



Charakterisierung der angeborenen Immunantwort gegen Pneumoviren in einem *in vivo* Modell

Characterization of the innate immune response against pneumoviruses in an *in vivo* model

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infection and Immunity

vorgelegt von

Britta Heinze

aus

Meppen

Würzburg 2010

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Müller

1. Betreuer: Dr. Christine Krempf

2. Betreuer: PD Dr. Gabriele Pradel

3. Betreuer: Prof. Dr. Axel Rethwilm

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

„Charakterisierung der angeborenen Immunantwort gegen Pneumoviren in einem *in vivo* Modell“

selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled

“Characterization of the innate immune response against pneumoviruses in an *in vivo* model”

is the result of my own work. I did not receive any help or support from third parties, i.e. commercial consultants or others. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I verify that this thesis, neither in identical nor in similar form has not yet been submitted as a part of another examination process. I confirm that the information which I have given in this application is complete and true.

Würzburg, 9. Mai 2011

In liebevoller Erinnerung an Gerhard Heinze

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Interferon (IFN)	1
1.2	Interferon-Synthese und Interferon-Signaltransduktion	3
1.3	Pneumoviren	6
1.3.1	Taxonomie von Pneumoviren	6
1.3.2	Morphologie von Pneumoviren	7
1.3.3	Transkription und Replikation von Pneumoviren	8
1.4	Das respiratorische Synzytialvirus (RSV)	10
1.4.1	Epidemiologie und Pathogenität	10
1.4.2	Immunologie	11
1.5	Das Pneumonievirus der Maus (PVM)	12
1.5.1	Die geschichtliche Entwicklung von PVM	12
1.5.2	Pathologie und Immunologie	13
1.6	Die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2	14
1.6.1	Die Funktion der Nichtstrukturproteine als Interferonantagonisten	14
2	Zielsetzung	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Material	17
3.1.1	Antikörper	17
3.1.2	Puffer, Medien und Lösungen	18
3.1.3	Kits	18
3.1.4	Chemikalien, Enzyme und Materialien	19
3.1.5	Versuchstiere	19
3.1.6	Zelllinien	20
3.1.7	Primer	21
3.1.8	Bakterienstamm	22
3.1.9	Plasmide	22
3.2	Zellbiologische Methoden	23
3.2.1	Kultivierung der Zellen	23
3.2.2	Gefrierkulturen	23
3.3	Molekularbiologische Methoden	23
3.3.1	Quantifizierung von Nukleinsäure-Proben	23
3.3.2	Plasmid-DNA Präparation	24
3.3.3	Restriktionsverdau von DNA	24
3.3.4	DNA-Gelelektrophorese	24
3.3.5	DNA-Extraktion	24
3.3.6	Ligation und Transformation	25
3.3.7	RNA-Isolierung	25
3.3.8	Reverse Transkription	25
3.3.9	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	26

3.3.10	Gerichtete Mutagenese-PCR	26
3.3.11	DNA-Sequenzierung	27
3.3.12	Nachweis von IFN- β mittels Luziferase Assay	27
3.4	Virologische und immunologische Methoden	28
3.4.1	Plaquetest	28
3.4.2	Virusinfektion	29
3.4.3	Transfektion von BSR T7/5-Zellen mit verschiedenen Δ NS-pPVM-Konstrukten	29
3.4.4	Nachweis von IFN- α und IFN- β mittels ELISA	30
3.4.5	Mitochondrial Permeability Transition (MitoPT)-TMRE Assay	30
3.5	Tierexperimentelle Methoden	31
3.5.1	Infektion von Mäusen	31
3.5.2	Präparation der Lunge	31
3.5.3	Homogenisation der Lunge	31
3.5.4	Bronchoalveolar Lavage (BAL)	31
3.5.5	Isolierung embryonaler Fibroblasten	32
3.5.6	Isolierung primärer Peritonealmakrophagen	32
3.6	Histologische Methoden	33
3.6.1	Vorbereiten der histologischen Schnitte	33
3.6.2	Nachweis von Typ I Interferon in RAW264.7-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz	33
3.6.3	Immunhistochemie zum Nachweis von rezeptorgebundenen Typ I Interferon	34
4	Ergebnisse	36
4.1	Konstruktion von rekombinanten PVM Δ NS-Mutanten	36
4.2	<i>In vitro</i> Charakterisierung von rPVM Δ NS-Mutanten	39
4.2.1	Replikationsfähigkeit von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in BHK-21-Zellen	39
4.2.2	Replikationsfähigkeit von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in Interferon-kompetenten und Interferon-inkompetenten Zellen	40
4.2.3	Induktion von Typ I und Typ III Interferon <i>in vitro</i>	44
4.3	<i>In vivo</i> Charakterisierung der rPVM Δ NS-Mutanten	46
4.3.1	C57BL/6.Mx1 ^{+/+} -Mäuse zeigten keine angeborene Resistenz gegenüber einer rPVM-Infektion	46
4.3.2	Replikation und Virulenz der rekombinanten Viren in Typ I Interferonrezeptor-defizienten Mäusen (C57BL/6.IFN- α R ^{0/0})	47
4.3.3	Nachweis der Induktion von Typ I und Typ III Interferon <i>in vivo</i>	50
4.3.4	Virulenz und Replikation von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in C57BL/6.IL28R α ^{0/0} -Mäuse und C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} .IL28R α ^{0/0} -Mäusen	55
4.3.5	Histopathologische Untersuchungen	57

4.3.6	Zytokin-Profil von C57BL/6-Mäusen und C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} .IL28 R α ^{0/0} -Mäusen während einer Infektion mit rPVM und rPVM Δ NS- Mutanten	59
4.4	Anti-apoptotische Funktion der NS-Proteine von PVM	61
4.5	Exogenes Typ I Interferon, aber nicht Typ III Interferon, schützt vor einer PVM induzierten Pneumonie	63
4.6	Qualitative Analyse der Typ I Interferon synthetisierenden Zellen <i>in vitro</i> .	64
4.7	Analyse von Typ I Interferon synthetisierenden Zellen <i>in vivo</i>	68
5	Diskussion	76
5.1	Die NS-Proteine von PVM sind Interferonantagonisten	76
5.2	Protektive Rolle von Typ I und Typ III Interferonen bei einer Infektion mit PVM	78
5.3	Gibt es weitere Funktionen der NS-Proteine von PVM?	80
5.4	Analyse von Typ I Interferon synthetisierenden Zellen <i>in vivo</i>	82
6	Zusammenfassung	85
7	Summary	87
	Literatur	88
A	Abkürzungsverzeichnis	103

Abbildungsverzeichnis

1	Vergleich des Typ I und Typ III Interferonrezeptors	3
2	Übersicht Typ I Interferonsystem	4
3	Darstellung des RSV-Virions	7
4	Replikationszyklus des respiratorischen Synzytialvirus	9
5	pGEM [®] -3Zf(+) Vektor	22
6	Konstruktion von pPVM1 Δ NS1, pPVM1 Δ NS2 und pPVM1 Δ NS1 Δ NS2	37
7	Schematische Darstellung der Primerlokalisierung	38
8	Überprüfung der Nucleotidsequenz der sechs PVM Δ NS-Mutanten	38
9	Schema der rPVM Δ NS-Mutanten	39
10	Wachstumskurve von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in BHK-21-Zellen	40
11	Wachstumskurve von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in C57BL/6- und C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} -MEFs	42
12	Replikationskinetik von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in RAW264.7-Zellen und peritonealen Makrophagen	43
13	Nachweis von Typ I und Typ III Interferon mittels RT-PCR	45
14	C57BL/6.Mx1 ^{+/+} -Mäuse zeigten keine angeborene Resistenz gegenüber einer rPVM-Infektion	47
15	Virulenz und Replikation von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in C57BL/6- und C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} -Mäusen	49
16	Nachweis der Menge an Luziferase als Maß für IFN- β in embryonalen Fibroblasten aus IFN- β ^{+/$\Delta$$\beta$-luc} -Mäusen	51
17	Nachweis der Menge an Luziferase als Maß für IFN- β mittels Luziferase-Assay und IFN- α mittels ELISA in IFN- β ^{+/$\Delta$$\beta$-luc} -Mäusen	52
18	Nachweis von Typ I Interferon mittels ELISA sowie Typ I und Typ III Interferon mittels RT-PCR	54
19	Virulenz und Replikation von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in C57BL/6-IL28R α ^{0/0} - und C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} .IL28R α ^{0/0} -Mäusen	56
20	Pulmonale Histopathologie von C57BL/6- und C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} .IL28R α ^{0/0} -Mäusen	58
21	MitoPT-Assay 16 h nach Infektion mit den rPVM-GFP7 Δ NS-Mutanten .	62
22	Vorbehandlung von C57BL/6-Mäusen mit exogenem Typ I und Typ III Interferon	63
23	Virusreplikation von rPVM in C57BL/6-Mäusen nach Vorbehandlung mit exogenem IL-28A/IFN- λ 2	64
24	Nachweis von IFN- α und IFN- β produzierenden Zellen in einer homogenen Zellpopulation	66
25	IFN- α und IFN- β Produktion in einer homogenen Zellpopulation	67
26	Nachweis von rezeptorgebundenen IFN- α in Gefrierschnitten von Lungen aus C57BL/6-Mäusen	69
27	Nachweis von rezeptorgebundenen IFN- β in Gefrierschnitten von Lungen aus C57BL/6-Mäusen	70

28	Nachweis von rezeptorgebundenen IFN- α in Gefrierschnitten von Lungen aus C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} .IL28R α ^{0/0} -Mäusen	71
29	Nachweis von IFN- α 5 spezifischer mRNA mittels RT-PCR in Lungen von C57BL/6- und C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} .IL28R α ^{0/0} -Mäusen	72
30	Doppelfärbung von rezeptorgebundenen IFN- α und zilierten Epithelzellen	73
31	Doppelfärbung von rezeptorgebundenen IFN- β und zilierten Epithelzellen	74
32	Doppelfärbung von rezeptorgebundenen IFN- α und Alveolarmakrophagen .	75
33	Doppelfärbung von rezeptorgebundenen IFN- β und Alveolarmakrophagen .	75
34	Schematische Darstellung zur Wirkungsweise der NS-Proteine von HRSV .	80

Tabellenverzeichnis

1	Charakteristische Vertreter der Familie <i>Paramyxoviridae</i>	7
2	Antikörper	17
3	Puffer, Medien und Lösungen	18
4	Kits	18
5	Chemikalien, Enzyme und Materialien	19
6	Zelllinien	20
7	Sequenzen aller verwendeten Primer	21
8	Name und Position der Mutagenese-Primer	21
9	Bakterienstamm	22
10	Plasmide	22
11	Interferon-PCR	26
12	Mutagenese-PCR	27
13	Beschreibung der verschiedenen Zelllinien	41
14	Expression von Chemokinen und Zytokinen in den Lungen von C57BL/6- und C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} .IL28R α ^{0/0} -Mäusen	60

1 Einleitung

1.1 Interferon (IFN)

M. Hoskins, G. Findlay und F. MacCallum gelang 1935 erstmals der Nachweis, dass Affen die mit avirulenten Gelbfiebertviren infiziert wurden bis zu 24 Stunden nach Infektion vor einer Reinfektion mit dem Wildtypvirus geschützt sind. Die Ursache für diese bahnbrechende Beobachtung, die als „Virusinterferenz“ beschrieben wurde, blieb lange unklar.

Mehr als 20 Jahre später beobachteten A. Isaacs und J. Lindenmann, dass Eiflüssigkeiten von befruchteten Hühnereiern, die zuvor mit inaktiviertem Influenzavirus infiziert wurden, eine Substanz enthielten, die andere Hühnereier vor einer Infektion mit dem lebenden Virus schützen (Isaacs & Lindenmann, 1957). Diese ca. 20 kDa großen antiviralen Proteine, deren Wirkungsweise sowohl autokrin als auch parakrin ist und die als Reaktion auf eine Virusinfektion von Zellen gebildet werden, wurden aufgrund ihrer Eigenschaft mit der viralen Replikation zu interferieren, als Interferone bezeichnet (Isaacs & Lindenmann, 1957; Pestka *et al.*, 2004). Die enorme Bedeutung von Interferonen wird deutlich, wenn man die Tatsache bedenkt, dass Menschen mit angeborenen genetischen Defekten im Interferonsystem schon im frühen Kindesalter an viralen Infektionen sterben (Dupuis *et al.*, 2003).

Interferone steuern in der frühen Phase einer Infektion die unspezifisch wirkende angeborene Immunantwort, bevor die adaptive spezifische Immunantwort eingreifen kann (Randall & Goodbourn, 2008). Neben antiviralen Eigenschaften beeinflussen Interferone nicht nur die Zellteilung und das Zellwachstum, sondern modulieren auch die adaptive Immunantwort und die Apoptose (Basler & García-Sastre, 2002; Goodbourn *et al.*, 2000). Nach heutigem Stand der Forschung lassen sich die Interferone aufgrund ihrer unterschiedlichen Rezeptoren und ihrer vorhandenen Sequenzhomologien in 3 Klassen einteilen: Typ I, Typ II und die erst 2003 entdeckten Typ III Interferone (Kotenko *et al.*, 2003; Sheppard *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2007).

Die wichtigsten Mitglieder der Typ I Interferone, die innerhalb weniger Stunden nach Infektion gebildet werden können, sind IFN- α und - β (Guidotti & Chisari, 2000). Zur Gruppe der IFN- α Proteine gehören mehrere verschiedene, teilweise glycosylierte Subtypen, die alle von einer Multigenfamilie kodiert werden. Diese verschiedenen Subtypen weisen eine Aminosäurehomologie von bis zu 90% innerhalb einer Spezies auf (Pestka *et al.*, 2004; van Pesch *et al.*, 2004; van Pesch & Michiels, 2003). Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den IFN- α produzierenden Zellen hauptsächlich um Makrophagen, Monozyten und Granulozyten handelt, galt IFN- α auch lange als *Leukozyten-Interferon* (Havell *et al.*, 1975). Von IFN- β , welches von nahezu allen Zellen, hauptsächlich jedoch von virusinfizierten Fibroblasten (*Fibroblasten-Interferon*) synthetisiert wird, existiert nur ein Subtyp (Havell

et al., 1975; Goodbourn *et al.*, 2000). Weiterhin gehören zur Typ I Interferonfamilie die weniger gut beschriebenen Interferone wie IFN- ω , IFN- κ sowie Limitin (LaFleur *et al.*, 2001; Oritani *et al.*, 2000; Hardy *et al.*, 2004, Pestka *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass für die Synthese von IFN- α die vorangegangene Synthese von IFN- β Voraussetzung ist (Erlandsson *et al.*, 1998). Eine Deletion des IFN- α Gens bei der Maus auf Chromosom 4 erhöht die Anfälligkeit für virale Infektionen deutlich (Dupuis *et al.*, 2003). Beim Menschen befinden sich die Gene der Typ I Interferonfamilie auf dem Chromosom 9, wobei charakteristisch ist, dass die Sequenzen keine Introns enthalten (Bragança & Civas, 1998). Der hohe Homologiegrad der Typ I Interferone, ihre Lage innerhalb eines Chromosomclusters sowie die gemeinsame intron-freie Struktur der Gene lassen auf eine evolutionäre Entwicklung durch Genduplikation, ausgehend von einem gemeinsamen Ausgangsgen, schließen (Roberts *et al.*, 1998). Die Signaltransduktion der Typ I Interferone, IFN- α und IFN- β , erfolgt über einen gemeinsamen ubiquitär auf allen kernhaltigen Zellen exprimierten Rezeptor. Dieser Rezeptor setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen: IFN- α -Rezeptor1 (IFNAR1) und IFN- α -Rezeptor2 (IFNAR2) (siehe Abb. 1 A). Die Bindung der Interferone an den Rezeptor induziert die Rezeptordimerisierung und die anschließende Autophosphorylierung sowie die Phosphorylierung der Protein-Tyrosinkinasen TYK-2 (IFNAR1) und JAK-1 (IFNAR2) (Platanias, 2005). Eine weiterführende Beschreibung der Signaltransduktion am Beispiel von IFN- β in Fibroblasten erfolgt in Abschnitt 1.2.

Das säurestabile IFN- γ (Typ II Interferon), früher auch als T-Helferzellen produzierendes *Immun-Interferon* bezeichnet, befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 12 und bei der Maus auf dem Chromosom 10 (Pestka *et al.*, 2004). Wie der frühere Name schon sagt, wird es hauptsächlich von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gebildet und zeigt keinerlei Sequenzhomologien zu den Typ I Interferonen. Die Signaltransduktion von Typ II Interferon erfolgt über einen spezifischen Typ II Interferonrezeptor, der in keinem Zusammenhang mit dem Typ I Interferonrezeptor steht (Platanias, 2005).

2003 wurde eine neue Klasse von Interferonen, die Typ III Interferone, beschrieben. Diese werden je nach Referenz entweder als IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 (Kotenko *et al.*, 2003) oder IL28A, IL28B und IL29 bezeichnet (Sheppard *et al.*, 2003). In der Maus sind bislang nur orthologe Gene für IFN- λ 2 und IFN- λ 3 identifiziert worden (Bartlett *et al.*, 2005; Lasfar *et al.*, 2006). Typ III Interferone verfügen, wie schon die zuvor beschriebenen Interferonklassen, über antivirale Eigenschaften, wobei es sich bei den hauptproduzierenden Zellen wahrscheinlich um plasmazytoide dendritische Zellen handelt (pDC)(Coccia *et al.*, 2004). Die Gene für Typ III Interferone, die im Gegensatz zu den Typ I Interferonen Introns enthalten und beim Menschen auf dem Chromosom 19 und bei der Maus ebenso wie die Typ I Interferone auf dem Chromosom 4 lokalisiert sind, besitzen nur eine geringe Sequenzhomologie von ca. 20% zu den IFN- α Interferonen. Die Signaltransduktion wird

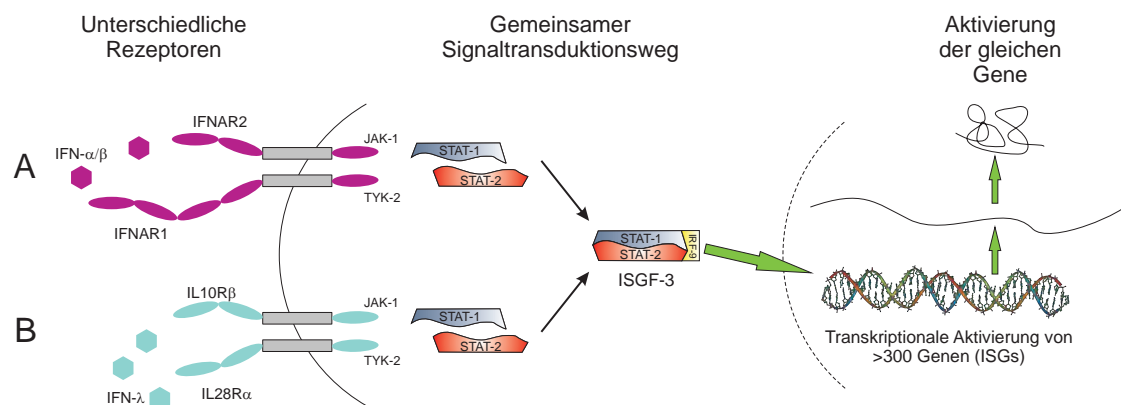


Abbildung 1: Vergleich des Typ I (A) und Typ III (B) Interferonrezeptors (modifiziert nach www.deduveinstitute.be/Interferone.php, 12.02.2010).

über einen eigenständigen Typ III Interferonrezeptor reguliert (Platanias, 2005), der aus den Untereinheiten IL10R β und IL28R α besteht (Abb. 1 B). Die IL10R β Untereinheit wird dabei ubiquitär exprimiert und ist Teil des IL-10 spezifischen Rezeptors, wogegen die IL28R α Untereinheit spezifisch für den Typ III Interferonrezeptor ist (Kotenko *et al.*, 2003). Die Expression dieser IL28R α Untereinheit wurde bislang auf primären Keratinozyten, Darmzellen und Makrophagen, nicht aber auf Milzzellen, peritonealen Makrophagen sowie endothelialen Zellen nachgewiesen (Hou *et al.*, 2009; Ank *et al.*, 2008; Sommereyns *et al.*, 2008). Demzufolge wurde eine zelltypspezifische Expression des Typ III Interferonrezeptors eindeutig belegt (Kotenko & Donnelly, 2006). Aufgrund dieser genannten Divergenzen ist für die Typ III Interferone nur eine Bezeichnung als *Typ I Interferon-ähnliche Proteine* zulässig (Kotenko *et al.*, 2003; Gad *et al.*, 2009). Obgleich sich die Rezeptoren von Typ I und Typ III Interferon deutlich unterscheiden (siehe Abb. 1 A, B), wurden bislang bezüglich der intrazellulären Signaltransduktionswege sowie der Aktivierung Interferon-stimulierender Gene (ISGs) keine nennenswerten Unterschiede belegt (Onoguchi *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2005).

1.2 Interferon-Synthese und Interferon-Signaltransduktion

Die Bindung der Interferone an die unterschiedlichen Rezeptoren löst in der Zelle eine Signalkaskade aus, die zur Ausbildung des antiviralen Status, zur Regulation der Zellteilung sowie zur Freisetzung weiterer Zytokine führt (siehe Abschnitt 1.1). Wie in Abb. 2 gezeigt, werden konservierte Strukturen von Pathogenen, sogenannte PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), bei denen es sich z.B. um Nebenprodukte des viralen Replikationszy-

kluses wie doppelsträngige oder einzelsträngige RNA handelt, in Fibroblasten (Klassischer Typ I Interferon-Signalweg) von intrazellulären Rezeptoren wie RIG-I (*retinoic acid inducible gene I*, Yoshimura *et al.*, 2007), MDA-5 (*melanoma differentiation-associated gene-5*, Andrejeva *et al.*, 2004) sowie von TLR3 (Toll like receptor 3, Alexopoulou *et al.*, 2001) erkannt. Diese Proteine regulieren über die Adapterproteine IPS1 (*interferon-beta promoter stimulator 1*, Kawai *et al.*, 2005) im Fall vom RIG-I und MDA-5 und TRIF (*TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon β*) im Fall von TLR3 (Yamamoto *et al.*, 2002; Kawai *et al.*, 2005) die Kinasen TBK-1 (*TANK-binding kinase-1*) und IKK- ϵ (*oncogenic kinase of the IKK family*). Diese Kinasen bewirken nachfolgend eine Phosphorylierung und somit Aktivierung des Transkriptionsfaktor IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*), ein Mitglied der Familie der Interferon-Regulator-Faktoren (*Interferon regulatory factors*, IRFs) und ein zentraler Faktor in der IFN- β -Induktion (Wathelet *et al.*, 1998; Paz *et al.*, 2006).

Phosphoryliertes IRF-3 bildet Homo- und- Heterodimere aus, transloziert in den Zellkern und bewirkt die Synthese von IFN- β -mRNA (siehe Abb. 2, Hiscott *et al.*, 1999). Ein anderer wichtiger Transkriptionsfaktor, NF- κ B (Nuklear Faktor κ B) wird nach Erkennung fremder Substanzen durch die Proteinkinase R (PKR) aktiviert (Kumar *et al.*, 2000).

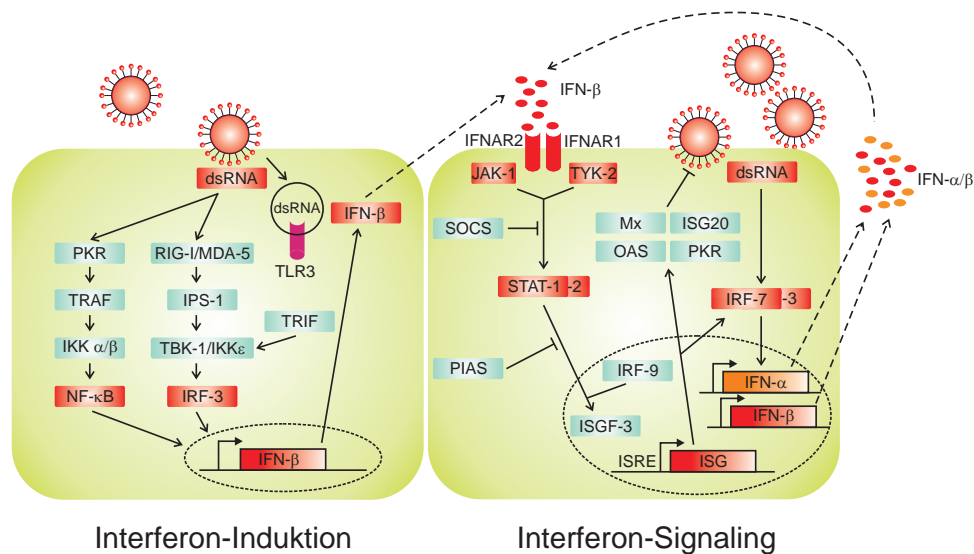


Abbildung 2: Übersicht Typ I Interferonsystem (modifiziert nach Haller *et al.*, 2006).

Nach Bindung von sekretiertem IFN- β an den Typ I Interferonrezeptor (siehe Abb. 2) kommt es zur Dimerisierung dieses Rezeptors, was abschließend zur Aktivierung der Janus-Kinasen JAK-1 und TYK-2 führt. Diese Aktivierung führt wiederum zur Phosphorylierung von STAT-1 und STAT-2 (*signal transducer and activator of transduction*), die als Folge dieser Phosphorylierung Heterodimere bilden und in den Zellkern translozieren.

Abschließend interagiert dieser Komplex aus STAT-1/STAT-2 mit IRF-9 (*interferon regulatory factor 9*) und bildet den trimeren Komplex ISGF-3 (*interferon stimulated gene factor 3*). Dieser Komplex aktiviert letztendlich zahlreiche ISGs (*interferon stimulated genes*), die für unterschiedliche antivirale Proteine und unter anderem IRF-7 kodieren (*interferon regulatory factor 7*) (Haller *et al.*, 2006). Hierbei verläuft die Aktivierung von IRF-7 über den gleichen Signaltransduktionsweg wie zuvor für IRF-3 beschrieben (Iwamura *et al.*, 2001). Phosphoryliertes IRF-7 transloziert in den Zellkern, initiiert dort die Transkription unterschiedlicher IFN- α Gene (Iwasak & Medzhitov, 2004) und somit die Synthese der verschiedenen IFN- α Subtypen, die sogenannte zweite Welle der Interferone (Marié *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2000).

In plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) wird IRF-7 nicht wie in Fibroblasten erst über IRF-3 und IFN- β synthetisiert, sondern liegt bereits in inaktiver Form in diesen Zellen vor. Nach Stimulation von endosomständigen TLRs (TLR7-9) durch virale Nukleinsäuren wird IRF-7 in pDCs über den Adapter MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) direkt aktiviert (Diebold *et al.*, 2004; Crozat & Beutler, 2004; Honda *et al.*, 2005). Diese Regulation ermöglicht sehr schnell die Synthese größerer Mengen an IFN- α und beschreibt die pDCs als wichtige Interferon-Produzenten.

Zu den am besten charakterisierten Interferon-stimulierenden Gen-Produkten (ISG) gehören OAS (2',5'-Oligoadenylatsynthetase, Silverman, 1994), PKR (Poteinkinase R, Williams, 1999) sowie das Mx-Protein (*Myxovirus resistance protein*, Haller & Kochs, 2002; Haller *et al.*, 2006). Die durch dsRNA aktivierte OAS (2'-5'-Oligoadenylatsynthetase) synthetisiert 2'-5'-Oligoadenylate. Diese wiederum binden an eine RNase L (latent im Zytoplasma vorhandene Endoribonuklease) und aktivieren diese, was zum Abbau viraler und zellulärer RNA führt (Borden *et al.*, 2007). Die Aktivierung der Proteinkinase R (PKR) erfolgt ebenfalls durch dsRNA, wobei die PKR den Translationsinitiationsfaktor eIF2 α phosphoryliert und damit gleichzeitig inaktiviert. Als Folge dieser Inaktivierung kommt es zur Inhibierung der Translation zellulärer als auch viraler mRNA. Da die PKR eine wichtige Rolle bei der Virusbekämpfung spielt, besitzen fast alle Viren Strategien zur Ausschaltung der PKR-Aktivität (Borden *et al.*, 2007). Mx-Proteine aus der Familie der Dynamin-artigen GTPasen (GTPase-Aktivität) hemmen die Transkription sowohl von Influenzaviren als auch von Vesikular-Stomatitis-Viren (VSV) (Haller *et al.*, 2006). Diese Proteine sind in der Lage, ohne zusätzliche IFN- α/β induzierende Proteine eine Virusvermehrung zu inhibieren.

Neben der Induktion der zuvor genannten ISGs, denen eine direkte antivirale Funktion zugeordnet werden kann, modulieren Typ I Interferone auch die adaptive Immunantwort. Eine wichtige Funktion der Typ I Interferone hinsichtlich der Modulation der adaptiven Immunantwort ist die Verstärkung der Expression von MHC-Klasse-I-Antigenen und co-

stimulatorischen Molekülen, wie z.B. CD80, CD86 und CD40. Durch diese Verstärkung wird die Fähigkeit der Zellen zur Präsentation von viralen Antigenen auf der Oberfläche gesteigert und das Erkennen und die Lyse der infizierten Zellen durch zytotoxische T-Zellen erleichtert (Theofilopoulos *et al.*, 2005; Kolumam *et al.*, 2005). Des Weiteren aktivieren Typ I Interferone natürliche Killerzellen (NK-Zellen), virusinfizierte Zellen zu töten und Zytokine freizusetzen (Reiter, 1993; Biron & Brossay, 2001). Auch wurde beschrieben, dass Typ I Interferone die Differenzierung von pDCs in reife antigenpräsentierende Zellen induzieren (Asselin-Paturel *et al.*, 2001).

1.3 Pneumoviren

1.3.1 Taxonomie von Pneumoviren

Das respiratorische Synzytialvirus (RSV) gehört zur Familie der *Paramyxoviridae*, innerhalb der Ordnung *Mononegavirales*. Viren dieser Ordnung zeichnen sich durch ein nicht-segmentiertes RNA Genom negativer Polarität aus (Collins *et al.*, 2001). Die *Paramyxoviridae* unterteilen sich in die Unterfamilien *Paramyxovirinae* und *Pneumovirinae* (Tab. 1), wobei sich die Unterfamilie der *Pneumovirinae* in die Gattungen *Pneumovirus* und *Metapneumovirus* aufgliedert. Die Spezies der respiratorischen Synzytialviren HRSV (humanes respiratorisches Synzytialvirus), BRSV (bovines respiratorisches Synzytialvirus), ORSV (ovines respiratorisches Synzytialvirus), CRSV (caprines respiratorisches Synzytialvirus) bilden zusammen mit dem Pneumonievirus der Maus (PVM) den Genus *Pneumovirus* (Tab. 1). Das respiratorische Synzytialvirus wurde erstmals 1956 aus einem Schimpanse mit Symptomen einer Atemwegserkrankung isoliert und als CCA (*chimpanzee coryza agent*) beschrieben (Blount *et al.*, 1956). Kurze Zeit später wurde das Virus erstmals beim Menschen beschrieben und nachfolgend als humanes respiratorisches Synzytialvirus (HRSV) bezeichnet (Chanock & Parrott, 1965). Der Name respiratorisches Synzytialvirus ist auf die Assoziation des Erregers mit dem Respirationstrakt und der in der Zellkultur typischen zytopathischen Effekte der Synzytienbildung zurückzuführen. Nach und nach wurden auch in anderen Spezies verwandte Viren nachgewiesen. Paccaud und Jaquier gelang 1967 der Nachweis des bovinen respiratorischen Synzytialvirus (BRSV) (Paccaud & Jaquier, 1970), bei dem neben klinisch ähnlichen Symptomen eine dem HRSV ähnliche Serologie nachgewiesen werden konnte (Walravens *et al.*, 1990). Bei Ziegen (caprines RSV) und bei Schafen (ovines RSV) konnte ebenfalls ein serologisch verwandtes Virus identifiziert werden (Walravens *et al.*, 1990; Alansari & Potgieter, 1993).

Tabelle 1: Charakteristische Vertreter der Familie *Paramyxoviridae* (modifiziert nach Modrow *et al.*, 2003).

Familie	Unterfamilie	Genus	Tier	Mensch
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i>	Sendai-Virus	Parainfluenza 1/3
		<i>Rubulavirus</i>	Simian-Virus 5	Mumpsvirus
		<i>Avulavirus</i>	Newcastle-Disease-Virus	/
		<i>Morbillivirus</i>	Hundestaubevirus	Masernvirus
		<i>Henipavirus</i>	Nipavirus (Schwein; Hund)	Nipavirus
	<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	BRSV (Rind)	humanes
ORSV (Schaf)			respiratorisches	
		<i>Metapneumovirus</i>	CRSV (Ziege)	Synzytialvirus (HRSV)
			PVM (Maus)	
			Rhinotracheitisvirus (Pute)	humanes
				Metapneumovirus

1.3.2 Morphologie von Pneumoviren

Das humane respiratorische Synzytialvirus (HRSV) und das Pneumonievirus der Maus (PVM) besitzen ein ca. 15222 nt bzw. 14886 nt großes Genom und bilden 10 subgenomische RNAs aus, die für 11 Proteine (RSV) bzw. 12 Proteine (PVM) kodieren (Collins *et al.*, 2001). Die Gestalt des Virions kann filamentös mit einem Durchmesser von 60-100 nm oder sphärisch mit einem Durchmesser von 150-300 nm sein. Die virale RNA bildet zusammen mit dem Nukleoprotein (N), der RNA-Polymerase (L), dem Phosphoprotein (P) und dem M2-1-Protein den Ribonukleoproteinkomplex (RNP-Komplex) (siehe Abb. 3), der als Matrize für die Transkription und Replikation dient. Dabei wird das M2-1-Protein nicht bei der Replikation benötigt, sondern dient bei der Transkription als Antiterminationsfaktor (Fearn & Collins, 1999). Auf dem Transkript von M2, das für M2-1 kodiert, befindet sich noch ein zweiter offener Leserahmen, der für das M2-2-Protein kodiert. Dieses nicht essentielle Protein fungiert als Regulationsfaktor zwischen Replikation und Transkription (Bermingham & Collins, 1999). Alle weiteren Transkripte, außer die M2-mRNA, besitzen

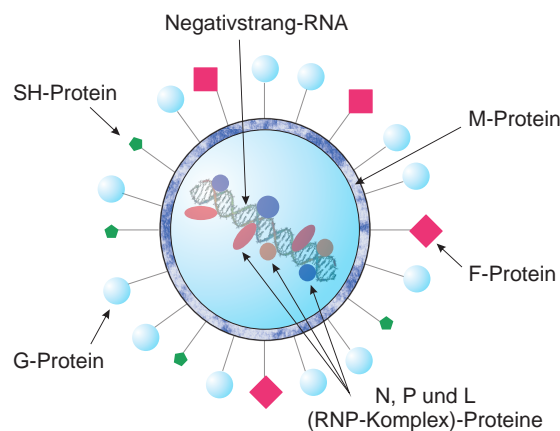


Abbildung 3: Darstellung des RSV-Virions (modifiziert nach Hacking & Hull, 2002).

nur einen offenen Leserahmen.

Das Viruspartikel ist von einer Lipidmembran umgeben, auf dessen Innenseite sich das Matrixprotein M befindet (siehe Abb. 3). Dieses Protein ist für die Interaktion von RNP-Komplex und Wirtsmembran verantwortlich. In der Virushülle eingelagert sind das Glykoprotein G, das Fusionsprotein F und das hydrophobe Protein SH (siehe Abb. 3). Das G-Protein, ein Typ II Transmembranprotein (N-Terminus intrazellulär), vermittelt durch die Bindung an Glykosaminykanen den Kontakt zur Wirtszelle und ermöglicht somit das Einbringen des Virons (Levine *et al.*, 1987). Das F-Protein, ein Typ I Transmembranprotein (N-Terminus extrazellulär), ein Heterodimer aus F1- und F2-Teilen vermittelt sowohl die Fusion der Viruspartikel mit der Zelle als auch die Fusion von benachbarten Zellen, wie es bei der Synzytienbildung stattfindet (Choppin *et al.*, 1975). Die Funktion des SH-Proteins, ein integrales Glykoprotein in der Virushülle, ist nicht genau bekannt. Aktuelle Publikationen diskutieren jedoch eine Rolle des SH-Proteins im TNF- α -Signalweg (Fuentes *et al.*, 2007). Am 3'-Ende des Genoms befinden sich die Gene für die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2. Das leicht saure NS1-Protein ($pI_{theo.}=4,97$) und das leicht basische NS2-Protein ($pI_{theo.}=9,21$) sind nur in infizierten Zellen, nicht in Virionen nachweisbar (Collins *et al.*, 2001). Für diese Nichtstrukturproteine, die bei RSV nachweislich als Interferonantagonisten fungieren, gibt es bei den anderen Paramyxoviren keine homologen Gegenstücke (Schlender *et al.*, 2000). Eine detaillierte Beschreibung der Nichtstrukturproteine von RSV und PVM im Hinblick auf die Funktion als Interferonantagonisten erfolgt in Abschnitt 1.6. Am 3'-Ende des Genoms befindet sich eine kurze, als Leader bezeichnete Sequenzfolge, die zwar transkribiert wird, aber nicht für Aminosäuren kodiert (Promotorsequenz für Transkription). Am 5'-Ende des Genoms befindet sich ein nichttranskribierter Bereich (Trailer), der die Termination der Transkription vermitteln. Kurze nichttranskribierte Sequenzfolgen (intergenische Nukleotide), die in ihrer Länge zwischen 1-56 Nukleotiden variieren, finden sich zwischen den einzelnen Genen (Collins *et al.*, 2001). Konservierte Sequenzfolgen befinden sich an den jeweiligen Start (S)- und Endpunkten (E) der einzelnen Gene (S/E-Consensus). Diese Bereiche grenzen die intergenischen Regionen ein und vermitteln eine geregelte Transkription. Die M2- und L-Gene besitzen im Gegensatz zu den restlichen Genen überlappende Stop/Start-Signale (68 nt), so dass die Transkription der M2-mRNA innerhalb des L-Gens terminiert wird (Collins *et al.*, 2001).

1.3.3 Transkription und Replikation von Pneumoviren

Die Transkription der viralen RNAs erfolgt nach dem sequentiellen Stop-Start-Mechanismus, ausgehend vom 3'-Ende des Genoms. Hierbei beginnt die Transkription im Bereich der Leader-Sequenz, die dem ersten Gen vorgeschaltet ist. Es wird eine kurze, zur Sequenz

des Leaders komplementäre RNA gebildet, die vor dem Beginn des ersten Gens (NS1-Gen) abbricht. Der Polymerasekomplex rückt danach einige Nukleotide bis zum Startsignal der mRNA Synthese (S-Consensussequenz) des NS1-Gens auf, bleibt dabei mit dem Virusgenom verbunden und die Polymerisationsreaktion startet erneut (Collins *et al.*, 2001). Die Polymerisation endet im Bereich der Consensussequenz E, überspringt die intergenische Region zwischen NS1-Gen und NS2-Gen und startet die Polymerisationsreaktion an der S-Consensussequenz des NS2-Gens. Dieser sich wiederholende Mechanismus zwischen Stop der Polymerisation, Überspringen der intergenischen Region und erneutem Start der Polymerisationsreaktion wird als sequentieller Stop-Start-Mechanismus bezeichnet. Alle mRNA-Moleküle sind am 5'-Ende gecappt und am 3'-Ende polyadenyliert. Beim sequentiellen Stop-Start-Mechanismus kann es vorkommen, dass der Polymerasekomplex beim Überspringen der intergenischen Region von der RNA-Matrize abfällt (Collins *et al.*, 2001). Als Folge davon nimmt die Menge an synthetisierten Transkripten, wie bei allen anderen Vertretern der *Mononegavirales*, ausgehend vom 3'-Ende des Genoms stetig ab. Diese gerichtete Genexpression wird als polarer Konzentrationsgradient bezeichnet.

Neben der Synthese der einzelnen mRNAs für die jeweiligen Gene, ist für die Bildung neuer Virusgenome die Synthese eines durchgehenden RNA-Moleküls (kein Abbruch der Synthese an den Consensussequenzen) in Positivstrangorientierung (Antigenom, positive Polarität) Voraussetzung. Dieses Antigenom bildet zusammen mit den viralen Proteinen den zuvor beschriebenen RNP-Komplex und dient als Matrize für weitere genomische RNA-Stränge (siehe Abb. 4; Collins *et al.*, 2001). Zeigt sich am Ende der Replikationszyklen eine ausreichende Menge an N-, M2-1- und M2-2-Protein, erfolgt eine Umstellung vom Tran-

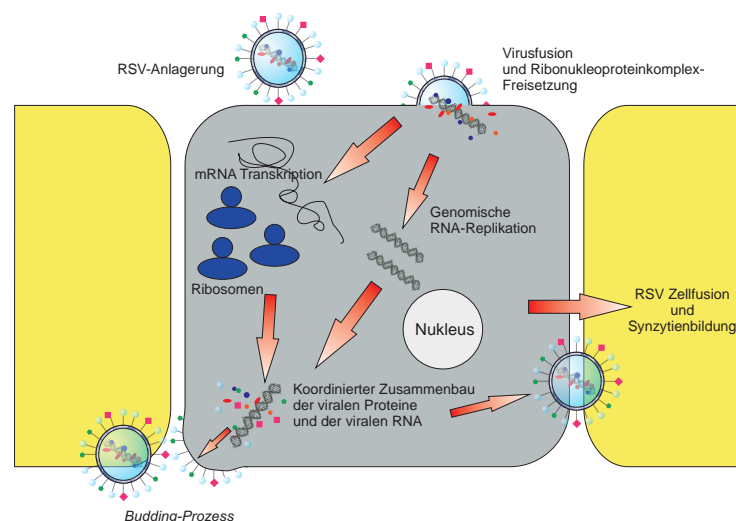


Abbildung 4: Replikationszyklus des respiratorischen Synzytialvirus (modifiziert nach Hacking & Hull, 2002).

skription auf Replikation. Somit werden nicht mehr kurze mRNAs sondern vollständige Antigenome synthetisiert, die zur Herstellung kompletter Virusgenome dienen (Cowton *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2005; Bermingham & Collins, 1999; Fearn & Collins, 1999). Die Freisetzung der Viren erfolgt als „Budding-Prozess“, also als Umkehrprozess der vorhergehenden Membranfusion (siehe Abb. 4).

1.4 Das respiratorische Synzytialvirus (RSV)

1.4.1 Epidemiologie und Pathogenität

HRSV ist die häufigste Erkrankung des unteren Respirationstraktes bei Säuglingen und Kleinkindern weltweit. Die HRSV-Infektionen treten in den Regionen der gemäßigten Breitengrade jährlich in den Wintermonaten während der sogenannten RSV-Saison von Oktober/November bis April/Mai auf. Der Haupterkrankungs-Peak liegt in Deutschland meist zwischen Dezember und März. Je nach Breitengrad gibt es jedoch Unterschiede im zeitlichen Auftreten der saisonalen HRSV-Infektionen (Collins & Graham, 2008; Weigl *et al.*, 2002; Weigl *et al.*, 2001). Das Virus tritt ubiquitär auf und eine Übertragung erfolgt überwiegend durch Nasensekrete und Tröpfcheninfektionen. Bis zum Ende des zweiten Lebensjahres liegt bei jedem Kleinkind eine fast 100%ige Serokonversion für RSV-spezifische Antikörper vor, wobei eine lebenslange Immunität jedoch nicht erlangt werden kann (Collins & Graham, 2008). Reinfektionen mit RSV sind daher sehr häufig, zeigen jedoch in der Regel einen milderen Krankheitsverlauf (Henderson *et al.*, 1979; Collins & Graham, 2008). Die Inkubationszeit von HRSV beläuft sich auf vier bis sechs Tage, wobei im Normalfall bei Kindern ohne weitere Grunderkrankungen die Infektionen im Nasopharynxbereich als Rhinitis verbunden mit leichtem Fieber häufig harmlos verlaufen. Nur in ca. 30% der Erkrankungen ist auch der Larynx betroffen (Collins *et al.*, 2001). Schwere Verlaufsformen mit Ausbildung einer Bronchiolitis oder Pneumonie, die bis zur Hospitalisierung führen sind jedoch in 1-2% der Fälle möglich. Die Erkrankungsdauer beträgt je nach Schwere der Infektion 1-2 Wochen. Risikopatienten für einen schweren Verlauf der Infektion sind immunsupprimierte und ältere Menschen ebenso wie Frühgeborene und Kleinkinder mit chronischer Herz- und Lungensymptomatik. Bei diesen Patienten verläuft eine HRSV-Infektion meist als schweres und teilweise lebensbedrohliches Krankheitsbild. Allein in den USA wird HRSV für 70.000 bis 126.000 registrierte Krankheitsfälle von Bronchiolitis und Pneumonie jährlich bei Säuglingen und Kleinkindern verantwortlich gemacht (Daten der WHO; World Health Organization, http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index2.html, 03.07.2010). Durch Literaturdaten lässt sich außerdem eine erhöhte Anfälligkeit von Asthma im Zusammenhang mit einer HRSV-Infektion belegen (Bramley *et al.*, 1999; Schwarze & Gelfand, 2002; Collins & Graham, 2008).

HRSV infiziert zuerst die Zellen des oberen Respirationstrakts, wobei es durch die Virusvermehrung zu zytopathogenen Effekten mit Ausbildung von mehrkernigen Riesenzellen, den sogenannten Synzytien, und epithelialen Zellnekrosen kommt. Des Weiteren sind Anhäufungen von peribronchiolären Infiltraten, bestehend hauptsächlich aus Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen die Folge. Breitet sich das Virus im Laufe der Infektion auf den unteren Respirationstrakt aus, sind Verdickungen der intraalveolären Wände durch mononukleäre Zellinfiltrationen, Lungenödeme und schließlich der Kollaps der mit Mukus gefüllte Alveolen die Folge (Collins *et al.*, 2001; Collins & Graham, 2008). Dieses macht bei ca. 1% der betroffenen Säuglinge und Kleinkinder eine Hospitalisierung erforderlich. Die therapeutischen Maßnahmen umfassen sowohl die Beatmung von Patienten mit Hypoxie, die Verabreichung von Ribavirin als antivirale Therapie, sowie den Einsatz der Antikörper Palivizumab und RSV-IGIV bei Frühgeborenen, Kindern mit Immunsuppression oder bronchopulmonaler Dysplasie (Rodriguez, 1999; Rudolph, 2002). Trotz erheblicher Bemühungen sind Impfstoffe gegen eine HRSV-Infektion bisher nicht zugelassen, obwohl schon einige Ansätze vorhanden waren. Formalininaktivierte Totimpfstoffe boten nicht nur keinen Impfschutz gegen eine HRSV-Infektion, sondern zeigten stattdessen eine Verstärkung der Pathologie nach vorangegangener Infektion mit dem Wildtypvirus. Dagegen waren abgeschwächte Lebendimpfstoffe in klinischen Studien entweder zu stark attenuiert oder für die Anwendung bei Säuglingen zu pathogen (Collins & Murphy, 2005; Karron *et al.*, 1997; Collins & Graham, 2008).

1.4.2 Immunologie

Die erste Barriere für das Virus bildet die unspezifische, angeborene Immunantwort. In Folge dieser Reaktion zeigt sich anscheinend eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges, ausgelöst durch die Bindung des viruseigenen F-Proteins an TLR4 (Toll-like-Rezeptor 4) und den CD14-Rezeptor, und somit eine Freisetzung von Typ I Interferon und TNF- α (Tumornekrosefaktor alpha) sowie den Chemokinen CCL-5 (RANTES, chemokine C-C-motif ligand 5), Eotaxin (CCL-11) und Interleukin 8 (IL-8) (Kurt-Jones *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2002). Diese Aktivierung der inflammatorischen Marker bewirkt eine Einwanderung von Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, NK-Zellen (natürliche Killerzellen) sowie dendritischen Zellen (DC) in die Lunge. Die neutrophilen Granulozyten bilden hierbei mit 80% die größte Gruppe der eingewanderten Zellen (Everard *et al.*, 1994). Im späteren Verlauf der Infektion konnte im Mausmodell eine deutliche Induktion der T-Zellantwort, welche mit dem Schweregrad der RSV-Infektion im Zusammenhang steht, belegt werden (Openshaw, 1995; Collins & Graham, 2008). Daneben konnten zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs, CD8⁺-Lymphozyten) als Hauptmediatoren für die Viruseliminatio-

on im Mausmodell eindeutig identifiziert werden (Cannon *et al.*, 1988; Collins & Graham, 2008). Den CTLs wurde nicht nur eine wichtige Rolle bei der Viruselimination, sondern auch eine entscheidende Rolle bei der Immunpathologie einer RSV-Infektion zugewiesen (Graham *et al.*, 1991; Ostler *et al.*, 2002).

1.5 Das Pneumonievirus der Maus (PVM)

1.5.1 Die geschichtliche Entwicklung von PVM

Das Pneumonievirus der Maus (PVM) wurde als erstes Mitglied (siehe Tab. 1) der Familie der *Paramyxoviridae*, Unterfamilie der *Pneumovirinae* beschrieben. Das Virus wurde erstmals 1938 aus Mäusen isoliert, die in einer Versuchsreihe zur Identifikation von neuen humanen respiratorischen Viren, aus Proben von Patienten mit akuten Erkrankungen des Respirationstrakts, als Tiermodell dienten. Die Mäuse wurden mit den klinischen, nasopharyngealen Proben intranasal infiziert und die Lungenhomogenate der infizierten Mäuse dienten zur sequentiellen Weiterpassage in klinisch gesunden Mäusen. Nach wiederholter Passage der Lungenhomogenate entwickelten zuvor klinisch gesunde Mäuse deutliche Symptome einer Erkrankung des unteren Respirationstrakts bis hin zu einer schweren Pneumonie (Horsfall *et al.*, 1940; Smith *et al.*, 1984; Carthew & Sparrow, 1980).

Obwohl das Virus den Namen „Pneumonievirus der Maus“ trägt, konnte der ursprüngliche Wirt des Virus bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Eine natürliche Infektion von Mäusen konnte jedoch, trotz fehlender Kenntnisse über den eigentlichen biologischen Ursprung, nachgewiesen werden (Weir *et al.*, 1988; Richter *et al.*, 1988). Neben Mäusen ist auch bei anderen Nagetieren wie z.B. Baumwollratten, Kaninchen und Meerschweinchen eine Infektion mit PVM möglich (Horsfall, 1946). Antikörper gegen PVM oder ein ähnliches Virus wurden nicht nur bei Nagetieren, sondern auch im Rahmen einer in England durchgeführten Studie bei ungefähr 80% der Bevölkerung im Serum nachgewiesen, wobei keine klinische Erkrankung einer „PVM“-Infektion im Menschen bisher identifiziert wurde (Pringle & Eglin, 1986).

Durch Sequenzanalysen wurde eine Ähnlichkeit des Aufbaus des PVM-Genoms zum HRSV-Genom auf Aminosäureebene bestätigt (Chambers *et al.*, 1990). Bis auf das zweite Translationsprodukt des P-Gens, P ORF2, konnte allen Proteinen von PVM ein entsprechendes HRSV-Analogon zugeordnet werden (Collins *et al.*, 2001), wobei die Sequenz-Homologie der Proteine von PVM und HRSV erhebliche Unterschiede aufweist. Für die N- und L-Proteine von PVM konnte mit 52-60% die höchste Aminosäurehomologie zu den Proteinen von HRSV gezeigt werden. Das G-Protein, das SH-Protein, das M2-2-Protein sowie die in dieser Dissertation relevanten NS-Proteine zeigen keine nennenswerten Sequenzhomologien mit den namentlich gleichen Proteinen von HRSV. Die Homologie der vier weiteren

Proteine (P, M, M2-1, F) liegt zwischen 33-45% (Kreml *et al.*, 2005).

1.5.2 Pathologie und Immunologie

In der Literatur sowie in der Anwendung im Labor findet man zwei verschiedene virulente Stämme vom PVM: PVM15 und PVMJ3666. Bei dem Isolat PVM15 (PVM strain 15, ATCC: VR-25; GenBank accession number: AY729016) handelt es sich um das original beschriebene virulente Virus, welches als einziges Isolat bei der American Type Culture Collection (ATCC) hinterlegt ist (Horsfall, 1946; Kreml & Collins, 2004). Zusätzlich zum virulenten Ausgangsstamm PVM15 existiert ein nicht-pathogener, also avirulenter Stamm von PVM15 (Randhawa *et al.*, 1995; Domachowske *et al.*, 2002). Dieser Stamm zeigt eine vermutlich durch die Passage in Nicht-Nagerzellen bedingte Attenuierung (Kreml & Collins, 2004; Kreml *et al.*, 2005). Ein weiterer virulenter Stamm von PVM ist PVMJ3666, der bisher nur in der Maus passagiert wurde. Hierbei handelt es sich vermutlich ebenfalls um ein ursprüngliches Isolat von 1938, welches von der gleichen Arbeitsgruppe wie PVM15 isoliert wurde. Die Herkunft wurde bisher nicht belegt (Randhawa *et al.*, 1995; Domachowske *et al.*, 2002).

Um im RSV-Mausmodell (BALB/c-Mäuse) eine respiratorische Erkrankung verbunden mit einem temporären Gewichtsverlust sowie die Pathologie einer pulmonalen Infektion induzieren zu können, sind unüblich hohe Infektionsdosen von 1×10^6 bis 1×10^7 PFU (*Plaque forming unit*) nötig. Im Gegensatz dazu ist bereits eine Infektion mit einer sehr geringen Dosis PVMJ3666 (30 PFU; Domachowske *et al.*, 2000b) sowie einer ebenso geringen Dosis PVM15 (50 PFU; Kreml & Collins, 2004) letal. Bedingt durch eine PVM-Infektion konnte eine Rekrutierung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, sowie die Produktion der proinflammatorischen Chemokine Eotaxin (CCL-11), RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*), MCP-1 (*Monocyte chemotactic protein 1*) und MIP-1- α (*Macrophage inflammatory protein alpha-1*) gezeigt werden (Domachowske *et al.*, 2000a; Domachowske *et al.*, 2002).

Ebenso wie im HRSV-Mausmodell konnte auch für das PVM-Mausmodell den CTLs eine essentielle Rolle bei der Viruselimination wie auch eine entscheidende Funktion bei der Immunpathologie zugewiesen werden (Frey *et al.*, 2008). Eine ähnliche Pathologie aber geringere Infektionsdosen sowie eine effizientere Replikation im natürlichen Wirt ermöglichen somit den Einsatz von PVM als Modell für HRSV (Easton *et al.*, 2004; Rosenberg *et al.*, 2005; Frey *et al.*, 2008).

1.6 Die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2

Die Gene für die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 unterscheidet die Mitglieder des Genus *Pneumovirus* von allen anderen Mitgliedern der Familie *Paramyxoviridae*. Durch die Position der Gene am 3'-terminalen Ende des Genoms erfolgt eine hohe Expression aufgrund des polaren Konzentrationsgradienten. Daher liegen die Nichtstrukturproteine in der infizierten Zelle in einer sehr hohen Konzentration vor, wobei eine Ausbildung zu Multimeren erfolgt (Evans *et al.*, 1996).

Das NS1-Gen von HRSV hat eine Länge von 532 Nukleotiden (nt) und kodiert für ein 139 Aminosäuren langes Protein mit einer Größe von ca. 15,6 kDa. Das HRSV NS2-Gen weist eine Länge von 503 nt auf und kodiert für ein 124 Aminosäuren langes Protein, welches ca. 14,7 kDa groß ist (Collins *et al.*, 2001). Die NS-Proteine von HRSV zeigen untereinander bis auf vier carboxyterminale Aminosäuren keine weiteren Sequenzhomologien (Collins & Wertz, 1985). Die NS1- und NS2-Gene von BRSV sind 524 nt und 489 nt lang und kodieren für Proteine mit einer Länge von 123 Aminosäuren und 156 Aminosäuren (Pastey & Samal, 1995). Die NS1- und NS2-Gene von PVM besitzen eine Länge von 410 nt und 571 nt, wobei sie für Proteine von 113 Aminosäuren und 156 Aminosäuren kodieren (Chambers *et al.*, 1991). Vergleiche der NS-Proteine von HRSV und BRSV zeigen eine Homologie der Aminosäuresequenzen von ca. 70%, wobei Sequenzvergleiche zu den Nichtstrukturproteinen NS1 und NS2 von PVM nur geringe Sequenzhomologien zeigen (Chambers *et al.*, 1991). Für das NS1-Protein von HRSV wurde mit Hilfe des Minireplikon Systems eine Inhibition auf Transkriptions- und RNA-Replikationsebene nachgewiesen. Somit wurde für das NS1-Protein eine regulatorische, für die Virusreplikation notwendige Funktion diskutiert (Atreya *et al.*, 1998), wogegen das NS2-Protein für die Virusreplikation nicht essentiell ist (Teng & Collins, 1999). Das NS1-Protein von RSV zeigt eine Assoziation mit dem Matrix-Protein (M), die mit Hilfe einer Co-Präzipitation mit dem monoklonalen Antikörper gegen das M-Protein nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde für das NS2-Protein keine Assoziation mit anderen RSV-Proteinen belegt (Evans *et al.*, 1996). Demhingegen konnte durch *Pulse-labeling* Experimente für das NS1-Protein von RSV eine hohe Stabilität nachgewiesen werden, wogegen das NS2-Protein sich mit einer Halbwertszeit von 30 min als sehr instabil zeigte (Evans *et al.*, 1996).

1.6.1 Die Funktion der Nichtstrukturproteine als Interferonantagonisten

Über die Wirkungsweise der NS-Proteine von PVM als Interferonantagonisten war zu Beginn dieser Dissertation nichts bekannt. Für die Proteine NS1 und NS2 von HRSV, deren Wirkungsweise sowohl unabhängig voneinander als auch kooperativ ist, konnte eine Inhibition der Typ I Interferon-Induktion in humanen und in murinen Zellen belegt werden.

Durch diese Inhibition wird die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 verhindert (Bossert *et al.*, 2003; Spann *et al.*, 2004; Spann *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte neben der Inhibition der Typ I Interferon-Induktion auch eine Inhibition der Typ III Interferon-Induktion in humanen epithelialen Zellen und Makrophagen gezeigt werden (Spann *et al.*, 2004). Dabei ist die inhibitorische Funktion der HRSV NS-Proteine auf die Typ I Interferon-Induktion auch für die NS-Proteine von BRSV gezeigt worden (Schlender *et al.*, 2000). Hierbei wurden eindeutige wirtsspezifische Unterschiede in der Wirkungsweise der NS-Proteine von HRSV und BRSV sichtbar. Das NS2-Protein von BRSV wurde als stärkerer Interferonantagonist als das NS1-Protein von BRSV identifiziert (Valarcher *et al.*, 2003), wobei die Stärke der antagonistischen Funktion der Proteine für HRSV invertiert ist (Spann *et al.*, 2004). Im Mausmodell für HRSV wurde jedoch eine stärkere antagonistische Funktion des NS2-Proteins belegt (Kotelkin *et al.*, 2006). Weiterhin konnte eine Interferenz der NS-Proteine mit der Typ I Interferon-induzierten Signaltransduktion, vermittelt durch den JAK/STAT-Signalweg, nachgewiesen werden, wodurch sich eine deutliche Reduktion der STAT-2-Konzentration, hervorgerufen durch eine kooperative Wirkungsweise der NS-Proteine, nachweisen ließ (Lo *et al.*, 2005). Hierbei inhibiert das NS2-Protein von RSV die Phosphorylierung von STAT-2 (Ramaswamy *et al.*, 2006) während das NS1-Protein als E3 Ubiquitin Ligase fungiert und eine durch die Polyubiquitinierung bedingte Degradation von STAT-2 bewirkt (Elliott *et al.*, 2007).

Für das NS2-Protein von HRSV konnte außerdem eine Inhibition des RIG-I-Signalweges hervorgerufen durch eine Bindung des NS2-Proteins an die N-terminale CARD (Caspase recruitment domain)-Domäne von RIG-I beschrieben werden (Ling *et al.*, 2009). Ebenso wird durch das NS2-Protein von HRSV eine Inhibition des TLR3-Signalweges durch einen bisher nicht genau bekannten Mechanismus vermutlich auf Ebene des Adapterproteins TRIF verursacht (Ling *et al.*, 2009). Neben der Funktion als Interferonantagonisten wurde den NS-Proteinen von HRSV auch eine Funktion bei der Unterstützung der viralen Replikation durch die Inhibition der vorzeitigen Apoptose virusinfizierter Zellen zugewiesen (Bitko *et al.*, 2007).

Aufgrund der zuvor beschriebenen Interferon-inhibitorischen Funktionsweise der NS-Proteine wurde für die rekombinanten HRSV-Deletionsmutanten eine deutliche Attenuierung in Schimpansen (Whitehead *et al.*, 1999; Teng *et al.*, 2000), Grünen Meerkatzen (Jin *et al.*, 2003) und in Menschen (Wright *et al.*, 2006) beobachtet. Für rekombinante BRSV-Deletionsmutanten wurde eine deutliche Attenuierung in Rindern beschrieben (Valarcher *et al.*, 2003). HRS-Viren mit einer Deletion des NS2-Gens und weiteren Punktmutationen in anderen Proteinen wurden in klinischen Studien (Phase I) als zu stark attenuiert beschrieben und kamen somit als Impfstoffkandidaten nicht in Betracht (Wright *et al.*, 2006).

2 Zielsetzung

Die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 des respiratorischen Synzytialvirus (RSV) sind als Interferonantagonisten beschrieben worden. Eine Deletion dieser Gene, unabhängig voneinander oder in Kombination, führt zu einer Attenuierung des Virus im entsprechenden Wirt und dokumentiert die Rolle der NS-Proteine als Pathogenitätsfaktoren.

In dieser Dissertation sollte das PVM-Mausmodell verwendet werden, um die Bedeutung der Typ I und Typ III Interferonantwort für die Pathogenese einer pneumoviralen Infektion zu analysieren. Hierzu sollten zunächst mit Hilfe der reversen Genetik rekombinante PVM-Mutanten hergestellt werden, bei denen die Gene für die NS-Proteine, welche vermutlich als Interferonantagonisten fungieren, deletiert sind.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten die rPVM Δ NS-Mutanten hergestellt und charakterisiert werden. Ein zentraler Schritt innerhalb dieser Charakterisierung sollte dabei die Untersuchung der Induktion von Interferon *in vitro* und *in vivo* nach Infektion mit den rPVM Δ NS-Mutanten sein, wobei bestimmt werden sollte, ob die NS-Proteine von PVM in Analogie zu den RS-Viren als Interferonantagonisten fungieren.

Im weiteren Verlauf sollten die Interferon-induzierenden Viren eingesetzt werden, um durch Bestimmung der Replikationsfähigkeit und Pathogenität von rPVM Δ NS-Mutanten sowohl in Typ I oder Typ III Interferonrezeptor-defizienten Mäusen als auch in Typ I/Typ III Interferonrezeptor-defizienten Mäusen die protektive Rolle der einzelnen Interferone bei einer Pneumovirusinfektion zu bestimmen.

Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, welche Zellen während einer natürlichen pulmonalen Infektion hauptsächlich Interferone, d.h. IFN- $\alpha/\beta/\lambda$ *in vivo* produzieren. Die Beantwortung der Frage nach den interferonproduzierenden Zellen *in vivo* sollte den abschließenden Teil dieser Arbeit bilden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Sofern nicht anders in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben, wurden die Chemikalien, Enzyme und Medienzusätze von folgenden Firmen bezogen:

Axxora, BD Pharmingen, Fermentas, Fluka, Gibco, Hartenstein, Invitrogen, Merck, New England Biolabs (NEB), PAA, peqLab, Pierce, Promega, Roche Diagnostics GmbH, Roth, Santa Cruz Biotechnology, Sigma Aldrich, Stratagene

Alle Medien wurden im Institut für Virologie und Immunbiologie (Universität Würzburg) bzw. im Institut für Mikrobiologie und Hygiene (Universität Freiburg) angesetzt (Hausmedien).

3.1.1 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 zusammengefasst und wurden in der angegebenen Verdünnung in der indirekten Immunfluoreszenz (siehe Abschnitt 3.6.2), der Immunhistochemie (siehe Abschnitt 3.6.3) und im Plaquetest (siehe Abschnitt 3.4.1) eingesetzt.

Tabelle 2: Antikörper

Spezifität/Modifikation	Wirtstier	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Anti-F4/80	Ratte	1:100	Serotec	MCA497G
Anti-IFN- α	Kaninchen	1:50	PBL	32100-1
Anti-IFN- β	Kaninchen	1:300	Millipore	AB2215
Anti-Kaninchen/Alexa 350 konjugiert	Ziege	1:100	Invitrogen	A11046
Anti-Kaninchen/Alexa 555 konjugiert	Ziege	1:100	Invitrogen	A21428
Anti-Kaninchen/Biotin konjugiert	Ziege	1:5000	ThermoScientific	31210
Anti-Kaninchen/Peroxidase konjugiert	Ziege	1:20000	Millipore	AP132P
Anti-PVM G-Protein	Kaninchen	1:1000	von Dr. C. Kreml zur Verfügung gestellt	—
Anti-Ratte/Alexa 350 konjugiert	Ziege	1:100	Invitrogen	A21093
Anti- β -Tubulin IV	Kaninchen	1:400	Sigma	T3952

3.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer, Medien und Lösungen sind, soweit nicht anders beschrieben, in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3: Puffer, Medien und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Blockierungslösung	5% (w/v) Milchpulver in PBS
DAB-Lösung	1 Tablette DAB (3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid) gelöst in 15 ml PBS und 12 μ l 30% igem H ₂ O ₂
DMEM-Medium	DMEM Hausmedium; 10% (v/v) FKS
DNA-Probenpuffer	50% (v/v) Glycin; 0,1% (w/v) Bromphenolblau in TAE-Puffer
EMEM-Medium	EMEM Hausmedium; 10% (v/v) FKS
GMEM-Medium	GMEM Hausmedium; 10% (v/v) FKS
Infektionsmedium	Zellkulturmedium mit 5% (v/v) FKS, 1% Penicilin/Streptomycin, 1% Fungizone TM
LB-Medium	1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,5% (w/v) NaCl; pH 7,0
Methylcelluloselösung	0,8% Methylcellulose in Infektionsmedium (Steril), 2-3 Tage bei 4 °C gerührt
Paraformaldehydlösung	4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS
PBS	0,8% (w/v) NaCl; 0,02% (w/v) KCl; 0,114% (w/v) Na ₂ HPO ₄ x2 H ₂ O; 0,2% (w/v) KH ₂ PO ₄ ; 0,01% CaCl ₂ ; 0,01% MgCl ₂
RPMI-Medium	RPMI Hausmedium; 20% (v/v) FKS; 1% Penicilin/Streptomycin; 1% Fungizone TM
SOC-Medium	0,5% (w/v) Hefeextrakt; 2% (w/v) Trypton; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose; pH 7,0
TAE	40 mM Tris; 10 mM NaAc; 1 mM EDTA, pH 8,0
Thioglykolat-Lösung	4% (w/v) Thioglykolat, frisch ansetzen
Trypsin-EDTA	0,05% (w/v) Trypsin 1:250; 0,16% (w/v) EDTA
Virusstabilisator	0,5 mM Hepes; 1 M MgSO ₄

3.1.3 Kits

Tabelle 4: Kits

Name	Firma
Cytometric Bead Array	BD Pharmingen
IFN- α /IFN- β ELISA	PBL Biomedical Laboratories
Mitochondrial Permeability Transition (MitoPT)-TMRE Assay	Serotec
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraktion Kits	Qiagen
Rapid DNA Ligation Kit	Roche
TSA Fluorescein Systems	Perkin Elmer

3.1.4 Chemikalien, Enzyme und Materialien

Tabelle 5: Chemikalien, Enzyme und Materialien

Name	Zusammensetzung/Anwendung	Firma
Ampicillin	100 µg/ml Ampicillin	Gibco
Cell Lysis Buffer		Promega
1 kb DNA Ladder		NEB
DMSO (Dimethylsulfoxid)		Sigma
DTT	0,1 M	Invitrogen
Ethidiumbromid	0,35 µg/ml	Appllichem
Formalin	4% (v/v) Formaldehyd	Appllichem
FKS		Gibco
Fungizone TM	250 µg/ml Amphotericin B 205 µg/ml Natriumdesoxycholat	Gibco
Geneticin G418	50 mg/ml	Gibco
GolgiStop TM		BD Pharmingen
HRP-Streptavidin-Komplex	1:2000 in PBS	BD Pharmingen
IFN-α/β/ω	10 ⁶ Einheiten/100 µl	Novartis, Basel
Image-iT FX Signal Enhancer		Invitrogen
LB-Amp-Platten	LB-Medium; 1,4% (w/v) Bacto Agar; 100 µg/ml Ampicillin	
Luziferase-Substrat		Promega
Narkosemittel	10% (v/v) Ketavet 2% (v/v) Rompun 0,9 % (w/v) NaCl Dosierung: Ketavet 1 µl/g Körpergewicht Rompun 0,2 µl/g Körpergewicht	Pfizer Bayer Healthscare
Opti-MEM		Invitrogen
Passive Lysis Buffer		Promega
Penicillin/Streptomycin	1% (w/v) Penicillin G, 1% (w/v) Streptomycinsulfat, 0,9% (w/v) NaCl	PAA
PfuUltra Hotstart TM DNA Polymerase		Stratagene
ProLong Gold antifade reagent		Invitrogen
Random Primer		Promega
Rekombinantes IL-28A/IFN-λ2	5 µg/100 µl	R&D Systems
RNaseOUT TM		Invitrogen
Staurosporin	1 µM in Infektionsmedium	VWR
SuperScript TM II Reverse Transcriptase		Invitrogen
Taq-DNA-Polymerase		Fermentas
TissueTek		Sakura
Transfektionsreagenz Lipofectamine TM 2000		Invitrogen
Trapanal0.5G	Substanz in 10 ml H ₂ O lösen und 100 µl pro Maus injizieren	Nycomed
Trizol [®]		Invitrogen

3.1.5 Versuchstiere

Neben dem Maus-Inzucht-Stamm C57BL/6N von Charles River Laboratories, Sulzfeld, wurden folgende Mausstämme für Versuche herangezogen:

- C57BL/6.IFN-αR^{0/0} -Mäuse (Koerner *et al.*, 2007) von Prof. Peter Stäheli (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg) zur Verfügung gestellt.

- C57BL/6.IL28R $\alpha^{0/0}$ -Mäuse (Ank *et al.*, 2008) von Prof. Peter Stäheli (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg) zur Verfügung gestellt.
- IFN- $\beta^{+/\Delta\beta-luc}$ -Mäuse (Lienenklaus *et al.*, 2009) von Prof. Siegfried Weiß und Dr. Stefan Lienenklaus (Institut für Infektionsforschung, Braunschweig) zur Verfügung gestellt.
- C57BL/6.IFN- $\alpha R^{0/0}$.IL28R $\alpha^{0/0}$ -Mäuse (Mordstein *et al.*, 2008) von Prof. Peter Stäheli (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg) zur Verfügung gestellt.

Die drei Mausstämme C57BL/6.IFN- $\alpha R^{0/0}$, C57BL/6.IL28R $\alpha^{0/0}$ und C57BL/6.IFN- $\alpha R^{0/0}$.IL28R $\alpha^{0/0}$ wurden in dieser Arbeit sowohl mit Mx1⁺ Hintergrund (funktionale Mx1-Allele) als auch mit Mx1⁻ Hintergrund (Deletion der Mx1-Allele) verwendet. Kommerziell erhältliche Laborstämme (Stäheli *et al.*, 1988) und alle übrigen in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme besitzen eine Deletion der Mx1-Allele.

3.1.6 Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Zelltyp	Referenz
BHK-21	Mesocricetus auratus (Hamster)	Nierenfibroblasten	ATCC: CCL-10
BSR T7/5	Mesocricetus auratus (Hamster)	Nierenfibroblasten exprimieren konstitutiv T7-Polymerase	Buchholz <i>et al.</i> , 1999
Embryonale Maus- fibroblasten (MEF)	C57BL/6 C57BL/6.IFN- $\alpha R^{0/0}$ IFN- $\beta^{+/\Delta\beta-luc}$	primäre Fibroblasten	Diese Arbeit
Peritoneale Makrophagen	BALB/c C57BL/6 C57BL/6.IFN- $\alpha R^{0/0}$ C57BL/6.IL28R $\alpha^{0/0}$ C57BL/6.IFN- $\alpha R^{0/0}$.IL28R $\alpha^{0/0}$	primäre Makrophagen	Diese Arbeit
RAW264.7	BALB/c	Abelson Leukämievirus (immortalisierte Makrophagen)	ATCC: TIB-71
Vero	Cenopithecus aethiops (Grüne Meerkatze)	Epitheliale Nierenzellen	ATCC: CCL-81

3.1.7 Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden im Kundenauftrag bei der Firma Biomers (Ulm) synthetisiert. Die DNA-Sequenzen und die Positionen der Mutagenese-Primer im PVM-Genom sind in den folgenden Tabellen angegeben.

Tabelle 7: Sequenzen aller verwendeten Primer

Primername	5'-3' Sequenz
IFN- α 5 forward	CCT GTG TGA TGC AAC AGG TC
IFN- α 5 reverse	TCA CTC CTC CTT GCT CAA TC
IFN- β forward	ATG AAC AAC AGG TGG ATC CTC C
IFN- β reverse	TTC AAG CTA TAA GCA GCT CCA
IFN- λ 2/3 forward	CCG CAG TGC TGA CAA GAA CC
IFN- λ 2/3 reverse	ACT GGC CAC ACA CTT GAG G
Aktin forward TM 92	TGG CGC TTT TGA CTC AGG AT
Aktin reverse TM 93	GTT GAG GTG TTG AGG CAG CCA GGG CT
PVM N 1505	CCA GAT TGA GGT GTG ATA GTT C
PVM N 2013	TGA CCC TAT GAT GCC TAA AC
Δ NS1 forward	AGG ACA AGT CCT AAT GTC CAC
Δ NS1 reverse	AAC TTT TTT CAG GTT GAT AGT TTT G
Δ NS2 forward	AGT TAA TTA AAA CAT TAG GAT AAA TAC
Δ NS2 reverse	TTT TAA TTA ACT ACA TAA TGT GCT G
Δ NS1 Δ NS2 forward	AGG ATA AAT ACA CAT CCT AGG CCG G
PVM1 lea2m forward	ATA ACA AAA CTA TCA ACC TG

Tabelle 8: Name und Position der Mutagenese-Primer

Name des Primers/Modifikation	Position im PVM-Genom	Konstrukt
Δ NS1 forward/phosphoryliert	462-482 nt	pPVM1 Δ NS1
Δ NS1 reverse/phosphoryliert	19-43 nt	
Δ NS2 forward/PacI Schnittstelle	1022-1047 nt	pPVM1 Δ NS2
Δ NS2 reverse/PacI Schnittstelle	429-453 nt	
Δ NS1 Δ NS2 forward/phosphoryliert	1037-1061 nt	pPVM1 Δ NS1 Δ NS2
Δ NS1 reverse/phosphoryliert	19-43 nt	

3.1.8 Bakterienstamm

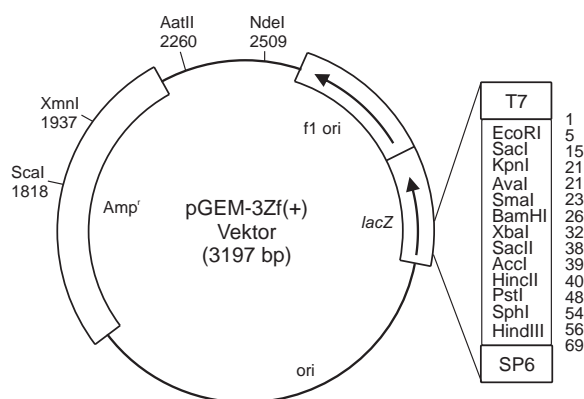
Tabelle 9: Bakterienstamm

Bakterienstamm	Genotyp
DH10B	F^- , endA1, recA1, galE15, galK16 nupG, rpsL, Δ lacX74, Θ 80lacZ Δ M15 araD139 Δ (ara,leu)7697, mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) λ^-

3.1.9 Plasmide

Tabelle 10: Plasmide

Plasmid	Firma/Referenz
pGEM [®] -3Zf(+)	Promega, siehe Abb. 5
pPVM-1	siehe Krempl <i>et al.</i> , 2007
pPVM-GFP7	siehe Krempl <i>et al.</i> , 2007

Abbildung 5: pGEM[®]-3Zf(+)

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung der Zellen

Alle Zellen wurden bei 37 °C und 95% Luftfeuchtigkeit mit 5% Kohlendioxid (CO₂) inkubiert. Als Medium diente für die embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) DMEM, für die Vero-Zellen EMEM und für die BHK-21-Zellen GMEM. Bei BSR T7/5-Zellen wurde dem GMEM-Medium zusätzlich Geneticin (G418; 1 mg/ml Medium) zugesetzt, welches zur Selektion der stabil T7-Polymerase exprimierenden Zellen diente. Sowohl die RAW264.7-Zellen also auch die peritonealen Makrophagen wurden in RPMI-Medium kultiviert. Zum Waschen der Zellen wurde Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) ohne Calcium und Magnesium verwendet. Alle Zellen exklusiv der Makrophagen wurden zur Passage mit Trypsin-EDTA von der Kulturschale abgelöst. Die RAW264.7-Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und wie alle anderen Zelltypen in geeigneter Verdünnung in neue Kulturgefäße überführt.

3.2.2 Gefrierkulturen

Zur Konservierung von Zellen wurden Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurden konfluente Zellen einer Kulturflasche mittels Trypsin-EDTA oder mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturschale abgelöst und in einem entsprechenden Volumen an Medium aufgenommen. Nach tropfenweiser Zugabe von DMSO bis zu einer Konzentration von 10% (v/v) wurden ca. 1×10^6 Zellen/ml in 1 ml Aliquots portioniert und sofort in eine Kryo-Einfrierbox gegeben. Die Einfrierbox (Abkühlrate: 1 °C pro min) wurde bei -80 °C eingelagert. Zur längerfristigen Konservierung wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Quantifizierung von Nukleinsäure-Proben

Die Konzentration von DNA- und RNA-Proben wurde über die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, wobei gilt: $OD_{260}=1=40 \text{ ng}/\mu\text{l}$ für RNA und einzelsträngige DNA (ssDNA). Des Weiteren wurde auch das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} gemessen, wodurch die Reinheit der DNA bzw. RNA abgeschätzt werden konnte. Der Quotient sollte für reine DNA Werte von 1,8-1,9 und für reine RNA Werte von 1,9-2,0 aufweisen (Sambrook & Russell, 2001).

3.3.2 Plasmid-DNA Präparation

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E.coli* erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Mini-prep Kit nach Angaben des Herstellers. Die Ausbeute aus 3 ml Übernachtskultur belief sich auf ca. 15 μg Plasmid-DNA. Die gewonnene doppelsträngige DNA (dsDNA) wurde zur Restriktionsspaltung und zur Sequenzierung eingesetzt. Um Plasmid-DNA in größerer Menge (75-500 μg) zu erhalten, wurde das Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

3.3.3 Restriktionsverdau von DNA

Die Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen wurde mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern unter den dafür vorgesehenen Bedingungen durchgeführt. Zur Überprüfung von DNA und Plasmiden wurde ein analytischer Verdau durchgeführt und für weitere Klonierungs-Schritte erfolgte ein präparativer Verdau. Für einen analytischen Verdau wurden pro 1 μg DNA 3-5 Units des Restriktionsenzym eingesetzt. Hingegen wurden für einen präparativen Verdau pro 5-10 μg 10-20 Units der entsprechenden Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Die Analyse der DNA erfolgt mittels DNA-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.3.4).

3.3.4 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese zur Identifizierung sowie zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1%igen Agarosegelen. Die Agarosegele wurden durch Aufkochen der gewünschten Menge an Agarose in TAE-Puffer hergestellt. Zum Nachweis der DNA-Fragmente wurde das Agarosegel mit Ethidiumbromid (0,35 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung (ca. 5 V/cm) wurden die in DNA-Probenpuffer gelösten DNA-Fragmente nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe des Gel Jet Imagers (Intas) bei einer Wellenlänge von 312 nm.

3.3.5 DNA-Extraktion

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kits nach Angaben der Herstellers durchgeführt. Hierzu wurde die DNA-Bande unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers weiterbehandelt.

3.3.6 Ligation und Transformation

Durch die Ligation wird DNA über komplementäre Schnittstellen in ein Plasmid inseriert. Die Ligation von überhängenden (sticky-end) und glatten Enden (blund-end) erfolgte mit dem Rapid DNA Ligation Kit nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden der Vektor und das Insert in einem molaren Konzentrationsverhältnis von 1:3 in die Ligation eingesetzt. Zur Transformation der ligierten DNA wurden 20 μl kompetente *E. coli* (siehe Abschnitt 3.1.8) zu 3 μl des Ligationsansatzes pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 75 s wurden die Zellen zur Regeneration für 2 min auf Eis gelagert. Nach der Zugabe von 200 μl SOC-Medium erfolgte eine Inkubation für 60 min bei 37 °C (32 °C bei den volle Länge Klonen) unter leichtem Schütteln. Die Zellen wurden auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aufgrund der plasmid-kodierten Antibiotikaresistenz können auf diesen Platten erfolgreich transformierte *E. coli* wachsen.

3.3.7 RNA-Isolierung

Die Isolierung der gesamtzellulären-RNA aus Zellen und Lungengewebe wurde unter Verwendung von Trizol[®] (Phenol/Guanidinisothiocyanat-Gemisch) durchgeführt (Chomczynski & Sacchi, 1987). Hierbei wurden die Empfehlungen des Herstellers zur Durchführung befolgt. Alle bei der Arbeit mit RNA verwendeten Lösungen wurden auf Basis autoklavierten, destillierten Wassers hergestellt.

3.3.8 Reverse Transkription

Zur Synthese eines cDNA-Erststranges aus gesamtzellulärer-RNA wurde 1 μg RNA verwendet. Dazu wurden 1 μl dNTPmix (10 mM), 2 μl Random Primer (50 ng/ μl) und ein entsprechendes Volumen an dd H₂O gemischt und die Lösung bei 65 °C für 5 min erhitzt. Anschließend wurde ein Reaktions-Mix aus folgenden Komponenten zu diesem Ansatz gegeben: 2 μl 10x RT-Puffer, 4 μl 25 mM MgCl₂, 2 μl 0,1 M DTT und 1 μl RNaseOUT Inhibitor (40 Units/ μl). Dieser Ansatz wurde für 2 min bei 25 °C inkubiert bevor 1 μl (50 Units) SuperScript[™] II RT hinzugeben wurde. Es folgte eine erneute Inkubation von 10 min bei 25 °C. Die Reaktion wurde danach bei 42 °C für 50 min durchgeführt und durch eine Inkubation für 15 min bei 70 °C beendet. Die so gewonnene cDNA wurde bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

3.3.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten (Saiki *et al.*, 1988), wobei die Taq-DNA-Polymerase als Standardenzym gewählt wurde. Sollte die amplifizierte DNA zur Klonierung dienen, wurde eine Polymerase mit Proof-reading-Aktivität (PfuUltraTM Hotstart DNA Polymerase) benutzt. In einem 50 μl Ansatz wurden je 2 μl Template-DNA, je 1 μl Primer (10 μM), 1 μl dNTP-Mix (10 μM), 0,2-0,5 μl Polymerase (je nach Applikation oder Herstellerfirma) und Polymerase spezifischer Puffer gemischt. Nach Denaturierung der DNA erfolgten 40 Zyklen mit Denaturierung, Hybridisierung des Primers und der Synthese der DNA-Stränge. Für die DNA-Synthesephase wurde eine Zeit von 1 min pro 1000 bp des PCR-Produktes angenommen. Die unterschiedlichen Elongationstemperaturen ergeben sich aus dem Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase. Die Hybridisierungstemperatur der verschiedenen Primer errechnet sich dabei nach der Wallace-Formel (Murakawa *et al.*, 1988):

$$\text{Temperatur} = [2 \cdot (A + T) + 4 \cdot (G + C)] - 5$$

Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine abschließende Elongation für 5 min zur Fertigstellung unvollständiger DNA-Fragmente. Die Analyse der Amplifikate erfolgt auf einem 1%igen Agarosegel (siehe Abschnitt 3.3.4). Für den spezifischen Nachweis der Induktion der unterschiedlichen Interferon-Typen, IFN- α 5, IFN- β und IFN- λ 2/3 (Primer siehe Tab. 7) mittels PCR wurden die PCR-Programme in Tabelle 11 gewählt.

Tabelle 11: Interferon-PCR

Programme	IFN- α 5	IFN- β	IFN- λ 2/3	Aktin	PVM
Initiale Denat.	95 °C, 2 min	95 °C, 2 min	95 °C, 2 min	95 °C, 2 min	95 °C, 2 min
Denaturierung	94 °C, 30 s	94 °C, 30 s	94 °C, 30 s	94 °C, 30 s	94 °C, 30 s
Annealing	55 °C, 60 s	55 °C, 60 s	55 °C, 60 s	53 °C, 45 s	55 °C, 45 s
Elongation	70 °C, 45 s	70 °C, 45 s	70 °C, 45 s	70 °C, 30 s	70 °C, 30 s
Zyklen	40	40	40	40	40
Finale Elong.	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min

3.3.10 Gerichtete Mutagenese-PCR

Die gerichtete Mutagenese-PCR (Byrappa *et al.*, 1995) wurde eingesetzt, um gezielt die NS-Gene aus dem pPVM1 Plasmid durch nur zwei Primer zu deletieren. Ausgehend von der zu gewünschten Deletion im Plasmid wurden die Primer jeweils so gewählt, dass sie ein Amplifikat generieren, welches das zu deletierende Gen nicht beinhaltet. Für eine anschließende direkte Religation des Plasmids wurden die Primer für die Mutagenese-PCR so modifiziert, dass sie entweder eine PacI Schnittstelle enthalten (Deletion des NS2-Gens) oder

phosphoryliert sind (Deletion des NS1-Gens oder beider NS-Gene) (siehe Tab. 8). Bei dieser Methode wurde die PfuUltraTM Hotstart DNA Polymerase, welche Proofreading-Aktivität besitzt, verwendet. Der Ablauf der Mutagenese-PCR gliederte sich in die verschiedenen Schritte wie in Tabelle 12 beschrieben.

Tabelle 12: Mutagenese-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Initiale Denaturierung	95	60
Denaturierung	95	30
Annealing	45-50	30
Elongation	72	60 pro 1000 bp
Finale Elongation	72	10 min

3.3.11 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen in dieser Arbeit wurden als Kundenauftrag von der Firma GATC, Konstanz, auf einem Sequenziergerät ABI, Modell 3730 oder 3100. durchgeführt. Dazu wurde die zu sequenzierende Probe mit dem jeweiligen Primer eingeschickt und von der Firma GATC nach der Sanger-Methode sequenziert (Sanger *et al.*, 1977). Die Ergebnisse wurden mit den Softwareprogrammen LasergeneTM von DNASTAR inc., Madison WI/USA oder GENTle (Universität Köln) analysiert.

3.3.12 Nachweis von IFN- β mittels Luziferase Assay

Zur Detektion von IFN- β *in vivo* und *in vitro* wurden IFN- $\beta^{+/\Delta\beta-luc}$ -Mäuse, bei denen sich das Gen der Glühwürmchen (Firefly)-Luziferase unter der Kontrolle des IFN- β Promotors befindet, herangezogen. In Abhängigkeit von der Promotoraktivierung wird die Luziferase synthetisiert. Die Luziferaseaktivität setzt das Substrat Luziferin zu Oxyluziferin um, wobei die dabei entstehende Chemilumineszenz mit Hilfe eines Luminometers (Berthold Technologies) detektiert wird und in relativen Lichteinheiten (RLU, *relative light units*) als Einheit angegeben wird. Für den Nachweis von IFN- β in embryonalen Fibroblasten aus IFN- $\beta^{+/\Delta\beta-luc}$ -Mäusen wurden pro Versuchsansatz jeweils 6×10^5 Zellen eingesetzt. Die Infektion erfolgte mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 1 PFU/Zelle.

24 h, 48 h und 72 h nach Infektion wurde der Überstand vorsichtig entfernt und die Zellen in 200 μ l Cell Lysis Buffer auf Eis lysiert. Für die Messung wurden 20 μ l Zelllysat mit 50 μ l Luziferase-Substrat versetzt. Die Messung erfolgte sofort.

Für den Nachweis von IFN- β *in vivo* wurden IFN- $\beta^{+/\Delta\beta-luc}$ -Mäuse mit 1×10^5 PFU der rekombinanten Viren (rPVM, rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2, rPVM Δ NS1 Δ NS2) infiziert. 24 h nach Infektion wurden die Mäuse getötet, die Lungen entnommen und sofort in flüssigem

Stickstoff schockgefroren. Für den Versuch wurden die Lungen gewogen und mit Hilfe von Quarzsand im Mörser zerkleinert. Entsprechend des Gewichtes wurden die zerkleinerten Lungen mit 1x Passive Lysis Buffer nach den Angaben des Herstellers versetzt und für 10 min bei $250\times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Für die Messung wurden $20\text{ }\mu\text{l}$ Überstand (Lungenhomogenat) mit $50\text{ }\mu\text{l}$ Luziferase-Substrat versetzt. Die Messung erfolgte sofort.

3.4 Virologische und immunologische Methoden

3.4.1 Plaquetest

Der Plaquetest diente der quantitativen Bestimmung der Infektiösität einer Virussuspension. Das Prinzip der Methode basiert auf der Zytotoxizität der zu bestimmenden Virussuspension und der durch Zugabe von Methylcellulose eingeschränkten Viruspartikel-ausbreitung. Dabei sind die makroskopisch sichtbaren Plaques ein quantitatives Zeichen für die Virusvermehrung und „ein Plaque“ kann auf die Infektion einer Zelle mit einem Viruspartikel zurückgeführt werden.

Für die Bestimmung des Virustiters wurde zuerst eine Verdünnungsreihe der entsprechenden Virussuspension in Infektionsmedium von 1×10^{-1} bis 1×10^{-6} angelegt. Für die Virustiterbestimmung von PVM wurden danach konfluente Vero-Zellen in einer 24-Well Zellkulturplatte mit $150\text{ }\mu\text{l}$ der jeweiligen Verdünnungsreihe infiziert und für 3 h bei $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach der 3 stündigen Inkubationszeit wurde das Inokulum abgesaugt und die Zellen mit je 1 ml Methylcellulose-Lösung überschichtet. Die Kulturen wurden für sechs Tage bei $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 95% Luftfeuchtigkeit mit 5% CO_2 inkubiert. Nach sechs Tagen wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal (20 min; 40 min) mit 80%igem (v/v) Methanol bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert. Das Blockieren der unspezifischen Bindungen erfolgte mit 1 ml Blockierungslösung für 1 h bei RT. Anschließend wurde jede Vertiefung der 24-Well Zellkulturplatte mit $150\text{ }\mu\text{l}$ des Anti-PVM G-Protein Antikörpers (siehe Tab. 2) in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockierungslösung für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit je 1 ml PBS pro Vertiefung wurde der Anti-Kaninchen/Biotin konjugierte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in Blockierungslösung unter leichtem Schütteln für 1 h bei RT eingesetzt. Nach erneutem einmaligem Waschen mit je 1 ml PBS pro Vertiefung, erfolgte die Inkubation des HRP-Streptavidin-Komplexes in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS für 1 h bei RT bei leichtem Schütteln. Abschließend wurde jede Vertiefung mit je 1 ml PBS gewaschen und durch Zugabe von $150\text{ }\mu\text{l}$ DAB-Lösung die Plaques angefärbt. Nach Bestimmung der Plaques pro Verdünnungsstufe wurde der Virustiter in Plaque-forming units (PFU) angegeben.

3.4.2 Virusinfektion

Die Infektion verschiedener Zelllinien mit Viren erfolgte bei einem 80-100% konfluenten Zellrasen. Die Zellen wurden für 3 h mit einer geeigneten Verdünnung des jeweiligen Virusstocks in Infektionsmedium bei 32 °C inkubiert. Dabei wurde die Mediummenge so gering gehalten, dass der Zellrasen gerade bedeckt war. Die Platte wurde während der Inkubation alle 20 min geschwenkt. Anschließend wurde der Überstand entfernt und je nach Flaschengröße die entsprechende Menge Infektionsmedium hinzugegeben.

Zur Charakterisierung der Virusvermehrung (Wachstumskurve) auf BHK-21-Zellen, RAW 264.7-Zellen, embryonalen Fibroblasten sowie peritonealen Makrophagen wurden diese mit den entsprechenden Viren infiziert (MOI=0,01 PFU/Zelle) und die Virustiter in Abständen von 24 h für sieben Tage bestimmt. Hierzu wurden im Fall von BHK-21-Zellen und von embryonalen Fibroblasten die mit Virus infizierten Zellen im Überstand abgeschabt, durch ein sich wiederholendes Frieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Tauen bei 37 °C lysiert, bei 250×g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand mit 10% (w/v) Virusstabilisator versetzt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte mittels Plaquetest (Titration von 1×10^{-1} bis 1×10^{-6}). Im Fall der RAW264.7-Zellen und der peritonealen Makrophagen wurde nur der Überstand für die Bestimmung der Virustiter herangezogen.

Zur Herstellung von Virusstocks wurden BHK-21-Zellen (80–100% konfluent) mit den jeweiligen Viren (MOI=0,01 PFU/Zelle) an Tag null infiziert. Drei bis vier Tage nach Infektion wurde 50% des Volumens des Infektionsmediums ausgetauscht. Fünf bis sechs Tage nach Infektion wurden die Zellen im Infektionsmedium abgeschabt, durch ein sich wiederholendes Frieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Tauen bei 37 °C lysiert, bei 250×g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand mit 10% (w/v) Virusstabilisator versetzt, die Proben aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte mittels Plaquetest (Titration von 1×10^{-1} bis 1×10^{-6}).

3.4.3 Transfektion von BSR T7/5-Zellen mit verschiedenen Δ NS-pPVM-Konstrukten

Die Transfektion von BSR T7/5-Zellen wurde mit dem Transfektionsreagenz LipofectamineTM 2000 durchgeführt. Die zu transfizierenden Zellen zeigten am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 80–90%. Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers mit Opti-MEM ohne FKS durchgeführt, wobei folgende Mengen an zu transfizierender Plasmid-DNA eingesetzt wurden: je 5 μ g des entsprechenden Δ NS-pPVM-Konstrukts und die folgende Menge der entsprechenden Support-Plasmide: 2 μ g pTM pvmN, 2 μ g pTM pvmP, 1 μ g pTM pvmM2-1 und 1 μ g pTM pvmL. 24 h nach der Transfektion wurde

das Transfektionsmedium durch GMEM-Infektionsmedium (5% (v/v) FKS, 1% (v/v) Penicilin/Streptomycin) ausgetauscht. Drei weitere Tage nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen passagiert und mit BHK-21-Zellen kokultiviert. Nach fünf weiteren Tagen wurden die nun mit Virus infizierten Zellen durch ein sich wiederholendes Frieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Tauen bei 37 °C lysiert und der Virustiter der Passage eins mittels Plaquetest bestimmt (siehe Abschnitt 3.4.1).

3.4.4 Nachweis von IFN- α und IFN- β mittels ELISA

Der ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay) wurde in dieser Arbeit zum Nachweis von IFN- α und IFN- β in infizierten Lungen von C57BL/6-Mäusen genutzt. Hierzu wurden C57BL/6-Mäuse mit 1×10^5 PFU der rekombinanten Viren (rPVM, rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2, rPVM Δ NS1 Δ NS2) infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Lungen entnommen und in 2 ml PBS mit Potter und Pistille homogenisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei $250 \times g$ und 4 °C zur Pelletierung der nicht homogenisierten Organbestandteile wurden die Überstände in den ELISA eingesetzt. Der ELISA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.4.5 Mitochondrial Permeability Transition (MitoPT)-TMRE Assay

In jeder lebenden, intakten Zelle besteht unter normalen physiologischen Bedingungen ein Transmembranpotential über der inneren Mitochondrienmembran. Dieses Transmembranpotential hat zur Folge, das sich polare Farbstoffe wie das lipophile Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) an der inneren Membran von Mitochondrien anreichern. Für die Anreicherung dieses Farbstoffes muss jedoch ein intakter Protonengradient über der inneren Membran vorhanden sein. Lebende, intakte Zellen zeigen somit eine Anfärbung mit TMRE, während apoptotische Zellen, die keinen intakten Protonengradienten aufweisen, sich nicht mehr anfärben lassen. Diese Anfärbung der Zellen lässt sich mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie auswerten. Die Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials wurde in dieser Dissertation durchgeführt, um die Frage nach frühzeitiger Apoptose, bedingt durch die Infektion mit den rPVM-GFP7 Δ NS-Mutanten, zu beantworten. Hierzu wurden BHK-21-Zellen in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät (ca. 80% konfluenter Zellrasen) und mit rPVM-GFP7, rPVM-GFP7 Δ NS1, rPVM-GFP7 Δ NS2, rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 und PBS als Kontrolle infiziert (MOI=3 PFU/Zelle). Eine apoptotische Kontrolle wurde durch die Zugabe von 200 μ l 1 μ M Staurosporin (Breitbandkinaseinhibitor) pro Vertiefung der 6-Well Zellkulturplatte für 3-4 h bei 37 °C induziert. Der anschließende Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Infektion von Mäusen

Die Mäuse wurden entweder mit einem Narkosemittel intraperitoneal (i.p.) oder mit Isofluran als Gasanästhetikum betäubt. Die Virussuspension (80 μl Inokulum) wurde intranasal pro Maus verabreicht. Zur Vorbehandlung mit exogenem Typ I und Typ III Interferon wurde Mäusen acht Stunden vor Infektion intranasal 10^6 Einheiten/100 μl IFN- $\alpha/\beta/\omega$ oder 5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ($\text{ED}_{50}=7,5\text{--}37,5 \text{ ng/ml}$) appliziert. Das Gewicht sowie das allgemeine Befinden der Mäuse wurde bei Letalitätsversuchen zweimal täglich kontrolliert. Bei andauernder Lethargie sowie mehr als 20% Gewichtsverlust über mehr als zwei Tage, bezogen auf das Ausgangsgewicht von Tag 0, wurden die Mäuse im Rahmen der Abbruchkriterien eines Tierversuchs getötet.

3.5.2 Präparation der Lunge

Zur Organentnahme wurde die Maus zuvor mit 100 μl Trapanal getötet und über die *Arteria femoralis* ausgeblutet. Der Brustkorb wurde geöffnet und das Zwerchfell wurde vom Abdomen ausgehend von Brustbein und Rippen abgetrennt. Anschließend wurde die Lunge herauspräpariert und bis zur Homogenisation in 3 ml EMEM-Medium mit 10% (v/v) Virusstabilisator auf Eis aufbewahrt.

3.5.3 Homogenisation der Lunge

Die Homogenisation der Lunge erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, mit Hilfe von Potter und Pistille in 3 ml EMEM-Medium mit 10% (v/v) Virusstabilisator. Der nachfolgende Zentrifugationsschritt wurde für 10 min bei $250\times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zur Pelletierung der nicht homogenisierten Organbestandteile durchgeführt. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.5.4 Bronchoalveolar Lavage (BAL)

Bei der Bronchoalveolar Lavage (BAL) handelt es sich um eine Spülung der Lunge mit PBS, wodurch Zellen und lösliche Bestandteile aus dem Respirationstrakt der Maus ausgespült werden. Um eine sichere und kontrollierte Durchführung der BAL zu ermöglichen, wurde bei der Maus die Lunge freigelegt und die Trachea in ihrem gesamten Verlauf dargestellt. Unter Sichtkontrolle wurde eine Venenverweilkanüle in die Trachea eingeführt. 800 μl PBS ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) wurden langsam in die Lunge injiziert, aspiriert und auf Eis aufbewahrt. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Zur Entfernung der Zellen wurde die BAL anschließend für 7 min bei $250\times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Das zellfreie BAL-Fluid wurde bis zur weiteren

Analyse mittels Cytometric Bead Array (CBA) bei -20 °C gelagert.

Der Ausgangspunkt für die Messungen sind sechs verschiedene Populationen von Beads, welche unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten besitzen. Diese Beads sind mit Antikörpern, die spezifisch gegen IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, IFN- γ und TNF- α interagieren, beschichtet. Der Cytometric Bead Array wurde nach Angaben des Herstellers von Dr. Stefanie Frey, Universitätsklinikum Freiburg, durchgeführt.

3.5.5 Isolierung embryonaler Fibroblasten

Zur Isolierung embryonaler Fibroblasten wurden trächtige Mäuse 14-16 Tage *post coitum* durch CO₂ getötet. Die Uteri wurden entnommen und mehrfach mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen aus dem Uterus isoliert, decapitiert, und nach dem Entfernen der inneren Organe in so kleine Stücke geschnitten, dass die Suspension mit einer 10 ml Einwegpipette aufgesaugt werden konnte. Die Gewebestücke wurden zusammen mit einem sterilen Rührfisch und 5 ml Trypsin-EDTA pro Embryo für 15 min bei RT gerührt. Die Suspension (ohne unverdaute Bestandteile) wurde zur Klärung mit Hilfe einer Pipette durch eine sterile Mullbinde filtriert. Diese erste Suspension wurde mit 5 ml (v/v) FKS pro Embryo versetzt und auf Eis aufbewahrt. Die im ersten Versuch im Gefäß verbliebenen nicht verdauten Bestandteile wurden erneut mit 5 ml Trypsin-EDTA (0,05% (w/v) Trypsin 1:250; 0,16% (w/v) EDTA) pro Embryo für 10 min bei RT gerührt. Diese zweite Suspension wurde erneut mit Hilfe einer Pipette durch eine sterile Mullbinde filtriert. Suspension 1 und Suspension 2 wurden zusammengeführt und für 10 min bei 250×g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in DMEM-Medium (10 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin) resuspendiert, in eine Zellkulturflasche mit 25 cm² Durchmesser ausgesät und bei 37 °C und einer CO₂-Atmosphäre von 5% in Kultur genommen.

3.5.6 Isolierung primärer Peritonealmakrophagen

Um primäre Peritonealmakrophagen zu gewinnen, erhielten die Mäuse eine intraperitoneale Injektion von 1 ml einer sterilen 4%igen (w/v) Thioglykolat-Lösung. Durch diese Injektion entwickelte sich bei den Mäusen eine aseptische Peritonitis. Vier Tage nach der Injektion wurden die Mäuse durch CO₂ getötet und die Bauchhöhle zur Gewinnung der Makrophagen mit 10 ml eiskaltem RPMI-Medium (2 mM L-Glutamin) gespült. Dazu wurde die Haut über der Bauchdecke entfernt, die Bauchwand mit der Pinzette median angehoben und das RPMI-Medium in die Bauchhöhle injiziert. Die Lavageflüssigkeit mit den durch die Peritonitis eingewanderten Leukozyten, überwiegend Makrophagen, wurde mit Hilfe einer neuen Spritze aus dem Bauchraum aufgezogen und der Rest der Flüssigkeit nach Eröffnung

der Bauchdecke abpipettiert. Abschließend wurde die Flüssigkeit für 10 min bei $250\times g$ zentrifugiert und danach in RPMI-Medium (2 mM L-Glutamin) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einer CO_2 -Atmosphäre von 5% in Kultur genommen.

3.6 Histologische Methoden

3.6.1 Vorbereiten der histologischen Schnitte

Für die histologische Untersuchung der Lunge erfolgte zuvor eine Perfusionsfixierung. Hierbei wurde die Lunge durch Injektion über die Trachea direkt mit $500\text{ }\mu\text{l}$ Formalin fixiert und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung in Formalin aufbewahrt. Die histologische Beurteilung erfolgte an Paraffin eingebettetem Material, das in $4\text{-}6\text{ }\mu\text{m}$ Präparate geschnitten, auf Glasobjektträger aufgezogen und gefärbt wurde. Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung werden saure Moleküle im Schnitt durch das Hämatoxylin dargestellt, sodass die Kerne, aber auch saure Schleimsubstanzen und Bakterien blau erscheinen. Das Zytoplasma der Zellen, Kollagen und proteinhaltige Lösungen werden rot angefärbt. Die in Abb. 20 dargestellten Lungenschnitte wurden von Prof. Dr. Annette Schmitt-Graeff, Universitätsklinikum Freiburg, erstellt und ausgewertet.

3.6.2 Nachweis von Typ I Interferon in RAW264.7-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz

Zum Nachweis von Typ I Interferon *in vitro* wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz in Lab-Tek[®] II Chamber Slides gewählt. Hierfür wurden ca. 1×10^4 RAW264.7-Zellen pro Kammer eines Lab-Tek[®] II Chamber Slides ausgesät. Die Zellen wurden 24 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend mit einer MOI von 3 PFU/Zelle mit den Viren rPVM-GFP7 oder rPVM-GFP7 $\Delta\text{NS1}\Delta\text{NS2}$ infiziert, wobei uninfizierte Zellen als Kontrolle dienten. Jeweils 4 h vor dem Fixierung der Zellen wurde das RPMI-Medium ($150\text{ }\mu\text{l}$) mit $1\text{ }\mu\text{l}$ GolgiStop[™] versetzt. Zur Durchführung der Immunfluoreszenz wurden die Zellen nach 16 h, 24 h und 48 h vorsichtig zweimal mit PBS gewaschen, mit einer Paraformaldehydlösung für 10 min bei RT fixiert, zweimal mit PBS gewaschen, mit 0,5% (v/v) Triton-X100 für 5 min bei RT permeabilisiert und abschließend erneut zweimal mit PBS gewaschen. Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen und zur Minimierung des Hintergrundes wurden die Präparate für 30 min bei RT mit Image-iT FX Signal Enhancer blockiert und danach mit der geeigneten Antikörperlösung (Anti-IFN- α , 1:50 in PBS mit 5% (v/v) FKS; Anti-IFN- β , 1:300 in PBS mit 5% (v/v) FKS) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen, die endogenen Peroxidasen mit 0,3% (v/v) H_2O_2 in PBS für 10 min bei RT blockiert, mit einer Lösung eines HRP-

gekoppelten Sekundärantikörpers (Anti-Kaninchen/Peroxidase konjugiert, 1:20000 in PBS mit 5% (v/v) FKS) für 1 h bei RT inkubiert und wieder zweimal mit PBS gewaschen. Da die nachzuweisenden Proteine nur in geringer Konzentration vorlagen, sollte die Detektion durch die Verwendung des TSA Fluorescein Systems verstärkt werden. Die Verstärkung erfolgte durch die Zugabe von 150 μl Cy3-Tyramid (1:50 in Verdünnungsreagenz aus dem Kit) und beruht auf enzymatischer Aktivierung und anschließender kovalenter Bindung des Tyramids an zelleigene Proteine. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wurde das Cy3-Tyramid wieder von den Präparaten entfernt. Abschließend wurden die Präparate mit ProLong Gold antifade reagent eingebettet. Die Auswertung erfolgte mit konfokaler Laser-mikroskopie (Leica) bei Verwendung entsprechender Filter zur Anregung des Farbstoffes.

3.6.3 Immunhistochemie zum Nachweis von rezeptorgebundenen Typ I Interferon

Um die Bindung von Typ I Interferonen *in vivo* am Rezeptor nachzuweisen, wurden Kryoschnitte der Lunge angefertigt. Hierzu wurden C57BL/6-Mäuse und C57BL/6.IFN- $\alpha\text{R}^{0/0}$.IL28R $\alpha^{0/0}$ -Mäuse wie unter 3.5.1 beschrieben intranasal mit 1×10^5 PFU rPVM-GFP, rPVM-GFP $\Delta\text{NS1}\Delta\text{NS2}$ oder als Kontrolle mit PBS (Mock) infiziert. 24 h nach Infektion wurden die Mäuse intranasal mit 50 μl (0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) des primären polyklonalen Anti-IFN- α Antikörpers, 50 μl (0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) des primären polyklonalen Anti-IFN- β Antikörpers oder 50 μl PBS (Kontrolltiere) behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Mäuse getötet und die Lungen über die Trachea mit einer Paraformaldehydlösung plus 8% (w/v) Saccharose fixiert. Nach zweimaligen Waschen für 10 min in PBS erfolgte die Stabilisierung des Gewebes für je 3 h in 10% (w/v) Saccharose, 20% (w/v) Saccharose und abschließend über Nacht in 30% (w/v) Saccharose. Danach wurden das Gewebe in TissueTek eingebunden, im Gefriermikrotom (Leica) bei -26 °C geschnitten (7-10 μm Dicke) und auf Objektträger (Typ Superfrost) aufgezogen. Die fertigen Schnitte wurden für 2 Stunden bei RT getrocknet. Zur Absättigung der freien Bindungsstellen und zur Minimierung des Hintergrundes wurden die Schnitte für 30 min bei RT mit Image-iT FX Signal Enhancer blockiert. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen/Alexa 555 konjugiert, 1:100 in PBS mit 5% (v/v) FKS) wurde für 1 h bei RT vorgenommen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit ProLong Gold antifade reagent eingedeckelt. Im Falle einer Doppelfärbung (IFN- α /Alveolarmakrophagen; IFN- α /zillierte Epithelien; IFN- β /Alveolarmakrophagen; IFN- β /zillierte Epithelien) erfolgte nach dem dreimaligen Waschen mit PBS und einer nochmaligen Behandlung für 30 min mit dem Image-iT FX Signal Enhancer, die Inkubation mit dem zweiten Erstantikörper (Anti-F4/80 (Alveolarmakrophagen), 1:100 in PBS mit 5% (v/v) FKS; Anti- β -Tubulin IV (zillierte Epithelien),

1:400 in PBS mit 5% (v/v) FKS) bei 4 °C über Nacht. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation für 1 h bei RT mit dem zweiten Sekundärantikörper (Anti-Ratte/Alexa 350 konjugiert, 1:100 in PBS mit 5% (v/v) FKS; Anti-Kaninchen/Alexa 350 konjugiert, 1:100 in PBS mit 5% (v/v) FKS). Nach abschließendem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit ProLong Gold antifade reagent eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte mit Fluoreszenzmikroskopie (Leica) und konfokaler Lasermikroskopie (Leica) bei Verwendung entsprechender Filter zur Anregung der entsprechenden Farbstoffe.

4 Ergebnisse

Die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 sind exklusiv bei den Pneumoviren im Gegensatz zu allen anderen Mitgliedern der *Mononegavirales* vorhanden (Evans *et al.*, 1996). Im Fall von HRSV und BRSV sind diese beiden Proteine bereits als Interferonantagonisten identifiziert worden (Bossert *et al.*, 2003; Spann *et al.*, 2004; Spann *et al.*, 2005). Das PVM-Mausmodell wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Bedeutung von Typ I und Typ III Interferonen für die Pathogenese einer pneumoviralen Infektion zu studieren. Hierzu wurden zunächst mit Hilfe der reversen Genetik rekombinante PVM-Mutanten hergestellt, bei denen die Gene für die NS-Proteine, welche vermutlich als Interferonantagonisten fungieren, deletiert sind.

4.1 Konstruktion von rekombinanten PVM Δ NS-Mutanten

Zur Konstruktion der rekombinanten PVM Δ NS-Mutanten rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 sowie rPVM-GFP7 Δ NS1, rPVM-GFP7 Δ NS2 und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 wurde ein Ansatz gewählt, bei dem zwei unterschiedliche Konstrukte, pPVM1 und pPVM-GFP7, die Basis für die Konstruktion der sechs Mutanten bildeten. Bei dem ersten Konstrukt, pPVM1 (17882 bp, Referenz siehe Abschnitt 3.1.9) befindet sich die komplette cDNA des Genoms des biologischen Wildtypstammes PVM15 (Kreml *et al.*, 2005), unter der Kontrolle des Transkriptionspromotors des T7-Bakteriophagen (Kreml *et al.*, 2007). Diese genomische Sequenz von pPVM1 unterscheidet sich nur durch zwei zusätzlich eingebrachte Restriktionsschnittstellen der Endonukleasen AgeI (Position 4509 nt) und BstBI (Position 8461 nt) von der genomischen Sequenz des biologischen Wildtyps PVM15. Das zweite Konstrukt, pPVM-GFP7 (Referenz siehe Abschnitt 3.1.9), unterscheidet sich vom pPVM1 Plasmid durch eine zusätzliche GFP- (*green fluorescent protein*) Genkassette, welche in die vorhandene AgeI Schnittstelle inseriert wurde (Kreml *et al.*, 2007). Zum besseren Verständnis der nachfolgenden Konstruktionsbeschreibung sind in Abb. 6 die einzelnen Schritte dargestellt. Durch die Verwendung der zwei unterschiedlichen Plasmide wurden die Mutanten sowohl als rPVM Δ NS-Mutanten als auch als rPVM-GFP7 Δ NS-Mutanten hergestellt.

Im ersten Schritt wurde aus dem Plasmid pPVM1 mit den Restriktionsenzymen SmaI (Position 17859 nt) und KpnI (Position 1658 nt) das folgende Fragment herausgeschnitten: T7 Promotor-leader-NS1-NS2-Teil von N (1681 nt). Dieses Fragment enthielt die komplette Sequenz des Transkriptionspromotors des T7-Bakteriophagen (20 nt), die komplette Leadersequenz (43 nt), die komplette Sequenz des NS1-Gens (410 nt), die komplette Sequenz des NS2-Gens (571 nt), eine 621 nt lange Teilsequenz des N-Gens, sowie kurze nichttran-

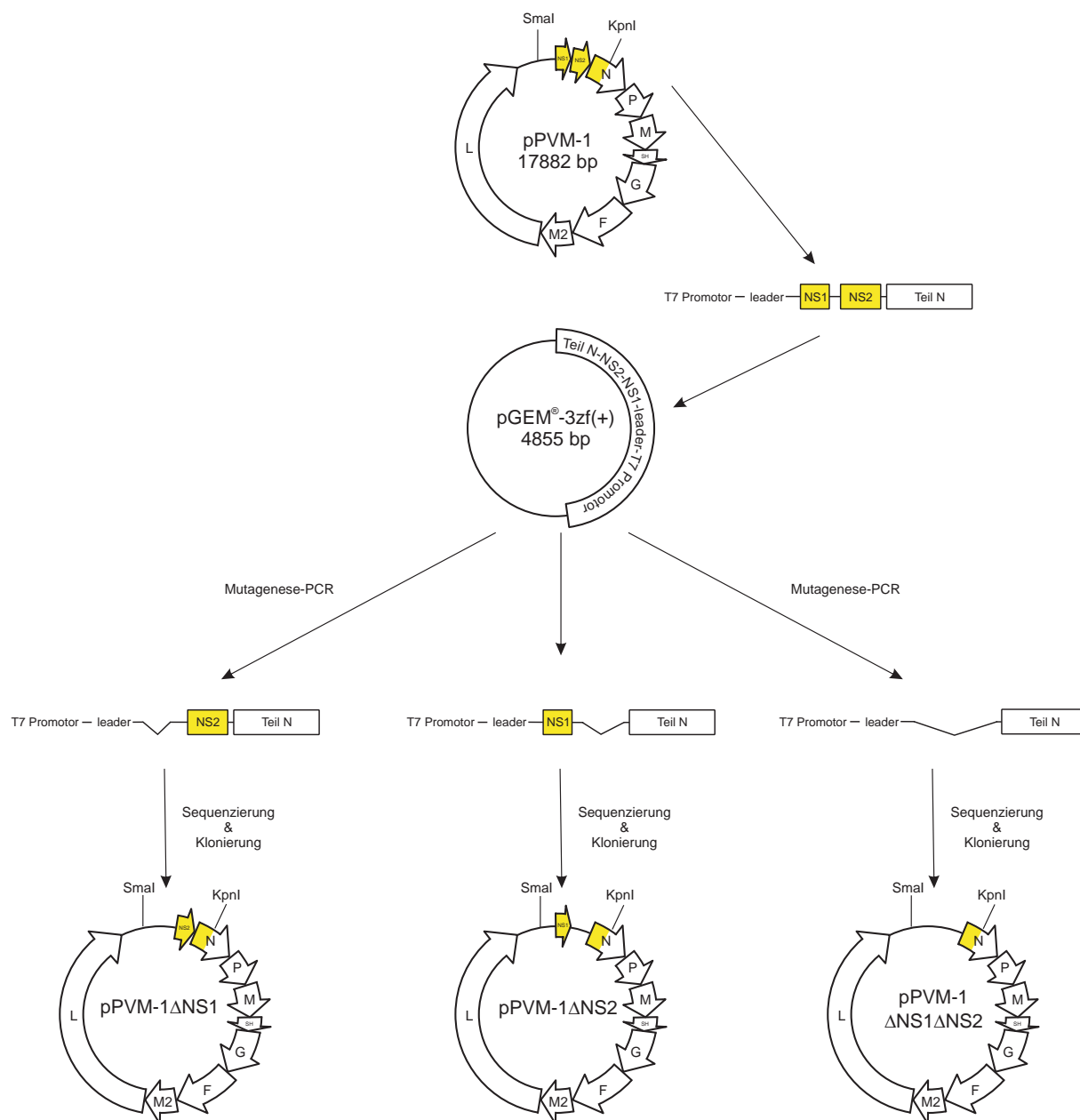


Abbildung 6: Konstruktion von pPVM1 Δ NS1, pPVM1 Δ NS2 und pPVM1 Δ NS1 Δ NS2. Aus dem Ausgangsplasmid pPVM1 wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen SmaI und KpnI das folgende Fragment herausgeschnitten: T7 Promotor-leader-NS1-NS2-Teil von N (1681 nt). Dieses Fragment wurde in den zuvor mit den Restriktionsendonukleasen SmaI und KpnI geschnittenen pGEM[®]-3zf(+) Vektor inseriert. Danach erfolgte eine gerichtete Mutagenese-PCR (Byrappa *et al.*, 1995) mit den in Tab. 8 aufgelisteten Primern (siehe Abschnitt 3.1.7). Nach abschließender Ligation erfolgte die Klonierung über die Restriktionsschnittstellen von SmaI und KpnI zurück in pPVM1. Die Plasmide wurden zur Bestätigung sequenziert.

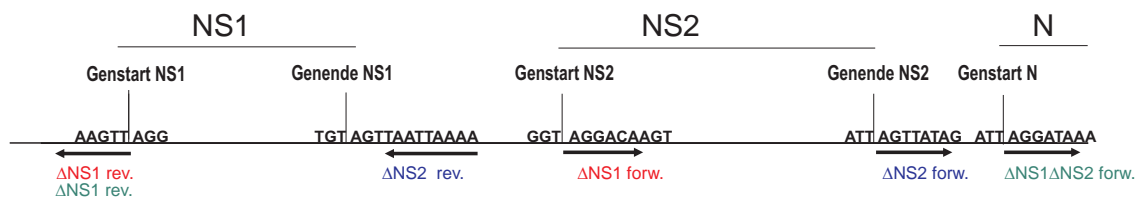


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Primerlokalisierung. Dargestellt ist die Lokalisation der spezifischen Mutagenese-PCR Primer (Primerpaare jeweils durch die gleiche Farbe gekennzeichnet) innerhalb der entsprechenden PVM-Sequenz.

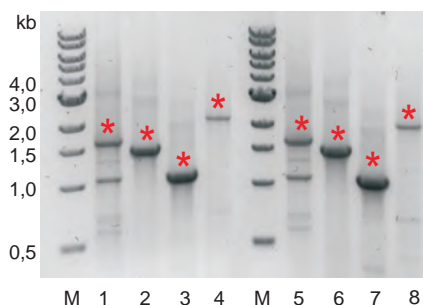


Abbildung 8: RT-PCR zur Überprüfung der Nucleotidsequenz der sechs PVM Δ NS-Mutanten. Zur Überprüfung der Nucleotidsequenzen wurde eine RT-PCR mit den Primern PVM1 *lea2m* forward und PVM N 2013 durchgeführt. M: 1 kb DNA Ladder, Spur 1 rPVM Δ NS1: 1540 bp, Spur 2 rPVM Δ NS2: 1379 bp, Spur 3 rPVM Δ NS1 Δ NS2: 1086 bp, Spur 4 rPVM: 1949 bp, Spur 5 rPVM-GFP7 Δ NS1: 1540 bp, Spur 6 rPVM-GFP7 Δ NS2: 1379 bp, Spur 7 rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2: 1086 bp, Spur 8 rPVM-GFP7: 1949 bp. Die korrekt amplifizierte Fragmente sind in der Abbildung mit einem roten Stern markiert.

skribierte Sequenzfolgen (intergenische Nucleotide) zwischen den einzelnen Genen.

Im zweiten Schritt erfolgte die Insertion des Fragments über die *Sma*I und *Kpn*I Schnittstellen in den Vektor pGEM[®]-3Zf(+) (Vektorkarte siehe Abschnitt 3.1.9, siehe Abb. 5). Nach erfolgreicher Ligation wurde eine gerichtete Mutagenese-PCR (nach Byrappa *et al.* (1995) und Abschnitt 3.3.10) mit spezifischen Primern zur Amplifikation der benötigten Bereiche durchgeführt. Zur besseren Orientierung sind in Abb. 7 die in der Mutagenese-PCR verwendeten Primer (siehe Tab. 8 und Abschnitt 3.1.7) und ihre entsprechende Lokalisation aufgeführt. Durch die Mutagenese wurden die entsprechenden Gensequenzen aus dem Amplifikat entfernt (NS1-Gen, NS2-Gen oder beide Gene). Nach anschließender Ligation erfolgte die Insertion der Sequenzen über die Restriktionsschnittstellen der Endonucleasen *Sma*I und *Kpn*I zurück in das Ausgangsplasmid pPVM1 und zusätzlich in das Plasmid pPVM-GFP7. Die korrekten Sequenzen der sechs Plasmide: pPVM1 Δ NS1, pPVM1 Δ NS2, pPVM1 Δ NS1 Δ NS2, pPVM-GFP7 Δ NS1, pPVM-GFP7 Δ NS2 und pPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 wurden durch eine DNA-Sequenzierung nach Sanger bestätigt (Sanger *et al.*, 1977) (siehe Abschnitt 3.3.11). Die Herstellung der rekombinanten Viren wurde durch Transfektion der entsprechenden Plasmid-DNA und den Support-Plasmiden (siehe Abschnitt 3.4.3), wie bei Krempl *et al.*, 2007 beschrieben, durchgeführt. Die Virusvermehrung

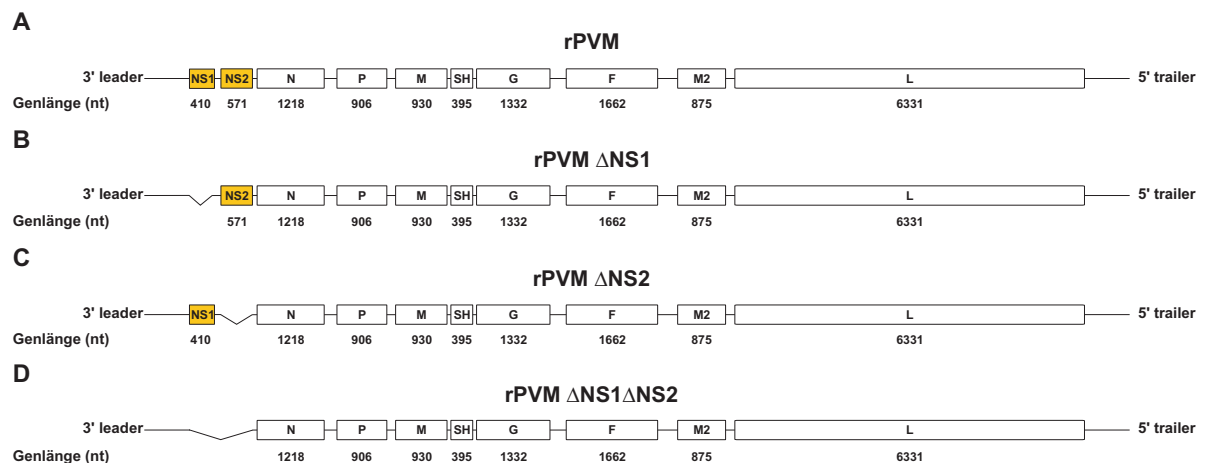


Abbildung 9: Schema der rPVM Δ NS-Mutanten. (A) Dargestellt ist das rPVM Genom ausgehend von der cDNA des Wildtypstammes PVM15, (GenBank accession number: AY729016). (B) zeigt rPVM Δ NS1 mit der Deletion des NS1-Gens (410 nt), (C) rPVM Δ NS2 mit der Deletion des NS2-Gens (571 nt) und (D) rPVM Δ NS1 Δ NS2 mit der Deletion beider NS-Gene.

rung erfolgte wie unter Abschnitt 3.4.3 beschrieben. Zur abschließenden Bestätigung der korrekten Gendeletionen wurden BHK-21-Zellen mit den sechs verschiedenen PVM Δ NS-Mutanten infiziert. Aus den infizierten Zellen wurde gesamtzelluläre-RNA isoliert (siehe Abschnitt 3.3.7). Nach der reversen Transkription mit Random Primern (siehe Abschnitt 3.3.8) erfolgte eine PCR mit den Primern PVM1 lea2m forward und PVM N 2013 (siehe Tabelle 7 und Abschnitt 3.1.7). Abb. 8 zeigt die amplifizierten Fragmente und ihre korrekte Größe. Abb. 9 beschreibt eine schematische Darstellung der rPVM Δ NS-Mutanten mit Deletion des NS1-Gens (410 nt), des NS2-Gens (571 nt) und mit Deletion beider NS-Gene. Eine Sequenzierung bestätigte die Korrektheit der konstruierten rPVM Δ NS-Mutanten.

4.2 *In vitro* Charakterisierung von rPVM Δ NS-Mutanten

4.2.1 Replikationsfähigkeit von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in BHK-21-Zellen

Im Anschluss an die Konstruktion der rPVM Δ NS-Mutanten wurde eine vollständige *in vitro* Charakterisierung durchgeführt. Hierzu wurde zuerst deren Replikationsfähigkeit in BHK-21-Zellen, die nachweislich kein funktionales Interferonsystem haben (Mifune *et al.*, 1970), getestet. Es wurden Wachstumskurven (siehe Abschnitt 3.4.2) im Doppelansatz durchgeführt, wobei die Zellen mit einer MOI von 0,01 PFU/Zelle infiziert wurden. Zellen und Überstände wurden jeweils im 24-Stunden Rhythmus geerntet und der Virustiter wurde über einen Plaquetest (siehe Abschnitt 3.4.1) bestimmt. Tag sieben nach Infektion wurde dabei als Endpunkt des Experiments festgelegt, da zu späteren Zeitpunkten kein er-

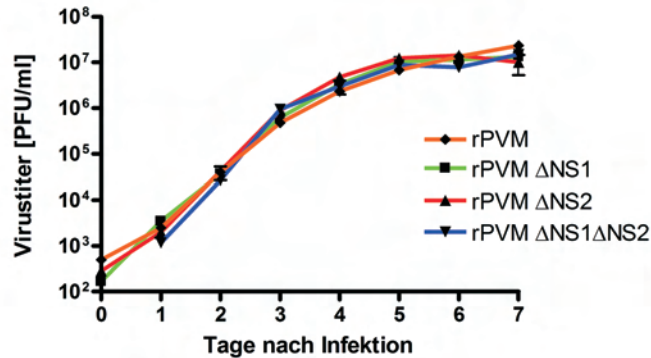


Abbildung 10: Wachstumskurve von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in BHK-21-Zellen. BHK-21-Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 PFU/Zelle infiziert. Zellen und Überstände wurden wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und der Virustiter mittels Plaquetest bestimmt (siehe Abschnitt 3.4.1). In der Graphik sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente sowie die Standardabweichungen (SD) dargestellt.

heblicher Zuwachs der Replikation erwartet wurde. Die Wachstumskurven beschreiben eine nahezu identische Replikation von rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 im Vergleich zum rekombinanten Wildtypvirus (siehe Abb. 10). Die Virustiter aller vier Viren waren zum Endpunkt des Experiments nahezu identisch, wobei ein maximaler Virustiter von $1,3 \times 10^7$ PFU/ml bei rPVM Δ NS1, $1,4 \times 10^7$ PFU/ml bei rPVM Δ NS2, $1,4 \times 10^7$ PFU/ml bei rPVM Δ NS1 Δ NS2 sowie 2×10^7 PFU/ml bei rPVM detektiert wurde. Diese Charakterisierung der Replikationsfähigkeit der rPVM Δ NS-Mutanten in BHK-21-Zellen belegte, dass die Deletion der NS-Gene keine Auswirkung auf die intrinsische Replikationsfähigkeit der Viren hat.

4.2.2 Replikationsfähigkeit von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in Interferon-kompetenten und Interferon-inkompetenten Zellen

Um zu überprüfen, ob es sich bei den NS-Proteinen von PVM um Antagonisten des Interferonsystems handelt, wurde die Replikationsfähigkeit von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in Zellen mit einem intakten Interferonsystem (Interferon-kompetent) sowie in Zellen mit einem defekten Interferonsystem (Interferon-inkompetent) getestet. In Tab. 13 sind alle Zelltypen, die in den nachfolgenden Versuchen benötigt wurden, sowie ihre Merkmale bezüglich Interferon-Kompetenz oder Interferon-Inkompetenz zusammengefasst. Zur Durchführung der nachfolgenden Versuche wurden primäre embryonale Mausfibroblasten (MEFs) aus C57BL/6- und C57BL/6.IFN- α R^{0/0}-Mäusen isoliert. Bei C57BL/6.IFN- α R^{0/0}-Mäusen liegt eine Deletion der IFNAR1 Untereinheit des Typ I Interferonrezeptors (Koerner *et al.*, 2007) vor, sodass diese Tiere bzw. Zellen dieser Tiere nicht mehr auf einen Typ I Interferon-Stimulus reagieren können. Die Durchführung der Wachstumskurven zur

Tabelle 13: Beschreibung der verschiedenen Zelllinien

Spezies	Zelllinie	Typ I Interferon kompetent	Typ III Interferon kompetent
C57BL/6	MEFs	Ja	Ja
C57BL/6	peri. Makrophagen	Ja	Ja
C57BL/6.IFN- α R ^{0/0}	MEFs	Nein	Ja
C57BL/6.IFN- α R ^{0/0}	peri. Makrophagen	Nein	Ja
C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} .IL28R α ^{0/0}	peri. Makrophagen	Nein	Nein
BALB/c	peri. Makrophagen	Ja	Ja
BALB/c	RAW264.7	Ja	Ja

Bestimmung der Replikationsfähigkeit erfolgte wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben.

In Interferon-kompetenten MEFs konnte ein maximaler Virustiter von 2×10^6 PFU/ml an Tag sieben nach Infektion mit rPVM bestimmt werden (siehe Abb. 11 A). Obwohl der Virustiter nach Infektion mit rPVM Δ NS1 über die Zeit (Tag eins bis Tag sieben) stetig anstieg, lag dennoch eine signifikante Reduktion gegenüber einer rPVM Infektion vor, die sich in einem maximalen Unterschied von Faktor 100 am Endpunkt des Experiments (2×10^4 PFU/ml) deutlich dokumentieren ließ. Für rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 ließ sich in C57BL/6-MEFs eine sehr starke Attenuierung, die sich in einer zeitlich verzögerten Virusreplikation (Nachweis erst ab Tag drei möglich) und einer verringerten Replikationsfähigkeit mit einem maximalen Virustiter von 4×10^2 PFU/ml äußerte, beschreiben.

In Interferon-inkompetenten C57BL/6.IFN- α R^{0/0} -MEFs konnte ein Virustiter von 2×10^6 PFU/ml an Tag sieben nach Infektion mit rPVM bestimmt werden (siehe Abb. 11 B). Ein Vergleich zu den Ergebnissen in Interferon-kompetenten MEFs belegt keinen Unterschied im Virustiter am Endpunkt des Experiments. rPVM Δ NS1 erreichte in C57BL/6.-IFN- α R^{0/0} -MEFs ebenfalls einen Virustiter von 2×10^6 PFU/ml sieben Tage nach Infektion. Dabei konnte im Gegensatz zu den Experimenten in Interferon-kompetenten MEFs kein Unterschied im Anstieg des Virustiters zu rPVM beobachtet werden (siehe Abb. 11 A, B). Die zuvor nachgewiesene Attenuierung der Replikationsfähigkeit von rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 in Interferon-kompetenten Zellen konnte in C57BL/6.IFN- α R^{0/0} -MEFs nahezu vollständig rekonstituiert werden, wobei keine nennenswerten Unterschiede im Anstieg der Virustiter im Vergleich zu rPVM und rPVM Δ NS1 verzeichnet werden konnten. Ein Vergleich von rPVM und rPVM Δ NS1 zu rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 beschreibt eine nicht statistisch relevante Reduktion der Virustiter um Faktor fünf sieben Tage nach Infektion. Somit wurde im Vergleich zu den C57BL/6-MEFs in C57BL/6.IFN- α R^{0/0} -MEFs eine ähnliche Replikationsfähigkeit aller drei rPVM Δ NS-Mutanten zu rPVM beschrieben.

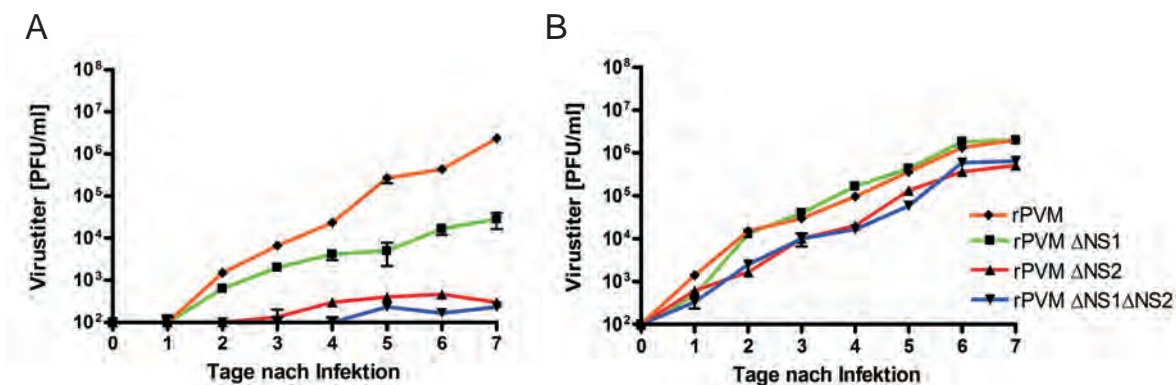


Abbildung 11: Wachstumskurve von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in Interferon-kompetenten C57BL/6- (A) und Interferon-inkompetenten C57BL/6.IFN- α R^{0/0}-MEFs (B). Die Zellen und die Überstände wurden wie unter Abschnitt 3.4.2 beschrieben zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und der Virustiter mittels Plaquetest (siehe Abschnitt 3.4.1) bestimmt. In der Graphik sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente plus Standardabweichung dargestellt.

Zur Bestätigung der vorhandenen Daten, wurde die Replikationsfähigkeit der rPVM Δ NS-Mutanten in weiteren Zelltypen getestet. Hierbei handelt es sich zum einen um die murine Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 (Raschke *et al.*, 1978) und zum anderen um primäre peritoneale Makrophagen, die aus C57BL/6-, C57BL/6.IFN- α R^{0/0}-, C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}- und BALB/c-Mäusen isoliert wurden. Bei C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen liegt eine Deletion der IFNAR1 Untereinheit des Typ I Interferonrezeptors und der IL28R α Untereinheit des Typ III Interferonrezeptors vor (Mordstein *et al.*, 2008). Die Tiere bzw. Zellen dieser Tiere können somit nicht mehr auf einen Typ I und Typ III Interferon-Stimulus reagieren. Bei den RAW264.7-Zellen handelt es sich um Makrophagen aus BALB/c-Mäusen, die mit dem murinen Abelson Leukämievirus transformiert wurden. Die Replikationsfähigkeit der Viren wurde durch die Bestimmung der Virustiter in den Zellüberständen mittels Plaquetest (siehe Abschnitt 3.4.1) ermittelt. In den RAW264.7-Zellen erreichte das rekombinante Wildtypvirus einen Virustiter von $3,3 \times 10^6$ PFU/ml an Tag sieben nach Infektion (siehe Abb. 12 A). Nach Infektion mit rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 konnte in den Zellüberständen der RAW264.7-Zellen mittels Plaquetest (Titration von 1×10^{-1} bis 1×10^{-6}) (siehe Abschnitt 3.4.2; siehe Abb. 12 A) kein Virustiter bestimmt werden. In peritonealen Makrophagen aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen konnte ebenfalls nach Infektion mit den rPVM Δ NS-Mutanten kein Virustiter detektiert werden (siehe Abb. 12 B und C). rPVM weist dagegen einen Virustiter von $1,5 \times 10^4$ PFU/ml am Endpunkt des Experiments in C57BL/6-Makrophagen (siehe Abb. 12 B) und einen um ca. Faktor 30 erhöhten Virustiter von $4,4 \times 10^5$ PFU/ml in BALB/c-Makrophagen (siehe Abb. 12 C) auf. Des Weiteren kann eine relative flache Wachstumskurve und eine zeitliche Verzögerung der Virusreplikation (beginnend erst an Tag drei)

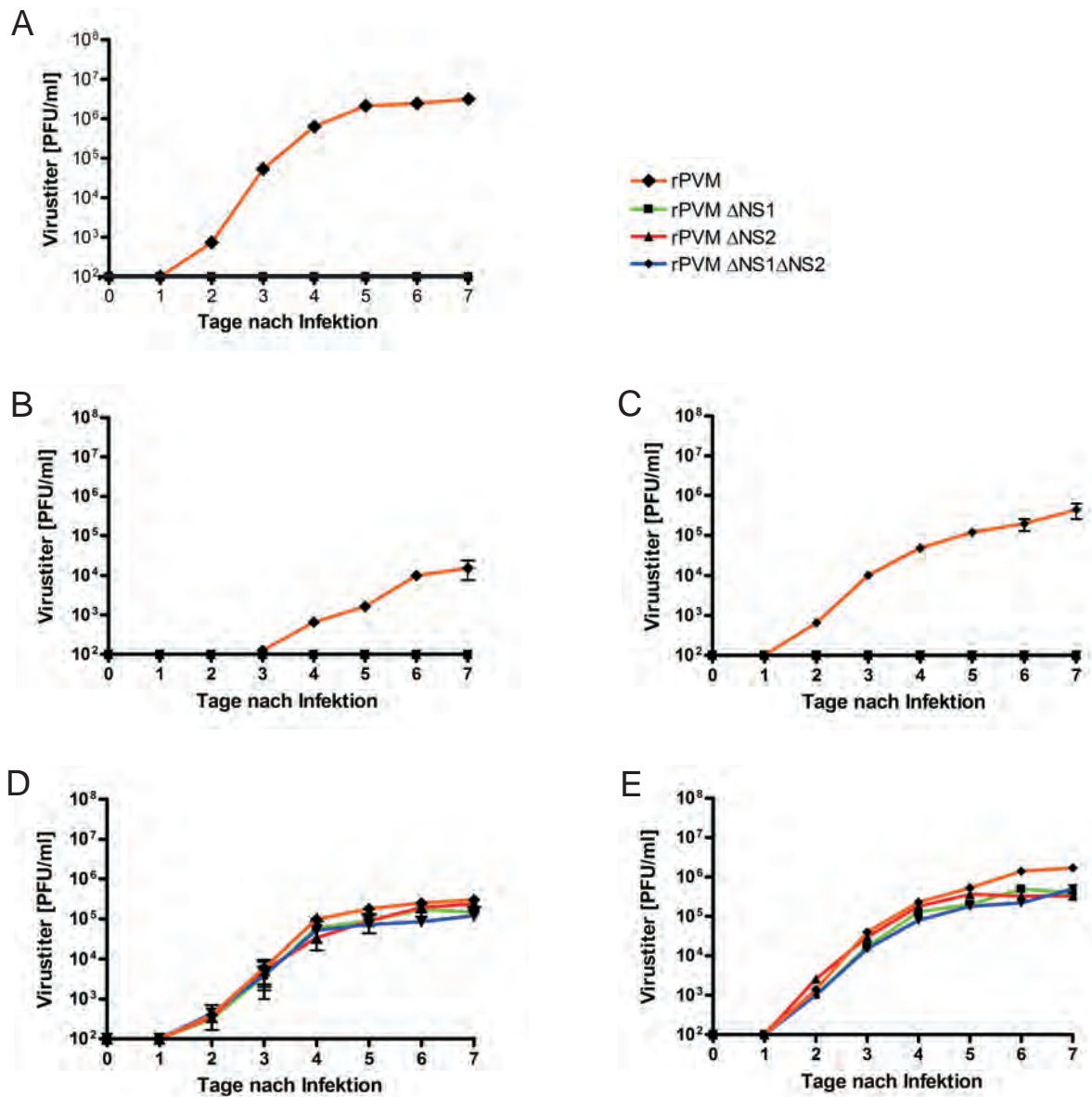


Abbildung 12: Die Replikationskinetik von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in (A) RAW264.7-Zellen und (B) peritonealen Makrophagen aus C57BL/6-, (C) BALB/c-, (D) C57BL/6.IFN- α R^{0/0} - sowie (E) C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0} -Mäusen. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte mittels Plaquetest (siehe Abschnitt 3.4.1). In der Graphiken (A, B, C, D) sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente plus Standardabweichung dargestellt. E zeigt die Mittelwerte eines Experimentes plus Standardabweichung.

von rPVM in den C57BL/6-Makrophagen, im Vergleich zu einer steileren Wachstumskurve und einer Virusreplikation beginnend bereits an Tag eins in den BALB/c-Makrophagen, beschrieben werden. Diese Daten lassen auf mausstammspezifische Replikationsunterschiede schließen.

In C57BL/6.IFN- α R^{0/0}-Makrophagen (siehe Abb. 12 D) zeigten alle rPVM Δ NS-Mutanten einen rPVM ähnlichen Virustiter von ungefähr 2×10^5 PFU/ml an Tag sieben nach Infektion. Der Verlauf der vier Wachstumskurven war dabei nahezu identisch. In C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Makrophagen (siehe Abb. 12 E) konnte nach Infektion mit rPVM und den rPVM Δ NS-Mutanten ein ähnlicher Virustiter von ungefähr 6×10^5 PFU/ml an Tag sieben detektiert werden. Auch in diesem Experiment war der Verlauf der vier Wachstumskurven ähnlich, wohingegen ein sigmoiderer Verlauf im Vergleich zu den Wachstumskurven in C57BL/6.IFN- α R^{0/0}-Makrophagen beschrieben werden konnte (siehe Abb. 12 D, E).

4.2.3 Induktion von Typ I und Typ III Interferon *in vitro*

In den vorher beschriebenen Versuchen konnte eine Replikation von rPVM sowohl in Interferon-kompetenten als auch in Interferon-inkompetenten Zellen gezeigt werden. Dagegen wiesen rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 eine deutliche Attenuierung in Interferon-kompetenten und ein dem rekombinanten Wildtypvirus ähnliches Wachstum in Interferon-inkompetenten Zellen auf. Aufgrund dieser Daten wurde in dieser Dissertation die Typ I und Typ III Interferon-Induktion nach Infektion mit rPVM, rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 in verschiedenen Zellen untersucht. Dazu wurde Interferon-spezifische mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen. Daneben wurde der Nachweis von rPVM spezifischer mRNA (Primer: PVM N 1505, PVM N 2013; Position 1548–2056 nt des PVM Genom; siehe Tabelle 7) als Kontrolle der Infektion und der Nachweis der konstitutiv exprimierten mRNA des Gesamtaktins (Primer: Aktin forward TM 92, Aktin reverse TM 93; siehe Tabelle 7) als Normierungskontrolle gewählt. Für die Experimente wurden MEFs von C57BL/6-Mäusen mit den rekombinanten Viren (MOI von 1 PFU/Zelle) infiziert. 8 h, 16 h, 24 h und 48 h später erfolgte der Nachweis von IFN- α 5, IFN- β und IFN- λ 2/3 Transkripten in den C57BL/6-MEFs (siehe Abb. 13 A). Der Nachweis der Interferon-Induktion erfolgte bei RAW264.7-Zellen (siehe Abb. 13 C) und peritonealen Makrophagen (siehe Abb. 13 B) nach 24 h.

16 h und 24 h nach Infektion mit rPVM Δ NS1 wurde in C57BL/6-MEFs (siehe Abb. 13 A) eine geringe, kaum nachweisbare Induktion von IFN- α 5 belegt. 48 h nach Infektion konnte keine IFN- α 5-Induktion mehr bestimmt werden. Eine schwache Induktion von IFN- α 5 konnte dagegen 16 h und 24 h, eine stärkere Induktion 48 h nach Infektion mit rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 dokumentiert werden. Für rPVM konnte in C57BL/6-MEFs wie

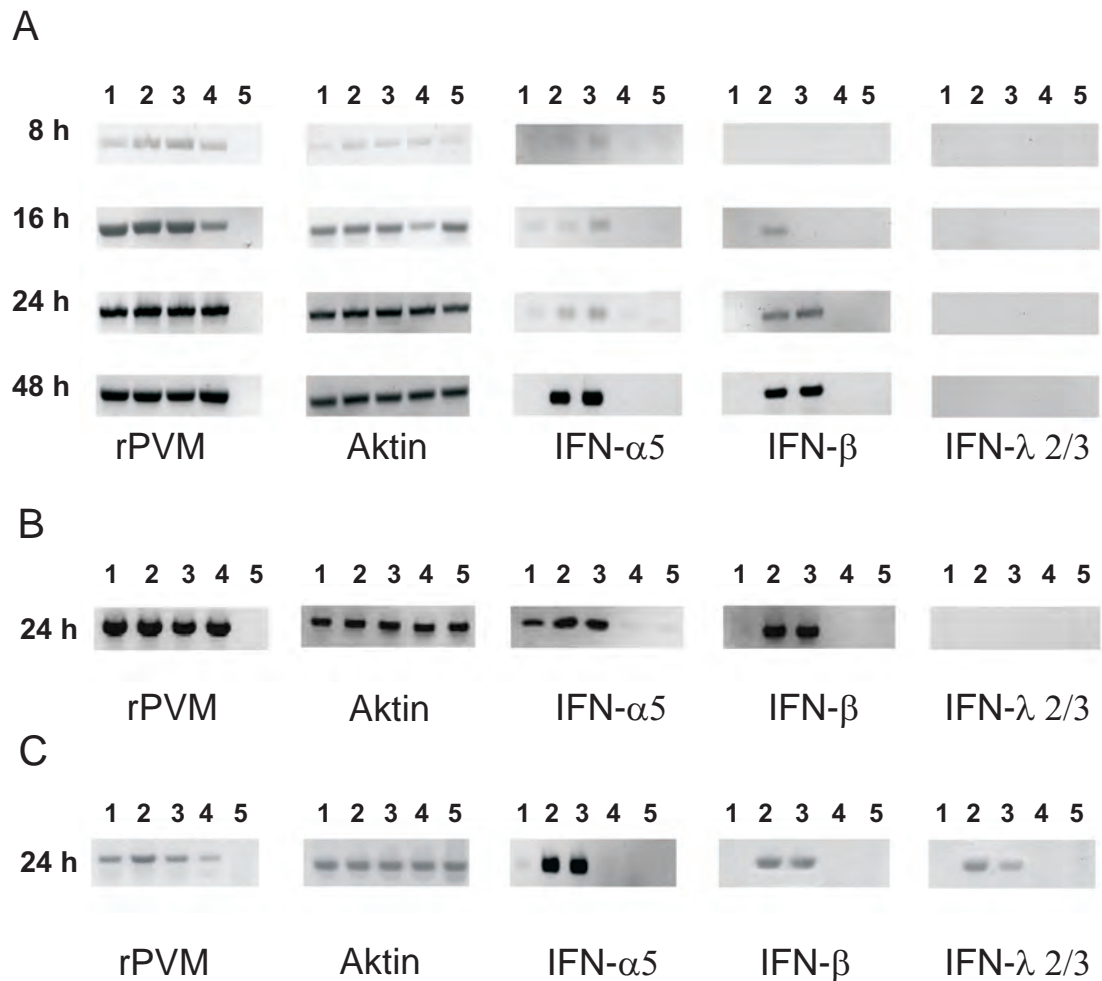


Abbildung 13: Nachweis von Typ I und Typ III Interferon mittels RT-PCR. Embryonale Mausfibroblasten (MEFs) von C57BL/6-Mäusen (A), peritoneale Makrophagen von C57BL/6-Mäusen (B) und RAW264.7-Zellen (C) wurden mit einer MOI von 0,01 PFU/Zelle in 6-well Zellkulturplatten infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und die gesamtzelluläre-RNA isoliert. Zur Synthese eines cDNA-Erststranges aus gesamtzellulärer-RNA wurde 1 μ g RNA eingesetzt. Die cDNA wurde zur Detektion von rPVM, Aktin, IFN- α 5, IFN- β und IFN- λ 2/3 Transkripten mittels RT-PCR eingesetzt. Für alle Abbildungen gilt: Spur 1: rPVM Δ NS1, Spur 2: rPVM Δ NS2, Spur 3: rPVM Δ NS1 Δ NS2, Spur 4: rPVM, Spur 5: Mock.

auch in peritonealen Makrophagen und RAW264.7-Zellen zu keinem Zeitpunkt eine Induktion von IFN- α 5 bestimmt werden (siehe Abb. 13 A, B, C). In RAW264.7-Zellen (siehe Abb. 13 C) wurde eine geringfügige Induktion von IFN- α 5 nach Infektion mit Δ NS1 ersichtlich. In peritonealen Makrophagen (siehe Abb. 13 B) wurde dagegen eine stärkere Induktion von IFN- α 5 im Vergleich zu den Daten der RAW264.7-Zellen und C57BL/6-MEFs ermittelt. IFN- α 5 Transkripte waren ebenso 24 h nach Infektion mit rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 in RAW264.7-Zellen (siehe Abb. 13 C) und peritonealen Makrophagen (siehe Abb. 13 B) nachweisbar.

Eine Induktion von IFN- β konnte zu keinem der gewählten Zeitpunkte nach Infektion mit rPVM Δ NS1 in C57BL/6-MEFs, peritonealen Makrophagen und RAW264.7-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 13 A, B, C). Nach Infektion mit rPVM Δ NS2 wurde 16 h, 24 h und 48 h in C57BL/6-MEFs eine Induktion von IFN- β belegt (siehe Abb. 13 A). Ebenso konnte in peritonealen Makrophagen und RAW264.7-Zellen eine Induktion von IFN- β ermittelt werden (siehe Abb. 13 B, C). Im Fall von rPVM Δ NS1 Δ NS2 konnte eine Induktion von IFN- β 24 h und 48 h nach Infektion in C57BL/6-MEFs und 24 h nach Infektion in peritonealen Makrophagen und RAW264.7-Zellen dokumentiert werden (siehe Abb. 13 B, C). Für rPVM konnte gleichermaßen wie zuvor für IFN- α 5 beschrieben, in allen drei Zelltypen zu keinem der bestimmten Zeitpunkte eine Induktion von IFN- β nachgewiesen werden (siehe Abb. 13 A, B, C).

Eine Detektion von IFN- λ 2/3 Transkripten war nur in den RAW264.7-Zellen nach Infektion mit rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 möglich (siehe Abb. 13 C). Diese beschriebenen Daten deuten auf eine Interferenz der NS-Proteine mit dem Typ I und Typ III Interferonsystem hin.

4.3 *In vivo* Charakterisierung der rPVM Δ NS-Mutanten

4.3.1 C57BL/6.Mx1^{+/+}-Mäuse zeigten keine angeborene Resistenz gegenüber einer rPVM-Infektion

Jean Lindenmann postulierte 1962 erstmals bei Mäusen des Inzuchtstammes A2G eine angeborene Resistenz gegen Influenzaviren (Lindenmann, 1962). Durch verschiedene Kreuzungsexperimente konnte schließlich ein Resistenzgen mit autosomal dominanter Vererbung, das Mx-Gen (myxovirus resistance), nachgewiesen werden (Staeheli *et al.*, 1988). Kommerziell erhältliche Laborstämme und die in dieser Arbeit verwendeten IFN- β ^{+/ Δ β -luc}-Mäuse besitzen eine Deletion der Mx1-Allele (Staeheli *et al.*, 1988). Die zusätzlich verwendeten Mausstämme C57BL/6.IFN- α R^{0/0}, C57BL/6.IL28R α ^{0/0} und C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0} besitzen hingegen funktionale Mx1-Allele. Um in der vorliegenden Dissertation sowohl Mx1^{+/+} als auch Mx1^{-/-} Mausstämme verwenden zu können (siehe Abschnitt

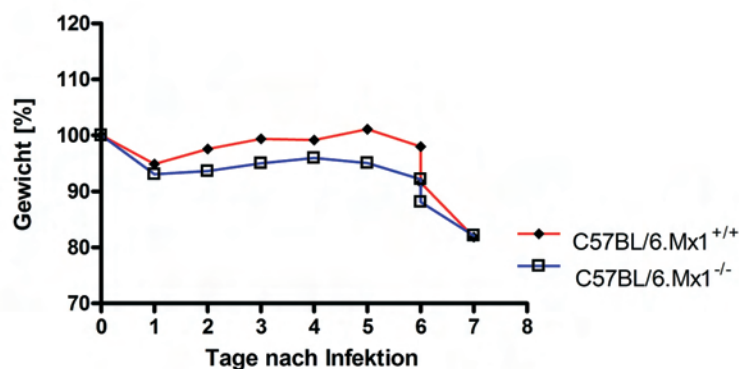


Abbildung 14: C57BL/6.Mx1^{+/+}-Mäuse zeigten keine angeborene Resistenz gegenüber einer rPVM-Infektion. C57BL/6.Mx1^{+/+}- und C57BL/6.Mx1^{-/-}-Mäuse wurden mit 5×10^3 PFU rPVM intranasal infiziert. Das Gewicht und der Gesundheitszustand der Mäuse wurde dabei täglich kontrolliert. In dieser Abbildung sind die Mittelwerte des Körpergewichts als prozentuale Abweichungen ausgehend vom Gewicht an Tag 0 graphisch dargestellt.

3.1.5), wurde zuvor die antivirale Funktion des Mx-Gens innerhalb einer rPVM-Infektion getestet. Hierzu wurden C57BL/6.Mx1^{+/+}-Mäuse und C57BL/6.Mx1^{-/-}-Mäuse intranasal mit einer letalen Dosis von 5×10^3 PFU des rekombinanten Wildtypvirus (rPVM) infiziert. Sowohl für C57BL/6.Mx1^{-/-}-Mäuse als auch C57BL/6.Mx1^{+/+}-Mäuse verlief die Infektion in 100% der Fälle letal (siehe Abb. 14). Eine antivirale Funktion des Mx-Gens bei einer rPVM-Infektion konnte somit ausgeschlossen werden.

4.3.2 Replikation und Virulenz der rekombinanten Viren in Typ I Interferonrezeptor-defizienten Mäusen (C57BL/6.IFN- α R^{0/0})

Aufgrund der zuvor beschriebenen Attenuierung der rPVM Δ NS-Mutanten in Interferonkompetenten Zellen und einer fast vollständigen Rekonstitution der Replikationsfähigkeit in Interferoninkompetenten Zellen (siehe Abschnitt 4.2.2), wurde eine Rekonstitution der Replikationsfähigkeit auch in Typ I Interferonrezeptor-defizienten C57BL/6.IFN- α R^{0/0}-Mäusen erwartet. Für den nachfolgenden Versuch wurden daher C57BL/6.IFN- α R^{0/0}-Mäuse und als Kontrolltiere C57BL/6-Mäuse herangezogen. Diese Mausstämme wurden intranasal mit einer letalen Dosis von 5×10^3 PFU der rekombinanten Viren infiziert. Zur Ermittlung der Virulenz wurde der Gewichtsverlust als Zeichen der Pathogenität im Verlauf der Infektion herangezogen. Hierfür wurde täglich das Gewicht und das klinische Erscheinungsbild der Mäuse (struppiges Fell, schwere Atmung usw.) kontrolliert. Zur Bestimmung der Replikationsfähigkeit der Viren wurden die Mäuse an Tag drei und Tag sieben nach Infektion getötet, die Lungen entnommen, homogenisiert und der Virustiter mittels Plaque-test bestimmt (siehe Abschnitt 3.4.1). Die Gewichtsdaten der C57BL/6-Kontrolltiere nach

Infektion mit den vier rekombinanten Viren sind in Abb. 15 A dargestellt. Alle rPVM infizierten Mäuse wurden aufgrund der starken Krankheitssymptome und dem an Tag fünf beginnenden erheblichen Gewichtsverlust an Tag sieben oder acht getötet. Mäuse infiziert mit rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 zeigten keinen tödlichen Infektionsverlauf und nur im Fall von rPVM Δ NS1 einen vorübergehenden Gewichtsverlust nach Tag sechs bis Tag neun, mit einem Maximum von ungefähr 12% an Tag acht. Bei rPVM infizierten C57BL/6-Mäusen konnte ein mittlerer Virustiter von $3,6 \times 10^4$ PFU/Lunge an Tag drei und $4,8 \times 10^6$ PFU/Lunge an Tag sieben nachgewiesen werden. Nach Infektion mit rPVM Δ NS1 konnte an Tag drei ein mittlerer Virustiter von $1,2 \times 10^4$ PFU/Lunge und an Tag sieben im Gegensatz zum rekombinanten Wildtypvirus ein um ca. Faktor 1000 verringerter Virustiter von $1,5 \times 10^3$ PFU/Lunge detektiert werden. Für rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 konnte an Tag drei ein mittlerer Virustiter von 3×10^2 PFU/Lunge bei 80% der getesteten Mäuse bzw. $1,2 \times 10^2$ PFU/Lunge bei 60% der getesteten Mäuse bestimmt werden. An Tag sieben nach Infektion konnte weder für rPVM Δ NS2 noch für rPVM Δ NS1 Δ NS2 bei einer Nachweisgrenze von 1×10^2 PFU/Lunge ein Virustiter detektiert werden (siehe Abb. 15 B). Aus diesen Daten lässt sich eine starke Attenuierung von rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 und eine schwächere Attenuierung von rPVM Δ NS1 hinsichtlich Virulenz und Replikationsfähigkeit in C57BL/6-Mäusen ableiten. Dieses lässt den Schluss zu, dass es sich sowohl bei dem NS1- als auch bei dem NS2-Protein von PVM um Pathogenitätsfaktoren handelt.

Im zweiten Teil der Experimente wurden C57BL/6.IFN- α R^{0/0} -Mäuse wie zuvor beschrieben infiziert und die Replikation und Pathogenität der rPVM Δ NS-Mutanten wurde anhand der Viruslast bzw. in Form symptomatischer Erkrankung und Gewichtsverlust bestimmt. Der Verlauf des Gewichtsverlustes der C57BL/6.IFN- α R^{0/0} -Mäuse (siehe Abb. 15 C) nach Infektion mit rPVM und den rPVM Δ NS-Mutanten entsprach nahezu dem zuvor beschriebenen Verlauf des Gewichtsverlustes in C57BL/6-Mäusen (siehe Abb. 15 A). Bei Mäusen infiziert mit rPVM Δ NS1 ließ sich ein Gewichtsverlust beginnend nach Tag fünf, mit einem Maximum von ca. 12% an Tag acht, beschreiben. Im Gegensatz dazu konnte nach Infektion mit rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 kein Gewichtsverlust und keine symptomatische Erkrankung beobachtet werden (siehe Abb. 15 C). Mäuse infiziert mit rPVM wurden bis Tag acht nach Infektion aufgrund des Krankheitsverlaufes getötet. Die Virustiter von C57BL/6.IFN- α R^{0/0} -Mäusen nach Infektion mit rPVM waren nahezu identisch mit den zuvor für C57BL/6-Mäusen beschriebenen Daten. An Tag drei nach Infektion konnte ein mittlerer Virustiter von $4,3 \times 10^4$ PFU/Lunge und an Tag sieben ein mittlerer Virustiter von $9,7 \times 10^5$ PFU/Lunge bestimmt werden (siehe Abb. 15 D). Die Virulenz und Replikationsfähigkeit von rPVM scheint somit unabhängig vom Typ I Interferonsystem. Nach Infektion mit rPVM Δ NS2 oder rPVM Δ NS1 Δ NS2 konnte ein dem rekombinan-

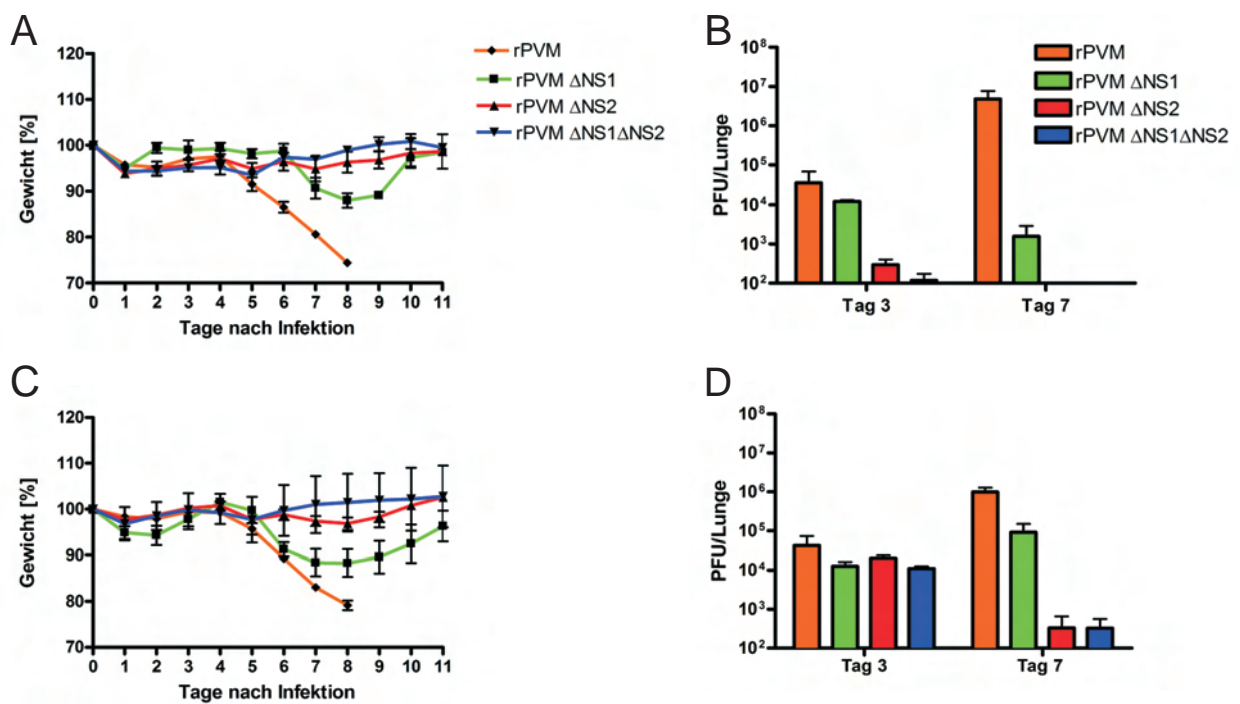


Abbildung 15: Virulenz und Replikation von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in C57BL/6- und C57BL/6.IFN- α R^{0/0}-Mäusen. C57BL/6- (A, B) und C57BL/6.IFN- α R^{0/0}-Mäuse (C, D) wurden mit 5×10^3 PFU rPVM, rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2 oder rPVM Δ NS1 Δ NS2 intranasal infiziert. Pro Gruppe wurden mindestens 5 Versuchstiere eingesetzt. Die Graphen zeigen die Mittelwerte des Körpergewichts ausgehend vom Gewicht an Tag 0 als prozentuale Werte und die entsprechende Standardabweichung pro Gruppe (A, C). Zur Bestimmung der Virusreplikation wurden die Mäuse jeweils an Tag drei und Tag sieben getötet, die Lungen entnommen, homogenisiert und der pulmonale Virustiter mittels Plaquetest bestimmt (B, D) (siehe Abschnitt 3.4.1).

ten Wildtypvirus ähnlicher mittlerer Virustiter an Tag drei ($2,0 \times 10^4$ PFU/Lunge bzw. $1,1 \times 10^4$ PFU/Lunge), jedoch ein um ca. Faktor 3000 reduzierter mittlerer Virustiter an Tag sieben (für beiden rPVM Δ NS-Mutanten: $3,2 \times 10^2$ PFU/Lunge) bestimmt werden. Auch nach Infektion mit rPVM Δ NS1 war an Tag drei ein dem rekombinanten Wildtypvirus ähnlicher Virustiter von $1,2 \times 10^4$ PFU/Lunge vorhanden. An Tag sieben nach Infektion wurde im Vergleich zu rPVM ein um Faktor 10 reduzierter Virustiter von $9,1 \times 10^4$ PFU/Lunge bestimmt (siehe Abb. 15 D). Wie zuvor beschrieben waren die rPVM Δ NS-Mutanten in C57BL/6-Mäusen stark attenuiert hinsichtlich Virulenz und Replikation (siehe Abb. 15 A und B). Diese Attenuierung der rPVM Δ NS-Mutanten konnte im Gegensatz zu den Ergebnisse aus der Zellkultur (siehe Abschnitt 4.2.2) in Mäusen, die kein funktionales Typ I Interferonsystem besitzen, nicht wieder rekonstituiert werden (siehe Abb. 15 C und D).

4.3.3 Nachweis der Induktion von Typ I und Typ III Interferon *in vivo*

Um einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Attenuierung der rPVM Δ NS-Mutanten in C57BL/6- und C57BL/6. $\text{IFN-}\alpha\text{R}^{0/0}$ -Mäusen und der Induktion von Typ I und Typ III Interferon *in vivo* herstellen zu können, wurden sowohl C57BL/6- als auch $\text{IFN-}\beta^{+/\Delta\beta\text{-luc}}$ -Mäuse, bei denen sich das Gen der Firefly-Luziferase unter der Kontrolle des $\text{IFN-}\beta$ Promotors befindet, herangezogen. Um vorab eine Kontrolle über die Sensitivität des eigentlichen *in vivo* Luziferase-Assays zu erhalten, wurde die $\text{IFN-}\beta$ -Induktion nach Infektion mit den rPVM Δ NS-Mutanten *in vitro* getestet. Hierzu wurden embryonale Fibroblasten aus $\text{IFN-}\beta^{+/\Delta\beta\text{-luc}}$ -Mäusen isoliert und mit rPVM sowie den rPVM Δ NS-Mutanten infiziert (MOI von 1 PFU/Zelle). Als Negativkontrolle dienten uninfizierte MEFs aus $\text{IFN-}\beta^{+/\Delta\beta\text{-luc}}$ -Mäusen. 24 h, 48 h und 72 h nach Infektion wurde der Überstand verworfen und die Zellen auf Eis lysiert. Die Lumineszenz wurde als Maß für die Aktivität des Promotors und somit als Menge für $\text{IFN-}\beta$ bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.12).

24 h nach Infektion mit rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 ($2,4 \times 10^3$ RLU bzw. $2,2 \times 10^3$ RLU; RLU: *relative light units*) wurde eine nicht signifikante, geringe Induktion von $\text{IFN-}\beta$ beobachtet. Eine signifikante Induktion von $\text{IFN-}\beta$ konnte 48 h ($2,9 \times 10^4$ RLU bzw. $1,1 \times 10^4$ RLU) und mit Maxima bei 72 h ($9,4 \times 10^4$ RLU bzw. $7,2 \times 10^4$ RLU) nach Infektion gezeigt werden (siehe Abb. 16, gekennzeichnet durch rote Kreise). Im Vergleich dazu konnte 24 h und 48 h nach Infektion mit rPVM Δ NS1 eine nicht signifikante, sehr geringe $\text{IFN-}\beta$ Induktion detektiert werden ($5,4 \times 10^2$ RLU bzw. $1,2 \times 10^3$ RLU, siehe Abb. 16). 72 h nach rPVM Δ NS1 Infektion konnte ein RLU Wert verzeichnet werden, der sich nicht vom Wert der rPVM infizierten MEFs unterscheiden ließ.

Nach diesem Vorversuch wurde die Induktion von $\text{IFN-}\beta$ anhand eines Luziferase-Assays

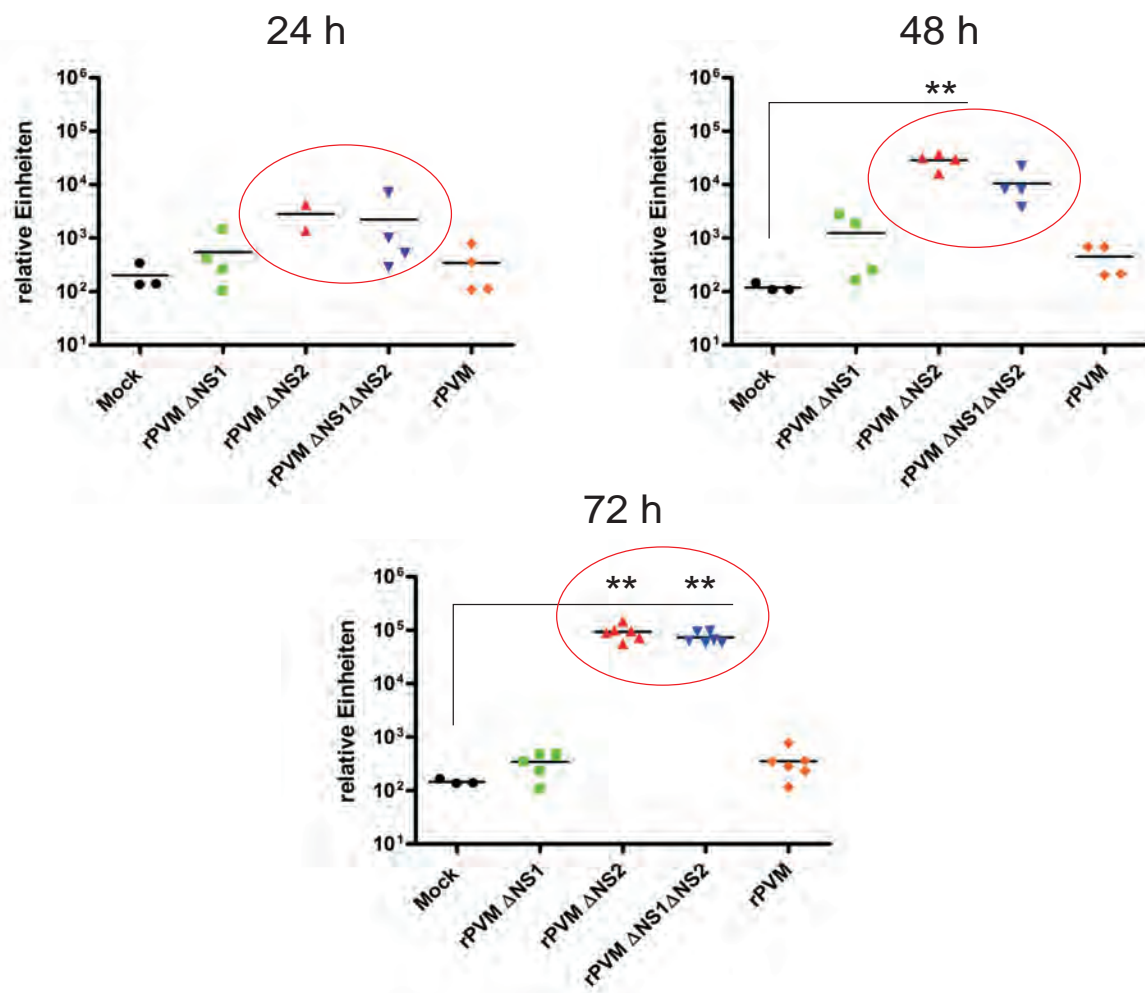


Abbildung 16: Nachweis der Menge an Luziferase als Maß für IFN- β in embryonalen Fibroblasten aus IFN- $\beta^+/\Delta\beta^{-luc}$ -Mäusen. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 1 PFU/Zelle. 24 h, 48 h und 72 h nach Infektion wurde der Überstand verworfen und die Zellen auf Eis lysiert. Pro Versuchsgruppe wurden jeweils 2-6 wells einer Zellkulturplatte im Doppelansatz infiziert. Gruppen die statistisch miteinander verglichen wurden (Dunnett's post Test), sind durch eine Verbindungslinie gekennzeichnet. ** bezeichnet statistisch signifikant hohe Unterschiede (** $0,001 \leq P \leq 0,01$) der jeweiligen Proben zur Kontrolle (Mock). Die in der Abbildung dargestellten roten Kreise kennzeichnen die Datenpunkte für rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 (n=1).

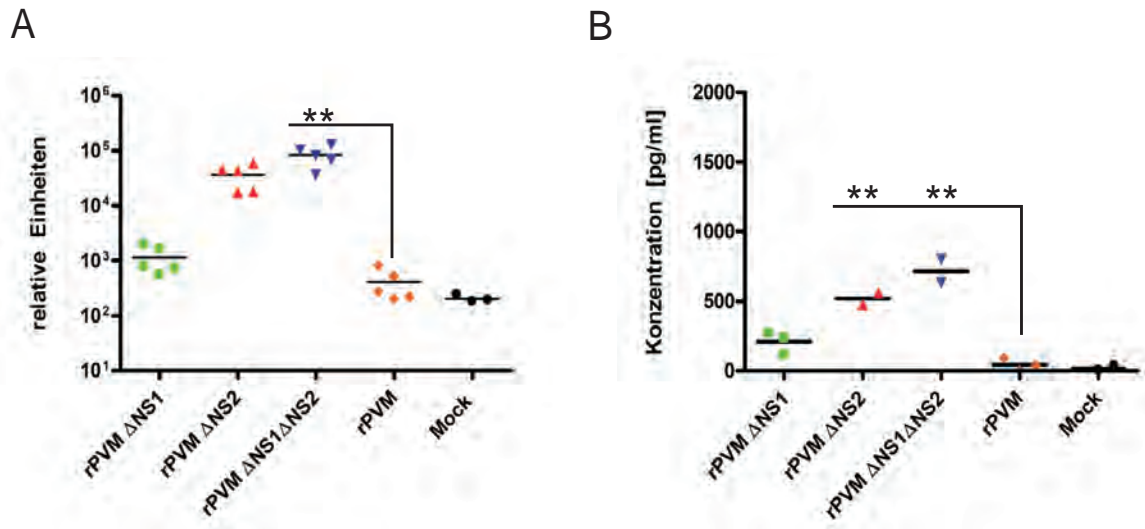


Abbildung 17: Nachweis der Menge an Luziferase als Maß für IFN- β mittels Luziferase-Assay (A) und IFN- α mittels ELISA (B) in IFN- $\beta^{+}/\Delta\beta^{-luc}$ -Mäusen. Zum Nachweis von Typ I Interferon *in vivo* wurden IFN- $\beta^{+}/\Delta\beta^{-luc}$ -Mäuse mit 1×10^5 PFU der rekombinanten rPVM Viren (rPVM, rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2) infiziert. 24 h nach Infektion wurden die Mäuse getötet und die Lungen entnommen. Pro Versuchsgruppe wurden 3-5 Mäuse infiziert. Zur Bestimmung von IFN- α mittels ELISA wurden 2-3 Mäuse herangezogen. Gruppen die statistisch miteinander verglichen wurden (Dunnett's post Test) sind durch eine Verbindungslinie gekennzeichnet. ** bezeichnet statistisch signifikant hohe Unterschiede (** $0,001 \leq P \leq 0,01$) der jeweiligen Proben im Vergleich zu rPVM.

und die Induktion von IFN- α mittel ELISA *in vivo* getestet. Hierzu wurden IFN- $\beta^{+}/\Delta\beta^{-luc}$ -Mäuse mit 1×10^5 PFU der vier rekombinanten Viren intranasal infiziert. 24 h nach Infektion wurden die Mäuse getötet, die Lungen entnommen und homogenisiert. Das gewonnene Lungenhomogenat wurde sowohl zur Bestimmung von IFN- β mittels Lumineszenz als auch zur Bestimmung von IFN- α mittels ELISA herangezogen. Die vorhandenen Daten bestätigten die Ergebnisse, die im Vorversuch mit embryonalen IFN- $\beta^{+}/\Delta\beta^{-luc}$ -Fibroblasten dokumentiert wurden. Wie beschrieben zeigte sich erneut, dass die rPVM Δ NS-Mutanten rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 im Vergleich zu rPVM im Stande sind, die Induktion von IFN- α sowie von IFN- β *in vivo* zu initiieren. Nach Infektion mit rPVM Δ NS1 wurde eine geringe Induktion von IFN- β ($1,1 \times 10^3$ RLU) beschrieben, die im Vergleich zu einer Infektion mit rPVM Δ NS2 ($3,7 \times 10^4$ RLU) um ca. Faktor 33 reduziert war. Für rPVM Δ NS1 Δ NS2 ließ sich eine signifikante Induktion von IFN- β ($8,4 \times 10^4$ RLU) beobachten (siehe Abb. 17 A). Nach Infektion mit rPVM Δ NS1 konnte eine schwache, nicht signifikante Induktion von IFN- α ($2,0 \times 10^2$ pg/ml) bestimmt werden. Für rPVM Δ NS2 ($5,1 \times 10^2$ pg/ml) bzw. rPVM Δ NS1 Δ NS2 ($7,1 \times 10^2$ pg/ml) wurde eine signifikante IFN- α Induktion in den IFN- $\beta^{+}/\Delta\beta^{-luc}$ -Mäusen dokumentiert (siehe Abb. 17 B). Der Nachweis der Typ I Interferon-Induktion wurde sowohl in IFN- $\beta^{+}/\Delta\beta^{-luc}$ -Mäusen als

auch in C57BL/6-Mäusen durchgeführt. Als Grund dafür ist anzuführen, dass alle in dieser Arbeit verwendeten Knockout-Mausstämme, mit Ausnahme der heterozygoten IFN- $\beta^{+/\Delta\beta-luc}$ -Mäuse (Chimäre aus BALB/c-, C57BL/6- und K14Cre-Mäusen; Lienenklaus *et al.*, 2009), einen genetischen Hintergrund des Inzuchtstammes C57BL/6 besitzen. Der Versuch wurde wie zuvor für die IFN- $\beta^{+/\Delta\beta-luc}$ -Mäuse beschrieben durchgeführt.

Die Konzentration an IFN- α sowie die Konzentration an IFN- β wurden mittels ELISA bestimmt (siehe Abb. 18 A). Die Konzentration von IFN- λ konnte aufgrund von unspezifischen Signalen in uninfizierten Lungen nicht mit Hilfe eines kommerziellen ELISAs bestimmt werden. Der Nachweis einer IFN- λ -Induktion erfolgte daher durch RT-PCR (siehe Abb. 18 B). Hierzu wurden die im Anhang aufgeführten Primer für Aktin, rPVM, IFN- $\alpha 5$, IFN- β und IFN- $\lambda 2/3$ eingesetzt und die RT-PCR mit denen in Tabelle 11 (siehe Abschnitt 7) beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Nach Infektion mit rPVM wurde keine Induktion von IFN- $\alpha 5$, IFN- β und IFN- $\lambda 2/3$ mittels RT-PCR und keine Induktion von IFN- α und IFN- β mittels ELISA bestimmt (siehe Abb. 18 A, B). Diese Daten bestätigen die Ergebnisse der RT-PCR Analysen der C57BL/6-MEFs, peritonealen Makrophagen und RAW264.7-Zellen (siehe Abb. 13) sowie die Ergebnisse der IFN- $\beta^{+/\Delta\beta-luc}$ -Mäusen (siehe Abb. 16). Im Fall von rPVM $\Delta NS1$ konnte keine Induktion von IFN- $\alpha 5$ und IFN- β mittels RT-PCR und IFN- α und IFN- β mittels ELISA, sowie keine Induktion von IFN- $\lambda 2/3$ mittels RT-PCR in C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden (siehe Abb. 18). Diese Daten korrelieren nicht mit der schwachen Induktion von IFN- α und IFN- β in IFN- $\beta^{+/\Delta\beta-luc}$ -Mäusen (siehe Abb. 17). Die Ergebnisse könnten somit auf mausstammspezifische Unterschiede in der Induktion von IFN- α und IFN- β nach Infektion mit rPVM $\Delta NS1$ zurückzuführen sein (Seeds *et al.*, 2009).

Für rPVM $\Delta NS2$ und rPVM $\Delta NS1\Delta NS2$ konnte entgegen den Daten für rPVM und rPVM $\Delta NS1$ eine Induktion von IFN- $\alpha 5$, IFN- β und IFN- $\lambda 2/3$ mittels RT-PCR bestimmt werden. Mittels ELISA konnte für rPVM $\Delta NS2$ eine sehr geringe Induktion von IFN- α (62 pg/ml) und eine schwache Induktion von IFN- β (320 pg/ml) gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wurde eine starke, signifikante Induktion beider Interferone (IFN- α : 880 pg/ml; IFN- β : 1267 pg/ml) nach Infektion mit rPVM $\Delta NS1\Delta NS2$ bestimmt (siehe Abb. 18 A). Der Nachweis von IFN- α und IFN- β nach Infektion mit rPVM $\Delta NS2$ und rPVM $\Delta NS1\Delta NS2$ in C57BL/6-Mäusen korreliert mit den zuvor beschriebenen Daten der IFN- $\beta^{+/\Delta\beta-luc}$ -Mäuse.

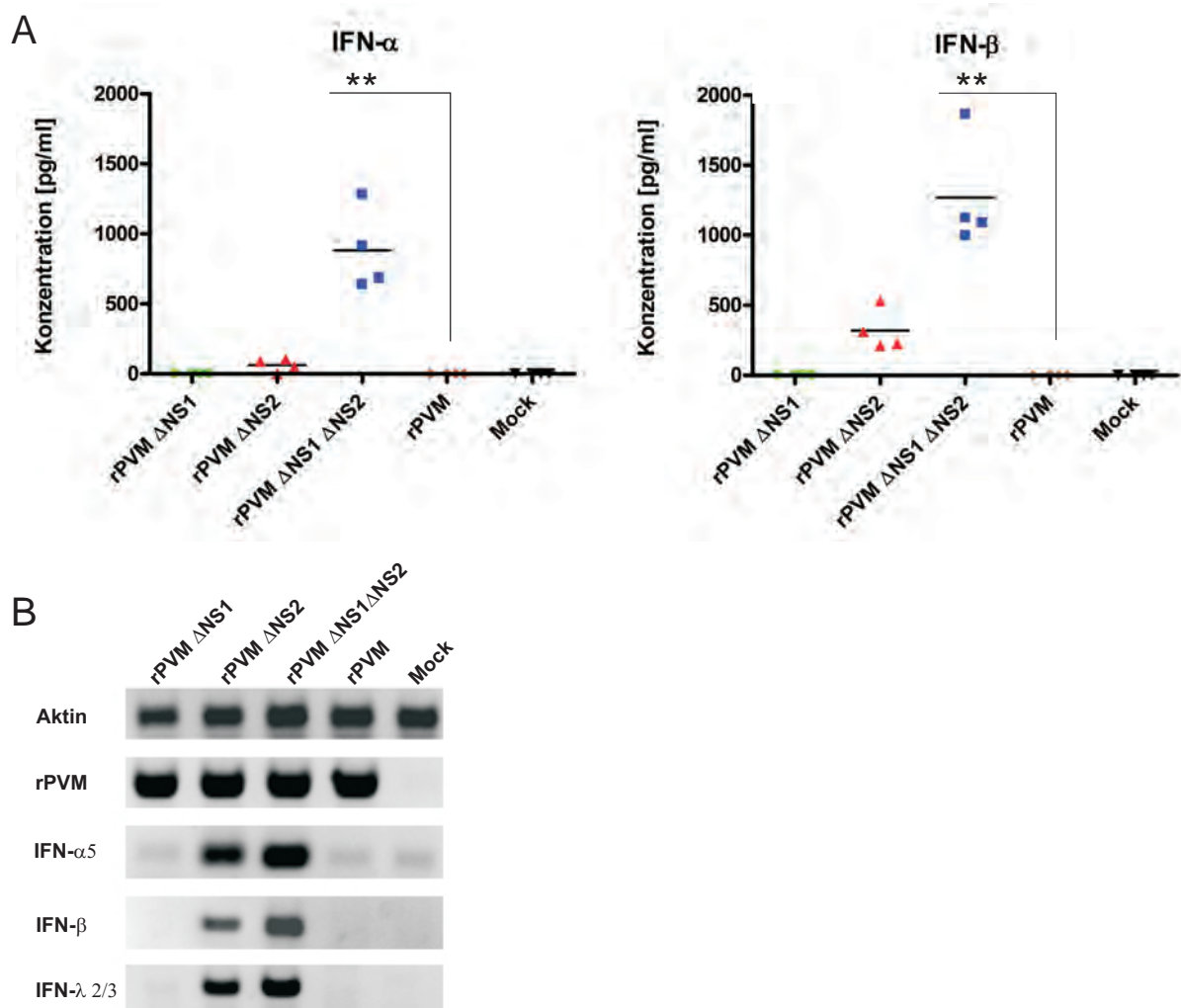


Abbildung 18: Nachweis von Typ I Interferon mittels ELISA (A) sowie Typ I und Typ III Interferon mittels RT-PCR (B). Nach intranasaler Inokulierung von C57BL/6-Mäusen mit 1×10^5 PFU rPVM, rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2, rPVM Δ NS1 Δ NS2 oder PBS als Kontrolle (Mock) wurden diese nach 24 h getötet, die Lunge entnommen und wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben bearbeitet. (A) Die Graphen zeigen die Mittelwerte einer Gruppe ($n = 4$). Alle Gruppen wurden mit dem Dunnett's post Test statistisch miteinander verglichen, wobei sich die durch eine Verbindungslinie gekennzeichneten Gruppen als statistisch signifikant erwiesen haben. ** bezeichnet statistisch signifikant hohe Unterschiede (** $0,001 \leq P \leq 0,01$), wobei die Daten aus einem Experiment dargestellt sind. (B) Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel für den Nachweis von Typ I und Typ III Interferon mittels RT-PCR. Die cDNA wurde zur Detektion von rPVM, Aktin, IFN- α 5, IFN- β und IFN- λ 2/3 Transkripten eingesetzt.

4.3.4 Virulenz und Replikation von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in C57BL/6.IL28R $\alpha^{0/0}$ -Mäuse und C57BL/6.IFN- α R $^{0/0}$.IL28R $\alpha^{0/0}$ -Mäusen

In den nachfolgenden Experimenten wurde die Virulenz und die Replikation von rPVM, rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 sowohl in C57BL/6.IL28R $\alpha^{0/0}$ - (siehe Abb. 19 A, B) als auch in C57BL/6.IFN- α R $^{0/0}$.IL28R $\alpha^{0/0}$ -Mäusen (siehe Abb. 19 C, D) untersucht.

Durch die Verwendung dieser unterschiedlichen Interferonrezeptor-defizienten Knock-out-Mäuse war es möglich, die protektive Rolle der verschiedenen Interferone bei einer natürlichen pulmonalen Infektion zu studieren. Hierfür wurden C57BL/6.IL28R $\alpha^{0/0}$ - und C57BL/6.IFN- α R $^{0/0}$.IL28R $\alpha^{0/0}$ -Mäuse intranasal mit 5×10^3 PFU des jeweiligen Virus infiziert (siehe Abschnitt 3.5.1). Für alle mit rPVM infizierten C57BL/6.IL28R $\alpha^{0/0}$ -Mäuse verlief die Infektion an Tag sechs tödlich. Dabei wurde an Tag drei ein mittlerer Virustiter von $1,8 \times 10^5$ PFU/Lunge und an Tag sieben ein mittlerer Virustiter von $6,1 \times 10^5$ PFU/Lunge detektiert. Nach Infektion mit rPVM Δ NS1 wurde an Tag drei ein dem rekombinanten Wildtypvirus ähnlicher mittlerer Virustiter von $9,6 \times 10^4$ PFU/Lunge und an Tag sieben ein um ca. Faktor 1200 reduzierter mittlerer Virustiter von $5,5 \times 10^2$ PFU/Lunge bestimmt. Bei rPVM Δ NS1 infizierten Mäusen wurde ein Gewichtsverlust beginnend nach Tag sechs, mit einem maximalen Gewichtsverlust von 6% an Tag 7, beobachtet. Für rPVM Δ NS2 wurde ein sehr geringer mittlerer Virustiter von $2,9 \times 10^2$ PFU/Lunge an Tag drei und ein unter der Nachweisgrenze liegender Virustiter an Tag sieben aufgezeichnet. Nach Infektion mit rPVM Δ NS1 Δ NS2 in C57BL/6.IL28R $\alpha^{0/0}$ -Mäusen konnte weder an Tag drei noch an Tag sieben ein Virustiter bestimmt werden. Sowohl nach Infektion mit rPVM Δ NS2 als auch nach Infektion mit rPVM Δ NS1 Δ NS2 konnte kein Gewichtsverlust und keine symptomatische Erkrankung beobachtet werden (siehe Abb. 19 A). Die Ergebnisse dieses Versuchs beschreiben eine starke Attenuierung der rPVM Δ NS-Mutanten in C57BL/6.IL28R $\alpha^{0/0}$ -Mäusen (siehe Abb. 19 A, B), ähnlich den zuvor beschriebenen Ergebnissen der C57BL/6-Mäuse (siehe Abb. 15).

Um das Verhalten der rPVM Δ NS-Mutanten bezüglich Replikation und Virulenz ohne Einfluss von Typ I und Typ III Interferon untersuchen zu können, wurden C57BL/6.IFN- α R $^{0/0}$.IL28R $\alpha^{0/0}$ -Mäuse herangezogen (Mordstein *et al.*, 2008). C57BL/6.IFN- α R $^{0/0}$.IL28R $\alpha^{0/0}$ -Mäuse weisen eine Deletion des Typ I und des Typ III Interferonrezeptors auf. Der nachfolgende Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Peter Stäheli und Dipl. biol. Markus Mordstein, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg durchgeführt, da die C57BL/6.IFN- α R $^{0/0}$.IL28R $\alpha^{0/0}$ -Mäuse zum benötigten Zeitpunkt nur dort zur Verfügung standen. Bei rPVM und rPVM Δ NS1 infizierten Mäusen wurde eine Viruslast von $4,6 \times 10^4$ PFU/Lunge bzw. $4,0 \times 10^4$ PFU/Lunge an Tag drei und $3,3 \times 10^6$

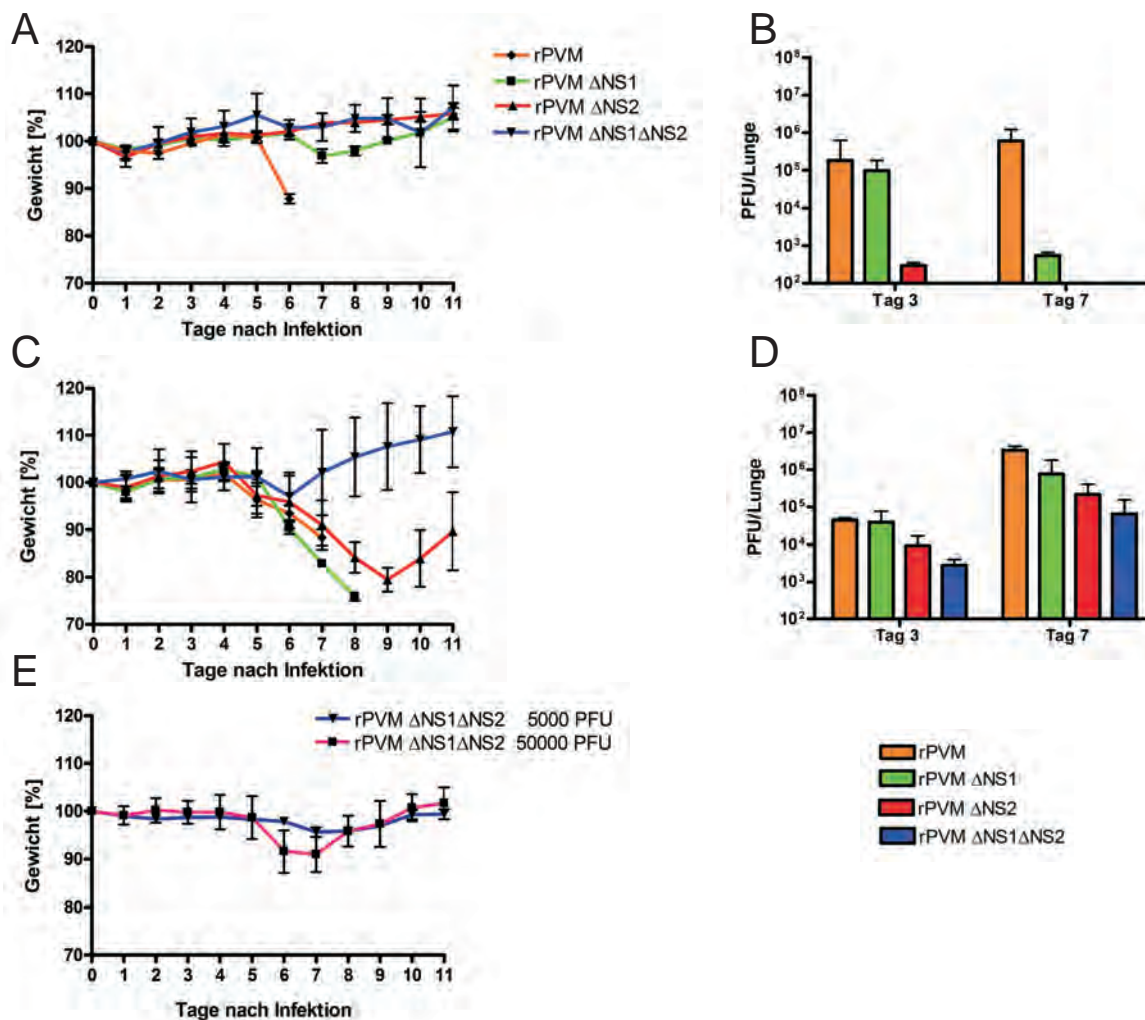


Abbildung 19: Virulenz und Replikation von rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten in *C57BL/6.IL28R $\alpha^{0/0}$* - (A, B) und *C57BL/6.IFN- α R $^{0/0}$.IL28R $\alpha^{0/0}$* -Mäusen (C, D). *C57BL/6.IL28R $\alpha^{0/0}$* - und *C57BL/6.IFN- α R $^{0/0}$.IL28R $\alpha^{0/0}$* -Mäuse wurden intranasal mit 5×10^3 PFU rPVM, rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 infiziert. Pro Gruppe wurden mindestens 5 Versuchstiere eingesetzt. Die Mäuse wurden täglich gewogen und auf auftretende Krankheitsanzeichen hin beobachtet. Die Graphen zeigen die Mittelwerte des Körpergewichts ausgehend vom Gewicht an Tag 0 als prozentuale Werte und die entsprechende Standardabweichung pro Gruppe (A, C). Zur Bestimmung der Virusreplikation wurden die Mäuse jeweils an Tag drei und Tag sieben getötet, die Lungen entnommen, homogenisiert und der pulmonale Virustiter mittels Plaquetest bestimmt (B, D) (siehe Abschnitt 3.4.1). Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Konzentrationen an rPVM Δ NS1 Δ NS2 wurden *C57BL/6.IFN- α R $^{0/0}$.IL28R $\alpha^{0/0}$* -Mäuse intranasal mit 5×10^3 PFU oder 5×10^4 PFU rPVM Δ NS1 Δ NS2 infiziert (E). Der Graph zeigt die Mittelwerte des Körpergewichts ausgehend vom Gewicht an Tag 0 als prozentuale Werte und die entsprechende Standardabweichung pro Gruppe.

PFU/Lunge bzw. $7,7 \times 10^5$ PFU/Lunge an Tag sieben bestimmt (siehe Abb. 19 D). Alle rPVM und rPVM Δ NS1 infizierten Mäuse wurden spätestens bis Tag acht nach Infektion aus ethischen Gründen im Rahmen der Abbruchkriterien eines Tierversuchs getötet. Die Daten beschreiben eine rPVM ähnliche Pathogenität von rPVM Δ NS1 in C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen. rPVM Δ NS2 infizierte Mäuse zeigten beginnend nach Tag vier einen Gewichtsverlust mit einem Maximum von ca. 20% an Tag neun (siehe Abb. 19 C). Dabei ist darauf hinzuweisen, dass alle rPVM Δ NS2 infizierten Tiere den Versuch überlebten. Im Vergleich zu rPVM Δ NS1 wurde nach Infektion mit rPVM Δ NS2 ein um Faktor 4 reduzierter mittlerer Virustiter ($9,4 \times 10^3$ PFU/Lunge) an Tag drei und ein mittlerer Virustiter von $2,2 \times 10^5$ PFU/Lunge an Tag sieben detektiert (siehe Abb. 19 D). Diese Daten beschreiben eine geringere Pathogenität von rPVM Δ NS2 im Vergleich zu rPVM Δ NS1. Für rPVM Δ NS1 Δ NS2 konnte nur ein Gewichtsverlust von maximal 4% bei den infizierten Mäusen beobachtet werden. Im Hinblick auf die Replikationsfähigkeit wurde an Tag drei ein mittlerer Virustiter von $2,7 \times 10^3$ PFU/Lunge und an Tag sieben ein mittlerer Virustiter von $6,5 \times 10^4$ PFU/Lunge bestimmt (siehe Abb. 19 D).

Abb. 19 E beschreibt den Gewichtsverlauf von C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen nach Infektion mit zwei unterschiedlichen Infektionsdosen an rPVM Δ NS1 Δ NS2. Die Daten verdeutlichen, dass auch eine um Faktor 10 erhöhte Virusdosis (5×10^4 PFU statt 5×10^3 PFU) nur zu einem geringen Gewichtsverlust von ca. 10% führt. Ein Vergleich von Replikation und Virulenz zwischen C57BL/6.IL28R α ^{0/0}-Mäusen (siehe Abb. 19 A, B), C57BL/6.IFN- α R^{0/0}-Mäusen (siehe Abb. 15 C, D) und C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen (siehe Abb. 19 C, D) zeigte für C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäuse eine deutlich höhere Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit den rPVM Δ NS-Mutanten. Eine vollständige Aufhebung der Attenuierung konnte jedoch auch in C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen nicht erlangt werden.

4.3.5 Histopathologische Untersuchungen

Um die in den vorhergegangenen Versuchen nachgewiesene gesteigerte Pathogenität der rPVM Δ NS-Mutanten in C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen auch histopathologisch nachweisen zu können, wurden Paraffinschnitte der Lungen angefertigt (siehe Abb. 20). Für diesen Versuch wurden die beiden Mausstämme mit $2,5 \times 10^2$ PFU rPVM und mit jeweils 5×10^4 PFU rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 infiziert, um das unterschiedliche Ausmaß der Attenuierung der jeweiligen Viren zu berücksichtigen. Innerhalb des Versuchs wurden die Mäuse an Tag acht nach Infektion getötet und die Lungen in 4% Formalin fixiert (siehe Abschnitt 3.6.1). Die Herstellung der Paraffinschnitte und die anschließende Hämatoxylin-Eosin-Färbung der

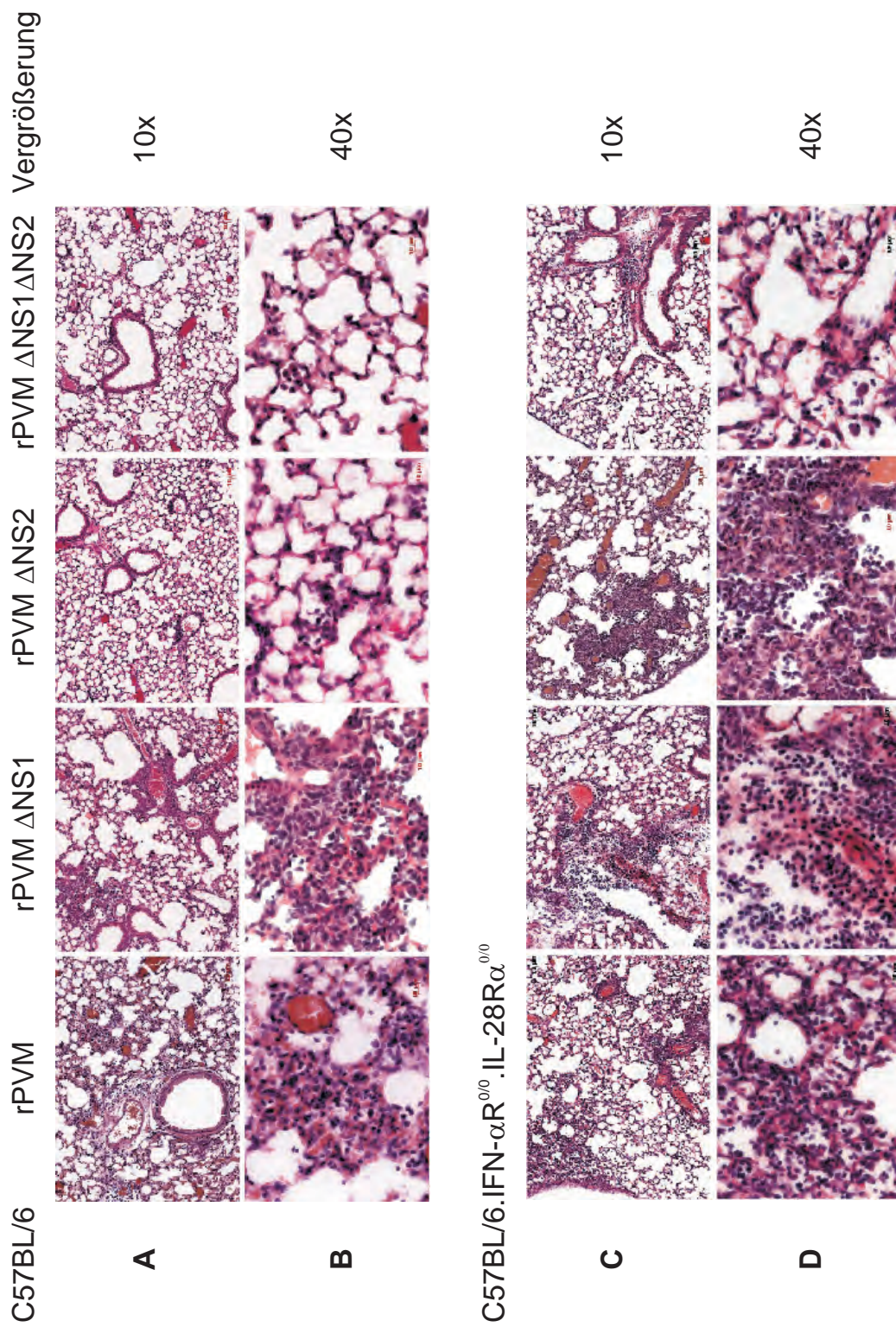


Abbildung 20: Pulmonale Histopathologie von C57BL/6- und C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen nach Infektion mit rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten. Die Abbildungen A und C zeigen eine 10-fache Vergrößerung und die Abbildungen B und D eine 40-fache Vergrößerung. Dargestellt sind die Bilder der Histopathologie (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) von Lungen der C57BL/6- (A, B) und C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäuse (C, D) acht Tage nach Infektion mit $2,5 \times 10^2$ PFU rPVM sowie 5×10^4 PFU rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2. Die Bilder zeigen eine repräsentative Auswahl aller Bilder der histologischen Analysen. Für diesen Versuch wurden 3-4 Tiere pro Mausstamm und Virus eingesetzt.

Präparate (siehe Abschnitt 3.6.1) sowie die pathologische Analyse erfolgte durch Prof. Dr. Annette Schmitt-Graeff, Universitätsklinikum Freiburg.

Wie aus den vorangegangenen Versuchen zu erwarten, ließ sich nach Infektion von C57BL/6-Mäusen mit rPVM und rPVM Δ NS1 eine heterogene ausgeprägte interstitielle Pneumonie mit lymphoplasmatischen Infiltraten sowie sichtbaren Zeichen von Hyperämie (siehe Abb. 20 A, B) beobachten. rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 infizierte C57BL/6-Lungen zeigten keine besonderen pathologischen Auffälligkeiten. In Lungen von C57BL/6. $\text{IFN-}\alpha\text{R}^{0/0}$. $\text{IL28R}\alpha^{0/0}$ -Mäusen konnte ebenso wie in Lungen von C57BL/6-Mäusen nach Infektion mit rPVM eine stark ausgeprägte interstitielle Pneumonie, Zeichen von Nekrose sowie deutliche lymphoplasmatische Infiltrate verzeichnet werden (siehe Abb. 20 C, D). Zusätzlich konnten in den rPVM infizierten Lungen von C57BL/6. $\text{IFN-}\alpha\text{R}^{0/0}$. $\text{IL28R}\alpha^{0/0}$ -Mäusen vereinzelt Neutrophile in den Infiltraten beobachtet werden. In Lungen von rPVM Δ NS2 infizierten C57BL/6. $\text{IFN-}\alpha\text{R}^{0/0}$. $\text{IL28R}\alpha^{0/0}$ zeigte sich jedoch im Gegensatz zu infizierten Lungen von C57BL/6-Mäusen eine Pneumonie mit Infiltraten prädominant bestehend aus Neutrophilen und Lymphozyten (siehe Abb. 20 C, D). In rPVM Δ NS1 Δ NS2 infizierten Lungen von C57BL/6. $\text{IFN-}\alpha\text{R}^{0/0}$. $\text{IL28R}\alpha^{0/0}$ -Mäusen wurde im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Lungen von rPVM Δ NS2 infizierten C57BL/6. $\text{IFN-}\alpha\text{R}^{0/0}$. $\text{IL28R}\alpha^{0/0}$ -Mäusen eher eine milde Pneumonie mit Infiltration von Granulozyten, perivaskulär sowie peribronchiolär beobachtet. In Lungen von rPVM Δ NS1 infizierten C57BL/6. $\text{IFN-}\alpha\text{R}^{0/0}$. $\text{IL28R}\alpha^{0/0}$ -Mäusen wurde eine starke interstitielle Pneumonie verbunden mit deutlichen Anzeichen einer peribronchiolären chronischen Entzündung (ca. 45% des Gewebes) und wenigen Granulozyten sichtbar.

4.3.6 Zytokin-Profil von C57BL/6-Mäusen und C57BL/6. $\text{IFN-}\alpha\text{R}^{0/0}$. $\text{IL28R}\alpha^{0/0}$ -Mäusen während einer Infektion mit rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten

Zusätzlich zur histopathologischen Analyse der rPVM Δ NS-Mutanten und des rekombinanten Wildtypvirus in C57BL/6- und C57BL/6. $\text{IFN-}\alpha\text{R}^{0/0}$. $\text{IL28R}\alpha^{0/0}$ -Mäusen wurden Zytokine des TH1- und TH2-Typs in der Bronchoalveolar Lavage (BAL) bestimmt. Dazu wurden C57BL/6- und C57BL/6. $\text{IFN-}\alpha\text{R}^{0/0}$. $\text{IL28R}\alpha^{0/0}$ -Mäuse mit 5×10^2 PFU rPVM, 5×10^4 PFU rPVM Δ NS2 oder 5×10^4 PFU rPVM Δ NS1 Δ NS2 infiziert. An Tag acht nach Infektion wurden die Mäuse getötet und eine BAL durchgeführt. 50 μ l des BAL-Überstandes wurden in einem Cytometric Bead Array zur Bestimmung folgender Zytokine eingesetzt: $\text{IFN-}\gamma$, MCP-1, IL-6, IL12p70, IL-10 und $\text{TNF-}\alpha$ (siehe Tabelle 14). Die Durchführung dieser Studie erfolgte am Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Freiburg durch Dr. Stefanie Frey.

An Tag acht nach Infektion mit rPVM konnte in beiden Mausstämmen eine gleichmäßig

hohe Produktion der proinflammatorischen Zytokine des TH1-Typs, IL-6, IFN- γ und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) bestimmt werden. Für das Monozyten Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), welches hauptsächlich von Makrophagen produziert wird, konnte nach Infektion mit rPVM in C57BL/6-Mäusen eine Konzentration von 847,5 pg/ml und in C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen eine statistisch relevante Reduktion um das Vierfache (270,6 pg/ml) detektiert werden. Ähnlich reduzierte Konzentrationen an MCP-1 ließen sich auch nach Infektion mit rPVM Δ NS1 Δ NS2 in C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen beschreiben. Diese Ergebnisse korrelieren mit bereits publizierten Daten, in denen eine Typ I Interferon-abhängige Synthese von MCP-1 nach Infektion mit dem Zytomegalievirus der Maus (MZMV) gezeigt wurde (Hokeness *et al.*, 2005).

Nach Infektion mit rPVM Δ NS2 bzw. rPVM Δ NS1 Δ NS2 konnte in der BAL-Flüssigkeit von C57BL/6-Mäusen eine Konzentration von 21,9 pg/ml bzw. 88,6 pg/ml IL-6, 9,7 pg/ml bzw. 21,3 pg/ml IFN- γ und 39,5 pg/ml bzw. 93,1 pg/ml TNF- α nachgewiesen werden. Diese Werte liegen deutlich unter den zuvor bestimmten Werten für eine rPVM-Infektion und lassen sich durch die verringerte Replikationsfähigkeit der rPVM Δ NS-Mutanten in C57BL/6-

Tabelle 14: Expression von Chemokinen und Zytokinen in den Lungen von C57BL/6- und C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen nach Infektion mit rPVM und rPVM Δ NS-Mutanten. Acht Tage nach intranasaler Inokulierung mit rPVM (5×10^2 PFU), rPVM Δ NS2 (5×10^4 PFU) und rPVM Δ NS1 Δ NS2 (5×10^4 PFU) wurden die Mäuse getötet, die Lungen freipräpariert und eine BAL durchgeführt (siehe Abschnitt 3.5.4). Nach der Zentrifugation der BAL-Flüssigkeiten wurde der zellfreie Überstand zur Konzentrationsbestimmung von IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, IFN- γ und TNF- α mittels CBA-Array eingesetzt (siehe Abschnitt 3.5.4). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte in pg/ μ l einer Infektionsgruppe von 5-6 Tieren. Gruppen verschiedener Mausstämme (C57BL/6 und C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}), die sich durch den Tukey-Kramer Test statistisch voneinander unterscheiden, sind wie folgt markiert: * $0,01 \leq P \leq 0,05$, ** $0,001 \leq P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,0001$.

	rPVM	rPVM Δ NS2	rPVM Δ NS1 Δ NS2	
IFN- γ	266,4 \pm 139,5	9,7 \pm 3,3	21,3 \pm 3,7	C57BL/6
	298,9 \pm 192,0	82,5 \pm 82,5	34,8 \pm 32,8	C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} .IL28R α ^{0/0}
MCP-1	847,5 \pm 295,1 ***	65,4 \pm 23,1 *	177,8 \pm 55,5	C57BL/6
	270,6 \pm 112,6	347,6 \pm 130,4	100,4 \pm 36,7	C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} .IL28R α ^{0/0}
IL-6	872,7 \pm 246,7	21,9 \pm 8,4	88,6 \pm 40,3	C57BL/6
	713,5 \pm 467,4	297,9 \pm 40,9	116,7 \pm 73,3	C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} .IL28R α ^{0/0}
IL-12p70	13,4 \pm 12,1	10,5 \pm 7,7	10,7 \pm 10,0	C57BL/6
	20,7 \pm 15,7	10,4 \pm 11,0	10,7 \pm 8,9	C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} .IL28R α ^{0/0}
IL-10	53,8 \pm 34,0	32,2 \pm 17,6	32,8 \pm 11,5	C57BL/6
	29,9 \pm 24,9	30,3 \pm 13,0	68,3 \pm 375,2	C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} .IL28R α ^{0/0}
TNF- α	205,7 \pm 93,9	39,5 \pm 12,8	93,1 \pm 15,4	C57BL/6
	249,1 \pm 163,3	107,8 \pm 22,4	128,0 \pm 44,6	C57BL/6.IFN- α R ^{0/0} .IL28R α ^{0/0}

Mäusen begründen. In den BAL-Überständen von C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen konnte nach Infektion mit den beiden Mutanten eine deutlich erhöhte Menge an IL-6 und TNF- α bestimmt werden. Für rPVM Δ NS2 konnte in den C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen auch eine erhöhte IFN- γ Konzentration beschrieben werden. Die Konzentrationserhöhung der zuvor genannten Zytokine kann auf die gesteigerte Replikation der rPVM Δ NS-Mutanten in C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen zurückgeführt werden. Für IL-12p70 und IL-10 konnten weder mausstamm- noch virusspezifische Unterschiede in der Konzentration gezeigt werden. Die histopathologischen Unterschiede sowie die Unterschiede in der Zytokin-Synthese reflektieren die Replikationseffizienz und Virulenz von rPVM und den rPVM Δ NS-Mutanten in C57BL/6- und C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen.

4.4 Anti-apoptotische Funktion der NS-Proteine von PVM

In den vorangegangenen Versuchen ließ sich eine protektive Rolle von Typ I und Typ III Interferon während einer pulmonalen Infektion mit PVM belegen (siehe Abschnitt 4.3.4). In C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen konnte eine gesteigerte Replikation und Pathogenität von rPVM Δ NS1 und in einem geringeren Ausmaß von rPVM Δ NS2 dokumentiert werden. rPVM Δ NS1 Δ NS2 infizierte C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäuse zeigten überraschenderweise keinen Gewichtsverlust und nur eine geringe Virusreplikation (siehe Abb. 19). Im Hinblick auf diese Versuche ergab sich somit die Frage nach weiteren Funktionen der NS-Proteine, ausgenommen ihrer Rolle als Typ I und Typ III Interferonantagonisten.

Bitko *et al.* (2007) dokumentierten, dass die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 von RSV dafür verantwortlich sind, die frühe Apoptose durch einen Interferon-unabhängigen Mechanismus zu inhibieren. Ob diese für die NS-Proteine von RSV beschriebene Funktion auch für die NS-Proteine von PVM zutrifft, wurde im nachfolgenden Versuch durch den Einsatz eines MitoPT-Assays überprüft. Dieser Test ermöglicht es, Zellen die kein intaktes Transmembranpotential über der inneren Mitochondrienmembran mehr besitzen und bei denen somit die Signaltransduktionswege der Apoptose eingeleitet sind, von intakten Zellen zu unterscheiden. Der Test wurde wie unter Abschnitt 3.4.5 beschrieben durchgeführt, wobei BHK-21-Zellen, die nachweislich kein funktionales Interferonsystem haben, verwendet wurden (Mifune *et al.*, 1970). 16 h nach Infektion konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen einer uninfizierten Negativkontrolle (Mock) und mit rPVM-GFP7 bzw. rPVM-GFP7 Δ NS1 infizierten BHK-21-Zellen bezüglich der relativen Anzahl an Zellen, die ein intaktes Transmembranpotential über der inneren Mitochondrienmembran besitzen (TMRE rot-fluoreszierende Zellen), festgestellt werden (siehe Abb. 21). Im Gegensatz dazu zeigten rPVM-GFP7 Δ NS2 infizierte BHK-21-Zellen eine deutliche Verminderung der Anzahl an Zellen mit intaktem Transmembranpotential. rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierte BHK-21-

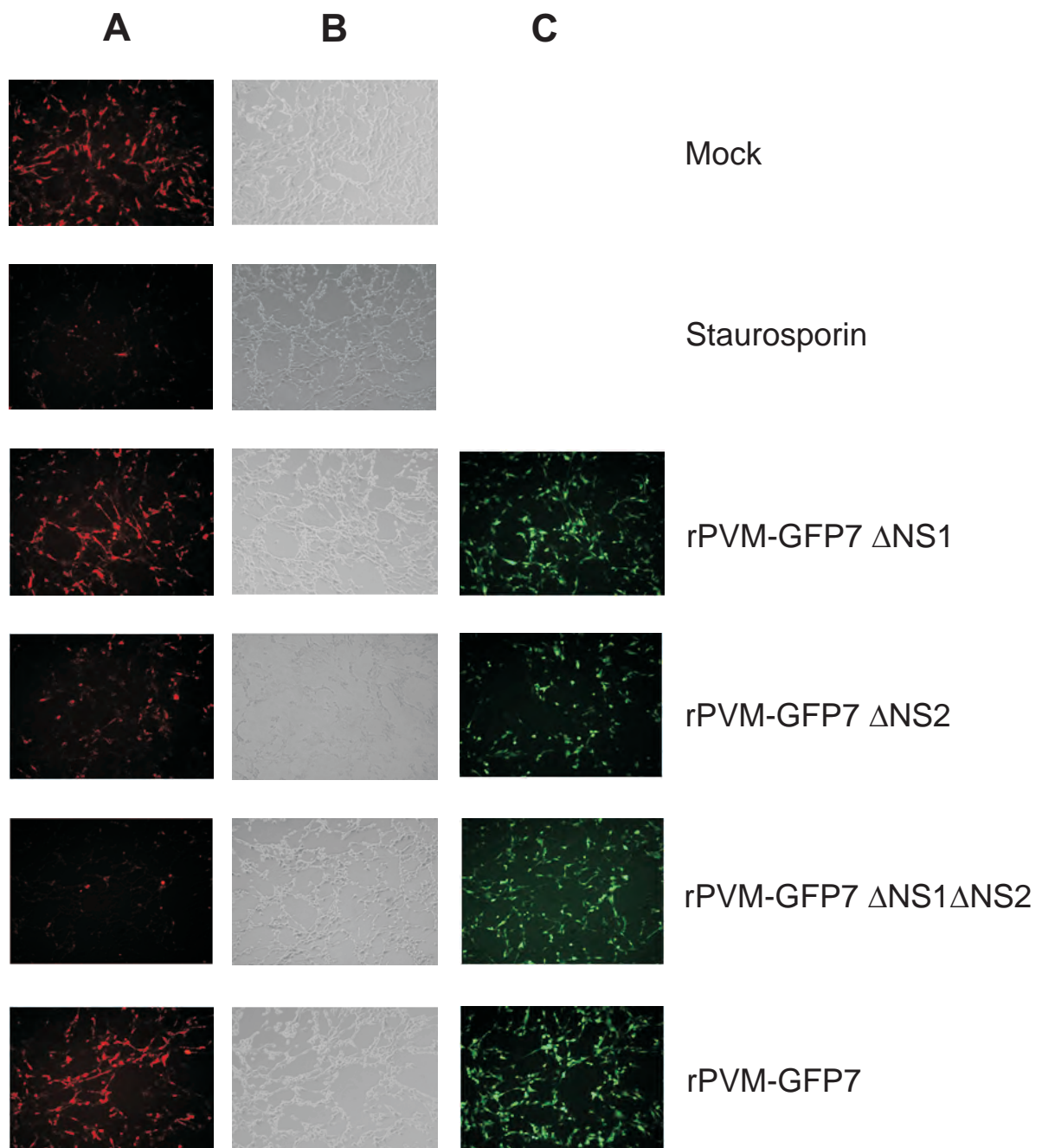


Abbildung 21: MitoPT-Assay 16 h nach Infektion mit den rPVM-GFP7 Δ NS-Mutanten. BHK-21-Zellen wurden mit rPVM-GFP7, rPVM-GFP7 Δ NS1, rPVM-GFP7 Δ NS2, rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 (MOI=3 PFU/Zelle) oder mit PBS als Kontrolle (Mock) infiziert. Als Positivkontrolle wurde Staurosporin verwendet. Die unter A aufgeführten Abbildungen zeigen die mit Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) gefärbten Zellen, die unter B aufgeführten Abbildungen zeigen die jeweiligen Hellfeld-Mikroskopbilder und die unter C dargestellten Abbildungen zeigen die mit dem jeweiligen GFP-Virus infizierten Zellen. Alle Abbildungen zeigen repräsentative Ausschnitte aus zwei unabhängigen Versuchen in einer 10-fachen Vergrößerung.

Zellen waren 16 h nach der Infektion nicht mehr von der Staurosporin-Positivkontrolle zu unterscheiden. Die Verwendung des MitoPT-Assays lieferte innerhalb dieser Dissertation einen ersten Hinweis auf eine anti-apoptotische Funktion der NS-Proteine von PVM. Weiterführende Experimente sind jedoch notwendig, um den genauen Wirkungsmechanismus der einzelnen Proteine innerhalb der Signaltransduktionswege der Apoptose bestimmen zu können.

4.5 Exogenes Typ I Interferon, aber nicht Typ III Interferon, schützt vor einer PVM induzierten Pneumonie

In den nachfolgenden Experimenten wurde die protektive Rolle von exogenem Typ I und Typ III Interferon als Schutz vor einer rPVM induzierten Pneumonie untersucht. Hierzu wurden C57BL/6-Mäuse intranasal mit 10^6 Einheiten/100 μ l IFN- $\alpha/\beta/\omega$ (siehe Abb. 22 A) oder 5 μ g/100 μ l ($ED_{50}=7,5-37,5$ ng/ml) rekombinantes IL-28A/IFN- $\lambda 2$ (siehe Abb. 22 B) vorbehandelt. Acht Stunden nach Injektion wurden die Mäuse mit 5×10^3 PFU rPVM

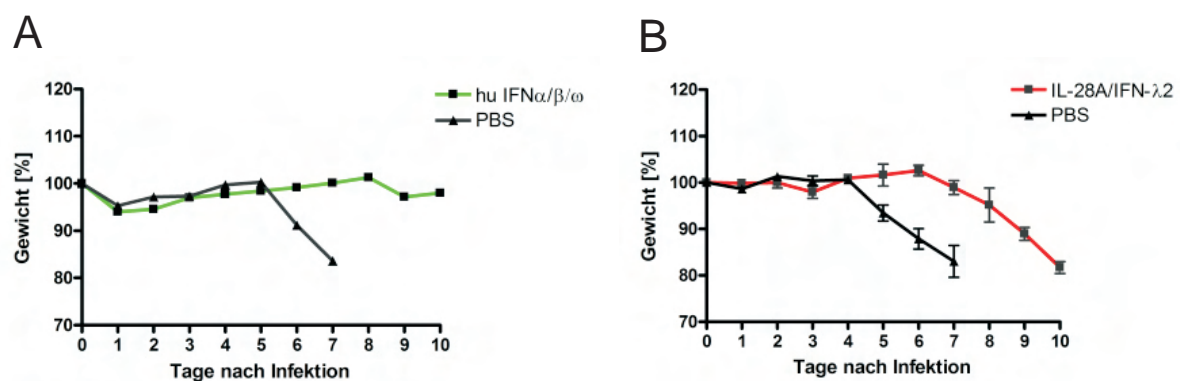


Abbildung 22: Vorbehandlung von C57BL/6-Mäusen mit exogenem Typ I und Typ III Interferon. Je fünf C57BL/6-Mäuse wurden acht Stunden vor Infektion mit rPVM (5×10^3 PFU) mit 1×10^6 Einheiten IFN- $\alpha/\beta/\omega$ (A), 5 μ g rekombinantes IL-28A/IFN- $\lambda 2$ (B) oder 100 μ l PBS intranasal als Kontrolle vorbehandelt. Die Mäuse wurden täglich gewogen und auf auftretende Krankheitsanzeichen hin beobachtet. Der Graph zeigt die Mittelwerte des Körpergewichts als prozentuale Werte ausgehend vom Gewicht an Tag 0 und die entsprechenden Standardabweichungen pro Gruppe.

infiziert. Bei den mit PBS behandelten Kontrolltieren (100 μ l PBS, intranasal) ließ sich in den Versuchen beginnend nach Tag vier bzw. nach Tag fünf ein starker Gewichtsverlust beobachten, wobei für alle Kontrolltiere die Infektion tödlich verlief (siehe Abb. 22 A, B). Im Gegensatz dazu konnte bei keiner der IFN- $\alpha/\beta/\omega$ behandelten Mäuse eine symptomatische Erkrankung oder ein Gewichtsverlust beobachtet werden (siehe Abb. 22 A). Eine protektive Rolle von exogenem Typ I Interferon bei einer PVM Infektion konnte somit belegt werden.

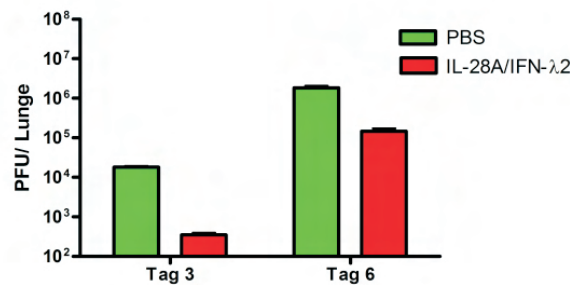


Abbildung 23: Virusreplikation von rPVM in C57BL/6-Mäusen nach Vorbehandlung mit exogenem IL-28A/IFN- λ 2. C57BL/6-Mäuse wurden im Alter von 6-8 Wochen 8 h vor Infektion mit $5 \mu\text{g}$ rekombinantes IL-28A/IFN- λ 2 behandelt und nachfolgend mit 5×10^3 PFU rPVM in $80 \mu\text{l}$ Inokulum intranasal infiziert. Pro Gruppe wurden 5 Versuchstiere eingesetzt. Zur Bestimmung der Virusreplikation wurden die Mäuse jeweils an Tag drei und Tag sechs getötet, die Lungen entnommen, homogenisiert und der pulmonale Virustiter mittels Plaquetest bestimmt (siehe Abschnitt 3.4.1).

C57BL/6-Mäuse, die acht Stunden vor einer Infektion mit $5 \mu\text{g}$ rekombinantes IL-28A/IFN- λ 2 behandelt wurden, zeigten einen im Vergleich zur Kontrollgruppe um zwei Tage verzögerten Gewichtsverlust beginnenden nach Tag sechs. Für alle Mäuse, die mit exogenem IL-28A/IFN- λ 2 vorbehandelt wurden, verlief die Infektion bis Tag zehn tödlich (siehe Abb. 22 B). Um den verzögerten Krankheitsverlauf nach einer Vorbehandlung mit exogenem IL-28A/IFN- λ 2 mit einer möglichen verzögerten Virusreplikation in Verbindung setzen zu können, wurden die Virustiter an Tag drei und Tag sechs nach Infektion mit rPVM bestimmt. An Tag drei wurde ein mittlerer Virustiter von $1,8 \times 10^4$ PFU/Lunge in den Kontrollmäusen im Vergleich zu einem um ca. Faktor 50 reduzierten mittleren Virustiter von $3,5 \times 10^2$ PFU/Lunge in mit exogenem IL-28A/IFN- λ 2 vorbehandelten C57BL/6-Mäusen bestimmt. An Tag sechs nach Infektion konnte ein mittlerer Virustiter von $1,8 \times 10^6$ PFU/Lunge in den Kontrolltieren und ein um ca. Faktor 13 reduzierter mittlerer Virustiter von $1,4 \times 10^5$ PFU/Lunge in den IL-28A/IFN- λ 2 vorbehandelten Mäusen bestimmt werden (siehe Abb. 23).

Ausgehend von diesem Versuch konnte eine verzögerte Replikation von rPVM nach Vorbehandlung mit exogenem IL-28A/IFN- λ 2 gezeigt werden. Im Vergleich zu einer Vorbehandlung mit Typ I Interferon war nach Vorbehandlung mit Typ III Interferon jedoch keine Protektion bei einer rPVM Infektion erkennbar.

4.6 Qualitative Analyse der Typ I Interferon synthetisierenden Zellen *in vitro*

Welche Zellen während einer natürlichen pulmonalen Infektion hauptsächlich Interferone synthetisieren ist bisher nicht bekannt. Die Beantwortung dieser spannenden Frage sollte

mittels Immunhistologie erfolgen. Die rPVM Δ NS-Mutanten wurden zu Beginn dieser Arbeit auch als rPVM-GFP7 Δ NS-Mutanten hergestellt (siehe Abschnitt 4.1), so dass eine Identifikation der infizierten Zellen durch GFP-Expression in Kryoschnitten erfolgen konnte.

Antikörper gegen die murinen Interferone (IFN- α , IFN- β und IFN- λ) sind kommerziell erhältlich und wurden vor der Durchführung der *in vivo* Versuche auf ihre immunhistologische Verwendbarkeit in Zellkultur überprüft. Hierzu wurden RAW264.7-Zellen mit rPVM-GFP7 und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 (MOI=3 PFU/Zelle) infiziert, die Zellen nach 16 h, 24 h und 48 h mittels Paraformaldehydlösung fixiert und eine intrazelluläre Färbung für IFN- α und IFN- β durchgeführt (siehe Abschnitt 3.6.2).

Für IFN- λ war es aufgrund einer sehr starken Hintergrundfärbung in uninfizierten Zellen und durch ein sehr schwaches Signal-Rausch-Verhältnis nicht möglich, IFN- λ produzierende Zellen zu identifizieren. Nach Infektion mit rPVM-GFP7 war es zu keinem der zuvor beschriebenen Zeitpunkte möglich, IFN- α und IFN- β produzierende Zellen nachzuweisen (siehe Abb. 24 A, B). Bei einer Infektion mit rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 konnten sowohl IFN- α als auch IFN- β produzierende Zellen detektiert werden. Diese Daten der indirekten Immunfluoreszenz, unter Verwendung der homogenen Zellpopulation RAW264.7, beschreiben zu allen Zeitpunkten einen überraschenderweise sehr geringen Prozentsatz an IFN- α und IFN- β produzierenden Zellen. Anhand der in Abb. 24 (A, B) dargestellten Immunfluoreszenzbilder lässt sich kein beträchtlicher Unterschied in der Menge an IFN- α produzierenden Zellen im Vergleich zu der Menge an IFN- β produzierenden Zellen erkennen. Zusammenfassend konnte durch dieses *in vitro* Experiment das Vorhandensein einer nur sehr geringen Menge an Typ I Interferon-produzierenden Zellen in einer homogenen Zellpopulation dokumentiert werden.

Bisher wurde in der Literatur beschrieben, dass Interferone als Reaktion auf eine Virusinfektion von Zellen, die mit Virus infiziert wurden, produziert werden. Ihre Wirkungsweise erfolgt sowohl auto- als auch parakrin. Zur Beantwortung der Frage, ob es sich bei den Interferon-produzierenden Zellen um virusinfizierte oder uninfizierte Zellen handelt, wurden einzelne, durch indirekte Immunfluoreszenz positive gefärbte Interferon-produzierende Zellen in einer höheren Vergrößerung ausgewertet. In dieser 40-fachen Vergrößerung war es deutlicher möglich virusinfizierte als auch uninfizierte Zellen (ohne erkennbare GFP-Expression) als Interferon-Produzenten zu identifizieren. Die dargelegten Ergebnisse identifizieren eindeutig sowohl virusinfizierte (siehe Abb. 25 A und Abb. 25 C) als auch uninfizierte Zellen (siehe Abb. 25 B und Abb. 25 D) als IFN- α und IFN- β Produzenten. Diese beschriebenen Daten belegen, dass sowohl der eingesetzte IFN- α Antikörper als auch der IFN- β Antikörper zum spezifischen Nachweis der jeweiligen Interferone *in vitro* eingesetzt werden konnte.

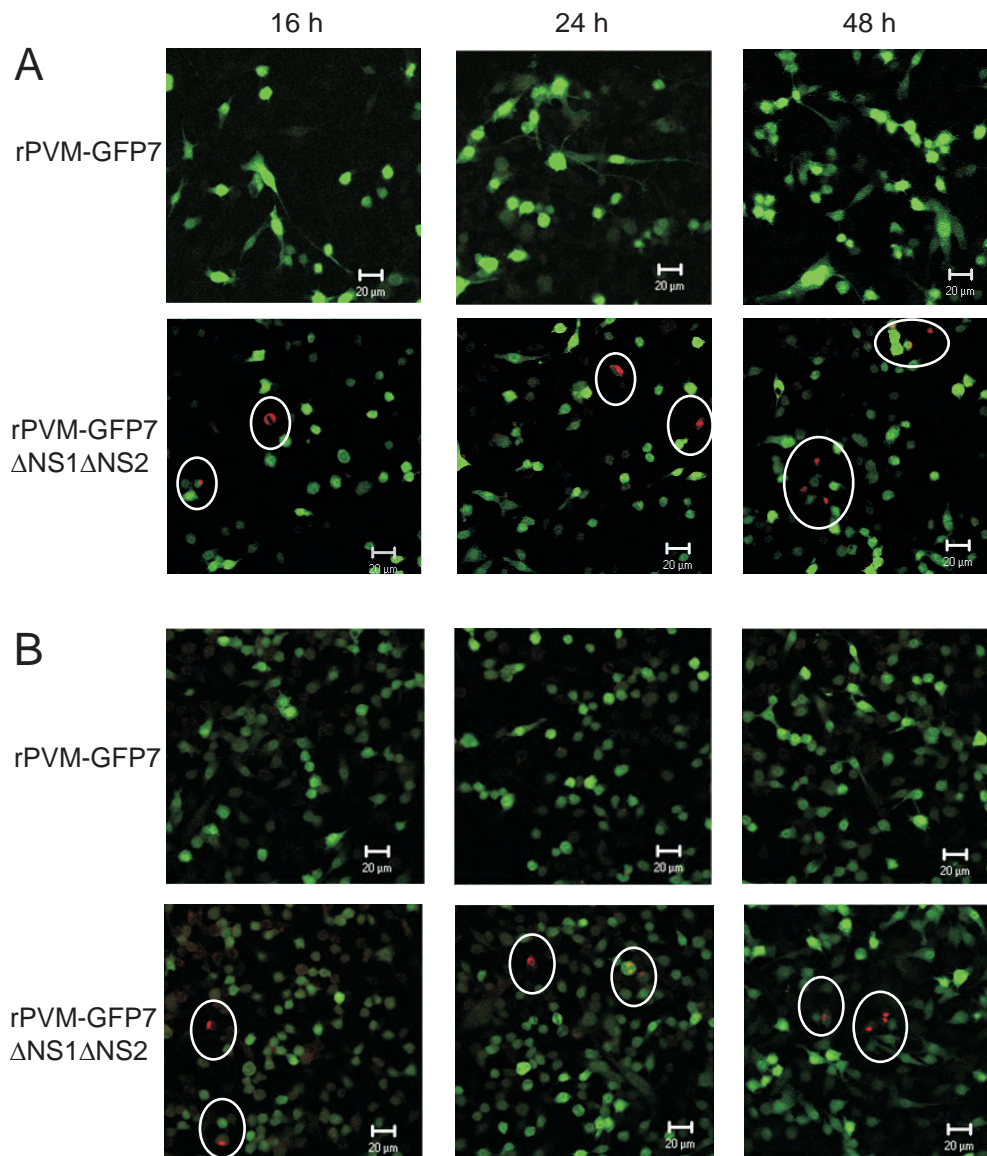


Abbildung 24: Nachweis von IFN- α und IFN- β produzierenden Zellen in einer homogenen Zellpopulation. RAW264.7-Zellen wurden mit rPVM-GFP7 und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 (MOI=3 PFU/Zelle) infiziert und 16 h, 24 h und 48 h später mit einer Paraformaldehydlösung fixiert. Die intrazelluläre Färbung für IFN- α (A, rote Fluoreszenz) und IFN- β (B, rote Fluoreszenz) wurde mit primären Antikörpern gegen IFN- α und IFN- β wie unter Abschnitt 3.6.2 beschrieben durchgeführt. Die Identifikation der rPVM-GFP7 und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierten Zellen erfolgte über die Expression von GFP (grüne Fluoreszenz). Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte der indirekten Immunfluoreszenzanalyse. Die in der Abbildung dargestellten weißen Kreise kennzeichnen die Lokalisation einzelner IFN- α (A) und IFN- β (B) produzierender Zellen. Alle Abbildungen zeigen Ausschnitte von zwei unabhängigen Versuchen.

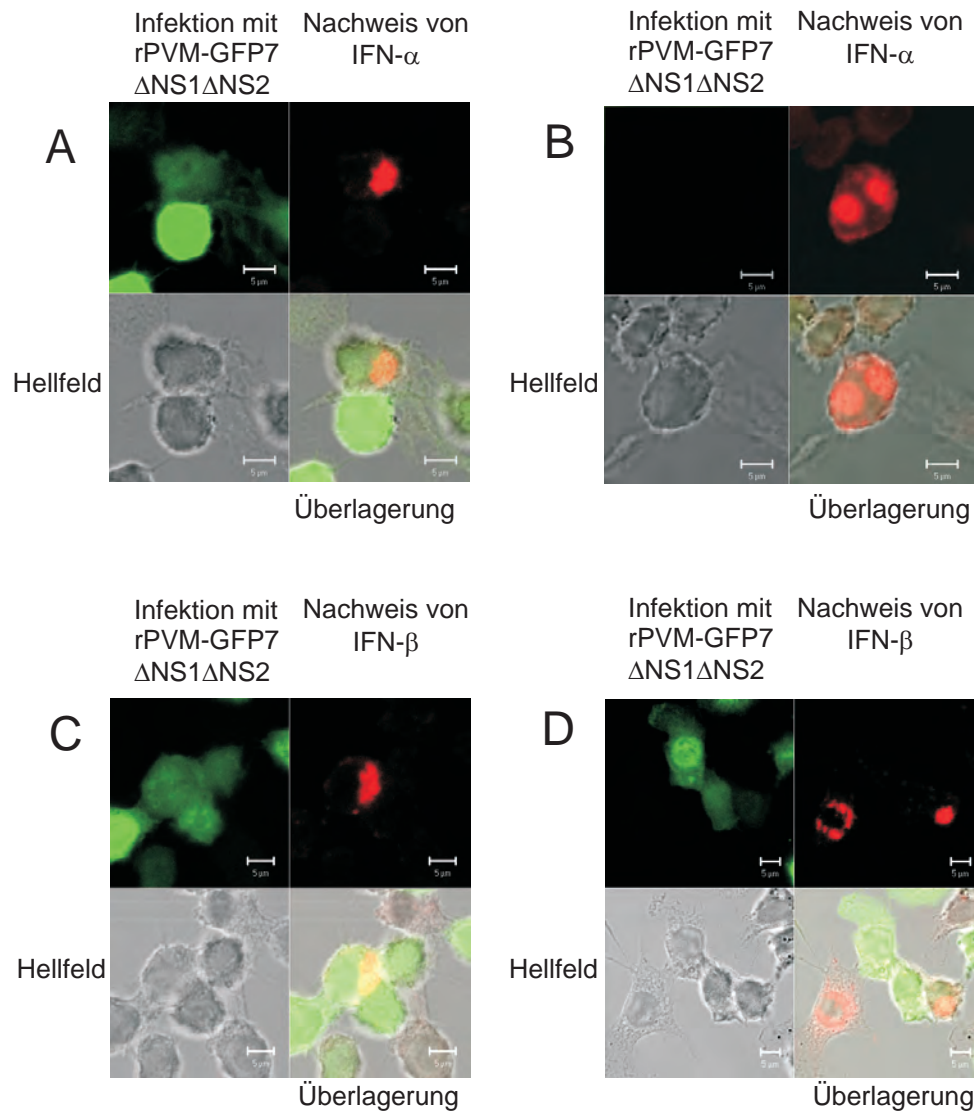


Abbildung 25: Sowohl virusinfizierte als auch uninfizierte Zellen produzieren IFN- α und IFN- β in einer homogenen Zellpopulation. RAW264.7-Zellen wurden mit rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 (MOI=3 PFU/Zelle) infiziert. Die intrazelluläre Färbung für IFN- α (A, B) und IFN- β (C, D) (rote Fluoreszenz) wurde mit primären Antikörpern gegen IFN- α und IFN- β wie unter Abschnitt 3.6.2 beschrieben durchgeführt. Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte von zwei separaten Experimenten. (A) Exemplarische Darstellung für die Produktion von IFN- α durch rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierte Zellen. (B) Exemplarische Darstellung für die Produktion von IFN- α in Zellen, die keine Expression von GFP aufweisen. (C) Exemplarische Darstellung für die Produktion von IFN- β durch rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierte Zellen. (D) Exemplarische Darstellung für die Produktion von IFN- β in Zellen, die keine Expression von GFP aufweisen.

4.7 Analyse von Typ I Interferon synthetisierenden Zellen *in vivo*

Welche Zelltypen Interferone während einer Infektion mit Pneumoviren synthetisieren ist nicht bekannt. Die Identifikation der Interferon-produzierenden Zelltypen mittels intrazellulärer Färbung konnte nicht durchgeführt werden, da die verwendeten IFN- α - und IFN- β -Antikörper einen hohen unspezifischen Hintergrund im Gefrierschnitt aufweisen und daher für intrazelluläre Färbungen im Gewebe nicht geeignet sind. Somit war es in dieser Arbeit leider nicht möglich, unterschiedliche Zelltypen wie z.B. Immunzellen oder Gewebezellen mittels histologischer Analysen als Interferon-Produzenten zu identifizieren (Delhaye *et al.*, 2006). Durch die Modifikation der Methode nach Sas *et al.* (2008) sollte dennoch der Nachweis von IFN- α und IFN- β im Gewebe versucht werden .

Im nachfolgenden Experiment wurden C57BL/6-Mäuse intranasal mit 1×10^5 PFU rPVM-GFP7, rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 oder als Kontrolle mit PBS (Mock) infiziert. 24 h nach Infektion erfolgte eine intranasale Injektion mit einem primären Antikörper gegen IFN- α oder IFN- β (siehe Abschnitt 3.6.3). Nach weiteren 24 h wurden die Mäuse getötet, die Lungen entnommen, Gefrierschnitte angefertigt und die anschließende immunhistologische Färbung von rezeptorgebundenen IFN- α und IFN- β wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben durchgeführt. In Kontrollmäusen (Mock) und in rPVM-GFP7 infizierten Mäusen konnten keine IFN- α - und IFN- β -Signale detektiert werden (siehe Abb. 26 A, B und Abb. 27 A, B). In rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierten C57BL/6-Mäusen war es möglich, spezifisch IFN- α und IFN- β zu detektieren (siehe Abb. 26 C-F und Abb. 27 C-F). Dabei konnten IFN- α und IFN- β im Bronchiolusepithel (siehe Abb. 26 C, D und Abb. 27 C, D) und im Parenchym (siehe Abb. 26 E, F und Abb. 27 E, F) an Zellen gebunden detektiert werden. Diese repräsentativen Ausschnitte beschreiben eine Lokalisation der IFN- α - und IFN- β -Signale sowohl an virusinfizierten (in der Überlagerung gelblich in Abb. 26 und Abb. 27) als auch an uninfizierten Zellen.

Um zu bestätigen, dass der Nachweis des an Zellen gebundenen Interferons spezifisch war, wurden exemplarisch für IFN- α Lungen von zuvor mit rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierten C57BL/6. $\text{IFN-}\alpha\text{R}^{0/0}.\text{IL28R}\alpha^{0/0}$ -Mäusen immunhistologisch gefärbt. C57BL/6-Mäuse wurden in diesem Versuch als Kontrollmäuse herangezogen (Abbildungen nicht dargestellt; Daten wie in Abb. 26). Wie erwartet konnte in C57BL/6. $\text{IFN-}\alpha\text{R}^{0/0}.\text{IL28R}\alpha^{0/0}$ -Mäusen, die eine Deletion des Typ I und des Typ III Interferonrezeptors besitzen, kein IFN- α nach Infektion mit rPVM-GFP7 (siehe Abb. 28 A), rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 (siehe Abb. 28 C, D) und Mock (siehe Abb. 28 B) detektiert werden. In C57BL/6-Kontrollmäusen konnte dagegen nach Infektion mit rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 eindeutig IFN- α detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

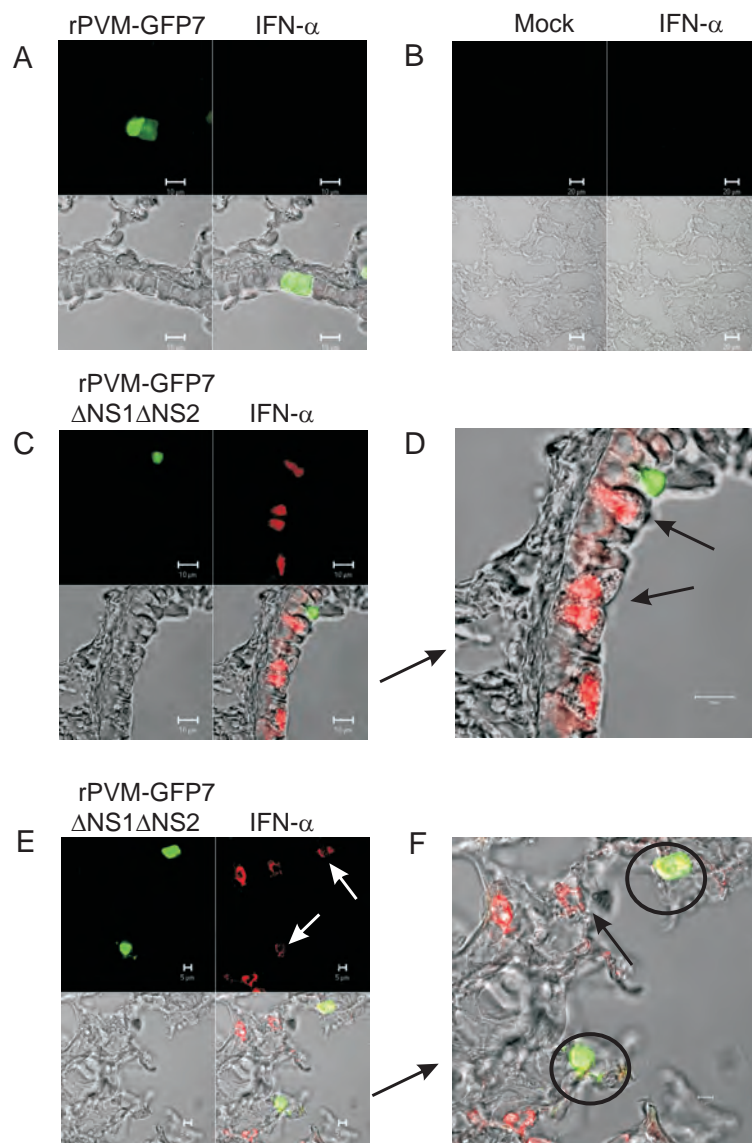


Abbildung 26: Nachweis von rezeptorgebundenen IFN- α in Gefrierschnitten von Lungen aus C57BL/6-Mäusen. C57BL/6-Mäuse wurden mit 1×10^5 PFU rPVM-GFP7 (A), rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 (C, D, E, F) oder PBS (Mock) (B) infiziert. 48 h nach Infektion erfolgte der Nachweis von IFN- α (rote Fluoreszenz) mit primären polyklonalen IFN- α Antikörpern. Die anschließende immunhistologische Färbung mit Alexa 555 gekoppelten sekundären Antikörpern wurde wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben durchgeführt, wobei Abbildung B in einer 20-fachen Vergrößerung und die repräsentativen Ausschnitte A, C und E in einer 40-fachen Vergrößerung dargestellt sind. Die Identifikation der rPVM-GFP7 und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierten Zellen geschah über die Expression von GFP (grüne Fluoreszenz). Die in D und F dargestellten schwarzen Pfeile kennzeichnen die Lokalisation von einzelnen IFN- α -Signalen. Die in E dargestellten weißen Pfeile zeigen das schwache Interferonsignal, welches sich in F mit den virusinfizierten Zellen überlagert (schwarze Kreise). Dargestellt sind Gefrierschnitte einer von zwei Mäusen. Größenmarker in A, C und D sind 10 μ m, in B 20 μ m, in E und F 5 μ m.

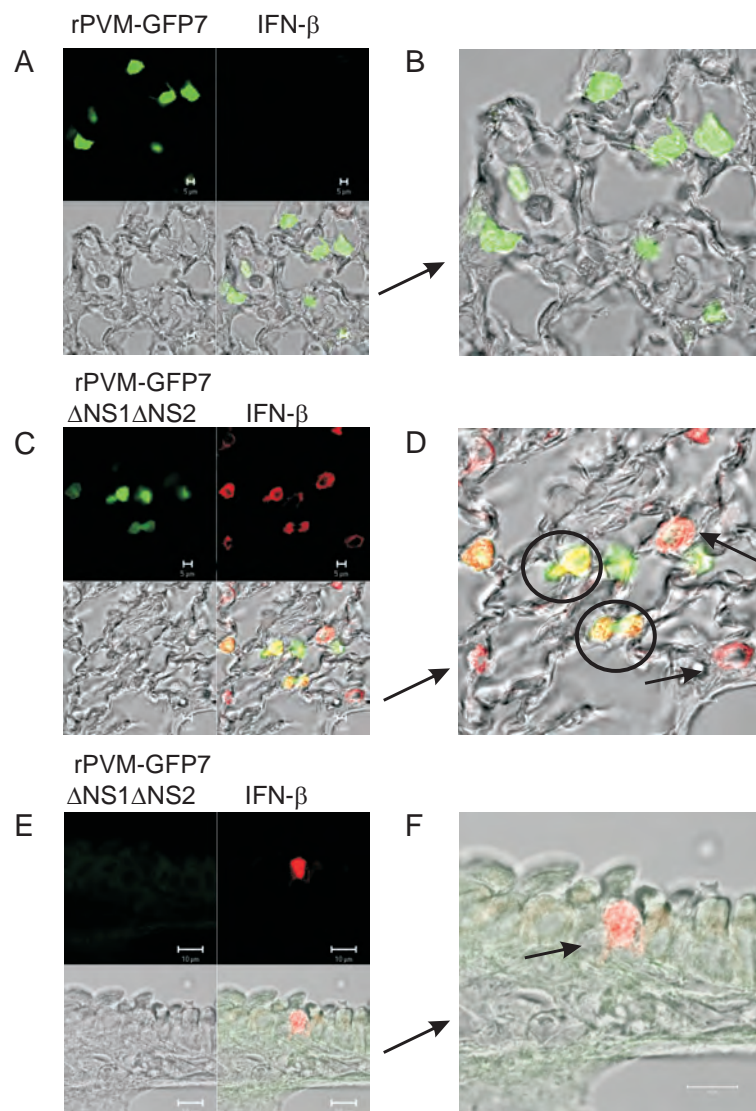


Abbildung 27: Nachweis von rezeptorgebundenen IFN- β in Gefrierschnitten von Lungen aus C57BL/6-Mäusen. C57BL/6-Mäuse wurden mit 1×10^5 PFU rPVM-GFP7 (A, B) und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 (C, D, E, F) infiziert. 48 h nach Infektion erfolgte der Nachweis von IFN- β (rote Fluoreszenz) mit primären polyklonalen IFN- β Antikörpern. Die anschließende immunhistologische Färbung mit Alexa 555 gekoppelten sekundären Antikörpern wurde wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben durchgeführt. Die in Abbildung D und F dargestellten schwarzen Pfeile kennzeichnen die Lokalisation von einzelnen IFN- β -Signalen. Die Identifikation der rPVM-GFP7 und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierten Zellen geschah über die Expression von GFP (grüne Fluoreszenz). A, C und E zeigen repräsentative Ausschnitte in einer 40-fachen Vergrößerung, B, D und F zeigen einzelne stärker vergrößerte Bereiche. In D gelblich dargestellte Bereiche (schwarze Kreise in der Abbildung) zeigen eine Überlagerung von virusinfizierten Zellen mit dem Interferonsignal. Dargestellt sind Gefrierschnitte einer von zwei Mäusen. Größenmarker in A, B, C und D sind $5 \mu\text{m}$, in E und F $10 \mu\text{m}$.

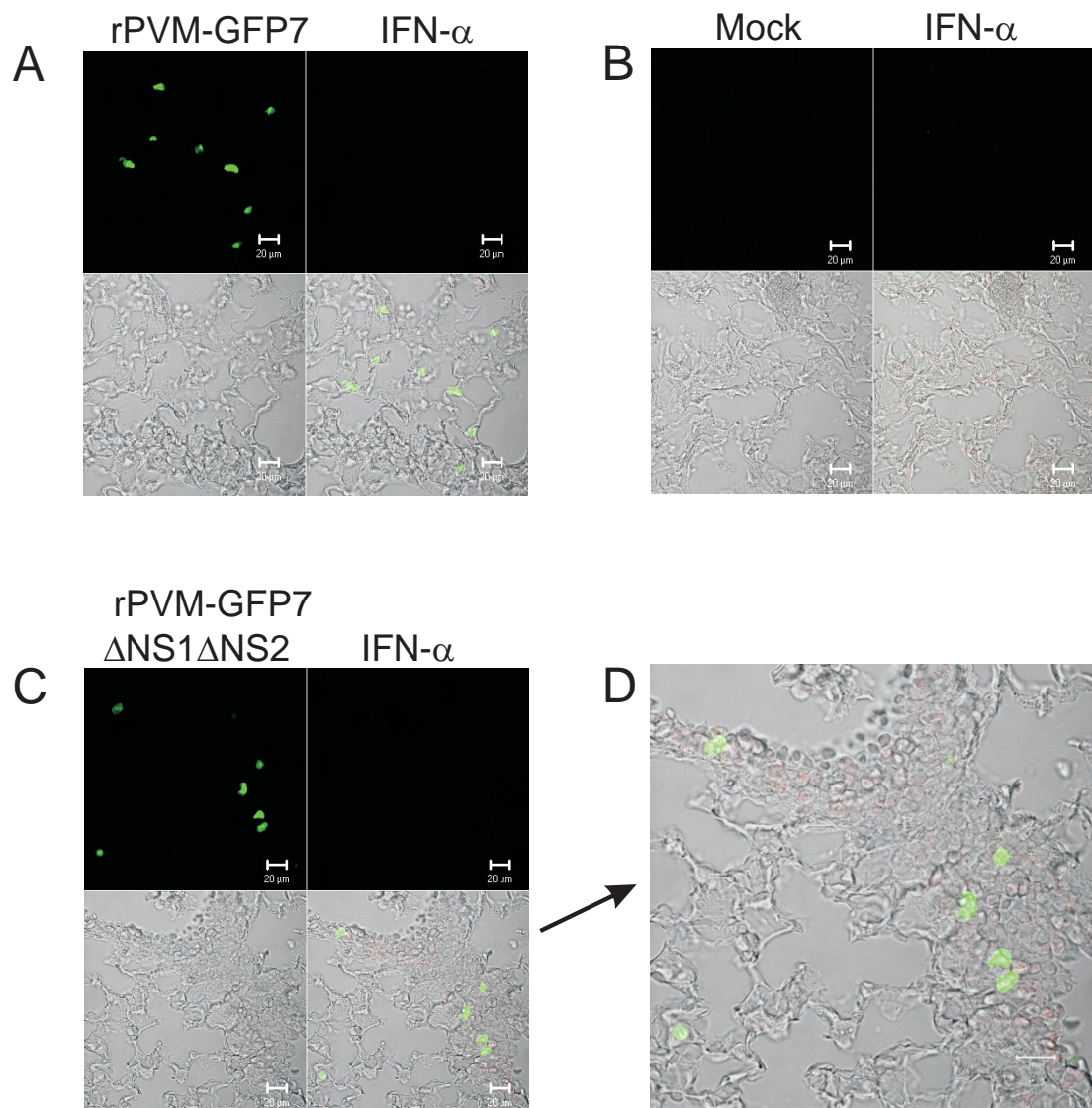


Abbildung 28: Nachweis von rezeptorgebundenen IFN- α in Gefrierschnitten von Lungen aus C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen. C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäuse wurden mit 1×10^5 PFU rPVM-GFP7 (A), rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 (C, D) oder PBS (Mock) (B) infiziert. 48 h nach Infektion erfolgte der Nachweis von IFN- α mit primären polyklonalen IFN- α Antikörpern. Die anschließende immunhistologische Färbung mit Alexa 555 gekoppelten sekundären Antikörpern wurde wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben durchgeführt, wobei die Bilder repräsentative Ausschnitte (20-fache Vergrößerung) der indirekten Immunfluoreszenzanalyse darstellen. Abbildung D stellt einen vergrößerten Ausschnitt von Abbildung C dar. Die Identifikation der rPVM-GFP7 und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierten Zellen geschah über die Expression von GFP (grüne Fluoreszenz). Dargestellt sind Gefrierschnitte einer von zwei Mäusen. Größenmarker in A, B, C und D sind 20 μ m.

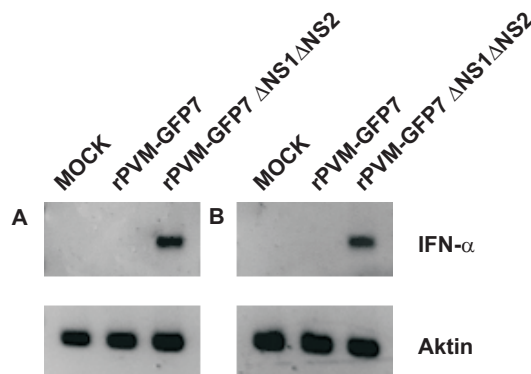


Abbildung 29: Nachweis von IFN- α 5 spezifischer mRNA mittels RT-PCR in Lungen von C57BL/6- und C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0} -Mäusen. Zur Isolierung der gesamtzellulären-RNA wurden jeweils die apikalen Lungenflügel der in Abb. 26 und Abb. 28 verwendeten Mäuse eingesetzt. 1 μ g gesamtzelluläre-RNA wurde dabei zur Detektion von Aktin- und IFN- α 5-Transkripten mittels RT-PCR eingesetzt. A: C57BL/6-Mäuse; B: C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0} -Mäuse.

Als Kontrolle für den zuvor durchgeführten Versuch wurde in C57BL/6- und C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0} -Mäusen die Induktion von IFN- α 5 mittels RT-PCR untersucht. Die Isolierung der gesamtzellulären-RNA erfolgte dabei in beiden Versuchen jeweils aus dem apikalen Lungenflügel, der zuvor entnommen und homogenisiert wurde. Nach Infektion mit rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 konnte sowohl in C57BL/6- (siehe Abb. 29 A) als auch in C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0} -Mäusen (siehe Abb. 29 B) eine Induktion von IFN- α 5 nachgewiesen werden. Somit konnte eindeutig belegt werden, dass die eingesetzte Methode dazu genutzt werden kann, um rezeptorgebundenes Interferon spezifisch zu detektieren.

Um Aussagen über die Zelltypen zu treffen, bei welchen Interferon an den Rezeptor gebunden hat, wurden Mehrfachfärbungen etabliert. Aufgrund der zuvor durchgeführten Versuche und der Struktur der Mauslunge ließ sich vermuten, dass es sich bei den Zellen zum einen um die für das Bronchiolusepithel (*Bronchiolus terminalis*) typischen kubisch bis hochprismatischen nicht-zilierten Clarazellen oder um zilierte Epithelzellen handeln könnte (siehe Abb. 26 C, D). Zum anderen könnte es sich um die für Alveolen typischen, flachen Typ I Pneumozyten (Alveolardeckzellen) oder um kleine kubische bzw. rundliche Typ II Pneumozyten (Nischenzellen) handeln. Auch die in das Lungenparenchym eingelagerten relativ großen Alveolarmakrophagen (siehe Abb. 26 E, F), die im Gegensatz zu den Typ I Pneumozyten und Typ II Pneumozyten nicht auf der alveolären Basallamina sitzen, könnten als Zelltypen, an denen das Interferon an den Rezeptor gebunden hat, in Frage kommen (Broeckert & Bernard, 2000; Fehrenbach *et al.*, 1995; DiFiore & Wilson, 1994). Die Überlagerung der jeweiligen Zelltypen mit dem Interferonsignal wurden mit Hilfe von Mehrfachfärbungen überprüft. Leider war es nicht möglich, die bisher etablierten

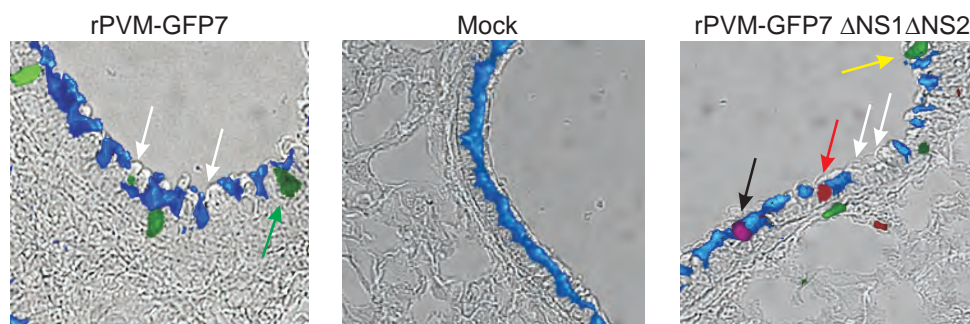


Abbildung 30: Doppelfärbung von rezeptorgebundenen IFN- α und zilierten Epithelzellen. C57BL/6-Mäuse wurden mit jeweils 1×10^5 PFU rPVM-GFP7, rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 oder PBS (Mock) infiziert. 48 h nach Infektion erfolgte eine Inkubation mit primären polyklonalen IFN- α Antikörpern. Die anschließende immunhistologische Färbung mit Alexa 555 (rote Fluoreszenz) gekoppelten sekundären Antikörpern wurde wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben durchgeführt. Der Nachweis der zilierten Epithelzellen wurde mit primären Antikörpern gegen β -Tubulin IV gefolgt von Alexa 350 (blaue Fluoreszenz) gekoppelten sekundären Antikörpern durchgeführt (siehe Abschnitt 3.6.3). Die Identifikation der rPVM-GFP7 und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierten Zellen geschah über die Expression von GFP (grüne Fluoreszenz). Die repräsentativen Ausschnitte zeigen eine 40-fache Vergrößerung. Die schwarz dargestellten Pfeile zeigen die Überlagerung von IFN- α und zilierten Epithelzellen (lila Fluoreszenz). Die weißen Pfeile deuten auf vermutlich Clarazellen. Die rote Fluoreszenz kennzeichnet rezeptorgebundenes IFN- α an einer vermutlichen Clarazelle (roter Pfeil). Durch den gelben bzw. grünen Pfeil wird eine infizierte vermutliche Clarazelle bzw. eine infizierte zilierte Epithelzelle kenntlich gemacht. Dargestellt sind Gefrierschnitte einer von zwei Mäusen.

Oberflächenfärbungen für IFN- α und IFN- β mit Färbungen für Clarazellen, Pneumozyten Typ I und Pneumozyten Typ II, sondern nur mit weiteren Färbungen, bei denen keine Permeabilisierung nötig war, wie für Alveolarmakrophagen und zilierte Epithelzellen zu kombinieren. Der Nachweis der zilierten Epithelzellen und Alveolarmakrophagen erfolgte mittels Immunfluoreszenz. Dabei wurde für zilierte Epithelzellen ein primärer Antikörper gegen β -Tubulin IV und für Alveolarmakrophagen ein primärer Antikörper gegen das Glykoprotein F4/80, gefolgt von einem Alexa 350 (blaue Fluoreszenz) gekoppelten sekundären Antikörper eingesetzt. Die Identifikation der rPVM-GFP7 und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierten Zellen geschah über die Expression von GFP (grüne Fluoreszenz). Der Nachweis von rezeptorgebundenen IFN- α und IFN- β in Gefrierschnitten von Lungen aus C57BL/6-Mäusen gelang mit den primären IFN- α und IFN- β Antikörpern und einem nachfolgenden Alexa 555 gekoppelten sekundären Antikörper.

Wie in Abb. 30 und Abb. 31 zu erkennen, konnte nach Infektion mit rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 eine partielle Überlagerung (lila Fluoreszenz; schwarze Pfeile) von IFN- α und IFN- β mit zilierten Epithelzellen nachgewiesen werden. Bei den nicht gefärbten Zellen im Flimmerepithel handelt es sich wahrscheinlich um die nicht Zilien-tragenden Clarazellen (weiße Pfeile; siehe Abb. 30 und Abb. 31). Auch bei diesen Zellen konnte rezeptorgebundenes Interferon beobachtet werden (rote Pfeile, siehe Abb. 30 und Abb. 31). Bei den rPVM-GFP7

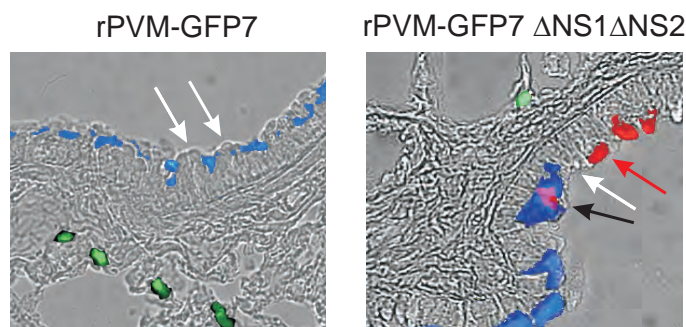


Abbildung 31: Doppelfärbung von rezeptorgebundenen IFN- β und zilierten Epithelzellen. C57BL/6-Mäuse wurden mit jeweils 1×10^5 PFU rPVM-GFP7, rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 oder PBS (Mock) infiziert. 48 h nach Infektion erfolgte eine Inkubation mit primären polyklonalen IFN- β Antikörpern. Die anschließende immunhistologische Färbung mit Alexa 555 (rote Fluoreszenz) gekoppelten sekundären Antikörpern wurde wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben durchgeführt. Der Nachweis der zilierten Epithelzellen wurde mit primären Antikörpern gegen β -Tubulin IV gefolgt von Alexa 350 (blaue Fluoreszenz) gekoppelten sekundären Antikörpern durchgeführt (siehe Abschnitt 3.6.3). Die Identifikation der rPVM-GFP7 und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierten Zellen geschah über die Expression von GFP (grüne Fluoreszenz). Die repräsentativen Ausschnitte zeigen eine 40-fache Vergrößerung. Die schwarz dargestellten Pfeile zeigen die Überlagerung von IFN- β und zilierten Epithelzellen (lila Fluoreszenz). Die weißen Pfeile deuten auf vermutlich Clarazellen. Die rote Fluoreszenz kennzeichnet rezeptorgebundenes IFN- β an vermutlich Clarazellen (roter Pfeil). Dargestellt sind Gefrierschnitte einer von zwei Mäusen.

und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierten Zellen des Flimmerepithels handelt es sich sowohl um zilierte Epithelzellen (grüner Pfeil; siehe Abb. 30) als auch wahrscheinlich um Clarazellen (gelber Pfeil; siehe Abb. 30). Bei allen weiteren infizierten Zellen (grüne Fluoreszenz; siehe Abb. 33) könnte es sich sowohl um die kleinen kubischen Typ II Pneumozyten als auch um Alveolarmakrophagen handeln (siehe Abb. 31). Abb. 32 und Abb. 33 zeigen eine spezifische Überlagerung von IFN- α und IFN- β mit Alveolarmakrophagen (schwarze Pfeile). Dabei ist darauf hinzuweisen, dass der Prozentsatz der Alveolarmakrophagen, die eine Überlagerung mit dem Interferonsignal aufweisen, sehr gering ist. Bei den übrigen Signalen für rezeptorgebundenes Interferon könnte es sich sowohl um flache Typ I Pneumozyten (weißer Pfeil; siehe Abb. 32) als auch um kleine kubische bis rundliche Pneumozyten vom Typ II handeln (weiße Kreise; siehe Abb. 32 und Abb. 33). Eine Dreifachfärbung (IFN- α , Alveolarmakrophage und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 Infektion) konnte in den exemplarischen Bildern nur in einem Fall beobachtet werden (schwarzer Kreis, siehe Abb. 32). Bei den weiteren rPVM-GFP7 und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierten Zellen handelt es sich wahrscheinlich aufgrund der Morphologie um Typ I (flache bzw. platte Zellen) und Typ II Pneumozyten (kubisch bzw. rundliche Zellen).

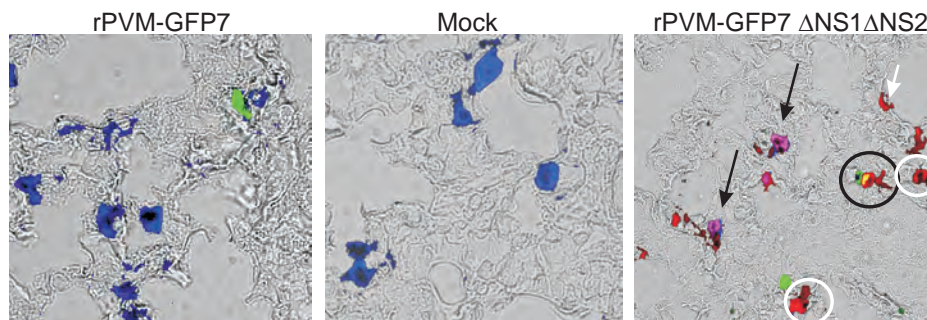


Abbildung 32: Doppelfärbung von rezeptorgebundenen IFN- α und Alveolarmakrophagen. C57BL/6-Mäuse wurden mit jeweils 1×10^5 PFU rPVM-GFP7, rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 oder PBS (Mock) infiziert. 48 h nach Infektion erfolgte eine Inkubation mit primären polyklonalen IFN- α Antikörpern. Die anschließende immunhistologische Färbung mit Alexa 555 (rote Fluoreszenz) gekoppelten sekundären Antikörpern wurde wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben durchgeführt. Der Nachweis der Alveolarmakrophagen wurde mit primären Antikörpern gegen das Glykoprotein F4/80 gefolgt von Alexa 350 (blaue Fluoreszenz) gekoppelten sekundären Antikörpern durchgeführt (siehe Abschnitt 3.6.3). Die Identifikation der rPVM-GFP7 und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierten Zellen geschah über die Expression von GFP (grüne Fluoreszenz). Die repräsentativen Ausschnitte zeigen eine 40-fache Vergrößerung. Die schwarzen Pfeile zeigen die Überlagerung von IFN- α und Alveolarmakrophagen (lila Fluoreszenz). Die weißen Pfeile deuten auf vermutlich Typ I Pneumozyten hin, die weißen Kreise auf vermutlich Typ II Pneumozyten. Eine Dreifachfärbung (IFN- α , Alveolarmakrophage und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 Infektion) wird durch den schwarzen Kreis gekennzeichnet. Dargestellt sind Gefrierschnitte einer von zwei Mäusen.

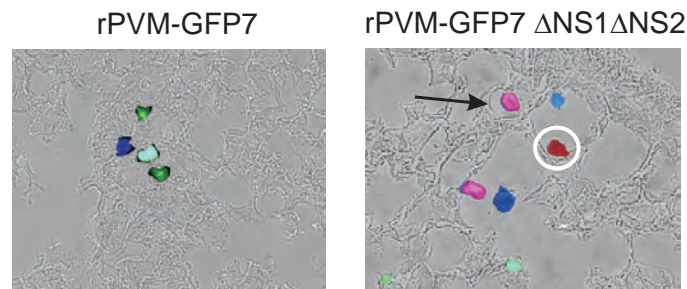


Abbildung 33: Doppelfärbung von rezeptorgebundenen IFN- β und Alveolarmakrophagen. C57BL/6-Mäuse wurden mit jeweils 1×10^5 PFU rPVM-GFP7, rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 oder PBS (Mock) infiziert. 48 h nach Infektion erfolgte eine Inkubation mit primären polyklonalen IFN- β Antikörpern. Die anschließende immunhistologische Färbung mit Alexa 555 (rote Fluoreszenz) gekoppelten sekundären Antikörpern wurde wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben durchgeführt. Der Nachweis der Alveolarmakrophagen wurde mit primären Antikörpern gegen das Glykoprotein F4/80 gefolgt von Alexa 350 (blaue Fluoreszenz) gekoppelten sekundären Antikörpern durchgeführt (siehe Abschnitt 3.6.3). Die Identifikation der rPVM-GFP7 und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infizierten Zellen geschah über die Expression von GFP (grüne Fluoreszenz). Die repräsentativen Ausschnitte zeigen eine 40-fache Vergrößerung. Die schwarzen Pfeile zeigen die Überlagerung von IFN- β und Alveolarmakrophagen (lila Fluoreszenz). Der weiße Kreis markiert einen vermutlichen Typ II Pneumozyten. Dargestellt sind Gefrierschnitte einer von zwei Mäusen.

5 Diskussion

5.1 Die NS-Proteine von PVM sind Interferonantagonisten

Die NS-Proteine von PVM wurden in dieser Dissertation als Typ I und Typ III Interferonantagonisten identifiziert, wobei das NS2-Protein eindeutig eine stärkere antagonistische Funktion besitzt als das NS1-Protein. Eine additive Funktion des NS1-Proteins und eine starke kooperative Wirkung beider Proteine konnte gezeigt werden. Das NS2-Protein inhibiert hierbei die Induktion von Interferon, der Angriffspunkt von NS1 konnte dagegen nicht klar identifiziert werden. Die nachfolgend beschriebenen *in vitro* Daten belegen diese Aussagen. rPVM Δ NS-Mutanten zeigten in primären Interferon-kompetenten C57BL/6-MEFs eine deutliche Attenuierung im Vergleich zum rekombinanten Wildtypvirus (siehe Abb. 11) und in Interferon-inkompetenten C57BL/6.IFN- α R^{0/0}-MEFs eine annähernd vollständige Rekonstitution der Replikationsfähigkeit. Für rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 wurde sowohl in Interferon-kompetenten RAW264.7-Zellen als auch in Interferon-kompetenten peritonealen Makrophagen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen eine vollständige Attenuierung der Replikation beschrieben (siehe Abb. 12). In C57BL/6.IFN- α R^{0/0}-Makrophagen und C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Makrophagen wurde eine vollständige Rekonstitution der Replikationsfähigkeit von rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 beobachtet (siehe Abb. 12). In C57BL/6-MEFs hatte die Deletion des NS2-Gens (rPVM Δ NS2) eine stärkere Attenuierung *in vitro* zur Folge als die Deletion des NS1-Gens (rPVM Δ NS1) (siehe Abb. 11). Diese *in vitro* Daten belegen zelltypspezifische Replikationsunterschiede in drei Interferon-kompetenten Zelllinien (Fibroblasten, peritoneale Makrophagen, RAW264.7-Zellen) (siehe Abb. 12).

Die Induktion von Typ I und Typ III Interferon *in vitro* wurde ebenfalls in drei unterschiedlichen Zellsystemen analysiert. Die folgenden *in vitro* Ergebnisse der PCR-Analysen (siehe Abb. 13) bestätigen gleichermaßen, wie die zuvor beschriebenen Daten der Wachstumskurven, eine Funktion beider NS-Proteine von PVM als Interferonantagonisten. In allen drei Zellsystemen konnte deutlich IFN- α 5 und IFN- β spezifische mRNA nach Infektion mit rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 detektiert werden (siehe Abb. 13), wobei eine Induktion von IFN- α 5-mRNA und IFN- β -mRNA zu keinem Zeitpunkt nach Infektion mit rPVM beobachtet wurde (siehe Abb. 13). Nach Infektion mit rPVM Δ NS1 wurde eine schwache Induktion von IFN- α 5-mRNA in Fibroblasten und in RAW264.7-Zellen nachgewiesen, hingegen wurde eine deutlich stärkere Induktion in peritonealen Makrophagen belegt. Eine Induktion von IFN- β -mRNA konnte hingegen nicht dokumentiert werden (siehe Abb. 13). Eine Typ III Interferon-Induktion konnte nur nach Infektion mit rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 in den RAW264.7-Zellen beschrieben werden (siehe Abb. 13), was

sich durch zelltypspezifische Unterschiede in der Induktion der Typ III Interferone erklären ließe.

Neben den beschriebenen *in vitro* Daten (PCR-Analysen und Daten der Wachstumskurven) bestätigen sowohl die *in vivo* Daten der C57BL/6-Mäuse wie auch die *in vivo* Daten der IFN- $\beta^{+/\Delta\beta-luc}$ -Mäuse eine Funktion beider NS-Proteine von PVM als Interferonantagonisten. IFN- $\beta^{+/\Delta\beta-luc}$ -Mäuse zeigten eine starke Induktion von IFN- α und IFN- β nach Infektion mit rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 sowie eine schwache Induktion von IFN- α und IFN- β nach Infektion mit rPVM Δ NS1 *in vivo* (siehe Abb. 16). In C57BL/6-Mäusen wurde eine geringe Induktion von IFN- α und IFN- β nach Infektion mit rPVM Δ NS2, eine starke Induktion von IFN- α und IFN- β nach Infektion mit rPVM Δ NS1 Δ NS2 und keine Induktion von beiden Interferonen nach Infektion mit rPVM Δ NS1 bestimmt (siehe Abb. 18). Die im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen deutlich höhere Konzentration an IFN- α und IFN- β nach Infektion mit rPVM Δ NS2 in den IFN- $\beta^{+/\Delta\beta-luc}$ -Mäusen (Chimäre aus BALB/c-, C57BL/6- und K14Cre-Mäusen) (Lienenklaus *et al.*, 2009; siehe Abb. 16) könnte auf die Verwendung unterschiedlicher Mausstämmen mit verschiedenen genetischen Hintergründen zurückzuführen sein (Seeds *et al.*, 2009). Ausgehend von den C57BL/6 ELISA Daten, die eine deutlich verstärkte Induktion von IFN- α und IFN- β nach Infektion mit rPVM Δ NS1 Δ NS2 im Vergleich zu rPVM Δ NS2 belegten, konnte eine additive Funktion des NS1-Proteins im Interferonsystem und eine starke kooperative Wirkung beider NS-Proteine *in vivo* beschrieben werden.

Die Daten dieser Dissertation und die Daten unserer Publikation (Buchholz *et al.*, 2009) belegen eine Funktion des NS2-Proteins als potenten Interferonantagonisten. In dieser Arbeit gelang es zusätzlich, das NS1-Protein von PVM als Interferonantagonisten zu identifizieren, wobei die nachfolgenden Ergebnisse die interferonantagonistische Funktion des NS1-Proteins beschreiben. In C57BL/6-MEFs wurde eine verringerte Replikationsfähigkeit von rPVM Δ NS1 im Vergleich zu rPVM dokumentiert, wohingegen in RAW264.7-Zellen und in peritonealen Makrophagen eine vollständige Attenuierung von rPVM Δ NS1 verzeichnet werden konnte (siehe Abb. 12). Die zuvor beschriebene Attenuierung von rPVM Δ NS1 wurde sowohl in C57BL/6.IFN- α R^{0/0}-MEFs als auch in peritonealen C57BL/6.IFN- α R^{0/0}-Makrophagen und C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Makrophagen vollständig rekonstituiert (siehe Abb. 12). Der additive Effekt der Replikationsfähigkeit von rPVM Δ NS1 Δ NS2 im Vergleich zu rPVM Δ NS2 ist auf die Deletion von NS1 zurückzuführen (siehe Abb. 11). Des Weiteren wurde eine unterschiedlich starke, zelltypspezifische Induktion von IFN- α 5 nach Infektion mit rPVM Δ NS1 bestimmt (siehe Abb. 13). Diese Ergebnisse beschreiben auch eine Rolle des NS1-Proteins im Interferonsystem und erweitern somit unsere bisherigen Daten (Buchholz *et al.*, 2009).

Wie zuvor beschrieben, wurden beide NS-Proteine von PVM in Analogie zu RSV als

Interferonantagonisten identifiziert. Dabei wurde für PVM eine deutlich stärkere antagonistische Funktion des NS2-Proteins im Vergleich zum NS1-Protein beobachtet. Bei HRSV wurde das NS1-Protein verglichen mit dem NS2-Protein als stärkerer Interferonantagonist beschrieben (Spann *et al.*, 2004). Bei BRSV zeichnet sich für die Stärke der Interferonantagonisten hingegen das gleiche Bild wie bei PVM ab (Valarcher *et al.*, 2003). Im Mausmodell für HRSV wurde jedoch wie auch in dieser Dissertation für PVM gezeigt, eine stärkere interferonantagonistische Funktion des NS2-Proteins belegt (Kotelkin *et al.*, 2006). Diese Daten beschreiben somit eine wirtsabhängige Aktivität der NS-Proteine.

5.2 Protektive Rolle von Typ I und Typ III Interferonen bei einer Infektion mit PVM

Typ I und Typ III Interferone besitzen eine protektive Rolle bei einer natürlichen pulmonalen Infektion mit PVM, wobei den Typ I Interferonen, im Vergleich zu den Typ III Interferonen ein bedeutenderer Einfluss zugeordnet werden konnte. *In vivo* Ergebnisse hinsichtlich der Replikation und Pathogenität der rPVM Δ NS-Mutanten in unterschiedlichen Interferon-defizienten Knockout-Mäusen erläutern diese Aussage. Für rPVM Δ NS-Mutanten wurde eine starke Attenuierung hinsichtlich Replikationsfähigkeit und Virulenz in C57BL/6-Mäusen bestimmt (siehe Abb. 15). In C57BL/6. $\text{IFN-}\alpha\text{R}^{0/0}$ -Mäusen wurde eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit den rPVM Δ NS-Mutanten beobachtet. Im Vergleich zu den durchgeführten Zellkulturversuchen zeigten C57BL/6. $\text{IFN-}\alpha\text{R}^{0/0}$ -Mäuse jedoch keine Rekonstitution der zuvor in C57BL/6-Mäusen beschriebenen Attenuierung der Replikationsfähigkeit und der Virulenz (siehe Abb. 15). Die Replikation der rPVM Δ NS-Mutanten in C57BL/6. $\text{IL28R}\alpha^{0/0}$ -Mäusen hatte eine ähnliche Ausprägung wie zuvor in C57BL/6-Mäusen gezeigt (siehe Abb. 19) und spricht somit für eine untergeordnete Rolle der Typ III Interferone bei einer PVM-Infektion. In C57BL/6. $\text{IFN-}\alpha\text{R}^{0/0}$. $\text{IL28R}\alpha^{0/0}$ -Mäusen wurde eine deutlich erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit den rPVM Δ NS-Mutanten dokumentiert, wobei eine vollständige Aufhebung der Attenuierung jedoch ausblieb. Die Beobachtung der erhöhten Suszeptibilität wurde sowohl histopathologisch (siehe Abb. 20) als auch durch die Analyse eines Zytokin-Profiles (siehe Tab. 14) untermauert. Die Aussage, dass Typ I Interferone im Vergleich zu den Typ III Interferonen eine stärkere Protektion bei einer Infektion mit PVM vermitteln, wird auch dadurch unterstrichen, dass die Vorbehandlung von C57BL/6-Mäusen mit exogenem Typ I Interferon vor einer PVM induzierten Pneumonie schützt. Im Unterschied dazu zeigte sich nach Vorbehandlung mit exogenem Typ III Interferon zwar eine zeitlich verzögerte Virusreplikation, ein umfassender protektiver Schutz blieb jedoch aus (siehe Abb. 22, 23). Eine Infektion mit rekombinantem Wildtypvirus (rPVM) führte in C57BL/6-, C57BL/6.-

IFN- α R^{0/0} -, C57BL/6.IL28R α ^{0/0} - und C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0}-Mäusen zu einem letalen Krankheitsverlauf.

Kürzlich veröffentlichte Daten beschreiben eine geringe Replikation von HRSV in C57BL/6-, in C57BL/6.IFN- α R^{0/0} - und in C57BL/6.IL28R α ^{0/0} -Mäusen (Mordstein *et al.*, 2010). In C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0} -Mäusen wurde dagegen eine deutlich erhöhte Suszeptibilität und eine damit verbundene deutlich erhöhte Replikationsrate beschrieben. Die geringeren Virustiter und die geringere Suszeptibilität der unterschiedlichen Interferon-defizienten Knockout-Mäuse gegenüber einer Infektion mit HRSV wurden durch die fehlende Induktion von Typ III Interferon begründet. Die Autoren schlussfolgerten eine starke protektive antivirale Funktion sowohl von Typ I Interferonen als auch von Typ III Interferonen bei einer Infektion mit HRSV. Diese beschriebenen Daten reflektieren durch die Verwendung eines nicht spezie-konformen Tiermodells (humanes Virus (HRSV) im Mausmodell) jedoch nicht die Situation einer pulmonalen Infektion im natürlichen Wirt.

Durch die Verwendung von rPVM Δ NS-Mutanten war es in dieser Dissertation erstmals möglich, die Rolle von Typ I und Typ III Interferon in einem natürlichen Wirt (murines Virus (PVM) im Mausmodell) zu untersuchen. Die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 von PVM wurden dabei als Interferonantagonisten beschrieben (siehe Abschnitt 5.1). In C57BL/6-, in C57BL/6.IFN- α R^{0/0} -, in C57BL/6.IL28R α ^{0/0} - und in C57BL/6.IFN- α R^{0/0}.IL28R α ^{0/0} -Mäusen wurde im Vergleich zu den zuvor veröffentlichten Daten mit HRSV (Mordstein *et al.*, 2010) nach Infektion mit rPVM nur ein geringer Unterschied in der Replikation und der Virulenz beobachtet. Durch die Verwendung von rPVM Δ NS-Mutanten und unterschiedlichen Interferon-defizienten Mäusen wurde den Typ I Interferonen nachweislich ein protektiverer Einfluss zugeordnet als den Typ III Interferonen.

Nach einer Vorbehandlung mit exogenem Typ III Interferon vor einer intranasalen Infektion mit Influenza-Viren konnte keine Erkrankung der Mäuse beobachtet werden (Mordstein *et al.*, 2008). Im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit beschreiben die Daten eine protektive Rolle von exogenem Typ III Interferon bei einer Infektion mit Influenza-Viren. Eine Erklärung für diese unterschiedliche protektive Wirkung des Typ III Interferons könnte in der Infektion verschiedener pulmonaler Zelltypen nach Infektion mit Influenza-Viren bzw. PVM liegen. Während einer PVM-Infektion konnten in dieser Arbeit durch Antikörper und anhand morphologischer Beschreibungen zilierte Epithelzellen, Alveolarmakrophagen, Clarazellen, Typ I und Typ II Pneumozyten als virusinfizierte Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 30, 31, 32, 33). Dieser Zelltropismus konnte auch in Autopsien von HRSV-infizierten Patienten gefunden werden. Ein histologischer Vergleich von HRSV- und Influenza-Virus-infizierten Patienten zeigte bei Influenza-Patienten, dass nur Epithelzellen der größeren Atemwege jedoch keine alveolaren Zellen infiziert werden (Welliver *et al.*, 2007). Mordstein *et al.* (2010) beschrieben vor kurzem ein Vorhandensein des Typ III In-

terferonrezeptor auf Epithelzellen der größeren Atemwege nicht aber auf alveolaren Zellen. Somit wäre nach Vorbehandlung mit exogenem Typ III Interferon ein antiviraler Status von interferon-sensitiven Epithelzellen der größeren Atemwege bei einer Influenza-Infektion vorstellbar. Da bei PVM im Gegensatz zu Influenza außerdem Zellen in kleineren Atemwegen und Alveoli infiziert werden, könnte es sich bei diesen Zellen um interferon-insensitive Zellen handeln. Somit würde sich zwar die Virusreplikation zeitlich verzögern, ein umfassender protektiver Schutz würde jedoch ausbleiben. Dieser mögliche Unterschied im Verhalten der Zellen gegenüber Typ III Interferon könnte die unterschiedliche Effizienz der Vorbehandlung erklären.

5.3 Gibt es weitere Funktionen der NS-Proteine von PVM?

Die NS-Proteine von PVM wurden in dieser Arbeit als potente Interferonantagonisten identifiziert. In C57BL/6. $IFN-\alpha R^{0/0}$. $IL28R\alpha^{0/0}$ -Mäusen konnte im Vergleich zu C57BL/6. $IFN-\alpha R^{0/0}$ - und C57BL/6. $IL28R\alpha^{0/0}$ -Mäusen eine gesteigerte Replikation und Virulenz von rPVM $\Delta NS1$ und rPVM $\Delta NS2$ dokumentiert werden, wobei in rPVM $\Delta NS1\Delta NS2$ infizierten C57BL/6. $IFN-\alpha R^{0/0}$. $IL28R\alpha^{0/0}$ -Mäusen kein Gewichtsverlust und nur eine geringere Virusreplikation im Vergleich zu den übrigen rPVM ΔNS -Mutanten beschrieben werden konnte.

Würde es sich bei der interferonantagonistischen Funktion der NS-Proteine von PVM um die einzige Funktion dieser Proteine handeln, würde in C57BL/6. $IFN-\alpha R^{0/0}$. $IL28R\alpha^{0/0}$ -Mäusen, die eine Deletion des Typ I und des Typ III Interferonrezeptors aufweisen, eine Replikation und Virulenz der rPVM ΔNS -Mutanten ähnlich dem rekombinanten Wildtypvirus erwartet. Da diese Erwartung nicht erfüllt werden konnte, sind weitere Funktionen der NS-Proteine wahrscheinlich.

Bitko *et al.* (2007) beschrieben in einem Modell, dass die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 von HRSV neben ihrer bekannten Funktion als Interferonantagonisten einen frühen

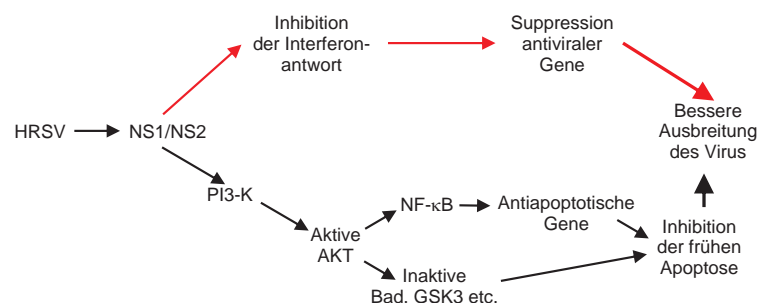


Abbildung 34: Schematische Darstellung zur Wirkungsweise der NS-Proteine von HRSV (modifiziert nach Bitko *et al.*, 2007)

Zeitpunkt der Apoptose durch einen Interferon-unabhängigen Mechanismus inhibieren, wodurch eine längere Virusreplikation und somit eine stärkere Ausbreitung des Virus gegeben wäre (siehe Abb. 34). Diese Inhibition der frühen Apoptose wird vermutlich unabhängig vom Interferon-Signalweg durch die NS-Protein abhängige Aktivierung des NF- κ B und PI3-K/AKT Signalweges reguliert (Bitko *et al.*, 2007). In Säugetierzellen bewirkt die Aktivierung des PI3-K/AKT-Signalweges (PI3-K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, AKT: Phosphatidylinositol-3-Kinase, PKB oder Proteinkinase B, Gene: AKT1, AKT2, AKT3) einen antiapoptotischen Status (Downward, 2004). Die Aktivierung von PI3-K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) durch die NS-Proteine katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol zu Phosphatidylinositol-3-Phosphat bzw. von Phosphatidylinositol-4-phosphat zu Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat und von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat. Die Entstehung dieser Substrate führt zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der Kinase AKT. Die aktivierte Kinase AKT führt zur Phosphorylierung einer Reihe von proapoptotischen Markern, wie z.B. Bad, GSK3, I κ B. Dadurch kommt es zum einen zur Inaktivierung von Bad (Bcl2-associated agonist of cell death) und GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) und zum anderen zur Degradierung von I κ B (Inhibitor von NF- κ B), was wiederum zur Translokation von NF- κ B aus dem Zytoplasma in den Zellkern führt. Die Folge der Translokation ist eine Aktivierung proinflammatorischer und antiapoptotischer Gene, z.B. der Bcl-Familie. Die Inaktivierung der proapoptotischen Marker und die Aktivierung antiapoptotischer Gene bewirken eine Inhibition der frühen Apoptose virusinfizierter Zellen (siehe Abb. 34).

Hinweise auf eine anti-apoptotische Funktion der NS-Proteine von PVM wurden in dieser Dissertation durch die Verwendung eines MitoPT-Assays erlangt. Die Ergebnisse belegten einen Zusammenbruch des Transmembranpotentials 16 h nach Infektion mit rPVM-GFP7 Δ NS2 und rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 im Vergleich zu einer Infektion mit rPVM-GFP und rPVM-GFP7 Δ NS1 (siehe Abb. 21). Diese Ergebnisse lassen sich durch die nachfolgende Funktionsbeschreibung der Mitochondrien innerhalb der Signalkaskade der Apoptose verstehen. Bei der oxidativen Phosphorylierung ist die ATP-Synthese durch einen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran mit dem Elektronenfluss vom NADH/FADH₂ zum O₂ gekoppelt. Der Elektronenfluss durch drei asymmetrisch orientierte Transmembrankomplexe führt dazu, dass Protonen aus der Mitochondrienmatrix herausgepumpt werden und somit ein Transmembranpotential entsteht (Pedersen & Amzel, 1993). Der Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials wird ebenso wie die DNA-Fragmentierung und die Chromatinkondensation als ein sehr frühes Anzeichen im Apoptoseprozess beschrieben (Scaife, 1966; Decaudin *et al.*, 1997). Die Änderung des Transmembranpotentials entsteht dabei durch die Öffnung eines Porenkomplexes, der durch das Protoonkogen *bcl-2* reguliert wird (Crompton, 1999; Faller-Müller *et al.*, 1999).

Durch die beschriebene Änderung des Transmembranpotentials wird die Atmungskette entkoppelt und somit die ATP-Bildung durch die mitochondriale ATPase unterbunden. Als Folge der Entkopplung der Atmungskette strömen Ionen, wie z.B. Ca^{2+} , aus den Mitochondrien in das Zytosol. Dadurch wird die mitochondriale RNA- und Proteinsynthese gestoppt und der Transport von Proteinen aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien unterbrochen. Das Öffnen dieser Poren hat nicht nur die Freisetzung von Ionen zur Folge, sondern bewirkt auch die Freisetzung des intramitochondrialen Proteins Zytochrom c, welches ein essentieller Bestandteil der Atmungskette ist (Kluck *et al.*, 1997; Kroemer & Reed, 2000; Crompton, 1999; Faller-Müller *et al.*, 1999). Durch die Freisetzung von Zytochrom c wird nachfolgend unter ATP-Verbrauch die Oligomerisierung von Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) induziert. Dieses Adapterprotein bindet und aktiviert die Pro-Caspase-9. Der Proteinkomplex aus Zytochrom c, Apaf-1, ATP und Pro-Caspase-9 wird als Apoptosom bezeichnet, welches nachfolgend die Initiation der Caspase-Kaskade bewirkt und deren Folge zur Apoptose führt (Li *et al.*, 1997).

Durch den Einsatz eines MitoPT-Assays war es in dieser Dissertation möglich, die Änderung des mitochondrialen Transmembranpotentials und somit den vermutlichen Startpunkt der frühen apoptotischen Signalkaskade zu dokumentieren. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Verwendung des MitoPT-Assays innerhalb dieser Dissertation einen entscheidenden Hinweis auf eine anti-apoptotische Funktion der NS-Proteine von PVM lieferte. Weiterführende Experimente, wie z.B. der Einsatz unterschiedlicher Caspase-Assays wären notwendig, um den genauen Wirkmechanismus der einzelnen Proteine innerhalb der Signaltransduktionswege der Apoptose bestimmen zu können und um die Apoptose als Grund für die verminderte Pathogenität von rPVM-GFP7 ΔNS2 und rPVM-GFP7 $\Delta\text{NS1}\Delta\text{NS2}$ *in vivo* anzuführen.

5.4 Analyse von Typ I Interferon synthetisierenden Zellen *in vivo*

Welche Zellen während einer natürlichen pulmonalen Infektion hauptsächlich Interferone produzieren, war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Die kommerziell erhältlichen Antikörper wurden in dieser Arbeit vor der eigentlichen *in vivo* Anwendung in RAW264.7-Zellen auf ihre immunhistologische Verwendung getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach Infektion mit der Interferon-induzierenden Deletionsmutante rPVM-GFP7 $\Delta\text{NS1}\Delta\text{NS2}$ im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp sowohl virusinfizierte als auch uninfizierte Zellen als Typ I Interferon-Produzenten fungieren.

Typ I Interferone werden als Reaktion auf eine Virusinfektion von Zellen gebildet und ihre Wirkungsweise erfolgt sowohl autokrin als auch parakrin (Isaacs & Lindenmann, 1957;

Pestka *et al.*, 2004). Bereits veröffentlichte Daten lassen annehmen, dass für die Synthese von IFN- α die vorherige Synthese von IFN- β notwendig ist (Erlandsson *et al.*, 1998). Die Daten dieser Arbeit beschreiben, dass auch uninfizierte Zellen in der Lage sind, ohne einen direkten Infektionsstimulus, Interferone zu produzieren. Die beschriebene Produktion der Interferone durch uninfizierte Zellen lässt sich zum einen möglicherweise als Schutzmechanismus verstehen, der eine schnelle und effiziente Interferonproduktion aller Zellen sichert und somit einen antiviralen Status auslöst, und zum anderen lassen diese Daten einen bisher unbeschriebenen Kommunikationsmechanismus von benachbarten Zellen vermuten.

Die Annahme, dass nach einer Virusinfektion alle Zellen Interferone bilden (Isaacs & Lindenmann, 1957; Pestka *et al.*, 2004) konnte in dieser Arbeit überraschenderweise nicht bestätigt werden: Nach Infektion mit rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 finden sich nur wenige, vereinzelte Zellen, die IFN- α und - β produzieren (siehe Abb. 24, 25). Ein möglicher zeitabhängiger Anstieg der Menge an Interferon-produzierenden Zellen (16 h, 24 h, 48h) konnte nicht beschrieben werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit aktuell veröffentlichten Daten, die nach einer Behandlung von YFP-IFN- β -Reporter Mäusen (*Yellow fluorescent protein*) mit CpG-ODN (CpG-Oligodesoxynukleotide) *in vivo* nur vereinzelte, sehr geringe Mengen an Interferon-produzierenden Zellen dokumentieren (Scheu *et al.*, 2008). Im Zuge dieser Daten lässt sich vermuten, dass nur ein sehr geringer Prozentsatz an Interferon-produzierenden Zellen erforderlich ist, um eine ausreichende Menge an Interferon für einen nachfolgenden effizienten antiviralen Status zu produzieren.

Die Frage, welche Zellen während einer pulmonalen Infektion hauptsächlich Interferone *in vivo* produzieren, sollte innerhalb dieser Dissertation mittels Immunhistologie beantwortet werden. Leider wurde bei den histologischen Färbungen festgestellt, dass die in der Zellkultur geeigneten IFN- α und - β spezifischen Antikörper nach Permeabilisierung des Lungengewebes weitere Strukturen unspezifisch erkennen und somit für die intrazelluläre Färbung der Interferone im Gewebe nicht geeignet sind. Die Beobachtung bezüglich der Unspezifität der getesteten Interferon-Antikörper korreliert im Fall von IFN- α mit bereits veröffentlichten Daten (Delhaye *et al.*, 2006), die deutliche Signale für IFN- α sowohl in TMEV (*Theiler's murines Enzephalitis-Virus*) infizierten Gehirnpräparaten als auch in uninfizierten Kontrollpräparaten dokumentieren. Delhaye *et al.* (2006) begründeten diese unspezifischen IFN- α -Signale in Kontrollpräparaten durch eine mögliche Kreuzreaktivität des IFN- α Antikörpers mit unbekanntem Antigenen von Endothelzellen. Obgleich sich die beschriebenen Interferon-Antikörper nicht für intrazelluläre Färbungen im Lungengewebe eignen, gelang es mit Hilfe einer neuen Nachweismethode (Intranasale Applikation der Antikörper vor Tötung der Versuchstiere, siehe Abschnitt 3.6.3) erstmals Zellen zu identifizieren, bei denen Interferon an den Rezeptor gebunden hatte. Eine Bestätigung über die Spezifität dieser Nachweismethode konnte durch die Verwendung von C57BL/6-IFN-

$\alpha R^{0/0} . IL28R\alpha^{0/0}$ -Mäusen eindeutig geführt werden. Eine Infektion von Alveolarmakrophagen, zilierten Epithelzellen, Clarazellen, Typ I und Typ II Pneumozyten mit rPVM-GFP7 oder rPVM $\Delta NS1\Delta NS2$ ist prinzipiell nachzuweisen (siehe Abb. 30, 31, 32, 33). Durch Mehrfachfärbungen war es möglich Alveolarmakrophagen und zilierte Epithelzellen als diejenigen Zellen zu identifizieren, die nach Infektion mit rPVM-GFP7 $\Delta NS1\Delta NS2$ Typ I Interferone am Rezeptor gebunden hatten (siehe Abb. 30, 31, 32, 33). Dabei sei jedoch darauf hingewiesen, dass der Prozentsatz an Alveolarmakrophagen und zilierten Epithelzellen, die sich mit dem IFN- α und - β Signal überlagern, gering ist. Die übrigen IFN- α und - β spezifischen Signale konnten aufgrund der limitierten Mehrfachfärbungen keinem Zelltyp zugeordnet werden. Eine histologische Betrachtung der einzelnen Gefrierschnitte (siehe Abb. 30, 31, 32, 33) ließ jedoch auch bei den für das Bronchiolusepithel (*Bronchiolus terminalis*) typischen kubisch bis hochprismatischen nicht-zilierten Clarazellen oder bei den für die Alveolen typischen, flachen Typ I Pneumozyten (Alveolardeckzellen) und kleinen kubischen bzw. rundlichen Typ II Pneumozyten (Nischenzellen) rezeptorgebundenen IFN- α und - β vermuten. Bei diesen Zelltypen konnte kein gleichzeitiger Nachweis von einer PVM-Infektion (GFP-Expression) und rezeptorgebundenen Interferon beschrieben werden. Bei Alveolarmakrophagen war ein gleichzeitiger Nachweis von Infektion und rezeptorgebundenen Interferon nur einmal möglich (siehe Abb. 32). Bei den Zellen mit nachgewiesenen, rezeptorgebundenen Interferon handelt es sich wahrscheinlich um interferonproduzierende Zellen, die autokrin stimuliert wurden. Eine mögliche Begründung ergibt sich daraus, dass im direkten Umfeld der interferonproduzierenden Zelle eine extrem erhöhte Konzentration an Interferon vorlag, sodass vor allem autokrin gebundenes Interferon nachgewiesen wurde.

Durch die Etablierung dieser Nachweismethode wird es in weitergehenden Studien möglich sein, die zeitabhängige Wirkung sowohl von IFN- α als auch von IFN- β auf die entsprechenden Zielzellen in einem natürlichen Wirt genauer zu analysieren, wobei auch eine Unterscheidung von infizierten und interferonproduzierenden Zellen möglich ist.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das PVM-Mausmodell verwendet, um die Bedeutung der Typ I und Typ III Interferonantwort für die Pathogenese einer pneumoviralen Infektion zu analysieren. Hierzu wurden zunächst mit Hilfe der reversen Genetik rekombinante PVM-Mutanten hergestellt, bei denen die Gene für die NS-Proteine, welche vermutlich als Interferonantagonisten fungieren, deletiert sind. Die Charakterisierung der Replikationsfähigkeit der rPVM Δ NS-Mutanten erfolgte *in vitro* in Interferon-kompetenten und Interferon-inkompetenten Zelllinien. Ein zentraler Schritt innerhalb dieser Charakterisierung war die Untersuchung der Induktion von Interferonen *in vivo* und *in vitro* nach Infektion mit den rPVM Δ NS-Mutanten, wobei nachgewiesen wurde, dass die NS-Proteine von PVM als Interferonantagonisten fungieren.

In allen Interferon-kompetenten Zellkulturen wurde eine Attenuierung von rPVM Δ NS1, rPVM Δ NS2 und rPVM Δ NS1 Δ NS2 bezogen auf rPVM beobachtet. In allen Interferon-inkompetenten Zellkulturen konnte die Attenuierung der rPVM Δ NS-Mutanten nahezu vollständig revertiert werden. Nach Infektion mit den rPVM Δ NS-Mutanten wurde in verschiedenen Zelllinien eine Induktion von Typ I und Typ III Interferonen betrachtet, wobei Unterschiede in der Stärke der Interferon-Induktion nach Infektion mit den rPVM Δ NS-Mutanten vorhanden waren. Zusammenfassend war es möglich, die NS1- und NS2-Proteine von PVM in Analogie zu RSV eindeutig als Antagonisten der Interferonantwort zu identifizieren.

Die Untersuchung der protektiven Rolle von Typ I und Typ III Interferonen für die Replikation und Pathogenität von PVM bildete den zweiten Teil dieser Arbeit. Hierzu wurde die Replikationsfähigkeit und Pathogenität der rPVM Δ NS-Mutanten in verschiedenen Interferon-defizienten Mausstämmen getestet. Die Untersuchungen ergaben eine protektive Rolle von Typ I und Typ III Interferonen bei einer Infektion mit PVM, wobei den Typ I Interferonen ein effektiverer Einfluss zugeordnet werden konnte. Ein Vergleich von Replikation und Virulenz zwischen den verschiedenen Typ I oder Typ III oder Typ I/Typ III Interferonrezeptor-defizienten Mausstämmen belegte eine erhöhte Suszeptibilität der Typ I/Typ III Interferonrezeptor-defizienten Mäuse gegenüber einer Infektion mit den rPVM Δ NS-Mutanten. Eine vollständige Aufhebung der Attenuierung wurde auch in den Typ I/Typ III Interferonrezeptor-defizienten Mäusen nicht erlangt. Eine anti-apoptotische Funktion der NS-Proteine zusätzlich zu ihrer Wirkungsweise als Interferonantagonisten wurde aufgrund der unvollständigen Revertierung der Pathogenität der rPVM Δ NS-Mutanten in Typ I/Typ III Interferonrezeptor-defizienten Mäusen vermutet.

Der abschließende Teil dieser Dissertation befasste sich mit der Frage, welche Zellen bei einer natürlichen pulmonalen Infektion Interferone *in vivo* produzieren. *In vitro* wur-

de beobachtet, dass überraschenderweise nur sehr wenige virusinfizierte oder uninfizierte Zellen Typ I Interferone bilden. Der Nachweis darüber, welche Zellen während einer pulmonalen Infektion hauptsächlich Interferone *in vivo* produzieren, war aufgrund der fehlenden Eignung der kommerziell erhältlichen Interferon-Antikörper für intrazelluläre Gewebefärbungen nicht möglich. Dennoch gelang es abschließend durch eine neue Nachweismethode erstmals Zellen mit rezeptorgebundenen Interferon zu identifizieren, wobei es sich um zilierte Epithelzellen, Alveolarmakrophagen und vermutlich Clarazellen sowie Typ I und Typ II Pneumozyten handelte.

7 Summary

In this thesis the PVM mouse model was used to unveil the role of type I and type III interferone response for the pathogenesis of pneumoviral infection.

First, recombinant PVM Δ NS-mutants with single or combined deletions of the NS-genes were generated and replication efficiency characterization was analyzed in interferon-competent cells as well as in interferon-incompetent cells. A major point was to elucidate the NS-proteins of PVM as interferon antagonists. In interferon-competent cells the replication of rPVM Δ NS-mutants were significantly attenuated. These attenuation of all three rPVM Δ NS-mutants was almost completely reversed when interferon-incompetent cells were infected. Induction of type I and type III interferons was determined in different cell types after infection with rPVM Δ NS-mutants with differences in intensity of interferon induction. Thus, NS1- and NS2-proteins were clearly identified as interferon antagonists.

To analyze the protective capacity of type I and type III interferons with respect to replication and pathology of PVM, mice lacking functional receptors for either or both interferons were infected with rPVM or the respective Δ NS-mutants. The results indicated that both type I and type III interferons which one restricted replication and pathology of PVM, with the former playing the greater role. Interestingly, the replication and virulence of wild-type PVM were completely unaffected by the presence or absence of functional receptors to type I and type III interferon, indicating that both systems are strongly suppressed during infection. However, pretreatment of mice with type I interferon were protective against lethal rPVM challenge, whereas pretreatment with type III interferon delayed but did not prevent death. Finally, the PVM-NS-proteins appeared to delay apoptosis independently of its IFN-antagonistic activity that may contribute to the limited pathogenicity of the viruses in type I/type III receptor deficient mice.

In the last part type I interferon producing cells in a pneumoviral infection *in vivo* should be identified. It was documented that type I interferon producing cells are virus-infected cells as well as uninfected cells. Surprisingly, *in vitro* only few cells produced type I interferon during rPVM-GFP7 Δ NS1 Δ NS2 infection. Because the commercially available interferon antibodies are not qualified for intracellular tissue staining it was not possible to identify *in vivo* the interferon producing cells, but by inventing a new method it was possible to verify the binding of type I interferon to the cell surface receptor of ciliated epithelial cells, alveolar macrophages and presumably Clara cells and type I and type II pneumocytes.

Literatur

- Alansari, H. & Potgieter, L.N. 1993. Nucleotide sequence analysis of the ovine respiratory syncytial virus G glycoprotein gene. *Virology*, **196**(2), 873–877.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. & Flavell, R.A. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, **413**(6857), 732–738.
- Andrejeva, J., Childs, K.S., Young, D.F., Carlos, T.S., Stock, N., Goodbourn, S. & Randall, R.E. 2004. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(49), 17264–17269.
- Ank, N., Iversen, M.B., Bartholdy, C., Staeheli, P., Hartmann, R., Jensen, U.B., Dagnaes-Hansen, F., Thomsen, A.R., Chen, Z., Haugen, H., Klucher, K. & Paludan, S. P. 2008. An important role for type III Interferon (IFN- λ /IL-28) in TLR-induced antiviral activity. *J Immunol*, **180**(4), 2474–2485.
- Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O'Garra, A., Biron, C., Brière, F. & Trinchieri, G. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol*, **2**(12), 1144–1150.
- Atreya, P.L., Peeples, M.E. & Collins, P.L. 1998. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. *J Virol*, **72**(2), 1452–1461.
- Bartlett, N.W., Buttigieg, K., Kotenko, S.V. & Smith, G.L. 2005. Murine interferon lambdas (type III interferons) exhibit potent antiviral activity in vivo in a poxvirus infection model. *J Gen Virol*, **86**(6), 1589–1596.
- Basler, C.F. & García-Sastre, A. 2002. Viruses and the type I interferon antiviral system: induction and evasion. *Int Rev Immunol*, **21**(4-5), 305–337.
- Bermingham, A. & Collins, P.L. 1999. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(20), 11259–11264.
- Biron, C.A. & Brossay, L. 2001. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol*, **13**(4), 458–464.

- Bitko, V., Shulyayeva, O., Mazumder, B., Musiyenko, A., Ramaswamy, M., Look, D.C. & Barik, S. 2007. Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. *J Virol*, **81**(4), 1786–1795.
- Blount, R.E., Morris, J.A. & Savage, R.E. 1956. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med*, **92**(3), 544–549.
- Borden, E.C., Sen, G.C., Uze, G., Silverman, R.H., Ransohoff, R.M., Foster, G.R. & Stark, G.R. 2007. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov*, **6**(12), 975–990.
- Bossert, B., Marozin, S. & Conzelmann, K.-K. 2003. Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol*, **77**(16), 8661–8668.
- Bragança, J. & Civas, A. 1998. Type I interferon gene expression: differential expression of IFN-A genes induced by viruses and double-stranded RNA. *Biochimie*, **80**(8-9), 673–687.
- Bramley, A.M., Vitalis, T.Z., Wiggs, B.R. & Hegele, R.G. 1999. Effects of respiratory syncytial virus persistence on airway responsiveness and inflammation in guinea-pigs. *Eur Respir J*, **14**(5), 1061–1067.
- Broeckaert, F. & Bernard, A. 2000. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clin Exp Allergy*, **30**(4), 469–475.
- Buchholz, U.J., Finke, S. & Conzelmann, K.-K. 1999. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol*, **73**(1), 251–259.
- Buchholz, U.J., Ward, J.M., Lamirande, E.W., Heinze, B., Krempl, C.D. & Collins, P.L. 2009. Deletion of nonstructural proteins NS1 and NS2 from pneumonia virus of mice attenuates viral replication and reduces pulmonary cytokine expression and disease. *J Virol*, **83**(4), 1969–1980.
- Byrappa, S., Gavin, D.K. & Gupta, K.C. 1995. A highly efficient procedure for site-specific mutagenesis of full-length plasmids using Vent DNA polymerase. *Genome Res*, **5**(4), 404–407.

- Cannon, M.J., Openshaw, P.J. & Askonas, B.A. 1988. Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *J Exp Med*, **168**(3), 1163–1168.
- Carthew, P. & Sparrow, S. 1980. A comparison in germ-free mice of the pathogenesis of Sendai virus and mouse pneumonia virus infections. *J Pathol*, **130**(3), 153–158.
- Chambers, P., Barr, J., Pringle, C.R. & Easton, A.J. 1990. Molecular cloning of pneumonia virus of mice. *J Virol*, **64**(4), 1869–1872.
- Chambers, P., Pringle, C.R. & Easton, A.J. 1991. Genes 1 and 2 of pneumonia virus of mice encode proteins which have little homology with the 1C and 1B proteins of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, **72**(10), 2545–2549.
- Chanock, R.M. & Parrott, R.H. 1965. Acute respiratory disease in infancy and childhood: Present understanding and prospects for prevention. *Pediatrics*, **36**(Jul), 21–39.
- Cheng, X., Park, H.J., Zhou, H. & Jin, H. 2005. Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication. *J Virol*, **79**(22), 13943–13952.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**(1), 156–159.
- Choppin, P.W., Scheid, A. & Mountcastle, W.E. 1975. Proceedings: Paramyxoviruses, membranes, and persistent infections. *Neurology*, **25**(5), 494.
- Coccia, E.M., Severa, M., Giacomini, E., Monneron, D., Remoli, M.E., Julkunen, I., Cella, M., Lande, R. & Uzé, G. 2004. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*, **34**(3), 796–805.
- Collins, P.L. & Graham, B.S. 2008. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol*, **82**(5), 2040–2055.
- Collins, P.L. & Murphy, B.R. 2005. New generation live vaccines against human respiratory syncytial virus designed by reverse genetics. *Proc Am Thorac Soc*, **2**(2), 166–173.
- Collins, P.L. & Wertz, G.W. 1985. Nucleotide sequences of the 1B and 1C nonstructural protein mRNAs of human respiratory syncytial virus. *Virology*, **143**(2), 442–451.
- Collins, P.L., McIntosh, K. & Chanock, R.M. 2001. *Respiratory Syncytial virus in: Fields Virology*. Vol. 4th edition. D.M. Knipe & P.M. Howley.

- Cowton, V.M., McGivern, D.R. & Fearn, R. 2006. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol*, **87**(7), 1805–1821.
- Crompton, M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, **341**(2), 233–249.
- Crozat, K. & Beutler, B. 2004. TLR7: A new sensor of viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(18), 6835–6836.
- Decaudin, D., Geley, S., Hirsch, T., Castedo, M., Marchetti, P., Macho, A., Kofler, R. & Kroemer, G. 1997. Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res*, **57**(1), 62–67.
- Delhaye, S., Paul, S., Blakqori, G., Minet, M., Weber, F., Staeheli, P. & Michiels, T. 2006. Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(20), 7835–7840.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & e Sousa, C.R. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, **303**(5663), 1529–1531.
- DiFiore, J.W. & Wilson, J.M. 1994. Lung development. *Semin Pediatr Surg*, **3**(4), 221–232.
- Domachowske, J.B., Bonville, C.A., Gao, J.L., Murphy, P.M., Easton, A.J. & Rosenberg, H.F. 2000a. MIP-1alpha is produced but it does not control pulmonary inflammation in response to respiratory syncytial virus infection in mice. *Cell Immunol*, **206**(1), 1–6.
- Domachowske, J.B., Bonville, C.A., Dyer, K.D., Easton, A.J. & Rosenberg, H.F. 2000b. Pulmonary eosinophilia and production of MIP-1alpha are prominent responses to infection with pneumonia virus of mice. *Cell Immunol*, **200**(2), 98–104.
- Domachowske, J.B., Bonville, C.A., Easton, A.J. & Rosenberg, H.F. 2002. Differential expression of proinflammatory cytokine genes in vivo in response to pathogenic and nonpathogenic pneumovirus infections. *J Infect Dis*, **186**(1), 8–14.
- Downward, Julian. 2004. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol*, **15**(2), 177–182.
- Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I.Z., Al-Jumaah, A., Yang, K., Chapgier, A., Eidenschenk, C., Eid, P., Al Ghonaium, A., Tufenkeji, H., Frayha,

- H., Al-Gazlan, S., Al-Rayes, H., Schreiber, R.D., Gresser, I. & Casanova, J.-L. 2003. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet*, **33**(3), 388–391.
- Easton, A.J., Domachowske, J.B. & Rosenberg, H.F. 2004. Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, **17**(2), 390–412.
- Elliott, J., Lynch, O.T., Suessmuth, Y., Qian, P., Boyd, C.R., Burrows, J.F., Buick, R., Stevenson, N., Touzelet, O., Gadina, M., Power, U.F. & Johnston, J.A. 2007. Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase. *J Virol*, **81**(7), 3428–3436.
- Erlandsson, L., Blumenthal, R., Eloranta, M.L., Engel, H., Alm, G., Weiss, S. & Leanderson, T. 1998. Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Curr Biol*, **8**(4), 223–226.
- Evans, J.E., Cane, P.A. & Pringle, C.R. 1996. Expression and characterisation of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus. *Virus Res*, **43**(2), 155–161.
- Everard, M.L., Swarbrick, A., Wright, M., McIntyre, J., Dunkley, C., James, P.D., Sewell, H.F. & Milner, A.D. 1994. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. *Arch Dis Child*, **71**(5), 428–432.
- Faller-Müller, A., Falkenberg, P. & Maid, U. (eds). 1999. *Lexikon der Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Fearn, R. & Collins, P.L. 1999. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol*, **73**(7), 5852–5864.
- Fehrenbach, H., Schmiedl, A., Wahlers, T., Hirt, S.W., Brasch, F., Riemann, D. & Richter, J. 1995. Morphometric characterisation of the fine structure of human type II pneumocytes. *Anat Rec*, **243**(1), 49–62.
- Frey, S., Krempl, C.D., Schmitt-Gräff, A. & Ehl, S. 2008. Role of T cells in virus control and disease after infection with pneumonia virus of mice. *J Virol*, **82**(23), 11619–11627.
- Fuentes, S., Tran, K.S., Luthra, P., Teng, M.N. & He, B. 2007. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *J Virol*, **81**(15), 8361–8366.
- Gad, H.H., Dellgren, C., Hamming, O.J., Vends, S., Paludan, S.R. & Hartmann, R. 2009. Interferon-lambda is functionally an interferon but structurally related to the interleukin-10 family. *J Biol Chem*, **284**(31), 20869–20875.

- Goodbourn, S., Didcock, L. & Randall, R.E. 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol*, **81**(10), 2341–2364.
- Graham, B.S., Bunton, L.A., Wright, P.F. & Karzon, D.T. 1991. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *J Clin Invest*, **88**(3), 1026–1033.
- Guidotti, L.G. & Chisari, F.V. 2000. Cytokine-mediated control of viral infections. *Virology*, **273**(2), 221–227.
- Hacking, D. & Hull, J. 2002. Respiratory syncytial virus–viral biology and the host response. *J Infect*, **45**(1), 18–24.
- Haller, O. & Kochs, G. 2002. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, **3**(10), 710–717.
- Haller, O., Kochs, G. & Weber, F. 2006. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology*, **344**(1), 119–130.
- Hardy, M.P., Owczarek, C.M, Jermin, I.S., Ejdebäck, M. & Hertzog, P.J. 2004. Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics*, **84**(2), 331–345.
- Havell, E.A., Berman, B., Ogburn, C.A., Berg, K., Paucker, K. & Vilcek, J. 1975. Two antigenically distinct species of human interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**(6), 2185–2187.
- Henderson, F.W., Collier, A.M., Clyde, W.A. & Denny, F.W. 1979. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med*, **300**(10), 530–534.
- Hiscott, J., Pitha, P., Genin, P., Nguyen, H., Heylbroeck, C., Mamane, Y., Algarte, M. & Lin, R. 1999. Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. *J Interferon Cytokine Res*, **19**(1), 1–13.
- Hokeness, K.L., Kuziel, W.A., Biron, C.A. & Salazar-Mather, T.P. 2005. Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN-alpha/beta-induced inflammatory responses and antiviral defense in liver. *J Immunol*, **174**(3), 1549–1556.

- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C. & Taniguchi, T. 2005. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature*, **434**(7036), 1035–1040.
- Horsfall, F.L. & Curnen, E.C. 1946. Studies of pneumonia virus of mice (PVM). II. Immunological evidence of latent infection with virus in numerous mammalian species. *Journal of Experimental Medicine*, **93**, 139–150.
- Horsfall, F.L., Hahn, R.G. & Rickard, E.R. 1940. Four recent influenza epidemics: An experimental study. *J Clin Invest*, **19**(2), 379–392.
- Hou, W., Wang, X., Ye, L., Zhou, L., Yang, Z.Q., Riedel, E. & Ho, W.Z. 2009. Lambda interferon inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages. *J Virol*, **83**(8), 3834–3842.
- Isaacs, A. & Lindenmann, J. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **147**(927), 258–267.
- Iwamura, T., Yoneyama, M., Yamaguchi, K., Suhara, W., Mori, W., Shiota, K., Okabe, Y., Namiki, H. & Fujita, T. 2001. 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**(4), 375–388.
- Iwasak, A.I. & Medzhitov, R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*, **5**(10), 987–995.
- Jin, H., Cheng, X., Traina-Dorge, V.L., Park, H.J., Zhou, H., Soike, K. & Kemble, G. 2003. Evaluation of recombinant respiratory syncytial virus gene deletion mutants in African green monkeys for their potential as live attenuated vaccine candidates. *Vaccine*, **21**(25-26), 3647–3652.
- Karron, R.A., Wright, P.F., Crowe, J.E., Clements-Mann, M.L., Thompson, J., Makhele, M., Casey, R. & Murphy, B.R. 1997. Evaluation of two live, cold-passaged, temperature-sensitive respiratory syncytial virus vaccines in chimpanzees and in human adults, infants, and children. *J Infect Dis*, **176**(6), 1428–1436.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O. & Akira, S. 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*, **6**(10), 981–988.

- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, **275**(5303), 1132–1136.
- Koerner, I., Kochs, G., Kalinke, U., Weiss, S. & Staeheli, P. 2007. Protective role of beta interferon in host defense against influenza A virus. *J Virol*, **81**(4), 2025–2030.
- Kolumam, G.A., Thomas, S., Thompson, L.J., Sprent, J. & Murali-Krishna, K. 2005. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med*, **202**(5), 637–650.
- Kotelkin, A., Belyakov, I.M., Yang, L., Berzofsky, J.A., Collins, P.L. & Bukreyev, A. 2006. The NS2 protein of human respiratory syncytial virus suppresses the cytotoxic T-cell response as a consequence of suppressing the type I interferon response. *J Virol*, **80**(12), 5958–5967.
- Kotenko, V.S. & Donnelly, R.P. 2006. *Type III Interferons: The Interferon lambda family: in The Interferons*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- Kotenko, V.S., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H. & Donnelly, R.P. 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, **4**(1), 69–77.
- Krempl, C.D. & Collins, P.L. 2004. Reevaluation of the virulence of prototypic strain 15 of pneumonia virus of mice. *J Virol*, **78**(23), 13362–13365.
- Krempl, C.D., Lamirande, E.W. & Collins, P.L. 2005. Complete sequence of the RNA genome of pneumonia virus of mice (PVM). *Virus Genes*, **30**(2), 237–249.
- Krempl, C.D., Wnekowicz, A., Lamirande, E.W., Nayebagha, G., Collins, P.L. & Buchholz, U.J. 2007. Identification of a novel virulence factor in recombinant pneumonia virus of mice. *J Virol*, **81**(17), 9490–9501.
- Kroemer, G. & Reed, J.C. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, **6**(5), 513–519.
- Kumar, K.P., McBride, K.M., Weaver, B.K., Dingwall, C. & Reich, N.C. 2000. Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1. *Mol Cell Biol*, **20**(11), 4159–4168.

- Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J. & Finberg, R.W. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*, **1**(5), 398–401.
- LaFleur, D.W., Nardelli, B., Tsareva, T., Mather, D., Feng, P., Semenuk, M., Taylor, K., Buergin, M., Chinchilla, D., Roshke, V., Chen, G., Ruben, S.M., Pitha, P.M., Coleman, T.A. & Moore, P.A. 2001. Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J Biol Chem*, **276**(43), 39765–39771.
- Lasfar, A., Lewis-Antes, A., Smirnov, S.V., Anantha, S., Abushahba, W., Tian, B., Reuhl, K., Dickensheets, H., Sheikh, F., Donnelly, R.P., Raveche, E. & Kotenko, S.V. 2006. Characterization of the mouse IFN-lambda ligand-receptor system: IFN-lambdas exhibit antitumor activity against B16 melanoma. *Cancer Res*, **66**(8), 4468–4477.
- Levine, S., Klaiber-Franco, R. & Paradiso, P. R. 1987. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, **68**(9), 2521–2524.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. & Wang, X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**(4), 479–489.
- Lienenklaus, S., Cornitescu, M., Zietara, N., Lyszkiewicz, M., Gekara, N., Jabłńska, J., Edenhofer, F., Rajewsky, K., Bruder, B., Hafner, M., Staeheli, P. & Weiss, S. 2009. Novel reporter mouse reveals constitutive and inflammatory expression of IFN-beta in vivo. *J Immunol*, **183**(5), 3229–3236.
- Lindenmann, J. 1962. Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. *Virology*, **16**(Feb), 203–204.
- Ling, Z., Tran, K.C. & Teng, M.N. 2009. Human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I. *J Virol*, **83**(8), 3734–3742.
- Lo, M.S., Brazas, R.M. & Holtzman, M.J. 2005. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *J Virol*, **79**(14), 9315–9319.
- Marié, I., Durbin, J.E. & Levy, D.E. 1998. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J*, **17**(22), 6660–6669.

- Mifune, K., Desmyter, J. & Rawls, W.E. 1970. Effect of Exogenous Interferon on Rubella Virus Production in Carrier Cultures of Cells Defective in Interferon Production. *Infect Immun*, **2**(2), 132–138.
- Modrow, S., Falke, D. & Truyen, U. 2003. *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Mordstein, M., Kochs, G., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., Paludan, S.R., Klucher, K. & Staeheli, P. 2008. Interferon-lambda contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses. *PLoS Pathog*, **4**(9), e1000151.
- Mordstein, M., Neugebauer, E., Ditt, V., Jessen, B., Rieger, T., Falcone, F., Sorgeloos, F., Ehl, S., Mayer, D., Koch, G., Schwemmle, M., Günther, S., Drosten, C., Michiels, T. & Staeheli, P. 2010. Lambda interferon renders epithelial cells of respiratory and gastrointestinal tract resistant to viral infections. *J Virol*, **84**(11), 5670–5677.
- Murakawa, G.J., Zaia, J.A., Spallone, P.A., Stephens, D.A., Kaplan, B.E., Wallace, R.B. & Rossi, J.J. 1988. Direct detection of HIV-1 RNA from AIDS and ARC patient samples. *DNA*, **7**(4), 287–295.
- Onoguchi, K., Yoneyama, M., Takemura, A., Akira, S., Taniguchi, T., Namiki, H. & Fujita, T. 2007. Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J Biol Chem*, **282**(10), 7576–7581.
- Openshaw, P.J. 1995. Immunopathological mechanisms in respiratory syncytial virus disease. *Springer Semin Immunopathol*, **17**(2-3), 187–201.
- Oritani, K., Medina, K.L., Tomiyama, Y., Ishikawa, J., Okajima, Y., Ogawa, M., Yokota, T., Aoyama, K., Takahashi, I., Kincade, P.W. & Matsuzawa, Y. 2000. Limitin: An interferon-like cytokine that preferentially influences B-lymphocyte precursors. *Nat Med*, **6**(6), 659–666.
- Ostler, T., Davidson, W. & Ehl, S. 2002. Virus clearance and immunopathology by CD8(+) T cells during infection with respiratory syncytial virus are mediated by IFN-gamma. *Eur J Immunol*, **32**(8), 2117–2123.
- Paccaud, M.F. & Jacquier, C. 1970. A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Arch Gesamte Virusforsch*, **30**(4), 327–342.
- Pastey, M. K. & Samal, S. K. 1995. Nucleotide sequence analysis of the non-structural NS1 (1C) and NS2 (1B) protein genes of bovine respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, **76**(1), 193–197.

- Paz, S., Sun, Q., Nakhaei, P., Romieu-Mourez, R., Goubau, D., Julkunen, I., Lin, R. & Hiscott, J. 2006. Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **52**(1), 17–28.
- Pedersen, P.L. & Amzel, L.M. 1993. ATP synthases. Structure, reaction center, mechanism, and regulation of one of nature's most unique machines. *J Biol Chem*, **268**(14), 9937–9940.
- Pestka, S., Krause, C.D. & Walter, M.R. 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*, **202**(1), 8–32.
- Platanias, L.C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*, **5**(5), 375–386.
- Pringle, C.R. & Eglin, R.P. 1986. Murine pneumonia virus: seroepidemiological evidence of widespread human infection. *J Gen Virol*, **67**(6), 975–982.
- Ramaswamy, M., Shi, L., Varga, S.M., Barik, S., Behlke, M.A. & Look, D.C. 2006. Respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 specifically inhibits type I interferon signal transduction. *Virology*, **344**(2), 328–339.
- Randall, R.E. & Goodbourn, S. 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*, **89**(1), 1–47.
- Randhawa, J.S., Chambers, P., Pringle, C.R. & Easton, A.J. 1995. Nucleotide sequences of the genes encoding the putative attachment glycoprotein (G) of mouse and tissue culture-passaged strains of pneumonia virus of mice. *Virology*, **207**(1), 240–245.
- Raschke, W.C., Baird, S., Ralph, P. & Nakoinz, I. 1978. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, **15**(1), 261–267.
- Reiter, Z. 1993. Interferon—a major regulator of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J Interferon Res*, **13**(4), 247–257.
- Richter, C.B., Thigpen, J.E., Richter, C.S. & Mackenzie, J.M. 1988. Fatal pneumonia with terminal emaciation in nude mice caused by pneumonia virus of mice. *Lab Anim Sci*, **38**(3), 255–261.
- Roberts, R.M., Liu, L., Guo, Q., Leaman, D. & Bixby, J. 1998. The evolution of the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res*, **18**(10), 805–816.

- Rodriguez, W.J. 1999. Management strategies for respiratory syncytial virus infections in infants. *J Pediatr*, **135**(2 Pt 2), 45–50.
- Rosenberg, H.F., Bonvill, C.A., Easton, A.J. & Domachowske, J.B. 2005. The pneumonia virus of mice infection model for severe respiratory syncytial virus infection: identifying novel targets for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther*, **105**(1), 1–6.
- Rudolph, C.D. (ed). 2002. *Rudolph's pediatrics*. McGraw-Hill Professional.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**(4839), 487–491.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edn. Cold Spring Harbour Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**(12), 5463–5467.
- Sas, A., Jones, R. & Tyor, W. 2008. Intra-peritoneal injection of polyclonal anti-interferon alpha antibodies cross the blood brain barrier and neutralize interferon alpha. *Neurochem Res*, **33**(11), 2281–2287.
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N. & Taniguchi, T. 2000. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity*, **13**(4), 539–548.
- Scaife, J.F. 1966. The effect of lethal doses of x-irradiation on the enzymatic activity of mitochondrial cytochrome c. *Can J Biochem*, **44**(4), 433–448.
- Scheu, S., Dresing, P. & Locksley, R.M. 2008. Visualization of IFNbeta production by plasmacytoid versus conventional dendritic cells under specific stimulation conditions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(51), 20416–20421.
- Schlender, J., Bossert, B., Buchholz, U. & Conzelmann, K.-K. 2000. Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J Virol*, **74**(18), 8234–8242.
- Schwarze, J. & Gelfand, E.W. 2002. Respiratory viral infections as promoters of allergic sensitization and asthma in animal models. *Eur Respir J*, **19**(2), 341–349.

- Seeds, R.E., Gordon, S. & Miller, J.L. 2009. Characterisation of myeloid receptor expression and interferon alpha/beta production in murine plasmacytoid dendritic cells by flow cytometry. *J Immunol Methods*, **350**(1-2), 106–117.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T.E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., Ostrander, C., Dong, D., Shin, J., Presnell, S., Fox, B., Haldeman, B., Cooper, E., D., Taft., Gilbert, T., Grant, F.J., Tackett, M., Krivan, W., McKnight, G., Clegg, C., Foster, D. & Klucher, K.M. 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*, **4**(1), 63–68.
- Silverman, R.H. 1994. Fascination with 2-5A-dependent RNase: a unique enzyme that functions in interferon action. *J Interferon Res*, **14**(3), 101–104.
- Smith, A.L., Carrano, V.A. & Brownstein, D.G. 1984. Response of weanling random-bred mice to infection with pneumonia virus of mice (PVM). *Lab Anim Sci*, **34**(1), 35–37.
- Sommereyns, C., Paul, S., Staeheli, P. & Michiels, T. 2008. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog*, **4**(3), e1000017.
- Spann, K.M., Tran, K.-C., Chi, B., Rabin, R.L. & Collins, P.L. 2004. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J Virol*, **78**(8), 4363–4369.
- Spann, K.M., Tran, K.-C. & Collins, P.L. 2005. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J Virol*, **79**(9), 5353–5362.
- Staeheli, P., Grob, R., Meier, E., Sutcliffe, J.G. & Haller, O. 1988. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol Cell Biol*, **8**(10), 4518–4523.
- Teng, M.N. & Collins, P.L. 1999. Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein. *J Virol*, **73**(1), 466–473.
- Teng, M.N., Whitehead, S.S., Bermingham, A., Claire, M. St, Elkins, W.R., Murphy, B.R. & Collins, P.L. 2000. Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. *J Virol*, **74**(19), 9317–9321.

- Theofilopoulos, A.N., Baccala, R., Beutler, B. & Kono, D. H. 2005. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*, **23**, 307–336.
- Tian, B., Zhang, Y., Luxon, B.A., Garofalo, R.P., Casola, A., Sinha, M. & Brasier, A.R. 2002. Identification of NF-kappaB-dependent gene networks in respiratory syncytial virus-infected cells. *J Virol*, **76**(13), 6800–6814.
- Valarcher, J.F., Furze, J., Wyld, S., Cook, R., Conzelmann, K.-K. & Taylor, G. 2003. Role of alpha/beta interferons in the attenuation and immunogenicity of recombinant bovine respiratory syncytial viruses lacking NS proteins. *J Virol*, **77**(15), 8426–8439.
- van Pesch, V. & Michiels, T. 2003. Characterization of interferon-alpha 13, a novel constitutive murine interferon-alpha subtype. *J Biol Chem*, **278**(47), 46321–46328.
- van Pesch, V., Lanaya, H., Renaud, J.-C. & Michiels, T. 2004. Characterization of the murine alpha interferon gene family. *J Virol*, **78**(15), 8219–8228.
- Walravens, K., Kettmann, R., Collard, A., Coppe, P. & Burny, A. 1990. Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses. *J Gen Virol*, **71**(12), 3009–3014.
- Wathelet, M.G., Lin, C.H., Parekh, B.S., Ronco, L.V., Howley, P.M. & Maniatis, T. 1998. Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell*, **1**(4), 507–518.
- Weigl, J.A., Puppe, W. & Schmitt, H.J. 2001. Incidence of respiratory syncytial virus-positive hospitalizations in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **20**(7), 452–459.
- Weigl, J.A., Puppe, W. & Schmitt, H.J. 2002. Seasonality of respiratory syncytial virus-positive hospitalizations in children in Kiel, Germany, over a 7-year period. *Infection*, **30**(4), 186–192.
- Weir, E.C., Brownstein, D.G., Smith, A.L. & Johnson, E.A. 1988. Respiratory disease and wasting in athymic mice infected with pneumonia virus of mice. *Lab Anim Sci*, **38**(2), 133–137.
- Welliver, T.P., Garofalo, R.P., Hosakote, Y., Hintz, K.H., Avendano, L., Sanchez, K., Vellozo, L., Jafri, H., Chavez-Bueno, S., Ogra, P.L., McKinney, L., Reed, J.L. & Welliver, R.C. 2007. Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses. *J Infect Dis*, **195**(8), 1126–1136.

- Whitehead, S.S., Bukreyev, A., Teng, M.N., Firestone, C.Y., Claire, M. St, Elkins, W. R., Collins, P.L. & Murphy, B.R. 1999. Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. *J Virol*, **73**(4), 3438–3442.
- Williams, B.R. 1999. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene*, **18**(45), 6112–6120.
- Wright, P.F., Karron, R.A., Madhi, S.A., Treanor, J.J., King, J.C., O’Shea, A., Ikizler, M.R., Zhu, Y., Collins, P.L., Cutland, C., Randolph, V.B., Deatly, A.M., Hackell, J.G., Gruber, W.C. & Murphy, B.R. 2006. The interferon antagonist NS2 protein of respiratory syncytial virus is an important virulence determinant for humans. *J Infect Dis*, **193**(4), 573–581.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. & Akira, S. 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*, **169**(12), 6668–6672.
- Yang, K., Puel, A., Zhang, S., Eidenschenk, C., Ku, C.-L., Casrouge, A., Picard, C., von Bernuth, H., Senechal, B., Plancoulaine, S., Al-Hajjar, S., Al-Ghonaium, A., Maródi, L., Davidson, D., Speert, D., Roifman, C., Garty, B.-Z., Ozinsky, A., Barrat, J.F., Coffman, R.L., Miller, R.L., Li, X., Lebon, P., Rodriguez-Gallego, C., Chapel, H., Geissmann, F., Jouanguy, E. & Casanova, J.-L. 2005. 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**(5), 465–478.
- Yoshimura, A., Naka, T. & Kubo, M. 2007. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol*, **7**(6), 454–465.
- Zhou, Z., Hamming, O.J., Ank, N., Paludan, S.R., Nielsen, A.L. & Hartmann, R. 2007. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *J Virol*, **81**(14), 7749–7758.

A Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKT	PKB oder Proteinkinase B
Amp	Ampicillin
Bad	<i>BCL2-associated agonist of cell death</i>
BAL	Bronchoalveolar Lavage
bp	Basenpaar
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CCA	<i>chimpanzee coryza agent</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CpG-ODN	CpG-Oligodesoxynukleotide
CRSV	Caprines Respiratorisches Synzytialvirus
DAB	3,3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride
Denat.	Denaturierung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	<i>Dulbeccos modified essential medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosintriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ED₅₀	mittlere Effektivdosis
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
Elong.	Elongation
EMEM	<i>Eagle's minimal essential medium</i>
F	Fusionsprotein
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
G	Glykoprotein
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GMEM	<i>Glasgow minimal essential medium</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
h	Stunde
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HRSV	Humanes Respiratorisches Synzytialvirus
IFN	Interferon
IFNAR1	IFN- α -Rezeptor1
IFNAR2	IFN- α -Rezeptor2

IRF	<i>IFN regulatory factor</i>
IKK-ϵ	<i>oncogenic kinase of the IKK family</i>
IPS1	<i>interferon-beta promoter stimulator 1</i>
ISGF3	<i>IFN stimulated gene factor 3</i>
ISGs	<i>IFN-stimulated genes</i>
JAK	Janus-aktivierte Kinase
kb	kilo Basenpaare
kDa	kilo Dalton
L	Polymerase
LB	Luria Broth
MEFs	embryonale Mausfibroblasten
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
MDA-5	<i>melanoma differentiation-associated gene-5</i>
min	Minuten
MIP-1-α	<i>Macrophage inflammatory protein alpha-1</i>
MitoPT	<i>Mitochondrial Permeability Transition</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
Mx-Protein	<i>Myxovirus resistance protein</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
N	Nukleoprotein
NF-κB	Nuklear Faktor κ B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NS1-Protein	Nichtstrukturprotein 1
NS2-Protein	Nichtstrukturprotein 2
nt	Nukleotid
OAS	2',5'-Oligoadenylatsynthetase
OD	Optische Dichte
ORSV	Ovines Respiratorisches Synzytialvirus
P	Phosphoprotein
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pDCs	Plasmazytoide dendritische Zellen
PFU	<i>Plaque forming unit</i>
PFA	Paraformaldehyd
pI	Isoelektrischer Punkt
PI3-K	Phosphatidylinosytol-3-Kinase
PKR	Proteinkinase R

PVM	Pneumovirus der Maus
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
RLU	<i>relative light units</i>
rPVM	rekombinantes Pneumovirus der Maus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP-Komplex	Ribonukleoproteinkomplex
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
s	Sekunde
SH	hydrophobes Protein
ssDNA	einzelsträngige DNA
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBK-1	<i>TANK-binding kinase-1</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TMEV	<i>Theiler's murine Encephalitis-Virus</i>
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon β</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
VSV	Vesikular-Stomatitis-Virus
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen
w/v	Verhältnis Masse zu Volumen
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

Veröffentlichungen

Buchholz, U. J., Ward, J. M., Lamirande, E. W., Heinze, B., Krempl, C. D., Collins, P. L. 2009. Deletion of nonstructural proteins NS1 and NS2 from pneumonia virus of mice attenuates viral replication and reduces pulmonary cytokine expression and disease. *J Virol*, **83**, 1969-1980.

Heinze, B., Frey, S., Mordstein, M., Schmitt-Gräff, A., Ehl, S., Buchholz, U., Collins, P., Stäheli, P., Krempl, C. D. 2010. Both Nonstructural Proteins 1 and 2 of Pneumonia Virus of Mice are Inhibitors of the Interferon Type I and III Response In Vivo, *Submitted*

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Dr. Christine Krempf für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Ebenso danke ich ihr herzlich für die Bereitstellung einer interessanten und vielschichtigen Themenstellung, für die stets motivierenden und lehrreichen Worte im Laboralltag sowie für ihre Diskussionsbereitschaft die meine Promotion stets positiv begleitet hat.

Ebenfalls bedanke ich mich bei PD Dr. Gabriele Pradel und Prof. Dr. Axel Rethwilm für ihr Interesse an dieser Arbeit und ihre Bereitschaft, die vorliegende Dissertation zu begutachten.

Dr. Harry Harms danke ich für Anfertigung der phantastischen Aufnahmen am konfokalen Mikroskop, die in oft stundenlangen Sitzungen entstanden sind. Prof. Peter Stäheli danke ich die fachliche Unterstützung und sein stetiges Interesse an den Fragestellungen meiner Promotion.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Ursula Mädler für die zahlreichen Tipps und Tricks bei der Durchführung der Immunhistochemie sowie für Ihre stets hilfreichen und aufmunternden Worte bedanken.

Den ehemaligen Mitgliedern der Pneumorunde in Freiburg sowie allen Mitgliedern des Instituts für Virologie und Immunbiologie danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und eine angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein Dank gilt auch Dr. Stefanie Frey, Dipl. biol. Markus Mordstein und Prof. Annette Schmitt-Gräff für eine erfolgreiche Kooperation bei wichtigen Experimenten.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern und besonders bei Stephan für die bedingungslose Unterstützung sowie für die unendliche Geduld in den vergangenen Studien- und Promotionsjahren bedanken. Durch „Eure“ Hilfe wurde diese Dissertation erst möglich.

Danke

Curriculum Vitae

Britta Heinze

Adresse Lindahlstraße 2
97070 Würzburg
Geburtsdatum 14.09.1979

Hochschulbildung

Zeitraum April 2010
Ort Universitätsklinikum Würzburg, Zentrum für Innere Medizin
Position Postdoc AG Prof. Dr. B. Allolio, Endokrinologie

Zeitraum SS 2008 - WS 2009/2010
Ort Universität Würzburg, Institut für Immunbiologie und Virologie
Position Promotionsstudent bei der GSLS Würzburg (ab 3. Semester)

Zeitraum SS 2007 - WS 2007/2008
Ort Universität Freiburg, Institut für Mikrobiologie und Hygiene
Position Promotionsstudent 1. und 2. Semester, Universität Freiburg

Zeitraum November 2005
Ort Universitätsklinikum Freiburg, Institut für Mikrobiologie und Hygiene
Position wissenschaftliche Mitarbeiterin, Arbeitsgruppe Dr. C. Krempf

Zeitraum Mai 2005
Ort Universität Osnabrück
Position Abschluss des Studiums als Dipl.-Biol.

Zeitraum August 2004 - Mai 2005
Ort Universität Osnabrück, Abteilung für Tierphysiologie
Position Diplomarbeit mit dem Thema: Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen zum Ammoniak-Transport über das Darmepithel von Säugetieren.

Zeitraum	Oktober 1999 - August 2004
Ort	Universität Osnabrück
Position	Diplomstudiengang

Schulbildung

Zeitraum	Mai 1999
Ort	Windthorst-Gymnasium Meppen
Position	Allgemeine Hochschulreife

Zeitraum	August 1993 - Mai 1999
Ort	Windthorst-Gymnasium Meppen

Würzburg, 9. Mai 2011