

**Analyse Vaccinia Virus induzierter Typ I
Interferon Produktion und viraler
Mechanismen zur Unterwanderung des
Immunsystems**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologin Martina Anzaghe
geboren am 27.10.1980, in Frankfurt am Main

2011

Referent: Prof. Dr. Ulrich Kalinke
Korreferent: Prof. Dr. Reinhold Förster
Tag der Promotion: 14.07.2011

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation „Analyse Vaccinia Virus induzierter Typ I Interferon Produktion und viraler Mechanismen zur Unterwanderung des Immunsystems“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2006 bis September 2009 am Paul-Ehrlich-Institut, Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel, in Langen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Kalinke (TWINCORE Institut, MHH) angefertigt.

Ich erkläre, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde. Außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden habe ich früher keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Frankfurt am Main, 04.03.2011

Martina Anzaghe

gewidmet meinem Vater Hermann und meinem Sohn Hisham

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
A	Adenin; Alanin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	Antigen präsentierende Zelle (<i>antigene presenting cell</i>)

BCR	B-Zell Rezeptor
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	Beziehungsweise

°C	Celsius
C	Cytosin; Cystein
ca.	circa
CCR	CC-Chemokin Rezeptor
CD	Nomenklatur für Zelloberflächenmoleküle (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CMV-P	Promotor des Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>
Cy5/Cy7	Cychrom5/Cychrom7

d	delta
Da	Dalton
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonuclein acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotide: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DTT	Dithiothreitol

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eGFP	<i>enhanced GFP</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Ethylendiamintetraessigsäure)
env	virales Gen für Hüllproteine
ER	Endoplasmatisches Reticulum
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alterii</i>)

Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	<i>Fragment crystallisable</i>
FcR	Fc Rezeptor

FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)

γ	Gamma
g	Gravitation Erdbeschleunigung; Gramm
G	Guanosin
<i>gag</i>	virales Gen für Kapsid- und Matrixproteine
GAP-DH	GAP-Dehydrogenase
gDNA	Genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulocyten-Monocyten Kolonie-stimulierender Faktor

h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure Hydro-Ethyl-Piperazin-Ethan-Sulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)

iDC	immature dendritische Zellen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRES	interne Ribosomenbindungsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>)

k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
Konz.	Konzentration

l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid(e)
LSR II	<i>Life science research II</i>
LTR	<i>long terminal repeats</i>

μ	Mikro ($1/10^6$)
m	Milli ($1/1000$); Meter; myeloid
M	Molar; Methionin
MACS	<i>Magnetic cell sorting</i>
max	Maximum
mDC	myloide dendritische Zelle
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute(n)

moi	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVA	Modifiziertes Vaccinia Virus Ankara

n	nano
N ₂	Stickstoff
NaN ₃	Natriumazid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLR	<i>Nod like receptor</i>
NOD	<i>Nukleotide-binding oligomerization domains</i>

OD	optische Dichte
----	-----------------

%	Prozent
p	pico
P.	Passage
PAGE	Poly Acryl Gel Elektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	mononukleare Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pDC	plasmazytoide DC
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	<i>Plaque forming units</i>
PGE ₂	Prostaglandin
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration (<i>potenita hydrogenii</i>)
<i>pol</i>	virales Gen für die reverse Transkriptase, Integrase, Protease
Poly-A	Poly-Adenylierungsstelle
Poly I:C	synthetische doppelsträngige RNA (<i>polyriboinosinic polyribocytidylic acid</i>)
PRR	<i>pattern-recognition receptors</i>

R-848	Resiquimod
rev	<i>regulator of virion</i>
RIG-I	<i>Retinoic Acid-inducible gene I</i>
RLR	<i>RIG-I like receptors</i> (RIG-I ähnliche Rezeptoren)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonuclein acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Zellkultur Medium)
RRE	<i>rev responsive element</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription

s	Sekunde(n)
s.	siehe
S.	Seite
SAC	<i>Staphylococcus aureus cosac</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIN	<i>self-inactivating</i>
SIV	Simianes Immundefizienz Virus
SIVmac	Vektorsystem SIVmac251 (SIVmac Δ env)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>sideward scatter</i>)

T	Tyrosin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus Aquaticus</i> DNA-Polymerase
Tat	<i>transactivator of transcription</i>
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zell Rezeptor)
T _h -Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

U	Unit(s)
U3	U3-Region des 3'LTR
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett

V	Volt; Valin
VACV	Vaccinia Virus
v/v	Volumenprozent
vgl.	vergleiche
Vif	<i>viral infectivity factor</i>
Vpr	<i>viral rapid protein</i>
Vpx	<i>viral protein x</i>
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
VSV-G	G-Protein des Vesikulären Stomatitis Virus

WB	<i>Western Blot</i>
----	---------------------

x	-fach/multipliziert
---	---------------------

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

Inhaltsverzeichnis

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1.	KURZBESCHREIBUNG	1
1.2.	ABSTRACT	2
2.	EINLEITUNG	4
2.1.	DAS IMMUNSYSTEM.....	4
2.2.	DENDRITISCHE ZELLEN.....	5
2.2.1.	<i>Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDC)</i>	7
2.3.	INTERFERONE (IFN).....	9
2.3.1.	<i>Typ-I Interferon (IFN-I)</i>	9
2.3.2.	<i>Der Typ I-IFN Rezeptor (IFNAR) Feedback Loop</i>	11
2.4.	INDUKTION VON IFN-I.....	12
2.4.1.	<i>Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs)</i>	14
2.4.2.	<i>TLR-unabhängige Mechanismen</i>	16
2.5.	VIRALE MECHANISMEN ZUR UNTERWANDERUNG DES IMMUNSYSTEMS.....	19
2.6.	DAS VACCINIA VIRUS (VACV) UND DAS MODIFIZIERTE VACCINIA VIRUS ANKARA (MVA)	20
3.	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1.	MATERIAL	25
3.1.1.	<i>Chemikalien und Lösungen</i>	25
3.1.2.	<i>Medien und Puffer</i>	28
3.1.3.	<i>Antikörper</i>	31
3.1.4.	<i>Kits</i>	33
3.1.5.	<i>Zytokine</i>	34
3.1.6.	<i>Enzyme</i>	34
3.1.7.	<i>Zelllinien</i>	35
3.1.8.	<i>Bakterien</i>	35
3.1.9.	<i>Plasmide</i>	36
3.1.10.	<i>Viren und andere Stimuli</i>	36
3.1.11.	<i>Oligonukleotide</i>	37
3.1.12.	<i>Geräte</i>	38
3.1.13.	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	40
3.2.	METHODEN	42
3.2.1.	<i>Zellbiologische Methoden</i>	42
3.2.1.1.	<i>Arbeiten mit Zellkulturen</i>	42
3.2.1.2.	<i>Kulturbedingungen für eukaryontische Zellen</i>	42
3.2.1.3.	<i>Auftauen von Zellen</i>	42
3.2.1.4.	<i>Passagieren von Zellen</i>	42
3.2.1.5.	<i>Einfrieren von Zellen</i>	43
3.2.1.6.	<i>Lagerung von Zellen</i>	43
3.2.1.7.	<i>In vitro Differenzierung von murinen myeloiden und plasmazytoiden dendritischen Zellen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks</i>	43
3.2.1.8.	<i>In vitro Stimulierung von murinen DC</i>	44
3.2.1.9.	<i>Präparation einer Einzelzellsuspension der Milz</i>	44
3.2.1.10.	<i>Isolierung von mononuklearen Zellen des peripheren Blutes</i>	45
3.2.1.11.	<i>In vitro Differenzierung humaner dendritischer Zellen aus Monozyten</i>	45
3.2.1.12.	<i>Ernte von in vitro differenzierten, humanen dendritischen Zellen</i>	46
3.2.1.13.	<i>Zellzahlbestimmung</i>	46
3.2.1.14.	<i>Herstellung von Zelllysaten</i>	47
3.2.2.	<i>Immunologische Arbeitstechniken</i>	47
3.2.2.1.	<i>Durchflusszytometrie</i>	47
3.2.2.2.	<i>Antikörperfärbung und PI-Färbung</i>	48
3.2.2.3.	<i>SDS-Poyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	49
3.2.2.4.	<i>Western Blot</i>	49
3.2.2.5.	<i>Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)</i>	50

3.2.2.6.	Zytokinbestimmung mittels eines Enzyme-Linked-Immuno-sorbent-Assay (ELISA).....	51
3.2.3.	Maustechniken.....	52
3.2.3.1.	Maushaltung.....	52
3.2.3.2.	Mauszucht und -screening.....	52
3.2.3.3.	Mausnarkose.....	52
3.2.3.4.	Intravenöse Injektion.....	52
3.2.3.5.	Retroorbitale Blutentnahme.....	53
3.2.3.6.	Maustötung.....	53
3.2.4.	Molekularbiologische und Genetische Methoden.....	53
3.2.4.1.	Isolation viraler DNA.....	53
3.2.4.2.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	54
3.2.4.3.	Phusion-Polymerase-Ketten-Reaktion.....	55
3.2.4.4.	Restriktion, Klenow Behandlung, Ligation und Transformation von DNA.....	56
3.2.4.5.	Präparation geringer Mengen an Plasmid-DNA nach Qiagen.....	57
3.2.4.6.	Präparation großer Mengen an Plasmid-DNA.....	58
3.2.4.7.	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	58
3.2.4.8.	Sequenzieren von Plasmid-DNA.....	59
3.2.4.9.	Agarose-Gelelektrophorese.....	59
3.2.4.10.	Klonierungsstrategie.....	60
4.	ERGEBNISSE.....	62
4.1.	INDUKTION VON TYP I INTERFERON DURCH INFEKTION MIT MVA.....	62
4.1.1.	MVA induziert Typ I IFN nach Immunisierung von Mäusen sowie nach in vitro Infektion von DC 63	
4.1.2.	Die MVA-vermittelte IFN- α Induktion in DCs geschieht unabhängig von produktiver Infektion, viraler Replikation und intermediärer oder später viraler Genexpression.....	66
4.1.3.	Die IFN- α Induktion durch MVA ist unabhängig von Toll-ähnlichen Rezeptoren.....	69
4.1.4.	Der Typ I Interferon Rezeptor (IFNAR), jedoch nicht die Expression von IFN- β , spielt eine entscheidende Rolle bei der MVA-induzierten IFN- α Produktion.....	73
4.2.	INHIBITION VON TYP I INTERFERON ANTWORTEN DURCH INFEKTION MIT VACCINIA VIRUS (VACV) 75	
4.2.1.	VACV inhibiert MVA-induzierte Typ I IFN Antworten.....	75
4.2.2.	VACV-kodierte Immunmodulatoren sind schrittweise bei der Attenuierung von MVA verloren gegangen.....	78
4.2.3.	VACV inhibiert die Maturierung dendritischer Zellen.....	84
4.2.4.	VACV inhibiert durch TLR-Liganden induzierte Typ I IFN Antworten.....	86
4.2.5.	VACV-kodierte Immunmodulatoren inhibieren die Phosphorylierung von STAT1 und die Degradierung von I κ -B α	88
4.2.6.	VACV-kodierte Immunmodulatoren inhibieren IFN- β Antworten nach Infektion humaner immaturer dendritischer Zellen (iDC).....	90
4.3.	IDENTIFIKATION POTENTIELLER VACV-KODIERTER IFN- β INHIBITOREN UND ETABLIERUNG NEUER METHODEN ZUR ANALYSE VACV-KODIERTER IMMUNMODULATOREN.....	92
4.3.1.	Identifikation VACV-kodierter Immunmodulatoren, die eine IFN- β Induktion inhibieren mittels differential in gel electrophoresis (DIGE)-Analysen und two-dimensional (2D)-Gelelektrophorese.....	93
4.3.2.	Sequenzanalysen von VACV, CVA152, CVA386 und MVA zur Identifikation VACV-kodierter Immunmodulatoren, die eine IFN- β Induktion inhibieren.....	98
4.3.3.	Herstellung lentiviraler Vektoren, die VACV-kodierte Gene exprimieren, zur Analyse des immunmodulatorischen Potentials.....	100
5.	DISKUSSION UND AUSBLICK.....	107
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	117
7.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	128
8.	LEBENS LAUF.....	130
9.	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	131
10.	DANKSAGUNG.....	132

1. Zusammenfassung

1.1. Kurzbeschreibung

Typ I Interferone (überwiegend IFN- α und IFN- β) spielen bei der Kontrolle von Infektionen mit verschiedensten Erregern eine entscheidende Rolle. Nach viralen Infektionen werden IFN-Antworten induziert, die über Bindung an den IFN Rezeptor (IFNAR) die Expression von mehr als 300 Zielgenen beeinflussen. Auf diese Art wird im Wirt ein antiviraler Status etabliert, der das Überleben sichert, bis das adaptive Immunsystem so weit aktiviert ist, dass es den Erreger spezifisch eliminieren kann. Das replikationsdefiziente, DNA-kodierte Modifizierte Vaccinia Virus Ankara (MVA) ist über mehr als 570 *in vitro* Passagen aus dem replikationskompetenten Vaccinia Virus (VACV) abgeleitet worden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MVA, anders als VACV, sowohl nach Infektion von Mäusen als auch nach *in vitro* Infektion von dendritischen Zellen (DC) IFN-Antworten induziert. Dabei sind MVA-vermittelte IFN-Antworten unabhängig von viraler Replikation und unabhängig von einer produktiven Infektion. Stattdessen ist die IFN-Induktion von der Expression früher viraler Gene und von der IFNAR-Expression der IFN-produzierenden Zellen abhängig. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für die Induktion von Typ I IFN sowohl Toll-ähnliche Rezeptor (TLR)-abhängige als auch TLR-unabhängige Mechanismen eine Rolle spielen. Obwohl der Ligand von TLR9 doppelsträngige DNA ist, und daher TLR9 als potentieller Sensor des DNA-kodierten MVA-Genoms in Frage kommt, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MVA vollkommen unabhängig von TLR9 IFN-Antworten induziert. Interessanterweise wird bei Co-Infektion von Mäusen oder DCs mit VACV und MVA die MVA-vermittelte IFN-Induktion inhibiert. Um zu untersuchen, welche VACV-kodierten Immunmodulatoren die Inhibition von IFN Antworten vermitteln, wurden Zwischenpassagen der Generierung von MVA nach 152 (CVA152) und 386 (CVA386) *in vitro* Passagen untersucht. Dabei zeigte sich, dass mindestens zwei VACV-kodierte Immunmodulatoren, die schrittweise bei der Attenuierung von MVA verloren gegangen sind, die Induktion jeweils von IFN- β oder IFN- α inhibieren. Die Inhibition von IFN- α erfolgt über sezernierte Faktoren, während die Inhibition von IFN- β durch intrazelluläre Faktoren vermittelt wird. Das zuvor schon in der Literatur beschriebene VACV-kodierte lösliche Protein B18 bindet IFN- α mit hoher Affinität und neutralisiert dessen Funktion. In dieser Arbeit konnte in Experimenten

mit rekombinantem B18 gezeigt werden, dass B18 auch als effizienter Inhibitor der Induktion von IFN- α Antworten fungiert. Dieser Befund wurde durch Infektionsstudien mit der B18-defizienten VACV Variante vAA6 bestätigt, die in der Lage ist, IFN- α zu induzieren. Zur Identifizierung weiterer VACV-kodierter IFN-Inhibitoren wurden differentielle Expressionsstudien wie DIGE-Analysen und 2D-Gelanalysen durchgeführt. Um die immunmodulatorische Wirkung dabei identifizierter Proteine zu untersuchen, wurden VACV-Kandidatengene in ein lentivirales Vektorsystem kloniert. In nachfolgenden Studien kann so in transduzierten DCs untersucht werden, ob die identifizierten Genprodukte die MVA-vermittelte IFN-Induktion inhibieren.

Schlagworte: Typ I Interferon, Dendritische Zellen, Vaccinia Virus

1.2. Abstract

Upon infection with many different viruses type I interferon (mainly IFN- α and IFN- β) responses are induced. Type I IFN establish an antiviral state to confer host survival until adaptive immunity is induced to an extent that virus is eliminated. During many viral infections type I IFN production is dependent on signalling via the type I IFN receptor (IFNAR) regulating the expression of more than 300 target genes. DNA-encoded Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) is an attenuated Vaccinia Virus strain, deficient in replication in most mammalian cells that was derived from replicationcompetent Vaccinia Virus (VACV) during *in vitro* cultivation for more than 570 passages on chicken embryo fibroblasts (CEF). In this study we could demonstrate that, in contrast to VACV, MVA induced IFN responses upon *in vivo* challenge of mice or *in vitro* infection of dendritic cells (DC). IFN responses were independent of viral replication or productive infection. However, IFN induction was dependent on expression of early viral genes and on IFNAR-expression on IFN-producing cells. Furthermore, this work could show that IFN was induced via Toll-like receptor (TLR)-dependent and TLR-independent mechanisms. Although TLR9 binds double stranded (ds)-DNA and therefore was postulated as a potential sensor for DNA-encoded MVA, MVA-induced IFN production was TLR9-independent. Interestingly, upon co-infection of mice or DC with VACV and MVA no IFN was induced suggesting that MVA-induced IFN responses

were inhibited by VACV. To investigate which VACV-encoded immunomodulator(s) are responsible for IFN inhibition, intermediate passages 152 (CVA152) and 386 (CVA386) obtained during the attenuation of MVA were analysed. Experiments with these VACV variants suggested that VACV encodes for at least two immunomodulators that inhibit IFN- α and IFN- β responses, respectively, that got successively lost during stepwise attenuation of MVA. Inhibition of IFN- α responses are mediated via secreted factors, while IFN- β inhibitor(s) act intracellularly. Previously described VACV-encoded soluble protein B18 binds IFN- α with high affinity and neutralizes IFN-mediated effects. In this work, we could show that B18 efficiently inhibits IFN- α induction. These results were confirmed by experiments with B18-deficient VACV variant vAA6, that induces IFN- α expression. To identify further VACV-encoded IFN inhibitors, expression studies via DIGE-analysis and 2D-gel analysis were performed. To analyse immune-modulatory function, identified inhibitor candidate genes were cloned into a lentiviral vector system. Subsequent studies with transduced DCs shall help to investigate whether identified VACV-encoded gene-products inhibit MVA-induced IFN production.

Keywords: Type I interferon, Dendritic cells, Vaccinia virus

2. Einleitung

2.1. Das Immunsystem

Vertebraten sind ständig eindringenden Mikroorganismen ausgesetzt, welche dazu in der Lage sind Infektionen auszulösen, und haben daher Mechanismen entwickelt, um sich vor Pathogenen wie Viren, Bakterien oder Pilzen zu schützen. Das Immunsystem von Vertebraten wird in die angeborene und die adaptive Immunität unterteilt, welche gemeinsam die Abwehr gegen eindringende Pathogene vermitteln.¹⁻³ Das angeborene Immunsystem stellt hierbei einen ersten Abwehrmechanismus gegen eindringende Erreger dar⁴⁻⁶ und spielt eine Rolle bei der Limitierung von früher Replikation und Ausbreitung infektiöser Erreger.⁶⁻⁹ Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, sowie Mastzellen und Natürliche Killer (NK)-Zellen.^{1,4,6,10} Dendritische Zellen (DC) sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) monozytären Ursprungs. Die molekularen Komponenten des angeborenen Immunsystems setzen sich aus dem Komplement, Akute Phase Proteinen und Zytokinen wie Typ I Interferon (IFN-I) zusammen.^{4,7,10-12}

Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems zählen die Lymphozyten, die man in Thymus-gereifte (T)-Zellen und Knochenmarks-gereifte (B)-Zellen unterscheidet. Diese besitzen spezifische Antigenrezeptoren, den T-Zellrezeptor (TCR) bzw. B-Zellrezeptor (BCR), mit denen sie Antigene erkennen und eine Immunantwort auslösen.² Die Zellen des Immunsystems entstehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen, die sich in myeloide und lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark differenzieren. Aus den lymphoiden Vorläuferzellen wiederum entstehen B- und T-Vorläuferzellen. Während B-Vorläuferzellen im Knochenmark verweilen, um dort zu reifen B-Zellen zu differenzieren, wandern T-Vorläuferzellen in den Thymus. Dort erfolgt das *Rearrangement* des TCR und die Differenzierung zu reifen T-Zellen. Als Co-Rezeptor des TCR exprimieren T-Zellen das Oberflächenmolekül (*cluster of differentiation*) CD3, welches mit dem TCR einen Komplex bildet und so Signale ins Zellinnere weiterleitet. Reife T-Zellen verlassen den Thymus und wandern zu den sekundären lymphatischen Organen. Über den TCR sind sie dazu in der Lage, Pathogene, die durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*; MHC) auf APC präsentiert werden, zu erkennen.^{2,13} Hierbei erkennen CD8 positive

zytotoxische T-Zellen (CTL) Antigene, die auf MHC-I präsentiert werden. MHC-I wird von allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Nach Erkennung des Peptid-MHC-Komplexes setzen CTL zytotoxische Granula frei, produzieren Zytokine und können infizierten Zellen spezifisch lysieren. CD4 positive T-Helferzellen (T_H) interagieren mit MHC-II, welches auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert wird. T_H -Zellen helfen den B-Zellen bei ihrer Teilung, Differenzierung und Produktion von Antikörpern. Des Weiteren unterstützen T_H -Zellen sowohl Phagozyten bei der Zerstörung von Pathogenen als auch zytotoxischen T-Zellen.^{2,7,14-18} T_H -Zellen lassen sich in weitere Subtypen unterteilen. So unterscheidet man z.B. T_H1 , T_H2 , T_H3 , T_H17 , T_H9 , T_H25 , T folliculäre Helfer (T_{FH})-Zellen und $CD25^+FoxP3^+$ regulatorische T-Zellen (T_{reg}).^{19,20}

Im Gegensatz zu T-Zellen, die eine zellvermittelte Immunantwort auslösen, vermitteln B-Zellen die humorale Immunität. Reife B-Zellen wandern aus dem Knochenmark in die sekundären lymphatischen Organe und erkennen hier Antigene über den BCR. Nach Antigenbindung werden B-Zellen aktiviert und differenzieren zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen. Plasmazellen wandern in das Knochenmark ein und sezernieren Antikörper. Diese vermitteln die humorale Immunantwort durch die ein Pathogen direkt neutralisiert, opsonisiert oder für die zellvermittelte Zytotoxizität markiert werden kann.^{11,12,21-26} Des Weiteren können B-Zellen nach dem ersten Antigenkontakt zu Gedächtniszellen differenzieren. Sie ermöglichen so ein immunologisches Gedächtnis, damit nach wiederholtem Kontakt mit dem gleichen Pathogen eine schnellere und effizientere Immunantwort folgen kann.^{2,11,12,24}

2.2. Dendritische Zellen

DC sind der hauptverantwortliche Zelltyp für die Vermittlung zwischen angeborener und adaptiver Immunität.^{11,12,27} Nach Aufnahme eines Antigens präsentieren DC über den MHC naiven T-Zellen Antigenfragmente zur Induktion einer adaptiven Immunantwort. Sie differenzieren aus Knochenmarkvorläuferzellen und stellen die hauptverantwortlichen APC *in vivo* dar.²⁸⁻³⁰ Sie können endogene Antigene über MHC Klasse I (MHC-I) den *cluster of differentiation* (CD)8-positiven zytotoxischen T-Zellen (CTL) und exogene Antigene über MHC-II den CD4-positiven T-Helferzellen (T_H) präsentieren. Im Gegensatz zu Peptiden, die aus intrazellulären Proteinen hervorgehen, werden exogene Antigene über Endozytose aufgenommen. In der Regel gelangen diese Peptide nicht in das Endoplasmatische Retikulum

(ER), um über MHC-I präsentiert zu werden, sondern werden über MHC-II den T_H präsentiert. Um ihre zytotoxische Effektorfunktion auszuüben, müssen CTL in einem ersten Schritt über die Bindung des Peptid-MHC Komplexes von DC aktiviert werden. Intrazelluläre Pathogene, die keine DC infizieren und so über MHC-I präsentiert werden können, führen daher nur zur CTL Aktivierung, wenn APC extrazelluläres Antigen über MHC-I präsentieren. Dieser Prozess wird als *Crosspresentation* (Kreuzpräsentation) bezeichnet. Unter den DC können $CD24^+CD8\alpha^+CD103^+$ DC Antigene kreuzpräsentieren, wobei kürzlich mit Hilfe von *Knockout*-Mäusen gezeigt werden konnte, dass der von $CD8\alpha^+CD103^+$ DC exprimierte Transkriptionsfaktor BATF3 für die *Crosspresentation* eine entscheidende Rolle spielt. Unter inflammatorischen Bedingungen, sowie in mukosalem Gewebe oder bei Tumoren wurde ebenfalls bei $CD8\alpha^-CD103^-$ DC Subtypen die Fähigkeit zur *Crosspräsentation* beobachtet. Weiterhin ist beschrieben, dass neben DC auch andere Zelltypen, wie B-Zellen, Endothelzellen oder Makrophagen Kreuzpräsentation ausüben.³¹ Hierbei werden unterschiedliche Arten von Antigen wie z.B. lösliche Proteine, Immunkomplexe, intrazelluläre bakterien, Parasiten und zelluläre Antigene kreuzpräsentiert.^{32,33}

DCs können pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*; PAMP) bestimmter Pathogene (wie Bakterien, Viren oder Pilze) über so genannte *pattern recognition receptors* (PRR) wahrnehmen.^{8,34-36} Derartige PAMPs stellen beispielsweise virale Nukleinsäuren und Komponenten bakterieller Zellwände oder Flagellin dar. Des Weiteren ist eine Aktivierung durch die Freisetzung von Gefahrensignalen von apoptotischen Zellen möglich.³⁷ Nach Erkennung eines Pathogens unterziehen sich DCs einem Maturierungsprozess, welcher die Induktion co-stimulatorischer Moleküle, Antigenprozessierung, sowie eine verstärkte Expression von MHC Molekülen beinhaltet. Sie wandern zum dränierenden Lymphknoten und präsentieren dort das prozessierte Antigen in einem Peptid-MHC-Komplex naiven T-Zellen.⁷

Es existieren anatomisch unterscheidbare Subtypen von DCs, nämlich solche, die in lymphatischen Organen und solche, die in nicht-lymphatischen Organen vorkommen. DCs lymphoiden Ursprungs werden in zwei Subgruppen unterteilt: plasmazytoide DC (pDC) und konventionelle DCs (cDC). Zu der Gruppe der migratorischen DCs gehören z.B. die Langerhans-Zellen der Epidermis und intestinale DCs.³⁸ Es konnte inzwischen ein Knochenmarksgereifter gemeinsamer $Lin^-c-Kit^{int}Flt3^+M-CSFR^+CD11c^+$ DC Vorläufer (*common DC precursor*, CDP) identifiziert werden, aus dem sich pDCs und cDCs

differenzieren können.^{27,39,40} Unter den bislang sechs in der Maus identifizierten Subtypen von DCs, wurden pDC und cDCs ebenso im humanen System nachgewiesen.²⁷ cDC werden oftmals auch als myeloide DC (mDC) bezeichnet. Sie exprimieren die Oberflächenantigene CD11c und CD11b und stellen die Haupt-APCs *in vivo* dar. Während mDC in der Lage sind effizient T-Zellen zu aktivieren, besitzen pDC nur begrenzte Fähigkeiten, eine T-Zellproliferation zu induzieren und sind daher im Vergleich zu mDCs die ineffizienteren APCs.^{27,41-44} Es wurde beschrieben, dass im Verlauf einer viralen Infektion pDC zu mDC konvertieren können. Diese Differenzierung könnte aufgrund des Potentials von mDC zur Antigenpräsentation ein wichtiger Schritt zur Vermittlung zwischen angeborener und adaptiver Immunität darstellen.²⁷

Obwohl pDC als auch mDC konstant im Knochenmark produziert werden und anschließend im Blut zirkulieren, besitzen sie ein unterschiedliches Migrationsverhalten. Während unreife mDCs in peripheren Geweben zu finden sind, sind reife mDCs in den T-Zell-Zonen der lymphatischen Organe angesiedelt. Im Gegensatz dazu sind im Blutkreislauf zirkulierende pDC unabhängig von ihrem Aktivierungsstatus dazu befähigt, in sekundäre lymphatische Organe einzuwandern.^{41,44,45}

2.2.1. Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDC)

Aus dem Knochenmark oder der Milz isolierte pDC weisen eine plasmazytoide Morphologie mit einem hohen Anteil an ER auf. Sie sind durch eine runde Form, glatte Oberfläche und einen exzentrischen Nukleus gekennzeichnet.^{42,44,46-48} Nach Aktivierung sind murine pDC größer und besitzen eine weitaus ungleichförmigere Struktur.⁴⁶ Murine pDC sind durch die Expression der Oberflächenmarker CD11c, B220, CD45RB, Ly6C, DEC205 (CD205), SiglecH, CD209, CD123 und Gr-1 charakterisiert. Die meisten murinen pDC exprimieren kein CD8 α , jedoch exprimieren sie schwach die Aktivierungsmarker CD40, CD69, CD80, CD86 und CD95.^{41,46,49-52} Humane pDCs hingegen exprimieren CD123, BDCA-2, CD209, CD205, ILT7 und HLA-DR jedoch kein CD11c.^{42,44,45,47,49,53}

Obwohl sich die meisten Zellen *in vitro* zur Sekretion von IFN-I induzieren lassen, produzieren pDC 1000-fach höhere Mengen an IFN-I als die meisten Zellen und stellen somit die Haupt-IFN-produzenten *in vivo* dar. Daher wurden sie zuerst auch als IFN-produzierende Zellen (IPC) bezeichnet.^{6,27,41,44,45,51,54-57} Induziert durch eine virale Infektion, können pDC >50 % ihrer gesamten Transkription auf die Synthese von IFN-I kodierender mRNA

umstellen.⁴⁴ Zudem nehmen sie eine übergeordnete Rolle gegenüber anderen IFN-produzierenden Zellen ein, da sie ein breiteres Expressionsspektrum der unterschiedlichen Subtypen von IFN- α , z.B. im Vergleich zu mDCs, aufweisen.⁴⁴ Des Weiteren sind pDCs anders als viele andere Zelltypen dazu in der Lage, ohne eine direkte Infektion IFN-I zu produzieren.⁴⁴

Es wurde spekuliert, ob die Fähigkeit von pDCs zur schnellen und massiven Produktion von IFN-I der Expression bestimmter *interferon regulatory factors* (IRFs) zu Grunde liegt. IRF1-9 sind wichtige Transkriptionsfaktoren für die beschrieben ist, dass sie einen Einfluss auf frühe Immunantworten nehmen. Speziell IRF7 wurde hierbei eine Rolle zugewiesen. Während IRF7 bei Zelltypen wie Monozyten induzierbar ist, weisen pDCs eine konstitutive Expression an IRF7 auf, die nach viraler Infektion nur moderat verstärkt wird.^{6,41,44,47,58-61} Es existieren sowohl in der Maus als auch im Menschen <1 % pDCs *in vivo*, die sich in den lymphatischen Organen oder Geweben wie der Leber, Lunge, sowie den sekundären lymphatischen Organen befinden. Nachdem sie das Knochenmark verlassen haben, wandern pDC zu den sekundären lymphatischen Organen, wo sie sich in den T-Zellzonen ansiedeln.^{41,44,45} Die Entwicklung von pDCs aus hämatopoetischen Stammzellen wird sowohl in der Maus als auch im Mensch über das Zytokin Flt3-L vermittelt.^{42,62,63} Flt3-L-transgene Mäuse weisen eine erhöhte Anzahl an pDCs auf, wohingegen Flt3-L-defiziente Mäuse geringere Anteile an pDC besitzen. Des Weiteren konnte in Patienten, denen Flt3-L verabreicht wurde, erhöhte Anzahlen an pDC im peripheren Blut nachgewiesen werden.^{41,42,51,62} *In vitro* lassen sich unter der Zugabe von Flt3-L bzw. GM-CSF DC-Kulturen aus murinen Knochenmarkszellen generieren, die phänotypisch und morphologisch mit *in vivo* vorkommenden DC-Subtypen zu vergleichen sind (Abb 2.1 B).

A

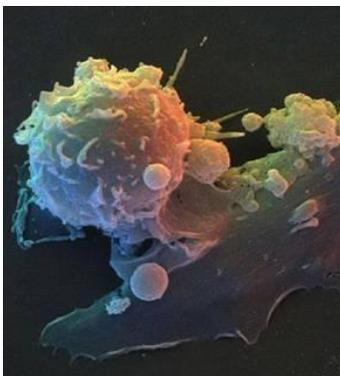


Abbildung 2.1: Darstellung einer DC und die schematische Darstellung der Generierung *in vitro* differenzierter DC. (A) Interaktion einer aktivierten DC mit anderen Zellen des Immunsystems. (B) Zur Generierung *in vitro* differenzierter pDC oder mDC werden aus Mäusen Femur und Tibia präpariert und die Knochenmarkszellen unter der Zugabe von Flt3-L bzw. GM-CSF in Kultur genommen.

Quelle: www.sciencemuseum.org.uk

B

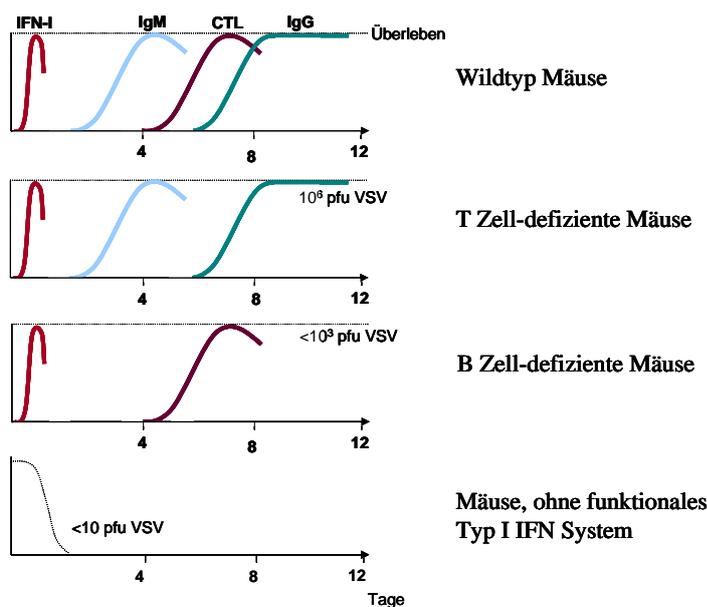


2.3. Interferone (IFN)

IFN sind Zytokine, die ursprünglich aufgrund ihrer Fähigkeit eine Resistenz gegenüber viralen Infektionen zu vermitteln, beschrieben wurden.⁶⁴⁻⁶⁷ Die unterschiedliche Zielgene der IFN sind oft spezifisch für den jeweiligen Zelltyp. IFN induzieren Proliferation bestimmter Zelltypen, wohingegen sie bei anderen diese inhibieren, sie beeinflussen die Apoptose, Differenzierung, Migration und Aktivierung bestimmter Effektorzellen des Immunsystems.⁶⁸ IFN lassen sich in Typ I Interferon (IFN-I), welches mehr als 20 Subtypen beinhalten, sowie das aus einem Subtyp bestehende Typ II IFN unterteilen. Zudem wurden kürzlich die Typ III IFN beschrieben, zu dem IFN- λ 1, IFN- λ 2 und IFN- λ 3 gehören. Diese Klassifizierung basiert auf Sequenzunterschieden, gemeinsamer Rezeptoren, induzierende Stimuli und dem produzierenden Zelltyp.⁶⁸⁻⁷¹ Während Typ-II IFN (IFN- γ) hauptsächlich von Natürlichen Killer (NK)-Zellen, T-Zellen und Natürlichen Killer T-Zellen (NKT)-Zellen produziert wird, sind alle kernhaltigen Zellen nach einer Infektion dazu in der Lage, Typ I IFN zu bilden.^{68,70,71}

2.3.1. Typ-I Interferon (IFN-I)

IFN-I sind proinflammatorische Zytokine. Zusätzlich zu ihren zellvermittelten Effekten, wie Regulation der Zelldifferenzierung, Proliferation oder Immunmodulation, spielen sie ebenso eine große Rolle bei viralen Infektionen und stellen den ersten Abwehrmechanismus für den infizierten Organismus dar.⁷² Dies wird bei Infektion von Mäusen deutlich, die aufgrund einer Deletion des Typ I IFN Rezeptors (IFNAR) kein funktionales Typ I IFN System besitzen. Obwohl diese Tiere ein vollkommen funktionsfähiges adaptives Immunsystem besitzen, erliegen sie sehr rasch Infektionen mit geringen Infektionsdosen an Erregern wie z.B. dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) (Abbildung 2.2).^{73,74}



Infektionsschemata Prof. Dr. Ulrich Kalinke, modifiziert

Abbildung 2.2: Die Rolle des Typ I IFN am Beispiel einer Infektion von Mäusen mit VSV: Mäuse ohne funktionales Typ I IFN System erliegen viralen Infektionen in geringsten Infektionsdosen: Dieses Schemata zeigt stark vereinfacht ein Infektions-experiment. Es wurden Wildtyp Tiere, T-Zell-defiziente Tiere (CD4-Cre C57 BL/6); B-Zell-defiziente Tiere (CD19 Cre C57 BL/6); sowie Tiere ohne funktionales Typ I IFN System (IFNAR^{-/-} C57 BL/6) mit Vesikulärem Stomatitis Virus (VSV) intravenös (i.v.) in den angegebenen Infektionsdosen infiziert. Gezeigt ist das Überleben (schwarze gepunktete Linie) nach Einsetzen der entsprechenden Immunantworten (Kurve). Tiere, ohne funktionales Typ I IFN System erliegen einer Infektion mit weniger als 10 pfu (*plaque forming Units*; entspricht der Anzahl viraler Partikel).

IFN-I gehören zu einer evolutionär konservierten, in Vertebraten exprimierten Multigenfamilie.⁶⁸ Sie setzen sich aus diversen Subtypen verschiedener Intron-freier Gene zusammen: 1 IFN- β , 13–14 IFN- α Subtypen, abhängig von der jeweiligen Spezies, sowie den weniger bekannten IFN- ε , IFN- κ , IFN- ω , IFN- δ , IFN- τ und IFN- ζ .^{70,75} Die schnelle Produktion von Typ I IFN ist ein zentraler Schritt bei der angeborenen Immunantwort, und induziert die Expression hunderter IFN-stimulierter Gene (*interferon stimulated genes*, ISG), die die Bildung eines „antiviralen Status“ sichern, der die Ausbreitung der Infektion durch benachbarte Zellen begrenzt. IFN-I kann hierbei sowohl autokrin als auch parakrin wirken, in dem es beispielsweise die Aktivierung und somit Funktionalität von NK-Zellen oder auch virus-spezifischer CTLs verstärkt. Sekretiertes IFN zirkuliert im Körper und aktiviert die jeweiligen Zielzellen, in denen dann wiederum antiviral wirkende Mechanismen induziert werden, die limitierend auf die Ausbreitung und die Replikation des Virus wirken.^{8,71-73,76,77}

Hierbei wirken ISGs inhibierend auf den Eintritt, die Transkription, die Induktion der Translation, sowie die Reifung, Zusammenbau und Freisetzung der Viruspartikel.⁶⁸

Zusätzlich zu seiner antiviralen Wirkung besitzt Typ I IFN pleiotrope Effekte und spielt eine Rolle bei der Zellzykluskontrolle, Hämatopoese und reguliert zelluläre und humorale Immunantworten.⁷⁴ IFN-I wirkt auf Effektorzellen der angeborenen und adaptiven Immunität. Es unterstützt Proliferation, Differenzierung und Zytotoxizität von NK-Zellen, die

Differenzierung von T-Zellen, das Überleben von *memory* T-Zellen, sowie die Generierung und Aktivierung immaturer mDC. Typ I IFN induziert die Maturierung von DCs, in dem es die Expression von co-stimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 und CD40, sowie die Antigenpräsentation über MHC-II verstärkt.^{6,41,68,78,79} IFN-I regulieren die IL-7 stimulierte B-Zell-Differenzierung und unterstützen deren Reifung sowie den Immunglobulin (Ig) Klassenwechsel.^{80,81} Durch die Induktion diverser Chemokine und Chemokin Rezeptoren, wie z.B. CXCL10 und CCL12 nehmen Typ I IFN ebenfalls auf die Rekrutierung einzelner Immunzellen Einfluss.⁸²

Die meisten IFN- α Subtypen bestehen aus 166 Aminosäuren, mit 78-98 % identischer Sequenz zueinander. Strukturell liegen sie als fünf α -Helices gebündelt vor, die von zwei Disulfidbrücken stabilisiert werden. IFN- β hingegen besitzt eine 35%ige Übereinstimmung der Aminosäureabfolge im Vergleich zu den IFN- α Sequenzen. Sowohl die IFN- α Subtypen als auch IFN- β sind glykosyliert und die isoelektrischen Punkte von IFN- α und IFN- β entsprechen 5,6 bzw. 8,9. Alle Typ I IFN liegen stabil bei einem pH=2 und 56°C vor.⁶⁸ In der Maus existieren 24 Typ I IFN spezifische Gene, die auf Chromosom 4p kodiert sind: 13 IFN- α Gene, ein einzelnes IFN- β Gen, IFN- ϵ , drei IFN- ζ Gene und sechs Pseudogene.⁶⁸ Die 14 in der Maus exprimierten IFN- α Isoformen sowie IFN- β binden den gleichen Typ I IFN Rezeptor (IFNAR). Dieser besitzt eine extrazelluläre Bindedomäne, sowie eine intrazelluläre Kinase-Domäne, die über die Ligandenbindung induzierte Dimerisierung aktiviert wird.⁸³ Der IFNAR besitzt zwei Ketten, IFNAR1 und IFNAR2 die beide für die Funktionalität essentiell sind.^{8,84-86} Einer der Hauptsignalwege, der durch die Induktion von Typ I IFN aktiviert wird ist der der *janus kinase (JAK)/signal transducers and activators of transcription (STAT)* Proteine.⁸

2.3.2. Der Typ I-IFN Rezeptor (IFNAR) *Feedback Loop*

Studien in murinen embryonalen Fibroblasten zeigten, dass die IFN- α/β Antwort ihre eigene Expression über einen so genannten autokrinen Rückkopplungsmechanismus (*feedback loop*) reguliert.^{41,87,88} Die Transkription von IFN- β und - α wird durch die Mitglieder der *interferon regulatory factor (IRF)*-Familie reguliert, vorzugsweise durch IRF3 und IRF7.⁴¹ Insbesondere virale Infektionen führen zu der Aktivierung von IRF3, welches konstitutiv exprimiert wird und nach Phosphorylierung die initiale Sekretion geringer Mengen an IFN- β und frühem IFN- α (IFN- $\alpha 4$) induziert. Diese initiieren wiederum einen autokrinen

Rückkopplungsmechanismus (*feedback loop*) über den IFNAR. Dies induziert die Expression des Transkriptionsfaktors IRF7, welcher nach Aktivierung die Expression zusätzlicher IFN- α Gene vermittelt und somit die IFN-Produktion gesteigert wird.^{41,89} Während die meisten Zelltypen, inklusive mDCs, eine Aufregulation der IRF7 Expression für die Induktion des IFNAR *feedback loop* und somit der Produktion großer Mengen an IFN- α benötigen, sind pDC dazu in der Lage große Mengen IFN- α in Abwesenheit des IFNAR-*feedback loops* zu bilden.^{41,48} Es konnte gezeigt werden, dass die konstitutive IRF7 Expression durch pDC^{41,58,59}, und die Möglichkeit IRF7 jedoch nicht IRF3 über das Adaptorproteins *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) zu rekrutieren über Mechanismen erfolgt, die über die Signalmoleküle TRAF6 und IRAK4 vermittelt werden.^{41,90,91} Somit ist in pDCs eine IFNAR-unabhängige IFN- α Expression ohne die Beteiligung des Transkriptionsfaktors IRF3 möglich.^{41,44,48}

2.4. Induktion von IFN-I

Durch eine Virusinfektion kann auf unterschiedlichen Wegen die Produktion von Typ I IFN induziert werden. Die Induktion der Typ I IFN wird hierbei durch PRR vermittelt, welche Pathogen-assoziierte molekulare Muster, PAMP, die für bestimmte Mikroorganismen charakteristisch sind, erkennen können. So werden beispielsweise Virus-assoziierte Moleküle wie genomische DNA oder RNA und doppelsträngige (ds)RNA, die in Virus-infizierten Zellen vorkommen kann, über PRRs von Zellen des angeborenen Immunsystem erkannt.^{6,10,92} PRRs werden konstitutiv exprimiert, sind keimbahnkodiert und werden unabhängig von einem immunologischen Gedächtnis von allen Zellen des Immunsystems exprimiert.^{7,10,57,92} Die PRRs, die die Induktion von Typ I IFN gewährleisten, lassen sich in Subklassen unterteilen: die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR), die C-Type Lectine (CTLs), die RIG-I ähnlichen Helicasen (*RIG I like helicases*, RLH), DNA Sensoren wie z.B. *absent in melanoma 2* (AIM2), sowie NOD-ähnliche Rezeptoren. Während die RLH und NLR im Zytosol lokalisiert sind, werden TLRs an der Zelloberfläche oder in den Endosomen exprimiert, wo sie virale Komponenten oder Nukleinsäuren detektieren.^{6,10,78,79,92-96} Kürzlich konnten weitere intrazelluläre Sensoren identifiziert werden, die mikrobielle oder nicht-mikrobielle Gefahrensignale detektieren können.^{37,97} So können beispielsweise dsRNA, die während des Replikationszyklus vieler Viren gebildet wird⁹⁸, oder bestimmte virale Glykoproteine⁹⁹⁻¹⁰¹ die Induktion von Typ I IFN Antworten stimulieren. Zudem kann Typ I IFN durch bakterielle Infektionen induziert werden. Hierbei wirken bestimmte Bestandteile des Bakteriums wie

Lipopolysaccharide (LPS) oder bakterielle DNA als Stimuli zur Induktion von Typ I IFN. Weiterhin stellen unmethylierte CpG-reiche Motive bakterieller DNA, die nicht in Säugerzellen zu finden sind, einen Stimulus für die Typ I IFN Induktion dar.⁸

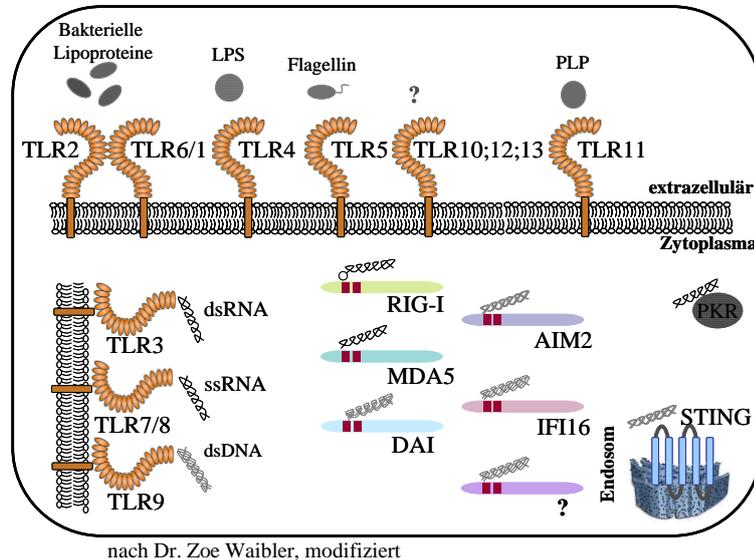


Abb. 2.3: Induktion von Typ I IFN. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular pattern*; PAMPs), wie sie von vielen Pathogenen exprimiert werden, können von unterschiedlichen Pathogenerkennungsrezeptoren (*pathogen recognition receptors*; PRR) detektiert werden und so Typ I IFN Antworten induzieren. Zu den PRR zählen Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR), zytoplasmatische Sensoren wie die RIG-like Rezeptoren (RLR), Protein Kinase R (PKR) und die kürzlich identifizierten zytoplasmatischen oder im ER lokalisierten DNA Sensoren DAI, AIM2, STING und IFI16. [PLP=Proteolipidprotein]

Wie bereits beschrieben, wird die Expression von Typ I IFN über die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, IRF3 und IRF7 reguliert, wobei insbesondere IRF3 und IRF7 als Antwort auf eine virale Infektion aktiviert werden.^{6,95} Es wurde angenommen, dass Zellen entweder über TLR- oder den RLH-vermittelte Signaltransduktion verfügen, um Viren wahrzunehmen und die Aktivierung der Typ I IFN Genexpression einzuleiten. Die meisten Zellen wie beispielsweise Fibroblasten, Hepatozyten, aber auch cDCs agieren hierfür über den so genannten „klassischen Signalweg“. Sie besitzen RLHs als intrazelluläre Sensoren, welche während einer Infektion virale Komponenten im Zytoplasma detektieren und so IRF3 und NF- κ B aktivieren. Dies wiederum resultiert in der Induktion der Genexpression von IFN- β . Infizierte Zellen sekretieren somit initial IFN- β wobei anschließend die IFN- α Genexpression erfolgt.⁷³ Im Gegensatz dazu exprimieren andere Zellen, wie beispielsweise pDCs, TLRs auf ihrer Oberfläche oder in den Endosomen, um extrazelluläre oder intrazellulär eingeschlossene virale Komponenten, wie beispielsweise virale Nukleinsäuren, zu detektieren. Der TLR-vermittelte Signalweg wird über die Adaptormoleküle MyD88 oder TRIF vermittelt. Diese aktivieren Proteinkinasen, wie den I κ B-Kinasekomplex (bestehend aus IKK- α , IKK- β und NEMO), sowie IKK-ähnliche Kinasen (wie z.B. TBK1, IKK ϵ). Der IKK-Komplex führt zur Phosphorylierung und anschließenden Degradierung des NF- κ B Inhibitors I κ B. NF- κ B kann

so in den Nucleus eintreten und die Expression einer Vielzahl von Genen, die bei der Immunantwort involviert sind, induzieren. TBK1 and IKKε phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren IRF3 oder IRF7, dies führt zur Dimerisierung von IRF3 bzw. IRF7 und zur nuklearen Translokation. Die IRFs sowie NF-κB sowie andere Transkriptionsfaktoren bilden einen so genannten *enhanceosome* Komplex, welcher die Expression der IFN aktiviert (vgl. Abb. 2.4).^{73,102}

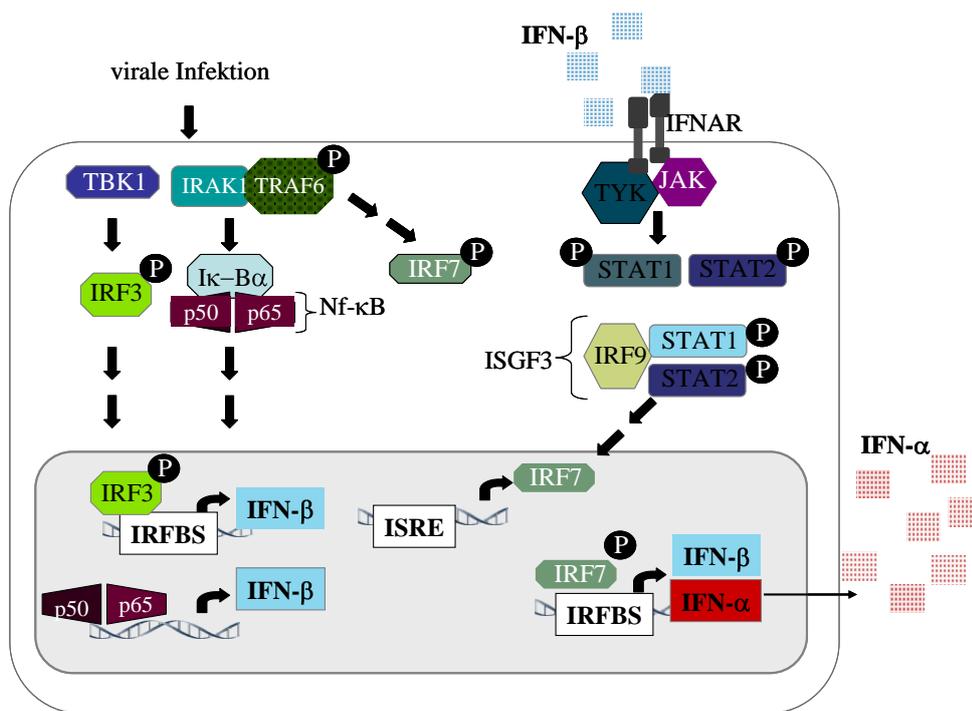


Abbildung 2.4: Durch eine virale Infektion wird über eine hier schematisch vereinfacht dargestellte Signaltransduktion IFN-α induziert. [IRF=Interferon Regulatory Factor; ISRE= IFN-stimulated Response Element; ISGF= IFN-stimulated Gene Factor]

2.4.1. Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs)

TLRs sind eine Klasse von Membranproteinen, die Mikroben wie Viren, Bakterien, Pilze oder Protozoen detektieren und so eine antimikrobielle Signalkaskade induzieren können.^{1,6,7,10,37,97,103} Sie werden auf Immunzellen, wie DCs, Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen aber auch Nicht-Immunzellen wie Fibroblasten oder Epithelzellen exprimiert.¹⁰ TLRs gehören zu den Typ-I Membranrezeptoren und sind evolutionär konserviert. Die extrazelluläre Domäne der TLRs besteht aus einer Leucin-reichen Wiederholungssequenzen (*leucin-rich repeats*; LRR), die eine Länge von 24-29 Aminosäuren besitzen. Jede LRR besteht aus einem α/β Strang und einer α-Helix, die über so genannte *loops* verbunden sind. Die

zytoplasmatische Domäne hingegen weist Homologien mit dem Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R) auf und wird daher auch als Toll/IL-1R (TIR) Domäne bezeichnet.^{4,10,37,92,95,104} Bislang wurden 13 TLRs identifiziert, die auf Säugerzellen des Immunsystems exprimiert werden. TLR2 liegt als Komplex gebunden vor und bestehend aus TLR2/6 oder TLR1/2.^{10,105} Kürzlich wurde ebenfalls für TLR10 eine Komplexbildung mit TLR2 vermutet.¹⁰⁶

Die auf der Zelloberfläche exprimierten TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 10, 11 und 13 detektieren Lipide, Lipoproteine und Peptidoglykan von Bakterien, Pilzen oder Protozoen. Intrazellulär lokalisierte TLRs wie TLR3, 7, 8 und 9 detektieren bakterielle und virale Nukleinsäuren. Die Liganden von TLR12 sind nicht bekannt. TLR8 ist im murinen System nicht funktional und TLR11, 12 und 13 werden nur in der Maus und nicht im Menschen exprimiert.^{1,6,10,57,92,94,105}

Die TLRs, die nach einer viralen Infektion bei der Induktion von Typ I IFN eine Rolle spielen sind TLR7 und TLR9, die insbesondere von murinen und humanen pDC exprimiert werden, sowie TLR3, der von konventionellen DC und Makrophagen exprimiert wird.^{6,10,105,107} Viren, deren Genom von dsDNA kodiert wird, wie beispielsweise Herpes simplex Virus (HSV)-1 and HSV-2, induzieren somit über die Aktivierung von TLR9 die Sekretion von Typ I IFN. Für ein weiteres DNA-kodiertes Virus, das murine Zytomegalovirus (MCMV), wurde ebenso die TLR9-vermittelte Induktion von Typ I IFN als Mechanismus identifiziert.¹⁰⁷⁻¹¹¹ Die TLR9-vermittelte IFN- α Produktion nach Infektion mit HSV-1 und HSV-2 erfolgt vor allem durch pDC.¹⁰ Auch synthetische Oligonukleotide, so genannte A/D Typ CpG DNAs, induzieren IFN-Antworten in pDC.^{70,112,113} Diese sind durch einen phosphorothioat-modifizierten poly-G Schwanz am 5'- und 3'-Ende, sowie ein Phosphodiester CpG Motiv im Zentrum charakterisiert.¹⁰ Demnach werden Viren, die von pDCs aufgenommen werden, für die proteolytische Degradation in das endosomale Kompartiment eingeschlossen und ihr RNA- oder DNA-kodiertes Genom für die Detektion durch TLR7, 8 oder 9 freigesetzt.¹¹⁴ Dieser Prozess erfolgt unabhängig von einer produktiven Infektion, wodurch es pDCs möglich ist, IFN-Antworten nach Infektion mit replikationsdefizienten oder inaktivierten Viren zu induzieren.⁷⁰ Autophagie-betreibende pDC können Intermediate der RNA Replikation von VSV im Zytosol wahrnehmen und so eine IFN-Antwort über TLR7 induzieren.¹¹⁵

Die Bindung des entsprechenden Liganden führt zur Konformationsänderung des TLRs sowohl in der Ektodomäne als auch in den zytoplasmatischen TIR-Domänen. Diese Konformationsänderung des Rezeptors resultiert in der Rekrutierung spezifischer

Adaptorproteine. Bis jetzt sind fünf zytosolische TIR-Domänen enthaltende Adaptorproteine identifiziert worden: (I) MyD88, (II) Mal (*MyD88 adaptor like*, auch als TIRAP bezeichnet), (III) TRIF (*TIR domain-containing adapter-inducing interferon- β* , auch als TICAM-1 bezeichnet), (IV) TRAM (*TRIF related adaptor molecule*, auch als TICAM-2 bezeichnet) und (V) SARM (*sterile α - and armadillo-motif-containing protein*).^{103,116} Außer TLR3 binden alle TLR an das Adaptormolekül MyD88. Für TLR3 und TLR4 sind MyD88 unabhängige Signalwege beschrieben, die über TRIF vermittelt werden. TRIF aktiviert hierbei über TRAF3 TBK1, welches dann wiederum eine Familie von I κ B Kinasen aktiviert, die IRF3 und IRF7 phosphorylieren können.¹⁰ Die Bindung dieser Adaptoren resultiert in einer Signalkaskade über *IL-1R associated kinases* (IRAKs), *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6* (TRAF6), *transforming growth factor- β activated kinase* (TAK1), und den Inhibitor des *nuclear factor- κ B* (NF- κ B)-(I κ B)-Kinase Komplexes. Die anschließende Signaltransduktion führt wiederum zur Induktion von *mitogen activated protein* (MAP) Kinasen und der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B, IRF3 und IRF7.^{10,78,79,89,92,103,105,117} Über TLR-vermittelte Pathogenerkennung können Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose, sowie die Sekretion inflammatorischer Zytokinen und Chemokine wie Typ I IFN, Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-10 und IL-12 induziert werden. Des weiteren können sie die Expression co-stimulatorischer Moleküle und eine verstärkte MHC-Expression induzieren.^{7,37,92}

2.4.2. TLR-unabhängige Mechanismen

Es konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten und cDCs, die defizient für MyD88 und TRIF sind und somit kein funktionales TLR System besitzen, dazu in der Lage sind, nach viraler Infektion Typ I IFN zu produzieren. Demnach existieren, zumindest in einigen Zelltypen TLR-unabhängige Mechanismen zur Induktion von Typ I IFN.^{10,96,105,118} Während TLRs dazu in der Lage sind, Pathogene auf der Zelloberfläche oder in den Lysosomen bzw. Endosomen zu detektieren, können Pathogene im Zytoplasma von zytoplasmatischen PRRs wahrgenommen werden. Diese sind im Gegensatz zu TLRs lösliche, nicht Membran-gebundene Proteine. Zu diesen gehören u.a. die NOD-ähnlichen Rezeptoren (*NOD-like receptors*; NLR) und die RIG-ähnlichen Helikasen (*RIG-like helicases*; RLHs). Diese Proteinfamilien sind auf die Erkennung bakterieller und viraler Komponenten spezialisiert.^{6,10,37}

NLRs besitzen eine N-terminale Caspase-rekrutierende Domäne (CARD) Domäne, eine Nukleotidbindungsdomäne (*nucleotide binding domain*; NBD oder auch *nucleotide binding and oligomerization domain*; NACHT) und eine C-terminale LRR. NLRs können in zwei Subklassen unterteilt werden: die NOD Proteine sowie 14 Mitglieder der NALP Familie. Die NLRs werden in einer inaktiven Form synthetisiert und werden erst nach Ligandenbindung über die NBD-abhängige Oligomerisierung und Komplexbildung aktiviert. Die CARD Domäne von NOD1 und NOD2 assoziiert z.B. mit Proteinkinasen, die wiederum NF- κ B and MAP Kinase aktiviert und so die Expression von Typ I IFN induziert.^{7,10,37} Zu der Familie der NLRs gehören zahlreiche Mitglieder. So detektiert beispielsweise der NLR NOD2 bakterielles Peptidoglykan, welches zur Aktivierung von NF- κ B führt.⁵⁷

Ein weiterer TLR-unabhängiger Mechanismus zur Erkennung viraler und bakterieller Nukleinsäuren wird über RLHs, wie *retinoic acid inducible gene I* (RIG-I) und *Melanoma differentiation associated gene* (Mda5) vermittelt.^{37,119} Sie werden basal in vielen Zelltypen exprimiert und ihre Expression wird durch IFN verstärkt.⁹⁵ RIG-I und Mda5 binden synthetische dsRNA über ihre Helicase Domäne. Nach Bindung des Liganden erfolgt die Signalweiterleitung über die CARD-ähnlichen Domänen. Diese binden das Adaptorprotein *interferon- β promoter stimulator protein-1* (IPS-1, auch als CARDIF, MAVS oder VISA bezeichnet) in der mitochondrialen Membran, dass zur Aktivierung von IRF3 und NF- κ B führt.^{10,95,97,120-124}

RIG-I ist eine DExD/H box RNA Helicase und weist zwei CARD-ähnliche Domänen auf. RIG-I ist dazu in der Lage, freie 5'-Triphosphat RNA, die von viralen Polymerasen gebildet wird, zu erkennen.^{6,10,70,93,105,125-128} Die RNA-kodierten Genome von Influenza, Rabies Virus, sowie VSV sind einzelsträngig aber besitzen ein 5'-Triphosphat und können so von RIG-I gebunden und erkannt werden.^{70,125} Mda5, auch als Helicard bezeichnet, ist strukturell mit RIG-I verwandt. Es besitzt zwei CARD-ähnliche Domänen und eine einzelne Helicase Domäne. Der Mechanismus der Aktivierung über Mda5 ist bislang noch weitgehend unklar, jedoch erfolgt die Aktivierung nicht alleine über die Präsenz von dsRNA. Unter den doppelsträngigen Nukleinsäuren induziert nur poly I:C undefinierter Länge eine über Mda5-vermittelte Typ I IFN Antwort.^{6,10,70,105} RIG-I und Mda5 werden über A20 oder die RNA Helicase LGP2 negativ reguliert. Während A20 an RIG-I bindet und die Signalweiterleitung zur Aktivierung von IRF-3 und NF- κ B inhibiert, bindet LGP2 dsRNA, RNA und andere PAMPs. LGP2 ist strukturell mit RIG-I und Mda5 verwandt, besitzt jedoch keine CARD-

ähnlichen Domänen. Es ist anzunehmen, dass trotz seiner Fähigkeit PAMPs zu binden, LGP2 aufgrund dessen keine aktivierende Funktion besitzt.^{6,10,95,105} Auch andere im Zytosol lokalisierte dsRNA-bindenden Proteine, wie die Proteine Kinase R (PKR) oder die 2',5'-Oligoadenylat Synthetase tragen zur Bildung eines antiviralen Status bei.³⁷ PKR ist eine Serin/Threonin Kinase, die über Autophosphorylierung nach der Bindung von dsRNA, die während einer viralen Replikation gebildet wird, aktiviert wird. Aktivierte PKR phosphoryliert und inaktiviert wiederum den Translationsinitiationsfaktor eIF2 α . Dies führt zur Inhibition der viralen und zellulären Proteinsynthese.¹²⁹ Zusätzlich aktiviert PKR NF- κ B sowie MAP-Kinasen, wodurch antiviral wirkendes Typ I IFN induziert wird. PKR inhibiert durch die Induktion von Apoptose in infizierten Zellen die Ausbreitung viraler Erreger.⁷ Typ I IFN Antworten können nicht nur in Abhängigkeit von der Anwesenheit von RNA über TLR-unabhängige Mechanismen erfolgen. Auch DNA kann über intrazellulär exprimierte Sensoren detektiert werden und so eine Typ I IFN Produktion induzieren.¹³⁰⁻¹³³ Während RIG-I- und Mda5-vermittelte IFN-Antworten über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der MAP-Kinasen erfolgen, geschieht hier die Induktion von IFN-I in Abhängigkeit von IRF3.¹³³ Es konnte gezeigt werden, dass die Insertion von B-helikalen Formen von dsDNA in das Zytoplasma ebenfalls zur IFN Antwort führen kann.^{70,130-133} Die zytosolische dsDNA Detektion erfolgt, vergleichbar mit der Detektion von RNA, über die Aktivierung von TBK-1 und IKK ϵ ^{70,130,131,133}, ist jedoch unabhängig von der Aktivierung von IPS-1.^{70,134} Ein möglicher Kandidat für die zytosolische DNA Erkennung ist das zDNA-bindende Proteine 1, auch als *DNA dependent activator of IRFs* (DAI) bezeichnet. Eine mögliche Rolle wurde DAI zugeschrieben, da Wang *et al.* 2008 zeigen konnte, dass über Inhibition von DAI die DNA-induzierte Transkription von IFN- β reduziert wird.^{70,135,136} *Stimulator of interferon genes* (STING) wurde als weiterer Kandidat für die Detektion zytosolischer DNA postuliert. STING besteht aus fünf Transmembranregionen und ist überwiegend im ER lokalisiert. Es wurde beschrieben, dass als Antwort auf IFN-stimulierende DNA (ISD) STING NF- κ B und IRF3 aktiviert und so die Expression von IFN- α/β induziert.¹³⁷ Interessanterweise kann STING mit RIG-I interagieren und hat so vermutlich Einfluss auf die RIG-I-vermittelte IFN-Induktion.¹³⁷ AIM2 ist dazu in der Lage, dsDNA zu binden und die Produktion von IL-1 β , jedoch nicht die Produktion von Typ I IFN zu induzieren.¹³⁸⁻¹⁴¹ Ein erst kürzlich identifizierter Mechanismus der Detektion zytosolischer DNA wird über RNA Polymerase III vermittelt, welche mikrobielle DNA in dsRNA mit 5'-

Triphosphat transkribiert und so über die Aktivierung von RIG-I die Produktion von Typ I IFN induziert. Es wird vermutet, dass dies z.B. bei Epstein Barr Virus (EBV)- oder HSV-Infektionen einen relevanter Mechanismus darstellen könnte.^{142,143}

2.5. Virale Mechanismen zur Unterwanderung des Immunsystems

Viele Viren haben Strategien entwickelt, um den Kontrollmechanismen des Immunsystems zu unterwandern. Diese werden als so genannte *immune evasion strategies* bezeichnet.^{10,144-146}

Es wurden des Weiteren eine Vielzahl viraler Strategien identifiziert, die gezielt Typ I IFN Antworten inhibieren. Viren können beispielsweise die Synthese von IFN- α/β unterbinden, sekretierte IFN Moleküle inaktivieren, mit dem IFNAR interagieren aber auch die Aktivierung IFN-induzierter Effektormoleküle inhibieren.^{70,147,148} Viren bilden zudem Homologe zu zellulären Genen und kodieren für Proteine, die mit zellulären Komponenten konkurrieren, um die Signalweiterleitung einer Immunantwort zu unterbinden.¹⁴⁴ Insbesondere das Genom DNA-kodierter Viren, wie Herpesviren oder Pockenviren, enthält eine Vielzahl von Genen, die dazu dienen, eine so genannte Immunflucht zu betreiben. Diese Gene stellen mehr als 50 % des Gesamtgenoms dar.¹⁴⁴ Vaccinia Virus (VACV), Influenza A und B, Thogoto virus oder HSV-I kodieren beispielsweise für Proteine, die mit der Induktion oder Weiterleitung von Typ I IFN interagieren. Andere Viren wie z.B. *human immunodeficiency virus* (HIV) oder EBV interagieren mit IFN-induzierten Effektormolekülen.^{144,147} Betrachtet man die Rolle der TLRs bei der Viruserkennung, so liegt es nahe, dass Viren Strategien entwickelt haben, um gezielt Komponenten der TLR-abhängigen IFN-Induktion zu inhibieren. Insbesondere TIR-Domänen-enthaltende Adaptoren sind Zielgene von diversen Viren. VACV exprimiert die TIR-Domän-enthaltenden Proteine A46R und A52R, welche spezifisch MyD88 und TRIF binden und so die TLR- oder IL-1R-induzierte NF- κ B Aktivierung inhibieren.^{149,150} Des Weiteren kodiert VACV für N1L, welches IKKs and TBK1 inhibiert.¹⁵¹ dsRNA gilt, wie bereits beschrieben, als potenter Induktor für eine Immunantwort. Daher exprimieren viele RNA- und DNA-kodierte Viren Proteine, die dsRNA binden und so die Bildung von IFN und die daraus resultierende Aktivierung antiviral-wirkender Enzyme inhibieren. Derartige virale dsRNA-bindende Proteine sind z.B. NS1 des Influenza A Virus, VACV-kodiertes E3L, VP35 des Ebola Virus oder das HSV-kodierte US11 Protein.¹⁴⁸

Pockenviren besitzen eine Vielzahl an offenen Leserahmen (*open reading frame*; ORF), die einer Immunantwort entgegenwirken.^{144,152} Die meisten dieser Proteine wirken auf das angeborene Immunsystem, da dies die erste Abwehr bei dem Eintritt eines Pathogens darstellt. Viele dieser Proteine weisen Sequenzähnlichkeiten mit Komponenten des Immunsystems auf, weshalb vermutet wird, dass Pockenviren Wirtsgene „gestohlen“ und modifiziert haben, um eine Immunantwort zu inhibieren.^{144,152} Obwohl viele Viren Strategien besitzen, um einer Immunantwort zu entgehen, existiert kein vergleichbares Repertoire zu dem der Pockenviren. Ein möglicher Grund hierfür ist der Replikationszyklus der Pockenviren, der zytosolisch erfolgt und so in Anwesenheit eines aktiven Immunsystems stattfindet. Daher wird vermutet, dass Pockenviren mehr Immunmodulatoren als andere Viren benötigen, um das Immunsystem des Wirtes zu modulieren.^{144,152}

2.6. Das Vaccinia Virus (VACV) und das Modifizierte Vaccinia Virus Ankara (MVA)

Pockenviren sind komplexe Viren mit einem 130-300 kb großen dsDNA-kodierten Genom, in dem über 200 offene Leserahmen kodiert sind.¹⁵³⁻¹⁵⁵ Die virale Replikation sowie die Bildung neuer Viruspartikel erfolgt im Zytoplasma und führt zur Lyse der infizierten Wirtszelle.¹⁵³ VACV und MVA sind Mitglieder der Familie der *Poxviridae* und des Genus Orthopoxviren.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

Die Infektion von Zellen durch VACV erfolgt über rezeptorvermittelte Endozytose, über endosomale Fusion oder über direkte Verschmelzung der viralen Membran mit der Zellmembran des Wirtes. Hierfür muss das Genom für die Proteinsynthese und anschließende Replikation entpackt werden (*uncoating*).^{95,159} Nach dem Viruseintritt werden über Virus-assoziierte Enzyme als frühe Gene transkribiert und so eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und Virulenzfaktoren, die für die Nukleotid Biosynthese und DNA Replikation notwendig sind, synthetisiert. Die Replikation der DNA beginnt etwa zwei Stunden nach Infektion und ist für die Expression intermediärer und später Gene erforderlich. Intermediäre Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die für die Transkription später Gene benötigt werden, während späte virale Gene für Strukturproteine, Enzyme und frühe Transkriptionsfaktoren der neu gebildeten Viruspartikel kodieren.¹⁶⁰ Die virale DNA wird in immature Virionen (*immature virions*; IV) aufgenommen, die zu infektiösen, intrazellulären, maturen Virionen (*intracellular mature virions*; IMV) reifen und schließlich zu intrazellulären

verpackten Virionen (*intracellular enveloped virions*; IEV) werden. An der Zelloberfläche fusionieren IEVs mit der Zellmembran und verlieren hierbei ihre äußere Membran. Hierbei bilden sich Zell-assoziierte verpackte Virionen (*cell-associated enveloped virions*; CEV), die direkt oder indirekt von der Zellmembran freigesetzt werden.^{29,161} Das mature Virion von VACV besteht aus einer äußeren Lipoproteinmembran, einem Lateralkörper und einem Kern, der das Genom sowie frühe Transkripte enthält.¹⁵⁹ Die Infektion von DC mit VACV erfolgt abortiv. So erfolgt nur frühe virale Genexpression, wohingegen keine DNA Replikation oder späte Genexpression stattfindet.^{29,162,163} Analysen hinsichtlich des Tropismus von VACV haben gezeigt, dass sowohl pDC als auch mDC bei einer VACV Infektion von Maus und Mensch infiziert werden.^{29,164}

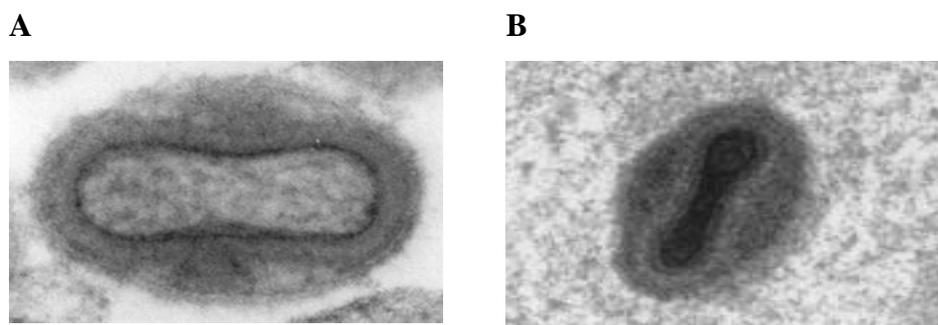


Abbildung 2.5: Elektronenmikroskopische Aufnahme des (A) Vaccinia Virus (VACV) und des (B) Modifizierten Vaccinia Virus Ankara (MVA). Quelle: <http://vacciniamodel.com>

Das 194 kb große Genom von VACV (Stamm *Western Reserve*) kodiert für ca. 200 ORF.¹⁵⁴ Im Zentrum des Genoms sind so genannten Haushaltsgene lokalisiert, die für Enzyme kodieren, die für Replikation und Transkription benötigt werden, während an den Genomenden nichtessentielle Gene kodiert sind, die für die Wirtsspezifität (*host range*) und Virulenz wichtig sind. Letztere sind Gene, die vor allem für diverse Immunmodulatoren kodieren.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷

VACV kodiert für zahlreiche Immunmodulatoren. Unter ihnen befinden sich so genannte Virokine, die Homologe zu zellulären Zytokinen darstellen und von infizierten Zellen sezerniert werden.¹⁶⁸ Analog hierzu können ebenfalls Antagonisten zu zellulären Rezeptoren, auch als Virozeptoren bezeichnet, exprimiert werden. Sie sind veränderte zelluläre Rezeptoren, die mit zellulären Rezeptoren konkurrieren und deren Liganden binden. So werden beispielsweise virale Rezeptoren für IFN- α/β , IFN- γ , TNF- α und IL-1 β von VACV exprimiert.^{144,156,157,169}

Der lösliche Rezeptor für IFN- α/β wird durch das Gen B18R in VACV (Stamm *Western Reserve*) kodiert.^{144,156,157} Das von B18R kodierte Protein B18 wird in VACV infizierten Zellen in zwei Isoformen exprimiert, die eine Größe von 52 kDa und 60-65 kDa aufweisen, und von infizierten Zellen sekretiert werden.^{144,156,157,170,171} B18 ist ein Glykoprotein der Immunglobulin Superfamilie und weist Homologien zum zellulären IFNAR auf.^{167,171,172} Während der zelluläre IFNAR jedoch nur mit dem C-Terminus von IFN interagieren kann, bindet B18 sowohl den N- als auch C-Terminus von IFN.¹⁷³ B18 kann löslich und auch an die Zelloberfläche gebunden vorliegen.^{171,172} Zellkulturüberstände VACV-infizierter Zellen enthalten B18, welches dazu in der Lage ist, antivirale Effekte von rekombinantem IFN zu inhibieren.^{144,152,167,171,172} Es wurde gezeigt, dass B18R früh während einer Infektion transkribiert und translatiert wird.^{170,174} Nach Sekretion bindet B18 an die Oberflächen infizierter und uninfizierter Zellen.^{144,171} Dort wird es in der Plasmamembran über N-terminale hydrophobe Sequenzen verankert.^{144,171,175} Alcami *et al.* beschrieben, dass an der Zelloberfläche gebundenes B18 dazu in der Lage ist, IFN zu binden.^{167,171} Im Überstand vorhandenes B18 stellt somit wahrscheinlich überschüssiges Protein dar, welches nicht an die Oberfläche gebunden hat.¹⁷¹ Hinsichtlich der Spezifität von B18 konnte Symons *et al.* zeigen, dass B18 hohe Affinität zu humanem und Kaninchen Typ I IFN aufweist, wohingegen Rinder- und Ratten IFN- α nur geringe Bindungsaffinitäten aufwies. In der Maus bindet B18 nur IFN- α , jedoch nicht IFN- β .¹⁶⁷

VACV exprimiert Antagonisten zu Komponenten, die wichtig für die Induktion von Typ I IFN sind. So werden z.B. Immunmodulatoren exprimiert, die antagonistisch auf das TLR System wirken. A46R kodiert für eine TIR Domäne über die A46 mit TLR-Adaptormolekülen interagieren kann. Das VACV-kodierte Protein A52 wurde ebenfalls als intrazellulärer Inhibitor des TLR Signalweges beschrieben und inhibiert die Aktivierung von NF- κ B.^{151,176} Für N1L ist beschrieben, dass es die Aktivierung von NF- κ B und IRF3 inhibiert. N1L wird überwiegend intrazellulär exprimiert und liegt als nicht-kovalentes Homodimer vor. Es konnte in intradermalen und intranasalen Infektionsmodellen gezeigt werden, dass über N1L die Virulenz von VACV gesteigert wird. Tiere, die mit N1L-defizienten VACV infiziert wurden, zeigten eine deutlich gesteigerte Überlebensrate sowie geringe Krankheitsanzeichen.^{150,165} K1L ist essentiell für eine produktive Infektion von VACV, beispielsweise in RK13 Zellen.¹⁷⁷ Wiederum andere Immunmodulatoren stellen Antagonisten für Komponenten intrazellulärer Signalwege dar, die Apoptose induzieren.¹⁷⁸ Engelmayer *et al.* beschrieben Mechanismen,

über die VACV die Maturierung von DCs inhibiert.¹⁶³ So konnte gezeigt werden, dass VACV die Maturierung CD8⁺ DC aus der Milz über die Inhibition der Expression von CD86 unterbindet.¹⁷⁹

VACV ist das am besten charakterisierte Mitglied der Familie der Pockenviren und wurde bis zur erfolgreichen Eliminierung der Humanpocken, welche über Infektion mit dem Orthopoxvirus Variola ausgelöst wird, als Lebendvakzin eingesetzt.^{158,180} Es induziert humorale und zelluläre Immunantworten und die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses. Aufgrund auftretender „Impfzwischenfälle“ war der Einsatz alternativer Vakzinstämmen wie MVA kurz vor der Ausrottung der Pocken von großem Interesse. Etwa 120.000 Individuen wurden in Deutschland und in der Türkei mit MVA immunisiert, wobei keine Nebeneffekte, selbst nicht in Hochrisikopatienten, beobachtet wurden.^{29,181}

MVA stellt ein hoch attenuiertes Virus dar und wurde aus dem Chorioallantois Vaccinia Virus Ankara (CVA) über Passagierung auf Hühnerembryo-fibroblasten generiert.¹⁸²⁻¹⁸⁵ Über diesen Prozess erfolgten sechs große sowie zahlreichen kleinere Deletionen, die eine Vielzahl an Haushaltsgenen sowie immunmodulatorisch-wirkende Gene beinhalteten. Zudem ist eine Vielzahl an Punktmutationen im Genom aufgetreten, die zu Aminosäureaustausch oder verkürzten Proteinen führen, und somit Einfluss auf die Funktionalität des jeweiligen Proteins ausüben können. Das Genom von MVA besteht, im Gegensatz zu dem 208 kb großen Genom des parentalen CVA, nur aus 177 kb. Somit wurden etwa 31 kb deletiert, was in etwa 15 % des parentalen Genoms entspricht.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ MVA ist in den meisten Säugerzellen replikationsdefizient und stagniert in einer späten Phase des viralen Replikationszyklus, so dass keine Bildung neuer Viruspartikel stattfindet.^{29,184,189-193} Es konnte jedoch gezeigt werden, dass MVA eine sehr hohe Immunogenität besitzt.²⁹ MVA exprimiert keine IFN-Antagonisten wie den löslichen VACV-kodierten IFN Rezeptor B18^{187,192,194} und induziert, im Gegensatz zu VACV^{158,178,195} *in vivo* und bei der Infektion von DC die Sekretion hoher Mengen an Typ I IFN.¹⁹¹ Analysen MVA-infizierter humaner DC zeigten zudem die Aktivierung der Zellen über die verstärkte Expression co-stimulatorischer Moleküle.¹⁹⁰ Attenuierte Viren, die ihre Fähigkeit verloren haben, die Synthese von IFN zu inhibieren, zeigen wiederum reduzierte Pathogenität und werden in zahlreichen experimentellen Modellsystemen für Vakzinierungsstudien eingesetzt.⁷⁰ Ausgehend von der hohen Immunogenität und Sicherheit von MVA, wird MVA als potentieller Vakzinvektor für die

Immunisierung gegen HIV, Malaria, Tuberkulose und für die Immuntherapie gegen eine Reihe von malignen Erkrankungen erprobt.^{29,158}

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien und Lösungen

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
2-log DNA-Ladder	New England Biolabs	N3200S
Aceton	Merck	1000132500
Agarose	Invitrogen	15510-027
Agarplatten	Lösungsmittellabor, PEI	
Ampicillin	Merck KG	
Aqua dest.	Lösungsmittellabor, PEI	
Biocoll (human Ficoll)	Biochrom AG	L6115
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich	NA7030100G
Bromphenolblau	Bio-Rad	1610404
Buffy Coat	“Blutspendedienst Frankfurt”	
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Lösungsmittellabor, PEI	
CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec	130-091-097
CFSE	Molecular Probes	C34554
Chloroform	Merck	1.02431.1000
Chloroquin	Sigma	C6628
Collagenase D (10 ng/ml)	Roche	11088866001
Complete	Roche	04693159001
Coomassie Brilliant Blue	Biorad	161-04000
Cytosin-Arabinofuranosid (AraC)	Sigma	C6645
DC-Medium, serumfrei (human)	CellGro	2005
Desderman	Schülkes und Mayr	
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Sigma	114K2370
Dithiothreitol (DTT)	Sigma	43815
DMEM	Biochrom AG	F0445
DNase I, RNasefree 10 U /µl	Roche	776785

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
Dulbeccos MEM, <i>high glucose</i>	Invitrogen	10938
Earl's MEM	Lösungsmittellabor, PEI	
Ethanol p.A.	Merck KGaA	1.00983.5000
Ethidiumbromid	Merck KGaA	1.11608.0010
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 0,5 M pH 8	Merck KG	324504
FACS <i>Clean</i>	Becton Dickinson	34-0345
FACS <i>Flow</i>	Becton Dickinson	34-2003
FACS <i>Rinse</i>	Becton Dickinson	34-0346
<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS)	Biochrom AG	S-0615
Ficoll	Biochrom	L6715
Formaldehyd 37 %	Merck KGaA	1.04000.0250
Fugene <i>Transfection Reagent</i>	Roche	1815091
GeneRuler 1 kb Plus DNA <i>Ladder</i>	Fermentas	SM1333
Glutamax (L-Glutamin)	Gibco	35050-038
Glycerin	Sigma	G-5516
Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure (HEPES)	Lösungsmittellabor, PEI	
H ₂ O	Sigma	W3500
H ₂ O ₂	Merck	1.072.09.0250
Isofluran Baxter	Baxter	HGG9623
Isopropanol p.A.	Merck KG	1.09634.5000
Kaliumchlorid (KCl)	Lösungsmittellabor, PEI	
Kaliumhydroxid (KOH)	Lösungsmittellabor, PEI	
Kanamycin	Lösungsmittellabor, PEI	
LB-Medium	Lösungsmittellabor, PEI	
L-Glutamin	Biochrom AG	K0282
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Qiagen	
Maus Serum	Sigma Aldrich	S3509
Mercaptoethanol	Sigma	M-3148
Methanol	Merck	1.06009.2511
Natriumazid (NaN ₃)	Merck KG	6688.0100

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Sigma	S5761
Natriumchlorid (NaCl)	Merck	1.06404.5000
Natriumhydrogenoxid (NaOH)	Lösungsmittellabor, PEI	
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA	106566
Natriumpyruvat	ICN	1682049
Natriumorthovanadat	Sigma	S6508
<i>Non-essential aminoacids</i> (Nea)	Biochrom AG	K0293
NP-40	Sigma	NP40
Oligo dT <i>Primer</i>	Invitrogen	18418-012
PageRuler Plus Protein <i>Ladder</i>	Fermentas	SM1811
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KG	1.04005.1000
<i>Phosphate-Buffered-Saline</i> (PBS)	Biochrom AG	L1825
PBS Dulbeccos	Invitrogen	14190
Pefabloc (100 mg)	Roche	11873601001
Penicillin/Streptomycin (PS)-Lösung	Lösungsmittellabor, PEI	
Polyethylenglykol (PEG)	Serva Fulka	33193 81260
Polyglobin 10 %	Bayer Vital	Bayer-37646
Ponceau-Lösung	Sigma	P-7170
Propidiumiodid (PI)	Sigma	P-4170
Proteinase K (20 µg/ml)	Roche	03115828001
<i>Rat Serum</i>	Sigma Aldrich	S7648
<i>Red Blood Cell Lysing Buffer</i>	Sigma	R7757
Reinstwasser autoklaviert	Lösungsmittellabor, PEI	
RPMI 1640	Biochrom AG	F1215
RPMI 1640	Gibco	31870-025
Saponin	Merck KgaA	558255-100GM
Salzsäure (HCl)	Lösungsmittellabor, PEI	
Streptavidin-PE	BectonDickinson GmbH	349023
Sucrose	Sigma	57-50-1
Superscript II RNase H	Invitrogen	18064-014
TBE-Puffer	Lösungsmittellabor, PEI	
Terralin Liquid	Schülkes und Mayr	

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
Tris	Lösungsmittellabor, PEI	
Trypanblau 0,4 %	Gibco	15250-061
Trypsin-EDTA	Lösungsmittellabor, PEI	
Tween 20	Merck	109280

3.1.2. Medien und Puffer

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
DNA-Probenpuffer 5x	0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerin
FACS-Puffer	2 % BSA in PBS 20 mM EDTA pH 8 0,03 % Natriumazid
Fc-Block	FACS Puffer 1 % anti CD16/CD32
Fixierlösung	FACS Puffer 1 % PFA
HEPES-Buffered-Saline (HBS)-Puffer 2x	281 mM NaCl 100 mM HEPES 1,5 mM Na ₂ HPO ₄
Ladepuffer (6-fach)	0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerin <i>Aqua dest.</i>
1 kb <i>Ladder</i> -Standard	30 µl 1kb Ladder (New England Biolabs) 60 µl Ladepuffer 195 ml <i>Aqua dest.</i>
Lyse-Puffer	10 mM KCl, pH 7,4 20 mM HEPES 0,2 % NP-40 0,1 mM EDTA 10 % Glycerol 0,1 mM Natriumorthovanadat 2 mM DTT

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
	1 Tablette Complete
MACS-Puffer	1 % BSA in PBS 2 mM EDTA
PBS	10 mM NaCl 80 mM Na ₂ HPO ₂ 20 mM KH ₂ PO ₄
Perm-Lösung	1 % FCS in FACS-Puffer 0,1 % Saponin
Preabsorbierende Antikörper Lösung	FACS Puffer 2 % FC-F(ab) ₂ -PE 2 % Mausserum 2 % Rattenserum
Proteaseinhibitor-Mix	0,1 M Phenylmethylsulfonylfluorid 250 mM Benzamidin/EtOH
SDS-Laufpuffer 10x	250 mM Tris Base 2 M Glycin 0,035 % SDS
SDS-PAGE-Probenpuffer 6x	50 % Glycerin in 1x TAE-Puffer 0,2 % SDS 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylencyanol
Substrat (Titration Vaccinia Virus)	4 Spatelspitzen Dianisidin ca. 13 ml Ethanol p.A. →vortexen→2000 rpm. 1min →Überstand steril fixieren → 4,5 ml Überstand in 150 ml PBS + 0,1 % H ₂ O ₂
Transferpuffer	48 mM Tris Base, pH 9,2 39 mM Glycin 20 % Methanol 0,04 % SDS
Tris-Puffer	1 M Tris Base/HCl, pH 6,8/8,5/8,8
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer 10x	400 mM Tris Base, pH 8,3 200 mM Essigsäure

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
	20 mM EDTA
Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer 10x	890 mM Tris Base, pH 8,0 890 mM Borsäure 25 mM EDTA
Tris-Buffered-Saline (TBS)-Puffer 10x	100 mM Tris Base, pH 7,6 1,5 M NaCl
TBE (10x)	890 mM Tris Base 890 mM Boracid 25 mM EDTA pH 8
TBS-T-Puffer	0,1 % Tween20 in 1x TBS-Puffer
Tryphanblau Lösung	PBS 0,4 % Tryphanblau

Medium	Zusammensetzung
CEF-Medium	Earl's MEM 10 % FCS 1 % Glutamax 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % <i>Non essential aminoacids</i>
DC-Medium (Maus)	RPMI 1640 10 % FCS 1 mM Natriumpyruvat 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % Glutamin 1 % HEPES 0,1 mM β -Mercaptoethanol
Titrationmedium	Earl's MEM 5 % FCS 1 % Glutamax 1 % Penicillin/Streptomycin
Transfektionsmedium	Dulbeccos MEM 2 % Glutamax

Medium	Zusammensetzung
Vollmedium für BHK, HEK 293T und HT1080 Zellen	DMEM 1 % Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin 10 % FCS deaktiviert

3.1.3. Antikörper

Epitop	Konjugat	Hersteller	Bestellnummer
Actin (murin, human)	-	Chemicon	MAB1501
B220 (murin)	FITC	Caltag	# RM2601-3
	PE	BD Pharmingen	# 553089
	PE-Cy5.5	Caltag	RM2618
	APC	BD Pharmingen	553092
CD11b (murin)	Pacific blue	Caltag	# RM2828
CD11c (murin)	APC	BD Pharmingen	# 550261
CD14 (human)	PacBlue	BD Pharmingen	558121
CD16/CD32 (murin)	-	BD Pharmingen	# 553142
CD19 (murin)	FITC	Southern Biotech	# 1575-02S
	PE	NatuTec, Frankfurt	# CTS11439PE
CD19 (human)	PE	BD Pharmingen	555413
CD3 (murin)	FITC	Caltag	# HM3401-3
	AlexaFluor 647	Caltag	# HM3421
	PE	Caltag	# RM 3404-3
CD3 (human)	APC	BD Pharmingen	555335
CD4 (murin)	FITC	NatuTec	# CTS11107F
	PE	BD Pharmingen	# 553562
	APC-AF750	Caltag	# MCD0427
CD44 (murin)	APC	BD Pharmingen	# 55x9350
	PE	BD Pharmingen	# 553134
CD62L (murin)	PE	Caltag	# RM4304

Epitop	Konjugat	Hersteller	Bestellnummer
CD69 (murin)	PE	BD Pharmingen	# 553237
CD8 (murin)	FITC	Biozol	# 1550-02 S
	FITC	NatuTec	# CTS11362F
	PE	BD Pharmingen	# 553032
	PE-Cy5	Caltag	# MCD0806
CD86 (murin)	FITC	BD Pharmingen	553691
F4/80 (murin)	PE	Serotec	# MCA497PE
GFP (murin)		Cell Signaling	2955
IFNAR1 (murin)	Biotin	Bob Schreiber,	
IFNAR1 (murin)	Biotin	R&D Systems	# BAF3039
IL-10 (murin)	FITC	eBioscience	11-7101
	PE	BD Pharmingen	554467
MOMA1 (murin)	FITC	Serotec	# MCA947F
MOMA2 (murin)	FITC	Serotec	# MCA519F
PDCA-1 (murin)	PE	Miltenyi Biotec	130-091-957
<i>rat</i> anti HA	-	Roche	11-867-423-001
pSTAT1	-	Cell Signaling	# 9167S
pIRF3	-	Cell Signaling	# 4947 S
IRF3	-	Zymed	51-3200
Ik-B α	-	Cell Signaling	#9246 S
ViG	-	OMRIX Israel	

Sekundäre Antikörper	Hersteller	Bestellnummer
Fc-F(ab) ₂ -PE	Jackson Immuno Research	800-367-5296
<i>Donkey</i> α - <i>rat</i> PE	Dianova	712-116-153
<i>Goat</i> α - <i>rabbit</i> HRP	Dianova	111-035-003
<i>Goat</i> anti <i>rat</i> IgG HRP	Cell Signaling	7077
Anti human PO IgG	Dianova	109-035-088
<i>Rabbit</i> α - <i>mouse</i> HRP	Zymed Lab	61-6020
<i>Rabbit</i> anti <i>mouse</i> IgG HRP	Zymed Lab	61-6420

Sekundäre Antikörper	Hersteller	Bestellnummer
<i>Rat α</i> -HA High Affinity	Roche	558121

Alle Fluorochrom-konjugierten Antikörper wurden bei 4°C gelagert und vor Licht geschützt.

3.1.4. Kits

ELISA Kit	Hersteller	Bestellnummer
<i>Mouse IFN-α</i> ELISA Kit	PBL Biomedical Laboratories	# 42100-1
<i>Mouse IFN-β</i> ELISA Kit	PBL Biomedical Laboratories	# 42400-1
<i>Mouse IL-6</i> Immunoassay	R&D Systems Europe	#M6000B
<i>Mouse IL-10</i> Immunoassay	R&D Systems Europe	# M1000
<i>Mouse IL-12p40</i> Immunoassay	R&D Systems Europe	#M1270
<i>Mouse IL-12p70</i> Immunoassay	R&D Systems Europe	#MP400
<i>Mouse TNF-α</i> Immunoassay	R&D Systems Europe	# MTA00

Microbead Kit	Hersteller	Bestellnummer
B220 <i>microbeads mouse</i>	Miltenyi	#130-049-501
CD11c <i>microbeads mouse</i>	Miltenyi	#130-052-001
CD11b <i>microbeads mouse</i>	Miltenyi	# 130-049-601
CD14 <i>microbeads human</i>	Miltenyi	#130-050-201
CD304 <i>microbead kit human</i>	Miltenyi	#130-090-532
PDCA1 <i>microbeads mouse</i>	Miltenyi	#130-091-965
<i>Plasmacytoid dendritic cell isolation kit mouse</i>	Miltenyi	#130-091-263
<i>Plasmacytoid dendritic cell isolation kit human</i>	Miltenyi	#130-092-207
<i>B cell isolation kit</i>	Miltenyi	#130-090-862
<i>Pan T cell isolation kit</i>	Miltenyi	#130-090-861

Sonstige Kits	Hersteller	Bestellnummer
PureYield Maxiprep Kit	Promega	A2393
QIAfilter Plasmid Purification Maxi Kit	Qiagen	12263

Sonstige Kits	Hersteller	Bestellnummer
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	27106
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	28706
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	28106
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen	K4500-001

Alle ELISA kits und *Microbead* kits für MACS wurden bei 4°C gelagert. ELISAs wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und die Reagenzien sowie *Microbeads* auf Eis gehalten.

3.1.5. Zytokine

Zytokin	Hersteller	Bestellnummer
Human GM-CSF	CellGenix	1412
Human IL-4	CellGenix	1403
Maus rm GM-CSF	R&D Systems	415-ML
Maus rm Flt3-L	R&D Systems	427-FL
Rekombinantes IFN- α	HyCult	HC1040a

Alle Zytokine wurden bei -20°C aufbewahrt und auf Eis aufgetaut.

3.1.6. Enzyme

Enzym	Hersteller	Bestellnummer
<i>AgeI</i>	New England Biolabs	R0552S
<i>BamHI</i>	New England Biolabs	R0136S
<i>BglII</i>	New England Biolabs	R0144S
<i>Clal</i>	New England Biolabs	R0197S
<i>DNAse I rec. RNAse free</i>	Roche	04 716 728 001
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs	R0101S
<i>EcoRV</i>	New England Biolabs	R0195L
<i>HindIII</i>	New England Biolabs	R0104S
<i>Hot Star Taq DNA Polymerase</i>	Qiagen	203205
<i>Klenow-Fragment</i>	New England Biolabs	M0212S
<i>KpnI</i>	New England Biolabs	R0142S
<i>Mun I fast digest</i>	Fermentas	FD0753
<i>NcoI</i>	New England Biolabs	R0193S

Enzym	Hersteller	Bestellnummer
<i>NheI</i>	New England Biolabs	R0131S
<i>NotI</i>	New England Biolabs	R0189S
<i>Phusion DNA Polymerase</i>	Finnzymes	F-530
<i>PNGaseF</i>	New England Biolabs	P0704S
<i>PvuI</i>	New England Biolabs	R0150S
<i>Sac I-HF</i>	New England Biolabs	R3156s
<i>Sac II</i>	New England Biolabs	R0157S
<i>Sal I fast digest</i>	Fermentas	FD0644
<i>ScaI</i>	New England Biolabs	R0122S
<i>SuperScript III</i>	Invitrogen	18080-044
<i>T4 DNA Ligase</i>	New England Biolabs	M0202S
<i>Xba I</i>	New England Biolabs	R0145S
<i>XhoI</i>	New England Biolabs	R0146S

Alle Enzyme wurden mit den mitgelieferten Puffern verwendet.

3.1.7. Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Bezugsquelle
Baby Hamster Kidney (BHK)	PEI, Abteilung Immunologie	
Chicken Embryo Fibroblasten (CEF)	PEI, Abteilung Virologie	
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen	PEI, Abteilung 6; Medizinische Biotechnologie
HT1080	Humane Fibrosarkomzellen	PEI, Abteilung 6; Medizinische Biotechnologie

Die Zellen wurden in DMEM (10 % FCS, 1 % Glutamax (100 units/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin) kultiviert. Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5 % CO₂ and 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.1.8. Bakterien

Bakterien	Hersteller
TopF10	Invitrogen

GM2163	New England Biolabs
XL2-Blue	Stratagene
STBL2	Invitrogen
SURE	Stratagene

3.1.9. Plasmide

Plasmid	Bezeichnung
pcDNA3.1+	Eukaryotisches Expressionsplasmid (Invitrogen) ¹
pIRES2-EGFP	Eukaryotisches Expressionsplasmid (Clontech) ¹
pMD.2G	VSV-G Hüllvektor ²
pViFCGdBH	SIVmac Transfervektor (mit EGFP) ²
spg.d2	SIVmac Verpackungsvektor ²

¹ Diese Plasmide wurden von der Abteilung 6/2 des Paul-Ehrlich-Institutes, Arbeitsgruppe PD Dr. M. Schweizer, bereitgestellt.

² Diese Plasmide wurden in der Abteilung 3/0 des Paul-Ehrlich-Institutes, Arbeitsgruppe Prof. U. Kalinke, selbst hergestellt.

3.1.10. Viren und andere Stimuli

Virus	Bezugsquelle	Titer
VACV WR/NIH 10/91	Yasemin Süzer	7,6 x 10 ⁹ pfu/ml
C VA152 (152)	Holger Ludwig	2,1 x 10 ⁹ pfu/ml
CVA152 (152)	Astrid Schwantes	1,5 x 10 ⁹ pfu/ml
CVA386 (386)	Holger Ludwig	4,0 x 10 ⁹ pfu/ml
CVA386 (386)	Astrid Schwantes	5 x 10 ⁹ pfu/ml
Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA)/F6	Holger Ludwig	4,5 x 10 ⁹ pfu/ml
MVA F6 584 P	Astrid Schwantes	1,8 x 10 ¹⁰ pfu/ml
MVA F6 584 P	Astrid Schwantes	2,3 x 10 ⁹ pfu/ml
VSV-M2	Claudia Detje	7,8 x 10 ⁸ pfu /ml

Stimulus	Bezugsquelle	Bestellnummer
Poly I:C	Sigma	P0913
rB18	Antonio Alcami	

CpG 1668	TIB Molbiol Berlin	759381
CpG 2216	Sigma	R-1309-007

3.1.11. Oligonukleotide

Bezeichnung	Hersteller und Bestellnummer
Oligo (dt) Nukleotid	Invitrogen # 18418-012
Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
BIP fwd	GGTGGCTTTCCAGCCTTC
BIP rev	TACTTGGTATTGAAACTG
pIRES MCS fwd (Mun I + CMV-Beginn)	CTATGACAATTGTAGTTATTAATAGTAATC AATTACGG
pIRES MCS rev (HA + MCS-Ende)	AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGGA TCCCGGGCCCGCGC
pIRES GFP fwd (HA + Stop + EcoRV + IRES-Beginn)	TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTAGG ATATCGCCCCTCTCCCTCCCC
pIRES GFP rev (Bgl II + EcoRV + GFP-Ende)	CTATGAAGATCTGATATCTTACTTGTACAGC TCGTCCATG
fwd Primer pVif_IRES (Sequenzierung)	TCAATGGGTGGAGTATTTACGG
rev Primer p Vif_IRES (Sequenzierung)	TGGCACTGGGGTTGTGCCG
SacI-VACV A4L begin (62°C)	<i>GAGCTGAGCTC</i> - ATG GAC TTC TTT AAC AAG TTC TC
SacII- XX –VACV A4L end (58°C)	<i>GAGCTC</i> CCGCGG <i>CT</i> CTT TTG GAA TCG TTC AAA ACC
SalI-VACV F11L begin (62°C)	<i>GAGCTGTCGACATG</i> GGG TTT TGC ATT CCA TCG
BamHI-VACV F11L end (58°C)	<i>GAGCTGGATCCCAAACGAAAGTCCAGGTTT</i> G
SacI-VACV C23L begin (60°C):	<i>GAGCTGAGCTC</i> ATG CAT GTG CCT GCC AGT C
BamHI-VACV C23L end (58°C)	<i>GAGCTGGATCC</i> GAC ACA CGC TTT GAG TTT TG
SacI-VACV F5L begin (62°C)	<i>GAGCTGAGCTC</i> ATG GGT ACG AAC GGC GTT AG

BamHI-VACV F5L end (64°C)	GAGCTGGATCC GTT ATC TAT ATG CCT GTA CTT GG
SacI-VACV B18R begin (60°C)	GAGCTGAGCTC ATG ACG ATG AAA ATG ATG GTA C
BamHI-VACV B18R end (60°C)	GAGCTGGATCC CTCCAATACTACTGTAGTTGTAAG
VACV I3L incl promoterregion (fwd)	TAAGCTTTCAATGCACGGGC
VACV I3L incl promoterregion (rev)	GATCGTACGCCAGTAACGG
VACV B14R incl promoterregion (fwd)	ATCAGTCTTCGAAGCATGCG
VACV B14R incl promoterregion (rev)	TGGGTACTAAAGTTGGCCG
VACV A57R incl promoterregion (fwd)	TCGAAATCGCGACTCCGG
VACV A57R incl promoterregion (rev)	TATTAATGGTCCAACGACCC
VACV F5L incl promoterregion (fwd)	TTTAACGCCTCCCATTCCG
VACV F5L incl promoterregion (rev)	ATGGATTAGTTTAATATGACGC
VACV F11L incl promoterregion (fwd)	GATTGTTGTATAGAAATTTGGG
VACV F11L incl promoterregion (rev)	TACTAACGACCATATTCCCG
VACV C23L incl promoterregion (fwd)	CATTTTTGTTTTGCAAACCGG
VACV C23L incl promoterregion (rev)	GCAGATAAATGCGAACCCG
VACV A4L incl promoterregion (fwd)	ATCGCTATTGACCACGGC
VACV A4L incl promoterregion (rev)	CTTTGTCAAATCGTTTACCG
GAPDH fwd	ACCACAGTCCATGCCATCAC
GAPDH rev	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

Alle *Primer* wurden von der Firma Sigma bezogen.

[T_m= *Annealing* Temperatur, rev= *reverse*, fw= *forward*]

3.1.12. Geräte

Gerät	Bezeichnung/Hersteller
Autoklav	KSG
AutoMACS	Miltenyi Biotec
Blottingapparatur	Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad
CO ₂ -Brutschränke	Cytoperm, Heraeus
Einfrierbox	Mr. Frosty, Nunc
Einkanalpipetten	Eppendorf AG
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200, Zeiss

Gerät	Bezeichnung/Hersteller
Gelkammer mit Zubehör	Sub-Cell GT, Bio-Rad
Heizblock	Eppendorf Ag
Kühlblock	Isosafe, Eppendorf AG
Kühlschränke	Liebherr
Kühlzentrifuge	Heraeus Sepatech
LSR II Flow Cytometer	Becton Dickinson
MACS-MultiStand	Miltenyi Biotec
Magnetrührer	Combimag Ret, Janke & Kunkel
Mehrkanalpipetten	Socorex
Mikroskope	Axiovert 25, AxioLab, Zeiss
Mikrowelle	AEG
Multipette	Eppendorf AG
Netzgerät	Bio-Rad
Optima L-70K Ultrazentrifuge mit SW28 und SW41 Rotor	Beckman Coulter
Optima Ultracentrifuge mit TLA 100.3 Rotor und Aufsatz 355919	Beckman Coulter
Pipettierhilfe	Pipetboy acu, Integra Biosciences
Schüttler (25 und 37°C)	Infors AG
SDS-PAGE Vorrichtung und Zubehör	Mini-PROTEAN System, Bio-Rad
Sterilbank	Steril Gard III Advance, The Baker Company
Thermocycler	Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad
Thermomixer	Eppendorf Ag
Tiefkühlschränke (-20 und -80°C)	New Brunswick Scientific
Tischzentrifuge	Zentrifuge 5415 C, Eppendorf Ag
UV/VIS-Spektrometer	SmartSpec 3000, Bio-Rad
Vakuumpumpe	Vacunsafe, IBS Integra Biosciences
Vortexer	VF2, Janke & Kunkel IKA-Labor Technik
Waagen	Sartorius LP820
Wasserbad	GFL
Wecker	neoLab 2-2002

3.1.13. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
6-well Zellkulturplatten	Sarstedt
24-well Zellkulturplatten	Sarstedt
96-well Zellkulturplatten	Sarstedt
AutoMACS Separation Column	Miltenyi Biotec
Bechergläser	Schott
Combitips	Eppendorf Ag
Deckgläschen	Menzel-Gläser
Douncer	Kleinfeld Labortechnik
Einfriergefäß	Cryotube, Nunc
Einmal-Injektionskanüle	Sterican, Braun
Einmal-OP-Mundschutz	Coldex
Einweghandschuhe	Manufix Sensitive, Braun
Einwegpipetten	Greiner
Erlenmeyerkolben	Schott
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson
Filterpapier	Whatman GmbH
Glasflaschen mit Schraubdeckel	Schott
Handstückzähler	Rettberg Laborgeräte
Objektträger	Labor Optik
Parafilm	American National Can
Pasteurpipetten	VWR
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen, gestopfte	Biozym Scientific GmbH
Plastik Probenröhrchen	Falcon, TPP
Plastikpipetten	Greiner
Reaktionsgefäße	Sarstedt
Schutzbrille	Purisafe, Roma
Spritzen	Henke-Sass-Wolf GmbH
Spritzenvorsatzfilter	Sartorius
Standzylinder	Schott
Stericup 0,45 µm	Millipore
Sterilfilter 0,2 µm	Millipore

Verbrauchsmaterial	Hersteller
T25-Zellkulturflaschen	Greiner, Nunc
T75-Zellkulturflaschen	Greiner, Nunc
T175-Zellkulturflaschen	Greiner, Nunc
Terralin-Liquid	Schülke & Mayr
Zählkammer	Labor Optik
Zentrifugenröhrchen	Falcon, TPP
Zentrifugentubes	Beckman

3.2. Methoden

3.2.1. Zellbiologische Methoden

3.2.1.1. Arbeiten mit Zellkulturen

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer sterilen Werkbank mit vertikaler Luftströmung durchgeführt. Die Arbeitsfläche und die benutzten Geräte wurden vor und nach dem Arbeiten mit Terralin Liquid desinfiziert. Es wurden neben Einwegverbrauchsmaterialien nur autoklavierte oder steril filtrierte Lösungen oder Medien verwendet. Vor dem Beginn der Arbeit wurden, sofern dies nicht anders beschrieben ist, alle Lösungen und Medien auf 37°C vorgewärmt.

3.2.1.2. Kulturbedingungen für eukaryontische Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten primären Zellen und Zelllinien und wurden bei 37°C mit 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert.

3.2.1.3. Auftauen von Zellen

Zellen sind für eine längere Lagerung in Medium mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -176°C eingefroren. Die Zellen werden beim Auftauen in ein geeignetes Volumen warmes Medium aufgenommen. Bevor sie jedoch in Kultur genommen werden können, muss das DMSO aus der Zellsuspension entfernt werden. Dies geschieht durch Zentrifugieren und mehrfaches Waschen der Zellen. Anschließend werden die Zellen in eine Zellkulturflasche überführt und im Falle der hier verwendeten Zellen bei 37°C mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

3.2.1.4. Passagieren von Zellen

Wenn die Zellen in der Zellkulturflasche eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht haben, sollten sie passagiert werden. Adhärente Zellen müssen hierfür mit Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst werden. Die Zellen wurden zunächst in PBS gewaschen. Dies dient dazu, Calciumionen, die sich im Medium befinden, zu entfernen, da diese bei Zugabe von Trypsin Komplexbildungen vollziehen, wodurch sich die Zellen nicht von der Zellkulturflasche lösen können. Nach dem Entfernen der Calciumionen wurden die Zellen mit ca. 5 ml Trypsin (0,5 %) abgelöst. Mit Medium wurde nun auf ein geeignetes Volumen

aufgefüllt und je nachdem in welchem Verhältnis passagiert wird, Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium überführt.

3.2.1.5. Einfrieren von Zellen

Die Zellen werden für die Lagerung im Stickstoff in Medium mit 10% DMSO eingefroren. DMSO diffundiert durch die Zellmembran und ersetzt das Wasser innerhalb der Zelle. So wird verhindert, dass sich Eiskristalle beim Einfriervorgang bilden können, welche die Zellstruktur zerstören würden. Zum Einfrieren wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in PBS gewaschen, danach wurden diese ggf. trypsinisiert, in Medium resuspendiert und anschließend für 3 min. bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in dem Einfriermedium resuspendiert und im entsprechenden Volumen eingefroren. Aus einer T175 Zellkulturflasche erhielt man bei einer Konfluenz von 80 % etwa drei Nunc Gefäße à 1 ml. Die Zellen werden in einer Einfrierbox, die ein langsames Absinken der Temperatur von 1°C/Stunde ermöglicht, auf -80°C gelagert und konnten nach einigen Tagen in den flüssigen Stickstoff überführt werden.

3.2.1.6. Lagerung von Zellen

Zellen können mehrere Jahre in einem speziellen Einfriermedium (siehe 3.2.1.5) in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert werden.

3.2.1.7. *In vitro* Differenzierung von mruinen myeloiden und plasmazytoiden dendritischen Zellen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks

Die Donormäuse wurden mittels Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Nach Desinfektion mit 70%igem Ethanol wurde ein Hautschnitt über dem Abdomen gesetzt und das Fell über die Hinterbeine abgezogen. Anschließend wurden die Beine vom Rumpf abgetrennt. Femur und Tibia wurden vom Fußgelenk beginnend von Muskel- und Bindegewebe frei präpariert und für 30 sec in 70%igem Ethanol sterilisiert. Daraufhin wurde das Kniegelenk durchtrennt, das restliche Gewebe entfernt und die Epiphysen der Knochen abgeschnitten. Jeder Knochen wurde mit einer mit 4-5 ml vorgewärmten DC-Medium gefüllten Spritze mit steriler Einmal-Injektionskanüle in eine Petrischale ausgespült. Das in Medium resuspendierte Knochenmark wurde in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt und bei 300 xg für 6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1,5 ml *RBC-Lysing* Puffer (pro Bein) resuspendiert und für 1 min inkubiert. Daraufhin wurden die

Zellen mit DC-Medium gewaschen und bei 300 xg 6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einem geeigneten Volumen DC-Medium resuspendiert und mittels einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Aus einer Maus ließen sich durchschnittlich 4×10^7 Knochenmarkszellen isolieren. Für die Differenzierung von Flt3-L pDCs bzw. GM-CSF mDC erfolgte eine Inkubation von 1×10^7 Knochenmarkszellen in 5 ml Medium mit 20 µg/ml Flt-3L bzw GM-CSF für 8 Tage bei 37°C, 4,8 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit. Je nach Zustand der Zellen wurde bei GM-CSF mDC das Medium alle 2-3 und bei Flt3-L pDC an Tag 4 gewechselt.

3.2.1.8. *In vitro* Stimulierung von murinen DC

Die Stimulierung der DCs erfolgte am achten Tag nach der Präparation. Hierfür wurden die Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in eine 24-*well* Platte mit 1 ml Zellsuspension pro *well* mit 1×10^6 pDCs ausgesät. Die DCs wurden mit unterschiedlichen viralen und synthetischen Stimuli stimuliert. Bei jeder Stimulation wurden unstimulierte Zellen als Negativkontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Ernte der Zellüberstände. Hierfür wurde vorsichtig mit einer 1 ml-Pipette am Rand der Plattenvertiefung das Medium abgenommen und in eine neue 24-*well* Platte übertragen. Die Überstände wurden bis zur Zytokin-Bestimmung bei -20°C gelagert.

3.2.1.9. Präparation einer Einzelzellsuspension der Milz

Die Donormäuse wurden mittels Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Nach Desinfektion mit 70%igem Ethanol wurde ein Hautschnitt entlang der linken Seite des Abdomens gesetzt. Beim Aufziehen des Fells wurde die Milz sichtbar, die durch wenige Schnitte frei präpariert werden konnte. Die weitere Präparation folgte auf Eis. In einer Petrischale mit DMEM 10 % FCS wurde die Milz mithilfe einer 100 µl Pipette an einer Seite leicht aufgerissen. Die Zellen der Milz konnten nun mit einer 5 ml Pipette heraus geklopft werden. Anschließend wurden die Milzzellen in Zentrifugen-Röhrchen übertragen und bei 300 xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Milzzellen in 5 ml *RBC-lysing* Puffer zur Lyse der Erythrozyten resuspendiert. Nach 2 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) wurden die Zellen bei 300 xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in einem geeigneten Volumen DMEM 10 % FCS resuspendiert, durch ein Zellnetz mit einer Maschengröße von 70 µm filtriert und gezählt.

3.2.1.10. Isolierung von mononuklearen Zellen des peripheren Blutes

Für die Isolierung von mononuklearen Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurde die Methode der Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt. Bei dieser Methode wird in einem Zentrifugenröhrchen Vollblut auf das Lymphozytentrennmedium Ficoll aufgetragen und anschließend zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entstehen vier verschiedene Phasen. Kleine Zellen, vornehmlich Erythrozyten und Granulozyten sowie Zelltrümmer können entlang des Zentrifugalfeldes durch den Ficollgradienten wandern, bis sie auf dem Boden des Zentrifugenröhrchens pelletieren und somit die unterste Phase bilden. Über dieser Zellschicht befindet sich das Ficoll, welches die zweite Phase darstellt. Größere Zellen wie Lymphozyten und Monozyten werden während der Wanderung im Zentrifugalfeld von der Ficollschicht zurückgehalten. Dieses weißliche Lymphozytenkonzentrat, das auch als Schildkrötenhaut bezeichnet wird und den *Buffy Coats* ihren Namen gibt, stellt die dritte Schicht dar. Darüber befindet sich als vierte Phase noch das Blutplasma. Entweder wurde Vollblut den jeweiligen humanen Spendern frisch entnommen oder *Buffy Coats* (Zellkonzentrat mit reduziertem Serumanteil) vom Blutspendedienst Frankfurt am Main bezogen. Die Blutkonserve (ca. 50 ml) wird bis zur Aufbereitung bei 37°C gelagert und von außen vor dem Öffnen desinfiziert. Das Blut wird in eine T75-Zellkulturflasche überführt, damit es mit warmen PBS verdünnt werden kann. Die Verdünnung (für Vollblut 1:2; für *Buffy Coats* ca. 1:4) verbessert die Auftrennung durch die Dichtegradientenzentrifugation. Anschließend werden 50 ml Reaktionsgefäße mit 15 ml Ficoll-Lösung befüllt. Dann wird das Ficoll langsam mit 25 ml des Blutgemisches überschichtet. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 2100 rpm für 20 min bei 20°C, wobei die Bremse ausgeschaltet wird. Die obere Plasmaschicht wird verworfen und das entstandene Lymphozytenkonzentrat, welches die mononuklearen Zellen enthält, in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden zweimal mit MACS-Puffer gewaschen und zur Bestimmung der Zellzahl in einem geeignetem Volumen MACS-Puffer resuspendiert. Die Auszählung erfolgt mittels einer Zählkammer. Aus einer Blutkonserve lassen sich durchschnittlich zwischen 5×10^8 und 1×10^9 mononukleare Zellen isolieren.

3.2.1.11. *In vitro* Differenzierung humaner dendritischer Zellen aus Monozyten

Aus den Monozyten des peripheren Blutes, die zuvor über magnetische Zellseparation angereichert wurden, können *in vitro* immature myeloide DC generiert werden. Dies entspricht der natürlichen Differenzierung von Monozyten in peripherem Gewebe. Für die

Differenzierung von Monozyten zu immaturren DC werden pro well einer 24-well Zellkulturplatte 1×10^6 CD14⁺ Zellen in einem Volumen von 1 ml DC-Medium ausgesät. Dem Medium werden je 1000 *Units* GM-CSF sowie IL-4 zugefügt und die Zellen für 5 Tage bei 37°C inkubiert.

3.2.1.12. Ernte von *in vitro* differenzierten, humanen dendritischen Zellen

Die *in vitro* aus Monozyten differenzierten, humanen dendritischen Zellen werden, soweit nicht anders vermerkt, nach 5 Tagen Kultivierung geerntet. Dazu werden die Zellen mit PBS, das 1 mM EDTA enthält, nach 5 min Inkubation bei 4°C von der Zellkulturplatte abgelöst. Die Zellen werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und können für weitere Experimente verwendet werden.

3.2.1.13. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl einer Zellsuspension wird durch das Auszählen einer Verdünnung der Zellen mit einer Trypanblau-Lösung in einer Zählkammer bestimmt. Die Methode erlaubt auch einen Einblick in den Vitalitätszustand der Zellen. Im Vergleich zu gesunden Zellen haben tote bzw. sterbende Zellen eine höhere Membrandurchlässigkeit. Der Farbstoff Trypanblau kann die Membran lebender Zellen nicht passieren, gelangt allerdings in das Zytoplasma von toten Zellen. In einer 96-well Rundbodenplatte wird eine serielle Verdünnung erstellt, mittels einer Zählkammer werden 9 Quadrate einer geeigneten Verdünnung ausgezählt und ein Mittelwert gebildet. Es ist darauf zu achten, dass die Zellen, die auf einer der Linien der angrenzenden Quadrate liegen, nicht doppelt ausgezählt werden. Beim Auszählen ist es zudem wichtig, Zellaggregate zu vermeiden und die richtige Verdünnungsstufe zu wählen. Aus mathematischen Gründen ist eine Zellzahl zwischen 30 und 100 Zellen pro Quadrat zu wählen. Beide Faktoren können die Genauigkeit der Zählung beeinflussen. Mit einem Kammerfaktor **k** von 10^4 und dem gezählten Mittelwert an Zellen **n** kann unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors **v** über folgende Formel die Zellzahl **c** bestimmt werden:

$$C [\text{Zellen/ml}] = n [\text{Zellen}] \cdot k \cdot v [1/\text{ml}]$$

Die totale Zellzahl kann berechnet werden, indem die Zellzahl pro ml mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension multipliziert wird.

3.2.1.14. Herstellung von Zelllysaten

Um die Expression von Proteinen in einer Zelle nachzuweisen, werden Zelllysate hergestellt, die dann mittels Western Blot analysiert werden. Dazu wird das Medium vollständig von den Zellen abgenommen und durch Lyse-Puffer ersetzt. Alternativ dazu können die Zellen auch erst abgelöst werden und nach Zentrifugation in Lyse-Puffer resuspendiert werden. Durch den Puffer werden die Zellen aufgeschlossen. Proteaseinhibitoren verhindern hierbei einen Abbau der Proteine. Von den Zelllysaten kann z.B. nach der Bradford Methode die Proteinkonzentration bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde jedoch darauf verzichtet und äquivalent dazu für jeden Ansatz die Zellzahl und somit auch der Proteinanteil konstant gehalten. In den Western Blot Analysen wurde zudem immer eine Actin-Bestimmung als Ladekontrolle durchgeführt.

3.2.2. Immunologische Arbeitstechniken

3.2.2.1. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*fluorescent activated cell sorting*; FACS) wird häufig eingesetzt, um das Vorkommen von Oberflächenmolekülen in einer Zellsuspension zu quantifizieren. Alle FACS-Messungen dieser Arbeit wurden an einem LSRII durchgeführt. Die Methode beruht auf einer Antigen-Antikörper-Bindung. Die zu untersuchenden Zellen müssen als Suspension in FACS-Puffer vorliegen. Sobald die Zellsuspension durch die Zugabe von monoklonalen, Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt wurde, die spezifisch an bestimmte Oberflächenmoleküle binden, kann sie mit einem Durchflusszytometer analysiert werden. Im Zytometer werden die Zellen nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung vereinzelt. Die Suspension wird durch die schmale Öffnung einer Nadel eingesaugt, wodurch ein Flüssigkeitsstrom aus einzelnen Zellen entsteht. Der Flüssigkeitsstrom passiert dann je nach Gerät mehrere Laser, welche die Fluorochrome dazu anregen, Fluoreszenz zu emittieren. Fluoreszenz entsteht, wenn ein Fluorochrom nach der Absorption eines Photons aus einem elektronisch angeregten Zustand wieder in den Grundzustand übergeht, indem die Energie in Form eines weiteren Photons emittiert wird. Dabei kommt es im Allgemeinen zu einer Rotverschiebung der Fluoreszenz relativ zu der absorbierten Strahlung, da ein Abschnitt der Energie als Wärme verloren geht. Die Absorption ist abhängig von der Wellenlänge des anregenden Lichtes. Um verschiedene Fluorochrome

gleichzeitig anregen zu können, sind deshalb in den Zytometern mehrere Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen eingebaut. Die von den Fluorochromen nach Anregung durch die Laser emittierten Photonen werden zu einer Detektionseinheit geleitet. Diese besteht aus mehreren Filterpaaren und zugehörigen Sekundärelektronenverstärkern. Nur bestimmte Wellenlängen können jeweils ein Filterpaar passieren und lösen dann ein elektronisches Signal aus, das proportional zur Lichtintensität ist. Die Lichtintensität wiederum ist der Menge an gebundenen Antikörpern und somit der Anzahl an Oberflächenmolekülen auf einer Zelle proportional. Da unterschiedliche Fluorochrome unterschiedliche Emissionsspektren besitzen, ist es möglich, mehrere gleichzeitig zu detektieren. Demnach können auf einer Zelle auch gleichzeitig mehrere Oberflächenmarker analysiert werden. Bei der Auswahl der Fluoreszenz-markierten Antikörper muss jedoch auf Überlappungen in den Absorptions- und Emissionsspektren der konjugierten Fluorochrome geachtet werden. Durch die Detektion der Beugung und der Streuung des Lichtes werden zusätzliche Informationen über die Zellen gewonnen. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*; FSC) gibt Auskunft über die Größe und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*; SSC) über die Granularität einer Zelle. Die Darstellung in einem Dot Plot (SSC/FSC) ermöglicht die erste Auswahl der Zellpopulationen, die untersucht werden sollen, sowie den Ausschluss von Zelltrümmern und toten Zellen. Zudem ist es möglich intrazelluläre Färbungen durchzuführen, um cytosolische Proteine oder Proteine, die in den Membranen von Zellorganellen wie z.B. dem ER liegen, im FACS zu detektieren. Dazu müssen die Zellen mit einem Detergenz semipermeabilisiert werden. Die Auswertung der Daten wurde mit der dem Gerät zugehörigen Software DIVA durchgeführt. Alle Abbildungen wurden mit dem Programm WinList erstellt.

3.2.2.2. Antikörperfärbung und PI-Färbung

Für eine FACS-Messung werden zwischen 2×10^5 und 1×10^6 Zellen in 50 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Die Inkubation mit Fluoreszenz-markiertem Antikörper erfolgt im Dunkeln für 20 min bei 4°C. Anschließend werden die Zellen in einem geeignetem Volumen FACS-Puffer gewaschen und 5 min bei 300 xg zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden mit 1 % PFA in FACS Puffer fixiert, bevor sie für die Messung verwendet werden. Zudem ist es möglich, ähnlich einem Western Blot, unmarkierte Primärantikörper zu verwenden, die dann in einem zweiten Schritt mit einem Sekundärantikörper markiert werden, der ein konjugiertes Fluorochrom besitzt. Zudem besteht die Möglichkeit zusätzlich zu einer

Antikörperfärbung noch eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) durchzuführen. PI färbt die DNA an, gelangt nur in sterbende Zellen, und kann somit als Marker der Vitalität der Zellen verwendet werden. Dazu werden vor einer Messung 10 µl einer PI-Lösung (1 mg/ml) zu den Zellen gegeben und im Dunkeln 10 min bei 4°C inkubiert.

3.2.2.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Proteine, die in Zelllysaten enthalten sind, analysieren zu können, werden diese per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Gel kann anschließend gefärbt (Coomassie) oder für einen Western Blot eingesetzt werden.

Dabei werden zuerst die Proteine eines Zelllysats durch Zugabe von Probenpuffer, welcher das Detergenz SDS enthält, und Erhitzen auf 96°C denaturiert. Das SDS, welches selbst negativ geladen ist, bindet an die entfalteten Proteine und führt dazu, dass diese aufgrund ihres Molekulargewichts getrennt werden können. Die Proben werden dann auf ein SDS-Gel aufgetragen, an welches eine Spannung von 70-120 V angelegt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich SDS-Gele nach Laemmli angefertigt. Es handelt sich um ein diskontinuierliches Gelsystem, bestehend aus einem 5%igen Sammel- und einem 10%igen Trenngel, das von SDS-Laufpuffer umgeben ist. Der Laufpuffer enthält unter anderem Chloridionen und Glycin. Im Sammelgel bei einem pH-Wert von 6,8 werden die Proteine zunächst konzentriert, indem sie nach dem Prinzip des Stapeleffekts zwischen dem Leit-Ion Chlorid und dem Folge-Ion Glycin, das bei diesem pH als Zwitterion vorliegt, eingeschlossen werden. Das Trenngel ist engmaschiger und hat einen pH-Wert von 8,8. Dadurch überholt das kleinere Glycin, das nun negativ geladen ist, die Proteine, wodurch ein homogenes Puffersystem entsteht, das die Proteine der Größe nach auftrennt. Alle Proteine sind durch das gebundene SDS negativ geladen und werden von der Anode angezogen. Die kleineren Proteine können schneller durch die Polyacrylamid-Matrix wandern. Es wird immer ein Größenstandard mitgeführt.

3.2.2.4. Western Blot

Mit einem Western Blot lassen sich Proteine aus Zelllysaten spezifisch detektieren, die zuvor durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die Methode basiert auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung und besteht aus zwei verschiedenen Abschnitten. Im ersten Schritt (*Blotting*) werden die aufgetrennten Proteine durch das Anlegen einer Spannung im rechten

Winkel aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dazu wurde eine *semi-dry* Apparatur verwendet. Auf die unten liegende Anode wird ein mit Transferpuffer getränktes Filterpapier gelegt, darüber die Membran, dann das Gel sowie ein weiteres Filterpapier und abschließend die Kathode. Nach ca. 15 min bei 30 V kann die Membran für den zweiten Schritt, die Antikörperfärbung, eingesetzt werden. Zur Kontrolle des *Blottings* kann eine Ponceau-Färbung der Membran durchgeführt werden, durch welche die transferierten Proteine angefärbt werden.

Nach dem Transfer der Proteine wird die Membran zuerst für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C geblockt, d.h. die Oberfläche der Membran wird mit Protein abgesättigt. Dadurch wird eine unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran verhindert. In dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck 2- 5%ige *Blocking*-Lösungen, bestehend aus bovinem Serumalbumin (BSA) oder Milchpulver gelöst in TBS-T, verwendet. Nach dem Absättigen kann optional mit 1x TBS-T gewaschen werden, bevor der Primärantikörper hinzugegeben wird. Der Primärantikörper wird dafür nach den Herstellerangaben in einer meist 0,1-1%igen *Blocking*-Lösung verdünnt und für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C je nach Herstellerprotokoll mit der Membran inkubiert. Der Antikörper ist spezifisch gegen ein Protein auf der Membran gerichtet. In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen STAT1, pSTAT1, IRF3, pIRF3, I κ -B α und Aktin (Abschnitt 3.1.3) verwendet. Die Primärantikörper wurden nach Angaben des Herstellers verwendet. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 10 min mit 10 ml 1x TBS-T gewaschen. Danach wird ein passender Sekundärantikörper, der an den Fc-Teil des ersten Antikörpers bindet, nach den Herstellerangaben verdünnt und auf die Membran gegeben. Alle Sekundärantikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren Konjugate mit der *horseradish peroxidase* (HRP). Nach einer Inkubation von 45 min bei RT wird die Membran erneut dreimal für 10 min mit 10 ml 1x TBS-T gewaschen. Danach werden für 5 min die Lumineszenzfarbstoffe Luminol und Cumarin auf die Membran gegeben. Anschließend wird HRP durch die Zugabe von H₂O₂ aktiviert und für 1 min inkubiert. Auf die Membran wird dann im Dunkeln ein Film gelegt, welcher durch die Biolumineszenz belichtet wird, die von der HRP erzeugt wird. Abschließend wird der Film entwickelt und digitalisiert.

3.2.2.5. *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)

Über die Methode der magnetischen Zellseparation (MACS) können spezifische Zellpopulationen aus einem Zellgemisch anhand ihrer Oberflächenmarker isoliert werden.

Hierfür werden zwei Komponenten benötigt, magnetische Kügelchen (*MACS-Beads*), an deren Oberfläche monoklonale Antikörper gegen einen spezifischen Oberflächenmarker gebunden sind, und eine ferromagnetische Säule. Die gewünschte Zellpopulation wird mit den *Beads* über eine Antigen-Antikörper-Bindung verknüpft und über die Säule gegeben. Durch ein Magnetfeld, in dem sich die Säule befindet, binden die *Beads* an die Säule und halten somit die mit ihnen verknüpften Zellen von einem Durchlauf zurück. Nicht gebundene Zellen werden aus der Säule gespült und nachdem das Magnetfeld entfernt wird, kann die gewünschte Zellpopulation eluiert werden. Die Kapazität einer Säule beträgt je nach verwendeter Säulengröße (MS oder LS) zwischen 1×10^7 und 2×10^9 Zellen.

Neben der beschriebenen Positivselektion kann auch eine Depletion einer spezifischen Zellpopulation durchgeführt werden. Dabei werden die in der Säule zurückgehaltenen Zellen verworfen. Genauere Angaben sind dem Herstellerprotokoll zu entnehmen.

3.2.2.6. Zytokinbestimmung mittels eines *Enzyme-Linked-Immuno-sorbent-Assay* (ELISA)

Diese Methode erlaubt einen qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen in Zellkulturüberständen. Der ELISA bedient sich eines Enzyms als Marker. Die Proteinkonzentration kann so anhand des Substratumsatzes bestimmt werden. Bei einem wie hier verwendeten *Sandwich-ELISA* sind die monoklonalen Antikörper bereits auf der Mikrotiterplatte gebunden. Das in den Zellkulturüberständen vorkommende Protein wird im ersten Schritt über diese Antikörper auf der Platte gebunden. Nach Wegwaschen der ungebundenen Proteine wird ein spezifischer Enzym-gekoppelter polyklonaler Antikörper zugegeben, der wiederum an das gebundene Protein auf der Platte bindet. Das Enzym, welches in diesen Tests verwendet wird, ist eine Meerrettich-Peroxidase (HRP). Um das ungebundene Protein nun zu entfernen, erfolgen erneute Waschschritte und anschließend wird eine Substratlösung hinzugegeben. Als Substrat wirkt hier Tetramethylbenzidin (TMB), welches durch die HRP in ein blau-gefärbtes Produkt umwandelt wird. Nach Zugabe der Stopp-Lösung verfärbt sich das Produkt von blau nach gelb. An einem *ELISA-Reader* kann anschließend die Absorption der Lösung bestimmt werden. Die Farbkonzentration verhält sich hierbei proportional zur gebundenen Proteinmenge. Über eine Standardkurve, welche in jedem Test mitgeführt wird, lassen sich die genauen Konzentrationswerte der Proteine ermitteln. Die Messung erfolgt mit Hilfe eines *ELISA-Readers* von Tecan und wird mit dem Programm *Tecan XRead Plus* ausgewertet. Die ELISA-Kits werden unter den von den

Herstellern angegebenen Bedingungen, unter Verwendung der mitgelieferten Puffer und Lösungen, eingesetzt.

3.2.3. Maustechniken

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

3.2.3.1. Maushaltung

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

3.2.3.2. Mausezucht und *-screening*

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

3.2.3.3. Mausnarkose

Zur Kurzzeitinhalationsnarkose wurde in ein Glas mit Deckel 1-2 ml Isofluran gegeben und mit etwas Zellstoff überdeckt. Die Maus wurde in das Glas gegeben und bis zur Narkose beobachtet. Nach dem Herausnehmen der Mäuse blieben sie noch etwa 30 Sekunden in Narkose.

3.2.3.4. Intravenöse Injektion

Um eine intravenöse Injektion am Schwanz zu erleichtern, wurden die Mäuse ca. 10 min unter Rotlicht aufgewärmt. Die Menge des zu injizierenden Agens wurde in 200 µl PBS 0,1 % BSA pro Maus gelöst. Die Maus wurde in einer Röhre fixiert, die den Schwanz leicht zugänglich machte. Die Kanüle wurde in einem sehr flachen Winkel in die Schwanzvene eingeführt und der Spritzeninhalt injiziert.

3.2.3.5. Retroorbitale Blutentnahme

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

3.2.3.6. Maustötung

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

3.2.4. Molekularbiologische und Genetische Methoden

3.2.4.1. Isolation viraler DNA

Für die Isolation viraler DNA wurden 1×10^8 pfu Virus-Lösung eingesetzt. Es erfolgte zunächst ein Proteinase K Verdau und anschliessend eine Phenol/Chloroform Fällung. Die gefällte DNA wurde in Ethanol gewaschen und in *Aqua bidest* eluiert.

Proteinase K Verdau:

mit Tris oder PBS oder TE auf 500 µl auffüllen
+ 50 µl TEN-Puffer
+ 46 µl 10 % SDS
+ 2,5 ml Proteinase K (20 mg/ml)
→ 1h - ÜN 56°C sanft schütteln

Phenol/Chlorophorm DNA-Fällung:

- + 1 Vol. (600 µl) Phenol (untere Phase der Flasche)
- vortexen
- 5 min 13.000 rpm
- Obere Phase + 1 Vol. Phenol/Chlorophorm (1:1)
- vortexen
- 5 min 13.000 rpm
- obere Phase + 1 Vol. Chlorophorm/Isoamylalkohol (24:1)
- vortexen

- 5 min 13.000 rpm
- obere Phase abnehmen
 - + 2 Vol. (1200 µl) EtOH 100 %
 - + 0,1 Vol. (60 µl) Na-Acetat (3 M pH 5,2)
 - + 1 µl Glycogen (20 mg/ml)
- 30 min - ÜN -20°C/-80°C

Eluieren der gefällten DNA:

- 30 min 4°C, 13.000 rpm
- Überstand abkippen
- mit 1 ml EtOH 70 % waschen
- 15 min 4°C, 13.000 rpm
- Pellet trocknen
- in 30 µl *Aqua bidest* eluieren

3.2.4.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die *polymerase chain reaction* (PCR) ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Zunächst wird die doppelsträngige DNA bei 94°C denaturiert (*denaturation*). Danach wird die Temperatur Oligonukleotid-abhängig erniedrigt, wodurch die Oligonukleotide an die DNA binden können (*annealing*). Anschließend bindet die thermostabile Polymerase an die Oligonukleotide und beginnt Desoxy-Nukleotide an die freie OH-Gruppe des 3' Endes des Oligonukleotides zu knüpfen (*elongation*), die dem DNA-Strang komplementär sind. Das Temperaturoptimum beträgt für die meisten Polymerasen 72°C. Die gewählte Elongationszeit ist Enzym-abhängig und wird der Länge der DNA angepasst, die amplifiziert werden soll. Es werden ca. 30-40 Zyklen wiederholt. Wenn beide Oligonukleotide enthalten sind, kann auf diese Weise ein lineares DNA-Fragment, deren Enden durch die 5' Enden der Oligonukleotide definiert sind, exponentiell vervielfältigt werden. Beim Herstellen der Oligonukleotide können zusätzliche Nukleotide eingebaut werden, die nicht zur Bindung an die DNA beitragen. Diese Nukleotide werden dann auch in die zu amplifizierende DNA eingebaut. So können Gene z.B. um zusätzliche Restriktionsschnittstellen für Enzyme verlängert werden.

Alle Materialien für DNA-Techniken sowie Oligonukleotide werden bei -20°C aufbewahrt und auf Eis aufgetaut, bzw. pipettiert. Folgender PCR-Ansatz wird pro Probe in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß aus einem so genannten *Mastermix* auf Eis zusammen pipettiert:

5 µl	10x Puffer
5 µl	fwd Oligonukleotide (5 mM)
5 µl	rev Oligonukleotide (5 mM)
2 µl	dNTP (10 mM)
3 µl	MgCl ₂ (25 mM)
27,8 µl	<i>Aqua dest.</i>
0,2 µl	HotStar Taq Polymerase

Bei problematischen Matrizen können zusätzlich 10 µl 5x Puffer Q zugegeben und entsprechend 10 µl weniger *Aqua dest.* verwendet werden. Puffer Q dient dazu, die DNA zu entwinden und somit ein besseres *annealing* der Oligonukleotide zu ermöglichen.

Anschließend wird 2 µl DNA pro Ansatz hinzu gegeben. Das PCR-Reaktionsgemisch wird 15 min bei 94°C inkubiert, um den Antikörper, der die Polymerase zunächst hemmt, zu deaktivieren. 30-40 Zyklen folgenden Programms werden durchlaufen:

<i>Denaturation:</i>	94°C	30 s
<i>Annealing:</i>	Oligonukleotid-spezifisch	30 s
<i>Elongation:</i>	72°C	60 s

Abschließend wird der Ansatz für weitere 10 min bei 72°C inkubiert und dann auf 4°C gekühlt. Das PCR Produkt wurde durch Auftragen eines Aliquots auf ein Agarosegel nachgewiesen.

3.2.4.3. Phusion-Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Phusion-Polymerase zeichnet sich gegenüber der HotStar-Taq-Polymerase durch eine geringere Fehlerrate ($4,4 \times 10^{-7}$) aus. Folgender PCR-Ansatz wird pro Probe in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß aus einem so genannten *Mastermix* auf Eis zusammen pipettiert:

10 µl	5 x Phusion HF Puffer
5 µl	fwd Oligonukleotide (5 mM)
5 µl	rev Oligonukleotide (5 mM)
1 µl	dNTP (10 mM)
26,5 µl	<i>Aqua dest.</i>
0,5 µl	Phusion Polymerase

Bei problematische *Matrizen* können zusätzlich 3,8 µl (entspricht 7,5 %) Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben und entsprechend 3,8 µl weniger *Aqua dest.* verwendet werden. DMSO dient ebenfalls dazu die DNA zu entwenden und somit ein besseres *annealing* der Oligonukleotide zu ermöglichen.

Anschließend wird 2 µl DNA pro Ansatz hinzu gegeben. 30-40 Zyklen folgenden Programms werden durchlaufen:

<i>Denaturation:</i>	98°C	10 s
<i>Annealing:</i>	Oligonukleotid-spezifisch	30 s
<i>Elongation:</i>	72°C	60 s

Abschließend wird der Ansatz für weitere 10 min bei 72°C inkubiert und dann auf 4°C gekühlt. Das PCR Produkt wurde durch Auftragen eines Aliquots auf ein Agarosegel nachgewiesen.

3.2.4.4. Restriktion, Klenow Behandlung, Ligation und Transformation von DNA

DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Mit der Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann ein DNA-Doppelstrang geschnitten werden. Die Enzyme spalten Phosphodiesterbindungen des Rückgrats und erkennen dabei spezifische, meist palindromische Sequenzen. Es gibt verschiedene Gruppen an Restriktionsendonukleasen, die hier verwendeten gehören jedoch alle dem Typ II an. Sie schneiden direkt an der Erkennungsstelle, wobei entweder glatte oder überhängende Enden entstehen. Dazu benötigen sie in der Regel Mg^{2+} -Ionen als Co-Faktor. Für eine Spaltung werden die meisten Enzyme 60 min bei 37 °C im zugehörigen Puffer mit der DNA inkubiert. Genauere Angaben sind dem Herstellerprotokoll zu entnehmen.

Behandlung von DNA mit dem Klenow-Fragment

DNA, die mit Restriktionsendonukleasen geschnitten wurde, welche überhängende Enden erzeugen, kann mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt bzw. abgebaut werden, so dass glatte Enden entstehen. Dazu wird die DNA 15 min bei 25°C mit dem Enzym im zugehörigen Puffer inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von EDTA abgestoppt und das Enzym durch Erhitzen (20 min bei 75°C) inaktiviert. Auch die Klenow Polymerase

benötigt Mg^{2+} -Ionen als Co-Faktor. Genauere Angaben sind dem Herstellerprotokoll zu entnehmen.

Ligation von komplementären DNA-Enden

DNA, deren Phosphodiesterbindung im Rückgrat durch Restriktionsendonukleasen geschnitten wurde, kann durch eine Ligase wieder verknüpft werden, sofern die Enden komplementär zueinander oder glatt sind. Dazu wird die DNA für mehrere Stunden bei 16-25°C mit dem Enzym im zugehörigen Puffer inkubiert. Genauere Angaben sind dem Herstellerprotokoll zu entnehmen.

Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wird diese in kompetente Bakterien transformiert. Die Bakterien vermehren sich und replizieren das Plasmid dabei. Durch eine DNA-Präparation kann die DNA dann wieder aus den Bakterien gewonnen werden. Die Transformation beginnt mit einer Inkubation der DNA mit den Bakterien (ca. 30 min bei 4°C), wobei sich die DNA an die Zellen anlagert. Durch einen Hitzeschock von 30-90 s bei 42°C wird die DNA in die Bakterien transferiert. Anschließend wird die Bakteriensuspension mit Medium verdünnt und abhängig vom jeweiligen Bakterium für 30-90 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach dieser Regenerationsphase wird die Suspension auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Selektioniert wird hierbei nach Antibiotikaresistenzen, die auf den jeweiligen Plasmiden kodiert sind. In dieser Arbeit wurden *E. coli* Bakterien verwendet (TOP10, XL2-Blue, STBL2), die kommerziell erhältlich sind. Für die lentiviralen Plasmide, die homologe LTR enthalten, wurden ausschließlich STBL2 verwendet, die zudem nur bei 25°C kultiviert wurden. Dadurch sollen spontane Rekombinationsereignisse unterdrückt werden. Durch die niedrige Temperatur verlängern sich die Inkubationszeiten. Eine transformierte Bakterienkultur kann durch die Zugabe von 20 Vol. % Glycerin bei -80°C für längere Zeit als Glycerinstock gelagert werden.

3.2.4.5. Präparation geringer Mengen an Plasmid-DNA nach Qiagen

Um kleinere Mengen an Plasmid-DNA (ca. 1-10 µg) aus zuvor transformierten *E. coli* Bakterien zu isolieren, wird eine Kultur von 2-5 ml LB-Medium mit einer Probe aus einem Glycerinstock oder einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Zur Selektion wird dem Medium Antibiotikum zugeführt. Im

Fälle der lentiviralen Plasmide werden die Bakterien ca. 40 Stunden unter Schütteln bei 25°C kultiviert, wobei das Kulturvolumen auf 10 ml erhöht wird. Neben einer Unterdrückung von Rekombinationsereignissen hat dies auch eine bessere Ausbeute zur Folge. Dies ist essentiell, da es sich um *low-copy* Plasmide handelt, die in wesentlich geringerer Stückzahl pro Bakterium vorliegen. Danach werden die Bakterien durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die DNA mit Hilfe eines Kits (QIAprep Spin Miniprep Kit) präpariert. Nach dem Zellaufschluss wird zuerst die genomische DNA der Bakterien gefällt und anschließend die Plasmid-DNA isoliert. Das Kit beinhalten dazu Säulen mit einer Anionenaustauscher-Matrix, welche die DNA bei geringen Salzkonzentrationen und niedrigem pH-Wert binden. Die DNA wird dabei gereinigt und zugleich angereichert. Durch Ändern der Salzkonzentration kann die DNA wieder eluiert werden. Die abschließende Fällung erfolgt durch Alkoholzugabe. Zur Kontrolle der präparierten DNA wird in den meisten Fällen eine Restriktionsanalyse durchgeführt und Konzentration sowie Reinheit photometrisch bestimmt. Genauere Angaben sind dem Herstellerprotokoll zu entnehmen.

3.2.4.6. Präparation großer Mengen an Plasmid-DNA

Um größere Mengen an Plasmid-DNA (ca. 0,5-1 mg) aus zuvor transformierten *E. coli* Bakterien zu generieren, wird zuerst eine Vorkultur von 2-5 ml LB-Medium mit einer Probe aus einem Glycerinstock angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Mit der Vorkultur wird dann eine Hauptkultur von 250 ml LB-Medium angeimpft, dem zur Selektion noch Ampicillin zugeführt wird. Die Bakterienkultur wird dann für 20-24 Stunden unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Im Falle der lentiviralen Plasmide werden die Bakterien ca. 40 Stunden unter Schütteln bei 25°C kultiviert, wobei auf eine Vorkultur verzichtet wird. Für diese *low-copy* Plasmide werden immer 2 Kolben angeimpft, die später vereinigt werden. Danach werden die Bakterien durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die DNA mit Hilfe eines Kits (QIAfilter Plasmid Purification Maxi Kit oder Promega PureYield Maxiprep Kit) präpariert. Das Prinzip der Kits entspricht demjenigen, das auch für die Präparation geringerer Mengen verwendet wurde. Genauere Angaben sind dem Herstellerprotokoll zu entnehmen.

3.2.4.7. Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Nachdem Plasmid-DNA aus Bakterien präpariert wurde, wird ihre Konzentration und Reinheit photometrisch bestimmt. Dazu wird mit einem UV/VIS-Spektrometer die Absorption der DNA, die meist in *Aqua dest.* gelöst vorliegt, bei 260 und 280 nm gemessen. Zuerst wird

die DNA so verdünnt, dass die Absorption der Probe in einem linearen Messbereich liegt. Über eine Quarzküvette wird die Probe in das Spektrometer eingeführt. Das Spektrometer wurde zuvor mit *Aqua dest.* geeicht. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz lässt sich mit der Absorption bei 260 nm die Konzentration der DNA berechnen. Bei 280 nm wird der Proteinanteil der Probe bestimmt. Der Quotient aus der Absorption bei 260 und 280 nm entspricht somit der Reinheit der DNA-Probe. Sie sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

3.2.4.8. Sequenzieren von Plasmid-DNA

Um Mutationen ausschließen zu können, die während der Herstellung der beschriebenen Plasmide entstanden sein könnten, wurde die DNA der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Konstrukte sequenziert. Dazu wurde die DNA nach den Vorgaben der Firma MWG vorbereitet und dieser zugeschickt. Die daraufhin erhaltenen Daten wurden mit dem Programmen VectorNTI oder Sequencher 4.6 ausgewertet.

3.2.4.9. Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente, wie sie z.B. nach einer Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen entstehen, analysieren zu können, werden diese per Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Die dazu verwendeten Gele enthalten je nach Größe der zu untersuchenden Fragmente ca. 0,5-1,5 % Agarose gelöst in 1x TBE-Puffer und sind mit Ethidiumbromid gefärbt. Das fluoreszierende Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA und macht diese somit unter UV-Licht sichtbar. Die geschnittene DNA wird mit Ladepuffer gemischt, der Glycerin enthält, und in die Geltaschen pipettiert. Durch das Glycerin sinkt die Probe in die Tasche, obwohl das Gel ebenfalls von TBE-Puffer umgeben ist. Sobald ein elektrisches Feld (60-120 V für 30-90 min bei konstantem Strom) angelegt wird, wandert die aufgrund der Phosphatreste des Rückgrats negative DNA zur positiven Anode. Kleinere Fragmente können schneller durch die Agarose-Matrix wandern. Neben den Proben wird ein Größenstandard mitgeführt, über den die Zuordnung der DNA-Banden möglich wird. Das Gel wird mit einer Kamera unter UV-Licht dokumentiert. Auf diese Weise können Schnittmuster im Sinne einer Restriktionsanalyse untersucht werden.

Es besteht auch die Möglichkeit neben den eben beschriebenen, analytischen Gelen diese Methode zur Reinigung eines bestimmten DNA-Fragments wie z.B. einem PCR-Produkt aus einem Gemisch an Fragmenten einzusetzen (präparatives Gel). Dazu wird die gewünschte

Bande anhand ihrer Größe identifiziert, aus dem Gel herausgeschnitten und über ein Kit (QIAquick Gel Extraction Kit) gereinigt. Für die Aufarbeitung von DNA-Fragmenten, wie z.B. die Entfernung von Pufferresten, gibt es jedoch schnellere Methoden (QIAquick PCR Purification Kit). Das Prinzip beider Kits entspricht demjenigen, das auch für die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien verwendet wird. Genauere Angaben sind dem Herstellerprotokoll zu entnehmen.

3.2.4.10. Klonierungsstrategie

In Abschnitt 4.3.3 wurden lentivirale Vektoren hergestellt, die VACV-kodierte Immunmodulatoren kodieren. Zu diesem Zweck wurden für das SIVmac 3-Plasmid-Vektorsystem entsprechende VIFCGdBH Transfervektoren hergestellt.

Deletion der BglII Schnittstelle innerhalb der MCS von pIRES2eGFP:

Um dieses pIRES-Konstrukt über die beim Oligonukleotiddesign angehängten Schnittstellen MunI und BglII in den VIFCGdBH Transfervektor ligieren zu können, musste zuvor die bereits im pIRES2eGFP Plasmid vorhandene BglII Schnittstelle (Abbildung 3.1) innerhalb der MCS durch eine NheI/BglII Restriktionsspaltung deletiert und nach anschließender Auffüllung durch das Klenow-Fragment die resultierenden *blunt ends* wieder religiert werden. Dieser pIRES (Δ NheI bis BglII) Klon diente dann als Matrize zur Herstellung des pIRES Konstruktes.

Abbildung 3.1: BglII Schnittstelle innerhalb der MCS von pIRES2eGFP. Die BglII Schnittstelle innerhalb der MCS des pIRES2eGFP wurde durch eine NheI/BglII Restriktionsspaltung deletiert. Die *sticky ends* wurden durch Inkubation mit dem Klenow Fragment zu *blunt ends* umgewandelt und religiert. Der resultierende pIRES (Δ NheI bis BglII) Klon konnte somit über die mittels Oligonukleotidüberhänge angehängte BglII Schnittstelle in den VIFCGdBH Transfervektor kloniert werden.

Ligation des pIRES-Konstruktes in den Transfervektor VIFCGdBH:

Der mit EcoR I und BamH I geschnittene VIFCGdBH Transfervektor, bei dem in einer vorangegangenen Diplomarbeit bereits die im Original-Transfervektor vorhandene zweite EcoR I Schnittstelle deletiert wurde (Benjamin Rengstl, Diplomarbeit), wurde mit einem

Konstrukt ligiert, das vom pIRES2eGFP Plasmid abstammt und von einer Mun I und einer Bgl II Schnittstelle flankiert ist. Durch diese Klonierung stand ein Transfektor mit einer *multiple cloning site* (MCS) zur Verfügung, in die dann die gewünschten VACV-kodierten Gene eingebracht werden konnten. Durch die Ligation der Bgl II mit der BamH I bzw. der Mun I mit der EcoRI Schnittstelle geht deren palindromische Sequenz verloren, sodass die Enzyme BamHI und EcoRI bei einer erneuten Restriktionsspaltung des ligierten Transfektors, nachfolgend als VIF/IRES bezeichnet, lediglich die entsprechenden verbliebenen Schnittstellen in der MCS erkennen. BamHI und EcoRI können demnach für die Insertion von Fremdgenen in die MCS genutzt werden. Als Reportergen fungiert *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), das nach erfolgreicher Transduktion translatiert wird, obwohl es 3' des Stoppkodons des Hämagglutinin (HA) liegt, da die Ribosomen der Zielzelle ein zweites Mal von der selben mRNA translatieren können, indem sie *cap* unabhängig an die 5' des eGFP gelegene IRES (*internal ribosomal entry site*) binden. Da nach erfolgter Transduktion der Zielzelle durch den Vektor mRNA transkribiert wird, in der auf die MCS direkt das HA-Tag folgt, kann die spätere Translation über das an das gewünschte Protein angehängte HA mittels Western Blot kontrolliert werden. Der HA Western Blot fungiert somit als alternativer Transduktionsnachweis.

4. Ergebnisse

Die Bildung proinflammatorischer Zytokine, wie Typ I Interferon (Typ I IFN), stellt einen zentralen Schritt bei der Kontrolle einer viralen Infektion dar. Dendritische Zellen (DCs) können Pathogene über unterschiedliche zelluläre Komponenten erkennen und die adaptive Immunantwort über Antigenpräsentation und die Bildung proinflammatorischer Zytokine einleiten. Von einigen Viren ist bekannt, dass sie für Immunmodulatoren kodieren, die eine so genannte „Immunflucht“ (*immune evasion*) ermöglichen. Pockenviren haben große Genome mit einer Vielzahl an offenen Leserahmen. Unter den kodierten Proteinen befinden sich auch solche, die nach Infektion gebildet werden, um die Ausbildung antiviraler Immunantworten zu beeinflussen.

Aus früheren Studien¹⁹¹ war bekannt, dass das Modifizierte Vaccinia Virus Ankara (MVA) in der Lage ist, in DCs die IFN- α Produktion zu induzieren. Hinweise aus der Literatur deuten darauf hin, dass Vaccinia Virus (VACV) für Immunmodulatoren kodiert, die es ermöglichen, die Induktion des Typ I IFNs zu inhibieren.^{144,158,170,178,195,196} Daher soll in dieser Arbeit untersucht werden, über welche zellulären Komponenten MVA die Produktion von Typ I IFN induziert (**4.1**) und in wieweit VACV-kodierte Immunmodulatoren eine Relevanz in primären DCs sowie *in vivo* für die Sekretion von Typ I IFN besitzen (**4.2**). Des Weiteren sollen VACV-kodierte Immunmodulatoren identifiziert werden, die für die Inhibition von Typ I IFN Antworten verantwortlich sind (**4.2** und **4.3**).

4.1. Induktion von Typ I Interferon durch Infektion mit MVA

MVA ist ein vom parentalen Vaccinia Virus abgeleiteter Vaccinia-Virus Stamm, welcher derzeit in klinischen Studien hinsichtlich seiner Einsetzbarkeit als replikations-defizienter Vakzinierungsvektor gegen eine Vielzahl von Infektions- und Tumorerkrankungen erprobt wird. Aufgrund seines hohen Attenuierungsgrades hat MVA ca. 15 % des parentalen Genoms verloren. Trotz seiner daraus resultierenden Avirulenz ist MVA äusserst immunogen. Zum Verständnis der hohen Immunogenität von MVA, soll der Mechanismus der IFN Induktion im Folgenden näher untersucht werden.

4.1.1. MVA induziert Typ I IFN nach Immunisierung von Mäusen sowie nach *in vitro* Infektion von DC

Es wurde bereits gezeigt, dass MVA die Flt3-L-vermittelte Expansion dendritischer Zellen *in vivo* in neugeborenen Mäusen induziert. Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass insbesondere plasmazytoide DC (pDC) nach MVA Infektion expandieren und eine verstärkte CD8 α und MHC II Expression aufwiesen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die pDC Entwicklung in Abhängigkeit des IFN-induzierten Transkriptionsfaktors *interferon regulatory factor 8* (IRF8) erfolgt. Daraus resultierend wurde IFN bei diesem Prozess eine entscheidende Rolle zugeschrieben.¹⁹¹ Allerdings war nicht bekannt, ob eine MVA Infektion auch Typ I IFN Antworten im Serum induziert. Um dieser Frage nachzugehen wurden C57BL/6 Mäuse (wildtyp; WT) mit 1×10^7 pfu MVA i.v. infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Blutproben entnommen, aus denen das Serum für die Bestimmung des Typ I IFN Gehalts mittels einer ELISA Methode gewonnen wurde. Es ließen sich 12 h nach Infektion ca. 0,35 ng/ml IFN- α im Serum MVA-infizierter Tiere nachweisen. Bereits 24 h nach Infektion war IFN- α im Serum nicht mehr detektierbar. Im Gegensatz dazu, induzierte eine Infektion der Tiere mit 1×10^5 pfu VACV zu keinem der getesteten Zeitpunkte messbare Mengen an IFN- α (Abbildung 4.1A). Auch nach Infektion der Tiere mit 1×10^7 pfu VACV sind keine detektierbaren Mengen IFN- α im Serum der Tiere messbar (Daten nicht gezeigt).

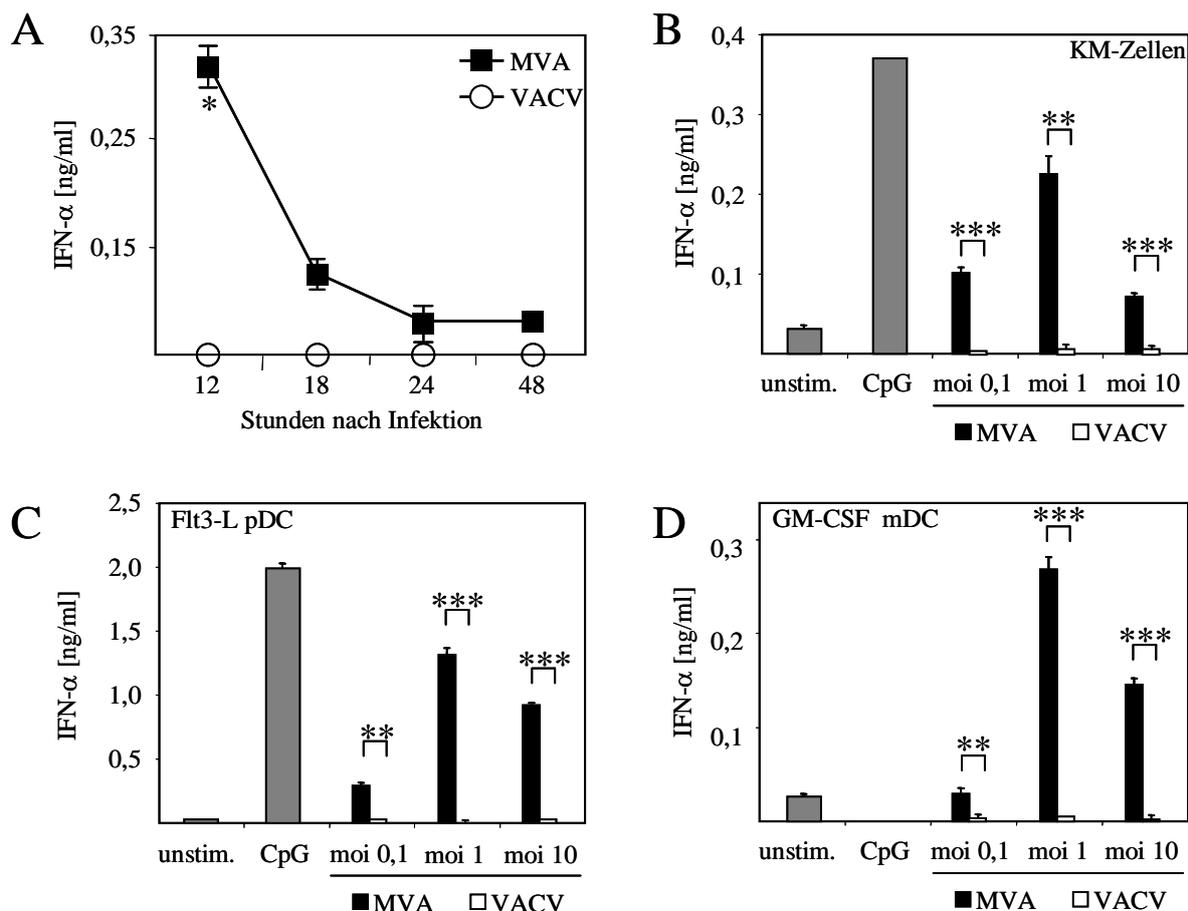


Abbildung 4.1: MVA induziert Typ I IFN Antworten nach Infektion von Mäusen sowie nach Infektion dendritischer Zellen. (A) Mäuse wurden intravenös (i.v.) mit 1×10^7 pfu MVA oder 1×10^5 pfu VACV infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion Serumproben entnommen, die mittels ELISA hinsichtlich der IFN- α Produktion analysiert wurden. (B-D) Es wurden je 1×10^6 KM-Zellen (B), Flt3-L pDC (C) und GM-CSF mDC (D) mit MVA oder VACV in unterschiedlicher *multiplicity of infection* (MOI) infiziert und die Zellkulturüberstände 24 h nach Infektion hinsichtlich ihres IFN- α Gehaltes analysiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit CpG2216 (CpG; 10 μ g/ml) stimuliert oder Zellkulturüberstände unstimulierter Zellen (unstim.) verwendet. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 2-4 durchgeführte Experimente. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Für statistische Analysen wurden die p-Werte anhand des T-Tests für unverbundene Stichproben ermittelt ($0,05 > p > 0,01$ *; $0,01 > p > 0,001$ **; $p > 0,001$ ***).

Anschließend wurden Knochemarkszellen (KM-Zellen) mit MVA oder VACV in unterschiedlichen Infektionsdichten pro Zelle (*multiplicity of infection*; MOI) infiziert und die Zellkulturüberstände 24 h nach Infektion im ELISA hinsichtlich des IFN- α Gehaltes untersucht. Als Kontrolle wurden die Überstände unbehandelter KM-Zellen, sowie CpG2216-stimulierter Zellen verwendet. MVA induziert die größten Mengen IFN- α bei einer MOI von 1 (ca. 0,25 ng/ml, siehe Abbildung 4.1B), wohingegen VACV-infizierte KM-Zellen in keiner der getesteten MOIs detektierbare IFN- α Mengen produzieren.

Um nun den Zelltyp, der für die Typ I IFN Produktion zuständig ist, zu identifizieren, wurden im Folgenden *in vitro* DC in einem Medium, das mit GM-CSF angereichert war (GM-CSF mDC) bzw. mit Flt3-L angereichert war (Flt3-L pDC) generiert. GM-CSF mDC oder Flt3-L pDC wurden mit MVA oder VACV in unterschiedlicher MOI infiziert und 24 h nach Infektion die Zellkulturüberstände hinsichtlich der Produktion an IFN- α untersucht. Während GM-CSF mDC nur moderate Mengen IFN- α produzierten, waren im Überstand MVA-infizierter Flt3-L pDC sehr hohe Mengen IFN- α detektierbar. Es lassen sich 18 h nach MVA-Infektion von Flt3-L pDC mit einer MOI von 1 im Zell-freien Überstand ca. 1,2 ng/ml IFN- α nachweisen. Im Gegensatz dazu zeigte sich auch hier, dass eine VACV Infektion weder von Flt3-L pDC noch von GM-CSF mDC zur Induktion einer IFN- α Sekretion in den Überstand führte (Abbildung 4.1C und 4.1D).

Es ist anzumerken, dass Kulturen Flt3-L-gereifter pDC aus verschiedenen Subtypen DC bestehen bestehen und neben 20-30 % CD11c⁺B220⁺ pDC auch CD11c⁺CD11b⁺ Zellen zu finden sind, die somit das Oberflächenmarker Expressionsprofil konventioneller DCs (cDC) besitzen.^{63,197} Um sicherzustellen, dass die MVA-induzierte IFN- α Produktion durch CD11c⁺B220⁺ Flt3-L pDC vermittelt wird, wurden über *magnetic cell sorting* (MACS) angereicherte pDC aus Flt3-L pDC Kulturen hinsichtlich ihrer IFN- α Expression nach MVA Infektion untersucht. CD11c⁺B220⁺ pDC wurden hierfür mit MVA in unterschiedlicher MOI infiziert und die Zellkulturüberstände 24 h nach Infektion im ELISA hinsichtlich des Gehalts an IFN- α analysiert. Als Kontrolle wurden Zellkulturüberstände unstimulierter, sowie CpG2216-stimulierter CD11c⁺B220⁺ pDCs verwendet. Die höchste IFN- α Expression zeigte sich hier nach einer MVA Infektion bei einer MOI von 1 und lag bei ca. 0,3 ng/ml (Abbildung 4.2A). Demnach scheinen CD11c⁺B220⁺ pDCs nach MVA Infektion der für die IFN- α Produktion in Flt3-L Kulturen relevante Zelltyp zu sein, während in den Kulturen vorkommende CD11c⁺B220⁻CD11b⁻ cDC¹⁹⁷ nicht zur IFN Produktion beitragen.

Um zu untersuchen, ob durch MVA Infektion der Aktivierungszustand von DC Kulturen beeinflusst wird, wurden Flt3-L pDC und GM-CSF mDC für 16 h mit MVA (MOI 1) infiziert und anschließend hinsichtlich der Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD86 mittels durchflusszytometrischer Analysen untersucht. Hierbei ließ sich eine verstärkte Expression von CD69 sowie CD86 auf CD11c⁺B220⁺ pDC nachweisen (Abbildung 4.2B).

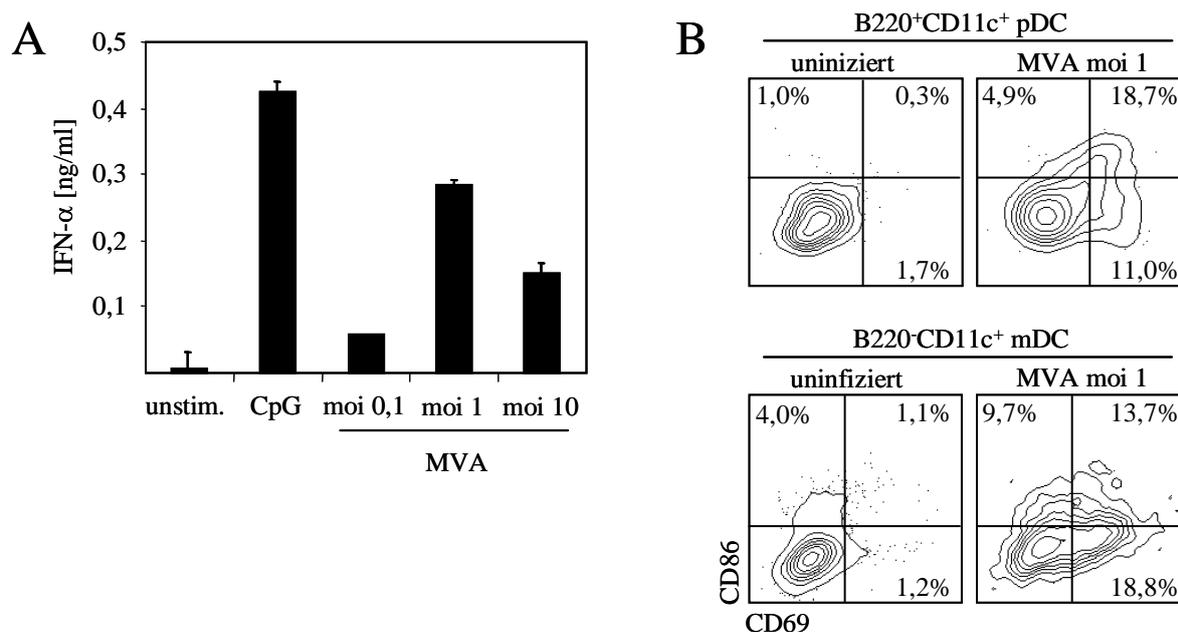


Abbildung 4.2: DC werden durch MVA-Infektion aktiviert. (A) B220⁺CD11c⁺ pDC wurden aus Flt3-L pDC Kulturen mittel *magnetic cell separation* (MACS) angereichert und je 2×10^5 Zellen pro 200 μ l mit MVA in den angegebenen MOIs infiziert. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellkulturüberstände geerntet und mittels ELISA der IFN- α Gehalt analysiert. Als Kontrolle wurden Überstände uninfizierter Zellen (unstim.) und Überstände CpG2216-stimulierter Zellen (CpG) verwendet. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (B) Flt3-L pDC und GM-CSFmDC Kulturen wurden mit MVA (MOI 1) infiziert und 16 h nach Infektion hinsichtlich der Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD86 analysiert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Somit läßt sich zusammenfassen, dass im Gegensatz zu VACV-infizierten Mäusen Mäuse, die mit MVA infizierte wurden systemische IFN- α Antworten zeigen. *In vitro* Experimente konnten belegen, dass MVA-infizierte Flt3-L pDC sehr hohe Mengen an IFN- α sekretieren, und zudem die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD86 auf CD11c⁺B220⁺ pDC durch eine MVA Infektion induziert wird.

4.1.2. Die MVA-vermittelte IFN- α Induktion in DCs geschieht unabhängig von produktiver Infektion, viraler Replikation und intermediärer oder später viraler Genexpression.

Um die Bedingungen, die zu einer MVA-vermittelten Induktion von IFN- α führten, zu untersuchen, wurde im Folgenden analysiert, ob eine produktive Infektion von DC-Kulturen notwendig ist. Hierfür wurden DC mit MVA in einer MOI von 0,1 infiziert und dann nach 1 h, 24 h und 48 h die Anzahl der viralen Partikel (Titer) in Überständen der MVA-infizierten

Flt3-L pDC sowie GM-CSF mDC analysiert. Hierfür wurden die geernteten Überstände auf Hühnerembryofibroblasten (*chicken embryo fibroblast*; CEF) inkubiert. Da MVA über die Passagierung auf CEFs generiert wurde, findet in diesem Zelltyp eine produktive Infektion statt und ermöglicht es so den Titer zu ermitteln. Durch den Vergleich der initialen Infektionsdosis mit dem ermittelten Titer lassen sich Rückschlüsse auf eine stattfindende produktive Infektion in DC ziehen. Als Kontrolle dienten Überstände MVA-infizierter CEF-Zellen. Es zeigt sich keine Zunahme der Anzahl viraler Partikel in den Überständen MVA-infizierter DC-Kulturen 48 h nach Infektion, wohingegen die Kontrolle der MVA-infizierten CEF-Zellen eine deutliche Zunahme an Viruspartikeln aufweist (exponentieller Anstieg um 3 log-Stufen, siehe Abbildung 4.3A). Somit ist für die Produktion von IFN- α durch DCs keine produktive Infektion der Zellen nötig.

Anschließend sollte untersucht werden, ob für die MVA-vermittelte Induktion von IFN- α die Synthese neuer viraler Gene erforderlich ist. Hierfür wurden DCs mit in unterschiedlichen Dosen UV-bestrahltem MVA in einer MOI von 1 infiziert. Mittels ELISA wurde 24 h nach Infektion der IFN- α Gehalt im Überstand der Zellen bestimmt. Verglichen mit einer Infektion von Flt3-L pDC oder GM-CSF mDC mit unbestrahltem Virus, induzierte die Infektion mit niedrigen Dosen UV-bestrahltem MVA einen Anstieg der IFN- α Sekretion. Bei zunehmender Bestrahlungsdosis nahm die Menge an sekretiertem IFN- α jedoch wieder ab, so daß sich in Abhängigkeit zur Bestrahlungsdosis von MVA eine „glockenförmige“ Kurve der IFN- α Sekretion abzeichnete (Abbildung 4.3B). Dieser Befund weist darauf hin, dass die Induktion der IFN- α Produktion ebenfalls unabhängig von neu synthetisierten viralen Genen erfolgt.

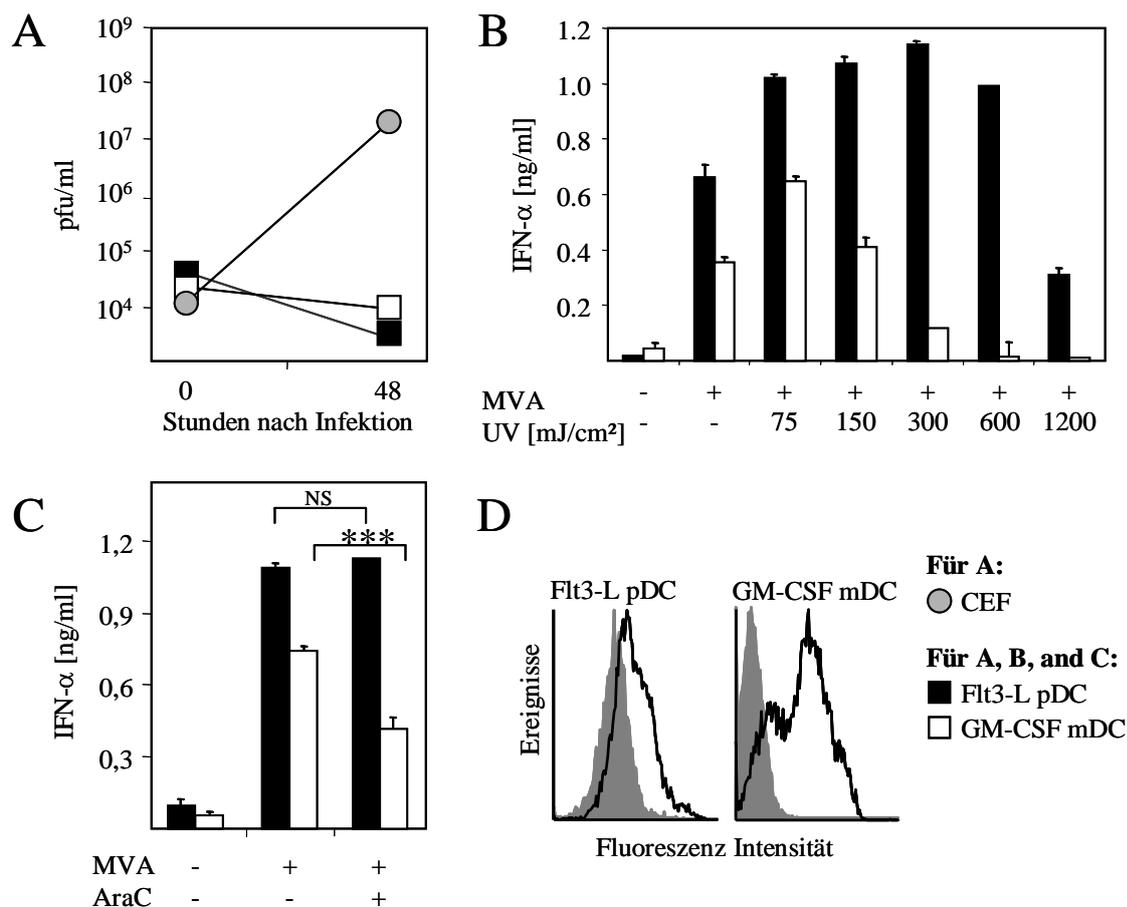


Abbildung 4.3: Die Produktion von IFN- α durch Flt3-L und GM-CSF DC erfordert weder eine produktive Infektion noch virale Replikation. (A) Flt3-L differenzierte pDC-Kulturen oder GM-CSF differenzierte mDC-Kulturen wurden mit MVA (MOI 0,1) infiziert. Anschließend wurden Zellen inklusive des Zellkulturüberstands 1 h und 48 h nach Infektion geerntet. Diese Zellsuspensionen wurden auf Hühnerembryofibroblasten (CEF) titriert. Als Kontrolle wurden Zellsuspensionen 1 h und 48 h MVA-infizierter CEFs verwendet. (B) Flt3-L pDC und GM-CSF mDC wurden mit unbestrahltem und mit in den angegebenen Dosen UV-bestrahltem MVA (MOI 1) infiziert und die Zellkulturüberstände 24 h nach Infektion hinsichtlich des Gehaltes an IFN- α mittels ELISA analysiert. (C) Flt3-L pDC (schwarze Balken) oder GM-CSF mDC (weiße Balken) wurden für 2 h mit AraC (40 μ g/ml) präinkubiert und anschließend mit MVA in einer MOI 1 infiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit MVA ohne eine Präinkubation mit AraC infiziert. Die Zellkulturüberstände wurden 24 h nach Infektion mittels ELISA hinsichtlich des IFN- α Gehaltes analysiert. (D) Zur Analyse der Expression viraler Proteine wurden Flt-L pDC und GM-CSF mDC für 18 h mit MVA infiziert und anschließend mit α -CD11c-APC, α -B220-PECy5.5, α -CD11b-PacBlue, sowie polyklonalem aufgereinigtem VIG (nähere Information siehe Material und Methoden) gefärbt. Gezeigt ist die Fluoreszenz-Intensität der Expression MVA-spezifischer Oberflächenproteine von CD11c⁺B220⁺ Flt3-L pDC oder CD11c⁺CD11b⁺ GM-CSF mDC. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Für statistische Analysen wurden die p-Werte anhand der des T-Tests für unverbundene Stichproben ermittelt (0,05 > p > 0,01 *; 0,01 > P > 0,001 **; P > 0,001 ***; NS= nicht signifikant).

Um die Relevanz des viralen Replikationszyklus, sowie der Expression intermediärer und später viraler Gene für die IFN- α Induktion zu ermitteln, wurden MVA-infizierte DC-Kulturen mit Cytosine- β -d-arabinofuranoside (AraC) präinkubiert. AraC inhibiert die DNA Replikation und folglich findet keine Expression intermediärer oder später viraler Gene statt.

Im Vergleich zu unbehandelten MVA-infizierten Flt3-L pDC zeigte sich, dass die Präinkubation mit AraC keinen Einfluss auf die MVA-vermittelte IFN- α Sekretion von Flt3-L pDC besitzt. MVA-infizierte GM-CSF mDC hingegen zeigten bei Präinkubation mit AraC eine Reduktion der IFN- α Antwort (Abbildung 4.3C). Es sollte nun untersucht werden, ob DC-Kulturen durch MVA infizierbar sind und somit virale Proteine von infizierten DCs exprimiert werden. Hierfür wurden Virus-spezifische Proteine MVA-infizierter Zellen mit polyklonalem, aufgereinigtem anti-VACV Immunoglobulin (VIG, siehe Material und Methoden) in Kombination mit einem F(ab)₂-Fragment, das mit PE konjugiert war 18 h nach Infektion gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurden DCs alleine mit dem F(ab)₂-Fragment behandelt (graue gefüllte Linie, Abbildung 4.3D). Es zeigte sich, dass nach MVA Infektion auf der Oberfläche beider DC-Subtypen die Expression viraler Proteine nachweisbar war (schwarze Linie Abbildung 4.3D).

Die MVA-vermittelte IFN- α Produktion durch Flt3-L pDC erfolgte somit unabhängig von einer produktiven Infektion oder viraler Replikation. Des Weiteren war keine Expression intermediärer oder später Gene erforderlich. Im Gegensatz dazu scheint bei GM-CSF mDC die späte und intermediäre Genexpression für die Induktion von IFN- α Antworten erforderlich zu sein.

4.1.3. Die IFN- α Induktion durch MVA ist unabhängig von Toll-ähnlichen Rezeptoren

Als nächstes stellte sich die Frage, über welchen zellulären Mechanismus die MVA-vermittelte IFN- α Produktion induziert wird. Hierfür wurden Flt3-L pDC aus Mäusen, die eine Defizienz für Komponenten des TLR-Systems aufweisen (*knockout* Tiere; KO) generiert. Als Kontrolle wurden für alle Experimente WT Tiere hinzugezogen. Es wurden hierfür Flt3-L pDC aus KO-Mäusen, die defizient für TLR9 (TLR9^{-/-} Mäuse), MyD88 (MyD88^{-/-} Mäuse) oder TRIF (TRIF^{-/-} Mäuse) sind generiert. TLR9 ist in den Endosomen lokalisiert und vermittelt die Erkennung CpG-Motiv-enthaltender dsDNA. Die Detektion von MVA, welches ein doppelsträngiges DNA Genom besitzt, könnte somit über diesen TLR erfolgen. MyD88 und TRIF sind TLR-Adaptormoleküle und somit essentielle Komponenten, um eine Signalgebung über das TLR-System zu ermöglichen.

Flt3-L pDC wurden mit MVA in einer MOI von 1 infiziert, mit 10 µg/ml CpG2216 stimuliert oder mit 2 µg Poly I:C transfiziert. Doppelsträngige, synthetisch hergestellte DNA-Oligonukleotide, die einen hohen Anteil CpG-reicher Motive aufweisen, werden als CpG bezeichnet und dienen als Stimulus für TLR9. PolyI:C (*polyribocytidylic acid*) ist ein synthetisches Analog zu dsRNA und kann als Stimulus für TLR3 oder RIG-like helicases (RLRs) eingesetzt werden.¹⁹⁸⁻²⁰² Nach 24 h Inkubation wurden die Zellkulturüberstände der unterschiedlich stimulierten Zellen hinsichtlich des IFN-α Gehaltes analysiert. Als Kontrolle wurden Überstände unstimulierter Flt3-L pDC verwendet. Im Vergleich zu MVA-infizierten WT Flt3-L pDC zeigten TLR9^{-/-} Flt3-L pDCs vergleichbare Mengen IFN-α im Überstand. Obwohl MVA ein dsDNA-kodiertes Virus ist, erfolgt somit die Induktion einer IFN-α Antwort nach Infektion von Flt3-L pDC nicht über TLR9. Im Vergleich zu WT Flt3-L pDC zeigten MyD88^{-/-} Flt3-L pDC nach MVA Infektion jedoch eine Reduktion der IFN-α Antwort. MyD88, als Adaptormolekül für die Signaltransduktion von TLR1, 2 und 4-13 verantwortlich, scheint somit einen Einfluss auf die MVA-induzierte IFN-α Sekretion zu besitzen.

Als Intermediat viraler Replikation wird von vielen infizierten Zellen dsRNA gebildet. Diese kann von TLR3 wahrgenommen werden und somit über das Adaptomolekül TRIF zur Induktion von IFN-α führen. Die Stimulation von TRIF-defizienten Flt3-L pDC mit poly I:C zeigte somit keine Induktion von IFN-α. Im Gegensatz dazu zeigten MVA-infizierte TRIF^{-/-} Flt3-L pDC eine ähnliche IFN-α Produktion im Vergleich zu WT Flt3-L pDC. Dies weist darauf hin, dass TRIF keine entscheidende Rolle bei der Induktion MVA-vermittelter IFN-α Antworten besitzt (Abbildung 4.4A).

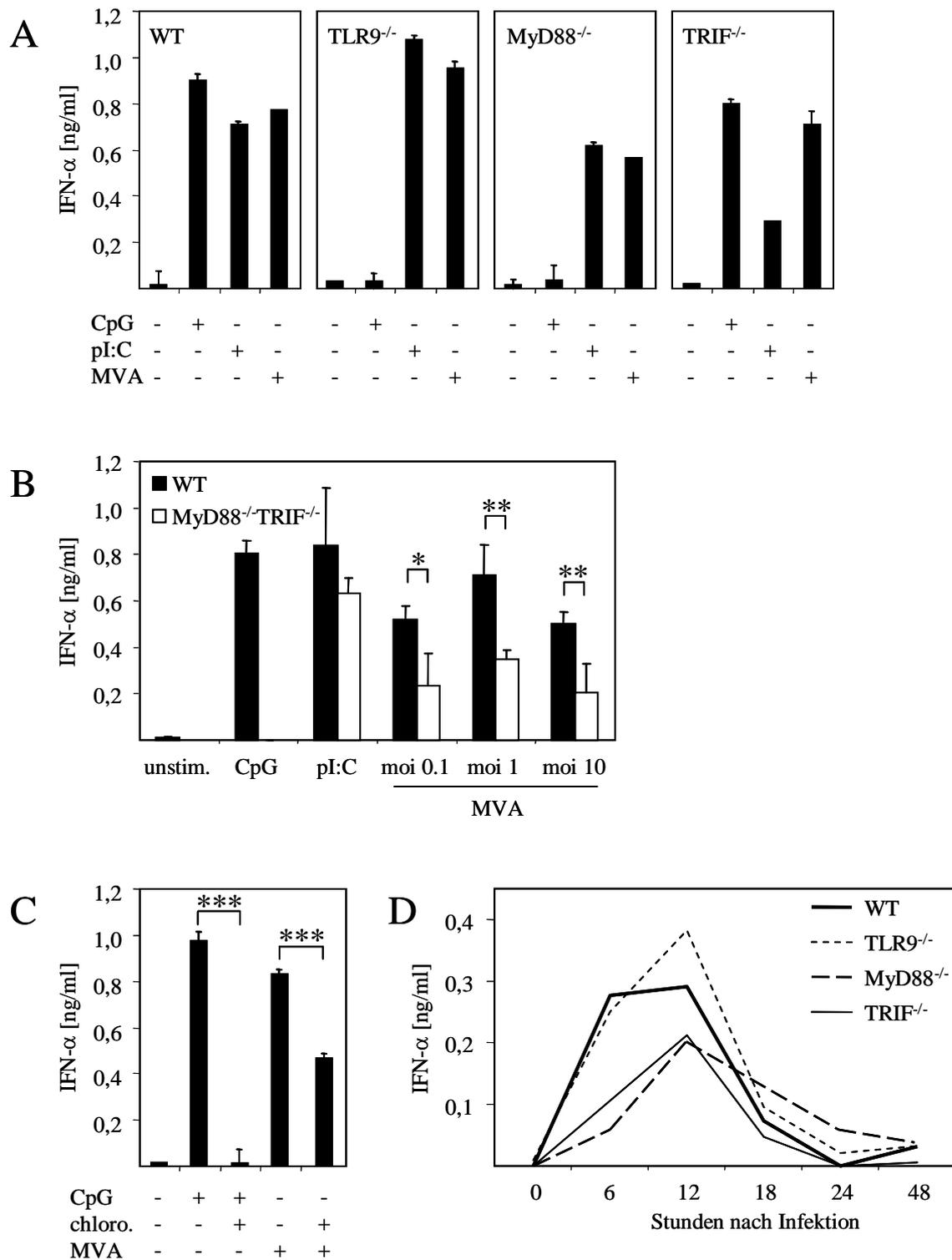


Abbildung 4.4: Die IFN- α Induktion durch MVA ist weitgehend unabhängig von TLRs. (A) Es wurden aus WT, TLR9^{-/-}, MyD88^{-/-} oder TRIF^{-/-} Mäusen Flt3-L pDC generiert und die Zellen mit MVA (MOI 1) infiziert, mit CpG2216 (CpG; 10 μ g/ml) stimuliert oder mit poly I:C (pI:C; 2 μ g) transfiziert (Fugene Transfektionsreagenz). Nach 24 h Inkubation wurde der IFN- α Gehalt im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen (unstim.). (B) Es wurden aus WT oder MyD88^{-/-}TRIF^{-/-} Mäusen Flt3-L pDC generiert und diese mit MVA in den angegebenen MOI infiziert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit CpG2216 stimuliert oder unstimulierte Zellen verwendet. Die Zellkulturüberstände wurden nach 24 h

geerntet und hinsichtlich der IFN- α Expression mittels ELISA analysiert. (C) Flt3-L pDC aus WT Mäusen wurden mit MVA (MOI 1) infiziert. Als Kontrolle wurden uninfizierte Flt3-L pDC oder CpG2216-stimulierte Flt3-L pDC verwendet. Bei den angegebenen Werten (+) wurden Flt3-L pDC zusätzlich mit Chloroquine (chloro.; 10 μ M) für 2 h präinkubiert. Zellkulturüberstände wurden 24 h nach Infektion hinsichtlich der IFN- α Expression mittels ELISA analysiert. (D) WT, TLR9^{-/-}, MyD88^{-/-} oder TRIF^{-/-} Mäuse wurden mit 1x10⁷ pfu MVA infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion Serumproben entnommen. Diese wurden im ELISA hinsichtlich des IFN- α Gehaltes untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 2-4 durchgeführte Experimente. Für statistischen Analysen wurden die p-Werte anhand des t-Tests für unverbundene Stichproben ermittelt (NS= nicht signifikant; 0,05 > p > 0,01 *; 0,01 > p > 0,001 **; p > 0,001 ***, t-Test für unverbundene Stichproben).

Als nächstes wurden Flt3-L pDCs aus Mäusen generiert, die eine Defizienz für MyD88 und TRIF aufweisen (MyD88^{-/-}TRIF^{-/-}Mäuse), und somit kein funktionales TLR-System besitzen. Die Infektion dieser Zellen mit MVA in unterschiedlichen MOIs zeigte eine Reduktion der IFN- α Expression im Vergleich zu der von WT Flt3-L pDC (Abbildung 4.4B). Dennoch sind Flt3-L pDC ohne funktionales TLR System dazu in der Lage IFN- α zu produzieren.

Die Detektion von Viren oder anderen Stimuli durch TLRs, die in den Endosomen lokalisiert sind^{6,9,10,105,107,120}, erfordert einen niedrigen pH Wert in den Endosomen. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob für die Detektion von MVA und die dadurch induzierte IFN- α Produktion eine endosomale Ansäuerung notwendig ist. Hierfür wurden Flt3-L pDC mit MVA alleine oder in Kombination mit Chloroquin stimuliert und die Zellkulturüberstände 24 h nach Infektion hinsichtlich der IFN- α Produktion analysiert. Chloroquin neutralisiert den pH Wert innerhalb der Vesikel, wodurch Zellen unter Zugabe von Chloroquin keine TLR3-, 7/8- und 9-abhängige IFN Induktion vermitteln. Als Kontrolle wurden Flt3-L pDC mit CpG2216 stimuliert, welches TLR9-abhängig die Produktion von IFN- α induziert.^{131,203,204} Bei Co-Stimulation von Flt3-L pDC mit CpG2216 und Chloroquin wurden nach 24 h Inkubation keine messbaren Mengen IFN- α im Zellkulturüberstand detektiert. Verglichen mit MVA-infizierten Flt3-L pDC zeigten mit Chloroquin vorbehandelte Flt3-L pDC nach MVA Infektion eine ~40%ige Reduktion der IFN- α Antwort (Abbildung 4.4C).

Zusammenfassend findet die MVA-induzierte Produktion von IFN- α unabhängig vom DNA-detektierenden TLR9 statt. Des Weiteren ist die IFN- α Induktion unabhängig vom Adaptormolekül TRIF. Allerdings haben das Adaptormolekül MyD88 sowie die endosomale Ansäuerung einen Einfluss auf die MVA-vermittelte Induktion von IFN- α .

Um nun die Relevanz TLR-abhängiger Mechanismen bei der IFN Induktion *in vivo* zu analysieren, wurden Mäuse, die defizient für MyD88, TRIF oder TLR9 sind, mit 1x10⁷ pfu MVA infiziert und der IFN- α Gehalt im Serum der Tiere ermittelt (Abbildung 4.4D). Nach

Infektion von WT Mäusen mit MVA zeigten die Tiere 12 h nach Infektion ca. 0,3 ng/ml IFN- α im Serum. Nach 24 h ist jedoch kein IFN- α im Serum der Tiere mehr detektierbar. In Korrelation zu den *in vitro* erhobenen Daten zeigen TLR9^{-/-} Mäuse im Vergleich zu WT Tieren keine Reduktion der systemischen IFN- α Antwort nach MVA Infektion. MVA-infizierte TRIF^{-/-} sowie MyD88^{-/-} Mäuse zeigten nur leicht reduzierte Mengen an IFN- α im Serum, was daraufhin weist, dass vergleichbar zu den *in vitro* Daten die Detektion von MVA zum einem großen Teil unabhängig von TLR-vermittelten Signalwegen erfolgt.

4.1.4. Der Typ I Interferon Rezeptor (IFNAR), jedoch nicht die Expression von IFN- β , spielt eine entscheidende Rolle bei der MVA-induzierten IFN- α Produktion

Die Rolle eines positiven Rückkopplungsmechanismus (*feedback loop*) bei der IFN- α Produktion über den Typ I IFN Rezeptor (IFNAR) wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Insbesondere für pDC wurde ein *feedback*-unabhängiger Signalweg postuliert, bei dem u.a. TLRs, IRAK4, TRAF6 und IRF7 involviert sind.^{90,91} Um die Rolle dieses *feedback-loops* bei MVA-induzierten IFN- α Antworten zu untersuchen, wurden Flt3-L pDC aus WT, IFNAR-defizienten Mäusen (IFNAR^{-/-}) und IFN- β -defizienten Mäusen (IFN- β ^{-/-}) mit MVA mit einer MOI von 1 infiziert. Als Kontrolle dienten Überstände CpG2216- oder poly I:C-stimulierter Flt3-L pDC, sowie Überstände unstimulierter Zellen. IFN- β ^{-/-} Flt3-L pDC produzierten nach MVA Infektion IFN- α Mengen, die mit denen von WT Flt3-L pDC vergleichbar sind. Im Gegensatz dazu, sind im Überstand MVA-infizierter IFNAR^{-/-} Flt3-L pDC keine messbaren Mengen an IFN- α detektierbar (Abbildung 4.5A). Um zu überprüfen, ob IFNAR^{-/-} Flt3-L pDC nach entsprechender Stimulation andere Zytokine produzieren können, wurden sie hinsichtlich ihrer Interleukin (IL)-12p70 Produktion analysiert. Nach Stimulation mit CpG2216 zeigten IFNAR-defiziente und WT Flt3-L pDC vergleichbare Mengen an IL12p70 (Daten nicht gezeigt). In Korrelation zu den *in vitro* Daten zeigten IFN- β ^{-/-} Mäusen und WT Mäuse nach MVA Infektion eine vergleichbare IFN- α Produktion. Im Gegensatz dazu waren bei einer Infektion IFNAR-defizienter Mäuse keine messbaren Mengen an IFN- α im Serum detektierbar (Abbildung 4.5B).

Die MVA-vermittelte IFN- α Sekretion erfolgt somit unabhängig von der Expression von IFN- β , jedoch ist die Signalgebung über den IFNAR zwingend erforderlich. Das gilt sowohl für *in vitro* infizierte Flt3-L pDC, als auch für MVA-induzierte IFN- α Antworten *in vivo*.

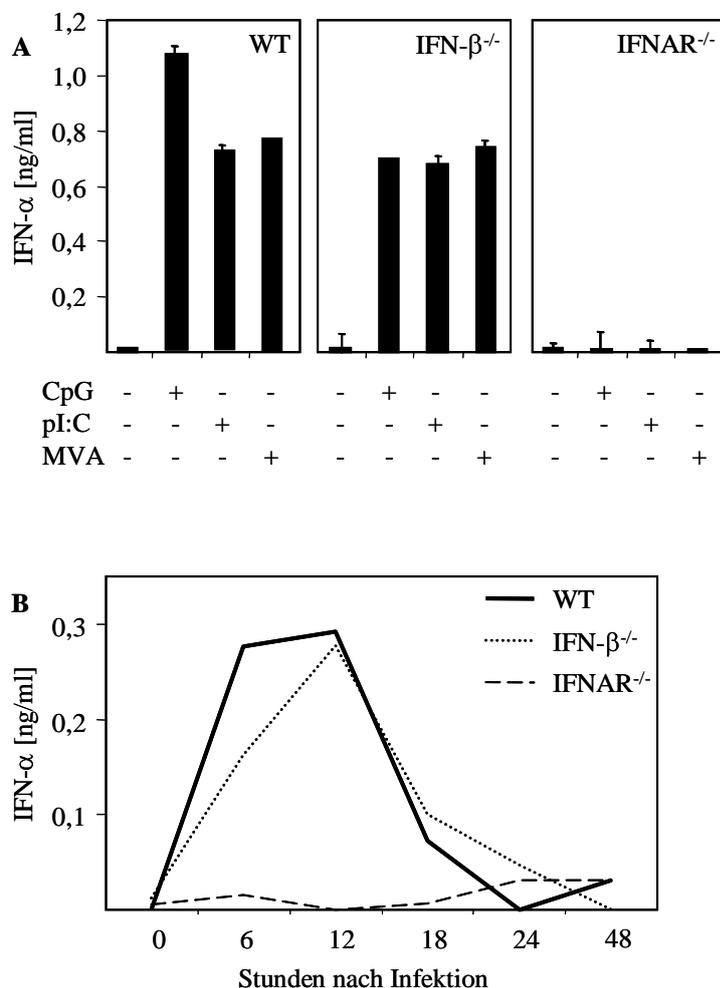


Abbildung 4.5: Der IFNAR, jedoch nicht die Expression von IFN- β , spielt eine entscheidende Rolle bei der MVA-vermittelten IFN- α Induktion. (A) Es wurden Flt3-L pDC aus WT-, IFN- $\beta^{-/-}$ - und IFNAR $^{-/-}$ -Mäusen generiert und mit MVA in einer MOI von 1 infiziert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit CpG2216 (CpG; 10 μ g/ml) stimuliert oder mit poly I:C (pI:C; 2 μ g) transfiziert (Fugene Transfektionsreagenz). Die Zellkulturüberstände wurden 24 h nach Infektion hinsichtlich des IFN- α Gehaltes mittels ELISA analysiert. (B) WT-, IFN- $\beta^{-/-}$ - und IFNAR $^{-/-}$ -Mäuse wurden mit 1×10^7 pfu MVA infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Serumproben entnommen. Diese wurden im ELISA hinsichtlich des IFN- α Gehaltes untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 2-4 durchgeführte Experimente.

4.2. Inhibition von Typ I Interferon Antworten durch Infektion mit Vaccinia Virus (VACV)

Pockenviren besitzen vielfältige Strategien, um eine sogenannte „Immunflucht“ zu begehen.^{10,144-146} Sie besitzen ein großes dsDNA Genom und kodieren für über 200 offene Leserahmen (*open reading frames*, ORF). VACV kodiert u.a. für Immunmodulatoren, die als Zytokinanaloge oder als lösliche Rezeptoren agieren. Diese sind dazu in der Lage, Komplementfaktoren, Zytokine oder Chemokine zu binden. Es wurden VACV-kodierte Rezeptor-Homologe für IL-1 β , Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IFN- α/β und IFN- γ beschrieben.^{144,156,157,169,171,205} Zudem exprimiert VACV Immunmodulatoren, die antagonistisch auf zelluläre Signalwege, wie beispielsweise das TLR-System, wirken und somit einen möglichen Einfluss auf die Induktion von Typ I IFN nehmen. Dennoch ist bislang nicht bekannt, ob VACV-kodierte Immunmodulatoren eine Relevanz *in vivo* besitzen. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob durch die Infektion mit VACV die Typ I IFN Induktion in pDC inhibiert werden kann. Daher soll in diesem Abschnitt die VACV-vermittelte Inhibition der Typ I IFN Produktion charakterisiert, sowie VACV-kodierte Immunmodulatoren identifiziert werden.

4.2.1. VACV inhibiert MVA-induzierte Typ I IFN Antworten

Wie bereits in Abschnitt 3.2.1 gezeigt, induziert VACV im Gegensatz zu attenuiertem MVA weder nach Infektion von Mäusen noch nach *in vitro* Stimulation von Flt3-L pDC detektierbare Mengen an IFN- α (siehe Abbildung 4.1A, 1B). Es stellte sich daher die Frage, ob die Abwesenheit einer IFN- α Antwort nach VACV Infektion durch die mangelnde Fähigkeit zur Induktion von IFN- α oder durch einen aktiv inhibierenden Mechanismus des Virus erfolgt. Daher wurde im Folgenden der Einfluss einer VACV Infektion auf die MVA-vermittelte IFN Produktion untersucht. Es wurden Mäuse mit 1×10^7 pfu VACV, 1×10^7 pfu MVA oder mit einer Kombination aus 1×10^7 pfu VACV und 1×10^7 pfu MVA infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Serumproben entnommen und anschließend mittels ELISA hinsichtlich des IFN- α Gehaltes analysiert. Während MVA-infizierte Mäuse ca. 0,2 ng/ml IFN- α im Serum 6 h nach Infektion aufweisen, zeigten VACV-infizierte Mäuse keine detektierbaren Mengen IFN- α . Interessanterweise, lässt sich bei Mäusen, die mit VACV und

MVA coinfiziert wurden, zu keinem der getesteten Zeitpunkte IFN- α im Serum nachweisen (Abbildung 4.6A). Werden Mäuse mit 1×10^5 pfu VACV in Kombination mit 1×10^7 MVA infiziert, lässt sich eine deutliche Reduktion, jedoch keine komplette Inhibition, der MVA-vermittelten IFN- α Induktion beobachten (Daten nicht gezeigt). In einem nächsten Schritt wurden Flt3-L pDC mit VACV und MVA in einer MOI von 1 coinfiziert und die Zellkulturüberstände 24 h nach Infektion im ELISA hinsichtlich der IFN- α Expression untersucht. Als Kontrolle dienten Zellkulturüberstände MVA- sowie VACV-infizierter Flt3-L pDCs. In Übereinstimmung mit den *in vivo* erhobenen Daten (Abbildung 6A), resultiert die Coinfektion von MVA-infizierten Flt3-L pDC mit VACV in einer kompletten Inhibition der IFN- α Produktion (Abbildung 4.6B). Dies weist auf einen VACV-vermittelten, aktiv inhibierenden Mechanismus hin, welcher zu einer Inhibition der MVA-vermittelten IFN- α Induktion führt.

Um zu untersuchen, ob zu der VACV-vermittelte Inhibition der MVA induzierten IFN- α Produktion intermediäre oder späte Genprodukte des Virus beigetragen, erfolgte vor der Infektion eine Präinkubation der Zellen mit AraC. Wie bereits in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, ist AraC ein Inhibitor der DNA Replikation. Die Zellkulturüberstände wurden anschließend mittels ELISA hinsichtlich der Typ I IFN Produktion analysiert. Zellkulturüberstände VACV-infizierter Zellen, die mit AraC behandelt wurden, zeigten vergleichbare IFN- α/β Antworten wie unbehandelte VACV-infizierte Zellen (Abbildung 4.6C). Daraus lässt sich schließen, dass VACV-kodierte Inhibitoren der Typ I IFN Antwort weder von intermediären noch späten viralen Genen kodiert werden. Zur Untersuchung, ob die VACV-vermittelte Inhibition der MVA-induzierten Typ I IFN Antwort durch neu synthetisierte virale Genprodukte erfolgt, wurden Flt3-L pDC mit UV-bestrahltem (75 mJ) VACV infiziert und 24 h nach Infektion hinsichtlich ihrer Typ I IFN Produktion analysiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit unbestrahltem VACV, sowie UV-bestrahltem (75 mJ) und unbestrahltem MVA infiziert (Abbildung 4.6D). Die Produktion von IFN- α bzw. IFN- β durch Flt3-L pDC war hierbei nach Infektion mit MVA oder UV-bestrahltem VACV vergleichbar. Dies weist darauf hin, dass die VACV-vermittelte Inhibition der Typ I IFN Induktion von frühen, neu synthetisierten Genprodukten des Virus kodiert wird.

Wie bereits in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, ist die IFN- α Induktion von Flt3-L pDC nach Infektion mit UV-bestrahltem MVA im Vergleich zu der nach Infektion mit unbestrahltem MVA signifikant erhöht.

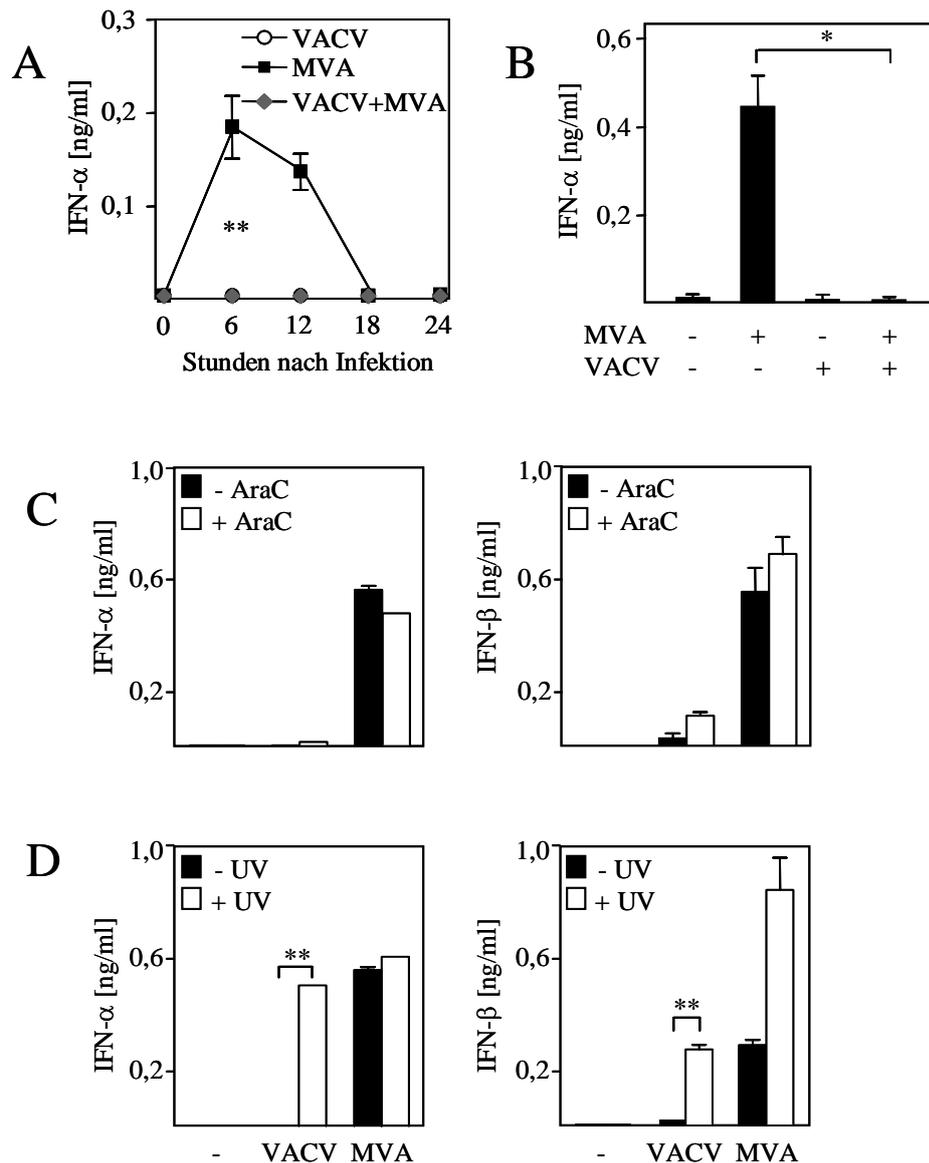


Abbildung 4.6: Die Infektion mit VACV inhibiert MVA-induzierte IFN- α Antworten. (A) Es wurden WT Mäuse mit 1×10^7 pfu MVA oder 1×10^7 pfu VACV oder beiden Viren coinfiert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion Serumproben entnommen. Diese wurden im ELISA hinsichtlich des IFN- α Gehaltes untersucht. (B) Flt3-L pDC wurden mit MVA oder VACV in einer MOI von 1 oder mit beiden Viren coinfiert. Die Zellkulturüberstände wurden 24 h nach Infektion geerntet. Als Kontrolle wurden Zellkulturüberstände uninfizierter Flt3-L pDC verwendet (-). Diese wurden im ELISA hinsichtlich der IFN- α Expression analysiert. (C) Flt3-L pDC wurden mit VACV oder MVA in der MOI von 1 alleine oder in Anwesenheit von AraC (40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) infiziert und 24 h nach Infektion die Zellkulturüberstände geerntet. Als Kontrolle wurden Zellkulturüberstände uninfizierter Flt3-L pDC verwendet. Diese wurden im ELISA hinsichtlich der IFN- α Expression analysiert. (D) Flt3-L pDC wurden mit unbestrahltem oder UV-bestrahltem (75 mJ) VACV oder MVA in der MOI von 1 infiziert und 24 h nach Infektion die Zellkulturüberstände geerntet. Als Kontrolle wurden Zellkulturüberstände uninfizierter Flt3-L pDC verwendet. Diese wurden im ELISA hinsichtlich der IFN- α Expression analysiert. Für statistischen Analysen wurden die p-Werte anhand des t-Test für unverbundene Stichproben ermittelt (NS= nicht signifikant; $0,05 > p > 0,01$ *; $0,01 > p > 0,001$ **; $p > 0,001$ ***, t-Test für unverbundene Stichproben).

4.2.2. VACV-kodierte Immunmodulatoren sind schrittweise bei der Attenuierung von MVA verloren gegangen

Betrachtet man die hohe Anzahl der bislang beschriebenen, von VACV-kodierten Immunmodulatoren^{144,156,157,168,169}, stellte sich die Frage, ob bei der Attenuierung von MVA eine Ansammlung von Mutationen zum schrittweisen Verlust der Fähigkeit zur Inhibition des Typ I IFN geführt haben. MVA wurde zur Herstellung eines sicheren Impfstammes durch die Passagierung des Chorioallantois Vaccinia Virus Ankara (CVA) auf Hühnerembryofibroblasten generiert.^{182,185} Zur Beantwortung dieser Frage wurden Flt3-L pDC mit zwei Zwischenpassagen der Attenuierung von MVA (Passage >570), der Passage 152 (CVA152) sowie der Passage 386 (CVA386) infiziert und die Menge an Typ I IFN im Zellkulturüberstand 24 h nach Infektion der Zellen ermittelt. Als Kontrolle wurden Zellkulturüberstände uninfizierter Zellen, sowie CpG2216-stimulierter Zellen verwendet. Eine Infektion von Flt3-L pDC mit VACV oder mit CVA152 induziert weder die Expression von IFN- α noch von IFN- β 24 h nach Infektion. Im Gegensatz dazu zeigten CVA386-infizierte Flt3-L pDC eine Produktion von ca. 0,8 ng/ml IFN- β . Jedoch produzieren Flt3-L pDC nach Infektion mit CVA386 keine detektierbaren Mengen an IFN- α . MVA induziert Flt3-L pDCs zur Produktion von IFN- α/β (Abbildung 4.7A). Durch den schrittweisen Verlust der Fähigkeit, Typ I IFN Antworten zu inhibieren, lässt sich darauf schließen, dass die Inhibition der Typ I IFN Antwort über multiple Mechanismen erfolgt und dass Immunmodulatoren für IFN- α und IFN- β existieren. Während die Fähigkeit zur Inhibition der IFN- α Antwort zwischen der Passage CVA386 und MVA (Passage >570) verloren ging, ist die Fähigkeit zur Inhibition von IFN- β Antworten bereits zwischen der Passage CVA152 und der Passage CVA386 nicht mehr vorhanden. Die Attenuierung von MVA hat somit zu einem schrittweisen Verlust IFN-inhibierender Immunmodulatoren geführt. Wie bereits in Abbildung 6B beschrieben, führt die Coinfektion MVA-infizierter Zellen mit VACV zu einer kompletten Inhibition der IFN- α Antwort. Des Weiteren wurden nun Coinfektionen von Flt3-L pDC mit den Zwischenpassagen und MVA durchgeführt und die Typ I IFN Produktion ermittelt. Bei einer Coinfektion MVA-infizierter Flt3-L pDC mit CVA152 oder CVA386 wurde die IFN- α Antwort komplett inhibiert. Auch MVA-induzierte IFN- β Antworten wurden durch die Coinfektion mit CVA152 ähnlich wie durch VACV inhibiert. Die Passage CVA386 hingegen

induzierte nach Infektion von Flt3-L pDC die Produktion von IFN- β , während IFN- α Antworten inhibiert wurden (Abbildung 4.7B).

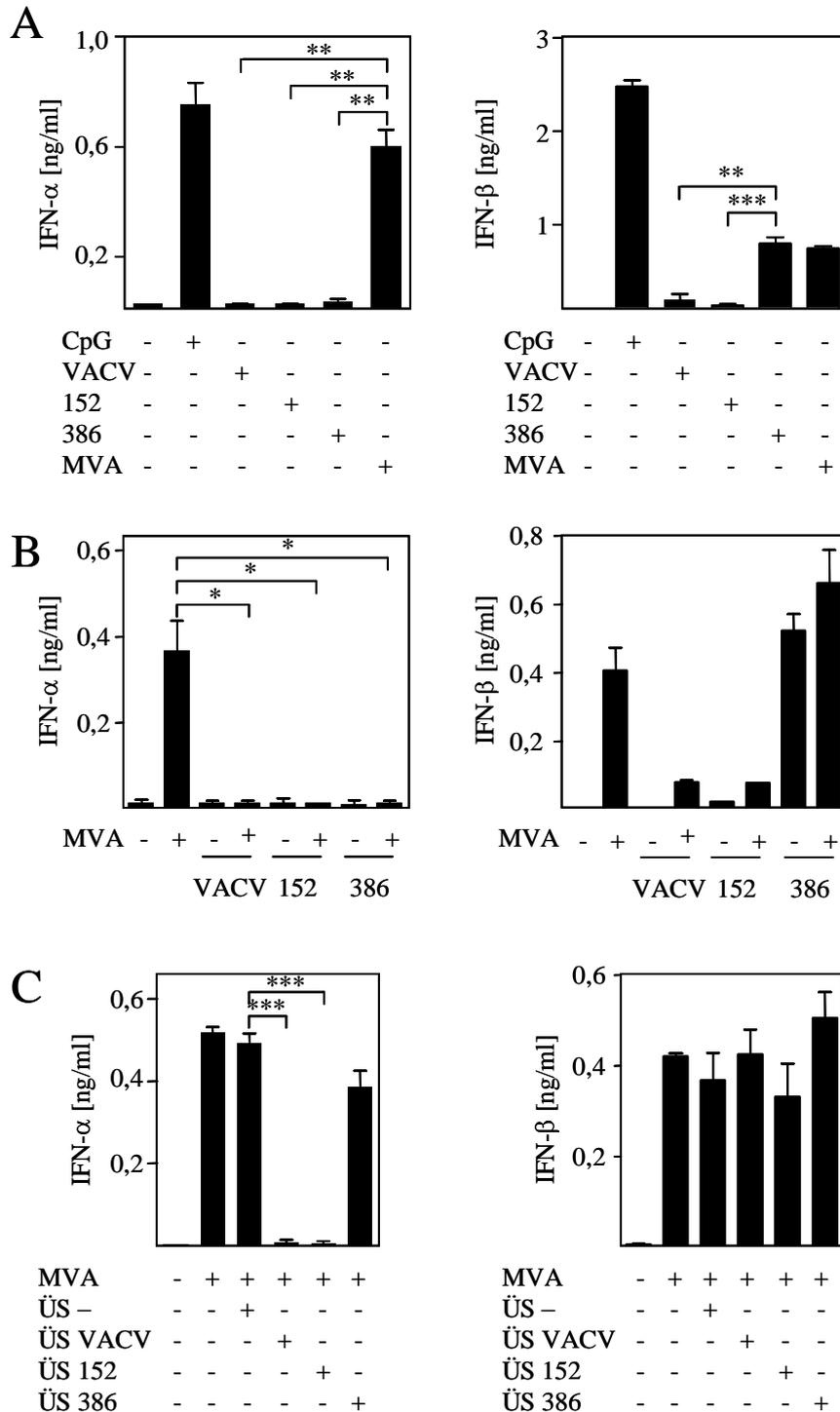


Abbildung 4.7: VACV-kodierte Immunmodulatoren gingen schrittweise bei der Attenuierung von MVA verloren. (A) Flt3-L pDC wurden mit VACV, MVA oder den beiden Zwischenpassagen CVA152 (152) und CVA386 (386) in der MOI von 1 infiziert und 24 h nach Infektion die Zellkulturüberstände geerntet. Als Kontrolle wurden Zellkulturüberstände uninfizierter Flt3-L pDC verwendet. Diese wurden mittels ELISA hinsichtlich der IFN- α und IFN- β Expression analysiert. (B) Flt3-L pDC wurden mit VACV, CVA152 oder

CVA386 alleine oder mit MVA in der MOI von 1 coinfiziert. Als Kontrolle dienten uninfizierte Flt3-L pDC und MVA-infizierte Flt3-L pDC. Die Zellkulturüberstände wurden 24 h nach Infektion geerntet und hinsichtlich des IFN- α und IFN- β Gehaltes mittels ELISA analysiert. (C) Flt3-L pDC wurden für 3 h mit VACV, 152 oder 386 in der MOI von 1 infiziert und die Zellen anschließend intensiv mit Medium gewaschen, um freie Viruspartikel im Zellkulturüberstand zu entfernen. Nach weiteren 21 h Inkubation wurden die Überstände (ÜS) geerntet und für folgende Experimente verwendet. Als Kontrolle wurden Überstände uninfizierter Zellen generiert. Flt3-L pDC wurden mit Überständen VACV- 152-, 386-infizierter Zellen oder mit Überständen uninfizierter Zellen 2 h präinkubiert und anschließend mit MVA in einer MOI von 1 für weitere 22 h infiziert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Flt3-L pDC oder mit MVA in der MOI von 1 infizierte Zellen verwendet. Die Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA hinsichtlich des IFN- α bzw. IFN- β Gehaltes analysiert. Für statistischen Analysen wurden die p-Werte anhand des t-Test für unverbundene Stichproben ermittelt (NS= nicht signifikant; $0,05 > p > 0,01$ *; $0,01 > p > 0,001$ **; $p > 0,001$ ***, t-Test für unverbundene Stichproben).

Um zu analysieren, ob die Inhibition der Typ I IFN Antwort durch sekretierte oder intrazellulär-wirkende Immunmodulatoren vermittelt wird, wurden Überstände VACV-, CVA152- oder CVA386-infizierter Flt3-L pDC hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die IFN- α bzw. IFN- β Sekretion zu inhibieren, getestet. Hierfür wurden Flt3-L pDC für 3 h mit VACV, CVA152 oder CVA385 infiziert und durch intensives Waschen mit frischem Medium alle freien Viruspartikel aus den Zellkulturüberständen entfernt. Nach weiteren 21 h Inkubation in frischem Medium erfolgte anschließend die Ernte der Überstände (ÜS). Durch *Plaque Assay* Analysen auf CEF zeigte sich, dass in diesen Überständen keine freien Viruspartikel mehr vorhanden sind (Daten nicht gezeigt). Dies korreliert mit dem Befund, dass weder VACV, noch CVA152, CVA386 oder MVA zu einer produktiven Infektion von Flt3-L pDC in der Lage sind (Abbildung 4.3A und Daten nicht gezeigt). Im Folgenden wurden Flt3-L pDC mit zuvor generierten VACV-Überständen 2 h präinkubiert, anschließend mit MVA infiziert und hinsichtlich ihrer Typ I IFN Produktion untersucht. Als Kontrolle wurden unbehandelte, MVA-infizierter Zellen oder mit Überständen unstimulierter Zellen präinkubierte Flt3-L pDC verwendet. Die Präinkubation von Flt3-L pDC mit Überständen VACV-, CVA152- oder CVA386-infizierter Zellen induzierte keine Inhibition der MVA-vermittelten IFN- β Produktion. Im Gegensatz dazu produzieren Flt3-L pDC, die mit Überständen VACV- oder CVA152-infizierter Zellen präinkubiert wurden, kein IFN- α nach MVA Infektion (Abbildung 4.7C). Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Inhibition einer IFN- β Antwort nicht durch lösliche Faktoren vermittelt wird und VACV-kodierte Immunmodulatoren der IFN- β Antwort intrazellulär exprimiert werden. Die Inhibition der IFN- α Antwort hingegen erfolgt allein durch die Zugabe des Überstandes VACV-infizierter Zellen. Dies weist darauf hin, dass VACV-kodierte Immunmodulatoren in den Überstand der Zellen nach Infektion sekretiert werden und als lösliche Faktoren die Inhibition von IFN- α vermitteln. Interessanterweise

resultiert die Präinkubation von Flt3-L pDC mit Überständen CVA386-infizierter Zellen nicht in der Inhibition der IFN- α Antwort. Lösliche Faktoren, die nach VACV- und CVA152-Infektion noch exprimiert werden und die Inhibition der IFN- α Antwort vermitteln, scheinen hier nicht mehr aktiv zu sein. Dennoch wird bei direkter Infektion von Flt3-L pDC durch CVA386 keine IFN- α Produktion induziert (siehe Abbildung 4.7A).

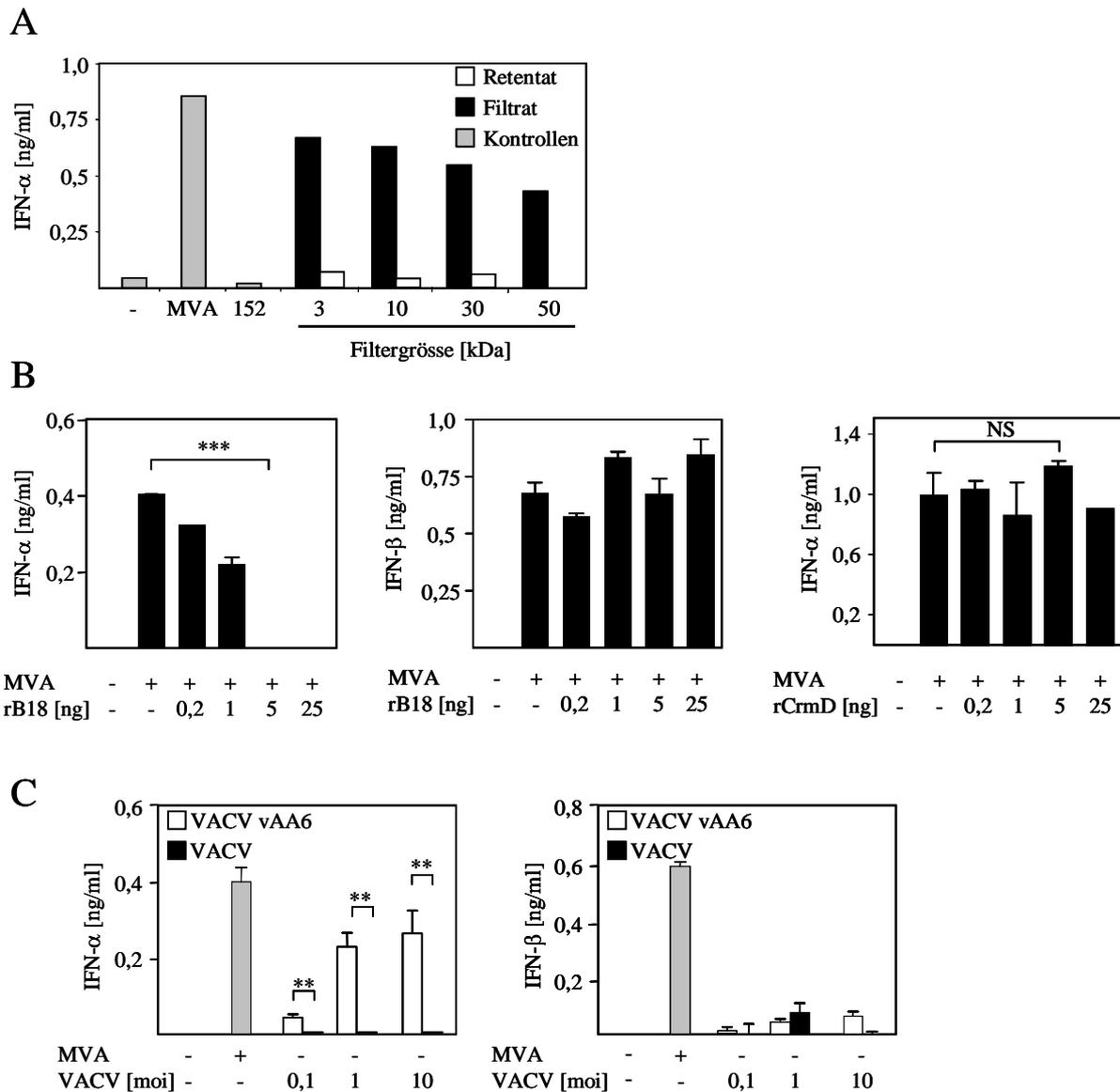


Abbildung 4.8: B18 vermittelt die Inhibition von IFN- α Antworten. (A) Zellkulturüberstände CVA152-infizierter Flt3-L pDC wurden wie in Abb. 7C beschrieben generiert und die Überstände mittels Zentrifugenfiltereinheiten (Centricon) der Größe nach fraktioniert. Es wurden Centriconfilter für 3 kDa, 10 kDa, 50 kDa und 30 kDa eingesetzt und die Filtration nach Herstellerangaben durchgeführt (siehe Material und Methoden). Das jeweilige Filtrat bzw. Retentat der CVA152-Überstände wurde für weitere Stimulationsexperimente verwendet. Hierfür wurden frisch generierte Flt3-L pDC mit dem Filtrat bzw. Retentat 3 h präinkubiert und anschließend für weitere 21 h mit MVA (MOI 1) stimuliert. Als Kontrollen wurden Flt3-L pDC mit MVA (MOI 1) oder CVA152 (MOI 1) infiziert oder nicht infiziert. Der IFN- α Gehalt im Zellkulturüberstand wurde mittel ELISA ermittelt. (B) Flt3-L pDC wurden mit MVA in einer MOI von 1 alleine

infiziert oder in Kombination mit rekombinantem B18 (rB18) in den angegebenen Konzentrationen costimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden 24 h nach Infektion geerntet und mittels ELISA hinsichtlich des IFN- α bzw. IFN- β Gehaltes analysiert (links und mitte). Flt3-L pDC wurden mit MVA in einer MOI von 1 alleine infiziert oder in Kombination mit einem irrelevanten Protein (CrmD) in den angegebenen Konzentrationen costimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden 24 h nach Infektion geerntet und mittels ELISA hinsichtlich des IFN- α Gehaltes analysiert (rechts). (C) Flt3-L pDC wurden mit VACV oder der B18-defizienten VACV-Variante vAA6 in den angegebenen MOIs infiziert und die Zellkulturüberstände 24 h nach Infektion geerntet. Als Kontrolle wurden die Zellkulturüberstände uninifizierter Flt3-L pDC und MVA-infizierter (MOI 1) Flt3-L pDC verwendet. Mittels ELISA wurde der IFN- α bzw. IFN- β Gehalt ermittelt. Für statistische Analysen wurden die p-Werte anhand des t-Test für unverbundene Stichproben ermittelt (NS= nicht signifikant; ***=P< 0,001, t-Test für unverbundene Stichproben).

Um die durch den Überstand VACV- sowie CVA152-infizierter Flt3-L vermittelte Inhibition von IFN- α Antworten näher zu untersuchen, sollten die löslichen Faktoren im Überstand infizierter Zellen charakterisiert werden. Lösliche Faktoren, die eine MVA-induzierte IFN- α Antwort inhibieren, werden in dieser Passage noch exprimiert. Um das inhibitorische Potential sekretierter Faktoren zu untersuchen, wurden Zellkulturüberstände CVA152-infizierter Flt3-L pDC generiert. Diese wurden mittels Zentrifugendifiltereinheiten (Centricon) der Grösse nach fraktioniert. Hierbei wurden Filtereinheiten für 3 kDa, 10 kDa, 30 kDa und 50 kDa verwendet und die Filtration nach Herstellerangaben durchgeführt. Frisch generierte Flt3-L pDC wurden mit dem jeweilige Filtrat bzw. Retentat 3 h präinkubiert und anschließend mit MVA (MOI 1) infiziert. Nach weiteren 21 h Inkubation wurden die Zellkulturüberstände hinsichtlich ihres IFN- α Gehaltes analysiert (Abbildung 4.8A). Als Kontrolle wurden Zellkulturüberstände uninifizierter, sowie MVA- und CVA152-infizierter Flt3-L pDC verwendet. MVA-infizierte Flt3-L pDCs, die mit dem jeweiligen Filtrat präinkubiert wurden, zeigten für alle verwendeten Filtereinheiten deutliche IFN- α Produktion (schwarze Balken, >0,4 ng/ml IFN- α). Im Gegensatz dazu lässt sich im Zellkulturüberstand von Flt3-L pDCs, die mit dem jeweiligen Retentat präinkubiert und anschließend mit MVA infiziert wurden, kein IFN- α detektieren. Dies weist darauf hin, dass lösliche Faktoren, die eine Inhibition der IFN- α Antwort vermitteln, grösser als 50 kDa sind und daher nur das Retentat inhibitorisches Potential aufweist.

Es ist bekannt, dass VACV für den 60-65 kDa grossen löslichen IFN- α Rezeptor B18 kodiert.^{144,170,171} B18 ist in der Lage, Typ I IFN Antworten in unterschiedlichen Zelllinien zu neutralisieren indem es entweder in löslicher Form oder gebunden an die Zelloberfläche infizierter und uninifizierter Zellen mit dem zellulären IFNAR um die Bindung von IFN- α konkurriert.^{144,167} Hierbei zeigte sich eine speziesspezifische Bindungsaffinität zu IFN- α/β . Es

war allerdings noch nicht bekannt, ob B18 die Induktion von Typ I IFN inhibiert und des Weiteren, inwiefern B18 als VACV-kodierter IFN-bindender Immunmodulator für die IFN Inhibition bei einer Infektion Flt3-L pDC relevant ist. Daher wurde untersucht, ob B18 dazu in der Lage ist, die MVA-vermittelten IFN- α Produktion von Flt3-L pDC zu inhibieren.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden MVA-infizierte Flt3-L pDC mit rekombinantem B18 (rB18) costimuliert und hinsichtlich der Typ I IFN Produktion untersucht. Während MVA-infizierte Flt3-L pDC ca. 0,4 ng/ml IFN- α exprimierten, zeigte sich eine Dosis-abhängige Reduktion der IFN- α Antwort nach Co-Stimulation mit rB18 (Abbildung 4.8B). Bei Co-Stimulation MVA-infizierter Flt3-L pDC mit 5 ng rB18 wurde die IFN- α Produktion komplett inhibiert. Betrachtete man hingegen die Produktion von IFN- β , so war diese bei Co-Stimulation der Zellen mit rB18 vergleichbar zu der MVA-infizierter Flt3-L pDC (Abbildung 4.8B Mitte). Um zu verifizieren, ob die Inhibition der IFN- α Antwort spezifisch durch rB18 vermittelt wird, wurden MVA-infizierte Flt3-L pDC mit dem irrelevanten Protein rCrmD costimuliert und die Produktion von IFN- α ermittelt. rCrmD ist der von VACV-kodierte lösliche Rezeptor für TNF- α ²⁰⁶ und sollte somit keinen Einfluss auf die Sekretion von Typ I IFN haben. Es zeigte sich, dass durch Inkubation mit rCrmD keine Reduktion der MVA-induzierten IFN- α Expression erfolgte (Figure 4.8B). Flt3-L pDC, die mit rekombinantem Protein alleine stimuliert wurden, zeigten keine Produktion von IFN- α/β (Daten nicht gezeigt).

Um die durch B18-vermittelte Inhibition der IFN- α Antwort näher zu untersuchen, wurde für weitere Experimente eine VACV-Variante verwendet (vAA6), die durch eine Mutation kein funktionales B18 exprimiert. Es wurden Flt3-L pDCs generiert und mit vAA6 in unterschiedlicher MOI infiziert. Nach 24 h wurde der Typ I IFN Gehalt im Zellkulturüberstand ermittelt (Abbildung 4.8C). Als Kontrolle dienten uninfizierte und MVA-infizierte Flt3-L pDCs. Während die Infektion von Flt3-L pDCs mit MVA eine Sekretion von ca. 0,4 ng/ml IFN- α und bis zu 0,8 ng/ml IFN- β induzierte, ließ sich bei VACV-infizierten Flt3-L pDC bei keiner der getesteten MOIs eine IFN- α/β Antwort nachweisen. Die B18-defiziente Variante vAA6 hingegen, induzierte in einer MOI von 1 oder MOI von 10 ca. 0,3 ng/ml IFN- α . Die induzierten IFN- α Mengen entsprechen zwar nicht denen einer MVA-induzierten IFN- α Antwort, sind jedoch signifikant erhöht im Vergleich zu IFN- α Antworten VACV-infizierter Flt3-L pDCs. Betrachtet man die IFN- β Induktion nach vAA6 Infektion, so

zeigt sich keine IFN- β Produktion durch Flt3-L pDCs bei allen getesteten MOIs. Dies lässt darauf schließen, dass VACV-kodiertes B18 spezifisch eine IFN- α Inhibition in Flt3-L pDCs vermittelt, wohingegen IFN- β Antworten nicht beeinflusst werden.

Um zu analysieren, ob B18R in den unterschiedlichen VACV-Passagen exprimiert wird, wurde des Weiteren die RNA infizierter NIH 3T3 Zellen isoliert und in Northern Blot Analysen hinsichtlich der B18R Expression untersucht. Interessanterweise, zeigten sich etwa vergleichbare Mengen an B18R nach Infektion mit VACV, CVA152, CVA386 und MVA (Daten Dr. Holger Ludwig;²⁰⁷). Sequenzanalysen des B18R ORF von VACV, CVA152, CVA386 und MVA zeigten, dass VACV, CVA152 und CVA386 eine intakte B18R Sequenz aufwiesen, wohingegen MVA eine Deletion von 20 Nukleotiden besitzt, die zu einer Leserasterverschiebung (*frame shift*) und somit einem verfrühten Stopp-Codon führt (Daten Theresa Frenz;²⁰⁷). Die Verkürzung des B18 Proteins könnte zu einem Verlust der Funktionalität des Proteins beitragen

Zusammenfassend wird B18R nach Infektion mit VACV, CVA152, CVA386 und MVA zumindest auf transkriptionaler Ebene in NIH 3T3 Zellen exprimiert. Es ist jedoch möglich, dass die von MVA kodierte, durch Deletion verkürzte Variante von B18R keine Funktionalität mehr besitzt.

4.2.3. VACV inhibiert die Maturierung dendritischer Zellen

Es wurde im Folgenden der Einfluss einer VACV-Infektion auf die Maturierung von Flt3-L pDCs näher untersucht. Hierfür wurden Flt3-L pDCs 16 h nach Infektion hinsichtlich der Expression von Aktivierungsmarkern mittels Durchflusszytometrischer Analysen untersucht. Wie bereits zuvor beschrieben (Abbildung 4.2B), induziert eine Infektion von CD11c⁺B220⁺ Flt3-L pDC mit MVA die Expression von Aktivierungsmarkern wie z.B. CD86 oder CD69. Die Infektion mit VACV hingegen induzierte keine Expression von CD69, sowie eine verminderte CD86-Expression. Wurden Flt3-L pDC mit MVA und VACV (beide MOI 1) co-infiziert, zeigte sich eine Reduktion der CD69 und CD86 Expression im Vergleich zu der MVA-infizierter Zellen (Abbildung 4.9A). Demnach ist hier eine VACV-vermittelte Inhibition der MVA-induzierten Aktivierung von Flt3-L pDC zu beobachten.

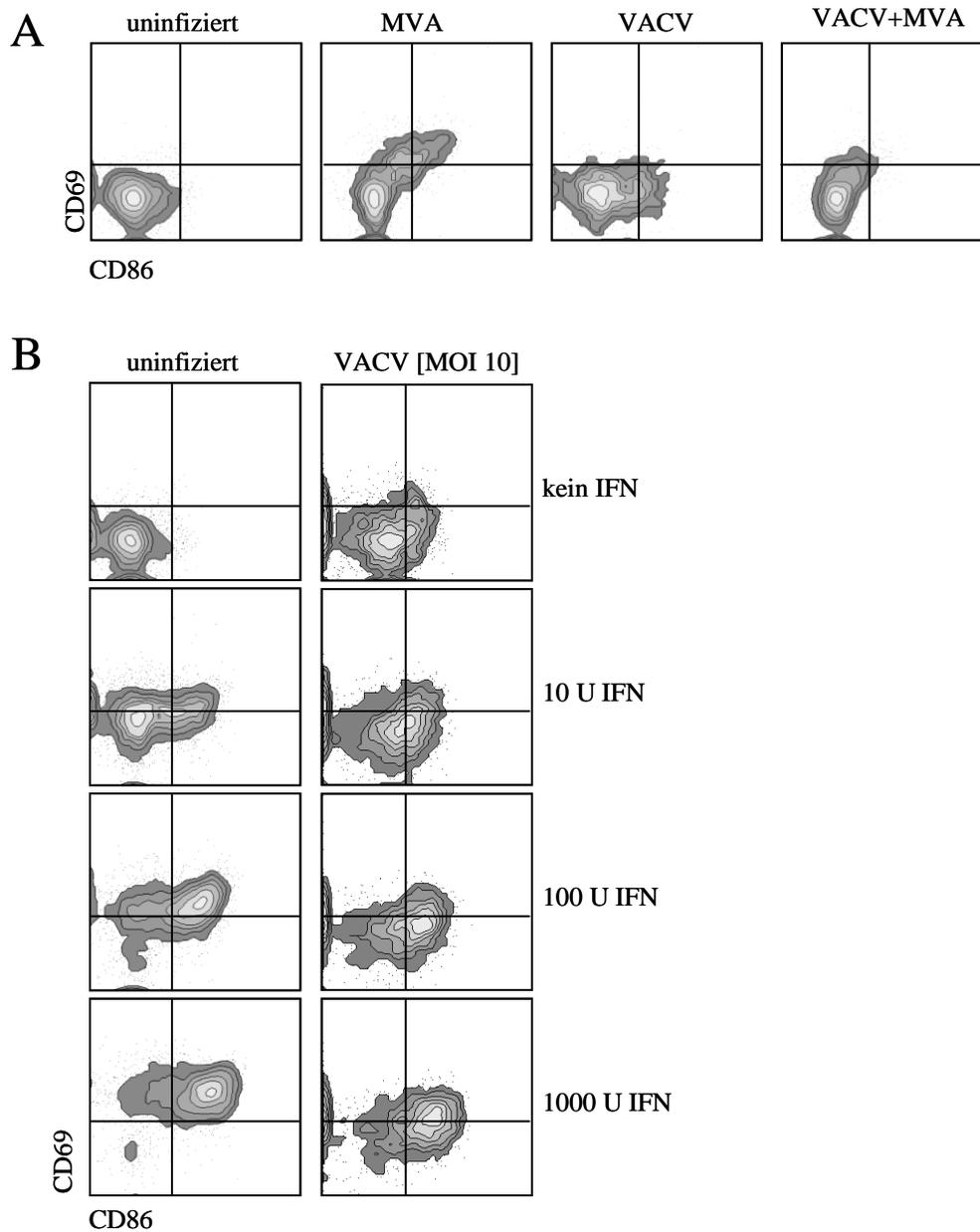


Abbildung 4.9: VACV inhibiert die Maturierung dendritischer Zellen. (A) Flt3-L pDC wurden mit MVA, VACV oder beiden Viren in der MOI von 1 co-infiziert. Als Kontrolle wurden uninfizierte Zellen verwendet. Nach 16 h Inkubation wurden die Zellen mit anti-B220-PECy5.5, anti-CD11c-APC, anti-CD69-PE und anti-CD86-FITC gefärbt. Für die Bestimmung der CD69 und CD86 Expression sind durchflusszytometrische Analysen der CD11c⁺B220⁺ Flt3-L pDC gezeigt. (B) Flt3-L pDC wurden mit VACV (MOI 10) und in Kombination mit den angegebenen Dosen murinem rekombinanten IFN- α (10, 100, 1000 U) infiziert. Nach 16 h Inkubation wurden die Zellen wie in (A) gefärbt und die CD69 und CD86 Expression von CD11c⁺B220⁺ Flt3-L pDC durchflusszytometrisch analysiert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Typ I IFN ist als potenter Induktor der Reifung dendritischer Zellen bekannt.^{6,41,68,78,79} So resultiert die VACV-vermittelte Inhibition der Aufregulation von CD69 und CD86 nach MVA Stimulation möglicherweise aus der Abwesenheit von Typ I IFN. Um dieser Frage

nachzugehen, wurden uninfizierte und VACV-infizierte Flt3-L pDC mit unterschiedlichen Dosen murinem rekombinatem IFN- α stimuliert und hinsichtlich ihrer CD69 und CD86 Expression 16 h nach Infektion durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 4.9B). Die Infektion von Flt3-L pDC mit VACV in einer MOI von 10 konnte im Vergleich zu uninfizierten Zellen die CD69 und CD86 Expression auch in der Anwesenheit von 1000 U rekombinatem IFN- α vermindern. Dies weist darauf hin, dass abgesehen von der Inhibition der IFN- α Antwort möglicherweise weitere, VACV-vermittelte Mechanismen die Aktivierung von DC unterbinden.

4.2.4. VACV inhibiert durch TLR-Liganden induzierte Typ I IFN Antworten

Es stellte sich im Folgenden die Frage, ob die VACV-vermittelte Inhibition spezifisch für MVA-induzierte Typ I IFN Antworten ist, oder, ob durch VACV auch TLR-Liganden induzierte Typ I IFN Antworten inhibiert werden. Daher wurden Flt3-L pDC mit dem TLR9 Liganden CpG2216, dem TLR3/MDA5 Liganden poly I:C und dem Einzelstrang (ss)RNA kodierten Vesikulären Stomatitis Virus (VSV), sowie UV-bestrahltem VACV stimuliert. VSV wird über einen TLR4, TLR7 oder RIG-I abhängigen Mechanismus von der Zelle detektiert und induziert so die Produktion hoher Mengen an Typ I IFN.^{208,209} Für UV-bestrahltes VACV zeigte sich bereits, dass bei Infektion von Flt3-L pDC hohe Mengen an IFN- α exprimiert werden (siehe Abbildung 4.6D). Es wurden daher im Folgenden Infektionsexperimente durchgeführt, bei denen Flt3-L pDCs mit dem jeweiligen TLR-Liganden alleine stimuliert oder mit VACV co-infiziert wurden. Als Kontrolle dienten uninfizierte Flt3-L pDC. Die Zellkulturüberstände wurden 24 h nach Stimulation geerntet und hinsichtlich ihres IFN- α/β Gehaltes mittels ELISA analysiert. TLR-Liganden-stimulierte Flt3-L pDCs produzieren IFN- α und IFN- β . So exprimieren beispielsweise CpG2216-stimulierte Flt3-L pDCs ca. 0,7 ng/ml IFN- α und 1,4 ng/ml IFN- β . Betrachtet man nun Flt3-L pDC, die mit VACV (MOI 10) und dem jeweiligen TLR-Liganden behandelt wurden, so zeigt sich, dass die durch den jeweiligen Stimulus induzierte IFN- α - als auch IFN- β -Antwort komplett inhibiert wurde (Abbildung 4.10A).

Es sollte im Folgenden untersucht werden, ob B18 dazu in der Lage ist, TLR Liganden-induzierte IFN- α Antworten zu inhibieren. Es wurden daher in weiteren Analysen Flt3-L

pDCs mit CpG2216, poly I:C, VSV oder VACV UV behandelt bzw. in Kombination mit rB18 co-stimuliert und hinsichtlich der IFN- α Sekretion untersucht. Als Kontrolle wurden Coinfektionen mit der B18-defizienten VACV Variante vAA6 und MVA durchgeführt. Es zeigte sich, dass rB18 nach Costimulation in der Lage war, die IFN- α Antwort aller getesteten Stimuli komplett zu inhibieren (Abbildung 4.10B). vAA6 und MVA waren hingegen nicht in der Lage, die TLR-Ligand-induzierte IFN- α Antworten zu reduzieren. Somit werden sowohl IFN- α als auch IFN- β Antworten, die durch diverse TLR- oder RIG-I *like*-Liganden induziert werden, durch VACV-kodierte Immunmodulatoren inhibiert. Die Inhibition einer IFN- α Antwort kann hierbei alleine durch rB18 vermittelt werden, wohingegen IFN- β Antworten durch weitere VACV-kodierte Immunmodulatoren, unabhängig von B18, inhibiert werden.

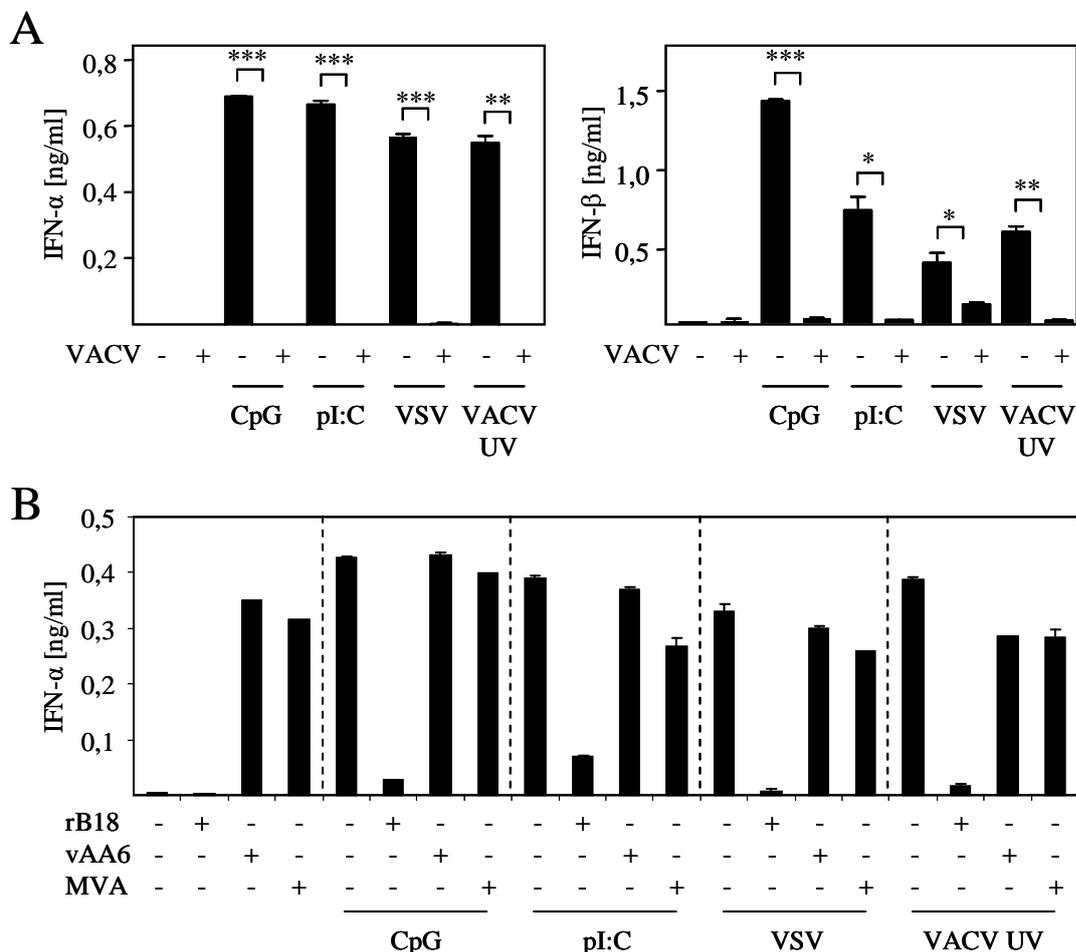


Abbildung 4.10: VACV inhibiert die durch TLR-Liganden induzierten Typ I IFN Antworten. (A) Flt3-L pDC wurden 2 h mit VACV (MOI 10) präinkubiert und anschließend mit CpG2216 (CpG; 10 μ g) stimuliert, poly I:C (pI:C; 2 μ g) transfiziert (Fugene Transfektionsreagenz) oder mit VSV (MOI 1) oder UV-bestrahltem (75 mJ) VACV (VACV UV; MOI 1) infiziert. Als Kontrolle wurden Flt3-L pDC ohne Präinkubation mit dem jeweiligen Stimulus behandelt oder unbehandelte Flt3-L pDC verwendet. Die Zellkulturüberstände wurden 24 h nach Infektion geerntet und hinsichtlich der IFN- α bzw. IFN- β Expression mittels ELISA analysiert. (B) Flt3-L pDC wurden mit vAA6 (MOI 10), MVA (MOI 10) oder rB18 (25 ng) 2 h präinkubiert und anschließend mit

CpG2216 (10 µg) stimuliert, poly I:C (2 µg) transfiziert (Fugene Transfektionsreagenz) oder mit VSV (MOI 1) oder UV-bestrahltem (75 mJ) VACV (MOI 1) infiziert. Als Kontrolle wurden Flt3-L pDC ohne Präinkubation mit dem jeweiligen Stimulus behandelt oder unbehandelte Flt3-L pDC verwendet. Zellkulturüberstände wurden 24 nach Stimulation mittels ELISA hinsichtlich der IFN- α Expression analysiert. Für statistischen Analysen wurden die p-Werte anhand des t-Test für unverbundene Stichproben ermittelt (NS= nicht signifikant; ***= P< 0,001, t-Test für unverbundene Stichproben).

4.2.5. VACV-kodierte Immunmodulatoren inhibieren die Phosphorylierung von STAT1 und die Degradierung von I κ -B α

Um auf zellulärer Ebene zu untersuchen, an welcher Stelle der Signaltransduktion (siehe Einleitung, Abbildung 2.4) VACV-kodierte Immunmodulatoren wirken, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Hierfür wurden für 8 h mit VACV, CVA152, CVA386 oder MVA-infizierte Flt3-L pDC für die Generierung von Zellysaten verwendet, die dann hinsichtlich der Expression von phosphoryliertem STAT1 (pSTAT1) untersucht wurden. Die Phosphorylierung von STAT1 stellt nach der Bindung von IFN- β und frühem IFN- α 4 an den IFNAR einen der ersten Schritte bei der Signaltransduktion über den Jak/STAT Signalweg dar⁸ und gibt einen Hinweis darauf, ob VACV-kodierte Immunmodulatoren in vorgeschalteten Signalkaskaden bereits interagieren. Zur Analyse der basalen Expression von pSTAT1 wurden Lysate uninfizierter Flt3-L pDC hergestellt und zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge die Aktin-Expression bestimmt. Nach Infektion mit VACV sowie CVA152 ist im Vergleich zu uninfizierten Zellen eine etwas höhere Expression von pSTAT1 zu beobachten, diese ist jedoch in Lysaten CVA386- und MVA-infizierter Flt3-L pDC deutlich verstärkt. Die Aktin-Expression ist bei allen Lysaten vergleichbar (Abbildung 4.11A). Nach Infektion mit VACV oder CVA152 zeigt sich demnach eine deutlich verminderte Expression von pSTAT1 im Vergleich zu der CVA386- und MVA-infizierter Flt3-L pDC. Dies korreliert mit den zuvor erhobenen Daten, die zeigten, dass Überstände VACV- und CVA152-infizierter Zellen dazu in der Lage waren, IFN- α Antworten zu inhibieren (Abb. 4.7C). Für B18 ist beschrieben, dass es mit dem zellulären IFNAR um die Bindung von IFN- α konkurriert.¹⁷³ Dies könnte zu einer verminderten Phosphorylierung von STAT1 führen. CVA386 hingegen induziert IFN- β , welches im murinen System nicht von B18 gebunden wird (siehe Abb. 4.8A) und somit an den IFNAR binden und die Phosphorylierung von STAT1 induzieren kann.

Um zu untersuchen, ob VACV- und CVA152-kodierte Immunmodulatoren für IFN- β *upstream* von STAT1 in der Signalkaskade interferieren, wurden die Expressionen von

interferon regulatory factor 3 (IRF3) sowie die von phosphoryliertem IRF3 (pIRF3) 1 h bzw. 2 h nach Infektion der Flt3-L pDC mit VACV, CVA152, CVA386 und MVA in Western Blot Analysen untersucht (Abbildung 4.11B).

Als Kontrolle wurden uninanzierte Zellen hinsichtlich der IRF3 und pIRF3 Expression betrachtet. Hier zeigte sich, dass IRF3, sowie pIRF3 zwar im Vergleich zu uninanzierter Zellen nach Infektion verstärkt exprimiert wird, jedoch die Expression bei den unterschiedlich infizierten Zellen vergleichbar ist. Da MVA-infizierte Flt3-L pDC im Vergleich zu VACV-, CVA152- oder CVA386-infizierten Zellen weder eine verstärkte IRF3 Expression noch eine anschließende Phosphorylierung zeigten, scheint dies keine relevante Signalkaskade für die Induktion von Typ I IFN in diesem Infektionsmodell darzustellen.

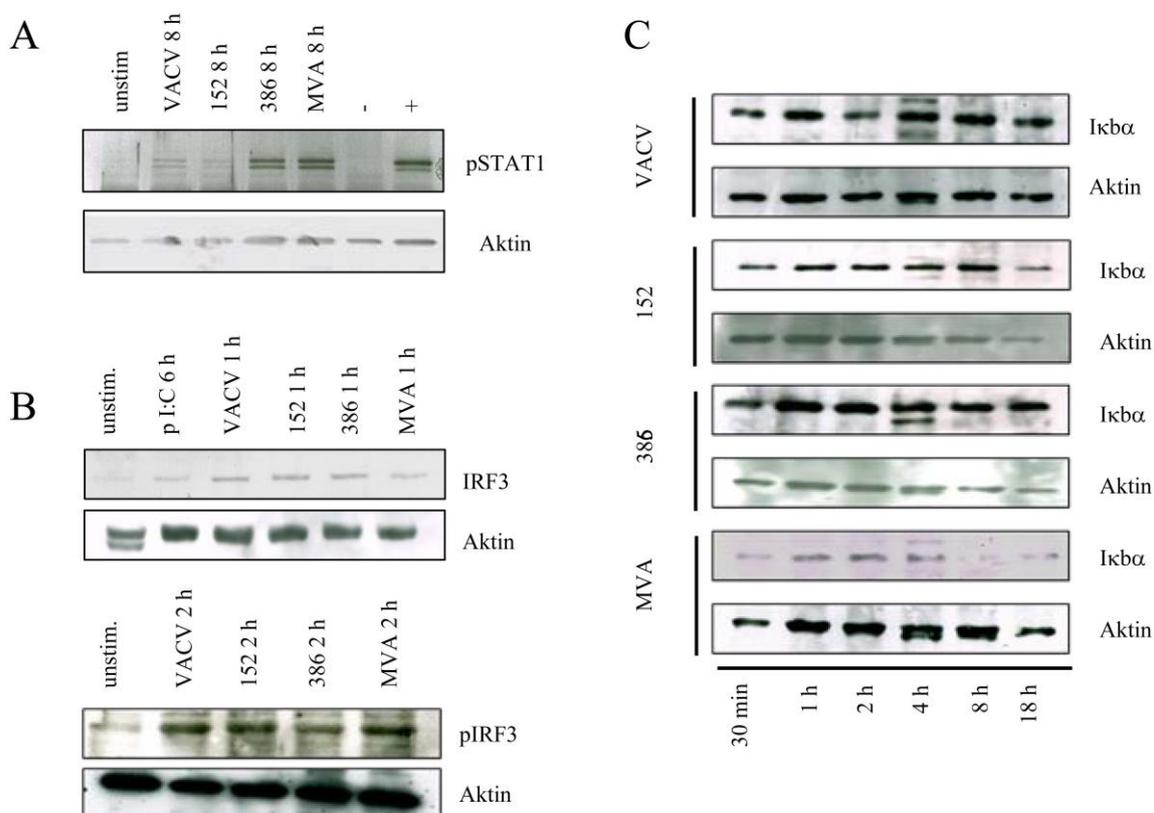


Abbildung 4.11: VACV-kodierte Immunmodularoren inhibieren die Phosphorylierung von STAT1 und die Degradierung von Iκ-Bα. (A) Flt3-L pDC wurden mit VACV, CVA152, CVA386 oder MVA mit der MOI von 1 für 8 h infiziert und die Zellen daraufhin pelletiert und in Lysispuffer resuspendiert. Es erfolgte eine Inkubation für 20 min bei 4°C. Die gewonnenen Zelllysate wurden bei -20°C gelagert und anschließend mittels Western Blot hinsichtlich der pSTAT1 Expression analysiert. Als Ladekontrolle wurde eine Aktinfärbung durchgeführt. (B) Flt3-L pDC wurden mit VACV, CVA152, CVA386 oder MVA mit der MOI von 1 für 1 h bzw. 2 h infiziert und die Zellen daraufhin pelletiert, in Lysispuffer resuspendiert und für 20 min bei 4°C und inkubiert. Die gewonnenen Zelllysate wurden bei -20°C gelagert und anschließend mittels Western Blot hinsichtlich der IRF3 bzw. pIRF3 Expression analysiert. Als Ladekontrolle wurde eine Aktinfärbung durchgeführt. (C) Flt3-L pDC wurden mit VACV, CVA152, CVA386 oder MVA in einer MOI von 1 für die angegebenen Zeiten infiziert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert, in Lysispuffer resuspendiert und für 20

min bei 4°C und inkubiert. Die gewonnenen Zelllysate wurden bei -20°C gelagert und anschließend mittels Western Blot hinsichtlich der I κ -B α Degradation analysiert. Als Ladekontrolle wurde eine Aktinfärbung durchgeführt.

Für die Phosphorylierung, Dissoziation und anschließende Translokation der Untereinheiten von NF- κ B in den Zellkern ist die Degradierung von I κ -B α ein initiiender Schritt. Daher wurden Flt3-L pDC für die angegebenen Zeitpunkte mit VACV, CVA152, CVA386 und MVA infiziert und hinsichtlich der I κ -B α Expression in Western Blot Analysen untersucht (Abbildung 4.11C). Als Kontrolle für die geladene Proteinmenge wurde die Aktinexpression analysiert. Es zeigte sich, dass nach einer Infektionsdauer von 8 h mit MVA eine reduzierte I κ -B α Expression zu beobachten ist, wohingegen nach Infektion mit VACV, CVA152 und CVA386 die Expressionslevel von I κ -B α vergleichbar zu uninfizierten Zellen sind (Abbildung 4.11C und Daten nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass VACV, CVA152 sowie CVA386 für Immunmodulatoren kodieren, die die Degradierung von I κ -B α inhibieren und somit keine oder nur eine reduzierte Aktivierung von NF- κ B stattfinden kann.

4.2.6. VACV-kodierte Immunmodulatoren inhibieren IFN- β Antworten nach Infektion humaner immaturer dendritischer Zellen (iDC)

VACV kodiert für Immunmodulatoren die effizient eine Typ I IFN Antwort durch murine DC inhibieren. Hierbei konnte der lösliche VACV-kodierte IFN- α Rezeptor B18 als der hauptverantwortliche Immunmodulator für die Inhibition von IFN- α Antworten identifiziert werden. Des Weiteren zeigte sich, dass VACV ebenfalls für intrazellulär wirkende IFN- β Inhibitor(en) kodiert, die zwischen der Passage CVA152 und CVA385 auf dem Weg der Attenuierung verloren gingen. Alcamì *et al.* konnten bereits in Studien betreffend der Spezifität von B18R zeigen, dass B18R dazu in der Lage ist, humanes IFN- α und IFN- β zu binden.^{167,171}

Im Folgenden sollte nun die Relevanz der hier beschriebenden Immunmodulatoren für IFN- β im humanen System untersucht werden. Hierfür wurden klinisch relevante, *in vitro* differenzierte humane immature DCs (iDC) (siehe Material und Methoden) mit VACV, CVA152, CVA386 oder MVA infiziert (Abbildung 4.12A). Der IFN- β Gehalt wurde 24 h nach Infektion im Zellkulturüberstand mittels ELISA ermittelt. Es zeigte sich, dass iDC nach

Infektion mit VACV, CVA152 sowie CVA386 kein IFN- β sezernieren, wohingegen MVA iDC zur IFN- β Produktion induziert. Um zu verifizieren, dass der inhibitorische Effekt alleine durch B18 vermittelt werden kann, wurden iDC mit MVA alleine oder zusammen mit rB18 stimuliert und hinsichtlich des IFN- β Gehaltes 24 h nach Infektion analysiert (Abbildung 4.12B). Es zeigte sich hierbei, dass alleine durch die Co-Inkubation mit rekombinatem B18 eine komplette Inhibition der IFN- β Antwort erfolgte. Durch vorangegangene Experimente im murinen System, in dem B18 nur murines IFN- α bindet und inhibiert, kann somit ein weiterer VACV-kodierter Inhibitor von humanem IFN- β postuliert werden.

Es stellte sich daher nun die Frage, ob auch im humanen System neben B18 ein weiterer IFN- β spezifischer Inhibitor exprimiert wird. Hiefür wurden MVA-infizierte humane iDC mit der B18R-defizienten VACV-Variante vAA6 in unterschiedlichen Konzentrationen (MOI 0,1; MOI 1; MOI 10) co-infiziert und die Zellkulturüberstände 24 h nach Infektion hinsichtlich des IFN- β Gehaltes analysiert (Abbildung 4.12C). Es zeigte sich, dass vAA6 in allen getesteten Konzentrationen dazu in der Lage war, MVA-induzierte IFN- β Antworten zu inhibieren. Demnach lässt sich sagen, dass auch im humanen System B18 als löslicher VACV-kodierter Typ I IFN-Inhibitor wirkt und dass ein weiterer, bislang nicht identifizierter Immunmodulator, der spezifisch IFN- β Antworten inhibiert, exprimiert wird. Beide Immunmodulatoren nehmen hier Einfluss auf die Typ I IFN Produktion von iDC und sind somit auch im humanen System von Relevanz.

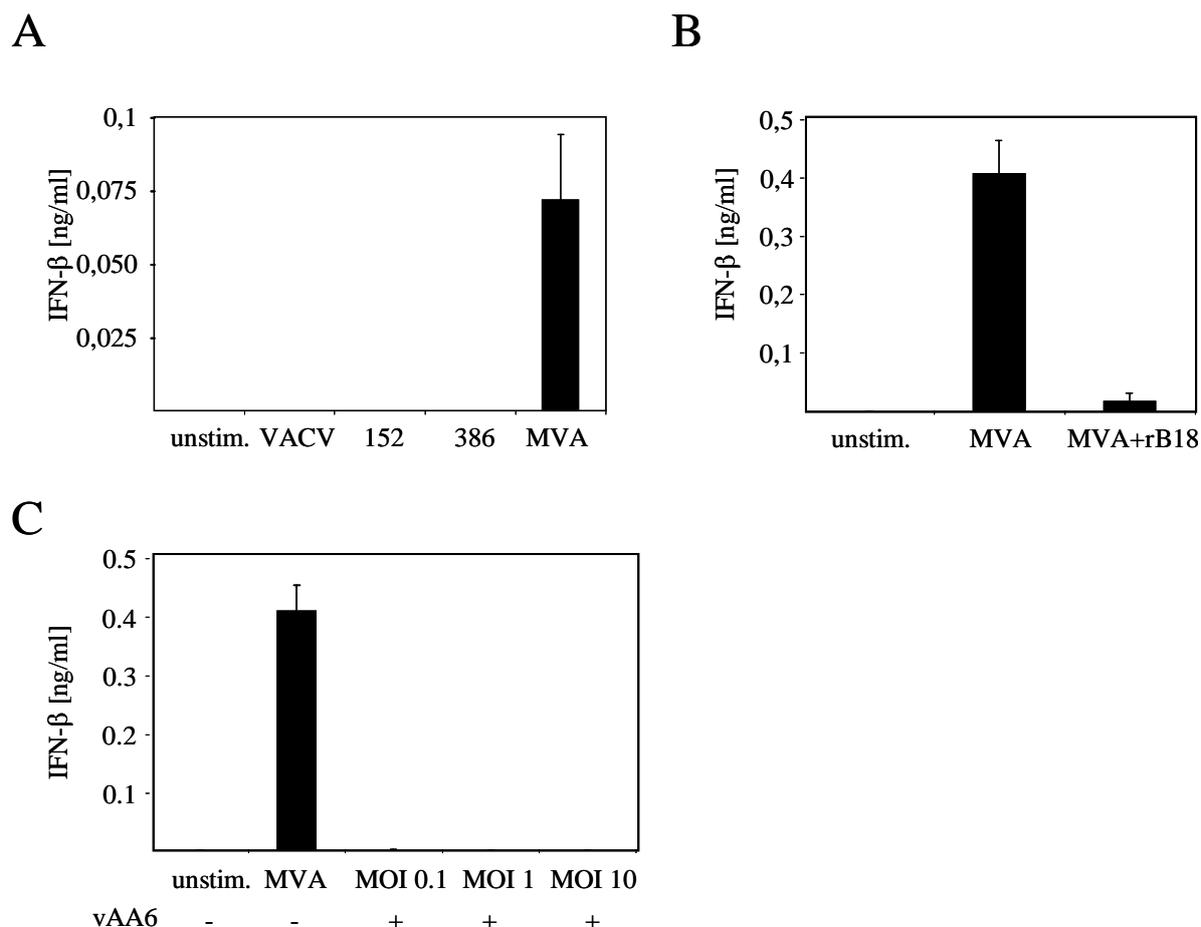


Abbildung 4.12: VACV-kodierte Immunmodulatoren inhibieren IFN- β Antworten nach Infektion humaner iDC. (A) Humane Monozyten wurden wie in Material und Methoden beschrieben fünf Tage durch Kultivierung mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen dendritischen Zellen (iDC) maturiert. Diese wurden für 24 h mit VACV, CVA152, CVA386 oder MVA (MOI 1) infiziert und die Zellkulturüberstände im ELISA hinsichtlich des IFN- β Gehaltes analysiert. (B) Humane iDC wurden mit MVA alleine oder in Kombination mit rekombinatem B18 (rB18) 24 h stimuliert und anschließend hinsichtlich des humanen IFN- β Gehaltes im Zellkulturüberstand untersucht. (C) Humane iDC wurden mit MVA und unterschiedlichen Konzentrationen vAA6 (MOI 0.1; MOI 1; MOI 10) co-infiziert und nach 24 h hinsichtlich des IFN- β Gehaltes im Zellkulturüberstand analysiert. Als Kontrolle wurden Zellkulturüberstände uninfizierte Zellen und MVA-infizierter Zellen verwendet. Gezeigt sind Mittelwerte von 3-5 getesteten Spendern.

4.3. Identifikation potentieller VACV-kodierter IFN- β Inhibitoren und Etablierung neuer Methoden zur Analyse VACV-kodierter Immunmodulatoren

In Abschnitt 4.2 zeigte sich, dass VACV für Inhibitoren der murinen und humanen Typ I IFN Antwort kodiert. Die Inhibition wird hierbei von multiplen Faktoren vermittelt. Einer von ihnen ist der lösliche Typ I IFN Rezeptor B18, der von infizierten Zellen in den Überstand sekretiert wird und dort, sowie an der Zelloberfläche, mit dem zellulären IFNAR um die

Bindung von IFN- α konkurriert. Bei Infektion muriner dendritischer Zellen (Flt3-L pDC) inhibiert B18 spezifisch IFN- α Antworten, die durch MVA oder diverse andere TLR-Liganden induziert werden. Es zeigte sich jedoch, dass VACV des Weiteren für zusätzliche Immunmodulatoren kodiert, die spezifisch IFN- β Antworten inhibieren. Diese Inhibitoren werden von frühen Genen kodiert und im Gegensatz zu B18 intrazellulär exprimiert. Infektionsexperimente mit den Zwischenpassagen CVA152 und CVA386 zeigten, dass VACV-kodierte Immunmodulatoren, die eine IFN- β Inhibition vermitteln, von VACV und CVA152 exprimiert werden, wohingegen sie in CVA386 und MVA inaktiv sind. In den folgenden Studien sollen weitere VACV-kodierte Immunmodulatoren, die spezifisch die Inhibition von IFN- β Antworten vermitteln, identifiziert werden. Desweiteren sollen Methoden zur Analyse und Charakterisierung dieser potentiellen Immunmodulatoren identifiziert und etabliert werden.

4.3.1. Identifikation VACV-kodierter Immunmodulatoren, die eine IFN- β Induktion inhibieren mittels *differential in gel electrophoresis* (DIGE)-Analysen und *two-dimensional* (2D)-Gelelektrophorese

Zur Identifikation weiterer VACV-kodierter Immunmodulatoren wurden zunächst potentielle VACV-kodierte Proteine, die eine mögliche Inhibition der Immunantwort vermitteln, identifiziert. Hierfür wurden sogenannte *differential in gel electrophoresis* (DIGE) Analysen und *two dimensional gel electrophoresis* (2D)-Analysen durchgeführt.

Analysen mittels 2D Gelen, wie u.a. die DIGE, kombinieren die isoelektrische Fokussierung (IEF) mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe hierzu Material und Methoden) zur Trennung komplexer Proteingemische. Durch die Kombination der beiden orthogonal zueinander ausgeführten Trenntechniken wird eine besonders hochauflösende Trennung erreicht. Die Trennung erfolgt hierbei in zwei Dimensionen. Die erste Dimension ist die IEF. Hierbei werden Proteine aus dem zu untersuchenden Extrakt hinsichtlich ihres isoelektrischen Punktes (relativer Gehalt saurer oder basischer Aminosäurereste) separiert. Hierfür wurden immobilisierte pH Gradienten (IPG) verwendet, die in einem Gelstreifen fixiert wurden. Anschließend werden die Proteine in einem zweiten Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt (zweite Dimension).²¹⁰⁻²¹²

Zur Identifizierung VACV-kodierter Immunmodulatoren wurden 2D Analysen von der Firma WITA durchgeführt.

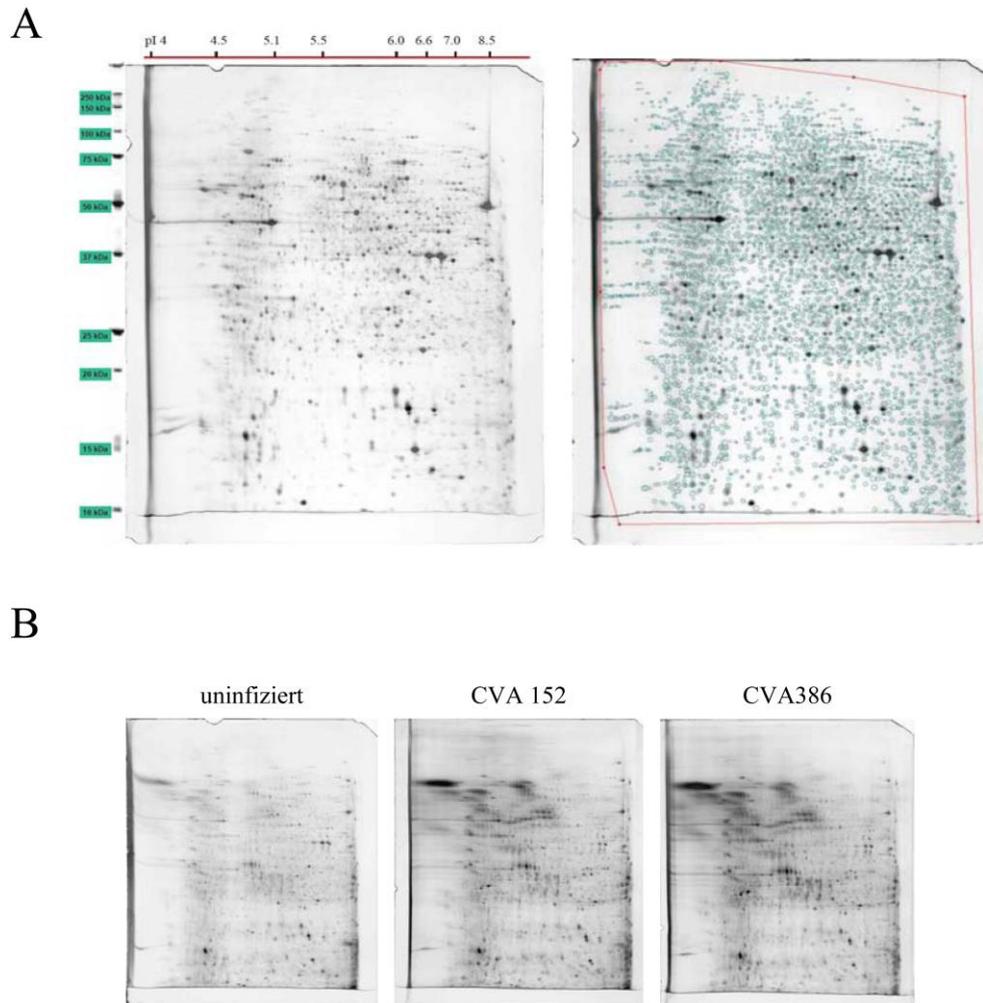


Abbildung 4.13: 2D Analysen CVA152 und CVA386-infizierter Zellen. $3,6 \times 10^7$ Flt3-L pDC wurden für 8 h mit CVA152 oder CVA386 (MOI 1) infiziert, geerntet und in PBS gewaschen. Als Kontrolle dienten uninfizierte Zellen. Das Zellpellet wurde anschließend in 100 μ l Lysispuffer (AP-Puffer, Firma WITA) resuspendiert und bei -80°C bis zum Versand gelagert. Die 2D Gelanalyse erfolgte durch die Firma WITA. Zu sehen ist ein Gel uninfizierter Flt3-L pDCs mit anschließender Identifikation von einzelnen *spot*-Gruppen (A) und des Weiteren die Gele uninfizierter, CVA152-infizierter-, sowie CVA386-infizierter Flt3-L pDC (B).

Zunächst wurde ein 2-DE Gel Analyse uninfizierter Zellen angefertigt (Abbildung 4.13A linke Seite). Die hierbei detektierten *spots* wurden mit einer speziellen Auswertesoftware der Firma WITA identifiziert und anschließend einzelne Proteine postuliert (Abbildung 4.13A; rechte Seite). Mittels der Auswertesoftware konnten keinerlei Anzeichen von Proteolyse oder artifizierlicher Proteinmodifikation beobachtet werden (Daten Firma WITA). Bei der Analyse der *spot*-Gruppen, die in CVA152-infizierten Zellen gegenüber der Kontrolle uninfizierter Zellen erhöht sind, ergaben sich durch die Analyse der Firma WITA 263 variante *spots*. Diese

wurden nun mit *spot*-Gruppen CVA386-infizierter Zellen verglichen. Es wurden mehrere *spots* identifiziert, die in CVA152-infizierten Flt3-L pDC gegenüber CVA386-infizierten Flt3-L pDC verstärkt exprimiert sind. Die einzelnen *spots* können nun in weiteren Analysen massenspektrometrisch analysiert werden.

Um Proben auf einem 2-DE Gel zu trennen, gibt es zusätzlich die Möglichkeit diese bei der DIGE Analyse durch kovalent bindende Fluoreszenzfarbstoffe zu markieren. Die Proteinextrakte (maximal drei pro Gel) werden hierbei mit je einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, gemischt und gemeinsam auf demselben Gel getrennt. Als Farbstoffe wurden bei den in dieser Arbeit angefertigten DIGE Analysen Cyanin (Cy)2, Cy3 und Cy5 eingesetzt. Die DIGE Methode ermöglicht somit die Generierung und den differentiellen Vergleich dreier probenspezifischer Proteinmuster. Für die folgenden Analysen sollen anhand dieser Methode die Proteinmuster von Flt3-L pDC, die mit den unterschiedlichen VACV Varianten infiziert wurden, verglichen werden, um potentielle VACV-kodierte Immunmodulatoren zu identifizieren. Die DIGE Analysen wurden von der Firma Toplab durchgeführt. Da Inhibitoren für IFN- β zwischen der Passage 152 und 386 bei der Attenuierung von MVA verloren gingen (siehe Abbildung 4.7B), wurden Flt3-L pDC mit CVA152 oder CVA386 infiziert und 3 h nach Infektion durch intensives Waschen freie Viruspartikel aus den Überständen entfernt. Nach weiteren 21 h Inkubation wurden Zelllysate generiert. Als Kontrolle wurden Lysate uninfizierter Zellen verwendet. Diese Lysate wurden nun mittels der DIGE Methode analysiert (Abbildung 4.14).

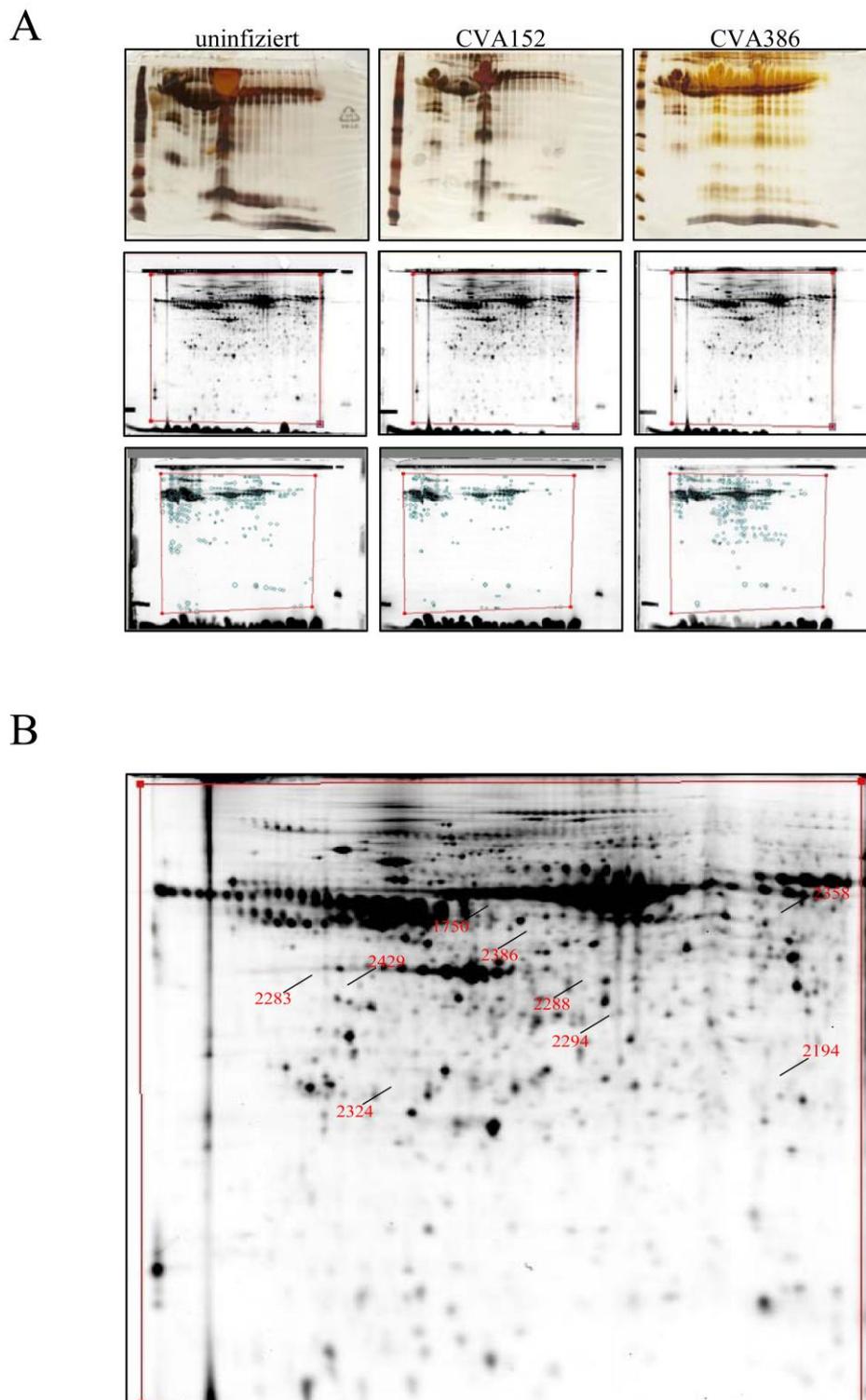


Abbildung 4.14: Differential in gel electrophoresis (DIGE)-Analysen CVA152- und CVA386-infizierter Zellen. (A) $9,6 \times 10^7$ Flt3-L pDC wurden mit CVA152 oder CVA386 (MOI 1) infiziert und freie Viruspartikel im Zellkulturüberstand nach 3 h durch intensives Waschen der Zellen entfernt. Es folgte eine weitere Inkubation für 21 h bei 37°C. Als Kontrolle wurden uninfizierte Flt3-L pDC verwendet. Anschließend wurden die Zellen in Lysispuffer (Firma Toplab) aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die hergestellten Lysate wurden von der Firma Toplab zunächst über eine Silberfärbung eines SDS Geles fraktioniert (obere Reihe). Für die DIGE Färbung wurden 150 µg Protein aufgetragen und das Gel bei einem *immobilized pH gradient* (IPG) 3-10

durchgeführt (mittlere Reihe). Die Färbung erfolgte durch Cy2, Cy3 und Cy5. Mittels einer Software (Fa. Toplab) wurden nun einzelne Protein-*spots* identifiziert (untere Reihe). (B) Anhand eines Referenzgels sind differentielle *spots* aufgezeigt. Signifikante *spots* (durch die eine Auswertesoftware der Fa. Toplab bestimmt) wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert und mittels Datenbank mit beschriebenen VACV-kodierten Proteinen abgeglichen.

Zunächst wurde eine SDS Gel Analyse der unterschiedlichen Lysate durchgeführt und die Proben fraktioniert (Abbildung 4.14A obere Reihe). Es zeigte sich, dass in den jeweiligen Lysaten große Mengen an dem im Zellkulturmedium der Flt3-L pDC enthaltenem fötalem Kälber Serum (FCS) detektierbar sind und hierdurch ggf. andere Proteine überlagert werden (Abbildung 4.14A obere Reihe). Die Firma Toplab hat für die DIGE Analysen über proteinbiochemische Verfahren das in den Lysaten enthaltene FCS depletiert und für die DIGE Analyse verwendet. Es wurden jeweils 150 µg Protein aufgetragen und das Gel wies einen IPG 3-10 auf (Abbildung 4.14A, mittlere Reihe). Es wurden nun die einzelnen *spots* der unterschiedlichen Proteine identifiziert (Abbildung 4.14A untere Reihe) und die Lysate der unterschiedlich infizierten Flt3-L pDC miteinander verglichen. In einem Referenzgel wurden *spots* identifiziert, die in CVA152-infizierten Zellen im Vergleich zu CVA386-infizierten Zellen verstärkt exprimiert werden detektiert (Abbildung 4.14B). Diese *spots* wurden massenspektrometrisch analysiert und mittels Datenbank mit beschriebenen VACV-kodierten Proteinen abgeglichen. Über derartige Analyseverfahren wurde das VACV-kodierte Protein F11 identifiziert.

Im nächsten Schritt wurde das F11-kodierende Gen F11L sowie eine Reihe bereits publizierter VACV-kodierter Gene, die für Proteine mit potentiell immunmodulatorischer Funktion kodieren, mittels Sequenzvergleichen des VACV und MVA Genoms analysiert (Daten nicht gezeigt). Die Gene, die Sequenzunterschiede beim Vergleich von VACV und MVA aufwiesen, sollten im folgenden Abschnitt in den Zwischenpassagen näher analysiert werden (Abschnitt 4.3.2).

4.3.2. Sequenzanalysen von VACV, CVA152, CVA386 und MVA zur Identifikation VACV-kodierter Immunmodulatoren, die eine IFN- β Induktion inhibieren

Die durch Literaturrecherche und mittels 2-DE- und DIGE-Analysen identifizierten Proteine sollten im Weiteren hinsichtlich sequenzspezifischer Mutationen und Deletionen untersucht werden. Hierfür wurde aus VACV, CVA152, CVA386 und MVA DNA isoliert und mittels spezifischer Oligonukleotide die jeweiligen Gene amplifiziert. Diese wurden auf einem Agarosegel aufgetragen. Für einige Gene ist bereits an der Produktgrösse dieser Amplifikation zu erkennen, dass sie Deletionen aufweisen. So wird z.B. aus der genomischen DNA von CVA386 und MVA für C23L ein deutlich kürzeres Produkt amplifiziert als aus der genomischen DNA von VACV und CVA152 (Abbildung 4.12A). Als Positivkontrolle wurde eine Amplifikation von B18R mittels PCR mitgeführt, von dem aus früheren Experimenten (Daten Theresa Frenz) bekannt war, dass es in allen VACV Varianten exprimiert wird. Die Amplifikate wurden anschließend inklusive der 5' Promotorregion (500 Nukleotide *upstream* des Startkodons) in TOPO TA Vektoren kloniert und sequenziert (Firma MWG). Durch Sequenzanalysen (Daten nicht gezeigt) ließen sich vier Kandidaten identifizieren, die Deletionen zwischen CVA152 und CVA386 akkumulieren: C23L, A4L, F11L und F5L.

Eine schematische Darstellung der auftretenden Mutationen sowie Deletionen ist in Abbildung 4.12B aufgezeigt. C23L besitzt eine Größe von 735 bp und kodiert für ein Chemokinbindeprotein.^{213,214} Sequenzanalysen der Passage CVA386 zeigen eine Vielzahl von Deletionen in C23L im Vergleich zu CVA152. Diese bewirken keine Leserasterverschiebung, können jedoch einen möglichen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins besitzen. A4L weist eine Größe von 846 bp auf und ist als Nukleoprotein beschrieben.^{215,216} Sequenzanalysen ergaben, dass A4L im Genom von CVA386 eine Deletion von 27 bp aufweist. F11L wird von 1082 bp kodiert und spielt eine Rolle bei der VACV-induzierten Zellmotilität.²¹⁷ Eine 15 bp große Deletion in CVA386 führt hier zu einem verfrühten Transkriptionsstopp. Eine zusätzlich auftretende Deletion von zwei Nukleotiden in MVA führt zu einer Leserasterverschiebung und somit einer weiteren Verkürzung des Transkriptes. F5L ist 969 bp gross und bislang wurde noch keine Funktion für dieses Genprodukt beschrieben. Die hier in CVA386 aufgezeigte Deletion von 17 bp in F5L führt zu einer Leserasterverschiebung, die in einem verfrühten Transkriptionsstopp resultiert. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die vier identifizierten VACV-kodierten Gene alle

Mutationen zwischen Passage 152 und 386 aufweisen, die womöglich Einfluß auf die Funktionalität der kodierten Proteine nehmen können und so als potentielle Inhibitoren von IFN- β in Frage kommen. Es sollen nun im folgenden Abschnitt Methoden zur Analyse des inhibitorischen Potentials der identifizierten Inhibitorokandidaten etabliert und evaluiert werden.

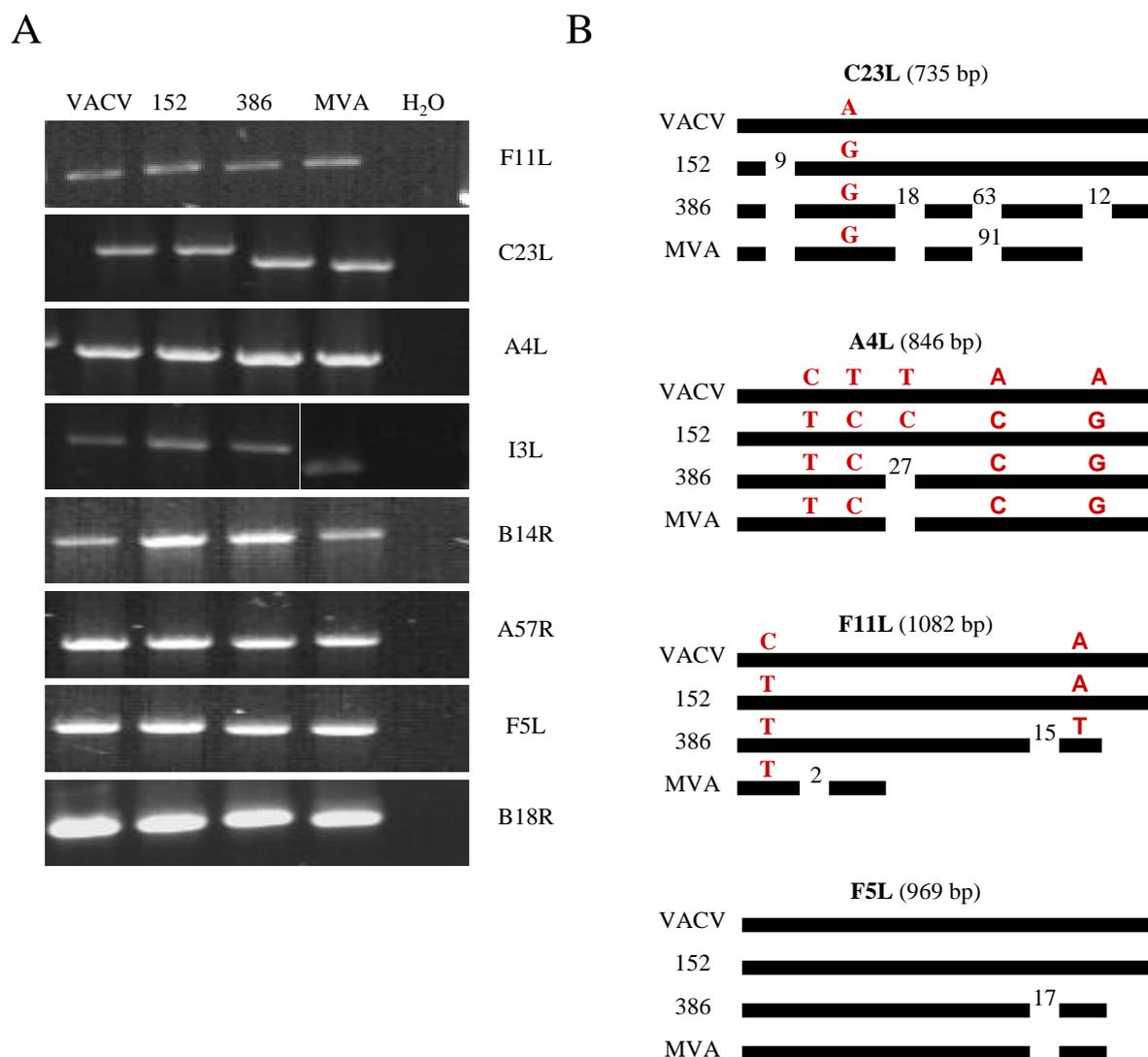


Abbildung 4.15: Identifikation VACV-kodierter Gene, die für potentielle Immunmodulatoren kodieren. (A) Es wurde DNA aus VACV, CVA152, CVA386 und MVA isoliert (siehe Material und Methoden) und die angegebenen VACV-kodierten Gene mittels spezifischer Oligonukleotide amplifiziert. (B) Die Amplifikate der in (A) gezeigten VACV-kodierten Gene wurden in TOPO TA Vektoren kloniert und sequenziert (Firma MWG). Gezeigt ist eine schematische Darstellung von vier der untersuchten Gene, die Deletionen bzw. Punktmutationen zwischen CVA152 (152) und CVA386 (386) aufweisen. Die auftretenden Deletionen sind jeweils eingezeichnet, wobei die angegebenen Zahlen darüber die Anzahl der fehlenden Nukleotide widerspiegeln. Rot markierte Nukleotide stellen Punktmutationen da, die zu einem Aminosäureaustausch führen.

4.3.3. Herstellung lentiviraler Vektoren, die VACV-kodierte Gene exprimieren, zur Analyse des immunmodulatorischen Potentials

Um die Analyse des inhibitorischen Potentials der in 4.3.1 und 4.3.2 identifizierten potentiellen VACV-kodierten Immunmodulatoren zu ermöglichen, sollen im Rahmen dieser Arbeit Transfervektoren kloniert werden, die zur Expression viraler Immunmodulatoren in dendritischen Zellen eingesetzt werden können. Um hierfür das entsprechende Gen in die Zellen zu transferieren, lassen sich lentivirale Vektoren einsetzen. Frühere Studien konnten zeigen, dass humane Monozyten mittels lentiviraler Vektoren transduziert und zu iDC Zellen differenziert werden können. Es wurden in diesem Rahmen drei Vektorsysteme hinsichtlich ihrer Einsetzbarkeit analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die lentiviralen Vektorsysteme PBJ, HIV-2 und SIVmac humane Monozyten effizient transduzieren, ohne die Zellen zu aktivieren oder die Expression eines veränderten Zytokinprofils zu induzieren.^{218,219} Es zeigte sich des Weiteren, dass von den drei getesteten Vektorsystemen das SIVmac System die höchste Ausbeute an Vektorpartikeln (Titer) lieferte sowie die höchsten Transduktionseffizienzen erzielte.^{218,220} Um die folgenden Studien zur Identifikation des IFN- β Inhibitors im humanen System zu verifizieren, sollten lentivirale Vektoren basierend auf dem SIVmac System generiert werden, die die zu untersuchenden VACV-kodierten Proteine kodieren. Das SIVmac System ist ein 3-Plasmidsystem, bestehend aus einem Transfervektor, welcher das Zielgen und akzessorische Gene enthält, einem Verpackungsvektor, welcher für Strukturgene und die reverse Transkriptase kodiert und einem Hüllvektor, der für VSV-G kodiert.

Die Klonierung eines SIVmac-basierenden Transfervektors sollte es ermöglichen, die potentiellen VACV-kodierten Inhibitoren über eine *multiple cloning site* (MCS) in den Transfervektor zu integrieren. Für die Generierung dieses Transfervektors, im Folgenden als Vif IRES bezeichnet, wurden zunächst der Cytomegalie-Virus (CMV)-Promotor sowie die MCS ausgehend von pIRES2 eGFP delta Nhe-BglII (Klonierung von pIRES2 eGFP delta Nhe-BglII siehe Material und Methoden) amplifiziert. Über spezifische Oligonukleotide wurde mittels PCR eine Restriktionsschnittstelle für MunI am 5' Ende eingefügt sowie ein Hämagglutinin (HA)-Tag am 3' Ende, wodurch ein Produkt von 703 bp entsteht (Abbildung 4.16Ai und 4.16Bi). Zudem wurde in einer weiteren PCR ausgehend von pIRES2 eGFP delta Nhe-BglII die *internal ribosomal entry site* (IRES) sowie das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) amplifiziert. Auch hier wurden über spezifische Oligonukleotide am 5' Ende ein HA-Tag sowie am 3' Ende eine BglII Restriktionsschnittstelle inseriert, wodurch ein 1349

bp großes Produkt entsteht (Abbildung 4.16Aii und 4.16Bii). Die IRES sowie eGFP werden durch die Amplifikation mit den jeweiligen Oligonukleotiden zusätzlich von Restriktionsschnittstellen für *EcoRV* flankiert. Dies ermöglicht es, über eine Restriktionsspaltung mit *EcoRV* die IRES sowie eGFP im zu generierenden Transfervektor zu deletieren. Über den überlappenden HA-Tag der beiden amplifizierten Produkte lässt sich in einem weiteren Schritt über eine Fusions-PCR ein 2059 bp großes Produkt generieren, das für das in den Transfervektor zu inserierende Konstrukt bestehend aus CMV Promotor, MCS, HA-Tag, IRES und eGFP kodiert (Abbildung 4.16Aiii und 4.16Biii). Die entsprechenden Amplifikate sind in Abbildung 4.16B aufgezeigt.

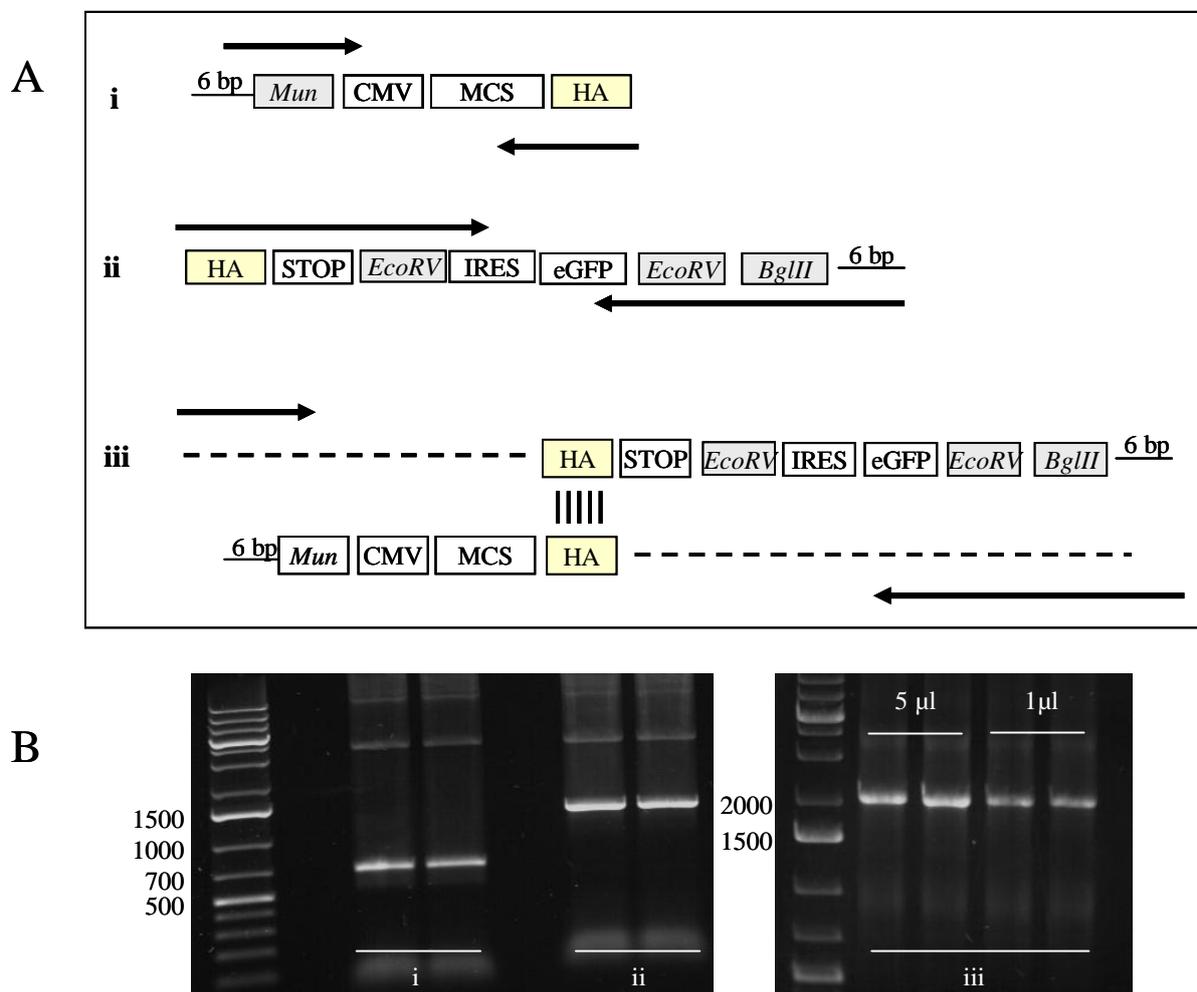


Abbildung 4.16: Generierung eines Konstruktes ausgehend von pIRES eGFP zur Insertion in den Transfervektor Vif delta *EcoRI*. (A) Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung des Vif IRES Transfervektors. Über PCR wurde zunächst der CMV Promotor sowie die *multiple cloning site* (MCS) ausgehend von pIRES2 eGFP deltaNhe-BglIII amplifiziert. Über die spezifischen Oligonukleotide wurde am 5' Ende eine Restriktionsschnittstelle für *MunI* sowie am 3' Ende ein 27 bp langes Hämagglutinin (HA)-Tag angefügt (i). Ausgehend von pIRES eGFP deltaNhe-BglIII wurde die *internal ribosomal entry site* (IRES) sowie eGFP in einer weiteren PCR amplifiziert. Das 1349 bp große Produkt besitzt am 3' Ende ein über spezifische

Oligonukleotide angefügtes HA-Tag, gefolgt von einem Stopp-Codon und einer *EcoRV* Restriktionsschnittstelle. Am 3' Ende wurden Restriktionsschnittstellen für *EcoRV* und *BglIII* inseriert (ii). Über eine Fusions-PCR wurden die getrennt amplifizierte Produkte über das HA-Tag fusioniert (iii) und bilden somit das 2059 bp große pIRES Konstrukt. (B) Wie in (A) beschrieben sind die dementsprechenden PCR Amplifikate aufgezeigt. (i) und (ii) entsprechen den voneinander getrennt durchgeführten PCRs zur Amplifikation der MCS und des eGFP ausgehend von pIRES2 eGFP delta*Nhe-BglIII*. In (iii) ist die Fusions-PCR aufgezeigt, die jeweils ausgehend von 1 µl oder 5 µl Matrizenstrang durchgeführt wurde (Zahlen neben den Gelen geben die Fragmentgrößen in Basenpaaren wieder; genauere Informationen sind Material und Methoden zu entnehmen).

Zur Generierung des modifizierten Transfervektors Vif IRES wurde der SIVmac-basierende Transfervektor Vif deltaEco²²⁰ mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten, um das von *MunI* und *BglIII* flankierte Konstrukt zu inserieren (Abbildung 17A). Die Restriktionsschnittstelle *XbaI* ist im nicht-funktionellen *backbone* des Vif deltaEco Transfervektors kodiert, während sich *SacII* und *SmaI* in der MCS des pIRES Konstruktes befinden. Durch kombinierte Restriktionsspaltungen mittels dieser Enzyme sollte eine erfolgreiche Integration des Konstruktes bestätigt werden. Als Kontrolle wurde der Vif IRES ungespalten (1. Spalte) und *SacII* gespalten (2. Spalte) auf ein Agarosegel aufgetragen. Der Restriktionsspaltung mittels *SacII* und *XbaI* liefert bei erfolgreicher Integration des pIRES Konstruktes Fragmente mit Größen von 6300 bp und 2300 bp (3. Spalte). Die Restriktionsspaltung mit *SmaI* und *XbaI* erzeugte Fragmente mit den Größen 6200 bp, 1600 bp, 700 bp und 100 bp (4. Spalte). Durch diese und weitere Kontrollspaltungen (Abbildung 17B und Daten nicht gezeigt) konnte die korrekte Integration des pIRES Konstruktes in den Transfervektor Vif deltaEco bestätigt werden und der dadurch generierte Transfervektor Vif IRES für die Insertion der unterschiedlichen identifizierten VACV-kodierten Gene verwendet werden.

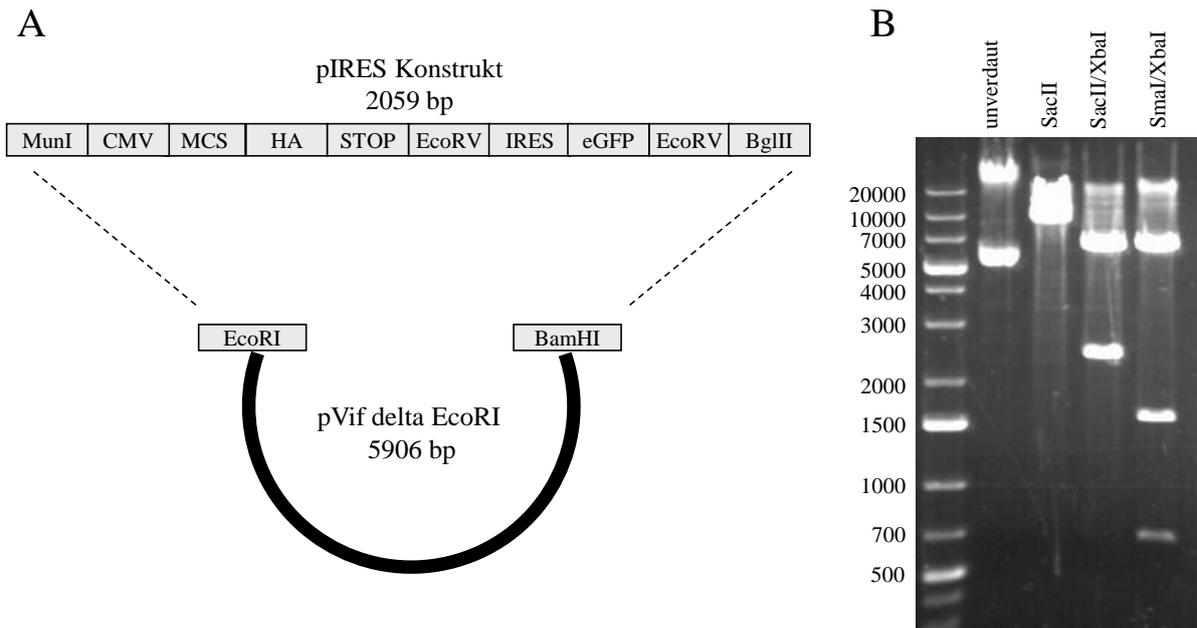


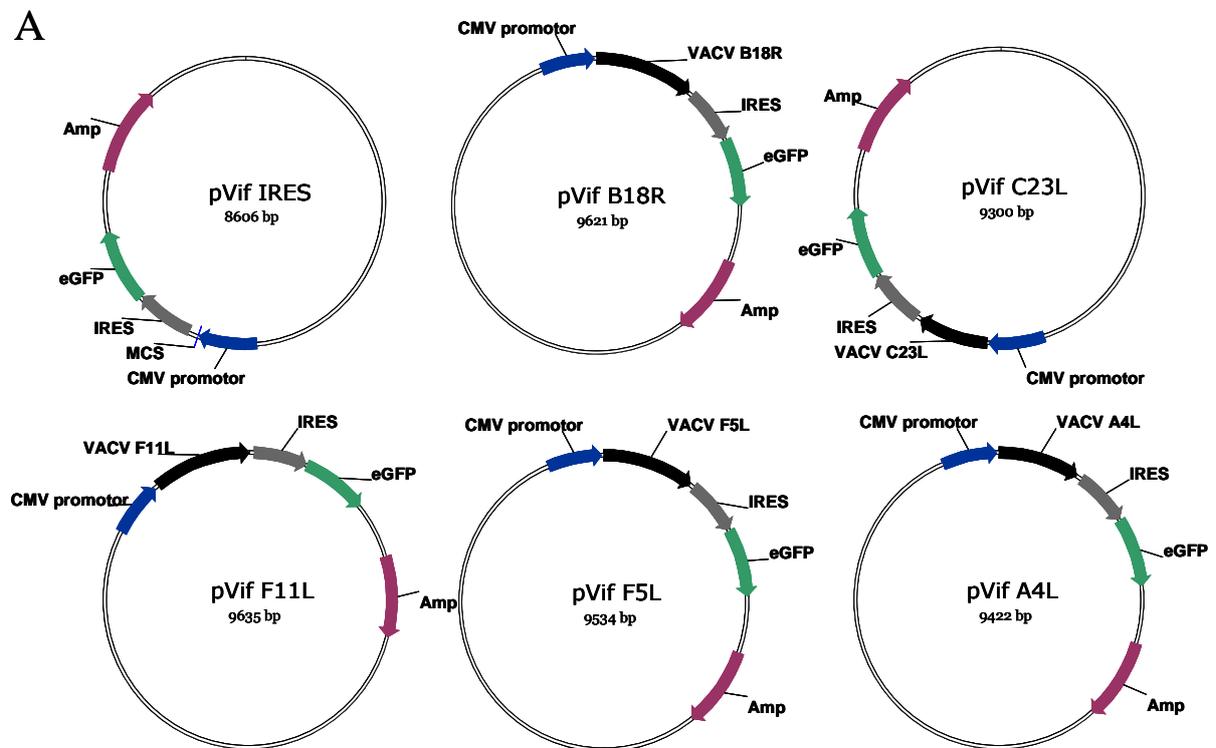
Abbildung 4.17: Klonierung eines SIVmac-basierenden Transfervektors für die Integration VACV-kodierter Gene. (A) Schematische Darstellung des Ligationsansatzes bestehend aus dem in Abbildung 4.16A gezeigtem pIRES Konstrukt und dem Transfektor Vif deltaEcoRI. (B) Restriktionsspaltung zur Analyse der korrekten Integration des pIRES Konstruktes in Vif deltaEco. Restriktionsspaltungen wurden wie in Material und Methoden durchgeführt und anschließend auf ein Agarosegel zur Analyse aufgetragen. Als Kontrolle wurden ungespaltene DNA und Einzelspaltungen des jeweiligen Klones mitgeführt. Gezeigt ist ein exemplarischer Klon (#8) der mittels der Restriktionsenzyme SacII und XbaI, sowie SmaI und XbaI analysiert wurde.

Vif IRES kodiert wie bereits beschrieben für ein HA-Tag, das direkt an das einzubringende Fremdgen anschließt, sowie das bicistronisch exprimierte eGFP. So ist das exprimierte Fremdgen indirekt über die Expression von eGFP mittels durchflusszytometrischer oder fluoreszenzmikroskopischer Analysen nachweisbar. Zudem ist es möglich, das Fremdgen direkt über die Expression des HA-Tags in Western Blot Analysen oder FACS-basierten intrazellulären Färbungen nachzuweisen.

Für die Insertion der identifizierten, potentiell immunomodulatorisch wirkenden VACV-kodierten Gene, wurden diese mittels PCR amplifiziert und über Oligonukleotide Restriktionsschnittstellen am 3'- und 5'-Ende angefügt. Hierbei wurden solche Restriktionsschnittstellen gewählt, die nur einfach in der MCS des klonierten Vif IRES Transfervektors schneiden, sowie keine Schnittstellen in den jeweiligen VACV-kodierten Genen aufweisen. Die amplifizierten Gene wurden zunächst in TOPO TA Vektoren kloniert (siehe Material und Methoden) und sequenziert (Firma MWG).

Klone mit korrekter Sequenz wurden anschließend zur Klonierung in Vif IRES verwendet. Der Transfektor Vif IRES sowie die in TOPO TA Vektoren klonierten VACV-kodierten

Gene wurden nun mit den jeweils spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten und für die Ligation verwendet. Nach Ligation erfolgte eine Transformation in *E.coli* (Stamm STBL2 oder TOP10) und die daraus hervorgehenden Klone wurden in diversen Restriktionsspaltungen hinsichtlich ihrer korrekten Insertion des jeweiligen Gens in Vif IRES analysiert. In Abbildung 4.18A ist eine schematische Übersicht der zu generierenden Transfervektoren, die für die unterschiedlichen VACV-kodierten Gene kodieren, gezeigt. Abbildung 4.18B zeigt exemplarisch Kontrollspaltungen der getesteten Klone die mit diversen Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend auf einem Agarosegel analysiert wurden.



B

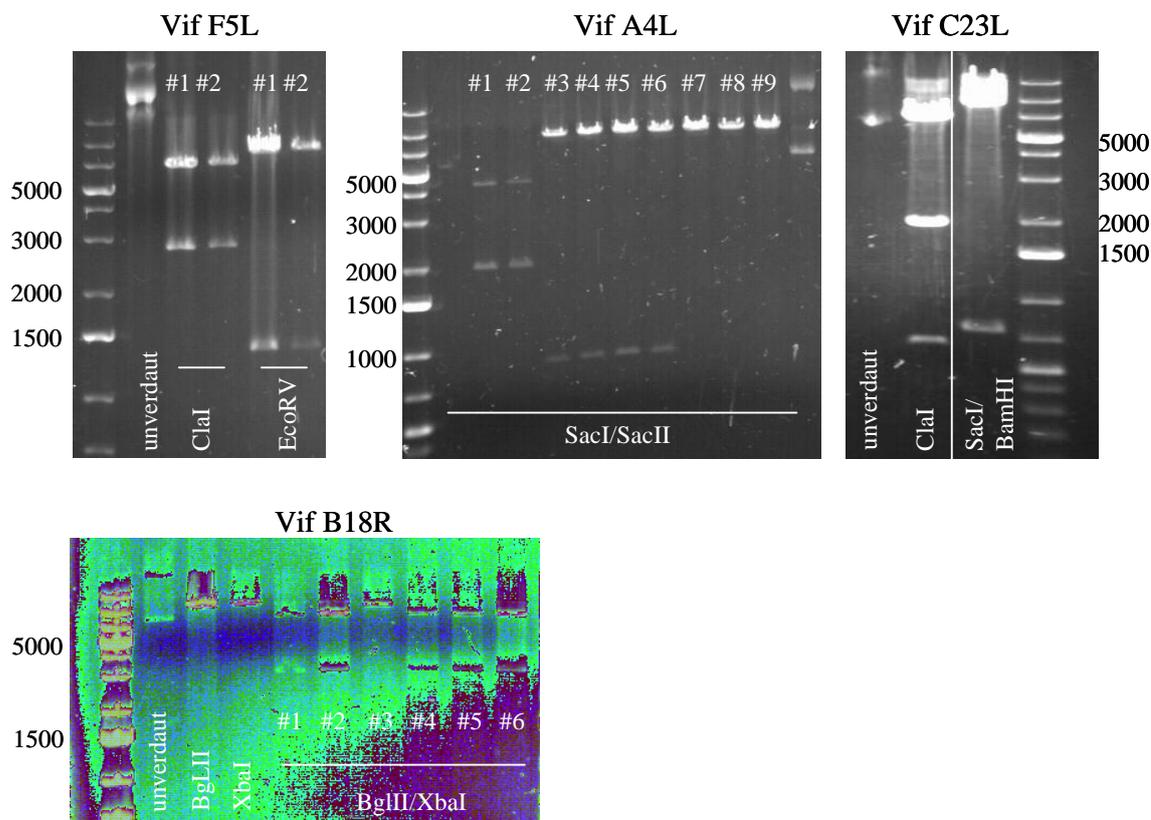


Abbildung 4.18: Insertion der VACV-kodierten Gene in den Transfervektor Vif IRES. (A) Schematische Übersicht der zu klonierenden Transfervektoren. (B) Vif IRES und die jeweiligen in TOPO TA Vektoren kodierten Gene F5L, A4L, C23L und B18R wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen für die über spezifische Oligonukleotide an die Amplifikate angefügten Schnittstellen restringiert und ligiert (siehe Material und Methoden). Die Ligationsansätze wurden anschließend in *E.coli* transformiert und daraus hervorgegangene Klone mit diversen Kontrollspaltungen analysiert. Gezeigt sind exemplarische Kontrollspaltungen einzelner positiver Klone mit den jeweils angegebenen Restriktionsenzymen. Vif F5L wurde mit ClaI gespalten. Gezeigt ist ein exemplarischer Klon mit den zu erwartenden Fragmentgrößen 6728 bp und 2849 bp. In einem weiteren Restriktionsspaltung mit EcoRV entstanden hierbei Produkte mit den zu erwartenden Fragmentgrößen von 8141 bp, 1314 bp und 79 bp (Fragment von 79 bp nicht detektierbar). Vif A4L wurde mit SacI und SacII restringiert. Die erwarteten Fragmentgrößen bei korrekter Insertion sind 8576 bp und 846 bp. Klone #3, #4, #5 und #6 zeigen die Produkte mit entsprechenden Fragmentgrößen. Vif C23L wurde mit ClaI gespalten. Die erwarteten Fragmentgrößen bei korrekter Insertion sind 6810 bp, 1864 bp und 621 bp. Gezeigt ist ein exemplarischer positiver Klon. In einem weiteren Restriktionsspaltung wurde dieser mit SacI und BamHI gespalten. Die zu erwartenden Fragmentgrößen mit 8547 bp und 735 bp sind hier aufgezeigt. Durch Restriktion von Vif B18R mit *BglII* und *XbaI* entstehen Fragmente mit den Größen 6893 bp und 2728 bp. Gezeigt sind sechs der getesteten Klone von denen Klone #1, #2, #4, #5 und #6 die korrekten Fragmentgrößen aufweisen.

Die in dieser Arbeit hergestellten Transfervektoren kodieren somit für die in den Abschnitten 4.3.1 und 4.3.2 identifizierten potentiellen VACV-kodierten Immunmodulatoren und können in zukünftigen Studien für die Generierung lentiviraler Vektoren verwendet werden. Der für eGFP kodierende Transfervektor Vif IRES dient hierbei als Negativkontrolle, wohingegen Vif B18R als Positivkontrolle fungiert. Nach Generierung der jeweiligen lentiviralen Vektoren ist es nun in zukünftigen Studien möglich, Monozyten zu transduzieren und aus ihnen iDCs zu generieren, die das jeweils integrierte VACV-kodierte Gen exprimieren. Dies eröffnet erstmals die Möglichkeit, in primären humanen Zellen direkt den Einfluss viral kodierter potentiell immunmodulatorisch wirkender Gene zu analysieren.

5. Diskussion und Ausblick

Nach einer viralen Infektion werden in der Regel schützende Typ I Interferon (IFN) Antworten induziert, die im Wirt einen antiviralen Status vermitteln.^{8,71-73,76,77} Typ I IFN sind eine Familie pleiotroper Zytokine, die antiviral wirken, indem sie die Ausbreitung und Replikation verschiedener Viren limitieren. Viren haben Strategien entwickelt, um die Induktion und Wirkung von Typ I IFN zu inhibieren.^{70,144,147,148} Das zu der Familie der Pockenviren gehörende Vaccinia Virus (VACV) induziert nach Infektion von Mäusen interessanterweise keine im Serum messbaren Typ I IFN Antworten. Analog sekretieren auch Dendritische Zellen (DC) nach *in vitro* Stimulation mit VACV kein Typ I IFN in das Kulturmedium. Im Gegensatz dazu induziert das aus dem VACV abgeleitete, attenuierte Modifizierte Vaccinia Virus Ankara (MVA) sowohl nach Infektion von Mäusen als auch nach *in vitro* Infektion von DC Typ I IFN Antworten.

MVA wurde aus dem Chorioallantois Vaccinia Virus Ankara (CVA) über Passagierung auf Hühnerembryofibroblasten abgeleitet, um ein hochattenuiertes und in seinem Tropismus stark eingeschränktes Vakzin gegen das human-pathogene Pockenvirus Variola major zu entwickeln.¹⁸¹⁻¹⁸⁴ In Deutschland und der Türkei wurden etwa 120.000 Personen mit MVA vakziniert, wobei keinerlei Nebenwirkungen beobachtet wurden.^{29,181} Trotz der Ausrottung der Pocken durch Impfkampagnen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Jahr 1979, wird seit dem 11.09.2001 die Bedeutung von Pockenviren als Biowaffen sowohl politisch als auch wissenschaftlich verstärkt diskutiert. Da der Grossteil der Population in den letzten Jahrzehnten keine Vakzinierung mehr erhalten hat, könnte die gezielte Freisetzung von Variola major katastrophale Folgen für die globale Bevölkerung haben.^{221,222} Zudem kommt es immer wieder zu Zoonosen, bei denen Pockenviren von Tieren auf Menschen übertragen werden.²²³ Daraus resultiert ein großes Interesse, die Mechanismen der Pockenvirus-assoziierten Pathogenese besser zu verstehen, um mögliche Interventionsstrategien zu erschließen.²²⁴ Betrachtet man die mangelnde Fähigkeit von MVA in Säugerzellen zu replizieren, sowie dessen hohe Immunogenität, so eignet es sich ideal als Vakzinierungsvektor-Kandidat. MVA wird inzwischen als Vakzinierungsvektor für diverse virale, bakterielle und parasitäre Erkrankungen wie HIV, Malaria, Tuberkulose oder Influenza geprüft. Zudem werden einige auf MVA-abgeleiteten Vakzinierungsvektoren basierende Therapieansätze gegen maligne Erkrankungen wie Prostatakrebs oder Brustkrebs

erprobt.^{29,158,225} Derzeit sind am *National Institute of Health* (NIH) 125 MVA-Vektor-basierte klinische Studien angemeldet, von denen 88 in Phase I sind.²²⁶ Trotz des Einsatzes von MVA in vielen Vakzinierungsstudien, ist bislang wenig über zelluläre und virale Mechanismen bekannt, die für die hohe Immunogenität von MVA verantwortlich sind. Im **Abschnitt 4.1** dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, über welche zellulären Rezeptoren MVA die Induktion von IFN- α Antworten vermittelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass plasmazytoide DC (Flt3-L pDC) auch nach einer Infektion mit MVA eine entscheidende Rolle bei der Produktion von Typ I IFN spielen. MVA induziert dabei sowohl über TLR-abhängige als auch über TLR-unabhängige Mechanismen Typ I IFN Antworten. Die MVA-induzierte IFN- α Produktion in DC erfolgte unabhängig von einer produktiven Infektion, viraler Replikation oder der Expression intermediärer und später viraler Gene (Abbildung 4.3). Weiterhin zeigte sich, dass für die IFN- α Produktion die Signalweiterleitung über den Typ I Interferon Rezeptor (IFNAR) zwingend erforderlich ist, während IFN- α unabhängig von der Produktion von IFN- β induziert werden kann (Abbildung 4.5). Obwohl MVA, anders als viele andere Orthopoxviren, viele bekannte Immunmodulatoren nicht mehr exprimiert, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass DC nach Infektion mit UV-bestrahltem MVA erhöhte Mengen an IFN- α produzieren (Abbildung 4.3). Daraus lässt sich schließen, dass MVA trotz des hohen Attenuierungsgrades noch ein oder mehrere Gene besitzt, die die IFN- α Antwort des Wirtes partiell inhibieren. Nach Infektion von Flt3-L pDC und GM-CSF mDC mit MVA werden die Oberflächenmoleküle CD69 und CD86 verstärkt exprimiert (Abbildung 4.2). Die Induktion von CD69 und CD86 ist IFN-induziert. Dies deutet darauf hin, dass beide DC-Subtypen nach MVA Infektion IFN produzieren.. Drillien *et. al.* beschrieben, dass bei Infektion humaner DC die Aufregulation des Aktivierungsmarkers CD86 nach Infektion mit bestrahltem und unbestrahltem Virus vergleichbar ist.¹⁹⁰ Somit hat die partielle Inhibition der IFN- α Antwort nach MVA Infektion keinen Einfluss auf die Induktion von CD86.

IFN-inhibierende VACV-kodierte Gene wie A46R, A52R, K1L oder N1L sind in MVA mutiert oder deletiert und werden entsprechend nicht exprimiert.^{29,184,189-193}

Der offene Leserahmen (*open reading frame*; ORF) des VACV-kodierte Gens A52R wurde im Rahmen der Passagierung von MVA auf Hühnerembryofibroblasten deletiert. Interessanterweise ist A52R dazu in der Lage, in Abhängigkeit der TLR

Signalwegkomponenten IRAK2 und TRAF6 die NF- κ B Aktivierung zu inhibieren.^{149,176} Für Fibroblasten ist beschrieben, dass die Induktion von IFN- β in Abhängigkeit von NF- κ B erfolgt.²²⁷⁻²³⁰ Somit kann möglicherweise die Inhibition von NF- κ B einen Einfluss auf die Induktion von Typ I IFN besitzen. Das VACV-kodierte Protein A46R interferiert mit TLR-Adaptorproteinen wie beispielsweise MyD88 oder Trif. A46R führt so möglicherweise zur Inhibition von TLR-abhängigen Immunantworten und trägt daher zur Virulenz bei.¹⁵⁰ Dies lässt darauf schließen, dass Interaktionen mit Komponenten des TLR-Systems möglicherweise einen wichtigen zellulären Mechanismus zur Detektion einer VACV Infektion darstellen. Daher ist anzunehmen, dass VACV gezielt Immunmodulatoren exprimiert, die TLR-abhängige Signalwege inhibieren. Dies könnte eine Strategie zur Unterwanderung des Immunsystems des Virus darstellen.

Einige DNA-kodierte Viren, wie beispielsweise HSV^{107,110} oder das murine Cytomegalovirus¹⁰⁹ werden über den dsDNA-detektierenden TLR9 erkannt. Um zu überprüfen, ob die MVA-vermittelte Induktion von IFN- α über TLR9 vermittelt wird, wurden TLR9-defiziente Mäuse mit MVA infiziert, sowie Flt3-L pDC aus TLR9^{-/-} Tieren generiert und mit MVA stimuliert. TLR9-defiziente Tiere zeigten hierbei eine zu der in Wildtyp (WT) Tieren beobachteten vergleichbare IFN Induktion. Auch aus TLR-defizienten Tieren generierte Flt3-L pDC produzierten normal IFN- α Mengen nach MVA Infektion. Somit erfolgt, anders als bei dem nahe verwandten Ectromelie Virus (ECTV)²³¹, weder *in vivo* noch *in vitro* eine MVA-induzierte IFN- α Antwort abhängig von der Detektion über TLR9 (Abbildung 4.4A und Abbildung 4.4D). Nichtsdestotrotz zeigten sich bei MVA-Infektion von MyD88-defizienten Mäusen leicht reduzierte IFN- α Mengen im Serum (Abbildung 4.4D). Um die Rolle des TLR-Systems bei der Induktion von IFN- α zu untersuchen, wurden Flt3-L pDC, die aus Mäusen ohne funktionales TLR-System (MyD88^{-/-}Trif^{-/-} Tiere) generiert. Nach Infektion mit MVA produzierten MyD88^{-/-}Trif^{-/-} Flt3-L pDC signifikant reduzierte Mengen IFN- α (Abbildung 4.4B). Somit konnte gezeigt werden, dass TLR-vermittelte Signalwege prinzipiell eine Rolle bei der MVA-induzierten IFN Antwort spielen. Es stellte sich weiterführend die Frage, ob insbesondere TLRs, die für die Erkennung von Nukleinsäuren eine Rolle spielen, für die MVA-induzierte IFN- α Antwort benötigt werden. Hierfür wurden Flt3-L pDC mit Chloroquin, einem lysomotropen Reagenz, das die Ansäuerung der Endosomen inhibiert und so eine Signalweiterleitung über die Nukleinsäure-bindenden TLR3, TLR7/8 und TLR9 unterbindet, präinkubiert. Es zeigte sich verglichen mit unbehandelten

Flt3-L pDC eine um 40 % reduzierte IFN- α Produktion nach MVA Infektion (Abbildung 4.4C). Somit ist die MVA-vermittelte IFN- α Antwort unabhängig von TLR9, erfolgt jedoch zumindest partiell in Abhängigkeit von dem TLR-Adaptormolekül MyD88 sowie der in den Endosomen lokalisierten, Nukleinsäure-detektierenden TLRs. Interessanterweise ist die Rolle von TLR9 für die MVA-induzierte IFN- α Induktion in der Literatur stark umstritten. Zhu *et al.* konnten 2007 zeigen, dass für die VACV-induzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine TLR2/MyD88 eine Rolle spielen.¹⁵⁸ Die Induktion erfolgt möglicherweise durch frühe virale RNA Transkripte und/oder frühe virale Proteine. Da TLR2 an der Zellmembran lokalisiert ist, steht dies zwar im Widerspruch zu den mit Chloroquin erhobenen Daten, jedoch ist hier, wie in dieser Arbeit, ebenfalls die Abhängigkeit von MyD88 beschrieben. Samuelsson *et al.* zeigten 2008, dass die NF- κ B Aktivierung und die Expression von IFN- α nach MVA Infektion abhängig von TLR9 sowie über TLR-unabhängige Mechanismen erfolgt.²³¹ Dies steht im Widerspruch zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten, die zeigen, dass für eine MVA-induzierte IFN- α Produktion TLR9 keine Rolle spielt. In einer anderen Arbeit von Martin *et al.* 2009 wurde durch die Überexpression eines dominant-negativen MyD88-Adaptorproteins TLR9 inhibiert. Auch dieser Experimentelle Ansatz führte zu keiner Reduktion der NF- κ B Expression.²³² Dies bestätigt wiederum die in dieser Arbeit beschriebene TLR9-unabhängige Detektion von MVA. Kürzlich beschrieben Lynch *et al.*, dass MVA in Abhängigkeit von PKR über frühe virale Genexpression NF- κ B aktiviert.²³³ Daraus lässt sich schließen, dass bei einer Infektion mit MVA möglicherweise zwei Mechanismen zur Aktivierung von NF- κ B und so zur Induktion von Typ I IFN führen: einer, der in Fibroblasten beobachtet wurde, frühe Proteinsynthese einschließt und in Abhängigkeit des TLR-Systems erfolgt, sowie ein anderer in Immunzellen auftretender Mechanismus, der unabhängig von TLRs stattfindet.²³²

Delaloye *et al.* beschrieben 2009, dass MVA abhängig von TLR2-6, Mda5 sowie dem NALP3 Inflammasom in Makrophagen die Sekretion von IL1- β und IFN- β induziert.²³⁴ Eine neuere Arbeit von 2010 zeigt eine TLR8-vermittelte Aktivierung von pDC nach Infektion mit VACV.²³⁵ Hier wurde erstmals gezeigt, dass TLR8 im murinen System funktional ist und bei der Kontrolle viraler Infektionen eine Rolle spielt.²³⁵ So postulieren Martinez *et al.*, dass in pDC die NF- κ B Expression vermutlich über die Detektion von VACV-DNA mit poly A/T-reichen Motiven durch TLR8 induziert wird.²³⁵ Unterholzner *et al.* beschrieben 2010 einen weiteren intrazellulären DNA Sensor, IFI16. Hier konnte gezeigt werden, dass IFI16 VACV

70mer dsDNA als auch HSV 60mer DNA bindet und STING rekrutiert. Zudem ist IFI16 entscheidend an der HSV-induzierten IFN- β Produktion beteiligt.²³⁶

Zusammenfassend, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die MVA-induzierte Typ I IFN Antwort unabhängig von Nukleinsäure-detektierenden TLRs, wie TLR9, erfolgt. Die partielle Abhängigkeit von MyD88 unterstützt die Daten von Zhu *et al.*, bei denen eine TLR2/MyD88-induzierte Typ I IFN Induktion nach VACV Infektion postuliert wurde.¹⁵⁸ Für den intrazelluläre Sensor IFI16 konnte eine direkte Bindung zu VACV dsDNA beschrieben werden, somit stellt sich die Frage, welche Relevanz IFI16 für die Detektion von MVA in primären Immunzellen sowie *in vivo* besitzt. Aufgrund der zahlreichen unterschiedlichen, und zum Teil widersprüchlichen Befunde werden zukünftige Studien erforderlich sein, um den Mechanismus der MVA-induzierten IFN Antwort vollständig aufzuklären.

Wie bereits erwähnt (Absatz 4.1.4), wird die Rolle eines positiven Rückkopplungsmechanismus über den IFNAR bei der Produktion von IFN- α kontrovers diskutiert. Für pDC wurde ein IFNAR-unabhängiger Mechanismus zur IFN- α Produktion beschrieben, der von den TLR Signalwegkomponenten IRAK4, TRAF6 und IRF7 abhängig ist.^{90,91} Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob der IFNAR bei der MVA-vermittelten IFN- α Produktion eine Rolle spielt, oder IFNAR-unabhängige Mechanismen zur IFN Produktion führen. *In vitro* und *in vivo* Experimente konnten zeigen, dass die MVA-vermittelte IFN- α Produktion ausschließlich in Anwesenheit des IFNAR stattfindet. In IFNAR-defizienten Tieren sowie IFNAR-defizienten Flt3-L pDC wird kein IFN- α nach Infektion mit MVA induziert (Abbildung 4.5). Bezüglich des positiven Rückkopplungsmechanismus ist für Fibroblastenkulturen beschrieben, dass frühes IFN- α_4 und IFN- β an den IFNAR binden und so zur Induktion großer Mengen IFN- α führen. Daher stellte sich die Frage, ob für die MVA-induzierte Induktion von IFN- α die Expression von IFN- β erforderlich ist. Obwohl nach MVA Infektion *in vivo* hohe IFN- β Mengen und *in vitro* nachweisbar sind, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass IFN- β -defiziente Tiere nach MVA Infektion IFN- α produzieren (Abbildung 4.5). Analog dazu zeigten IFN- β -defiziente Flt3-L pDC eine normal IFN- α Produktion. Zusammenfassend erfolgt somit die IFNAR-abhängige Expression von IFN- α unabhängig von IFN- β .

Ein funktionelles Typ I IFN System spielt für die Kontrolle einer VACV Infektion eine entscheidende Rolle.^{81,237,238} Während IFNAR-defiziente Tiere je nach Infektionsdosis einer

VACV Infektion erliegen, können Wildtyp Tiere in der Regel Infektionsdosen bis zu 10^7 pfu problemlos bewältigen. Interessanterweise, spielt der IFNAR, trotz Ausbleiben einer im Serum der Tiere messbaren IFN Antwort, für die Kontrolle einer VACV Infektion eine entscheidende Rolle. Offenbar spielt das lokale Zytokinmilieu eine wichtige Rolle, die noch genauer untersucht werden muss.

IFNAR-defiziente und IFN- β -defiziente Tiere zeigen selbst nach Infektion mit hohen Dosen MVA keine Krankheitssymptome (Abbildung 4.5 und Daten nicht gezeigt). Dies demonstriert die Sicherheit im Hinblick auf den Einsatz von MVA als Vakzinierungsvektor. Im Rahmen dieser Arbeit konnten im **Abschnitt 4.1** Mechanismen entschlüsselt werden, die eine entscheidende Rolle bei der Induktion einer Typ I IFN Antwort nach MVA Infektion spielen und so zu der hohen Immunogenität von MVA beitragen. Die Analyse der MVA-induzierten Typ I IFN Produktion stellt einen wichtigen Schritt für das Verständnis der hohen Immunogenität von MVA dar. Hierdurch wird es ermöglicht, Strategien für eine weitere Steigerung der Immunogenität zu entwickeln und so MVA-basierte Vakzinierungsvektoren zu optimieren.

VACV induziert, im Gegensatz zu MVA, weder nach Infektion von Mäusen noch nach *in vitro* Infektion von Flt3-L pDC die Sekretion von Typ I IFN. Um zu untersuchen, ob die Abwesenheit einer Typ I IFN Antwort durch VACV-kodierte Immunmodulatoren vermittelt wird, wurden Co-Infektionsexperimente durchgeführt. Diese zeigten, dass VACV dazu in der Lage ist, MVA-induzierte Typ I IFN Antworten zu inhibieren (Abbildung 4.6A). Im **Abschnitt 4.2** sollte daher der Mechanismus der VACV-vermittelten Inhibition untersucht, sowie virale Immunmodulatoren identifiziert werden.

Dazu sollte zunächst untersucht werden, ob die VACV-vermittelte Inhibition einer Typ I IFN Antwort in Abhängigkeit von frühen, intermediären oder späten Genprodukten des Virus erfolgt. Hierfür wurden Experimente mit AraC und UV-inaktivierten VACV durchgeführt. Während AraC die DNA Replikation inhibiert und auf diese Weise die Expression intermediärer und später viraler Gene inhibiert, können nach UV Bestrahlung keine frühen viralen Genprodukte gebildet werden. Es zeigte sich, dass die Co-Stimulation mit AraC zu keinen reduzierten IFN- α Mengen nach Infektion von Flt3-L pDC führte. Infektion mit UV-bestrahltem VACV induzierten jedoch die Sekretion von IFN- α (Abbildung 4.6C und Abbildung 4.6D). Somit werden Inhibitor(en) von neu synthetisierten viralen Genen kodiert

werden, die früh im viralen Replikationszyklus produziert werden. MVA wurde wie in Abschnitt 2.6 beschrieben, durch die sequentielle Passagierung des parentalen VACV generiert. Daher sollte untersucht werden, ab welcher Passagierung während des Attenuierungsprozesses die Fähigkeit IFN Antworten zu inhibieren verloren ging. Analysen zweier Zwischenpassagen des Attenuierungsprozesses, Passage 152 (CVA152) und Passage 386 (CVA386) von VACV bzw. MVA ergaben, dass Immunmodulatoren schrittweise bei der Attenuierung verloren gingen. Die Fähigkeit, IFN- β Antworten zu inhibieren ging bereits zwischen Passage 152 und 386 verloren. Immunmodulatoren, die IFN- α Antworten inhibieren, werden hingegen von Passage 386, jedoch nicht mehr von MVA, produziert (Abbildung 4.7A und Abbildung 4.7B). Es konnte im Rahmen dieser Arbeit somit gezeigt werden, dass bei der Inhibition von Typ I IFN Antworten mindestens zwei Immunmodulatoren zusammen wirken: ein Inhibitor für IFN- β und einer für IFN- α . Hierbei wirken Immunmodulator(en) für IFN- β intrazellulär, während die Inhibition der IFN- α Antwort durch sekretierte Faktoren vermittelt wird (Abbildung 4.7C). Die Fähigkeit Typ I IFN Antworten zu inhibieren stellt vermutlich einen Mechanismus dar, die Replikation und Ausbreitung des Virus im Wirtsorganismus sicherzustellen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun VACV-kodierte Immunmodulatoren identifiziert werden, welche die Typ I IFN Produktion in Flt3-L pDC inhibieren. Das VACV-kodierte B18 gehört zu den Glykoproteinen der Immunoglobulin Superfamilie und weist nur geringe Homologien zu dem zellulären IFNAR auf. B18 wird von infizierten Zellen sezerniert und kann sowohl löslich als auch an der Zelloberfläche wirken und dort Typ I IFN binden.^{167,171} Daher stellte sich die Frage, ob B18 in Flt3-L pDC eine Rolle bei der Inhibition von IFN Antworten spielt. Analysen mit rekombinantem B18 zeigten, dass MVA-vermittelte IFN- α Antworten dosisabhängig von B18 inhibiert werden können. Die B18R-defiziente VACV Variante vAA6 induzierte nach Infektion von DC hingegen IFN- α Antworten. Zudem ist B18 in der Lage, auch die durch unterschiedliche TLR-Liganden induzierte IFN- α Antwort zu inhibieren (Abbildung 4.8). Somit ist allein die Expression von B18 für die VACV-vermittelte Inhibition von IFN- α entscheidend. Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit der VACV-kodierte lösliche IFN-Rezeptor B18 als hauptverantwortlicher Inhibitor für die Produktion von IFN- α durch Flt3-L pDC identifiziert werden. Da pDC wichtige IFN-Produzenten *in vivo* darstellen^{41,42,47,48}, kann durch die in dieser Arbeit erhobenen Daten erstmals die Relevanz von B18 für die Inhibition der IFN- α Antwort in primären Immunzellen bestätigt werden.

Analysen der Zwischenpassagen von VACV und MVA zeigten, dass Überstände CVA386-infizierter Zellen nicht dazu in der Lage waren, MVA-vermittelte IFN- α Antworten zu inhibieren. Hingegen wird durch direkter Infektion von Flt3-L pDC mit CVA386 kein IFN- α induziert (Abbildung 4.7). Es stellte sich daher die Frage, ob CVA386 für die komplette Sequenz von B18 kodiert und dieses nach Infektion exprimiert wird. Interessanterweise zeigten Sequenzanalysen (Daten Theresa Frenz; ²³⁹) und Northern Blot Analysen (Daten Holger Ludwig; ²³⁹) einen intakten offenen Leserahmen für B18R in CVA386 sowie die Expression B18R-spezifischer mRNA. In weiteren Experimenten wurden 500 Nukleotide stromaufwärts 5' des B18R ORF analysiert, bei denen sich ebenfalls keinerlei Sequenzunterschiede zu CVA152 und VACV zeigten (Daten Theresa Frenz). Die Diskrepanz zwischen einer MVA-vermittelten IFN- α Produktion nach Präinkubation mit Überständen CVA386-infizierter Zellen und einer inhibierten IFN- α Antwort bei direkter Co-Infektion mit Passage CVA386 kann durch die bislang erfolgten Expressionsanalysen von B18 also nicht erklärt werden. Daher sollen in zukünftigen Experimenten mögliche Unterschiede in der B18-Proteinexpression im Rahmen von Western Blot Analysen untersucht werden. Zudem können andere VACV-kodierte Immunmodulatoren bei der Funktionalität von B18 eine Rolle spielen. Neben B18R exprimiert VACV zusätzlich Immunmodulator(en) für die Inhibition von IFN- β . Überstände VACV-infizierter Zellen waren nicht dazu in der Lage, IFN- β Antworten zu inhibieren. Im Gegensatz zu B18 ist der Inhibitor der IFN- β Antwort daher ein intrazellulär wirkendes Protein. Experimente mit AraC behandeltem und UV-bestrahltem VACV zeigten, dass IFN- β Inhibitor(en) neu synthetisiert und früh im viralen Lebenszyklus exprimiert werden. Bei Infektionen von Flt3-L pDC mit den Zwischenpassagen CVA152 und CVA386 konnte gezeigt werden, dass Immunmodulatoren für IFN- β bereits zwischen den Passagen 152 und 386 im Attenuierungsprozess verloren gingen (Abbildung 4.7). Die Passage CVA386 weist im Gegensatz zu CVA152 die Deletion I (nicht essentielle Gene, HindIII C Fragment), Deletion II (nicht essentielle Gene M1L, M2L, und K1L) und Deletion IV (Hind III B Fragment) auf.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ Für K1 wurde bereits gezeigt, dass es mit Komponenten des TLR Systems sowie IRF3 interagiert und die Aktivierung von NF- κ B inhibiert.^{68,177,240,241} C7 inhibiert die Induktion der Apoptose.²⁴¹ K1L und C7L wirken zusammen als Antagonisten für die Protein Kinase R (PKR)-abhängige IFN-Induktion.²⁴¹ B14 wird ebenfalls früh im viralen Lebenszyklus exprimiert und inhibiert die IL-1 β - und TNF- α -induzierte NF- κ B Expression.

Wie bereits beschrieben bieten Sequenzanalysen die Möglichkeit, Kandidaten für die Inhibition von IFN- β zu identifizieren. Es stellte sich daher die Frage, mit welchen Methoden weitere VACV-kodierte Immunmodulatoren eingegrenzt werden können und wie potentiell immunmodulatorisch wirkende virale Kandidatengene in weiteren Analysen verifiziert werden können (**Abschnitt 4.3.**). Für die Identifikation VACV-kodierter Immunmodulatoren wurden sowohl 2-D Gele als auch DIGE-Analysen mit Zelllysaten VACV-Varianten infizierter Ftl3-L pDC durchgeführt. Als Referenz dienten Lysate uninfizierter Zellen. Anhand dieser Analysen konnten zwei VACV-kodierte Proteine identifiziert werden, die nach Infektion mit CVA152, jedoch nicht mit CVA386 und MVA exprimiert wurden. Die Proteinexpressionsanalysen von Virus-infizierten Zellen ermöglicht vollkommen neue Perspektiven bei der Entdeckung und Charakterisierung viraler Immunmodulatoren. Zudem wurden durch Sequenzanalysen von in der Literatur beschriebener, potentiell immunmodulatorisch wirkender VACV-kodierter Gene vier VACV-kodierte Proteine identifiziert, die abschließend hinsichtlich ihres immunmodulatorischen Potentials untersucht werden sollen.

Lentivirale Vektoren sind, anders als retrovirale Vektoren, dazu in der Lage, ruhende, sich nicht teilende Zellen zu transduzieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl humane als auch murine DC für die Transduktion mit lentiviralen Vektoren getestet. Dabei haben sich die humanen Zellen als besser transduzierbar erwiesen (Daten nicht gezeigt). Die Transduktion von DC ermöglicht eine stabile Expression des gewünschten Fremdgens in primären Immunzellen. Lentivirale Vektoren werden häufig über ein so genanntes Drei-Plasmid-System hergestellt. Dieses besteht aus Transfervektor, Verpackungsvektor und Hüllvektor und garantiert eine höhere Sicherheit bei der Vektorherstellung, da keine unkontrollierte Replikation der Viren stattfinden kann.²¹⁸ Der Transfervektor kodiert hierbei für das zu exprimierende Fremdgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Hinblick auf die Analyse VACV-kodierter potentiell immunmodulatorisch wirkender Proteine ein Transfervektor kloniert, der über eine *multiple cloning site* (MCS) verfügt (Abbildung 3.1), die ein einfaches Inserieren von Fremdgenen ermöglicht. In diesen Vektor wurden die vier identifizierten VACV-kodierten Gene, die möglicherweise für einen IFN- β Inhibitor kodieren, kloniert. Dies ermöglicht es nun, lentivirale Vektoren herzustellen, welche das jeweilige VACV-kodierte Gen als Transgen tragen. Nach Transduktion der DC kann somit in primären humanen Zellen

evaluiert werden, ob das Transgen immunmodulatorisch wirksam ist. Es könnte abschließend im Rahmen dieser Arbeit also eine Methode etabliert werden, um zukünftig Virus-kodierte Gene hinsichtlich ihres Potentials, Typ I IFN Antworten zu inhibieren, zu analysieren (**Abschnitt 4.3**). Dies schafft erstmals die Möglichkeit, Analysen in primären Immunzellen durchzuführen und lässt somit mögliche Rückschlüsse auf die Wirkungsweise im jeweiligen Wirtsorganismus zu. Zudem eröffnet es die Möglichkeit auch andere, insbesondere humanpathogene Erreger im Hinblick auf ihre immunmodulatorische Wirksamkeit zu analysieren. Durch die Identifikation viraler Inhibitoren von IFN-I könnten zudem neue Ansätze entwickelt werden, um Autoimmunkrankheiten, die mit übermäßiger Produktion von IFN-I assoziiert sind (wie z.B. Lupus Erythematoses oder Rheumatoide Arthritis), zu therapieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Takeda,K., Kaisho,T. & Akira,S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335-376 (2003).
2. Takeda,K. & Akira,S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**, 1-14 (2005).
3. Takeda,K. & Akira,S. Toll-like receptors. *Curr. Protoc. Immunol.* **Chapter 14**, Unit (2007).
4. Akira,S. & Takeda,K. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C. R. Biol.* **327**, 581-589 (2004).
5. Honda,K., Yanai,H., Takaoka,A. & Taniguchi,T. Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int. Immunol.* **17**, 1367-1378 (2005).
6. Kawai,T. & Akira,S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* **7**, 131-137 (2006).
7. Janeway,C.A., Jr. & Medzhitov,R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216 (2002).
8. Le Bon,A. & Tough,D.F. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 432-436 (2002).
9. Lund,J.M. *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 5598-5603 (2004).
10. Akira,S., Uematsu,S. & Takeuchi,O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).
11. Delves,P.J. & Roitt,I.M. The immune system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **343**, 37-49 (2000).
12. Delves,P.J. & Roitt,I.M. The immune system. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* **343**, 108-117 (2000).
13. Geissmann,F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656-661 (2010).
14. Behrens,G. *et al.* Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity. *Immunol. Cell Biol.* **82**, 84-90 (2004).
15. Clarke,S.R. The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 607-614 (2000).
16. Germain,R.N. & Margulies,D.H. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 403-450 (1993).
17. Rudolph,M.G., Stanfield,R.L. & Wilson,I.A. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 419-466 (2006).
18. Xiang,J., Huang,H. & Liu,Y. A new dynamic model of CD8+ T effector cell responses via CD4+ T helper-antigen-presenting cells. *J. Immunol.* **174**, 7497-7505 (2005).
19. Zhu,J. & Paul,W.E. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol. Rev.* **238**, 247-262 (2010).
20. Vock,C., Hauber,H.P. & Wegmann,M. The other T helper cells in asthma pathogenesis. *J. Allergy (Cairo.)* **2010**, 519298 (2010).
21. Harwood,N.E. & Batista,F.D. The Cytoskeleton Coordinates the Early Events of B-cell Activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2010).
22. Harwood,N.E. & Batista,F.D. Early events in B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 185-210 (2010).
23. Janeway,C.A., Jr. & Bottomly,K. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* **76**, 275-285 (1994).
24. Janeway,C.A., Jr. The discovery of T cell help for B cell antibody formation: a perspective from the 30th anniversary of this discovery. *Immunol. Cell Biol.* **77**, 177-179 (1999).
25. MacLennan,I.C. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 117-139 (1994).
26. Rajewsky,K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381**, 751-758 (1996).

-
27. Zuniga,E.I., McGavern,D.B., Pruneda-Paz,J.L., Teng,C. & Oldstone,M.B. Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nat. Immunol.* **5**, 1227-1234 (2004).
 28. Banchereau,J. & Steinman,R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252 (1998).
 29. Chahroudi,A. *et al.* Differences and similarities in viral life cycle progression and host cell physiology after infection of human dendritic cells with modified vaccinia virus Ankara and vaccinia virus. *J. Virol.* **80**, 8469-8481 (2006).
 30. Lanzavecchia,A. & Sallusto,F. Lead and follow: the dance of the dendritic cell and T cell. *Nat. Immunol.* **5**, 1201-1202 (2004).
 31. Heath,W.R. *et al.* Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol. Rev.* **199**, 9-26 (2004).
 32. Di Pucchio,T. *et al.* Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat. Immunol.* **9**, 551-557 (2008).
 33. Kurts,C., Robinson,B.W. & Knolle,P.A. Cross-priming in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 403-414 (2010).
 34. Reis e Sousa. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin. Immunol.* **16**, 27-34 (2004).
 35. Reis e Sousa. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 21-25 (2004).
 36. Viala,J., Sansonetti,P. & Philpott,D.J. Nods and 'intracellular' innate immunity. *C. R. Biol.* **327**, 551-555 (2004).
 37. Meylan,E., Tschopp,J. & Karin,M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* **442**, 39-44 (2006).
 38. Merad,M. & Ginhoux,F. Dendritic cell genealogy: a new stem or just another branch? *Nat. Immunol.* **8**, 1199-1201 (2007).
 39. Naik,S.H. *et al.* Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.* **8**, 1217-1226 (2007).
 40. Onai,N. *et al.* Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol.* **8**, 1207-1216 (2007).
 41. Barchet,W., Cella,M. & Colonna,M. Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Semin. Immunol.* **17**, 253-261 (2005).
 42. Colonna,M., Trinchieri,G. & Liu,Y.J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* **5**, 1219-1226 (2004).
 43. Grouard,G. *et al.* The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* **185**, 1101-1111 (1997).
 44. Haeryfar,S.M. The importance of being a pDC in antiviral immunity: the IFN mission versus Ag presentation? *Trends Immunol.* **26**, 311-317 (2005).
 45. Colonna,M., Krug,A. & Cella,M. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 373-379 (2002).
 46. Asselin-Paturel,C. *et al.* Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol.* **2**, 1144-1150 (2001).
 47. Asselin-Paturel,C. & Trinchieri,G. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J. Exp. Med.* **202**, 461-465 (2005).
 48. Barchet,W. *et al.* Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J. Exp. Med.* **195**, 507-516 (2002).
 49. www.ebioscience.com. Dendritic Cell Markers. 2011.
Ref Type: Catalog
 50. Bjorck,P. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* **98**, 3520-3526 (2001).
-

-
51. Liu, Y.J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 275-306 (2005).
 52. Nakano, H., Yanagita, M. & Gunn, M.D. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **194**, 1171-1178 (2001).
 53. Asselin-Paturel, C. *et al.* Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J. Exp. Med.* **201**, 1157-1167 (2005).
 54. Cella, M. *et al.* Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* **5**, 919-923 (1999).
 55. Diebold, S.S. *et al.* Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* **424**, 324-328 (2003).
 56. Fitzgerald-Bocarsly, P. Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol. Ther.* **60**, 39-62 (1993).
 57. Kabelitz, D. & Medzhitov, R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 1-3 (2007).
 58. 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.* **34**, 796-805 (2004).
 59. Dai, J., Megjugorac, N.J., Amrute, S.B. & Fitzgerald-Bocarsly, P. Regulation of IFN regulatory factor-7 and IFN-alpha production by enveloped virus and lipopolysaccharide in human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* **173**, 1535-1548 (2004).
 60. Honda, K. *et al.* IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772-777 (2005).
 61. Prakash, A., Smith, E., Lee, C.K. & Levy, D.E. Tissue-specific positive feedback requirements for production of type I interferon following virus infection. *J. Biol. Chem.* **280**, 18651-18657 (2005).
 62. Brawand, P. *et al.* Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J. Immunol.* **169**, 6711-6719 (2002).
 63. Gilliet, M. *et al.* The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **195**, 953-958 (2002).
 64. Isaacs, A., Lindenmann, J. & VALENTINE, R.C. Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **147**, 268-273 (1957).
 65. Isaacs, A. & Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **147**, 258-267 (1957).
 66. Isaacs, A. & Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J. Interferon Res.* **7**, 429-438 (1987).
 67. Krause, C.D. & Pestka, S. Historical developments in the research of interferon receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**, 473-482 (2007).
 68. Noppert, S.J., Fitzgerald, K.A. & Hertzog, P.J. The role of type I interferons in TLR responses. *Immunol. Cell Biol.* **85**, 446-457 (2007).
 69. Kotenko, S.V. *et al.* IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* **4**, 69-77 (2003).
 70. Pichlmair, A. & Reis e Sousa. Innate recognition of viruses. *Immunity.* **27**, 370-383 (2007).
 71. Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. & Schreiber, R.D. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 227-264 (1998).
 72. Stetson, D.B. & Medzhitov, R. Antiviral defense: interferons and beyond. *J. Exp. Med.* **203**, 1837-1841 (2006).
 73. Haller, O., Kochs, G. & Weber, F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* **344**, 119-130 (2006).
 74. Muller, U. *et al.* Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* **264**, 1918-1921 (1994).
-

-
75. Pestka,S., Krause,C.D. & Walter,M.R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* **202**, 8-32 (2004).
 76. Loo,Y.M. *et al.* Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J. Virol.* **82**, 335-345 (2008).
 77. Stetson,D.B. & Medzhitov,R. Type I interferons in host defense. *Immunity.* **25**, 373-381 (2006).
 78. Uematsu,S. & Akira,S. [Toll-like receptor and innate immunity]. *Seikagaku* **79**, 769-776 (2007).
 79. Uematsu,S. & Akira,S. Toll-like receptors and Type I interferons. *J. Biol. Chem.* **282**, 15319-15323 (2007).
 80. Le Bon,A. *et al.* Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity.* **14**, 461-470 (2001).
 81. van den Broek,M.F., Muller,U., Huang,S., Aguet,M. & Zinkernagel,R.M. Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *J. Virol.* **69**, 4792-4796 (1995).
 82. Weighardt,H. *et al.* Identification of a. *Eur. J. Immunol.* **34**, 558-564 (2004).
 83. Darnell,J.E., Jr., Kerr,I.M. & Stark,G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421 (1994).
 84. Boxel-Dezaire,A.H., Rani,M.R. & Stark,G.R. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity.* **25**, 361-372 (2006).
 85. Honda,K. & Taniguchi,T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 644-658 (2006).
 86. Samuel,C.E. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 778-809, table (2001).
 87. Marie,I., Durbin,J.E. & Levy,D.E. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* **17**, 6660-6669 (1998).
 88. Sato,M. *et al.* Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett.* **441**, 106-110 (1998).
 89. Colonna,M. TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own. *Eur. J. Immunol.* **37**, 306-309 (2007).
 90. Honda,K. *et al.* Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 15416-15421 (2004).
 91. Kawai,T. *et al.* Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat. Immunol.* **5**, 1061-1068 (2004).
 92. Kanzler,H., Barrat,F.J., Hessel,E.M. & Coffman,R.L. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat. Med.* **13**, 552-559 (2007).
 93. Kawai,T. & Akira,S. [Role of IPS-1 in type I IFN induction]. *Nippon Rinsho* **64**, 1231-1235 (2006).
 94. Kawai,T. & Akira,S. TLR signaling. *Cell Death. Differ.* **13**, 816-825 (2006).
 95. Saito,T. & Gale,M., Jr. Principles of intracellular viral recognition. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 17-23 (2007).
 96. Schroder,K. & Tschopp,J. The inflammasomes. *Cell* **140**, 821-832 (2010).
 97. Meylan,E. & Tschopp,J. Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol. Cell* **22**, 561-569 (2006).
 98. Jacobs,B.L. & Langland,J.O. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* **219**, 339-349 (1996).
 99. Ankel,H., Westra,D.F., Welling-Wester,S. & Lebon,P. Induction of interferon-alpha by glycoprotein D of herpes simplex virus: a possible role of chemokine receptors. *Virology* **251**, 317-326 (1998).
 100. Capobianchi,M.R. *et al.* Recombinant glycoprotein 120 of human immunodeficiency virus is a potent interferon inducer. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**, 575-579 (1992).
-

101. Laude,H., Gelfi,J., Lavenant,L. & Charley,B. Single amino acid changes in the viral glycoprotein M affect induction of alpha interferon by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* **66**, 743-749 (1992).
102. Sun,S. *et al.* UXT is a novel and essential cofactor in the NF-kappaB transcriptional enhanceosome. *J. Cell Biol.* **178**, 231-244 (2007).
103. Lang,T. & Mansell,A. The negative regulation of Toll-like receptor and associated pathways. *Immunol. Cell Biol.* **85**, 425-434 (2007).
104. Brinkmann,M.M. *et al.* The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.* **177**, 265-275 (2007).
105. Baccala,R., Hoebe,K., Kono,D.H., Beutler,B. & Theofilopoulos,A.N. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat. Med.* **13**, 543-551 (2007).
106. Guan,R. & Mariuzza,R.A. Peptidoglycan recognition proteins of the innate immune system. *Trends Microbiol.* **15**, 127-134 (2007).
107. Lund,J., Sato,A., Akira,S., Medzhitov,R. & Iwasaki,A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198**, 513-520 (2003).
108. Hochrein,H. *et al.* Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 11416-11421 (2004).
109. Krug,A. *et al.* TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity.* **21**, 107-119 (2004).
110. Krug,A. *et al.* Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* **103**, 1433-1437 (2004).
111. Tabeta,K. *et al.* Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 3516-3521 (2004).
112. Honda,K. *et al.* Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* **434**, 1035-1040 (2005).
113. Krug,A. *et al.* Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3026-3037 (2001).
114. Crozat,K. & Beutler,B. TLR7: A new sensor of viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 6835-6836 (2004).
115. Lee,H.K., Lund,J.M., Ramanathan,B., Mizushima,N. & Iwasaki,A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* **315**, 1398-1401 (2007).
116. O'Neill,L.A. & Bowie,A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 353-364 (2007).
117. Karin,M. Rsk Tolls the bell for endocytosis in DCs. *Nat. Immunol.* **8**, 1197-1199 (2007).
118. Kato,H. *et al.* Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity.* **23**, 19-28 (2005).
119. van Vliet,S.J., den Dunnen,J., Gringhuis,S.I., Geijtenbeek,T.B. & van Kooyk,Y. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 435-440 (2007).
120. Kawai,T. & Akira,S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 338-344 (2005).
121. Kawai,T. & Akira,S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* **21**, 317-337 (2009).
122. Malathi,K., Dong,B., Gale,M., Jr. & Silverman,R.H. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* **448**, 816-819 (2007).
123. Seth,R.B., Sun,L., Ea,C.K. & Chen,Z.J. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**, 669-682 (2005).

-
124. Xu,L.G. *et al.* VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol. Cell* **19**, 727-740 (2005).
 125. Hornung,V. *et al.* 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-997 (2006).
 126. Kawai,T. & Akira,S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1143**, 1-20 (2008).
 127. Yoneyama,M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* **5**, 730-737 (2004).
 128. Yoneyama,M. & Fujita,T. [RIG-I: critical regulator for virus-induced innate immunity]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **49**, 2571-2578 (2004).
 129. Clemens,M.J. & Elia,A. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J. Interferon Cytokine Res.* **17**, 503-524 (1997).
 130. Ishii,K.J. *et al.* A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat. Immunol.* **7**, 40-48 (2006).
 131. Ishii,K.J. & Akira,S. Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. *Trends Immunol.* **27**, 525-532 (2006).
 132. Okabe,Y., Kawane,K., Akira,S., Taniguchi,T. & Nagata,S. Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *J. Exp. Med.* **202**, 1333-1339 (2005).
 133. Stetson,D.B. & Medzhitov,R. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity.* **24**, 93-103 (2006).
 134. Sun,Q. *et al.* The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity.* **24**, 633-642 (2006).
 135. Takaoka,A. *et al.* DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**, 501-505 (2007).
 136. Wang,Z. *et al.* Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 5477-5482 (2008).
 137. Ishikawa,H. & Barber,G.N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674-678 (2008).
 138. Cao,X. New DNA-sensing pathway feeds RIG-I with RNA. *Nat. Immunol.* **10**, 1049-1051 (2009).
 139. Fernandes-Alnemri,T. *et al.* The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nat. Immunol.* **11**, 385-393 (2010).
 140. Krieg,A.M. AIMing 2 defend against intracellular pathogens. *Nat. Immunol.* **11**, 367-369 (2010).
 141. Rathinam,V.A. *et al.* The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat. Immunol.* **11**, 395-402 (2010).
 142. Ablasser,A. *et al.* RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat. Immunol.* **10**, 1065-1072 (2009).
 143. Chiu,Y.H., Macmillan,J.B. & Chen,Z.J. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* **138**, 576-591 (2009).
 144. Alcami,A. & Koszinowski,U.H. Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol. Today* **21**, 447-455 (2000).
 145. Mahalingam,S. & Karupiah,G. Modulation of chemokines by poxvirus infections. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 409-412 (2000).
 146. Oie,K.L. & Pickup,D.J. Cowpox virus and other members of the orthopoxvirus genus interfere with the regulation of NF-kappaB activation. *Virology* **288**, 175-187 (2001).
 147. Weber,F., Kochs,G. & Haller,O. Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol.* **17**, 498-515 (2004).
 148. Weber,F. & Haller,O. Viral suppression of the interferon system. *Biochimie* **89**, 836-842 (2007).
 149. Bowie,A. *et al.* A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 10162-10167 (2000).
-

-
150. Stack, J. *et al.* Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J. Exp. Med.* **201**, 1007-1018 (2005).
 151. DiPerna, G. *et al.* Poxvirus protein N1L targets the I-kappaB kinase complex, inhibits signaling to NF-kappaB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 36570-36578 (2004).
 152. Alcami, A. & Smith, G.L. Cytokine receptors encoded by poxviruses: a lesson in cytokine biology. *Immunol. Today* **16**, 474-478 (1995).
 153. Alcami, A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 36-50 (2003).
 154. Goebel, S.J. *et al.* The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* **179**, 247-263 (1990).
 155. Johnson, G.P., Goebel, S.J. & Paoletti, E. An update on the vaccinia virus genome. *Virology* **196**, 381-401 (1993).
 156. Moss, B. *Poxviridae: the viruses and their replication.* 2849-2883. *Fields virology*, 4th ed., vol. 2. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa., D. M. Knipe and P. M. Howley. Ref Type: Generic
 157. Moss, B. & Shisler, J.L. Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes. *Semin. Immunol.* **13**, 59-66 (2001).
 158. Zhu, J., Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. Innate immunity against vaccinia virus is mediated by TLR2 and requires TLR-independent production of IFN-beta. *Blood* **109**, 619-625 (2007).
 159. Townsley, A.C. & Moss, B. Two distinct low-pH steps promote entry of vaccinia virus. *J. Virol.* **81**, 8613-8620 (2007).
 160. Smith, G.L., Symons, J.A., Khanna, A., Vanderplasschen, A. & Alcami, A. Vaccinia virus immune evasion. *Immunol. Rev.* **159**, 137-154 (1997).
 161. Vos, J.C. & Stunnenberg, H.G. Derepression of a novel class of vaccinia virus genes upon DNA replication. *EMBO J.* **7**, 3487-3492 (1988).
 162. Drillien, R., Spehner, D., Bohbot, A. & Hanau, D. Vaccinia virus-related events and phenotypic changes after infection of dendritic cells derived from human monocytes. *Virology* **268**, 471-481 (2000).
 163. Engelmayer, J. *et al.* Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J. Immunol.* **163**, 6762-6768 (1999).
 164. Chahroudi, A. *et al.* Vaccinia virus tropism for primary hematology cells is determined by restricted expression of a unique virus receptor. *J. Virol.* **79**, 10397-10407 (2005).
 165. Bartlett, N., Symons, J.A., Tschärke, D.C. & Smith, G.L. The vaccinia virus N1L protein is an intracellular homodimer that promotes virulence. *J. Gen. Virol.* **83**, 1965-1976 (2002).
 166. Smith, G.L. Vaccinia virus glycoproteins and immune evasion. The sixteenth Fleming Lecture. *J. Gen. Virol.* **74 (Pt 9)**, 1725-1740 (1993).
 167. Symons, J.A., Alcami, A. & Smith, G.L. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell* **81**, 551-560 (1995).
 168. Modrow, Falke & Truyen. *Molekulare Virologie. Eine Einführung für Biologen und Mediziner.* Spektrum Akademischer Verlag / Gustav Fischer, (2003).
 169. Alcami, A., Symons, J.A., Collins, P.D., Williams, T.J. & Smith, G.L. Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *J. Immunol.* **160**, 624-633 (1998).
 170. Alcami, A. & Smith, G.L. A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* **71**, 153-167 (1992).
 171. Alcami, A., Symons, J.A. & Smith, G.L. The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN. *J. Virol.* **74**, 11230-11239 (2000).
 172. Smith, G.L., Symons, J.A. & Alcami, A. Immune modulation by proteins secreted from cells infected by vaccinia virus. *Arch. Virol. Suppl* **15**, 111-129 (1999).
-

-
173. Liptakova,H., Kontsekova,E., Alcamì,A., Smith,G.L. & Kontsek,P. Analysis of an interaction between the soluble vaccinia virus-coded type I interferon (IFN)-receptor and human IFN-alpha1 and IFN-alpha2. *Virology* **232**, 86-90 (1997).
 174. Ueda,Y., Morikawa,S. & Matsuura,Y. Identification and nucleotide sequence of the gene encoding a surface antigen induced by vaccinia virus. *Virology* **177**, 588-594 (1990).
 175. Morikawa,S. & Ueda,Y. Characterization of vaccinia surface antigen expressed by recombinant baculovirus. *Virology* **193**, 753-761 (1993).
 176. Harte,M.T. *et al.* The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J. Exp. Med.* **197**, 343-351 (2003).
 177. Shisler,J.L. & Jin,X.L. The vaccinia virus K1L gene product inhibits host NF-kappaB activation by preventing IkappaBalpha degradation. *J. Virol.* **78**, 3553-3560 (2004).
 178. Deng,L., Dai,P., Ding,W., Granstein,R.D. & Shuman,S. Vaccinia virus infection attenuates innate immune responses and antigen presentation by epidermal dendritic cells. *J. Virol.* **80**, 9977-9987 (2006).
 179. Belz,G.T. *et al.* Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J. Immunol.* **172**, 1996-2000 (2004).
 180. Fenner,F. Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign. *Res. Virol.* **140**, 465-466 (1989).
 181. Mayr,A. [Historical review of smallpox, the eradication of smallpox and the attenuated smallpox MVA vaccine]. *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **112**, 322-328 (1999).
 182. Hochstein-Mintzel,V., Huber,H.C. & Stickl,H. [Virulence and immunogenicity of a modified vaccinia virus (strain MVA) (author's transl)]. *Z. Immunitätsforsch. Exp. Klin. Immunol.* **144**, 104-156 (1972).
 183. Hochstein-Mintzel,V., Hanichen,T., Huber,H.C. & Stickl,H. [An attenuated strain of vaccinia virus (MVA). Successful intramuscular immunization against vaccinia and variola (author's transl)]. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig. A* **230**, 283-297 (1975).
 184. Mayr,A., Stickl,H., Müller,H.K., Danner,K. & Singer,H. [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl. Bakteriolog. B* **167**, 375-390 (1978).
 185. Mayr,H.-M.u.H.S. Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. Volume 3(Number 1), 6-14.
Ref Type: Generic
 186. Altenburger,W., Suter,C.P. & Altenburger,J. Partial deletion of the human host range gene in the attenuated vaccinia virus MVA. *Arch. Virol.* **105**, 15-27 (1989).
 187. Antoine,G., Scheiflinger,F., Dorner,F. & Falkner,F.G. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* **244**, 365-396 (1998).
 188. Meyer,H., Sutter,G. & Mayr,A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.* **72** (Pt 5), 1031-1038 (1991).
 189. Drexler,I., Heller,K., Wahren,B., Erfle,V. & Sutter,G. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J. Gen. Virol.* **79** (Pt 2), 347-352 (1998).
 190. Drillien,R., Spohner,D. & Hanau,D. Modified vaccinia virus Ankara induces moderate activation of human dendritic cells. *J. Gen. Virol.* **85**, 2167-2175 (2004).
 191. Franchini,M. *et al.* Dendritic cells from mice neonatally vaccinated with modified vaccinia virus Ankara transfer resistance against herpes simplex virus type I to naive one-week-old mice. *J. Immunol.* **172**, 6304-6312 (2004).
 192. Hornemann,S. *et al.* Replication of modified vaccinia virus Ankara in primary chicken embryo fibroblasts requires expression of the interferon resistance gene E3L. *J. Virol.* **77**, 8394-8407 (2003).
-

-
193. Sutter,G. & Moss,B. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 10847-10851 (1992).
 194. Blanchard,T.J., Alcami,A., Andrea,P. & Smith,G.L. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J. Gen. Virol.* **79 (Pt 5)**, 1159-1167 (1998).
 195. Yates,N.L. & Alexander-Miller,M.A. Vaccinia virus infection of mature dendritic cells results in activation of virus-specific naive CD8+ T cells: a potential mechanism for direct presentation. *Virology* **359**, 349-361 (2007).
 196. Alcami,A. & Smith,G.L. Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *J. Virol.* **69**, 4633-4639 (1995).
 197. Waibler,Z. *et al.* Excessive CpG 1668 stimulation triggers IL-10 production by cDC that inhibits IFN-alpha responses by pDC. *Eur. J. Immunol.* **38**, 3127-3137 (2008).
 198. Kalali,B.N. *et al.* Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling. *J. Immunol.* **181**, 2694-2704 (2008).
 199. McCartney,S. *et al.* Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly(I:C)-mediated activation of mouse NK cells. *J. Exp. Med.* **206**, 2967-2976 (2009).
 200. Perrot,I. *et al.* TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA. *J. Immunol.* **185**, 2080-2088 (2010).
 201. Takeuchi,O., Hemmi,H. & Akira,S. Interferon response induced by Toll-like receptor signaling. *J. Endotoxin. Res.* **10**, 252-256 (2004).
 202. Wang,Y., Cella,M., Gilfillan,S. & Colonna,M. Cutting edge: polyinosinic:polycytidylic acid boosts the generation of memory CD8 T cells through melanoma differentiation-associated protein 5 expressed in stromal cells. *J. Immunol.* **184**, 2751-2755 (2010).
 203. Barber,G.N. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Curr. Opin. Immunol.* (2011).
 204. Takeshita,F. & Ishii,K.J. Intracellular DNA sensors in immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 383-388 (2008).
 205. Alcami,A. & Smith,G.L. The vaccinia virus soluble interferon-gamma receptor is a homodimer. *J. Gen. Virol.* **83**, 545-549 (2002).
 206. Alcami,A. & Saraiva,M. Chemokine binding proteins encoded by pathogens. *Adv. Exp. Med. Biol.* **666**, 167-179 (2009).
 207. Waibler,Z. *et al.* Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components. *J. Virol.* **83**, 1563-1571 (2009).
 208. Georgel,P. *et al.* Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Virology* **362**, 304-313 (2007).
 209. Zhou,S. *et al.* Role of MyD88 in route-dependent susceptibility to vesicular stomatitis virus infection. *J. Immunol.* **178**, 5173-5181 (2007).
 210. Rabilloud,T. Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline. *Methods Mol. Biol.* **112**, 9-19 (1999).
 211. Rabilloud,T. Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. *Anal. Chem.* **72**, 48A-55A (2000).
 212. Schmitz,S. Der Experimentator: Zellkultur . (2009).
 213. Laassri,M., Chizhikov,V., Mikheev,M., Shchelkunov,S. & Chumakov,K. Detection and discrimination of orthopoxviruses using microarrays of immobilized oligonucleotides. *J. Virol. Methods* **112**, 67-78 (2003).
 214. Ryabinin,V.A. *et al.* Microarray assay for detection and discrimination of Orthopoxvirus species. *J. Med. Virol.* **78**, 1325-1340 (2006).
 215. Pedersen,K. *et al.* Characterization of vaccinia virus intracellular cores: implications for viral uncoating and core structure. *J. Virol.* **74**, 3525-3536 (2000).
-

-
216. Risco,C. *et al.* The vaccinia virus 39-kDa protein forms a stable complex with the p4a/4a major core protein early in morphogenesis. *Virology* **265**, 375-386 (1999).
217. Valderrama,F., Cordeiro,J.V., Schleich,S., Frischknecht,F. & Way,M. Vaccinia virus-induced cell motility requires F11L-mediated inhibition of RhoA signaling. *Science* **311**, 377-381 (2006).
218. Grabski,E. *et al.* Comparative analysis of transduced primary human dendritic cells generated by the use of three different lentiviral vector systems. *Mol. Biotechnol.* **47**, 262-269 (2011).
219. Muhlebach,M.D. *et al.* Stable transduction of primary human monocytes by simian lentiviral vector PBj. *Mol. Ther.* **12**, 1206-1216 (2005).
220. Rengstl,B. Funktionale Analyse des TAP-abhängigen Peptidtransports auf MHC-I Moleküle in humanen dendritischen Zellen (Diplomarbeit). 2009.
Ref Type: Thesis/Dissertation
221. Merkel,T.J. *et al.* Development of a highly efficacious vaccinia-based dual vaccine against smallpox and anthrax, two important bioterror entities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 18091-18096 (2010).
222. Paul Ehrlich Institut. Paul-Ehrlich-Institut Jahresbericht 2007/2008. 2008.
Ref Type: Report
223. de Souza,T.G. *et al.* Zoonotic vaccinia virus infection in Brazil: clinical description and implications for health professionals. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1370-1372 (2007).
224. Smith,G.L. & McFadden,G. Smallpox: anything to declare? *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 521-527 (2002).
225. Garber,D.A. *et al.* Expanding the repertoire of Modified Vaccinia Ankara-based vaccine vectors via genetic complementation strategies. *PLoS. One.* **4**, e5445 (2009).
226. National Institute of Health. ClinicalTrial.gov <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=MVA>. 2011.
Ref Type: Internet Communication
227. Apostolou,E. & Thanos,D. Virus Infection Induces NF-kappaB-dependent interchromosomal associations mediating monoallelic IFN-beta gene expression. *Cell* **134**, 85-96 (2008).
228. Iwamura,T. *et al.* Induction of IRF-3/-7 kinase and NF-kappaB in response to double-stranded RNA and virus infection: common and unique pathways. *Genes Cells* **6**, 375-388 (2001).
229. Taniguchi,T. & Takaoka,A. The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 111-116 (2002).
230. Yang,K. *et al.* Human TLR-7-, -8-, and -9-mediated induction of IFN-alpha/beta and -lambda Is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. *Immunity.* **23**, 465-478 (2005).
231. Samuelsson,C. *et al.* Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *J. Clin. Invest* **118**, 1776-1784 (2008).
232. Martin,S. & Shisler,J.L. Early viral protein synthesis is necessary for NF-kappaB activation in modified vaccinia Ankara (MVA)-infected 293 T fibroblast cells. *Virology* **390**, 298-306 (2009).
233. Lynch,H.E. *et al.* Modified vaccinia virus Ankara can activate NF-kappaB transcription factors through a double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-dependent pathway during the early phase of virus replication. *Virology* **391**, 177-186 (2009).
234. Delaloye,J. *et al.* Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. *PLoS. Pathog.* **5**, e1000480 (2009).
235. Martinez,J., Huang,X. & Yang,Y. Toll-like receptor 8-mediated activation of murine plasmacytoid dendritic cells by vaccinia viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 6442-6447 (2010).
236. Unterholzner,L. *et al.* IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol.* **11**, 997-1004 (2010).
-

237. Deonarain,R. *et al.* Impaired antiviral response and alpha/beta interferon induction in mice lacking beta interferon. *J. Virol.* **74**, 3404-3409 (2000).
238. van den Broek,M.F., Muller,U., Huang,S., Zinkernagel,R.M. & Aguet,M. Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol. Rev.* **148**, 5-18 (1995).
239. Waibler,Z. *et al.* Modified vaccinia virus Ankara induces Toll-like receptor-independent type I interferon responses. *J. Virol.* **81**, 12102-12110 (2007).
240. Chang,T.H., Liao,C.L. & Lin,Y.L. Flavivirus induces interferon-beta gene expression through a pathway involving RIG-I-dependent IRF-3 and PI3K-dependent NF-kappaB activation. *Microbes. Infect.* **8**, 157-171 (2006).
241. Meng,X. *et al.* Vaccinia virus K1L and C7L inhibit antiviral activities induced by type I interferons. *J. Virol.* **83**, 10627-10636 (2009).

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Darstellung einer DC und die schematische Darstellung der Generierung <i>in vitro</i> differenzierter DC	
Abb. 2.2:	Die Rolle des Typ I IFN am Beispiel einer Infektion von Mäusen mit VSV	S. 10
Abb. 2.3:	Induktion von Typ I IFN.	S. 13
Abb. 2.4:	Durch eine virale Infektion wird über eine hier schematisch vereinfacht dargestellte Signaltransduktion IFN- α induziert.	S. 14
Abb. 2.5:	Elektronenmikroskopische Aufnahme des (A) Vaccinia Virus (VACV) und des (B) Modifizierten Vaccinia Virus Ankara (MVA).	S. 21
Abb. 3.1:	BglII Schnittstelle innerhalb der MCS von pIRES2eGFP.	S.60
Abb. 4.1:	MVA induziert Typ I IFN Antworten nach Infektion von Mäusen sowie nach Infektion dendritischer Zellen.	S. 64
Abb. 4.2:	DC werden durch MVA-Infektion aktiviert.	S. 66
Abb. 4.3:	Die Produktion von IFN- α durch Flt3-L und GM-CSF DC erfordert weder eine produktive Infektion noch virale Replikation.	S. 68
Abb. 4.4:	Die IFN- α Induktion durch MVA ist weitgehend unabhängig von TLRs.	S. 71
Abb. 4.5:	Der IFNAR, jedoch nicht die Expression von IFN- β , spielt eine entscheidende Rolle bei der MVA-vermittelten IFN- α Induktion.	S. 74
Abb. 4.6:	Die Infektion mit VACV inhibiert MVA-induzierte IFN- α Antworten.	S. 77
Abb. 4.7:	VACV-kodierte Immunmodulatoren gingen schrittweise bei der Attenuierung von MVA verloren.	S. 79
Abb. 4.8:	B18 vermittelt die Inhibition von IFN- α Antworten.	S. 81
Abb. 4.9:	VACV inhibiert die Maturierung dendritischer Zellen.	S. 85
Abb. 4.10:	VACV inhibiert die durch TLR-Liganden induzierten Typ I IFN Antworten.	S. 87

Abb. 4.11:	VACV-kodierte Immunmodularoren inhibieren die Phosphorylierung von STAT1 und die Degradierung von I κ -B α .	S. 89
Abb. 4.12:	VACV-kodierte Immunmodularoren inhibieren IFN- β Antworten nach Infektion humaner iDC.	S. 92
Abb. 4.13:	2D Analysen CVA152 und CVA386-infizierter Zellen.	S. 94
Abb. 4.14:	<i>Differential in gel electrophoresis</i> (DIGE)-Analysen CVA152- und CVA386-infizierter Zellen.	S. 96
Abb. 4.15:	Identifikation VACV-kodierter Gene, die für potentielle Immunmodulatoren kodieren.	S. 99
Abb. 4.16:	Generierung eines Konstruktes ausgehend von pIRES eGFP zur Insertion in den Transfervektor Vif delta <i>EcoRI</i> .	S. 101
Abb. 4.17:	Klonierung eines SIVmac-basierenden Transfervektors für die Integration VACV-kodierter Gene.	S. 103
Abb. 4.18:	Insertion der VACV-kodierten Gene in den Transfervektor Vif IRES.	S.105

8. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Martina Anzaghe (geborene Wietschorke)
Geburtsdatum	27. Oktober 1980
Geburtsort	Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulische und Berufliche Ausbildung

09/87 - 06/91	Münzenberger Grundschule
09/91 - 06/00	Wöhlerschule Abschluss mit Abitur 06/00
10/00 - 11/05	Johann Wolfgang von Goethe Universität Fachrichtung: Biologie, Schwerpunkt: Molekulare Biologie Abschluss als Diplom Biologin 11/05
02/06 -09/09	Paul-Ehrlich-Institut, Abteilung: Immunologie Doktorandin
04/09-09/09	Angestellte des TWINCORE Institutes mit Gastwissenschaftlerstatus am Paul-Ehrlich-Institut
seit 10/09	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Stammzelltransplantationszentrum, Kinderklinik der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main

9. Veröffentlichungen

Anzaghe M, Waibler Z, Ludwig H, Akira S, Weiss S, Sutter G, Kalinke U., 2007, „Modified vaccinia virus Ankara induces Toll-like receptor-independent type I interferon responses.“, J Virol. 81(22):12102-10

Waibler Z, **Anzaghe M**, Konur A, Akira S, Müller W, Kalinke U., 2008, „Excessive CpG 1668 stimulation triggers IL-10 production by cDC that inhibits IFN-alpha responses by pDC.“, Eur J Immunol. 38(11):3127-37

Anzaghe M, Waibler Z, Frenz T, Schwantes A, Pöhlmann C, Ludwig H, Palomo-Otero M, Alcamí A, Sutter G, Kalinke U., 2009 „Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components.“, J Virol. 83(4):1563-71

Rettinger E, Kuci S, Kuci Z, **Anzaghe M**, Willasch A, Kreyenberg H, Koehl U, Fulda S, Klingebiel T, Bader P, 2010 „Enhancing cytotoxicity of cytokine-induced killer cells against refractory leukemia.“, Bone Marrow Transplantation 45 (Suppl. 2): S300

10. Danksagung

Zum Abschluss meiner Doktorarbeit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren und die mich während der letzten Jahre unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Kalinke danke ich als meinem Doktorvater, dass er mir diese Doktorarbeit ermöglicht hat. Danke für alles, was ich von dir lernen durfte, für deine stets motivierenden Worte, deine kreativen Ideen und dafür, dass du mir am Paul Ehrlich Institut ein erstklassiges Umfeld zum Erstellen der Arbeit bereitgestellt hast.

Herrn Prof. Dr. Reinhold Förster danke ich, dass er für die Disputation das Co-Referat übernommen hat.

Herrn Prof. Dr. Ernst Ungewickell danke ich, dass er sich als Drittprüfer zur Verfügung gestellt hat.

Herrn Prof. Dr. Thomas Brüser danke ich, dass er freundlicherweise die Betreuung und den Prüfungsvorsitz von Seiten der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover übernommen hat.

Ein besonderes Dankeschön gilt Frau Dr. Zoe Waibler für ihre Betreuung dieser Doktorarbeit. Danke, dass du mich wissenschaftlich durch dein Motivations- und Organisationstalent geprägt hast, danke für dein stets offenes Ohr, für deine Unterstützung und noch so vieles mehr. Diese Arbeit wäre ohne dich nicht zu dem geworden, was sie ist.

Prof Dr. Gerd Sutter, Dr. Yasemine Süzer, Dr. Astrid Schwantes und Dr. Holger Ludwig danke ich sehr für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei virologischen Fragen und Experimenten.

Allen Mitarbeitern, sowie ehemaligen Doktoranden und Diplomanden der Abteilung Immunologie, sowie der Nachwuchsgruppe NG2 des Paul-Ehrlich-Institutes möchte ich für die gemeinsame Zeit, die gegenseitige Hilfe und Unterstützung und den vielen Spass, den wir hatten, danken.

Besonders erwähnen möchte ich Dr. Patricia Bach, Stefanie Bauer, Elea Conrad, Dr. Claudia Detje, Katja Doering, Sven Flindt, Dr. Theresa Frenz, Elena Grabski, Dr. Thomas Hinz, Dr. Elisabeth Kamphuis, Dr. Jörg Kirberg, Dr. Martin Koenig, Dorothea Kreuz, Benjamin Rengstl, Dr. Susanne Roederstein, Dr. Linda Semmler, Christian Stein und Sabrina Weissmüller.

Es war eine unvergessliche Zeit mit euch und ich möchte keine Sekunde davon missen!

Der größte Dank gebührt meiner Mutter, Irene Wietschorke. Ich danke dir für deine ausdauernde immer währende Hilfsbereitschaft und das viele Babysitten - ohne dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Ich danke Zuber Anzaghe für sein offenes Ohr und seine Unterstützungen in unseren gemeinsamen Jahren, meinem Bruder, Manfred Wietschorke, und allen Freunden, die mir auch in schweren Zeiten zur Seite standen. Insbesondere möchte ich Juliane Kummer, Christine Hartwig, Ines Hartwig und Seda Germeli-Anzaghe für ihre stets motivierenden Worte und ihre Unterstützung während all der Jahre danken. Danke auch an Dr. Claus Meyer und Dr. Björn-Philipp Kloke für den seelischen Beistand und ihre Hilfe bei Formatierungsfragen, sowie Ben Eising, der mir in meiner letzten Schreibphase im Labor den Rücken frei gehalten hat.

Abschliessend ein großes Dankeschön an Prof. Dr. Peter Bader, meinem Arbeitgeber seit Oktober 2009, für sein großzügiges Entgegenkommen und seine stetige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Vielen Dank!