten Seren wurden je 100 µl VSV in einer Konzentration von  $10^3$  pfu/ml gegeben und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert.

Von den am vorherigen Tag ausgesäten Verozellen wurde das Medium entfernt und je 100 µl der Virus-Serum-Mischung zugegeben. Nach einer 60 minütigen Inkubation bei 37 °C wurde das Medium mit 1%iger Methylcellulose überschichtet und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Kristallviolett überschichtet. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Farblösung mit Leitungswasser gewaschen und die Platten luftgetrocknet.

Die höchste Serumverdünnung, bei der 50% der Virusplaques reduziert sind, bestimmt den Antikörpertiter (Charan und Zinkernagel, 1986).

#### 4.2.5.3 BESTIMMUNG VON VIRUSTITERN (PLAQUE-ASSAY)

Am Tag vor Durchführung des Plaque-Assays wurden in 6-Well Flachbodenzellkulturplatten je 3 ml einer Verozellsuspension ( $2 \times 10^5$  Zellen/ml in Medium) eingesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zur Bestimmung von Virustitern aus Organen wurden diese in 1 ml Medium mit Hilfe des FastPrep-Homogenisators homogenisiert und das Homogenat in seriellen 1:10 Schritten verdünnt. Je 1 ml der Verdünnungen wurde auf den konfluenten Zellrasen gegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. An-

schließlich wurde das Medium vorsichtig mit 1%iger Methylcellulose überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Kristallviolett überschichtet. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Farblösung mit Leitungswasser gewaschen und die Platten luftgetrocknet.

Die Plaques werden ausgezählt und der Titer ergibt sich nach der Formel:

$$pfu / ml = N \cdot V^{-1} \quad (4.2)$$

$N$  = Anzahl der Plaques

$V$  = Verdünnung

#### 4.2.5.4 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Messungen erfolgten am LSRII von Becton Dickinson und wurden mit dem Diva-FACS Analyse Programm ausgewertet.

Beim FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) handelt es sich um eine Methode der Durchflusszytometrie, daher kann sie nur an Zellen in Suspension angewendet werden. Sie ermöglicht unter anderem eine quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Die Zellen werden mit monoklonalen Antikörpern, die gegen bestimmte Oberflächenmoleküle gerichtet und Fluorochrom konjugiert sind, markiert. Zur Analyse werden die Zellen in einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photonendetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge



an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Die Lichtsignale werden proportional zur Lichtstärke in elektronische Signale umgewandelt.

Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur der Zelle gewonnen. Anhand des Vorwärtslichtes erhält man Informationen über die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht ermöglicht Aussagen über ihre Granularität.

Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

Die Darstellung im Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht ermöglicht durch das Setzen eines Rahmens die Auswahl bestimmter Zellpopulationen sowie den Ausschluss von Zelltrümmern und toten Zellen.

#### **4.2.5.5 ANTIKÖRPERFÄRBUNG VON ZELLEN**

Standardmäßig wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  (FACS-Puffer) gefärbt. Nach Zugabe der Antikörper folgten 15 Minuten Inkubation im Kühlschrank. Wurden direkt Blutzellen gefärbt, wurde 1 ml *FACS Lysing Solution* hinzugegeben, die die Erythrozyten lysierte und gleichzeitig die Zellen fixierte, und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation bei 300 x g für 5 min abgekippt und verworfen. Anschließend wurden die Proben mit mindestens 1 ml FACS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand abgekippt

#### **4.2.5.6 WESTERN BLOT**

Zelluläre Extrakte wurden im Western-Blot-Verfahren auf das Ausmaß der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT-1 untersucht. Dazu wurden je 10  $\mu\text{l}$  der Lysate in 2  $\mu\text{l}$  6x SDS-Probenpuffer aufgenommen und in 7%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen unter Standardbedingungen in Laufpuffer bei 200 V aufgetrennt (Laemmli et al., 1970). Der anschließende, 40-minütige Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose-Membran erfolgte im Semi-Dry-Verfahren bei 18 V. Anschließend wurde die Membran für 1 Std. mit 4 % BSA in TBS-T geblockt und für eine weitere Stunde

mit dem polyklonalem Phosphospezifischem Anti-STAT-1-Tyr<sup>701</sup>-Antikörper bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T erfolgte eine 45-minütige Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Schwein-Anti-Kaninchen-Immunglobulinen. Spezifisch gebundene Antikörperkomplexe wurden nach weiteren drei Waschprozeduren in TBS-T und zuletzt in TBS über ihre Peroxidase-Aktivität in einer Chemilumineszenzreaktion mit Hilfe des Renaissance-Kits nachgewiesen. Zur Photodokumentation wurden die Membranen in dem Lumi-Imager digital erfaßt.

#### **4.2.5.7 ENTFERNUNG DER ANTIKÖRPERBINDUNG VOM WESTERN BLOT**

Zur Bestimmung des STAT-1-Expressionsniveaus wurden die in der ersten Reaktion gebundenen Antikörper für 40 min. bei 50°C in SDS/β-Mercaptoethanol-Puffer wieder entfernt und die Blot-Membranen anschließend mit STAT-1-spezifischen polyklonalen Antikörpern inkubiert.

#### **4.2.5.8 HERSTELLUNG VON HIRNHOMOGENATEN FÜR ELISA**

Hirngewebe wird in einer passenden Menge Hirnhomogenatpuffer in der FastPrep homogenisiert. Anschließend wird das Homogenat für 15 min bei 16.000 x g bei 4°C zentrifugiert und der klare Überstand für den ELISA verwendet.

#### **4.2.5.9 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)**

Diese Methode erlaubt einen qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen in Zellkulturüberständen, Seren oder Gewebhomogenaten. Der ELISA bedient sich eines Enzyms als Marker. Die Proteinkonzentration kann so anhand des Substratumsatzes bestimmt werden. Es wurde für sämtliche Experimente ein *Sandwich*-ELISA verwendet. Hierbei wurden die monoklonalen Antikörper auf der Mikrotiterplatte gebunden. So wurde das in den Zellkulturüberständen, Serum oder Homogenat vorkommendes Protein im ersten Schritt über die Antikörper auf der Platte gebunden. Nach Wegwaschen der ungebundenen Proteine wurde ein spezifischer Enzym-gekoppelter polyklonaler Antikörper zugegeben, der wiederum an das gebundene Protein auf der Platte bindet. Bei dem Enzym handelte es sich in den hier angewendeten Tests um die Meerrettich-Peroxidase (HRP). Nach erneuten Waschsritten, um das ungebundene

Enzym-Reagenz zu entfernen, wurde eine Substratlösung zugesetzt. Als Substrat wirkte hier Tetramethylbenzidin (TMB). Durch Umwandlung des TMB durch die Peroxidase wird ein blaugefärbtes Produkt gebildet, das sich nach Zugabe der Stop-Lösung gelb verfärbt. An einem *ELISA-Reader* konnte anschließend die Absorption der Lösung bestimmt werden. Dabei verhielt sich die Farbintensität proportional zur gebundenen Proteinmenge. Über eine Standardreihe, die in jedem Test mitgeführt wird, können die genauen Konzentrationswerte der Proteine ermittelt werden.

Die genauen Arbeitsschritte wurden gemäß dem dem Kit beiliegenden Protokoll durchgeführt.

#### **4.2.5.10 FRAKTIONIERTE ZELLEXTRAKTION**

Von Gewebeproben wurden entweder cytoplasmatische, nukleare oder Gesamtzell-extrakte gewonnen.

Cytoplasmatische Extrakte wurden durch Zugabe von 150 µl cytoplasmatischem Extraktionspuffer erhalten. Die Gewebe wurden fünfmal in einer 200 µl Pipettenspitze auf- und abpipettiert und für 5 min. auf Eis lysiert. Die Extrakte wurden bei 16000 x g für 10 Sekunden zentrifugiert und die Überstände dann für weitere 5 min. bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände dieses letzten Zentrifugationsschrittes wurden als cytoplasmatische Extrakte für Western Blot Untersuchungen oder Gelshift-Assays portioniert, auf Trockeneis eingefroren und dann bei -80°C gelagert. Das Pellet der ersten Zentrifugation wurde in 150 µl nuklearem Extraktionspuffer aufgenommen und für weitere 30 min. auf Eis aufgeschlossen. Nukleäre Extrakte wurden nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 16000 x g und 4°C in den Überständen enthalten und ebenfalls bis zu ihrer weiteren Verwendung auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden die Gewebe in 150 µl Gesamtzell-Extraktionspuffer aufgenommen. Die Gewebe wurden durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren und anschließender 30-minütiger Inkubation auf Eis lysiert. Die Extrakte wurden für 5 min. bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert und die portionierten Überstände auf Trockeneis eingefroren.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 EIN NEUES MAUSMODELL ZUM STUDIUM DER ROLLE DER TYP I INTERFERONE IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM

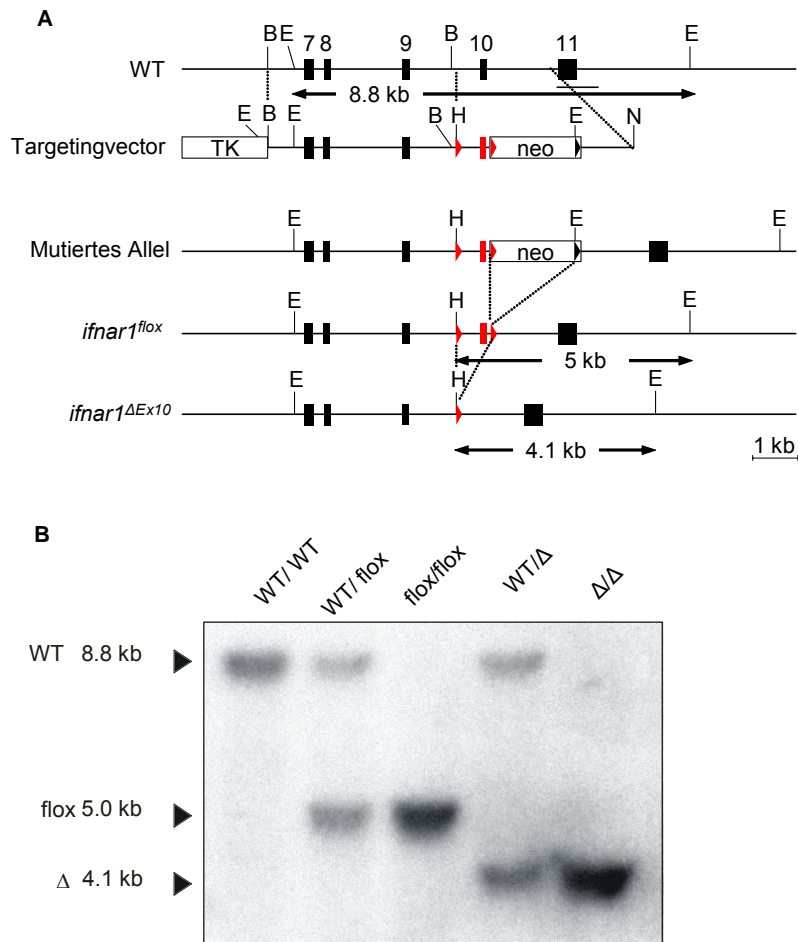
#### 5.1.1 GENERIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER GENTECHNISCH VERÄNDERTEN MAUSLINIE MIT EINER GEWEBESPEZIFISCHEN DELETION DES TYP I INTERFERONREZEPTORS IM ZENTRALEN NERVENSYSTEMS

Es ist bekannt, dass virale Infektionen in der Peripherie des Körpers durch das Immunsystem bekämpft werden. Es wird davon ausgegangen, dass nur wenn die periphere Immunabwehr versagt, es möglich ist, dass das Virus das zentrale Nervensystem (ZNS) infiziert. Eine zentrale Rolle in der angeborenen und adaptiven Immunabwehr spielen die Typ I Interferone. Mäuse ohne Typ I Interferonrezeptor (IFNAR<sup>-/-</sup>), und somit ohne funktionelles Typ I Interferonsystem, sind im Gegensatz zu WT Mäusen nicht in der Lage, Virusinfektionen zu kontrollieren und sterben innerhalb weniger Tage nach Infektion mit dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) (Müller et al., 1994). Um zu überprüfen, ob die These, dass antivirale Aktivitäten nur in der Peripherie eine Rolle spielen, zutrifft, wurde durch Ulrich Kalinke ein Mausmodell entwickelt, das es ermöglicht, das Interferonsystem gewebsspezifisch im ZNS auszuschalten. Auf der Basis der Cre loxP-Technologie wurde hierfür zunächst eine Mauslinie hergestellt, die einen konditionellen *ifnar1*-Lokus trägt. Das heißt, dass bei dieser Mauslinie Genelemente, die für die Funktion des *ifnar1* Gens essentiell sind, mit den loxP Erkennungssequenzen der Rekombinase Cre (von *Causes Recombination*) flankiert wurden. Durch Kreuzen dieser Mauslinie mit anderen gentechnisch veränderten Mauslinien, die die Rekombinase Cre spezifisch in bestimmten Zelltypen oder Geweben exprimieren, können Mäuse mit einer Zelltyp oder Gewebe-spezifischen *ifnar1* Deletion gezüchtet werden (Kamphuis et al., 2006).

Durch zielgerichtete Mutagenese (*Gene Targeting*) der IFNAR- $\alpha$ -Kette mit einem *Targeting*-Vektor, der neben den Exons 7-10 eine Neomycin-Resistenz-Kassette (*neo*) und

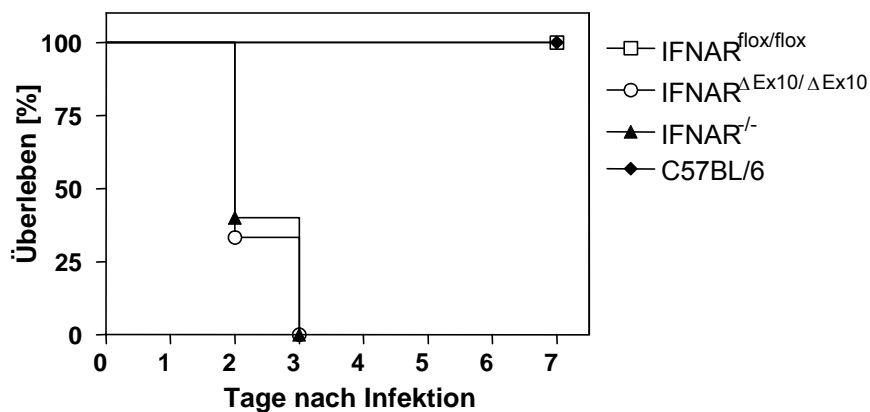
eine Thymidinkinase-Kassette (TK) enthielt, wurden murine embryonale Stammzellklone generiert, die ein mit loxP-Sequenzen flankiertes Exon10 sowie eine loxP flankierte *neo*-Kassette enthalten. LoxP-Sequenzen (von *Locus of Crossingover* (X)) sind 34 Basenpaar (bp) lange palindromische Sequenzen aus dem Bakteriophagen P7 (Orban et al., 1992; Sauer und Henderson, 1988), die durch die Rekombinase Cre erkannt werden. Die flankierte Sequenz wird mitsamt einer der beiden loxP-Sequenzen herausgeschnitten und anschließend abgebaut, so dass es zu einer Deletion des flankierten Genabschnitts kommt.

Murine embryonale Stammzellen der Zelllinie IB10, die ursprünglich aus Blastozysten der Mauslinie SV126 isoliert worden ist, wurden mit dem *Targeting*-Vektor durch Elektroporation stabil transfiziert. Durch homologe Rekombination wurde die mutierte Sequenz in den *ifnar1*-Genloкус integriert, wobei die TK-Kassette deletiert wurde. Durch positive Selektion auf Neomycin-Resistenz und negative Selektion auf die TK-Kassette. Die TK-Kassette liegt außerhalb der homologen Arme und entfällt bei einer erfolgreichen homologen Rekombination, wohingegen sie bei einer zufälligen Integration oft in das Mausgenom integriert wird. Durch die Thymidin-Kinase werden Stoffe wie Gancyclovir oder Cymevene in toxische Stoffe umgewandelt, die die Zelle dann töten (Mansour et al., 1988). Im nächsten Schritt wurden Klone mit erfolgreicher homologer Rekombination durch PCR identifiziert. Mittels Southern Blot Analyse wurde die gewünschte Mutation bestätigt. Durch anschließende transiente Cre-Expression wurde die loxP flankierte Neo-Kassette entfernt und die Stammzellen mit dem so entstandenen *ifnar1<sup>fllox</sup>* Allel in Blastocysten mikroinjiziert. Die mikroinjizierten Blastozysten wurden in scheinsschwangere Mäuse transferiert, in denen sich chimäre Nachkommen entwickelten, die sowohl Erbinformationen der mutierten Stammzelle als auch der Blastocyste enthielten. Durch Kreuzung der chimären Nachkommen und nach erfolgreicher Keimbahntransmission wurden heterozygote IFNAR<sup>fllox/WT</sup> erhalten, die weiter verkreuzt wurden, um homozygote IFNAR<sup>fllox/fllox</sup> Mäuse zu züchten.



**Abb. 5.1:** Schematische Darstellung der genetischen Basis für die Herstellung von gentechnisch veränderten Mäusen mit einem konditionellen Typ I Interferonrezeptors und Nachweis des Genotyps durch Southern Blot Analyse. Für die zielgerichtete Mutagenese des *ifnar1* Gens wurde das Exon 10 durch zwei *loxP*-Sequenzen flankiert. Nach homologer Integration des *Targeting*-Vektors in das Genom muriner embryonaler Stammzellen (Mutiertes Allel) wurde die ebenfalls *loxP* flankierte Neo-Kassette durch transiente Cre-Expression entfernt (*ifnar1<sup>flox</sup>*). Nach Blastozysteninjektion erhielt man chimäre Mäuse, die durch weitere Kreuzung mit WT Tieren das IFNAR<sup>flox</sup> Allel an Nachkommen weiter gaben. Nach Kreuzung mit Deleter-Cre Mäusen, wurden Mäusen mit einer ubiquitären Deletion des Exon 10 gezüchtet (IFNAR<sup>ΔEx10/ΔEx10</sup>). Mäuse mit einer hirnspezifischen Deletion des Exon 10 wurden durch Kreuzung von IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen mit NesCre<sup>+/-</sup> Mäusen, die Cre ZNS-spezifisch exprimieren, erreicht.

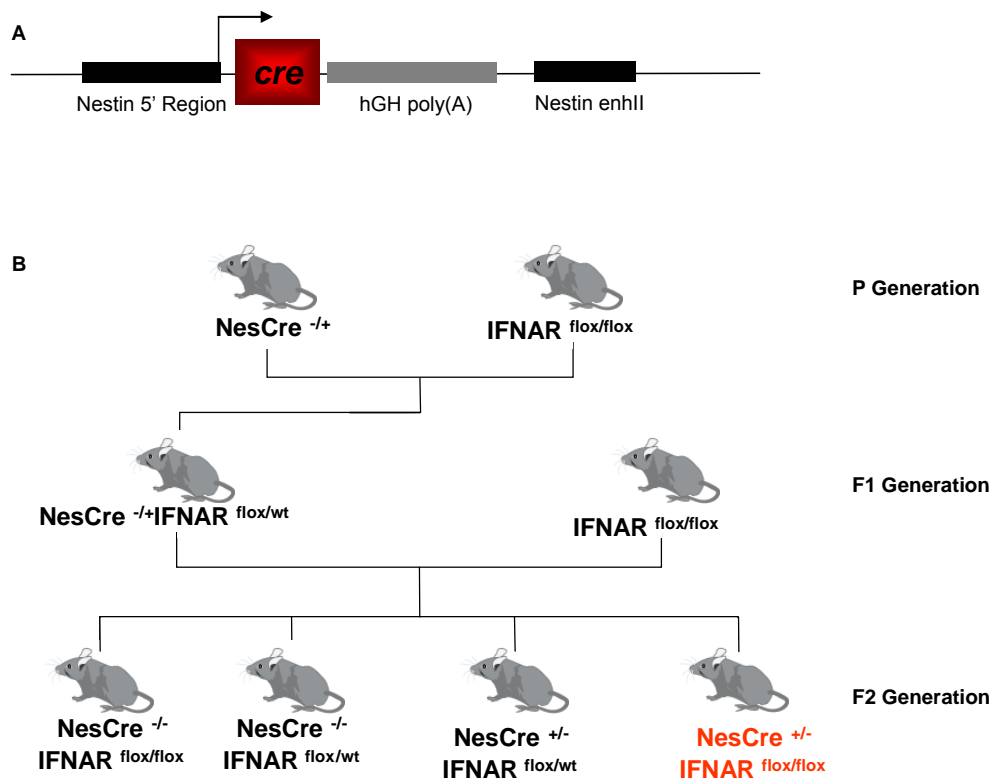
Die Funktionalität des Interferonsystems in den IFNAR<sup>flx/flx</sup> Mäusen wurde durch intravenöse Infektion mit VSV gezeigt. IFNAR<sup>flx/flx</sup> Mäuse sind gegenüber der Virusinfektion genauso resistent wie WT Kontrollen (U. Kalinke, unveröffentlicht). Die Kreuzung der IFNAR<sup>flx/flx</sup> Mäuse mit Deleter-Cre (Schwenk et al., 1995) Mäusen führte zu einer ubiquitären Deletion des Exon 10 (IFNAR<sup>ΔEx10/ΔEx10</sup>). Exon 10 kodiert die Transmembrandomäne der  $\alpha$ -Kette des Rezeptors (Lutfalla et al., 1992). Die Deletion des Exons 10 führt zusätzlich zu einer *Frameshift*-Mutation in Exon 11, der Signaldomäne. Die Cre-Expression führt somit zu einem funktionellen IFNAR-Knockout. Um dies zu überprüfen wurden IFNAR<sup>ΔEx10/ΔEx10</sup> Mäuse intranasal mit 10<sup>3</sup> pfu VSV infiziert. IFNAR<sup>ΔEx10/ΔEx10</sup> Mäuse zeigten den gleichen Krankheitsverlauf wie konventionelle IFNAR-Knockoutmäuse (IFNAR<sup>-/-</sup>) und starben innerhalb weniger Tage (Abb. 5.2).



**Abb. 5.2: Mäuse mit einer ubiquitären Deletion des Exons 10 des IFNAR sterben nach intranasaler VSV Infektion.** WT, IFNAR<sup>-/-</sup>, IFNAR<sup>flx/flx</sup> und IFNAR<sup>ΔEx10/ΔEx10</sup> wurden mit 10<sup>3</sup> pfu VSV *i.n.* infiziert. In den folgenden Tagen wurde zweimal täglich der Zustand der Tiere untersucht. Es zeigte sich, dass nach Infektion von WT und IFNAR<sup>flx/flx</sup> keine Krankheitssymptome zu beobachten waren, wohingegen sowohl IFNAR<sup>-/-</sup> und IFNAR<sup>ΔEx10/ΔEx10</sup> Tiere innerhalb von drei Tagen nach Virusinfektion verstarben.

Wenn in diesem System die Cre-Rekombinase nicht ubiquitär sondern nur in ausgewählten Geweben oder Zelltypen exprimiert wird, erhält man Mäuse mit einer gewebs- oder zelltypspezifischen IFNAR-Deletion.

Nach 10-fachem Zurückkreuzen auf den C57BL/6 Hintergrund wurden die IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse mit transgenen Nestin-Cre Mäusen (NesCre<sup>+/-</sup>) (Tronche et al., 1999) verkreuzt (Abb. 5.3B). Nestin ist ein Intermediärfilament, das sowohl in der Neuronal- als auch der Muskelentwicklung exprimiert wird. Das Transgen der NesCre<sup>+/-</sup> Mäuse besteht aus dem 5' Promotor des Nestingens, einer humanen Polyadenylierungssequenz sowie den neuroepithelial-spezifischen *Enhancer* aus dem Intron II (Abb. 5.3A).



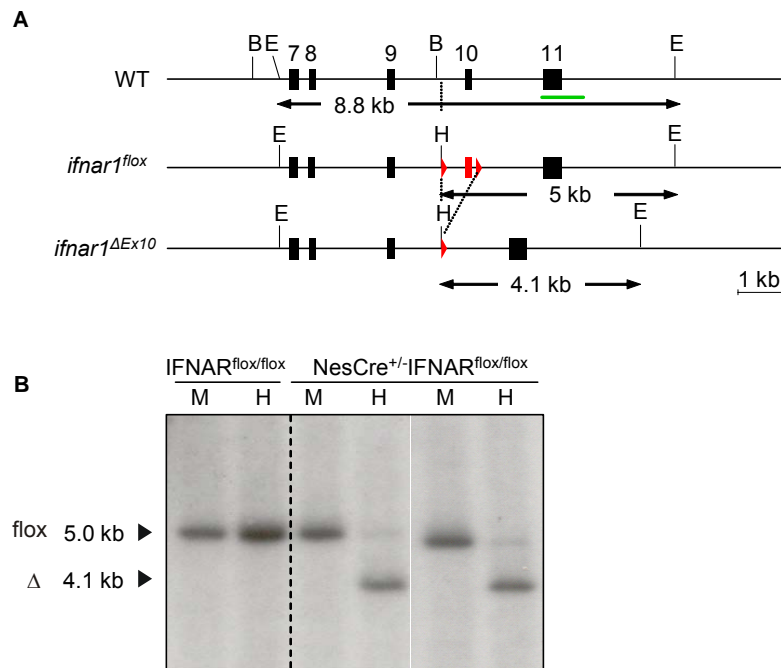
**Abb. 5.3:** Schematische Darstellung des Nestin-Cre Transgens und Übersichtsdiagramm der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Zucht: (A) Das Nestin-Cre (NesCre) Transgen besteht aus dem Gen für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Nestin-Promoters (Nestin 5' Region), einer humanen Polyadenylierungssequenz sowie dem neuroepithelial-spezifischen Enhancer aus dem Intron II (Nestin enhII) des Nestin-Lokus (Tronche et al., 1999). (B) Zuchtschema zum Erhalt der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse. Zum weiteren Ausbau der Zucht wurden ab der F2 Generation NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> mit IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen gekreuzt, so dass 50% der Nachkommen NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> waren.



### 5.1.1.1 CHARAKTERISIERUNG DER NESCRE<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>FLOX/FLOX</sup> MAUS ÜBER SOUTHERN BLOT ANALYSE

Die aus der Kreuzung der NesCre<sup>+/-</sup> und der IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse resultierenden NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse wurden sowohl durch Southern Blot Analyse als auch durch PCR-Analyse genetisch charakterisiert.

Zur Southern Blot Charakterisierung wurden verschiedene NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Tiere perfundiert, das heißt, dass Blut gegen physiologische Kochsalzlösung ausgetauscht wurde. Die Perfusion wurde durchgeführt, um kontaminierende Blutzellen aus dem Hirn zu entfernen. Anschließend wurde über Phenol-Chloroform-Extraktion die genomische DNA aus dem Hirn und der Milz isoliert. Die EcoRI/HindIII doppelt verdaute genomische DNA wurde im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die DNA wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert, die an Exon 11 bindet, welches außerhalb des *Targeting*-Konstruktes liegt. Anhand der Bandenmuster, die durch Hybridisierung mit der radioaktiv-markierten DNA-Sonde und nach Exposition auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wurden, können verschiedene Genotypen unterschieden werden: Liegt ein WT Allel vor, wird im Southern Blot eine 8,8 kb lange Bande sichtbar (vergl. Abb. 5.1B). Liegt das mutierte *ifnarI<sup>flox</sup>* Allel vor, wird eine 5,0 kb lange Bande und nach Cre vermittelter Rekombination (*ifnar<sup>ΔEx10</sup>*) eine 4,1 kb lange Bande sichtbar (Abb. 5.4A). IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse zeigten wie erwartet sowohl in der Milz (als Beispiel für ein peripheres Organ) als auch im Hirn nur eine Bande mit einer Länge von 5,0 kb. Somit liegt in beiden Organen keine Deletion vor. NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse zeigten in der Milz ebenfalls keine Deletion. Sie haben hier einen *ifnarI<sup>flox</sup>* Genotyp. Aber im Hirn zeigten sie eine dominante Bande mit einer Länge von 4,1 kb. Hier lag also in erster Linie ein *ifnarI<sup>ΔEx10</sup>* Genotyp vor (Abb. 5.4B). Die zweite, schwächere Bande zeigte jedoch, dass nicht in allen Zellen des ZNS der *ifnarI<sup>ΔEx10</sup>* Genotyp vorlag. Es ist davon auszugehen, dass die Mikroglia, die nicht der neuronalen Linie entstammen, keine Deletionen des Exon 10 aufwiesen. Insgesamt lässt sich aus den beschriebenen Befunden schließen, dass NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse ZNS-spezifisch das Exon 10 des *ifnarI* Locus deletiert haben. Im ZNS sind die Mäuse IFNAR-Knockout, während in der Peripherie jedoch eine WT-ähnliche Situation vorliegt.

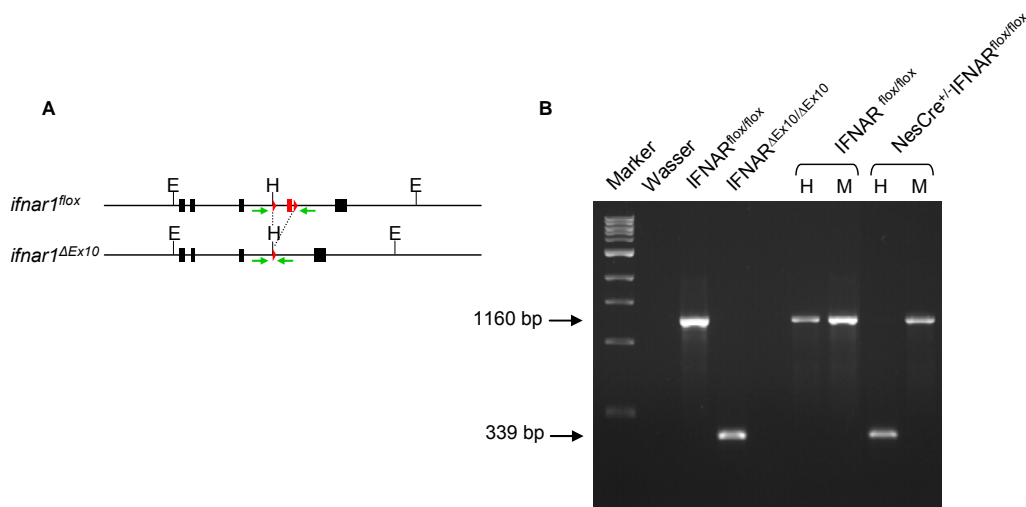


**Abb. 5.4: Southern Blot Analyse zur Charakterisierung der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>lox/lox</sup> Mäuse:** Genomische DNA von C57BL/6, IFNAR<sup>lox/lox</sup> und NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>lox/lox</sup> Mäusen wurde mit *EcoRI* und *HindIII* verdaut, über ein Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurde die DNA mit einer flankierenden radioaktiv markierten DNA-Sonde (in grün) hybridisiert. In (A) sind die Lage der Sonde und die zu erwartenden Fragmentgrößen gezeigt. (B) zeigt den fertigen Southern Blot mit DNA aus der Milz (M) und dem Hirn (H). Die Banden bei 5,0 kb entsprechen einem *ifnar1<sup>lox</sup>* und die Banden bei 4,1 kb einem *ifnar1<sup>ΔEx10</sup>* Genotyp.

### 5.1.1.2 CHARAKTERISIERUNG DER NESCRE<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>FLOX/FLOX</sup> MAUS ÜBER PCR

Der Southern Blot hat den Vorteil, dass die DNA-Sonde stöchiometrisch an die Zielsequenz bindet. Die Signalstärke ist somit unabhängig von der Länge der Zielsequenz und nur von der Anzahl der Zielsequenzen abhängig. Allerdings weist der Southern Blot eine limitierte Sensitivität auf. Im Vergleich zum Southern Blot ist die Sensitivität der PCR größer. Bei der PCR besteht allerdings der Nachteil, dass kurze Produkte im Vergleich zu langen bevorzugt werden. Dies kann ausgenutzt werden, um zu überprüfen, ob es in einem geringen Umfang zu partiellen Deletionen kommt, die im Southern Blot nicht leicht erkennbar sind.

Es wurde eine PCR entwickelt, bei der die Primer 5' und 3' der loxP-Sequenzen binden. So erhält man bei beiden möglichen Genotypen (*ifnar1<sup>flox</sup>* und *ifnar1<sup>ΔEx10</sup>*) ein PCR-Produkt. Anhand der Länge des PCR-Produktes lassen sich der *ifnar1<sup>flox</sup>* und der *ifnar1<sup>ΔEx10</sup>* Genotyp unterscheiden. Liegt der *ifnar1<sup>flox</sup>* Genotyp vor, erhält man ein 1160 bp langes Produkt. Findet jedoch eine Deletion des Exon 10 statt, ist das Produkt um 821 bp verkürzt und nur noch 339 bp lang (Abb. 5.5A). Um etwas über die Sensitivität der PCR aussagen zu können, wurde *ifnar1<sup>ΔEx10</sup>* DNA in *ifnar1<sup>flox</sup>* DNA seriell verdünnt. Dabei zeigte sich, dass sich *ifnar1<sup>ΔEx10</sup>* DNA in *ifnar1<sup>flox</sup>* DNA noch in einem Verhältnis von 1:100 nachweisen ließ. Bei einem Verhältnis 1:10 zeigte das 339 bp lange Produkt eine erhebliche Dominanz gegenüber dem 1160 bp langen Fragment (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Erkenntnissen lässt sich schließen, dass mindestens 99% Zellen der peripheren Organe der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse, die hier analysiert wurden, den *ifnar1<sup>flox</sup>* Genotyp aufwiesen (Abb. 5.5B) und nur ein kleiner Teil Exon 10 deletiert hatte. Wie erwartet zeigten die IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse keine Deletion.

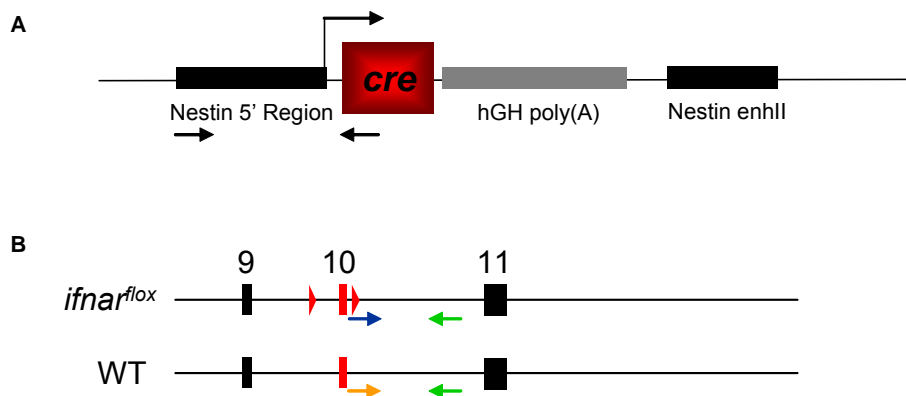


**Abb. 5.5: PCR-Analyse von verschiedenen Geweben der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Tiere:** Für die entwickelte PCR wurden Primer verwendet, die links und rechts der loxP-Sequenzen binden. So erhält man sowohl wenn der *ifnar1<sup>flox</sup>* als auch wenn der *ifnar1<sup>ΔEx10</sup>* Genotyp vorliegt ein PCR-Produkt (A). Je nach dem, ob Matrizen mit dem *ifnar1<sup>flox</sup>* oder dem *ifnar1<sup>ΔEx10</sup>* Genotyp vorliegen, unterscheiden sich die resultierenden PCR-Produkte in ihrer Größe und lassen sich über ein Gel auftrennen. Lag der *ifnar1<sup>flox</sup>* Genotyp vor, erhielt man ein 1160 bp langes Produkt. Fand Deletion des Exon 10 statt, war das PCR-Produkt um 821 bp kürzer und nur noch 339 bp lang (B).

### 5.1.1.3 GENOTYPISIERUNG DER NESCRE<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>FLOX/FLOX</sup> MÄUSE

Im Rahmen der Zucht der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse wurden alle Tiere auf das Vorhandensein des NesCre-Transgens und der zwei flox-Allele über PCR typisiert. Als Proben wurde DNA von Schwanzbiopsien verwendet. Das Vorhandensein des NesCre-Transgens und der zwei flox-Allele wurde über PCR nachgewiesen. Das NesCre-Transgen und eine loxP-Sequenz wurden direkt nachgewiesen. Die zweite loxP-Sequenz wurde indirekt nachgewiesen, indem auf Abwesenheit des WT-Allels typisiert wurde.

Nach Mendel ist zu erwarten, dass 50% der Nachkommen aus einer NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/wt</sup> x IFNAR<sup>flox/flox</sup> Zucht zwei *flox* Allele und 50% das NesCre Transgen tragen. Daraus resultiert, dass in der F2 Generation nur 25% der Mäuse den Genotyp NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> zeigen. Werden dann in allen weiteren Generationen NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> mit IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen verkreuzt, sind alle Nachkommen IFNAR<sup>flox/flox</sup> während nur 50% der Nachkommen das NesCre Transgen tragen. Die Ausbeute von NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen beträgt in diesem Zuchtschema somit 50%. Auch hier konnten wir die nach Gregor Mendel zu erwartende Verteilung in unserer Zucht sehen (vergleiche Abb. 5.3B).



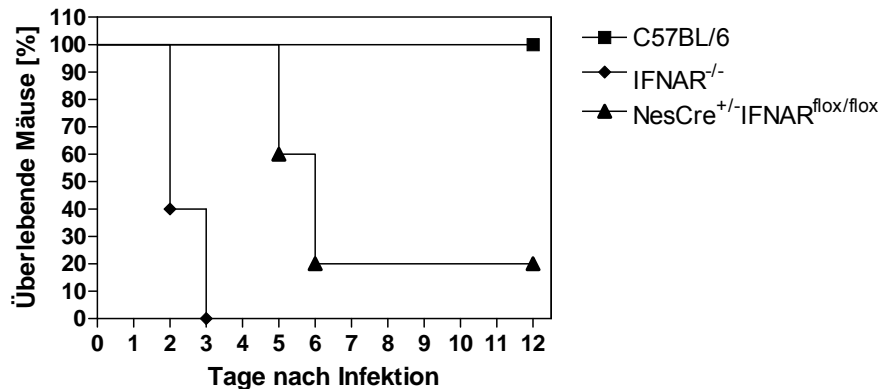
**Abb. 5.6: Position der Primer zur Genotypisierung der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse.** Zur Genotypisierung der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> wurden drei PCRs durchgeführt. In (A) wird die Position der Oligonukleotide (NesCre fwd und rev) zum Nachweis des Transgens gezeigt. (B) Zum Nachweis der zwei flox Allele wurden drei PCRs durchgeführt. Für den Nachweis des *flox* Allels wurde das Oligonukleotide I2loxP fwd (■) mit dem Oligonukleotid IFN-U745 rev (■) verwendet. Um zu kontrollieren, dass kein WT Allel mehr vorlag, werden das Oligonukleotid 2Ex10 fwd (■) mit dem Oligonukleotid IFN-U745 rev verwendet.

Durch eine Southern Blot Analyse stellte es sich heraus, dass ein Teil der Mäuse ubiquitär ein deletiertes Allel trugen, also den Genotyp  $\text{NesCre}^{+/-}\text{IFNAR}^{\text{flo}/\Delta\text{Ex}10}$  zeigten. Dies wurde vermutlich durch eine Deletion in der Keimbahn eines Mäusebocks verursacht, da alle Nachkommen dieses Männchens ein deletiertes Allel trugen. Nach diesem Befund wurde die gesamte Zucht auf Deletion des konditionellen *ifnar*-Allels in der Peripherie durch PCR-Analyse untersucht. Alle Tiere, die ubiquitär ein  $\text{ifnar}^{\Delta\text{Ex}10}$  aufwiesen, wurden aus der Zucht entnommen und getötet. Nach dieser Erfahrung wurden routinemäßig alle Mäuse auf Deletionen untersucht. Es tauchten jedoch nur noch sporadisch  $\text{NesCre}^{+/-}\text{IFNAR}^{\text{flo}/\Delta\text{Ex}10}$  Mäuse auf. Im Jahr 2006 gab es 9 Würfe mit insgesamt 79  $\text{NesCre}^{+/-}\text{IFNAR}^{\text{flo}/\text{flo}}$  Nachkommen. Davon zeigten 25 Mäuse PCR-Signale für ein deletiertes Allel. Es muss also davon ausgegangen werden, dass in diesen Tieren eine ubiquitäre Deletion eines IFNAR-Allels vorlag. Diese Anzahl entspricht einem Anteil von 32,98% an Tieren, bei denen spontane Deletionen auftraten.

## 5.2 VSV-INFEKTIONEN VON $\text{NesCre}^{+/-}\text{IFNAR}^{\text{FLOX}/\text{FLOX}}$ MÄUSEN

### 5.2.1 $\text{NesCre}^{+/-}\text{IFNAR}^{\text{FLOX}/\text{FLOX}}$ MÄUSE ZEIGEN NACH INTRANASALER INFEKTION MIT VSV EINEN VERÄNDERTEN KRANKHEITSVERLAUF

Im ersten Schritt wurde untersucht, ob die  $\text{NesCre}^{+/-}\text{IFNAR}^{\text{flo}/\text{flo}}$  Mäuse im Vergleich zu Wildtyp und  $\text{IFNAR}^{-/-}$  Tieren einen veränderten Krankheitsverlauf nach Virusinfektionen aufwiesen. Dies wurde getestet, indem  $\text{IFNAR}^{-/-}$ ,  $\text{NesCre}^{+/-}\text{IFNAR}^{\text{flo}/\text{flo}}$  und C57BL/6 mit dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) infiziert wurden. VSV wird seit mehr als 65 Jahren als Modell für neurotrope Viren in Mäusen verwendet (Sabin und Olitsky, 1937). Nach intranasaler Infektion mit VSV kann es zu Infektionen des zentralen Nervensystems kommen, indem das Virus über die olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) in das Riechhirn und somit in das ZNS gelangt (Huneycutt et al., 1993; Plakhov et al., 1995). Die Mäuse wurden unter Vollnarkose intranasal mit  $10^3$  pfu VSV infiziert. Es ist bekannt, dass WT Mäuse in der Lage sind, VSV Infektionen dieser Dosis zu kontrollieren, wohingegen  $\text{IFNAR}^{-/-}$  Mäuse dies nicht können (Müller et al., 1994).



**Abb. 5.7: NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber *i.n.* VSV Infektionen.** Nach intranasaler Infektion mit  $10^3$  pfu VSV starben NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse innerhalb von 6 Tagen. WT Mäuse überlebten die Infektion ohne Anzeichen einer Erkrankung zu zeigen. IFNAR<sup>-/-</sup> zeigten ab Tag 2 schwere Krankheitssymptome wie struppiges Fell, gekrümmte Körperhaltung, zeigten eine reduzierte Aktivität und starben. NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> zeigten keine Zeichen einer Infektion bis Tag 5. Im Vergleich zu IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> zunächst eine verstärkte Aktivität, liefen im Kreis und hatten Probleme geradeaus zulaufen oder die Richtung zu ändern. Im fortgeschrittenen Stadium wurden sie halbseitig gelähmt, fingen an sich zu krümmen, bekamen struppiges Fell und verstarben. In der Graphik ist ein repräsentatives Ergebnis aus fünf unabhängigen Versuchsdurchführungen gezeigt.

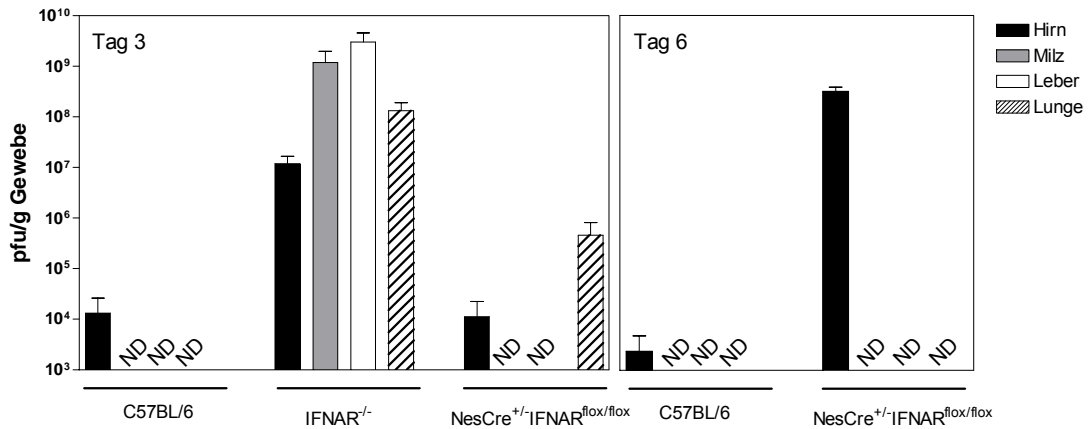
WT Mäuse überlebten die Virusinfektion ohne Anzeichen einer Erkrankung zu zeigen. IFNAR<sup>-/-</sup> zeigten wie erwartet ab Tag 2 schwere Krankheitssymptome wie struppiges Fell, flache Atmung, sie krümmten sich, bewegten sich kaum noch und verstarben. NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> zeigten bis Tag 5 keine Zeichen einer Erkrankung. Dann kam es jedoch zu ersten Symptomen. Im Vergleich zu IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> zunächst eine verstärkte Aktivität, liefen im Kreis und hatten Probleme geradeaus zu laufen oder die Richtung zu ändern. In einem weiter fortgeschrittenen Stadium zeigten sie halbseitige Lähmungen, fingen an, sich zu krümmen, bekamen struppiges Fell und verstarben.

Die klinischen Symptome der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse wiesen auf zentralnervöse Störungen hin, wohingegen die Symptome der IFNAR<sup>-/-</sup> Mäuse eher auf ein Lungen- oder Multiorganversagen schließen lassen.

### **5.2.2 NESCRE<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>FLOX/FLOX</sup> MÄUSE ZEIGEN ERHÖHTE VIRUSTITER IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM, ABER NICHT IN DEN PERIPHEREN ORGANEN**

Um zu überprüfen, ob nach einer Virusinfektion VSV in den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 und IFNAR<sup>-/-</sup> Tieren einen veränderten Tropismus aufweist, wurden die Virustiter mittels eines Plaqueassays im Hirn, in der Leber, in der Lunge und in der Milz bestimmt. Die Mäuse wurden mit 10<sup>3</sup> pfu VSV i.n. infiziert und zweimal täglich kontrolliert. Zum Todeszeitpunkt der IFNAR<sup>-/-</sup> Mäuse (Tag 3 nach Infektion) wurden zur Kontrolle jeweils 3 Tiere aus den Gruppen der C57BL/6 und der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Tiere entnommen und getötet. An Tag 6, dem Todeszeitpunkt der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Tiere, wurden ebenfalls 3 C57BL/6 Mäuse getötet. Von allen Tieren wurden Organe entnommen und diese in Verozellmedium homogenisiert. Anschließend wurden serielle Verdünnungen der Homogenate hergestellt und die Verdünnungen auf einen konfluente Verozellrasen gegeben. Nach einer Stunde Vorinkubation wurde mit Methylcellulose überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Zellen mit Kristallviolett angefärbt, und die entstandenen Plaques ausgezählt werden. Es zeigte sich, dass an Tag 3, dem Zeitpunkt des Todes der IFNAR<sup>-/-</sup> Mäuse, nur diese hohe VSV-Titer in allen getesteten Organen aufwiesen. Man fand in den IFNAR<sup>-/-</sup> Tieren die höchsten Titer in der Leber und Milz. C57BL/6 und NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt nur relativ niedrige bis keine VSV-Titer in den Organen. Zu diesem Zeitpunkt konnte man hinsichtlich der Virusverteilung keine signifikanten Unterschiede zwischen C57BL/6 und NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Tieren feststellen. Drei Tage später, also 6 Tage nach Infektion, war in den C57BL/6 Mäusen so gut wie kein Virus mehr nachzuweisen. In die NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen fand sich in den peripheren Organen ebenfalls kein Virus. Aber im Hirn fand man Titer um die 10<sup>8</sup> pfu/Hirn (**Abb. 5.8**). Daraus lässt sich schließen, dass die NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse durchaus in der Lage sind, das Virus in der Peripherie zu

kontrollieren. Es scheinen aber die adäquaten Immunantworten im ZNS auszubleiben, so dass sich das Virus innerhalb des ZNS nahezu ungehindert ausbreiten kann.



**Abb. 5.8:** NesCre<sup>+/-</sup> IFNAR<sup>flox/flox</sup> zeigen erhöhte Virustiter im Gehirn aber nicht in den peripheren Organen. C57BL/6, IFNAR<sup>-/-</sup> und NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse wurden intranasal mit 10<sup>3</sup> pfu VSV infiziert. An Tag 3 und Tag 6 nach Infektion wurden die Mäuse getötet, um Hirn, Milz, Leber und Lunge zu entnehmen und zu homogenisieren. Die Homogenate wurden seriell verdünnt und auf konfluente Verozellrasen gegeben. Am nächsten Tag wurde mit Kristallviolett gefärbt und die durch die Virusvermehrung entstandenen Plaques ausgezählt.

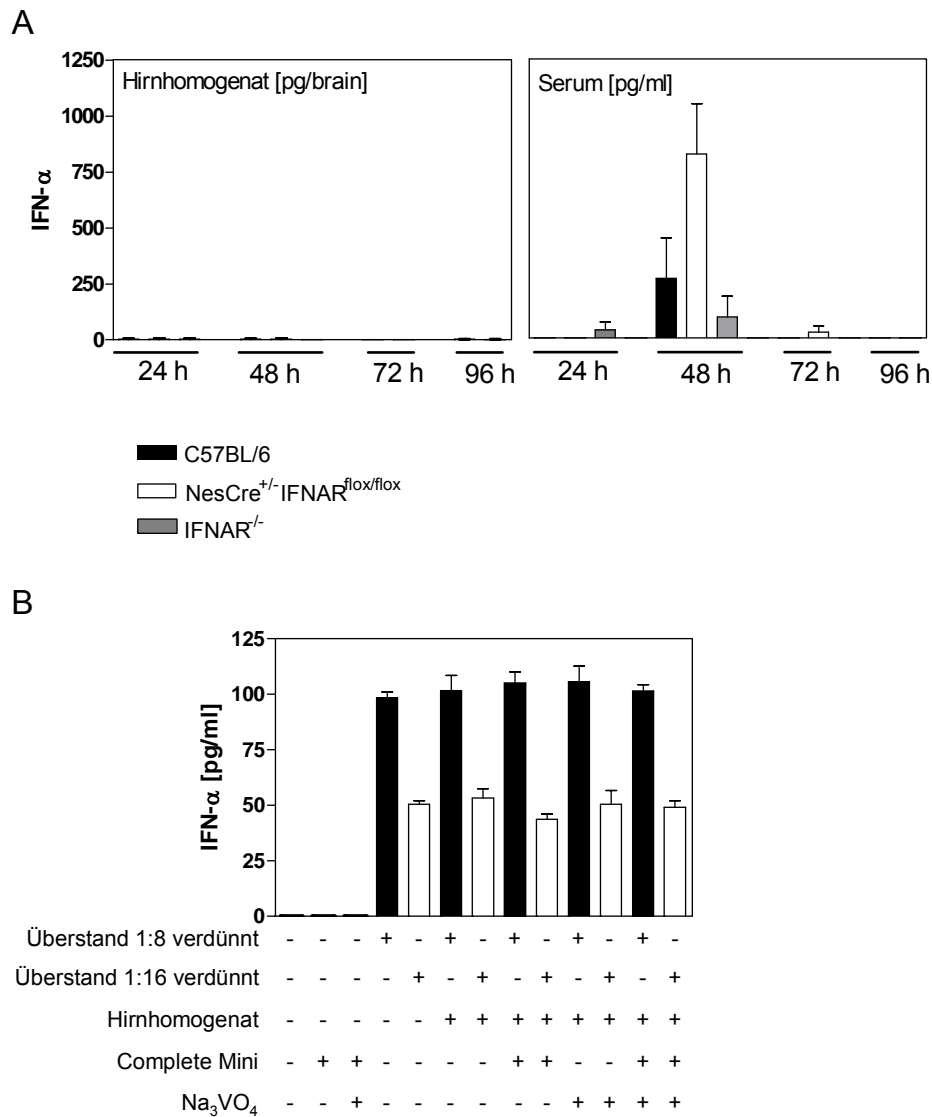
### 5.2.3 VSV INFIZIERTE NESCRE<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>FLOX/FLOX</sup> MÄUSE ZEIGEN WIE C57BL/6 MÄUSE SYSTEMISCHE INTERFERONTITER

Zur Bestätigung, dass es in den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen zu einer adäquaten Immunantwort kommt, wurden einerseits die Interferontiter im Serum als auch in Hirnhomogenaten gemessen. Weiterhin wurden die virusneutralisierenden Antikörpertiter aus dem Serum der Mäuse bestimmt. Zur Bestimmung der IFN-Titer wurde den Mäusen 1, 2, 3 und 4 Tage nach intranasaler Infektion mit VSV Blut entnommen und daraus das Serum gewonnen. Zur Bestimmung eventueller lokaler Typ I IFN-Titer im zentralen Nervensystem wurden die Mäuse nach der Blutentnahme perfundiert, das Hirn entnommen und in Hirnhomogenatpuffer homogenisiert. Da das ZNS eine sehr hohe Proteaseaktivität aufweist, wurde dem Homogenatpuffer ein Gemisch aus Proteaseinhibitoren (*Roche Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail* und 2 mM Natriumorthovanadat) zugegeben. Der IFN- $\alpha$ -Titer in den Homogenaten und im Serum wurde dann durch ELISA bestimmt. Wie in **Abb. 5.9A** zu sehen, ließen sich in den Hirnhomogenaten kein



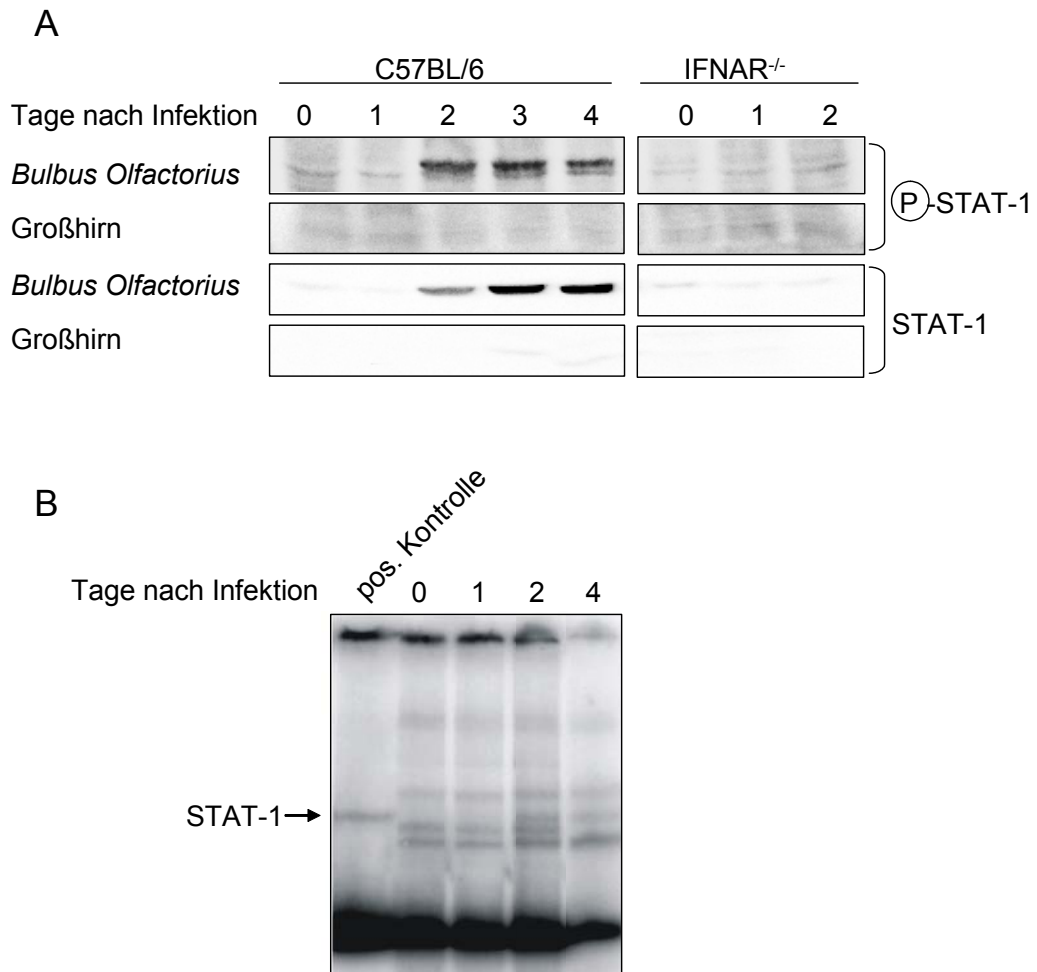
IFN- $\alpha$  im ELISA nachweisen. Es stellte sich nun die Frage, ob (i) im Homogenat kein oder nur sehr geringe Mengen IFN- $\alpha$  enthalten ist, (ii) ob trotz Proteaseinhibitoren IFN- $\alpha$  abgebaut wird bzw. (iii) ob andere Bestandteile der Hirnhomogenate den ELISA inhibieren. Um mögliche Proteaseaktivitäten zu untersuchen, wurden nichtinfizierte Gehirne in Hirnhomogenatpuffer mit und ohne Proteaseinhibitoren homogenisiert, anschließend mit  $\frac{1}{4}$  Volumen IFN-haltiger Zellkulturüberständen versetzt und der IFN- $\alpha$  Gehalt im ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass das Hirnhomogenat keinen negativen Einfluss auf die Bestimmung von IFN- $\alpha$  im ELISA hat.

Bei der Bestimmung der systemischen IFN- $\alpha$ -Titern im Serum fand man 2 Tage nach Infektion nur in den C57BL/6 und den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> signifikante Mengen IFN- $\alpha$ , wobei die Serum-IFN- $\alpha$  Mengen in den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> gegenüber den C57BL/6 Mäusen deutlich erhöht waren.



**Abb. 5.9: Nach intranasaler Infektion mit  $10^3$  pfu VSV zeigen NesCre<sup>+/-</sup> IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse erhöhte IFN- $\alpha$  Level im Serum, aber nicht im Gehirn.** (A) Die Mäuse wurden mit  $10^3$  pfu VSV i.n. infiziert. An Tag 1, 2, 3, und 4 wurde den Mäusen Blut entnommen. Dann wurden die Tiere perfundiert und die Hirne entnommen. Nach Homogenisierung der Hirne und Zentrifugation der Homogenate wurden in den klaren Überständen sowie in den Seren die IFN- $\alpha$ -Level über einen ELISA bestimmt. (B) Hirne von uninfizierten Tieren wurde in Hirnhomogenatpuffer mit und ohne Protease-/Phosphataseinhibitoren homogenisiert. Zu den Homogenaten wurden IFN-haltige Zellkulturüberstände von VSV-M2 behandelten pDCs (Waibler et al., 2007) in einer Verdünnung 1:8 und 1:16 zugegeben. Anschließend wurden die IFN- $\alpha$ -Level über einen ELISA bestimmt. Die Hirnhomogenate hatten keinen messbaren Einfluss auf die Bestimmung des IFN- $\alpha$ .

Da IFN- $\alpha$  nur eingeschränkt die Blut-Hirn-Schranken passieren kann (Pan et al., 1997), ist zu vermuten, dass, wenn IFN- $\alpha$  im ZNS eine Rolle spielt, es auch dort gebildet wird. 2006 zeigten zwei Gruppen unabhängig von einander, dass Neuronen im ZNS Typ I IFN transkribieren können (Delhaye et al., 2006; Préhaud et al., 2005). Von daher liegt es nahe, zu vermuten, dass Typ I IFN in dem hier verwendeten Tiermodell im ZNS gebildet werden. Wahrscheinlich handelt es sich um lokale IFN-Titer, die sich auf Grund ihrer niedrigen Gesamtmenge nicht über ELISA nachweisen lassen. Um zu überprüfen, ob IFN nach VSV-Infektion im ZNS gebildet wird bzw. ob es zur IFN-abhängigen Signalweiterleitung kommt, wurden über Western Blot die IFN-abhängige STAT-1 Phosphorylierung untersucht. Nach Stimulation des IFNAR kommt es zur Aktivierung des Jak/STAT Signaltransduktionsweges. STAT-1 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) gehört neben STAT-2 zu einem der wichtigen Faktoren des IFN-abhängigen Jak/STAT-Weges. STAT-1 wird auf niedrigem Niveau konstitutiv exprimiert, aber erst durch Phosphorylierung aktiviert (Platanias, 2005). In C57BL/6 Mäusen können im Western Blot ein Tag nach intranasaler Infektion mit VSV deutliche, wenn auch im Vergleich zu späteren Zeitpunkten schwache Banden von P-STAT-1 nachgewiesen werden. Zwei Tage nach Infektion kommt es zur maximalen STAT-1 Phosphorylierung, die bis Tag 4 wieder etwas abnimmt aber noch deutlich zu messen ist (siehe **Abb. 5.10A**). Neben der Phosphorylierung kam es auch zur verstärkten Expression des konstitutiv exprimierten STAT-1 (siehe **Abb. 5.10B**). Um zu zeigen, dass das phosphorylierte STAT-1 funktionelle Komplexe bildet, die an DNA binden können, wurden Gel-shift-Untersuchungen (EMSA) durchgeführt. Hier zeigte sich, dass es an Tag 2 und 4 nach Infektion zur spezifischen DNA-Bindung von STAT-1 kommt. Als Positivkontrolle wurden IFN- $\gamma$  stimulierte HeLa-Zellen verwendet, da es in der Signaltransduktion des IFN- $\gamma$  ebenfalls zur Phosphorylierung und Aktivierung von STAT-1 kommt, dass dann in den Zellkern transloziert (Platanias, 2005).



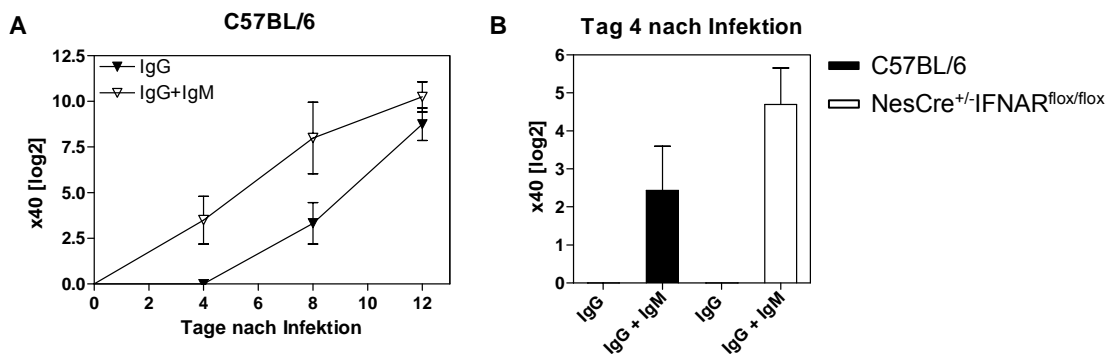
**Abb. 5.10: Nach intranasaler VSV Infektion wird STAT-1 verstärkt im Riechhirn von C57BL/6 Mäusen phosphoryliert und exprimiert.** Mäuse wurden intranasal mit  $10^3$  pfu VSV infiziert. An Tag 1, 2, 3 und 4 nach Infektion wurden die Mäuse perfundiert und die Hirnregionen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Später wurden die Proben homogenisiert und in Western Blot Analysen mit  $\alpha$ P-STAT-1, einem Antikörper, der spezifisch phosphoryliertes STAT-1 bindet, und einem pan-STAT-1 Antikörper durchgeführt (A). Im Gelshift-Assay (EMSA) wird STAT-1 spezifische DNA-Bindung gezeigt. Als Positivkontrolle dienen IFN- $\gamma$  stimulierte He-La-Zellen (B).

#### 5.2.4 VSV INFIZIERTE NESCRE<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>FLOX/FLOX</sup> MÄUSE ZEIGEN NORMALE ANTIKÖRPERANTWORTEN

Im Rahmen der Studie wurde die Frage aufgeworfen, ob das Sterben der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse durch ein fehlendes Einsetzen der adaptiven Immunant-

worten verursacht wurde. Um dieser Frage nachzugehen, wurden neutralisierende Antikörperantworten aus dem Serum der Tiere bestimmt. Im Neutralisierungsassay wurden Seren der Mäuse von Tag 4, 8 und 12 nach Infektion wie von Charan und Zinkernagel beschrieben untersucht (Charan und Zinkernagel, 1986).

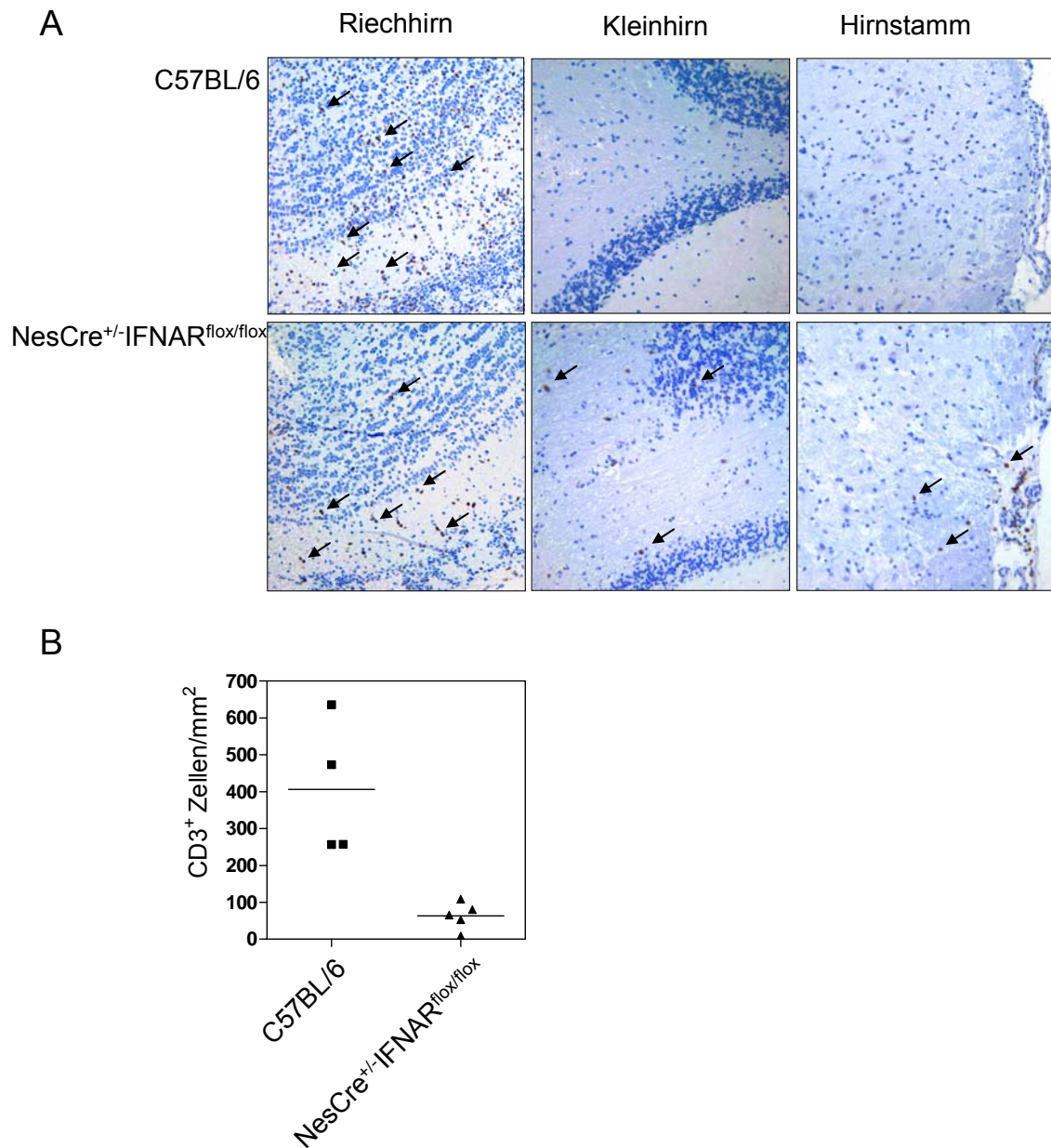
Wie erwartet konnten bei C57BL/6 Mäusen an Tag 4 deutliche IgM Titer gezeigt werden. Später kam es dann zur Induktion von IgG, die sich 8 Tage nach Infektion im Serum nachweisen ließen (Abb. 5.11A). Da NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse spätestens 6 Tage nach Infektion sterben, wurde bei ihnen kein zeitlicher Verlauf der Antikörperinduktion untersucht. Schaut man sich jedoch die Antikörpertiter 4 Tage nach Infektion an, sieht man, dass NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> vergleichbare IgM Titer wie WT Mäuse machen (Abb. 5.11B). Der Wechsel zur IgG Produktion findet erst später statt, so dass IgG noch nicht nachgewiesen werden kann. Aus den Daten lässt sich schließen, dass in den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen kein Defekt der Antikörperproduktion vorliegt und fehlende Antikörperantworten keine Ursache für den Krankheitsverlauf der Tiere darstellt.



**Abb. 5.11: In NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen werden normale VSV neutralisierende Antikörperantworten gebildet.** C57BL/6 und NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse wurden intranasal mit 10<sup>3</sup> pfu VSV infiziert. 4,8 und 12 Tage nach Infektion wurde den Mäusen Blut entnommen und es wurden die VSV neutralisierenden Serumantikörper bestimmt. (A) WT Mäuse bilden nach intranasaler Infektion mit 10<sup>3</sup> pfu VSV zunächst neutralisierende IgM Antikörper. Zwischen Tag 4 und 8 kommt es zum Wechsel von der IgM zur IgG Produktion. (B) Vier Tage nach VSV Infektion haben NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse ähnliche VSV neutralisierende IgM Titer wie WT Mäuse.

### 5.2.5 NESCRE<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>FLOX/FLOX</sup> MÄUSE UNTERSCHIEDEN SICH NACH INFEKTION MIT VSV VON WILDTYP-MÄUSEN IN DER T-ZELL-INFILTRATION

Um T-Zell-Infiltration im ZNS zu untersuchen, wurden histologische Studien durchgeführt. Dazu wurden NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> und C57BL/6 Mäuse intranasal mit 10<sup>3</sup> pfu VSV infiziert. Die Tiere wurden 3 und 6 Tage nach Infektion getötet, und die Hirne wurden präpariert und anschließend in Formalin fixiert. In den Histologien zeigte keine der Mäuse drei Tage nach Infektion T-Zellinfiltration (Daten nicht gezeigt). An Tag 6 nach Infektion fand man in WT Mäusen eine massive T-Zellinfiltration im Riechhirn aber keine im Kleinhirn oder Hirnstamm. NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse hingegen zeigten neben der T-Zellinfiltration im Riechhirn auch T-Zellen im Kleinhirn und Hirnstamm. Im Vergleich zur Infiltration des Riechhirns ist die Infiltration der anderen Regionen geringer. Die Infiltration im Kleinhirn und Hirnstamm konzentriert sich hauptsächlich auf die Meningen und perivaskuläre Regionen, wohin gegen parenchymale Gewebe weniger betroffen sind. Durch Quantifizierung der infiltrierenden T-Zellen pro mm<sup>2</sup> im Riechhirn zeigte sich, dass dieser in C57BL/6 Mäusen im Durchschnitt fast viermal stärker infiltriert wird, als das Riechhirn von NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen (siehe Abb. 5.12B).

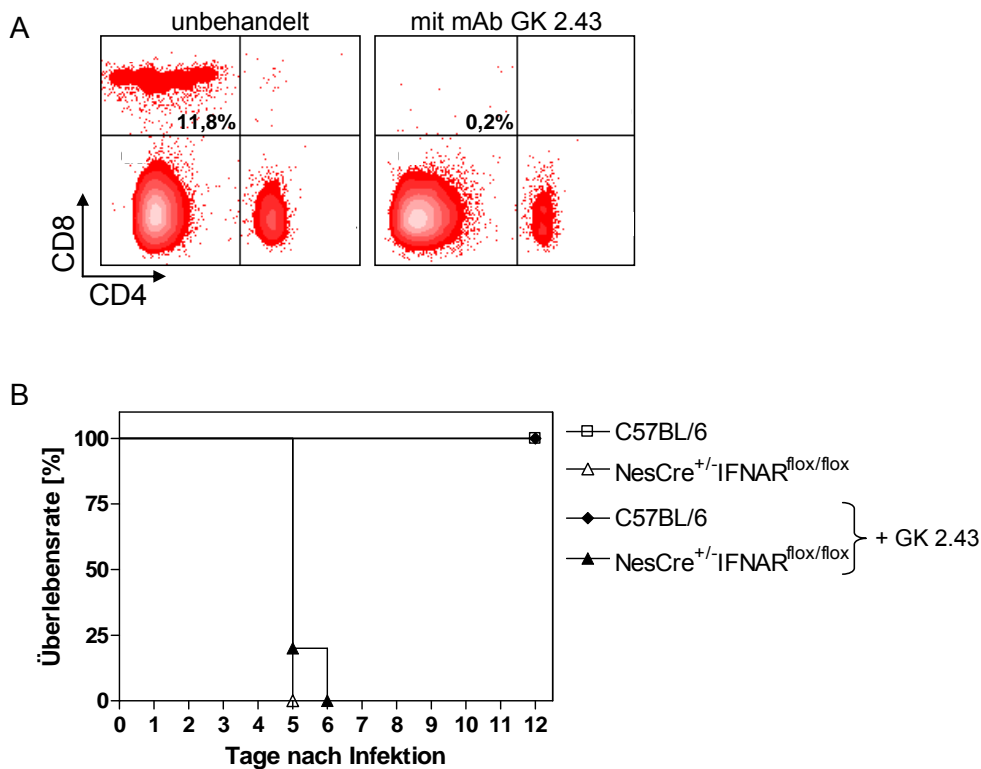


**Abb. 5.12: 6 Tage nach intranasaler VSV Infektion findet man im Hirn von WT und NesCre<sup>+/-</sup> IFNAR<sup>fllox/fllox</sup> T-Zellinfiltrate.** Formalinfizierte Hirne wurden in Parafin eingebettet, geschnitten, H&E sowie gegen CD3 gefärbt. **(A)** WT Mäuse zeigen nur im Riechhirn T-Zellinfiltration, wohingegen bei NesCre<sup>+/-</sup>/IFNAR<sup>fllox/fllox</sup> Mäusen T-Zellinfiltrate auch im Kleinhirn und im Hirnstamm zu finden sind. **(B)** Die T-Zellinfiltration im Riechhirn ist in C57BL/6 Tieren im Vergleich zu NesCre<sup>+/-</sup>/IFNAR<sup>fllox/fllox</sup> Tieren deutlich erhöht.

### 5.2.6 ZYTOTOXISCHE T-ZELLEN SPIELEN KEINE DIREKTE ROLLE IN DER PATHOGENESE VON VSV

Von anderen Pathogenen (z.B. LCMV) ist bekannt, dass sie nicht direkt die Ursache für die verheerenden Folgen einer Infektion sind, sondern die Pathologie über zytotoxische T-Zellen vermittelt wird. So zeigten Mäuse, bei denen die zytotoxischen T-Zellen depletiert wurden, nach LCMV Infektion keine Krankheitssymptome (Oehen et al., 1991). Wie in Abschnitt 5.2.5 gezeigt, kommt es nach VSV Infektion zu einer T-Zellinfiltration des ZNS. Dabei stellt sich die Frage, ob die Pathologie der Infektion direkt auf das Virus zurückzuführen ist, oder ähnlich wie bei LCMV durch die Immunantwort vermittelt wird. Um dies zu untersuchen, wurden C57BL/6 und NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Tiere mit dem monoklonalen Antikörper GK 2.43 behandelt. GK 2.43 bindet an CD8-positive zytotoxische T-Zellen, die anschließend eliminiert werden. Die Depletion der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen wurde durch FACS-Analyse kontrolliert. Nach der Behandlung mit dem depletierenden Antikörper reduzierte sich der Anteil der zytotoxischen T-Zellen im Blut um mehr als 98% und blieb dann für mehrere Tage stabil auf einem sehr niedrigen Niveau. CD4-positive T-Zellen waren von der Depletion nicht betroffen (Abb. 5.13A). Anschließend wurden die GK 2.43 behandelten Tiere gemeinsam mit nicht behandelten Tieren mit 10<sup>3</sup> pfu VSV *i.n.* infiziert und der Krankheitsverlauf beobachtet. In den GK 2.43 behandelten Tieren konnte im Vergleich zu nichtbehandelten Kontrollen keine Änderung im Krankheitsverlauf gefunden werden. Auch in Abwesenheit zytotoxischer T-Zellen zeigten C57BL/6 Mäuse keinerlei Krankheitssymptome. Die GK 2.43 behandelten NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse verstarben wie die nicht behandelten NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> an Tag 5 bis 6. Dabei zeigten sie die gleichen Symptome - erhöhte Aktivität, gefolgt von aufsteigenden Lähmungen (siehe 5.2.1). Dies lässt darauf schließen, dass die beobachteten neuropathologischen Symptome nicht durch die zytotoxischen Aktivitäten von CD8-positiven T-Zellen, sondern durch das Virus vermittelt wurden.





**Abb. 5.13: Zytotoxische T-Zellen spielen in der Pathologie von VSV keine Rolle.** C57BL/6 und NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen wurden 1 und 2 Tage vor Infektion je mit 250 µg des monoklonalen Antikörpers GK 2,43 *i.p.* behandelt. Der Antikörper depletiert zytotoxische T-Zellen. (A) Die Depletion der T-Zellen wurde durch FACS-Färbungen überprüft. (B) Im Infektionsexperiment mit 10<sup>3</sup> pfu VSV *i.n.* zeigen sowohl die C57BL/6 als auch die NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse ohne zytotoxische T-Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Tieren keine Abweichung im Krankheitsverlauf.

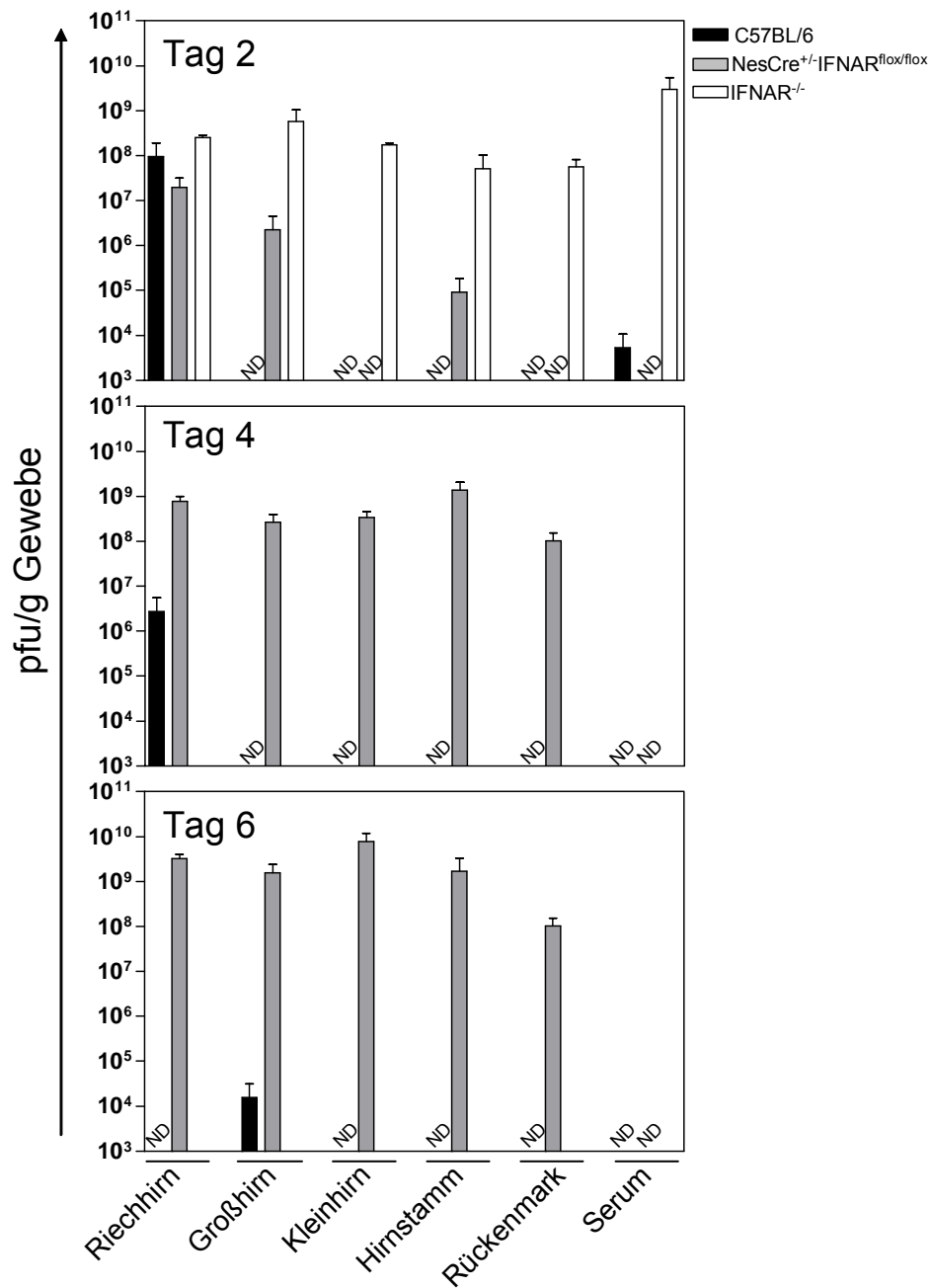
### 5.2.7 VIRUSVERMEHRUNG IST IN VSV INFIZIERTEN C57BL/6 MÄUSEN AUF DAS RIECHHIRN BESCHRÄNKT

Die bisherigen Daten lassen darauf schließen, dass es nach *i.n.* VSV Infektion in NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen zu einer weitreichenden Infektion des ZNS kommt (vergl. Abschnitt 5.2.2 und Abb. 5.12). Um den Infektionsverlauf beobachten zu können, wurden C57BL/6, IFNAR<sup>-/-</sup> und NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse mit 10<sup>3</sup> pfu VSV *i.n.* infiziert. An den Tagen 2, 4 und 6 nach Infektion wurden pro Gruppe jeweils 3 Tiere

willkürlich ausgewählt, Blut entnommen und durch Perfusion getötet. An Tag 4 und 6 wurden nur noch C57BL/6 und NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse untersucht. Es wurde jeweils ein halbes Hirn für die Histologie in Formalin fixiert. Die andere Hälfte wurde in ihre Großregionen Riechhirn, Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm zerlegt. Zusätzlich wurde das Rückenmark präpariert. Von den einzelnen Regionen und dem Serum wurden die Virustiter über einen Plaqueassay bestimmt.

Zwei Tage nach Infektion zeigten nur IFNAR<sup>-/-</sup> Mäuse signifikante Virustiter in allen Hirnregionen, wohingegen sich bei WT und NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen das Virus zu diesem Zeitpunkt auf das Riechhirn beschränkte. Zwei Tage später (an Tag 4) beschränkte sich die Virusinfektion der WT Mäuse weiterhin auf das Riechhirn. In den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen fand man an Tag 4 und 6 in allen Hirnregionen und dem Rückenmark hohe Virustiter.

Zur Virämie, das heißt man findet freies Virus im Blut, kam es nur in den IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen. In allen anderen Tieren ließ sich zu keinem Zeitpunkt Virus im Blut nachweisen.

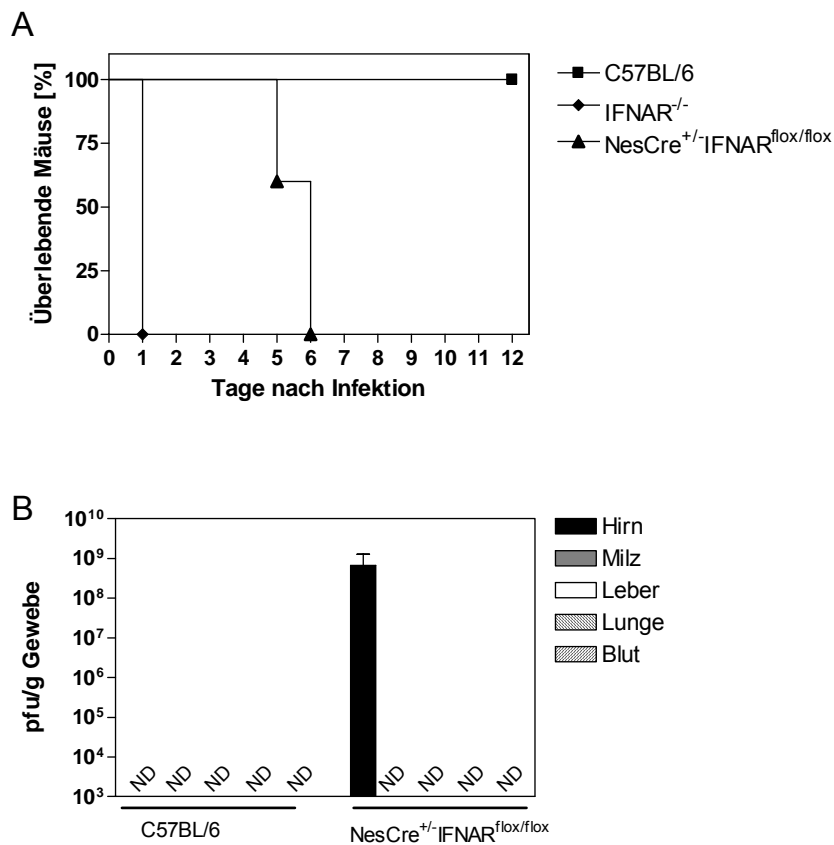


**Abb. 5.14:** Nach VSV Infektion repliziert VSV in IFNAR<sup>-/-</sup>, C57BL/6 und NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen in unterschiedlichen Regionen des ZNS. Mäuse wurden mit  $10^3$  pfu VSV *i.n.* infiziert. Je drei Tieren pro Gruppe wurden an Tag 2, 4 und 6 Blut entnommen und sie wurden anschließend durch Perfusion getötet. Die verschiedenen Regionen des ZNS wurden präpariert und aus den Geweben und dem zusätzlich gewonnenem Serum die Virustiter über einen Plaqueassay bestimmt. An Tag 4 und 6 wurden nur Proben von C57BL/6 und NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> genommen.

### 5.2.8 NESCRE<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>FLOX/FLOX</sup> MÄUSE ZEIGEN NACH INTRAVENÖSER VSV-INFEKTION DEN GLEICHEN KRANKHEITSVERLAUF WIE NACH INTRANASALER INFEKTION

Die Wahl der intranasalen Route zur VSV-Infektion eröffnet dem Virus die Möglichkeit, über die olfaktorischen Rezeptorneuronen auf direktem Weg in das ZNS zu gelangen. Die Möglichkeiten der peripheren Immunität in den Prozess einzugreifen, sind im Vergleich zu Infektionen, die ihren Ursprung in der Peripherie haben, eingeschränkt. Es stellte sich also die Frage, ob das Interferonsystem des ZNS eine ähnlich bedeutende Rolle spielt, wenn es zunächst zu einer peripheren Infektion kommt. Um dies zu überprüfen, wurden Mäuse mit  $2 \times 10^6$  pfu VSV intravenös infiziert:

Nach intravenöser Infektion verstarben die konventionellen IFNAR<sup>-/-</sup> Mäuse bereits einen Tag nach VSV-Infektion. Sie zeigten, wie nach intranasaler Infektion einen schnellen Krankheitsverlauf mit Symptomen wie struppiges Fell, flache Atmung, sie krümmten sich, bewegten sich kaum noch und verstarben. Der Krankheitsverlauf deutet auch hier auf ein Multiorganversagen hin. Die NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen zeigten wie nach intranasaler Infektion motorische Schwierigkeiten und im Endstadium aufsteigende Lähmungen und verstarben. Dem gegenüber zeigten C57BL/6 Mäuse bei der verwendeten Dosis keine Symptome und überlebten. Die Bestimmung der Virustiter zeigte, dass auch bei intravenöser Infektion mit  $2 \times 10^6$  pfu VSV 5 bis 6 Tage nach Infektion Virus in den C57BL/6 Mäuse in keinem der untersuchten Organe nachzuweisen war. In den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen ist wie nach intranasaler Infektion in den peripheren Organen und Blut kein Virus zu finden. Sie zeigten jedoch im Hirn Virustiter mit mehr als  $10^8$  pfu VSV pro Gramm Gewebe. Das deutet darauf hin, dass auch nach intravenöser Infektion eine funktionierende Immunabwehr in der Peripherie nicht ausreichend ist, um Infektionen des ZNS zu verhindern.



**Abb. 5.15: NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse zeigen auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber *i.v.* VSV Infektionen.** C57BL/6 und NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse wurden intravenös mit  $2 \times 10^6$  pfu VSV infiziert. **(A)** Nach intravenöser Infektion mit  $2 \times 10^6$  pfu VSV starben NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse an Tag 5/6 nach Infektion. WT Mäuse überlebten die Infektion ohne Anzeichen einer Erkrankung zu zeigen. IFNAR<sup>-/-</sup> zeigten bereits an Tag 1 schwere Krankheitssymptome wie struppiges Fell, eine gekrümmte Körperhaltung, reduzierte Aktivität und verstarben. NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse zeigten bis Tag 5/6 keine Zeichen einer Infektion. Im Vergleich zu IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> zunächst eine verstärkte Aktivität, liefen im Kreis und hatten Probleme geradeaus zu laufen oder die Richtung zu ändern. Im fortgeschrittenen Stadium waren sie halbseitig gelähmt, fingen an, sich zu krümmen, bekamen struppiges Fell und verstarben. **(B)** In C57BL/6 Mäusen ließ sich an Tag 5 nach Infektion kein Virus reisolieren. In den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> fand sich in den peripheren Organen und dem Blut, wie nach intranasaler Infektion keine Virus. Man fand jedoch in den Hirnen der Tiere sehr hohe Virusmengen.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 NESCRE<sup>+/-</sup>-IFNAR<sup>FLOX/FLOX</sup> MÄUSE ZEIGEN SPEZIFISCHE IFNAR-DELETION IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM

Um die Rolle von Typ I IFN im zentralen Nervensystem (ZNS) zu untersuchen, wurden Mäuse mit einer gewebespezifischen Deletion des Typ I Interferonrezeptors (IFNAR) im ZNS unter Verwendung der Cre loxP Technologie hergestellt. Das Cre loxP System beruht darauf, dass die Bakteriophagenrekombinase Cre spezifisch sogenannte loxP-Sequenzen erkennt und DNA-Fragmente, die durch zwei loxP-Sequenzen flankiert werden je nach Orientierung der loxP-Sequenzen entweder deletiert oder invertiert. Dazu wurden zuvor generierte Mäuse mit einem konditionellen *ifnar-1* Allel (IFNAR<sup>flox/flox</sup>) mit Mäusen gekreuzt, die auf einem Transgen die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Nestin-Promoters exprimieren (NesCre<sup>+/-</sup>) (Tronche et al., 1999). In Nachkommen dieser Zucht (NesCre<sup>+/-</sup>-IFNAR<sup>flox/flox</sup>) kommt es zu einer ZNS spezifischen Deletion des IFNAR.

Nestin ist ein Intermediärfilament und wird während der Embryogenese transient im Neuralrohr und in Myoblasten exprimiert (Lendahl et al., 1990; Sejersen und Lendahl, 1993). Die Nestinexpression im Neuralrohr und in Myoblasten wird unabhängig voneinander durch unterschiedliche *Intronenhancer* reguliert. Die ZNS-spezifische Expression geschieht unter der Kontrolle des Intron II *Enhancers*, der auch bei der Herstellung der NesCre<sup>+/-</sup> Maus verwendet wurde. Findet die Expression in Verbindung mit dem Intron I *Enhancer* statt, ist die Expression des Proteins Muskel-spezifisch (Zimmerman et al., 1994). Im Neuralrohr entwickeln sich Nestin-positive Zellen zu Neuronen und Gliazellen (Renfranz et al., 1991).

Die Zelltyp- und/oder Gewebsspezifität der Expression des NesCre Transgens scheint neben dem *Enhancer* noch von anderen Faktoren abhängig zu sein. So sind in der Literatur neben der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten NesCre<sup>+/-</sup> Maus (Tronche et al., 1999) weitere NesCre Mäuse beschrieben. Eine davon, die sogenannte Deleter-Cre Maus, zeigt eine ubiquitäre Aktivität der Cre-Rekombinase und führt somit zur

ubiquitären Deletion von loxP flankierten Genregionen (Schwenk et al., 1995). Die Deleter-Cre Maus wurde im Rahmen der Arbeit verwendet, um IFNAR<sup>ΔEx10/ΔEx10</sup> Tiere herzustellen. IFNAR<sup>ΔEx10/ΔEx10</sup> Tiere sind auf allen Zellen IFNAR defizient und gleichen im Phänotyp konventionellen IFNAR<sup>-/-</sup> Tieren. Die ubiquitäre Deletion wird über Cre-Expression in der Keimbahn vermittelt (Betz et al., 1996). Die Gruppe um Ulrich Müller zeigte, dass bei den in dieser Arbeit verwendeten NesCre<sup>+/-</sup> Mäusen eine effiziente und weitverbreitete Rekombination in neuronalen Vorläuferzellen ab dem Embryonalstadium E10.5 vermittelt wird (Graus-Porta et al., 2001). Zeitgleich mit der Publikation der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten NesCre<sup>+/-</sup> Maus wurden weitere NesCre-Mäuse publiziert. Allen gemein war eine ähnliche Konstruktion des Transgens, jedoch fand die Insertion der Transgene zufällig und somit wahrscheinlich an unterschiedlichen Stellen des Genoms statt. Dementsprechend zeigen die Mäuse unterschiedliche Phänotypen hinsichtlich der Rekombinationseffizienzen und des Expressionsmusters (Crone et al., 2003; Groszer et al., 2001; Lin et al., 2003; Zhou et al., 2003).

Bei der Züchtung der NesCre<sup>+/-</sup>-IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse wurde in 32,89% aller NesCre<sup>+/-</sup>-IFNAR<sup>flox/flox</sup> positiver Mäuse eine IFNAR-Deletionen auch außerhalb des ZNS beobachtet. So finden sich innerhalb eines Wurfes Individuen mit ubiquitär deletierten Allelen und solche, bei denen die Deletion des IFNAR auf das ZNS beschränkt ist. Die ubiquitäre Deletion eines *ifnar*<sup>flox</sup> Allels ist auf eine Cre-Expression in der Keimbahn zurückzuführen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch durch andere Gruppen gemacht. Jody Haigh et al. zeigten durch Verwendung von NesCre<sup>+/-</sup>;Z/EG Reporter doppeltransgenen Mäusen, dass Cre zunächst im Neuroektoderm und später in dem sich entwickelnden ZNS exprimiert wird. Verwendeten Haigh et al. diese Mäuse für weitere Zuchten kam es zu einer Keimbahn-vermittelten ubiquitären Expression eines Reportergens. Das Reportergen wurde benutzt, um die Aktivität der Cre Rekombinase *in vivo* bestimmen zu können. Des Weiteren führten sie Southern Blot Analysen durch, die zeigten, dass in NesCre<sup>+/-</sup> Mäusen die Aktivität der Cre-Rekombinase auf das ZNS und auf Spermien beschränkt ist (Haigh et al., 2003).

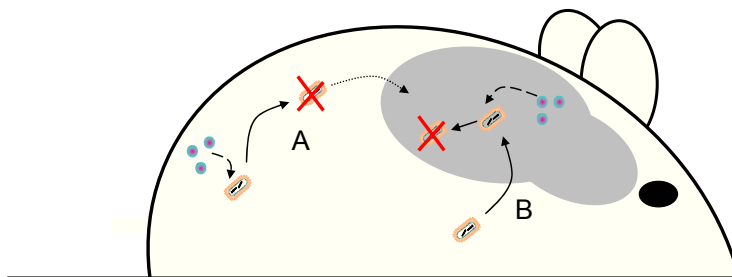
Die hier eingesetzten transgenen NesCre<sup>+/-</sup> Mäuse befanden sich zunächst auf einem durchmischten genetischen *Background* und wurden in unserer Gruppe 10-fach auf den C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt. Der durchmischte *Background* entstand durch

Injektion des NesCre-DNA Konstruktes in eine BL6/SJF2 Oozyten (Tronche et al., 1999). Die resultierenden Mäuse wurden mit C57BL/6 Tieren verpaart. Bei der Züchtung der Mäuse auf dem durchmischten genetischen Hintergrund kam es sporadisch zu Fehlbildungen, wie der Ausbildung eines fünften Hinterlaufs. Nach 10-fachem Zurückkreuzen des Transgens mit C57BL/6 Tieren wurden keine Fehlbildungen mehr beobachtet.

## 6.2 NESCRE<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>FLOX/FLOX</sup> MÄUSE ZEIGEN EINE ERHÖHTE SENSITIVITÄT GEGENÜBER EINER INFEKTION MIT VSV

Mit Hilfe der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Maus sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, welche Rolle Typ I Interferone (IFN) im ZNS spielen. Somit sollte die Bedeutung des zentralnervösen Immunsystems für die Kontrolle neurotroper Viren untersucht werden.

Eine Voraussetzung für eine Virusinfektion im ZNS ist in der Regel eine Infektion der Peripherie mit dem neurotrophen Erreger. Der Körper hat die Möglichkeit eine Virusinfektion in der Peripherie oder innerhalb des ZNS zu bekämpfen und so eine schwere Infektion des ZNS zu verhindern.



**Abb. 6.1: Möglichkeiten zur Verhinderung von Virusinfektionen im ZNS.** Nach peripherer Infektion mit Virus wird (A) das Virus in der Peripherie bekämpft und das Virus kann das ZNS nicht infizieren. (B) Das Virus infiziert zunächst das ZNS und wird dann innerhalb des ZNS eliminiert.

Unter Immunologen herrscht die Meinung vor, dass Viren erst dann das ZNS infizieren können, wenn die periphere Immunität versagt hat. Mit der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Maus bietet sich nun die Möglichkeit, genau zu untersuchen, ob das periphere Immunsystem allein für die Kontrolle von Viren und somit für die Verhinderung von Infektio-



nen des ZNS verantwortlich ist, oder ob Immunaktivitäten innerhalb des ZNS eine entscheidende Rolle spielen. NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse haben in der Peripherie ein intaktes Interferonsystem. Dagegen fehlt im ZNS der Typ I Interferonrezeptor.

NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse, C57BL/6 WT und IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit 10<sup>3</sup> pfu VSV intranasal infiziert. Die intranasale Route wurde gewählt, da dadurch dem Virus die Möglichkeit gegeben wird, über eine Infektion der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) in das Riechhirn und somit in das ZNS zu gelangen (Plakhov et al., 1995; Huneycutt et al., 1994).

C57BL/6 Mäuse zeigten nach intranasaler Infektion mit 10<sup>3</sup> pfu VSV keinerlei Symptome und überlebten. Die Infektion von IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen verlief ebenso (Daten nicht gezeigt). Dem gegenüber starben IFNAR<sup>-/-</sup> Mäuse innerhalb von drei Tagen nach Infektion. Während des schnellen Krankheitsverlaufs zeigten IFNAR<sup>-/-</sup> Tiere verminderte Aktivität, gekrümmte Körperhaltung und gestäubtes Fell. Aus dem Krankheitsverlauf der Mäuse lässt sich schließen, dass sie an einem Multiorganversagen starben. Die erhöhte Empfindlichkeit von IFNAR defizienten Mäusen gegenüber VSV ist auch schon zuvor 1994 von Ulrike Müller und Kollegen gezeigt worden (Müller et al., 1994). NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse verhielten sich zunächst wie C57BL/6 Kontrolltiere und zeigten keinerlei Krankheitssymptome. Jedoch 5 bis 6 Tage nach Infektion zeigten sie zunächst eine erhöhte Aktivität und später zunehmende Lähmungserscheinungen, die einerseits als Halbseitenlähmung und teilweise als aufsteigende Lähmungen auftraten und schließlich zum Tod führten. Im Gegensatz zu den IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten sie kein struppiges Fell und ihre Atmung war zunächst nicht beeinträchtigt. Infolge der aufsteigenden Lähmung kam es letztlich wahrscheinlich zur Atemdepression und somit zum Tod. Die gleiche Symptomatik zeigten C57BL/6 Mäuse bei einer Infektion mit sehr hohen Dosen VSV. All dies deutet auf eine neuropathologische Symptomatik der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse hin (vergl. 5.2.1).

VSV gehört in der Maus zu den neurotrophen Viren, die bevorzugt in den Zellen des ZNS replizieren (Sabin und Olitsky, 1937; van den Pol et al., 2002). Durch die intranasale Applikation kann VSV über die olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) innerhalb von 12-24 Stunden in die Zellen des Riechhirns gelangen und diese infizieren (Reiss et al., 1998). Dies führt dann, wie von uns beobachtet und in der Literatur beschrieben,

zur Hinterlaufparalyse mit begleitender Meningitis, Ventrikulitis und Nekrosen im Kortex (Forger, III et al., 1991; Miyoshi et al., 1971).

In den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen infiziert VSV nach wie vor bevorzugt Zellen des ZNS und keine peripheren Gewebe. Die NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen zeigten zum Zeitpunkt des Todes nur im ZNS signifikante Virustiter. Gleiches sah man bei C57BL/6 Tieren nach Infektion mit sehr hohen VSV-Dosen, wohingegen in den IFNAR<sup>-/-</sup> Mäuse das Virus überall replizierte und es auch zur Virämie kam (siehe Abb. 5.8 und Abb. 5.14). Gleiche Beobachtungen wurden auch bei intravenöser Infektion mit dem Poliovirus gemacht, das in der Regel in Neuronen des Rückenmarks und des Hirnstammes repliziert (Racaniello, 2006). In IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen ist das Poliovirus jedoch auch in der Lage, nahezu alle anderen Organe zu infizieren (Ida-Hosonuma et al., 2005).

Stanners und Goldberg sind der Meinung, dass der Neurotropismus ein Resultat von Resistenzmechanismen in den peripheren Organen ist, die im ZNS jedoch nicht zum Tragen kommen (Stanners und Goldberg, 1975). Dies würde bedeuten, dass immunologische Mechanismen im ZNS nicht existieren bzw. keine größere Rolle spielen. Als Konsequenz würde die Deletion des IFNAR im ZNS keinen oder nur einen geringen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Mäuse ausüben. Tatsächlich spielt die An- oder Abwesenheit des Rezeptors im ZNS bei den verwendeten Virusdosen eine überlebenswichtige Rolle. Daraus folgt, dass die periphere Immunität nicht ausreicht um Virusinfektionen des ZNS zu verhindern.

### **6.3 NESCRE<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>FLOX/FLOX</sup> MÄUSE ZEIGEN IN DER PERIPHERIE ÄHNLICHE TYP I IFN TITER WIE C57BL/6 MÄUSE**

Bei dem verwendeten Mausmodell handelt es sich um eine gewebespezifische Deletion des IFNAR im ZNS. Der IFNAR hat nicht nur einen Einfluss auf die Erkennung und Signaltransduktion der IFN, sondern auch auf deren Expression. Frühe Typ I IFN (vor allem IFN- $\beta$ ) binden an den IFNAR und induzieren unter anderem die Expression weiterer Typ I IFN (Decker et al., 2005). Eine wichtige Frage, die im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden sollte, war ob es nach intranasaler Infektion zur lokal begrenzten und/oder über das Serum vermittelten Interferonausschüttung kommt und welchen Einfluss Seruminterferon auf den Krankheitsverlauf der Mäuse hat.

Durch ELISA wurden die IFN- $\alpha$  Konzentrationen im Serum und in Hirnhomogenaten an vier aufeinanderfolgenden Tagen nach Infektion bestimmt. Im Serum wurde ein Maximum an IFN- $\alpha$  48 Stunden nach intranasaler Infektion gefunden. C57BL/6 Mäuse hatten im Schnitt 250 pg/ml und NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse 800 pg/ml IFN- $\alpha$  im Serum. Nach intravenöser Infektion mit VSV fanden sich im Serum nach 12–18 Stunden maximale IFN- $\alpha$  Titer. Es wurden nach intravenöser Infektion auch höhere Titer von 2000–3500 pg/ml IFN- $\alpha$  gefunden (Kamphuis et al., 2006; Lund et al., 2004; Waibler et al., 2007). Die höheren IFN-Titer nach intravenöser Infektion lassen sich durch die Gabe einer höheren Virusdosis und durch die intravenöse Infektionsroute erklären, die eine schnellere Aktivierung der pDC (Hauptproduzenten der Typ I IFN nach VSV Infektion) ermöglichen (Barchet et al., 2002). Es wurde versucht, die IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  im ZNS über ELISA nachzuweisen. Hierzu wurden Hirne infizierter Tiere in Hirnhomogenatpuffer mit Proteaseinhibitoren und dem ATPase-Inhibitor Vanadat homogenisiert. Gewebereste wurden abzentrifugiert und die klaren Überstände im ELISA eingesetzt. Es zeigte sich aber, dass weder in den Hirnhomogenaten der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen noch in den Homogenaten von C57BL/6 Mäusen Typ I IFN im ELISA nachgewiesen werden konnte. Um zu überprüfen, ob es in den Proben trotz der Zugabe von Proteaseinhibitoren zu Proteaseaktivitäten kam, die die IFN-Bestimmung mittels ELISA negativ beeinflussen könnten, wurden sogenannte *Spiking*-Experimente durchgeführt. Es wurden Homogenate aus uninfizierten Hirnen angefertigt und anschließend IFN-haltige Zellkulturüberstände zugegeben (*spiking*). Die Interferontiter wurden anschließend in den Proben durch einen ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass das Hirnhomogenat bei den Mengen an zugegebenen Zellkulturüberständen keinen negativen Einfluss auf das Ergebnis des ELISAs hatte (siehe **Abb. 5.9B**). Anhand der vorliegenden Daten liegt es nah, dass die Typ I IFN im ZNS nur in sehr geringer Menge und lokal konzentriert auftreten. Dadurch liegt die vorhandene IFN-Menge unterhalb des Detektionslimits des ELISAs. Die Gruppe von Thomas Michiels zeigte zuvor, dass Zellen des ZNS *in vivo* nach Virusinfektionen in der Lage sind, IFN- $\alpha$  zu transkribieren. Der Nachweis, ob es auch zur Proteinsynthese kommt, blieb jedoch aus (Delhaye et al., 2006).

Um nachzuprüfen, ob es nach VSV Infektion zur Aktivierung des IFNAR kommt, untersuchten wir den Phosphorylierungsstatus von STAT-1 nach Infektion. STAT-1

(*Signal Transducers and Activators of Transcription*) ist eine wichtige Komponente des IFN-abhängigen JAK/STAT Signaltransduktionsweges. STAT-1 wird nach IFNAR-Stimulation phosphoryliert, dimerisiert anschließend mit STAT-2 und wandert in den Zellkern (vergl. **Abb. 2.1**). STAT-1 spielt auch in der IFN- $\gamma$  vermittelten Signaltransduktion eine Rolle. Nach Phosphorylierung bildet STAT-1 Homodimere. Im Falle der IFNAR vermittelten Signaltransduktion transloziert das STAT-1/STAT-2 Dimer gemeinsam mit IRF9 in den Zellkern, wo es dann zur Aktivierung von Interferon-abhängigen Genen kommt (siehe **Abb. 2.1**) (Platanias, 2005). Durch Analyse der STAT-1 Phosphorylierung konnte gezeigt werden, dass es in C57BL/6 Tieren nach VSV-Infektion zu Phosphorylierung und Hochregulation von STAT-1 im Riechhirn kommt (siehe **Abb. 5.10**).

Wie bereits beschrieben, spielt STAT-1 in der Signaltransduktion beider IFN-Rezeptoren eine Rolle. Die frühe Phosphorylierung zwei Tage nach Infektion deutet auf eine Aktivierung des INFAR und somit auch auf die Expression von Typ I IFN hin. IFN- $\gamma$  wird primär von T-Zellen und NK-Zellen fünf bis sieben Tage nach Infektion sekretiert, somit kommt es auch erst fünf bis sieben Tage nach Infektion zur Aktivierung des IFN- $\gamma$  Rezeptors (IFNGR) (Janeway, Jr. et al., 2005). Durch die Bestimmung der STAT-1 Phosphorylierung in IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen, die einen intakten IFNGR tragen aber IFNAR defizient sind (Müller et al., 1994), konnte überprüft werden, ob es sich um eine IFNAR-abhängige STAT-1 Phosphorylierung handelt. In IFNAR<sup>-/-</sup> Tieren konnte nach VSV-Infektion keine Phosphorylierung von STAT-1 innerhalb von 2 Tagen nach Infektion nachgewiesen werden. Da in den IFNAR<sup>-/-</sup> Tieren die STAT-1-Phosphorylierung ausblieb, kann man darauf schließen, dass die in C57BL/6 Tieren gemessene STAT-1-Phosphorylierung auf die Wirkung von Typ I IFN zurückzuführen ist.

#### **6.4 DIE LYMPHOZYTEN-INFILTRATION KORRESPONDIERT MIT DER AUSBREITUNG VON VSV INNERHALB DES ZNS**

Im Rahmen der Studie kam die Frage auf, ob die erhöhte Sensitivität der NesCre<sup>+/-</sup> IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse gegenüber einer letalen VSV-Infektion einer ausbleibenden Immunantwort im ZNS zuzuschreiben ist. In histologischen Studien konnte

im Rahmen einer Kooperation gezeigt werden, dass es sechs Tage nach Infektion zur Infiltration des ZNS durch T-Zellen (**Abb. 5.12**) und Makrophagen (Daten nicht gezeigt) kommt. In den C57BL/6 Mäusen beschränkte sich die Lymphozyteninfiltration auf das Riechhirn, wohingegen in den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen auch das Kleinhirn und der Hirnstamm T-Zellinfiltrate aufwiesen.

Im Gegensatz zu naiven T-Zellen infiltrieren aktivierte T-Zellen regelmäßig das ZNS. Finden sie dort kein Antigen vor, verlassen sie das ZNS wieder oder sterben durch Apoptose. Treffen sie aber im ZNS auf Antigen, verbleiben sie dort und werden aktiv (Hickey, 2001). Nach intranasaler Infektion mit VSV konnten replikationsfähige Viruspartikel in den Hirnen der C57BL/6 und NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Tieren nachgewiesen werden (**Abb. 5.12**). Sowohl in den C57BL/6 als auch in den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen konnten in histologischen Studien infiltrierende T-Zellen nachgewiesen werden. In Wildtyp-Tieren war die T-Zellinfiltration auf das Riechhirn beschränkt, aber deutlich ausgeprägter als im Riechhirn der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse. In den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen war die Infiltration nicht nur auf die eine Region des Gehirns beschränkt, stattdessen fanden sich auch T-Zellen in anderen Bereichen des ZNS. Da die Virusmenge im ZNS der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen deutlich erhöht war, lässt sich die erniedrigte T-Zellzahl nicht mit einer geringeren Menge VSV-spezifischen Antigens erklären. Es ist zu vermuten, dass die reduzierte T-Zellinfiltration im Riechhirn der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse auf eine abgeschwächte Immunantwort zurückzuführen ist. Nach Infektion des ZNS kommt es dort zu einer lokalen Zytokinausschüttung. Zu den ausgeschütteten Zytokinen gehört vermutlich auch Typ I IFN (Griffin, 2003). In Folge der Interferonausschüttung kommt es zur Expression von interferoninduzierten Chemokinen, unter anderem RANTES (CCL5) und CCL2, die zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und somit zur ansteigenden Lymphozyteninfiltration führen können (Zirger et al., 2006). Erhöhte RANTES-Konzentrationen werden mit der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der Multiplen Sklerose (MS), in Verbindung gebracht. EAE bzw. MS gehen mit einer erhöhten Infiltration autoreaktiver T-Zellen einher (Eugenin und Berman, 2003). Vermutlich werden in den C57BL/6 Mäusen die T-Zellen über Chemokine wie RANTES angelockt, die dann über die gezielt geöffnete Blut-Hirn-Schranke das Riechhirn infiltrieren. Dies wird durch die Beobachtung unter-

stützt, dass nach Infektion mit VSV die Hochregulation der entsprechenden Rezeptoren (CCR5 und CCR2) auf T-Zellen beobachtet wurde (Nansen et al., 2000).

Es ist zu vermuten, dass in den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen die zusätzliche Stimulation durch die Zytokine ganz oder teilweise ausbleibt, und so die T-Zellen nicht gezielt in das ZNS gelockt werden. Die stattfindende T-Zellinfiltration ließe sich dadurch erklären, dass aktivierte T-Zellen, die das ZNS regelmäßig infiltrieren, ausreichend Antigen vorfinden, um nicht zu sterben bzw. um das ZNS wieder zu verlassen. Dass es zu einer relativ starken Infiltration kommt, mag einerseits daran liegen, dass es auf Grund der Virusinfektion und der resultierenden T-Zellstimulation zu einer Expansion Virus-spezifischer T-Zellen kommt. Der Anteil der Virus-spezifischen T-Zellen an der gesamt T-Zellzahl ist somit um ein vielfaches gestiegen (Haring et al., 2006). Dass die T-Zellen in den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen auch in den anderen Regionen des ZNS zu finden sind, lässt sich nur damit erklären, dass die Ausbreitung der Viren weiter fortgeschritten ist als in den C57BL/6 Mäusen. Die verstärkte räumliche Ausbreitung von VSV im Hirn der NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse wurde in **Abb. 5.14** gezeigt. Daraus lässt sich schließen, dass die Lymphozyteninfiltration mit dem Ort der Virusinfektion korrespondiert.

## **6.5 IFN-ABHÄNGIGE MECHANISMEN VERHINDERN DIE AUSBREITUNG NEUROTROPER VIREN INNERHALB DES ZNS**

Der Befund, dass sich die Virusausbreitung in den Wildtyp C57BL/6 Mäusen auf das Riechhirn beschränkt, wohingegen sich das Virus in den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäusen scheinbar ungehindert innerhalb des ZNS ausbreitet, impliziert, dass Typ I Interferone eine wichtige Rolle zur Kontrolle des Virus im ZNS spielen. Die Befunde zeigen, dass ein intaktes Interferonsystem in der Peripherie nicht ausreichend ist, um Infektionen des ZNS mit neurotrophen Viren zu verhindern. In beiden Gruppen werden normale IFN-Titer im Serum induziert, die aber scheinbar keinen Einfluss auf das Geschehen innerhalb des ZNS haben. Interferone können die Bluthirnschranke nicht oder nur sehr eingeschränkt passieren (Banks, 2005; Pan et al., 1997). Deshalb ist davon auszugehen, dass IFN- $\alpha/\beta$  innerhalb des ZNS gebildet werden muss, um dort lokal wirken zu können. Diese These wird durch die Beobachtungen unterstützt, dass Zellen des ZNS in der La-

ge sind, nach Virusinfektion IFN- $\alpha/\beta$  zu transkribieren (vergl. 6.3). Die Autoren gehen davon aus, dass es mit hoher Wahrscheinlichkeit nach der Transkription auch zur Translation und somit zur Expression von Typ I IFN innerhalb des ZNS kommt. Zu den Interferonproduzenten gehören unter anderem die Neuronen (Delhaye et al., 2006; Préhaud et al., 2005). Neuronen sind nach Infektion nicht nur Interferonproduzenten, sondern sind auch in der Lage, Typ I IFN zu erkennen, was sich unmittelbar auf die Virusreplikation auswirkt. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung von Neuroplastomazellen oder primären olfaktorischen Neuronen mit IFN- $\alpha$  zu einer erheblichen, wenn auch nicht vollständigen, Inhibition der VSV-Replikation führt (Trottier, Jr. et al., 2005). Der Einfluss von Typ I IFN auf die Virusreplikation im ZNS wurde bereits zuvor gezeigt: Die Behandlung von Mäusen mit Typ I IFN vor bzw. während VSV-Infektionen führte zu erhöhten Überlebensraten und reduzierter Virusreplikation (DeClercq und DoSomer, 2007; Gresser et al., 1975; Tovey und Maury, 1999).

Eine wichtige Rolle bei antiviralen Aktivitäten müssen den Neuronen des Riechhirns zugeschrieben werden. Da nach intranasaler Infektion von Wildtypmäusen im Riechhirn Viruspartikel nachgewiesen werden können, die Viruspartikel sich aber nicht weiter in andere Regionen des ZNS ausbreiten, ist anzunehmen, dass hier ein Schwerpunkt der antiviralen Aktivität liegt. Das Riechhirn eignet sich auch insofern als Ort für die Virusinhibition, da die Neuronen sich von denen des restlichen ZNS in wichtigen Eigenschaften unterscheiden: Die Neuronen des olfaktorischen Systems haben die Möglichkeit zur unbegrenzten Regeneration (Graziadei und Monti Graziadei, 1980; Graziadei und Monti Graziadei, 1985). Die olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) bilden die Schnittstelle zwischen der Außenwelt und dem ZNS und sind die Eintrittspforte für viele Viren in das ZNS. So wurde gezeigt, dass nach intranasaler Infektion mit VSV die ORN innerhalb von 12 Stunden infiziert werden und dass virale Antigene nachweisbar sind (Lundh et al., 1987; Mori et al., 2005; Plakhov et al., 1995). Schwob und Kollegen konnten zeigen, dass es nach Infektion mit Maushepatitisvirus (MHV) zu einer weitreichenden Zerstörung der Neuronen im Riechhirn kommt, die aber zu einer beschleunigten Regeneration der Neuronen führt (Schwob et al., 2001). Aus diesen Befunden ist zu schließen, dass im Riechhirn Viren eliminiert werden können, ohne dass der Verlust von Neuronen verstärkt pathologische Folgen hat, wie es der Fall wäre, wenn Neuronen aus anderen Bereichen des ZNS zerstört würden. Es wird postuliert, dass im ZNS prinzipiell anti-

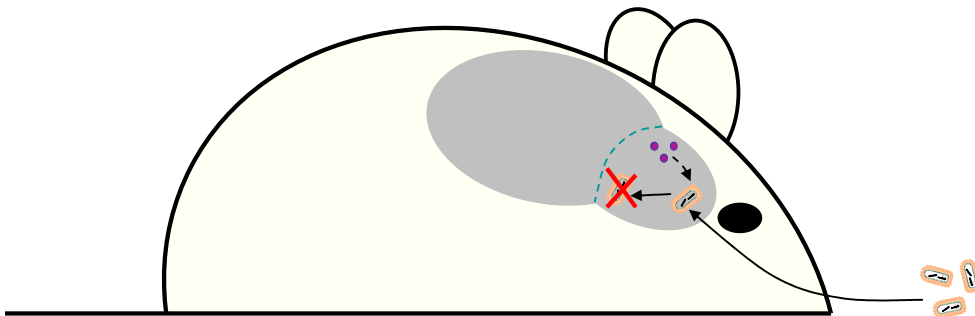
körpervermittelte Methoden der Viruselimination bevorzugt werden, auch wenn das zur Folge hat, dass das Virus eventuell nicht vollständig eliminiert, sondern nur in Ruhe gehalten wird (Griffin, 2003). So wird der neurotrope JHM-Stamm des Mausepithelitisvirus (MHV) initial über die zelluläre Immunität unter Kontrolle gebracht, aber anschließend durch humorale Mechanismen an der Reaktivierung gehindert (Ramakrishna et al., 2003). Dass die Viruselimination im ZNS in erster Linie nicht durch die MHC Klasse I restringierten zytotoxische T-Zellen vermittelt wird, zeigt sich bereits dadurch, dass die MHC I Expression auf Neuronen auch nach Virusinfektion oder Zytokinstimulation nicht aufreguliert wird (Mauerhoff et al., 1988; Momburg et al., 1986). Levine et al. zeigten 1991 erstmals *in vivo*, dass Alphavirusinfektionen des ZNS über antikörpervermittelte Mechanismen bekämpft werden (Levine et al., 1991).

Nach Virusinfektion kommt es zu Rekrutierung von Lymphozyten in das Riechhirn (vergleiche 5.2.5). Lymphozyteninfiltration geht mit einer Änderung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke einher. Es werden spezifisch Adhäsionsmoleküle wie z.B. ICAM1/VCAM1 aufreguliert, die eine verstärkte Infiltration durch Lymphozyten ermöglichen (Irani und Griffin, 1996). Dabei handelt es sich um einen gesteuerten Mechanismus, der lokal begrenzt ist. Ansonsten würde man auch in Regionen des ZNS Lymphozyten finden, die nicht mit Virus infiziert sind.

Im Verlauf von VSV-Infektionen kommt es zu Veränderungen der Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität. Es wird vermutet, dass der tödliche Verlauf einer viralen Enzephalitis mit einer unkoordinierten Öffnung der Blut-Hirn-Schranke korreliert sei (Chaturvedi et al., 1991). Am Beispiel des Rabiesvirus konnte hingegen gezeigt werden, dass eine lokale Öffnung der Blut-Hirn-Schranke im Rahmen der Inflammation zu einer aseptischen Elimination des Virus führt. Das heißt, dass für die Viruselimination ein Öffnen der Blut-Hirn-Schranke essentiell ist (Phares et al., 2006; Roy et al., 2007). Hierbei könnte IFN- $\beta$  eine entscheidende Rolle spielen. Es konnte gezeigt werden, dass IFN- $\beta$  die Infiltration von neutrophilen Granulozyten einschränkt und so eine stabilisierende Wirkung auf die Blut-Hirn-Schranken-Integrität hat (Veldhuis et al., 2003).



Ein mögliches Modell der antiviralen Aktivität im ZNS könnte folgendermaßen aussehen: Nach intranasaler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit VSV kommt es zu einer Infektion des Riechhirns. Durch Typ I IFN vermittelte Mechanismen führen zur Viruselimination innerhalb des Riechhirns, und eine weiterreichende Infektion des ZNS wird verhindert (Abb. 6.2). Dabei ist es möglich, dass das Virus vollständig eliminiert wird. Wahrscheinlicher ist aber, dass die Virusreplikation durch das Immunsystem unterdrückt und so eine Weiterverbreitung des Virus inhibiert wird. Der Vorteil der Viruselimination innerhalb des Riechhirns ist es, dass ein Verlust olfaktorischer Rezeptorneurone (ORN) toleriert werden kann, da diese sich regenerieren und unter normalen Bedingungen eine Halbwertszeit von 90 Tagen aufweisen (Mori et al., 2005). So kann es im Riechhirn zur Aktivität von zytotoxischen T-Zellen kommen, ohne dass es langfristige Folgen für den Organismus hätte. Wahrscheinlich spielen die zytotoxischen T-Zellen keine entscheidende Rolle, da ihre Depletion zu keiner Änderung des Krankheitsverlaufs führt und die Mäuse auch ohne zytotoxische T-Zellen sterben (siehe 5.2.6). Das lässt darauf schließen, dass die neuropathologische Symptomatik nicht durch lytische Aktivitäten der CD8 positiven T-Zellen, sondern durch das Virus verursacht wurde.



**Abb. 6.2:** Typ I IFN haben wichtige antivirale Funktionen innerhalb des ZNS und verhindern die Ausbreitung von VSV über das Riechhirn hinaus. Die intranasale Inokulation mit VSV führt zu einer Infektion des Riechhirns. Durch Typ I IFN vermittelte Mechanismen kommt es zur Viruselimination innerhalb des Riechhirns und eine weiterreichende Infektion des ZNS wird verhindert.

Zur genaueren Überprüfung des oben vorgeschlagenen Modells sind weitere Experimente erforderlich. Eine Möglichkeit zu untersuchen, ob es spezifisch die

IFN-abhängigen Immunantworten im Riechhirn sind, die die Virusausbreitung im ZNS verhindern, wäre die Generierung eines Mausmodells mit einer *Bulbus*-spezifischen Deletion des IFNAR. Dies könnte durch Kreuzung der IFNAR<sup>flox/flox</sup> Maus mit einer OMP-Cre Maus hergestellt werden. OMP steht für *olfactory marker protein* und wird spezifisch nur im Riechhirn exprimiert (Li et al., 2004). Durch die Kreuzung ließe sich eine Maus mit einer Riechhirn-spezifischen Deletion des IFNAR herstellen. Würden die resultierenden OMP-Cre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> Mäuse eine erhöhte Sensitivität für tödliche VSV Infektionen nach intranasaler Gabe zeigen, spräche es dafür, dass die Elimination von VSV im Riechhirn stattfinden und dadurch ein Überspringen der Infektion auf andere Bereiche des ZNS verhindert würde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde VSV als neurotropes Virus in Mäusen verwendet. Dabei handelt es sich um ein relativ artifizielles Infektionsmodell, da Mäuse nicht zu den natürlichen Wirten des Virus gehören und andererseits VSV in seinen natürlichen Wirten (Pferde und Rinder) keinen Neurotropismus zeigt. Es stellt sich also die Frage, in wie weit die hier beschriebenen Ergebnisse für etwaige Virusinfektionen des Menschen relevant sind. Eine bedeutende Virusinfektion des Menschen ist die Infektion mit dem neurotrophen Poliovirus. Poliovirus ist wie VSV ein Einzelstrang-RNA Virus und verursacht die paralytische Poliomyelitis, auch Kinderlähmung genannt. Die Polioinfektion findet in der Regel über den oralen Weg statt. Zunächst repliziert das Virus in den lymphoiden Geweben des Rachenraums und des Darms. In Folge der massiven Replikation kommt es zur Virämie, die letztendlich in einer Infektion des ZNS mündet. Das Poliovirus repliziert innerhalb des ZNS in den Motorneuronen des Rückenmarks, des Hirnstamms und des Motorcortex. Bei der Replikation zerstört das Virus die Wirtszellen und führt zu den charakteristischen Lähmungen (Bodian, 1955). Das Poliovirus infiziert ausschließlich Primaten, da nur diese den für die Infektion notwendigen Poliovirusrezeptor (PVR) exprimieren (Holland und McLaren, 1959). Ein Charakteristikum der Poliomyelitis ist, dass es Jahrzehnte nach scheinbarer Heilung zu erneuten Symptomen kommen kann (Post-Polio-Syndrom) (Howard, 2005). Es wird diskutiert, ob das erneute Auftreten von Symptomen auf persistierendes Poliovirus zurückzuführen ist (Sharief et al., 1991; Destombes et al., 1997). Welche Bedingungen erfüllt sein müssen, um ein erneutes Ausbrechen der Erkrankung zu begünstigen, ist bisher nicht geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Poliovirus Typ I IFN-abhängig eliminiert wird

(Ida-Hosonuma et al., 2005). So kann vermutet werden, dass IFN-abhängig das Wiederaufflackern persistierender Virusinfektionen unterbunden wird.

In der Vergangenheit wurden Mäuse generiert, die den humanen Poliovirusrezeptor exprimieren (TgPVR1-17) und als Modellorganismus für die Poliomyelitis dienen (Ren et al., 1990). Würde man die TgPVR1-17 Mäuse mit den NesCre<sup>+/-</sup>IFNAR<sup>flox/flox</sup> kreuzen, könnte man die Funktion von Typ I IFN im ZNS bei Poliovirusinfektionen untersuchen und so das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Konzept zur Rolle des Typ I IFN erstmals im Zusammenhang mit einer humanpathologisch wichtigen Erkrankung überprüfen.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine funktionierende Immunität in der Peripherie und die Blut-Hirn-Schranke nicht ausreichend sind, um eine Infektion des ZNS mit VSV zu verhindern. Es muss stattdessen zu einer Aktivierung von IFN-abhängigen Mechanismen innerhalb des Riechhirns kommen, die ein Übergreifen der VSV Infektion auf andere Hirnregionen verhindert und zur Elimination von VSV im Riechhirn beiträgt.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Akira,S. und Takeda,K. Toll-like receptor signalling *Nat. Rev. Immunol.*, (2004) 4, 499-511.
- Akira,S., Uematsu,S., und Takeuchi,O. Pathogen recognition and innate immunity *Cell*, (2006) 124, 783-801.
- Akwa,Y., Hassett,D.E., Eloranta,M.L., Sandberg,K., Masliah,E., Powell,H., Whitton,J.L., Bloom,F.E., und Campbell,I.L. Transgenic expression of IFN-alpha in the central nervous system of mice protects against lethal neurotropic viral infection but induces inflammation and neurodegeneration *J. Immunol.*, (1998) 161, 5016-5026.
- Anderson,J.R. The mechanisms of direct, virus-induced destruction of neurons *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, (2001) 253, 15-33.
- Andersson,T., Mohammed,A.K., Henriksson,B.G., Wickman,C., Norrby,E., Schultzberg,M., und Kristensson,K. Immunohistochemical and behaviour pharmacological analysis of rats inoculated intranasally with vesicular stomatitis virus *J. Chem. Neuroanat.*, (1993) 6, 7-18.
- Banks,W.A. Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology *Curr. Pharm. Des.*, (2005) 11, 973-984.
- Barchet,W., Cella,M., Odermatt,B., Asselin-Paturel,C., Colonna,M., und Kalinke,U. Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo *J. Exp. Med.*, (2002) 195, 507-516.
- Besedovsky,H.O. und del Rey,A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses *Endocr. Rev.*, (1996) 17, 64-102.

- Betz,U.A., Vosshenrich,C.A., Rajewsky,K., und Muller,W. Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination *Curr. Biol.*, (1996) 6, 1307-1316.
- Beutler,B. Innate immune responses to microbial poisons: discovery and function of the Toll-like receptors *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, (2003) 43, 609-628.
- Billiau,A., Kieseier,B.C., und Hartung,H.P. Biologic role of interferon beta in multiple sclerosis *J. Neurol.*, (2004) 251 Suppl 2, II10-II14.
- Billingham,R.E. und Boswell,T. Studies on the problem of corneal homografts *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, (1953) 141, 392-406.
- Bodian,D. Emerging concept of poliomyelitis infection *Science*, (1955) 122, 105-108.
- Campbell,I.L., Krucker,T., Steffensen,S., Akwa,Y., Powell,H.C., Lane,T., Carr,D.J., Gold,L.H., Henriksen,S.J., und Siggins,G.R. Structural and functional neuropathology in transgenic mice with CNS expression of IFN-alpha *Brain Res.*, (1999) 835, 46-61.
- Chapman,G.A., Moores,K., Harrison,D., Campbell,C.A., Stewart,B.R., und Strijbos,P.J. Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage *J. Neurosci.*, (2000) 20, RC87.
- Charan,S. und Zinkernagel,R.M. Antibody mediated suppression of secondary IgM response in nude mice against vesicular stomatitis virus *J. Immunol.*, (1986) 136, 3057-3061.
- Chaturvedi,U.C., Dhawan,R., Khanna,M., und Mathur,A. Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice *J. Gen. Virol.*, (1991) 72 ( Pt 4), 859-866.
- Chen,J., Baig,E., und Fish,E.N. Diversity and relatedness among the type I interferons *J. Interferon Cytokine Res.*, (2004) 24, 687-698.

- Clanet,M., Kappos,L., Hartung,H.P., und Hohlfeld,R. Interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis: four-year extension of the European IFNbeta-1a Dose-Comparison Study *Mult. Scler.*, (2004) 10, 139-144.
- Colonna,M., Trinchieri,G., und Liu,Y.J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity *Nat. Immunol.*, (2004) 5, 1219-1226.
- Constantinescu,S.N., Croze,E., Murti,A., Wang,C., Basu,L., Hollander,D., Russell-Harde,D., Betts,M., Garcia-Martinez,V., Mullersman,J.E., und . Expression and signaling specificity of the IFNAR chain of the type I interferon receptor complex *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, (1995) 92, 10487-10491.
- Crone,S.A., Negro,A., Trumpp,A., Giovannini,M., und Lee,K.F. Colonic epithelial expression of ErbB2 is required for postnatal maintenance of the enteric nervous system *Neuron*, (2003) 37, 29-40.
- Crow,Y.J., Black,D.N., Ali,M., Bond,J., Jackson,A.P., Lefson,M., Michaud,J., Roberts,E., Stephenson,J.B., Woods,C.G., und Lebon,P. Cree encephalitis is allelic with Aicardi-Goutieres syndrome: implications for the pathogenesis of disorders of interferon alpha metabolism *J. Med. Genet.*, (2003) 40, 183-187.
- Cutrone,E.C. und Langer,J.A. Contributions of cloned type I interferon receptor subunits to differential ligand binding *FEBS Lett.*, (1997) 404, 197-202.
- de Veer,M.J., Holko,M., Frevel,M., Walker,E., Der,S., Paranjape,J.M., Silverman,R.H., und Williams,B.R. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays *J. Leukoc. Biol.*, (2001) 69, 912-920.
- Decker,T., Muller,M., und Stockinger,S. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection *Nat. Rev. Immunol.*, (2005) 5, 675-687.
- DeClercq,E. und DoSomer,P. Comparative study of the efficacy of different forms of interferon therapy in the treatment of mice challenged intranasally with vesicular stomatitis virus (VSV). *Proc Soc Exp Biol Med*, (2007) 183, 301-307.

- Delhaye,S., Paul,S., Blakqori,G., Minet,M., Weber,F., Staeheli,P., und Michiels,T. Neurons produce type I interferon during viral encephalitis *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2006) 103, 7835-7840.
- Destombes,J., Couderc,T., Thiesson,D., Girard,S., Wilt,S.G., und Blondel,B. Persistent poliovirus infection in mouse motoneurons *J. Virol.*, (1997) 71, 1621-1628.
- Dietzschold, B., Rupprecht, C. E., Fu, Z. F., und Koprowski, H. Rhabdoviruses In Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M. (ed.), *Virology* (1996) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp.1137-1159.
- Ehrlich, P. *Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus.* (1885) Hirschwald, Berlin.
- Ehrlich,P. Über die Methylenblaureaction der lebenden Nervensubstanz. *Dtsch. Med. Wschr.*, (1886) 12, 49-52.
- Engelhardt,B. Regulation of immune cell entry into the central nervous system *Results Probl. Cell Differ.*, (2006) 43, 259-280.
- Eugenin,E.A. und Berman,J.W. Chemokine-dependent mechanisms of leukocyte trafficking across a model of the blood-brain barrier *Methods*, (2003) 29, 351-361.
- Fenner,J.E., Starr,R., Cornish,A.L., Zhang,J.G., Metcalf,D., Schreiber,R.D., Sheehan,K., Hilton,D.J., Alexander,W.S., und Hertzog,P.J. Suppressor of cytokine signaling 1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity *Nat. Immunol.*, (2006) 7, 33-39.
- Fitzgerald-Bocarsly,P. Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells *Biotechniques*, (2002) Suppl, 16-19.
- Flint, S. J, Enquist, L. W., Racaniello, V. R., und Skalka, A. M. *Principles of Virology* (2004) ASM Press, Washington, DC.
- Forger,J.M., III, Bronson,R.T., Huang,A.S., und Reiss,C.S. Murine infection by vesicular stomatitis virus: initial characterization of the H-2d system *J. Virol.*, (1991) 65, 4950-4958.

- Fried, M. und Crothers, D.M. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis *Nucleic Acids Res.*, (1981) 9, 6505-6525.
- Galea, I., Bechmann, I., und Perry, V.H. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.*, (2007) 28, 12-18.
- Goldmann, E. Vitalfärbung am Zentralnervensystem *Abh. Preuss. Akd. Wiss. Phys. - Math. Kl. I.*, (1913) 1, 1-13.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., und Kuby, J. *Immunology* (2003) W.H. Freeman & Co., New York.
- Goodbourn, S., Didcock, L., und Randall, R.E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures *J. Gen. Virol.*, (2000) 81, 2341-2364.
- Gosztonyi, G. und Koprowski, H. The concept of neurotropism and selective vulnerability ("pathocclisis") in virus infections of the nervous system--a historical overview *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, (2001) 253, 1-13.
- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J.C., und Muller, U. Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex *Neuron*, (2001) 31, 367-379.
- Graziadei, P.P. und Monti Graziadei, G.A. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. III. Deafferentation and reinnervation of the olfactory bulb following section of the fila olfactoria in rat *J. Neurocytol.*, (1980) 9, 145-162.
- Graziadei, P.P. und Monti Graziadei, G.A. Neurogenesis and plasticity of the olfactory sensory neurons *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (1985) 457, 127-142.



- Gresser,I., Tovey,M.G., und Bourali-Maury,C. Efficacy of exogenous interferon treatment initiated after onset of multiplication of vesicular stomatitis virus in the brains of mice *J. Gen. Virol.*, (1975) 27, 395-398.
- Griffin,D.E. Immune responses to RNA-virus infections of the CNS *Nat. Rev. Immunol.*, (2003) 3, 493-502.
- Groszer,M., Erickson,R., Scripture-Adams,D.D., Lesche,R., Trumpp,A., Zack,J.A., Kornblum,H.I., Liu,X., und Wu,H. Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo *Science*, (2001) 294, 2186-2189.
- Guillemin,G.J. und Brew,B.J. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification *J. Leukoc. Biol.*, (2004) 75, 388-397.
- Haigh,J.J., Morelli,P.I., Gerhardt,H., Haigh,K., Tsien,J., Damert,A., Miquerol,L., Muhler,U., Klein,R., Ferrara,N., Wagner,E.F., Betsholtz,C., und Nagy,A. Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling *Dev. Biol.*, (2003) 262, 225-241.
- Hänninen,P., Arstila,P., Lang,H., Salmi,A., und Panelius,M. Involvement of the central nervous system in acute, uncomplicated measles virus infection *J. Clin. Microbiol.*, (1980) 11, 610-613.
- Haring,J.S., Badovinac,V.P., und Harty,J.T. Inflaming the CD8+ T cell response *Immunity*, (2006) 25, 19-29.
- Hart,D.N. und Fabre,J.W. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain *J. Exp. Med.*, (1981) 154, 347-361.
- Hickey,W.F. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system *Glia*, (2001) 36, 118-124.

- Hoek,R.M., Ruuls,S.R., Murphy,C.A., Wright,G.J., Goddard,R., Zurawski,S.M., Blom,B., Homola,M.E., Streit,W.J., Brown,M.H., Barclay,A.N., und Sedgwick,J.D. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200) *Science*, (2000) 290, 1768-1771.
- Holland,J.J. und McLaren,L.C. The mammalian cell-virus relationship. II. Adsorption, reception, and eclipse of poliovirus by HeLa cells *J. Exp. Med.*, (1959) 109, 487-504.
- Hooper,D.C., Morimoto,K., Bette,M., Weihe,E., Koprowski,H., und Dietzschold,B. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system *J. Virol.*, (1998) 72, 3711-3719.
- Howard,R.S. Poliomyelitis and the postpolio syndrome *BMJ*, (2005) 330, 1314-1318.
- Huneycutt,B.S., Bi,Z., Aoki,C.J., und Reiss,C.S. Central neuropathogenesis of vesicular stomatitis virus infection of immunodeficient mice *J. Virol.*, (1993) 67, 6698-6706.
- Huneycutt,B.S., Plakhov,I.V., Shusterman,Z., Bartido,S.M., Huang,A., Reiss,C.S., und Aoki,C. Distribution of vesicular stomatitis virus proteins in the brains of BALB/c mice following intranasal inoculation: an immunohistochemical analysis *Brain Res.*, (1994) 635, 81-95.
- Ida-Hosonuma,M., Iwasaki,T., Yoshikawa,T., Nagata,N., Sato,Y., Sata,T., Yoneyama,M., Fujita,T., Taya,C., Yonekawa,H., und Koike,S. The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus *J. Virol.*, (2005) 79, 4460-4469.
- Irani,D.N. und Griffin,D.E. Regulation of lymphocyte homing into the brain during viral encephalitis at various stages of infection *J. Immunol.*, (1996) 156, 3850-3857.
- Isaacs,A. und Lindenmann,J. Virus interference. I. The interferon *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, (1957) 147, 258-267.

- Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport M., und Shlomchik, M. J. *Immunobiology* (2005) Garland Science, New York.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O., und Gratzl, M. *Histologie* (2002) Springer, Berlin.
- Kamphuis, E., Junt, T., Waibler, Z., Forster, R., und Kalinke, U. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia *Blood*, (2006) 108, 3253-3261.
- Klinke, R. und Silbernagl, S. *Lehrbuch der Physiologie* (1996) Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kniesel, U. und Wolburg, H. Tight junctions of the blood-brain barrier *Cell Mol. Neurobiol.*, (2000) 20, 57-76.
- Knopf, P.M., Harling-Berg, C.J., Cserr, H.F., Basu, D., Sirulnick, E.J., Nolan, S.C., Park, J.T., Keir, G., Thompson, E.J., und Hickey, W.F. Antigen-dependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: tissue entry and local retention of antigen-specific B cells *J. Immunol.*, (1998) 161, 692-701.
- Kotenko, S.V. und Langer, J.A. Full house: 12 receptors for 27 cytokines *Int. Immunopharmacol.*, (2004) 4, 593-608.
- Laemmli, U.K., Beguin, F., und Gujer-Kellenberger, G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation *J. Mol. Biol.*, (1970) 47, 69-85.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., und McKay, R.D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein *Cell*, (1990) 60, 585-595.
- Levine, B., Hardwick, J.M., Trapp, B.D., Crawford, T.O., Bollinger, R.C., und Griffin, D.E. Antibody-mediated clearance of alphavirus infection from neurons *Science*, (1991) 254, 856-860.

- Li,J., Ishii,T., Feinstein,P., und Mombaerts,P. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons *Nature*, (2004) 428, 393-399.
- Liedtke,W., Opalka,B., Zimmermann,C.W., und Lignitz,E. Age distribution of latent herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus genome in human nervous tissue *J. Neurol. Sci.*, (1993) 116, 6-11.
- Liew,F.Y., Xu,D., Brint,E.K., und O'Neill,L.A. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses *Nat. Rev. Immunol.*, (2005) 5, 446-458.
- Lin,T., Sandusky,S.B., Xue,H., Fishbein,K.W., Spencer,R.G., Rao,M.S., und Franco-mano,C.A. A central nervous system specific mouse model for thanatophoric dysplasia type II *Hum. Mol. Genet.*, (2003) 12, 2863-2871.
- Lund,J.M., Alexopoulou,L., Sato,A., Karow,M., Adams,N.C., Gale,N.W., Iwasaki,A., und Flavell,R.A. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2004) 101, 5598-5603.
- Lundh,B., Kristensson,K., und Norrby,E. Selective infections of olfactory and respiratory epithelium by vesicular stomatitis and Sendai viruses *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, (1987) 13, 111-122.
- Lutfalla,G., Gardiner,K., Proudhon,D., Vielh,E., und Uze,G. The structure of the human interferon alpha/beta receptor gene *J. Biol. Chem.*, (1992) 267, 2802-2809.
- Lutfalla,G. und Uze,G. Structure of the murine interferon alpha/beta receptor-encoding gene: high-frequency rearrangements in the interferon-resistant L1210 cell line *Gene*, (1994) 148, 343-346.
- Mansour,S.L., Thomas,K.R., und Capecchi,M.R. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes *Nature*, (1988) 336, 348-352.
- Marshak-Rothstein,A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease *Nat. Rev. Immunol.*, (2006) 6, 823-835.

- Mauerhoff,T., Pujol-Borrell,R., Mirakian,R., und Bottazzo,G.F. Differential expression and regulation of major histocompatibility complex (MHC) products in neural and glial cells of the human fetal brain *J. Neuroimmunol.*, (1988) 18, 271-289.
- McMahon,E.J., Bailey,S.L., und Miller,S.D. CNS dendritic cells: critical participants in CNS inflammation? *Neurochem. Int.*, (2006) 49, 195-203.
- McMenamin,P.G. Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations *J. Comp Neurol.*, (1999) 405, 553-562.
- Medawar,P. Immunity of homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, tu subcutaneous tissue and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.*, (1948) 29, 58-69.
- Miyoshi,K., Harter,D.H., und Hsu,K.C. Neuropathological and immunofluorescence studies of experimental vesicular stomatitis virus encephalitis in mice *J. Neuro-pathol. Exp. Neurol.*, (1971) 30, 266-277.
- Momburg,F., Koch,N., Moller,P., Moldenhauer,G., und Hammerling,G.J. In vivo induction of H-2K/D antigens by recombinant interferon-gamma *Eur. J. Immunol.*, (1986) 16, 551-557.
- Mori,I., Nishiyama,Y., Yokochi,T., und Kimura,Y. Olfactory transmission of neurotropic viruses *J. Neurovirol.*, (2005) 11, 129-137.
- Müller,U., Steinhoff,U., Reis,L.F., Hemmi,S., Pavlovic,J., Zinkernagel,R.M., und Aguet,M. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense *Science*, (1994) 264, 1918-1921.
- Nansen,A., Marker,O., Bartholdy,C., und Thomsen,A.R. CCR2+ and CCR5+ CD8+ T cells increase during viral infection and migrate to sites of infection *Eur. J. Immunol.*, (2000) 30, 1797-1806.

- Nieder Korn, J.Y. See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege *Nat. Immunol.*, (2006) 7, 354-359.
- Oehen, S., Hengartner, H., und Zinkernagel, R.M. Vaccination for disease *Science*, (1991) 251, 195-198.
- Orban, P.C., Chui, D., und Marth, J.D. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (1992) 89, 6861-6865.
- Pan, W., Banks, W.A., und Kastin, A.J. Permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barriers to interferons *J. Neuroimmunol.*, (1997) 76, 105-111.
- Perry, V.H., Hume, D.A., und Gordon, S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain *Neuroscience*, (1985) 15, 313-326.
- Pestka, S., Krause, C.D., und Walter, M.R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors *Immunol. Rev.*, (2004) 202, 8-32.
- Phares, T.W., Kean, R.B., Mikheeva, T., und Hooper, D.C. Regional differences in blood-brain barrier permeability changes and inflammation in the apathogenic clearance of virus from the central nervous system *J. Immunol.*, (2006) 176, 7666-7675.
- Plakhov, I.V., Arlund, E.E., Aoki, C., und Reiss, C.S. The earliest events in vesicular stomatitis virus infection of the murine olfactory neuroepithelium and entry of the central nervous system *Virology*, (1995) 209, 257-262.
- Platanias, L.C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling *Nat. Rev. Immunol.*, (2005) 5, 375-386.
- Préhaud, C., Megret, F., Lafage, M., und Lafon, M. Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon *J. Virol.*, (2005) 79, 12893-12904.

- Prinz,M., Garbe,F., Schmidt,H., Mildner,A., Gutcher,I., Wolter,K., Piesche,M., Schrors,R., Weiss,E., Kirschning,C.J., Rochford,C.D., Bruck,W., und Becher,B. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis *J. Clin. Invest.*, (2006) 116, 456-464.
- Prinz,M., Schmidt,H., Mildner,A., Knobloch,K., Hanisch,U., Detje,C.N., Gutcher,I., Mages,J., Lang,R., Martin,R., Gold,R., Becher,B., Brück,W., und Kalinke,U. Engagement of IFNAR on myeloid cells determines the course of autoimmunity in the central nervous system *eingereicht*
- Racaniello,V.R. One hundred years of poliovirus pathogenesis *Virology*, (2006) 344, 9-16.
- Ramakrishna,C., Bergmann,C.C., Atkinson,R., und Stohlman,S.A. Control of central nervous system viral persistence by neutralizing antibody *J. Virol.*, (2003) 77, 4670-4678.
- Reiss,C.S., Plakhov,I.V., und Komatsu,T. Viral replication in olfactory receptor neurons and entry into the olfactory bulb and brain *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (1998) 855, 751-761.
- Ren,R.B., Costantini,F., Gorgacz,E.J., Lee,J.J., und Racaniello,V.R. Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis *Cell*, (1990) 63, 353-362.
- Renfranz,P.J., Cunningham,M.G., und McKay,R.D. Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain *Cell*, (1991) 66, 713-729.
- Roy,A., Phares,T.W., Koprowski,H., und Hooper,D.C. Failure to open the blood-brain barrier and deliver immune effectors to central nervous system tissues leads to the lethal outcome of silver-haired bat rabies virus infection *J. Virol.*, (2007) 81, 1110-1118.

- Sabin,A.B. und Olitsky,P.K. Influence of Host Factors on Neuroinvasiveness of Vesicular Stomatitis Virus: I. Effect of Age on the Invasion of the Brain by Virus Instilled in the Nose. *J. Exp. Med.*, (1937) 66, 15-34.
- Samuel,C.E. Antiviral actions of interferons *Clin. Microbiol. Rev.*, (2001) 14, 778-809, table.
- Sandberg,K., Eloranta,M.L., und Campbell,I.L. Expression of alpha/beta interferons (IFN-alpha/beta) and their relationship to IFN-alpha/beta-induced genes in lymphocytic choriomeningitis *J. Virol.*, (1994) 68, 7358-7366.
- Sato,M., Suemori,H., Hata,N., Asagiri,M., Ogasawara,K., Nakao,K., Nakaya,T., Katsuki,M., Noguchi,S., Tanaka,N., und Taniguchi,T. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction *Immunity.*, (2000) 13, 539-548.
- Sauer,B. und Henderson,N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (1988) 85, 5166-5170.
- Schwenk,F., Baron,U., und Rajewsky,K. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells *Nucleic Acids Res.*, (1995) 23, 5080-5081.
- Schwob,J.E., Saha,S., Youngentob,S.L., und Jubelt,B. Intranasal inoculation with the olfactory bulb line variant of mouse hepatitis virus causes extensive destruction of the olfactory bulb and accelerated turnover of neurons in the olfactory epithelium of mice *Chem. Senses*, (2001) 26, 937-952.
- Sejersen,T. und Lendahl,U. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development *J. Cell Sci.*, (1993) 106 ( Pt 4), 1291-1300.
- Sharief,M.K., Hentges,R., und Ciardi,M. Intrathecal immune response in patients with the post-polio syndrome *N. Engl. J. Med.*, (1991) 325, 749-755.



- Silbernagl, S. und Despopoulos, A. *dtv-Atlas der Physiologie* (1990) Dt. Taschenbuch Verlag, München.
- Stanners, C.P. und Goldberg, V.J. On the mechanism of neurotropism of vesicular stomatitis virus in newborn hamsters. Studies with temperature-sensitive mutants *J. Gen. Virol.*, (1975) 29, 281-296.
- Streilein, J.W. Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature *Nat. Rev. Immunol.*, (2003) 3, 879-889.
- Tovey, M.G. und Maury, C. Oromucosal interferon therapy: marked antiviral and anti-tumor activity *J. Interferon Cytokine Res.*, (1999) 19, 145-155.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R., und Schutz, G. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety *Nat. Genet.*, (1999) 23, 99-103.
- Trottier, M.D., Jr., Palian, B.M., und Shoshkes, R.C. VSV replication in neurons is inhibited by type I IFN at multiple stages of infection *Virology*, (2005) 333, 215-225.
- Tschen, S.I., Bergmann, C.C., Ramakrishna, C., Morales, S., Atkinson, R., und Stohlman, S.A. Recruitment kinetics and composition of antibody-secreting cells within the central nervous system following viral encephalomyelitis *J. Immunol.*, (2002) 168, 2922-2929.
- Tyor, W.R., Wesselingh, S., Levine, B., und Griffin, D.E. Long term intraparenchymal Ig secretion after acute viral encephalitis in mice *J. Immunol.*, (1992) 149, 4016-4020.
- van den Broek, M.F., Muller, U., Huang, S., Aguet, M., und Zinkernagel, R.M. Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors *J. Virol.*, (1995) 69, 4792-4796.
- van den Pol, A.N., Dalton, K.P., und Rose, J.K. Relative neurotropism of a recombinant rhabdovirus expressing a green fluorescent envelope glycoprotein *J. Virol.*, (2002) 76, 1309-1327.

- Veldhuis, W.B., Floris, S., van der Meide, P.H., Vos, I.M., de Vries, H.E., Dijkstra, C.D., Bar, P.R., und Nicolay, K. Interferon-beta prevents cytokine-induced neutrophil infiltration and attenuates blood-brain barrier disruption *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (2003) 23, 1060-1069.
- Waibler, Z., Detje, C.N., Bell, J.C., und Kalinke, U. Matrix Protein Mediated Shutdown of Host Cell Metabolism Limits Vesicular Stomatitis Virus Induced Interferon-alpha Responses to Plasmacytoid Dendritic Cells *eingereicht*
- Welsch, U. und Sobotta, J. *Lehrbuch Histologie* (2003) Urban und Fischer, München.
- Zhou, Y.X., Zhao, M., Li, D., Shimazu, K., Sakata, K., Deng, C.X., und Lu, B. Cerebellar deficits and hyperactivity in mice lacking Smad4 *J. Biol. Chem.*, (2003) 278, 42313-42320.
- Zimmerman, L., Parr, B., Lendahl, U., Cunningham, M., McKay, R., Gavin, B., Mann, J., Vassileva, G., und McMahon, A. Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors *Neuron*, (1994) 12, 11-24.
- Zirger, J.M., Barcia, C., Liu, C., Puntel, M., Mitchell, N., Campbell, I., Castro, M., und Lowenstein, P.R. Rapid upregulation of interferon-regulated and chemokine mRNAs upon injection of 10<sup>8</sup> international units, but not lower doses, of adenoviral vectors into the brain *J. Virol.*, (2006) 80, 5655-5659.

## 8 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

### 8.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 1.1: Induktion der Expression von IFN- $\alpha/\beta$ nach TLR-Aktivierung. ....                                                                                                                                        | 15 |
| Abb. 1.2: Die vier Großregionen eines Maushirns. ....                                                                                                                                                                        | 20 |
| Abb. 1.3: Die vier Hauptzelltypen im Zentralnervensystem und ihre Herkunft.....                                                                                                                                              | 21 |
| Abb. 1.4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von VSV.....                                                                                                                                                                     | 25 |
| Abb. 1.5: Veränderungen im ZNS während einer antiviralen Immunantwort und mögliche Mechanismen zur Eliminierung des Virus. ....                                                                                              | 28 |
| Abb. 4.1: Schematische Darstellung der genetischen Basis für die Herstellung von gentechnisch veränderten Mäusen mit einem konditionellen Typ I Interferonrezeptor und Nachweis des Genotyps durch Southern Blot Analyse.... | 74 |
| Abb. 4.2: Mäuse mit einer ubiquitären Deletion des Exons 10 des IFNAR sterben nach intranasaler VSV Infektion.. ....                                                                                                         | 75 |
| Abb. 4.3: Schematische Darstellung des Nestin-Cre Transgens und Übersichtsschema der NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Zucht.....                                                                             | 76 |
| Abb. 4.4: Southern Blot Analyse zur Charakterisierung der NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Mäuse.....                                                                                                        | 78 |
| Abb. 4.5: PCR-Analyse von verschiedenen Geweben der NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Tiere:.. ....                                                                                                           | 79 |
| Abb. 4.6: Position der Primer zur Genotypisierung der NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Mäuse.                                                                                                                | 80 |
| Abb. 4.7: NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Mäuse zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber <i>i.n.</i> VSV Infektionen.. ....                                                                               | 82 |
| Abb. 4.8: NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> zeigen erhöhte Virustiter im Gehirn aber nicht in den peripheren Organen.....                                                                                     | 84 |
| Abb. 4.9: Nach intranasaler Infektion mit 10 <sup>3</sup> pfu VSV zeigen NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Mäuse erhöhte IFN- $\alpha$ Level im Serum, aber nicht im Gehirn.....                              | 86 |

|                                                                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abb. 4.10: Nach intranasaler VSV Infektion wird STAT-1 verstärkt im Riechhirn von C57BL/6 Mäusen phosphoryliert und exprimiert.....                                                   | 88  |
| Abb. 4.11: In NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Mäusen werden normale VSV neutralisierende Antikörperantworten gebildet.....                                           | 89  |
| Abb. 4.12: 6 Tage nach intranasaler VSV Infektion findet man im Hirn von WT und NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> T-Zellinfiltrate.....                                | 91  |
| Abb. 4.13: Zytotoxische T-Zellen spielen in der Pathologie von VSV keine Rolle. ....                                                                                                  | 93  |
| Abb. 4.14: Nach VSV Infektion repliziert VSV in IFNAR <sup>-/-</sup> , C57BL/6 und NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Mäusen in unterschiedlichen Regionen des ZNS..... | 95  |
| Abb. 4.15: NesCre <sup>+/-</sup> IFNAR <sup>flox/flox</sup> Mäuse zeigen auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber <i>i.v.</i> VSV Infektionen. ....                                   | 97  |
| Abb. 5.1: Möglichkeiten zur Verhinderung von Virusinfektionen im ZNS.....                                                                                                             | 100 |
| Abb. 5.2: Typ I IFN haben wichtige antivirale Funktionen innerhalb des ZNS und verhindern die Ausbreitung von VSV über das Riechhirn hinaus.....                                      | 109 |

## 8.2 TABELLENVERZEICHNIS

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1.1: Liganden der Toll-ähnlichen Rezeptoren (nach (Akira et al., 2006)..           | 14 |
| Tabelle 3.1: Übersicht verwendeter Geräte .....                                            | 33 |
| Tabelle 3.2: Übersicht verwendeter Verbrauchsmittel .....                                  | 36 |
| Tabelle 3.3: Übersicht verwendeter Chemikalien, Lösungsmittel und Fertigpuffer ..<br>..... | 39 |
| Tabelle 3.4: Übersicht verwendeter Medien und Medienzusätze.....                           | 44 |
| Tabelle 3.5: Übersicht verwendeter Enzyme .....                                            | 44 |
| Tabelle 3.6: Übersicht verwendeter Restriktionsenzyme .....                                | 45 |
| Tabelle 3.7: Übersicht verwendeter Kits .....                                              | 45 |
| Tabelle 3.8: Übersicht verwendeter Oligonukleotide .....                                   | 46 |

---

|               |                                        |    |
|---------------|----------------------------------------|----|
| Tabelle 3.9:  | Verwendete Antikörper.....             | 47 |
| Tabelle 3.10: | Verwendete Zelllinien.....             | 47 |
| Tabelle 3.11: | Übersicht verwendeter Mauslinien ..... | 48 |
| Tabelle 3.12: | Schema PCR-Programm .....              | 58 |

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel:

*„Zur Rolle der Typ I Interferone in der Abwehr von viralen Infektionen des zentralen Nervensystems“*

selbstständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 17. Juli 2007

## DANKSAGUNG

Ich bedanke mich an dieser Stelle ganz herzlich bei all denjenigen, die mich während meiner Promotion unterstützt und diese Dissertation bereichert haben:

Mein besonderer Dank gilt **Dr. Ulrich Kalinke** für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Durchführung am Paul-Ehrlich-Institut in Langen. Ich möchte mich für seine gute Betreuung, die stete Diskussionsbereitschaft und sein unerschütterlichen Optimismus („Das ist alles ganz phantastisch“) waren für mich sehr motivierend und von großer Bedeutung.

**Prof. Robert Tampé** danke ich für die freundliche Übernahme der Betreuung von Seiten der J.W. Goethe-Universität und **Prof. Johannes Löwer** für die Übernahme der „offiziellen PEI-Betreuung“.

**Dorothea Kreuz** danke ich für die gute Zusammenarbeit und die ganze Arbeit, die sie sich bei der Zucht „meiner“ Mäuse gemacht hat.

Als meine „Neuropathologische Servicestelle“ standen mir **Dr. Marco Prinz** und **Hauke Schmidt** von der Georg-August-Universität in Göttingen stets zur Seite, führten die histologischen Studien durch und unterstützten mich mit ihrem Rat bei allen neuropathologischen Fragestellungen. Mit **Dr. Thomas Meyer** von der Phillips-Universität Marburg arbeitete ich sehr gut bei der Analyse des STAT-Signallings zusammen.

Ich bedanke mich bei den Pink Ladies **Elis Kamphuis**, **Kathrin Gibbert**, **Linda Sender**, **Martin König** (Lady ehrenhalber), **Martina Anzaghe**, **Patricia Bach**, **Sabine Falk**, **Steffi Bauer**, **Suse Roederstein**, **Sven Flindt**, **Tanja Kierschniok**, **Theres Matjeka**, **Theresa Frenz** und unserer „Mehr-als-PostDoc“ **Dr. Zoe Waibler**, für die große Hilfsbereitschaft und gemeinsam verbrachte Zeit in Labor und Doktorandenzimmer. (Als Dichtniete kann ich Euch leider nicht in Form eines Edichts danken, so müsst Ihr mit Prosa vorlieb nehmen.) **Katja Döring** danke ich für die Unterstützung bei allen Kämpfen gegen die Windmühlen der Verwaltung und **Elena Grabski** für das gründliche Korrekturlesen.

Mein PEI-Mentor **Dr. Gerd Sutter** war stets zu wissenschaftlichen Diskussionen bereit und **Dr. Claudia Neumann-Haefelin** hat mich als Mentorin durch das letzte Jahr dieser Arbeit begleitet und mir dabei einen kleinen Einblick in ihr Leben und ihre Arbeit ermöglicht.

Außerdem danke ich noch **Anna Schreibweis i Torrents**, **Anne Reichmann**, **Christina Roth**, **Christiane Reusch**, **Inga Sellien**, **Jacqueline Shehab**, **Kai Werth**, **Nicola Bruns**, **Nina Herrmann**, **Thomas Wagner**, **Ursi Mich** und den vielen anderen, die

mich regelmäßig aus dem Elfenbeinturm der Forschung rausgeholt haben und mich am wahren Leben teilhaben ließen.

Mein größter Dank gilt meiner Mutter **Helga Detje** und meiner Großmutter **Irmgard Schönteich**, die mich immer unterstützten und zu mir gehalten haben.

*Vielen Dank*



## **VORTRÄGE, POSTERBEITRÄGE UND PUBLIKATIONEN**

### **VORTRÄGE**

“Type I IFN triggering of cells in the central nervous system excludes neurotropic viruses from brain.” 1<sup>st</sup> Joint Meeting of European National Societies of Immunology, Paris, France 6.-9. September 2006

### **POSTERBEITRÄGE**

**Claudia N. Detje**, Hauke Schmidt, Marco Prinz, Ulrich Kalinke: “Early type I interferon responses exclude neurotropic viruses from central nervous system.” 2<sup>nd</sup> Spring School of Immunology, Ettal, Bayern 6.-10.März 2006

### **PUBLIKATIONEN**

**Claudia N. Detje**, Hauke Schmidt, Marco Prinz, Thomas Meyer und Ulrich Kalinke: “Type I IFN triggering of cells in the central nervous system excludes neurotropic viruses from brain” (in Vorbereitung)

Marco Prinz, Hauke Schmidt, Alexander Mildner, Klaus Peter Knobloch Uwe-Karsten Hanisch, **Claudia Detje**, Ilona Gutcher, Jörg Mages, Roland Lang, Roland Martin, Ralf Gold, Burkhard Becher, Wolfgang Brück und Ulrich Kalinke: “Engagement of IFNAR on myeloid cells determines the course of autoimmunity in the central nervous system.” (eingereicht)

Zoe Waibler, **Claudia N. Detje**, John C. Bell und Ulrich Kalinke: “Matrix Protein Mediated Shutdown of Host Cell Metabolism Limits Vesicular Stomatitis Virus Induced Interferon-alpha Responses to Plasmacytoid Dendritic Cells.”(eingereicht)

## **LEBENS LAUF**

**Name** Claudia Nadine Detje

**Geburtsdatum und -ort** 29. April 1976 in Frankfurt am Main

### **Schulbildung**

1982 bis 1986 Gruneliuschule, Grundschule der Stadt Frankfurt

1986 bis 1992 Schillerschule, Integrierte Gesamtschule der Stadt Offenbach

1992 bis 1995 Rudolf- Koch- Schule, Gymnasium der Stadt Offenbach  
Abschluss mit dem Abitur

### **Universitätsausbildung**

Okt 1995 bis Sep1996 Studium der Chemie an der TH Darmstadt

Okt 1996 bis Aug 2003 Oktober 1996 Studium der Biochemie an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt

Aug 1999 bis Jun 2000 Fulbright-Stipendiatin an der University of Kansas Lawrence, KS, USA (Studium der Biochemie)

Mitarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Robert Palazzo

Herbst 2002 Absolvierung der Diplomhauptprüfungen in Biochemie (Prof. R. Tampè), Biophysikalischer Chemie (Prof. E. Bamberg) und Zellbiologie (Prof. J. Bereiter-Hahn)

- Nov 2002 bis Aug 2003 Durchführung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Robert Tampé mit dem Thema „Untersuchung von Nukleotid-induzierten Konformationsänderungen des ABC-Transporters TAP“
- Apr 2004 bis Jul 2007 Durchführung der Promotion in der Abteilung Immunologie in der Arbeitsgruppe von Dr. Ulrich Kalinke am Paul-Ehrlich-Institut mit dem Titel „Zur Rolle der Typ I Interferone in der Abwehr von viralen Infektionen des zentralen Nervensystems.“
- Stipendien** Fulbright Stipendium zum zweisemestrigen Studium in den USA (1999-2000)

Frankfurt, den 17. Juli 2007