

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von Univ.- Prof. Dr. Bernd Kaspers

Identifizierung Interferon-regulierter Gene beim Haushuhn

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Susanne Hildegard Röhl

aus Freiburg im Breisgau

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korb

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

Für Mama, Papa und Katharina

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1.	Das Interferon System.....	2
2.2.	Interferone beim Säugetier	4
2.2.1.	Charakterisierung von Interferonen.....	4
2.2.1.1	Typ I Interferone	4
2.2.1.2	Typ II Interferon	5
2.2.1.3	Typ III Interferone	8
2.2.2.	Induktion einer Interferon Antwort	10
2.2.2.1	Pathogen-assoziierte molekulare Muster.....	10
2.2.2.2	Mustererkennungsrezeptoren	10
2.2.3.	Die Interferon vermittelten Signalkaskaden	15
2.2.4.	Interferon-regulierte Gene	18
2.3.	Interferone beim Huhn	25
3.	ZIELSETZUNG	32
4.	MATERIAL UND METHODEN.....	33
4.1.	Tiere und Tierhaltung	33
4.2.	Gewinnung von Proben.....	33
4.2.1.	Gewinnung von Organen.....	33
4.2.2.	Gewinnung von Plasma.....	35
4.3.	Zellkultur	35
4.3.1.	Medien und Zusätze	35
4.3.2.	Verwendete Zelllinien	36
4.3.3.	Kultivierung von Zellen	36
4.3.4.	Einfrieren von Zellen.....	36
4.3.5.	Auftauen von Zellen	36
4.3.6.	CEC-32#511 Interferon- α Reporterassay	37
4.3.7.	Nachweistest für ChII-6.....	38
4.4.	Herstellung von rekombinantem ChIFN-α.....	39
4.5.	Endotoxin Messung mit dem Limulus Amebocyte Lysate Biotest.....	42
4.6.	RNA-Präparation	43
4.6.1.	RNA-Isolation	43
4.6.2.	Reinheitsbestimmung der RNA im NanoDrop	45
4.6.3.	Bestimmung der RNA Integrität im Agilent 2100 Bioanalyzer _{TM}	45
4.7.	cDNA Synthese	45
4.7.1.	DNase Verdau	46
4.7.2.	cDNA Synthese	47

4.8.	Quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	47
4.9.	Mikroarray	50
4.9.1.	cRNA Synthese	50
4.9.2.	Fragmentierung der cRNA	51
4.9.3.	Hybridisierung des Mikroarrays	52
4.9.4.	Waschen und Scan des Mikroarrays	52
4.9.5.	Auswertung des Mikroarrays	53
4.9.5.1	Agilent Feature Extraction Software Version 10.5.1.1	53
4.9.5.2	Bioconductor „R“ Version 2.9.1	53
4.9.5.3	Significance Analysis of Microarrays Version 3.08 (SAM)	53
4.9.5.4	Berechnung der Expressionsänderung (fold change)	54
4.9.5.5	Microsoft Office Access Datenbanksystem	54
4.9.5.6	Pathway Express	54
4.9.5.7	Multi Experiment Viewer Version 4.8.1	55
4.9.5.8	Ingenuity	55
4.9.5.9	PANTHER-Gene List Analysis	56
4.9.5.10	INTERFEROME Datenbank und ISG-Database	56
4.10.	Durchflusszytometrische Untersuchungen	57
4.10.1.	Färbung mit direkt Fluorochrom-markierten Antikörpern	59
4.10.2.	Indirekte Färbungen	59
4.10.3.	Lebend/Tot-Färbung mit 7-AAD	59
4.11.	Histologie	60
4.11.1.	Vorbereitung der Gewebeproben für die Histologie	60
4.11.2.	Anfertigung von Gewebeschnitten	61
4.11.3.	Vorbereitung der Schnitte für die Färbung	61
4.11.4.	Histologische Färbung mit Hämatoxylin-Eosin Lösung	62
4.11.5.	Immunhistochemische Färbung	62
4.12.	Statistische Auswertung	64
5.	ERGEBNISSE	65
5.1.	Datenbank Analysen zur Identifizierung von Interferon-regulierten Genen im Hühnergenom	65
5.2.	Halbwertszeit von ChIFN-α	65
5.3.	Vergleich der Bioverfügbarkeit nach intravenöser und intramuskulärer Injektion von ChIFN-α	67
5.4.	Ausschluss von Lipopolysaccharid Kontamination	68
5.4.1.	Limulus Amebocyte Lysate Biotest	68
5.4.2.	Analyse der LPS-Auswirkungen auf die Gen- und Proteinexpression	68
5.5.	Identifizierung IFN-regulierter Gene im Huhn mittels Mikroarray ..	70
5.5.1.	Behandlung mit ChIFN- α	70
5.5.2.	Mikroarray Experiment	72
5.5.2.1	Heat Map Gruppenanalyse nach IFN Behandlung	73

5.5.2.2	Identifizierung signifikant regulierter Gene nach IFN-Behandlung	75
5.5.2.3	Vergleich von IRGs beim Huhn und Säugetier	76
5.5.2.4	Weitere funktionelle Analysen der Gengruppen nach IFN Behandlung...	83
5.5.2.5	Eingehende Betrachtung von Zytokinen und Chemokinen.....	110
5.5.3.	Verifizierung ausgewählter Gene in der qRT-PCR.....	115
5.5.4.	Messung von Interleukin-6 Protein im Plasma	116
5.6.	Behandlung mit Newcastle Disease Virus	117
5.6.1.	NDV Infektion.....	117
5.6.2.	Makroskopische Veränderungen der Lunge nach NDV Infektion.....	117
5.6.3.	Charakterisierung der nach NDV Infektion makroskopisch veränderten Lungen.....	119
5.6.3.1	Histologische Charakterisierung der Lungen	119
5.6.3.2	Durchflusszytometrische Charakterisierung der Lungen	123
5.6.4.	Mikroarray Experiment nach Infektion mit NDV	125
5.6.4.1	Heat Map Gruppenanalyse nach Infektion mit NDV	125
5.6.4.2	Identifizierung signifikant regulierter Gene nach NDV Infektion	126
5.6.4.3	Verifizierung ausgewählter Gene in der qRT-PCR.....	128
5.6.4.4	Vergleichende Betrachtung der signifikant regulierten Gene nach NDV Infektion.....	128
5.6.4.5	Funktionelle Analysen nach NDV Infektion.....	134
5.6.4.6	Zytokine und Chemokine	140
5.6.4.7	Identifizierung von IRGs nach Infektion mit NDV.....	141
5.6.4.8	Funktionelle Analysen nach NDV Infektion regulierten IRGs und weiterer Gene	142
6.	DISKUSSION	148
6.1.	Datenbank-Analyse zur Identifizierung von IRGs im Huhn	148
6.2.	IFN-Injektion zur Identifizierung von IRGs im Huhn	149
6.3.	NDV Infektion zur Bestätigung der IRGs im Huhn	154
6.4.	Genauere Betrachtung der Gewebespezifität von IRGs.....	156
6.5.	Zytokine und Chemokine	157
6.6.	Genauere Betrachtung ausgewählter IRGs	162
7.	ZUSAMMENFASSUNG.....	167
8.	SUMMARY.....	169
9.	LITERATURVERZEICHNIS	171
10.	ANHANG	199
11.	TABELLARISCHER ANHANG.....	201
12.	DANKSAGUNG	229

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematischer Überblick über eine Auswahl von Mustererkennungsrezeptoren (PRRs)	11
Abbildung 2	Schematische Darstellung der Virus induzierten <i>Toll-Like Receptor</i> (TLR) Signalkaskade	13
Abbildung 3	Die klassische durch Interferone induzierte Jak-Stat Signalkaskade.....	17
Abbildung 4	Probenentnahme aus der Lunge	34
Abbildung 5	Bioverfügbarkeit nach intravenöser Injektion von rek ChIFN- α	66
Abbildung 6	Vergleich der IFN Bioverfügbarkeit nach intravenöser und intramuskulärer Injektion von rek ChIFN- α	67
Abbildung 7	Il-6 und K203 Gen Expression in Milz und Lunge nach LPS Injektion.....	69
Abbildung 8	Il-6 Protein im Plasma nach LPS Injektion.....	70
Abbildung 9	Behandlungsschema mit rek ChIFN- α	71
Abbildung 10	Typ I IFN Plasmaspiegel vor und nach IFN Injektion	72
Abbildung 11	Vergleich der Mikroarrays von Milz und Lunge nach IFN Injektion	73
Abbildung 12	Gesamtanalyse der Mikroarrays von Milz und Lunge nach IFN Injektion..	74
Abbildung 13	Ableich durch IFN Injektion im Huhn regulierter Gene mit IRGs des Säugetiers	77
Abbildung 14	Schema einer Mikroarray Analyse	84
Abbildung 15	Ausgewählte funktionellen Untergruppen nach IFN Injektion	88
Abbildung 16	Expressionsprofile nach IFN Injektion	90
Abbildung 17	Netzwerkanalyse von PTX3	102
Abbildung 18	Netzwerkanalyse von SFTPA1	104
Abbildung 19	Netzwerkanalyse von Interleukin-22	107
Abbildung 20	Netzwerkanalyse von Albumin	109
Abbildung 21	Expressionsprofile der Zytokine und Chemokine nach IFN Injektion	111
Abbildung 22	Validierung ausgewählter Gene mit qRT-PCR.....	115
Abbildung 23	Interleukin-6 Protein im Plasma nach IFN Injektion	116
Abbildung 24	Typ I IFN Plasmaspiegel 16h p.i. nach NDV Infektion.....	117
Abbildung 25	Makroskopische Veränderungen der Lungen nach NDV Infektion.....	118
Abbildung 26	Probenentnahme für die RNA Isolation nach NDV Infektion	118
Abbildung 27	HE-Färbung der Lunge nach NDV Infektion.....	119
Abbildung 28	Immunhistologische Charakterisierung der Lungen nach NDV Infektion	122

Abbildung 29	Durchflusszytometrische Charakterisierung der Lungen nach NDV Infektion.....	124
Abbildung 30	<i>Heat Map</i> Darstellung von Milz und Lunge nach NDV Infektion	125
Abbildung 31	qRT-PCR Validierung ausgewählter Gene nach NDV Infektion	128
Abbildung 32	Genexpression in der Lunge nach NDV Infektion.....	129
Abbildung 33	Vergleich der Gewebeexpression nach NDV Infektion und IFN Behandlung	133
Abbildung 34	Funktionelle Gruppen nach NDV Infektion.....	135
Abbildung 35	IRGs nach NDV Infektion und IFN Injektion.....	141
Abbildung 36	Gene Ontology der IRGs und weiterer Gene nach NDV Infektion	144

Beiliegende CD:

Abbildung 37	Netzwerkanalyse von Interleukin-6	
--------------	-----------------------------------	--

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht über die Interferone.....	2
Tabelle 2	Humane <i>Toll-Like</i> Rezeptoren und ihre Liganden	12
Tabelle 3	TLR und RLR des Huhnes	29
Tabelle 4	Verwendete qRT-PCR Primer.....	48
Tabelle 5	In der Durchflusszytometrie eingesetzte Antikörper	58
Tabelle 6	Verwendete Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung	63
Tabelle 7	Ermittlung der biologischen Halbwertszeit von rek ChIFN- α	66
Tabelle 8	Signifikant regulierte Gene in Milz und Lunge nach IFN Injektion	76
Tabelle 9	Anzahl signifikant regulierter IRGs nach IFN Injektion.....	78
Tabelle 10	Gene in den Expressionsprofilen nach IFN Injektion	92
Tabelle 11	Biologisch relevante Signalwege nach IFN Injektion.....	94
Tabelle 12	Signifikante biologische Funktionen nach IFN Injektion	97
Tabelle 13	Anzahl an Zytokinen und Chemokinen in den Expressionsprofilen.....	114
Tabelle 14	Signifikant regulierte Gene in Milz und Lunge nach NDV Infektion.....	127
Tabelle 15	Funktionelle Gruppen nach NDV Infektion.....	136
Tabelle 16	Biologisch relevante Signalwege nach NDV Infektion	139
Tabelle 17	Durch IRGs und weitere Gene nach NDV Infektion beeinflusste Signalwege.....	147
Tabelle 18	Höchst signifikant regulierte Gene 3 Stunden nach IFN Injektion	201
Tabelle 19	Gene Ontology Analyse nach IFN Injektion.....	208
Tabelle 20	Ausgewählte funktionelle Untergruppen nach IFN Injektion	210
Tabelle 21	Upstream Regulators nach IFN Injektion.....	212
Tabelle 22	Zytokine und Chemokine nach IFN Injektion.....	217
Tabelle 23	Höchst signifikant regulierte Gene nach NDV Infektion.....	220
Tabelle 24	Signifikant regulierte Gene im unveränderten Lungengewebe nach NDV Infektion	222
Tabelle 25	Zytokine und Chemokine nach NDV Infektion	224
Tabelle 26	Gene Ontology Analyse der IRGs und weiterer Gene nach NDV Infektion .	227

Tabellenverzeichnis der beiliegenden CD

Mappe 1

Tabelle 27	Übersicht
Tabelle 28	Annotation
Tabelle 29	Allgemeine IRGs aus Datenbank –Analyse
Tabelle 30	Signifikant regulierte Gene nach IFN Injektion
Tabelle 31	Allgemeine und neu identifizierte IRGs nach IFN Injektion
Tabelle 32	Signifikant regulierte Gene sechs und neun Stunden nach IFN Injektion
Tabelle 33	Gene Ontology der allgemeinen IRGs in Milz und Lunge
Tabelle 34	Gene Ontology der allgemeinen IRGs in der Milz
Tabelle 35	Gene Ontology der allgemeinen IRGs in der Lunge
Tabelle 36	Gene Ontology der neu identifizierten IRGs in Milz und Lunge
Tabelle 37	Gene Ontology der neu identifizierten IRGs in der Milz
Tabelle 38	Gene Ontology der neu identifizierten IRGs in der Lunge
Tabelle 39	Gene Ontology ausgewählter funktioneller Untergruppen der allgemeinen IRGs in Milz und Lunge
Tabelle 40	Gene Ontology ausgewählter funktioneller Untergruppen der allgemeinen IRGs in der Milz
Tabelle 41	Gene Ontology ausgewählter funktioneller Untergruppen der allgemeinen IRGs in der Lunge
Tabelle 42	Gene Ontology ausgewählter funktioneller Untergruppen der neu identifizierten IRGs in Milz und Lunge
Tabelle 43	Gene Ontology ausgewählter funktioneller Untergruppen der neu identifizierten IRGs in der Milz
Tabelle 44	Gene Ontology ausgewählter funktioneller Untergruppen der neu identifizierten IRGs in der Lunge
Tabelle 45	MEV der allgemeinen IRGs in Milz und Lunge
Tabelle 46	MEV der allgemeinen IRGs in der Milz
Tabelle 47	MEV der allgemeinen IRGs in der Lunge
Tabelle 48	MEV der neu identifizierten IRGs in Milz und Lunge
Tabelle 49	MEV der neu identifizierten IRGs in der Milz
Tabelle 50	MEV der neu identifizierten IRGs in der Lunge

Tabelle 51	Pathway Express nach IFN Injektion
Tabelle 52	Biologische Funktionen nach IFN Injektion
Tabelle 53	Biologische Funktionen in der Milz nach IFN Injektion
Tabelle 54	Biologische Funktionen in der Lunge nach IFN Injektion
Tabelle 55	Apoptose und Nekrose nach IFN Injektion
Tabelle 56	Netzwerkanalyse von Interleukin-6

Mappe 2

Tabelle 57	Signifikant regulierte Gene nach NDV Infektion
Tabelle 58	Genüberschneidungen in der Lunge nach NDV Infektion
Tabelle 59	Genüberschneidungen in Milz und Lunge nach NDV Infektion
Tabelle 60	Genexpression in der Milz nach NDV Infektion
Tabelle 61	Gewebeexpressionsvergleich der Milz nach NDV Infektion und IFN Injektion
Tabelle 62	Genexpression im unveränderten Lungengewebe
Tabelle 63	Gewebeexpressionsvergleich des unveränderten Lungengewebes nach NDV Infektion und IFN Injektion
Tabelle 64	Stark exprimierte Gene in NDV (A) vs K und NDV (A) vs NDV (U)
Tabelle 65	Genexpression im veränderten Lungengewebe im Vergleich zur Kontrolle
Tabelle 66	Genexpressionsvergleich des veränderten Lungengewebes nach NDV Infektion und IFN Injektion
Tabelle 67	Gewebeexpressionsvergleich des veränderten Lungengewebes nach NDV Infektion und IFN Injektion
Tabelle 68	Funktionelle Gruppen in Milz und Lunge nach NDV Infektion
Tabelle 69	Pathway Express der Milz nach NDV Infektion
Tabelle 70	Pathway Express der Lunge nach NDV Infektion
Tabelle 71	IRGs nach NDV Infektion und IFN Injektion
Tabelle 72	Pathway Express von IRGs und weiterer Gene nach NDV Infektion

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2'5'-OAS	<i>2'5'-Oligoadenylatsynthetase</i>
ADAR	<i>Adenosin Deaminase</i>
AP	<i>Apurin-Apyrimidin Endonuklease</i>
AP-1	<i>Aktivator Protein -1</i>
APC	<i>Antigen präsentierende Zelle</i>
APOBEC3G	<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G</i>
Aqua bidest.	<i>Bidestilliertes Wasser</i>
Aqua dest.	<i>Destilliertes Wasser</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
AUC	<i>Area under the curve</i>
Bak	<i>BCL-2 antagonist/killer</i>
Bax	<i>BCL-2 assoziiertes X Protein</i>
BCL-2	<i>B cell leukemia/lymphoma-2</i>
BSA	<i>Bovines Serum Albumin</i>
BSL	<i>Biosicherheitslevel</i>
bzw.	<i>Beziehungsweise</i>
CARD	<i>Caspase Aktivierungs und Rekrutierungsdomäne</i>
CCL	<i>CC-Chemokin Ligand</i>
CCR	<i>CC-Chemokin-Rezeptor</i>
cDC	<i>Konventionelle dendritische Zellen</i>
CDK-2	<i>Cyclin abhängige Kinase 2</i>
cDNA	<i>Copy Desoxyribonukleinsäure</i>
Ch	<i>Chicken (Huhn)</i>
ChIFN- α	<i>Hühner Interferon alpha</i>
ChIFN- β	<i>Hühner Interferon beta</i>
ChIFN- γ	<i>Hühner Interferon gamma</i>
ChIFN- λ	<i>Hühner Interferon lambda</i>
CKI	<i>CDK Hemmer</i>
Cl	<i>Clearance</i>
CL	<i>C Chemokin Ligand</i>
C _{max}	<i>Maximale Konzentration</i>
CML	<i>chronische myeloische Leukämie</i>
CMV	<i>Zytomegalieviren</i>
CpG	<i>Cytosin Phosphatidyl Guanin</i>
CR	<i>C-Chemokin Rezeptor</i>
CRF2	<i>Klasse II Zytokin Rezeptor Familie</i>
CRNA	<i>Copy Ribonukleinsäure</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CV	<i>Variationskoeffizient</i>
Cy3	<i>Cyanine3</i>
DAI	<i>DNS-abhängige Aktivator des IRF</i>
DAP	<i>Death associated Protein</i>
DDT	<i>Dichlordiphenyltrichlorethan</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA-PK	<i>DNS abhängigen Protein Kinase</i>
DNS/DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
dsRNS	<i>Doppelstrang Ribonukleinsäure</i>
EBV	<i>Epstein Barr Viren</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
eIF-2 α	<i>eukaryotic translation initiation factors-2</i>
EMCV	<i>Enzephalomyokarditits Virus</i>
ERK 2	<i>extrazelluläre Signal regulierte Kinase 2</i>
et al.	<i>Und andere (et alii)</i>

F	<i>Bioverfügbarkeit</i>
FADD	<i>Fas-associated via death domain</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FBS	<i>Fetales Bovines Serum</i>
FC	<i>Fold Change</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FITC	<i>Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat</i>
fMLP -R	<i>fMet-Leu-Phe-(fMLP)-Rezeptor</i>
GBP	<i>Guanylat bindende Proteine</i>
GDP	<i>Guanosidiphosphat</i>
GTP	<i>Guanosintriphosphat</i>
GTPase	<i>Guanosintriphosphatase</i>
HA	<i>Hämagglutinin</i>
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i>
HCl	<i>Chlorwasserstoff</i>
HCMV	<i>humane Zytomegalie Virus</i>
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HEF	<i>Hühnerembryofibroblasten</i>
HIN-200	<i>hematopoietic IFN-inducible nuclear protein with the 200-amino-acid repeat</i>
HIV	<i>Humanes Immundefizienz Virus</i>
HPAIV	<i>Hoch pathogene aviäre Influenza Viren</i>
HPSE	<i>Heparanase</i>
HS	<i>Heparan Sulfat</i>
HSV-1	<i>Herpes-simplex Viren-1</i>
HWT	<i>Halbwertszeit</i>
i.m.	<i>Intra muskulär</i>
i.v.	<i>Intra venös</i>
IF16	<i>IFN-γ induzierbares Protein 16</i>
IFI44L	<i>IFN induziertes ähnliches Protein 44</i>
IFIT	<i>IFN induzierten Proteine mit tetratricopeptid Wiederholungen</i>
IFITM-3	<i>IFN induziertes transmembran Protein-3</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IFN- α	<i>Interferon alpha</i>
IFN- β	<i>Interferon beta</i>
IFN- ω	<i>Interferon omega</i>
IFN- κ	<i>Interferon kappa</i>
IFN- λ	<i>Interferon lambda</i>
IFN- ϵ	<i>Interferon epsilon</i>
IFN- δ	<i>Interferon delta</i>
IFN- ν	<i>Interferon ny</i>
IFN- ζ	<i>Limitin</i>
IFN- τ	<i>Interferon tau</i>
IFN- γ	<i>IFN-gamma</i>
IFN λ R1, IL-28R α	<i>Interferon lambda Rezeptor 1</i>
IFNAR	<i>Interferon alpha Rezeptor</i>
IFNGR	<i>Interferon gamma Rezeptor</i>
Ig	<i>Immunglobulin</i>
IgG2a	<i>Immunglobulin G 2a</i>
IKK γ , NEMO	<i>NF-κB essentiellen Modulator</i>
Il-xy	<i>Interleukin-xy</i>
iNOS	<i>induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase</i>
IRAK-	<i>Interleukin-1Rezeptor assoziierte Kinase</i>
IRF-1, -3, -5, -7	<i>Interferon regulierender Faktor-1, -3, -5, -7</i>
IRG	<i>Interferon-reguliertes Gen</i>
ISG	<i>Interferon stimulierte Gene</i>
ISG-15	<i>IFN-stimuliertes Gen-15</i>
ISG-20	<i>IFN stimulierten Gen-20</i>
ISGF-3	<i>Interferon stimulierter Gen Faktor 3</i>
IVPI	<i>intravenösen Pathogenitätsindex</i>

Jak	<i>Janus Protein Tyrosin Kinase</i>
K203	<i>Chicken Chemokine C-Cmotif Ligand Inflammatory 3</i>
kDa	<i>Kilo-Dalton</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>
LGP-2	<i>laboratory of genetics and physiology-2</i>
LPAIVΔNS1	<i>Low pathogenic avian invluenza virus delete NS1</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
LSL	<i>Lohmann ´s Selected Leghorn</i>
Ly49	<i>Killer cell lectin like receptor</i>
LY6E	<i>Lymphozyten Antigen 6 Komplex, Lokus E</i>
MAF	<i>Makrophagen aktivierende Faktor</i>
MAPK	<i>Mitogen aktivierende Protein Kinase</i>
MAVS, VISA, IPS-1, CARDIF	<i>mitochondriales antivirales Signal Protein</i>
MCOLN2	<i>Mucolipin 2</i>
MDA-5	<i>Melanoma Differenzierungs assoziierten Gen-5</i>
MDT	<i>Mittlere Todeszeit</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MEV	<i>Multi Experiment Viewer</i>
Min	<i>Minuten</i>
MNDA	<i>myeloid cell nuclear differentiation antigen</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäurue</i>
MS	<i>Multiple Sklerose</i>
MW	<i>Mittelwert</i>
Mx	<i>myxovirus resistance Gen</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NA	<i>Neuraminidase</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NaOH	<i>Natrium Hydrogencarbonat</i>
NDV	<i>Newcastle Disease Virus</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NKT-Zelle	<i>Natürlichen Killer T-Lymphozyten</i>
NK-Zelle	<i>Natürliche Killerzelle</i>
NLR	<i>Nukleotid Oligomerisierungs Domäne ähnlicher Rezeptor</i>
NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>
NOD1	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1</i>
OD	<i>Optische Dichte</i>
PACT	<i>Protein Aktivator fort PKR</i>
PAMP	<i>pathogen-assozierte molekulare Muster</i>
PAMP	<i>Pathogen associated molecular Pattern</i>
PBMC	<i>Periphere einkernige Blutzellen</i>
PBS	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PCR	<i>Polymerase Kettenreaktion</i>
pDC	<i>Plasmazytoide dendritische Zelle</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PKR	<i>Protein Kinase R</i>
PLSCR-1	<i>Phopholipid Scramblase</i>
PML	<i>Promyelozytischen Leukämie Gen</i>
pNA	<i>p-Nitroanilin</i>
PRR	<i>Mustererkennungszepptoren</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion</i>

Rb	<i>Retinoblastoma Gen Produkt</i>
RD	<i>Unterdrücker Domäne</i>
rek	<i>Rekombinant</i>
RID	<i>Regulatoren des IFN vermittelten Todes</i>
RIG-I	<i>Retinolsäure induzierbaren Gen</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RIP-1	<i>Rezeptor interagierenden Protein-1</i>
RLR	<i>Retinolsäure induzierbares Gen I ähnlicher Rezeptor</i>
RNS/RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
rRNA	<i>Ribosomale Ribonukleinsäure</i>
RSV	<i>Respiratorisches Synzytial Virus</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
SDS	<i>Natrium Dodecylsulfat</i>
Sek	<i>Sekunden</i>
SFV	<i>Semliki Forest Virus</i>
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
SOTA	<i>Self organising tree algorithm</i>
ssRNS	<i>Einzelstrang Ribonukleinsäure</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SV	<i>Sendai Virus</i>
TAB	<i>TAK-1 bindendes Protein</i>
TAK-1	<i>TGF-β aktivierten Kinase-1</i>
TBK-1	<i>TANK bindenden Kinase-1</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TH	<i>T-Helferzelle</i>
TIR	<i>Toll/Interleukin-1 Rezeptor</i>
TIRAP	<i>Toll/Interleukin-1 Rezeptor domain-containing adaptor protein</i>
TLR	<i>Toll- ähnlicher Rezeptor</i>
TNF α	<i>Tumor Nekrose Faktor alpha</i>
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain Protein</i>
TRAF-3	<i>TNFα Rezeptor assoziierten Faktor-</i>
TRAF-6	<i>TNFα Rezeptor assoziierten Faktor-6</i>
TRAIL	<i>Tumor Nekrose Faktor verwandte Apoptose induzierende Ligand</i>
TRAM	<i>Toll/Interleukin-1 Rezeptor domain-containing adaptor inducing IFN-β-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>Toll/Interleukin-1 Rezeptor domain-containing adaptor inducing IFN-β</i>
TRIM-5	<i>tripartite motif containing-5</i>
V	<i>Verteilungsvolumen</i>
Viperin	<i>Virus-inhibitory protein, endoplasmic reticulum associated, interferon inducible</i>
VSV	<i>Vesikulo Stomatitis Virus</i>
WNV	<i>West Nile Virus</i>
XAF-1	<i>X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor 1</i>
z.B.	<i>zum Beispiel</i>
ZAP	<i>Zink Finger antivirales Protein</i>

1. EINLEITUNG

Interferone stellen bei Säugern und Vögeln einen unverzichtbaren Teil der angeborenen Immunantwort dar. Intensive Forschung seit über 55 Jahren auf diesem Gebiet hat gezeigt, dass sie Schutz gegen viele Pathogene vermitteln und zudem immunmodulatorische Aktivität besitzen.

Beim Säugetier kennt man drei Typen von Interferonen: Typ I, Typ II und Typ III Interferone und versteht mittlerweile die Mechanismen ihrer Induktion, die durch sie induzierten intrazellulären Signalkaskaden, durch sie induzierte weiterführende Abwehrstrategien des Organismus und wie es Viren gelingt, die Interferonantwort zu umgehen oder sie für ihre Zwecke zu nutzen.

Von Zellen gebildetes Interferon löst die Induktion so genannter Interferon-regulierter Gene (IRGs) aus. Diese vermitteln die mannigfaltigen Aufgaben von Interferonen. Im Säugetier sind zahlreiche IRGs charakterisiert und in ihren Funktionsweisen erforscht.

Auch wenn Typ I Interferon initial im Huhn entdeckt wurde, gibt es im Huhn noch viele Wissenslücken im Interferonsystem. Seuchenausbrüche beim Geflügel mit pandemischem Potential, wie beispielsweise Influenza, verdeutlichen die Notwendigkeit das Abwehrsystem des Vogels zu verstehen, um Mensch und Tier vor gefährlichen Krankheiten zu schützen. Insbesondere auf dem Gebiet der IRGs im Huhn ist noch viel Forschungsbedarf. Nur einzelne IRGs, wie PKR (*Protein Kinase R*), 2'5'OASL (*2'5'-Oligoadenylat Synthetase Like*) und Mx-1 (*Myxovirus-Resistance Protein-1*) sind näher charakterisiert [1, 2]. Mx-1 ist bei der Maus als der essentielle Faktor bei der Bekämpfung einer Influenza A Virus Infektion bekannt [3]. Die Frage, ob Mx-1 auch im Huhn eine wesentliche Rolle in der Abwehr einer Influenza Virus Infektion spielt, wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Jedoch zeigen jüngste Arbeiten, dass Mx-1 im Huhn keine antivirale Aktivität gegen Influenzaviren besitzt [4]. Demnach scheint es Unterschiede in den Wirkmechanismen von bestimmten IRGs beim Säugetier und im Huhn zu geben, wobei nach wie vor die Frage ungeklärt ist, welche von ihnen im Huhn wesentliche Aufgaben bei der Abwehr einer Virusinfektion spielen.

Im Gegensatz zu Vertretern der Säugetiere, für die diverse Datenbanken mit IRGs zur Verfügung stehen, die einen Überblick über zahlreiche durch Interferon induzierte Gene liefern, fehlen im Huhn bisher umfassende Übersichtsarbeiten über IRGs.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden daher mittels Datenbankrecherchen und verschiedener *in vivo* Ansätze die IRGs des Huhnes näher untersucht. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage im Huhn potentielle antiviral wirksame IRGs auszuwählen und sie funktionell näher zu charakterisieren.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Das Interferon System

Interferone (IFNs) bilden einen unverzichtbaren Teil der angeborenen Immunantwort und sind essentiell bei der Bekämpfung vieler Infektionen. Im Säugetier spielen sie beispielsweise eine Schlüsselrolle bei der Abwehr von Influenzavirusinfektionen. Bereits 1957 entdeckten Isaacs und Lindemann IFN im Huhn [5]. Dabei identifizierten sie einen löslichen Faktor, der Hühnerallantoismembranen vor einer Infektion mit hoch pathogenen Influenzaviren (HPAIV) schützte. Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieser Faktor auch eine wesentliche Rolle in der Abwehr vieler anderer Viren spielt, beispielsweise gegen Sendai Viren (SV), Vaccinia Viren und Newcastle Disease Virus (NDV) [6]. Da dieser lösliche Faktor mit der Virusreplikation interferierte, nannte man ihn Interferon (IFN). In den darauf folgenden Jahren wurden IFNs bei vielen Vertretern der Wirbeltiere entdeckt [7]. Komponenten der durch IFNs ausgelösten Signalkaskaden, wie beispielsweise Stat (*Signal transducer and activator of transcription*), sind auch in Intervertebraten zu finden. Dennoch wurde bisher kein IFN in diesen Organismen gefunden [8], obwohl es auch in diesen Tieren Hinweise auf ein Abwehrsystem, welches dem IFN System der Vertebraten ähnelt, gibt [9]. Die Forschung fokussierte sich hauptsächlich auf die Entschlüsselung der IFN vermittelten Mechanismen im Säugetier. Mittlerweile kennt man drei Klassen von IFNs: Typ I, Typ II und Typ III IFN. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur, ihrer genomischen Sequenz, ihrer Rezeptor Spezifität und ihren biochemischen und biologischen Eigenschaften (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Übersicht über die Interferone

Dargestellt sind die verschiedenen Typen von IFN beim Menschen und deren Unterschiede.

	Typ I	Typ II	Typ III
Mitglieder	IFN- α (alpha) IFN- β (beta) IFN- ω (omega) IFN- κ (kappa) IFN- ϵ (epsilon) IFN- ζ (limitin) IFN- τ (tau) IFN- δ (delta) IFN- ν (ny)	IFN- γ (gamma)	IFN- λ 1 (II-29) IFN- λ 2 (II-28a) IFN- λ 3 (il-28b)
Sequenz	unterschiedliche Sequenzen		
Struktur	keine Introns	Introns	Introns
Genomische Lokalisation	Chromosom 9	Chromosom 12	Chromosom 19
Produziert von	meisten Zellen	Leukozyten	meisten Zellen
Rezeptor Spezifität	IFNAR1/IFNAR2	IFNGR1/IFNGR2	IFN- λ R1/IL-10R2
Besondere biologische Eigenschaften	Vor allem antiviral	Vor allem Immunmodulation	Vor allem antiviral

Alle IFNs gehören zu der großen Familie der Klasse II Zytokine. Zu dieser gehören neben den IFNs selbst, auch Il-10 (Interleukin-10), Il-19 (Interleukin-19), Il-20 (Interleukin-20), Il-22 (Interleukin-22), Il-24 (Interleukin-24), Il-26 (Interleukin-26) und einige weitere Il-10 verwandte Zytokine [10]. Ihre Gemeinsamkeit ist, dass sie an Rezeptoren binden, die gemeinsame Motive in ihrer extrazellulären Domäne besitzen. Diese Klasse von Rezeptoren nennt man auch CRF2 (*Class II Cytokine receptor family*). Ihren antiviralen, antibakteriellen und antiparasitären Schutz vermitteln Interferone durch die Beeinflussung von Zellwachstum und Zelldifferenzierung. Außerdem können sie die Apoptose von Zellen auslösen [11, 12]. Es scheint, als ob manche Viren alleine durch eine Typ I IFN-Antwort eliminiert werden können (Beispielsweise Semliki Forest Virus (SFV) und Vesikulo Stomatitis Virus (VSV)), während andere Viren sowohl eine Typ I IFN-, als auch eine Typ II IFN-Antwort benötigen um effizient eliminiert werden zu können (Vaccinia Virus, *Theilier's murine Encephalomyelitis Virus* und *Lymphocytic Choriomeningitis Virus*) [13]. In den ersten Jahren der IFN-Forschung glaubte man, dass Typ I IFNs die primär antiviral wirksamen IFNs sind und Typ II IFN das primär immunmodulatorisch wirksame IFN [14]. Mittlerweile weiß man, dass beide sowohl antiviral als auch immunmodulatorisch wirken [15]. Vielmehr scheint Ihre sich ergänzende antivirale Aktivität im frühen Stadium der Infektion bedeutend zu sein, während ihre immunmodulatorische Funktion in einem späteren Stadium der Infektion zum Tragen kommt - wenn die erworbene Immunantwort einsetzt [13].

Insgesamt spielen IFNs eine große Rolle bei Infektionen, Entzündungsgeschehen, Autoimmunität und Krebserkrankungen [16]. Aus diesem Grund werden sie inzwischen auch bei der Therapie von Infektionen mit Hepatitis C Virus (HCV), Hepatitis B Virus (HBV), Humanem Immundefizienz Virus (HIV), Hämatologischen Krebsarten, soliden Tumoren und Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose eingesetzt (MS) [17].

Initial im Huhn entdeckt, erlangte die Erforschung des Hühnerinterferons neue Bedeutung als es im Jahre 1994 gelang, Hühnerinterferon zu klonieren [18].

2.2. Interferone beim Säugetier

2.2.1. Charakterisierung von Interferonen

Bisher konnten bei Vertretern der Säugetiere drei Typen von IFNs identifiziert werden: Typ I, Typ II und Typ III IFNs. Im Folgenden werden die drei Typen von IFNs näher erläutert.

2.2.1.1 Typ I Interferone

Beim Mensch sind bisher neun Mitglieder der Typ I IFN Familie bekannt (siehe Tabelle 1). Dabei sind IFN- α und IFN- β die am besten erforschten IFNs. Viele Mitglieder der Typ I IFN Familie kommen bei den meisten Säugetieren vor. Dazu zählen IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ und IFN- κ . Einige Familienmitglieder konnten bisher nur in bestimmten Tierarten gefunden werden: IFN- ω findet man insbesondere im Genom von Primaten aber auch bei einigen anderen Säugetieren. IFN- ζ findet man nur bei Nagetieren und IFN- ν bei Katzen [19, 20]. IFN- τ und IFN- δ spielen in der Reproduktion eine bedeutende Rolle und sind bisher nur bei behuften Wiederkäuern und Schweinen beschrieben [21-23].

Mit Bekanntwerden der Genomsequenzen wurde Chromosom neun des Menschen als humaner Typ I IFN Gen Cluster identifiziert [24]. Auf diesem werden 13 nicht allelische IFN- α Gene, mindesten fünf Pseudogene und jeweils ein einziges funktionelles IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ und IFN- ω Gen codiert. Den humanen Typ I IFNs fehlen Introns (mit einer Ausnahme: IFN- κ , welches ein Intron besitzt), eine Besonderheit, die sie mit den Genen für Histone und G-Protein gekoppelten Rezeptoren gemeinsam haben [25]. Auf Proteinebene codieren die 13 beschriebenen IFN- α Gene 12 IFN- α Proteine, da IFNA1 und IFNA13 für das gleiche Protein codieren [26].

Der murine Typ I IFN Cluster befindet sich auf Chromosom vier. Diese Region enthält mindestens drei Pseudogene, 14 funktionelle IFN- α Gene und jeweils ein einziges Gen für IFN- β , IFN- κ und IFN- ϵ . Die genaue Anzahl an IFN- ζ Genen wird noch kontrovers diskutiert. Hardy *et al.* beschreiben mindestens zwei IFN- ζ Gene, wobei van Pesch *et al.* von 16 IFN- ζ Genen sprechen [27, 28].

Fast alle kernhaltigen Zellen des Körpers können Typ I IFN bilden. Es gibt Zellen die im Vergleich zu anderen Zellen äußerst viel Typ I IFN bilden und ausschütten. So konnten im Säugetier pDCs (plasmazytoide dendritische Zellen) als besonders starke Typ I IFN Produzenten identifiziert werden. Diese Zellen können bis zu 1000 mal mehr Typ I IFN

produzieren, wenn sie mit einem geeigneten IFN-Induktor stimuliert werden [29].

Mikroorganismen stellen einen Stimulus für Typ I IFN Produktion dar. Hierzu zählen Viren, Bakterien, Mykoplasmen, Protozoen und deren Produkte wie virale Glykoproteine, bakterielle Lipopolysaccharide, CpG DNS und ss und ds RNS (Einzelstrang und Doppelstrang RNS). Außerdem können auch wirtseigene Faktoren eine Typ I IFN-Antwort auslösen, wie Mitogene und eine Vielzahl an Zytokinen.

Die gebildeten Typ I IFNs können auto- und parakrin wirken. Dafür binden sie an einen Rezeptor, der von fast allen Körperzellen exprimiert wird (zusammengefasst von [30]) und der aus zwei Untereinheiten besteht: IFNAR1 und IFNAR2c [31]. Beide Moleküle gehören zur Klasse II der Zytokin Rezeptor Superfamilie. IFNAR1 ist alleine nicht in der Lage Typ I IFN zu binden. Im Komplex mit IFNAR2 wird allerdings eine hochaffine Bindung geschaffen, was eine effiziente Signaltransduktion ermöglicht [32]. Die Bindung von Typ I IFN an seinen Rezeptorkomplex löst eine Signalkaskade aus. Diese ist in Kapitel 2.2.3 genauer beschrieben.

Am Ende der durch Typ I IFNs ausgelösten Signalkaskade steht die Transkription von IFN-regulierten Genen (IRGs). IRGs sind für die Vermittlung und Ausführung der Aufgaben von Typ I IFN verantwortlich (siehe Kapitel 2.2.4). Dabei sind sie fähig in vielen verschiedenen Zellarten eine wirksame antivirale Aktivität zu induzieren. IFN- α wird insbesondere nach Virusinfektionen rasch gebildet und sezerniert [33]. IFN- β hingegen wird nach einer Infektion mit gram negativen Bakterien schnell gebildet. Außerdem wird IFN- β daneben eine bedeutende Rolle bei der Zelldifferenzierung myeloider Zellen zugesprochen. Des Weiteren wirken Typ I IFN regulierte IRGs antiproliferativ und können bei Virus infizierten Zellen Apoptose auslösen. IFN- ζ , welches bisher nur im Nagetier beschrieben ist, hat sogar im Vergleich zu anderen Typ I IFNs eine sehr hohe antivirale, immunmodulatorische und Tumor unterdrückende Wirkung. Dabei verursacht es weder Myelosuppression noch Fieber - Nebeneffekte, die andere Typ I IFNs stets hervorrufen. Diese Entdeckungen haben dazu geführt, dass IFN- ζ als hoffnungsvoller neuer Kandidat für eine nebenwirkungsarme IFN-Therapie in Betracht gezogen wird (zusammengefasst von [30]).

2.2.1.2 Typ II Interferon

IFN- γ (IFN-gamma) stellt den einzigen Vertreter der Typ II IFNs dar. Es wurde im Jahre 1965 von E.F. Wheelock zum ersten Mal beschrieben [34]. Schon bald sprach man IFN- γ antivirale und vor allem immunmodulatorische Eigenschaften zu. Der endgültige Name IFN- γ wurde im Jahre 1980 festgelegt. Das für IFN- γ codierende Gen wurde bisher in vielen Säugetieren, in

Vögeln und sogar im Knochenfisch und Fugu Fisch beschrieben. Niedrigere Eukaryoten scheinen kein IFN- γ ähnliches Gen zu besitzen (zusammengefasst von [35]).

Die Expression von IFN- γ wird durch vielerlei extrazelluläre Signale ausgelöst. Zu den IFN- γ Induktoren zählen lösliche Mediatoren wie TNF α (Tumor Nekrose Faktor alpha), Il-2 (Interleukin-2), Il-12 (Interleukin-12), Il-15 (Interleukin-15) und Il-18 (Interleukin-18) und die Vernetzung verschiedener Oberflächen Rezeptoren, wie CD3, CD16 und Ly49 (zusammengefasst von [30]). Diese Faktoren werden insbesondere von APCs (Antigen präsentierenden Zellen) nach Pathogen Erkennung ausgeschüttet [36-42]. Durch Ausschüttung von Zytokinen wie Il-12 und Il-18, rekrutieren APCs IFN- γ produzierende Zellen zum Entzündungsherd [43, 44]. Treffen mehrere induzierende Signale zusammen, kann eine verstärkte IFN- γ Induktion beobachtet werden. Es gibt auch Regulatoren, die hemmend auf eine IFN- γ Bildung wirken. Zu diesen zählen Il-4 (Interleukin-4), Il-10, TGF- β (*transforming growth factor β*) und Glukokortikoide [45, 46].

IFN- γ wird insbesondere von folgenden Zellen gebildet: CD4 positiven und CD8 positiven T-Lymphozyten, NK-Zellen (Natürlichen Killerzellen) und NKT-Zellen (Natürlichen Killer T-Lymphozyten). Aber auch Makrophagen, B-Lymphozyten und Neutrophile Granulozyten produzieren IFN- γ (zusammengefasst von [30]).

Das humane Gen, welches für IFN- γ codiert, befindet sich auf Chromosom 12. Das murine IFN- γ Gen auf Chromosom 10. Die Genstruktur ist spezieübergreifend hoch konserviert und besteht aus vier Exons und drei Introns. Die Gensequenz jedoch weist nur 40% Homologie zwischen Mensch, Maus und Ratte auf [47].

IFN- γ weist folgende Struktur auf: Das IFN- γ Monomer besteht aus sechs α - Helices und C-Terminal einer ausgesetzten ungefalteten Sequenz. Um biologische Aktivität zu erhalten verbinden sich zwei Monomere antiparallel zum Dimer. Im Gegensatz zu Typ I IFNs ist IFN- γ säurelabil [48, 49].

Um eine zelluläre Antwort auszulösen, bindet auch IFN- γ an einen Rezeptor, der - ähnlich dem Rezeptor der Typ I IFNs - aus zwei Untereinheiten besteht: IFNGR1 und IFNGR2. Ein funktioneller IFN- γ Rezeptor ist ein Tetramer und besteht aus zwei IFNGR1 Untereinheiten und zwei IFNGR2 Untereinheiten [50, 51].

Bindung von IFN- γ an seinen Rezeptorkomplex löst die Jak-Stat Signalkaskade aus. Diese wird im Kapitel 2.2.3 besprochen. Außerdem kann IFN- γ an das Glykosaminoglykan HS (Heperan

Sulfat) auf Zelloberflächen binden. Eine Bindung an HS führt zur Hemmung seiner biologischen Aktivität [52].

Analog zu Typ I IFNs mündet ein durch IFN- γ aktivierter Signalweg in der Transkription von IRGs, die auch für die Vermittlung und Ausführung der Aufgaben von Typ II IFN verantwortlich sind.

Insgesamt kann man sagen, dass IFN- γ und durch IFN- γ induzierte IRGs immunmodulatorische und antivirale Aufgaben erfüllen. Da es neben den durch die von IFN- γ regulierten IRGs ausgeübten Eigenschaften auch als Botenstoff des Immunsystems arbeitet, gehört IFN- γ in gewisser Weise auch zu den Interleukinen. Zu den immunmodulatorischen Aufgaben von IFN- γ zählt die Tatsache, dass IFN- γ die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort unterstützt. Dies gelingt durch Förderung der T_H1-Zell-Antwort, Vermittlung des B-Lymphozyten Isotypen Klassenwechsels zu IgG2a [53-55] und der Regulation lokaler Entzündungsreaktionen durch Rekrutierung von Leukozyten zum Entzündungsherd. Außerdem regelt es Wachstum, Reifung und Differenzierung vieler Zellarten [35, 56, 57]. Zusätzlich fördert es die Hochregulierung von MHC Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche. Dies führt dazu, dass zytotoxische T-Lymphozyten besser in der Lage sind Fremdartigen zu erkennen [58-64]. Zudem ist allein IFN- γ in der Lage MHC Klasse II Moleküle auf der Zelloberfläche hochzuregulieren. Dies vermag es sowohl bei Zellen die konstitutiv MHC Klasse II Moleküle exprimieren, wie APC, als auch bei Zellen die MHC Klasse II Moleküle nicht konstitutiv exprimieren. So konnte bei Mensch und Maus gezeigt werden, dass dadurch vermehrt antigenspezifische CD4 positive T-Lymphozyten aktiviert werden [57, 65, 66]. Dennoch ist die durch IFN- γ ausgelöste T-Zell Antwort vor allem eine T_H1-Zell-Antwort. Dies wird durch Förderung spezifischer T_H1 Effektor Mechanismen erreicht: NK-Zell Effektor Funktionen werden gefördert, zytotoxische Immunität wird unterstützt und Makrophagen und Neutrophile Granulozyten werden aktiviert [57]. Zytotoxische Immunität wird dadurch erreicht, dass das Wachstum von T_H2-Lymphozyten gehemmt wird und Antigen Verarbeitung, Präsentation und Expression kostimulatorischer Moleküle gefördert werden. Außerdem treibt IFN- γ sich entwickelnde CD4 positive T-Lymphozyten in Richtung einer T_H1-Zell-Antwort, zum einen durch die Anwesenheit von IFN- γ selbst, zum anderen durch die geförderte Produktion von Il-12, während die Il-4 Produktion unterdrückt wird [67, 68]. Seine antiviralen Fähigkeiten vermittelt IFN- γ durch die Induktion spezifisch antiviral wirksamer Enzyme, wie PKR (Protein Kinase R) [69-74], ADAR (*RNA specific Adenosin Deaminase*) [75] und GBP1 und GBP2 (Guanylat bindende Proteine 1 und 2) [76-78]. Darüber hinaus greift IFN- γ auch in den Zellzyklus vieler Zellen ein, indem es den

Zellzyklus von Makrophagen arretiert [79]. Andererseits kann IFN- γ aber auch die Apoptose von bestimmten Zellen fördern, in dem es proapoptotische Moleküle induziert [80, 81]. Beispiele hierfür sind PKR, DAP (*Death Associated protein*), Cathepsin D, Fas und der TNF α Rezeptor [82-92]. Durch welche Mechanismen IFN- γ induzierte IRGs diese Aufgaben erfüllen wird genauer in Kapitel 2.2.4 erläutert.

2.2.1.3 Typ III Interferone

Im Jahr 2003 wurde ein dritter Vertreter der Interferone beschrieben: Typ III IFN, auch IFN- λ (IFN lambda) genannt [93-95].

Beim Menschen hat die IFN- λ Familie drei Mitglieder: IFN- λ 1, - λ 2 und - λ 3. IFN- λ 1 wird auch als Il-29 (Interleukin-29) bezeichnet, IFN- λ 2 als Il-28a (Interleukin-28a) und IFN- λ 3 als Il-28b (Interleukin-28b). Diese werden von drei funktionellen Genen auf dem humanen Chromosom 19 codiert, welches außerdem ein Pseudogen enthält: IFN- λ 4 ψ . Jedes der humanen Gene besteht aus fünf Exons und vier Introns [96]. Mäuse besitzen nur funktionelle Gene für IFN- λ 2 und - λ 3, die auf Chromosom 7 codiert sind. Murines IFN- λ 1 ψ und IFN- λ 4 ψ sind Pseudogene. Von den beim Menschen beschriebenen fünf Exons fehlt den Mäusen das komplette Exon zwei [97].

Da die Promotor Regionen von IFN- λ 1 und - λ 2 einander sehr ähnlich sind und viele gemeinsame Elemente mit der Promotor Region von IFN- λ 3 besitzen, geht man davon aus, dass ihre Expression auf die gleiche Weise induziert wird [98-100]. Des Weiteren konnten Bindungsstellen für dieselben Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die auch an den Typ I IFN Promotor binden können (AP-1, NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) und VRE (*Virus Response Elements*) für IRF (IFN regulierende Faktor) Proteine) [101-104]. Auch konnte allgemein gezeigt werden, dass Typ I und Typ III IFNs durch sehr viele gemeinsame Stimuli (Viren und andere TLR Agonisten) induziert werden [105, 106].

IFN- λ s ähneln in Struktur und Sequenz Mitgliedern der Il-10 Familie. Auf Grund der großen Ähnlichkeit zu Typ I IFNs hinsichtlich Induktion und Wirkungsweise werden sie aber zu den Interferonen gezählt [93, 94]. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von Typ III IFN mit anderen IFNs und Il-10 verwandten Zytokinen, so besteht zu beiden nur eine sehr geringe Homologie von 10-18% [107].

Typ III IFNs binden an einen Rezeptorkomplex bestehend aus dem für IFN- λ spezifischen IFN λ R1 (IFN- λ Rezeptor 1 oder IL-28R α) und einer Kette des Rezeptors der Il-10 Familie: Il-

10R2 [93, 94, 108]. Neben IFN- λ nutzen diesen auch IL-10, IL-22 und IL-26 [109].

Während der IL-10R2 von fast allen Körperzellen exprimiert wird, wird IFN λ R1 nur auf bestimmten Zelllinien gefunden. Epithelzellen sprechen außerordentlich gut auf eine Behandlung mit Typ III IFNs an und scheinen die Zielzellen für Typ III IFNs zu sein. Bezüglich anderer Zellarten kann bisher mit Sicherheit gesagt werden, dass primäre Fibroblasten, HUVEC (Humane Nabelvenen Endothelzellen) und murine Milzzellen keinen IFN λ R1 auf ihrer Oberfläche tragen [97, 110]. PBMCs (Periphere einkernige Blutzellen) und Knochenmarks-Zellen reagieren nur mit schwacher Aktivierung auf eine Behandlung mit Typ III IFNs [97]. Auch scheinen die meisten Leukozyten keinen IFN λ R1 auf ihrer Oberfläche zu tragen [111]. Erwähnenswert erscheint in diesem Zusammenhang, dass der IFN λ R1 zusammen mit dem IL-22R1 (IL-22 Rezeptor 1) auf dem humanen Chromosom 1 codiert wird, was die Möglichkeit nahelegt, dass die Expression beider Rezeptoren durch dieselben Stimuli reguliert wird [107, 109].

Bindet ein Vertreter der IFN- λ Familie an seinen Rezeptorkomplex löst dies wiederum die Aktivierung der Jak-Stat Signalkaskade aus. Um eine hochaffine Bindung zu erhalten, benötigt IFN- λ die Anwesenheit beider Rezeptor Untereinheiten. IFN- λ bindet zuerst an die IFN λ R1 Untereinheit. Dies führt zu einer Konformationsänderung, wodurch der IL-10R2 rekrutiert werden kann [94].

Schließlich steht auch bei Typ III IFNs am Ende der Signalkaskade die Transkription von IRGs, die für die Vermittlung und Ausführung der Aufgaben von Typ III IFNs verantwortlich sind. Bis heute sind allerdings noch keine spezifischen Typ III IRGs beschrieben. Doch konnte für zahlreiche IRGs gezeigt werden, dass sie auch durch Typ III IFNs reguliert werden [112, 113]. Daher ist es nicht überraschend, dass die Aufgaben von Typ III IFNs sich mit denen von Typ I IFNs (und auch Typ II IFN) oftmals überschneiden. Ebenso wie Typ I IFNs wirken sie antiviral und fördern die MHC Klasse I Expression. Die durch IRGs vermittelten Aufgaben werden in Kapitel 2.2.4 noch genauer beschrieben.

2.2.2. Induktion einer Interferon Antwort

In den Körper eingedrungene Pathogene haben typische, konservierte Erkennungsmerkmale, was es Körperzellen ermöglicht, Pathogene als fremd zu erkennen und eine Immunantwort auszulösen. Diese Erkennungsmerkmale werden pathogen-assoziierte molekulare Muster (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs) genannt und binden an so genannte Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs), die viele Körperzellen besitzen oder sogar frei löslich im Blutplasma vorkommen. Erkennen PRRs in den Körper eingedrungene Pathogene über deren PAMPs, werden Signalkaskaden in Gang gesetzt. Dadurch werden Interferone und andere Zytokine gebildet. Dies ermöglicht eine rasche Immunantwort, die das Ausbreiten des Pathogens verhindert und dieses schließlich beseitigt oder bis zur Ausbildung einer adaptiven Immunantwort in Schach hält [114-116].

2.2.2.1 Pathogen-assoziierte molekulare Muster

Meist sind PAMPs sich wiederholende molekulare Strukturen auf der Pathogen Oberfläche. Im Falle von Bakterien sind dies beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Membran von gram negativen Bakterien oder Lipoteichonsäure von gram positiven Bakterien. Ein weiteres Erkennungsmerkmal von Bakterien sind nichtmethylierte CpG Motive. Erkennungsmerkmale von Viren sind ss (Einzelstrang) RNS oder ds (Doppelstrang) RNS, welche von diesen in der Regel im Laufe ihres Vermehrungszyklus, nicht aber von eukaryotischen Zellen exprimiert werden (zusammengefasst von [117]).

2.2.2.2 Mustererkennungsrezeptoren

Es gibt unterschiedliche Gruppen von PRRs, die bestimmte PAMPs erkennen. Zu den PRRs gehören die TLRs (*Toll-Like Receptors*), die RLRs (*Retinoic Acid-inducible Gene I-Like Receptors*) und DNS und RNS Sensoren des Zytosols (zusammengefasst von [116]). Diese drei großen Gruppen spielen insbesondere bei der durch Viren ausgelösten IFN Induktion eine bedeutende Rolle und sind in Abbildung 1 nochmals schematisch dargestellt. Die NLRs (*Nucleotide Oligomerization Domain-Like Receptors*, auch NACHT, LRR und PYD Domäne Proteine genannt) sind essentiell für die Aktivierung anderer wichtiger Zytokine wie Il-1 β und Il-18 [118].

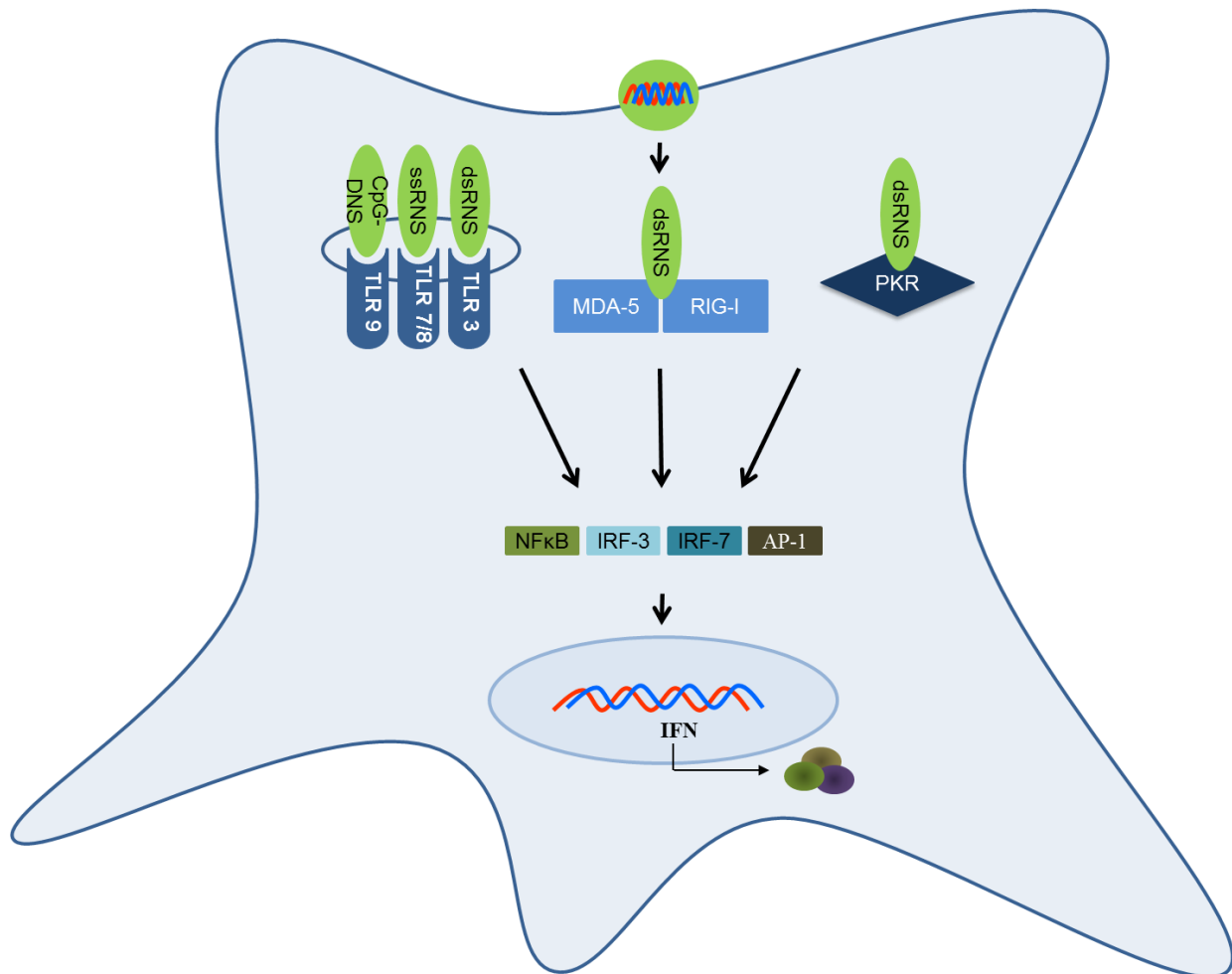


Abbildung 1 Schematischer Überblick über eine Auswahl von Mustererkennungsrezeptoren (PRRs)

Zu den PRRs zählen die endosomal lokalisierten TLR (*Toll-Like Receptors*) 3, 7, 8 und 9, die zur Familie der RLR (*Retinoic Acid-inducible Gene I-Like Receptors*) gehörenden RIG-I (*Retinoic acid-Inducible Gene*) und MDA-5 (*Melanoma Differentiation-Associated Gene 5*) und die PKR (*Proteinkinase R*). Binden diese Rezeptoren ihren Liganden, kommt es zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und schließlich zur Transkription von Interferonen.

Toll- Like Rezeptoren

TLRs spielen insbesondere bei der Erkennung einer viralen oder bakteriellen Infektion eine bedeutende Rolle. Ursprünglich wurden sie bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Mittlerweile weiß man, dass sie bei der Bekämpfung von Infektionen in Pflanzen, adulten Insekten und Vertebraten eine große Rolle spielen. Fast alle Vertebraten haben mindestens einen Vertreter jeder Gruppe [119].

Die TLRs sind vermutlich die am intensivsten erforschten PRRs. Sie gehören zu den Typ 1 Transmembran Proteinen und befinden sich auf der Zelloberfläche oder in der Membran von Endosomen. TLRs, die sich an der Zelloberfläche befinden, erkennen PAMPs aus hydrophoben Lipiden und Proteinen, während intrazellulär lokalisierte TLRs vor allem Nukleinsäuren

erkennen. Einerseits ist es ihnen dadurch möglich, Pathogene anhand deren Hüllproteine bereits im extrazellulären Raum zu erkennen, andererseits haben Pathogene Mechanismen entwickelt, der Erkennung durch Zellen des angeborenen Immunsystems zu entgehen und diese zu infizieren. Durch die intrazellulär lokalisierten TLRs können Viren schließlich doch noch erkannt werden.

Für die TLR Familie des Menschen sind 10 für die Maus 13 Rezeptoren beschrieben. TLR 1-9 kommen in beiden Spezies vor. Dabei befinden sich TLR1, 2, 4, 5 und 6 auf der Plasmamembran und TLR3, 7, 8 und 9 sind endosomal lokalisiert [120]. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die beim Menschen vorkommenden TLR, ihre Liganden und welche Mikroorganismen diesen Liganden besitzen.

Tabelle 2 Humane *Toll-Like* Rezeptoren und ihre Liganden

TLR können in endosomalen Membranen (rot) oder Zelloberflächenmembranen (schwarz) lokalisiert sein, Tabelle modifiziert nach [30].

Rezeptor	Ligand	Ursprung des Liganden
TLR1	Triacyl Lipopeptide Lösliche Faktoren	Bakterien und Mykobakterien <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Hitze Schock Protein 70 Peptidoglycan Lipoprotein/Lipopeptide HCV <i>core</i> und nicht strukturelles Protein 3	Wirt Gram positive Bakterien Verschiedene Pathogene Hepatitis C Virus
TLR3	dsRNS	Viren
TLR4	Lipopolysaccharide Taxol	Gram negative Bakterien Pflanzen
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Zymosan Lipoteichonsäure Diacyl Lipopeptide	Pilze Gram positive Bakterien Mykoplasmen
TLR7	ssRNS Imidazoquinoline	Viren Synthetische Stoffe
TLR8	ssRNS Imidazoquinoline	Viren Synthetische Stoffe
TLR9	CpG enthaltende DNS	Bakterien und Viren
TLR11	Profilin ähnliche Moleküle	<i>Toxoplasma gondii</i>

Alle TLRs haben den gleichen Aufbau. Sie gehören zu den Typ I Transmembranproteinen und bestehen aus extrazellulären gelegenen *Leucin Rich Repeats* und einer intrazellulären TIR (*Toll/Interleukin-1 Receptor*) Domäne [121]. Diese Rezeptoren dimerisieren und rekrutieren verschiedene Adapter Proteine. Hierzu gehören TIRAP (*TIR-Domain-Containing Adaptor Protein*), MyD88 (*Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*), TRIF (*TIR-Domain-*

Containing Adaptor Inducing IFN- β) und TRAM (TRIF-Related Adaptor Molecule) [122-126]. Diese Adapter Proteine aktivieren NF- κ B (Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-cells), die MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) und IRF-1, -3, -5 und -7 (IFN-Regulating Factors-1, -3, -5, und -7). Diese Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von IFNs, anderen Zytokinen und Chemokinen und beeinflussen die Zellreifung und das Überleben von Zellen [127].

Die nach viraler Infektion ausgelöste TLR-Signalkaskade ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

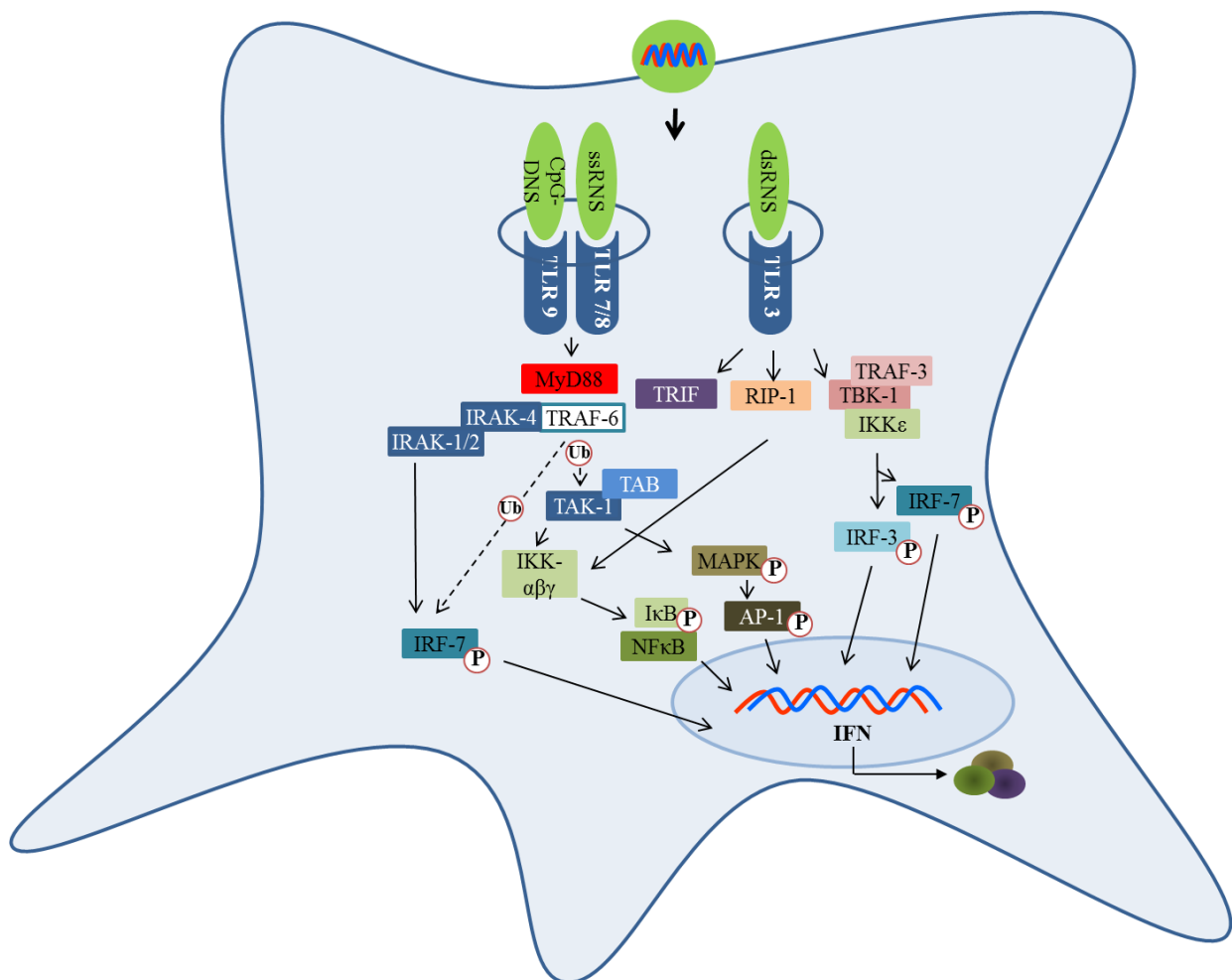


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Virus induzierten Toll-Like Receptor (TLR) Signalkaskade

Nach viraler Infektion der Zelle finden sich im Zytoplasma virale ssRNS, dsRNS und virale CpG- Motive. Diese binden an endosomal lokalisierte TLRs. Im Fall von TLR7, 8 und 9 kommt es zur Rekrutierung von MyD88 (*Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*) und IRF (*Interferon-Regulatig Factors*), die letztendlich in den Zellkern translokieren und die Transkription von Interferonen veranlassen [122, 123, 125, 128]. Bindet ssRNS an TLR3 kommt es zur Rekrutierung von TRIF (*TIR-Domain-Containing Adaptor Inducing IFN- β*), RIP-1 (*Receptor Interacting Protein-1*) und TRAF-3 (*TNF α Receptor Associated Factor-3*). TRIF und RIP-1 Rekrutierung mündet ebenfalls in der Aktivierung von NF κ B (*Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-Cells*) [123, 124, 129]. Rekrutierung von TRAF-3 führt zur Aktivierung von IRF-3 und IRF-7, die ihrerseits die Transkription von Interferonen veranlassen [104, 130-133]. (Modifiziert nach [134] und zusammengefasst von [135])

Retinoic acid-inducible gene I-Like Rezeptoren

RLRs sind wichtige intrazytoplasmatische, virale Sensoren, die in vielen Zellarten vorkommen. Zu diesen zählen Fibroblasten, Lymphozyten, Epithelzellen und cDCs (konventionelle dendritische Zellen) [136-138]. Die RLR Familie besteht aus drei DExD/H box RNS Helikasen: RIG-I (*Retinoic acid-Inducible Gene*), MDA-5 (*Melanoma Differentiation-Associated Gene 5*) und LGP-2 (*Laboratory of Genetics and Physiology-2*) [139]. RIG-I und MDA-5 erkennen dsRNS. MDA-5 erkennt außerdem noch poly I:C, RIG-I hingegen zusätzlich noch ssRNS [140-142]. Dem dritten Familienmitglied LGP-2 fehlen für die Aktivierung essentielle Bestandteile, die RIG-I und MDA-5 besitzen [143-148]. Daher wird vermutet, dass LGP-2 regulierend auf RIG-I und MDA-5 wirkt, aber auch dsRNA erkennen kann [149]. Hinweise für eine regulatorische Funktion liefern einerseits, dass sich eine Überexpression von LGP-2 negativ auf eine New Castle Disease Virus (NDV) und Sendai Virus (SV) induzierte IFN Produktion auswirkt. Ein weiterer Hinweis hierfür ist, dass mit poly I:C stimulierte Mäuse ohne LGP-2 eine verstärkte IFN-Antwort zeigen [144, 145, 148]. Andererseits wurde auch gezeigt, dass LGP-2 die RLR-spezifische antivirale Funktion fördert [150]. Aktivierung von RIG-I und MDA-5 führt zur Transkription von Typ I IFNs [139, 151].

Zyotosolische DNS und RNS Sensoren

Die Vermutung, dass es neben TLRs und RLRs weitere zyotosolische DNS Sensoren geben muss, kam auf, als TLR9^{-/-} MEF (*Mouse Embryonic Fibroblasts*), die nicht auf CpG DNS reagierten, auf Transfektion mit synthetischer b-Form dsDNS oder genomischer DNS aus Bakterien, Viren oder Säugetierzellen mit massiver IFN Expression reagierten [152]. Die durch zyotosolische DNS Sensoren aktivierten Signalkaskaden münden ebenfalls in der Aktivierung von TBK-1 und IRF und letztendlich in der Expression von Typ I IFNs [153-155]. Zu den zyotosolischen DNS Sensoren gehören DAI (*DNA-Dependent Activator of IFN-Regulatory Factors*) [156, 157], IFI16 (*IFN-Inducible Protein 16*) [158], die RNA Polymerase III [159, 160], LRRFIP1 (*Leucine-Rich Repeat (LRR)-Containing Protein*) [161], Ku70 [162] und DHX9 bzw. DHX36 (*DEAD/H-box Helicases 9 bzw. 36*) [163]. Als zyotosolischer RNS Sensor arbeitet die ubiquitär vorkommende Serin/Threonin Protein Kinase PKR. Sie wird durch dsRNS im Zytoplasma aktiviert, aber auch durch eine Vielzahl weiterer Signale wie Zytokine (darunter IFN selbst), Wachstumsfaktoren und zellulären Stress. Die Aktivierung von PKR führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und dadurch wiederum zur Transkription von IFNs [164]. Da PKR selbst zu den antiviral wirksamen IRGs zählt, wird in Kapitel 2.2.4 noch einmal näher auf PKR und seine Funktionen eingegangen.

2.2.3. Die Interferon vermittelten Signalkaskaden

Sobald Interferone durch diverse Stimuli induziert werden, werden sie ausgeschüttet und binden an ihre Rezeptoren auf der Zelloberfläche bestimmter Zellen. Diese Bindung löst die Aktivierung diverser Signalkaskaden, insbesondere der Jak-Stat Signalkaskade aus [165]. An dieser Signalkaskade sind zwei *Janus Protein Tyrosin Kinases* (Jak1 und 2) beteiligt, die verschiedenen Stats (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) phosphorylieren und aktivieren, die wiederum als Transkriptionsfaktoren wirken [166]. Die Jak-Stat Signalkaskade wird von über 50 Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen zur Signaltransduktion genutzt [167].

Üblicherweise unterscheiden sich die durch Typ I /Typ III und die durch Typ II IFNs aktivierten Jak-Stat Signalkaskaden.

Der Rezeptor der Typ I IFNs IFNAR1 ist mit der Janus Kinase TYK2 und IFNAR2 mit JAK1 assoziiert. Ligandenbindung führt zur Phosphorylierung des Rezeptorkomplexes. Dieser bindet nun die SH2 Untereinheiten von Stat 1 und 2. Dadurch werden bestimmte Tyrosine von Stat1 und 2 phosphoryliert. Stat1 und 2 können nun mit IRF-9 assoziieren und bilden den Transkriptionsfaktor ISGF3 (*IFN-Stimulated Gene Factor 3*) [168, 169]. ISGF3 transloziert in den Nukleus, wo es an ISRE (*IFN-Stimulated Response Elements*) bindet [170, 171]. Diese befinden sich in den Promoter Region von IRGs und bestehen aus einer definierten Nukleotid Sequenz (AGTTTN3TTC). Durch Bindung von ISGF3 an ISRE wird die Expression von IRGs entweder veranlasst oder aber gehemmt.

Für Typ I IFNs konnte nachgewiesen werden, dass sie neben ISGF3 auch andere Stats zur Signaltransduktion benutzen. Dies konnte für Komplexe aus Stat1/Stat1, Stat3/Stat3 und Stat5/Stat5 Homodimeren und für Stat3/Stat1 und Stat2/Stat1 Heterodimere gezeigt werden. Auch sie binden im Nukleus an bestimmte Promotor Regionen - jedoch nicht an ISRE. Diese Promotor Regionen enthalten die Nukleotid Sequenz (TTCN(2-4)GAA), auch GAS (*Gamma Activated Sequence*) genannt, welche wie ISRE, Bestandteil von Promotor Regionen vieler IRGs ist [172-175].

Des weiteren nutzen Typ I IFNs auch einen Komplex aus Stat5/CrkL zur Signaltransduktion [176]. CrkL (*v-CRK Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog (Avian)-Like*) ist Teil der dreiköpfigen CrK Protein Familie. Diese sind zelluläre Homologe des v-crk Protoonkogens. Stat5 interagiert konstitutiv mit TYK2. In Anwesenheit von IFN wird Stat5 phosphoryliert. Daraufhin bindet CrkL an die SH2 Domäne von Stat5. Dieser Komplex aus Stat5 und CrkL transloziert in den Nukleus und bindet ebenfalls an GAS-Elemente [176].

In reifen B-Lymphozyten kann IFN auch einen ISGF3 ähnlichen Komplex aus Stat2/6 und IRF-9 zur Signaltransduktion nutzen [177].

Im Fall von IFN- γ ist der Rezeptorkomplex mit den Janus Kinasen Jak1 und Jak2 assoziiert. Ligandenbindung an den Rezeptor führt zur Autophosphorylierung von Jak2 und dessen Aktivierung. Dadurch wird Jak1 transphosphoryliert [178]. Das aktivierte Jak1 phosphoryliert Tyrosine der IFNGR1 Untereinheiten. Dadurch können sich SH2 Domänen von Stat1 mit der IFNGR1 Untereinheit verknüpfen [179]. Stat1 löst sich als Homodimer von dem Rezeptor. Diesen Homodimer nennt man auch GAF (*Gamma IFN Activating Factor*) [180]. GAF transloziert in den Zellkern und bindet GAS [175]. Durch diese Bindung wird die Transkription von IRGs gefördert oder gehemmt [181]. Die erste Welle an IFN- γ induzierter Gen Expression erfolgt innerhalb 15-30 Minuten nach IFN- γ Behandlung [182]. Viele der induzierten Gene sind wiederum Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise IRF-1, welche die nächste Welle der IFN-Antwort aufrechterhalten sollen.

Bindet ein Vertreter der Typ III IFN Familie an seinen Rezeptorkomplex löst auch dies die Aktivierung der Jak-Stat Signalkaskade aus. Bisher ist noch nicht sicher bekannt, welche Janus Kinasen durch Ligandenbindung phosphoryliert werden. Kotenko *et al.* konnten aber 1997 zeigen, dass TYK2 mit IL-10R2 interagieren kann [183]. Die weiterfolgende Signalkaskade ist mit der durch Typ I IFNs ausgelösten vergleichbar. Es kommt zur Bildung des Transkriptionsfaktors ISGF3. ISGF3 transloziert in den Zellkern und bindet an ISRE. Dadurch kommt es zur Transkription von IRGs. Bis heute sind noch keine spezifischen Typ III IFN regulierten Gene beschrieben, doch konnte für zahlreiche IRGs gezeigt werden, dass sie auch durch Typ III IFNs reguliert werden.

Inzwischen konnte nachgewiesen werden, dass sich die durch Typ I/III IFNs und Typ II IFN ausgelösten Signalkaskaden überschneiden. Früher glaubte man, dass ISGF3 der für Typ I IFN spezifische Transkriptionsfaktor ist und GAF der für Typ II IFN spezifische Transkriptionsfaktor. Mittlerweile weiß man aber, dass auch Typ I IFNs GAF als Transkriptionsfaktor gebraucht und Typ II IFN ISGF3 [184]. Diese Überschneidungen ermöglichen es, dass sich die, durch die verschiedenen Typen ausgelösten IFN-Antworten gegenseitig unterstützen oder sich gegebenenfalls gegenseitig aufheben. Durch die Überschneidungen lassen sich auch die ähnlichen Wirkungsweisen der Interferone erklären. Dies stützt außerdem die Theorie, dass nicht ein einziges Zytokin eine antivirale Antwort auslöst, sondern dass dies vielmehr durch einen ganzen Zytokincocktail vermittelt wird, der viele interagierende Signalkaskaden aktiviert.

In Abbildung 3 ist die klassische durch alle drei Typen von Interferonen induzierte Jak-Stat Signalkaskade schematisch dargestellt.

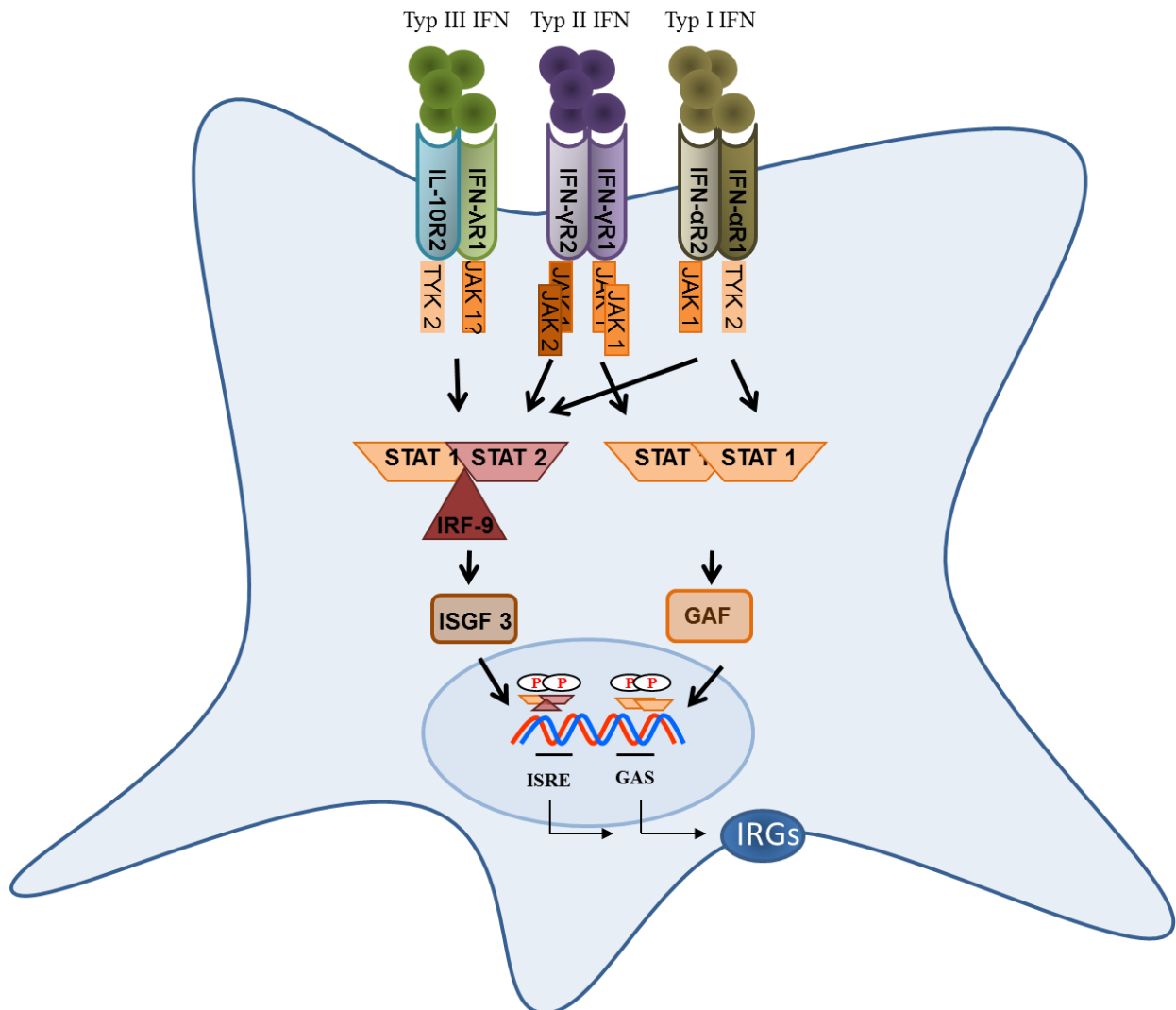


Abbildung 3 Die klassische durch Interferone induzierte Jak-Stat Signalkaskade.

IFNs binden an ihre jeweilige Rezeptoren, die mit Janus Kinasen assoziiert sind und Stats rekrutieren und aktivieren. Alle drei Typen von IFNs können den Transkriptionsfaktor ISGF3 (*Interferon Stimulating Gene Factor 3*), bestehend aus Stat1/Stat2/IRF-9, aktivieren. Dieser transloziert in den Nucleus und bindet an ISRE (*IFN-Stimulated Response Elements*) in den Promotor Regionen von bestimmten IRGs (*IFN-Regulated Genes*). Typ I und Typ II IFNs könne außerdem GAF (*Gamma Activating Factor*), bestehend aus einem Stat1/Stat1 Homodimer aktivieren. GAF transloziert in den Nucleus und bindet an GAS (*Gamma Activating Sequences*) Elemente, die ebenfalls in den Promotor Regionen bestimmter IRGs zu finden sind.

Schon lange gibt es Hinweise, dass eine IFN-Antwort nicht alleine durch die Jak-Stat Signalkaskade vermittelt wird. Im Gegenteil - je mehr über IFNs und über die durch IFNs ausgelösten Signalkaskaden bekannt wird, desto deutlicher wird, wie komplex eine IFN-Antwort ist. Im Folgenden sind einige Signalwege aufgeführt, die neben der Jak-Stat Signalkaskade zu der durch IFNs induzierten biologischen Antwort beitragen.

Eine Beteiligung an einer IFN-Antwort konnte für Mitglieder der IRS-1 und -2 (*Insulin*

Receptor Substrate-1 und -2) gezeigt werden [185, 186]. Mögliche Folge dieser Aktivierung ist eine PI3K (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*) vermittelte Aktivierung der Serin/Threonin Protein Kinase mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) [187]. So trägt auch die mTOR Signalkaskade zur Expression Typ I induzierter IRGs bei.

Auch konnten für die MAPK, ERK2 (*Extrazellular Signal Regulating Kinase 2*) und p38 gezeigt werden, dass sie eine Rolle in der Typ I IFN Vermittlung spielen [188]. Die MAPK Signalkaskade mündet sowohl in ISRE, als auch in GAS vermittelter Genexpression von IRGs [189].

Eine gewisse Bedeutung bei der Aktivierung einer IFN-Antwort scheint auch das Vav Protoonkogen zu haben. Vav ist ein Guanin austauschender Faktor in der Rho/Rac Familie der GTPasen (*Guanosintriphosphatases*) und viele unterschiedliche Stimuli können eine Thyrosinphosphorylierung von Vav auslösen, zu denen auch IFN zählt. Dabei assoziiert Vav sowohl mit IFNAR1 als auch mit IFNAR2 und bildet einen Komplex mit den Tyk2 und Ku80 Untereinheiten der DNA-PK (*DNA dependent Protein Kinase*). Zwar ist die Rolle von Ku80 bei einer IFN-Antwort noch nicht erforscht, es könnte aber die Genexpression beeinflussen. Es wird außerdem angenommen, dass die IFN induzierte Phosphorylierung von Vav die GDP/GTP (*Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat*) Austauschaktivität von Rac-1 (*RAS-related C3 Botulinum Substrate 1*) fördert, was wiederum die MAPK Signalkaskade aktiviert [190, 191].

Zuletzt ist zu erwähnen, dass auch Mitglieder der PKC (*Protein Kinase C*) Familie durch Typ I IFNs aktiviert werden. So aktiviert IFN PKC- δ , welche wiederum die Phosphorylierung von Stat1 reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von PKC- δ sowohl die GAS- und ISRE- vermittelte Gen Transkription, als auch die Aktivierung des MAPK Signalweges behindert [192].

2.2.4. Interferon-regulierte Gene

Die vielfältigen Funktionen von IFNs werden durch IRGs (*IFN-Regulated Genes*) vermittelt. Das bedeutet, dass durch IFNs die Expression von Genen induziert wird, die antivirale, antibakterielle, antiparasitäre, immunmodulatorische und apoptotische Eigenschaften haben und außerdem den Zellzyklus, die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung beeinflussen.

Die ersten IRGs wurden vor über 30 Jahren beschrieben [193] und in den darauf folgenden Jahren konnten zahlreiche durch IFNs induzierte Gene identifiziert werden. Einige wenige wurden auch hinsichtlich ihrer Funktion eingehend untersucht. Dazu gehören antiviral, apoptotisch und immunmodulatorisch wirkenden IRGs, von denen in den folgenden Absätzen

einige eingehender besprochen und ihre Funktionsmechanismen näher erläutert werden.

Antiviral wirksame IRGs können fast jeden Schritt eines viralen Lebenszyklus beeinflussen. Manche induzieren weitere IRGs und IFNs um den Effekt noch zu verstärken. Zu den antiviral wirkende IRGs deren Mechanismen eingehend untersucht wurden gehören PKR, 2'-5-OAS/RNase L und das Mx (*Myxovirus Resistance*) Protein (zusammengefasst von [30]). Antivirale Eigenschaften wurden außerdem der ADAR-1 (*Adenosin Deaminase 1*), den IFITs (*Family of IFN-induced Protein with Tetratricopeptide Repeats*), Viperin (*Virus-Inhibitory Protein, Endoplasmatic Reticulum associated, Interferon inducible*), PLSCR-1 (*Phospholipid Scramblase*) und ISG-20 (*IFN Stimulated Gene-20*) zugesprochen [194-197]. Seit einiger Zeit werden auch antiviral wirksame IRGs APOBEC3G (*Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme, Catalytic Polypeptide-Like 3G*), TRIM-5 (*Tripartite Motif Containing-5*), ZAP (*Zinc Finger Antiviral Protein*), ISG-15 (*IFN-Stimulated Gene-15*) und BST-2 (*Tetherin*) intensiv erforscht, in der Hoffnung insbesondere im Kampf gegen HIV neue Therapieansätze zu finden [198, 199].

Mx zählt wohl zu den am intensivsten erforschten IRGs. Schon 1962 konnte dieser antivirale Effekt von Mx bei der Maus festgestellt werden, als Mäuse des Inzuchtstammes A2G die intrazerebrale Infektion mit einem an die Maus adaptierten neurotrophen Influenza A Virusstamm überlebten [200]. Staeheli *et al.* konnten schließlich in MEFs von Mäusen dieses Inzuchtstammes zeigen, dass die antivirale Wirkung von Mx durch Typ I IFNs ausgelöst wird [201]. Insgesamt konnte für Mx eine antivirale Aktivität gegen eine Vielzahl von Viren gezeigt werden. Sowohl gegen negativ orientierte ss RNS Viren wie Influenza Viren, Masern Viren, Thogoto Viren, Vesikulo Stomatitis Viren und Bunyaviren, als auch gegen positiv orientierte RNS Viren wie Semliki Forest Viren und Coxsackie B Viren [202-208]. Mx Proteine gehören zur Familie der großen GTPasen. Teil dieser Familie sind auch Dynamine und die IFN regulierten Guanylat bindenden Proteine. Für die meisten Vertebraten ist mindestens eine Isoform von Mx beschrieben. Mx ist entweder im Zellkern oder im Zytoplasma lokalisiert [209]. Die Maus besitzt zwei Mx Isoformen: Mx1 und Mx2. Für beide konnte eine antivirale Aktivität gezeigt werden. Mx1 befindet sich im Zellkern und ist ein entscheidender antiviraler Faktor bei Infektionen mit Influenzaviren und Togaviren, die beide im Nukleus replizieren. Mx2 ist intrazytoplasmatisch lokalisiert und ist antiviral gegen die intrazytoplasmatisch replizierenden Bunyaviren wirksam. Der Mensch besitzt zwei Mx Isoformen die im Zytoplasma lokalisiert sind: MxA und MxB, wobei bislang lediglich für MxA eine antivirale Wirksamkeit gegen viele Viren gezeigt werden konnte [210]. Seine antivirale Aktivität vermittelt Mx über die Bindung von GTP und die dadurch veranlasste Hydrolyse [211]. Einerseits unterbricht Mx die Polymerase Aktivität von Viren und blockiert so deren Replikation. Andererseits kann Mx

Ribonukleoproteine binden und dadurch die virale RNS Transkription verhindern. Des Weiteren verhindert Mx den Transport von viraler mRNA und Nukleokapsiden und damit den Zusammenbau von Viruspartikeln.

PKR zählt zu den Serin/Threonin Kinasen. Den viralen Replikationszyklus unterbricht PKR indem es nach Bindung von viraler dsRNS eine Konformationsänderung erfährt. Hierdurch kann es die alpha Untereinheit des eIF-2 α (*Eukaryotic Translation Initiation Factor-2*) phosphorylieren. Dadurch wird verhindert, dass Initiatoren von Translationfaktoren wiederverwendet werden, und schränkt die *de novo* Proteinsynthese ein [212]. Die antivirale Eigenschaft von PKR ist Virus spezifisch. So konnte eine antivirale Wirksamkeit gegen Vesikulo Stomatitis Virus (VSV) und Influenza Viren nachgewiesen werden, jedoch nur eine eingeschränkte antivirale Wirksamkeit gegen Enzephalomyokarditis Virus (EMCV) oder Vaccinia Viren [213-216]. Dabei starben PKR^{-/-} Mäuse an einer im Wildtyp klinisch inapparent verlaufenden intranasalen Infektion mit VSV und zeigten verstärkte Empfänglichkeit für eine Infektion mit Influenza Viren (A/WSN/33 Influenza Virus Stamm) [213].

Virale dsRNS induziert auch die Expression von 2'-5'-OAS [217]. OAS sind Enzyme die die Polymerisation von Adenosintriphosphat (ATP) in 2'-5'- verknüpfte Oligoadenylate katalysieren. Diese Oligoadenylatfragmente aktivieren konstitutiv vorhandene RNase L, welche einzelsträngige zelluläre und virale RNS spalten kann und damit die virale Proteinsynthese inhibiert. Außerdem inhibiert RNase L den Proteinbaukasten der Zelle, indem es 28S ribosomale RNS spaltet und dadurch Ribosomen inaktiviert [218]. Eine besonders effektive OAS/RNase L vermittelte antivirale Aktivität konnte gegen Picoranvirusinfektionen, wie zum Beispiel EMCV gezeigt werden [219]. Wurden murine Zellen, die eine stabile, trunkierte Form dieses RNS Degradierung Systems (2'-5'-A RNase) exprimierten, mit EMCV infiziert, zeigten diese Zellen keine antivirale Antwort gegen die Infektion [218]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass RNase L für die Aktivierung der JNK (*C-Jun-NH2-Terminal Kinase*) Signalkaskade als Teil der MAPK Signalkaskade essentiell ist, da RNase L^{-/-} MEFs nach EMCV Infektion im Vergleich zu Wildtyp Zellen nur eingeschränkt in Apoptose gingen und JNK Aktivierung aufwiesen, was den Schluss nahe legte, dass die RNase L vermittelte JNK Aktivierung eine bedeutende Komponente der Interferon vermittelten Apoptose ist [220].

IFITs werden sowohl nach viraler Infektion, als auch nach IFN Applikation induziert [197]. Beim Menschen gibt es vier Mitglieder der IFIT Familie: IFIT-1 (auch ISG56), IFIT-2 (ISG54), IFIT-4 (ISG60) und IFIT-5 (ISG58). Bei Mäusen wurden bisher drei Mitglieder der IFIT Familie beschrieben: IFIT-1, MuP54 und MuP49. Vermutlich vermitteln IFITs ihre antivirale Aktivität indem sie die Translation einschränken [221]. Bisher konnte gegen Sendai Viren (SV),

Respiratorisches Synzytial Viren (RSV), Vesikulo Stomatitis Viren (VSV), West Nile Viren, Lymphozytäre Choriomeningitits Viren (LCMV), Influenza Viren, Reoviren, Herpes simplex Viren, Zytomegalieviren und Adeneoviren ein Geninduktion von Mitgliedern der IFIT Familie nachgewiesen werden [222-230].

Viperin wirkt antiviral gegen humane Zytomegalieviren (HCMV), indem es die Expression viraler, essentieller Proteine einschränkt. Dies konnten Chin *et al.* feststellen, als sie Fibroblasten, die mit einem Retrovirus, welches für Viperin codierte oder einem Kontrollvirus transduzierten, die Fibroblasten mit HMCV infizierten und sieben Tage später mit Hilfe eines Plaque Assays bei den Viperin transduzierten Zellen eine Verminderung der viralen Replikation um 90% im Vergleich zu den Kontrollen feststellen konnten [195].

PLSCR-1 ist ein Kalzium bindendes Plasmamembran Protein und vermag selber die Expression von einigen IRGs zu stimulieren, darunter ISG-15, IFIT-2 und IFIT-1 [231]. Die antivirale Wirkung von PLSCR-1 konnte gezeigt werden, indem Hey1B Zellen (eine humane Ovarialtumor Zelllinie), die vermindert PLSCR-1 exprimierten und PLSCR-1^{-/-} MEFs nach Vesikulo Stomatitis Virus Infektion oder Enzephalomyokarditis Virus Infektion erhöhte Virustiter aufwiesen [231].

ISG-20 ist eine IFN induzierte 2'-5'-Exoribonuklease. Es hat antivirale Effekte gegen RNS Viren, wie Vesikulo Stomatitis Viren, Enzephalomyokarditis Viren und Influenza Viren, indem es ihre mRNS Synthese und Peptid Produktion hemmt, zeigt jedoch keinen antiviralen Effekt gegen das DNS Adenovirus [232]. Dies konnten Espert *et al.* zeigen, indem sie nachwiesen, dass VSV, Influenza Viren und EMCV infizierte ISG-20 überexprimierende HeLa Zellen resistent gegen eine Infektion mit den genannten Viren sind, jedoch nicht gegen eine Infektion mit Adenoviren [232].

APOBEC3G gehört zu der Familie der Cytidin Deaminasen. Man hat festgestellt, dass APOBEC3G von Virionen des Humanen Immunodefizienz-Viruses (HIV) aufgenommen wird, wo es Cytosin zu Uracil deaminiert und damit die virale RNS angreifbar für Spaltung durch die Uracil DNS Glykosylase und Apurin-Apyrimidin (AP) Endonuklease macht [233].

Neben antiviral wirksamer IRGs werden auch IRGs induziert, die das Zellwachstum einschränken und gezielt Apoptose auslösen. Dies kann auf mehreren Wegen geschehen. Zum einen, indem Signalkaskaden eingeleitet werden, die zur Apoptose oder Wachstumshemmung bestimmter Zellen führen. Zum anderen können gezielt Effektormoleküle induziert werden, die den Zellzyklus kontrollieren. Zuletzt können proapoptotisch wirkende IRGs induziert werden, die gezielt Zellen in Apoptose führen.

Durch IRGs induzierte Signalkaskaden, die zur Apoptose und Wachstumshemmung bestimmter Zellen führen, sind die CrkL und MAPK Signalkaskade und die Vav Protoonkogene. So nimmt die CrkL Signalkaskade Einfluss auf das Zellwachstum haematopoetischer Vorläuferzellen [234]. Werden Zellen von Patienten mit CML (Chronischer Myeloischer Leukämie) mit IFN behandelt, kommt es zur Komplexbildung von CrkL und STAT5. Diese binden Promotor Sequenzen von einigen IRGs, die wachstumshemmend wirken, wie zum Beispiel PML (*Promyelocytic Leukemia Gene Product*), welches für ein Tumor unterdrückendes Protein codiert. Auch TRAIL, wird so induziert und führt zur Wachstumshemmung und Apoptose. Es gehört zur TNF Ligand Superfamilie und wird unter anderem von NK-Zellen nach IFN- β Stimulation ausgeschüttet um an seine Rezeptoren (TNFRSF10A und TNFRSF10B) zu binden und dadurch Apoptose auszulösen [235]. Für TRAIL konnte ein antiviraler Effekt nach Enzephalomyokarditis Virus (EMCV) Infektion *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden [194]. MEFs wurden mit EMCV infiziert und anschließend mit einer TRAIL überexprimierenden Mäusezelllinie behandelt. Nach acht Stunden wurde die TRAIL induzierte Apoptose gemessen. Es konnte festgestellt werden, dass, im Gegensatz zu nicht infizierten MEFs, die infizierten MEFs apoptotisch waren. Behandlung mit einem anti-TRAIL Antikörper verhinderte die Apoptose der infizierten MEFs. Ähnliches konnte *in vivo* festgestellt werden, als Mäuse, die EMCV infiziert wurden signifikant länger lebten als Mäuse die vor EMCV Infektion den neutralisierenden anti-TRAIL Antikörper erhielten [194].

Einige IRGs inhibieren das Zellwachstum direkt, indem sie die Expression von bestimmten Effektormolekülen, die den Zellzyklus kontrollieren, beeinflussen. Auf diese Weise wirken die IRGs Rb (*Retinoblastoma Gene Product*), Cyclin A, CDK-2 (*Cyclin Dependent Kinase-2*), E2F, c-myc und CKI (*CDK Inhibitors*) [236-238]. Weitere wachstumshemmende IRG sind die HIN-200 Familie (*Family of Hematopoietic IFN-inducible Nuclear Protein with the 200-Amino-Acid Repeats*). Mitglieder dieser Familie sind P202, P203, P204 und P205 (*Murine Myeloide Cell Nuclear Differentiation Antigens*) und ihre humanen Vertreter MNDA (*Myeloid Cell Nuclear Differentiation Antigen*), AIM-2 (*Absent In Melanoma-2*) und IFI16 [239]. Die genannten Faktoren ermöglichen es, den Zellzyklus in jeder Phase zu beeinflussen.

Um die Apoptose einzelner Zellen auszulösen, werden einige proapoptotisch wirkenden IRGs induziert. Zu diesen zählen Fas, Kaspasen, TRAIL, der XAF-1 (*X-Linked Inhibitor of Apoptosis-associated Factor-1*), die BCL-2 (*B-Cell Leukemia/Lymphoma-2*) verwandten Proteine Bak (*BCL-2 Antagonist/Killer*) und Bax (*BCL-2 associated-X Protein*) und die Gruppe der RIDs (*Regulators of IFN-Induced Death*) [240, 241]. Des Weiteren zählen Mitglieder der IRF-Familie wie IRF-1, -3 und -5 zur Gruppe der proapoptotisch wirkenden IRGs, indem sie

die Transkription weitere proapoptotischer IRGs veranlassen [242]. Die genauen Mechanismen der IFN induzierten Apoptose sind noch unklar, jedoch weiß man, dass Kaspasen, Cytochrom C Freisetzung und FADD (*Fas-Associated via Death Domain*) und damit der extrinsische und intrinsische Weg der Apoptose daran beteiligt sind [243].

Darüber hinaus wirken IRGs immunmodulierend. So spielen IFNs in der Entwicklung des Immunsystems und in der Hämatopoese eine entscheidende Rolle [244, 245]. Abwesenheit von IFNs - und damit von IRGs - während der Entwicklung des Immunsystems hat Auswirkungen auf fast alle Zellpopulationen, insbesondere Makrophagen, B-Lymphozyten und Granulozyten. Auch im ausgereiften Immunsystem spielen IRGs eine Rolle: In einem Infektionsgeschehen beeinflussen sie direkt die Antwort der T-Lymphozyten und der B-Lymphozyten. Sie vermitteln das Wachstum von T-Gedächtnis Zellen und unterstützen die Entwicklung einer T_H1 Immunantwort. IRGs, wie beispielsweise IRF-1, vermitteln die Hochregulierung von MHC Klasse I Molekülen und die Entwicklung einer CD8 T-Zell-Antwort. IRGs, wie CCL5 (Chemokin (C-C Motiv) Ligand 5), CCL3 (Chemokin (C-C Motiv) Ligand 3; auch Mip-1 α genannt) und IP-10 (*IFN- γ induced Protein-10*) wirken selber chemotaktisch auf T-Lymphozyten oder regulieren die Expression von weiteren Zytokinen und Chemokinen, die chemotaktisch auf T-Lymphozyten wirken [15, 246]. Sie aktivieren Makrophagen und NK-Zellen und regulieren die Reifung und Ausdifferenzierung von Dendritischen Zellen [247, 248]. Des Weiteren helfen IRGs von einer angeborenen Immunantwort in eine adaptive Immunantwort überzuleiten [249]. .

In den letzten Jahren haben verschiedene Forschergruppen viel Arbeit in die Katalogisierung von IRGs investiert [250-253]. Der Fortschritt in der Methodik und die Kenntnis von Genomsequenzen ermöglichte eine umfassende Identifizierung von IRGs innerhalb einer Spezies. So ermöglicht die im Jahre 1994 auf dem Markt erschienene Mikroarray Technologie die Identifizierung tausender IRGs innerhalb eines Experiments. Dieser Methodik bedienten sich zahlreiche Gruppen zur Identifizierung vieler IRGs, indem sie verschiedene Zellarten oder Gewebe mit unterschiedlichen Typen von IFNs oder Viren stimulierten (zusammengefasst in [252]) und die RNS dieser Proben mit Hilfe von Mikroarrays analysierten.

Samarajiwa *et al.* fassten 2008 die Ergebnisse von 28 Publikationen in einer Datenbank namens „INTERFEROME“ zusammen [252]. Diese Datenbank enthält einerseits eine umfangreiche Liste an IRGs aus zahlreichen Experimenten (über 1900 IRGs bei Maus und Mensch). Andererseits gibt sie auch einen Überblick darüber, welche Gene durch welche Typen von IFNs reguliert werden. So scheint es Gene zu geben, die ausschließlich durch Typ I IFNs

reguliert werden und Gene die ausschließlich durch Typ II IFN reguliert werden. Es scheint auch viele IRGs zu geben, die durch Typ I und Typ II oder durch Typ I und Typ III IFNs reguliert werden. Ein großer Teil der IRGs wird aber durch alle drei Arten von IFNs reguliert. Bisher konnten keine Typ III spezifischen IRGs identifiziert werden. Mehrere Gruppen konnten jedoch zeigen, dass Typ III IFNs ähnliche Gene wie Typ I IFNs regulieren [113, 254]. Dennoch konnten Unterschiede zwischen Typ I und Typ III IFNs hinsichtlich Geschwindigkeit und Dauer der Induktion festgestellt werden [112]. Interessanterweise gibt es einige IRGs, die beim Menschen und bei der Maus durch unterschiedliche Typen von IFNs induziert werden. Die Identifizierung von zahlreichen IRGs auf Transkriptomenebene beim Säugetier ermöglicht es, sich gezielt interessante Kandidaten auszusuchen und sie hinsichtlich ihrer Wirkungsweise näher zu charakterisieren. Einige dieser IRGs sind bezüglich ihrer biologischen Funktion schon eingehend untersucht worden.

Dies kann man individuell für einzelne Kandidaten machen, oder aber in einem umfassenden Ansatz wie bei Schoggins *et al.* [253]. Deren Ziel war es, gezielt antiviral wirksame IRGs zu identifizieren. Dafür haben sie IRGs aus publizierten Mikroarray Datensätzen auf ihre antivirale Wirkung nach Infektion mit unterschiedlichen Viren analysiert [253]. Ihr methodischer Ansatz hierfür war, diese IRGs mit Hilfe eines bicitronischen lentiviralen Vektors der zusätzlich ein rot fluoreszierendes Protein codiert, in Zellen zu transduzieren, diese mit verschiedenen, grün fluoreszierenden Viren zu infizieren und nach bestimmten Zeiträumen die Replikation der Viren in den rot fluoreszierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie zu messen. Bei einigen IRGs gelang zwar die lentivirale Transfektion nicht - darunter PKR und APOBEC3G, für zahlreiche IRGs zeigte dieser Ansatz aber höchst interessante Ergebnisse: So gelang es insgesamt für 25 IRGs eine antivirale Wirkung nachzuweisen von denen etwa die Hälfte bis dahin noch nicht als antiviral wirksam beschrieben war. Es gelang generell antiviral wirksame IRGs zu identifizieren (IRF-1, C6orf150, HPSE (*Heparanase*), RIG-I, MDA-5 und IFITM-3 (*IFN-Induced Transmembrane Protein-3*), aber auch IRGs die spezifisch auf bestimmte Viren antiviral wirken. Viele IRGs vermochten die Virusreplikation entweder besonders stark zu hemmen (über 80%) wie IRF-1, IRF-7, MDA-5 oder RIG-I oder um weniger als 20% wie IRF-3, Map3K14 (*Mitogen Activating Protein Kinase Kinase Kinase 14*), IFI44L (*IFN-Induced Protein 44-Like*) und andere. Nur ein IRG hemmte intermediär: 2'5'-OAS. Interessanterweise konnten auch einige IRGs gefunden werden, welche die Replikation von Viren erhöhten: ADAR, FAM46C, LY6E (*Lymphocyten Antigen 6 Complex, Locus E*) und MCOLN2 (*Mucolipin 2*). Dies könnte einerseits ein Zeichen für eine komplexe IFN-Funktion sein, andererseits könnte es auch bedeuten, dass Viren Mechanismen entwickelt haben, Effektorfunktionen von IFNs zu

ihrem Zweck zu nutzen. Schon längere Zeit gibt es Hinweise, dass mehrere Faktoren gleichzeitig vorhanden sein müssen, um einen vollständigen antiviralen Schutz zu erhalten. So zeigen Mäuse deren IRGs Mx-1, 2'5'-OAS und PKR ausgeschaltet wurden, noch immer antivirale Aktivität [216]. Um die Hypothese zu stützen, dass eine schützende IFN-Antwort die Kombination aus mehreren IRGs braucht, testeten Schoggins *et al.* das kombinatorische Verhalten mehrerer IRGs auf bestimmte Viren. Hierbei sahen sie, dass die Effekte von IRGs durchaus additiv wirken. Die Replikation der Viren konnte dadurch um bis zu 90% gesenkt werden. Bei näherer Betrachtung der antiviralen Mechanismen von IRGs fanden Schoggins *et al.* heraus, dass eines der Hauptziele von antiviral wirksamen IRGs eine frühe Hemmung der viralen Replikation und Translation ist [253]. Weitere wichtige Punkte, an denen antivirale IRGs ansetzen sind der Virus Zusammenbau und die Virus Freisetzung, was beispielsweise Tetherin und Viperin vermögen [255].

Zu den interessantesten neueren Erkenntnissen im Feld der IRGs gehört auch die Tatsache, dass einige IRGs ihrerseits IFNs induzieren können - oder aber selber weitere IRGs induzieren können, ohne IFNs zu induzieren. Diese IRGs wirken einerseits antiviral, andererseits verstärken sie die IFN Signalkaskade. Dies konnte bisher unter anderem für IRF-1, IRF-7, ZAP, Viperin und PKR [251, 256, 257] gezeigt werden.

2.3. Interferone beim Huhn

Säugetiere und Vögel gehören unterschiedlichen Klassen der Wirbeltiere an. Diese haben sich vor Millionen von Jahren aufgetrennt und seitdem weiterdifferenziert. Daher ist es nicht erstaunlich, dass sich auch die Bestandteile des Immunsystems weiterentwickelt haben, und das Immunsystem von Säugern und Vögeln sowohl gemeinsame Bestandteile besitzen, die sich vor Trennung der Klassen entwickelt haben, als auch unterschiedliche Bestandteile des Immunsystems, die sich nach Trennung der beiden Klassen entwickelt haben. Einen evolutionär alten Anteil des Immunsystems stellt das IFN-System dar, welches bei vielen Wirbeltieren vorkommt. Im Zusammenhang mit Zoonosen und Pandemien ist es wichtig, die Unterschiede zwischen dem Immunsystem des Vogels und des Säugetiers zu kennen. Am besten erforscht ist hierbei das IFN-System des Huhnes (*gallus gallus*). Jedoch konnten auch bei anderen Mitgliedern der Klasse der Vögel, wie beispielsweise der Ente und der Pute Typ I und Typ II IFNs bereits kloniert werden [258-261].

Vögel sind äußerst empfänglich für Infektionen des Respirationstraktes, bedingt durch eine besondere Anatomie und den fehlenden Alveolarmakrophagen [262, 263]. Bisher ist jedoch

wenig über die molekularen Mechanismen einer Wirt-Pathogen Interaktion nach viraler Infektion beim Huhn bekannt.

Obwohl IFN initial im Huhn entdeckt wurde trat die Forschung hinsichtlich IFNs im Huhn lange Jahre in den Hintergrund [5]. Dies lag wohl mitunter daran, dass die Sequenzhomologie zwischen Säugertieren und anderen Vertebraten nur sehr gering ist. Doch haben Seuchen, wie die Influenza Ausbrüche und deren pandemisches Potential, eingehende Erforschung der Abwehrmechanismen von Geflügel umso dringlicher gemacht. Die Erforschung des Hühner IFNs bekam neuen Schwung, als Pusztai *et al.* 1986 einen löslichen antiviralen Faktor nach der Stimulation von Hühnerleukozyten entdeckten [264]. Im Jahr darauf identifizierten Weiler *et al.* eine säurestabile und säurelabile Form von antiviral wirksamen IFNs im Huhn nach Stimulation von Milzzellen [265].

Die erste Klonierung eines Hühner IFNs, gelang 1994 aus der cDNS Virus infizierter Hühner Embryonen [18]. Hühner IFN konnte aus befruchteten Hühnereiern und embryonalen Hühnerzellen aufgereinigt werden [266-268]. Dabei handelte es sich um ein glykosiliertes Protein von 20-30kDa Größe, welches die gleiche Hitze- und Säurestabilität wie Typ I IFN von Säugertieren aufwies [269]. Jedoch zeigte es nur 20-25% Homologie zum Säuger Typ I IFN [7]. Aber auch dieses im Huhn gefundene IFN hatte ein konserviertes Cysteinmuster und fünf alpha Helices, eine typische Eigenschaft von Typ I IFN. Die endgültige Bestätigung, dass es sich um Typ I IFN handelte, brachte die stark antivirale Aktivität von rekombinant in *Escheria Coli* hergestelltem IFN gegen Vesikulo Stomatitis Virus (VSV) [270].

Sick *et al.* gingen der Frage nach, ob im Huhn (wie bei Vertretern der Säugtiere) mehrere Mitglieder der Typ I IFN Familie zu finden sind und identifizierten 1996 10 Typ I IFN Gene. Von diesen konnten drei sehr ähnliche intronlose Gene (IFN- α 1-3) sequenziert werden, deren Proteine 24% Homologie zu humanem IFN- α , 20% Homologie zu humanem IFN- β und 3% Homologie zu humanen IFN- γ hatten. Diese drei Gene der Typ I IFN Familie nannte man ChIFN1 [271]. Zusätzlich konnte ein weiteres intronloses Gen sequenziert werden, dessen Protein 57% Homologie zu ChFIN1 hatte. Dieses nannte man ChIFN2. Nach wie vor wird kontrovers diskutiert, ob ChIFN1 dem Säugtier IFN- α und ChIFN2 dem Säugtier IFN- β entspricht. Es wird postuliert, dass sich Vögel und Säugtiere vor der Entwicklung von ChIFN1 und ChIFN2 getrennt haben und sich die verschiedenen Arten von Typ I IFN bei Säugtier und Vogel unabhängig voneinander entwickelt haben [272, 273]. Phylogenetische Erforschung des Säugtier Typ I IFN zeigt jedoch, dass sich die Vervielfältigung von IFN Genen vor der Trennung von Säugtier und Vogel vollzogen hat [274]. Auch spricht die Tatsache, dass es

mehrere ChIFN1 Gene und nur ein singuläres ChIFN2 Gen gibt, für die These, dass ChIFN1 ein Homolog zu IFN- α und ChIFN2 ein Homolog zu IFN- β ist. Außerdem ähneln sich die Struktur ihrer jeweiligen Promotor Regionen und ihre Reaktion auf entsprechende Induktoren [275]. Also entschied man sich, die für das Säugetier verwendete Nomenklatur zu übernehmen und ChIFN1 als IFN- α und ChIFN2 als IFN- β anzusprechen [276, 277]. Im Gegensatz zu Säugetieren, deren IFN Gene autosomal codiert sind, finden sich Hühner Gene für Typ I IFNs auf dem Geschlechts Chromosom Z [278]. Wie die Typ I IFNs des Säugetiers, vermittelt ChIFN- α starke antivirale Aktivität [270]. Einen Hinweis auf die Existenz weiterer IFNs lieferte die Tatsache, dass ChIFN- α die Fähigkeit fehlte, Makrophagen zu aktivieren [279]. Interessanterweise scheint ChIFN- α eine 10fach höhere antivirale Aktivität als ChIFN- β zu besitzen. Allerdings aktivierten beide Typ I IFNs des Huhns in einem biologischen Testverfahren den Mx-Promotor gleichermaßen [280]. Karpala *et al.* lieferten kürzlich Hinweise, dass auch IFN- κ im Huhn zu finden ist, allerdings wurde dies bisher noch nicht publiziert und bisher ist diesbezüglich nur ein Datenbankeintrag darüber zu finden (GenBank: ADU04501.1).

Im Jahre 1995 konnten Digby und Lowenthal auch Typ II IFN (ChIFN- γ) im Huhn nachweisen und klonieren [281, 282]. Das ChIFN- γ befindet sich auf Chromosom 1 und besitzt mit 30-35% Homologie zum IFN- γ Protein des Säugetiers besitzt eine beträchtliche Ähnlichkeit zu diesem. ChIFN- γ zeigt Makrophagen aktivierende Faktor (MAF) Aktivität und hat antivirale Eigenschaften gegen Semliki Forest Virus und Vesikulo Stomatitis Virus [281, 282]. Daneben konnte gezeigt werden, dass ChIFN- γ MHC Klasse II Moleküle auf Hühner Makrophagen, GBP und NOS2 (*Nitric Oxide Synthase 2, inducible*, auch iNOS) hochreguliert [283]. Neben der Induktion durch die Jak-Stat Signalkaskade konnte für ChIFN- γ auch gezeigt werden, dass es durch Il-18 induziert wird [284].

Als Vertreter der Typ III IFNs konnte ChIFN- λ , welches dem humanen IFN- λ 2 entspricht, nachgewiesen und kloniert werden. ChIFN- λ ist auf Chromosom 7 lokalisiert [285] und scheint auch antivirale Aktivität zu besitzen. Bisher konnte dies für das Semliki Forest Virus und das Influenza Virus gezeigt werden, wenn auch weniger stark als ChIFN- α [285]. Analog zum IFN- λ des Säugetiers konnte für ChIFN- λ gezeigt werden, dass es bekannte Typ I IRGs wie 2'5'-OAS und Mx-1 auch im Huhn induziert [93, 286].

Insgesamt scheinen IFNs im Huhn aber hinsichtlich ihrer Funktionsweise denen von Säugetieren weitgehend zu entsprechen [282, 285]. So ähneln bei der Aktivierung einer IFN-Antwort die im Vogel beschriebenen Mechanismen denen des Säugetiers. Ebenso wie

Säugetiere besitzen Hühner PRRs, die durch PAMPs aktiviert werden. Jedoch ist nur wenig über die beim Huhn vorkommenden PRR bekannt. Man weiß jedoch, dass das Huhn Vertreter der TLRs, der NLRs und RLRs besitzt.

Wie beim Säugetier gibt es auch im Huhn TLRs auf der Zelloberfläche und auf endosomalen Membranen. Dabei findet man im Huhn Orthologe zu einigen TLRs des Säugetiers, jedoch auch einige Hühner spezifische TLRs (siehe Tabelle 3). Die TLRs des Huhns werden auch durch dem Säugetier entsprechenden PAMPs aktiviert [287-293].

Orthologe zum Säugetier konnten für TLR4 und TLR5 gefunden werden. Sie befinden sich auch beim Huhn auf der Zelloberfläche [294, 295]. Statt des humanen TLR Komplexes bestehen aus TLR1/6/10 besitzt das Huhn zwei Gene TLR1A und TLR1B [289, 296, 297]. Auch hat das Huhn statt einem TLR2 Gen zwei TLR2 Gene: TLR2A und TLR2B [289, 297], die funktionelle Heterodimere mit TLR1 eingehen können [298, 299].

Intrazellulär besitzt das Huhn Orthologe zu TLR3 und TLR7. Diese können, wie beim Säugetier, Nukleinsäure erkennen [291, 296]. TLR8 ist ein Pseudogen [291]. Das Huhn besitzt kein TLR9, jedoch wird dessen Aufgabe im Säugetier (CpG Motive zu erkennen) von einem Hühner spezifischen TLR21 übernommen [300]. Ein weiterer hühnerspezifischer TLR ist TLR15. Er ist auf der Zelloberfläche lokalisiert. Sein Ligand ist derzeit noch unbekannt, es gibt allerdings Hinweise, dass TLR15 durch Bestandteile von Hefen aktiviert wird [301, 302].

NOD1 (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing Protein 1*) konnte als Vertreter der NLRs im Hühnergenom gefunden werden. Von den RLRs scheint es beim Huhn MDA-5 und LGP-2 zu geben. Dabei konnte für MDA-5 in Hühner DF-1 (Fibroblasten) und HD11 Zellen (Hühner Makrophagen) gezeigt werden, dass es nach dsRNS Stimulus oder Infektion mit einer LPAIVΔNS1 Mutante zur Bildung von biologisch aktivem Typ I IFN führt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass LGP-2 die Typ I IFN Sekretion nach Infektion mit der LPAIVΔNS1 Mutante fördert [303, 304]. RIG-I gibt es im Huhn nicht, es wurde jedoch bei der Ente beschrieben [305]. Dies bietet Anlass zur Spekulation, ob das Fehlen von RIG-I im Huhn im Zusammenhang mit der hohen Empfindlichkeit gegenüber Infektionen mit HPAIV steht - vor denen die Ente geschützt ist. In diesem Fall müsste das Huhn jedoch für eine Vielzahl von Viren empfänglicher sein als die Ente. Daher kann das Fehlen von RIG-I zumindest nicht die einzige Ursache für die hohe Empfindlichkeit gegenüber HPAIV sein.

Tabelle 3 TLR und RLR des Huhnes

PRR	Lokalisation	Mensch	Huhn	Ligand
TLRs	Zelloberfläche	TLR1/6/10	TLR1A und TLR1B	Diacyl und Triacyl Peptide
		TLR2	TLR2A und TLR2B	Lipoteichonsäure
		TLR4	Vorhanden	Lipopolysaccharide
		TLR5	Vorhanden	Flagellin
		TLR11	Nicht vorhanden	
			TLR15	Unbekannt (Motive aus Hefen)
	Endosomal	TLR3	Vorhanden	ds RNS
		TLR7	Vorhanden	ssRNS
		TLR8	Pseudogen	
		TLR9	Nicht vorhanden	
			TLR21	CpG Motive
RLRs	intrazytoplasmatisch	RIG-I	Nicht vorhanden	
		MDA-5	Vorhanden	dsRNS
		LGP-2	Vorhanden	

Wenn PRRs passende PAMPs erkennen und binden, führt dies auch beim Huhn zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden und zur Bildung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und IFNs. Zahlreiche Mitglieder dieser Signalkaskaden konnten auch im Huhn identifiziert werden. Des Weiteren spricht die Tatsache, dass viele der Produkte dieser Signalkaskaden auch im Huhn im Rahmen einer Immunantwort zu finden sind, dafür, dass die durch PRRs aktivierten Signalkaskaden im Huhn weitgehend denen des Säugetiers entsprechen [291, 306-308].

Der Hühner IFN/II-10 Rezeptor Cluster wurde bereits identifiziert, kloniert und charakterisiert [309]. Hier finden sich beide Ketten des IFNAR, eine Kette des IFNGR (IFNGR-2) und IL-10R2, als eine Kette des Rezeptors für IFN- λ . Damit ähnelt seine Struktur dem humanen IFN/II-10 Rezeptor Cluster auf Chromosom 21, wobei der entsprechende Cluster des Huhnes dreimal kleiner ist als der des Menschen, was aber in Übereinstimmung mit den Größenverhältnissen zwischen Humanen- und Hühnergenom ist [310]. Die zweite Kette des IFNGR (IFNGR-1) befindet sich auf Chromosom 3, auf welchem sich auch TLR15 befindet [301] und ist damit nicht Teil des IFN/II-10 Rezeptor Clusters.

Die Mechanismen der durch IFNs ausgelösten Signalkaskaden scheinen sich mit denen von Säugetieren weitgehend zu überschneiden und so gibt es Hinweise auf eine funktionelle Jak-

Stat Signalkaskade, die auch im Huhn zur Aktivierung von ISRE und GAS Elemente in den Promotor Regionen von IRGs führt und dadurch deren Gen Expression veranlasst [311, 312].

Größtenteils unbeantwortet ist nach wie vor die Frage, welche IRGs beim Huhn vorkommen und wie diese wirken. Zu den bereits identifizierten IRGs gehören PKR, 2'5'-OAS und Mx-1.

Die antivirale Rolle von Mx-1 beim Huhn wird seit Jahren kontrovers diskutiert. Da Mx-1 bei der Maus einen potenten Schutz gegen hoch pathogene aviäre Influenza Viren (HPAIV) vermittelt [3], lag die Vermutung nahe, dass Mx beim Huhn ebenfalls antiviral gegen HPAIV wirkt. Nach viraler Infektion oder Typ I IFN Stimulation wird Mx Protein auch im Huhn induziert. Doch wirkt das gebildet Mx im Huhn nicht antiviral gegen HPAIV, Vesikulo Stomatitis Viren und Thogoto Viren [1, 4, 313]. Vermutungen, dass dies einerseits mit der zytoplasmatischen Lokalisation von Mx-1 beim Huhn und andererseits mit einem Aminosäurepolymorphismus an Position 631 zusammenhängt konnten nicht bestätigt werden [314-318]. Kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass das Hühner Mx-1 keine GTPase Aktivität besitzt - eine essentielle Eigenschaft für die antivirale Aktivität des Mx des Säugetiers [4].

Für PKR konnte im Huhn eine antivirale Wirksamkeit gegen Vesikulo Stomatitis Virus gezeigt werden [1, 319]. Die 2'5'-OAS wird im Huhn durch zwei Gene codiert. OAS A und OAS B. Dabei scheinen einige Hühnerlinien beide Varianten zu tragen, andere jedoch nur OAS A. [320, 321]. Antivirale Aktivität von ChOASL konnte *in vitro* gegen West Nile Virus gezeigt werden [2].

Innerhalb von Transkriptomstudien nach viraler Infektion von Hühnern oder Hühnerzelllinien konnten auch viele aus dem Säugetier bekannte IRGs gefunden werden [263, 322-328].

Reemers et al. zeigten, dass nach Infektion mit aviärem Influenzavirus, Subtyp H9N2 via Aerosol in der Lunge zahlreiche Gene exprimiert wurden, darunter zahlreiche Zytokine, Chemokine und Apoptose assoziierte Gene und Transkriptionsfaktoren, die sie in Zusammenhang mit der Anatomie der Lunge brachten [263]. In einem weiteren Experiment zeigten sie wiederum, dass viele immunrelevante Gene nach H9N2 Infektion in der Trachea und Lunge, in Abhängigkeit vom Alter des Tieres exprimiert wurden [328]. Andere Gruppen analysierten CEF Zellen nach Infektion mit LPAIV-Stämmen und konnten beispielsweise die Expression von IFN- β , IFN- γ , CCL20, K203 (Chicken Chemokine (C-C motif) inflammatory Ligand 3), Il-6 und Il-8 zeigen, aber auch von OAS, Mx-1, ISG12-2 und IFIT-5 [327].

Lee *et al.* sahen, nachdem sie Hühnerembryo Lungenzellen mit Laryngotracheitis Virus

infizierten, wiederum zahlreiche Zytokine, Chemokine, MHC-assoziierte Gene und Signaltransduktoren differentiell exprimiert [326], ebenso wie Dar *et al.*, die Hühnerembryonen mit Infektiösem Bronchitis Virus infizierten und anschließend deren Lungentranskriptom untersuchten [324]. Nach Infektion von Hühnerembryozellen mit velogenem NDV konnten erst nach 24 Stunden die ersten Interferon- regulierten Gene gefunden werden [323].

All diese Experimente zeigten, dass nach viraler Infektion, aus dem Säugetier bekannte IRGs auch im Huhn reguliert werden. Jedoch lässt sich aus diesen Experimenten nicht klar erkennen, ob die Transkription dieser Gene viral bedingt oder IFN vermittelt ist. Eine umfassende Übersicht, welche IRGs im Huhn alleine durch IFN induziert werden, steht daher bisher nicht zur Verfügung.

3. ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war es, eine umfassende Zusammenstellung Interferon-regulierter Gene (IRGs) im Huhn zu erstellen, da bisher nur einzelne IRGs im Huhn näher charakterisiert sind. Das Wissen über das antivirale Abwehrsystem im Huhn wird aber in Zeiten von drohenden Pandemien umso dringlicher.

Um IRGs im Huhn zu identifizieren, sollte zunächst in Datenbanken und Publikationen nach IRGs von Maus und Menschen gesucht werden, um die gefundenen IRGs mit dem Hühnergenom abzugleichen. Anschließend sollte Hühnern rekombinantes Hühner Interferon alpha (rek ChIFN- α) intravenös injiziert werden, um die induzierten Gene mittels Transkriptomanalyse von Milz und Lunge mit zu analysieren. Um die Interferon Antwort in einem natürlichen Infektionsmodell zu überprüfen, sollte ein weiteres Mikroarray Experiment mit Milz und Lunge von intratracheal mit lentogenem Newcastle Disease Virus infizierten Hühnern durchgeführt werden. Die auf diese Weise identifizierten Gene sollten hinsichtlich ihrer Einteilung in funktionelle Gengruppen, biologisch relevante Signalkaskaden und Netzwerke und Expression in bestimmten Expressionsprofilen näher charakterisiert werden. Die derart identifizierten IRGs im Huhn sollen einen umfassenden Überblick geben, welche Typ I IFN induzierten IRGs im Huhn vorkommen und in Zukunft die genaue Charakterisierung potentiell antiviral wirksame Kandidatengene erleichtern.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Tiere und Tierhaltung

Befruchtete Hühnereier der Hühnerlinie LSL (Lohmann's Selected Leghorn) stammten von der LSL-Rhein-Main-Geflügelvermehrung GmbH, Dieburg. Befruchtete Hühnereier der Hühnerlinie M11(B^{2/2}-Haplotyp) stammten vom Institut für Tierzucht in Mariensee. Brut und Schlupf erfolgten am Lehrstuhl für Tierphysiologie, München. Die Hühnereier wurden bei 37,8°C und 55% Luftfeuchtigkeit bebrütet und viermal täglich gewendet.

Für den *in vivo* Tierversuch zur Bestimmung der Lipopolysaccharid (LPS) Auswirkungen auf den Plasmagehalt an biologisch aktivem Typ I IFN und auf die Genexpression in Lunge und Milz wurden Hühner der Linie LSL im Alter von fünf Wochen von Gut Heinrichsruh, Berglern geliefert und für eine Woche bis zum Versuchsbeginn am Lehrstuhl für Tierphysiologie, München aufgestellt. Zu Versuchsbeginn hatten die Tiere folgendes Alter: Ermittlung der Halbwertszeit von rek ChIFN- α : 10 Wochen, LPS-Injektion: 6 Wochen, Vergleich der Bioverfügbarkeit nach i.m./i.v. Injektion von rek ChIFN- α : 4 Wochen, i.v. Injektion von rek ChIFN- α zur Mikroarray Analyse: 7 Wochen, NDV Infektion: 13 Wochen. Die *in vivo* Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern unter der Tierversuchsnummer 55.2-1-2531-121-09 genehmigt.

Die Hühnerhaltung erfolgte in Kleingruppen in Volieren oder auf Gitterrostkäfigen. Die Tiere wurden mit handelsüblichem Alleinfuttermittel gefüttert und hatten Wasser ad libitum zur Verfügung.

4.2. Gewinnung von Proben

4.2.1. Gewinnung von Organen

Material:

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2

8,00g Natriumchlorid¹
1,45g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat¹
0,2g Kaliumchlorid¹
0,2g Kaliumhydrogenphosphat¹
ad 1000ml Aqua dest.
Einstellen des pH mit HCl und NaOH auf 7,2
Zum Arbeiten mit sterilem PBS wurde die Lösung autoklaviert

RNAlater⁹

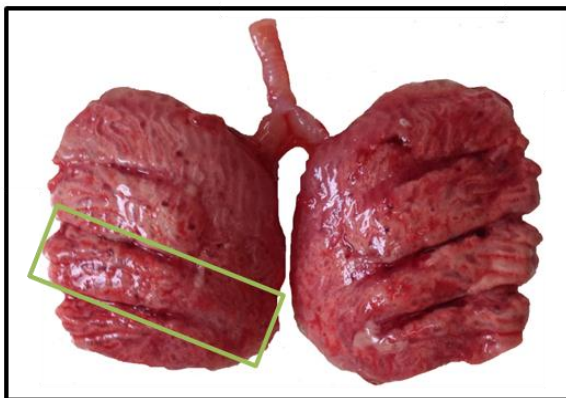
Skalpellklingen²⁴

Steriles Besteck

Durchführung:

Die Hühner wurden betäubt und durch Blutentzug getötet. Anschließend wurden die Organe unter Verwendung von sterilem Besteck entnommen und entsprechend der weiteren Analyse in geeignete Medien überführt. Für die RNA-Isolation wurden die Organe in eisgekühltem RNAlater aufgenommen, für 12 Stunden bei 4°C gekühlt und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. RNAlater verhindert die Destabilisierung der RNA durch zelleigene RNAsen. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Organe in eisgekühltem PBS aufgenommen. Für die histologischen Untersuchungen wurden die Lungen wie in Kapitel 4.12 beschrieben behandelt und weiterverarbeitet. Für alle durchgeführten Analysen der Lungen wurden stets die vorletzten Lungenscheiben (*Tori intercostales*) mit scharfen Skalpellklingen von den benachbarten Lungenscheiben getrennt. Für die Genexpressionsanalysen und die durchflusszytometrischen Analysen der Lunge wurden ausschließlich die Anteile der vorletzten Lungenscheibe verwendet, die sich dorsal und ventral des Primärbronchus befinden. Damit sollte verhindert werden, dass konstitutiv um Primärbronchus gelegenes Bronchial Assoziiertes Lymphatisches Gewebe (BALT) mit analysiert wird [329, 330]. Die Hühnerlunge und die zur Analyse entnommenen Anteile sind in Abbildung 4 zu sehen.

A



B

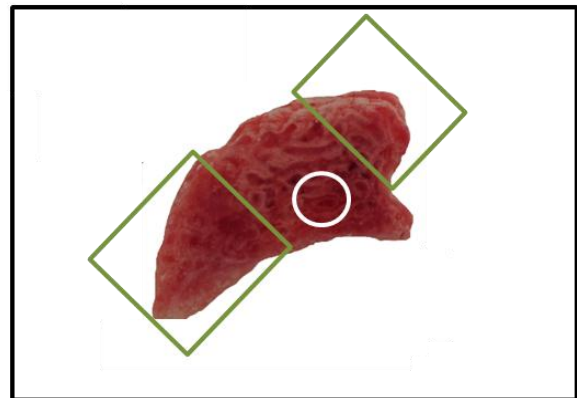
**Abbildung 4 Probenentnahme aus der Lunge**

Abbildung (A) zeigt eine Hühnerlunge von dorsal. Die Trachea teilt sich in die zwei Hauptbronchien (*Bronchi primarii*). Des Weiteren sind die linke und die rechte Lunge zu sehen. Jede Lungenseite ist in vier Lungenscheiben (*Tori intercostales*) aufgeteilt, die durch Rinnen (*Sulci costales*) jeweils voneinander getrennt sind. Die für die Analysen verwendete vorletzte Lungenscheibe der linken Lunge ist durch eine grüne Umrandung hervorgehoben. In Abbildung (B) ist die vorletzte Lungenscheibe der linken Lunge im Transversalschnitt dargestellt. Der Kreis kennzeichnet die Lage des Primärbronchus. Für die Genexpressionsanalysen und die durchflusszytometrische Analyse wurden die durch die grüne Umrandung hervorgehobenen ventral und dorsal des Primärbronchus gelegenen Anteile der vorletzten Lungenscheibe entnommen.

4.2.2. Gewinnung von Plasma

Material:

Heparinlösung (500 U/ml)

5 ml Heparin-Natrium (25.000IU/5ml)³
45 ml RPMI 1640 with Glutamax⁴

die Lösung wurde aliquotiert und bei 4°C gelagert.

Spritzen

Kanülen der Größe 0,4x19mm

Probengefäß 1,3ml Lithium zur Plasmagewinnung²⁶

Durchführung:

Zur Gewinnung von Hühnerplasma wurden Spritzen mit Heparinlösung beschichtet. Die Blutentnahme erfolgte aus der Vena jugularis dextra oder der Vena ulnaris. Das Blut wurde sofort in Probengefäße zur Plasmagewinnung überführt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gekühlt. Um Plasma zu erhalten wurden die Blutproben für 10 Minuten bei 4°C mit 300xg zentrifugiert.

4.3. Zellkultur

4.3.1. Medien und Zusätze

CEC32#511-Medium:

Medium: Basal ISCOVE⁴
40ml fetales Rinderserum (fetal bovine serum, FBS)²
10ml Hühnerserum⁴

7TD1-Medium:

Medium: RPMI 1640 with Glutamax⁴
10ml FBS
Rekombinantes ChII-6 (1ng/ml); Referenz: [331]

G418-Gebrauchslösung

250mg G418-Stammlösung (50mg/ml)²
ad 5ml PBS
Lagerung bei 4°C

Standard –Einfriermedium

45ml FBS²
5ml Dimethylsulfoxid (DMSO)¹
Lagerung bei -20°C

Trypsin-EDTA²

PBS

4.3.2. Verwendete Zelllinien

CEC32#511

Zellart: Wachtelfibroblasten

Spezies: Wachtel

Medium: CEC32#511 Medium

Zusatz: nach jedem dritten Teilen 250µg/ml G418–Gebrauchslösung zugesetzt

Referenz: [312, 332]

7TD1

Zellart: Hybridom

Spezies: Maus

Medium: 7TD1 Medium

Referenz: [333]

4.3.3. Kultivierung von Zellen

Zur Teilung der adhärent wachsenden CEC32#511 Zellen wurde das Medium vollständig abgenommen. Der Zell-Monolayer wurde zur Entfernung von FBS Resten einmal mit 37°C warmen PBS gewaschen und anschließend mit 37°C warmer 1xTrypsin Lösung bedeckt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die abgelösten Zellen mit PBS gewaschen. Die gewünschte Zelldichte wurde in Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen⁶ bei 37°C kultiviert.

Die 7TD1 Zellen wurden zur Teilung durch abklopfen gelöst und dann in der gewünschten Zelldichte in frischem Medium aufgenommen und ebenfalls bei 37°C kultiviert.

4.3.4. Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden gewaschen und pelletiert und in einer Dichte von 5×10^6 - 1×10^7 Zellen/ml in kaltem Einfriermedium aufgenommen. Es wurden 1,8 ml Zellsuspension pro Gefrier Röhrchen⁶ in eine isopropanolhaltige⁷ Einfrierbox überführt und diese bei -80°C eingefroren. Diese ermöglicht eine Abkühlung um 1°C pro Minute. 24 Stunden später wurden die Gefrier Röhrchen zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff⁸ überführt.

4.3.5. Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden in dem Gefrier Röhrchen⁶ möglichst rasch in 37°C warmem Wasserbad aufgetaut und zügig in ein 50 ml Proben Röhrchen²⁶ überführt. Anschließend wurde sehr langsam und unter dauerndem Schwenken des Röhrchens eiskaltes RPMI 1640 zugegeben. Dies ermöglicht ein langsames Auswaschen des zelltoxischen DMSOs. Die Zellen wurden pelletiert um anschließend nochmals mit PBS gewaschen zu werden. Anschließend wurden sie in Medium aufgenommen und bei 37°C kultiviert.

4.3.6. CEC-32#511 Interferon- α Reporterassay

CEC-32#511-Zellen sind stabil mit einem Plasmid transfiziert, welches für Luciferase codiert. Die Transkription von Luciferase steht unter einem Mx-Promotor. Bindet IFN an den IFN-Rezeptor wird der Mx-Promotor aktiviert und das Luciferase-Gen transkribiert. Das Ausmaß an Luciferaseaktivität kann luminometrisch quantifiziert werden und dadurch der Gehalt an biologisch aktivem Typ I IFN in den gemessenen Proben bestimmt werden.

Material:

Proben

CEC-32#511

CEC.32#511 Medium

IFN- α Standard 1000 Units/ml

hergestellt aus rek ChIFN- α (E.coli) (Herstellung siehe Kapitel 4.4)
verdünnt in RPMI 1640 with Glutamax⁴ mit 10% FBS²
Lagerung bei -20°C

Luciferase Assay Reagent³

Lagerung bei -80°C

Cell culture lysis reagent 5x³

Lagerung bei -20°C
vor Gebrauch auf RT erwärmen
mit Aqua bidest. auf 1x verdünnen

Gerät: GloMax 96 Microplate Luminometer³

Referenz: [332]

Durchführung:

Am Vorabend der Messung wurden die CEC-32#511 in einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen pro Kavität auf einer sterilen 96-Loch Flachbodenplatte⁶ ausgesät und 12-16 Stunden bei 37°C kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Proben in Duplikaten in den gewünschten Verdünnungen aufgetragen. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde IFN- α Standard in einer log-2 Titration von 6 Units/ml bis 0,1875 Units/ml in Duplikaten aufgetragen. Als Negativkontrolle diente reines Medium. Nach Zugabe der Proben wurde die Platte für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Überstände entfernt, die Platte mit warmen PBS gewaschen und 1x *Cell culture lysis reagent* aufgetragen. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben aufsuspendiert und in eine 96-Loch Rundbodenplatte⁶ überführt. Um Luftblasen zu entfernen wurde die Platte kurz abzentrifugiert. Anschließend wurden jeweils 10 μ l der zu testenden Proben auf eine 96-Loch-Lumitrac200-Messplatte²⁷ überführt und im GloMax®- Luminometer³ nach Zugabe von Luciferase Reagenz die Emission der Lichtquanten pro Probe gemessen. In Relation zu den Lichtquanten im Standard mit bekannter IFN-Konzentration konnte nun der Gehalt der Proben an biologisch

aktivem Typ I IFN bestimmt werden.

4.3.7. Nachweistest für ChII-6

In Anwesenheit von Il-6 proliferieren die streng Il-6 abhängigen murinen Hybridomzellen 7TD1. Diese dosisabhängige Proliferation der 7TD1 Zellen lässt sich mittels des Tetrazoliumsalzes XTT quantifizieren, da mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen das gelbe XTT in ein orange-rotes Formazan Produkt umwandeln. Die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450nm wird mit dem ELISA-Reader³³ gemessen. Somit lässt sich in den gemessenen Proben der Gehalt an ChII-6 bestimmen.

Material:

Proben

7TD1 Zellen

7TD1 Medium

Rekombinantes ChII-6 (1ng/ml)

XTT-Lösung⁹

PMSG-Lösung⁹ (5mM)

Durchführung:

Die zu testenden Proben wurden auf einer sterilen 96-Loch Flachbodenplatte⁶ in einer log₂ Titration austitriert. Als Positivkontrolle diente rekombinantes ChII-6 in einer Konzentration von 1ng/ml, als Negativkontrolle Il-6 freies 7TD1 Medium.

Die 7TD1Zellsuspension wurde aus den Zellkulturflaschen⁶ in ein 50 ml Probenröhrchen²⁶ überführt. Die Zellsuspension wurde dreimal mit sterilem PBS gewaschen um sämtliches Il-6 aus der Zellsuspension zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen pro Kavität auf die zu testenden Proben aufgetragen. Nach 96-stündiger Inkubation bei 37°C wurde eine 0,025 mM XTT-Gebrauchslösung angesetzt und dieser pro ml XTT-Lösung 5µl PMS-Lösung zugesetzt. Von dieser Gebrauchslösung wurden 50µl auf jede Kavität der 96-Loch-Flachbodenplatte gegeben. Danach wurde diese 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nun wurde die 96-Loch-Flachbodenplatte noch eine Minute auf einen Schüttler gestellt, um die Formazansalze in Lösung zu bringen und anschließend die Extinktion der zu testenden Proben bei einer Wellenlänge von 450nm im Plattenphotometer³³ gemessen.

4.4. Herstellung von rekombinantem ChIFN- α

Material:

Verwendetes Konstrukt:

Vektor: pET-3a
Insert: ChIFN α -His

Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Peter Staeheli, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum zur Verfügung gestellt.

Das Konstrukt wurde in den chemisch kompetenten Bakterienstamm BL21-DE3 transformiert und als Glycerolstock bei -80°C gelagert.

Proteinexpression:

Ampicillin

400mg Ampicillin
ad 4ml Aqua dest.
Lagerung bei -20°C

LB-Medium

Vor Gebrauch autoklaviert
Lagerung bei 4°C

Expressionsbakterium BL21-DE3

Tris-HCl Lösung (1M), pH 7,5

1,21g Tris¹
in 5ml Aqua dest. lösen
pH 7,5 einstellen (mit NaOH¹ (1M) bzw. HCl¹ (1M))
ad 10 ml Aqua dest.
Lagerung bei RT

Glucose (1M)

9,91g D(+)-Glucose-Monohydrat¹
ad 50 ml Aqua dest.
Immer frisch ansetzen

IPTG- Lösung (1M)

0,48g IPTG¹
ad 2ml Aqua dest.
Lagerung bei -20°C

Ultraschall Puffer, pH 7,8

0,53g Natriumchlorid¹ (300mM)
0,21g Di-Natriumhydrogenphosphat¹ (50mM)
ad 30 ml Aqua dest.
pH 7,8 einstellen (mit NaOH¹ (1M) bzw. HCl¹ (1M))
Lagerung bei 4°C
Vor Gebrauch DDT (1M)¹ zugeben

Puffer A, pH 8,0

114,64g Guanidin-Hydrochlorid¹ (6M)
3,12g Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat¹ (100mM)
2ml 1M Tris HCl(10mM)
ad 200 ml Aqua dest.
pH 8,0 einstellen (mit NaOH¹ (1M) bzw. HCl¹ (1M))
Lagerung bei 4°C
Vor Gebrauch DDT (1M)¹ zugeben

Puffer B1, pH 8,0

24,02g Harnstoff¹ (8M)
0,78g Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat¹ (100mM)
0,5 1M Tris HCl (10mM)
ad 50ml Aqua dest.
pH 8,0 einstellen (mit NaOH¹ (1M) bzw. HCl¹ (1M))
Lagerung bei 4°C
Vor Gebrauch DDT¹ (1M) zugeben

Puffer B2, pH 8,0

30,03g Harnstoff¹ (2M)
14,61 Natriumchlorid¹ (1M)
3,9g Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat¹ (100mM)
2,5g 1M Tris HCl (10mM)
ad 250ml Aqua dest.
pH 8,0 einstellen (mit NaOH¹ (1M) bzw. HCl¹ (1M))
Lagerung bei RT
Vor Gebrauch DDT¹ (1M) zugeben

Puffer E1, pH 6,5

0,21g Natriumacetat¹ (50mM)
2,92g Natriumchlorid¹ (1M)
6,01g Harnstoff¹ (2M)
0,5ml 1M Tris-HCl (10mM)
ad 50ml Aqua dest.
pH 6,5 einstellen (mit NaOH¹ (1M) bzw. HCl¹ (1M))
Lagerung bei 4°C
Vor Gebrauch DDT¹ (1M) zugeben

Puffer E2, pH 3,6

0,21g Natriumacetat¹ (50mM)
2,92g Natriumchlorid¹ (1M)
6,01g Harnstoff¹ (2M)
ad 50ml Aqua dest.
pH 3,6 einstellen (mit NaOH¹ (1M) bzw. HCl¹ (1M))
Lagerung bei 4°C
Vor Gebrauch DDT¹ (1M) zugeben

Ni-NTA Agarose²⁸

Lagerung bei 4°C

Econo-Pac® 10DG Columns⁵**Dreiwegehahn****Dialyse Schlauch ZelluTrans 3,5 19mm¹⁷****Dialysepuffer, pH 3,6**

14,61g Natriumchlorid¹ (50mM)
20,51g Natriumacetat¹ (50mM)
6,01g Harnstoff¹ (2M)
ad 5000ml Aqua dest.
pH 3,6 einstellen (mit NaOH¹ (1M) bzw. HCl¹ (1M))
Lagerung bei 4°C

Spritzenfilter Filtropur S 0,2µm²⁶

Gel-Elektrophorese:**5x Elektrophoresepuffer, pH 8,3**

15g Tris¹
72g Glycin¹
5g SDS¹ (Natriumdodecylsulfat)
ad 1000ml Aqua dest.
Die Stammlösung wird zur Elektrophorese 1:5 mit Aqua dest. verdünnt
Lagerung bei RT

Gelpuffer, pH 8,8

91g Tris¹(1,5M)
2g SDS¹
ad 500ml Aqua dest.
pH 8,8 einstellen (mit NaOH¹ (1M) bzw. HCl¹ (1M))
Lagerung bei 4°C

Sammelgelpuffer, pH 6,8

6,05g Tris¹(0,5M)
0,4 g SDS
ad 100ml Aqua dest.
pH 6,8 einstellen (mit NaOH¹ (1M) bzw. HCl¹ (1M))
Lagerung bei 4°C

TEMED¹ (N,N,N,N'-Tetramethyläthylendiamin)

Lagerung bei 4°C
Gebrauchslösung in dunklem Cup

10%ige APS-Lösung (Ammoniumperoxodisulfat)

0,5 g Ammoniumpersulfat¹
ad 5 ml Aqua bidest.
Lagerung bei -20°C

Acrylamid-Lösung¹ 30%

Lagerung bei RT

Probenpuffer Lämmli 6x reduzierend

0,93mg DTT¹ (0,6 M)
10 ml 6x Lämmli
Lagerung bei -20°C

Unstained Protein Molekulargewichtsmarker, ~10-200 kD

Lagerung bei 4°C

Coomassie Färbung**Coomassie Färbelösung**

450ml Ethanol¹ 99% vergällt
100ml Essigsäure¹ 100%
2,5g Coomassie Brilliant Blue R-250¹
ad 1000ml Aqua bidest.
Lagerung bei RT unter dem Abzug

Entfärbelösung

250ml Ethanol¹ 99% vergällt
100ml Essigsäure¹ 100%
ad 1000ml Aqua dest.
Lagerung bei RT unter dem Abzug

Durchführung:

Von dem angefertigten Glycerolstock des Expressionsbakteriums wurden einige Kristalle in 20ml mit 20µl Ampicillin versetztes LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 200rpm hochgeschüttelt. Am nächsten Tag wurde diese Bakteriensuspension auf weitere vier Kolben mit jeweils 0,5l LB-Medium, die zuvor mit 0,5ml Ampicillin und 10ml 1M Glukose versetzt wurden, aufgeteilt und bis zu einer optischen Dichte (OD)₆₀₀ zwischen 0,3 und 0,5 bei 37°C und 200rpm inkubiert. Zur Induktion der Proteinexpression wurde pro Kolben 250µl einer 1M IPTG-Lösung zugegeben und weitere 2 Stunden bei 37°C und 200rpm inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 30 Minuten bei 4°C mit 2400xg zentrifugiert und die Pellets in 20ml Ultraschall Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde 7x30 Sekunden mit Ultraschallwellen auf Eiswasser behandelt, um die Bakterienzellwände zu zerstören. Anschließend wurde die Suspension 25 Minuten bei 4°C mit 16.000xg zentrifugiert und die Pellets in 20ml Puffer A resuspendiert. Danach wurde die Suspension zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nochmals 30 Minuten bei 4°C mit 16.000xg zentrifugiert. Das Bakterienlysat wurde mit gereinigter Ni-NTA Agarose über Nacht bei 4°C gemischt und nacheinander mit Puffer A, Puffer B1, Puffer B2 und Puffer E1 über eine Biorad-Säule aufgereinigt. Puffer E2 wurde als letztes für die Elution des Proteins zugegeben. Die ersten 15ml wurden als Fraktion 1, die folgenden 10ml wurden einzeln in 1ml Fraktionen als Fraktionen 2-11 und die darauffolgenden 15ml wurden als Fraktion 12 in mehreren Röhrcchen aufgefangen. Mit Hilfe eines 12%igen SDS-Gels, welches mit Coomassie gefärbt und über Nacht entfärbt wurde, wurde der Proteingehalt abgeschätzt. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden gepoolt und in einen Dialyseschlauch überführt und über Nacht gegen 5l Dialysepuffer umgepuffert. Anschließend wurde der Inhalt des Dialyseschlauchs durch einen Spritzenfilter Filtropur S mit einer Porengröße von 0,2µm filtriert und anschließend der Proteingehalt im NanoDrop und der Gehalt an biologisch aktivem Typ I IFN im CEC-32#511 IFN-α Reporterassay bestimmt.

4.5. Endotoxin Messung mit dem Limulus Amebocyte Lysate

Biotest

Der Limulus amebocyte lysate (LAL) Biotest dient der quantitativen Bestimmung von Endotoxin gram negativer Bakterien. Der Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* besitzt ein Gerinnungsprotein, welches im Beisein von Endotoxin enzymatisch aktiviert wird. Im LAL Biotest katalysiert dieses aktive Gerinnungsenzym die Spaltung von einem farblosem Substrat zu gelbem p-Nitroanilin (pNA). Die Menge an gespaltenem pNA kann bei einer Wellenlänge

von 405-410nm photometrisch gemessen werden. Sie ist proportional zur Menge an enthaltenem Endotoxin.

Material:

Limulus ameocyte lysate Kit QCL-1000²⁹

Endotoxin freie Plastikwaren

Endotoxin freies H₂O

Durchführung:

Bei diesem Test ist unbedingt darauf zu achten, dass endotoxinfreie Materialien verwendet werden und möglichst Endotoxin kontaminationsfrei gearbeitet wird. Der pH-Wert der zu messenden Proben sollte zwischen 6 und 8 liegen. Nötigenfalls war der pH-Wert mit Endotoxin freien Substanzen anzugleichen. Als Positivkontrolle diene ein standardisiertes Escherichia coli Endotoxin, welches in vier Verdünnungsstufen getestet wurde. Als Negativkontrolle diene endotoxinfreies Wasser. Die zu testenden Proben und die Kontrollen wurden nach Herstellerangaben mit LAL gemischt und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein farbloses chromogenisches Substrat hinzugefügt und die Mischung für 6 Minuten bei 37°C inkubiert. Nun wurde ein Stop-Reagenz hinzugefügt. Die Menge an enthaltendem Endotoxin wurde mit dem ELISA Reader³³ bei einer Wellenlänge von 405-410nm photometrisch bestimmt und mit Hilfe der Standardkurve der Positivkontrolle in EU/ml berechnet.

4.6. RNA-Präparation

4.6.1. RNA-Isolation

Alle RNA Isolationen wurden mit einer Guanidinisothiocyanant-Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt.

Material:

TpeqGold Trifast¹⁰

Lagerung bei 4°C

Chloroform ad analysis¹

Lagerung bei RT unter dem Abzug

Aqua bidest. (nukleasefrei)

Lagerung bei -20°C

Isopropanol¹

Lagerung bei RT unter dem Abzug

70% Ethanol

70ml Ethanol absolut¹
Lagerung bei RT unter dem Abzug
30ml Aqua bidest. (nukleasefrei)

10%ige SDS-Lösung¹
Lagerung bei RT

Durchführung:

Für sämtliche Arbeiten wurde RNase freies Einwegmaterial und Handschuhe verwendet. Vor Arbeitsbeginn wurden Arbeitsflächen und Arbeitsgeräte mit 10% SDS-Lösung behandelt.

Bis zu 100mg Organgewebe wurde in 1ml gekühltem Trizol aufgenommen. Das Gewebe wurde mit einem PreCellys Homogenisator¹⁰ aufgeschlossen. Dafür wurden die Proben 10 Sekunden bei 5.000rpm homogenisiert. Sofern das Gewebe durch einmalige Homogenisierung nicht ausreichend aufgeschlossen werden konnte, wurde nach einer zweiminütigen Pause, in der die Probe gekühlt wurde, ein weiteres Homogenisierungsintervall durchgeführt. Anschließend wurden jeder Probe 200µl Chloroform zugegeben und die Mischung 30 Sekunden stark geschüttelt. Anschließend wurde die Probe fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im folgenden Zentrifugationsschritt (12.000xg bei 6°C für 15 Minuten) trennte sich die Suspension in drei Phasen: eine milchig-rosa Phase mit organischem Material, eine weiße Interphase mit DNA und eine wässrige Phase mit RNA. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein 500µl Isopropanol enthaltendes Eppendorf-Cup überführt und durch Schwenken gemischt. Die Probe wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit kam es zur Ausfällung der RNA. Anschließend wurde die Probe 10 Minuten bei 6°C mit 12000xg zentrifugiert. Es bildete sich ein RNA-Pellet am Boden. Von diesem RNA-Pellet wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Nun wurde das Pellet in 70%igem Ethanol gewaschen und erneut fünf Minuten bei 6°C mit 7.600xg zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das RNA-Pellet maximal 30 Minuten bei Raumtemperatur unter der PCR-Arbeitsstation¹⁰ getrocknet, bevor es in 100µl nukleasefreiem Aqua bidest. gelöst, wobei es sich 10 Minuten bei Raumtemperatur und 10 Minuten bei 58°C und 300rpm lösen konnte. Anschließend wurde die RNA-Konzentration und Reinheit mit einem NanoDrop¹⁰ bestimmt und die Konzentration der RNA auf 500-1000ng/ml mit nukleasefreiem Aqua bidest. eingestellt. Die RNA wurde kurzfristig auf -20°C und langfristig auf -80°C gelagert.

4.6.2. Reinheitsbestimmung der RNA im NanoDrop

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde mit einem NanoDrop¹⁰ bestimmt. Kontaminationen können durch Phenol oder durch in Trizol enthaltene chaotrope Salze verursacht werden, was zu einer Hemmung der c-DNA Synthese oder der Bindungskapazität eines Fluoreszenzfarbstoffes führen kann. Im NanoDrop wurde die Absorption der RNA bei 230nm bis 280nm gemessen. Reine RNA absorbiert maximal bei 260nm, während mit Guanidinisothiocyanat verunreinigte RNA bei 230nm und mit Phenol verunreinigte RNA bei 270nm absorbiert. Mit Hilfe des NanoDrops werden die Absorptionsverhältnisse von 260nm zu 230nm (260/230) und von 260nm zu 280nm(260/280) bestimmt. Für die weiter verarbeitete RNA wurden Grenzwerte von mindestens 1,9 im 260/280 Verhältnis und von mindestens 2,0 im 260/230 Verhältnis vorausgesetzt.

4.6.3. Bestimmung der RNA Integrität im Agilent 2100 BioanalyzerTM

Material:

RNA 6000 Nano-Kit

Durchführung:

Um die Qualität der isolierten RNA zu bestimmen wurde diese im Agilent 2100 Bioanalyzer³⁰ analysiert. Der Agilent 2100 Bioanalyzer³⁰ ermöglicht es, die Intaktheit der RNA zu bestimmen und Schädigungen der RNA durch Nukleasen, Scherkräfte, Hitze und Verunreinigungen mit DNA zu ermitteln. Hierfür bedient er sich einer chip-basierten Kapillar-Gelelektrophorese. Dabei werden die RNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt und in einem Elektroferogramm dargestellt. Aus den analysierten Werten, wie dem Verhältnis des 18s zum 28s rRNA Peaks, der 5s rRNA und der Grundlinie des Elektroferogramms, errechnet die Software des Agilent 2100 Bioanalyzer „Agilent 2100 Expert“ die Integrität der RNA (RIN). Diese reicht von 1, was einer vollständig degradierten RNA entspricht, bis 10, was einer vollständig intakten RNA entspricht.

Die Proben der isolierten RNA wurden nach Herstellerangaben aufgetragen und analysiert. Für weiter verarbeitete RNA wurde eine RIN von mindestens 7,6 vorausgesetzt.

4.7. cDNA Synthese

Die isolierte RNA wurde in eine komplementäre 'copy' DNA (cDNA) umgeschrieben. Dafür wurde Reverse Transkriptase und Random Hexamer Primer verwendet. Random Hexamer Primer bestehen aus einer Mischung aus allen möglichen Kombinationen von Adenin,

Thymin, Guanin und Cytosin.

Vor der c-DNA Synthese wurde ein DNase Verdau durchgeführt, der Verunreinigungen mit genomischer DNA vernichtet. Alle Arbeitsflächen und Arbeitsgeräte wurden vor Beginn der Arbeit mit 10%iger SDS Lösung gereinigt. Die Arbeit wurde unter einer PCR Arbeitsstation¹⁰ durchgeführt, die zuvor durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht dekontaminiert wurde. Je Probe wurde 400ng Gesamt-RNA streng nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Die umgeschriebene cDNA konnte als Matritze in der qRT-PCR eingesetzt werden. Nach dem Verdau der genomischen DNA wurde die verbleibende RNA dazu genutzt von einer einzelsträngigen RNA einen RNA-DNA-Hybridstrang mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase zu synthetisieren.

4.7.1. DNase Verdau

Material:

RNA Proben

Lagerung bei -80°C

DNase I, RNase free¹² (1U/μl)

Lagerung bei -20°C

10x Reaktionspuffer mit MgCl¹²

Lagerung bei -20°C

Aqua bidest. (nukleasefrei)

Lagerung bei -20°C

25mM EDTA Lösung¹²

Lagerung bei -20°C

Durchführung:

Ansatz für einen DNase Verdau

RNA	1 μg
10x Reaktionspuffer mit MgCl	1 μl
DNase	1 μl (1U/μl)
Aqua bidest. (nukleasefrei)	ad 10 μl

30 Minuten Inkubation bei 37°C

25mM EDTA	1 μl
-----------	------

10 Minuten Inkubation bei 65°C

4.7.2. cDNA Synthese

Material:

DNase verdaute RNA

GoScript™ Reverse Transcription System³
Lagerung bei -20°C

Aqua bidest. (nukleasefrei)
Lagerung bei -20°C

Durchführung:

DNase verdaute RNA	4,4µl
Random Hexamer Primer (100pmol)	1µl
Aqua bidest. (nukleasefrei)	4,6µl

5 Minuten Inkubation bei 70°C

5 Minuten Inkubation auf Eis

Aqua bidest. (nukleasefrei)	1,5µl
GOScript 5x Reaktionspuffer	4µl
MgCl (25mM)	2µl
PCR Nukleotid Mix (0,5mM)	1µl
RNasin Ribonuklease Hemmer	0,5µl
GOScript Reverse Transkriptase	1µl

5 Minuten Inkubation bei 25°C, 60 Minuten Inkubation bei 42°C und 15 Minuten Inkubation bei 70°C

Im Anschluss wurden die Proben bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.8. Quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR dient dazu, die Menge RNA eines bestimmten Gens in einer Ausgangsprobe quantitativ zu bestimmen. Sie beruht auf dem Prinzip der konventionellen Polymerase Kettenreaktion. Dabei wird ein fluoreszierender Farbstoff (*SYBR Green*) in die DNA-Stränge eingebaut. Die Fluoreszenz Intensität wird nach jedem PCR-Zyklus ermittelt und nimmt

proportional mit der Menge an PCR-Produkt zu, so dass anhand der Stärke der Fluoreszenz die relative Menge an DNA eines bestimmten Gens in der Probe ermittelt werden kann.

Material:

GoTaq q-PCR Mater Mix³
Lagerung bei -20°C

Aqua bidest. (nukleasefrei)
Lagerung bei -20°C

qPCR Primer (5pmol/µl)¹⁴
Lagerung bei -20°C

Verwendete Primer:

Die in der qRT-PCR eingesetzten Primer wurden nach einer einheitlichen *Annealing*-Temperatur von 59°C und einer Amplikongröße von 80 bis 150 Nukleotiden gewählt. Sie weisen eine Länge von etwa 20 Nukleotiden auf und bilden weder Selbst- noch Kreuz-Dimere und keine Sekundärstrukturen. Für jedes Primerpaar wurde die Bindungseffizienz in einer Standardkurve bestimmt. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg. Die Spezifität der Primerpaare wurde durch Sequenzierung des Amplifikats überprüft (Firma GATC, Konstanz).

Tabelle 4 **Verwendete qRT-PCR Primer**

Primer	Primersequenz sense	Primersequenz antisense
18s rRNA	CATGTCTAAGTACACACGGGCGGTA	GGCGCTCGTCGGCATGTATTA
CD40	CACCTTCTCCAATGTATCTTCCAA	TCCCTTTCACCTTCACCACAA
IL6	GCTTCGACGAGGAGAAATGC	GCCAGGTGCTTTGTGCTGTA
Mx	GCGGACAAGCCATAGAACAAG	GGCACCCCAAAAACCTCCTACA
PKR	GGAAGTAGACATTTATGCGCTGG	CATCCTGCCATACCTTGTTTTTCT
TFRC	GGCGGGCCTTCAGTCAA	ATCGGCTCGACGCTGAAC
TLR5	ACTGCTGGAGGATTTGTTCTTGTT	GGTCCAAGACACGAAGATTTGG
TLR21	GACCGACCTCTATCACAACCTCCTT	AGGACGGAGACACGGTTGTT

Durchführung qRT-PCR:

Alle Arbeitsflächen und Arbeitsgeräte wurden vor Beginn der Arbeit mit 10%iger SDS Lösung gereinigt. Die Arbeit wurde unter einer PCR Arbeitsstation¹⁰ durchgeführt, die zuvor durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht dekontaminiert wurde. Jeder Ansatz wurde als echtes Duplikat pipettiert.

Aus den folgenden Reagenzien wurde ein Mastermix pipettiert:

Primer sense	1,5µl
Primer antisense	1,5µl
Aqua bidest. (nukleasefrei)	8,25µl
GoTaq Mastermix	12,5µl
100xCXR Reference Dye	0,25µl

Von diesem Mastermix wurden 24µl in eine 96-Loch-PCR-Platte²⁶ pipettiert und jeweils 1µl cDNA zugegeben. Die PCR-Ansätze wurden vorsichtig gemischt und mit einer durchsichtigen, selbstklebenden Folie abgedichtet. Die Platte wurde kurz zentrifugiert um Luftblasen zu entfernen.

Die qRT-PCR wurde nach folgendem Temperaturprotokoll durchgeführt:

Phase	Funktion	Temperatur	Wiederholungen	Zeit
Initiale Aktivierungsphase		95°C	1 mal	2 Minuten
Amplifikationsphase	Denaturierung	95°C	40 mal	15 Sekunden
	Annealing	59°C		30 Sekunden
	Extension	72°C		30 Sekunden
Schmelzkurve		95°C	1 mal	15 Sekunden
		57°C		30 Sekunden
		95°C		15 Sekunden

Auswertung:

Um das Ergebnis einer qRT-PCR vergleichbar zu machen, wurde der CT-Wert (*threshold cycle*) in der exponentiellen Phase ermittelt. Da die Proben in Duplikaten aufgetragen wurden, wurde ein Mittelwert der CT-Werte errechnet und auf den Mittelwert des CT-Wertes des *Housekeeping*-Gens (18s rRNA) normalisiert. Durch Subtraktion des CT-Wertes der 18s rRNA von dem CT-Wert der Probe ergab sich der Δ CT. Nun wurde der Δ CT von der maximalen Anzahl der Amplifikationszyklen abgezogen, $40-\Delta$ CT, um einen zur Expression direkt proportionalen Wert zu erhalten. Um mehrere Gruppen, beispielsweise die Gruppen „Kontrolle“ und „Infiziert“ miteinander vergleichen, wurde der Δ CT einer Gruppe vom Δ CT einer anderen Gruppe abgezogen. Dies ergab den $\Delta\Delta$ CT-Wert. Dadurch erhielt man die relative Expressionsänderung zwischen „Kontrolle“ und „Infiziert“. Um die n-fache Expression E eines Gens der Gruppe „Infiziert“ im Vergleich zu der Gruppe „Kontrolle“ zu ermitteln, wurde die Formel $E=2^{-\Delta\Delta CT}$ verwendet.

4.9. Mikroarray

Durch die Mikroarray Technologie ist es möglich, mehrere tausend Gene gleichzeitig zu untersuchen. Es gibt zwei Arten der DNA Mikroarrays: „spotted Microarrays“ und „Oligonucleotide Microarrays“. Der Unterschied liegt darin, dass sich beim „spotted Microarray“ cDNA oder PCR Produkte als Sonden auf der Trägerplatte befinden, während beim „Oligonucleotide Microarray“ synthetisch hergestellte Oligonukleotide als Sonden dienen. In beiden Arten dienen die Sonden als komplementäres Gegenstück für bestimmte fluoreszierende cRNA in zu untersuchenden Proben.

Für die in dieser Dissertation beschriebene Mikroarray Analysen wurde der Agilent Oligonukleotid Mikroarray: „Agilent 4x44K chicken-Genom“ Katalog- Mikroarray verwendet. Dieser ermöglicht die gleichzeitige Analyse von vier Mikroarrays auf einem Glasträger mit jeweils 44.000 Spots. Jeder Spot besteht aus 60 Nukleotiden mit bestimmter Sequenz. Auf dem „Agilent 4x44K chicken-Genom“ Katalog- Mikroarray ist ein Querschnitt aller bekannten Hühnergene zu finden. Zusätzlich bietet Agilent die Möglichkeit weitere Gene auf dem Mikroarray analysieren zu lassen. Deren Sequenz kann man über ein Internetprogramm „eArray“ in eine passende, für das gewünschte Gen spezifische, Oligonukleotidsequenz umrechnen lassen. Dadurch konnten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mikroarrays zusätzlich zu den bereits von Agilent gespotteten Genen 1.699 weitere Gene analysiert werden, die speziell Funktionen im Bereich des Immunsystems erfüllen. Mängel in der Annotation wurden im Rahmen von früheren Dissertationen über eine eigens für das Projekt AvImmun entwickelte Software „AvI-Blast“ und über im Internet verfügbare *ID-Converter* wie DAVID, Babelomics und g:Profiler stark verbessert. Durch diese Arbeiten konnten den 44.000 Spots auf dem Mikroarray 24.515 Proben zugeordnet werden. Da einige Gene wiederholt als Spots auf den Mikroarray geladen wurden, entspricht dies 13.353 Genen, die über den Mikroarray angesprochen werden können. Eine Liste mit den annotierten Genen ist auf der beiliegenden CD in Mappe 1, Tabelle 28 zu finden.

4.9.1. cRNA Synthese

Material:

One-Color Spike-In-Kit¹¹

Quick Amp Labeling Kit, one color¹¹

RNeasy Mini Kit¹¹

Durchführung:

Den RNA-Proben wurden sogenannte *Spike-In-RNAs* zugesetzt. Diese ermöglichen die Positivkontrolle des gesamten Arbeitsablaufs. *Spike-In-RNAs* bestehen aus zehn definierten Transkripten, die nur minimal selbst- und kreuzhybridisieren. Bei der Hybridisierung binden die *Spike-In-RNAs* an *Spike-In-Proben*. Diese *Spike-In-Proben* weisen keine komplementäre Sequenz zu biologischen Replikaten auf.

Bei der cDNA Synthese wurden 500ng RNS streng nach Herstellerangaben mit einer rekombinanten Reversen Transkriptase 1:1 in cDNA umgeschrieben. Die eingesetzten T7-Promotor-Primer banden an poly-Adenosin RNA Abschnitte. Dadurch wurde nur der mRNA-Anteil in cDNA umgeschrieben. Außerdem enthielten diese Primer auch eine Promotorsequenz für die T7-RNA Polymerase, die in der nachfolgenden cRNA-Synthese eingesetzt wurde.

Die Silikatmembran basierte Aufreinigung der cRNA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, um Rückstände aus den bisher durchgeführten Reaktionen aus den Proben zu entfernen. Die Proben wurden im NanoDrop¹⁰ gemessen um die Gesamt-cRNA Ausbeute und die spezifische Cy3-Aktivität zu bestimmen. Dafür wurde das Verhältnis der Cy3 Konzentration (pmol/μl) zur Menge der Gesamt cRNA (μg) berechnet. Für die weitere Verwendung musste eine cRNA Gesamtmenge von mindestens 1,65μg und eine spezifische Cy3 Aktivität von mehr als 9,0pmol Cy3 pro μg RNA vorliegen.

4.9.2. Fragmentierung der cRNA**Material:**

Gene Expression Hybridisation Kit¹¹

Durchführung:

Um die Hybridisierungskinetik zu optimieren, mussten die cRNA Stränge fragmentiert werden. Dafür wurde zu 1,65μg cRNA 2,2μl 25xFraktionspuffer zugegeben. Diese Mischung wurde exakt 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Dann wurde Hybridisierungspuffer zugefügt und dadurch die Fragmentation gestoppt. Anschließend wurden die Proben in ein spezielles Medium für die Hybridisierung überführt.

4.9.3. Hybridisierung des Mikroarrays

Material:

Gasketslides¹¹

Durchführung:

Bei der Hybridisierung des Mikroarrays musste streng auf Sauberkeit geachtet werden, da die Mikroarrays äußerst empfindlich sind. Sie durften nur mit puderfreien Handschuhen seitlich berührt werden und die Luftexposition des Mikroarrays musste auf ein Minimum reduziert werden. Gleichzeitig musste rasch und präzise gearbeitet werden.

Durch das gewählte Mikroarrayformat 4x44K konnten vier Mikroarrays auf ein Gasketslide aufgetragen werden. Dafür wurden pro Mikroarray 100µl Hybridisierungsflüssigkeit auf einen mit einem Gummiring abgedichteten Teil des Gasketslides aufgetragen. Dadurch entstand der so genannte Mikroarray-Gasketslide Sandwich. Dabei durfte die Flüssigkeit keinen Kontakt zu dem Gummiring haben. Nachdem dies für alle vier Mikroarrays auf dem Gasketslide durchgeführt wurde, wurde das Microarrayslide so aufgelegt, dass zwischen den beiden Glasplatten vier durch die Gummiringe abgedichtete Räume entstanden. Jede Mikroarrayfläche musste vollkommen mit Flüssigkeit benetzt sein und eine mobile Luftblase musste in dem abgedichteten Raum zu sehen sein. Die Mikroarrays wurden für 17 Stunden bei 65°C und 10rpm in einem Hybridisierungsofen inkubiert. Die einzelne mobile Luftblase ermöglichte eine kontinuierliche Durchmischung der Hybridisierungsflüssigkeit und sorgte dafür, dass jeder Teil des Mikroarrays immer wieder mit der Flüssigkeit in Kontakt kam.

4.9.4. Waschen und Scan des Mikroarrays

Material:

Gene Expression Wash Buffer 1¹¹

Gene Expression Wash Buffer 2¹¹

Triton X-102¹¹

Durchführung:

Nach der Hybridisierung wurden die Mikroarray-Gasketslide-Sandwiches in einem Bad mit 500ml Waschpuffer 1 gewaschen und dabei wurde der Mikroarray vom Gasketslide mit Hilfe einer Pinzette getrennt. Anschließend wurden die Mikroarrays erneut in ein Bad mit Waschpuffer 1 gestellt und dort gesammelt, bis alle bearbeiteten Microarrayslides in Waschpuffer 1 standen. Daraufhin kamen die Microarrayslides für 1 Minute in Waschpuffer 2 (31°C) und wurden langsam herausgezogen, damit die Flüssigkeit gleichmäßig abfließen

konnte. Diese Waschschriffe dienten der Entfernung nicht gebundener cRNA Fragmente. Schließlich wurden die Mikroarray in einem Agilent G2505C Scanner¹¹ bei einer Auflösung von 3µm gescannt.

4.9.5. Auswertung des Mikroarrays

4.9.5.1 Agilent Feature Extraction Software Version 10.5.1.1

Die *Agilent Feature Extraction Software* diente zum Bearbeiten der Bilddatei des Scans. Dadurch konnten die Daten weiter analysiert werden. Jedem *Feature* bzw. Spot auf dem Mikroarray wurde über ein ausgelegtes Raster eine Probe-ID zugeordnet. Außerdem rechnete die Software die Signalintensität jedes *Features* in einen Zahlenwert um. Zeigte ein *Feature* Abnormitäten wurde es von der Software erkannt und entfernt. Ein Qualitätsreport wurde anhand der mitanalyierten *Spike-In-Proben* erstellt. Außerdem wurde von der Software über die *Spike-In-Proben* der lineare Bereich der Quantifikation, die Nachweisgrenze und der Punkt der Sättigung bestimmt.

4.9.5.2 Bioconductor „R“ Version 2.9.1

Mit dem Programm „R“ wurden die Mikroarraydaten normalisiert und statistisch ausgewertet. Erweiterungswerkzeuge ermöglichten die spezifische Analyse von Daten aus Mikroarray Experimenten.

Analysiert wurden die Fluoreszenz Intensitäts-Werte (*gProcessSignal*) aller Mikroarrays. Diese wurden als tabstop getrennte Textdatei dem Programm zur Analyse zur Verfügung gestellt. Die Normalisierung wurde als VSN (*Variance Stabilization and Normalization*) durchgeführt. Dabei wurden die Daten derart transformiert, dass die Varianz der Stärke der Signalintensität der Mikroarraydaten möglichst konstant war. Der natürliche Logarithmus der Mikroarraydaten wurde durch VSN errechnet. Das *Geneplotter* Paket reduzierte die normalisierten Arraydaten zur graphischen Darstellung in einer *Heat Map*.

4.9.5.3 Significance Analysis of Microarrays Version 3.08 (SAM)

SAM dient der statistischen Analyse von Mikroarrayexperimenten. Mit SAM können signifikant regulierte Gene aus der Masse von Mikroarraydatensätzen identifiziert werden. Dafür erstellt SAM wiederholt Permutationen der Mikroarraydaten und identifiziert Spots die in einer Gruppe im Vergleich zu einer anderen Gruppe signifikant reguliert sind. Für die Analyse muss ein Exceltabellenblatt erstellt werden. Auf diesem sollte die Probe-ID der einzelnen Spots und die zugehörigen normalisierten *gProcessSignal* Werte der einzelnen Mikroarrayexperimente gelistet sein. Um ausschließlich signifikant regulierte Gene zu untersuchen, wurde die *False Discovery Rate* (FDR) auf 5% festgelegt. Für die statistische

Analyse in der vorliegenden Arbeit wurden zwei Analysemethoden durchgeführt: „Two class, unpaired“ und „Multiclass“. Bei den Arbeiten mit Newcastle Disease Virus wurde die Analysemethode „Two class, unpaired“ angewandt. Dabei wurden zwei Gruppen miteinander verglichen („Two class“), die jeweils mehrere biologische Replikate umfassten („unpaired“). Diese Analyse wurde im Lungengewebe für die Gruppen „infiziert verändert“ und „nicht infiziert“, „infiziert verändert“ und „infiziert unverändert“, „infiziert unverändert“ und „nicht infiziert“ durchgeführt und im Milzgewebe für die Gruppen „infiziert“ und „nicht infiziert“. Bei dem Mikroarray Experiment nach Typ I IFN Injektion wurde die „Multiclass“ Analyse angewandt. Dabei werden signifikant regulierte Proben in mehreren Gruppen gesucht. In dem erwähnten Experiment war dies der Gruppenvergleich zwischen „Kontrolle“ und den drei Injektionszeitpunkten „IFN(3h)“, „IFN(6h)“ und „IFN(9h)“.

4.9.5.4 Berechnung der Expressionsänderung (fold change)

Mit dem *fold change* (FC) können Expressionsänderungen zwischen zwei Gruppen errechnet werden. Dafür wurden in einer Excel Tabelle die Probe-IDs der einzelnen Spots und die zugehörigen normalisierten *gProcessSignal* Werte der einzelnen Mikroarrayexperiment gelistet. Der FC wurde mit der Formel $FC = \frac{\text{Mittelwert(Gruppe2)}}{\text{Mittelwert(Gruppe1)}}$ errechnet. Werte über 1 bedeuten, dass ein Spot in Gruppe 2 eine höhere Expression als in Gruppe 1 hat. Werte zwischen 0 und 1 bedeuten, dass ein Spot in Gruppe 2 eine weniger starke Expression als in Gruppe 1 hat. Ein Wert von 1 bedeutet, dass es keinen Expressionsunterschied zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 gibt. Zur vereinfachten Darstellung und besseren Interpretationsmöglichkeit der herunterregulierten FC-Werte wurden diese in negative Zahlenwerte umgerechnet. Dafür wurde folgende Excel Funktion durchgeführt: $=\text{WENN}(FC < 1; -1/FC; FC)$. So ergab sich aus einem FC von 0,5 vor der Umrechnung ein Wert von -2, also eine 2fache Herunter-Regulation des Spots.

4.9.5.5 Microsoft Office Access Datenbanksystem

Um Daten aus unterschiedlichen Analysen miteinander zu vergleichen wurden Microsoft Access Analysen verwendet. Dafür wurde die Versionen Microsoft Office Access 2003 und Microsoft Office Access 2010 verwendet.

4.9.5.6 Pathway Express

Die Datensätze mit signifikant regulierten *Spots* aus den Mikroarray Experimenten wurden mit dem online Programm „Pathway Express“ (*Intelligent Systems and Bioinformatic Laboratory*) analysiert. Mit diesem Programm können für die Analyse biologisch relevante Signalwege identifiziert werden. Dabei bedient sich das Programm der KEGG Datenbank (*Kyoto*

Encyclopedia of Genes and Genomes). Für die Analyse mit „Pathway Express“ müssen eine Eingabedatei und eine Referenzdatei als Textdateien erstellt werden. Die Eingabedatei enthält die Gensymbole der signifikant regulierten Spots und die entsprechenden FCs. Die Referenzdatei enthält alle orthologen Gensymbole, die auf dem Mikroarray zu finden sind. Als Ergebnis der Analyse erhält man ein Datenblatt mit den identifizierten Signalwegen und einigen weiteren Parametern. Außerdem erhält man eine Graphikdatei mit dem entsprechenden Signalweg. Zu den Parametern gehört der *Impact* Faktor, der *p-value* des Signalwegs und der *corrected gamma p-value*. Der *Impact* Faktor repräsentiert die Eindeutigkeit der enthaltenen Gene und deren Lage im Signalweg. Der *p-value* die Signifikanz des Signalwegs. Der *corrected gamma p-value* wird aus dem *Impact* Faktor, dem FC und dem *p-value* errechnet. Er spiegelt die biologische Relevanz des Signalwegs wider. Als Grenzwert für die biologische Relevanz des Signalwegs wurde ein *corrected gamma p-value* von kleiner als 0,5 festgelegt.

4.9.5.7 Multi Experiment Viewer Version 4.8.1

Mit der Software MEV kann man mehr als zwei Gruppen eines Experiments gleichzeitig auswerten. Dadurch kann man beispielsweise das Expressionsverhalten eines bestimmten Genes über verschiedene Analysezeitpunkte darstellen. Es besteht die Möglichkeit, alle signifikant regulierte Spots mit den entsprechenden FC zu analysieren, einzelne interessante Gruppen oder sogar einzelne Gene. Dafür wurden die gewünschten Probe-IDs und die entsprechenden normalisierten *gProcessSignal* Werte in eine Exceltabelle übertragen. In MeV kann man die hochgeladenen Datensätze auf unterschiedliche Weise analysieren. Zum einen kann man eine hierarchische Cluster-Analyse (*Hierarchical Clustering HCL, sample tree*) durchführen. Darin sieht man, wie ähnlich die analysierten Gruppen untereinander sind. Durch die baumähnliche Darstellung wird die Beziehung der unterschiedlichen Gruppen widergespiegelt. Die *Self Organizing Tree Algorithm* (SOTA) Analyse teilt Gene hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens in den analysierten Gruppen ein. Für alle Analysen wurde die Metrik: *Pearson correlation* und *Iteration*: 100 angewandt. #

4.9.5.8 Ingenuity

Ingenuity (www.ingenuity.com/) ist ein kommerzielles Internet Programm mit dem man hochgeladene Datensätze auf unterschiedlichste Weise analysieren kann. Die Eingabedatei sollte Gensymbol oder Probe-IDs und die entsprechenden FCs der zu analysierenden Experimente beinhalten. Ingenuity analysiert nun den Datensatz hinsichtlich der in der Analyse relevanten biologischen Funktionen, Signalwege, beteiligter Transkriptionsfaktoren und Netzwerke. Außerdem stellt Ingenuity die genannten Analysen graphisch dar. Für die Analysen greift Ingenuity auf zahlreiche Datenbanken und Veröffentlichungen zurück. Deren

Ergebnisse analysiert Ingenuity und setzt sie in Verhältnisse zueinander, um biologisch relevante Zusammenhänge zu verdeutlichen.

4.9.5.9 PANTHER-Gene List Analysis

PANTHER ist ein im Internet frei verfügbares Programm (www.pantherdb.org/). Es analysiert hochgeladene Listen von Gensymbolen hinsichtlich genontologischer Kriterien. Die Ergebnisse sind als Kreisdiagramm oder Balkendiagramm darstellbar und beinhalten die prozentuale Aufteilung der beteiligten genontologischen Gruppen der hochgeladenen Genliste. Des Weiteren erhält man Listen, mit Informationen über die ontologischen Gruppen, in die die hochgeladenen Gene eingeteilt werden.

4.9.5.10 INTERFEROME Datenbank und ISG-Database

Die „INTERFEROME“ Datenbank und die „ISG-Database“ sind im Internet frei verfügbare Datenbanken zur Identifizierung von IRGs. Die INTERFEROME Datenbank umfasst eine umfangreiche Liste von über 2.000 IRGs aus zahlreichen Mikroarray Experimenten, in welchen das Transkriptom von Gewebe oder Zelllinien aus Maus oder Menschen nach IFN-Applikation untersucht wurde. Des Weiteren gibt INTERFEROME einen Überblick darüber, durch welche IFNs die Transkription bestimmter Gene ausgelöst wird. Um zu untersuchen ob in einem Datensatz in INTERFEROME gelistete IRGs enthalten sind, mussten die entsprechenden Gensymbole in humane oder murine *Ensembl* Identitäten umgeformt werden. Hierfür bot INTERFEROME eine spezielle Funktion. Mit dieser Funktion wurden im Rahmen dieser Dissertation, die auf dem Mikroarray annotierten Gensymbole in humane bzw. murine *Ensembl* Identitäten umgeformt und diese dann in INTERFEROME zur Analyse hineingeladen.

Die „ISG-Database“ umfasst über 300 IFN-stimulierte Gene (ISGs). „ISG-Database“ teilt ISGs hinsichtlich ihrer Funktion in zahlreiche Gruppen, wie beispielsweise Adhäsion, Immunmodulation, Chemokine und antivirale ISGs. Diese Gruppen wurden aufgerufen und die enthaltenen Gene mit den auf dem Mikroarray annotierten Gensymbolen abgeglichen. Neben anderen Publikationen über IRGs wurden diese beiden Datenbanken zur Identifizierung von möglichen IRGs im Hühnergenom verwendet.

4.10. Durchflusszytometrische Untersuchungen

Material:

Collagenase Verdau:

Liberase TM³⁶ 5mg

Gelöst in 13ml Aqua bidest.

Im Kühlschrank für 30 Minuten stehen lassen

In 100µl Aliquots bei -20°C einfrieren (0,2 Wunsch Units)

Puffer für die Enzymreaktion

0,0203g MgCl₂¹ (1mM)

0,0011g CaCl₂¹ (0,1mM)

ad 100ml PBS

bei RT lagern

PBS pH 7,2

PBS pH 7,2 mit 1% BSA⁹ (bovines Serum Albumin)

Biocoll Separating Solution²

Zellen als klumpenfreie Einzelzellsuspension

Primäre und sekundäre Antikörper verdünnt in Fluo-Puffer

Fluo-Puffer

5g BSA⁹ (bovines Serum Albumin)

50mg Natrium-Azid (NaN₃)¹

Ad 500ml PBS pH7,2; Lagerung bei 4°C

Ethylendiamintetraacetat¹ (EDTA)

7-Actinomycin-D (7-AAD)⁹

1mg 7-AAD in 50µl Methanol¹ lösen, ad 5ml PBS pH7,2; Lagerung in 1ml-Aliquots bei 20°C

Zell-Sieb (Cell Strainer) 100µm, gelb³⁸

Durchführung:

Die Lunge wurde mit der Schere in 6ml PBS und 1ml Puffer für die Enzymreaktion in einem 50ml Probenröhrchen möglichst stark zerkleinert und nach Zugabe von 600µl Liberase TM³⁶ 30Minuten bei 37°C in ein Schüttelinkubator³⁷ gestellt. Anschließend wurde das Präparat durch ein Sieb in ein 50ml Probenröhrchen homogenisiert, dieses auf 50ml mit PBS aufgefüllt um das Homogenat für 10Minuten auf Eis sedimentieren zu lassen. Der Überstand (etwa 45ml) wurde abgenommen, in ein weiteres 50ml Probenröhrchen überführt²⁶, und abzentrifugiert (10Minuten bei 4°C und 225xg). Das Zellpellet in 10ml PBS mit 1% BSA⁹ resuspendiert und auf 10ml einer Biocoll-Separations-Lösung geschichtet. Nach 12 Minuten Dichtezentrifugation bei RT mit 650xg wurde die Interphase mit einer Pipette abgenommen und mit PBS gewaschen und zentrifugiert (10Minuten bei 4°C und 350xg). Anschließend wurde das Zellpellet in 10ml Fluopuffer mit 0,1% EDTA¹ und über einen 100µm Falcon-Aufsatz filtriert. Die Zellen wurden gezählt und pro Färbung wurden 1x10⁶ Zellen eingesetzt. Diese wurden in Rundlochplatten mittels Zentrifugation in 96-Rundloch-

Platten pelletiert. Nach Resuspendieren in den jeweiligen Antikörper-Lösungen wurden die Zellen für je 20 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden 200µl Fluo-Puffer zugegeben, die 96-Lochplatten dann für 1 Minute bei 700xg und 4°C zentrifugiert und abschließend der Überstand durch rasches Abkippen gründlich vom Zellpellet entfernt (im Folgenden als Waschen bezeichnet). Am Ende einer Färbung wurden die Zellen in 200µl Fluo-Puffer resuspendiert und diese 200µl Zellsuspension in ein Messröhrchen überführt, in das zuvor 200µl Fluopuffer vorgelegt wurden. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen erfolgte mithilfe der Programme BD FACS-DIVA Version 3.0 und FlowJo7.6.1.

Eine Auflistung der eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper ist Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5 In der Durchflusszytometrie eingesetzte Antikörper

Gelistet sind die verwendeten Primärantikörper (A) und Sekundärantikörper (B)

A

Antigen	Klon	Isotyp		Fluorochrom	Konzentration/ Verdünnung	Hersteller/ Referenz
chCD45	16-6	IgG2a	P	FITC	1:50	39
chCD45	16-6	IgG2a	P	APC	1:1000	selbst
chB6 (Bu1)	AV20	IgG1	P	APC	1:1000	34
chB6 (Bu1)	AV20	IgG1	P	RPE	1:100	34
chCD3	CT3	igG1	P	FITC	1:50	34
chCD4	CT4	IgG1	P	RPE	1:500	35
chCD8a	CT8	IgG1	P	RPE	1:1000	35
chMHCII	anti-chIa (CIa)	IgM k	P	RPE	1:1000	35
chTCRγδ	TCR1	IgG1	P	FITC	1:300	34
chTCRαβ-1	TCR2	IgG1	P	FITC	1:200	34
chTCRαβ-2	TCR3	IgG1	P	FITC	1:500	34
chMz, chMQ	KUL01	IgG1	P	RPE	1:100	34
evtl. Integrin CD11C	8F2	IgG1	A	APC	1:500	selbst
Granulozyten	GRL1	IgG3	Z		1:10	32
Granulozyten	GRL2	IgG1	Z		1:20	32
chCD45	LT40	IgM	P		5µg/ml	[334]
CD56	4B5	IgG1			1:3	[335]
Thrombozyten, Makrophagen	K1	IgG2a	Z		1:3	[336]

Z = Zellkulturüberstand; P = gereinigter Antikörper

B

Antigen	Klon	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
muIgG3	Ziege-anti-Maus-IgG3	FITC	1:200	34
muIgG1	Ziege-anti-Maus-IgG1	RPE	1:30	34
muIgG2a	Ziege-anti-Maus-IgG2a	Alexa Fluor 647	1:2000	4
muIgM	Ziege-anti-Maus-IgM	FITC	1:200	34

4.10.1. Färbung mit direkt Fluorochrom-markierten Antikörpern

Bei Färbungen mit Direktkonjugaten wurden die Zellen in 40µl der Antikörper-Lösungen inkubiert, danach 1x gewaschen. Wurden Mehrfachfärbungen durchgeführt, so wurden die Antikörper gemeinsam in ihrer Endkonzentration angesetzt und 40µl der Mixtur zum Färben verwendet.

4.10.2. Indirekte Färbungen

Hierbei wurden nicht markierte Primärantikörper und nach einmaligem Waschen der Zellen Fluorochrom-markierte Sekundärantikörper eingesetzt. Von den Primärantikörpern wurden pro Färbung 40µl der Antikörper-Lösung eingesetzt. Verwendete man bei Mehrfachfärbungen gereinigte Primärantikörper, so wurden diese gemeinsam in Fluo-Puffer verdünnt. Bei Einsatz von zwei oder mehr Zellkulturüberständen wurden in Mehrfachfärbungen bei purem Einsatz jeweils 40µl von jedem Zellkulturüberstand zu den Zellen gegeben. Wurden Mehrfachfärbungen gleichzeitig sowohl mit aufgereinigten Primärantikörpern als auch Zellkulturüberständen durchgeführt, so wurden die gereinigten Primärantikörper in den Zellkulturüberständen verdünnt.

Von den Enverdünnungen der isotypspezifischen Sekundärantikörper wurden jeweils 40µl eingesetzt. Bei Mehrfachfärbungen wurden die benötigten Sekundärantikörper in einem einzigen Endverdünnungs-Ansatz in Fluo-Puffer angemischt.

Wurden bei Mehrfachfärbungen Direktkonjugate und unkonjugierte Antikörper eingesetzt, so wurden die Direktkonjugate stets mit den Sekundärantikörpern zugegeben.

4.10.3. Lebend/Tot-Färbung mit 7-AAD

Für eine Diskriminierung zwischen toten und lebenden Zellen wurde direkt vor der Messung 10µl 7-AAD-Lösung zu den im FACS-Röhrchen befindlichen 400µl Zellsuspension gegeben.

4.11. Histologie

4.11.1. Vorbereitung der Gewebeproben für die Histologie

Material

1,5%ige LowMelt Agarose¹⁷

Knopfkanüle

Faden

50ml Spritzen

Einbettkassetten für Paraffinhistologie¹⁵

10% Neutral gepufferte Formalinlösung (NBF)

Aufsteigende Alkoholreihe und Paraffinreihe

2x Ethanol 40%	je 12 Stunden
2x Ethanol 50%	je 12 Stunden
2x Ethanol 60%	je 12 Stunden
2x Ethanol 70%	je 12 Stunden
2x Ethanol ¹⁶ 100%	je 12 Stunden
2x Isopropanol ¹⁶	je 12 Stunden
2x Xylol ¹⁶	je 24 Stunden
Einmalige Verwendung bei RT	

1er Paraffin ¹⁷	für 24 Stunden
3er Paraffin ¹⁷	für 24 Stunden
6er Paraffin ¹⁷	für 24 Stunden
9er Paraffin ¹⁷	für 24 Stunden
Anwendung und Lagerung bei 65°C im Wärmeschrank	

Tissue Tek®¹⁸

Lagerung bei RT

Peel-Off-Einbettkassetten für Kryohistologie¹⁹

Flüssiger Stickstoff⁸

Aluminiumfolie²⁰

SuperFrost®Plus Objektträger¹⁸

Aceton¹

Lagerung bei RT, Verwendungstemperatur 4°C

Absteigende Alkoholreihe

Xylol ¹⁶ 1	für 10 Minuten
Xylol ¹⁶ 2	für 10 Minuten
Isopropanol ¹⁶ 1	20 mal getaucht
Isopropanol ¹⁶ 2	20 mal getaucht
Ethanol ¹⁶ 100%	20 mal getaucht
Ethanol ¹⁶ 70%	20 mal getaucht
Lagerung bei RT	

PBS

Lagerung bei RT

Durchführung:

Für die Kryohistologie der Lungen wurden die Tiere getötet und die Organe mit Ausnahme der Atmungsorgane entfernt. Die Trachea wurde frei präpariert und eröffnet. Eine Knopfkanüle wurde eingeführt und mit einem Bindfaden befestigt. Die Tiere wurden an den Ständern aufgehängt und die erwärmte 1,5%ige LowMeltAgarose mit einer 50ml Spritze über die Knopfkanüle in die Lunge injiziert. Sobald man den Flüssigkeitsspiegel in den Luftsäcken ansteigen sah, wurde die Trachea mit einem Faden verschlossen und die Knopfkanüle entfernt. Zum Druckausgleich wurden die abdominalen Luftsäcke eröffnet und die Tiere für etwa 2 Stunden in einen 4°C kalten Raum oder Kühlschrank gehängt. In dieser Zeit härtete die Agarose aus. Sobald die Agarose vollständig ausgehärtet war, wurden die Lungen herauspräpariert und die vorletzten und letzten Lungenscheiben der linken Lungen in Tissue Tek eingebettet. Anschließend wurden die Proben vorsichtig in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C mit Alufolie umwickelt gelagert.

Für die Paraffinhistologie wurden die vorletzte Lungenscheibe der rechten Lungen in Einbettkassetten für Paraffinhistologie gelegt und für 12 Stunden in NBF fixiert. Anschließend wurden die fixierten Präparate zweimal für 12 Stunden in PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Danach kamen die Proben für jeweils 24 Stunden in vier verschiedene Paraffine und wurden schließlich an einer Ausgießstation in Paraffinblöcke eingebettet. Diese wurden bei Raumtemperatur gelagert.

4.11.2. Anfertigung von Gewebeschnitten

Für die Kryohistologie wurden mit einem Kryotom (Kryostat HM500 OM³¹) 8µm dicke Gefrierschnitte von den Präparaten angefertigt. Für die Paraffinhistologie wurden mit einem Rotationsmikrotom³¹ 5µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte auf Superfrost® Plus Objektträger aufgetragen und entsprechend den Anforderungen (Kryohistologie bei Raumtemperatur für 1 Stunde; Paraffinhistologie bei 37°C für 48 Stunden) getrocknet.

4.11.3. Vorbereitung der Schnitte für die Färbung

Zum Fixieren der Gefrierschnitte wurden diese vor Beginn der Färbung für 2 Minuten mit eiskaltem Aceton behandelt, anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und zuletzt mit PBS für 15 Minuten gewässert.

Zum Fixieren der Paraffinschnitte wurden diese vor Beginn der Färbung mit der absteigenden Reihe der Alkohole entparaffiniert und zuletzt mit PBS für 15 Minuten gewässert.

4.11.4. Histologische Färbung mit Hämatoxylin-Eosin Lösung

Material:

Eosin-Lösung¹⁵

Lagerung bei Raumtemperatur

Mayer´s Hämatoxylin-Lösung¹⁵

Lagerung bei Raumtemperatur

Aufsteigende Alkoholreihe

Ethanol 70%

Ethanol¹⁶ 100%Isopropanol¹⁶ 1Isopropanol¹⁶ 2Xylol¹⁶ 1Xylol¹⁶ 2

Lagerung bei RT

Deckgläser¹⁵**Eukitt®Eindeckelmedium¹⁵**

Lagerung bei RT

Durchführung:

Entparaffinierte gewässerte Paraffinschnitte wurden für fünf Minuten in Mayer´s Hämatoxylin-Lösung gelegt. Anschließend wurden sie für fünf Minuten unter fließendem Wasser abgespült.

Nun wurden sie zwei Minuten in Eosin gefärbt. Es folgte die Behandlung der Schnitte mit der aufsteigenden Reihe der Alkohole. Zuletzt wurden die Schnitte mit Eukitt® Eindeckelmedium und Deckgläsern versehen.

4.11.5. Immunhistochemische Färbung

Material:

Feuchte Kammer**Parafilm®²⁰****PBS****30% H₂O₂¹**

Lagerung bei RT

Methanol¹⁶ 40%

Lagerung bei RT

Bovines Serumalbumin⁹ (BSA)**Magermilchpulver¹****Pferdeserum²¹**

Lagerung bei -20°C

Vectastain® ABC-Kit -PK4002²¹

Vector® DAB-Kit²¹

Aqua dest.

Mayer´s Hämatoxylin-Lösung¹⁵

Aufsteigende Alkoholreihe

Eukitt® Eindeckelmedium¹⁵

Deckgläser¹⁵

Tabelle 6 **Verwendete Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung**

Antikörper (Klonname)	Antigen	Zelltyp	Verdünnung	Referenz
α-Bu1 a+b	chB6.1, chB6.2	Hühner B-Lymphozyten	1:100	selbst
α-CD4 (2-6)	chCD4	Hühner T-Helfer Lymphozyten	1:2	selbst
α-CD8 (3-298)	chCD8	Zytotoxische Hühner T-Lymphozyten	1:50	selbst
α-CD45 (16-6)	chCD45	Leukozyten	1:400	selbst
GRL1	unbekannt	Granulozyten, aktivierte Thrombozyten	1:400	32
Kul01	unbekannt	myeloide Zellen	1:500	selbst
TCR1	chTCRγδ	γδ-T-Lymphozyten	1:20	selbst

Durchführung:

Für alle Inkubationsschritte wurde eine mit Aqua dest. befeuchtete Inkubationskammer verwendet. Gewässerte Gefrierschnitte wurden mit 0,3% Wasserstoffperoxid in 40%igem Methanol für 30 Minuten behandelt, um die endogene Peroxidaseaktivität zu blocken. Nun wurden die Schnitte drei Minuten unter fließendes Wasser gehalten. Anschließend wurden die Schnitte dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurden sie für eine Stunde mit Pferdeserum 1:40 in PBS mit 1% BSA verdünnt inkubiert. Dadurch wurden unspezifische Bindungen blockiert. Nach dieser Zeit wurde die Flüssigkeit abgekippt und der gewünschte Primärantikörper aufgetragen. Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 4 aufgelistet. Sie wurden zuvor im dort beschriebenen Verhältnis mit PBS verdünnt. Als Kontrollfärbung wurde auf einen Schnitt pro Gruppe nur PBS aufgetragen. Die Schnitte wurden mit dem gewünschten Antikörper oder PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Der gebundene Antikörper wurde mit Peroxidase markiert. Dafür wurde das Vectastain® ABC-Kit nach Anleitung des Herstellers verwendet. Zum Nachweis der Peroxidase Aktivität wurde das Vector®DAB-Kit verwendet. Anschließend folgte eine Zellkernfärbung. Dafür wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. getaucht, anschließend für 35 Sekunden in Mayer´s Hämatoxylin-Lösung gegeben und danach für fünf Minuten unter fließendes Wasser gehalten. Es folgte die Dehydratation der Schnitte über die aufsteigende Reihe der Alkohole. Die Objektträger wurden mit Eukitt®Eindeckelmedium und Deckgläsern eingedeckelt.

4.12. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse aus den biologischen Testverfahren und der q-RT PCR erfolgte mit Microsoft® Excel 2010 für Windows. Die statistische Auswertung der Microarray Experimente erfolgte mit den Programmen Bioconductor „R“ Version 2.9.1 und *Significance Analysis of Microarrays* Version 3.08 (SAM).

Grafiken wurden mit GraphPad Prism® von GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA oder mittels Microsoft® Power Point 2010 angefertigt.

5. ERGEBNISSE

5.1. Datenbank Analysen zur Identifizierung von Interferon-regulierten Genen im Hühnergenom

Im Rahmen dieser Dissertation soll die Typ I IFN-Antwort des Haushuhnes untersucht werden. Der erste Schritt um IRGs (IFN-regulierte Gene) im Haushuhn zu identifizieren, war der Abgleich von Genen des Haushuhns mit bekannten IRGs des Säugetiers (vergleiche Kapitel 4.9.5).

Bekannte IRGs des Säugetiers wurden aus folgenden Quellen verwendet: Im Internet verfügbare Datenbanken wie die „INTERFEROME“ Datenbank und die „ISG-Database“ [250, 252], in denen aus zahlreichen Mikroarray Experimenten mit humanen und murinen Zelllinien und Geweben IRGs dieser Spezies zusammengetragen wurden. Dabei enthält die „INTERFEROME“ Datenbank außerdem Informationen, welche Gene durch welche Typen von IFN induziert werden. Des Weiteren wurden einige IRGs in der KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; Internet Adresse: www.genome.jp/kegg/) und der „Reactome“ Datenbank (Internet Adresse: www.reactome.org/) gefunden. Außerdem wurden einige im Säugetier bekannte IRGs aus Publikationen herausgesucht [253, 337]. All diese IRGs des Säugetiers wurden in einer Liste zusammengefasst und mit den annotierten Genen auf dem für die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Mikroarray abgestimmt. Dabei handelte es sich um den Agilent Oligonukleotid Mikroarray: „Agilent 4x44K chicken-Genom“ Katalog-Mikroarray. Mit diesem Mikroarray war es möglich 13.353 Gene anzusprechen. Nachdem die auf dem Mikroarray annotierten Gene überarbeitet und verifiziert worden sind, wurde die Liste der IRGs des Säugers mit den auf dem Mikroarray annotierten Genen abgeglichen. Auf diese Weise konnten 1.420 Gene identifiziert werden, die im Säugetier als IRGs bekannt und gleichzeitig im Hühnergenom zu finden sind. Der Einfachheit halber werden diese Gene im Folgenden „allgemeine IRGs“ genannt. Eine Liste dieser Gene mit Gen Beschreibung, den zugehörigen *Ensemble* Nummern und *Accession* Nummern und den Gensequenzen ist auf der beiliegenden CD in Mappe 1, Tabelle 29 zu finden.

5.2. Halbwertszeit von ChIFN- α

Um die biologische Halbwertszeit von rek ChIFN- α im Huhn zu ermitteln, wurde drei Hühnern rek ChIFN- α intravenös verabreicht und vor Injektion und zu den Zeitpunkten 5, 10, 15, 30

Minuten, 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden Blut zur Plasmagewinnung entnommen. Zuvor wurden die Tiere gewogen. Dem schwersten Tier wurde eine Dosis von 1×10^7 Units rek ChIFN- α verabreicht, den anderen Tieren eine ihrem Gewicht entsprechende Dosis (siehe Tabelle 7). Der Gehalt an biologisch aktivem Typ I IFN wurde mit Hilfe des Interferon Reporterassays bestimmt. Wie Tabelle 7 und Abbildung 5 zeigen, wurde die maximale Konzentration C_{\max} 5 Minuten nach Injektion gemessen, die dann bis etwa 60 Minuten nach Injektion exponentiell sank, um anschließend in eine Gerade überzugehen. Bei etwa 15 Units/ml nach 240 Minuten war das Detektionsminimum des Assays erreicht. Cl (Clearance) gibt die Effizienz der Ausscheidung von rek ChIFN- α aus dem Organismus an, V das Verteilungsvolumen in der terminalen Phase. Die Werte sind bei allen Tieren sehr ähnlich und bedeuten letztendlich, dass rek ChIFN- α schnell aus dem Plasma diffundiert. Die Berechnung des Mittelwerts, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten (CV) zeigten mit Werten unter 12% einen vernünftigen Schwankungsbereich. Mit Hilfe der AUC (*Area under the curve*) ließ sich eine durchschnittliche terminale Halbwertszeit von rek ChIFN- α im Plasma der Tiere von 36 Minuten berechnen.

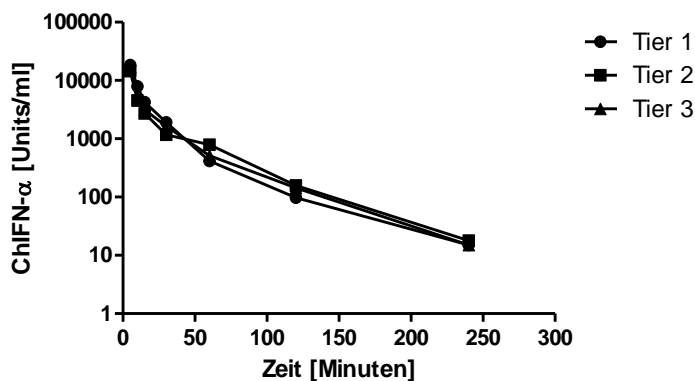


Abbildung 5 Bioverfügbarkeit nach intravenöser Injektion von rek ChIFN- α

Drei Tiere wurden mit den in Tabelle 7 beschriebenen Mengen rek ChIFN- α i.v. behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren Blut zur Plasmagewinnung entnommen und der Gehalt an biologisch aktivem Typ I IFN im IFN Reporterassay bestimmt.

Tabelle 7 Ermittlung der biologischen Halbwertszeit von rek ChIFN- α

Dargestellt sind die aufgrund des Gewichts errechneten verabreichten Mengen an rek ChIFN- α und die Messergebnisse von jedem Tier, sowie der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient (CV) der errechneten Werte.

	Gewicht [kg]	IFN- α [U]	Dosis [U/kg]	C_{\max} [U/ml]	T_{\max} [min]	Cl [ml/(h \times kg)]	V [l/kg]	terminale $T_{1/2}$ [min]
Tier 1	0.615	$0,83 \times 10^7$	$1,34 \times 10^7$	18447	5	3288.60	3.08	38.99
Tier 2	0.689	$0,93 \times 10^7$	$1,35 \times 10^7$	14510	5	4028.20	3.30	34.06
Tier 3	0.744	1×10^7	$1,34 \times 10^7$	16915	5	3747.82	3.21	35.57
Mittelwert	-	-	-	16624	5	3688.21	3.20	36.21
SD	-	-	-	1985	0	373.39	0.11	2.53
CV [%]	-	-	-	11.94	0	10.12	3.38	7.00

5.3. Vergleich der Bioverfügbarkeit nach intravenöser und intramuskulärer Injektion von ChIFN- α

Um Aussagen über die Bioverfügbarkeit von intravenös verabreichtem rek ChIFN- α im Vergleich zu intramuskulär verabreichtem rek ChIFN- α treffen zu können, erhielt ein Huhn intravenös eine Dosis von 4×10^6 Units rek ChIFN- α . Drei weiteren Hühnern wurde intramuskulär die gleiche Dosis verabreicht. Nach Injektion wurde den Tieren nach 5, 15, 30 Minuten, 1, 2, 4 und 8 Stunden Blut zur Plasmagewinnung entnommen. Der Gehalt an biologisch aktivem Typ I IFN wurde mit Hilfe des Interferon Reporterassays bestimmt (siehe Abbildung 6).

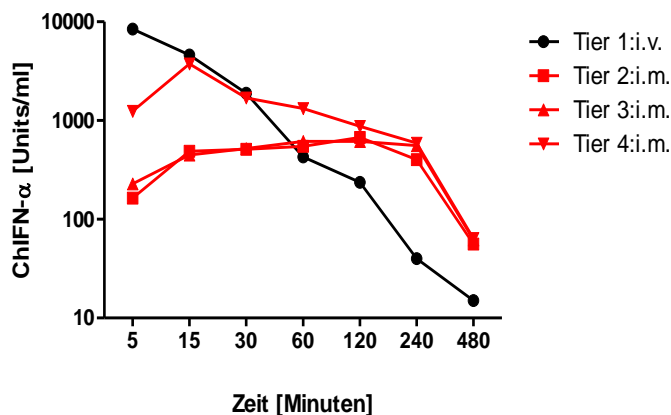


Abbildung 6 Vergleich der IFN Bioverfügbarkeit nach intravenöser und intramuskulärer Injektion von rek ChIFN- α

Vier Tiere wurden mit 4×10^6 Units rek ChIFN- α behandelt. Tier 1 erhielt das rek ChIFN- α intravenös, Tier 2, 3 und 4 intramuskulär. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren Blut zur Plasmagewinnung entnommen und der Gehalt an biologisch aktivem Typ I IFN im IFN Reporterassay bestimmt.

Wie zu erwarten, zeigte sich bei Tier 1 eine typische i.v. Kinetik mit einem Maximalwert nach 5 Minuten und einer raschen Abnahme der IFN-Konzentration.

Bei allen drei Hühnern, die intramuskulär mit rek ChIFN- α behandelt wurden, waren bereits nach 5 Minuten über 100 Units Typ I IFN pro ml Plasma messbar. Nach 15 Minuten war bei Tier 4 ein Höchstwert von 3750 Units/ml Typ I IFN messbar, der dann über die weiteren Messzeitpunkte abfiel. Möglicherweise wurde bei diesem Tier, welches deutlich höhere Plasmawerte an Typ I IFN zeigte, versehentlich bei der Injektion rek ChIFN- α in ein Blutgefäß verabreicht. Bei den anderen beiden Tieren war der Gehalt an Typ I IFN im Plasma über den gesamten Messzeitraum sehr ähnlich. Die maximale Konzentration (C_{max}) war bei Tier 2 mit 632 Units/ml Typ I IFN nach 60 Minuten erreicht und bei Tier 3 mit 674 Units/ml Typ I IFN nach 2 Stunden. Insgesamt zeigte sich bei Tier 2 und Tier 3 nach 30 - 60 Minuten eine Art Plateau, das bis 4 Stunden nach Injektion anhielt und dann wieder absank. Nach 8 Stunden war bei allen Tieren noch etwa 60 Units/ml Typ I IFN im Plasma zu messen.

Folglich stieg und sank der Gehalt an Typ I IFN im Plasma nach intramuskulärer Injektion später als nach intravenöser Applikation. Außerdem war nach intramuskulärer Injektion nur ein Bruchteil der maximalen Konzentration (C_{\max}) der nach intravenöser Injektion nachweisbaren Menge an Typ I IFN messbar. Um die Bioverfügbarkeit von rek ChIFN- α nach intramuskulärer Injektion zu bestimmen, wurden die AUC (*Area under the Curve*) Werte aus den Daten von Tier 1 und den gemittelten Daten von Tier 3 und 4 bestimmt. Dadurch ließ sich bei einer Dosis von 4×10^6 Units rek ChIFN- α nach intramuskulärer Injektion im Vergleich zur intravenösen Injektion eine Bioverfügbarkeit (F) von 84% ermitteln.

5.4. Ausschluss von Lipopolysaccharid Kontamination

Kontaminationen von Proben durch Lipopolysaccharid (LPS) stellen ein bekanntes Problem bei der Laborarbeit dar. Da LPS als Bestandteil der Zellwand von gram negativen Bakterien PRRs binden und aktivieren kann, vermag es seinerseits eine Interferon-Antwort auszulösen und die Ergebnisse der durchgeführten Experimente nachhaltig zu beeinflussen.

5.4.1. Limulus Amebocyte Lysate Biotest

Um auszuschließen, dass die durch Interferon Injektion vermittelte Geninduktion auf einer Kontamination mit LPS beruhte, wurde das aus E.Coli hergestellte rek ChIFN- α und der lentogene NDV Impfstoff La Sota mit dem Limulus Amöbozyten Lysat Biotest auf Kontamination mit LPS geprüft. Die Endotoxin Toleranzgrenze beträgt laut der Methodvalidierung der U.S. Pharmacopeia für parenteral verabreichte Medikamente beim Menschen 20 EU/Dosis (*U.S. Pharmacopeil Convention*, Kapitel 161 und 85, 2005). Die Messung ergab, dass in einer Dosis rek ChIFN- α 19,33 EU enthalten waren und in einer Dosis NDV Impfstoff 4,98 EU. Damit enthielten die applizierten Substanzen weniger LPS, als von USPC für parenteral verabreichte Substanzen vorgegeben.

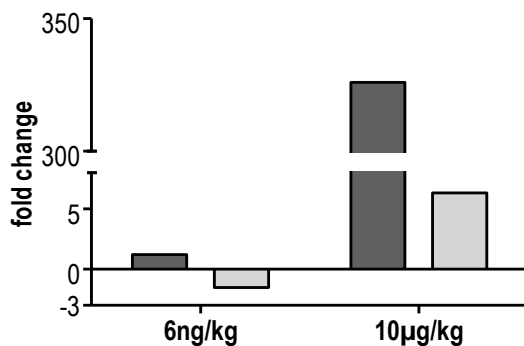
5.4.2. Analyse der LPS-Auswirkungen auf die Gen- und Proteinexpression

Um zu prüfen, ob die in den applizierten Substanzen enthaltenen geringen Mengen LPS einen Einfluss auf die Genexpression hatten, wurde Hühnern vergleichbare Mengen LPS intravenös injiziert und Il-6 Protein im Plasma und auf Genexpressionsebene bestimmt. Il-6 wurde gewählt, da es zu den klassischen proinflammatorischen Zytokinen zählt, die rasch und in großer Menge nach LPS Behandlung gebildet werden [338]. Des Weiteren wurde das Gen K203 (*Chicken Chemokine (C-C motif) Ligand inflammatory 3*) auf Genexpressionsebene gemessen, da in einer weiteren Dissertation in der AG Kaspers die LPS induzierte

Genexpression von K203 in Hühnermakrophagen festgestellt wurde (persönliches Gespräch mit Melanie Reger).

Im Rahmen dieses Experiments wurden zwei von drei Hühnergruppen mit jeweils fünf Tieren verschiedene Mengen an LPS intravenös injiziert: Gruppe 1 erhielt 10 μ g/kg LPS, Gruppe 2 erhielt 6ng/kg LPS und Gruppe 3 erhielt sterile isotone NaCl Lösung. Die gewählten Konzentrationen ergaben sich aus Beobachtungen, dass nach intravenöser Injektion von 10 μ g/kg eine deutliche Fieberinduktion feststellbar ist (persönliches Gespräch mit Bernd Kaspers) und dass laut *Food and Drug Administration* (FDA) je nach Art des Endotoxins 1EU zwischen 0,1 und 0,2 ng Endotoxin enthält. Daher erhielt in den durchgeführten Experimenten mit rek ChIFN- α und lentogenem NDV Impfstoff La Sota, ein Huhn mit einem Gewicht von 500g zwischen 1 und 3 ng LPS (zwischen 2 und 6 ng/kg). Um ein mit dem IFN-Versuch vergleichbares Ergebnis zu erhalten, wurden die Tiere nach drei Stunden getötet und die Organe Milz und Lunge zur Genexpressionsanalyse entnommen (siehe Abbildung 7). Außerdem wurde vor LPS Injektion und zum Zeitpunkt der Organentnahme Blut zur Plasmagewinnung entnommen, und der Il-6 Proteinspiegel im Plasma bestimmt (siehe Abbildung 8)

A



B

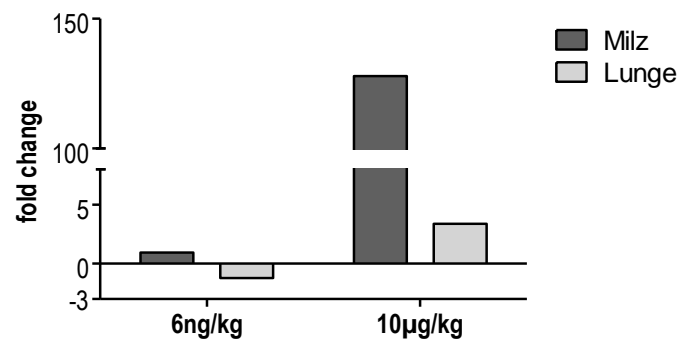


Abbildung 7 Il-6 und K203 Gen Expression in Milz und Lunge nach LPS Injektion

Expression von Il-6 (A) und K203 (B) nach Injektion von LPS im Vergleich zur Kontrolle gemessen in der qRT-PCR. ($n=5$)

Im Vergleich zur Kontrolle waren in der Tiergruppe die 6ng/kg LPS erhalten hatte nur äußerst geringe Expressionsunterschiede im Bereich von -1,5 - 1,2 (FC) zu finden. Bei der Tiergruppe, die 10 μ g/kg LPS erhalten hatte war Il-6 im Vergleich zur Kontrolle in der Milz 327fach und in der Lunge 6fach hochreguliert. K203 war im Vergleich zur Kontrolle in der Milz 128fach und in der Lunge 3fach hoch reguliert.

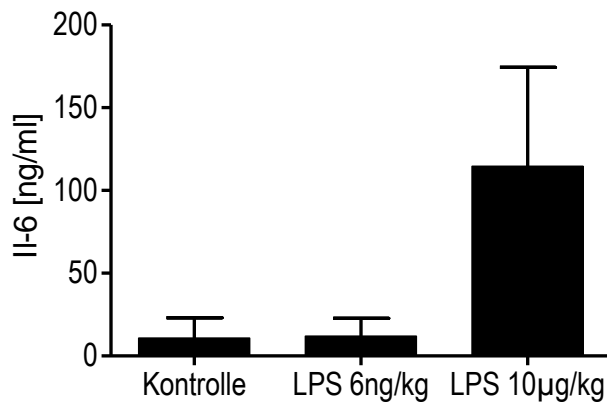


Abbildung 8 IL-6 Protein im Plasma nach LPS Injektion

Dargestellt sind die im 7TD1 Biotest gemessenen Plasmawerte an IL-6 Protein und deren Standardabweichung in den verschiedenen Behandlungsgruppen. ($n=5$)

Die Messung von IL-6 Protein im Plasma ergab, dass drei Stunden nach Injektion von 10µg/kg LPS im Mittel 115 ng/ml IL-6 Protein im Plasma und nach Applikation von 6ng/kg LPS ein Mittelwert von 12 ng/ml IL-6 Protein im Plasma zu messen war und damit ungefähr die gleiche Menge wie im Plasma der Kontrollgruppe (11ng/ml).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Injektion von LPS Mengen die zu einer Fieberinduktion führen, zu einem massiven Anstieg der Genexpression von IL-6 und K203 in Milz und Lunge führten und hohe Mengen an IL-6 Protein im Plasma nachweisbar waren. Injizierte man Mengen an LPS die mit den im Rahmen dieser Dissertation applizierten Substanzen rek ChIFN- α und NDV Impfstoff enthaltenen LPS Mengen vergleichbar waren, hatte dies keinen Einfluss auf die Genexpression von IL-6 und K203 in Milz und Lunge und den IL-6 Protein Gehalt im Plasma. Da IL-6 und K203 sehr sensitiv auf LPS reagieren, sollte dieses Ergebnis repräsentativ für die gesamte Gen Expression in Milz und Lunge sein.

5.5. Identifizierung IFN-regulierter Gene im Huhn mittels Mikroarray

5.5.1. Behandlung mit ChIFN- α

Die frühe IFN-Antwort des Huhnes sollte auf Transkriptomebene untersucht werden. Hierfür wurde Hühnern rek ChIFN- α i.v. appliziert. Um eine über die Zeit anhaltende konstante IFN Konzentration zu erreichen, wurde aus den Daten über die Halbwertszeit und Bioverfügbarkeit von ChIFN- α das in Abbildung 9 gezeigte Behandlungsschema abgeleitet. Insgesamt 24 Hühner der Hühnerlinie LSL wurden in vier Gruppen mit jeweils sechs Tieren eingeteilt. Diese vier Tiergruppen setzten sich aus der Kontrollgruppe (K) und drei Tiergruppen zusammen, die rek ChIFN- α über die verschiedenen Zeiträume drei (IFN(3h)), sechs (IFN(6h)) und neun Stunden (IFN(9h)) i.v. erhielten. Eine Dosis rek ChIFN- α enthielt 1×10^7 Units biologisch

aktives Typ I IFN. Um einen konstanten IFN Level zu erhalten, wurde bei den Tieren aus den Gruppen IFN(6h) und IFN(9h) alle drei Stunden eine weitere Dosis rek ChIFN- α appliziert. Nach diesen Zeiträumen wurden die Tiere getötet und die Organe Milz und Lunge für die Analysen entnommen. Bei der Entnahme des Lungengewebes wurden wie in Abbildung 4 beschrieben, nur die dorsal und ventral des Primärbronchus gelegenen Anteile entnommen, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch konstitutiv exprimiertes BALT zu verhindern. Außerdem wurde vor Injektion und vor Tötung Blut zur Plasmagewinnung entnommen. Die Kontrollgruppe wurde nach sechs Stunden getötet.

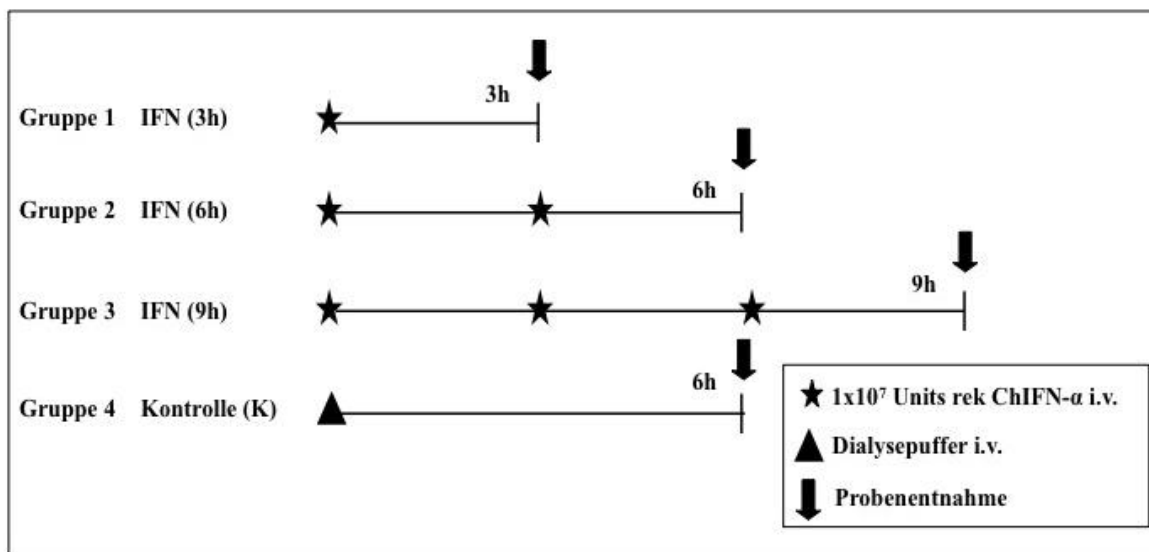


Abbildung 9 Behandlungsschema mit rek ChIFN- α

Das gewählte Behandlungsschema sollte die Möglichkeit bieten, den Genexpressionsverlauf in einer IFN-Antwort über den Zeitraum von neun Stunden zu beobachten und Gene zu identifizieren, die rasch nach IFN-Injektion exprimiert werden oder aber erst später.

Vor und nach Behandlung mit rek ChIFN- α wurde der Gehalt an Typ I IFN im Plasma mit dem IFN Reporterassay bestimmt (siehe Abbildung 10).

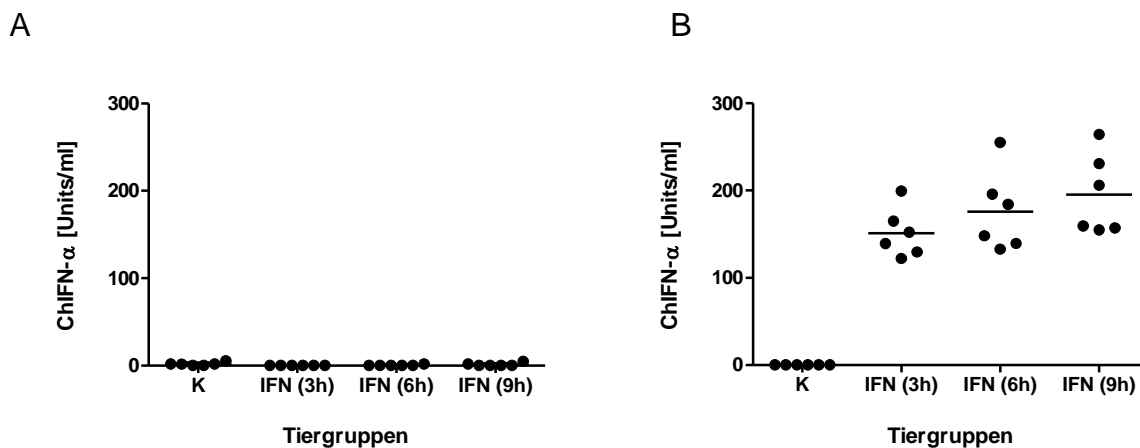


Abbildung 10 Typ I IFN Plasmaspiegel vor und nach IFN Injektion

Vier Tiergruppen ($n = 6$) wurde vor (A) und nach (B) der in Abbildung 9 dargestellten Behandlung mit rek ChIFN- α Blut zur Plasmagewinnung entnommen und der Gehalt an Typ I IFN im IFN Reporterassay gemessen. Dargestellt sind die Werte der Einzeltiere, sowie die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe.

Bei keinem der Tiere wurden vor der IFN Applikation relevante Mengen Typ I IFN im Plasma gemessen (siehe Abbildung 10 A). In den Plasmaproben, die nach Behandlung mit rek ChIFN- α gewonnen wurden, war Typ I IFN nachweisbar. Im Plasma der Tiergruppe IFN(3h) war nach drei Stunden ein Mittelwert von ca. 150 Units/ml Typ I IFN im Plasma messbar (siehe Abbildung 10 B). Nach weiteren Dosen rek ChIFN- α war eine geringe Steigerung der Plasmakonzentrationen von Typ I IFN feststellbar. So konnte im Plasma der Tiergruppe IFN(6h) ein Mittelwert von ca. 175 Units/ml ChIFN- α und im Plasma der Tiergruppe IFN(9h) ein Mittelwert von annähernd 200 Units/ml Typ I IFN gemessen werden, während im Plasma der Kontrollgruppe (K) weiterhin kein Typ I IFN messbar war.

Folglich gelang es tatsächlich, durch das gewählte Behandlungsschema über den Zeitraum von neun Stunden einen relativ konstanten Plasma Spiegel an Typ I IFN zu erzielen.

5.5.2. Mikroarray Experiment

Die unter 5.5.1 beschriebenen Tiergruppen wurden nach drei, sechs und neun Stunden getötet und Milz und Lunge zur RNA-Isolation entnommen. Die Milz wurde dabei als wichtiges lymphatisches Organ ausgewählt, die Lunge als Organ, welches bei der angeborenen Immunantwort des Huhns eine bedeutende Rolle spielt und als Eintrittspforte für eine Vielzahl von für den Respirationstrakt relevanten Erregern in den Organismus dient. Aus den sechs Proben pro Gruppe wurden für das Mikroarray Experiment von Milz und Lunge anhand der RIN und der RNA-Reinheit jeweils vier Replikate pro Tiergruppe ausgewählt. Dabei lag die RIN bei mindestens 8,5 und die Parameter der RNA-Reinheit für den 260/280 Wert über 2,0

und für den 260/230 Wert über 1,9. Die Hybridisierung der RNA-Proben erfolgte auf dem „customized“ chicken Agilent 4x44k Array.

5.5.2.1 Heat Map Gruppenanalyse nach IFN Behandlung

Die Mikroarraydaten wurden mit dem Programm „R“ (Version 2.9.1. *The R Foundation for Statistical Computing*) normalisiert und mit dem *Bioconductor* Paket *Genplotter* in einer *Heat Map* graphisch dargestellt. In dieser *Heat Map* wurden die Signalintensitäten der im Mikroarray analysierten Proben als zweidimensionale Matrix dargestellt. Dies ermöglicht eine Beurteilung der Homologie der Genexpression der verschiedenen Proben innerhalb einer Gruppe und der Gruppen zueinander. Dabei wird diese Homologie durch Farbstufen widerspiegelt, die von Rot über Zwischenstufen bis Blau reichen. Rot bedeutet, dass die Genexpression zweier Proben sehr ähnlich ist, blau hingegen weist auf eine geringe Homologie der Genexpression hin. Neben der Farbeinteilung verdeutlicht „R“ die Homologien der analysierten Proben mit Hilfe eines Dendrogramms, das über einen *distance plot* erstellt wurde. Dabei kennt das Programm „R“ die Gruppeneinteilung des Experiments nicht und ordnet die analysierten Datensätze ausschließlich nach ihrer Ähnlichkeit in der Genexpression. Das bedeutet, dass die Gruppierung der *Heat Map* alleine auf der Homologie der Signalintensitäten beruht. In Abbildung 11 ist eine *Heat Map* aller analysierten Proben von Milz und Lunge zu sehen.

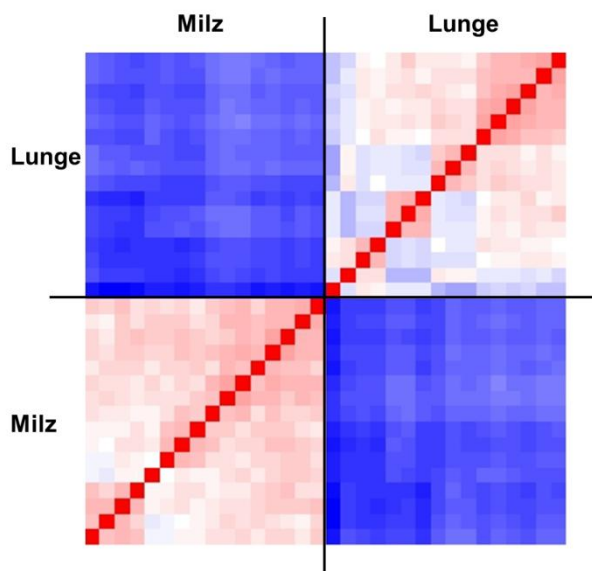


Abbildung 11 Vergleich der Mikroarrays von Milz und Lunge nach IFN Injektion

Mittels „R“ wurden die Signalintensitäten von Milz und Lunge verglichen und eine *Heat Map* erstellt.

Wie der Farbverlauf der *Heat Map* zeigt, sind alle analysierten Proben von Milz und Lunge innerhalb eines Organs sehr homogen. Vergleicht man allerdings die Signalintensitäten beider Organe miteinander, sieht man, dass sich Milz und Lunge in ihrem Genexpressionsmuster deutlich voneinander unterscheiden.

Um Genexpressionsmuster innerhalb der Organe genauer zu betrachten, wurden Milz und Lunge unabhängig voneinander mit dem Programm „R“ analysiert (siehe Abbildung 12).

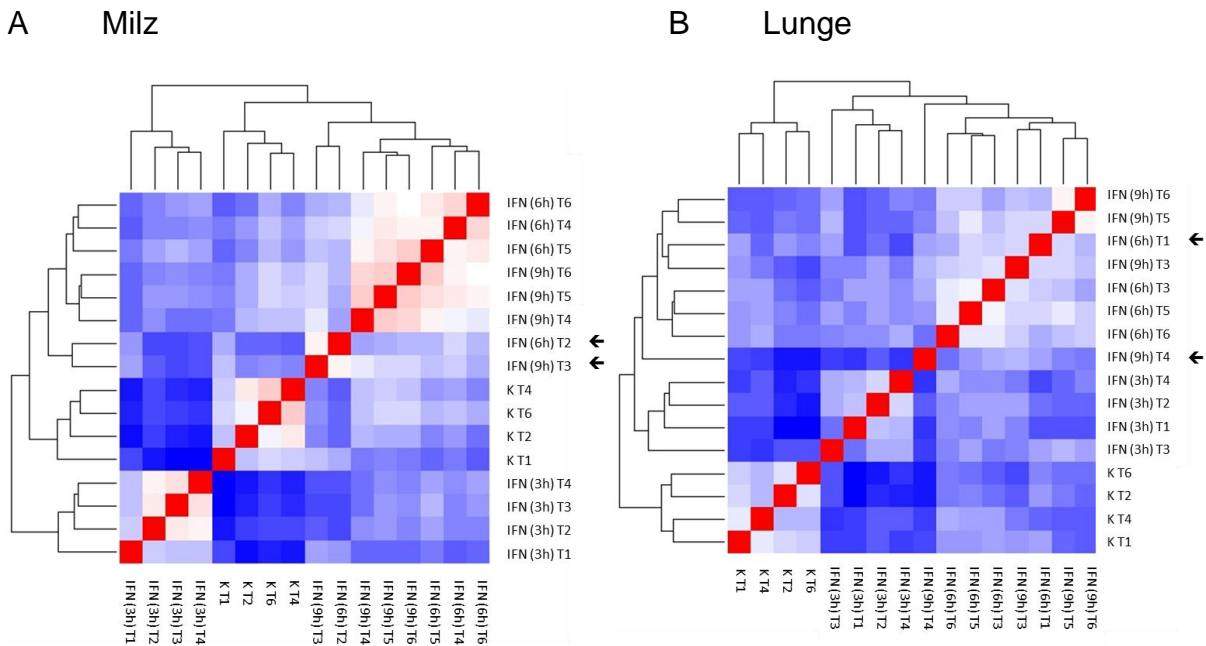


Abbildung 12 Gesamtanalyse der Mikroarrays von Milz und Lunge nach IFN Injektion

Mittels „R“ wurden die Signalintensitäten der einzelnen Mikroarrays von Milz (A) und Lunge (B) verglichen und eine *Heat Map* erstellt. Die Proben sind nach Gruppenzugehörigkeit benannt gefolgt von der jeweiligen Tiernummer (T1-6). Auffällig eingeordnete Datensätze wurden mit einem Pfeil markiert.

Dabei zeigte sich, dass fast alle Proben in die richtigen Gruppen eingeteilt werden. Da „R“ die Proben alleine hinsichtlich ihrer Signalintensität einteilt, ist die korrekte Einteilung der Proben entscheidend bei dieser Analyse. In der Milz und in der Lunge sind die Genexpressionsmuster der einzelnen Proben innerhalb der verschiedenen Tiergruppen nach Behandlung mit rek ChIFN- α sehr homogen. In der Milz weisen die Tiergruppen IFN(3h) und Kontrolle(K) innerhalb ihrer Gruppen sehr ähnliche Genexpressionsmuster auf, sind aber gegeneinander deutlich voneinander abgrenzbar wie das Dendrogramm belegt. Bei den Tiergruppen IFN(6h) und IFN(9h) weisen jeweils drei der vier Proben innerhalb einer Tiergruppe sehr ähnliche Genexpressionsmuster auf. Doch zeigt jeweils eine Probe dieser beiden Tiergruppen ein divergierendes Genexpressionsmuster: IFN(6h)T2 und IFN(9h)T3 (siehe Abbildung 12 A, Pfeilmarkierung). Das Dendrogramm zeigt, dass diese beiden Proben einander sehr ähnlich sind, sich aber von den anderen Mitgliedern ihrer jeweiligen Tiergruppe unterscheiden. Dennoch besteht eine größere Ähnlichkeit zu den anderen Mitgliedern der Gruppen IFN(6h) und IFN(9h). Interessanterweise scheint das Genexpressionsmuster der Kontrolle(K) dem der Tiergruppen IFN(6h) und IFN(9h) ähnlicher zu sein, als das der Tiergruppe IFN(3h). Die Genexpression nach drei Stunden weist im Vergleich zu allen anderen Gruppen auch zur

unbehandelten Kontrollgruppe die größten Unterschiede auf.

Wie in der Milz zeigen auch in der Lunge die Kontrolle(K) und IFN(3h) innerhalb ihrer Tiergruppen ein sehr homogenes Genexpressionsmuster, sind aber gegeneinander deutlich abgrenzbar. Ebenso wie in der Milz gibt es innerhalb der Tiergruppen IFN(6h) und IFN(9h) zwei Ausreißer: IFN(6h)T1 und IFN(9h)T4 (siehe Abbildung 12 B, Pfeilmarkierung). Dabei scheint IFN(6h)T1 ein ähnliches Genexpressionsmuster aufzuzeigen wie die restlichen Mitglieder der Tiergruppe IFN(9h). Das Genexpressionsmuster von IFN(9h)T4 scheint den Genexpressionsmustern der weiteren Proben nach drei Stunden und sechs Stunden noch ähnlicher zu sein, als den anderen neun Stunden Proben. Jedoch zeigt das Dendrogramm, dass IFN(9h)T4 geringere Ähnlichkeit zu den weiteren Mitgliedern der Tiergruppen IFN(6h) und IFN(9h) hat, als diese untereinander haben. Im Gegensatz zur Milz ist die Kontrollgruppe in der Lunge von allen Behandlungsgruppen deutlich abgegrenzt.

Insgesamt konnte mit dieser Analyse festgestellt werden, dass die Genexpressionsmuster der Gruppen IFN(3h) und (K) jeweils in der Milz und in der Lunge innerhalb ihrer Gruppen sehr homogen sind, sich aber deutlich voneinander abgrenzen lassen, während die Genexpression der Gruppen IFN(6h) und IFN(9h) in beiden Organen gewisse Überschneidungen aufweist. Diese Ergebnisse ermöglichen weiterführende Analysen der Daten, wobei für die folgenden Untersuchungen die große Ähnlichkeit der Genexpressionsmuster der Tiergruppen IFN(6h) und IFN(9h) zueinander berücksichtigt werden muss.

5.5.2.2 Identifizierung signifikant regulierter Gene nach IFN-Behandlung

Da in einem Mikroarray Experiment sehr viele Daten auf einmal analysiert werden, ist eine strenge statistische Auswertung dieser Daten zur Identifizierung signifikant regulierter Gene unerlässlich. Diese statistische Auswertung wurde mit dem Programm SAM (*significance analysis of microarrays*) durchgeführt. Als Maß für die Signifikanz dienten einerseits die FDR (*False Discovery Rate*) und andererseits der FC (*fold change*). Die FDR beurteilt die Wahrscheinlichkeit, ob ein *Spot* fälschlicherweise als signifikant reguliert beurteilt wurde (falsch positiv). Der FC gibt die Höhe der Expressionsänderung eines *Spots* zwischen zwei Tiergruppen an. Analysiert wurden alle Datensätze von Milz und Lunge mit Hilfe der SAM *Multiclass* Analyse. Der FC wurde jeweils aus den Expressionsunterschieden der drei mit rek ChIFN- α behandelten Tiergruppen zur Kontrollgruppe errechnet. Dabei wurden *Spots* mit einer FDR von kleiner als 5% und einer mindestens 2fachen Hoch- oder Herunter-Regulation als signifikant reguliert beurteilt. Da manche Gene wiederholt in mehreren *Spots* auf den Mikroarray geladen wurden, wurden aus der Anzahl der signifikant regulierten *Spots* die der

signifikant regulierten Gene ermittelt. Tabelle 8 zeigt die Anzahl der signifikant regulierten Gene nach Behandlung mit rek ChIFN- α in den Gruppen IFN(3h), IFN(6h) und IFN(9h) bezogen auf die Kontrollgruppe.

Tabelle 8 Signifikant regulierte Gene in Milz und Lunge nach IFN Injektion

Gelistet ist die Anzahl der signifikant regulierten Gene der unterschiedlichen Tiergruppen nach Behandlung mit rek ChIFN- α im Vergleich zur Kontrollgruppe in Milz und Lunge. Dabei sind die Gesamtzahl der signifikant regulierten Gene und die jeweilige Anzahl an hoch (schwarz) - und herunter (rot) regulierten Genen gezeigt. (FDR<5%; FC mindestens +/-2)

		Gene		
Milz	IFN(3h)	1.870	+	872
			-	998
	IFN(6h)	852	+	316
			-	536
	IFN(9h)	665	+	257
			-	407
Lunge	IFN(3h)	947	+	687
			-	260
	IFN(6h)	435	+	372
			-	63
	IFN(9h)	611	+	489
			-	122

Eine Liste aller signifikant regulierten Gene ist auf der beiliegenden CD in Mappe 1, Tabelle 30 zu finden.

Die Zahlen zeigen, dass drei Stunden nach Injektion von rek ChIFN- α sowohl in der Milz als auch in der Lunge die Genexpression zwischen IFN behandelten Tieren und Kontrolltieren die größten Unterschiede aufweist, während nach sechs und neun Stunden in beiden Organen eine geringere Anzahl an Genen signifikant reguliert ist. Interessanterweise sind in der Milz ungefähr gleich viele herunter regulierte Gene zu finden wie hoch regulierte, während in der Lunge deutlich mehr hoch regulierte Gene identifiziert werden konnten. Wie auch die *Heat Map* zeigen diese Ergebnisse, dass sich in Milz und Lunge das Genexpressionsmuster der Gruppe IFN(3h) deutlich von den anderen Gruppen unterscheidet.

5.5.2.3 Vergleich von IRGs beim Huhn und Säugetier

Da im Rahmen dieser Dissertation IRGs im Huhn identifiziert werden sollten, wurden die Ergebnisse aus dem Mikroarray Experiment drei Stunden nach Behandlung mit rek ChIFN- α

von Milz und Lunge mit der Liste der aus den Datenbank Analysen erhaltenen „allgemeinen IRGs“ abgeglichen (siehe Abbildung 13). Dabei wurde zum Abgleich der Zeitpunkt drei Stunden nach Injektion von rek ChIFN- α gewählt um sicherzustellen, dass ausschließlich IRGs analysiert werden. Dies geschah aufgrund der Überlegung, dass sechs und neun Stunden nach IFN Injektion Gene durch andere Umstände als allein durch das injizierte rek ChIFN- α exprimiert werden könnten, wie zum Beispiel aufgrund zuvor induzierter IRGs. Außerdem zeigte bereits die *Heat Map* Darstellung, dass die Tiergruppen IFN(3h) und die Kontrollgruppe(K) am deutlichsten von den anderen Gruppen abgrenzbar sind, während Mitglieder der Tiergruppen IFN(6h) und IFN(9h) untereinander ein sehr ähnliches Expressionsprofil aufweisen.

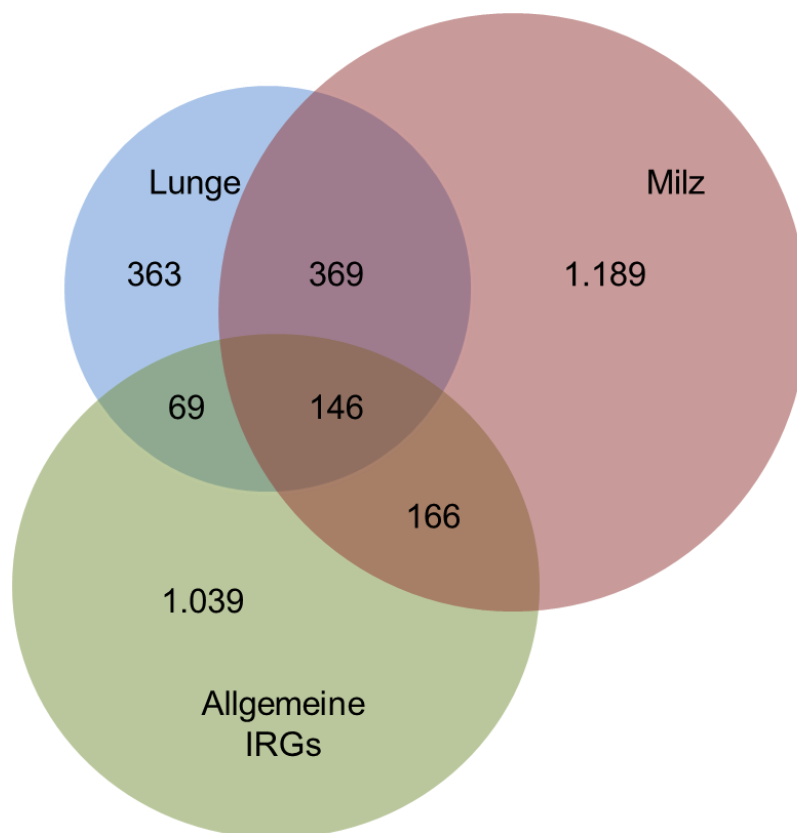


Abbildung 13 Abgleich durch IFN Injektion im Huhn regulierter Gene mit IRGs des Säugetiers

In diesem Venn-Diagramm ist die Verteilung der signifikant regulierten Gene drei Stunden nach Behandlung mit rek ChIFN- α in Milz (rot) und Lunge (blau) dargestellt. Der dritte grüne Kreis entspricht den im Säugetier vorkommenden IRGs, die auch im Hühnergenom zu finden sind, hier „allgemeine IRGs“ genannt. Die Zahlen geben die Anzahl von Genen innerhalb der Schnittmengen an.

Tabelle 9 Anzahl signifikant regulierter IRGs nach IFN Injektion

Gelistet ist die Anzahl der signifikant regulierten Gene der verschiedenen Gruppen, die in Abbildung 13 dargestellt sind. Die Gruppen teilen sich in die Gesamtzahl der signifikant regulierten Gene und die jeweilige Anzahl an hoch (schwarz) und herunter (rot) regulierten Genen (FDR<5; FC mindestens +/-2)

	Allgemeine IRGs		Neu identifizierte IRGs		
Milz und Lunge	146	+	129	+	253
		-	15	-	105
		Milz +/- Lunge-	1	Milz +/- Lunge-	9
		Milz -/ Lunge+	1	Milz -/ Lunge+	2
Milz	166	+	97	+	403
		-	69	-	786
Lunge	69	+	51	+	249
		-	18	-	114

Es zeigte sich, dass die signifikant regulierten Gene in Milz und Lunge drei Stunden nach Injektion von rek ChIFN- α mit den „allgemeinen IRGs“ mehrere verschiedene Schnittmengen bilden. Jedoch fallen 1.189 Gene in der Milz und 363 Gene in der Lunge, sowie 369 Gene die sowohl in Milz als auch in der Lunge signifikant reguliert sind, nicht in die Gruppe der „allgemeinen IRGs“. Außerdem können durch dieses Experiment von der Liste der „allgemeinen IRGs“ lediglich 381 Gene bestätigt werden. Dabei wurden von diesen 381 Genen 166 Gene in der Milz, 69 in der Lunge und 146 in beiden Organen gefunden. In Anlehnung an die Definition eines IRGs als ein durch IFN reguliertes Gen, werden Gene die drei Stunden nach Injektion von rek ChIFN- α signifikant reguliert sind und nicht in die Gruppe der „allgemeinen IRGs“ fallen, im Folgenden als „neu identifizierte IRGs“ bezeichnet. Betrachtet man die Datensätze der Gruppen IFN(6h) und IFN(9h) sieht man, dass einige Gene die in der Gruppe IFN(3h) ausschließlich in Lunge oder Milz reguliert sind, in den Gruppen IFN(6h) und IFN(9h) auch im jeweilig anderen Organ oder in beiden Organen reguliert sind (siehe beiliegende CD Mappe 1, Tabelle 31) Dabei überwiegt in fast allen Gruppen der Anteil hoch regulierter Gene (siehe Tabelle 9). Lediglich in der Milz sind etwa doppelt so viele herunter regulierte „neu identifizierte IRGs“ wie hoch regulierte zu finden, eine Tatsache die schon bei der ersten Gesamtanalyse der signifikant regulierten Gene aufgefallen ist. In der Gruppe der „allgemeinen IRGs“ die sowohl in der Lunge als auch in der Milz signifikant reguliert sind, ist ein Gen, EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), welches in der Milz 2fach hoch und in der Lunge 2fach herunter reguliert ist und ein Gen HNMT (*Histamin N-Methyltransferase*), welches in der Milz herunter und in der Lunge hoch reguliert ist. Alle anderen Gene dieser Gruppe sind entweder in Lunge und Milz hoch reguliert oder in beiden Organen herunter reguliert. Ähnliches trifft für die Gruppe „neu identifizierte IRGs“ zu. Neben zahlreichen Genen die in beiden Organen entweder hoch oder herunter reguliert sind, gibt es neun Gene (SNAI2

(*Snail Homolog 2*), *DUSP14* (*Dual Specificity Phosphatase 14*), *CRISPLD1* (*Cysteine-Rich Secretory Protein LCCL Domain Containing 1*), *TMEM215* (*Transmembrane Protein 215*), *DKK1* (*Dickkopf Homolog 1*), *ARHGAP22* (*Rho GTPase Activating Protein 22*), *VASH2* (*Vasohibin 2*), *GJC1* (*Gap Junction Protein, Gamma 1*) und *RGS4* (*Regulator of G-Protein Signaling 4*)), die in der Milz hoch reguliert sind und in der Lunge herunter reguliert sind und zwei Gene (*ST3GAL5* (*ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 5*), *C1QB* (*Complement Component 1, Q Subcomponent, B Chain*)), die in der Milz herunter reguliert sind und in der Lunge hoch reguliert sind. Zu den Genen, die drei Stunden nach Injektion von rek ChIFN- α reguliert sind und zu den „allgemeinen IRGs“ zählen, gehören Gene die durch alle drei Typen von IFN induziert werden, wie ein Abgleich mit der „INTERFEROME“ Datenbank zeigt. Allerdings überwiegt der Anteil an Typ I IFN induzierten Genen (siehe beiliegende CD Mappe 1, Tabelle 31).

Typ I IFN selbst ist nicht reguliert (siehe beiliegende CD, Mappe 1, Tabelle 30). Allerdings ist einer der Rezeptoren des Typ I IFN Rezeptorkomplexes, *IFNAR1*, sowohl in der Milz als auch in der Lunge nach drei Stunden 2fach hoch reguliert, jedoch nicht mehr nach sechs und neun Stunden. IFN- γ ist in beiden Organen signifikant hoch reguliert. So findet sich in der Milz nach drei Stunden eine 10fache und nach sechs und neun Stunden noch eine 2fach Hoch-Regulierung. In der Lunge zeigt IFN- γ über die Behandlungszeiträume steigende Expressionswerte: IFN- γ ist hier 2fach nach drei Stunden, 3fach nach sechs Stunden und 9fach nach neun Stunden hoch reguliert. Einer der Rezeptoren des IFN- γ Rezeptorkomplexes, *IFNGR1*, ist in der Milz in drei Stunden nach IFN Injektion 2fach hoch reguliert. In den anderen Gruppen ist *IFNGR1* nicht signifikant reguliert, ebenso wenig wie in allen Gruppen der Lunge. Typ III IFN ist nicht reguliert. Jedoch wird die Expression der Anteile aus denen sich der passende Rezeptorkomplex für Typ III IFN (*IL-28R1* und *IL-10R2*) bildet, gegenläufig reguliert. Die für IFN- λ spezifische Kette *IL-28R1* ist in der Milz nach drei Stunden 2fach herunter reguliert, während *IL-10R2* sowohl in der Milz als auch in der Lunge nach drei Stunden 2fach hoch reguliert ist.

Es wurden 386 Gene gefunden, die ausschließlich nach sechs und/oder neun Stunden reguliert wurden. Unter ihnen finden sich 46 „allgemeine IRGs“. Diese Gene sind auf beiliegender CD, Mappe 1, Tabelle 32 zu finden.

Um die Gruppen der „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ in Milz und Lunge näher zu charakterisieren, wurden zunächst die 15 am stärksten hoch und herunter regulierten Gene jeder Gruppe herausgesucht (siehe tabellarischer Anhang Tabelle 18). Dabei fiel auf, dass

innerhalb der 15 meist hoch regulierten „allgemeinen IRGs“ in Milz und Lunge (siehe tabellarischer Anhang Tabelle 18 A) fast alle Gene nicht nur nach drei Stunden, sondern auch nach sechs und neun Stunden in Lunge und Milz hoch reguliert waren. Nur FKBP5 (*FK 506 Binding Protein 5*) war in beiden Organen ausschließlich nach drei Stunden hoch reguliert, SOCS3 (*Suppressor of Cytokine Signaling 3*) war zwar in der Lunge zu allen Zeitpunkten hoch reguliert, in der Milz jedoch nur nach drei Stunden. In der Lunge waren außerdem PTX3 (*Pentraxin related Gene, rapidly induced by Il-1b*) und DIO2 (*Deodinase type II*) nur nach drei Stunden hoch reguliert, in der Milz jedoch zu allen Zeitpunkten. Bei den herunter regulierten „allgemeinen IRGs“ hingegen waren lediglich 5 der 15 Gene in der Milz zu allen Zeitpunkten reguliert (EVPL (*Envoplakin*), PCP4 (*Purkinje Cell Protein 4*), AHNAK2 (*AHNAK Nucleoprotein 2*), HNMT (*Histamine N-Methyltransferase*) und HSD11B1 (*Hydroxysteroid Dehydrogenase 1*)), ein weiteres Gen (HOXB7 (*Homeobox B7*)) nach drei und sechs Stunden und ein weiteres Gen (PROCR (*Protein C Receptor, endothelial*)) nach drei und neun Stunden. In der Lunge waren sogar nur zwei der „allgemeinen IRGs“ die in Milz und Lunge herunter reguliert waren auch nach neun Stunden herunter reguliert: MCM3 (*Minichromosome Maintenance Complex Component3*) und AHNAK2.

Innerhalb der meist hoch regulierten „allgemeinen IRGs“ die drei Stunden nach IFN Injektion ausschließlich in der Milz reguliert waren (siehe tabellarischer Anhang Tabelle 18 B) waren nur zwei Gene zu finden, die auch nach sechs Stunden in der Milz hoch reguliert waren: CD40 (*TNF Superfamily Member 5*) und KIF9 (*Kinesin Family Member 9*) und nur ein Gen, Il-22 (Interleukin-22), welches nach drei und nach neun Stunden reguliert war. Dafür waren sechs Gene zu späteren Zeitpunkten auch in der Lunge reguliert, wie Il-22, VIP (*Vasoactive Intestinal Peptide*), NR1D2 (*Nuclear Receptor Subfamily 1, Group D, Member 2*), GOS2 (*G0/G1 Switch 1*), NOS2 (*Nitric Oxide Synthase 2, inducible* auch iNOS) und KIF9. Hingegen waren innerhalb der 15 meist herunter regulierten „allgemeinen IRGs“ in der Milz acht Gene, die auch zu späteren Zeitpunkten in der Milz reguliert wurden: CYB1B1 (*Cytochrom P 450, Family 1, Subfamily B, Polypeptide 1*), ME1 (*Malic Enzyme 1, NADP+ Dependent, Cytosolic*), TSHB (*Thyreoid Stimulating Hormone Beta*), NFIL3 (*Nuclear Factor, Interleukin-3 regulated*) und SCRNI1 (*Secernin 1*) waren auch nach sechs Stunden in der Milz reguliert, LCAT (*Lecithin-Cholesterol Acyltransferase*), FKBP1B (*FK506 Binding Protein 1B*) und SFTPA1 (*Surfactant, Pulmonary Associated Protein A1*) waren auch nach sechs und neun Stunden reguliert. Dabei waren LCAT und NFIL3 auch zu späteren Zeitpunkten in der Lunge reguliert - wobei LCAT in der Lunge hoch reguliert war. Außerdem fällt bei den herunter regulierten „allgemeinen IRGs“ in der Milz auf, dass zu ihnen stärker herunter regulierte Gene zählen als zu den „allgemeinen

IRGs“ die in Milz und Lunge reguliert waren, wie MEOX1 (*Mesenchym Homobox 1*), das nach drei Stunden 22fach herunter reguliert war und SFTPA1, das nach drei Stunden 66fach herunter reguliert war, wobei die Regulation von SFTPA1 über die Behandlungszeiträume weiter, bis auf eine 436fache Herunter-Regulation nach neun Stunden, sank.

Ein ähnliches Regulationsmuster zeigt sich auch bei den „allgemeinen IRGs“ die drei Stunden nach IFN Injektion ausschließlich in der Lunge reguliert waren (siehe tabellarischer Anhang Tabelle 18 C). Innerhalb der hoch und herunter regulierten Gene waren fünf Gene auch zu späteren Zeitpunkten in der Lunge hoch reguliert: LEPR (*Leptin Receptor*), FGG (*Fibrinogen gamma Chain*), MT3 (*Metallothionein 3*), ASPA (*Asparacylase*) und CFI (*Complement Factor 1*) die auch nach sechs und neun Stunden hoch reguliert wurden und FABP1 (*Fatty Acid Binding Protein 1, Liver*) welches nach drei und neun Stunden hoch reguliert wurde. Dabei wurden zwei Gene auch in der Milz nach neun Stunden hoch reguliert: ASPA und LPTM4B (*Lysosomal Associated Protein Transmembrane 4 Beta*). Die Gene SNAP25 (*Synaptosomal Associated Protein*), WNT7A (*Wingless Type MMTV Integration Site Family, Member 7A*), EPB41 (*Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1*) waren in der Lunge auch nach sechs und neun Stunden herunter reguliert, wobei WNT7A auch in der Milz nach sechs und neun Stunden herunter reguliert war. TLR5 war nach drei und sechs Stunden in der Lunge herunter reguliert und SH3PXD2A (*SH3 and PX Domains 2A*) war nach drei und neun Stunden in der Lunge herunter reguliert. Auch in der Lunge fiel auf, dass mit TLR5 und SNAP25 die am stärksten herunter regulierten „allgemeinen IRGs“ ausschließlich in der Lunge zu finden waren.

Interessanterweise zeigte sich ein sehr ähnliches Bild bei den meist regulierten der „neu identifizierten IRGs“, die drei Stunden nach IFN Injektion in Milz und Lunge hoch reguliert waren (siehe tabellarischer Anhang Tabelle 18 D). Hier waren mit einer Ausnahme in Milz und Lunge (TULP1 (*Tubby Like Protein 1*)) und einem weiteren Gen in der Milz (MSC (*Musculin*)) alle zu allen Zeitpunkten reguliert, während innerhalb der herunter regulierten Genen nur neun Gene in der Milz auch zu späteren Zeitpunkten reguliert wurden, was auch auf sechs dieser Gene in der Lunge zutraf. Dabei stach das Gen LOC417981 (*Similar to Cytochrome P450 2D20*) dadurch heraus, dass es drei Stunden nach IFN Injektion in Milz und Lunge herunter reguliert war, nach sechs Stunden aber in beiden Organen hoch reguliert war.

Im Gegensatz zu den „allgemeinen IRGs“, die drei Stunden nach IFN Injektion ausschließlich in der Milz reguliert waren, sind auch innerhalb der hoch regulierten, aber auch der herunter regulierten „neu identifizierten IRGs“ die ausschließlich in der Milz reguliert waren (siehe tabellarischer Anhang Tabelle 18 E) die meisten Gene auch nach sechs und/oder neun Stunden reguliert. Ausnahme bildeten innerhalb der hoch regulierten Gene CSF3 (*Granulozyte*

Stimulating Growth Factor 3), RHD10 (*Retinol Dehydrogenase 10*), CACNA1C (*Calcium Channel, Voltage Dependent, L Type, Alpha 1C Subunit*), GBX2 (*Gastrulation Brain Homeobox 2*) und PKP2 (*Plakophilin*). Innerhalb der herunter regulierten Gene waren TMEM121 (*Transmembrane Protein 121*) und KCNA1 (*Potassium Voltage-Gated Channel, Shaker-Related Subfamily, Member 1*) nur nach drei Stunden reguliert. Die in der Milz hoch regulierten Gene CSF3, LIP1 (*Lipase Member 1*) und RHD10 waren zu späteren Zeitpunkten auch in der Lunge hoch reguliert. Das in der Milz herunter regulierte Gen MMP-13 (*Matrix Metalloproteinase 13*), wurde in der Lunge nach neun Stunden 2fach hoch reguliert. Auch bei den meist herunter regulierten „neu identifizierten IRGs“ in der Milz fiel auf, dass über die Hälfte der Gene stärker herunter reguliert wurden, als innerhalb der meist herunter regulierten „neu identifizierten IRGs“ in Milz und Lunge.

Innerhalb der 15 meist hoch und herunter regulierten „neu identifizierten IRGs“ die ausschließlich in der Lunge reguliert wurden (siehe tabellarischer Anhang Tabelle 18 F) waren alle hoch regulierten Gene auch zu späteren Zeitpunkten reguliert, außer die drei Gene UCP3 (*Uncoupling Protein 3*), B3GALT2 (*UDP-Gal:betaGlcNAc b 1,3-Galactosyltransferase, Polypeptide 2*) und LOC423536 (*Similar to Potassium Channel, Subfamily K, Member 16*). Dabei waren zwei dieser Gene nach sechs Stunden auch in der Milz reguliert: B3GALT2 war dabei in der Milz 2fach herunter reguliert und LOC423536 2fach hoch reguliert. Das Gen DMBT1 (*Deleted in Malignant Brain Tumors 1*) war neben der über alle Zeitpunkte 5fachen Hoch-Regulation in der Lunge, in der Milz nach neun Stunden 2fach hoch reguliert. Bei den herunter regulierten Genen waren hingegen nur drei Gene auch zu späteren Zeitpunkten reguliert. Dabei war NES (*Nestin*) und LOC421332 auch nach sechs Stunden herunter reguliert und LIMCH1 (*LIM and Calponin Domain 1*) auch nach sechs und neun Stunden herunter reguliert. TCF15 (*Transcription Factor 15*) war auch in der Milz sechs Stunden nach IFN Injektion reguliert. Mit dem 15fach herunter regulierten Gen LOC421332 war eines der am stärksten herunter regulierten Gene in der Lunge in dieser Gruppe zu finden.

Insgesamt war feststellbar, dass der überwiegende Anteil der hoch regulierten IRGs die in Milz und Lunge reguliert waren, auch nach sechs und/oder neun Stunden reguliert waren, der Anteil bei den herunter regulierten Genen in Milz und Lunge war geringer, unabhängig davon ob sie zu den „allgemeinen IRGs“ oder „neu identifizierten IRGs“ zählten. Bei den Genen die ausschließlich in Milz oder Lunge reguliert waren und zu den „allgemeinen IRGs“ zählen, war der überwiegende Teil nur nach drei Stunden signifikant reguliert - jedoch waren einige dieser Gene im jeweils anderen Organ zu späteren Zeitpunkten reguliert. Anders sah es bei den „neu identifizierten IRGs“ aus: Hier waren in der Milz sowohl unter den hoch regulierten als auch

unter den herunter regulierten Genen der überwiegende Teil auch zu späteren Zeitpunkten reguliert, ebenso wie bei den hoch regulierten „neu identifizierten IRGs“ in der Lunge. Die herunter regulierten „neu identifizierten IRGs“ in der Lunge waren hauptsächlich nur nach drei Stunden reguliert. Auch innerhalb der „neu identifizierten IRGs“ die ausschließlich in der Milz oder in der Lunge reguliert waren, fanden sich zahlreiche Gene, die zu späteren Zeitpunkten auch im jeweilig anderen Organ reguliert wurden. Auffällig war zudem, dass bei den herunter regulierten „allgemeinen IRGs“ die ausschließlich in Milz oder Lunge reguliert waren, die am stärksten herunter regulierten Gene zu finden waren. Die am stärksten hoch regulierten „allgemeinen IRGs“ waren hingegen bei den in Milz und Lunge gemeinsam regulierten Genen zu finden. Auch unter den „neu identifizierten IRGs“ in der Milz waren die am stärksten herunter regulierten Gene zu finden. Die am stärksten hoch und herunter regulierten „neu identifizierten IRGs“ in der Lunge und die am stärksten hoch regulierten „neu identifizierten IRGs“ in der Milz waren unter den Genen zu finden, die in Milz und Lunge reguliert waren.

5.5.2.4 Weitere funktionelle Analysen der Gengruppen nach IFN Behandlung

Mit den folgenden Analysen sollten die „allgemeinen IRGs“ und insbesondere auch die „neu identifizierten IRGs“ näher charakterisiert werden. Bei der Analyse von Datensätzen aus Mikroarrays wird nach dem in Abbildung 14 dargestellten Schema vorgegangen. Die Daten werden in unterschiedlichste Richtungen analysiert und aus den einzelnen Analysen werden Folgerungen gezogen. Diese Folgerungen werden anschließend miteinander in Beziehung gesetzt, um die Frage zu beantworten welche biologische Prozesse, Signalkaskaden und Zellantworten in den Organen Milz und Lunge durch die IRGs beeinflusst werden und in welchem Zusammenhang diese Prozesse zueinander stehen.

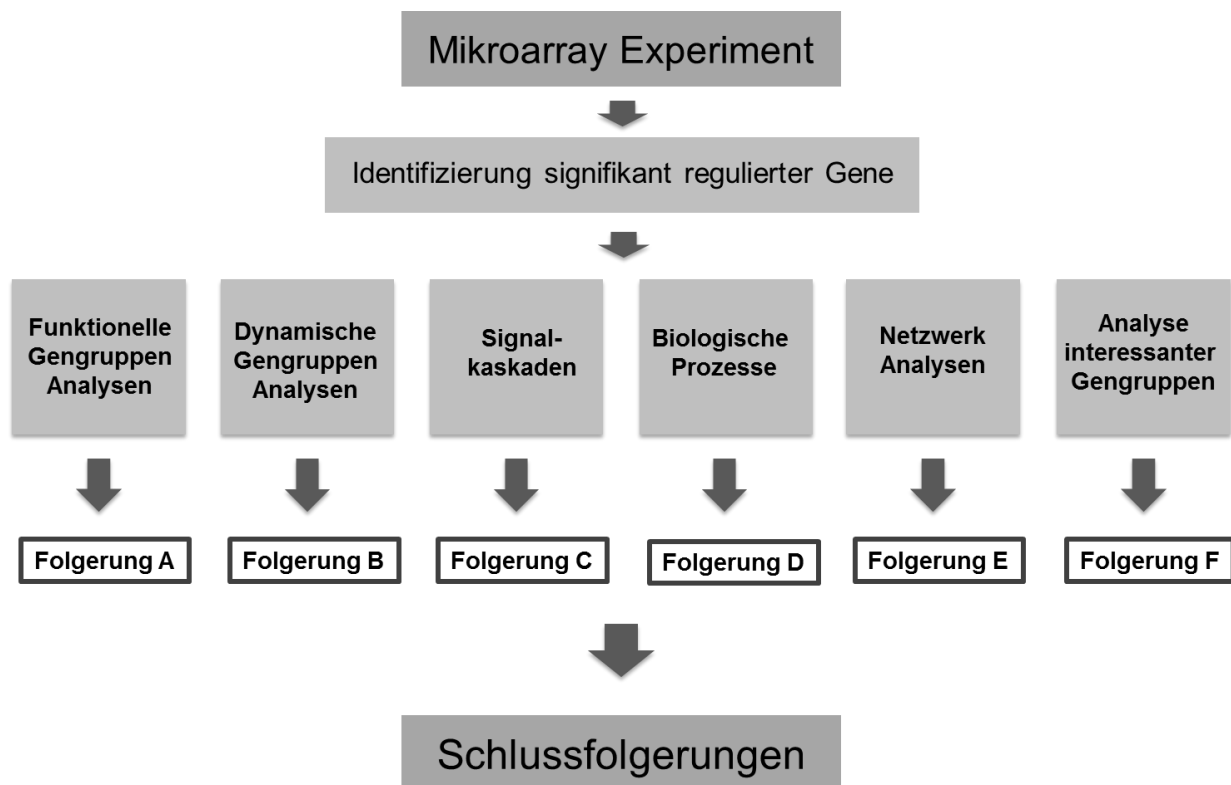


Abbildung 14 Schema einer Mikroarray Analyse

Funktionelle Gengruppen Analysen

Mit der Panther Gene List Analysis wurden die verschiedenen Gruppen der „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ in funktionelle Untergruppen eingeteilt, um herauszufinden, ob sich die Gene der einzelnen Datensätze hinsichtlich ihrer Funktionalität unterscheiden (siehe tabellarischer Anhang Tabelle 19). Dabei gibt es drei große funktionelle Gruppen „Molecular Function“, „Biological Process“ und „Cellular Component“, die sich wiederum in funktionelle Untergruppen aufteilen lassen.

Die Analyse ergab folgende Ergebnisse. Zwischen 31 und 50% der signifikant regulierten Gene konnten mit Panther Gene Analysis eingeordnet werden. Das Gen der Gruppe „allgemeine IRGs“ welches in der Milz hoch und in der Lunge herunter reguliert war (EGFR), konnte keiner funktionellen Gruppe zugeordnet werden, ebenso wenig wie HNMT, welches in der Milz herunter und in der Lunge hoch reguliert wurde. Die funktionellen Gruppen „Molecular Function“, „Biological Process“ und „Cellular Component“ konnten in allen außer einem Datensatz gefunden werden, da dem Gen aus der Gruppe der „neu identifizierten IRGs“ welches in der Milz negativ und in der Lunge positiv reguliert war (ST3GAL5), keine funktionelle Untergruppe in „Cellular Component“ zugeordnet werden konnte.

Betrachtet man die Untergruppen der funktionellen Gruppen genauer, stechen folgende Auffälligkeiten ins Auge: Innerhalb von „Molecular Function“ findet man unter „Receptor Activity“ in beiden „Lungen“ Datensätzen prozentual mehr als doppelt so viele herunter regulierte wie hoch regulierte Gene. Dabei sind die Verhältnisse der anderen Datensätze annähernd ausgeglichen. „Enzym Regulator Activity“ enthält in den Datensätzen „Milz und Lunge“ und „Milz“ der „allgemeinen IRGs“ nur hoch regulierte Gene, alle anderen Datensätze enthalten hoch und herunter regulierte Gene. „Transcription Regulator Activity“ enthält in allen Datensätzen prozentual mindestens doppelt so viel hoch regulierte Gene, außer der Datensatz „Milz“ der „allgemeinen IRGs“, der ausschließlich herunter regulierte Gene enthält. „Ion Channel Activity“ wurde nur in den Datensätzen der „neu identifizierten IRGs“ gefunden und die funktionelle Untergruppe „Translation Regulator Activity“ und „Motor Activity“ nur im Datensatz „Milz“ der „neu identifizierten IRGs“.

Innerhalb von „Biological Process“ fällt bei näherer Betrachtung der funktionellen Untergruppe folgendes auf: „Cell Communication“ enthält überall außer im Datensatz „Milz und Lunge“ der „allgemeinen IRGs“ und „Milz“ der „neu identifizierten IRGs“ prozentual deutlich mehr herunter regulierte Gene, während im Datensatz „Milz und Lunge“ der „allgemeinen IRGs“ deutlich mehr hoch regulierte Gene sind und im Datensatz „Milz“ der „neu identifizierten IRGs“ das Verhältnis an hoch regulierten und herunter regulierten Genen annähernd ausgeglichen ist. Ähnliches fällt für die funktionelle Untergruppe „Cellular Process“ auf. Auch hier ist in allen Datensätzen ein höherer Anteil an herunter regulierten Genen zu finden, außer im Datensatz „Milz“ der „neu identifizierten IRGs“, indem das Verhältnis ausgeglichen ist. Ebenso „System Process“. Auch hier ist ein doppelt so hoher Anteil an herunter regulierten Genen in allen Datensätzen, außer in den Datensätzen beider „Milz“ Gruppen, in denen das Verhältnis an hoch und herunter regulierten Genen wiederum annähernd ausgeglichen ist. Auch für „Cell Adhesion“ fällt Ähnliches auf. Alle Datensätze der „neu identifizierten IRGs“ und der Datensatz „Lunge“ der „allgemeinen IRGs“ enthalten prozentual deutlich mehr herunter regulierte Gene. Ausnahmen bilden der Datensatz „Milz“ der „allgemeinen IRGs“, indem der Anteil an hoch und herunter regulierten Genen annähernd ausgeglichen ist und der Datensatz „Milz und Lunge“ der „allgemeinen IRGs“, indem nur hoch regulierte Gene zu finden sind. Die im Zusammenhang mit der Untersuchung der IFN-Antwort interessante funktionelle Untergruppe „Response to Stimulus“ zeigt in fast allen Abfragen ausgewogene Anteile an hoch und herunter regulierten Genen. Gene der Datensätze „Milz und Lunge“ fallen etwas aus dem Rahmen. In ihnen findet man deutlich mehr hoch regulierte Gene als herunter regulierte Gene und insgesamt höhere Anteile an Genen als in den anderen Datensätzen.

In der im oben genannten Zusammenhang interessanten funktionellen Untergruppe „Immune System Process“ findet man in den Datensätzen „Milz und Lunge“ und „Milz“ der „allgemeinen IRGs“, sowie in „Milz und Lunge“ und „Lunge“ der „neu identifizierten IRGs“ prozentual deutlich mehr positiv regulierte Gene, jedoch sind im Datensatz „Lunge“ der „allgemeinen IRGs“ prozentual deutlich mehr negativ regulierte Gene. Im Datensatz „Milz“ der „neu identifizierten IRGs“ ist das Verhältnis ausgeglichen. „Regulation of biological Process“ beinhaltet nur Gene der Datensätze „neu identifizierte IRGs“ von „Milz und Lunge“ und „Lunge“. „Generation of Precursor Metabolites and Energy“ und „Localization“ findet man in allen Datensätzen der „neu identifizierten IRGs“ und dem Datensatz „Lunge“ der „allgemeinen IRGs“. Die meisten mittels Panther gefundenen Gene finden sich in „Cell Communication“ und „Cellular Process“, die vor allem Zytokine und Chemokine enthalten, wieder.

Innerhalb von „Cellular Component“ sind in „Protein Complex“ in den beiden Datensätzen „Milz“ und „Lunge“ der „allgemeinen IRGs“ und dem Datensatz „Milz und Lunge“ der „neu identifizierten IRGs“ nur herunter regulierte Gene zu finden, in den Datensätzen „Milz“ und „Lunge“ der „neu identifizierten IRGs“ jedoch nur hoch regulierte IRGs. „Plasma Membrane“ beinhaltet im Datensatz „Milz“ der „allgemeinen IRGs“ und „Milz und Lunge“ der „neu identifizierten IRGs“ nur herunter regulierte Gene. Im Datensatz „Milz“ der „neu identifizierten IRGs“ sind nur hoch regulierte Gene innerhalb dieser funktionellen Gruppe zu finden. In „Ribonucleoprotein Complex“ sind im Datensatz „Lunge“ der „allgemeine IRGs“ und im Datensatz „Lunge und Milz“ der „neu identifizierten IRGs“ nur hoch regulierte Gene zu finden, im Datensatz „Milz“ der „neu identifizierten IRGs“ nur herunter regulierte IRGs.

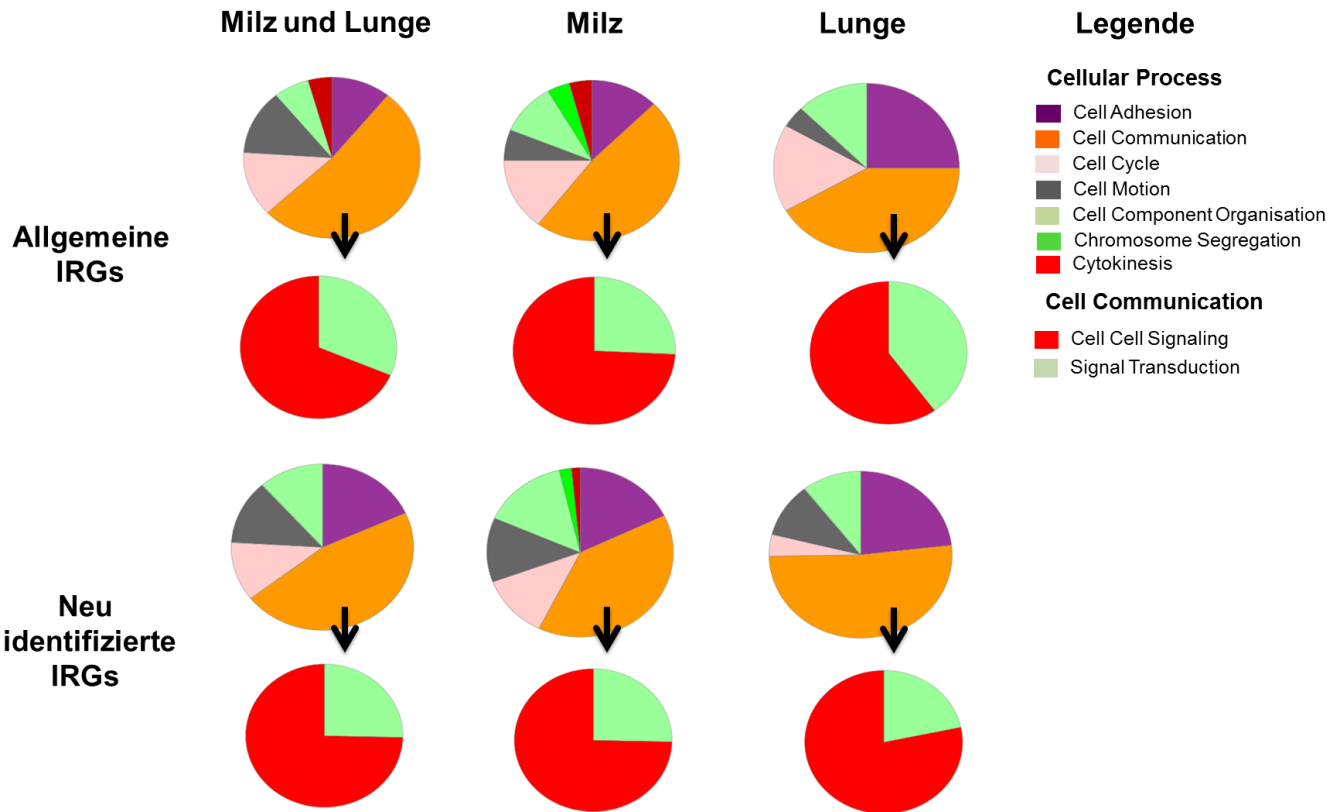
Vergleicht man die Einteilung „allgemeiner IRGs“ und „neu identifizierter IRGs“ unabhängig von ihrer Organspezifität, fällt auf, dass insbesondere in „Molecular Function“ „neu identifizierte IRGs“ in mehr funktionelle Untergruppen eingeteilt werden konnten. „Ion Channel Activity“, „Translation Regulator Activity“ und „Motor Activity“ erscheinen nur in Datensätzen der „neu identifizierten IRGs“, während es unter den „allgemeinen IRGs“ keine funktionelle Untergruppe gibt, die nicht bei den „neu identifizierten IRGs“ vorkommt. Bei „Biological Process“ sieht man diesbezüglich Ähnliches, da „Regulation of biological Process“, „Generation of Precursor Metabolites and Energy“ und „Localization“ innerhalb der „allgemeinen IRGs“ jeweils nur in einem Datensatz reguliert sind, während sie innerhalb der „neu identifizierten IRGs“ im Fall von „Generation of Precursor Metabolites and Energy“ und „Localization“ in allen drei Datensätzen erscheinen und im Fall von „Regulation of biological Process“ in zwei der drei Datensätzen. Bei „Cellular Component“ ist Ähnliches für „Protein Complex“, „Plasma Membrane“ und „Ribonucleoprotein Complex“ feststellbar, da diese

funktionellen Untergruppen in ein bis zwei (im Fall von „Protein Complex“) Datensätzen der „allgemeinen IRGs“ zu finden sind, während sie innerhalb der „neu identifizierten IRGs“ in zwei (im Fall von „Ribonucleoprotein Complex“) bzw. allen Datensätzen zu finden sind. Des Weiteren scheint innerhalb „Molecular Function“ bei den „allgemeinen IRGs“ der Anteil der Gene, die in „Binding“ und „Transcription Regulator Activity“ eingeteilt wurden, höher zu sein als bei den „neu identifizierten IRGs“, während umgekehrt bei den „neu identifizierten IRGs“ ein höherer Anteil an Genen die in „Transporter Activity“ eingeteilt wurden, vorzukommen scheint. Bei „Biological Process“ scheint ein höherer Anteil an Genen in „Apoptosis“ und „Immune System Process“ den „allgemeinen IRGs“ zugeordnet werden zu können als den „neu identifizierten IRGs“.

Vergleicht man die Anteile der Gene die in Milz und Lunge bzw. ausschließlich in Milz oder Lunge reguliert wurden, unabhängig davon, ob sie zu den „allgemeinen IRGs“ oder „neu identifizierten IRGs“ zählen und ob sie hoch oder herunter reguliert sind, miteinander, fällt innerhalb von „Biological Process“ auf, dass in der Lunge im Durchschnitt höhere Anteile in „Cell Communication“, „Transport“, „System Process“ und „Cell Adhesion“ zu finden sind, als in der Milz und in Milz und Lunge, während in „Metabolic Process“ anteilmäßig weniger Gene in der Lunge sind als in der Milz und in Milz und Lunge. Hingegen sind durchschnittlich in „Response to Stimulus“ anteilmäßig die meisten Gene in Milz und Lunge zu finden..

Da die funktionellen Untergruppen „Cell Communication“, „Cellular Component“, „Immune System Process“ und „Response to Stimulus“ aufgefallen sind, wurden diese Gruppen näher betrachtet (siehe Abbildung 15). Hierfür wurden von jedem Datensatz hoch und herunter regulierte Gene gemeinsam analysiert (siehe Abbildung 15 und Tabelle 20). Bei näherer Betrachtung von „Cellular Process“ und „Cellular Communication“ konnte man feststellen, dass sich „Cellular Process“ in weitere Untergruppen unterteilen lässt, unter anderem auch in „Cellular Communication“, die sich wiederum in zwei Untergruppen unterteilen lässt. Insbesondere in „Cell Communication“ und ihren Untergruppen finden sich zahlreiche Zytokine und Chemokine. Dabei liegt der Anteil an „Cell Communication“ mit 39-52% der in „Cellular Process“ relevanten Gene in allen Datensätzen recht hoch, wobei er mit 52% bei den „allgemeinen IRGs“ in Milz und Lunge und den „neu identifizierten IRGs“ in der Lunge am höchsten ist. Eine fokussierte Analyse der regulierten Chemokine und Zytokine wird in 5.5.2.5 abgehandelt.

A



B

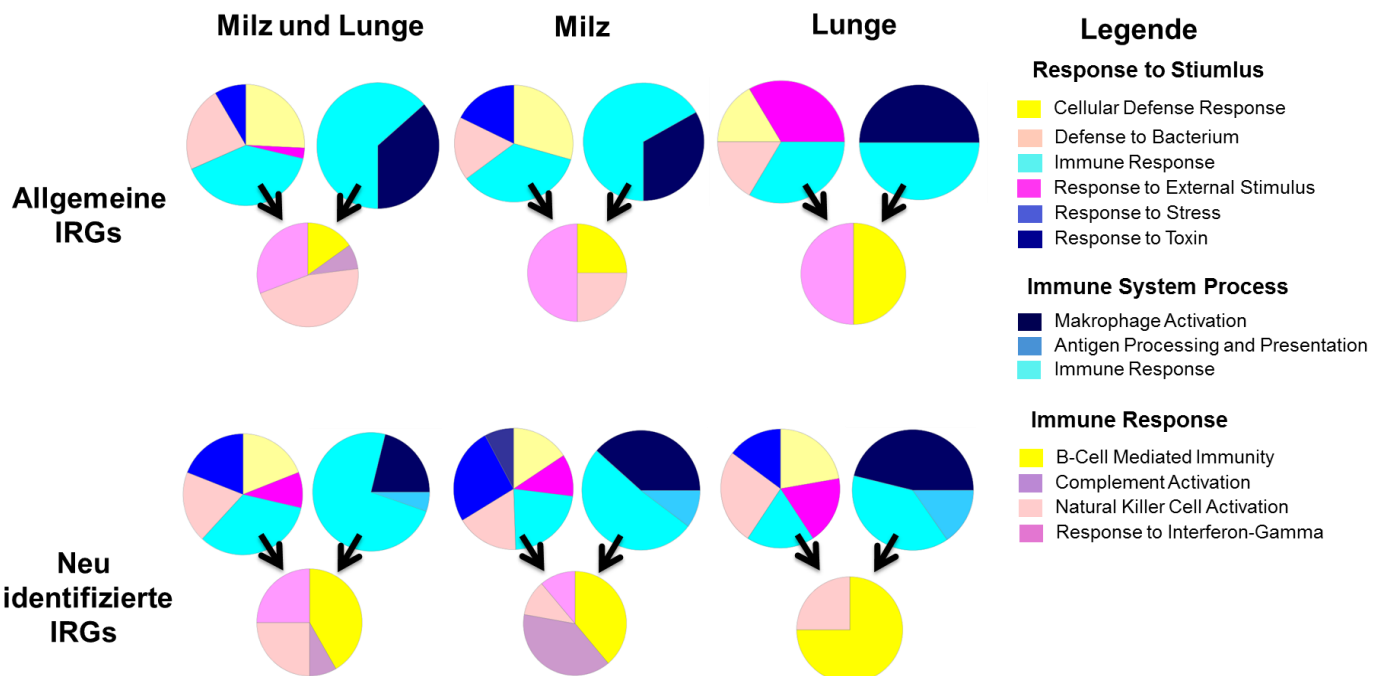


Abbildung 15 Ausgewählte funktionellen Untergruppen nach IFN Injektion

Dargestellt sind die prozentualen Zusammensetzungen von (A) „Cellular Process“ und „Cell Communication“ und (B) „Response to Stimulus“, „Immune System Process“ und „Immune Response“ aller Gene der einzelnen Gruppen. (A) In jeder Gruppe entspricht das obere Kreisdiagramm „Cellular Process“ und das untere Kreisdiagramm „Cell Communication“, welches einen Anteil von „Cellular Process“ bildet. (B) In jeder Gruppe entspricht das linke obere Kreisdiagramm „Response to Stimulus“, das rechte obere „Immune System Process“. Einen Anteil dieser beider Kreisdiagramme bildet „Immune Response“, dargestellt als das untere Kreisdiagramm. Die entsprechenden Prozentangaben sind in Tabelle 20 verzeichnet.

Die nähere Betrachtung von „Response to Stimulus“ und „Immune System Process“ enthüllte, dass sich nach IFN Injektion „Response to Stimulus“ in fünf bis sechs weitere Untergruppen unterteilen lässt und „Immune System Process“ in zwei oder drei. Alle gefundenen Untergruppen sind relevant bei einer Immunantwort und bei „Immune System Process“ scheinen neben „Immune Response“ auch die Makrophagen Aktivierung von Bedeutung zu sein, da besonders in der Lunge ein großer Teil der Gene „Makrophage Activation“ zugeordnet wird. Außerdem konnten unter den „neu identifizierten IRGs“ auch Gene gefunden werden, die in „Antigen Processing and Presentation“ eingeordnet werden - nicht aber bei den „allgemeinen IRGs“. Ein großer Anteil der Gene wird in allen analysierten Datensätzen „Immune Response“ zugeordnet, die sowohl bei „Response to Stimulus“ als auch bei „Immune System Process“ eine Rolle spielt. „Immune Response“ setzt sich nach IFN Injektion je nach Gewebe aus zwei bis vier Untergruppen zusammen. Dabei konnten in den Untergruppen teilweise nicht viele Gene gefunden werden und die Zusammensetzung ist sehr unterschiedlich. Während bei den „allgemeinen IRGs“ in Milz und Lunge „Natural Killer Cell Activation“ und „Response to IFN Gamma“ im Vordergrund stehen, scheint unter den „allgemeinen IRGs“ in der Milz „Response to IFN Gamma“ besonders relevant, jedoch auch „Natural Killer Cell Activation“ und „B-Cell Mediated Immunity“. Unter den „neu identifizierten IRGs“ in Milz und Lunge werden die meisten der gefundenen Gene in „B-Cell Mediated Activation“ und einige in „Natural Killer Cell Activation“ und „Response to IFN Gamma“ eingeteilt. Die „neu identifizierten IRGs“ in der Milz hingegen werden vor allem in „B-Cell Mediated Activation“ und „Complement Activation“ eingeteilt, während von den „neu identifizierten IRGs“ in der Lunge nur ein Gen (C17orf60) in „Natural Killer Cell Activation“ gefunden werden kann und der Hauptteil in „B-Cell Mediated Activation“(C17orf60, ALOX5AP und PHLDB1).

Eine Liste der Gene die in die verschiedenen funktionellen Gruppen und ihren Untergruppen eingeteilt wurden, ist auf beiliegender CD, Mappe 1, Tabellen 33-44, Tabellenbeschriftung siehe Tabellenverzeichnis zu finden.

Zusammenfassend fällt auf, dass der Datensatz „Milz und Lunge“ der „allgemeinen IRGs“ die geringste Vielfalt an funktionellen Untergruppen aufweist, während der entsprechende Datensatz der „neu identifizierten IRGs“ wesentlich diverser ist und sich in ihm alle funktionellen Untergruppen finden. Einige funktionelle Untergruppen sind nur in bestimmten Datensätzen zu finden, andere zeigen Auffälligkeiten durch die Verteilung von hoch und herunter regulierten Genen in den verschiedenen Datensätzen. Besonders deutlich tritt hervor, dass die meisten von Panther gefunden Gene der Datensätze in „Cellular Process“ und „Cell Communication“, die viele Zytokine und Chemokine enthalten, eingeteilt wurden. Ähnliches

fällt für die in Milz und Lunge positiv regulierten Gene bei „Immune System Process“ und „Response to Stimulus“ auf. Diese Auffälligkeiten müssen mit den Ergebnissen weiterer funktioneller Analysen in Zusammenhang gebracht werden, um genauer interpretiert werden zu können.

Dynamische Gengruppen Analyse (MeV)

Um die Expressionsprofile der drei Stunden nach IFN Injektion signifikant regulierten Gene über alle Behandlungszeiträume zu untersuchen, wurden die verschiedenen Datensätze der „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ mit dem Multi Experiment Viewer (MeV) analysiert. Die von MeV identifizierten „Expressionsprofil-Gruppen“ wurden miteinander verglichen und in ähnliche Expressionsmuster zusammengefasst. Dabei konnten die in Abbildung 16 anhand eines Beispiels dargestellten neun Gruppen von Expressionsprofilen identifiziert werden. Tabelle 10 enthält eine Übersicht über die Anzahl der Gene der einzelnen Datensätze, die in diesen Expressionsprofilen gefunden werden konnten.

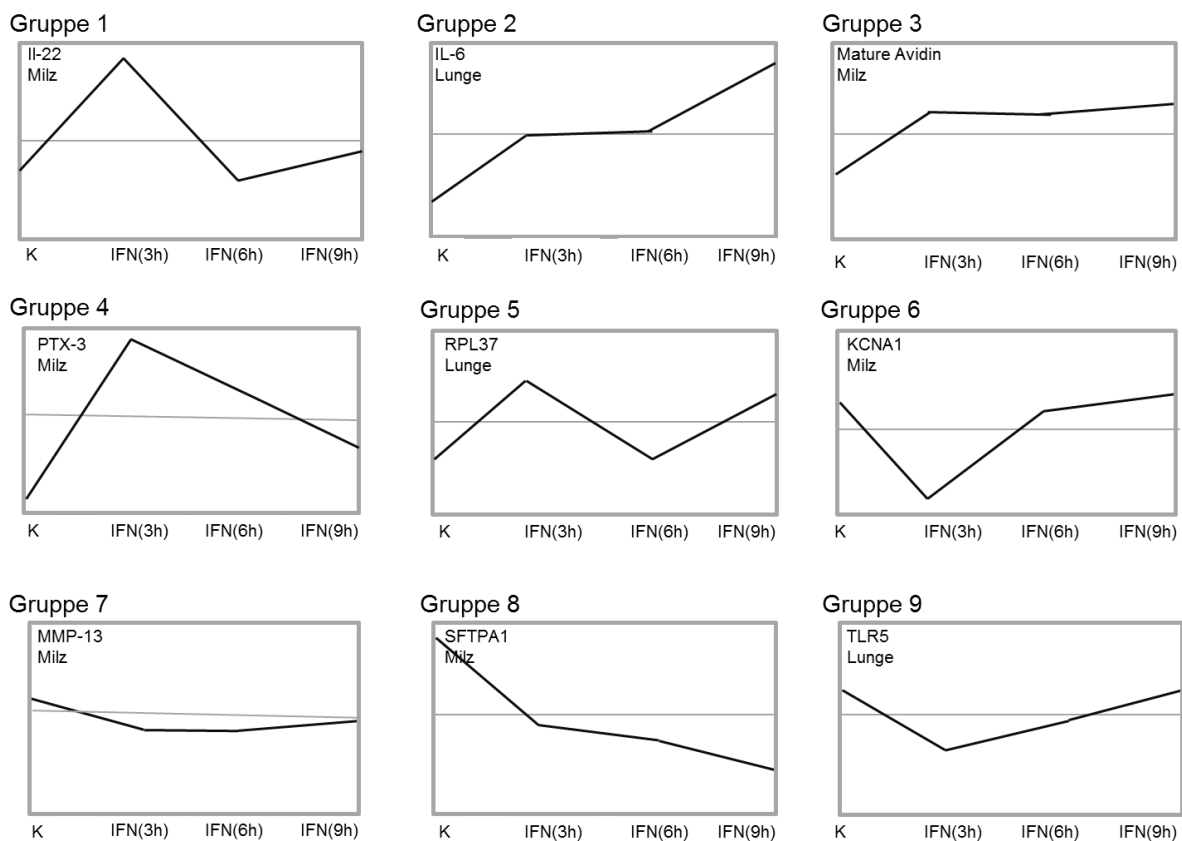


Abbildung 16 Expressionsprofile nach IFN Injektion

Die verschiedenen Datensätze der „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ wurden mit dem Programm MeV hinsichtlich ihrer Expressionsmuster über alle Behandlungszeiträume untersucht. Dargestellt ist exemplarisch ein Gen jedes gefundenen Expressionsprofils. Die y-Achse zeigt die medianisierte Signalintensität jedes Gens, die von maximal -4 über 0 bis +4 reicht. Die x-Achse zeigt die Tiergruppen.

Das Ergebnis der MeV Analyse zeigt, dass Gene aller Datensätze der „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ die in Gruppe 1, 3, 4, 6 und 7 dargestellten Expressionsprofile aufwiesen. Dies bedeutet, dass Gene die in Milz und Lunge reguliert waren, sowie Gene die ausschließlich in der Lunge und in der Milz reguliert waren, nach drei Stunden einen deutlichen Expressionsunterschied zu allen anderen Tiergruppen zeigten (Gruppe 1 und Gruppe 6) und dass zudem in allen Datensätzen Gene vorkamen, deren Expressionsunterschied zur Kontrollgruppe sowohl bei den hoch regulierten Genen, als auch bei den herunter regulierten Genen über die Behandlungszeiträume ähnlich stark blieb (Gruppe 3 und 7). In allen Datensätzen konnten außerdem hoch regulierte Gene gefunden werden, die nach drei Stunden stark exprimiert wurden um dann im weiteren Zeitverlauf schwächer exprimiert zu werden (Gruppe 4), wobei dies bei den „allgemeinen IRGs“ innerhalb der Gene die in Milz und Lunge reguliert wurden mit Ausnahme der Milz nur sehr wenige Gene waren. Bei den Genen, die in Milz und Lunge reguliert wurden, fiel insbesondere in der Lunge, aber auch für acht Gene in der Milz, ein weiteres Expressionsprofil auf: Die Gene, die das Expressionsprofil Gruppe 2 aufzeigten, zeigten drei und sechs Stunden nach Behandlung mit rek ChIFN- α einen mittleren Expressionsunterschied zur Kontrollgruppe, welcher neun Stunden nach Behandlung mit rek ChIFN- α noch weiter anstieg. Bei genauerer Betrachtung stellte man fest, dass bei den „allgemeinen IRGs“ dabei sechs dieser Gene in der Milz den Expressionsprofilen 1 oder 4 zugeordnet wurden, also nach drei Stunden stark reguliert wurden und nach sechs und neun Stunden schwächer oder gar nicht mehr reguliert wurden. Nur das Expressionsprofil von LBA1 (*Lupus Brain Antigen 1*) blieb in der Milz auf einem andauernd ähnlichen Expressionsniveau. Bei den „allgemeinen IRGs“ gehören zu den auf diese Weise exprimierten Genen unter anderem Il-1B, Il-6 und IFN- γ , die alle zu der Gruppe der Zytokine gehören und CCL4 und Il-8 welche zu der Gruppe der Chemokine gehören. Mit CXCL13L2 (*Chemokine (C-X-C motif) Ligand 13*), ah221, K60 (*CXCLi1*), K203 (*Chicken CCLi3*) und Il-13RA2 gehören auch einige Chemokine bzw. ein Zytokin Rezeptor zu dieser Gruppe. Bei den „neu identifizierten IRGs“, die in Milz und Lunge reguliert waren, wurden 6 der 24 Gene, die in der Lunge diesem Expressionsprofil 2 zugeordnet wurden, auch in der Milz auf ähnliche Weise exprimiert. Neun weitere Gene wurden in der Milz Gruppe 4 zugeordnet, zwei weitere Gruppe 1. Zudem wurden sieben dieser Gene in der Milz über den Behandlungszeitraum ähnlich stark exprimiert (Gruppe 3). Die zwei verbliebenen Gene, die in der Milz Gruppe 2 zugeordnet wurden, wurden in der Lunge Gruppe 3 zugeordnet (P20K (*Quisence Specific Protein*) und S100A9 (*S100 Calcium binding Protein A9*)). Gruppe 5 stellte ein interessantes Expressionsprofil dar, welches in allen Datensätzen außer in der Milz innerhalb der „allgemeinen IRGs“ die in Milz und Lunge zu finden waren, vorkam. Gruppe 5 enthielt hoch regulierte Gene, die nach drei Stunden und nach

neun Stunden verstärkt exprimiert wurden, nicht aber nach sechs Stunden, wie das Beispiel RPL37 (*Ribosomal Protein L37*) zeigt. Zwei weitere Expressionsprofile, die vor allem bei den herunter regulierten „neu identifizierten IRGs“ in der Milz gefunden werden konnten, aber vereinzelt auch in anderen Datensätzen, stellen die Gruppen 8 und 9 dar. Dabei zählen zu Gruppe acht Gene, die über den Behandlungsverlauf immer stärker herunter reguliert wurden, wie SFTPA1, welches nach drei Stunden 66fach, nach sechs Stunden 130fach und nach neun Stunden 436fach herunter reguliert wurde. In Gruppe 9 fanden sich hingegen herunter regulierte Gene, deren Expression über die Behandlungszeit schwächer wurde, wie TLR5, das nach drei Stunden in der Lunge 18fach, nach sechs Stunden jedoch nur noch 4fach herunter reguliert wurde.

Eine Übersicht der in den einzelnen Gruppen enthaltenen Gene ist auf beiliegender CD, Mappe 1, Tabellen 45-50 zu finden, Tabellenbeschriftung siehe Tabellenverzeichnis.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die MeV Analyse neun klar definierte Expressionsprofile über die Behandlungszeiträume mit rek ChIFN- α zeigt, von denen fünf in allen Datensätzen gefunden werden konnten. Es scheint, als ob bestimmte Gengruppen wie die Zytokine und Chemokine verstärkt bestimmte Expressionsprofile aufweisen (Gruppe 1-4).

Tabelle 10 Gene in den Expressionsprofilen nach IFN Injektion

Übersicht über das Vorkommen von in Abbildung 15 dargestellten Expressionsprofilen in den verschiedenen Datensätzen der „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“. Hinter der Gesamtzahl der Gene eines Profils ist ihr Anteil in Klammern in Prozent angegeben.

Expressionsprofil	Gesamtzahl	Allgemeine IRGs				Neu identifizierte IRGs			
		Milz und Lunge		Milz	Lunge	Milz und Lunge		Milz	Lunge
		Milz	Lunge			Milz	Lunge		
Gruppe 1	900 (32,5)	53	30	86	29	136	80	326	160
Gruppe 2	39 (1,4)	0	7	0	0	8	24	0	0
Gruppe 3	317 (11,5)	27	51	8	12	63	108	45	3
Gruppe 4	156 (5,6)	28	2	1	2	34	7	23	59
Gruppe 5	98 (3,5)	1	20	1	8	0	35	8	25
Gruppe 6	798 (28,9)	10	11	42	12	83	88	460	92
Gruppe 7	399 (14,4)	4	1	24	4	39	23	280	24
Gruppe 8	20 (0,7)	0	0	1	0	2	0	17	0
Gruppe 9	38 (1,4)	0	0	3	2	1	2	30	0

Pathway Express

Durch das Programm Pathway Express ist es möglich, biologisch relevante Signalwege in einem Datensatz zu identifizieren. Die Datensätze der „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ drei Stunden nach Injektion von rek ChIFN- α wurden mit Pathway Express analysiert, um zwischen den Gengruppen Unterschiede in der Signaltransduktion zu identifizieren. Insgesamt konnten 78 biologisch relevante Signalkaskaden gefunden werden. Sie sind auf beiliegender CD in Mappe 1, Tabelle 51 zu finden. Da die IFN-Antwort des Huhns untersucht werden sollte, wurden die im Immunsystem biologisch relevanten Signalkaskaden ausgewählt und in Tabelle 11 dargestellt.

Die Analyse zeigte, dass die einzelnen Datensätze in unterschiedliche und gemeinsame biologisch relevante Signalkaskaden einteilbar waren. Dabei wurden manche Signalkaskaden exklusiv in einer Gruppe reguliert und andere in den unterschiedlichsten Zusammensetzungen gemeinsam reguliert. Mit „Cytokine-cytokine receptor interaction“, „MAPK signaling pathway“, „Toll-like receptor signaling pathway“, „Jak-STAT signaling pathway“, „TGF beta signaling pathway“ und „Apoptosis“ zählen wichtige immunologisch relevante Signalkaskaden zu den meist biologisch relevanten Signalkaskaden.

Es konnte keine Signalkaskade gefunden werden, die bei allen analysierten Datensätzen gemeinsam biologisch relevant reguliert wurde, aber „Complement and Coagulation Cascade“ war bei allen Gruppen außer im Datensatz „Milz“ der „neu identifizierten IRGs“ reguliert. „PPAR Signaling Cascade“ war ausschließlich bei beiden Datensätzen der Gruppe „Milz“ reguliert.

Auch konnte keine Signalkaskade gefunden werden, die ausschließlich bei allen drei Gruppen der „neu identifizierten IRGs“ reguliert war. Allerdings wurde die Signalkaskade „Calcium signaling pathway“ ausschließlich innerhalb zweier Gruppen der „neu identifizierten IRGs“ gefunden: in den Gruppen „Milz und Lunge“ und „Lunge“, wobei sie im Datensatz „Milz und Lunge“ zu den biologisch relevantesten Signalwegen zählte.

Tabelle 11 Biologisch relevante Signalwege nach IFN Injektion

Dargestellt sind die in immunologischen Prozessen biologisch relevanten Signalwege in den Datensätzen der „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ und der entsprechende *corrected gamma p-value*. Als biologisch relevant wurde ein *corrected gamma p-value* von <0,5 angesehen. Je niedriger dieser ist, desto höher die biologische Relevanz des Signalwegs. Die *corrected gamma p-values* der drei Signalwege mit der höchsten biologischen Relevanz jedes Datensatzes sind rot geschrieben.

Name des Signalwegs	Allgemeine IRGs			Neu identifizierte IRGs		
	Milz und Lunge	Milz	Lunge	Milz und Lunge	Milz	Lunge
Ubiquitin mediated proteolysis	0.0940	-	-	-	-	-
Regulation of autophagy	0.4275	-	-	-	-	-
Cell cycle	-	0.0881	-	-	-	-
Adherens junction	-	0.4889	-	-	-	-
Mismatch repair	-	-	0.2534	-	-	-
Homologous recombination	-	-	0.3446	-	-	-
DNA replication	-	-	0.3545	-	-	-
Antigen processing and presentation	-	-	0.3646	-	-	-
SNARE interactions in vesicular transport	-	-	0.3929	-	-	-
Nucleotide excision repair	-	-	0.4194	-	-	-
Tight junction	-	-	-	-	0.2365	-
Phosphatidylinositol signaling system	-	-	-	-	-	0.0952
Hedgehog signaling pathway	-	-	-	-	-	0.3308
mTOR signaling pathway	-	-	-	-	-	0.3308
Regulation of actin cytoskeleton	0,2824	0,3485	-	-	-	-
p53 signaling pathway	0,3069	0,3485	-	-	-	-
Apoptosis	4x10⁻¹¹	0.0059	0,1640	-	-	-
Natural killer cell mediated cytotoxicity	0.1903	0,0048	0.1529	-	-	-
Calcium signaling pathway	-	-	-	0.0921	-	0.1665
T cell receptor signaling pathway	0.0195	-	-	-	0,2719	-
Cell adhesion molecules (CAMs)	0,1592	-	-	-	0,3308	-
PPAR signaling pathway	-	0.0031	-	-	0.3206	-
Gap junction	-	0,1849	-	-	-	0.1613
B cell receptor signaling pathway	-	0.3568	-	-	-	0.4320
ErbB signaling pathway	0,4721	-	-	-	-	0,3916
Focal adhesion	0.1299	0,0660	-	-	0.4458	-
Leukocyte transendothelial migration	-	0.2375	-	-	0,3165	0,4596
VEGF signaling pathway	-	0,1088	-	-	0,5058	0,4685
Wnt signaling pathway	-	0.4577	0,3806	-	-	0.1819
Cytokine-cytokine receptor interaction	-	6x10⁻⁷	0.0042	0.1430	0,0195	
MAPK signaling pathway	0.0059	4x10⁻¹²	-	-	0.1374	0,3555
ECM-receptor interaction	0.3621	0.1901	-	-	0.3141	0,1679
Hematopoietic cell lineage	0.0014	0.0920	-	-	0,4186	0.4186
Toll-like receptor signaling pathway	4x10⁻⁸	1x10⁻¹⁰	0.0325	0,4071	-	-
Jak-STAT signaling pathway	8x10⁻⁶	0.0075	0,3005	0,1036	-	-
TGF-beta signaling pathway	0,1419	0,0435	0,1828	-	-	0,0515
Complement and coagulation cascades	0,2914	0.3315	0,1094	0,1758	-	0,0467

Auffallend ist, dass die einzelnen Signalwege immer wieder ineinander greifen und zusammen ein Gesamtbild vermitteln. Dies gilt auch für die Signalwege, die unabhängig voneinander sowohl in der Milz als auch in der Lunge reguliert wurden. Angefangen beim „Toll-like receptor signaling pathway“ zur Pathogen Erkennung und entsprechender Zellantwort, über klassische Signalwege wie „Jak-STAT signaling pathway“ und „MAPK signaling pathway“, erschienen Signalwege wichtiger Immuneffektorzellen wie „T cell receptor signaling pathway“ und „Natural killer cell mediated cytotoxicity“, aber auch Signalwege der Haematopoese wie „Hematopoietic cell lineage“. Des Weiteren traten Signalwege der Effektormoleküle auf wie „Cytokine-cytokine receptor interaction“ und Signalwege, die aufzeigen wie die Zellantworten vermittelt werden, wie „Gap junction“, „Calcium signaling pathway“, „Focal adhesion“ und „Cell adhesion molecules“. Schließlich waren auch Signalwege biologisch relevant, die die Zellantworten aufzeigen wie „Regulation of Autophagy“, „Apoptosis“, „VEGF signaling pathway“ und „Ubiquitin mediated proteolysis“.

Alle Signalkaskaden, die ausschließlich in der Milz biologisch relevant reguliert wurden, spielen wichtige Rollen bei der Interaktion von Zellen. So beeinflusst „Cell cycle“ den Zellzyklus und zeigt unter welchen Umständen eine Zelle in Apoptose geht, Proteine degradiert oder Genexpression veranlasst. „Adherens junction“ und „Tight junction“ sind wichtige Bestandteile bei der Zellkommunikation und „PPAR signaling pathway“ ist am Lipidstoffwechsel beteiligt.

Die Signalkaskaden, die ausschließlich in der Lunge biologisch relevant reguliert wurden spielen einerseits auf DNA-Ebene eine wichtige Rolle („Mismatch repair“, „Homologous recombination“, „DNA replication“ und „Nucleotide excision repair“), andererseits wurde hier auch ein Signalweg biologisch relevant reguliert, der die Antigen Prozessierung und Präsentation widerspiegelt und aufzeigt unter welchen Umständen naive T-Lymphozyten zu T-Effektorzellen werden. Des Weiteren waren in der Lunge auch Signalwege relevant, die wiederum in der Signaltransduktion und dem Zelltransport von Bedeutung sind („Phosphatidylinositol signaling system“, „Hedgehog signaling pathway“ und „mTOR signaling pathway“).

Zusammenfassend fällt auf, dass zahlreiche Signalkaskaden ausschließlich in einer der analysierten Gruppen biologisch relevant reguliert waren - jedoch keine Signalkaskade in allen analysierten Gruppen gemeinsam. Die Signalkaskaden, die in Milz und Lunge reguliert wurden, sind am gesamten Prozess einer Immunantwort beteiligt und greifen umfassend ineinander. Die Signalkaskaden, die exklusiv in der Milz reguliert waren, zählen hauptsächlich zu Signalkaskaden des Zellzyklus, der Zellkommunikation und des Zellstoffwechsels. Die

exklusiv in der Lunge regulierten Signalkaskaden spielen einerseits auf DNA-Ebene eine Rolle, andererseits sind in der Lunge wiederum Signalwege wichtiger Signaltransduktoren relevant. Insgesamt ergibt sich ein schlüssiges Bild einer Immunantwort mit Hinweisen auf eine fokussierte Regulation von Signalkaskaden die Zellkommunikation betreffend in der Milz und Signalkaskaden die DNA-Replikation betreffend in der Lunge.

Biologische Funktionen

Mit dem Programm Ingenuity können unter anderem relevante biologische Funktionen und Netzwerke innerhalb von Datensätzen identifiziert werden. Daher wurden die drei Stunden nach Injektion von rek ChIFN- α in der Milz und in der Lunge regulierten Gene mit diesem Programm analysiert.

Hierzu wurden die Datensätze zunächst hinsichtlich der fünf meist signifikanten relevanten biologischen Funktionen untersucht. Für die biologische Relevanz wurde die Höhe des *p-values* herangezogen (siehe Tabelle 12).

Die drei Stunden nach Behandlung mit rek ChIFN- α in der Milz regulierten Gene können in insgesamt 67, die in der Lunge regulierten Gene können in insgesamt 69 signifikant biologisch relevante Funktionen eingeteilt werden (siehe beiliegende CD, Mappe 1, Tabelle 52). Dabei überschneiden sich 61 biologische Funktionen. Die biologischen Funktionen „Cell Signaling“, „Infectious Disease“, „Post Translational Modification“, „Vitamin and Mineral Metabolism“, „Metabolic Disease“ und „Nucleic Acid Metabolism“ sind ausschließlich in der Milz relevant. „Amino Acid Metabolism“, „Auditory and Vestibular System Development and Function“, „Cellular Compromise“, „Hair and Skin Development and Function“, „Hereditary Disorder“, „Hypersensitivity Response“, „Organismal Functions“ und „Protein Trafficking“ kommen dagegen in der Lunge vor. Die biologischen Funktionen wurden in eine Vielzahl von Untergruppen unterteilt. In Tabelle 12 sind die fünf Hauptfunktionen mit der höchsten Signifikanz und die entsprechenden fünf meist signifikanten Untergruppen aufgelistet. Die Zahl der zugeordneten Gene beläuft sich auf 474 Gene in der Milz und 198 Gene in der Lunge.

Tabelle 12 Signifikante biologische Funktionen nach IFN Injektion

Dargestellt sind in Spalte eins die fünf meist signifikant regulierten biologischen Funktionen in Milz (A) und Lunge (B). Spalte zwei zeigt die meist signifikanten funktionellen Untergruppen der biologischen Funktionen. In Spalte drei ist die entsprechende Anzahl signifikant regulierter Gene gelistet, in Spalte vier der jeweilige *p-value*.

A Milz

Kategorie	Untergruppe	# an Genen	p-value
Tissue Morphology	Quantity of cells	231	2.4×10^{-30}
	Quantity of blood cells	155	2.4×10^{-24}
	Quantity of leukocytes	141	1×10^{-23}
	Quantity of lymphocytes	118	2×10^{-23}
	Quantity of mononuclear leukocytes	120	5×10^{-23}
Cellular Movement	Cell movement	247	8×10^{-28}
	Migration of cells	228	2×10^{-27}
	Leukocyte migration	121	1×10^{-16}
	Cell movement of mononuclear leukocytes	76	9×10^{-16}
	Cell movement of leukocytes	106	7×10^{-15}
Cellular Development	Differentiation of cells	230	2×10^{-22}
	Differentiation of leukocytes	100	1×10^{-17}
	Proliferation of blood cells	121	2×10^{-17}
	Differentiation of blood cells	110	5×10^{-17}
	Proliferation of mononuclear leukocytes	108	2×10^{-16}
Cell Death and Survival	Necrosis	276	1×10^{-20}
	Cell death	335	4×10^{-20}
	Apoptosis	276	8×10^{-18}
	Cell death of blood cells	101	3×10^{-15}
	Cell death of immune cells	98	4×10^{-15}
Immune Cell Trafficking	Leukocyte migration	121	1×10^{-16}
	Cell movement of mononuclear leukocytes	76	9×10^{-16}
	Cell movement of leukocytes	106	7×10^{-15}
	Migration of mononuclear leukocytes	62	1×10^{-14}
	Lymphocyte migration	56	2×10^{-13}

B Lunge

Kategorie	Untergruppe	# an Genen	p-value
Cellular Development	Differentiation of cells	114	1×10^{-15}
	Differentiation of blood cells	52	8×10^{-10}
	Differentiation of connective tissue cells	39	7×10^{-9}
	Development of blood cells	44	1×10^{-8}
	Epithelial-mesenchymal transition	16	7×10^{-8}
Cellular Movement	Migration of cells	103	6×10^{-14}
	Cell movement	109	4×10^{-13}
	Invasion of cells	43	7×10^{-7}
	Cell movement of fibroblasts	16	2×10^{-6}
	Migration of vascular endothelial cells	14	5×10^{-6}
Tissue Morphology	Quantity of cells	100	2×10^{-13}

Organismal Survival	Organismal death	94	5×10^{-12}
	Survival of organism	39	4×10^{-6}
Cardiovascular System Development and Function	Morphology of cardiovascular system	49	1×10^{-11}
	Development of cardiovascular system	66	1×10^{-11}
	Development of blood vessel	51	4×10^{-9}
	Vasculogenesis	46	1×10^{-8}
	Abnormal morphology of artery	16	1×10^{-7}

Es fällt auf, dass sich die Untergruppen „Cellular Movement“ und „Immune Cell Trafficking“ in der Milz teilweise überschneiden. Betrachtet man die enthaltenen Gene, fällt auf, dass 56 Gene in allen Untergruppen reguliert wurden. Die größte Gruppe stellt „Cell movement“ mit 246 Genen dar. 227 dieser Gene wurden in „Migration of cells“ reguliert. Gene, die „Cell movement“, aber nicht „Migration of cells“ zugeordnet wurden sind beispielsweise ARHGAP22 (*Rho GTPase activating protein 22*), eine GTPase, die an der Zellmotilität beteiligt ist, HIPKK2 (*Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2*), eine Serin/Threonin Protein Kinase, die unter anderem das Zellwachstum hemmt und PLA2G4A (*Phospholipase A2, Group IVA (cytosolic, calcium-dependent)*), eine Phospholipase, die die Hydrolyse von Membran Phospholipiden hydrolisiert und so in den Zellstoffwechsel eingreift. ARHGAP22 und HIPK2 wurden in der Milz drei Stunden nach IFN Injektion 3fach und PLA2G4A 5fach hoch reguliert. „Leukocyte Migration“ aus „Cellular Movement“ und „Immune Cell Trafficking“ enthalten die gleichen 120 Gene. Unter den 120 Genen, die in „Migration of cells“ enthalten sind, nicht aber in „Leukocyte migration“ findet sich beispielsweise MSH2 (*Homeobox Protein MSX-2*) in der Milz 3fach hoch reguliert. In dieser Untergruppe ist im Gegensatz zu „Cell movement of mononuclear leukocytes“ FLT4 (*FMS-related Tyrosine Kinase 4*) in der Milz 3fach hoch reguliert. FLT4 ist eine Tyrosin Kinase, die unter anderem an der Lymphangiogenese beteiligt ist. „Cell movement of leukocytes“ und „Cell movement of mononuclear leukocytes“ aus „Cellular movement“ und „Immune Cell Trafficking“ enthalten die gleichen Gene. Die Untergruppe von „Immune Cell Trafficking“ „Migration of mononuclear leukocytes“ enthält mit FLT1 (*FMS-related tyrosine kinase 1*), EFNB2 (*Ephrin B2*), MAPK14 (*Mitogen Activated Protein Kinase 14*), NINJ1 (*Ninjin 1*) und PLA2G6 (*Phospholipase A2, Group VI*) fünf Gene mehr als „Lymphocyte migration“, welches mit 56 Genen, die auch in allen anderen erwähnten Untergruppen zu finden waren, die kleinste Untergruppe bildet. Auch in allen anderen in Tabelle 12 aufgeführten Gruppen, überschneiden sich in den jeweiligen Untergruppen zahlreiche Gene und Gene, die der jeweils größten Untergruppe zugewiesen werden, finden sich auch in kleineren Untergruppen dieser Gruppe. Ausnahmen bilden hierbei die Gruppen „Organismal Survival“ und „Cardiovascular System

Development and Function“, wo in den Untergruppen „Organismal death“ und „Survival of organism“ bzw. in „Morphology of cardiovascular system“ und „development of cardiovascular system“ zwar zahlreiche Gene gemeinsam zugeordnet werden, aber einige Gene auch nur in einer der genannten Untergruppen erscheinen, wie beispielsweise FAT4 (*FAT Tumor Supressor Homolog 4*) und CCND1 (*Cyclin D1*), die in der Lunge 2fach herunter reguliert wurden, in „Morphology of cardiovascular system“ und ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) und FGL2 (*Fibrinogen-like 2*) in „Survival of organsim“, die in der Lunge 2fach herunter bzw. 2fach hoch reguliert wurden.

Betrachtet man das Gesamtbild dieser biologischen Funktionen scheint im Milzgewebe vermehrt mRNA messbar zu sein, die Rückschlüsse auf die Zellzusammensetzung gibt. Wie „Tissue Morphology“ zeigt, scheint sich die mRNA Abundanz, die mit der Anzahl an Zellen in Verbindung gebracht wird, insbesondere bei den Leukozyten und Blutzellen zu verändern. Der Punkt „Cellular Movement“ deutet darauf hin, dass im Milzgewebe mRNA exprimiert wurde, die darauf hinweist, dass Leukozyten vermehrt einwandern und, wie „Cellular Development“ zeigt, proliferieren und sich differenzieren. „Cell death and survival“ zeigt, dass vermehrt mRNA gefunden wurde, die für einen gesteigerten Zelltod spricht, da 335 Gene in „Cell Death“ eingeordnet werden. Einerseits sind vermehrt Gene, die sich der Nekrose zuordnen lassen, andererseits auch vermehrt mit Apoptose verknüpfte Gene feststellbar. Sowohl Nekrose, als auch Apoptose wurden jeweils 276 Gene zugeordnet, von denen sich 233 Gene überschneiden und jeweils 43 Gene alleine Nekrose oder Apoptose zugeordnet werden (siehe beiliegende CD; Mappe 1, Tabelle 55). Zu den mit Apoptose assoziierten Genen gehören beispielsweise AQP1 (*Aquaporin 1*), welches für ein molekulares Wasserkanal Protein codiert. AQP1 wurde in der Milz drei Stunden nach IFN Injektion 4fach hoch reguliert. Ein weiteres Gen, das von Ingenuity nur mit Apoptose und nicht mit Nekrose assoziiert wird, ist CACNA1C (*Calcium Channel, Voltage Dependent, L Type, Alpha 1C Subunit*), das drei Stunden nach IFN Injektion in der Milz 13fach hoch reguliert wurde. Ein weiteres Beispiel ist Il-12B (*Interleukin-12 Beta*), als wichtiges Zytokin in der T_H1-Immunantwort. Mit Nekrose werden SQSTM1 (*Sequestosome 1*) und STK25 (*Serine/Threonine Kinase 25*) in Verbindung gebracht, die in der Milz drei Stunden nach IFN Injektion 2fach bzw. 3fach hoch reguliert wurden.

Auch in der Lunge spielt die biologische Funktion „Cellular Development“ eine entscheidende Rolle. Allerdings werden mit „Differentiation of connective tissue cells“, „Development of connective tissue cells“ und „Epithelial-mesenchymal transition“ andere Untergruppen als relevant eingestuft. Auch die biologische Funktion „Cellular Movement“ ist in der Lunge relevant. Hier jedoch konnten mehr Gene gefunden werden, die mit der Einwanderung von

Fibroblasten und Epithelzellen in Verbindung gebracht werden, als mit Leukozyten. Zudem wird „Invasion of cells“ und „Migration of vascular endothelial cells“ in der Lunge als biologisch relevant bewertet. Der Punkt „Tissue Morphology“ enthält mit „Quantity of cells“ nur eine einzige biologisch relevante Untergruppe. Der Punkt „Organismal survival“ enthält die Untergruppen „Organismal death“ und „survival of organism“. Außerdem kommen die biologischen Funktionen „Cardiovascular System Development and Function“ vor, die mit den Untergruppen „Morphology of cardiovascular system“, „Development of cardiovascular system“, „Development of blood vessel“, „Vasculogenesis“ und „Abnormal morphology of artery“ auf Veränderungen der Genexpression, die mit biologisch relevanten Vorgängen im Gefäßsystem in Zusammenhang gebracht werden, hinweisen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass drei Stunden nach Injektion von rek ChIFN- α insgesamt mit einigen Ausnahmen ähnliche biologische Funktionen in Milz und Lunge relevant sind. Allerdings unterscheiden sich diese hinsichtlich der Höhe der biologischen Relevanz. In beiden Organen konnten Gene gefunden werden, die mit Zellmigration und Zelldifferenzierung in Verbindung gebracht werden. Während in der Milz vor allem Gene exprimiert werden, die mit der Migration, Proliferation und Differenzierung von Leukozyten in Zusammenhang gebracht werden, scheinen in der Lunge vor allem Gene exprimiert zu werden, die mit einer Zunahme von Fibroblasten und Endothelzellen in Verbindung gebracht werden. Zudem konnten in der Lunge viele Gene gefunden werden, die darauf hindeuten, dass hier dem Gefäßsystem eine hohe biologische Relevanz zugeordnet werden kann.

Netzwerke

Um Zusammenhänge zwischen den regulierten Genen besser charakterisieren zu können, wurden PTX3 (*Pentraxin Related Gene, rapidly induced by Il-1b*), Il-6, Il-22, Alb (*Albumin*) und SFTPA1 (*Surfactant, Pulmonary-associated Protein A1*) mit Ingenuity analysiert. Mit der durchgeführten Analyse kann gezeigt werden, mit welchen Genen die ausgewählten Gene, in Ingenuity „upstream regulator“ genannt, in direkter oder indirekter Beziehung stehen und Netzwerke bilden. Als Quelle dieser Zusammenhänge nutzt Ingenuity die „Ingenuity Knowledge Base“, welche aus zahlreiche Datenbanken und Veröffentlichungen zusammengetragen wurde und deren Ergebnisse Ingenuity analysiert und miteinander verknüpft, um Beziehungen zwischen Daten darzustellen. Aus diesem Grund kann nicht für jedes beliebige Gen eine Beziehung zu anderen Genen dargestellt werden. Die Gene wurden zum einen anhand ihrer Expressionsstärke, zum anderen aufgrund der Frage, ob für sie eine derartige Analyse durchführbar ist, ausgewählt. Mit PTX3 und SFTPA1 sind die über die Behandlungszeit am stärksten hoch und herunter regulierten Gene dieser Analyse unterzogen

worden. Il-6 sollte als wichtiges Zytokin und als das nach IFN Injektion am zweitstärksten hoch regulierte Gen umfassend untersucht werden. Ähnlich wie Il-22, das am zweitstärksten nach drei Stunden ausschließlich in der Milz hoch reguliert war und das stärkste Gen in der Milz war, für das diese Art der Analyse durchgeführt werden konnte. Albumin wurde gewählt, da es das am stärksten hoch regulierte Gen in der Lunge war, für das Beziehungen zu anderen Genen gefunden werden konnte. Die Ergebnisse dieser Analyse von PTX3 (Abbildung 17), SFTPA1 (Abbildung 18), Il-22 (Abbildung 19) und Albumin (Abbildung 20) wurden graphisch dargestellt. Da das Netzwerk um Il-6 zu umfangreich war, um es graphisch in dieser Monographie darzustellen, wurde es auf beiliegender CD unter Abbildung 37 und die Gene die Ingenuity mit Il-6 in Zusammenhang bringt in Mappe 1, Tabelle 56 gespeichert. Eine Liste mit den Genen, die mit den vier dargestellten „upstream regulators“ in Zusammenhang gebracht werden, ist im tabellarischen Anhang Tabelle 21 zu finden.

PTX3, auch *Pentraxin related Gen, rapidly induced by Il-1beta* (siehe Abbildung 17), gehört zu den „allgemeinen IRGs“. PTX3 war das am stärksten regulierte Gen überhaupt. In der Milz war es drei Stunden nach Injektion von rek ChIFN- α 685fach hoch reguliert. Über den Behandlungsverlauf nahm die Regulation stark ab. In der Lunge war es ausschließlich in der Gruppe IFN(3h) 3fach hoch reguliert. Die Gene, die mit PTX3 in Zusammenhang gebracht werden können, sind in Tabelle 21 A näher erläutert. PTX3 kann direkt und indirekt Einfluss auf Gene nehmen, die zu den Zytokinen bzw. deren Rezeptoren, Wachstumsfaktoren, G-Protein gekoppelten Rezeptoren, Peptidasen, Transkriptionsfaktoren und Transmembran Rezeptoren zählen. Auffallend ist, dass zu diesen viele Chemokine und Zytokine sowie Chemokinrezeptoren, die ebenfalls stark hoch oder herunter reguliert waren, gehören : Il-1B (*Interleukin-1 Beta*), Il-6, CCL5 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 5*), CCR2 (*Chemokine (C-C motif) Receptor 2*), CCR5 (*Chemokine (C-C motif) Receptor 5*), CX3CR1 (*Chemokine (C-X3-C motif) Receptor 1*) und zwei PRR (*Toll-like Receptor 2* und *4*). Außerdem kann PTX3 mit dem Wachstumsfaktor IGF1 (*Insulin-like Growth Factor 1*), den Transkriptionsfaktoren JUN (*JUN Onkogene*) und NFKB1 (*Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-Cells 1*), der Peptidase MMP9 (*Matirx Metallopeptidase 9*) und TRAF3 (*TNF Receptor-associated Factor 3*) in Beziehung treten. Acht dieser Gene gehören zu den „allgemeinen IRGs“, fünf zu den „neu identifizierten IRGs“. Die Gene IGF1, IL-1B, Il-6, TLR2, TRAF3, CCL5 und CCR2 waren sowohl in der Milz als auch in der Lunge reguliert. Die Gene CXCR1, JUN, MMP9 und NFKB1 waren ausschließlich in der Milz reguliert. Die Gene TLR4 und CCR5 waren ausschließlich in der Lunge reguliert. Unter den Genen, auf die PTX3 Einfluss nimmt, sind Gene, die nach IFN-Injektion sowohl hoch als auch herunter reguliert wurden.

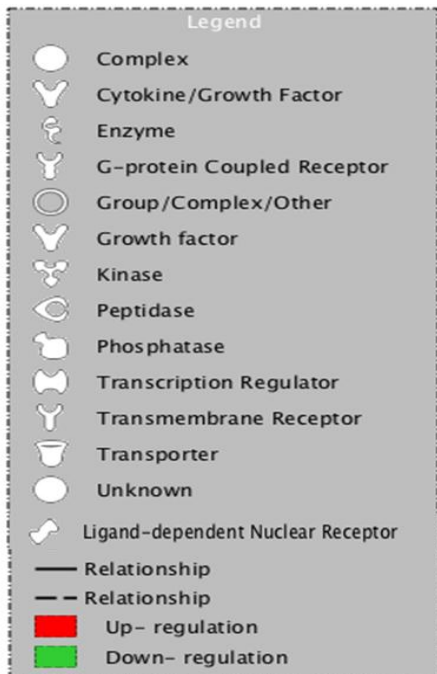
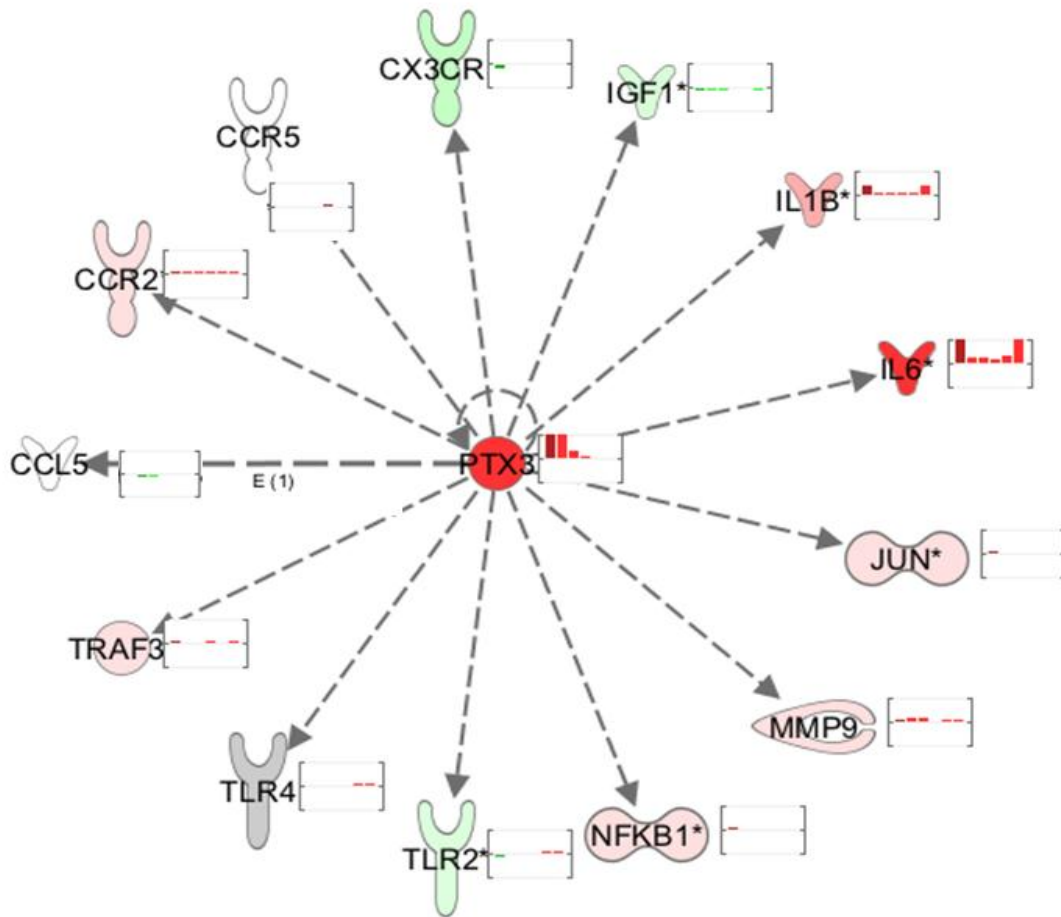
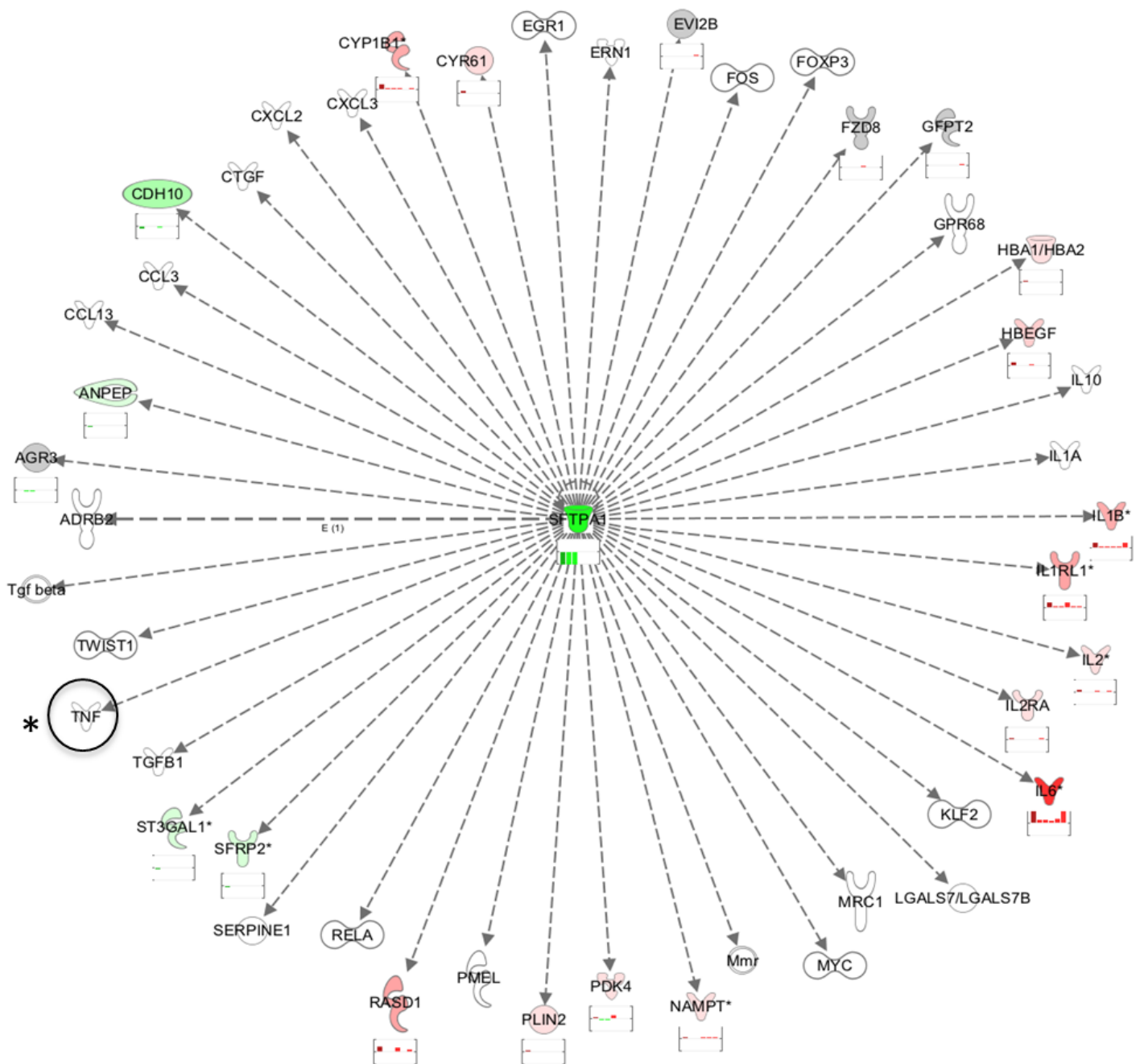


Abbildung 17 Netzwerkanalyse von PTX3

Dargestellt ist die Wechselwirkung von PTX3 (*Pentraxin-related Gene, rapidly induced by Il-1β*) mit anderen signifikant regulierten Genen. Die kleinen Kästen neben den Genen zeigen das Expressionsprofil des Gens in der Reihenfolge Milz IFN(3h), Milz IFN(6h), Milz IFN(9h), Lunge IFN(3h), Lunge IFN(6h) und Lunge IFN(9h). Dabei steht ein roter Balken für eine Hoch-Regulation, ein grüner Balken für eine Herunter-Regulation. Die Pfeile zeigen die Natur der Beziehung. Gestrichelte Linien symbolisieren eine direkte oder indirekte Beziehung zwischen dem zentralen Gen und dem beeinflussten Gen, durchgehende Linien symbolisieren eine direkte Beziehung zwischen einem Gen und einem anderem.

SFTPA1, auch *Surfactant Pulmonary-associated Protein A1* (siehe Abbildung 18) war das am stärksten herunter regulierte Gen überhaupt und wurde ausschließlich in der Milz reguliert. Über die Zeit der Behandlung sank die Expression von SFTPA1 in der Milz auf das über 460fache. SFTPA1 zählt zu den „allgemeinen IRGs“. Die Gene mit denen SFTPA1 laut Ingenuity in Beziehung treten kann, zählen zu den Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (IL-10 (*Interleukin-10*), IL-1A (*Interleukin-1 Alpha*), IL-1B, IL-1RL1 (*Interleukin-1 Receptor-like 1*), IL-2 (*Interleukin-2*), IL-2RA (*Interleukin-2 Receptor Alpha*), IL-6, CXCL2 (*Chemokine (C-X-C motif) Ligand 2*), CXCL3 (*Chemokine (C-X-C motif) Ligand 3*), HBEGF (*Heparin Binding EGF-like Growth Factor*), NAMPT (*Nicotinamid Phosphoribosyltransferase*), PDK4 (*Pyruvate Dehydrogenase Kinase, Isozyme 4*) und CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*)), den Enzymen (RASD 1 (*RAS, Dexamethason-induced 1*), PMEL (*Premelanosome Protein*), ST3GAL1 (*ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase*) und CYP1B1 (*Cytochrome P450, Family 1, Subfamily B, Polypeptide 1*)), den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (MRC1 (*Mannose Receptor, C Type 1*), ADRB2 (*Adrenergic, Beta-2-, Receptor, Surface*), FZD8 (*Frizzled Homolog 8*) und GPR68 (*G-Protein-Coupled Receptor 68*)), den Kinasen (ERN1 (*Endoplasmic Reticulum to Nucleus Signaling 1*)), den Peptidasen (ANPEP (*Alanin (Membran) Aminopeptidase*)) und den Transkriptionsfaktoren (RELA (*V-rel Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog A (Avian)*)), MYC (*V-MYC Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (Avian)*)), KLF2 (*Kruppel like Factor 2*), FOS (*V-FOS FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog*), FOXP3 (*Forkhead Box P3*) und EGR1 (*Early Growth Response 1*)). Von insgesamt 49 Genen waren 18 nicht auf dem Mikroarray annotiert (siehe Tabelle 21 B). Es sollte vermerkt werden, dass das Gen TNF (Tumor Nekrose Faktor), das mit SFTPA1 in Zusammenhang gebracht wird, vermutlich im Huhn nicht vorkommt, was die Datenbank Ingenuity jedoch nicht berücksichtigt. Nur etwa die Hälfte der auf dem Mikroarray annotierten Gene, die mit SFTPA1 in Beziehung treten können, wurde auch signifikant reguliert. Davon können 9 Gene den „allgemeinen IRGs“ zugeordnet werden und 13 den „neu identifizierten IRGs“. Von den signifikant regulierten Genen wurden 10 sowohl in der Milz als auch in der Lunge reguliert. Fünf Gene wurden ausschließlich in der Lunge reguliert, sieben ausschließlich in der Milz. Von den 22 (inklusive TGFB2 und TGFB3) nach IFN Injektion regulierten Genen waren 5 Gene herunter reguliert und 17 hoch reguliert.



* Im Huhn wahrscheinlich nicht existent

Abbildung 18 Netzwerkanalyse von SFTPA1

Dargestellt ist die Wechselwirkung von SFTPA1 (Surfactant Pulmonary-Associated Protein A1) mit anderen signifikant regulierten Genen bzw. mit Gengruppen zu denen signifikant regulierte Gene zählen und Genen die nicht signifikant reguliert sind. Die kleinen Kästen neben den Genen zeigen das Expressionsprofil des Gens in der Reihenfolge Milz IFN(3h), Milz IFN(6h), Milz IFN(9h), Lunge IFN(3h), Lunge IFN(6h) und Lunge IFN(9h). Dabei steht ein roter Balken für eine Hoch-Regulation, ein grüner Balken für eine Herunter-Regulation. Die Pfeile zeigen die Natur der Beziehung. Gestrichelte Linien symbolisieren eine direkte oder indirekte Beziehung zwischen dem zentralen Gen und dem beeinflussten Gen, durchgehende Linien symbolisieren eine direkte Beziehung zwischen einem Gen und einem anderem. Legende siehe Abbildung 17.

Il-6 (Interleukin-6) (siehe beiliegende CD, Abbildung 37 und Mappe 1, Tabelle 56) wurde als „allgemeines IRG“ nach IFN Injektion in der Milz 186fach hoch reguliert, wobei die Expression rasch sank und schon nach sechs Stunden nur noch eine 10fache Hoch-Regulation messbar war. In der Lunge wurde Il-6 nach drei und sechs Stunden nur 7 bzw. 12fach hoch reguliert, um dann nach neun Stunden auf eine 67fache Hoch-Regulation anzusteigen. Il-6 kann von Ingenuity mit über 1.000 Genen bzw. Molekülen in Zusammenhang gebracht werden. Von diesen waren mindestens 251 Gene auf dem Mikroarray annotiert und 85 nach IFN Injektion reguliert. Dabei zählen 30 dieser Gene zu den „allgemeinen IRGs“ und 55 zu den „neu identifizierten IRGs“. Unter diesen Genen sind mit CX3CR1 (*Chemokine (C-X3-C motif) Receptor 1*), CCR6 (*Chemokine (C-C motif) Receptor 6*) und CCL17 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 17*) zwei Chemokinrezeptoren und ein Chemokin und mit Il-1B (*Interleukin-1 Beta*), Il-17F (*Interleukin-17F*), Il-7R (*Interleukin-7 Receptor*), Il-12RB2 (*Interleukin-12 Receptor Beta 2*), Il-1R1 (*Interleukin-1 Receptor 1*), Il-1R2 (*Interleukin-1 Receptor 2*), IFNGR1 (*IFN-gamma Receptor 1*) und Il-23R (*Interleukin-23 Receptor*) zwei Zytokine und sechs Zytokinrezeptoren nach IFN Injektion reguliert. Außerdem können zahlreiche weitere Gene, die bereits in anderen durchgeführten Analysen aufgefallen sind, mit Il-6 in Zusammenhang gebracht werden, darunter PTX3, USP18 (*Ubiquitin Specific Peptidase 18*), AHNAK2 (*AHNAK Nucleoprotein 2*) und IFIH1 (*Interferon Induced with Helicase C Domain 1*). Von den 85 nach IFN Injektion regulierten Genen, die mit Il-6 in Verbindung gebracht werden können, wurden 25 in Milz und Lunge reguliert, davon wurden 22 Gene hoch reguliert, 2 Gene (AHNAK2 und EDN3 (*Endothelin 3*)) wurden in Milz und Lunge herunterreguliert und 1 Gen, NMU (*Neuromedin U*) wurde in der Milz herunter reguliert und in der Lunge hoch reguliert. Ausschließlich in der Lunge wurden 12 Gene reguliert, davon wurden 10 Gene hoch reguliert und 2 Gene (CRHR1 (*Corticotropin Releasing Hormon Receptor 1*) und ROR1 (*Receptor Tyrosin Kinase-like Orphan Receptor 1*)) herunter reguliert. Auffallend ist, dass von den 47 Genen die ausschließlich in der Milz reguliert wurden, 25 Gene herunter reguliert und nur 22 Gene hoch reguliert wurden.

Il-22 (Interleukin-22) (siehe Abbildung 19 und tabellarischer Anhang Tabelle 21 C) zählt zu den „allgemeinen IRGs“. Es wurde in der Milz drei und neun Stunden 34fach bzw. 3fach hoch reguliert, in der Lunge aber nur nach neun Stunden 3fach hoch reguliert. Damit war es nach ZPD (*Zona Pellucida Protein D*), welches drei Stunden nach IFN Injektion 38fach hoch reguliert war, das höchst regulierte Gen, das drei Stunden nach IFN Stimulation ausschließlich in der Milz vorkam. Auch Il-22 kann mit vielen Genen in Verbindung gebracht werden. Diese zählen zu den Zytokinen (IFN- γ (*Interferon gamma*), Il-10 (*Interleukin-10*), Il-13 (*Interleukin-13*), Il-4 (*Interleukin-4*), Il-6, Il-8 (*Interleukin-8*) und Il-1 (*Interleukin-1*)), den Enzymen (HMOX1 (*Heme Oxygenase 1*), CD274 und NOS2 (*Nitric Oxide Synthase 2, inducible*)), den Kinasen (AKT1 (*V-AKT Murine Thymoma Viral Oncogen Homolog 1*)), den Peptidasen (MMP3 (*Matirx Metallopeptidase 3*)) und den Transkriptionsfaktoren (MYC (*V-MYC Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (Avian)*)). Außerdem kann Il-22 mit dem antiapoptotischen BCL2 (*B-Cell CLL/Lymphoma 2*) in Zusammenhang gebracht werden. Von den durch Ingenuity identifizierten 34 Genen waren sechs Gene nicht auf dem Mikroarray annotiert. Von den 28 Genen die auf dem Mikroarray vorkamen wurden 22 signifikant reguliert. Davon zählen 14 Gene zu den „allgemeinen IRGs“ und acht zu den „neu identifizierten IRGs“. Lediglich neun der Gene die mit Il-22 in Zusammenhang gebracht werden können, wurden sowohl in der Milz als auch in der Lunge reguliert. Von diesen wurden nur Il-18 und S100A9 über alle Behandlungszeiträume konstant exprimiert. Vier weitere Gene wurden in der Milz nur nach drei Stunden reguliert. Dies traf für MCL1 (*Myeloid Cell Leukemia Sequence 1*) auch in der Lunge zu. NOS2 wurde erst neun Stunden nach IFN Injektion in der Lunge verstärkt exprimiert. SOCS3 und CD274 wurden bereits drei Stunden nach der Injektion in der Lunge reguliert. Beide wurden in der Lunge sechs Stunden nach IFN Injektion nicht oder vermindert exprimiert, um nach neun Stunden wieder stärker reguliert zu werden. Lediglich 5 der 22 Gene wurden herunter reguliert, die restlichen Gene wurden hoch reguliert. Auffallend ist, dass alle in der Lunge regulierten Gene, außer NOS2, bereits drei Stunden nach IFN Injektion exprimiert wurden, obwohl Il-22 erst neun Stunden nach IFN Injektion in der Lunge messbar war, was auf eine systemische Wirkung von Il-22 hinweisen könnte.

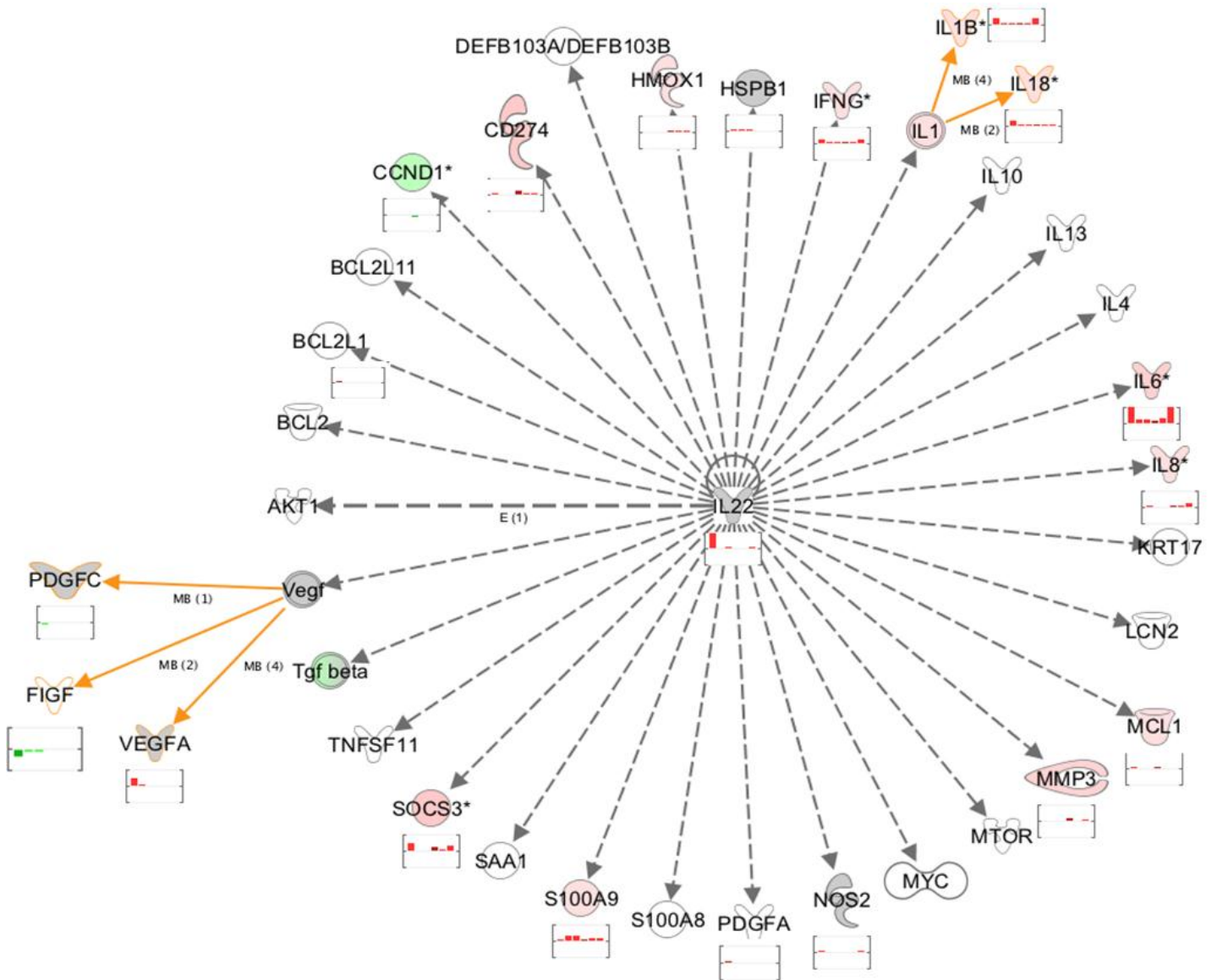
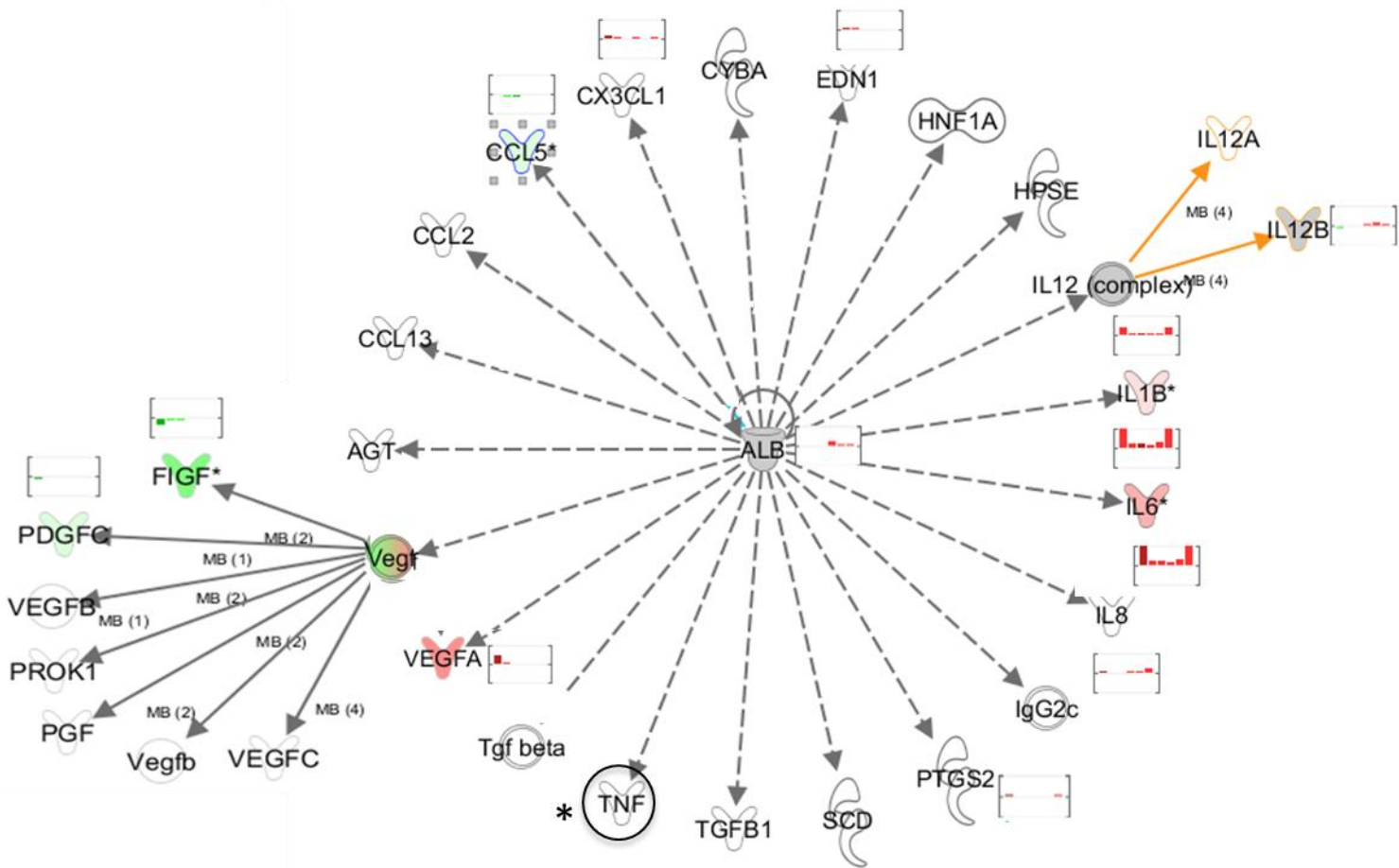


Abbildung 19 Netzwerkanalyse von Interleukin-22

Dargestellt ist die Wechselwirkung von Interleukin-22 mit anderen signifikant regulierten Genen bzw. mit Gengruppen zu denen signifikant regulierte Gene zählen und Genen die nicht signifikant reguliert sind. Die kleinen Kästen neben den Genen zeigen das Expressionsprofil des Gens in der Reihenfolge Milz IFN(3h), Milz IFN(6h), Milz IFN(9h), Lunge IFN(3h), Lunge IFN(6h) und Lunge IFN(9h). Dabei steht ein roter Balken für eine Hoch-Regulation, ein grüner Balken für eine Herunter-Regulation. Die Pfeile zeigen die Natur der Beziehung. Gestrichelte Linien symbolisieren eine direkte oder indirekte Beziehung zwischen dem zentralen Gen und dem beeinflussten Gen, durchgehende Linien symbolisieren eine direkte Beziehung zwischen einem Gen und einem anderem. Legende siehe Abbildung 17.

Der Transporter Albumin (siehe Abbildung 20 und tabellarischer Anhang Tabelle 21 D) zählt zu den „neu identifizierten IRGs“ und wurde ausschließlich drei Stunden nach Injektion von rek ChIFN- α in der Lunge 10fach hoch reguliert. Die Regulation von Albumin sank anschließend auf eine 3fache Expression. Laut Ingenuity steht Albumin in Beziehung zu Genen, die zu den Zytokinen und Wachstumsfaktoren bzw. deren Rezeptoren gehören (IL-12, IL-1B, IL-6, IL-8, EDN1 (*Endothelin 1*), Mitglieder der TNF (*Tumor Necrosis Factor*) Familie, AGT (*Angiotensinogen*), TGFB1 (*Transforming Growth Factor Beta 1*) CCL13 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 13*), CCL2 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 2*), CCL5 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 5*) und CX3CL1 (*Chemokine C-X3-C motif) Ligand 1*)), Transkriptionsfaktoren (HNF1A (*HNF1 Homeobox A*)) und Enzyme (HPSE (*Heparanase*), CYBA (*Cytochrome B-245, Alpha Polypeptide*) und PTGS2 (*Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2*)). Von 26 Genen die mit Albumin in Zusammenhang gebracht werden können waren 8 nicht auf dem Array annotiert. Von den annotierten 18 Genen wurden 14 signifikant reguliert. Dabei zählten acht dieser Gene zu den „allgemeinen IRGs“ und sechs zu den „neu identifizierten IRGs“. Insgesamt wurden neun der Gene hoch reguliert und vier herunter reguliert. IL-12B wurde in der Milz negativ reguliert und in der Lunge positiv reguliert. Fünf Gene waren ausschließlich in der Milz reguliert, zwei ausschließlich in der Lunge. Weitere sieben Gene waren in Milz und Lunge reguliert.

Zusammenfassend ist aus dieser Art der Netzwerkanalyse zu sagen, dass die mit Ingenuity analysierten Gene in Beziehung mit vielen weiteren signifikant regulierten Genen treten können. Ein großer Teil dieser Gene gehört zu den Zytokinen, Chemokinen und deren Rezeptoren. Auch viele Enzyme, Peptidasen, Pathogen Erkennungsrezeptoren und Transkriptionsfaktoren werden von den „upstream regulators“ beeinflusst. Dabei gibt es zahlreiche Überschneidungen dieser Gene aus den unterschiedlichen Analysen, insbesondere bei den Zytokinen und Chemokinen. Des Weiteren scheinen auch Gene, die ausschließlich in einem der beiden Organe stark reguliert sind, Einfluss auf Gene im jeweilig anderen Organ zu nehmen. Das „neu identifizierte IRG“ Albumin kann mit zahlreichen „neu identifizierten IRGs“ aber auch mit vielen „allgemeinen IRGs“ in Zusammenhang gebracht werden. Ebenso wie Beziehungen zwischen PTX3, SFTPA1, IL-6 und IL-22, die zu den „allgemeinen IRGs“ zählen und vielen „neu identifizierten IRGs“ und „allgemeinen IRGs“ gefunden werden konnten. Insgesamt unterstützen die durchgeführten Netzwerkanalysen die Erkenntnisse aus den anderen Analysen. Ein komplexer Zusammenhang zwischen den signifikant regulierten Genen in allen analysierten Organen verdeutlicht sich.



* Im Huhn wahrscheinlich nicht existent

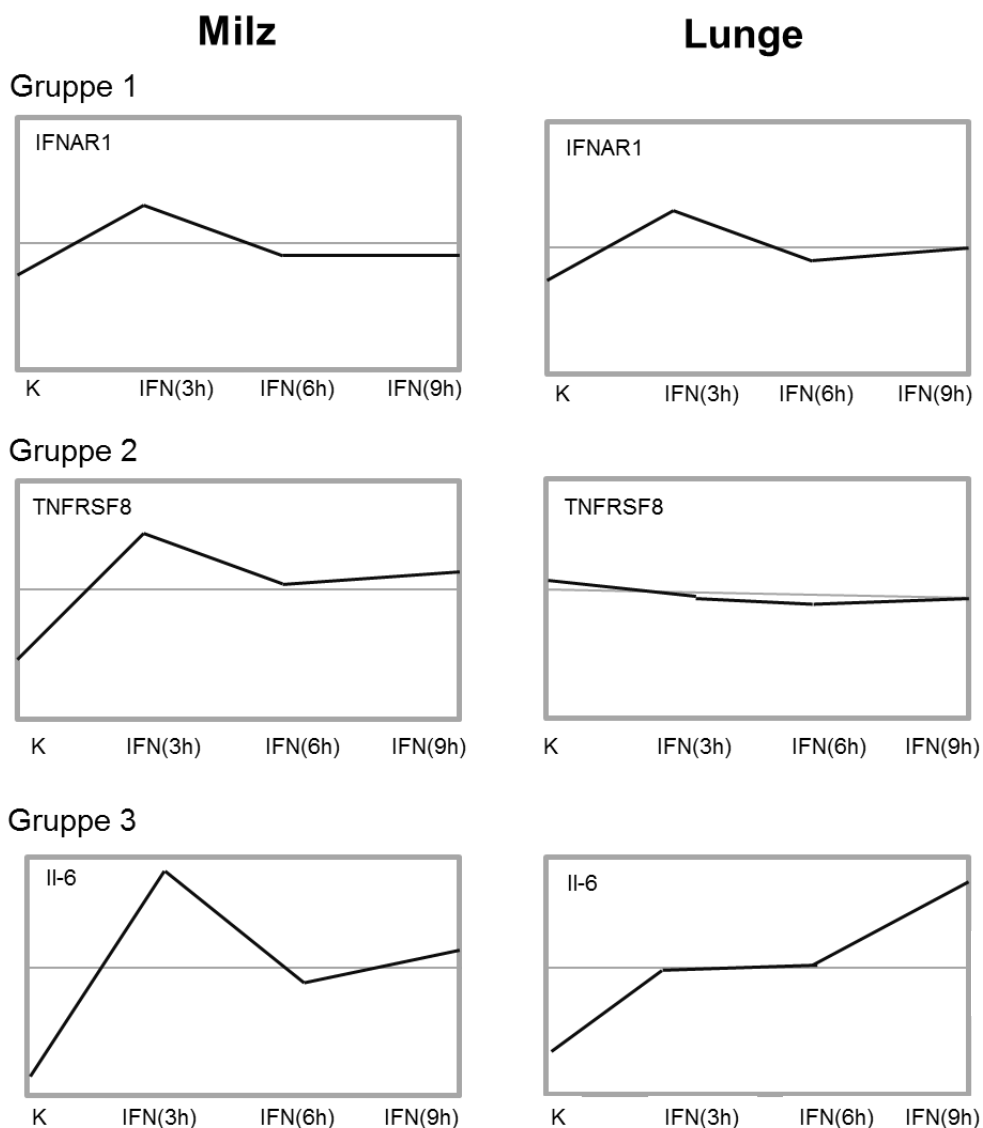
Abbildung 20 Netzwerkanalyse von Albumin

Dargestellt ist die Wechselwirkung von Albumin mit anderen signifikant regulierten Genen bzw. mit Gengruppen zu denen signifikant regulierte Gene zählen und Genen die nicht signifikant reguliert sind. Die kleinen Kästen neben den Genen zeigen das Expressionsprofil des Gens in der Reihenfolge Milz IFN(3h), Milz IFN(6h), Milz IFN(9h), Lunge IFN(3h), Lunge IFN(6h) und Lunge IFN(9h). Dabei steht ein roter Balken für eine Hoch-Regulation, ein grüner Balken für eine Herunter-Regulation. Die Pfeile zeigen die Natur der Beziehung. Gestrichelte Linien symbolisieren eine direkte oder indirekte Beziehung zwischen dem zentralen Gen und dem beeinflussten Gen, durchgehende Linien symbolisieren eine direkte Beziehung zwischen einem Gen und einem anderem. Legende siehe Abbildung 17.

5.5.2.5 Eingehende Betrachtung von Zytokinen und Chemokinen

In den bisher durchgeführten Analysen war aufgefallen, dass viele Vertreter der Gruppe der Zytokine und der Chemokine nach IFN Injektion immer wieder in Erscheinung treten. Daher wurden diese beiden Gengruppen detailliert betrachtet. Tabelle 22 listet die auf dem Mikroarray annotierten und signifikant regulierten Zytokine und Chemokine.

Bereits die MeV Analyse der verschiedenen Datensätze der „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ hat Hinweise geliefert, dass bei den Zytokinen und Chemokinen bestimmte Expressionsprofile überwiegen. Um diesem Verdacht nachzugehen, wurden die Datensätze der signifikant regulierten Zytokine und Chemokine in Milz und Lunge alleine mit MeV analysiert.



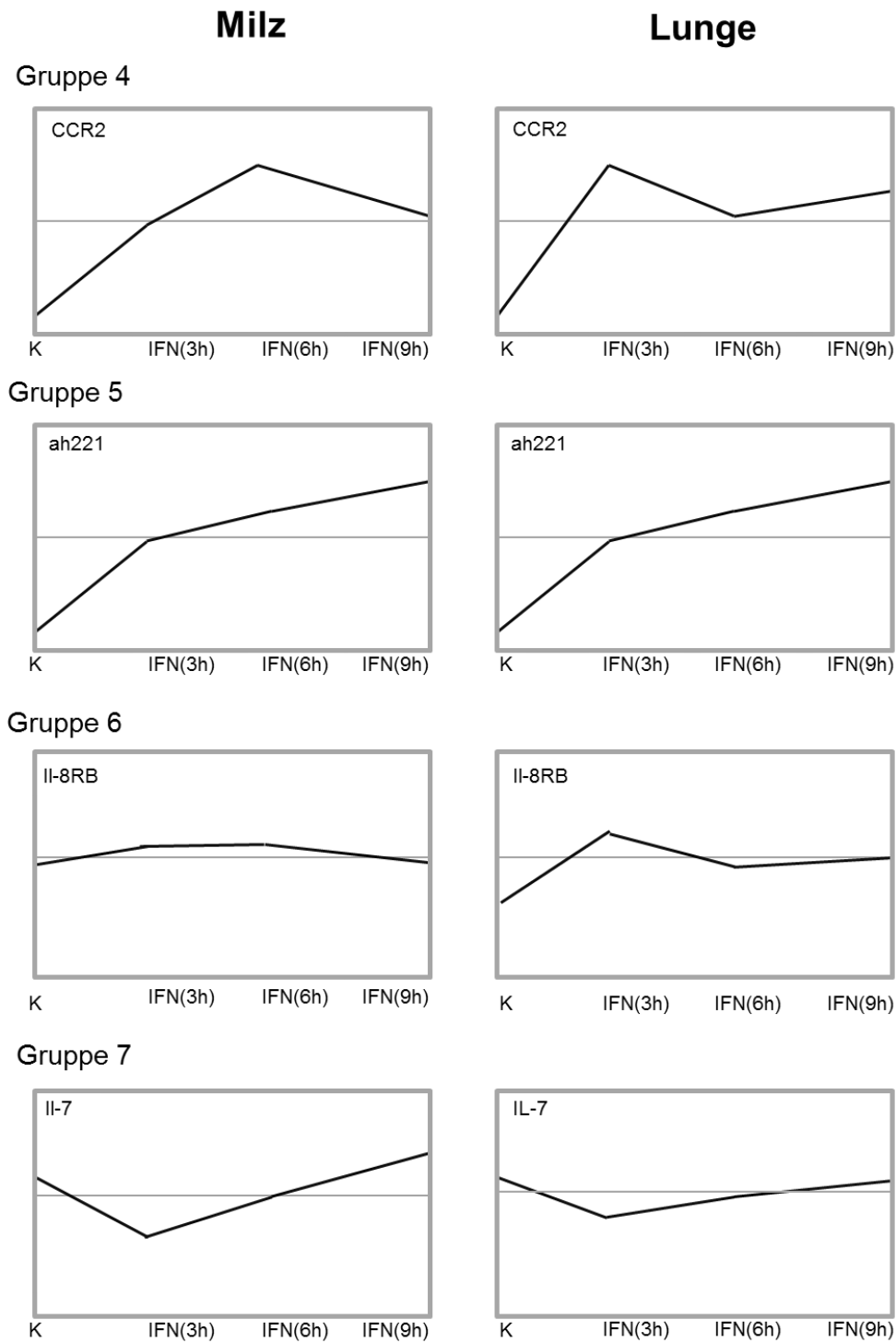


Abbildung 21 Expressionsprofile der Zytokine und Chemokine nach IFN Injektion

Dargestellt ist exemplarisch ein Gen jedes von MeV gefundenen Expressionsprofils der Zytokine und Chemokine über den Behandlungszeitraum in Milz und Lunge nach Injektion von rek ChIFN- α . Die y-Achse zeigt die medianisierten Signalintensität jedes Gens, die von maximal -2 über 0 bis +2 reicht. Die x-Achse zeigt die Tiergruppen.

Es zeigte sich, dass Zytokine und Chemokine nach IFN Injektion in Milz und Lunge in sieben Expressionsprofile eingeteilt werden können (Abbildung 21 und Tabelle 22).

Expressionsprofil 1 wurden 12 Zytokinen und 4 Chemokine zugeordnet. Gene dieser Gruppe wurden sowohl in der Milz als auch in der Lunge drei Stunden nach IFN Injektion stark exprimiert. Sechs und neun Stunden nach IFN Behandlung wurden diese Gene schwächer oder gar nicht exprimiert. Zu dieser Gruppe zählen viele stark exprimierte Zytokinrezeptoren wie Il-1R2 (*Interleukin-1 Receptor 2*), Il-20RA (*Interleukin-20 Receptor Alpha*), CSF2RB (*Colony Stimulating Factor, Beta*), IFNAR1 (*IFN- α Receptor 1*) und das Mitglied der TNF-Rezeptor Superfamilie FAS. Neben FAS wurden auch andere Rezeptoren der TNF-Familie auf diese Weise exprimiert, wie TNFRSF1B (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily 1 Beta*) und TNFRSF11B (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily 11 Beta*, auch *Osteoprotegerin*). Die einzigen Zytokine, die Expressionsprofil 4 zugeordnet wurden sind Il-2 (*Interleukin-2*) und TNFAIP3 (*Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 3*). Unter den Chemokinen wurden CX3CL1 (*Chemokine (C-X3-C motif) Ligand 1*, auch *Fractalkine*), CCL20 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 20*; auch *MIP-3 α (Macrophage Inflammatory Protein-3 alpha)*), CCL5 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 5*, auch *RANTES (Regulated upon Activation Normal T-Cell Express Sequence)*) und CCL17 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 17* auch *TARC (Thymus and Activation Regulated Chemokine)*) Expressionsprofil 4 zugeordnet.

Expressionsprofil 2 enthält Zytokine und Chemokine, die in der Milz drei Stunden nach IFN Injektion ein erhöhtes Expressionsprofil aufwiesen, nach sechs und neun Stunden jedoch kaum oder gar nicht exprimiert wurden. Gene dieses Expressionsprofils wurden in der Lunge nicht reguliert. Zu diesem Expressionsprofil zählen 15 Zytokine und 3 Chemokine. Damit stellt es das Expressionsprofil mit den meisten Mitgliedern dar. Auf diese Weise werden unter anderem der BAFF-Rezeptor (*B-Cell Activating Factor belonging to the TNF Receptor Family*, auch *TNFRSF13C*), CTLA8 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 8*, auch *Il-17*), TNFSF15 (auch *Vascular Endothelial Cell Growth Inhibitor*), das CD40 Molekül als Teil der TNF-Rezeptor Superfamilie und IFNGR1 (*IFN- γ Receptor 1*) exprimiert.

Expressionsprofil 3 enthält acht Zytokine und drei Chemokine. Gene, die dieses Expressionsprofil aufwiesen wurden in der Milz drei Stunden nach IFN Injektion stark und nach sechs und neun Stunden nicht exprimiert oder zeigten über die Behandlungszeit abnehmende Expressionswerte. In der Lunge hingegen waren die Gene nach drei Stunden nicht oder nur gering exprimiert und die Expression stieg über die Behandlungszeit an. Zu dieser Gruppe zählen die am stärksten regulierten Zytokine wie Il-6, Il-22, Il-1B und IFN- γ als Mediatoren einer zellulären Entzündungsantwort und CSF3 (*Colony Stimulating Growth*

Factor 3), das die Produktion, Differenzierung und Funktion von Granulozyten kontrolliert. Auch CCL4 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 4*, MIP-1 β (*Macrophage Inflammatory Protein-1 Beta*)) und K203 (*Chicken Chemokine (C-C motif) Ligand Inflammatory 3*), die am stärksten regulierten Chemokine, zählen zu dieser Gruppe.

Expressionsprofil 4 enthält einen Zytokinrezeptor, CSF2RA (*Colony Stimulating Factor 2 Receptor, alpha*) und zwei Chemokine, CCL19 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 19*, auch MIP-3 β (*Macrophage Inflammatory Protein-3 beta*) und CCR2 (*Chemokine (C-C motif) Receptor 2*), die in Milz und Lunge über die Behandlungszeit ein relativ konstantes Expressionsmuster zeigten.

Zwei Chemokine, ah221 (*Chicken Chemokine ah221*) und CXCL13 (*Chemokine (C-x-C motif) Ligand 13*, auch BCA-1 (*B-Cell Attractant Chemokine*), zeigten sowohl in der Milz, als auch in der Lunge ein ansteigendes Expressionsprofil und wurden daher Gruppe 5 zugeordnet.

Drei Zytokine und drei Chemokine wurden Expressionsprofil 6 zugeordnet. Diese Gene zeigten ausschließlich in der Lunge ein erhöhtes Expressionsprofil und wurden dabei in der Milz nicht, oder nur schwach vermindert oder nach sechs und neun Stunden schwach erhöht exprimiert. Hierzu zählen unter den Zytokinen TNFRSF1A (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily 1 Alpha*, auch *TNF Receptor Type I*), BAFF (*B-Cell Activating Factor belonging to the TNF Family*, auch TNFSF13B (*Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily 13B*)) und Il-12B (*Interleukin-12 Beta*). Außerdem wurden die Chemokinrezeptoren Il-8RB (*Interleukin-8 Receptor Beta*, auch CXCLi2 *Receptor*) und CCR7 (*Chemokine (C-C motif) Receptor 7*) Expressionsprofil 5 zugeordnet.

Fünf Chemokine, XCL1 (*Chemokine (C motif) Ligand 1*, auch *Lymphotactin*), sein Rezeptor XCR1 (*Chemokine (C motif) Receptor 1*), CCR6 (*Chemokine (C-C motif) Receptor 6*), CXCL12 (*Chemokine (C-X-X motif) Ligand 12*, auch SDF-1 (*Stromal Cell Derived Factor-1*)) und CX3CR1 (*Chemokine (C-X3-C motif) Receptor 1*, auch *Fractalkine Receptor*), zwei Zytokine (Il-7 und TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Induced Ligand-like*, auch TNFSF10)) und drei Zytokinrezeptoren (Il-11RA (*Interleukin-11 Receptor Alpha*), Il-12RB (*Interleukin-12 Receptor Beta*) und Il-28RA (*IFN- λ Receptor 1*)) wurden in der Milz drei Stunden nach IFN Behandlung herunter reguliert und in der Lunge zu keinem Zeitpunkt reguliert und wurden daher Expressionsprofil 7 zugeordnet.

Zuletzt gab es unter den Zytokinen vier Gene, und unter den Chemokinen ein Gen, CCR5 (*Chemokine (C-C motif) Receptor 5*), die nicht drei Stunden nach IFN Injektion exprimiert wurden, jedoch nach sechs und/oder neun Stunden in Milz und/oder Lunge schwach

exprimiert wurden, zudem einen Chemokinrezeptor, CXCR7 (*Chemokine (C-X-X motif) Receptor 7*), der ausschließlich in der Lunge schwach herunter reguliert wurde und CCL21 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 21*, auch Exodus-2), das in der Lunge konstant exprimiert wurde und in der Milz nach sechs und neun Stunden schwach exprimiert wurde. Die Expressionswerte dieser Gene waren jedoch zu niedrig um von MeV ein eigenes Expressionsprofil zugewiesen zu bekommen.

Zusammenfassend bestätigt sich bei näherer Betrachtung der in den anderen Analysen gewonnene Eindruck, dass viele Zytokine und Chemokine nach Injektion von rek ChIFN- α stark exprimiert wurden. Von 85 auf dem Mikroarray annotierten Zytokinen und Rezeptoren wurden nach Injektion von rek ChIFN- α 48 Gene signifikant reguliert. Der überwiegende Anteil der Zytokine wurde drei Stunden nach IFN Injektion hoch reguliert. Von den Chemokinen und deren Rezeptoren wurden von 30 auf dem Mikroarray annotierten Genen nach IFN Injektion 25 signifikant reguliert, davon 24 drei Stunden nach IFN Injektion. Von diesen 24 Chemokinen konnten 9 den „allgemeinen IRGs“ zugeordnet werden und 15 den „neu identifizierten IRGs“. Wiederum wurde ein Großteil der Chemokine nach IFN Injektion hoch reguliert. Die Zytokin- und Chemokin Expression in Milz und Lunge nach Injektion von rek ChIFN- α zeigte sich über die Behandlungsdauer in 7 Expressionsprofilen. Dabei konnten mit 15 Zytokinen am meisten Zytokine in Expressionsprofil Gruppe 2 gefunden werden, gefolgt von Expressionsprofil Gruppe 1 mit 12 Zytokinen. Mit 5 Chemokinen konnten die meisten Chemokine in Expressionsprofil Gruppe 7 gefunden werden, wobei insgesamt alle Expressionsprofile der Chemokine eine ähnliche Anzahl an Mitgliedern aufwiesen.

Tabelle 13 Anzahl an Zytokinen und Chemokinen in den Expressionsprofilen

Expressionsprofil Gruppe	Zytokine	Chemokine
1	12	4
2	15	3
3	8	3
4	1	2
5	-	2
6	3	3
7	5	5

5.5.3. Verifizierung ausgewählter Gene in der qRT-PCR

Um zu überprüfen, ob die mit dem Mikroarray ermittelten Genexpressionsdaten korrekt sind, wurde von drei ausgewählten Genen die Genexpression mittels qRT-PCR bestimmt (siehe Abbildung 22).

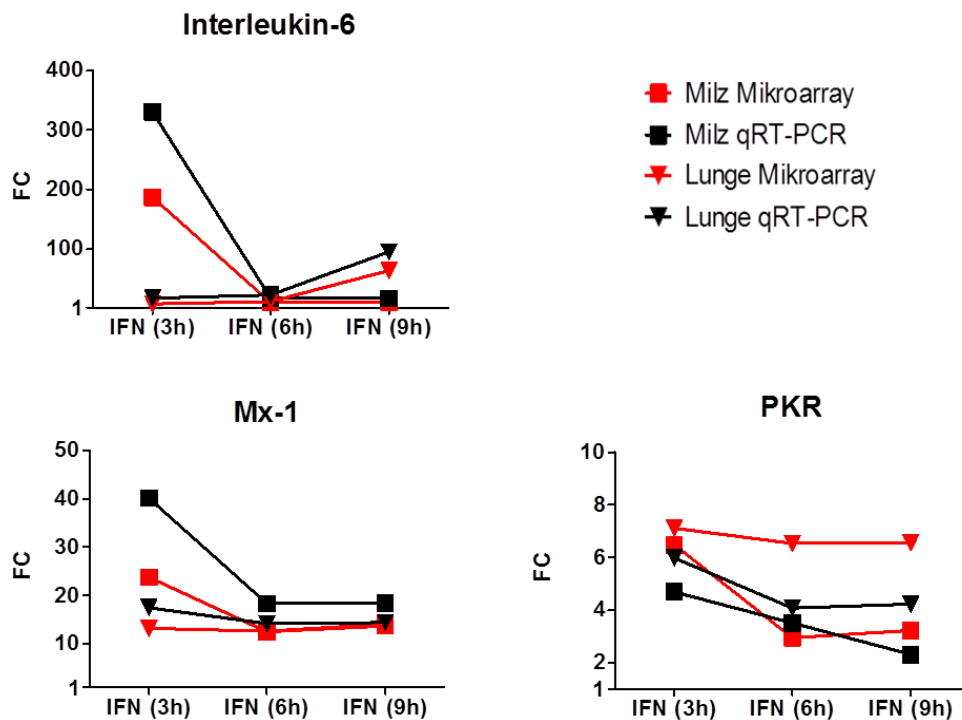


Abbildung 22 Validierung ausgewählter Gene mit qRT-PCR

Dargestellt ist der Verlauf des *Fold Change* (FC) für die angegebenen Gene nach Mikroarray und qRT-PCR Analyse, errechnet aus den Expressionswerten der drei mit rek ChIFN- α behandelten Tiergruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Dabei zeigte sich, dass die FC-Werte der drei analysierten Gene nach Mikroarray Analyse und qRT-PCR Analyse einander sehr ähnlich waren. Il-6 wurde in der Milz drei Stunden nach IFN Injektion hoch exprimiert, nach sechs und neun Stunden jedoch nur vergleichsweise gering. In der Lunge hingegen war nach drei und sechs Stunden wenig Il-6 mRNA zu finden, nach neun Stunden wurde es aber hoch exprimiert. Dies war sowohl nach Mikroarray Analyse, als auch nach qRT-PCR Analyse zu sehen. Auch bei dem Gen Mx-1 korrelierten die FC Werte nach Mikroarray Analyse und qRT-PCR Analyse sehr gut. In der Milz war Mx-1 drei Stunden nach IFN Injektion etwas höher exprimiert als nach sechs und neun Stunden. In der Lunge blieb die Mx-1 Expression in allen Gruppen auf einer ähnlichen Höhe. Ein ähnliches Ergebnis zeigte auch die Vergleichsmessung des Gens PKR.

Zusammenfassend kann vermerkt werden, dass die qRT-PCR Analyse die Mikroarray Daten absolut bestätigt hat und somit die im Mikroarray ermittelten Expressionsdaten zuverlässige Aussagen über den Genexpressionsverlauf zulassen.

5.5.4. Messung von Interleukin-6 Protein im Plasma

Transkriptom Daten liefern nur Informationen über eine erhöhte oder reduzierte Menge von mRNA, nicht aber über das Vorhandensein von funktionellem Protein. Dennoch ist das Wissen über Veränderungen im Transkriptom wichtige Grundlagenforschung und liefert Hinweise, welche Gene möglicherweise auch auf Protein Ebene eine wichtige Rolle spielen. Il-6 ist ein bekanntes IRG, welches durch alle drei Typen von IFNs induziert wird. Es scheint sehr interessant nach Behandlung mit rek ChIFN- α mehr über Il-6 auf Protein Ebene zu erfahren. Il-6 ist auf Genexpressionsebene in der Milz und in der Lunge nach Injektion von rek ChIFN- α stark hoch reguliert, wie Abbildung 22 zeigt. Durch die Verfügbarkeit eines Nachweistests konnte im Plasma der Gehalt von Il-6 Protein nach Behandlung mit rek ChIFN- α bestimmt werden (siehe Abbildung 23).

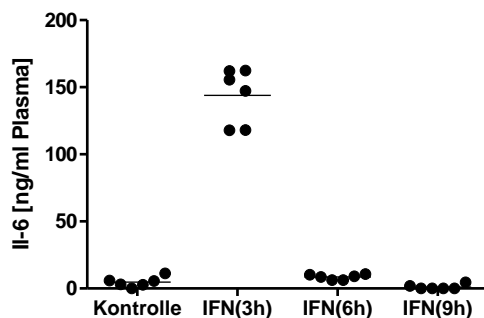


Abbildung 23 Interleukin-6 Protein im Plasma nach IFN Injektion

Dargestellt ist der Plasmagehalt an Il-6 Protein der verschiedenen Tiergruppen nach Behandlung mit rek ChIFN- α ($n = 6$). Die Messung wurde mit dem 7TD1-Bioassay durchgeführt. Dargestellt sind die Werte der Einzeltiere sowie die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe.

Es konnte gezeigt werden, dass drei Stunden nach IFN Applikation durchschnittlich 144ng/ml im Plasma zu messen waren. Sechs Stunden nach IFN Applikation konnte im Mittel noch 9ng/ml im Plasma detektiert werden, während die Werte nach neun Stunden auf das Niveau der Kontrollgruppe abgefallen waren.

Insgesamt ist zu sagen, dass nach Behandlung mit rek ChIFN- α neben der Geninduktion von Il-6 auch Il-6 Protein gebildet wird. Dabei korrelieren die Il-6 Proteinexpression im Plasma und die Il-6 Genexpression in der Milz sehr gut miteinander.

5.6. Behandlung mit Newcastle Disease Virus

Um die IFN-Antwort des Haushuhns auch im Verlauf einer viralen Infektion zu analysieren wurden Hühner intratracheal mit NDV infiziert. Dabei wurde der lentogene Impfstamm NDV La Sota Avipro ND 131 gewählt, da er als potenter IFN Induktor bekannt ist.

5.6.1. NDV Infektion

Vier Tiere erhielten intratracheal 1×10^8 EID NDV, vier Kontrolltiere erhielten PBS. Nach 16 Stunden wurde den Tieren Blut zur Plasmagewinnung, sowie Milz und Lunge für die Analysen entnommen. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da aufgrund von Vorversuchen [339] zu diesem Zeitpunkt eine zur Behandlung mit rek ChIFN- α vergleichbare IFN Konzentration im Plasma zu erwarten war.

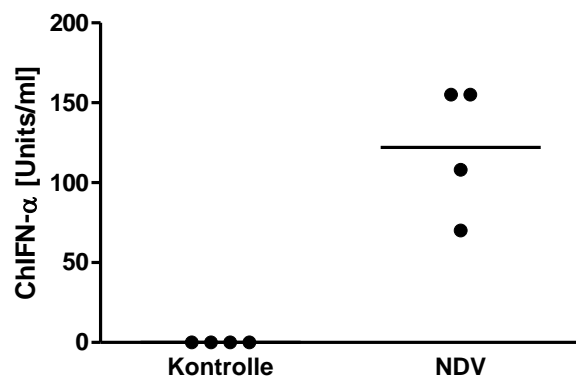


Abbildung 24 Typ I IFN Plasmaspiegel 16h p.i. nach NDV Infektion

NDV infizierten Tieren und einer Kontrollgruppe ($n = 4$) wurde 16 Stunden nach NDV Infektion Blut zur Plasmagewinnung entnommen und der Gehalt an Typ I IFN im IFN Reporterassay gemessen. Dargestellt sind die Werte der Einzeltiere, sowie die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe.

Die Bestimmung des IFN Gehalts im Plasma (siehe Abbildung 24) ergab, dass im Plasma der NDV infizierten Tiere im Mittel 122 Units/ml Typ I IFN detektierbar waren, während das Plasma der Kontrollgruppe kein messbares Typ I IFN enthielt. Damit sind im Plasma der NDV infizierten Tiere vergleichbare Mengen an Typ I IFN messbar wie drei Stunden nach intravenöser Injektion von rek ChIFN- α (150 Units/ml).

5.6.2. Makroskopische Veränderungen der Lunge nach NDV Infektion

Nach intratrachealer Applikation von lentogenem NDV zeigten sich in der Lunge beidseitig kaudoventral makroskopisch veränderte Bereiche (Abbildung 25 B). Die Veränderungen äußerten sich in landkartenähnlich begrenzten, dunkelroten Herden. Der Primärbronchus der infizierten Tiere war in diesem Bereich verdickt und die Lungenränder waren kaudoventral abgerundet. Die gesamte Lunge erschien ödematös. Trotz dieser Veränderungen in der Lunge waren die Hühner klinisch unauffällig.

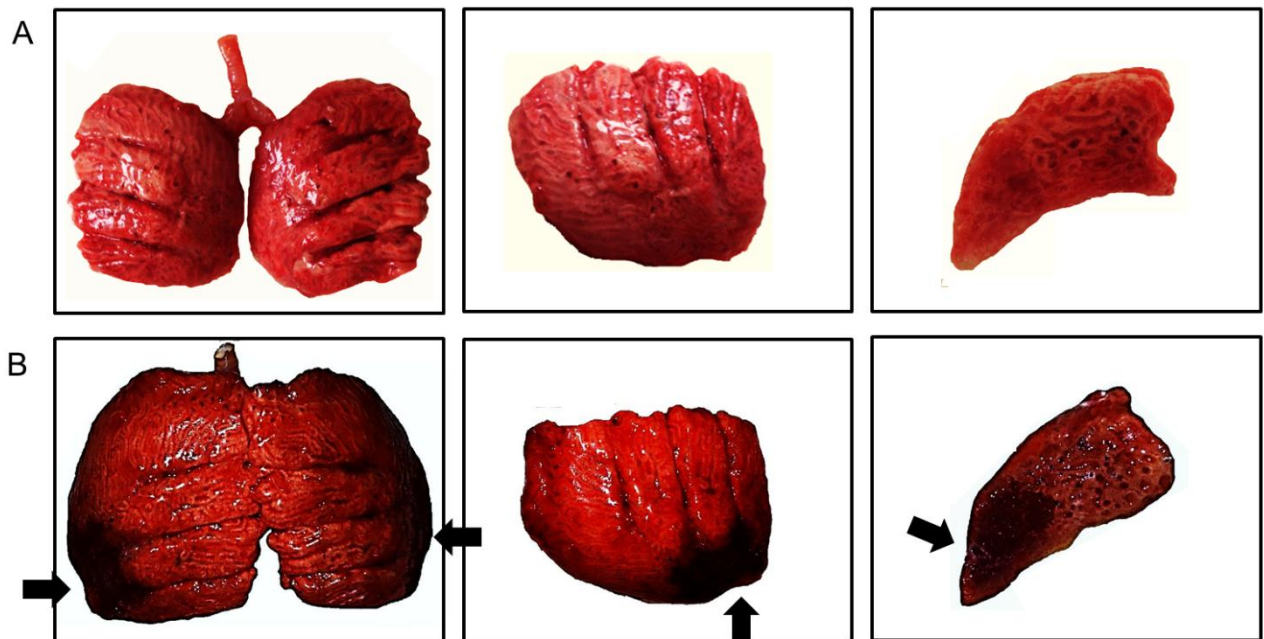


Abbildung 25 Makroskopische Veränderungen der Lungen nach NDV Infektion

Gesunde Hühnerlunge (A) und nach intratrachealer Infektion mit NDV veränderte Hühnerlunge (B). Von links nach rechts sind jeweils eine Hühnerlunge von dorsal, die linke Lungenhälfte von lateral und die vorletzte Lungscheibe (Torus intercostalis) der linken Lunge im Transversalschnitt dargestellt. Die abgegrenzten Veränderungen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Aufgrund der kaudoventral lokalisierten Veränderungen wurden zur RNA Isolation aus der Lunge der infizierten Tiere jeweils zwei Lungenanteile, NDV (A), als verändertes, „alteriertes“ Lungengewebe und NDV(U), als „unverändertes“ Lungengewebe, aus der vorletzten Lungscheibe (Torus intercostalis) entnommen und getrennt analysiert (siehe Abbildung 26).

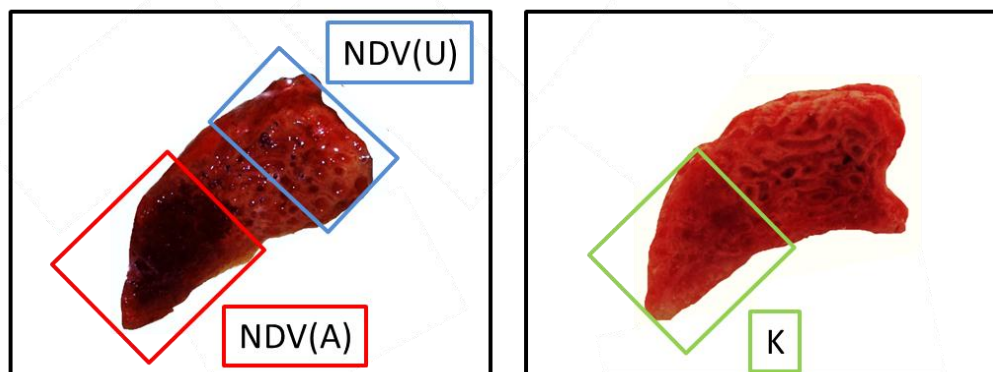


Abbildung 26 Probenentnahme für die RNA Isolation nach NDV Infektion

Den infizierten Tieren wurde der rot umrandete, ventrale, „alterierte“ Anteil (NDV(A)) und der blau umrandete, dorsomedial des Hauptbronchus gelegene, unveränderte Anteil (NDV(U)) für die RNA Isolation entnommen. Den Kontrolltieren wurde der grün markierte, ventral des Hauptbronchus gelegene Anteil entnommen.

Von den Kontrolltieren wurden auch die ventral des Hauptbronchus gelegenen Lungenanteile isoliert (K). Analog zur Probenentnahme nach Injektion von rek ChIFN- α wurde darauf geachtet, dass um den Primärbronchus gelegene BALT auszusparen, da dieses durch seine andere Zellzusammensetzung die Genexpression ungewollt beeinflussen könnte (siehe Abbildung 4).

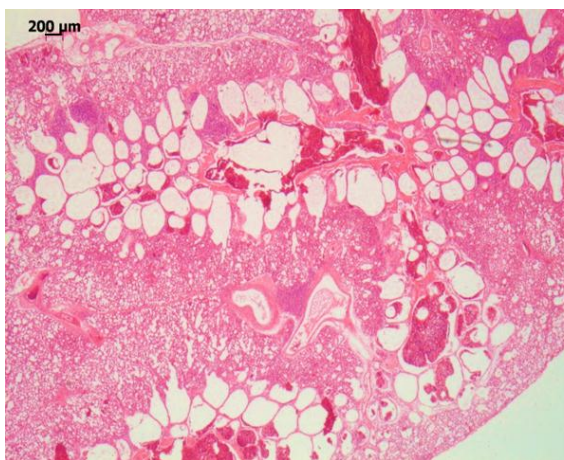
5.6.3. Charakterisierung der nach NDV Infektion makroskopisch veränderten Lungen

Um die Zellzusammensetzung der makroskopisch veränderten Lungen nach NDV Infektion näher zu charakterisieren, wurden die Lungen NDV infizierter Tiere und Kontrolltiere histologisch und durchflusszytometrisch analysiert.

5.6.3.1 Histologische Charakterisierung der Lungen

Für die histologische Untersuchung wurden Paraffin- und Gefrierschnitte der Lungen infizierter und nicht infizierter Tiere angefertigt.

A



B

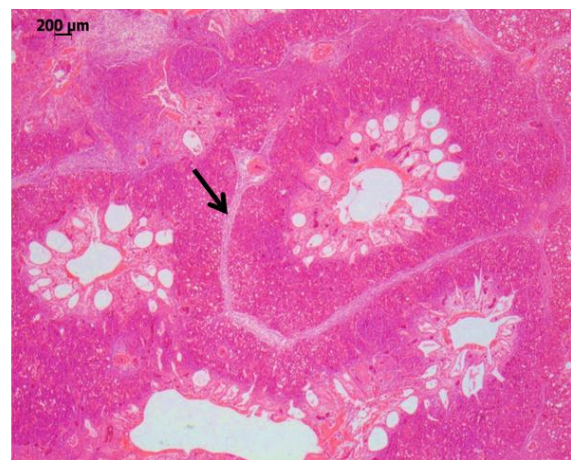


Abbildung 27 HE-Färbung der Lunge nach NDV Infektion

Paraffinschnitte der Lungen nicht infizierter (A) und NDV infizierter Tiere (B) wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Der Pfeil weist auf ein Ödem des Bindegewebes der Sekundär- bzw. Parabronchien. (2,5fache Vergrößerung)

Die HE Färbung der Paraffinschnitte zeigte, dass die makroskopisch sichtbaren Veränderungen nach NDV Infektion auch auf mikroskopischer Ebene deutlich sichtbar sind (siehe Abbildung 27). Die Lungen nicht infizierter Tiere wiesen viel belüftetes Lungengewebe auf, das umliegende Stroma erschien nicht verdichtet (Abbildung 27 A). Lungenstrukturen wie Primär-, Sekundär- und Parabronchien waren klar identifizierbar. In

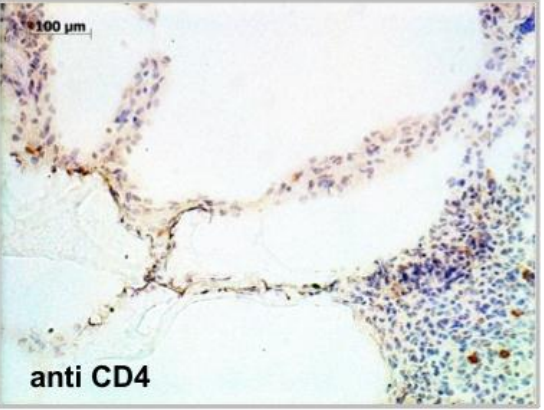
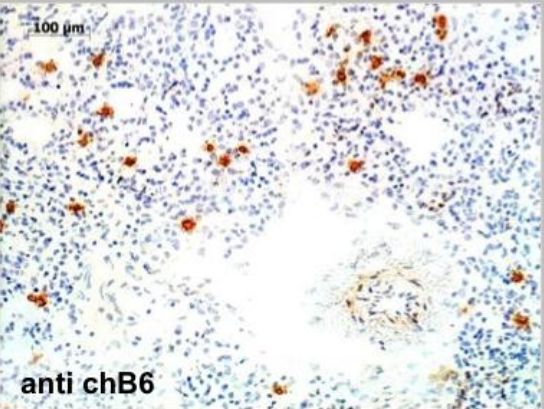
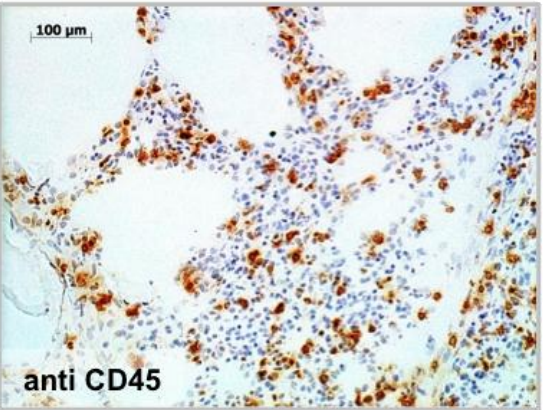
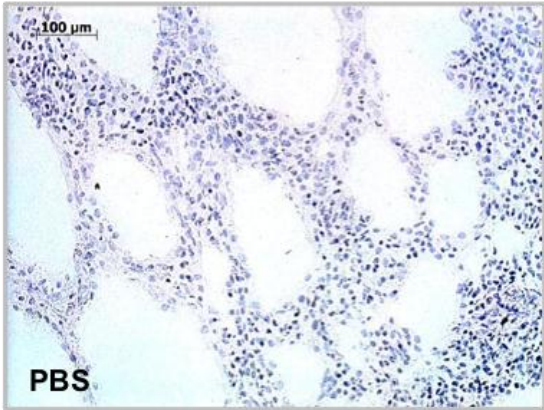
den Lungengefäßen befanden sich kernhaltige Zellen, ein Artefakt, das auf der Tötung durch Blutentzug beruht. Das Lungengewebe infizierter Tiere hingegen zeigte sich stark verdichtet und um die Sekundärbronchien und die in reduzierter Zahl identifizierbaren Parabronchien befanden sich eine große Anzahl Zellen. Die Sekundär- und Parabronchien ließen sich durch ein Ödem des Bindegewebes klar abgrenzen. Die Anordnung dieser Zellen erschien organisiert um die verbliebenen Bronchien und ähnelte induzierten BALT Strukturen.

Für eine nähere Charakterisierung der Zellen wurden mit Gefrierschnitten infizierter und nicht infizierter Lungen immunhistochemische Färbungen durchgeführt (siehe Abbildung 28).

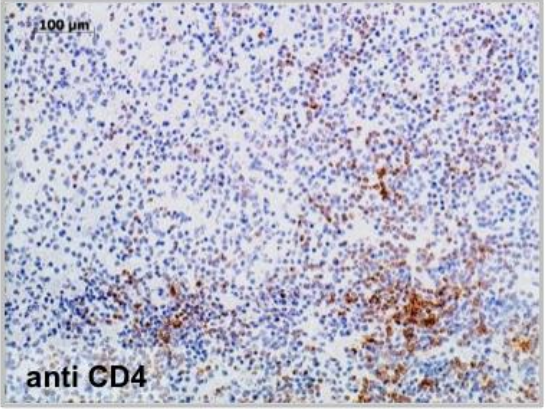
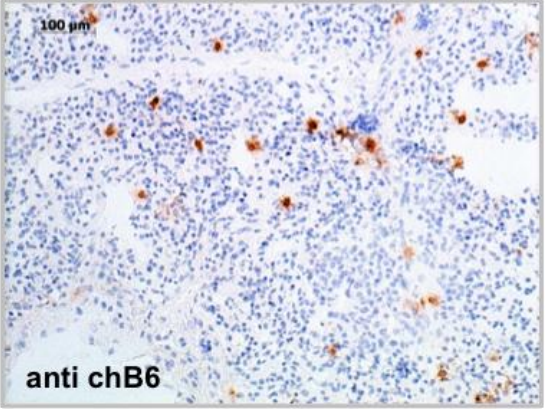
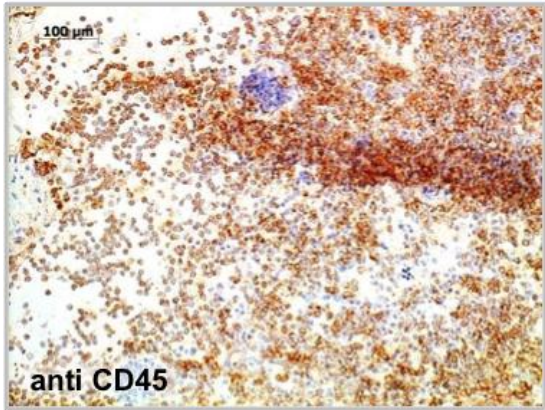
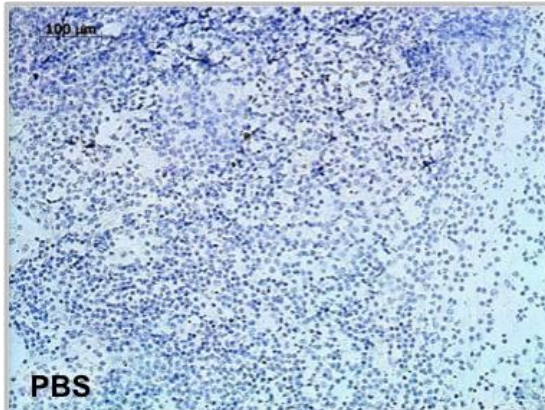
Diese bestätigten, dass in den Lungen infizierter Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren massive Zellansammlungen zu finden waren und nur wenig belüftetes Lungengewebe sichtbar war. Beim Hauptteil der Zellen handelte es sich um Leukozyten (CD45 positiv). Ein großer Teil der Zellen waren zytotoxische T-Zellen (CD8 positiv) oder mit KUL01 anfärbbare myeloiden Zellen (Makrophagen) und möglicherweise dendritische Zellen. CD4 positive T-Helferzellen wurden ebenso wie $\gamma\delta$ T-Lymphozyten (TCR $\gamma\delta$) und B-Lymphozyten (chB6) nur wenige gefunden. Interessanterweise waren in den Zellansammlungen auch nur wenige Granulozyten (GRL1 positiv) zu finden.

Zusammenfassend konnten in der histologischen Untersuchung der Lunge NDV infizierter Tiere starke Gewebeverdichtungen und Ansammlungen von Leukozyten, die zum Großteil aus zytotoxischen T-Lymphozyten und Makrophagen bestehen, gefunden werden.

A



B



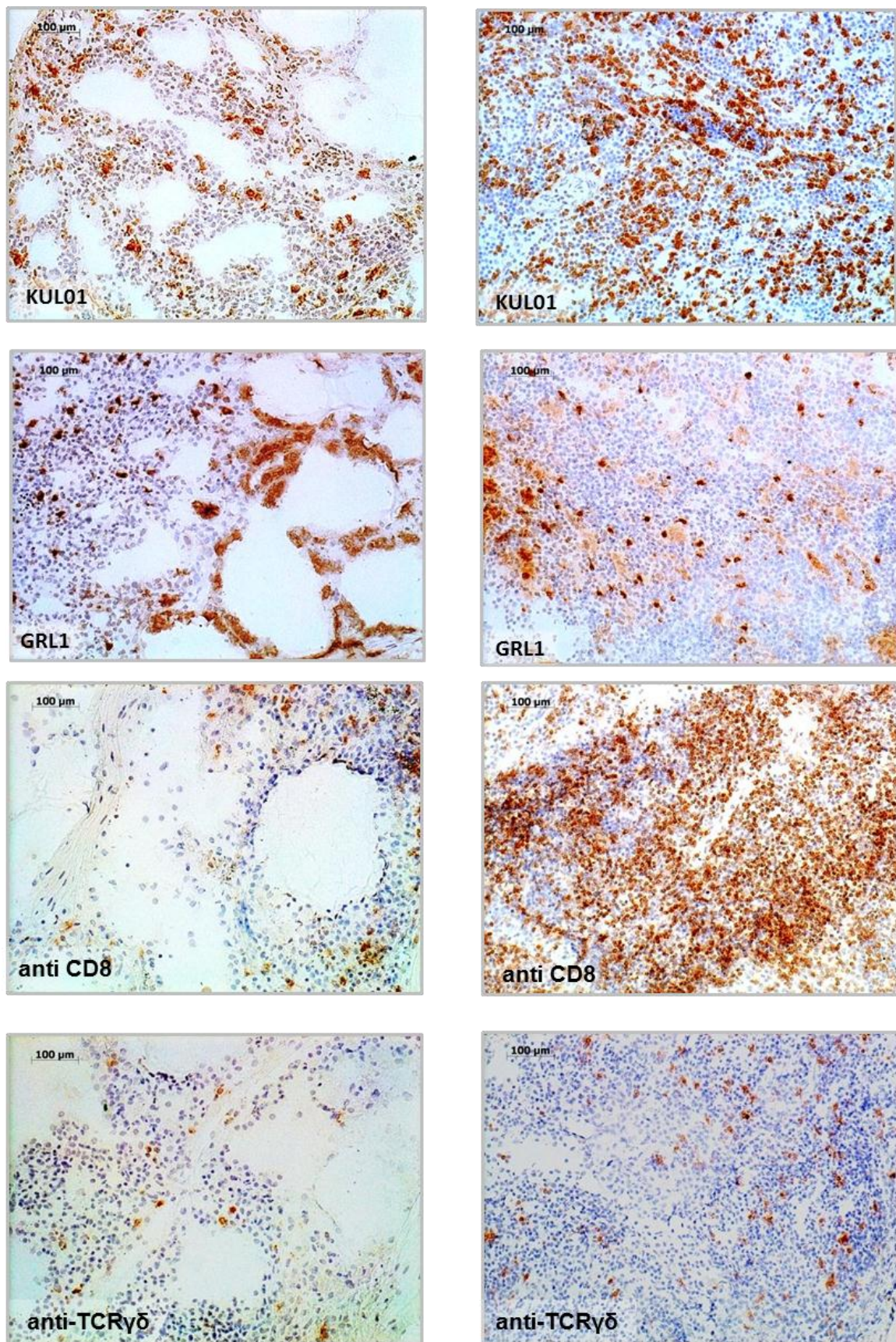


Abbildung 28 Immunhistologische Charakterisierung der Lungen nach NDV Infektion

Gefrierschnitte der Lungen von Kontrolltieren (A) und NDV infizierter Tieren (B) wurden mit den angegebenen Antikörpern immunhistologisch gefärbt. (20fache Vergrößerung)

5.6.3.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Lungen

Neben der histologischen Untersuchung wurde die Zellzusammensetzung der Lungen nach NDV Infektion auch durchflusszytometrisch analysiert. Hierfür wurden die Lungen von NDV infizierten Tieren und Kontrolltieren entnommen, die Leukozyten isoliert und nach einer lebend-tot Färbung mit Trypan Blau die Anzahl lebender Zellen gezählt. Die Zählung der lebenden Zellen ergab durchschnittlich $1,7 \times 10^7$ ($\pm 6 \times 10^6$) Zellen pro ml Suspension in den Lungen der Kontrolltiere und $3,6 \times 10^7$ ($\pm 1 \times 10^7$) Zellen pro ml Suspension in den Lungen der infizierten Tiere. In der durchflusszytometrischen Messung konnte man feststellen, dass in den Lungen NDV infizierter Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren alleine innerhalb der Leukozytenpopulation der Prozentsatz der $\alpha\beta$ T-Lymphozyten (TCR2 positiv) von etwa 34% in den Kontrolltieren auf etwa 44% in den infizierten Tieren zunahm, wobei sich gleichzeitig der Anteil an $\gamma\delta$ T-Lymphozyten (TCR1 positiv) in den infizierten Tieren hoch signifikant von 37% in den Kontrolltieren auf 22% in den infizierten Tieren verringerte (siehe Abbildung 29 A). Des Weiteren stieg der Anteil an Granulozyten (GRL2 positiv) nach NDV Infektion hoch signifikant an. Der Anteil an myeloiden Zellen (KUL01 positiv) stieg nach NDV Infektion nicht an, allerdings könnten diese bei der Gewebepräparation verloren gegangen sein. Es konnte keine Veränderung der B-Lymphozyten Subpopulationen (AV20 positiv), weiteren antigenpräsentierenden Zellen (MHCII positiv, AV20 negativ) und NK-Zellen (CD56 positiv) festgestellt werden. Innerhalb der $\alpha\beta$ T-Lymphozyten Population (CD4 positiv bzw. CD8 positiv) konnte nach NDV Infektion eine Zunahme der CD8 positiven T-Lymphozyten festgestellt werden (siehe Abbildung 29 B).

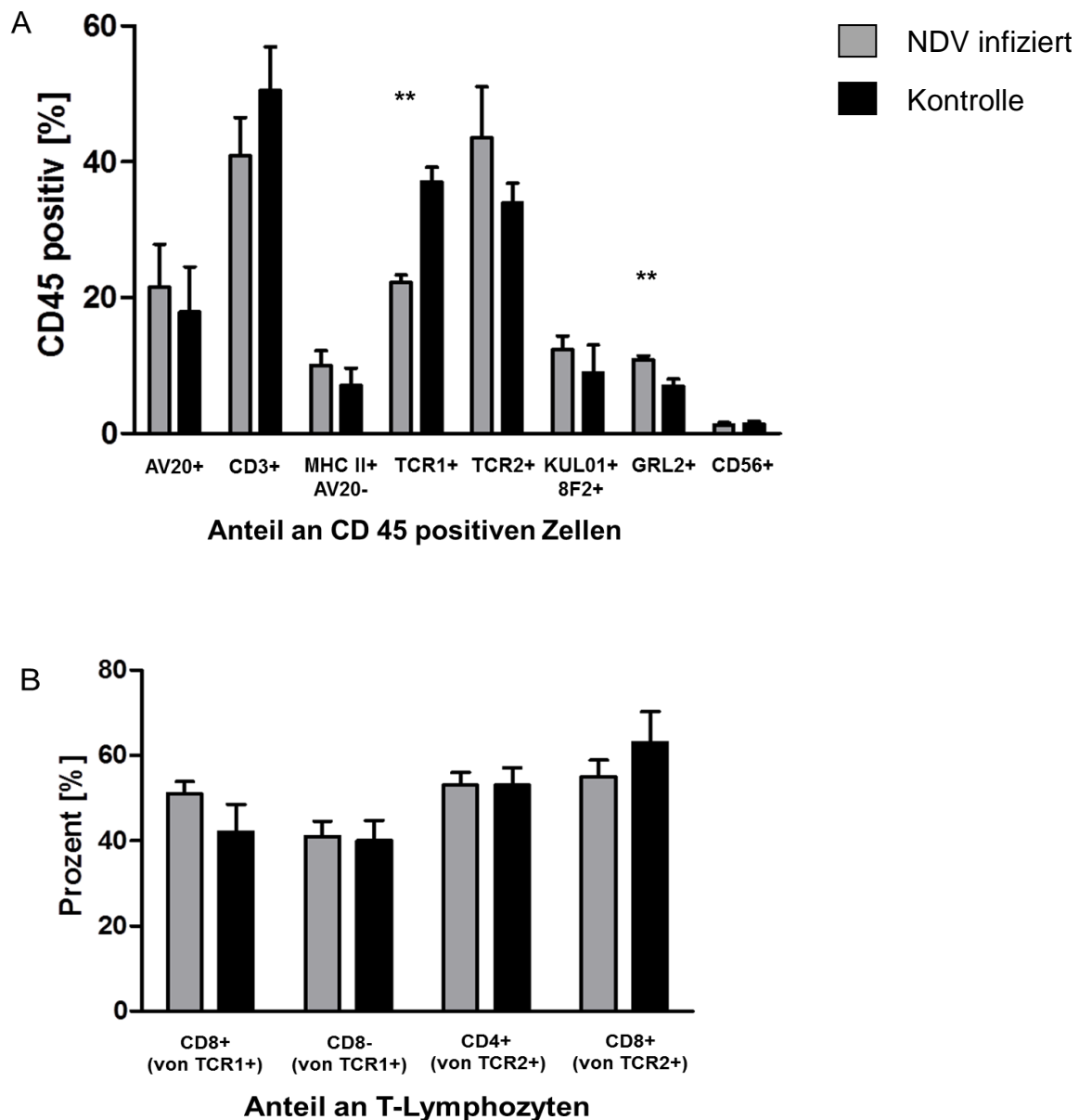


Abbildung 29 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Lungen nach NDV Infektion

Dargestellt sind der Anteil der jeweiligen Zellpopulationen an der Gesamtheit der CD45 positiven Zellen (A) und T-Lymphozyten (B), die mit den angegebenen Antikörpern detektierbar waren. GRL2 wurde an lebenden Zellen angewandt. (** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$. Students T-Test)

Zusammenfassend bestätigt die durchflusszytometrische Analyse die Erkenntnisse aus der histologischen Untersuchung dahingehend, dass die Zahl der Leukozyten im NDV infizierten Lungengewebe zunahm, die sich nach weiterer Spezifizierung als zytotoxische $\alpha\beta$ -TCR exprimierende CD8 positive T-Lymphozyten und Granulozyten darstellten.

5.6.4. Mikroarray Experiment nach Infektion mit NDV

Das Transkriptom von Lunge und Milz nach NDV Infektion sollte mit dem nach Behandlung mit rek ChIFN- α verglichen werden. Dafür wurde die RNA der Milz der infizierten Tiere (Milz „NDV“) und der Kontrolltiere (Milz „K“) und die RNA der in Abbildung 26 beschriebenen Lungenareale isoliert. Analog dem Mikroarray Experiment nach Injektion von rek ChIFN- α erfolgte die Hybridisierung der RNA-Proben auf dem „customized“ chicken Agilent 4x44k Array. Die Hybridisierung einer Milzprobe der Kontrollgruppe misslang, daher konnten von dieser Gruppe nur drei Proben analysiert werden.

5.6.4.1 Heat Map Gruppenanalyse nach Infektion mit NDV

Zunächst wurden die Mikroarraydaten mit dem Programm „R“ (Version 2.9.1 The R Foundation for Statistical Computing) normalisiert und mit dem Bioconductor Paket Genplotter in einer *Heat Map* mit einem *distance plot* graphisch dargestellt. Der Vergleich der Signalintensitäten der analysierten Mikroarrays ist in Abbildung 30 dargestellt.

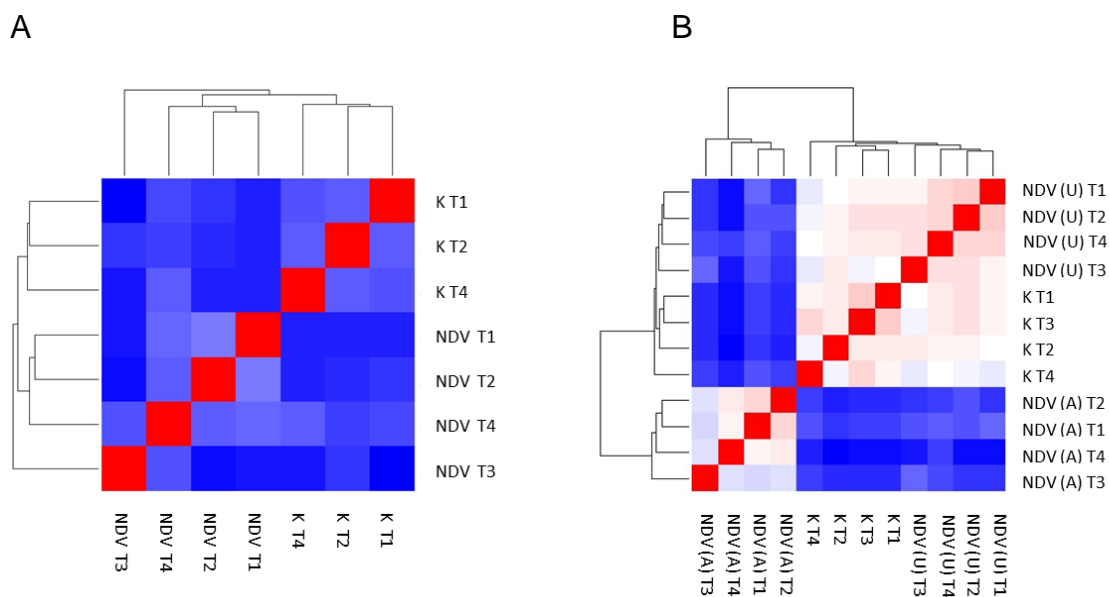


Abbildung 30 Heat Map Darstellung von Milz und Lunge nach NDV Infektion

Diese Darstellung wurde mit dem „R“ Paket *Genplotter* (Version 2.9.1.) angefertigt. Die Signalintensitäten der einzelnen Mikroarrays der Milz (A) und der Lunge (B) wurden miteinander verglichen. Der Grad der Homologie der Proben wird in Farbstufen wiedergespiegelt, die von Rot bis Blau reichen. Sehr ähnliche Proben sind rot, unterschiedliche Proben blau. Das Dendrogramm zeigt die verwandtschaftliche Beziehung zwischen den Proben. Die Proben sind nach Gruppenzugehörigkeit benannt, gefolgt von der jeweiligen Tiernummer (T1-4).

Es zeigte sich, dass nach NDV Infektion die Genexpressionsmuster der einzelnen Proben innerhalb der verschiedenen Tiergruppen sehr homogen waren. Alle analysierten Proben wurden vom Programm „R“ alleine aufgrund ihrer Genexpressionsmuster der Gruppe zugeordnet, der sie angehören - ein entscheidendes Kriterium dieser Analyse. Zwar wiesen in der Milz Kontroll- und NDV Proben ein recht ähnliches Genexpressionsmuster auf, das Dendrogramm zeigte jedoch, dass die Kontrollgruppen einer Genexpressionsgruppe zugeordnet wurden und drei der NDV infizierten Proben (T1, T2 und T4) in eine separate Genexpressionsgruppe fielen. Die Probe T3 aus der NDV infizierten Gruppe zeigte hingegen ein von den anderen infizierten Tieren leicht abweichendes Genexpressionsmuster. In der Lunge zeigten alle Tiergruppen innerhalb ihrer Gruppe ein sehr ähnliches Genexpressionsmuster, waren aber deutlich voneinander abgrenzbar. Dabei waren sich die Genexpressionsmuster der Gruppen NDV(U) und Kontrolle (K) verwandtschaftlich näher als der deutlich abgegrenzten und dem veränderten Gewebe entsprechenden Gruppe NDV(A). Dies spiegelt sich einerseits in der Farbverteilung, andererseits im Dendrogramm wider.

Zusammenfassend zeigte die *Heat Map* Darstellung, dass die Gruppen sich eindeutig voneinander abgrenzen lassen. Dabei unterschieden sich insbesondere die Genexpressionsmuster der veränderten und unveränderten Lungenanteile beträchtlich, während die Genexpressionsmuster der in der Milz analysierten Gruppen und der unveränderten Lungenareale der infizierten Tiere und der Kontrolltiere einander ähnlicher waren. Damit erlaubt das Ergebnis weiterführende Analysen der Daten aus dem Mikroarray Experiment nach NDV Infektion.

5.6.4.2 Identifizierung signifikant regulierter Gene nach NDV Infektion

Um signifikant regulierte Gene zu identifizieren, wurde eine SAM (*significance analysis of microarrays*) *single class, unpaired* Analyse durchgeführt. Dabei wurden folgende Vergleiche durchgeführt: Milz NDV vs K, Lunge NDV(A) vs Kontrolle, Lunge NDV(A) vs NDV(U) und Lunge NDV(U) vs K. Hieraus wurden die Expressionsunterschiede (*fold change* (FC)) errechnet, wobei ein *Spot* mit einer FDR von kleiner als 5% und einer mindestens 2fachen Hoch oder Herunter-Regulation als signifikant reguliert beurteilt wurde.

Tabelle 14 zeigt die Anzahl der signifikant regulierten Gene in den genannten Gruppenvergleichen. Bei Genen, die mehrmals auf dem Mikroarray zu finden sind, wurde der Mittelwert des FCs der einzelnen Spots errechnet.

Tabelle 14 Signifikant regulierte Gene in Milz und Lunge nach NDV Infektion

Gelistet ist die Anzahl signifikant regulierter Gene nach Infektion mit NDV (FDR<5%, FC mindestens +/-2). In der Milz wurde der Expressionsunterschied von infizierten Tieren mit nicht infizierten Tieren verglichen. Die verschiedenen Vergleiche in der Lunge beziehen sich auf den Genexpressionsunterschied zwischen unverändertem Lungengewebe der infizierten Tiere zur Kontrollgruppe (NDV(U) vs K), dem veränderten Lungengewebe der infizierten Tiere zur Kontrollgruppe (NDV(A) vs K) und dem veränderten Lungengewebe zum unveränderten Lungengewebe infizierter Tiere (NDV(A) vs NDV(U)). (+) bedeutet, dass ein Gen in der erstgenannten Gruppe im Vergleich zur zweitgenannten hoch reguliert wurde, (-) bedeutet, dass ein Gen in der erstgenannten Gruppe im Vergleich zur zweitgenannten herunter reguliert wurde.

		Anzahl der Gene		
Milz	NDV vs K	113	+	113
			-	0
Lunge	NDV(U) vs K	66	+	66
			-	0
	NDV(A) vs K	4.459	+	2.361
			-	2.198
	NDV(A) vs NDV(U)	4.428	+	2.354
			-	2.075

Die Analyse ergab, dass durch die NDV Infektion in Lunge und in Milz zahlreiche Gene signifikant reguliert wurden. In der Milz und im unveränderten Lungengewebe infizierter Tiere fanden sich ausschließlich hoch regulierte Gene im Vergleich zum Kontrollgewebe, im veränderten Lungengewebe der infizierten Tiere waren sowohl im Vergleich zum Kontrollgewebe, als auch im Vergleich zum unveränderten Lungengewebe über 2.000 Gene jeweils hoch oder herunter reguliert. Dieses Ergebnis spiegelte die Genexpressionsmuster der *Heat Map* wider, bei der bereits deutlich voneinander abweichende Genexpressionsmuster zwischen dem veränderten Lungengewebe und dem unveränderten Lungengewebe der infizierten Tiere bzw. dem Kontrollgewebe sichtbar waren. Auch die vergleichsweise geringe Anzahl signifikant regulierter Gene in der Milz und im unveränderten Lungengewebe der infizierten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren bestätigte das Ergebnis der *Heat Map* Analyse, da die Signalintensitäten dieser Gruppen sich nur zu einem geringen Grad unterschieden.

Eine Liste aller signifikant regulierten Gene ist auf der beiliegenden CD in Mappe 2, Tabelle 57 zu finden.

5.6.4.3 Verifizierung ausgewählter Gene in der qRT-PCR

Auch nach NDV Infektion sollten die Expressionswerte einiger im Mikroarray signifikant regulierter Gene mittels qRT-PCR verifiziert werden.

Hierfür wurden Il-6, CD40, Mx-1 und TLR21 als Beispiele für hoch regulierte Gene und TLR5 und TFRC (*Transferrin Receptor (p90, CD71)*) als Beispiele für herunter regulierte Gene ausgewählt (siehe Abbildung 31).

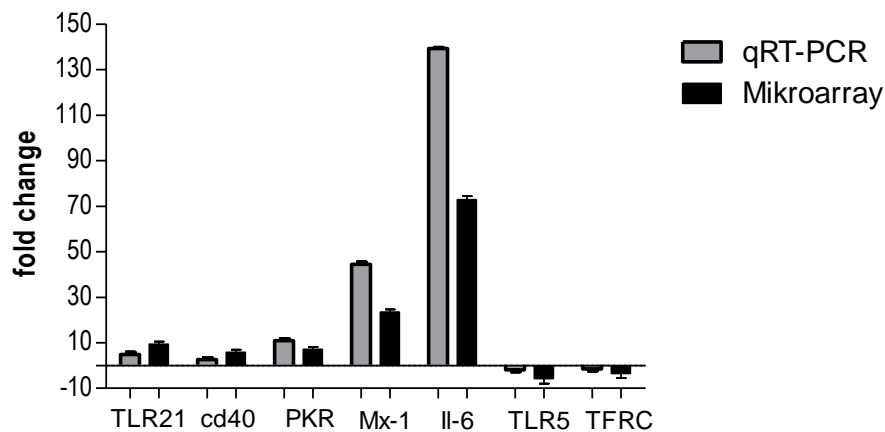


Abbildung 31 qRT-PCR Validierung ausgewählter Gene nach NDV Infektion

Dargestellt sind die FC Werte und die Standardabweichung nach Mikroarray und qRT-PCR Analyse, errechnet aus den Expressionswerten des veränderten Lungengewebes der NDV infizierten Tiere Vergleich zur Kontrollgruppe.

Wie bei der Überprüfung der FC-Werte nach Injektion von rek ChIFN- α zeigte auch die Kontrolle der FC Werte der in der qRT-PCR gemessenen Gene, dass die Ergebnisse aus dem Mikroarray Experiment und nach qRT-PCR Messung gut miteinander vergleichbar sind und dies sowohl für die hoch regulierten Gene, als auch für die herunter regulierten Gene gilt. Einzig Il-6 zeigte im Mikroarray mit einer 73fachen Hoch-Regulation und in der qRT-PCR mit einer 139fachen Hoch-Regulation einen 1,9fachen Expressionsunterschied.

5.6.4.4 Vergleichende Betrachtung der signifikant regulierten Gene nach NDV Infektion

Vergleich des Lungengewebes

Um das Genexpressionsverhalten nach NDV Infektion in den analysierten Lungenarealen besser beurteilen zu können, wurden die in der Lunge signifikant regulierten Gene miteinander verglichen und das Ergebnis in einem Venn-Diagramm dargestellt (siehe Abbildung 32).

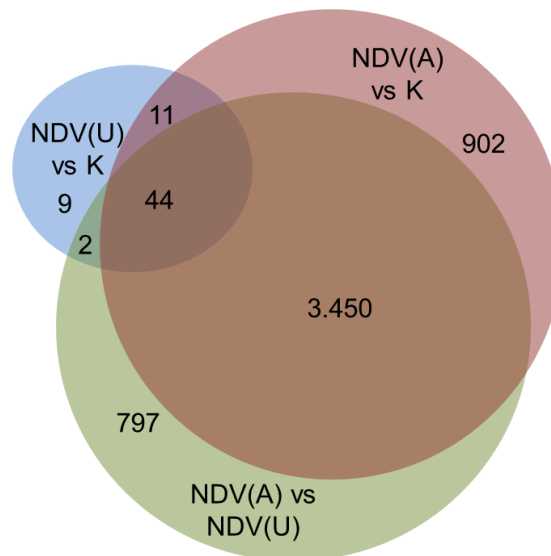


Abbildung 32 Genexpression in der Lunge nach NDV Infektion

Dargestellt ist die Anzahl signifikant regulierter Gene nach Vergleich der Genexpression in den diversen Lungenarealen nach NDV Infektion. Überschneidungen der Kreise entsprechen Schnittmengen an Genen. Die Zahlen geben die Anzahl von Genen innerhalb der Schnittmengen an.

Wie das Venn Diagramm zeigt, gab es innerhalb der analysierten Lungenareale Überschneidungen in der Genexpression. So konnten 44 Gene gefunden werden die in allen analysierten Datensätzen signifikant reguliert wurden. Außerdem gab es 3.450 Gene die sowohl im veränderten Lungengewebe der infizierten Tiere im Vergleich zum Kontrollgewebe signifikant reguliert wurden, als auch im Vergleich zum unveränderten Lungengewebe der infizierten Tiere. Im unveränderten Lungengewebe der infizierten Tiere konnten 9 exklusiv regulierte Gene gefunden werden und lediglich weitere 11 Gene waren gemeinsam mit dem veränderten Lungengewebe der infizierten Tiere reguliert. In den Vergleichen NDV (A) vs K und NDV (A) vs NDV (U) wurden exklusiv 900 bzw. knapp 800 Gene gefunden.

Eine Liste der aufgeführten Genüberschneidungen in der Lunge ist auf beiliegender CD in Mappe 2, Tabelle 58 zu finden.

Vergleich des Lungen- und Milzgewebes

Verglich man die in der Lunge signifikant regulierten Gene mit den signifikant regulierten im Milzgewebe konnten 34 Gene identifiziert werden, die ebenfalls in allen analysierten Vergleichen in der Lunge reguliert wurden. Weitere 40 Gene waren sowohl in der infizierten Milz als auch im veränderten Lungengewebe der infizierten Tiere, sowohl im Vergleich zum

Kontrollgewebe, als auch im Vergleich zum unveränderten Lungengewebe der infizierten Tiere signifikant reguliert. Neun Gene wurden im Milzgewebe und im unveränderten und veränderten Lungengewebe der infizierten Tiere im Vergleich zum Kontrollgewebe gemeinsam hoch reguliert und 18 Gene gemeinsam mit dem veränderten Lungengewebe der infizierten Tiere im Vergleich zum Kontrollgewebe. Zwei Gene wurden gefunden die zwischen Milzgewebe und verändertem Lungengewebe im Vergleich zum unveränderten Lungengewebe differentiell exprimiert wurden. Schließlich wurden 8 Gene ausschließlich in der Milz reguliert.

Eine Liste der aufgeführten Genüberschneidungen von Milz und Lunge ist auf beiliegender CD in Mappe 2, Tabelle 59 zu finden.

Signifikant regulierte Gene in der Milz

In der Milz waren nach NDV Infektion 113 Gene hoch reguliert. Nur acht dieser Gene waren ausschließlich in der Milz reguliert. Von diesen zählen zwei zu den „allgemeinen IRGs“, wobei CSF3R (*Colony Stimulating Growth Factor 3 Receptor*) auch nach IFN Injektion reguliert wurde, nicht aber TFPI2 (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*). Die meisten der stark hoch regulierten Gene wurden auch in allen Lungenanteilen stark exprimiert (siehe tabellarischer Anhang Tabelle 23 A). Darunter waren viele „allgemeine IRGs“, wie MX-1, OASL, IFIT-5 (*Interferon-Induced Protein with Tetratricopeptide Repeat 5*) und USP18 (*Ubiquitin Specific Peptidase 18*), aber auch zahlreiche „neu identifizierte IRGs“ wie mdvn106_g10, LYG2 (*Lysozym G-like 2*) und OSBPLA1A (*Oxysterol Binding Protein-Like 1A*). Das am stärksten exprimierte Gen war OASL, das eine 18fache Hoch-Regulation zeigte und damit sogar stärker exprimiert war, als in der Lunge.

Alle außer acht Gene waren auch nach IFN Injektion reguliert. Vergleicht man die Gewebeexpression von Genen nach NDV Infektion mit der nach IFN Injektion, fällt auf, dass ein Großteil der Gene in beiden Experimenten in Milz und Lunge exprimiert wurde (siehe Abbildung 33 A). Zehn der Gene, die nach IFN Injektion ausschließlich in der Lunge exprimiert wurden, wurden nach NDV Infektion in der Milz (und auch in der Lunge) exprimiert. Zehn weitere Gene, die nach IFN Injektion ausschließlich in der Milz exprimiert wurden, wurden auch nach NDV Infektion in der Milz gefunden, wobei acht von ihnen nach NDV Infektion auch in der Lunge exprimiert wurden. Zwei Gene, Twist 2 und GBP6 (*Guanylat Binding Protein 6*) wurden auch nach NDV Infektion ausschließlich in der Milz exprimiert (siehe beiliegende CD, Mappe 2, Tabelle 60 (Genexpression) und Tabelle 61 (Gewebevergleich))

Signifikant regulierte Gene in der Lunge

Unverändertes Lungengewebe:

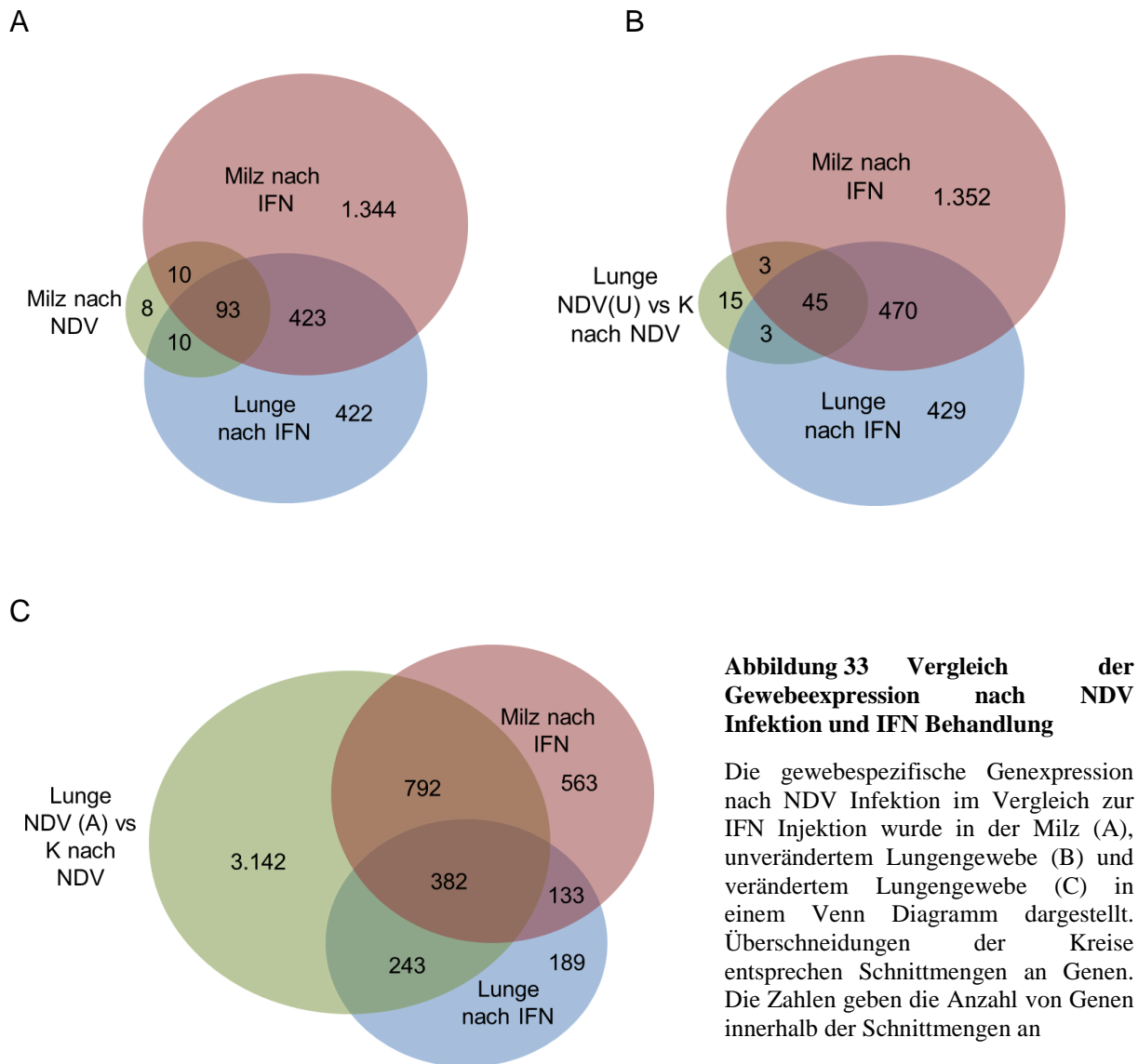
In den unveränderten Lungenarealen der infizierten Tiere fanden sich im Vergleich zum Kontrollgewebe 66 signifikant hoch regulierte Gene (siehe tabellarischer Anhang Tabelle 24). Von ihnen gehören 33 Gene zu den „allgemeinen IRGs“, wovon 30 auch nach Typ I IFN Injektion reguliert wurden. Weitere 21 Gene zählen zu den „neu identifizierten IRGs“ und 12 konnten keiner dieser Gruppen zugeordnet werden. Interessanterweise ist das meist hoch regulierte Gen, UGT1A9 (*UDP Glucoronyltransferase 1 Family, Polypeptide A9*) eines der ausschließlich nach NDV Infektion regulierten Gene. Es wurde nur in der Lunge im unveränderten Gewebe exprimiert. Ein Großteil der Gene wurde auch im Milzgewebe signifikant exprimiert. Zahlreiche dieser Gene sind bekannt IRGs wie Mx-1, OASL, IFIT-5 und PKR. Vergleicht man die Gewebeexpression der Gene nach NDV Infektion und IFN Injektion wurden nach IFN Injektion in Milz und Lunge auch ein Großteil der Gene exprimiert. Mit Il-10 und CCL19 wurden auch jeweils ein Vertreter der Zytokine und Chemokine im unveränderten Lungengewebe exprimiert. Drei Gene, die nach IFN Injektion ausschließlich in der Milz reguliert wurden, wurden nach NDV Infektion auch im unveränderten Lungengewebe exprimiert (siehe Abbildung 33 B). Weitere drei Gene, die nach IFN Injektion ausschließlich in der Lunge reguliert wurden, wurden auch im unveränderten Lungengewebe exprimiert. Diese Gene, RGS6 (*Regulator of G-Protein Signaling 6*), HMGA2 (*High Mobility Group AT-hook 2*) und EDNRB (*Endothelin Receptor Type B*) wurden auch nach NDV Infektion ausschließlich im unveränderten Lungengewebe reguliert (siehe beiliegende CD, Mappe 2, Tabelle 62 (Genexpression) und Tabelle 63 (Gewebevergleich)).

Verändertes Lungengewebe:

Von den im veränderten Lungengewebe signifikant regulierten Genen war ein Großteil sowohl im Vergleich zum Kontrollgewebe, als auch im Vergleich zum unveränderten Gewebe exprimiert (siehe beiliegende CD, Mappe 2, Tabelle 58). Andere Gene waren ausschließlich in einem dieser Vergleiche reguliert. Von diesen waren bei NDV (A) vs K nur 49 Gene (22 hoch und 26 herunter regulierte) und im Vergleich NDV (A) vs (U) nur 22 Gene (11 hoch und 11 herunter regulierte) mindestens 4fach hoch oder herunter reguliert. Eine Liste der in diesen Vergleichen exklusiv stark exprimierten Gene, findet sich auf beiliegender CD, Mappe 2, Tabelle 64. Da für eine genauere Betrachtung der Genexpression das Datenvolumen eingeschränkt werden musste, wurden folgende Untersuchung ausschließlich mit NDV (A) vs

K durchgeführt.

Zwischen verändertem Lungengewebe der infizierten Tiere und Kontrollgewebe wurden 4.559 Gene differentiell exprimiert (siehe beiliegende CD, Mappe 2, Tabelle 65). Mit Il-22 (FC 161), CCL19 (FC 81) und Il-6 (FC 74) waren die am stärksten hoch regulierten Gene Zytokine (siehe tabellarischer Anhang Tabelle 23 B). Auch der Il-13RA2 ist mit einem FC von 40 stark exprimiert. Zudem findet sich das in allen Gruppen zu den 15 meist regulierten Gene gehörende *mdvn106_g10* auch im veränderten Lungengewebe. Insgesamt zeigten die Gene im veränderten Lungengewebe wesentlich höhere Expressionswerte als im unveränderten Lungengewebe und in der Milz. Mehr als 40 Gene sind stärker hoch reguliert, als das am stärksten regulierte Gen (OASL) in der Milz. Etwa 30% der Gene wurden nach IFN Injektion ebenfalls signifikant reguliert. Etwa 1/8 der im veränderten Lungengewebe exprimierten Gene zählt zu den „allgemeine IRGs“, wobei weniger als die Hälfte auch nach IFN Injektion reguliert wurden. Vergleicht man die Gewebeexpression nach NDV Infektion und IFN Injektion (siehe Abbildung 33 C) fällt auf, dass 792 Gene, die nach IFN Injektion ausschließlich in der Milz reguliert wurden, nach NDV Injektion auch in der Lunge reguliert wurden. Weitere 243 Gene, die nach IFN Injektion ausschließlich in der Lunge reguliert wurden, wurden auch nach NDV Infektion in der Lunge exprimiert, könnten also möglicherweise „lungenspezifisch exprimierte IRGs“ sein. Neun dieser Gene wurden nach NDV Infektion auch in der Milz hoch reguliert, darunter *CXCL13L1*, *PSTA1* (*Phosphoserine aminotransferase 1*), der *Trypsin Inhibitor CITI-1-like* und das *Interferon-Induced Transmembrane Protein 1-like* (siehe beiliegende CD, Mappe 2, Tabelle 66 (Expressionsdaten) und Tabelle 67 (Übersicht)).



Insgesamt ist festzuhalten, dass nach NDV Infektion viele „allgemeine IRGs“ und „neu identifizierte IRGs“, aber auch Gene die keiner dieser Gruppen zugeordnet werden konnten, in Milz und Lunge reguliert wurden. Zwischen Milz und dem unveränderten Lungengewebe überschneiden sich viele stark exprimierte Gene von denen fast alle bekannte „allgemeine IRGs“ waren oder auch nach IFN Injektion reguliert wurden. Im veränderten Lungengewebe sind einige Zytokine stark exprimiert. Außerdem war die Genexpression im veränderten Lungengewebe stärker als in der Milz, zum einen hinsichtlich der Anzahl der signifikant regulierten Gene, zum anderen aber auch hinsichtlich der Expressionswerte. Vergleicht man die Gewebeexpression nach NDV Infektion und IFN Injektion, findet man viele Gene, die nach IFN Injektion ausschließlich in der Milz oder in der Lunge exprimiert wurden, nach NDV Infektion aber auch im jeweilig anderen Organ. Einige Gene jedoch, zeigen auch nach NDV Infektion eine gewebespezifische Expression.

5.6.4.5 Funktionelle Analysen nach NDV Infektion

Um eine bessere Aussage treffen zu können, an welchen Signalkaskaden und biologischen Prozessen die nach NDV Infektion regulierten Gene beteiligt waren, wurden die Gene mit Panther Gene List Analysis und KEGG Pathway Express untersucht.

Funktionelle Gengruppen Analysen nach NDV Infektion (Gene Ontology)

Die funktionelle Gengruppen Analyse (Gene Ontology) von signifikant regulierten Genen nach NDV Injektion wurde mit Panther Gene List Analysis durchgeführt. Analysiert wurden die in der Milz und im veränderten Lungengewebe hoch und herunter regulierten Gene (siehe Tabelle 15 und Abbildung 34)

Zwischen 40 und 48% der signifikant regulierten Gene konnten von Panther analysiert werden. Die meisten funktionellen Gruppen konnten in allen Vergleichen gefunden werden. Einige funktionelle Untergruppen, die in der Lunge gefunden wurden, wurden in der Milz nicht gefunden. Allerdings wurden diesen Untergruppen auch in der Lunge nur einzelne Gene zugeordnet. In Cellular Component konnten in der Milz nur die Gruppen „Extracellular region“ und „Intracellular“ gefunden werden.

Auffällig war, dass in der Milz ein wesentlich größerer Anteil an Genen in „Response to stimulus“ und „Immune System Process“ eingeteilt wurde, als in der Lunge. Hingegen wurden in der Lunge prozentual deutlich mehr Gene in „Catalytic activity“ als in der Milz gefunden. Die meisten Gene fanden sich in „Metabolic Process“ und „Cellular Process“. „Cell adhesion“ stach dadurch ins Auge, dass in Milz und bei den herunter regulierten Genen in der Lunge anteilig viele Gene zu finden waren, während unter den hoch regulierten Genen in der Lunge nur ein kleiner Anteil dieser Gruppe zugeordnet wurde. Vergleich man die funktionellen Gruppen der hoch und herunter regulierten Gene der Lunge, fiel auf, dass in „Structural molecule activity“, „Cell communication“ und „Cellular process“ anteilig mehr Gene bei den herunter regulierten Genen zu finden waren.

Die Gene der in Tabelle 15 aufgeführten Gruppen finden sich auf beiliegender CD, Mappe 2 Tabelle 68.

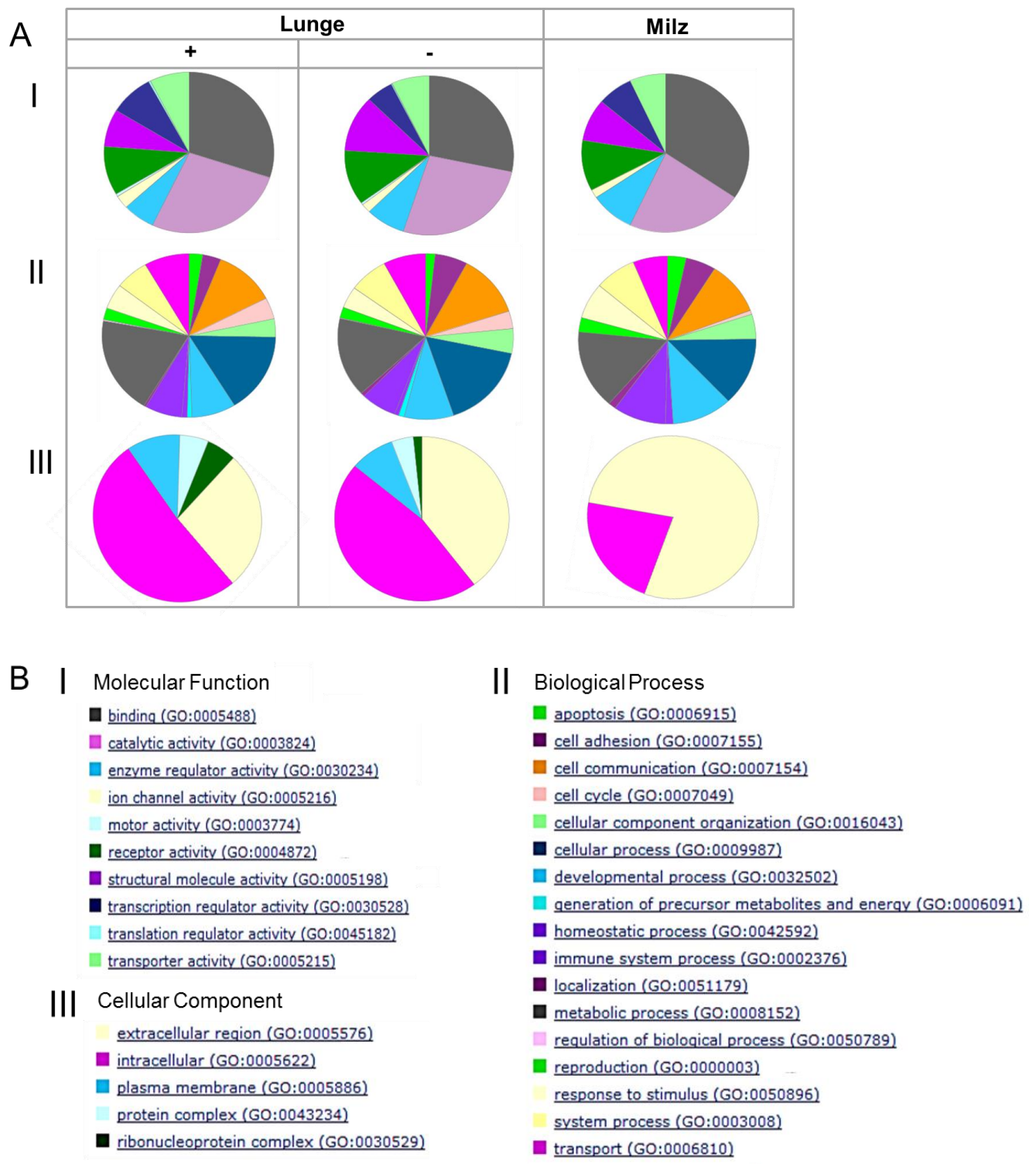


Abbildung 34 Funktionelle Gruppen nach NDV Infektion

Die nach NDV Infektion gefundenen funktionellen Gruppe und deren Untergruppen in der Milz und im veränderten Lungengewebe im Vergleich zur Kontrolle, als Kreisdiagramm (A) und die Legende (B).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass nach NDV Infektion zwar in der Milz prozentual wesentlich mehr Gene in „Immune System Process“ und „Response to stimulus“ eingeteilt wurden, als im veränderten Lungengewebe, insgesamt aber nur sehr geringe GO Unterschiede feststellbar waren.

Tabelle 15 Funktionelle Gruppen nach NDV Infektion

Gelistet sind die Anzahl der signifikant regulierten Gene nach NDV Infektion in der Milz und im veränderten Lungengewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe und die Anzahl der von Panther Gene List Analysis identifizierten Gene. In der Lunge wurden die hoch (+) und herunter (-) regulierten Gene getrennt analysiert. Die analysierten Gruppen wurden in funktionelle Gruppen und mehrere Untergruppen eingeteilt, denen der offizielle GO Term beigefügt ist. Die Zahlen geben an, wieviele Gene in den funktionellen Untergruppen gefunden wurden, die Zahlen in Klammern geben deren prozentualen Anteil an der Gesamtzahl der gefundenen Gene wider.

		Lunge		Milz
		+	-	
Signifikant regulierte Gene		2.361	2.198	113
Mit Panther gefundene Gene		958	927	54
Funktionelle Gruppe	Funktionelle Untergruppe			
Molecular Function	Ion channel activity (GO:0005216)	30 (3)	21 (2)	1 (2)
	Transporter activity (GO:0005215)	84 (9)	81 (9)	4 (7)
	Translation regulator activity (GO:0045182)	4 (0,5)	3 (0,5)	-
	Transcription regulator activity (GO:0030528)	94 (10)	59 (6)	4 (7)
	Enzyme regulator activity (GO:0030234)	69 (7)	87 (9)	5 (9)
	Catalytic activity (GO:0003824)	302 (32)	301 (33)	13 (24)
	Motor activity (GO:0003774)	6 (0,5)	5 (0,5)	-
	Receptor activity (GO:0004872)	110 (12)	126 (14)	6 (11)
	Antioxidant activity (GO:0016209)	-	1 (0,1)	-
	Structural molecule activity (GO:0005198)	84 (9)	129 (14)	5 (9)
	Binding (GO:0005488)	336 (35)	320 (35)	20 (37)
Biological Process	Cell communication (GO:0007154)	260 (27)	305 (33)	15 (28)
	Cellular process (GO:0009987)	361 (38)	413 (45)	19 (35)
	Localization (GO:0051179)	9 (1)	18 (2)	2 (4)
	Transport (GO:0006810)	189 (20)	195 (21)	9 (17)
	Cellular component organization (GO:0016043)	82 (9)	119 (13)	7 (13)
	Apoptosis (GO:0006915)	59 (6)	45 (5)	9 (5)
	System process (GO:0003008)	142 (15)	179 (19)	11 (20)
	Reproduction (GO:0000003)	52 (5)	53 (6)	4 (7)
	Response to stimulus (GO:0050896)	113 (12)	105 (11)	10 (19)
	Regulation of biological process (GO:0050789)	6 (0,5)	3 (0,3)	-
	Homeostatic process (GO:0042592)	23 (2)	18 (2)	2 (4)
	Developmental process (GO:0032502)	187 (20)	228 (25)	16 (30)
	Generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091)	19 (2)	26 (3)	-
	Metabolic process (GO:0008152)	436 (46)	386 (42)	22 (41)
	Cell cycle (GO:0007049)	96 (10)	86 (9)	1 (2)
	Immune system process (GO:0002376)	158 (17)	164 (18)	14 (26)
	Cell adhesion (GO:0007155)	77 (8)	149 (16)	8 (19)
Cellular Component	Protein complex (GO:0043234)	7 (1)	8 (1)	-
	Ribonucleoprotein complex (GO:0030529)	7 (1)	3 (0,3)	-
	Extracellular region (GO:0005576)	34 (4)	77 (8)	7 (13)
	Plasma membrane (GO:0005886)	13 (1)	16 (2)	-
	Intracellular (GO:0005622)	65 (7)	90 (9)	2 (4)

Biologisch relevante Signalkaskaden nach NDV Infektion

Neben der Einteilung in funktionelle Gruppen sollte auch untersucht werden, an welchen Signalkaskaden durch NDV Infektion induzierte Gene beteiligt sind. Daher wurden die zwischen veränderten Lungengewebe und Kontrollgewebe hoch und herunter regulierten Gene und die in der Milz differentiell exprimierten Gene mit KEGG pathway express analysiert. Dabei wurde ein *corrected gamma p-value* von kleiner als 0,5 als biologisch relevant angesehen.

In der Lunge wurden 71 und in der Milz 22 biologisch relevante Signalwege gefunden (siehe beiliegende CD, Mappe 2, Tabelle 69 (Milz) und Tabelle 70 (Lunge). Um die Interferon Antwort nach NDV Infektion fokussiert zu betrachten, wurden die immunrelevanten Signalwege herausgesucht (siehe Tabelle 16).

Es zeigte sich, dass 31 Signalwege, die bei einer Immunantwort von Bedeutung sind, in der Lunge biologisch relevant waren und nur 11 in der Milz. Zu den in der Lunge höchst relevanten zählten die Signalwege „Leukocyte transendothelial migration“, „Cell adhesion molecules“ und „Phosphatidyl inositol signaling system“ und damit wichtige Signalwege der Zellmigration und Zellkommunikation. Aber auch die Signalwege „Cytokine-cytokine receptor interaction“, „Adherens junction“ und „Focal adhesion“ sind als weitere wichtige Signalwege der Zellkommunikation mit Zytokinbeteiligung biologisch höchst relevant. „Antigen processing and presentation“ ist ein weiterer alleine in der Lunge höchst relevant regulierter Signalweg. Damit sind in der Lunge zahlreiche Signalwege reguliert, die an vielen Schritten der angeborenen Immunantwort beteiligt sind. Hier wurden umfassende Signalwege zur Antigen Erkennung, zur Signaltransduktion, zur Zellantwort und sogar Signalwege, die eher zu einer adaptiven Immunantwort gehören, wie „B-cell receptor interaction“ und „FC epsilon RI signaling pathway“, reguliert. Aber auch viele Signalwege, die etwas über die Art der Zellantwort aussagen, wie „Regulation of autophagy“, „Natural Killer cell mediated cytotoxicity“ und „Apoptosis“ und viele Signalwege der Zellkommunikation.

Von den in der Lunge biologisch relevantesten Signalwegen, waren in der Milz lediglich „Cell adhesion molecules“ und „Cytokine-cytokine receptor interaction“ und „Focal adhesion“ biologisch relevant. Die als höchst relevant beurteilten Signalwege in der Milz waren „Toll-like receptor signaling pathway“, „Jak-Stat signaling pathway“ und „ECM-receptor interaction“, die auch alle in der Lunge identifiziert wurden. Damit wurden in der Milz Signalwege als höchst relevant beurteilt, die an der Pathogenerkennung und an der Signaltransduktion beteiligt sind, aber auch an der Vermittlung der Zelladhäsion,

Zellmigration, Differenzierung, Proliferation und Apoptose. Als einziger ausschließlich in der Milz relevante Signalweg wurde „Ubiquitin mediated proteolysis“ reguliert und damit ein Signalweg der and der Degradierung von Proteinen beteiligt ist und somit neben „Apoptosis“ der einzige Signalweg in der Milz, der Rückschlüsse auf die Art der Zellantwort erlaubt.

Insgesamt reflektieren die biologisch relevanten Signalwege in der Lunge das Bild einer umfassenden Immunantwort mit Tendenz zu Effektormechanismen mit zytotoxischen Schwerpunkten. In der Milz hingegen scheint eher die frühe Immunantwort mit Signaltransduktion und Zellkommunikation im Vordergrund zu stehen und nur einzelne „Effektor-Signalwege“ sind relevant.

Tabelle 16 Biologisch relevante Signalwege nach NDV Infektion

Dargestellt sind die in immunologischen Prozessen biologisch relevanten Signalwege nach NDV Infektion. Analysiert wurden die signifikant regulierten Gene in Milz und verändertem Lungengewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe. Als biologisch relevant wurde ein *corrected gamma p-value* von $<0,5$ angesehen. Je niedriger dieser ist, desto höher ist die biologische Relevanz des Signalweges. Die *corrected gamma p-values* der drei höchst relevanten Signalwegen jedes Datensatzes sind rot geschrieben.

Signalkaskade	Lunge	Milz
Leukocyte transendothelial migration	1×10^{-17}	-
Cell adhesion molecules (CAMs)	4×10^{-17}	0.25397
Phosphatidylinositol signaling system	7×10^{-17}	-
Adherens junction	2×10^{-15}	-
Antigen processing and presentation	4×10^{-9}	-
Cytokine-cytokine receptor interaction	8×10^{-8}	0.01314
Focal adhesion	1×10^{-6}	0.27382
Hematopoietic cell lineage	0.00001	0.00282
ECM-receptor interaction	0.00001	0.00656
Toll-like receptor signaling pathway	0.00030	0.00064
Jak-STAT signaling pathway	0.00045	0.00296
MAPK signaling pathway	0.00122	0.16366
Regulation of actin cytoskeleton	0.00273	-
Complement and coagulation cascades	0.00373	-
T cell receptor signaling pathway	0.00882	-
Calcium signaling pathway	0.01082	-
Tight junction	0.01755	-
p53 signaling pathway	0.06689	-
TGF-beta signaling pathway	0.06911	0.00891
ErbB signaling pathway	0.08060	-
PPAR signaling pathway	0.10304	-
Natural killer cell mediated cytotoxicity	0.11888	-
Fc epsilon RI signaling pathway	0.15238	-
Apoptosis	0.17172	0.36343
Cell cycle	0.25213	-
Regulation of autophagy	0.32264	-
Notch signaling pathway	0.33689	-
B cell receptor signaling pathway	0.34113	-
mTOR signaling pathway	0.35530	-
VEGF signaling pathway	0.39688	-
ECM-receptor interaction	-	-
Ubiquitin mediated proteolysis	-	0.30026

5.6.4.6 Zytokine und Chemokine

Da viele Zytokine und Chemokine durch Relevanz in den Genexpressionsanalysen nach NDV Infektion reguliert wurden, wurde diese Gengruppe in der Milz und im veränderten Lungengewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe genauer betrachtet (siehe tabellarischer Anhang Tabelle 25).

Von den 85 auf dem Mikroarray annotierten Zytokinen und deren Rezeptoren wurden nach NDV Infektion 46 Gene signifikant reguliert (siehe tabellarischer Anhang Tabelle 25 A). Dabei wurden 30 davon auch nach IFN Injektion gefunden. Betrachtete man die Organexpression dieser 30 Gene in den beiden Experimenten fiel auf, dass ausschließlich die „allgemeinen IRGs“ Il-6 und Il-1b in Milz und Lunge gleichermaßen exprimiert wurden. Alle nach NDV Infektion regulierten Zytokine und deren Rezeptoren wurden in der Lunge gefunden. Die einzige Ausnahme bildete CSF3R (*Colony Stimulating Growth Factor 3 Receptor*), das ausschließlich in der Milz hoch reguliert wurde. Insgesamt 18 Zytokine wurden nach IFN Injektion reguliert, nicht jedoch nach NDV Infektion. Weitere Zytokine bzw. deren Rezeptoren wurden ausschließlich nach NDV Infektion in der Lunge reguliert. Unter diesen Zytokinen befanden sich auch einige der Interferone selbst und deren Rezeptoren. So wurde im veränderten Lungengewebe der infizierten Tiere IFN- α 7fach hoch reguliert und IFN- λ 16fach hoch reguliert. IFN- γ wurde im veränderten Lungengewebe der infizierten Tiere 15fach hoch reguliert. Il-10R2 als Teil des Rezeptorkomplexes von IFN- λ wurde NDV Infektion im veränderten Lungengewebe 3fach hoch reguliert. Innerhalb der durch NDV regulierten Zytokine, konnten von den durch Datenbank Analysen identifizierten „allgemeinen IRGs“ weitere 10 IRGs bestätigt werden. RIPK1 (*Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1*), Il-5, Il-4, Il-10, FAS Ligand (FASLG) und CD40 Ligand (CD40LG), CSF1R (*Colony stimulating factor 1 receptor*), IFNAR2, Il-17RA und Il-16.

Von den 30 auf dem Mikroarray annotierten Chemokinen und deren Rezeptoren wurden 17 durch die NDV Infektion reguliert (siehe tabellarischer Anhang Tabelle 25 B). Der Großteil der Chemokine wurde hoch reguliert, nur drei Chemokine wurden herunter reguliert (XCR1 (*Lymphotactin-Rezeptor*), CXCL14 (*BRAK*) und CCL17 (*TARC*)). Die Chemokine CXCL14 und die Chemokine Rezeptoren CXCR5 und CCR9 waren ausschließlich nach NDV Infektion reguliert. Mit CCR9 und CXCR5 konnten zwei weitere Vertreter der „allgemeinen IRGs“ bestätigt werden. Mit Ausnahme von CCL19 (*MIP-3 β*) und ah221 wurden alle Chemokine ausschließlich in der Lunge differentiell exprimiert. Die zwei genannten Chemokine wurden auch in der Milz reguliert. Das Chemokine CCL17, das nicht zwischen verändertem

Lungengewebe und Kontrollgewebe differentiell exprimiert wurde, wurde zwischen verändertem Lungengewebe und unverändertem Lungengewebe 2fach herunter reguliert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nach NDV Infektion die Expression zahlreicher Zytokine und Chemokine bzw. deren Rezeptoren reguliert wurde. Die meisten wurden auch nach Interferon Injektion gefunden, jedoch wurden einige Gene auch ausschließlich nach NDV Infektion exprimiert, von denen der Großteil zu den „allgemeinen IRGs“ zählt. Nur wenige Zytokine und Chemokine wurden auch in der Milz reguliert, jedoch wurden alle außer CSF3R in der Lunge gefunden. Unter ihnen fanden sich Vertreter aller Typen von Interferonen deutlich hoch reguliert.

5.6.4.7 Identifizierung von IRGs nach Infektion mit NDV

Es wurde untersucht, wie viele der insgesamt nach NDV Infektion signifikant regulierten Gene in Übereinstimmung mit den „allgemeinen IRGs“ und den „neu identifizierten IRGs“ im Huhn waren (siehe Abbildung 35). Dafür wurden die Datensätze der signifikant regulierten Gene drei Stunden nach Injektion von rek ChIFN- α , die durch Datenbank Analyse erstellte Liste an „allgemeinen IRGs“ und die signifikant regulierten Gene nach NDV Injektion miteinander verglichen.

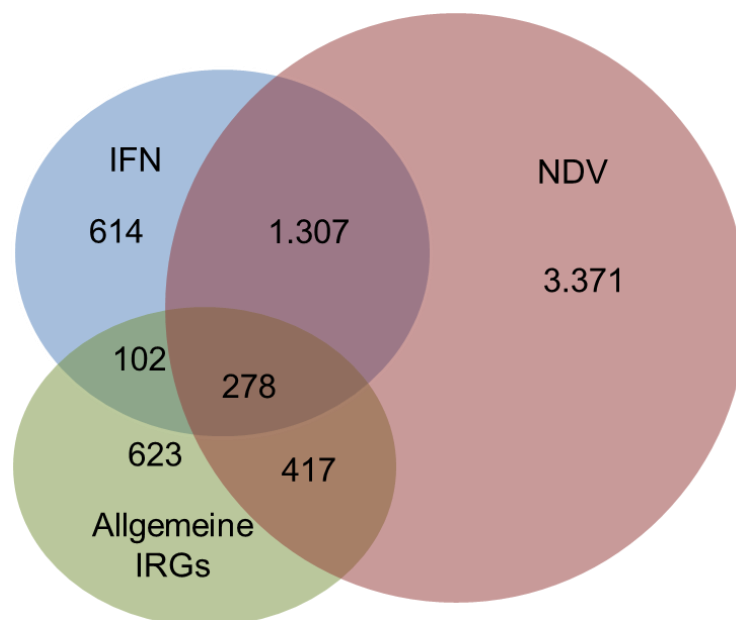


Abbildung 35 IRGs nach NDV Infektion und IFN Injektion

Dargestellt sind die Schnittmengen von signifikant regulierten Genen nach NDV Infektion, IFN Injektion in Milz und Lunge und den „allgemeinen IRGs“. Die Anzahl der Gene in der jeweiligen Schnittmenge ist auf dieser vermerkt.

Es zeigte sich, dass zahlreiche Gene beider durchgeführten Mikroarray Experimente und die „allgemeinen IRGs“ Schnittmengen miteinander bilden. Von den im Kapitel 5.5.2.3 beschriebenen 381 Genen, die drei Stunden nach Injektion von rek ChIFN- α in Übereinstimmung mit den „allgemeinen IRGs“ waren, wurden 278 Gene auch nach NDV Infektion reguliert. 417 weitere „allgemeine IRGs“ wurden nach NDV Infektion, nicht aber nach Injektion von rek ChIFN- α reguliert. Des Weiteren wurden 1.307 Gene in beiden Mikroarray Experimenten gemeinsam signifikant reguliert. Die drei Stunden nach IFN Injektion 1.921 signifikant regulierten Gene wurden zuvor als „neu identifizierte IRGs“ bezeichnet. Es konnten 1.307 dieser „neu identifizierten IRGs“ durch Infektion mit dem starken IFN Induktor NDV bestätigt werden. Weitere 3.371 Gene wurden ausschließlich nach NDV Infektion signifikant reguliert und konnten weder den „allgemeinen IRGs“ noch den „neu identifizierten IRGs“ zugeordnet werden.

Eine Liste mit den Genen die in den besprochenen Gruppen enthalten sind, findet sich auf beiliegender CD in Mappe 2, Tabelle 71.

Insgesamt wurden etwa 1/4 der Gene nach NDV Infektion auch durch IFN reguliert und etwa 1/10 der Gene gehörte zu den „allgemeinen IRGs“. Die Mehrzahl der Gene konnte jedoch keiner dieser Gruppen zugeordnet werden.

5.6.4.8 Funktionelle Analysen nach NDV Infektion regulierten IRGs und weiterer Gene

Um einen Überblick zu erhalten an welchen Prozessen die nach NDV regulierten IRGs und restlichen regulierten Gene beteiligt sind, wurden sie hinsichtlich relevanter funktioneller Gengruppe und Signalkaskaden untersucht.

Funktionelle Gengruppen Analyse der IRGs und weiterer Gene nach NDV Infektion

Zuerst wurden die „allgemeinen IRGs“, „neu identifizierten IRGs“ und die restlichen nach NDV Infektion regulierten Gene mit Panther Gene List Analysis untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass Gene in den funktionellen Gruppen „Molecular Function“, „Biological Process“ und „Cellular Component“ in allen vier analysierten Gruppen gefunden werden konnten (siehe tabellarischer Anhang Tabelle 26 A). Lediglich einzelne Gene innerhalb einer analysierten Gruppe wurden funktionellen Untergruppen zugeordnet, die bei anderen analysierten Gruppen nicht erschienen, wie beispielsweise „Antioxidant Activity“ welches ausschließlich bei den Gruppe der „restlichen Gene die nach NDV Infektion reguliert

waren“ auftaucht.

Innerhalb der „Molecular Function“ fiel auf, dass den „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ prozentual mehr Gene „Receptor Activity“ zugeordnet wurden als den „restlichen regulierten Genen“. Diese funktionelle Untergruppe soll laut Definition Gene enthalten, die sich mit einem extrazellulären oder intrazellulären *Messenger* verbinden um Veränderungen in der Zellaktivität auszulösen.

In „Biological Process“ konnte Folgendes festgestellt werden. In „Transport“, „Cellular Component Organisation“, „System Process“ und „Developmental Process“ waren in der Gruppe der „allgemeinen IRGs“, die auch nach IFN Injektion reguliert waren, deutlich weniger Gene enthalten, als in den anderen drei analysierten Gruppen nach NDV Infektion. Dabei enthielten diese Gruppen hauptsächlich Gene die an Zell- und Organkommunikation und Umbauvorgängen der Zelle beteiligt sind, wie am Zelltransport und der Organisation von Zellbestandteilen. Hingegen waren mit 22% in der Gruppe der „allgemeinen IRGs“ die auch nach IFN Injektion zu finden waren, prozentual am meisten Gene, die zu „Response to Stimulus“ gehören. In der Gruppe der „restlichen regulierten Genen“ wurden nur 9% der Gene „Response to Stimulus“ zugeordnet. Zu dieser funktionellen Untergruppe gehören Gene, die von der Einwirkung eines Stimulus bis hin zur Zellantwort eine Rolle spielen. Ähnliches ließ sich für „Immune System Process“ feststellen. Hier wurden bei allen IRG-Gruppen prozentual deutlich mehr Gene gefunden als bei den „restlichen regulierten Genen“, insbesondere bei den „allgemeinen IRGs“, die auch nach IFN Injektion reguliert wurden (siehe Abbildung 36).

Innerhalb „Cellular Component“ gab es keine Auffälligkeiten. Lediglich die Tatsache, dass in allen analysierten Gruppen Gene enthalten waren, die in die gleichen funktionellen Untergruppen eingeteilt werden konnten fällt auf.

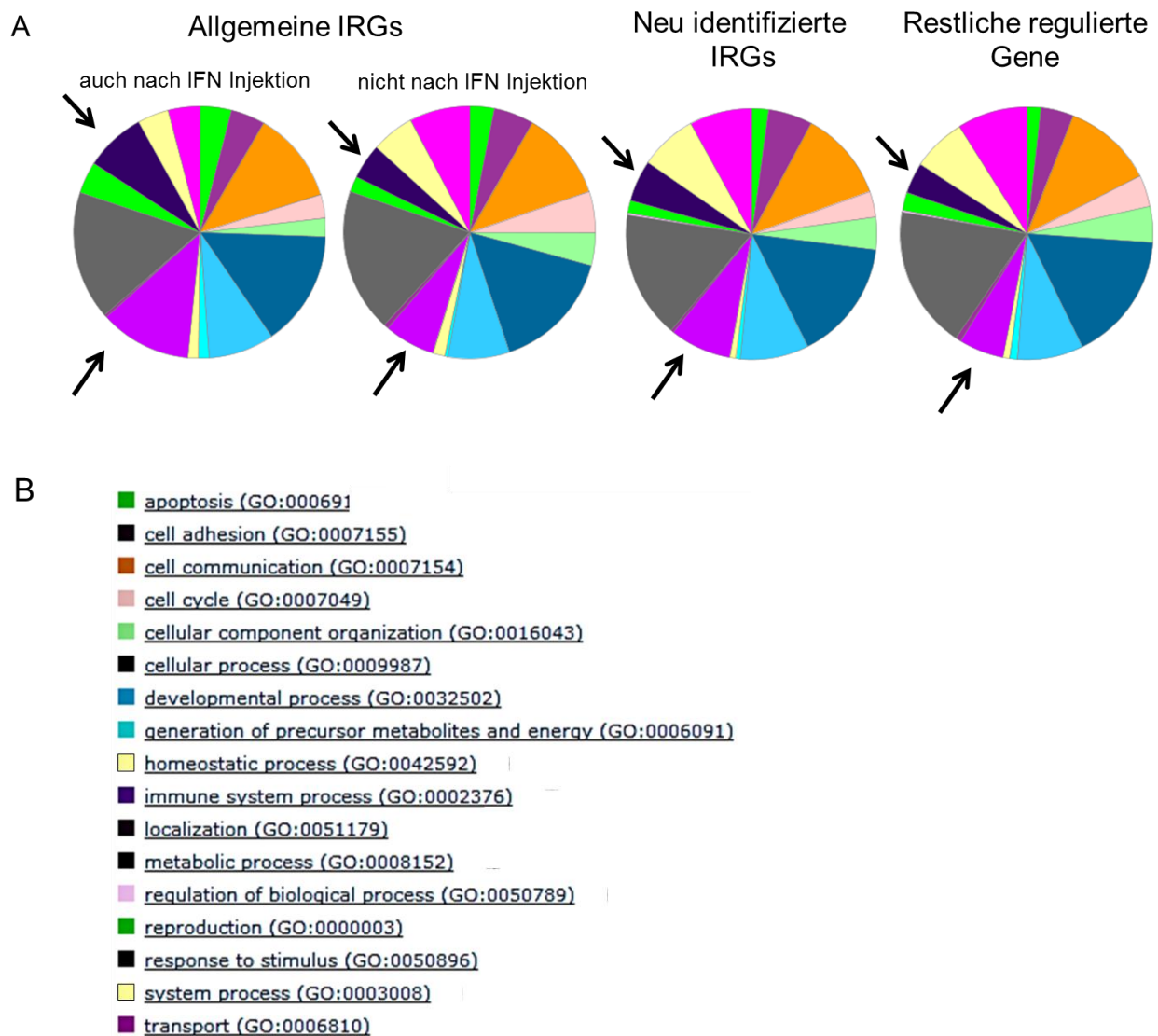


Abbildung 36 Gene Ontology der IRGs und weiterer Gene nach NDV Infektion

Dargestellt ist die Zusammensetzung von „Biological Process“ der analysierten Gruppen (A) und die Legende (B). „Immune System Process“ und „Response to Stimulus“ sind mit Pfeilmarkierung hervorgehoben.

Als nächstes wurden diese Gruppen mit der Summe der „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ die drei Stunden nach IFN-Injektion reguliert wurden verglichen (siehe Tabelle 26 B).

Dabei wurden etwa 2/3 der „neu identifizierten IRGs“ die nach IFN Injektion reguliert waren auch nach NDV Infektion reguliert. Es gab keine auffälligen Veränderungen in der Zugehörigkeit zu funktionellen Gruppen. Wenn man jedoch die „allgemeinen IRGs“ die nach NDV Infektion reguliert wurden mit den „allgemeinen IRGs“ die nach IFN Injektion reguliert wurden verglichen, konnten folgendes festgestellt werden. Obwohl fast $\frac{3}{4}$ der „allgemeinen IRGs“, die nach IFN-Injektion reguliert waren auch nach NDV Infektion reguliert wurden, veränderte sich die Zusammensetzung von „Apoptosis“. Nach NDV Infektion zählten zu

„Apoptosis“ nur noch die Hälfte der Gene, die nach IFN Injektion gefunden wurden. Diese Verschiebung beruhte auf der nach NDV Infektion fehlenden Regulation der Gene BAK1 (*BCL2-antagonist/killer 1*), FLT1 (*Fms-related tyrosine kinase 1*), IFNAR1 (*Type I IFN Receptor 1*), IFNGR1 (*Type II IFN Receptor 1*), IL-28R1 (*IFN- λ Receptor 1*), NFKB1A (*Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1*), SORD (*Sorbitol dehydrogenase*), IL-12RB2 (*Interleukin-12 Receptor, Beta 2*) und der Mitglieder der TNF-Superfamilie TNFRSF1A und TNFRSF1B.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass alle analysierten Gengruppen nach NDV Infektion grob in ähnliche funktionelle Gruppen und deren Untergruppen eingeteilt wurden, jedoch der Anteil enthaltener Gene in verschiedenen funktionellen Untergruppen zwischen den Gruppen deutlich variierte. Besonders in „Biological Process“ gab es bemerkenswerte Unterschiede in mehreren funktionellen Untergruppen, die eine wichtige Rolle in einer Immunantwort spielen. Bemerkenswert ist außerdem, dass nach NDV Infektion zwar ein großer Teil der „allgemeinen IRGs“ die auch nach IFN Injektion reguliert wurden, exprimiert wurde, jedoch zu einem verminderten Teil „Apoptosis“ zugeordnet wurden. Dies beruhte auf der nach NDV Infektion fehlenden Expression von einigen Zytokinen, Mitgliedern der TNF-Superfamilie und anderen Genen.

Pathway Express der IRGs und weiterer Genen nach NDV Infektion

Neben der Einteilung in funktionelle Gruppen sollte mit einer KEGG Pathway Express Analyse untersucht werden, ob es Unterschiede in der Beteiligung an Signalkaskaden zwischen nach NDV Infektion gefundenen „allgemeinen IRGs“, „neu identifizierten IRGs“ und den restlichen nach NDV Infektion regulierten Genen gibt.

Es konnte gezeigt werden, dass alle analysierten Gruppen nach NDV Infektion an zahlreichen Signalkaskaden beteiligt sind (siehe beiliegende CD, Mappe 2, Tabelle 72). Diese wurden nach in Immunprozessen relevanten Signalkaskaden gefiltert (siehe Tabelle 17). Die biologisch relevantesten Signalkaskaden nach NDV Infektion, die in zwei Gruppen der IRGs reguliert wurden sind „Jak-Stat signaling pathway“, „Cytokine-cytokine receptor interaction“ und „Hematopoietic cell lineage“. Keine Signalkaskade wurde durch Gene aller vier Gruppen nach NDV Infektion biologisch beeinflusst. Doch wurden sechs Signalkaskaden gemeinsam durch Gene der „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ biologisch relevant beeinflusst, die eine wichtige Rolle in der Zellkommunikation, -adhesion, -migration und -proliferation bei Entzündungsgeschehen spielen. An weiteren sechs Signalkaskaden waren „allgemeine IRGs“ die nach NDV Infektion alleine und auch nach IFN Injektion signifikant

reguliert waren, beteiligt. Mit „Toll-like receptor interaction“ zur Pathogenerkennung, „Jak-STAT signaling pathway“ zur Signaltransduktion, „T cell receptor interaction“ zum Auslösen einer entsprechenden Immunantwort und drei Signalwegen die Zelleffekte beschreiben wie „Ubiquitin mediated proteolysis“, „Apoptosis“ und „Cell cycle“ waren innerhalb der gesamten „allgemeinen IRGs“ nach NDV Infektion in einer Immunantwort weitreichende Signalwege biologisch relevant. Auch die fünf Signalwege, die alleine durch „allgemeine IRGs“ die auch nach IFN Injektion biologisch relevant reguliert wurden, sind wichtig bei der Zellkommunikation, dem Zellstoffwechsel und beim Auslösen einer – oftmals fatalen- Zellantwort, wie „TGF-beta signaling pathway“, „PPAR signaling pathway“, „p53 signaling pathway“ und „Natural killer cell mediated cytotoxicity“. Weitere drei Signalkaskaden wurden von „allgemeinen IRGs“, die auch nach IFN Injektion reguliert wurden gemeinsam mit den „neu identifizierten IRGs“ reguliert. Sie sind wichtig bei der Zellkommunikation, der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und der Aktivierung des Komplementsystems als unspezifischen Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems.

Die „restlichen regulierten Gene“ waren nur an sechs immunrelevanten Signalkaskaden beteiligt. Von diesen waren jeweils zwei Signalwege gemeinsam mit den „allgemeinen IRGs“ oder den „neu identifizierten IRGs“ reguliert und zwei waren allein in dieser Gruppe biologisch relevant. Dabei sind alle relevanten Signalkaskaden am Zellaufbau und der Zellkommunikation beteiligt und damit eher das Immunsystem unspezifisch beeinflussende Signalkaskaden.

Außerdem wurden die Signalwege der „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ nach NDV Infektion und nach IFN Injektion miteinander verglichen (siehe Tabelle 17). Es konnte festgestellt werden, dass die „neu identifizierten IRGs“ aus beiden Experimenten die gleichen Signalkaskaden biologisch relevant beeinflussen. Einige Signalkaskaden galten nur in einem der beiden Experimente als biologisch relevant, was an der roten Schrift in Tabelle 17 zu erkennen ist. Bei den „allgemeinen IRGs“ nach IFN Injektion jedoch wurden auch „Antigen processing and presentation“ biologisch relevant beeinflusst, was der Anteil dieser Gene die nach NDV Infektion reguliert wurden nicht vermag. Hierfür ist die Abwesenheit der Gene TAP1 und TAP2 (Transporter 1 und 2, *ATP-binding cassette, sub-family B*) und CTSS (Cathepsin S) nach NDV Infektion verantwortlich, die nach IFN-Injektion signifikant reguliert wurden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nach NDV Infektion zahlreiche Signalkaskaden des Immunsystems biologisch relevant beeinflusst wurden. Dabei beeinflussten alle Gene die zu den IRGs zählen (allgemeine und neu identifizierte), einen

Großteil der immunrelevanten Signalwege, in denen sich der Ablauf einer Immunreaktion widerspiegelt. Die Gene, die nach NDV Infektion reguliert wurden, aber nicht zu den IRGs zählen, sind hingegen nur an wenigen immunrelevanten Signalwegen beteiligt, die zudem eher unspezifisch am Immunsystem beteiligt sind. Vergleich man die „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ nach NDV Infektion und IFN Injektion, sah man, dass die gleichen Signalkaskaden beeinflusst werden, wenn auch teilweise mit unterschiedlicher biologischer Relevanz. Nur der Signalweg „Antigen processing and presentation“ wurde durch „allgemeine IRGs“ nach NDV Infektion nicht beeinflusst.

Tabelle 17 Durch IRGs und weitere Gene nach NDV Infektion beeinflusste Signalwege

Gelistet sind die in den dargestellten Gruppen nach NDV Infektion gefundenen Signalwege und deren *corrected gamma p-value*. Zum Vergleich der Signalwege nach NDV Infektion und nach IFN Injektion sind die biologisch relevanten Signalwege aller „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ IFN Injektion dargestellt. Als biologisch relevant wurde ein *corrected gamma p-value* <0,5 gerechnet. Die *corrected gamma p-values* der höchst relevanten Signalwege sind rot geschrieben. Auffälligkeiten zwischen dem NDV und IFN Experiment sind rot markiert.

	Nach NDV Infektion reguliert				Nach IFN Injektion reguliert	
	Allgemeine IRGs		Neu identifizierte IRGs	Restliche nach NDV Infektion regulierte Gene	Allgemeine IRGs	Neu identifizierte IRGs
	Auch nach IFN Injektion reguliert	Nicht nach IFN Injektion reguliert				
Hematopoietic cell lineage	8x10 ⁻⁷	0.0240	0.0357	-	1x10 ⁻⁵	0.2691
ECM-receptor interaction	1x10 ⁻⁴	0.0025	0.0384	-	4x10 ⁻⁵	0.2376
MAPK signaling pathway	0,0031	0.0102	0.1670	-	5x10 ⁻⁴	0.0914
Focal adhesion	0,0053	2x10 ⁻⁶	0.0819	-	0.0022	0.4873
Cell adhesion molecules (CAMs)	0,0227	6x10 ⁻⁴	0.4233	-	0.0761	0.6623
Leukocyte transendothelial migration	0,0357	0.0058	0.4128	-	0.1121	0.5623
Toll-like receptor signaling pathway	4x10 ⁻¹¹	0.0279	-	-	1x10 ⁻⁹	-
Jak-STAT signaling pathway	3x10 ⁻⁸	2x10 ⁻⁵	-	-	2x10 ⁻¹¹	-
Apoptosis	0,0124	0.0194	-	-	1x10 ⁻⁵	-
Cell cycle	0,0503	0.0316	-	-	0.0587	-
Ubiquitin mediated proteolysis	0,4266	0.0221	-	-	0.6626	-
T cell receptor signaling pathway	0,3215	0.0279	-	-	0.1384	-
Complement and coagulation cascades	4x10 ⁻⁴	-	0.1431	-	0.0027	0.1215
Gap junction	0,4718	-	0,0726	-	0,3921	0,2192
Adherens junction	0,4533	-	-	0.0056	0.6526	-
Hedgehog signaling pathway	0,5402	-	-	0.3918	0,1304	-
Regulation of actin cytoskeleton	0,3465	-	-	0.1750	0.2711	-
PPAR signaling pathway	9x10 ⁻⁴	-	-	-	1x10 ⁻⁴	-
TGF-beta signaling pathway	0,0176	-	-	-	0.0010	-
ErbB signaling pathway	0,0839	-	-	-	0.2045	-
p53 signaling pathway	0,2791	-	-	-	0.0626	-
Natural killer cell mediated cytotoxicity	0,3773	-	-	-	4x10 ⁻⁴	-
DNA replication	0,7530	-	-	-	0.1231	-
Cytokine-cytokine receptor interaction	-	1x10 ⁻⁴	0.0224	-	-	0.0023
Fc epsilon RI signaling pathway	-	0.0178	0.3936	-	-	0.7311
Phosphatidylinositol signaling system	-	0.0138	-	-	-	-
Nucleotide excision repair	-	0.0155	-	-	-	-
Ribosome	-	0.0209	-	-	-	-
Calcium signaling pathway	-	-	0.3333	0.3950	-	0.06838
Wnt signaling pathway	-	-	-	0.0114	-	-
Tight junction	-	-	-	0.4809	-	-
Antigen processing and presentation	-	-	-	-	0,4315	-

6. DISKUSSION

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war, umfassend Interferon-regulierte Gene im Huhn zu identifizieren, die für die mannigfaltigen Funktionen von Interferon verantwortlich sind.

Hierfür wurden drei Ansätze gewählt. Zum einen wurden durch intensive Analyse von Datenbanken für IRGs bei Maus und Mensch über 1.400 IRGs identifiziert, die auch im Hühnergenom zu finden sind. Anschließend wurde Hühnern rek ChIFN- α intravenös injiziert und das Transkriptom von Lunge und Milz untersucht, um Typ I IFN regulierte IRGs im Huhn zu identifizieren. Zuletzt wurde die Genexpression in Lunge und Milz nach Infektion mit Newcastle Disease Virus untersucht, um IRGs in einem natürlichen Infektionsmodell zu bestätigen.

6.1. Datenbank-Analyse zur Identifizierung von IRGs im Huhn

Für die Datenbank Analyse wurden die Gen Symbole aus der Annotation des im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten „Agilent 4x44K chicken-Genom“ Katalog-Mikroarrays mit im Säugetier bekannten IRGs abgeglichen. Hierfür wurden mehrere Datenbanken herangezogen, die ihre Informationen aus Mikroarray- und Proteomik-Experimenten von IFN behandelten Zellen (vor allem von Maus und Mensch) bezogen. Nach Abgleich der mehr als 13.300 Hühner Gen Symbole konnten über 1.250 mit der INTERFEROME Datenbank übereinstimmende Gene gefunden werden. Da laut INTEFEROME etwa 2.000 IRGs in der Datenbank zu finden sind, konnten auf diese Weise etwa 800 IRGs nicht gefunden werden. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnten diese Gene nicht in unserer Annotation zu finden sein, da sie entweder nicht im Huhn beschrieben wurden, oder die Annotation dieser Gene versäumt wurde. Zum anderen könnten aufgrund von Gen-Schreibweisen oder Gen-Synonymen die Konvertierung in humane und murine *Ensembl* Signaturen misslungen sein. Beispielsweise erkennt der „Gene ID Converter“ das Gen Symbol der Proteinkinase R „EIF2AK2“, aber nicht „PKR“.

Als weitere Datenbank wurde die ISG-Database verwendet. In dieser werden über 300 Interferon-stimulierte Gene (ISGs) in funktionelle Kategorien eingeteilt [250]. Dadurch konnten weitere 77 IRGs identifiziert werden. Weitere 81 IRGs wurden mit Hilfe einer Publikation von Schoggins *et al.* identifiziert, die bekannte IRGs auf antivirale Aktivität testeten [253].

Insgesamt war es durch die Datenbank Analyse möglich, über 1.400 „allgemeine IRGs“ zu

identifizieren deren Gen Sequenzen auch im Hühnergenom zu finden sind und die im Säugetier als IRGs bekannt sind. In der Annahme, dass im Säugetier etwas über 2.000 IRGs bekannt sind, heißt das, dass über $\frac{2}{3}$ dieser IRGs auch im Hühnergenom gefunden werden konnten. Dies bedeutet jedoch nicht, dass mit dieser Datenbank Analyse alle möglichen Interferon-regulierten Gene im Huhn identifiziert wurden. Einerseits könnten es aus beschriebenen Gründen misslungen sein, Gene als IRGs zu identifizieren, die aber durch Interferon induziert werden. Andererseits ist es möglich, dass die verwendeten Datenbanken Lücken aufweisen. Zuletzt könnte es hühnerspezifische IRGs geben, die von den Säugetier-Datenbanken nicht erfasst wurden. Erwähnt werden sollte auch, dass alleine die Tatsache, dass Säuger IRGs auch im Hühnergenom zu finden sind, nicht bedeutet, dass sie auch im Huhn durch Interferon induziert werden. Daher wurden weitere experimentelle Ansätze gewählt um diese Gene als IRGs im Huhn zu bestätigen.

6.2. IFN-Injektion zur Identifizierung von IRGs im Huhn

Da die IRG-Expression über einen großen Zeitraum in der frühen IFN-Antwort untersucht werden sollte, wurden Milz und Lunge von Hühnern drei, sechs und neun Stunden nach IFN Injektion untersucht. Die Milz wurde gewählt, da sie als wichtiges Organ bei einer Immunantwort ein sehr gutes Modell für Transkriptom Studien darstellt, die Lunge, da sie nach Infektion des Respirationstraktes schnell und potent antivirale Abwehrmechanismen induzieren muss, um den Gesamtorganismus zu schützen.

Durch die Mikroarray Analyse des Transkriptoms von Milz und Lunge nach Injektion von rek ChIFN- α konnten etwas über 25% der „allgemeinen IRGs“ bestätigt werden, die in Übereinstimmung mit IRGs im Säugetier waren. Der Großteil der signifikant regulierten Gene (etwa 2.200), war aber nicht in Übereinstimmung mit den „allgemeinen IRGs“. Um die Frage zu beantworten, ob all die zusätzlich regulierten Gene auch als IRGs bezeichnet werden können, mussten einerseits der experimentelle Ansatz kritisch überprüft, andererseits die identifizierten Gene näher charakterisiert werden.

Die Dosis und die Behandlungsintervalle wurden anhand der berechneten biologischen Halbwertszeit von rek ChIFN- α ermittelt. Die biologische Halbwertszeit (HWZ) von rek ChIFN- α liegt mit gut 30 Minuten unter der biologischen Halbwertszeit von IFN- α im Menschen [340]. Dies ist in Übereinstimmung mit Erkenntnissen, die zeigen, dass die HWZ von Immunglobulinen im Hühnerplasma deutlich kürzer ist als beim Menschen [341, 342]. Möglicherweise liegt die Ursache der vergleichsweise kurzen Halbwertszeit von rek ChIFN-

α in der spezifischen Metabolismusrate eines kleinen Organismus, die höher ist als die eines Menschen. Die konstanten Typ-I IFN Level über neun Stunden im Plasma der IFN behandelten Tiere, bestätigten die Validität des gewählten Behandlungsschemas.

Die *Heat Map* Einteilung durch „R“ von den aus Milz und Lunge nach IFN Injektion gewonnenen Proben, zeigte sehr schön, dass sich insbesondere die Tiergruppe, die über drei Stunden IFN erhalten hatte, sehr gut von der Kontrollgruppe abgrenzen lässt. Dies war in beiden Organen ersichtlich, ganz besonders auffallend in der Milz. Die Genexpressionsmuster der Gruppen die über sechs und neun Stunden IFN erhalten hatten, waren einander sehr ähnlich und überschritten sich teilweise. Weitere Analysen ergaben, dass sich die signifikant regulierten Gene nach drei, sechs und neun Stunden zum Teil überschritten, die meisten Gene jedoch nach drei Stunden besonders stark exprimiert wurden. Nur etwa 400 Gene wurden ausschließlich nach sechs oder neun Stunden reguliert. Dabei stellte sich die Frage, durch welche Stimuli die signifikant regulierten Gene neben Typ I IFN beeinflusst werden könnten. Zum einen könnten die nach sechs und neun Stunden regulierten Gene durch zuvor regulierte IRGs induziert werden und nicht durch IFN selbst. Berücksichtigt man neuere Erkenntnisse die zeigen, dass einige IRGs ihrerseits IFNs induzieren können, oder aber ohne Anwesenheit von IFNs selber IRGs induzieren können, muss diese Möglichkeit auch für die nach drei Stunden regulierten Gene in Betracht gezogen werden. Dies konnte beispielsweise für IRF-1, IRF-7 und PKR (in der Maus bzw. in Hela-Zellen) gezeigt werden, die drei Stunden nach IFN Injektion in Milz und Lunge etwa 3fach (IRF-1 und -7) bzw. etwa 7fach (PKR) hoch reguliert wurden [251, 256, 343, 344]. Da es sich bei dem injizierten IFN um rekombinant hergestelltes IFN handelte, könnte die Genexpression auch durch LPS Kontamination verursacht worden sein. Dies wurde aber durch LPS Messung und Genexpressionsanalyse nach Applikation vergleichbarer Mengen LPS ausgeschlossen. Da somit mögliche alternative Ursachen für die Genexpression drei Stunden nach IFN Injektion weitgehend ausgeschlossen wurden, wurden diese Gene im Sinne der Definition eines IRGs als ein durch Interferon reguliertes Gen, auch als solche angesehen. Dabei waren 1/6 dieser Gene „allgemeine IRGs“. Die verbliebenen 1.900 Gene, die nicht zu den „allgemeinen IRGs“ zählten, wurden als „neu identifizierte IRGs“ bezeichnet. Als Ursache für diesen auffallend geringen Anteil von „allgemeinen IRGs“ nach IFN Injektion kommen mehrere Ursachen in Frage. Ein gewisser Teil der Gene könnte fälschlicherweise aus beschriebenen Gründen nicht als IRG erkannt worden sein. Da aber über 2/3 der annotierten Gene in den IRG Datenbanken gefunden wurden, kann dies nur für einen kleinen Teil der Gene zutreffen. Eine weitere Ursache kann eine gewisse Gewebespezifität von IRGs sein. Die Datenbankinformationen wurden hauptsächlich aus *in*

vitro Versuchen zusammengetragen, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Arbeiten waren *in vivo* Versuche mit Milz und Lunge. Außerdem könnten IRGs zu anderen Zeitpunkten exprimiert werden oder benötigen eine höhere Interferon Dosis bzw. Typ II oder Typ III IFN Interferon um exprimiert zu werden. Einen Zusammenhang zwischen Dosis, Zeit, Zellart und Behandlungszeit und exprimierten IRGs konnte schon von anderen Gruppen festgestellt werden [250, 345, 346]. Schließlich sollte auch in Betracht gezogen werden, dass einige dieser Gene auch alleine im Huhn durch Interferon reguliert werden, es also Hühner spezifische IRGs gibt.

Die funktionelle Charakterisierung der „allgemeinen“ und „neu identifizierten IRGs“ bestätigte die Theorie, dass es sich bei den drei Stunden nach IFN Injektion regulierten Genen tatsächlich um IRGs handelte. Der Großteil der biologisch relevanten Signalkaskaden waren bei den „allgemeinen“ und „neu identifizierten IRGs“ gemeinsam höchst relevant reguliert, darunter Signalwege, die von Pathogenerkennung über Signaltransduktion und Zellkommunikation bis zur Zellmigration und Zelldifferenzierung reichen. Interessanterweise waren viele der alleine bei den „allgemeinen IRGs“ relevanten Signalkaskaden mit Zytotoxizität und Apoptose assoziiert, während bei den wenigen Signalwegen, die nur bei den „neu identifizierten IRGs“ biologisch relevant waren, die Zellkommunikation und die Weiterleitung von extrazellulären Signalen in die Zelle im Vordergrund stand. Auch die Analyse hinsichtlich relevanter funktioneller Gruppen zeigte, dass die „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ hauptsächlich an einander ähnlichen Prozessen beteiligt waren. Allerdings sah man auch hier, dass die „allgemeinen IRGs“ zu einem größeren Prozentsatz an Apoptose, die „neu identifizierten IRGs“ an Transportvorgängen und Zellkommunikation beteiligt waren, da bei ihnen der Prozentsatz an „Transporter Activity“ und „Transport“ deutlich höher war und funktionelle Gruppen wie „Ion Channel Activity“ und „Motor Activity“ relevant waren, was möglicherweise wiederum in dem komplexen Organsystem begründet lag. Des Weiteren waren in der Panther Gene List Analysis an „Immune System Process“ und „Response to Stimulus“ prozentual mehr „allgemeine“ als „neu identifizierte IRGs“ beteiligt, was beispielsweise an einem höheren Anteil der „allgemeinen IRGs“ an „Immune Response“ als Untergruppe von „Immune System Process“ und „Response to Stimulus“ lag. In dieser Untergruppe sind vor allem „Natural Killer Cell Activation“ und „Response to Interferon Gamma“ stärker vertreten als bei den „neu identifizierten IRGs“-erneut ein Zeichen für eine hohe Relevanz der Zytotoxizität in dieser Gruppe. Als mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen „allgemeinen“ und „neu identifizierten IRGs“ ist denkbar, dass Prozesse wie Apoptose und Zytotoxizität als IFN-Antwort bekannt und weit

erforscht sind. Daher enthalten die Datenbanken der Säugetiere viele Gene die diesen Prozessen zugeordnet werden können. Hingegen werden Transportvorgänge nicht nur spezifisch mit einer IFN-Antwort in Verbindung gebracht, was zur Folge haben könnte, dass weniger dieser Gene in den Datenbanken gelistet sind. Zudem könnte IFN *in vivo* in einer systemische Reaktion andere Zellprozesse beeinflussen als *in vitro* und insbesondere Transportvorgänge und Zellkommunikation ergeben in diesem Zusammenhang Sinn. Insgesamt konnte aber auch für die „neu identifizierten IRGs“ eine Beteiligung an ähnlichen Prozessen und Signalkaskaden, die eine hohe Relevanz bei einer Immunantwort haben, gezeigt werden. Außerdem konnten die Netzwerkanalysen mit Ingenuity die Zusammenhänge zwischen ausgewählten Genen (*Upstream Regulators*) und vielen stark signifikant regulierten Genen zeigen. Diese *Upstream Regulators* zählten vor allem zu den „allgemeinen IRGs“ und konnten in gleicher Weise mit der Expression von „allgemeinen“ und „neu identifizierten IRGs“ in Zusammenhang gebracht werden. Dies spricht einerseits dafür, dass es sich auch bei den „neu identifizierten IRGs“ um Interferon-regulierte Gene handelt, andererseits könnten diese Gene auch durch IRGs selbst induziert worden sein. In diesem Zusammenhang ist dies vor allem für die Gene denkbar, die nach sechs und/oder neun Stunden, jedoch fraglich für die Gene die bereits nach drei Stunden exprimiert wurden. Schließlich wurden auch zahlreiche „neu identifizierte IRGs“ in Mikroarray Experimenten nach viraler Infektion von Hühnern oder Hühnerzelllinien gefunden, was ein weiterer Hinweis auf die Validität unseres Ansatzes ist [263, 323, 324, 326, 328, 347].

Zusammenfassend sprechen sowohl die Validierung des experimentellen Ansatzes, als auch die Beteiligung an immunrelevanten Prozessen und Signalkaskaden dafür, dass es durch Injektion von rek ChIFN- α *in vivo* gelungen ist, 380 „allgemeine IRGs“ zu bestätigen und 1.900 „neu identifizierte IRGs“ beim Huhn zu ermitteln.

Als nächstes sollte eruiert werden, auf welche Weise IRGs im Huhn exprimiert werden. Dabei sollte der Fokus auf gewebespezifische Expression und die Expressionskinetik gelegt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es eher früh und später regulierte IRGs gibt [337, 348, 349]. Daher wurden die regulierten IRGs auf bestimmte Expressionsprofile über den Behandlungszeitraum analysiert.

Es konnten IRGs angesprochen werden, die alleine in der Milz oder der Lunge, oder in beiden Organen gemeinsam exprimiert wurden. Schon der Vergleich der Genexpression von Milz und Lunge in einer *Heat Map* zeigte, dass sich deren Genexpressionsmuster deutlich unterscheiden. Dabei wurden mehr als doppelt so viele Gene alleine in der Milz exprimiert. Die am stärksten hoch regulierten Gene waren drei Stunden nach IFN Injektion in der Milz

und in der Lunge zu finden, wobei sie in der Milz in der Regel stärker exprimiert wurden als in der Lunge. Ausnahmen hierbei bildeten TULP1 (*Tubby like Protein 1*) und FKBP5 (*FK506 Binding Protein 5*), die in der Lunge 3-4fach stärker exprimiert wurden als in der Milz. Interessanterweise waren die am stärksten herunter regulierten Gene alleine in der Milz zu finden. Der Anteil an „allgemeinen IRGs“ war bei den in Milz und Lunge regulierten Genen mit 40% am höchsten, während nur 14% der alleine in der Milz und 19% der alleine in der Lunge regulierten Gene zu den „allgemeinen IRGs“ zählten. Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass gewebespezifische IRGs aus *in vivo* Experimenten zu einem geringeren Anteil in den Datenbanken zu finden waren und es viele IRGs gibt, die unspezifisch, schnell und stark gebildet werden - und sich auch zu einem großen Teil in den Datenbanken fanden.

Vergleicht man die stark regulierten Signalkaskaden fällt auf, dass in Milz und Lunge umfassend ineinander greifende Signalkaskaden den Ablauf einer Immunreaktion widerspiegeln, angefangen bei der Pathogenerkennung über Signaltransduktion bis hin zu Signalwegen der Immuneffektorzellen wie „T cell receptor signaling pathway“ und „Natural Killer Cell mediated Cytotoxicity“. Dabei wurden „Toll-like receptor signaling pathway“ zur Pathogenerkennung, „Cytokine-cytokine receptor interaction“ als Signalweg der Zellkommunikation und „Apoptosis“ als besonders biologisch relevant eingestuft. Hingegen spielten alle Signalwege die ausschließlich in der Milz als biologisch relevant eingestuft wurden eine wichtige Rolle bei der Zellinteraktion, wie „Cell Cycle“ und „Adherens-“ und „Tight Junction“. Der Fokus der ausschließlich in der Lunge relevanten Signalwege liegt auf DNS Reparaturvorgängen und Signalweiterleitung. Die Erklärung für diese Verteilung könnte darin liegen, dass systemisch zahlreiche IRGs eine umfassende Immunantwort gewährleisten müssen. In der Milz, als einer der zentralen Orte der Immunreaktion, spielt dabei die Zellkommunikation und -interaktion eine besonders wichtige Rolle. In der Lunge, die durch ihren direkten Kontakt zur Umwelt einer andauernden Gefahr durch weitere Infektionen ausgesetzt ist, müssen Viren rasch beseitigt und Schäden an der DNS repariert werden. Für diese These spricht zudem, dass an der funktionellen Untergruppe „Response to external stimulus“ in der Lunge ein besonders großer Anteil an Genen beteiligt war.

Betrachtet man die Genexpressionskinetik über die Behandlungszeit, finden sich in Milz und Lunge viele Gene, die nur nach drei Stunden hoch oder herunter reguliert wurden, aber auch viele Gene die über die gesamte Behandlungsdauer anhaltend stark exprimiert wurden. Unter den Genen, die in Milz und Lunge gemeinsam reguliert wurden, fiel auf, dass insbesondere viele Zytokine und Chemokine bzw. deren Rezeptoren, die in der Milz nach drei Stunden stark exprimiert wurden, um anschließend schwächer oder gar nicht mehr exprimiert zu

werden, in der Lunge eine über die Zeit ansteigende Expressionskinetik zeigten (siehe Kapitel 6.5). Nur wenige Gene zeigten diese ansteigende Expressionskinetik in der Milz - diese wurden dann fast alle auf die gleiche Weise in der Lunge exprimiert. Einige Gene in der Lunge, jedoch nur zehn Gene in der Milz wurden nach drei und neun Stunden stark exprimiert, nach sechs Stunden jedoch nur wenig oder gar nicht. Dies spricht entweder für eine phasische Expression, oder für sehr kurzzeitig exprimierte IRGs, welche durch einen neuerlichen Stimulus erneut exprimiert werden. Eine mögliche Erklärung dafür, dass dies vor allem in der Lunge, weniger aber in der Milz zu sehen war, könnte sein, dass die besonders starke Expression vieler Gene in der Milz eine intermittierende Genexpression einzelner Gene verhindert hat, während dies in der Lunge möglich war. Dies würde auch die These stützen, dass vor allem die nach drei Stunden regulierten Gene IRGs sind, die zu späteren Zeitpunkten zur Expression weiterer Gene führt. Andererseits könnte es auch ein Hinweis sein, dass eine anhaltende Expression von IRGs in einem zentralen Organ der Immunantwort wichtig für die systemische IFN-Antwort ist.

Andere Gene wurden in der Milz nach drei Stunden stark herunter reguliert, nach sechs und neun Stunden aber schwächer, was in der Lunge nur für vier Gene gezeigt werden konnte. Eine ähnliche Expressionskinetik zeigen einige hoch regulierte Gene in Milz und Lunge. Eines dieser Gene ist USP18 (*Ubiquitin Specific Peptidas 18*), für das in der Maus gezeigt werden konnte, dass es in einer antiviralen Antwort zwar die Virusreplikation hemmt, jedoch gleichzeitig dafür sorgt, dass insbesondere in der marginal Zone der Milz noch genug Virus gebildet wird, um eine IFN-Antwort aufrecht zu erhalten [350]. Diese anhaltende, schwache Virusreplikation konnte für Makrophagen gezeigt werden, die sehr viel USP18 exprimierten. Da im durchgeführten Experiment kein Virus vorhanden war scheint eine schwächer werdende, doch vorhandene Expression dieses Gens schlüssig. Zudem wurde USP18 mRNA auch 16h nach NDV Infektion in der Milz nachgewiesen.

6.3. NDV Infektion zur Bestätigung der IRGs im Huhn

Im dritten Ansatz wurden die IRGs im Huhn in einem natürlichen Infektionsmodell verifiziert. Hierfür wurde der lentogene Impfstamm La Sota des Paramyxovirus Newcastle Disease Virus (NDV) gewählt, welcher als guter Interferon Induktor beschrieben ist [351]. Obwohl beschrieben wurde, dass lentogenes NDV nur am Applikationsort repliziert [352, 353], konnten frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe belegen, dass intratracheal appliziertes lentogenes NDV auch in der Milz repliziert [339]. Da wir die Ergebnisse nach IFN Injektion und NDV Infektion miteinander vergleichen wollten, war es unser Ziel, das Transkriptom von

Milz und Lunge nach NDV Infektion bei einem vergleichbaren IFN-Level im Plasma zu analysieren. Einen zur IFN Injektion vergleichbaren Plasmaspiegel von Typ I IFN erhielten wir 16 Stunden nach Infektion, wie durch Messung von Typ I IFN im Plasma belegt. Die Mikroarray Analyse ergab in der Lunge insgesamt etwa 5.300 signifikant regulierte Gene, von denen etwa die Hälfte hoch bzw. herunter reguliert wurde. In der Milz wurden 113 Gene signifikant hoch reguliert. Diese könnten einerseits aufgrund von IFN induziert worden sein, andererseits wäre auch eine Reaktion auf andere Proteine des Virus denkbar. Da eingehende Analysen des Milzgewebes zeigten, dass insbesondere immunrelevante Signalkaskaden und Prozesse hier von Bedeutung waren und fast alle Gene zu den IRGs zählten, ist davon auszugehen, dass die Hauptursache der Genexpression in der Milz die NDV bedingte IFN Induktion war. Alle mit Ausnahme von acht Genen in der Milz wurden auch im Lungengewebe differentiell exprimiert. Insbesondere die 66 differentiell exprimierten Gene des unveränderten Lungengewebes der infizierten Tiere zählten zum Großteil zu den „allgemeinen“ oder „neu identifizierten IRGs“. Damit zeigte auch dieses Gewebe hauptsächlich eine IFN-Antwort. Vergleich man die nach NDV Infektion und IFN Injektion regulierten Gene, wurden knapp $\frac{2}{3}$ der Gene ausschließlich nach NDV Infektion reguliert. Einer der Hauptgründe für diese große Genzahl, ist wohl in der beobachteten Lungenpathologie zu suchen. Nach intratrachealer NDV Infektion zeigten sich in der Lunge kaudoventral lokalisierte Alterationen. Die Veränderungen äußerten sich in landkartenähnlich begrenzten, dunkelroten Herden. Der Primärbronchus der infizierten Tiere war in diesem Bereich verdickt und die Lungenränder waren kaudoventral abgerundet. Die gesamte Lunge erschien ödematös. Als mögliche Ursache für die kaudoventralen Veränderungen kommt die Anreicherung von Viruspartikeln nach intratrachealer Applikation in den kaudoventralen Lungenanteilen in Frage. Die Überlegung, dass eingeatmete Viruspartikel sich in den verschiedenen Lungenanteilen verteilen, ist in Übereinstimmung mit Erkenntnissen von Reemers *et al.*, die nach Infektion mit Influenzaviren durch Sprayinokkulation in den ventralen Lungenbereichen Virusanhäufung feststellten und dies auf die Lungenventilation und Lungenanatomie von Hühner zurückführten [263]. Auch histologisch waren diese Veränderungen deutlich sichtbar und definierten sich als massive Ansammlung von zytotoxischen T-Lymphozyten und Makrophagen bzw. möglicherweise auch dendritischer Zellen. Die durchflusszytometrische Untersuchung der Lungen ließ weiterhin auf eine Beteiligung von Granulozyten schließen. Ähnliche Beobachtungen machten Rue *et al.* in der Milz, Caecal Tonsille und im Augenlid nach Infektion mit velogenem NDV. Sie sahen 48-36 Stunden nach Infektion Lymphozytendepletion, Makrophagen Akkumulation und Heterophilen Infiltration, und zeigten damit ebenfalls Veränderungen in lymphatischen

Organen bzw. Organen mit MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*). Die von ihnen festgestellte Depletion der Lymphozyten ließe sich dabei mit der starken Pathogenität des Virus erklären [347]. Reemers *et al.* wiesen nach Infektion mit dem LPAIV Stamm H9N2 via Sprayinokkulation in ventralen Lungenanteilen massive Zellansammlungen von Makrophagen und zytotoxischen T-Lymphozyten, aber auch T-Helferzellen nach [263]. Insgesamt lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass die Vielzahl signifikant regulierter Gene in der Lunge, die nicht zu den IRGs zählen in der starken Änderung der Gewebezusammensetzung begründet liegt.

Eingehende Analysen der ausschließlich nach NDV Infektion regulierten Gene zeigten, dass diese weniger an einer Immunantwort („Immune System Process“ und „Response to Stimulus“), mehr jedoch an Umbauvorgängen der Gewebsarchitektur und Prozessen des Zellaufbaus und -teilung beteiligt waren (Signalwege „Adherens junction“, „Actin cytoskeleton“, „Tight junction“ und „WNT signaling pathway“). Neben den 3.300 Genen, die ausschließlich nach NDV Infektion reguliert wurden, zählten etwa 2.000 Gene zu den „neu identifizierten“ oder „allgemeinen IRGs“. Beim Vergleich der nach NDV Infektion regulierten Gene mit den „allgemeinen IRGs“ aus der Datenbankanalyse, konnten etwa 700 IRGs bestätigt werden, von denen etwa 280 auch nach IFN Injektion reguliert wurden. Dadurch konnten etwa 420 weitere IRGs im Huhn bestätigt werden. Eine Möglichkeit, warum diese Gene nach NDV Infektion, nicht aber nach IFN Injektion exprimiert wurden ist, dass diese IRGs durch andere Typen von IFNs induziert werden. Nach NDV Infektion wurde IFN- α in der Lunge 7fach, IFN- γ 15fach und IFN- λ 16fach hoch reguliert. Daher könnten weitere IRGs in der Lunge nach NDV Infektion durchaus aufgrund von IFN- γ induziert worden sein. Hierfür spricht außerdem, dass in der Milz, in der IFN- γ auch nach IFN Injektion hoch exprimiert wurde, nur drei weitere „allgemeine IRGs“ identifiziert werden konnten (NPM1 (*Nucleophosmin 1*), XPO1 (*Exportin 1*) und TFPI2 (*Tissue Factor Pathway Inhibitor 2*)). Tatsächlich konnte für viele dieser IRGs gezeigt werden, dass sie auch durch Typ II IFN induziert werden können. Eine weitere Erklärung könnte der Zeitpunkt der Analyse sein. Zwar wurde auf einen vergleichbaren IFN-Level zwischen den beiden Experimenten geachtet, doch bedenkt man die Möglichkeit der IRG induzierten IRGs könnten in dieser Zeit die Expression weiterer IRGs veranlasst worden sein.

6.4. Genauere Betrachtung der Gewebespezifität von IRGs

Um die Überlegung zu prüfen, ob es gewebespezifische IRGs gibt, wurde die Gewebeexpression der Gene nach NDV Infektion und IFN Injektion miteinander verglichen.

Der überwiegende Teil der nach IFN Injektion in Milz und Lunge exprimierten Gene wurde auch nach NDV Infektion in Milz und/oder Lunge gefunden, was bestätigt, dass diese Gene in Milz und Lunge durch IFN reguliert werden. Vergleicht man die Genexpressionsstärke dieser Gene fällt auf, dass vor allem antiviral wirksame IRGs wie Mx-1, PKR, IFIT-5 und OASL nach NDV Infektion und IFN Injektion ähnlich oder sogar nach NDV Infektion etwas stärker exprimiert wurden, wie beispielsweise Mx-1 in der Lunge. Rue *et al.* fanden 24 Stunden nach intranasaler und konjunktivaler Infektion mit velogenem NDV etwa 200 differentiell exprimierte Gene in der Milz, von denen ein Großteil auch nach Infektion mit lentogenem NDV in Milz und Lunge reguliert wurden [347]. Interessanterweise wurden in der Lunge diese Gene nach Infektion mit lentogenem NDV stärker exprimiert als in der Milz nach velogener Infektion, ein weiterer möglicher Hinweis, dass Milz und Lunge nach NDV Infektion unterschiedlich reagieren.

Von den 1.350 IRGs, die nach IFN Injektion alleine in der Milz reguliert wurden, wurden etwa 800 Gene nach NDV Infektion auch in der Lunge reguliert, ein Zeichen dafür, dass diese IRGs nicht „Milz spezifisch“ sind, sondern entweder zu späteren Zeitpunkten oder aufgrund viraler Infektion auch in der Lunge exprimiert werden können. Zudem wäre denkbar, dass hohe Typ II und/oder Typ III IFN-Level in der Lunge zu ihrer Expression führten. Etwa 550 nach IFN Injektion exprimierte „Milz spezifische“ IRGs wurden nach NDV Infektion nicht reguliert. Zudem konnten etwa 250 „Lungen spezifische IRGs“ im Huhn, die nach IFN Injektion reguliert wurden, durch NDV Infektion bestätigt werden, was für die Theorie von gewebespezifischen IRGs im Huhn spricht.

6.5. Zytokine und Chemokine

Unter den „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ nach IFN Injektion und NDV Infektion waren sehr viele Zytokine und Chemokine bzw. deren Rezeptoren reguliert. In beiden Experimenten waren sie an vielen der biologisch relevantesten Signalwege beteiligt, wie im „Cytokine-cytokine receptor signaling pathway“ und „Jak-STAT signaling pathway“. Auch in der Gene Ontology Analyse konnten in zahlreichen Untergruppen Zytokine und Chemokine bzw. deren Rezeptoren gefunden werden. In der Netzwerk Analyse nach IFN Injektion wurde festgestellt, dass insbesondere Chemokine und Zytokine mit stark exprimierten IRGs in Zusammenhang gebracht werden können. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Zytokine und Chemokine nach Typ I IFN Injektion und NDV Infektion eine wesentliche Rolle spielen. Auch andere Gruppen konnten nach viraler Infektion die Regulation von zahlreichen Zytokinen und Chemokinen beobachten. So konnten 24 bzw. 48

Stunden nach einer Infektion mit velogenem NDV die Expression von Zytokinen wie Il-6, Il-1 β , Il-18 und IFN- γ , sowie Chemokine wie ah221, MIP1 β (CCL4), MIP3 α (CCL20), MIP3 β (CCL19), K203, Il-8 und CXCL13 auf RNA-Ebene gezeigt werden. Il-8 war 36 Stunden nach Infektion mit velogenem NDV von primären Hühnerembryo Zellen 3,5fach hoch reguliert. Reemers *et al.* konnten nach Infektion mit Influenzavirus H9N2 via Sprayinokkulation insbesondere in den ventralen Lungenanteilen Il-6, Il-1 β , Il-13RA2, Il-18, Il-2RG, FASLG, BAFF (TNFSF13B) und K203 finden [263, 328]. Im Rahmen einer IFN-Antwort zur Bekämpfung einer möglichen Infektion ist es vollkommen schlüssig, dass Zytokine, wie Interleukine zur Kommunikation von Immunzellen, kostimulierende Faktoren, wie hämatopoetische Wachstumsfaktoren, Mitglieder der TNF/TNFR Superfamilie zur Regulierung der Zellproliferation, des Zellüberlebens, der Zelldifferenzierung und der Apoptose, sowie Chemokine zur Chemotaxis reguliert werden. Nach NDV Infektion und IFN Behandlung ist die Expression mancher Faktoren gegenläufig, was entweder ein Zeichen für den Einfluss des Virus oder weiterer induzierter Faktoren, wie beispielsweise Typ II und Typ III IFNs nach NDV Infektion sein könnte.

Die Expressionsprofile der Zytokine und Chemokine spiegeln den Beginn der Koordination einer Immunantwort mit Beteiligung von zytotoxischen Zellen und verschiedenen CD4 positiven T-Zell Subpopulationen wider, insbesondere von T_H1- und T_H17-Zellen. Erstaunlich ist dies vor allem, da viele dieser Zytokine bereits drei Stunden nach IFN Injektion reguliert wurden, ein Zeitpunkt, zu dem eigentlich nur wenige Effektormoleküle der T-Zell Subpopulationen zu erwarten sind. Die frühe Zytokin Expression von Zellen des angeborenen Immunsystems wie dendritischer Zellen und NK-Zellen ist schlüssig. Nach NDV Infektion sezernieren aktivierte dendritische Zellen unter anderem Typ I IFN, Il-12 und Il-6, wobei gezeigt werden konnte, dass Typ I IFN seinerseits die Reifung von DCs unterstützt [354]. Das sezernierte Il-12 regt NK-Zellen an, IFN- γ auszuschütten. Die Anwesenheit dieser Zytokine veranlasst naive T-Lymphozyten dazu, sich zu T_H1-Zellen (IFN- γ und Il-12) und T_H17-Zellen (Il-6) zu differenzieren. Dabei exprimieren sie den Überlebensfaktor Il-2, der ihre Differenzierung und klonale Vermehrung gewährleistet. Er wurde in beiden Experimenten in der Lunge und drei Stunden nach IFN Injektion auch in der Milz verstärkt exprimiert. Die Tatsache, dass auch die alpha-Untereinheit seines Rezeptors exprimiert wurde, ist ein weiterer Hinweis auf die ablaufenden Immunvorgänge, da die alpha-Untereinheit nur auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird, um Il-2 hochaffin binden zu können [355]. Mit Il-7R wurde nach NDV Infektion in der Lunge der Rezeptor eines weiteren Überlebensfaktors exprimiert, der von naiven T-Zellen und einigen CD8 positiven Effektorzellen exprimiert wird, aus denen

T-Gedächtniszellen hervorgehen [356]. Die Tatsache, dass Il-17F exprimiert wurde und die starke Expression von Il-22 (welches auch von T_H17-Zellen gebildet wird) sprechen dafür, dass T_H17-Zellen eine wesentliche Rolle in der IFN-Antwort spielt. Dadurch werden früh in der Infektion neutrophile Granulozyten angelockt, um die akute Entzündungsantwort zu fördern und Epithelzellen und Fibroblasten zu aktivieren. Zudem kann Il-17 auch von Makrophagen exprimiert werden [357]. Des Weiteren konnte für sie gezeigt werden, dass sie Il-6 produzieren und wiederum die Anwesenheit von Il-6 ihre Entwicklung fördert [358]. All dies ließ sich auch nach NDV Infektion bzw. IFN Injektion zeigen. Nach NDV Infektion waren in der Lunge heterophile Granulozyten durchflusszytometrisch und Makrophagen histologisch nachweisbar. In beiden Experimenten fand sich nicht nur verstärkt Il-6 mRNA, sondern drei Stunden nach IFN Injektion war auch ein deutlicher Anstieg im Il-6 Protein Gehalt des Plasmas nachweisbar.

Als Folge der entzündlichen Prozesse und Zellaktivierung wurden neben den genannten inflammatorischen Zytokinen Il-1 β , Il-12, Il-18 und Il-16, auch Wachstumsfaktoren wie CSF3 gebildet. Viele dieser Zytokine, beispielsweise Il-6, Il-1b, Il-22 und IFN- γ führen zu einer Akuten-Phase-Reaktion und wurden drei Stunden nach IFN Injektion stark in der Milz und nach neun Stunden stark in der Lunge exprimiert. Dies stützt den Verdacht, dass es nach IFN Injektion in der Milz früh zu einer starken Abwehrreaktion kommt, während die Lunge etwas später reagiert. Letztendlich steht hinter allen Regulationsmustern nach IFN-Injektion und viraler Infektion wohl ein komplexer Zusammenhang von Quervernetzung, die sich in gegenseitiger Induktion aber auch Hemmung auf Organebene und systemisch äußert.

Neben Il-6 war eines der am stärksten regulierten Zytokine Il-22, welches ein Mitglied der Il-10 Familie ist. Mitglieder dieser Familie zeigen Aminosäure-Sequenzhomologien, unterscheiden sich jedoch in vielen ihrer biologischen Funktionen. Allen gemeinsam ist, dass sie wichtige Aufgaben in der Immunantwort nach Infektion von Epithelien übernehmen. Sie werden in erster Linie von T_H1-, T_H17- und T_H22-Zellen gebildet. Im Menschen konnte eine gemeinsame Expression von T_H1-Zellen mit IFN- γ gezeigt werden [359], aber auch eine IFN- γ induzierte Expression [360]. In T_H17-Zellen konnte eine starke Il-22 Produktion gemeinsam mit Il-6, Il-23 und Il-1 β nachgewiesen werden [361]. Obwohl Il-22 in der Immunabwehr vor allem in Zusammenhang mit der Sekretion antimikrobieller Peptide in Verbindung gebracht wird, scheint es auch bei viralen Infektionen eine Rolle zu spielen, indem es beispielsweise zu einer Induktion von Akute-Phase-Proteinen wie Serum Amyloid A und Haptoglobin führt [360, 362]. Nach IFN Injektion wurde es in der Milz nach drei Stunden 34fach und nach neun Stunden 3fach und in der Lunge nach neun Stunden 3fach hoch reguliert. Nach NDV

Infektion wurde es in der Lunge 160fach hoch reguliert. Wie die Analyse mit Ingenuity zeigte, wird Il-22 in Zusammenhang mit vielen weiteren regulierten Genen gebracht, darunter IFN- γ , Il-10, Il-13, Il-4, Il-6, Il-8 und Il-1. Mit Il-10 wurde ein weiteres Il-10 Familien Mitglied nach NDV Infektion in der Lunge 3fach hoch reguliert, was ein Hinweis auf den Versuch eines regulatorischen Eingreifens in die Immunantwort sein könnte.

Zytokine, die auf eine Differenzierung der T-Lymphozyten in Richtung einer T_H2-Immunantwort hinweisen, wurden nach NDV Infektion in der Lunge nur schwach exprimiert (wie Il-4, Il-5 und Il-9) und überhaupt nicht nach IFN Injektion. Rezeptoren dieser Zytokine wurden in beiden Experimenten exprimiert, wie der Il-4R und vor allem der Il-13R α 2, der nach IFN Injektion früh in der Milz und spät in der Lunge stark exprimiert wurde und nach NDV Infektion in der Lunge 40fach hoch reguliert wurde. Die Erklärung für diese starke Expression könnte mit seiner Funktion als Internalisierungsrezeptor von Il-13 zusammenhängen, um eine T_H1-Immunantwort zu unterstützen [363].

Die Anwesenheit von CD40 nach IFN Injektion und CD40 Ligand nach NDV Infektion, kann sowohl für eine T_H2-, als auch für eine Verstärkung der T_H1-Immunantwort sprechen. Der von aktivierten CD4 positiven T-Lymphozyten exprimierte CD40 Ligand bindet an CD40 auf APCs und führt so zu Effektorfunktionen. Im Fall von B-Zellen führt diese zu deren Differenzierung und Einleitung des Klassenwechsels und zur GC-Reaktion (*Germinal Center Reaction*), im Fall von Makrophagen zur Zerstörung aufgenommener Fremdsubstanzen und im Fall von DCs zur verstärkten Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten. Schließlich wurden auch die mit Apoptose assoziierte Mitglieder der TNF/TNFR Superfamilie teilweise nach IFN Injektion und NDV Infektion exprimiert, wie FAS und FAS Ligand, TRAIL und TNFSF15.

Auch die Regulation der Chemokine bestätigt das Bild der Aktivierung von T_H1-Zellen und zytotoxischer Zellen, gestützt von den Befunden aus der Lungenhistologie und durchflusszytometrischen Analyse nach NDV Infektion. Insgesamt 14 Chemokine wurden nach IFN Injektion und/oder NDV Infektion reguliert. Dabei wurden mit CCL4, CCL1, Fraktaline und Il-8 in beiden Experimenten vier inflammatorische Chemokine und mit CCL19, CCL21, CXCL12 und CXCL13L1 vier homöostatische Chemokine reguliert. Von ihren entsprechenden Rezeptoren wurden nur wenige in beiden Experimenten gleichermaßen reguliert. Manche waren nur in einem Organ verstärkt exprimiert oder gar herunter reguliert. Beispielsweise wurde CCL19 in beiden Experimenten in Milz und Lunge stark reguliert, sein Rezeptor CCR7 war jedoch nur nach IFN Injektion in der Lunge nach drei und neun Stunden hoch reguliert. Andere Chemokine waren nur in einem der Experimente reguliert, wie die

inflammatorischen Chemokine XCL1 und CCL5 nach IFN Injektion und CXCL14 nach NDV Infektion (welches hier allerdings herunter reguliert wurde) und die homöostatischen Chemokine CXCL13, CCL20 und CCL17 nach IFN Injektion. Dabei vermitteln CCL19, CCL21 und CXCL13 den Eintritt von zirkulierenden APCs und B-Lymphozyten in Gewebe mit lymphatischen Anteilen, was möglicherweise nach Infektion vermehrt erforderlich ist. Nach IFN Injektion wurden CCL19 und CXCL13 konstant oder über die Behandlungszeit ansteigend exprimiert, nach NDV Infektion wurde CCL19 in der Lunge 81fach und in der Milz 3fach hoch reguliert. CCL21 wurde allein in der Lunge 9fach hoch reguliert. Mögliche Ursachen, für diese starke Expression von CCL19 nach NDV Infektion wären, dass aufgrund der viralen Infektion der Lunge möglichst viele APCs aktiviert werden sollen, um einerseits das Virus, andererseits Sekundärinfektionen der Lunge zu bekämpfen. Weitere Chemokine, die in beiden Experimenten stark hoch reguliert wurden, waren zwei im Huhn identifizierte inflammatorische Chemokine K203 (über das noch diskutiert wird, zu welchem Säuger Chemokin es homolog sein könnte, wobei Sequenzhomologien zu CCL16, CCL4 und CCL5 bestehen [364]) und ah221, welches Sequenzhomologien zum humanen CCL3 und equinen CCL11 aufweist [365]. Damit überwiegen nach NDV Infektion insbesondere in der Lunge die inflammatorischen Chemokine, was in Einklang mit den pathohistologischen Veränderungen steht. Die nach NDV Infektion regulierten Chemokine rekrutieren beim Säuger Monozyten, T-Lymphozyten, NK-Zellen, DCs, neutrophile Granulozyten (die im Huhn Heterophilen entsprechen) und T-Effektorzellen (zusammengefasst von [366]).

Neben den Chemokinen, wurden auch eine ganze Reihe von Matrix Metalloproteasen reguliert, wie MMP1, MMP3, MMP7, MMP9, MMP13, und MMP27 in beiden Experimenten und zudem MMP17 und MMP23B nach IFN Injektion und MMP2 nach NDV Infektion. Matrix Metalloproteasen modifizieren Chemokine durch proteolytische Spaltung und beeinträchtigen diese dadurch in ihrer Signalfähigkeit und Funktionsweise. Sie werden von Stromazellen und Leukozyten bei entzündlichen Prozessen exprimiert und beeinflussen klassischerweise den Wiederaufbau der Zellmatrix. Es konnte von dem starken Lockstoff für Lymphozyten CXCL12 gezeigt werden [367], dass es durch die MMPs 1, 2, 3, 9, 13 und 14 gespalten werden kann, wodurch es nicht mehr an seinen Rezeptor CXCR4 binden kann oder was zum Verlust der Hemmung des CXCR4 medierten Eintritts von HIV-1 in CD4 positive Zellen führen kann [368, 369]. MMP1, 3, 9 und 13 wurden nach NDV Infektion in der Lunge hoch reguliert, was einerseits als ein Chemotaxis regulierender Vorgang andererseits auch ein Zeichen für virale Immunevasion sein könnte. Es wurde nach IFN Injektion in der Milz herunter reguliert, während einer seiner Rezeptoren CXCR4 hoch reguliert wurde. Dies

könnte aufgrund von anderen regulierten IRGs geschehen sein, wie CSF3 für das gezeigt werden konnte, dass es zu einer Steigerung von CXCR4 führen kann [370]. Hingegen wurden in der NDV infizierten Lunge CXCR4 und CXCL12 hoch reguliert. Was auch durch die veränderte Zellzusammensetzung bedingt sein könnte. Der atypische Chemokinrezeptor CXCR7, der als Fänger von CXCL12 dient [371], wurde herunter reguliert. Naheliegender erscheint, dass dies wiederum mit der massiven Lymphozyten-Einwanderung, die auch histologisch gesehen werden konnte in Zusammenhang steht. Schließlich spiegeln sich die histologisch sichtbaren Zellansammlungen in der NDV infizierten Lunge in einem weiteren Punkt wider: nach NDV Infektion wurden alleine die Rezeptoren CCR2, CCR9, CXCR5 und XCR1 reguliert, ohne die gleichzeitige Regulation der passenden Liganden. Dies spricht dafür, dass Zellen, die diese Rezeptoren exprimieren in das Gewebe eingewandert sind. Alle genannten Rezeptoren werden von T-Lymphozyten (und anderen Zellen) exprimiert (zusammengefasst von [366]), deren Anwesenheit histologisch nachgewiesen werden konnten. Es gibt verschiedene denkbare Gründe, warum diese Zellen auch ohne die differentielle Expression des passenden Liganden eingewandert sind. Zum einen könnte ihre Migration durch andere, bereits besprochene Ligand/Rezeptor Interaktionen stimuliert worden sein. Zum anderen könnte das entsprechende Chemokin bereits als Protein in ausreichender Menge vorhanden sein, wodurch keine weitere mRNA Expression nötig, die Expression des Rezeptors jedoch weiterhin erforderlich ist.

Insgesamt weisen Genexpression, funktionelle Analysen, Histologie und durchflusszytometrische Messungen auf vermehrte zytotoxische Immunantwort und Differenzierung in Richtung einer T_H1 - und T_H17 Immunantwort hin, die im Zusammenhang mit einer viralen Infektion mit schweren Gewebeläsionen auch absolut sinnvoll erscheinen.

6.6. Genauere Betrachtung ausgewählter IRGs

Egal auf welche Weise man die biologische Funktion von identifizierten IRGs untersucht - es ist stets ein äußerst aufwendiges Verfahren. Daher scheint die Frage, welche IRGs interessante Kandidaten für eine funktionelle Untersuchung sind, nicht trivial. Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass nach viraler Infektion oder nach Stimulation mit Interferonen besonders stark induzierte Gene auch die wirkungsvollsten sind. In unseren Experimenten hat sich gezeigt, dass die stärksten IRGs, nicht unbedingt auch nach viraler Infektion am stärksten reguliert werden. Nach IFN Injektion wurde PTX3 in der Milz drei Stunden nach IFN Injektion 685fach hoch reguliert. In der Lunge wurde es in beiden Experimenten 3fach hoch reguliert. PTX3 ist ein „allgemeines IRG“ und Mitglied der Pentraxin Superfamilie. Weitere

Mitglieder dieser Familie sind die Akuten-Phase-Proteine C-reaktives Protein (CRP) und Serum Amyloid P Component (SAP). Bei entzündlichen Prozessen wird PTX3 schnell von Makrophagen, DCs, Fibroblasten und Epithelzellen ausgeschüttet. PTX3 bindet TNFAIP6 (drei Stunden nach IFN Injektion in der Milz 3fach hoch reguliert), welches Bestandteil der extrazellulären Matrix ist und den Komplementfaktor C1Q [372]. Es aktiviert den klassischen Weg der Komplementkaskade und erleichtert die Pathogenerkennung durch Makrophagen und DCs [372-374]. Für PTX3 konnte bereits antivirale Aktivität gegen Influenza Viren *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden [375]. Dabei hemmte PTX3 die Hämagglutinin Aktivität, die virale Infektiosität und die Neuraminidase. PTX3^{-/-}Mäuse waren empfänglicher für PTX3 sensitives Virus und die Behandlung mit menschlichem PTX3 förderte ihr Überleben und reduzierte die Viruslast in den Lungen. Allerdings scheint es PTX3 sensitive und resistente Influenza Stämme zu geben. Zu den sensitiven Influenzastämmen gehören der Laborstamm HKx31, der aus einer Reassortante von PR8, H1N1 und A/AIchi/2/68 H3N2 entstanden ist und der H3N2 Stamm Usorn/72. Neben seiner antiviralen Aktivität gegen Influenzaviren konnte diese auch gegen humane und murine Zytomegalieviren gezeigt werden [376]. Außerdem ist PTX3 auch bei bakteriellen und Pilz-Infektionen von Bedeutung [373, 374]. Es stellt sich die Frage, ob PTX3 auch im Huhn antiviral wirkt. Die drei Stunden nach IFN Injektion starke Expression von PTX3 in der Milz ließ sich nach NDV Infektion nicht feststellen. Dies kann unterschiedliche Gründe haben. Zum einen ist denkbar, dass es als Akute-Phase-Protein nach 16 Stunden in der Milz nicht mehr messbar war. Außerdem wäre es möglich, dass PTX3 nach intratrachealer Infektion von lentogenem Virus nicht in der Milz induziert wurde, da der Impfstamm nicht virulent genug ist. Die mRNA Menge von PTX3 in der Lunge war vergleichbar in beiden Experimenten - jedoch um das über 200fache geringer als nach IFN Injektion in der Milz. Der starke Expressionsunterschied nach IFN Injektion lässt sich möglicherweise mit der Zellzusammensetzung von Milz und Lunge erklären. Für Typ I IFN konnte gezeigt werden, dass es die PTX3 Expression in myeloiden DCs erhöht [377]. Außerdem wird PTX3 von Makrophagen und Fibroblasten exprimiert. Bei einem so zellreichen Organ wie der Milz, erscheint es daher stimmig, dass viel PTX3 mRNA messbar war. Die verhältnismäßig geringe Expression in der Lunge nach NDV Infektion könnte an ähnlichen Gründen liegen wie in der Milz. Neben der geringen Pathogenität des Virus ist auch in der Lunge denkbar, dass PTX3 als Akute-Phase-Protein früher exprimiert wird, insbesondere nach intratrachealer Infektion. Hierfür spricht, dass nach der Typ I IFN Behandlung die Expression in der Milz über die Behandlungszeit stetig sank und nach neun Stunden nur noch eine 11fache Expression messbar war. In der Lunge war bereits sechs Stunden nach Injektion keine verstärkte PTX3 Expression mehr messbar. Zudem konnte für

PTX3 gezeigt werden, dass seine Induktion durch IFN- γ gehemmt wird. Da nach NDV Infektion IFN- γ in der Lunge 15fach hoch reguliert wurde, ist es durchaus denkbar, dass die PTX3 Induktion unterdrückt wurde [378]. Da schon bei Mx-1 gezeigt werden konnte, dass ein antivirales Protein im Säuger und im Huhn nicht zwangsläufig dieselbe Wirkungsweise haben muss [4], müssten weitere Versuche durchgeführt werden um Aussagen über die antivirale Aktivität von PTX3 im Huhn treffen zu können.

Die Wirkungsweise von SFTPA1 (auch SP-A) scheint äußerst komplex zu sein, da manche Virusinfektionen zu einer verstärkten, andere aber zu einer verminderten Expression führen. Wurde es nach Infektion hoch reguliert, konnte eine antivirale Aktivität beispielsweise gegen verschiedene Influenzavirusstämme gezeigt werden [375, 379]. Nach Injektion von Typ I IFN wurde SFTPA1 jedoch in der Milz stark herunter reguliert. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Lee *et al.* und Reemers *et al.*, die auch eine Herunter-Regulation von SFTPA1 nach viraler Infektion mit Laryngotracheitis Virus *in vitro* und mit H9N2 *in vivo* messen konnten [326, 380]. Lee *et al.* erklärten sich dies mit einer viral bedingten Unterdrückung des EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) Signalwegs, da SFTPA1 als transkriptioneller Indikator dieses Signalweges beschrieben wurde [381]. Reemers *et al.* führten die Herunter-Regulation von SFTPA1 auf eine Unterdrückung durch den P38 MAPK Signalweg und den PI-3 Kinase Signalweg zurück, was für menschliche Lungenepithelzellen gezeigt werden konnte [382, 383]. Die äußerst stark verminderte Expression von SFTPA1 nach intravenöser Typ I IFN Injektion, spricht gegen eine primär viral bedingte Herunter-Regulation von SFTPA1, sondern scheint vielmehr durch Typ I IFN bedingt. Ähnlich wie bei PTX3, scheinen sich auch bei SFTPA1 die Auswirkungen von Typ I IFN und Typ II IFN zu unterscheiden. Für Typ II IFN konnte gezeigt werden, dass es SFTPA1 induziert [384, 385], während Wang *et al.* nach Infektion mit dem Influenzavirusstamm PR8 sowohl eine Induktion von Typ I IFN, als auch eine Reduktion der SFTPA1 Expression feststellten [386]. Mögliche Erklärung für die verminderte Expression von SFTPA1 lieferten Alcorn *et al.*, die zeigten, dass SFTPA1 die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen, wie Il-1 α , Il-1 β und die Bindungsfähigkeit des Transkriptionsfaktors NF κ B hemmt - vermutlich ein Balanceakt des Immunsystems um den Zytokinsturm nach Infektion in der Lunge zu verhindern [387]. Im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen scheint es daher logisch, dass Typ I IFN die SFTPA1 Expression in der Milz hemmt, um die Bildung proinflammatorischer Zytokine zu ermöglichen und somit eine adäquate Immunantwort zu gewährleisten. Damit ist SFTPA1 ein gutes Beispiel für ein IRG, welches durch verminderte Expression Wirkung zeigen kann.

Im Säugetier werden derzeit die Mitglieder der IFIT-Familie (IFIT1, 2, 3 und 5) stark

erforscht. Sie gehören zu den am stärksten induzierten IRGs nach IFN Injektion und viraler Infektion [388]. Auch in unseren *in vivo* Experimenten beim Huhn wurde eines ihrer Mitglieder IFIT5 nach IFN Injektion und NDV Infektion in beiden Organen stark exprimiert (Milz FC zwischen 8 und 17; Lunge FC zwischen 12 und 21). Ihre antivirale Aktivität sollen sie durch Störung der Protein Interaktion bei der Translation vermitteln [388]. Des Weiteren können sie selber direkt virale RNS, die eine wirtsfremde 5'-Triphosphat Gruppe (ss PPP-RNS) trägt, wie beispielsweise Influenzaviren und Vesikulo Stomatitis Viren, erkennen [389]. Indem sie dies vermögen, unterscheiden sie sich von RIG-I, welches ds PPP-RNS erkennt, was möglicherweise neuen Perspektiven für IFIT5 als antiviralen Kandidaten beim Huhn eröffnet, da dieses kein RIG-I besitzt [305]. Der Mechanismus wie sie nach Bindung der ssPPP-RNS antivirale Aktivität vermitteln ist noch unklar. Abbas *et al.* vermuten, dass sie sich an das Ende der viralen RNS heften und damit deren Replikation verhindern [390]. Einer der Mechanismen, wie es Viren gelingt, der Erkennung durch IFIT-Proteinen zu entgehen, ist die virale 2'-O-Methyltransferase [391, 392]. So konnte murines IFIT1/2 die Replikation von West Nile Viren ohne 2'-P-Methyltransferase hemmen, nicht jedoch die des Wildtyps. Zudem war diese Mutante avirulent in Wildtyp Mäusen, jedoch virulent in IFIT^{-/-} Mäusen. Um die antivirale Aktivität von IFIT5 im Huhn zu erforschen, könnte man IFIT5 cDNA in das aviäre retrovirale Vektorsystem RCASBP(A) einbauen und nach Expression in Hühner-Zelllinien und Hühnerembryonen mit verschiedenen Viren infizieren. Des Weiteren könnte man durch Blockade der IFITs mit Hilfe von siRNAs ihre antivirale Aktivität *in vitro* überprüfen.

Unter den „neu identifizierten IRGs“ war Albumin drei Stunden nach IFN Injektion ausschließlich in der Lunge 10fach hoch reguliert. Seine Expression sank bereits nach sechs Stunden auf eine 3fache Expression. Nach NDV Infektion war es in der Lunge 2fach hoch reguliert. Durch Ingenuity konnte Albumin mit 14 signifikant regulierten Genen, die gleichermaßen zu den „allgemeinen“ und „neu identifizierten IRGs“ gehörten, in Verbindung gebracht werden, darunter sieben Zytokine bzw. Chemokine, wie Il-1 β und Il-6. Auch wenn Albumin bisher nicht als typisches IRG beschrieben wurde, spricht viel dafür, dass es in engem Zusammenhang mit Interferonen steht. Im Stoffwechsel dient Albumin besonders der Regulation des kolloid-osmotischen Drucks und als Transportmolekül. Humanes Serum Albumin ist eines der Hauptplasmaproteine und es konnte gezeigt werden, dass es einen Bestandteil von LBP (*Lipopolysaccharide Binding Protein*) darstellt und damit zur Abwehr von gram negativen Bakterien beiträgt [393]. Dadurch scheint seine Expression auch im Rahmen einer Typ I IFN Antwort sinnvoll. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Albumin Gewebe vor oxidativem Stress schützt, indem es dessen Produkte entsorgt, wie für

menschliche neutrophile Granulozyten gezeigt werden konnte, deren ROS (*Reactive Oxygen Species*) durch BSA (Bovines Serum Albumin) Dosis abhängig beseitigt wurden [394, 395]. Da in durchflusszytometrischen Analysen der Lungen nach NDV Infektion die vermehrte Anwesenheit von heterophilen Granulozyten gezeigt werden konnte (die den neutrophilen Granulozyten des Säugetiers entsprechen) scheint die Hoch-Regulation von Albumin zur Beseitigung von deren Abbauprodukte Sinn zu ergeben. Möglicherweise trägt vom Organismus gebildetes Albumin auch im Rahmen einer Interferon Antwort dazu bei, die Wirkungsdauer von Interferon zu verlängern. Dies hat zur Folge, dass langanhaltend IRGs induziert werden [396]. Hierin könnte wiederum ein Zusammenhang mit der starken Expression vieler IRGs in der Lunge gesehen werden, die insbesondere nach neun Stunden aufgefallen war.

Ein weiteres „neu identifiziertes IRG“ welches nach IFN Injektion und NDV Infektion in beiden Organen stark exprimiert wurde, ist das EST (*Expressed Sequence Tag*) mdvn106_g10, dessen Expression in einem Mikroarray Experiment mit der Milz MDV (*Mareks Disease Virus*) infizierter Hühner zum ersten Mal registriert wurde (Gen Bank Eintrag: CF253690.1) [397]. Es besteht aus 835 Basenpaaren und ist möglicherweise Bestandteil eines bisher unbekanntes Gens. Die Suche nach der Sequenz bei Mensch und Maus ergab keine Treffer. Seine starke Regulation nach IFN Injektion und NDV und MDV Infektion spricht für eine Bedeutung in der IFN-Antwort des Huhnes. Dennoch kann über ein EST nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass es in funktionelles Protein umschreibbar ist. Um dieses EST genomisch näher zu charakterisieren könnte man eruieren, in welchem Bereich des Genoms diese Sequenz lokalisiert ist, um es möglicherweise bestimmten Genclustern zuordnen zu können. Man könnte auch die theoretisch denkbare Proteinstruktur erstellen lassen, um sich über bestimmte Strukturen der Funktion von mdv106_g10 zu nähern.

Die eingehende Betrachtung von einigen „allgemeinen“ und „neu identifizierten IRGs“ im Huhn zeigen auf, wie komplex die IFN-Antwort auch im Huhn ist und bilden die Basis für weitere Forschungsvorhaben.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Typ I Interferon stellt einen essentiellen Teil der angeborenen Immunantwort dar und besitzt antivirale und immunmodulatorische Eigenschaften. Diese Funktionen werden durch die Induktion sogenannter Interferon-regulierter Gene (IRGs) vermittelt, deren Expression in der Zelle nach Bindung von IFN an seinen Rezeptor reguliert wird. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es mit Hilfe verschiedener Ansätze erstmals, eine umfassende Anzahl Typ I Interferon-regulierte Gene beim Huhn zu identifizieren. Hierzu wurden umfangreiche Datenbankrecherchen und Transkriptomanalysen von Milz und Lunge sowohl nach Applikation von rekombinanten Hühner Interferon alpha, als auch einer Infektion mit Newcastle Disease Virus, einem starken IFN Induktor, durchgeführt. Etwa 30% der hierbei gefundenen IRGs wurden auch im Säugetier als solche beschrieben (allgemeine IRGs), weitere 1.900 Gene, die im Huhn nach Injektion von rekombinanten Hühner Interferon alpha exprimiert wurden sind jedoch beim Säuger in dieser Form nicht bekannt (neu identifizierte IRGs).

Die eingehende Charakterisierung der Hühner-IRGs zeigte, dass „neu identifizierte“ und „allgemeine IRGs“ an ähnlichen immunrelevanten Prozessen und Signalwegen beteiligt waren, wie der Komplement Kaskade, der TLR Signalkaskade und Zytokin-Interaktionen. Die Bedeutung dieser Prozesse wurde zudem durch die starke Regulation der Expression zahlreicher Vertreter der Zytokine und Chemokine gestützt, wie beispielsweise Interleukin-6, Interleukin-22 und CCL19. Auch durch Netzwerkanalysen konnte gezeigt werden, dass die Expression von „allgemeinen“ und „neu identifizierten IRGs“ in engem Zusammenhang miteinander steht. Durch die Untersuchung von verschiedenen Zeitpunkten konnte nachgewiesen werden, dass manche der im Huhn identifizierten IRGs in Milz und Lunge nur drei Stunden nach IFN Injektion stark exprimiert wurden, und andere IRGs über einen Zeitraum von neun Stunden konstante oder auch dynamische Expressionsprofile aufwiesen. Auch fiel eine Dynamik in der Genexpression in den verschiedenen Organen auf, da viele IRGs schon drei Stunden nach IFN Injektion in der Milz, aber erst neun Stunden nach IFN Injektion in der Lunge stark exprimiert wurden. Dabei unterschieden sich zahlreiche nach IFN Injektion und NDV Infektion regulierten IRGs in Milz und Lunge, während andere IRGs in beiden Organen exprimiert wurden, was darauf schließen lässt, dass viele IRGs gewebespezifisch und andere eher global exprimiert werden.

Eine Vielzahl der nach IFN Applikation identifizierten IRGs konnte auch im Infektionsmodell mit lentogenem Newcastle Disease Virus bestätigt werden. Zudem gelang es, weitere

„allgemeine IRGs“ zu identifizieren, was vermutlich auf die zusätzliche Expression von Typ II und Typ III IFN nach NDV Infektion zurückzuführen ist. In diesem Experiment konnte weiterhin zahlreiche Gene identifiziert werden, die mit den durch intratracheale NDV Infektion bedingten Alterationen des Lungengewebes assoziiert werden konnten.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass sich die durch IFN induzierten Gene beim Huhn zwischen den untersuchten Geweben und je nach Stimulus unterscheiden und neben den auch beim Säuger beschriebenen, eine Vielzahl an weiteren IRGs identifiziert werden konnte. Die erhaltene Übersicht von IRGs im Huhn kann nun als Grundlage genutzt werden, um potentielle antiviral wirksame IRGs auszuwählen und sie funktionell näher zu charakterisieren. Ein besseres Verständnis der IFN-Wirkungsweise beim Vogel könnte wesentlich zum Schutz von Huhn und Mensch vor gefährlichen Pandemien beitragen.

8. SUMMARY

Identification of interferon-regulated genes in chickens

Type I interferons (IFNs) are an indispensable part of the innate immune response and exhibit antiviral and immunomodulatory functions. Receptor binding of IFNs induces hundreds of so called IFN-regulated genes (IRGs), which mediate the main functions of IFNs. Applying different approaches, we were able to identify a comprehensive number of IRGs in the chicken for the first time.

Therefore, we performed extensive comparative database analysis and transcriptome analysis of spleen and lung tissue after intravenous injection of recombinant chicken interferon alpha (rec ChIFN- α) as well as after infection with lentogenic Newcastle Disease Virus, which is a potent inductor of Type I IFN. After IFN injection, in addition to 30% of the “common IRGs”, which exist in mammals as well as in the chicken, about 1.900 “newly identified IRGs” were found, which were regulated in the chicken, but not in the mammalian IRG databases.

A closer look at these IRGs revealed that both, “common“ and “newly identified IRGs”, were involved in immunorelevant biological processes and signalling cascades, like “complement and coagulation cascades”, “Toll-like receptor signalling pathway” and “cytokine-cytokine receptor interaction”. Relevance of these genes is supported by the fact that many of the genes with highest changes in RNA-abundance are cytokines (e.g. Interleukin-6 and Interleukin-22) and chemokines, like the lymphocyte attracting CCL19. Moreover, by network analysis it was possible to show that “common” and “newly identified IRGs” influence each other, which confirms the hypothesis of the identification of further IRGs in the chicken. We were able to show that chicken IRGs are expressed in different expression-profiles, with many IRGs expressed only three hours after IFN injection, while others showed either a constant expression over nine hours or a more dynamic expression-profile. Furthermore, this analysis revealed a dynamic organ specific IRG expression, as some IRGs were strongly induced after three hours in the spleen and but only after nine hours in the lung. In addition we were able to identify more globally expressed IRGs, which we found in spleen and lung tissue as well, and more tissue specific IRGs, which were expressed either in spleen or in lung tissue after IFN injection and/or NDV infection.

Finally, a multitude of the identified chicken IRGs could be confirmed after infection with NDV. In this experiment we were able to confirm further “common IRGs”, probably

mediated due to the expression of type II and type III IFNs after NDV infection. Induction of additional genes, which were exclusively regulated after NDV infection, was probably caused by the infection based alterations of the lung tissue. These alterations were reflected by strong cell migration seen in histology and flow cytometry.

Altogether, we were able to show, that beside of many IRGs, which exist in mammals and in chickens, there are a multitude of additional IFN induced genes in the chicken. IRGs in chickens differ depending on stimulus and analysed tissue. The obtained overview of IRGs in chickens can provide a basis for further functional characterisation. A better understanding of IFN effector mechanism can help to protect chicken and humans from dangerous pandemic infections.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Daviet, S., et al., *Induction of Mx and PKR failed to protect chickens from H5N1 infection*. *Viral Immunol*, 2009. **22**(6): p. 467-72.
2. Tag-El-Din-Hassan, H.T., et al., *The chicken 2'-5' oligoadenylate synthetase A inhibits the replication of West Nile virus*. *Jpn J Vet Res*, 2012. **60**(2-3): p. 95-103.
3. Haller, O. and J. Lindenmann, *Athymic (nude) mice express gene for myxovirus resistance*. *Nature*, 1974. **250**(5468): p. 679-80.
4. Schusser, B., et al., *Mx is dispensable for interferon-mediated resistance of chicken cells against influenza A virus*. *J Virol*, 2011. **85**(16): p. 8307-15.
5. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1957. **147**(927): p. 258-67.
6. Isaacs, A., J. Lindenmann, and R.C. Valentine, *Virus interference. II. Some properties of interferon*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1957. **147**(927): p. 268-73.
7. Schultz, U., B. Kaspers, and P. Staeheli, *The interferon system of non-mammalian vertebrates*. *Developmental & Comparative Immunology*, 2004. **28**(5): p. 499-508.
8. Dearolf, C.R., *JAKs and STATs in invertebrate model organisms*. *Cell Mol Life Sci*, 1999. **55**(12): p. 1578-84.
9. Miyazaki, T., N. Nozawa, and T. Kobayashi, *Clinical trial results on the use of a recombinant feline interferon-omega to protect Japanese pearl oysters *Pinctada fucata martensii* from akoya-virus infection*. *Dis Aquat Organ*, 2000. **43**(1): p. 15-26.
10. Renault, J.C., *Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(8): p. 667-76.
11. Basler, C.F. and A. Garcia-Sastre, *Viruses and the type I interferon antiviral system: induction and evasion*. *Int Rev Immunol*, 2002. **21**(4-5): p. 305-37.
12. Goodbourn, S., L. Didcock, and R.E. Randall, *Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures*. *J Gen Virol*, 2000. **81**(Pt 10): p. 2341-64.
13. Muller, U., et al., *Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense*. *Science*, 1994. **264**(5167): p. 1918-21.
14. Bach, E.A., M. Aguet, and R.D. Schreiber, *The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling*. *Annu Rev Immunol*, 1997. **15**: p. 563-91.
15. Biron, C.A., *Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look*. *Immunity*,

2001. **14**(6): p. 661-4.
16. Pestka, S., et al., *Interferons and their actions*. Annual review of biochemistry, 1987. **56**(1): p. 727-777.
 17. Gutterman, J.U., *Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(4): p. 1198-205.
 18. Sekellick, M.J., et al., *Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis*. J Interferon Res, 1994. **14**(2): p. 71-9.
 19. Kontsek, P., G. Karayianni-Vasconcelos, and E. Kontsekova, *The human interferon system: characterization and classification after discovery of novel members*. Acta Virol, 2003. **47**(4): p. 201-15.
 20. Krause, C.D. and S. Pestka, *Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives*. Pharmacol Ther, 2005. **106**(3): p. 299-346.
 21. Lefevre, F. and V. Boulay, *A novel and atypical type one interferon gene expressed by trophoblast during early pregnancy*. J Biol Chem, 1993. **268**(26): p. 19760-8.
 22. Roberts, R.M., *Interferon-tau*. Nature, 1993. **362**(6421): p. 583.
 23. Roberts, R.M., D.W. Leaman, and J.C. Cross, *Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants*. Proc Soc Exp Biol Med, 1992. **200**(1): p. 7-18.
 24. Diaz, M.O., et al., *Structure of the human type-I interferon gene cluster determined from a YAC clone contig*. Genomics, 1994. **22**(3): p. 540-52.
 25. Gentles, A.J. and S. Karlin, *Why are human G-protein-coupled receptors predominantly intronless?* Trends Genet, 1999. **15**(2): p. 47-9.
 26. Weissmann, C. and H. Weber, *The interferon genes*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1986. **33**: p. 251-300.
 27. Hardy, M.P., et al., *Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes*. Genomics, 2004. **84**(2): p. 331-45.
 28. van Pesch, V., et al., *Characterization of the murine alpha interferon gene family*. J Virol, 2004. **78**(15): p. 8219-28.
 29. Liu, Y.J., *IPC: professional type I interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 275-306.
 30. Meager, A., *The interferons*. 2006: Wiley-VCH-Verlag.
 31. Uze, G., et al., *The receptor of the type I interferon family*. Interferon: The 50th

- AnniVersary, 2007: p. 71-95.
32. Domanski, P. and O.R. Colamonici, *The type-I interferon receptor. The long and short of it.* Cytokine Growth Factor Rev, 1996. **7**(2): p. 143-51.
 33. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, *Cytokine-mediated control of viral infections.* Virology, 2000. **273**(2): p. 221.
 34. Wheelock, E.F., *Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin.* Science, 1965. **149**(3681): p. 310-1.
 35. Young, H.A. and K.J. Hardy, *Role of interferon-gamma in immune cell regulation.* J Leukoc Biol, 1995. **58**(4): p. 373-81.
 36. Akira, S., *The role of IL-18 in innate immunity.* Curr Opin Immunol, 2000. **12**(1): p. 59-63.
 37. Fukao, T., S. Matsuda, and S. Koyasu, *Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells.* J Immunol, 2000. **164**(1): p. 64-71.
 38. Golab, J., et al., *Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18--a bridge too far?* Immunol Lett, 2000. **72**(3): p. 153-7.
 39. Munder, M., et al., *Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation.* J Exp Med, 1998. **187**(12): p. 2103-8.
 40. Munder, M., et al., *Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18 - a bridge built on solid ground.* Immunol Lett, 2001. **75**(2): p. 159-60.
 41. Otani, T., et al., *Identification of IFN-gamma-producing cells in IL-12/IL-18-treated mice.* Cell Immunol, 1999. **198**(2): p. 111-9.
 42. Dinarello, C.A., *IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family.* J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(1 Pt 1): p. 11-24.
 43. Salazar-Mather, T.P., T.A. Hamilton, and C.A. Biron, *A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense.* J Clin Invest, 2000. **105**(7): p. 985-93.
 44. Pien, G.C., et al., *Cutting edge: selective IL-18 requirements for induction of compartmental IFN-gamma responses during viral infection.* J Immunol, 2000. **165**(9): p. 4787-91.
 45. Schindler, H., et al., *The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4.* J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3075-82.

46. Sen, G.C., *Viruses and interferons*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 255-81.
47. Taya, Y., et al., *Cloning and structure of the human immune interferon-gamma chromosomal gene*. EMBO J, 1982. **1**(8): p. 953-8.
48. Thiel, D.J., et al., *Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon-gamma receptor complex*. Structure, 2000. **8**(9): p. 927-36.
49. Ealick, S.E., et al., *Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma*. Science, 1991. **252**(5006): p. 698-702.
50. Bazan, J.F., *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(18): p. 6934-8.
51. Thoreau, E., et al., *Structural symmetry of the extracellular domain of the cytokine/growth hormone/prolactin receptor family and interferon receptors revealed by hydrophobic cluster analysis*. FEBS Lett, 1991. **282**(1): p. 26-31.
52. Sadir, R., E. Forest, and H. Lortat-Jacob, *The heparan sulfate binding sequence of interferon-gamma increased the on rate of the interferon-gamma-interferon-gamma receptor complex formation*. J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 10919-25.
53. Huang, S., et al., *Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1742-5.
54. Collins, J.T. and W.A. Dunnick, *Germline transcripts of the murine immunoglobulin gamma 2a gene: structure and induction by IFN-gamma*. Int Immunol, 1993. **5**(8): p. 885-91.
55. Snapper, C.M. and W.E. Paul, *Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production*. Science, 1987. **236**(4804): p. 944-7.
56. Perussia, B., et al., *Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway*. J Exp Med, 1983. **158**(6): p. 2058-80.
57. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.
58. Belich, M.P., et al., *Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins*. Curr Biol, 1994. **4**(9): p. 769-76.
59. Kelly, A., et al., *Second proteasome-related gene in the human MHC class II region*. Nature, 1991. **353**(6345): p. 667-8.
60. Groettrup, M., et al., *A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome*. Eur J Immunol, 1996. **26**(4): p. 863-9.

61. Nandi, D., H. Jiang, and J.J. Monaco, *Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit*. J Immunol, 1996. **156**(7): p. 2361-4.
62. Hisamatsu, H., et al., *Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1807-16.
63. Strobl, B., et al., *A completely foreign receptor can mediate an interferon-gamma-like response*. EMBO J, 2001. **20**(19): p. 5431-42.
64. Groettrup, M., et al., *Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why?* Biochimie, 2001. **83**(3-4): p. 367-72.
65. Mach, B., et al., *Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 301-31.
66. Billiau, A., et al., *Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-gamma*. J Immunol, 1988. **140**(5): p. 1506-10.
67. Gajewski, T.F. and F.W. Fitch, *Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones*. J Immunol, 1988. **140**(12): p. 4245-52.
68. Yoshida, A., et al., *IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **198**(3): p. 857-61.
69. Meurs, E., et al., *Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon*. Cell, 1990. **62**(2): p. 379-90.
70. Zamanian-Daryoush, M., et al., *NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(4): p. 1278-90.
71. Osman, F., et al., *A cis-acting element in the 3'-untranslated region of human TNF-alpha mRNA renders splicing dependent on the activation of protein kinase PKR*. Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3280-93.
72. Donze, O., J. Dostie, and N. Sonenberg, *Regulatable expression of the interferon-induced double-stranded RNA dependent protein kinase PKR induces apoptosis and fas receptor expression*. Virology, 1999. **256**(2): p. 322-9.
73. Balachandran, S., et al., *Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling*. EMBO J, 1998. **17**(23): p. 6888-902.
74. Wong, A.H., et al., *Physical association between STAT1 and the interferon-inducible protein kinase PKR and implications for interferon and double-stranded RNA signaling pathways*. EMBO J, 1997. **16**(6): p. 1291-304.

75. Patterson, J.B., et al., *Mechanism of interferon action: double-stranded RNA-specific adenosine deaminase from human cells is inducible by alpha and gamma interferons.* Virology, 1995. **210**(2): p. 508-11.
76. Anderson, S.L., et al., *Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus.* Virology, 1999. **256**(1): p. 8-14.
77. Vestal, D.J., V.Y. Gorbacheva, and G.C. Sen, *Different subcellular localizations for the related interferon-induced GTPases, MuGBP-1 and MuGBP-2: implications for different functions?* J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(11): p. 991-1000.
78. Kimura, T., et al., *Essential and non-redundant roles of p48 (ISGF3 gamma) and IRF-1 in both type I and type II interferon responses, as revealed by gene targeting studies.* Genes Cells, 1996. **1**(1): p. 115-24.
79. Xaus, J., et al., *Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis.* Immunity, 1999. **11**(1): p. 103-13.
80. Bernabei, P., et al., *Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death.* J Leukoc Biol, 2001. **70**(6): p. 950-60.
81. Chin, Y.E., et al., *Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(9): p. 5328-37.
82. Takizawa, T., K. Ohashi, and Y. Nakanishi, *Possible involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in cell death by influenza virus infection.* J Virol, 1996. **70**(11): p. 8128-32.
83. Yeung, M.C., J. Liu, and A.S. Lau, *An essential role for the interferon-inducible, double-stranded RNA-activated protein kinase PKR in the tumor necrosis factor-induced apoptosis in U937 cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12451-5.
84. Lee, S.B. and M. Esteban, *The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis.* Virology, 1994. **199**(2): p. 491-6.
85. Inbal, B., et al., *DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis.* Nature, 1997. **390**(6656): p. 180-4.
86. Deiss, L.P., et al., *Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death.* Genes Dev, 1995. **9**(1): p. 15-30.
87. Kissil, J.L., et al., *Isolation of DAP3, a novel mediator of interferon-gamma-induced cell death.* J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27932-6.

88. Levy-Strumpf, N., et al., *DAP-5, a novel homolog of eukaryotic translation initiation factor 4G isolated as a putative modulator of gamma interferon-induced programmed cell death*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(3): p. 1615-25.
89. Deiss, L.P., et al., *Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha*. EMBO J, 1996. **15**(15): p. 3861-70.
90. Xu, X., et al., *IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression*. Cancer Res, 1998. **58**(13): p. 2832-7.
91. Zheng, H., et al., *[Interferon-gamma up-regulates Fas expression and increases Fas-mediated apoptosis in tumor cell lines]*. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002. **22**(12): p. 1090-2.
92. Tsujimoto, M., Y.K. Yip, and J. Vilcek, *Interferon-gamma enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2441-4.
93. Kotenko, S.V., et al., *IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex*. Nat Immunol, 2003. **4**(1): p. 69-77.
94. Sheppard, P., et al., *IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R*. Nat Immunol, 2003. **4**(1): p. 63-8.
95. Vilcek, J., *Novel interferons*. Nat Immunol, 2003. **4**(1): p. 8-9.
96. Kotenko, S.V., *The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent?* Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(3): p. 223-40.
97. Lasfar, A., et al., *Characterization of the mouse IFN-lambda ligand-receptor system: IFN-lambdas exhibit antitumor activity against B16 melanoma*. Cancer Res, 2006. **66**(8): p. 4468-77.
98. Osterlund, P., et al., *Gene expression and antiviral activity of alpha/beta interferons and interleukin-29 in virus-infected human myeloid dendritic cells*. J Virol, 2005. **79**(15): p. 9608-17.
99. Osterlund, P.I., et al., *IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 3434-42.
100. Onoguchi, K., et al., *Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism*. J Biol Chem, 2007. **282**(10): p. 7576-81.
101. Eferl, R. and E.F. Wagner, *AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(11): p. 859-68.
102. Li, Q. and I.M. Verma, *NF-kappaB regulation in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 725-34.

103. Silverman, N. and T. Maniatis, *NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity*. Genes Dev, 2001. **15**(18): p. 2321-42.
104. Wathelet, M.G., et al., *Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 507-18.
105. Ank, N., et al., *Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo*. J Virol, 2006. **80**(9): p. 4501-9.
106. Coccia, E.M., et al., *Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 796-805.
107. Donnelly, R.P. and S.V. Kotenko, *Interferon-lambda: a new addition to an old family*. J Interferon Cytokine Res, 2010. **30**(8): p. 555-64.
108. Kotenko, S.V., et al., *Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2725-32.
109. Donnelly, R.P., et al., *The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(2): p. 314-21.
110. Sommereyns, C., et al., *IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo*. PLoS Pathog, 2008. **4**(3): p. e1000017.
111. Witte, K., et al., *Despite IFN-lambda receptor expression, blood immune cells, but not keratinocytes or melanocytes, have an impaired response to type III interferons: implications for therapeutic applications of these cytokines*. Genes Immun, 2009. **10**(8): p. 702-14.
112. Marcello, T., et al., *Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics*. Gastroenterology, 2006. **131**(6): p. 1887-98.
113. Doyle, S.E., et al., *Interleukin-29 uses a type I interferon-like program to promote antiviral responses in human hepatocytes*. Hepatology, 2006. **44**(4): p. 896-906.
114. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 89-97.
115. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. Cell, 1997. **91**(3): p. 295-8.
116. Thompson, M.R., et al., *Pattern recognition receptors and the innate immune response*

- to viral infection*. *Viruses*, 2011. **3**(6): p. 920-40.
117. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway's immunobiology*. 2011: Taylor & Francis.
118. Barker, B.R., D.J. Taxman, and J.P. Ting, *Cross-regulation between the IL-1beta/IL-18 processing inflammasome and other inflammatory cytokines*. *Curr Opin Immunol*, 2011. **23**(5): p. 591-7.
119. Roach, J.C., et al., *The evolution of vertebrate Toll-like receptors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(27): p. 9577-9582.
120. Bowie, A.G. and L. Unterholzner, *Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(12): p. 911-22.
121. Choe, J., M.S. Kelker, and I.A. Wilson, *Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain*. *Science*, 2005. **309**(5734): p. 581-5.
122. Horng, T., et al., *The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors*. *Nature*, 2002. **420**(6913): p. 329-33.
123. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. *Immunity*, 1999. **11**(1): p. 115-22.
124. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. *Science*, 2003. **301**(5633): p. 640-3.
125. Yamamoto, M., et al., *Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4*. *Nature*, 2002. **420**(6913): p. 324-9.
126. Yamamoto, M., et al., *TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(11): p. 1144-50.
127. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. *Nature Reviews Immunology*, 2004. **4**(7): p. 499-511.
128. Suzuki, N., S. Suzuki, and W.C. Yeh, *IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity*. *Trends Immunol*, 2002. **23**(10): p. 503-6.
129. Meylan, E., et al., *RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(5): p. 503-7.
130. Lin, R., et al., *Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(5): p. 2986-96.

131. Marie, I., J.E. Durbin, and D.E. Levy, *Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7*. EMBO J, 1998. **17**(22): p. 6660-9.
132. Sato, M., et al., *Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7*. FEBS Lett, 1998. **441**(1): p. 106-10.
133. Sato, M., et al., *Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene*. FEBS Lett, 1998. **425**(1): p. 112-6.
134. Baccala, R., et al., *TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 543-51.
135. Kaisho, T. and S. Akira, *Toll-like receptor function and signaling*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(5): p. 979-87; quiz 988.
136. Kato, H., et al., *Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response*. Immunity, 2005. **23**(1): p. 19-28.
137. Negishi, H., et al., *Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses*. Nat Immunol, 2012. **13**(7): p. 659-66.
138. Suthar, M.S., et al., *The RIG-I-like receptor LGP2 controls CD8(+) T cell survival and fitness*. Immunity, 2012. **37**(2): p. 235-48.
139. Yoneyama, M. and T. Fujita, *RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 54-65.
140. Gitlin, L., et al., *Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(22): p. 8459-64.
141. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
142. Zhang, X., et al., *An RNA helicase, RHIV -1, induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is mapped on porcine chromosome 10q13*. Microb Pathog, 2000. **28**(5): p. 267-78.
143. Cui, S., et al., *The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I*. Mol Cell, 2008. **29**(2): p. 169-79.
144. Komuro, A. and C.M. Horvath, *RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2*. J Virol, 2006. **80**(24): p. 12332-42.
145. Rothenfusser, S., et al., *The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I*. J Immunol, 2005. **175**(8): p. 5260-8.

146. Saito, T., et al., *Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(2): p. 582-7.
147. Takahashi, K., et al., *Nonsel f RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses*. Mol Cell, 2008. **29**(4): p. 428-40.
148. Yoneyama, M., et al., *Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2851-8.
149. Li, X., et al., *The RIG-I-like receptor LGP2 recognizes the termini of double-stranded RNA*. J Biol Chem, 2009. **284**(20): p. 13881-91.
150. Satoh, T., et al., *LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1512-7.
151. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-7.
152. Okabe, Y., et al., *Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation*. J Exp Med, 2005. **202**(10): p. 1333-9.
153. Ishii, K.J., et al., *A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA*. Nat Immunol, 2006. **7**(1): p. 40-8.
154. Miyahira, A.K., et al., *TANK-binding kinase-1 plays an important role during in vitro and in vivo type I IFN responses to DNA virus infections*. J Immunol, 2009. **182**(4): p. 2248-57.
155. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, *Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response*. Immunity, 2006. **24**(1): p. 93-103.
156. Takaoka, A., et al., *DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 501-5.
157. Parker, D., et al., *Streptococcus pneumoniae DNA initiates type I interferon signaling in the respiratory tract*. MBio, 2011. **2**(3): p. e00016-11.
158. Unterholzner, L., et al., *IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA*. Nat Immunol, 2010. **11**(11): p. 997-1004.
159. Chiu, Y.H., J.B. Macmillan, and Z.J. Chen, *RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway*. Cell, 2009. **138**(3): p. 576-91.
160. Cheng, G., et al., *Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): p. 9035-40.

161. Yang, P., et al., *The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway*. Nat Immunol, 2010. **11**(6): p. 487-94.
162. Zhang, X., et al., *Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN*. J Immunol, 2011. **186**(8): p. 4541-5.
163. Kim, T., et al., *Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(34): p. 15181-6.
164. Williams, B.R., *PKR; a sentinel kinase for cellular stress*. Oncogene, 1999. **18**(45): p. 6112-20.
165. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, *Type I interferons in host defense*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 373-81.
166. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. Science, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.
167. Subramaniam, P.S., B.A. Torres, and H.M. Johnson, *So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors*. Cytokine, 2001. **15**(4): p. 175-87.
168. Levy, D.E., et al., *Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control*. Genes Dev, 1988. **2**(4): p. 383-93.
169. Levy, D.E., *Whence interferon? Variety in the production of interferon in response to viral infection*. J Exp Med, 2002. **195**(4): p. F15-8.
170. Kessler, D.S., et al., *Interferon-alpha regulates nuclear translocation and DNA-binding affinity of ISGF3, a multimeric transcriptional activator*. Genes Dev, 1990. **4**(10): p. 1753-65.
171. Williams, B.R., *Transcriptional regulation of interferon-stimulated genes*. Eur J Biochem, 1991. **200**(1): p. 1-11.
172. Li, X., et al., *Formation of STAT1-STAT2 heterodimers and their role in the activation of IRF-1 gene transcription by interferon-alpha*. J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5790-4.
173. Ghislain, J.J. and E.N. Fish, *Application of genomic DNA affinity chromatography identifies multiple interferon-alpha-regulated Stat2 complexes*. J Biol Chem, 1996. **271**(21): p. 12408-13.
174. Brierley, M.M. and E.N. Fish, *Functional relevance of the conserved DNA-binding domain of STAT2*. J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 13029-36.

175. Decker, T., P. Kovarik, and A. Meinke, *GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression*. J Interferon Cytokine Res, 1997. **17**(3): p. 121-34.
176. Fish, E.N., et al., *Activation of a CrkL-stat5 signaling complex by type I interferons*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 571-3.
177. Gupta, S., M. Jiang, and A.B. Pernis, *IFN-alpha activates Stat6 and leads to the formation of Stat2:Stat6 complexes in B cells*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3834-41.
178. Briscoe, J., et al., *Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state*. EMBO J, 1996. **15**(4): p. 799-809.
179. Heim, M.H., et al., *Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway*. Science, 1995. **267**(5202): p. 1347-9.
180. Greenlund, A.C., et al., *Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process*. Immunity, 1995. **2**(6): p. 677-87.
181. Ramana, C.V., et al., *Complex roles of Stat1 in regulating gene expression*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2619-27.
182. Kerr, I.M. and G.R. Stark, *The control of interferon-inducible gene expression*. FEBS Lett, 1991. **285**(2): p. 194-8.
183. Kotenko, S.V., et al., *Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex*. EMBO J, 1997. **16**(19): p. 5894-903.
184. Matsumoto, M., et al., *Activation of the transcription factor ISGF3 by interferon-gamma*. Biol Chem, 1999. **380**(6): p. 699-703.
185. Uddin, S., et al., *Interferon-alpha engages the insulin receptor substrate-1 to associate with the phosphatidylinositol 3'-kinase*. J Biol Chem, 1995. **270**(27): p. 15938-41.
186. Plataniias, L.C., et al., *The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 2*. J Biol Chem, 1996. **271**(1): p. 278-82.
187. Lekmine, F., et al., *Activation of the p70 S6 kinase and phosphorylation of the 4E-BP1 repressor of mRNA translation by type I interferons*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 27772-80.
188. David, M., et al., *Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins*. Science, 1995. **269**(5231): p. 1721-3.
189. Uddin, S., et al., *Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase by type I interferons*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30127-31.

190. Crespo, P., et al., *Rac-1 dependent stimulation of the JNK/SAPK signaling pathway by Vav*. *Oncogene*, 1996. **13**(3): p. 455-60.
191. Crespo, P., et al., *Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product*. *Nature*, 1997. **385**(6612): p. 169-72.
192. Uddin, S., et al., *Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(17): p. 14408-16.
193. Knight, E., Jr. and B.D. Korant, *Fibroblast interferon induces synthesis of four proteins in human fibroblast cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(4): p. 1824-7.
194. Sato, K., et al., *Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(11): p. 3138-46.
195. Chin, K.C. and P. Cresswell, *Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(26): p. 15125-30.
196. Zhou, Q., et al., *Transcriptional control of the human plasma membrane phospholipid scramblase 1 gene is mediated by interferon-alpha*. *Blood*, 2000. **95**(8): p. 2593-9.
197. Sarkar, S.N. and G.C. Sen, *Novel functions of proteins encoded by viral stress-inducible genes*. *Pharmacol Ther*, 2004. **103**(3): p. 245-59.
198. Neil, S. and P. Bieniasz, *Human immunodeficiency virus, restriction factors, and interferon*. *J Interferon Cytokine Res*, 2009. **29**(9): p. 569-80.
199. Karki, S., et al., *Multiple interferon stimulated genes synergize with the zinc finger antiviral protein to mediate anti-alphavirus activity*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e37398.
200. Lindenmann, J., *Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus*. *Virology*, 1962. **16**: p. 203-4.
201. Staeheli, P., et al., *Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus*. *Cell*, 1986. **44**(1): p. 147-58.
202. Pavlovic, J., et al., *Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein*. *J Virol*, 1990. **64**(7): p. 3370-5.
203. Pavlovic, J., et al., *Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein*. *J Virol*, 1995. **69**(7): p. 4506-10.
204. Frese, M., et al., *Human MxA protein inhibits tick-borne Thogoto virus but not Dhori virus*. *J Virol*, 1995. **69**(6): p. 3904-9.

205. Frese, M., et al., *Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein*. J Virol, 1996. **70**(2): p. 915-23.
206. Schwemmle, M., et al., *Unexpected structural requirements for GTPase activity of the interferon-induced MxA protein*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 13518-23.
207. Landis, H., et al., *Human MxA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of viral structural proteins*. J Virol, 1998. **72**(2): p. 1516-22.
208. Chieux, V., et al., *Inhibition of coxsackievirus B4 replication in stably transfected cells expressing human MxA protein*. Virology, 2001. **283**(1): p. 84-92.
209. Lee, S.H. and S.M. Vidal, *Functional diversity of Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection*. Genome Res, 2002. **12**(4): p. 527-30.
210. MacMicking, J.D., *IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens*. Trends Immunol, 2004. **25**(11): p. 601-9.
211. Kochs, G., et al., *Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers*. J Biol Chem, 2002. **277**(16): p. 14172-6.
212. Meurs, E.F., et al., *Constitutive expression of human double-stranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth*. J Virol, 1992. **66**(10): p. 5805-14.
213. Balachandran, S., et al., *Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection*. Immunity, 2000. **13**(1): p. 129-41.
214. Stojdl, D.F., et al., *The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus*. J Virol, 2000. **74**(20): p. 9580-5.
215. Abraham, N., et al., *Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR*. J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5953-62.
216. Zhou, A., et al., *Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways*. Virology, 1999. **258**(2): p. 435-40.
217. Rebouillat, D. and A.G. Hovanessian, *The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(4): p. 295-308.
218. Hassel, B.A., et al., *A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon*. EMBO J, 1993. **12**(8): p. 3297-304.
219. Ghosh, A., S.N. Sarkar, and G.C. Sen, *Cell growth regulatory and antiviral effects of*

- the P69 isozyme of 2-5 (A) synthetase. Virology, 2000. 266(2): p. 319-28.*
220. Li, G., et al., *An apoptotic signaling pathway in the interferon antiviral response mediated by RNase L and c-Jun NH2-terminal kinase. J Biol Chem, 2004. 279(2): p. 1123-31.*
221. Hui, D.J., et al., *Viral stress-inducible protein p56 inhibits translation by blocking the interaction of eIF3 with the ternary complex eIF2.GTP.Met-tRNAi. J Biol Chem, 2003. 278(41): p. 39477-82.*
222. Zhu, H., J.P. Cong, and T. Shenk, *Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(25): p. 13985-90.*
223. Nicholl, M.J., L.H. Robinson, and C.M. Preston, *Activation of cellular interferon-responsive genes after infection of human cells with herpes simplex virus type 1. J Gen Virol, 2000. 81(Pt 9): p. 2215-8.*
224. Elco, C.P., et al., *Analysis of genes induced by Sendai virus infection of mutant cell lines reveals essential roles of interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and interferon but not toll-like receptor 3. J Virol, 2005. 79(7): p. 3920-9.*
225. Dorn, A., et al., *Identification of specific cellular genes up-regulated late in adenovirus type 12 infection. J Virol, 2005. 79(4): p. 2404-12.*
226. Smith, J.A., et al., *Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response. J Virol, 2006. 80(4): p. 2019-33.*
227. Terenzi, F., S. Pal, and G.C. Sen, *Induction and mode of action of the viral stress-inducible murine proteins, P56 and P54. Virology, 2005. 340(1): p. 116-24.*
228. Daffis, S., et al., *Cell-specific IRF-3 responses protect against West Nile virus infection by interferon-dependent and -independent mechanisms. PLoS Pathog, 2007. 3(7): p. e106.*
229. Janssen, R., et al., *Host transcription profiles upon primary respiratory syncytial virus infection. J Virol, 2007. 81(11): p. 5958-67.*
230. Wachter, C., et al., *Coordinated regulation and widespread cellular expression of interferon-stimulated genes (ISG) ISG-49, ISG-54, and ISG-56 in the central nervous system after infection with distinct viruses. J Virol, 2007. 81(2): p. 860-71.*
231. Dong, B., et al., *Phospholipid scramblase 1 potentiates the antiviral activity of interferon. J Virol, 2004. 78(17): p. 8983-93.*
232. Espert, L., et al., *ISG20, a new interferon-induced RNase specific for single-stranded RNA, defines an alternative antiviral pathway against RNA genomic viruses. J Biol Chem, 2003. 278(18): p. 16151-8.*

233. Mangeat, B., et al., *Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts*. Nature, 2003. **424**(6944): p. 99-103.
234. Plataniias, L.C., et al., *CrkL and CrkII participate in the generation of the growth inhibitory effects of interferons on primary hematopoietic progenitors*. Exp Hematol, 1999. **27**(8): p. 1315-21.
235. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
236. Einat, M., D. Resnitzky, and A. Kimchi, *Close link between reduction of c-myc expression by interferon and, G0/G1 arrest*. Nature, 1985. **313**(6003): p. 597-600.
237. Iwase, S., et al., *Modulation of E2F activity is linked to interferon-induced growth suppression of hematopoietic cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(19): p. 12406-14.
238. Sangfelt, O., S. Erickson, and D. Grander, *Mechanisms of interferon-induced cell cycle arrest*. Front Biosci, 2000. **5**: p. D479-87.
239. Asefa, B., et al., *The interferon-inducible p200 family of proteins: a perspective on their roles in cell cycle regulation and differentiation*. Blood Cells Mol Dis, 2004. **32**(1): p. 155-67.
240. Clemens, M.J., *Interferons and apoptosis*. J Interferon Cytokine Res, 2003. **23**(6): p. 277-92.
241. Morrison, B.H., et al., *Inositol hexakisphosphate kinase 2 mediates growth suppressive and apoptotic effects of interferon-beta in ovarian carcinoma cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 24965-70.
242. Kunzi, M.S. and P.M. Pitha, *Interferon targeted genes in host defense*. Autoimmunity, 2003. **36**(8): p. 457-61.
243. Chawla-Sarkar, M., et al., *Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis*. Apoptosis, 2003. **8**(3): p. 237-49.
244. Deonarain, R., et al., *Critical roles for IFN-beta in lymphoid development, myelopoiesis, and tumor development: links to tumor necrosis factor alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13453-8.
245. Hwang, S.Y., et al., *A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(24): p. 11284-8.
246. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, *Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 65-91.

247. Biron, C.A., et al., *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*. Annual review of immunology, 1999. **17**(1): p. 189-220.
248. Honda, K., T. Mizutani, and T. Taniguchi, *Negative regulation of IFN-alpha/beta signaling by IFN regulatory factor 2 for homeostatic development of dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(8): p. 2416-21.
249. Levy, D.E., I. Marie, and A. Prakash, *Ringling the interferon alarm: differential regulation of gene expression at the interface between innate and adaptive immunity*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(1): p. 52-8.
250. de Veer, M.J., et al., *Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(6): p. 912-20.
251. Der, S.D., et al., *Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15623-8.
252. Samarajiwa, S.A., et al., *INTERFEROME: the database of interferon regulated genes*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D852-7.
253. Schoggins, J.W., et al., *A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response*. Nature, 2011. **472**(7344): p. 481-5.
254. Zhou, Z., et al., *Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases*. J Virol, 2007. **81**(14): p. 7749-58.
255. Wang, X., E.R. Hinson, and P. Cresswell, *The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(2): p. 96-105.
256. Pine, R., *Constitutive expression of an ISGF2/IRF1 transgene leads to interferon-independent activation of interferon-inducible genes and resistance to virus infection*. J Virol, 1992. **66**(7): p. 4470-8.
257. Bick, M.J., et al., *Expression of the zinc-finger antiviral protein inhibits alphavirus replication*. J Virol, 2003. **77**(21): p. 11555-62.
258. Moehring, J.M. and W.R. Stinebring, *Examination of "species specificity" of avian interferons*. Nature, 1970. **226**(5243): p. 360-1.
259. Suresh, M., et al., *Molecular and functional characterization of turkey interferon*. J Virol, 1995. **69**(12): p. 8159-63.
260. ZIEGLER, R.E. and W.K. JOKLIK, *Effect of interferon on multiplication of avian sarcoma virus B77 in duck embryo fibroblasts*. Journal of Interferon Research, 1981. **1**(4): p. 521-538.

261. Schultz, U., et al., *Recombinant duck interferon: a new reagent for studying the mode of interferon action against hepatitis B virus*. Virology, 1995. **212**(2): p. 641-9.
262. Toth, T.E. and P.B. Siegel, *Cellular defense of the avian respiratory tract: paucity of free-residing macrophages in the normal chicken*. Avian Dis, 1986. **30**(1): p. 67-75.
263. Reemers, S.S., et al., *Differential gene-expression and host-response profiles against avian influenza virus within the chicken lung due to anatomy and airflow*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 9): p. 2134-46.
264. Pusztai, R., B. Tarodi, and I. Beladi, *Production and characterization of interferon induced in chicken leukocytes by concanavalin A*. Acta Virol, 1986. **30**(2): p. 131-6.
265. Weiler, H. and V. Von Bülow, *Detection of different macrophage-activating factor and interferon activities in supernatants of chicken lymphocyte cultures I*. Avian Pathology, 1987. **16**(3): p. 439-452.
266. Kohase, M., et al., *Purification and characterization of chick interferon induced by viruses*. J Gen Virol, 1986. **67** (Pt 1): p. 215-8.
267. Krempien, U., I. Redmann, and C. Jungwirth, *Purification of chick interferon by zinc chelate affinity chromatography and sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. J Interferon Res, 1985. **5**(1): p. 209-14.
268. Sekellick, M.J. and P.I. Marcus, *Induction of high titer chicken interferon*. Methods Enzymol, 1986. **119**: p. 115-25.
269. Lowenthal, J.W., et al., *Nomenclature of avian interferon proteins*. J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(7): p. 547-9.
270. Schultz, U., et al., *Recombinant chicken interferon from Escherichia coli and transfected COS cells is biologically active*. Eur J Biochem, 1995. **229**(1): p. 73-6.
271. Sick, C., U. Schultz, and P. Staeheli, *A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7635-9.
272. Roberts, R.M., et al., *The evolution of the type I interferons*. J Interferon Cytokine Res, 1998. **18**(10): p. 805-16.
273. Hughes, A.L. and R.M. Roberts, *Independent origin of IFN-alpha and IFN-beta in birds and mammals*. J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(8): p. 737-9.
274. Demaeyer, E. and J. Demaeyer-Guignard, *Interferons and other regulatory cytokines*. 1988: Wiley (New York).
275. Sick, C., et al., *Promoter structures and differential responses to viral and nonviral inducers of chicken type I interferon genes*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9749-54.

276. Lowenthal, J.W., et al., *Nomenclature of avian interferon proteins*. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2001. **21**(7): p. 547-549.
277. Sick, C., et al., *Promoter structures and differential responses to viral and nonviral inducers of chicken type I interferon genes*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(16): p. 9749-9754.
278. Smith, C.A., et al., *Conservation of a sex-determining gene*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 601-2.
279. Schultz, U., et al., *Recombinant chicken interferon: a potent antiviral agent that lacks intrinsic macrophage activating factor activity*. Eur J Immunol, 1995. **25**(3): p. 847-51.
280. Schumacher, B., et al., *The chicken Mx promoter contains an ISRE motif and confers interferon inducibility to a reporter gene in chick and monkey cells*. Virology, 1994. **203**(1): p. 144-8.
281. Digby, M.R. and J.W. Lowenthal, *Cloning and expression of the chicken interferon-gamma gene*. J Interferon Cytokine Res, 1995. **15**(11): p. 939-45.
282. Song, K., et al., *Expression and functional characterization of recombinant chicken interferon-gamma*. Veterinary immunology and immunopathology, 1997. **58**(3): p. 321-333.
283. Weining, K.C., et al., *Biological properties of recombinant chicken interferon-gamma*. Eur J Immunol, 1996. **26**(10): p. 2440-7.
284. Schneider, K., et al., *cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18*. J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(10): p. 879-83.
285. Karpala, A.J., et al., *Molecular cloning, expression, and characterization of chicken IFN -lambda*. J Interferon Cytokine Res, 2008. **28**(6): p. 341-50.
286. Masuda, Y., et al., *Biological Effects of Chicken Type III Interferon on Expression of Interferon-Stimulated Genes in Chickens: Comparison with Type I and Type II Interferons*. J Vet Med Sci, 2012. **74**(11): p. 1381-6.
287. Kogut, M.H., et al., *Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils*. Dev Comp Immunol, 2005. **29**(9): p. 791-807.
288. Kogut, M.H., et al., *Toll-like receptor agonists stimulate differential functional activation and cytokine and chemokine gene expression in heterophils isolated from chickens with differential innate responses*. Microbes Infect, 2006. **8**(7): p. 1866-74.
289. Fukui, A., et al., *Molecular cloning and functional characterization of chicken toll-like receptors. A single chicken toll covers multiple molecular patterns*. J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 47143-9.

290. Farnell, M.B., et al., *Oxidative burst mediated by toll like receptors (TLR) and CD14 on avian heterophils stimulated with bacterial toll agonists*. Dev Comp Immunol, 2003. **27**(5): p. 423-9.
291. Philbin, V.J., et al., *Identification and characterization of a functional, alternatively spliced Toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens*. Immunology, 2005. **114**(4): p. 507-21.
292. He, H., et al., *Profile of Toll-like receptor expressions and induction of nitric oxide synthesis by Toll-like receptor agonists in chicken monocytes*. Mol Immunol, 2006. **43**(7): p. 783-9.
293. Schwarz, H., et al., *Chicken toll-like receptor 3 recognizes its cognate ligand when ectopically expressed in human cells*. J Interferon Cytokine Res, 2007. **27**(2): p. 97-101.
294. Iqbal, M., et al., *Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with Salmonella enterica serovar typhimurium*. Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 2344-50.
295. Leveque, G., et al., *Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in chickens*. Infect Immun, 2003. **71**(3): p. 1116-24.
296. Iqbal, M., V.J. Philbin, and A.L. Smith, *Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines*. Vet Immunol Immunopathol, 2005. **104**(1-2): p. 117-27.
297. Temperley, N.D., et al., *Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 62.
298. Higuchi, M., et al., *Combinational recognition of bacterial lipoproteins and peptidoglycan by chicken Toll-like receptor 2 subfamily*. Dev Comp Immunol, 2008. **32**(2): p. 147-55.
299. Kestra, A.M., et al., *The central leucine-rich repeat region of chicken TLR16 dictates unique ligand specificity and species-specific interaction with TLR2*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 7110-9.
300. Brownlie, R., et al., *Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides*. Mol Immunol, 2009. **46**(15): p. 3163-70.
301. Roach, J.C., et al., *The evolution of vertebrate Toll-like receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9577-82.
302. Boyd, A.C., et al., *TLR15 is unique to avian and reptilian lineages and recognizes a yeast-derived agonist*. J Immunol, 2012. **189**(10): p. 4930-8.

303. Karpala, A.J., et al., *Characterization of chicken Mda5 activity: regulation of IFN-beta in the absence of RIG-I functionality*. J Immunol, 2011. **186**(9): p. 5397-405.
304. Liniger, M., et al., *Chicken cells sense influenza A virus infection through MDA5 and CARDIF signaling involving LGP2*. J Virol, 2012. **86**(2): p. 705-17.
305. Barber, M.R., et al., *Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(13): p. 5913-8.
306. Lynn, D.J., A.T. Lloyd, and C. O'Farrelly, *In silico identification of components of the Toll-like receptor (TLR) signaling pathway in clustered chicken expressed sequence tags (ESTs)*. Vet Immunol Immunopathol, 2003. **93**(3-4): p. 177-84.
307. Farnell, M.B., H. He, and M.H. Kogut, *Differential activation of signal transduction pathways mediating oxidative burst by chicken heterophils in response to stimulation with lipopolysaccharide and lipoteichoic acid*. Inflammation, 2003. **27**(4): p. 225-31.
308. Crippen, T.L., *The selective inhibition of nitric oxide production in the avian macrophage cell line HD11*. Vet Immunol Immunopathol, 2006. **109**(1-2): p. 127-37.
309. Reboul, J., et al., *Comparative genomic analysis of the interferon/interleukin-10 receptor gene cluster*. Genome research, 1999. **9**(3): p. 242-250.
310. Tiersch, T.R. and S.S. Wachtel, *On the evolution of genome size of birds*. J Hered, 1991. **82**(5): p. 363-8.
311. Jungwirth, C., et al., *Chicken interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP) and interferon regulatory factor (IRF) 1 genes reveal evolutionary conservation in the IRF gene family*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(8): p. 3105-3109.
312. Zöller, B., et al., *Sequence comparison of avian interferon regulatory factors and identification of the avian CEC-32 cell as a quail cell line*. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2000. **20**(8): p. 711-717.
313. Bernasconi, D., U. Schultz, and P. Staeheli, *The interferon-induced Mx protein of chickens lacks antiviral activity*. J Interferon Cytokine Res, 1995. **15**(1): p. 47-53.
314. Benfield, C.T., et al., *Asparagine 631 variants of the chicken Mx protein do not inhibit influenza virus replication in primary chicken embryo fibroblasts or in vitro surrogate assays*. J Virol, 2008. **82**(15): p. 7533-9.
315. Benfield, C.T.O., J.W. Lyall, and L.S. Tiley, *The cytoplasmic location of chicken mx is not the determining factor for its lack of antiviral activity*. PloS one, 2010. **5**(8): p. e12151.
316. Ewald, S.J., et al., *Association of Mx1 Asn631 variant alleles with reductions in morbidity, early mortality, viral shedding, and cytokine responses in chickens infected*

- with a highly pathogenic avian influenza virus*. Immunogenetics, 2011. **63**(6): p. 363-375.
317. Ko, J.H., et al., *Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene*. Genome Res, 2002. **12**(4): p. 595-601.
318. Sironi, L., et al., *Susceptibility of different chicken lines to H7N1 highly pathogenic avian influenza virus and the role of Mx gene polymorphism coding amino acid position 631*. Virology, 2008. **380**(1): p. 152-6.
319. Ko, J.H., et al., *Characterization of the chicken PKR: polymorphism of the gene and antiviral activity against vesicular stomatitis virus*. Japanese Journal of Veterinary Research, 2004. **51**(3-4): p. 123-133.
320. Tatsumi, R., et al., *2', 5'-Oligoadenylate synthetase gene in chicken: gene structure, distribution of alleles and their expression*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 2000. **1494**(3): p. 263-268.
321. Yamamoto, A., et al., *Two types of chicken 2', 5'-oligoadenylate synthetase mRNA derived from alleles at a single locus*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 1998. **1395**(2): p. 181-191.
322. Munir, S. and V. Kapur, *Regulation of host cell transcriptional physiology by the avian pneumovirus provides key insights into host-pathogen interactions*. J Virol, 2003. **77**(8): p. 4899-910.
323. Munir, S., J.M. Sharma, and V. Kapur, *Transcriptional response of avian cells to infection with Newcastle disease virus*. Virus Res, 2005. **107**(1): p. 103-8.
324. Dar, A., et al., *Transcriptional analysis of avian embryonic tissues following infection with avian infectious bronchitis virus*. Virus Res, 2005. **110**(1-2): p. 41-55.
325. Lan, D., et al., *Screening and identification of differentially expressed genes from chickens infected with Newcastle disease virus by suppression subtractive hybridization*. Avian Pathol, 2010. **39**(3): p. 151-9.
326. Lee, J.Y., et al., *Transcriptional profiling of host gene expression in chicken embryo lung cells infected with laryngotracheitis virus*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 445.
327. Sutejo, R., et al., *Activation of type I and III interferon signalling pathways occurs in lung epithelial cells infected with low pathogenic avian influenza viruses*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33732.
328. Reemers, S.S., et al., *Early host responses to avian influenza A virus are prolonged and enhanced at transcriptional level depending on maturation of the immune system*. Mol Immunol, 2010. **47**(9): p. 1675-85.
329. Fagerland, J.A. and L.H. Arp, *Structure and development of bronchus-associated*

- lymphoid tissue in conventionally reared broiler chickens*. Avian Dis, 1993. **37**(1): p. 10-8.
330. Reese, S., G. Dalamani, and B. Kaspers, *The avian lung-associated immune system: a review*. Vet Res, 2006. **37**(3): p. 311-24.
331. Schneider, K., et al., *Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties*. Eur J Biochem, 2001. **268**(15): p. 4200-6.
332. Schwarz, H., et al., *Synthesis of IFN-beta by virus-infected chicken embryo cells demonstrated with specific antisera and a new bioassay*. J Interferon Cytokine Res, 2004. **24**(3): p. 179-84.
333. Van Snick, J., et al., *Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(24): p. 9679-83.
334. Paramithiotis, E., L. Tkalec, and M.J. Ratcliffe, *High levels of CD45 are coordinately expressed with CD4 and CD8 on avian thymocytes*. J Immunol, 1991. **147**(11): p. 3710-7.
335. Neulen, M.L. and T.W. Gobel, *Chicken CD56 defines NK cell subsets in embryonic spleen and lung*. Dev Comp Immunol, 2012. **38**(3): p. 410-5.
336. Olah, I., et al., *Diverse expression of the K-1 antigen by cortico-medullary and reticular epithelial cells of the bursa of Fabricius in chicken and guinea fowl*. Dev Comp Immunol, 2002. **26**(5): p. 481-8.
337. Schoggins, J.W. and C.M. Rice, *Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions*. Curr Opin Virol, 2011. **1**(6): p. 519-25.
338. Pulendran, B., et al., *Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5067-76.
339. Krohmann, C., *Der Einfluss des Interferonsystems bei der Infektion mit aviärer Influenza im Haushuhn*. 2010.
340. Radwanski, E., et al., *Pharmacokinetics of interferon alpha-2b in healthy volunteers*. J Clin Pharmacol, 1987. **27**(5): p. 432-5.
341. Heryln, D.M., H.J. Bohner, and U. Losch, *IgG turnover in dysgammaglobulinemic chickens*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1977. **358**(9): p. 1169-72.
342. Leslie, G.A. and L.W. Clem, *Chicken immunoglobulins: biological half-lives and normal adult serum concentrations of IgM and IgY*. Proc Soc Exp Biol Med, 1970. **134**(1): p. 195-8.
343. Schmid, S., et al., *Transcription factor redundancy ensures induction of the antiviral*

- state*. J Biol Chem, 2010. **285**(53): p. 42013-22.
344. Schulz, O., et al., *Protein kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity*. Cell Host Microbe, 2010. **7**(5): p. 354-61.
345. Lanford, R.E., et al., *Genomic response to interferon-alpha in chimpanzees: implications of rapid downregulation for hepatitis C kinetics*. Hepatology, 2006. **43**(5): p. 961-72.
346. Sarasin-Filipowicz, M., et al., *Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(19): p. 7034-9.
347. Rue, C.A., et al., *Virulent Newcastle disease virus elicits a strong innate immune response in chickens*. Journal of General Virology, 2011. **92**(4): p. 931-939.
348. Arnaud, N., et al., *Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response*. PLoS Pathog, 2011. **7**(10): p. e1002289.
349. Perwitasari, O., et al., *Inhibitor of kappaB kinase epsilon (IKK(epsilon)), STAT1, and IFIT2 proteins define novel innate immune effector pathway against West Nile virus infection*. J Biol Chem, 2011. **286**(52): p. 44412-23.
350. Honke, N., et al., *Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus*. Nat Immunol, 2012. **13**(1): p. 51-7.
351. Marcus, P.I., C. Svitlik, and M.J. Sekellick, *Interferon induction by viruses. X. A model for interferon induction by Newcastle disease virus*. J Gen Virol, 1983. **64** (Pt 11): p. 2419-31.
352. Wakamatsu, N., et al., *The effect on pathogenesis of Newcastle disease virus LaSota strain from a mutation of the fusion cleavage site to a virulent sequence*. Avian Dis, 2006. **50**(4): p. 483-8.
353. Wakamatsu, N., et al., *The pathogenesis of Newcastle disease: a comparison of selected Newcastle disease virus wild-type strains and their infectious clones*. Virology, 2006. **353**(2): p. 333-43.
354. Honda, K., et al., *Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10872-7.
355. Gaffen, S.L., *Signaling domains of the interleukin 2 receptor*. Cytokine, 2001. **14**(2): p. 63-77.
356. Kaech, S.M., et al., *Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1191-8.

357. van de Veerdonk, F.L., et al., *The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to Candida albicans*. Cell Host Microbe, 2009. **5**(4): p. 329-40.
358. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 821-52.
359. Volpe, E., et al., *Multiparametric analysis of cytokine-driven human Th17 differentiation reveals a differential regulation of IL-17 and IL-22 production*. Blood, 2009. **114**(17): p. 3610-4.
360. Wolk, K., et al., *IL-22 increases the innate immunity of tissues*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 241-54.
361. Ghoreschi, K., et al., *Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling*. Nature, 2010. **467**(7318): p. 967-71.
362. Yang, J., et al., *Epstein-Barr virus-induced gene 3 negatively regulates IL-17, IL-22 and RORgamma t*. Eur J Immunol, 2008. **38**(5): p. 1204-14.
363. Kasaian, M.T., et al., *IL-13 antibodies influence IL-13 clearance in humans by modulating scavenger activity of IL-13Ralpha2*. J Immunol, 2011. **187**(1): p. 561-9.
364. Sick, C., et al., *Novel chicken CXC and CC chemokines*. Cytokine, 2000. **12**(3): p. 181-6.
365. Hughes, S., et al., *Identification, mapping, and phylogenetic analysis of three novel chicken CC chemokines*. Immunogenetics, 2001. **53**(8): p. 674-83.
366. Le, Y., et al., *Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease*. Cell Mol Immunol, 2004. **1**(2): p. 95-104.
367. Bleul, C.C., et al., *A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 1101-9.
368. McQuibban, G.A., et al., *Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 43503-8.
369. Zhang, K., et al., *HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration*. Nat Neurosci, 2003. **6**(10): p. 1064-71.
370. Petit, I., et al., *G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 687-94.
371. Levoye, A., et al., *CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling*. Blood, 2009. **113**(24): p. 6085-93.
372. Garlanda, C., et al., *Pentraxins at the crossroads between innate immunity,*

- inflammation, matrix deposition, and female fertility*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 337-66.
373. Diniz, S.N., et al., *PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages*. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(4): p. 649-56.
374. Garlanda, C., et al., *Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response*. *Nature*, 2002. **420**(6912): p. 182-6.
375. Reading, P.C., et al., *Antiviral activity of the long chain pentraxin PTX3 against influenza viruses*. *J Immunol*, 2008. **180**(5): p. 3391-8.
376. Bozza, S., et al., *Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation*. *Blood*, 2006. **108**(10): p. 3387-96.
377. Doni, A., et al., *Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma*. *J Leukoc Biol*, 2006. **79**(4): p. 797-802.
378. Polentarutti, N., et al., *Interferon-gamma inhibits expression of the long pentraxin PTX3 in human monocytes*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(2): p. 496-501.
379. Wright, J.R., *Immunoregulatory functions of surfactant proteins*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(1): p. 58-68.
380. Reemers, S.S., et al., *Transcriptional expression levels of chicken collectins are affected by avian influenza A virus inoculation*. *Vet Microbiol*, 2010. **141**(3-4): p. 379-84.
381. Fairley, J.A., et al., *Human cytomegalovirus infection inhibits epidermal growth factor (EGF) signalling by targeting EGF receptors*. *J Gen Virol*, 2002. **83**(Pt 11): p. 2803-10.
382. Miakotina, O.L., K.L. Goss, and J.M. Snyder, *Insulin utilizes the PI 3-kinase pathway to inhibit SP-A gene expression in lung epithelial cells*. *Respir Res*, 2002. **3**: p. 27.
383. Miakotina, O.L. and J.M. Snyder, *TNF-alpha inhibits SP-A gene expression in lung epithelial cells via p38 MAPK*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. **283**(2): p. L418-27.
384. Karinch, A.M., et al., *Regulation of expression of human SP-A1 and SP-A2 genes in fetal lung explant culture*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1398**(2): p. 192-202.
385. Scavo, L.M., R. Ertsey, and B.Q. Gao, *Human surfactant proteins A1 and A2 are differentially regulated during development and by soluble factors*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(4 Pt 1): p. L653-69.
386. Wang, J., et al., *Innate immune response to influenza A virus in differentiated human alveolar type II cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. **45**(3): p. 582-91.

387. Alcorn, J.F. and J.R. Wright, *Surfactant protein A inhibits alveolar macrophage cytokine production by CD14-independent pathway*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **286**(1): p. L129-36.
388. Fensterl, V. and G.C. Sen, *The ISG56/IFIT1 gene family*. J Interferon Cytokine Res, 2011. **31**(1): p. 71-8.
389. Pichlmair, A., et al., *IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA*. Nat Immunol, 2011. **12**(7): p. 624-30.
390. Abbas, Y.M., et al., *Structural basis for viral 5'-PPP-RNA recognition by human IFIT proteins*. Nature, 2013. **494**(7435): p. 60-4.
391. Daffis, S., et al., *2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members*. Nature, 2010. **468**(7322): p. 452-6.
392. Zust, R., et al., *Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5*. Nat Immunol, 2011. **12**(2): p. 137-43.
393. Gioannini, T.L., et al., *An essential role for albumin in the interaction of endotoxin with lipopolysaccharide-binding protein and sCD14 and resultant cell activation*. J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 47818-25.
394. Kouoh, F., et al., *Antioxidant properties of albumin: effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes*. Farmaco, 1999. **54**(10): p. 695-9.
395. Oettl, K., et al., *Oxidative damage of albumin in advanced liver disease*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1782**(7-8): p. 469-73.
396. Bain, V.G., et al., *Dynamics of interferon-specific gene expression in peripheral blood of interferon alfa-naive patients with genotype 1 chronic hepatitis C infection treated with albumin-interferon alfa*. Hepatol Res, 2006. **35**(4): p. 256-62.
397. Ahanda, M.L., et al., *Non-coding RNAs revealed during identification of genes involved in chicken immune responses*. Immunogenetics, 2009. **61**(1): p. 55-70.

10. ANHANG

A Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Tabelle in Kapitel 4 (Material und Methoden) integriert:

- 1 Applichem, Darmstadt
- 2 Biochrom, Berlin
- 3 Promega Corp., Mannheim
- 4 Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- 5 Biorad, München
- 6 Nunc, Wiesbaden
- 7 CLN GmbH, Freising
- 8 AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
- 9 Sigma Aldrich, Saint Louis/USA
- 10 Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
- 11 Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
- 12 Fermentas GmbH, St- Leon-Rot
- 14 MWG, Ebersberg
- 15 Medite, Burgdorf
- 16 CLN, Freising
- 17 Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
- 18 Hartstein, Würzburg
- 19 Polyscience, Eppelheim
- 20 Neolab, Heidelberg
- 21 Linaris, Wertheim-Bettingen
- 22 Lohmann Tierzucht, Cuxhaven
- 23 B.Braun Melsungen AG, Melsungen
- 24 Bayha GmbH, Tuttlingen
- 26 Sarstedt, Nürnbergrecht
- 27 USA scientific, Inc., Orlando/USA
- 28 Qiagen GmbH, Hilden
- 29 Lonza Group Ltd, Basel/Schweiz
- 30 Applied Bioscience, Darmstadt
- 31 Mikrom International GmbH, Walldorf
- 32 Hybridoma Bank, Iowa/USA
- 33 Tecan Group LTD, Crailsheim
- 34 Southern Biotechnologies, Birmingham/USA
- 35 Beckmann Counter GmbH, Krefeld
- 36 Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
- 37 Edmund Bühler GmbH, Hechingen
- 38 BD, Heidelberg
- 39 AbD Serotec, Düsseldorf

B Laborgeräte in alphabetischer Reihenfolge

Gegenstand	Modellname	Hersteller
Analysewaage	Mettler PJ400	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Bakterienbrutschrank	Mini Inkubator	Labnet International. Inc., Woodbridge, USA
Bioanalyser	Agilent 2100 Bioanalyser	Applied Biosciences, Darmstadt
	Softtiste: Bioanalyser 2100 Expert	
Brüter (Stall)	BSS 300/8203	Grumbach Brutgeräte GmbH, Asslar
Brutschrank für die Zellkultur	MCO-20AIC	Sanyo, München
Brutschrank für die Zellkultur	Galaxy R	Nunc, Wiesbaden
Chromatographie-Anlage	Bio-Rad BioLogic LP mit Model2100 Fraction Collector	Bio-Rad, München
Dampfsterilisator	Varioklav Typ 500E	Thermo Scientific, München
Durchflusszytometer	FACS Calibur	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
	Softtiste: CellQuest	
Flockeneisbereiter	Scotsman AF100	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Gel Dokumentation	Image Quant 300	GE Healthcare, Garching
	Softtiste: Image Quant Capture 300	
GloMax Luminometer	GloMax 96 Microplate Luminometer	Pormega Corp., Mannheim
Handzentrifuge	Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Homogenisator	Precellys24	Peqlab, Erlangen
Horizontalschüttler	KL-2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Hybridisierungssofen	G2545A	Sheldon Manufacturing, Inc., Cornelius/USA
Kryotom	Kryostat HM500OM	Mikrom International GmbH, Walldorf
Magnetrührer	IKAMAG®RCT	IKA®Werke GmbH + Co.KG, Staufen
Microarrayscanner	Agilent G2505C Scanner	Agilent, Böblingen
Mikroskop	Axioskop	Zeiss, Jena
	Kamera: Axioacam MRC5	
Mikrowelle S2	MS1987U	LG Electronics, Ratingen
Mikrozentrifuge	5415R	Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Workstation	Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	Peqlab, Erlangen
Peristaltische Pumpe	Peristaltic Pump P-1	GE Healthcare, Garching
pH-Meter	Sartorius PB-11 mit Glaselektorde PY-P10	
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Plattenphotometer	Sunrise-Remote	Tecan Group LTD, Crailsheim
	Softtiste: x-read Plus	
Power Supply	Power Pac 300	Bio-Rad, München
Pumpe		
qPCR System	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosciences, Darmstadt
Refraktormeter		
Rotationsmikrotom	HM360	Microm, Walldorf
Schüttelinkubator	Schüttler KS15A mitInkubatorhaube TH15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
SDS-Gel-Gießkammer	Mini Potean III	Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank	Mikroflow	Nunc, Wiesbaden
Spectrophotometer	NanoDrop ND-100	Peqlab, Erlangen
Stickstofftank	Locator 6 Plus	Barnstead Thermolyne, Dubuque/USA
Thermocycler	MJ Mini	Bio-Rad, München
Thermoschüttler	TS 1 Thermoshaker	Biometra, Göttingen
Ultraschall		
Ultraschall-Homogenisator	Bandelin Sonopuls GM200	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge	Avanti J-25	Beckmann Coulter, Krefeld
Vortex-Mixer	GVLab®	Gilson Inc., Middleton, USA
Waage		
Wärmeschrank	neoLab Universal Wärmeschrank Basic 391	neoLab Migge Laborbedards-GmbH, Heidelberg
Wasserbad	GFL1004	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zählkammer	modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	4K15	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz

11. TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle 18 **Höchst signifikant regulierte Gene 3 Stunden nach IFN Injektion**

Gelistet sind die 15 meist hoch und herunter regulierten Gene jeder Gruppe. Die Auswahl erfolgte anhand des drei Stunden Wertes, dargestellt sind die FC zu allen Zeitpunkten. Die FC hoch regulierter Gene sind schwarz geschrieben, die FC herunter regulierter Gene sind rot geschrieben.

A „Allgemeine IRGs“ in Milz und Lunge

Gen Symbol	Gen Beschreibung	Milz			Lunge		
		IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)	IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)
Hoch reguliert							
PTX3	Pentraxin related gene, rapidly induced by IL1 beta	685	80	11	3	-	-
IL-6	Interleukin-6	186	10	11	7	12	67
CCL4	Chemokine (CC motif) ligand 4	94	9	4	3	3	9
GCH1	GTP cyclohydrolase 1	43	10	8	17	5	9
FKBP5	FK506 binding protein 5	10	-	-	30	-	-
RPL37	Ribosomal protein L37	26	3	21	21	4	20
GBP	Guanylate binding protein	25	7	5	22	8	8
OASL	2'5'oligoadenylate synthetase like	25	13	12	11	9	7
MX-1	Myxovirus (influenza virus) resistance-1	24	13	14	13	13	14
HPS5	HermanskyPudlak syndrome 5	23	30	22	8	7	7
DIO2	Deiodinase, iodothyronine, type II	23	4	2	3	-	-
IFIT-5	Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 5	17	11	8	19	17	18
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	18	-	-	8	3	12
SAMD9L	Sterile alpha motif domain containing 9 like	13	5	5	15	10	15
IL-1RL1	Interleukin-1 receptor like 1	15	5	3	14	3	3
Herunter reguliert							
GINS1	GINS complex subunit 1 (Psf1 homolog)	2	-	-	2	-	-
ABLIM3	Actin binding LIM protein family, member 3	3	-	-	3	-	-
EVPL	Envoplakin	3	2	2	3	-	-
MCM3	Minichromosome maintenance complex component 3	3	-	-	2	-	-
MEIS2	Meis homeobox 2	3	-	-	2	-	-
MYH10	Myosin, heavy chain 10, nonmuscle	3	-	-	2	-	2
BRF2	BRF2, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor	4	-	-	2	-	-
PCP4	Purkinje cell protein 4	4	7	4	2	-	-
EDN3	Endothelin 3	5	-	-	3	-	-

HOXB7	Homeobox B7	5	4	-	2	-	-
AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2	5	4	5	2	-	2
PROCR	Protein C receptor, endothelial (EPCR)	6	-	2	3	-	-
GLI2	GLI family zinc finger 2	6	-	-	3	-	-
HNMT	Histamine Nmethyltransferase	7	5	3	4	-	-
HSD11B1	Hydroxysteroid (11beta) dehydrogenase 1	14	5	3	4	-	-

B „Allgemeine IRGs“ in der Milz

Gen Symbol	Gen Beschreibung	Milz			Lunge		
		IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)	IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)
Hoch reguliert							
CSF3	Colony stimulating factor 3	58	-	-	-	-	7
IL-22	Interleukin-22	34	-	3	-	-	3
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	8	3	-	-	-	-
TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	7	-	-	-	-	-
RREB1	Ras responsive element binding protein 1	7	-	-	-	-	-
DUSP1	Dual specificity phosphatase 1	6	-	-	-	-	-
CYR61	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	6	-	-	-	-	-
ADM	Adrenomedullin	6	-	-	-	-	-
STC2	Stanniocalcin 2	6	-	-	-	-	-
VIP	Vasoactive intestinal peptide	6	-	-	-	3	2
NR1D2	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2	5	-	-	-	-	4
ACSL1	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	5	-	-	-	-	-
G0S2	G0/G1switch 2	5	-	-	-	2	4
NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible	5	-	-	-	-	4
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	5	-	-	-	-	-
Herunter reguliert							
EMP2	Epithelial membrane protein 2	4	-	-	-	-	-
CYP1B1	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	4	3	-	-	-	-
FABP5	Fatty acid binding protein 5	4	-	-	-	-	-
IGFBP4	Insulin-like growth factor binding protein 4	4	-	-	-	-	-
ME1	Malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	4	4	-	-	-	-
S100B	S100 calcium binding protein B	5	-	-	-	-	-
LCAT	Lecithin-cholesterol acyltransferase	5	5	3	-	2	3
TSHB	Thyroid stimulating hormone, beta	6	4	-	-	-	-
NFIL3	Nuclear factor, interleukin 3 regulated	6	3	-	-	-	3
GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	6	-	-	-	-	-
SCRN1	Secernin 1	7	2	-	-	-	-
FKBP1B	FK506 binding protein 1B, 12.6 kDa	7	3	2	-	-	-
SKIV2L2	Superkiller viralicidal activity 2-like 2	9	-	-	-	-	-
MEOX1	Mesenchyme homeobox 1	22	-	-	-	-	-
SFTPA1	Surfactant, pulmonary-associated protein A1	66	130	436	-	-	-

C „Allgemeine IRGs“ in der Lunge

Gen Symbol	Gen Beschreibung	Milz			Lunge		
		IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)	IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)
Hoch reguliert							
LEPR	Leptin receptor	-	-	-	7	2	2
FGG	Fibrinogen gamma chain	-	-	-	7	3	3
RAB40B	RAB40B, member RAS oncogene family	-	-	-	5	-	-
UPP2	Uridine phosphorylase 2	-	-	-	5	-	-
LAPTM4B	Lysosomal associated protein transmembrane 4 beta	-	-	3	4	-	-
MC2R	Melanocortin 2 receptor (adrenocorticotropic hormone)	-	-	-	4	-	-
MT3	Metallothionein 3	-	-	-	4	2	3
FABP1	Fatty acid binding protein 1, liver	-	-	-	4	-	2
ASPA	Aspartoacylase	-	-	2	3	2	3
SLC14A2	Solute carrier family 14 (urea transporter), member 2	-	-	-	3	-	-
EREG	Epiregulin	-	-	-	3	-	-
PLOD2	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	-	-	-	3	-	-
TIPARP	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase	-	-	-	3	-	-
ADAMTS2	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 2	-	-	-	3	-	-
CFI	Complement factor I	-	-	-	2	3	3
Herunter reguliert							
COL3A1	Collagen, Type III, Alpha1	-	-	-	2	-	2
SH3PXD2A	SH3 and PX domains 2A	-	-	-	2	-	2
LGALS3	Lectin, galactoside-binding, soluble, 3	-	-	-	2	-	-
DNAJC7	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7	-	-	-	2	-	-
GATA6	GATA binding protein 6	-	-	-	2	-	-
CCND1	Cyclin D1	-	-	-	2	-	-
TIMP4	TIMP metalloproteinase inhibitor 4	-	-	-	2	-	-
FOXA2	Forkhead box A2	-	-	-	2	-	-
AQP9	Aquaporin 9	-	-	-	2	-	-
CXXC5	CXXC finger 5	-	-	-	3	-	-
EPB41	Erythrocyte membrane protein band 4.1	-	-	-	3	2	2
KIFC3	Kinesin family member C3	-	-	-	3	-	-
WNT7A	Wingless-type MMTV integration site family, member 7A	-	2	2	3	3	3
SNAP25	Synaptosomal-associated protein, 25kDa	-	-	-	10	7	4
TLR5	Toll-like receptor-5	-	-	-	18	4	-

D „Neu identifizierte IRGs“ in Milz und Lunge

Gen Symbol	Gen Beschreibung	Milz			Lunge		
		IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)	IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)
Hoch reguliert							
LOC396260	Mature avidin	315	301	384	29	34	44
K203	Chicken chemokine (C-C motif) L i 3	170	11	6	4	3	16
LAO	L-amino-acid oxidase precursor	169	42	21	40	11	24
TULP1	Tubby like protein 1	28	-	-	118	4	-
LYG2	Lysozyme G-like 2	62	30	37	24	13	18
CMBL	Carboxymethylenebutenolidase homolog	44	6	3	53	7	13
mdvn106_g10	MDVn106_g10 Marek's disease virus-infected spleen	38	22	18	23	16	16
IRG1	Immunoresponsive 1 homolog	35	8	7	10	8	19
BATF3	Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3	35	5	4	22	2	6
MSC	Musculin (activated B-cell factor-1)	10	-	-	33	5	5
LOC422511	Interleukin-8-like	30	20	9	4	3	8
MMP1	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	27	10	3	7	4	6
MAOA	Monoamine oxidase A	18	31	33	10	12	16
HEP1	Heme binding protein 1	17	15	8	5	4	4
RASD1	RAS, dexamethasone induced 1	16	-	-	12	-	5
Herunter reguliert							
BOC	Boc homolog	8	-	-	2	-	-
ANKK1	Ankyrin repeat and kinase domain containing 1	8	-	2	2	-	2
LOC417981	Similar to cytochrome P450 2D20	8	2	-	4	3	-
CDH10	Cadherin 10, type 2 (T2-cadherin)	8	-	-	3	2	-
DACH1	Dachshund homolog 1	8	-	-	3	-	-
ADCY8	Adenylate cyclase 8	4	3	2	9	2	-
YTHDC2	YTH domain containing 2	10	-	-	3	-	-
FAIM2	Fas apoptotic inhibitory molecule 2	10	-	2	3	3	3
HKDC1	Hexokinase domain containing 1	10	3	-	2	-	-
CA4	Carbonic anhydrase IV	10	-	-	7	-	-
DACT2	Dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 2	11	-	-	2	-	-
AGXT2L1	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	12	9	4	2	3	4
DUSP26	Dual specificity phosphatase 26 (putative)	13	3	2	3	-	-
SEMA6D	Sema domain, transmembrane domain and cytoplasmic domain 6 D	4	3	3	17	-	-
C6orf154	Chromosome 6 open reading frame 154	19	3	-	2	-	-

E „Neu identifizierte IRGs“ in der Milz

Gen Symbol	Gen Beschreibung	Milz			Lunge		
		IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)	IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)
Hoch reguliert							
ZPD	Zona pellucida protein D	38	4	3	-	-	-
LIPI	Lipase, member I	26	9	6	-	2	3
RHCG	Rh family, C glycoprotein	22	5	3	-	-	-
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	19	2	-	-	-	-
CCL1	Chemokine (C-C motif) ligand 1	19	2	-	-	-	-
RDH10	Retinol dehydrogenase 10 (all-trans)	18	-	-	-	-	-
SST	Somatostatin	18	5	2	-	-	3
CACNA1C	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	13	-	-	-	-	-
GBX2	Gastrulation brain homeobox 2	12	-	-	-	-	-
TMEM45A	Transmembrane protein 45A	12	2	-	-	-	-
PKP2	Plakophilin 2	9	-	-	-	-	-
TNFRSF8	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	9	3	4	-	-	-
AMY1A	Amylase, alpha 1A; salivary	8	5	3	-	-	-
VWA1	Von Willebrand factor A domain containing 1	8	3	-	-	-	-
CREB5	cAMP responsive element binding protein 5	8	-	-	-	-	-
Herunter reguliert							
SPHKAP	SPHK1 interactor, AKAP domain containing	12	5	7	-	-	-
LOC427306	Lipid phosphatase phosphatase-related protein type I-like	15	5	3	-	-	-
C1QTNF2	C1q and tumor necrosis factor related protein 2	15	4	3	-	-	-
TMEM121	Transmembrane protein 121	15	-	-	-	-	-
SPINK5	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 5	16	25	21	-	-	-
FAM5B	Family with sequence similarity 5, member B	16	9	6	-	-	-
MMP-13	Matrix metalloproteinase-13	18	19	14	-	-	2
RTN4R	Reticulon 4 receptor	19	3	-	-	-	-
EYA2	Eyes absent homolog 2	21	3	2	-	-	-
ETV1	ETS variant gene 1	30	2	-	-	-	-
LL	Lung lectin	30	64	140	-	-	-
FSHR	Follicle stimulating hormone receptor	39	4	3	-	-	-
PSCA	Prostate stem cell antigen	40	64	124	-	-	-
NEFH	Neurofilament, heavy polypeptide	56	13	6	-	-	-
KCNA1	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1	69	-	-	-	-	-

F „Neu identifizierte IRGs“ in der Lunge

Gen Symbol	GenBeschreibung	Milz			Lunge		
		IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)	IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)
Hoch reguliert							
TGM4	Transglutaminase 4 (prostate)	-	-	-	24	5	3
GAL9	Gallicin 9	-	-	-	16	4	5
Rd	Riboflavin-binding protein	-	-	-	16	5	3
ALB	Albumin	-	-	-	10	3	3
CHRNA6	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 6	-	-	-	9	2	-
LHFPL5	Lipoma HMGIC fusion partner-like 5	-	-	-	8	3	-
UCP3	Uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)	-	-	-	8	-	-
B3GALT2	UDP-Gal:betaGlcNAc b 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2	-	2	-	7	-	-
MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	-	-	-	7	-	4
ENPEP	Glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)	-	-	-	6	5	4
LOC771574	Phospholipase A2, group IVE-like	-	-	-	6	3	-
LBFABP	Liver basic fatty acid binding protein	-	-	-	6	2	3
LOC423536	Similar to potassium channel, subfamily K, member 16	-	2	-	6	-	-
FAM19A3	Family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like), member A3	-	-	-	5	-	2
DMBT1	Deleted in malignant brain tumors 1	-	-	2	5	5	5
Herunter reguliert							
MYCN	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived	-	-	-	3	-	-
SLC6A2	Solute carrier family 6 (noradrenalin transporter), member 2	-	-	-	3	-	-
MEX3A	Mex-3 homolog A	-	-	-	3	-	-
TCF15	Transcription factor 15 (basic helix-loop-helix)	-	2	-	3	-	-
HOXB8	Homeobox B8	-	-	-	3	-	-
NES	Nestin	-	-	-	3	3	-
FILIP1	Filamin A interacting protein 1	-	-	-	4	-	-
GPR23	G protein-coupled receptor 23	-	-	-	4	-	-
LIMCH1	LIM and calponin homology domains 1	-	-	-	4	-	2
BMP2	Bone morphogenetic protein 2	-	-	-	4	-	-
RAMP3	Receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 3	-	-	-	4	-	-
MRPS18A	Mitochondrial ribosomal protein S18A	-	-	-	5	-	-
OSGIN1	Oxidative stress induced growth inhibitor 1	-	-	-	5	-	-
PCDH17	Protocadherin 17 [Gallus gallus]	-	-	-	7	-	-
LOC421332	Hypothetical gene supported by CR389131	-	-	-	15	4	-

Tabelle 19 Gene Ontology Analyse nach IFN Injektion

Dargestellt sind die funktionellen Gruppen, ihre Untergruppen und der entsprechende offizielle GO Term. Zudem sind die Gesamtzahl der Gene in den verschiedenen Gruppen, die Anzahl an Genen die durch Panther identifiziert werden konnten, die Anzahl der in den funktionellen Untergruppen gefundenen Genen und in Klammern ihr prozentualer Anteil an den mittels Panther eingeteilten Genen aufgelistet.

		Allgemeine IRGs						Neu identifizierte IRGs								
		Milz und Lunge		Milz		Lunge		Milz und Lunge				Milz		Lunge		
		+	-	+	-	+	-	+	-	Milz + Lunge -	Milz - Lunge +	+	-	+	-	
Anzahl an Genen		129	15	97	69	51	18	253	105	9	2	403	786	249	114	
Mittels Panther eingeteilte Gene		52	5	36	29	22	7	116	38	5	1	186	336	101	42	
Funktionelle Gruppe	Funktionelle Untergruppe (GO Term)															
Molecular Function	Binding (GO:0005488)	25 (48)	4 (80)	12 (33)	12 (41)	11 (50)	3 (43)	43 (37)	14 (37)	1 (20)	-	53 (28)	117 (35)	33 (33)	16 (38)	
	Receptor Activity (GO:0004872)	11 (21)	1 (20)	7 (19)	4 (14)	3 (14)	2 (29)	13 (11)	5 (13)	-	-	-	27 (15)	53 (16)	11 (11)	10 (24)
	Enzyme Regulator Activity (GO:0030234)	3 (6)	-	5 (14)	-	2 (9)	1 (14)	11 (9)	3 (8)	1 (20)	-	-	5 (3)	27 (8)	7 (7)	3 (7)
	Structural Molecule Activity (GO:0005198)	3 (6)	1 (20)	2 (6)	1 (3)	2 (9)	1 (14)	10 (9)	2 (5)	-	1 (100)	-	15 (8)	51 (15)	5 (5)	4 (10)
	Catalytic Activity (GO:0003824)	16 (31)	1 (20)	15 (42)	10 (34)	7 (32)	1 (14)	37 (32)	13 (34)	1 (20)	-	-	75 (40)	123 (37)	31 (31)	7 (17)
	Transcription Regulator Activity (GO:0030528)	5 (10)	-	-	2 (7)	4 (18)	-	8 (7)	1 (3)	-	-	-	10 (5)	26 (8)	10 (10)	2 (5)
	Transporter Activity (GO:0005215)	-	-	-	2 (7)	2 (9)	2 (29)	16 (14)	3 (8)	-	-	-	15 (8)	31 (9)	18 (18)	4 (10)
	Ion Channel Activity (GO:0005216)	-	-	-	-	-	-	2 (2)	2 (5)	1 (20)	-	-	8 (4)	8 (2)	4 (4)	4 (10)
	Translation Regulator Activity (GO:0045182)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1)	1 (0,3)	-	-
	Motor Activity (GO:0003774)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (1)	3 (1)	-	-
Biological Process	Apoptosis (GO:0006915)	11 (21)	-	5 (14)	3 (10)	2 (9)	1 (14)	12 (10)	1 (3)	-	-	14 (8)	19 (6)	5 (5)	3 (7)	
	Cell Communication (GO:0007154)	23 (44)	1 (20)	11 (31)	12 (41)	7 (32)	3 (43)	31 (27)	15 (39)	2 (40)	-	57 (31)	106 (32)	27 (27)	21 (50)	
	Cellular Process (GO:0009987)	27 (52)	3 (60)	14 (39)	14 (48)	8 (36)	4 (57)	42 (36)	17 (45)	2 (40)	-	-	76 (41)	139 (41)	33 (33)	27 (64)
	Transport (GO:0006810)	5 (10)	-	6 (17)	2 (7)	5 (23)	4 (57)	29 (25)	6 (16)	-	-	-	34 (18)	72 (21)	29 (29)	11 (26)
	Cellular Component Organization (GO:0016043)	2 (4)	1 (20)	3 (8)	2 (7)	2 (9)	1 (14)	9 (8)	3 (8)	-	-	-	14 (8)	47 (14)	7 (7)	3 (7)
	System Process (GO:0003008)	1 (2)	1 (20)	5 (14)	4 (14)	4 (18)	3 (43)	19 (16)	12 (32)	-	-	-	32 (17)	69 (21)	16 (16)	13 (31)
	Reproduction (GO:0000003)	6 (12)	-	3 (8)	2 (7)	3 (14)	-	4 (3)	1 (3)	1 (20)	-	-	11 (6)	18 (5)	7 (7)	2 (5)

	Response to Stimulus (GO:0050896)	20 (38)	1 (20)	6 (17)	4 (14)	3 (14)	1 (14)	24 (21)	4 (11)	1 (20)	-	26 (14)	47 (14)	14 (14)	4 (10)
	Homeostatic Process (GO:0042592)	2 (4)	-	1 (3)	-	-	1 (14)	2 (2)	-	-	-	5 (3)	8 (2)	2 (2)	-
	Developmental Process (GO:0032502)	13 (25)	1 (20)	10 (28)	8 (28)	4 (18)	1 (14)	22 (19)	11 (29)	1 (20)	-	40 (22)	84 (25)	14 (14)	14 (33)
	Metabolic Process (GO:0008152)	23 (44)	3 (60)	16 (44)	14 (48)	13 (59)	1 (14)	59 (51)	12 (32)	1 (20)	1 (100)	88 (47)	157 (47)	47 (47)	11 (26)
	Cell Cycle (GO:0007049)	4 (8)	2 (40)	4 (11)	3 (10)	3 (14)	1 (14)	8 (7)	3 (8)	1 (20)	-	22 (12)	28 (8)	3 (3)	1 (2)
	Immune System Process (GO:0002376)	26 (50)	1 (20)	10 (28)	4 (14)	5 (23)	3 (43)	32 (28)	6 (16)	2 (40)	-	34 (18)	72 (21)	21 (21)	6 (14)
	Cell Adhesion (GO:0007155)	5 (10)	-	3 (8)	3 (10)	3 (14)	3 (43)	11 (9)	8 (21)	-	-	16 (9)	58 (17)	10 (10)	12 (29)
	Regulation of biological Process (GO:0050789)	-	-	1 (3)	-	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-	1 (1)	1 (2)
	Generation of Precursor Metabolites and Energy (GO:0006091)	-	-	-	-	1 (5)	-	3 (3)	1 (3)	-	-	5 (3)	5 (1)	2 (2)	-
	Localization (GO:0051179)	-	-	-	-	-	1 (14)	1 (1)	1 (3)	-	-	2 (1)	2 (1)	1 (1)	-
Cellular Component	Extracellular Region (GO:0005576)	4 (8)	-	1 (3)	1 (3)	2 (9)	2 (29)	5 (4)	3 (8)	-	-	7 (4)	32 (10)	4 (4)	4 (10)
	Intracellular (GO:0005622)	3 (6)	1 (20)	1 (3)	-	1 (5)	-	8 (7)	-	-	-	15 (8)	31 (9)	4 (4)	2 (5)
	Protein Complex (GO:0043234)	-	-	-	1 (3)	-	1 (14)	-	1 (3)	-	-	3 (2)	-	1 (1)	-
	Plasma Membrane (GO:0005886)	-	-	-	1 (3)	-	-	-	2 (5)	1 (20)	-	2 (1)	-	-	3 (7)
	Ribonucleoprotein Complex (GO:0030529)	-	-	-	-	1 (5)	-	1 (1)	-	-	-	-	3 (1)	-	-

Tabelle 20 **Ausgewählte funktionelle Untergruppen nach IFN Injektion**

Gelistet sind die in Abbildung 15 dargestellten funktionellen Untergruppen mit ihrer Einteilung in weitere Gruppen. Neben der Gesamtzahl der Gene in den Gruppen findet sich in Klammern der prozentuale Anteil an der jeweiligen Gruppe. Da „Cell Communication“ und „Immune Response“ noch weiter unterteilt wurden, finden sich Gesamtzahl der Gene und Prozentsatz in einer weiteren Spalte (Anzahl Ebene 2) jedes Datensatzes.

Ebene 1	Ebene 2	Allgemeine IRGs						Neu identifizierte IRGs					
		Milz und Lunge		Milz		Lunge		Milz und Lunge		Milz		Lunge	
		Anzahl Ebene 1	Anzahl Ebene 2	Anzahl Ebene 1	Anzahl Ebene 2	Anzahl Ebene 1	Anzahl Ebene 2	Anzahl Ebene 1	Anzahl Ebene 2	Anzahl Ebene 1	Anzahl Ebene 2	Anzahl Ebene 1	Anzahl Ebene 2
Cellular Process		46		48		24		104		414		95	
Cell Motion		6 (13)		3 (6)		1 (4)		13 (13)		51 (12)		10 (11)	
Cell Cycle		6 (13)		2 (4)		4 (17)		12 (12)		50 (12)		4 (4)	
Cell Adhesion		5 (11)		6 (13)		6 (25)		19 (18)		74 (18)		22 (23)	
Cellular Component Organisation		3 (7)		5 (10)		3 (13)		12 (12)		61 (15)		10 (11)	
Cytokinesis		2 (4)		2 (4)						6 (1)			
Chromosome Segregation				2 (4)						9 (2)			
Cell Communication		24 (52)	35	23 (48)	31	10 (42)	15	48 (46)	63	163 (39)	209	49 (52)	60
	Cell Cell Signaling		11 (31)		8 (27)		6 (40)		16 (25)		53 (25)		13 (22)
	Signal Transduction		24 (69)		22 (73)		9 (60)		47 (75)		156 (75)		47 (79)
Response to Stimulus		35		17		6		42		89		27	
Response to External Stimulus		8 (23)		3 (18)		1 (17)		8 (19)		15 (17)		7 (25)	
Response to Stress		3 (9)		3 (18)				8 (19)		23 (26)		4 (15)	
Cellular Defense Response		9 (26)		5 (29)		1 (17)		8 (19)		14 (16)		6 (6)	
Response to Toxin										7 (8)			
Defense Response to Bacterium		1 (3)				2 (33)		4 (10)		10 (11)		5 (19)	
Immune Response		14 (40)	13	6 (35)	8	2 (33)	2	14 (33)	12	20 (23)	18	5 (19)	4
	B-Cell Mediated Immunity		2 (15)		2 (25)		1 (50)		5 (42)		7 (39)		3 (75)
	Natural Killer Cell Activation		6 (46)		2 (25)				3 (25)		2 (11)		1 (25)
	Response to Interferon Gamma		4 (31)		4 (50)		1 (50)		3 (25)		2 (11)		
	Complement Activation		1 (8)						1 (8)		7 (39)		

Immune System Process	22		9		4		19		39		13	
Makrophage Activation	8 (36)		3 (33)		2 (50)		4 (21)		15 (39)		6 (46)	
Antigen Processing and Presentation							1 (5)		4 (10)		2 (15)	
Immune Reponse	14 (64)	13	6 (67)	8	2 (50)	2	14 (74)	12	20 (51)	18	5 (39)	4
B-Cell Mediated Immunity	2 (15)		2 (25)		1 (50)		5 (42)		7 (39)		3 (75)	
Natural Killer Cell Activation	6 (46)		2 (25)				3 (25)		2 (11)		1 (25)	
Response to Interferon Gamma	4 (31)		4 (50)		1 (50)		3 (25)		2 (11)			
Complement Activation	1 (8)						1 (8)		7 (39)			

Tabelle 21 Upstream Regulators nach IFN Injektion

Gelistet sind die in Abbildung 17 - Abbildung 20 durch ausgewählte „upstream regulators“ beeinflussten Gene, ob sie auf dem Mikroarray annotiert sind, ob sie signifikant reguliert sind und ob sie zu der Gruppe der „allgemeinen IRGs“ oder der „neu identifizierten IRGs“ gehören. Des Weiteren sind die FC-Werte der signifikant regulierten Gene in den Behandlungsgruppen gelistet. Die FC hoch regulierter Gene sind schwarz geschrieben, die FC herunter regulierter Gene rot. Der jeweilige „upstream regulator“ ist fett markiert.

A Pentraxin-related Gene

Gen Symbol	Gen Beschreibung	Annotiert	Signifikant reguliert	Allgemeines IRG	Neu identifiziertes IRG	Milz			Lunge		
						IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)	IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)
PTX3	Pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	x	x	x	-	685	80	11	3	-	-
CX3CR1	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	x	x	-	x	5	-	-	-	-	-
IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	x	x	-	x	4	2	2	-	-	2
Il-1B	Interleukin 1-, beta	x	x	x	-	14	-	-	4	4	14
Il-6	Interleukin-6	x	x	x	-	186	10	11	7	12	67
JUN	JUN oncogene	x	x	x	-	2	-	-	-	-	-
MMP9	Matrix metalloproteinase 9	x	x	x	-	2	-	-	-	-	-
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	x	x	-	x	2	-	-	-	-	-
TLR2	Toll-like receptor 2A	x	x	x	-	3	-	-	-	2	3
TLR4	Toll-like receptor 4	x	x	x	-	-	-	-	-	2	3
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	x	x	-	x	4	-	-	2	-	2
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	x	x	x	-	3	2	2	4	3	-
CCR2	Chemokine (C-C motif) receptor 2	x	x	-	x	2	3	2	4	3	3
CCR5	Chemokine (C-C motif) receptor 5	x	x	x	-	-	-	-	-	2	-

TNF	diverse Familienmitglieder	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TWIST1	Twist homolog 1	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TGFB2	Transforming growth factor, beta 2	x	x	-	x	-	-	-	2	-	-
TGFB3	Transforming growth factor, beta 3	x	x	-	x	-	-	-	2	-	-
ADRB2	Adrenergic, beta-2-, receptor, surface	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AGR3	Anterior gradient homolog 3	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ANPEP	Alanyl (membrane) aminopeptidase	x	x	-	x	2	-	-	-	-	-
CCL13	Chemokine (C-C motif) ligand 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDH10	Cadherin 10, type 2 (T2-cadherin)	x	x	-	x	8	-	-	3	2	-
CTGF	Connective tissue growth factor	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP1B1	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	-	-	-	x	4	3	-	-	-	-
CYR61	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	x	x	x	-	6	-	-	-	-	-

C Interleukin-22

Gen Symbol	Gen Beschreibung	Annotiert	Signifikant reguliert	Allgemeines IRG	Neu identifiziertes IRG	Milz			Lunge		
						IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)	IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)
Il-22	Interleukin-22	x	x	x	-	34	-	3			3
HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1	x	x	x	-	-	-	-	3	3	3
HSPB1	Heat shock 27kDa protein 1	x	x	-	x	4	3	2	-	-	-
Il-18	Interleukin-18	x	x	x	-	12	4	3	4	3	4
Il-1B	Interleukin-1, beta	x	x	x	-	14	-	-	4	4	14
Il-10	Interleukin-10	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-
Il-13	Interleukin-13	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-
Il-4	Interleukin-4	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-
Il-6	Interleukin-6 (interferon, beta 2)	x	x	x	-	186	10	11	7	12	67
Il-8	Interleukin-8 [Gallus gallus] = CXCLi2	x	x	x	-	4	2	2	2	2	7
IFNG	Interferon, gamma	x	x	x	-	10	2	2	2	3	9
KRT17	Keratin 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LCN2	Lipocalin 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	x	x	x	-	3	-	-	2	-	-
MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	x	x	-	x	-	-	-	7	-	4
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-
PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	x	x	x	-	2	-	-	-	-	-
NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible	x	x	x	-	5	-	-	-	-	4
S100A8	S100 calcium binding protein A8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S100A9	S100 calcium binding protein A9	x	x	-	x	4	11	11	4	6	5
SAA1	Serum amyloid A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	x	x	x	-	18	-	-	8	3	13
TNFSF11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	x	x	x	-	-	-	2	-	-	-
TGFB2	Transforming growth factor, beta 2	x	x	-	x	-	-	-	2	-	-
TGFB3	Transforming growth factor, beta 3	x	x	-	x	-	-	-	2	-	-
PDGFC	Platelet derived growth factor C	x	x	-	x	3	-	-	-	-	-
FIGF	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	x	x	-	x	12	4	2	-	-	-
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	x	x	-	x	19	2	-	-	-	-
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BCL2L1	BCL2-like 1	x	x	x	-	2	-	-	-	-	-
BCL2L11	BCL2-like 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCND1	Cyclin D1	x	x	x	-	-	-	-	2	-	-
CD274	CD274 molecule	x	x	x	-	3	-	-	3	-	2

Tabelle 22 Zytokine und Chemokine nach IFN Injektion

Hoch regulierte FC sind in schwarz geschrieben, herunter regulierte FC rot. Die entsprechenden Expressionsprofile sind in Abbildung 21 dargestellt.

Zytokine

Gen Symbol	Gen Beschreibung	Expressionsprofil	Milz			Lunge			Allgemeines IRG
			IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)	IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)	
IL-6	Interleukin-6	3	186	10	11	7	12	67	x
CSF3	Colony stimulation growth factor 3 (Granulocyte)	3	58	-	-	-	-	7	x
IL-22	Interleukin-22	3	34	-	3	-	-	3	x
IL-1B	Interleukin-1, beta	3	14	-	-	4	4	14	x
IL-18	Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor)	3	12	4	3	4	3	4	x
IFNG	Interferon gamma	3	10	2	2	2	3	9	x
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	2	8	3	-	-	-	-	x
IL-1R2	Interleukin 1 receptor, type II	1	7	3	-	3	-	-	x
TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	2	7	-	-	-	-	-	x
IL-20RA	Interleukin-20 receptor, alpha	1	4	3	-	3	-	-	x
CSF2RB	Colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity	1	4	-	-	3	-	2	x
TNFAIP3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	1	4	-	-	2	-	2	x
IL-2RA	Interleukin-2 receptor, alpha	3	4	-	-	-	-	2	x
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	1	3	-	-	3	-	2	x
IL-10RB	Interleukin-10 receptor, beta	1	3	-	-	2	-	-	x
TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	1	3	-	-	2	-	-	x
IL-12A	Interleukin-12A	2	3	-	-	-	-	-	x
IFNGR1	Interferon gamma receptor 1	2	3	-	-	-	-	-	x
TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	2	3	3	-	-	-	-	x
IFNAR1	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1	1	2	-	-	2	-	-	x
IL-12RB2	Interleukin-12 receptor, beta 2	7	2	-	-	-	-	-	x
IL-28RA	Interleukin-28 receptor, alpha (interferon, lambda receptor)	7	2	-	-	-	-	-	x
IL-7	Interleukin--7	7	3	-	-	-	-	-	x
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand-like	7	3	-	-	-	-	-	x
TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	6	-	-	-	2	-	3	x
TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	6	-	-	-	2	-	-	x
IL-1RL1	Interleukin - receptor-like 1	1	15	5	3	14	3	3	-
IL-13RA2	Interleukin-13 receptor, alpha 2	3	13	7	6	14	12	18	-
IL-2	Interleukin- 2	1	5	-	-	3	-	3	-
CSF2RA	Colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity	4	3	2	-	3	3	3	-

TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	1	3	-	-	5	-	-	-
IL-21R	Interleukin-21 receptor	1	2	-	-	3	-	-	-
IL-12B	Interleukin-12B	6	2	-	-	3	6	4	-
TNFRSF8	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	2	9	3	4	-	-	-	-
TNFSF15	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	2	5	-	-	-	-	-	-
IL-17F	Interleukin-17F	2	5	-	2	-	-	-	-
IL-23R	Interleukin-23 receptor	2	4	2	-	-	-	-	-
IL-4R	Interleukin-4 receptor	2	3	-	-	-	-	-	-
TNFAIP6	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	2	3	-	-	-	-	-	-
IL-1R1	Interleukin-1 receptor, type I	2	3	-	-	-	-	-	-
TNFRSF13C	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13C	2	2	-	-	-	-	-	-
IL-7R	Interleukin-7 receptor	2	2	-	-	-	-	-	-
IL-10RA	Interleukin-10 receptor, alpha	2	2	-	-	-	-	-	-
IL-11RA	Interleukin-11 receptor, alpha	7	3	-	-	-	-	-	-
CSF3R	Colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)		-	4	4	-	2	2	x
IL-1RL2	Interleukin-1 receptor-like 2		-	2	2	-	-	-	-
TNFSF11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11		-	-	2	-	-	-	x
TNFAIP2	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2		-	-	-	-	-	3	x

Chemokine

Gen Symbol	Gen Beschreibung	Expressionsprofil	Milz			Lunge			Allgemeines IRG
			IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)	IFN (3h)	IFN (6h)	IFN (9h)	
CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	3	94	9	4	3	3	9	x
CCL19	Chemokine (C-C motif) ligand 19	4	6	5	4	13	8	11	x
CX3CL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	1	6	3	-	2	-	2	x
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2	5	-	-	-	-	-	x
CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20 CX	1	4	-	-	2	-	-	x
IL-8	Interleukin-8 = CXCL2	3	4	2	2	2	2	7	x
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	1	3	2	2	4	3	-	x
IL-8RB	Interleukin-8 receptor, beta	6	-	-	-	2	-	-	x
CCR7	Chemokine (C-C motif) receptor 7	6	-	-	-	2	-	2	x
K203	Chicken Chemokine (C-C motif) ligand inflammatory 3	3	170	11	6	4	3	16	-
CXCL13	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	5	9	11	13	3	4	7	-
CCL17	Chemokine (C-C motif) ligand 17	1	3	2	4	3	-	-	-
ah221	Chemokine ah221	5	3	5	6	6	11	17	-

CCR2	Chemokine (C-C motif) receptor 2	4	2	3	2	4	3	3	-
CCL1	Chemokine (C-C motif) ligand1	2	19	2	-	-	-	-	-
CCR8	Chemokine (C-C motif) receptor 8	2	2	-	-	-	-	-	-
XCL1	Chemokine (C motif) ligand 1	7	2	-	-	-	-	-	-
XCR1	Chemokine (C motif) receptor 1	7	2	-	2	-	-	-	-
CCR6	Chemokine (C-C motif) receptor 6	7	3	-	2	-	-	-	-
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	7	4	-	-	-	-	-	-
CX3CR1	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	7	5	-	-	-	-	-	-
CCL21	Chemokine (C-C motif) ligand 21		-	3	3	4	2	2	-
CXCL13L1	Similar to macrophage inflammatory protein-2	6	-	-	2	3	3	5	-
CCR5	Chemokine (C-C motif) receptor 5		-	-	-	-	2	-	x
CXCR7	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7		-	-	-	2	-	2	-

Tabelle 23 **Höchst signifikant regulierte Gene nach NDV Infektion**

Neben den 15 meist hoch bzw. herunter regulierten Genen in Milz (A) und im veränderten Lungengewebe (B) nach NDV Infektion im Vergleich zum Kontrollgewebe, sind deren FC-Werte und ob sie zu den „neu identifizierten IRGs“ oder „allgemeinen IRGs“ gehören gelistet. Die FC-Werte hoch regulierter Gene sind schwarz geschrieben, die herunter regulierter Gene rot.

A Milz

Gen Symbol	Gen Beschreibung	Milz	Lunge		Neu identifiziertes IRG	Allgemeines IRG	
		NDV vs K	NDV(U) vs K	NDV(A) vs K			NDV(A) vs (U)
mdvn106_g10	mdvn106_g10 Marek's disease virus-infected spleen	18	9	34	4	x	-
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	18	10	9	-	-	x
MX-1	Myxovirus (influenza virus) resistance 1	17	7	23	3	-	x
LYG2	Lysozyme G-like 2	14	4	29	7	x	-
IFIT-5	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	12	12	21	3	-	x
SAMD9L	Sterile alpha motif domain containing 9-like	10	7	29	4	-	x
LOC422513	Similar to Hect domain and RLD5	10	7	17	3	x	-
XDH	Xanthine dehydrogenase	10	-	9	2	x	-
OSBPL1A	Oxysterol binding protein-like 1A	9	7	30	5	x	-
LOC771521		8	-	7	-	x	-
USP18	Ubiquitin specific peptidase 18	8	6	19	3	-	x
ISG12-2	ISG12-2 protein-like	8	3	6	2	-	x
LOC420108		7	4	8	2	x	-
IL-6	Interleukin-6	7	-	74	23	-	x
KPNA7	Karyopherin alpha 7 (importin alpha 8)	7	-	31	14	x	-

B Lunge NDV (A) vs K

Gen Symbol	Gen Beschreibung	Milz	Lunge		Neu identifiziertes IRG	Allgemeines IRG	
		NDV vs K	NDV(U) vs K	NDV(A) vs K			NDV(A) vs (U)
Hoch reguliert							
IL-22	Interleukin 22	-	-	161	121	-	x
CCL19	Chemokine (C-C motif) ligand 19	3	-	81	31	-	x
IL-6	Interleukin-6	7	-	74	23	-	x
TSHZ2	Teashirt family zinc finger 2	-	-	58	-	x	-
OLFML1	Olfactomedin-like 1	-	-	58	18	x	-
DUPD1	Dual specificity phosphatase and pro isomerase domain	-	-	55	29	x	-
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	-	-	54	28	x	-
LOC417973		-	-	45	7	x	-
IL-13RA2	Interleukin 13 receptor, alpha 2	-	-	40	24	x	-
PHTF2	Putative homeodomain transcription factor 2	-	-	39	21	-	-
LOC771482	Hypothetical protein LOC771482	5	10	39	4	x	-
TRIM25	Tripartite motif-containing 25	-	-	35	15	-	x
mdvn106_g10	mdvn106_g10 Marek's disease virus-infected spleen	18	9	34	4	x	
GUCA1B	Guanylate cyclase activator 1B	-	-	31	15	-	-
KPNA7	Karyopherin alpha 7 (importin alpha 8)	7	-	31	14	x	-
Herunter reguliert							
CNN3	Calponin 3, acidic	-	-	9	20	x	-
NR0B1	Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	-	-	9	-	x	-
RASL11B	RAS-like, family 11, member B	-	-	9	9	x	-
C6orf72	Chromosome 6 open reading frame 72	-	-	10	7	x	-
ITGBL1	Integrin, beta-like 1	-	-	10	6	-	-
KERA	Keratocan	-	-	10	2	-	-
NPFFR2	Neuropeptide FF receptor 2	-	-	10	5	-	-
GPLD1	Glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase	-	-	11	6	-	-
KCNQ1	Similar to Potassium voltage-gated channel	-	-	11	-	-	-
LOC395160	Transcription factor Crx	-	-	11	4	-	-
SNAI2	Snail homolog 2	-	-	11	6	x	-
TRF4-2	Projected HGNC	-	-	11	5	-	-
ZNF462	Zinc finger protein 462	-	-	11	16	x	-
MYO6	Myosin VI	-	-	12	3	-	-
PCP4	Purkinje cell protein 4	-	-	23	4	-	x

Tabelle 24 Signifikant regulierte Gene im unveränderten Lungengewebe nach NDV Infektion

Gelistet sind die nach NDV Infektion im unveränderten Lungengewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe signifikant regulierten Gene, deren FC-Werte und ob sie zu den „neu identifizierten IRGs“ oder „allgemeinen IRGs“ gehören. Hoch regulierte FC sind schwarz geschrieben, herunter regulierte rot.

Gen Symbol	Gen Beschreibung	Milz	Lunge			Neu identifiziertes IRG	Allgemeines IRG		Nur nach NDV reguliert
		NDV vs K	NDV(U) vs K	NDV(A) vs K	NDV(A) vs NDV(U)		Nicht nach IFN reguliert	Auch nach IFN reguliert	
UGT1A9	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A9	-	15	-	16	-	-	-	x
IFIT5	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	12	12	21	3	-	-	x	-
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	18	10	9	-	-	-	x	-
LOC771482		5	10	39	4	x	-	-	-
LOC420381	GTPase IMAP family member 8-like	5	9	14	-	-	-	-	x
mdvn106_g10	mdvn106_g10 Marek's disease virus-infected spleen Gallus gallus	18	9	34	6	x	-	-	-
LOC768827	Similar to claudin 14b	-	8	-	13	-	-	-	x
MX1	Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78	17	7	23	3	-	-	x	-
LOC422513	Similar to hect domain and RLD 4-like	10	7	17	3	x	-	-	-
SAMD9L	Sterile alpha motif domain containing 9-like	10	7	29	4			x	
OSBPL1A	Oxysterol binding protein-like 1A [Gallus gallus]	9	7	30	5	x	-	-	-
FAM19A5	Family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like), member A5	-	7	3	2	-	-	-	x
USP18	Ubiquitin specific peptidase 18	8	6	19	3	-	-	x	
DNAJB4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4 [Gallus gallus]	-	6		8	-			x
RNF213	Ring finger protein 213	5	5	12	2	-	-	x	-
LAMA1	Laminin, alpha 1 [Gallus gallus]	-	5	3	2	x	-	-	-
C19orf12	Chromosome 19 open reading frame 12	5	5	8	-	x	-	-	-
LBA1	Lupus brain antigen 1	4	5	8	2	-	-	x	-
LYG2	Lysozyme G-like 2	14	4	29	7	x	-	-	-
LOC418836	Mannose receptor, C type 2-like	4	4	17	4	x	-	-	-
LOC416147	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25-like	3	4	5	-	x	-	-	-
RGS6	Regulator of G-protein signaling 6	-	4	-	-	-	-	-	x
LOC770433		-	4	-	-	-	-	-	x
LOC419812		-	4	6	-	x	-	-	-
TLR3	Toll-like receptor 3 [Gallus gallus]	4	4	5	2	-	-	x	-
ZNFX1	Zinc finger, NFX1-type containing 1	5	4	6	2	-	-	x	-
IL10	Interleukin 10 [Gallus gallus]	-	4	3	4	-	x	-	-
LOC420108		6	4	7	2	x	-	-	-
Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa [Gallus gallus]	4	4	24	7	-	-	x	-
PML	Promyelocytic leukemia	4	3	5	-	-	-	x	-

EPSTI1	Epithelial stromal interaction 1 (breast)	5	3	14	4	-	-	x	-
CCL19	Chemokine (C-C motif) ligand 19	3	3	81	31	-	-	x	-
IFITM5	Interferon induced transmembrane protein 5	6	3	3		x	-		-
EIF2AK2	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	4	3	7	2	-	-	x	-
IFIH1	Interferon induced with helicase C domain 1 [Gallus gallus]	5	3	9	3	-	-	x	-
PHF11	PHD finger protein 11	3	3	5	-	-	-	x	-
ZC3HAV1	Zinc finger CCCH-type, antiviral 1	4	3	9	3	-	-	x	-
COL11A1	Collagen, type XI, alpha 1 [Gallus gallus]	-	3	-	-	-	x	-	-
ENDOV	Endonuclease V	2	3	5	-	-	-	-	x
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein	4	3	9	3	-	-	x	-
MOV10	Mov10, Moloney leukemia virus 10, homolog (mouse)	4	3	9	3	-	-	x	-
FAM26F	Family with sequence similarity 26, member F	3	3	13	5	-	-	x	-
SNX10	Sorting nexin 10	4	3	6	2	-	-	x	-
ISG12-2	ISG12-2 protein-like	8	3	6	2	-	-	x	-
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1 [Gallus gallus]	3	3	14	5	-	-	x	-
PARP14	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	-	3	6	2	x	-	-	-
PXK	PX domain containing serine/threonine kinase	3	3	5	2	-	-	x	-
NT5C3L	5'-nucleotidase, cytosolic III-like	3	3	7	3	x	-	-	-
STK31	Serine/threonine kinase 31	-	3	-	-	x	-	-	-
HMG2	High mobility group AT-hook 2	-	3	-	-	-	-	x	-
ZCCHC11	Zinc finger, CCHC domain containing 11	-	3	6	6	x	-	-	-
LCN15	Lipocalin 15	-	3	2	-	-	-	-	x
SMCHD1	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain cont. 1	3	3	8	3	-	-	x	-
K203	Ch CCLi3	-	2	8	7	x	-	-	-
DTX3L	Deltex 3-like (Drosophila)	-	2	-	-	-	-	x	-
LOC417192	Similar to Torsin B precursor (Torsin family 1 member B)	4	2	19	8	x	-	-	-
EDNRB	Endothelin receptor type B [Gallus gallus]	-	2	-	-	x	-	-	-
PARP12	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	2	2	4	-	-	-	x	-
SLC3A1	Solute carrier family 3, member 1	-	2	-	-	-	x	-	-
XPR1	Xenotropic and polytropic retrovirus receptor	-	2	3	-	-	-	-	x
LOC416146	Probable E3 ubiquitin-protein ligase MID2-like	-	2	-	-	-	-	-	x
IRF7	Interferon regulatory factor 7	2	2	3	-	-	-	x	
CCDC131	Coiled-coil domain containing 131	-	2	-	-	-	-	-	x
NMI	N-myc (and STAT) interactor	3	2	4	2	-	-	x	-
NCOA7	Nuclear receptor coactivator 7	-	2	7	3	x	-	-	-

Tabelle 25 Zytokine und Chemokine nach NDV Infektion

Gelistet sind die auf dem Mikroarray annotierten Zytokine (A) und Chemokine(B), ihr FC in den analysierten Vergleichen in Milz und Lunge, ob sie zu den „allgemeinen IRGs“ oder „neu identifizierten IRGs“ zählen und ob sie nach Injektion von rek ChIFN- α in Milz bzw. Lunge hoch (schwarz) oder herunter (rot) reguliert waren. Die FC hoch regulierter Gene sind schwarz geschrieben, die herunter regulierter Gene rot.

A

Gen Symbol	Gen Beschreibung	Milz	Lunge	Allgemeines IRG	Neu identifiziertes IRG	Nach IFN Injektion reguliert	
						Milz	Lunge
CSF3R	Colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	3	-	x	-	x	x
Il-22	Interleukin- 22	-	161	x	-	x	x
Il-6	Interleukin- 6 (Interferon, beta 2)	7	74	x	-	x	x
Il-13RA2	Interleukin- 13 receptor, alpha 2	-	40	-	x	x	x
IFN- λ	Interleukin- 28B (Interferon, lambda 3)	-	16	-	-	-	-
IFNG	Interferon gamma	-	15	x	-	x	x
CSF3	Colony stimulating growth factor 3	-	11	x	-	x	-
Il-2	Interleukin- 2	-	11	-	x	x	x
Il-18	Interleukin- 18 (Interferon-gamma-inducing factor)	-	10	x	-	x	x
Il-20RA	Interleukin- 20 receptor, alpha	-	10	x	-	x	x
TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	-	7	x	-	x	-
Il-1B	Interleukin- 1, beta	3	7	x	-	x	x
IFN- α	Interferon alpha	-	7	-	-	-	-
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	-	6	x	-	x	x
CSF2RB	Colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	-	6	x	-	x	x
Il-2RA	Interleukin- 2 receptor, alpha	-	6	x	-	x	x
Il-12A	Interleukin- 12A	-	5	x	-	x	-
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor	-	4	x	-	-	-
RIPK1	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	-	4	x	-	-	-
Il-17RA	Interleukin- 17 receptor A	-	4	x	-	-	-
NGFR	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	-	3	-	-	-	-
Il-1R2	Interleukin- 1 receptor, type II	-	3	-	x	x	x
Il-10RB	Interleukin- 10 receptor, beta	-	3	x	-	x	x
CSF2RA	Colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)	-	3	-	x	x	x
TNFAIP3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	-	3	x	-	x	x
Il-7R	Interleukin- 7 receptor	-	3	-	x	x	-
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand-like	-	3	x	-	x	-

Il-23R	Interleukin- 23 receptor	-	3	-	x	x	-
Il-11RA	Interleukin- 11 receptor, alpha	-	3	-	x	x	-
Il-10	Interleukin- 10	-	3	x	-	-	-
TNFSF13B	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	-	3	x	-	-	x
Il-4	Interleukin- 4	-	3	x	-	-	-
Il-2RG	Interleukin- 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)	-	3	-	-	-	-
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	-	3	x	-	-	-
Il-5	Interleukin- 5 (Colony-stimulating factor, eosinophil)	-	3	x	-	-	-
Tnfsf11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	-	3	x	-	x	-
Il-9	Interleukin- 9	-	2	-	-	-	-
Il-4R	Interleukin- 4 receptor	-	2	-	x	x	-
TNFAIP2	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	-	2	x	-	-	x
TNFRSF8	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	-	2	-	x	x	-
Il-1RL2	Interleukin- 1 receptor-like 2	-	2	-	-	x	-
TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	-	2	-	x	x	x
CD40LG	CD40 ligand (TNF superfamily, member 5, hyper-IgM syndrome)	-	2	x	-	-	-
Il-16	Interleukin- 16 (lymphocyte chemoattractant factor)	-	2	x	-	-	-
IFNAR2	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	-	2	x	-	-	-
GMCSF	granulocyte-macrophage Colony-stimulating factor	-	2	-	-	-	-
Il-21R	Interleukin- 21 receptor	-	-	-	x	x	x
Il-1RL1	Interleukin- 1 receptor-like 1	-	-	-	x	x	x
Il-1R1	Interleukin- 1 receptor, type I	-	-	-	x	x	x
Il-12B	Interleukin- 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)	-	-	-	x	x	x
IFNAR1	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1	-	-	x	-	x	x
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	-	-	x	-	x	x
TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	-	-	x	-	x	x
TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	-	-	x	-	x	-
IFNGR1	Interferon gamma receptor 1	-	-	x	-	x	-
TNFSF15	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	-	-	-	x	x	-
TNFRSF13C	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13C	-	-	-	x	x	-
TNFAIP6	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	-	-	-	x	x	-
Il-17F	Interleukin- 17F	-	-	-	x	x	-
Il-10RA	Interleukin- 10 receptor, alpha	-	-	-	x	x	-
Il-7	Interleukin- 7	-	-	x	-	x	-
Il-28RA	Interleukin- 28 receptor, alpha (Interferon, lambda receptor)	-	-	x	-	x	-
Il-12RB2	Interleukin- 12 receptor, beta 2	-	-	x	-	x	-
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	-	-	x	-	-	x

B

Gen Symbol	Gen Beschreibung	Milz	Lunge	Allgemeines IRG	Neu identifiziertes IRG	Nach IFN Injektion reguliert	
						Milz	Lunge
CCL19	Chemokine (C-C motif) ligand 19	3	81	x	-	x	x
CCL21	Chemokine (C-C motif) ligand 21	-	9	-	x	x	x
CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	-	8	x	-	x	x
K203	Chicken Chemokine (C-C motif) ligand inflammatory 3	-	7	-	-	-	x
ah221	Chemokine ah221	4	6	-	x	x	x
IL-8	Interleukin 8 = CXCLi2	-	4	x	x	x	x
CCR2	Chemokine (C-C motif) receptor 2	-	4	-	x	x	x
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	-	3	-	x	x	-
CX3CL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	-	3	x	-	x	x
CCR9	Chemokine (C-C motif) receptor 9	-	3	x	-	-	-
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	-	2	-	x	x	-
CXCR5	Chemokine (C-X-C motif) receptor 5	-	2	x	-	-	-
XCR1	Chemokine (C motif) receptor 1	-	3	-	x	x	-
CXCR7	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7	-	3	-	-	-	x
CXCL14	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	-	2	-	-	-	-
CCL1	Chemokine (C-C motif)Ligand 1	-	2	-	x	x	-

Tabelle 26 Gene Ontology Analyse der IRGs und weiterer Gene nach NDV Infektion

Dargestellt sind die Anzahl signifikant regulierter Gene der vier Gengruppen und die Anzahl der Gene die mit Panther Gene List Analysis gefunden werden konnten (A). Außerdem die Summe der drei Stunden nach Injektion von rek ChIFN regulierten „allgemeinen IRGs“ und „neu identifizierten IRGs“ (B). Die analysierten Gruppen wurden in drei funktionelle Gruppen und mehrere funktionelle Untergruppen eingeteilt, denen der jeweilige offizielle GO Term beigefügt ist. Die Zahlen besagen, wie viele Gene in den funktionellen Untergruppen gefunden werden konnten, die Zahlen in Klammern geben deren prozentualen Anteil an der Gesamtzahl gefundener Gene wider.

		A				B	
		NDV				IFN	
		Allgemeine IRGs		Neu identifizierte IRGs	Restliche regulierte Gene	Allgemeine IRGs	Neu identifizierte IRGs
		Nach IFN Injektion	Nicht nach IFN Injektion				
Anzahl an Genen		279	417	1,307	3.371	380	1.924
Mit Panther gefundene Gene		105	169	559	1.356	152	824
Funktionelle Gruppe	Funtionelle Untergruppe (GO Term)						
Molecular Function	Binding (GO:0005488)	45 (42)	70 (41)	192 (34)	464 (34)	67 (44)	276 (34)
	Receptor Activity (GO:0004872)	18 (17)	30 (18)	84 (15)	140 (10)	28 (18)	119 (14)
	Enzyme Regulator Activity (GO:0030234)	7 (7)	10 (6)	43 (8)	121 (9)	11 (7)	56 (7)
	Structural Molecule Activity (GO:0005198)	7 (7)	19 (11)	65 (12)	168 (12)	10 (6)	87 (11)
	Catalytic Activity (GO:0003824)	35 (33)	61 (36)	193 (35)	413 (30)	50 (33)	288 (35)
	Transcription Regulator Activity (GO:0030528)	8 (8)	19 (11)	39 (7)	120 (9)	13 (9)	57 (7)
	Transporter Activity (GO:0005215)	4 (4)	18 (11)	55 (10)	120 (9)	6 (4)	87 (11)
	Ion Channel Activity (GO:0005216)	-	7 (4)	23 (4)	32 (2)	-	30 (4)
	Translation Regulator Activity (GO:0045182)	-	4 (2)	2 (1)	6 (1)	-	2 (0,2)
	Motor Activity (GO:0003774)	-	-	2 (1)	13 (1)	-	4 (1)
	Antioxidant Activity (GO:0016209)	-	-	-	1 (0,1)	-	-
Biological Process	Apoptosis (GO:0006915)	12 (11)	16 (10)	34 (6)	58 (4)	22 (15)	54 (7)
	Cell Communication (GO:0007154)	35 (33)	58 (34)	180 (32)	371 (27)	57 (38)	260 (32)
	Cellular Process (GO:0009987)	44 (42)	79 (47)	242 (43)	531 (39)	71 (47)	337 (41)
	Transport (GO:0006810)	12 (11)	39 (23)	124 (22)	288 (21)	22 (15)	181 (22)

	Cellular Component Organization (GO:0016043)	7 (7)	21 (12)	64 (11)	149 (11)	11 (7)	83 (10)
	System Process (GO:0003008)	12 (11)	28 (17)	115 (21)	221 (16)	18 (12)	161 (20)
	Reproduction (GO:0000003)	12 (11)	10 (6)	25 (5)	73 (5)	14 (9)	44 (5)
	Response to Stimulus (GO:0050896)	23 (22)	23 (13)	82 (15)	125 (9)	35 (23)	120 (15)
	Homeostatic Process (GO:0042592)	4 (4)	8 (5)	13 (2)	25 (2)	4 (3)	17 (2)
	Developmental Process (GO:0032502)	25 (24)	40 (24)	137 (25)	273 (20)	37 (24)	186 (23)
	Metabolic Process (GO:0008152)	49 (47)	93 (55)	254 (45)	586 (43)	70 (46)	375 (46)
	Cell Cycle (GO:0007049)	9 (9)	27 (16)	53 (10)	128 (9)	17 (11)	66 (8)
	Immune System Process (GO:0002376)	35 (33)	33 (20)	122 (22)	184 (14)	49 (32)	173 (21)
	Cell Adhesion (GO:0007155)	13 (12)	26 (15)	88 (16)	134 (10)	17 (11)	115 (14)
	Regulation of biological Process (GO:0050789)	-	-	4 (1)	8 (1)	1 (1)	6 (1)
	Generation of Precursor Metabolites and Energy (GO:0006091)	4 (4)	-	9 (2)	32 (2)	4 (3)	16 (2)
	Localization (GO:0051179)	1 (1)	-	6 (1)	23 (2)	1 (1)	7 (1)
Cellular Component	Extracellular Region (GO:0005576)	8 (8)	12 (7)	47 (8)	66 (5)	10 (7)	55 (7)
	Intracellular (GO:0005622)	5 (5)	10 (6)	42 (8)	128 (9)	6 (4)	60 (7)
	Protein Complex (GO:0043234)	1 (1)	4 (2)	3 (1)	9 (1)	2 (1)	5 (1)
	Plasma Membrane (GO:0005886)	1 (1)	4 (2)	9 (2)	17 (1)	1 (1)	11 (1)
	Ribonucleoprotein Complex (GO:0030529)	1 (1)	2 (1)	4 (1)	6 (1)	1 (1)	5 (1)

12. DANKSAGUNG

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. habil. Sonja Härtle, für die Vergabe des Dissertationsthemas und die ausgezeichnete, stets freundliche und anregende wissenschaftliche Betreuung, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Ebenso möchte ich Prof. Dr. Bernd Kaspers für die kompetente Unterstützung bei einem seiner Steckenpferde, dem IFN-System, danken. Beiden ist das Gelingen dieser Arbeit durch enge wissenschaftliche Zusammenarbeit und fortwährende Anregung zu verdanken.

Prof. Dr. Stangassinger möchte ich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danken.

Herzlichen Dank auch der Arbeitsgruppe Blum im Genzentrum, die es ermöglichten, die Mikroarray Experimente durchzuführen. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Dr. Stefan Schmieder und Dr. Susanne Schwarz ganz besonders danken, die mir die Mikroarraytechnologie und q-RT PCR Technik näher gebracht haben.

Großer Dank gebührt auch Beatrice Schaerer, Ingrid Riehl und Marina Kohn für die stete Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima. Zudem gilt Beatrice Schaerer und Marina Kohn besonderer Dank, da sie mich bei den Interferon-Assays und der Histologie technisch ganz besonders unterstützt haben.

Durch die pharmakokinetischen Kenntnisse von Dr. Stefan Härtle war die exakte Ermittlung der Halbwertszeit von rek ChIFN- α möglich, wofür ich ihm ganz herzlich danken möchte.

Fritz Meggendorfer, Hedi Opitz und Thomas Hoschka danke ich für die Betreuung der Tiere. Frau Crass und Frau Summer danke ich für die Unterstützung in Verwaltungsangelegenheiten.

Auch bei meinen Mitdoktoranden möchte ich mich ganz besonders bedanken, die mir neben wertvollen Kollegen auch gute Freunde geworden sind. Vielen Dank auch an alle Institutsmitglieder, die an dem freundlichen und kollegialen Arbeitsklima mitgewirkt haben und meine Doktorandenzeit zu einer sehr schönen Zeit für mich gemacht haben. Besonderer Dank hierbei gilt Julia, Marie-Luise, Barbara, Maria, Melanie, Sarah, Christian und Florian.

Ein großer Dank gilt auch der Rechnerbetriebsgruppe, die mich bei vielen technischen Problemen unterstützt haben und das eine oder andere neue Profil für mich angelegt haben.

Christina Braun-Reichhart danke ich dafür, dass sie mit mir diesen Weg gemeinsam gegangen ist und stets für mich da ist.

Der Dank der meinen Eltern gebührt, ist mit Worten nicht auszudrücken. Sie haben mir alle Stufen gebaut, die ich erklimmen wollte und haben mich dabei in allen Lebenslagen unterstützt, motiviert und gefördert. Neben meinen Eltern widme ich diese Arbeit meiner Nichte Katharina, da ihre Geburt das Größte und Schönste war, das während meiner Promotionszeit geschehen ist.

Ich möchte diese Dissertation mit Worten von Johann Wolfgang von Goethe beenden: „Das schönste Glück des denkenden Menschen, ist das Erforschliche zu erforschen und das Unerforschliche zu verehren.“