



**Die Bedeutung einer forcierenden  
Virusreplikation auf die Aktivierung des  
adaptiven Immunsystems und Zerstörung der  
Selbsttoleranz**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Nadine Honke**  
aus Leverkusen

Düsseldorf, März 2014

aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl Sebastian Lang

Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2014

*Meiner Familie gewidmet*

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	I
<b>Vorwort</b>	IV
<b>1. Zusammenfassung</b>	1
<b>2. Summary</b>	2
<b>3. Einleitung</b>	3
<b>3.1 Das Immunsystem</b>	3
<b>3.1.1 Das angeborene Immunsystem</b>	3
<b>3.1.1.1 Zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems</b>	3
<b>3.1.1.1.1 Dendritische Zellen</b>	4
<b>3.1.1.1.2 Makrophagen</b>	6
<b>3.1.1.2 Humorale Komponente des angeborenen Immunsystems</b>	7
<b>3.1.1.2.1 Typen von Interferonen</b>	7
<b>3.1.1.2.2 Der Typ I Interferonsignalweg</b>	8
<b>3.1.1.2.3 UBP43 (<i>Usp18</i>) ein Inhibitor des Typ I Interferonsignalweges</b>	10
<b>3.1.2 Das adaptive Immunsystem</b>	11
<b>3.1.3 Sekundäre lymphatische Organe</b>	13
<b>3.1.3.1 Milz</b>	13
<b>3.1.3.2 Lymphknoten</b>	15
<b>3.2 Virusmodelle</b>	16
<b>3.2.1 Das Vesicular Stomatitis Virus (VSV)</b>	16
<b>3.2.2 Das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV)</b>	19
<b>3.3 T-Zell-Toleranz und Autoimmunität</b>	21
<b>3.3.1 Diabetes mellitus Typ I</b>	23
<b>3.3.1.1 Mausmodelle des Diabetes mellitus Typ I</b>	24
<b>3.3.1.2 Das RIP-GP Mausmodell</b>	24
<b>3.3.1.3 Das RIP-NP Mausmodell</b>	25
<b>3.3.2 Immunsupprimierende Medikamente</b>	25
<b>3.4 Fragestellung und Zielsetzung</b>	27
<b>4. Ergebnisse (Publikationen)</b>	28
<b>4.1 Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus</b>	29
Zusammenfassung (Abstract)	29
Einleitung (Introduction)	29
Ergebnisse (Results)	30
Diskussion (Discussion)	34
Danksagung (Acknowledgements)	35
Beitrag der Autoren (Author contributions)	35
Referenzen (References)	35
Online Methoden (Online Methods)	36

Zusätzliche Abbildungen (Supplementary Figures)	37
Abkürzungsverzeichnis (List of abbreviations)	41
Abbildungsverzeichnis (List of tables)	42
Anteilerklärung	45
<b>4.2 <i>Usp18</i> driven enforced viral replication in dendritic cells contributes to break of immunological tolerance in autoimmune diabetes</b>	46
Zusammenfassung (Abstract)	47
Einleitung (Introduction)	47
Autor Kurzfassung (Author summary)	48
Ergebnisse (Results)	48
Diskussion (Discussion)	54
Methoden (Methods)	55
Unterstützende Informationen (Supporting Information)	56
Danksagung (Acknowledgements)	57
Beitrag der Autoren (Author Contribution)	57
Referenzen (References)	57
Abkürzungsverzeichnis (List of abbreviations)	59
Abbildungsverzeichnis (List of tables)	61
Anteilerklärung	63
<b>4.3 Tunicamycin inhibits Diabetes</b>	64
Zusammenfassung (Abstract)	65
Einleitung (Introduction)	65
Material und Methoden (Materials and Methods)	66
Ergebnisse (Results)	67
Diskussion (Discussion)	71
Danksagung (Acknowledgements)	71
Referenzen (References)	71
Abkürzungsverzeichnis (List of abbreviations)	73
Abbildungsverzeichnis (List of tables)	74
Anteilerklärung	75
<b>5. Allgemeine Diskussion</b>	76
Schlussfolgerung / Ausblick	85
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	86
<b>7. Eidesstattliche Erklärung</b>	117
<b>8. Danksagung</b>	118
<b>9. Publikationen</b>	119
<b>10. Anhang</b>	121
<b>10.1 Abkürzungsverzeichnis</b>	121

<b>10.2</b>	Abbildungsverzeichnis	124
<b>10.3</b>	Tabellenverzeichnis	124

## VORWORT

Frau Nadine Honke hat ihre kumulative Dissertation mit dem Thema „Die Bedeutung einer forcierenden Virusreplikation auf die Aktivierung des adaptiven Immunsystems und Zerstörung der Selbsttoleranz,, angefertigt. Die Grundlage dieser kumulativen Dissertation sind folgende Publikationen:

### 1. Publikation:

**Honke N**, Shaabani N, Cadeddu G, Sorg UR, Zhang DE, Trilling M, Klingel K, Sauter M, Kandolf R, Gailus N, van Rooijen N, Burkart C, Baldus SE, Grusdat M, Löhning M, Hengel H, Pfeffer K, Tanaka M, Häussinger D, Recher M, Lang PA, Lang KS

Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus.

*Nat Immunol* 2012; **13**(1):51-7. doi:10.1038/ni.2169.

### 2. Publikation:

**Honke N**, Shaabani N, Zhang DE, Xu HC, Häussinger D, Recher M, Löhning M, Lang PA, Lang KS

*Usp18* driven enforced viral replication in dendritic cells contributes to break of immunological tolerance in autoimmune diabetes.

*PLoS Pathog* 2013; **9**(10):e1003650. doi:10.1371/journal.ppat.1003650

### 3. Publikation:

Shaabani N, **Honke N**, Lang PA, Görg B, Proksch P, Gailus N, Gotoh T, Häussinger D, Lang KS

Tunicamycin inhibits diabetes.

*Cell Physiol Biochem* 2012; **29**(3-4):595-602. doi:10.1159/000338

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Virale Infektionen führen zu einer starken Immunaktivierung. Ein Teil dieser Aktivierung ist auf eine Stimulation von Toll-like Rezeptoren (TLR) zurückzuführen, die während einer Virusinfektion deutlich stärker verläuft als eine Aktivierung ausschließlich über Toll-like Rezeptor Liganden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Immunsystem über spezialisierte Zellen verfügt, die eine virale Replikation gewollt zulassen. Diese forcierende Virusreplikation führt zu einer ausreichenden Produktion von Antigenen und Toll-like Rezeptor Liganden, die zu einer aktiven Immunantwort beitragen, solange die Viren im Körper persistieren. Welche Rolle eine forcierende Virusreplikation hierbei speziell in der Beeinflussung von Immunität und Autoimmunität hat wurde in der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht. Anhand unterschiedlicher muriner Infektions- und Erkrankungsmodelle konnten folgende neue Erkenntnisse im Hinblick auf die Virusvermehrung und dessen Einfluss auf die Aktivierung des adaptiven Immunsystems und die Entstehung eines Autoimmundiabetes (Typ I Diabetes) zusammengefasst werden.

In einem ersten Ansatz wurde das Vesicular Stomatitis Virus (VSV), ein zytopathisches Virus aus der Familie der *Rhabdoviridae*, in einem Mausinfektionsmodell verwendet. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass das VSV in Wildtyp Mäusen in den CD169<sup>+</sup> metallophilen Marginalzonenmakrophagen der Milz repliziert. Eine Sortierung dieser Zellen mittels Durchflusszytometrie und eine anschließende Analyse der Genexpression mittels einer Real Time PCR zeigten erstmalig, dass eine ansteigende virale Replikation in den CD169<sup>+</sup> Zellen mit einer Überexpression von *Usp18*, einem Inhibitor des Typ I Interferon Signalweges, korreliert. Eine *Usp18*-abhängige forcierende Virusreplikation in den CD169<sup>+</sup> Makrophagen ist hierbei für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems von erheblicher Bedeutung. Dieser Befund ließ sich durch eine Depletierung der CD169<sup>+</sup> Zellen oder einem genetischen Ausschalten von *Usp18* in den *Usp18*<sup>-/-</sup> Mäusen bestätigen. Beides führte zu einer Verschlechterung der adaptiven Immunantwort gegen ein zytopathisches Virus. Eine daraus resultierende geringere Produktion virus-spezifischer Antikörper führte schließlich in den *Usp18*<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer Ausbreitung von Virus in die neuronalen Gewebe und letztendlich zum Tod der Versuchstiere.

In einem zweiten Ansatz wurde das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) aus der Familie der *Arenaviridae* in einem Autoimmundiabetes-Modell (RIP-GP Modell) verwendet. Da RIP-GP Mäuse das LCMV-Glykoprotein (LCMV-GP) auf den pankreatischen  $\beta$ -Inselzellen exprimieren, kann eine Infektion mit LCMV zu einer Induktion eines Autoimmundiabetes führen. In diesem Modell konnte gezeigt werden, dass eine *Usp18*-abhängige Replikation von LCMV in dendritischen Zellen essenziell für eine Aktivierung Autoantigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist. Dies zeigt, dass der neu entdeckte Mechanismus einer forcierenden Virusreplikation wichtig ist, um die Insulin produzierenden  $\beta$ -Inselzellen im Pankreas zu zerstören und letztendlich einen Typ I Diabetes (Autoimmundiabetes) zu induzieren. Eine Inhibierung der Virusreplikation, beispielsweise durch eine Depletierung Antigen-präsentierender Zellen, ein genetisches Ausschalten von *Usp18* oder durch Verwendung des pharmakologischen Inhibitors Ribavirin, konnte hingegen eine Vermehrung autoreaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen und letztendlich die Entstehung eines Typ I Diabetes unterbinden.

In einem dritten und letzten Ansatz konnte das Antibiotikum Tunicamycin als ein neues immunsupprimierendes Medikament entdeckt werden. Durch eine Inhibierung der Proliferation und zytotoxischen Aktivität autoreaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte der Entstehung eines Typ I Diabetes in den mit Tunicamycin-behandelten Mäusen vorgebeugt werden.

Zusammenfassend zeigen die präsentierten Daten in dieser Arbeit einen neuen Mechanismus der Virusreplikation, mit dem es dem angeborenen Immunsystem einerseits gelingt eine virale Replikation durch die Produktion von Typ I Interferon zu inhibieren und andererseits ausreichend virales Antigen für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems bereitzustellen. Bei einer Fehlregulation des Immunsystems kann dieser sonst so bedeutende Mechanismus einer forcierenden Virusreplikation fatale Folgen haben und zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie z.B. einem Typ I Diabetes beitragen. Inwieweit dieser Mechanismus auch bei anderen Pathogenen wichtig ist oder therapeutisch genutzt werden kann, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Abschließend konnte ein neues immunsupprimierendes Medikament, namens Tunicamycin, entdeckt werden, mit dem sich T-Zell-abhängige Autoimmunerkrankungen, durch Inhibition autoreaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen, vermeiden lassen. Das Ziel zukünftiger Untersuchungen ist es die Applikationsweise und -dosis festzulegen sowie mögliche Nebenwirkungen zu erfassen um Tunicamycin für die klinische Anwendung zu prüfen.

## 2. SUMMARY

Viral infections lead to a strong immune activation. A part of this activation is due to a stimulation of Toll-like receptors (TLR), which is much stronger during a viral infection than the activation exclusively via Toll-like receptor ligands.

In the present work, it was hypothesized that the immune system has specialized cells that deliberately allow viral replication. This enforced virus replication leads to sufficient production of antigens and Toll-like receptor ligands to contribute to an active immune response as long as the viruses persist in the body. The specific role of enforced viral replication in mediating immunity and autoimmunity was investigated in detail in the present work. By using different mouse models of infection and disease, the following new findings, regarding virus replication and its influence on the activation of the adaptive immune system and the development of autoimmune diabetes (type I diabetes) are summarized below.

In a first approach, the vesicular stomatitis virus (VSV), a cytopathic virus of the family Rhabdoviridae, was used in a mouse infection model. Using immunofluorescence microscopy, it was shown that in wild-type mice the VSV replicated in the CD169<sup>+</sup> metallophilic marginal zone macrophages of the spleen. Sorting these cells by flow cytometry and subsequent analysis of gene expression by real-time PCR, showed for the first time that an increased viral replication in the CD169<sup>+</sup> cells correlated with an overexpression of *Usp18*, an inhibitor of the type I interferon signaling pathway. *Usp18*-dependent enforced viral replication in the CD169<sup>+</sup> macrophages is of considerable importance for the activation of the adaptive immune system. This finding was confirmed by depletion of CD169<sup>+</sup> cells or genetic knockout of *Usp18* in *Usp18*<sup>-/-</sup> mice, both leads to deterioration of the adaptive immune response against a cytopathic virus. This was accompanied by a lower production of virus-specific antibodies in the *Usp18*<sup>-/-</sup> mice which led to virus spreading into neuronal tissue, and finally to death of the laboratory animals.

In a second approach, the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) of the family Arenaviridae was used in an autoimmune diabetes model (RIP-GP model). As the RIP-GP mice express the LCMV glycoprotein (LCMV-GP) on the pancreatic beta-islet cells, infection with LCMV leads to induction of autoimmune diabetes. In this model, it was shown that *Usp18*-dependent replication of LCMV in dendritic cells is essential for the activation of autoantigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells. This demonstrates that the newly discovered mechanism of enforced viral replication plays an important role in destroying the insulin-producing beta-islet cells of the pancreas and finally in inducing type I diabetes (autoimmune diabetes). Inhibition of viral replication, for example either by depletion of antigen-presenting cells, genetic knockout of *Usp18* or by using the pharmacological inhibitor Ribavirin, could prevent the proliferation of autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells and finally the development of type I diabetes.

In a third and last approach the antibiotic Tunicamycin was discovered as a new immunosuppressive drug. By inhibition of the proliferation and cytotoxic activity of autoreactive CD8<sup>+</sup> T-cells, the development of type I diabetes could be prevented in Tunicamycin-treated mice.

In summary, the data presented in this work describe a novel mechanism of virus replication, which is dually crucial for the inhibition of viral replication through the production of type I interferon and also for the production of sufficient viral antigen to activate the adaptive immune system. In a dysregulated immune system, the otherwise so meaningful mechanism of enforced viral replication, can have fatal consequences and contribute to the development of autoimmune diseases such as type I diabetes. To what extent this mechanism is important for other pathogens or is exploitable therapeutically is the subject of current investigations. Finally, a new immunosuppressive drug, Tunicamycin, was discovered, which is capable of preventing T-cell-dependent autoimmune diseases by inhibiting autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells. The aim of future investigations is to determine the route of administration and dose and to detect possible adverse effects in order to approve the drug for clinical use.

### 3. EINLEITUNG

#### 3.1 Das Immunsystem

Der Kontakt des menschlichen Körpers mit zahlreichen Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilzen, Parasiten und Prionen führt nur in vereinzelt Fällen zu Gewebeschäden oder zur Entstehung einer ernstesten Erkrankung. Verantwortlich für den Schutz des Körpers vor dem Eindringen von Pathogenen oder deren schnelle Eliminierung ist das Immunsystem, ein System aus spezialisierten Zellen, lymphatischen Organen und humoralen (löslichen) Faktoren, die den Körper vor Infektionen schützen sollen. Das Immunsystem wird hierbei in zwei Bereiche, ein angeborenes und ein erworbenes (adaptives) Immunsystem, unterteilt, die in engem Kontakt zu einander stehen und nur gemeinsam eine effektive Immunantwort induzieren können. Das Immunsystem soll nicht nur Schutz vor dem Eindringen von Pathogenen bieten, sondern auch vor Autoimmunität und der Entstehung von Tumoren schützen (Neumann, 2008).

##### 3.1.1 Das angeborene Immunsystem

Den ersten Schutz vor einer Infektion stellen die äußeren und inneren Epitheloberflächen des Körpers dar. Abgesehen von der reinen physikalischen Barriere der Epithelien verfügt der Körper auch über chemische Barrieren mit anti-mikrobieller Wirkung, die das Eindringen von Pathogenen in den Körper verhindern sollen. Hierzu gehören beispielsweise die saure Umgebung im Magen sowie die Verdauungsenzyme im Darm (Pepsin). Des Weiteren weisen die sezernierten Enzyme im Speichel und der Tränenflüssigkeit wie das Lysozym aber auch Peptide wie die  $\alpha$ -Defensine der Darmschleimhaut und die  $\beta$ -Defensine der Lungenepithelien anti-mikrobielle Eigenschaften auf (Hof & Dörries, 2009). Pathogene, die trotz allem die erste äußere Barriere überwinden und in die Gewebe gelangen, treffen dort auf die zelluläre und humorale (lösliche) Komponente des angeborenen Immunsystems.

##### 3.1.1.1 Zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems

Zur zellulären Komponente des angeborenen Immunsystems gehören die Makrophagen, die dendritischen Zellen und die Neutrophilen Granulozyten, die durch ihre hohe Phagozytoseaktivität gekennzeichnet sind. Des Weiteren zählen die Mastzellen und die Natürlichen Killerzellen (NK) zur zellulären Komponente. Die Mastzellen bieten einen Schutz gegen zahlreiche bakterielle Infektionen und sind ein wichtiger Bestandteil allergischer Reaktionen

(Wesolowski & Paumet, 2011). Die natürlichen Killerzellen hingegen sind auf die Zerstörung virusinfizierter und maligner Zellen spezialisiert (Campbell & Hasegawa 2013).

#### **3.1.1.1.1 Dendritische Zellen**

Die dendritischen Zellen (DCs) wurden erstmalig im Jahre 1973 beschrieben (Steinman & Cohn 1973). Sie sind eine heterogene Gruppe von Zellen, die sich hinsichtlich ihrer Entwicklung, ihrer Oberflächenmarker und ihrer immunologischen Funktionen voneinander unterscheiden (Belz & Nutt, 2012). Die dendritischen Zellen werden in zwei große Hauptpopulationen eingeteilt: die konventionellen dendritischen Zellen (cDCs), die auch unter dem Namen myeloide dendritische Zellen (myDC) bekannt sind, und die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) (Ng & Gommerman, 2013; Belz & Nutt, 2012). Die konventionellen dendritischen Zellen (cDC) sind die wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems (Bar-On & Jung, 2010). Sie sind in allen lymphoiden Organen, den Grenzflächen der Gewebe und im Bindegewebe lokalisiert und sie sind durch eine hohe Expression von MHC Klasse II Proteinen sowie dem Integrin CD11c auf ihrer Zelloberfläche gekennzeichnet (Hashimoto et al., 2011). Als naive, unreife Zellen sind sie darauf spezialisiert, Antigene aus dem Blut oder den peripheren Organen aufzunehmen, zu prozessieren und über MHC-Klasse I oder Klasse II Proteine den T-Zellen zu präsentieren. Unreife dendritische Zellen können exogene Antigene über Makropinozytose, Phagozytose oder über rezeptor-vermittelte Endozytose aus der Umgebung aufnehmen. Eine Unterscheidung zwischen körperfremden und körpereigenen Antigenen erfolgt hierbei über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (engl. pattern-recognition receptors, PRRs). Diese können konservierte Muster, die pathogen-assoziierten molekularen Muster (engl. pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), die auf körpereigenen Zellen nicht vorzufinden sind, auf der Oberfläche der Pathogene erkennen (Murphy et al., 2009). Einige der wichtigsten Mustererkennungsrezeptoren sind die Toll-like Rezeptoren, die C-Typ-Lektine und NOD-Proteine (engl. nucleotide-binding oligomerization domain protein), die unterschiedliche molekulare Muster von Pathogenen erkennen können. Pathogene können nach Opsonisierung auch über Komplementrezeptoren und Fc-Rezeptoren aufgenommen werden. Diese exogenen Antigene werden im Endosom von Proteasen prozessiert und schließlich als Peptide über MHC-Klasse II Proteine auf der Oberfläche von dendritischen Zellen präsentiert. Endogene Antigene werden hingegen im Proteasom prozessiert und als Peptide über MHC-Klasse I Proteine auf der Oberfläche präsentiert. Antigen-präsentierende Zellen sind auch in der Lage Peptide von exogenen Antigenen über MHC-Klasse I Proteine zu präsentieren. Die dendritischen Zellen sind die bedeutendsten Zellen der Kreuzpräsentation (Kurts, 2013; Heath & Carbone, 2009; Bedoui et al., 2009) und sind zudem für das Kreuzpriming (Stimulation) (Jung et al., 2002) und für die Kreuztoleranz (Kurts et al., 2001)

zuständig. Die Kreuzpräsentation ist besonders wichtig, um eine zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen exogene Pathogene, die Antigen-präsentierende Zellen nicht direkt infizieren, induzieren zu können. Die Kreuztoleranz kommt hingegen durch die Kreuzpräsentation von Selbstantigenen zustande, die in der Regel zur Deletion autoreaktiver zytotoxischer T-Zellen führt (Kurts et al., 1997). Das zeigt, dass die konventionellen dendritischen Zellen nicht nur eine wichtige Funktion in der Induktion einer adaptiven Immunantwort haben, sondern auch essenziell für die Entstehung und Aufrechterhaltung der zentralen Toleranz sind (Steinman et al., 2003). Eine Erkennung von Pathogenen über die Mustererkennungsrezeptoren führt zu einer Aktivierung von dendritischen Zellen und zu einer Differenzierung von unreifen zu reifen dendritischen Zellen. Mit der Differenzierung ändern sich die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften der dendritischen Zelle. Im unreifen Zustand sind sie noch durch eine hohe Phagozytoseaktivität gekennzeichnet. Im reifen Zustand nimmt die Phagozytoseleistung ab und stattdessen werden kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 sowie MHC Proteine auf den dendritischen Zellen hochreguliert (Theofilopoulos et al., 2005), die für eine Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen notwendig sind. Für eine Migration in die sekundären lymphatischen Organe wird zudem auf reifen dendritischen Zellen sowie auf naiven T-Zellen der Chemokinrezeptor CCR7 exprimiert (Förster et al., 2008; Ziegler et al., 2007). Aufgrund der Affinität von CCR7 für die Chemokinliganden CCL19 und CCL21 werden peptid-beladene dendritische Zellen und naive T-Zellen in die sekundären lymphatischen Organe gelockt. Eine Produktion von CCL19 erfolgt durch gp38<sup>+</sup> fibroblastische Retikulum-Zellen (FRZs) in der T-Zellzone der sekundären lymphatischen Organe (Link et al., 2007), wohingegen CCL21 dort sowohl von FRZs als auch von den hochendothelialen Venolen (HEVs) produziert wird (Carlsen et al. 2005). Dies ermöglicht somit ein Zusammentreffen von T-Zellen und dendritischen Zellen in den sekundären lymphatischen Organen. Trifft eine antigenspezifische T-Zelle auf eine dendritische Zelle, die das entsprechende Antigen präsentiert, so bilden sie eine immunologische Synapse aus (Hivroz et al., 2012; Thauland & Parker, 2010). Diese Interaktion ist für die Aktivierung und Effektorfunktion von T-Zellen von großer Bedeutung (Thauland & Parker, 2010). Die plasmazytoiden dendritischen Zellen sind im Blut und in den peripheren lymphatischen Organen lokalisiert, wo sie nach einer Virusinfektion virale Nukleinsäuren über die Toll-like Rezeptoren (TLRs) 7 und 9 erkennen können (Swiecki & Colonna, 2010; Lande & Gilliet, 2010; Di Domizio et al., 2009; Gilliet et al., 2008). Im Vergleich zu den konventionellen dendritischen Zellen weisen die plasmazytoiden dendritischen Zellen eine deutlich geringere Kapazität für die Aufnahme, die Prozessierung und die Präsentation von löslichem Antigen auf (Lande & Gilliet, 2010). Sie sind eher darauf spezialisiert große Mengen Typ I Interferone als Antwort auf eine virale Infektion zu produzieren (Santana-de Anda et al., 2013; Schmidt et al., 2012; Gilliet et al., 2008; Colonna et al., 2004). Ihre Fähigkeit besteht darin, 100-1000-fach mehr Interferon zu produzieren als andere im Blut

befindliche Zellen (Siegal et al., 1999). Typische Oberflächenmarker muriner pDCs sind zum Beispiel CD11c, B220, Siglec-H und BST2 (Gehrie et al., 2011), wohingegen humane pDCs kein CD11c, sondern stattdessen CD123 und BDCA-2 (CD303) exprimieren (Schmidt et al., 2012).

### **3.1.1.1.2 Makrophagen**

Makrophagen sind gewebsständige, nicht-migratorische Zellen (Satpathy et al., 2012), die durch ihre hohe Phagozytoseaktivität gekennzeichnet sind (Wynn et al., 2013). Sie sind in allen Geweben vorhanden (Hashimoto et al., 2011) und werden aufgrund ihrer Lokalisation und der Expression von Oberflächenmarkern unterschiedlich benannt. Ein Überblick über die wichtigsten Makrophagen und deren Bezeichnungen in den unterschiedlichen Organen zeigt Tabelle 3.1. Ähnlich wie die dendritischen Zellen erkennen Makrophagen Pathogene über ihre Mustererkennungsrezeptoren (wie z.B. den Mannoserezeptor, den Scavenger-Rezeptor, die Toll-like Rezeptoren, die Komplementrezeptoren und die Fc-Rezeptoren). Eine Erkennung von Pathogenen über diese Rezeptoren führt in den Makrophagen zu einer Expression von MHC-Molekülen sowie kostimulatorischen Molekülen auf der Zell-Oberfläche. Des Weiteren werden inflammatorische Zytokine (Gordon, 2002), die zu einer Entzündungsreaktion führen und weitere Immunzellen anlocken, induziert. Im Vergleich zu dendritischen Zellen sind Makrophagen allerdings weniger effektiv in der Induktion einer adaptiven T-Zell- vermittelten Immunantwort (van Spriël & de Jong, 2013). Dies ist darauf zurückzuführen, dass in der Regel die Makrophagen durch die Phagozytose von Pathogenen nicht aktiviert werden können und infolgedessen diese auch nicht zerstören können (Murphy et al., 2009). Eine Beseitigung der Pathogene ist erst nach einer Aktivierung des Makrophagen durch IFN- $\gamma$ , welches von aktivierten T-Zellen sezerniert wird, möglich (Frucht et al., 2001). Makrophagen spielen nicht nur eine entscheidende Rolle in der Phagozytose von Fremddantigenen und apoptotischen Zellen, sondern sie sind auch bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase sowie der Reparatur und Regeneration von Geweben involviert (Stefater et al., 2011).

**Tab. 3.1:** Bezeichnung und Oberflächenmarker von Makrophagen unterschiedlicher Organe

Bezeichnung der Makrophagen	Organ	Oberflächenmarker
Kupffer-Zellen	Leber	F4/80 (Lopez et al., 2011; Movita et al., 2012)
Alveolarmakrophagen	Lunge	F4/80, CD45, CD11c (Song C et al., 2008) und CD68 (Zaynagetdinov et al., 2013)
Rote Pulpa Makrophagen	Milz, rote Pulpa	F4/80 (Backer et al., 2010; Nolte et al., 2004)
Marginalzonenmakrophagen	Milz, Marginalzone	SIGN-R1, MARCO (Wermeling et al., 2009; Kraal & Mebius, 2006)
Metallophile Marginalzonen Makrophagen	Milz, Marginalzone	Sialoadhesin (Siglec-1, CD169) (Oetke et al., 2006; York et al., 2007)
“Tingle body” Makrophagen	Milz, weiße Pulpa	CD68 (Taylor et al., 2005)

### 3.1.1.2 Humorale Komponente des angeborenen Immunsystems

Zu der löslichen (humoralen) Komponente des angeborenen Immunsystems gehören neben dem Komplementsystem, das sich aus mehr als 25 Serumproteinen zusammensetzt, auch die Akute-Phase-Proteine sowie zahlreiche Chemokine und Zytokine. Zu letzteren werden auch die Interferone gezählt.

#### 3.1.1.2.1 Typen von Interferonen

Als Antwort des Wirtes auf ein Pathogen werden eine Reihe unterschiedlicher Zytokine produziert, ein besonders wichtiges Zytokin sind die Interferone. Interferone wurden erstmalig von Isaacs und Lindenmann im Jahre 1957 in Zellkulturen (*in vitro*) entdeckt und als lösliche Proteine mit anti-viraler Aktivität beschrieben (Isaacs & Lindenmann, 1957). Mittlerweile unterscheidet man drei verschiedene Typen von Interferonen.

Die Typ I Interferon Familie besteht aus IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$  und IFN- $\delta$ . Im Menschen sind 13 und in Mäusen 14 unterschiedliche IFN- $\alpha$  Subtypen bekannt (Ng & Gommerman, 2013; van Pesch et al., 2004). Die Interferone - $\alpha$  und - $\beta$  stellen hierbei die beiden wichtigsten Vertreter dieser Familie dar. Der Rezeptor für die Typ I Interferon Familie ist der Interferon-alpha-Rezeptor (IFNAR), der sich aus der IFNAR1 und IFNAR2 Untereinheit zusammensetzt (Sadler & Williams, 2008). Die Typ I Interferone (IFN- $\alpha$ /IFN- $\beta$ ) werden während der frühen Phase einer Infektion von fast jeder Wirtszelle produziert (Ng & Gommerman, 2013). Die Produktion von Interferonen gehört zur ersten Verteidigungslinie einer viralen Infektion und hat die Funktion, eine Infektion bis zum Einsetzen der adaptiven Immunantwort unter Kontrolle zu halten. Typ I Interferone sind vor allem durch ihre anti-viralen, anti-proliferativen (Francois-Newton et al., 2012) sowie immunmodulatorischen Eigenschaften gekennzeichnet (González-Navajas et al., 2012)

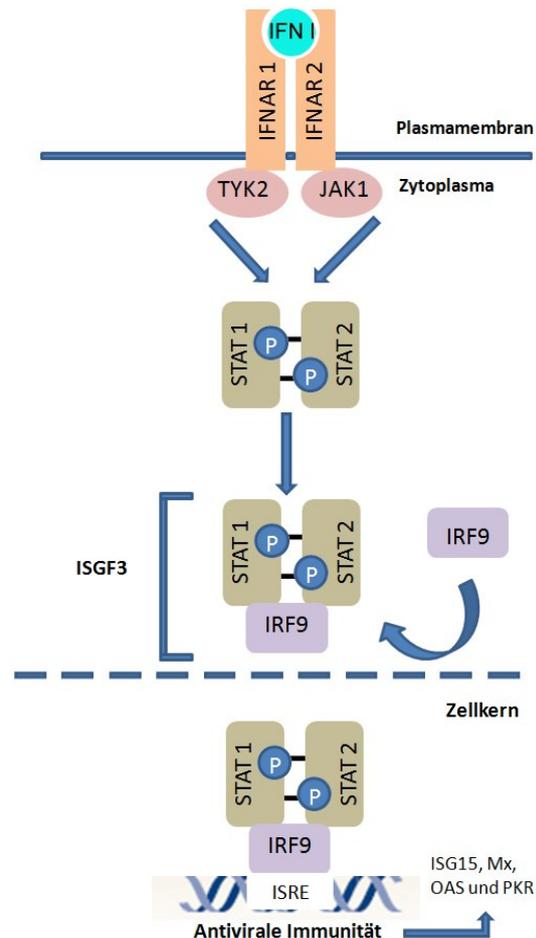
Die Typ II Interferon Familie besteht hingegen nur aus einem einzigen Zytokin, dem IFN- $\gamma$ . Dieses verfügt ebenfalls über antivirale Eigenschaften, kann aber nicht direkt durch eine Virusinfektion induziert werden. IFN- $\gamma$  wird primär von aktivierten Natürlichen Killerzellen (NK) und T-Zellen produziert (Borrow et al., 2010; Meyer, 2009). Der Rezeptor für das IFN- $\gamma$  ist der Interferon-gamma-Rezeptor (IFNGR), der sich aus der IFNGR1 und IFNGR2 Untereinheit zusammensetzt.

Die Typ III Interferon Familie besteht aus drei IFN- $\lambda$  Subtypen, IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) und IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B), die an den IFN $\lambda$ R binden. Der IFN $\lambda$ R besteht aus zwei Rezeptoruntereinheiten, dem IL28R $\lambda$  und dem IL10R $\beta$ . Die Typ III Interferon Familie weist im Vergleich zu den beiden anderen Interferon Familien eine Ähnlichkeit zu den Mitgliedern der Interleukin-10 (IL-10) Familie auf (González-Navajas et al., 2012). Sie verfügen allerdings ebenso über anti-virale Eigenschaften (Ank & Paludan, 2009; Ank et al., 2008; Kotenko et al., 2003) und können die Expression IFN-stimulierender Gene (ISGs) induzieren (Gad et al., 2009).

### 3.1.1.2.2 Der Typ I Interferonsignalweg

Der Typ I Interferonsignalweg wird durch die Bindung von IFN- $\alpha$ /IFN- $\beta$  an den Typ I Interferonrezeptor (IFNAR) induziert. Dies führt zu einer Aktivierung des JAK-STAT Signalweges, der die Induktion IFN-stimulierender Gene (ISGs) vermittelt (Abbildung 3.1). Der Typ I Interferon-alpha Rezeptor (IFNAR) ist ein heterodimerer Zelloberflächenrezeptor, der fast von jedem Zelltyp exprimiert wird (de Weerd et al., 2007). Dieser Rezeptor setzt sich aus zwei Untereinheiten, der IFNAR1 und der IFNAR2 Untereinheit, zusammen. Die zytoplasmatische Domäne jeder Rezeptoruntereinheit interagiert mit einem Mitglied der Janus aktivierenden Kinase (JAK) Familie. Die IFNAR1 Untereinheit ist mit der Tyrosin Kinase 2 (Tyk2) assoziiert, während die IFNAR2 Untereinheit

mit der Janus aktivierenden Kinase 1 (JAK1) verbunden ist (Randall & Goodbourn, 2008). Die Bindung der Typ I Interferone an den Typ I Interferonrezeptor führt zur Dimerisierung und Autophosphorylierung der Rezeptorketten und schließlich zur Aktivierung der JAK Kinasen. Diese wiederum sind in der Lage Tyrosinreste des Interferon-alpha Rezeptors zu phosphorylieren und somit einen Ort für die Anlagerung der signaltransduzierenden Transkriptionsaktivatoren (STATs) zu bilden. Eine Anlagerung der STATs an die phosphorylierten Tyrosinreste führt dazu, dass auch diese an einem einzelnen Tyrosin durch die JAK Kinasen phosphoryliert (z.B. Tyrosin 701 bei STAT1 und Tyrosin 690 bei STAT2) (Hervas-Stubbs et al., 2011; Randall & Goodbourn, 2008) und somit aktiviert werden. Nach Phosphorylierung bilden die aktivierten STATs Homo- oder Heterodimere, die vom Rezeptor dissoziieren und in den Zellkern translozieren. Ein wichtiger Komplex, der durch Typ I Interferon induziert wird, ist der Interferon-stimulierende Genfaktor 3 (ISGF3), der sich aus dem STAT1/STAT2 Heterodimer und dem Interferon-regulatorischen Faktor 9 (IRF9) zusammensetzt (Malmgaard, 2004). Dieser Komplex bindet spezifisch an die IFN-stimulierenden Antwort-Elemente (ISRE), um dort die Transkription der (Typ I) IFN-stimulierenden Gene (ISGs) zu initiieren (Bordon & Williams, 2011; Plataniias, 2005). Es ist bekannt, dass Typ I Interferon mehr als 300 unterschiedliche Gene regulieren kann (Meyer, 2009; Der et al., 1998). Darunter sind zahlreiche Gene, die antivirale Aktivität aufweisen wie beispielsweise *Oas1* (2'5'-



**Abb. 3.1:** Der Typ I Interferonsignalweg  
Modifiziert nach Sadler & Williams, 2008.

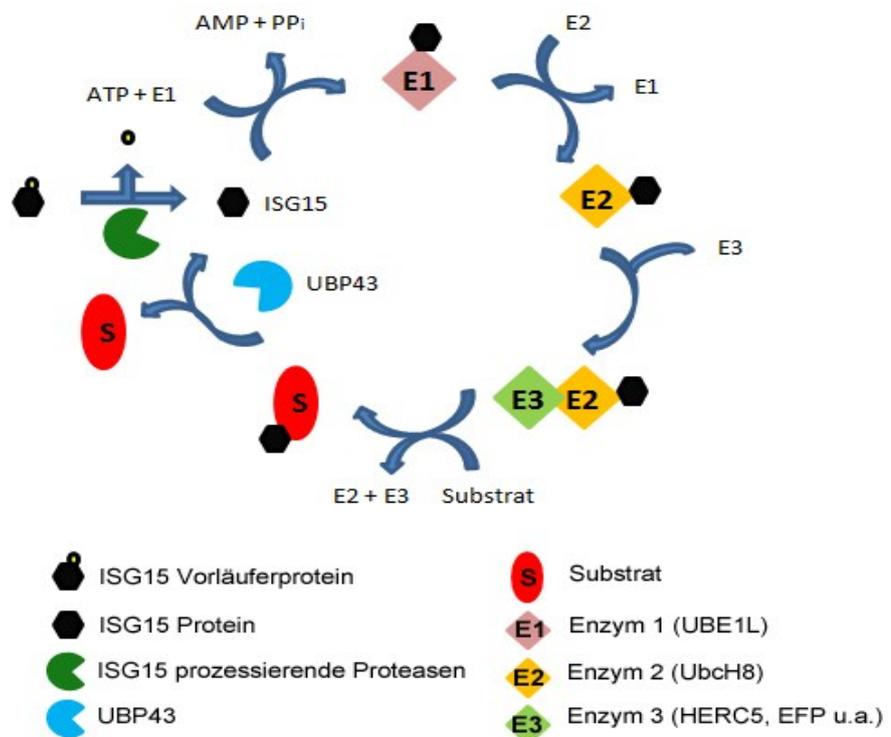
oligoadenylate synthetase), *RnaseL*, *Mx1* (myxovirus resistance 1), *PKR* (protein kinase R) und *ISG15* (IFN-stimulated gene 15) (Sadler & Williams, 2008). Typ I Interferon hat neben der Produktion zahlreicher, direkt anti-viral wirkender Gene auch Einfluss auf die Funktionalität des angeborenen und erworbenen Immunsystems. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass z.B. IFN- $\alpha$  einen direkten Einfluss auf die Differenzierung, Reifung und Migration von dendritischen Zellen (Hervas-Stubbs et al., 2011) sowie auf die Aktivierung und Differenzierung von B- und T-Zellen (Fink et al., 2006; Gonzalez-Navajas, 2012) hat. Es kann aber auch indirekt wirken, indem es die Produktion von

Chemokinen und Zytokinen, welche die Migration und Aktivierung anderer Immunzellen regulieren, induziert.

### 3.1.1.2.3 UBP43 (*Usp18*) ein Inhibitor des Typ I Interferonsignalweges

UBP43 ist eine Ubiquitin spezifische Protease, die als Inhibitor des Typ I Interferonsignalweges fungiert. Das Gen *Usp18* kodiert für das UBP43 Protein, welches spezifisch an die Interferon-alpha-Rezeptor 2 (IFNAR2) Untereinheit bindet und dadurch die Phosphorylierung der Janus-aktivierenden Kinase 1 (JAK1) durch Blockierung der Interaktion von JAK1 und der IFNAR2 Untereinheit verhindert (Malakhova et al., 2006). In Einklang mit dieser Funktion konnte gezeigt werden, dass durch eine

Beeinflussung des Typ I Interferon Signalweges, UBP43 auch Einfluss auf die Entwicklung von konventionellen CD11b<sup>+</sup> dendritischen Zellen hat (Cong et al., 2012). Als eine Ubiquitin spezifische Protease (Isopeptidase) hat UBP43 vor allem die Funktion, Proteine von anderen Proteinen zu entfernen. Diese Funktion ist hingegen unabhängig von der Inhibition des Typ I Interferonsignalweges. Proteine können posttranslational durch kovalente Anlagerung (Konjugation) von Ubiquitin oder Ubiquitin-



**Abb. 3.2:** ISG15 Enzymkaskade

Das Interferon-stimulierende Protein 15 (ISG15) wird als Vorläuferprotein synthetisiert und durch ISG-15 prozessierende Proteasen maturiert. ISG15 wird von dem aktivierenden Enzym UBE1L (E1) unter ATP-Verbrauch aktiviert und gebunden. Anschließend wird das ISG15 durch das Enzym UbcH8 (E2) konjugiert und durch die Enzyme EFP, HERC5 u.a. (E3) an das zu ISGylierende Protein ligiert. Das Ubiquitin-bindende Protein 43 (UBP43), eine Isopeptidase, kann hingegen diesen Prozess umkehren und spezifisch ISG15 von ihrem Zielprotein wieder dekonjugieren.

Modifiziert nach Jeon et al., 2010.

ähnlichen Proteinen modifiziert werden. Diese Konjugation findet über einen dreistufigen enzymatischen Prozess statt (E1-E3) (Abbildung 3.2; Bogunovic et al., 2013; Jeon et al., 2010; Kim et

al., 2004). Proteinmodifizierungen sind wichtig, um zum Beispiel die Funktion und Aktivität von Proteinen zu verändern. Eines der Ubiquitin-ähnlichen Proteine ist das Interferon-stimulierende Gen 15 (ISG15). Dieses wird nach Interferon (Zhang & Zhang, 2011; Osiak et al., 2005) oder Lipopolysaccharid (Li et al., 2001) Behandlung oder während einer viralen Infektion (Kim & Zhang, 2003) hochreguliert. ISG15 wird von verschiedenen Zellen wie Monozyten, Lymphozyten, Neutrophilen Granulozyten und Fibroblasten sezerniert und spielt eine wichtige Rolle in der Induktion von IFN- $\gamma$  in T- Zellen und Natürlichen Killer (NK) Zellen (Bogunovic et al., 2013). In unkonjugierter, freier Form ist es auch für seine antivirale Aktivität bekannt (Morales & Lenschow, 2013; Skaug & Chen, 2010; Lenschow, 2010). Posttranslationale Proteinmodifikationen sind reversible Prozesse, die man als Dekonjugation bezeichnet und unter anderem durch Ubiquitin-spezifische Proteasen ausgeführt werden. Das Protein UBP43 (*Usp18*) gehört zur Familie der Ubiquitin-spezifischen Proteasen (Malakhova et al., 2002) und wird ebenfalls stark durch Interferon-alpha (Potu et al., 2010; Kang et al., 2001; Li et al., 2000, 2001) oder durch Lipopolysaccharide (LPS) (Kang et al., 2001, Li et al., 2000, 2001) induziert. Es hat die Funktion das Interferon-stimulierende Gen 15 (ISG15) von ISG15-konjugierten Proteinen (Malakhov et al., 2002) zu entfernen. UBP43 trägt somit dazu bei, Proteine, die kovalent mit dem ISG15 Protein verbunden sind, im Gleichgewicht zu halten.

### 3.1.2 Das adaptive Immunsystem

Kann ein Pathogen durch das angeborene Immunsystem nicht kontrolliert werden, greift das adaptive Immunsystem ein. Das adaptive Immunsystem wird durch die B- und T-Lymphozyten gebildet, die bei einer primären Infektion, d.h. dem erstmaligen Kontakt mit einem Pathogen zwar schnell aktiviert werden, aber erst nach ca. 4 Tagen vollständig differenziert sind. Im Unterschied zum angeborenen Immunsystem werden die Pathogene spezifisch erkannt und es kommt zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (Murphy et al. 2009). Die Entstehung und Differenzierung der Lymphozyten findet in den primären lymphatischen Organen wie dem Knochenmark und dem Thymus statt. B- u. T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark aus einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle. Während die B-Vorläuferzellen im Knochenmark zu reifen B-Zellen differenzieren, wandern die T-Vorläuferzellen zur weiteren Differenzierung in den Thymus ein. Im Thymus differenzieren die T-Vorläuferzellen zu reifen  $CD4^+$  T-Helferzellen oder  $CD8^+$  zytotoxischen T-Zellen und bilden die zelluläre Immunität. Die zelluläre Immunantwort richtet sich hauptsächlich gegen intrazelluläre Pathogene wie zum Beispiel Viren. Reife, naive Lymphozyten, die noch keinen Antigenkontakt hatten, zirkulieren zwischen Blut und sekundären lymphatischen Organen (siehe 3.1.3) bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Antigene im Blut oder den

extrazellulären Flüssigkeiten (extrazelluläre Pathogene) können von reifen B-Zellen über ihre variable Region des B-Zell-Rezeptors erkannt werden. Die variable Region jedes B-Zell Rezeptors ist unterschiedlich und kann spezifisch nur ein bestimmtes Antigen erkennen. Diese Variabilität kommt durch Genumlagerung der V-D-J Gene innerhalb der variablen Region jedes B-Zell-Rezeptors (BCR) zustande und wird als somatische Rekombination bezeichnet (Shaffer et al., 2002). Erkennen die B-Zellen ihr spezifisches Antigen, wandern diese in die Milz oder nahegelegenen Lymphknoten ein, um dort von einer antigenspezifischen  $CD4^+$  Helferzelle aktiviert zu werden. Für die Aktivierung benötigt die B-Zelle zwei Signale (Bretscher & Cohn, 1970). Das erste Signal erhält sie durch die Bindung eines Antigens an ihren BCR (Fehr et al., 1996). Durch den BCR wird das Antigen in das Zellinnere geschleust, prozessiert und die Peptide mit den MHC-Klasse II Proteinen an die Zelloberfläche transportiert. Das zweite Signal empfängt die B-Zelle von der T-Helferzelle (TH-Zelle), die den MHC-II-Peptid-Komplex erkennt und daran bindet (Yuseff et al., 2013; Parker, 1993). Verstärkt wird dieses Signal insbesondere durch die Wechselwirkung zwischen CD40 auf der B-Zelle und dem Liganden CD40L (CD154) auf der T-Zelle. Diese Interaktion induziert die Produktion von zahlreichen Zytokinen, die von der TH-Zelle sezerniert werden und eine wichtige Rolle vor allem bei der B-Zell-Proliferation, dem Isotypwechsel und bei der Entwicklung von Keimzentren spielen (Bishop & Hostager, 2001). Eine Aktivierung der B-Zelle führt zur Proliferation und Differenzierung in Antikörper-produzierende Plasmazellen, die die humorale Immunantwort bilden (Shapiro-Shelef & Calame, 2005). Die humorale Immunantwort bekämpft im Vergleich zur zellulären Immunantwort Pathogene in den extrazellulären Räumen. Stellen die Plasmazellen ihre Antikörperproduktion ein, gehen sie in Apoptose. Nur ein Teil der B-Zellen entwickelt sich zu langlebigen Gedächtnis B- Zellen. T-Zellen können im Vergleich zu B-Zellen nur durch Antigenpeptide, die über MHC-Proteine präsentiert werden, aktiviert werden.  $CD4^+$  T-Zellen erkennen Antigenpeptide, die über MHC-II-Proteine auf antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen präsentiert werden. Sie dienen in erster Linie als T-Helferzellen (TH-Zellen) für die Aktivierung von B-Zellen.  $CD8^+$  T-Zellen erkennen Antigenpeptide nur, wenn sie über MHC-I-Proteine präsentiert werden. Sie werden als zytotoxische T-Zellen bezeichnet, da sie infizierte Zellen durch die Expression von Effektormolekülen wie Perforin, Granzym b und Fas-Ligand töten können. Für die Aktivierung benötigt eine T-Zelle drei Signale. Das erste Signal erhält die T-Zelle, indem sie mit ihrem T-Zellrezeptor das Antigenpeptid, welches über MHC-Proteine der APC präsentiert wird, spezifisch erkennt (Cantrell, 2002). Die Rezeptorvielfalt kommt ähnlich wie bei den B-Zellen durch somatische Rekombination der Rezeptorgene zustande. Zusätzlich benötigt die T-Zelle ein zweites Signal. Dieses kommt durch die Interaktion kostimulatorischer Signale auf reifen dendritischen Zellen mit CD28 auf T-Zellen zustande (Schmidt et al., 2012). Dieses Signal wird zudem durch die Interaktion von CD40 auf dendritischen Zellen mit dem CD40 Liganden (CD40L) auf T-Zellen

verstärkt (O`Sullivan & Thomas, 2003). Das dritte Signal wird über Zytokine vermittelt, die von der Antigen-präsentierenden Zelle sezerniert werden (Thaiss et al., 2011; Moser & Murphy 2000). Diese Zytokine sind für die Differenzierung der T-Zellen in unterschiedliche Subtypen verantwortlich (Lichtenstein et al., 2012). Eine Subpopulation von aktivierten T-Zellen differenziert wie bei den B-Zellen ebenfalls zu Gedächtnis-T-Zellen aus. Diese garantieren bei einer sekundären Infektion, dass heißt dem wiederholten Kontakt mit demselben Antigen, eine adaptive Immunantwort innerhalb weniger Stunden.

Die Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems interagieren miteinander über die Produktion von Zytokinen, Chemokinen und Zell-Zell-Kontakt. Diese Interaktion ist essenziell, um die spezifische Immunantwort einzuleiten. Somit brauchen T-Zellen beispielsweise antigenpräsentierende Zellen für dessen Aktivierung. Umgekehrt könnten extrazelluläre Pathogene ohne die Opsonisierung von B-Zellen produzierenden Antikörpern oder virusinfizierte Zellen ohne die zytotoxischen Eigenschaften von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nicht so schnell erkannt und eliminiert werden.

### **3.1.3 Sekundäre lymphatische Organe**

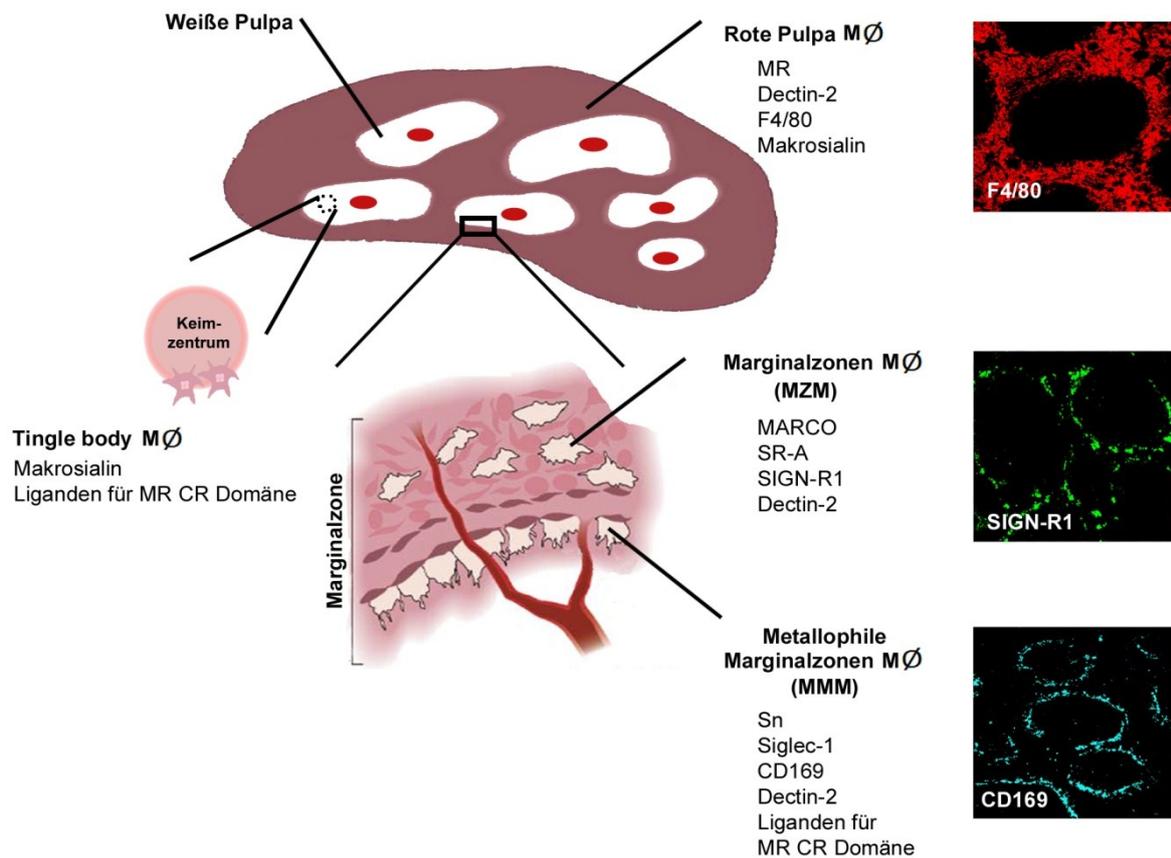
Die sekundären lymphatischen Organe sind die Orte, in denen reife Antigen-präsentierende Zellen (APCs) und naive T-Zellen aufeinander treffen, um eine adaptive Immunantwort gegen ein Antigen zu induzieren. Zu den sekundären lymphatischen Organen gehören die Milz, die Lymphknoten und das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT) (Hof & Dörries, 2009). Allen sekundären lymphatischen Organen gemeinsam ist eine Lokalisation der T- und B- Lymphozyten in separaten Kompartimenten.

#### **3.1.3.1 Milz**

Die Milz ist das größte sekundäre lymphatische Organ, es ist für die Aufnahme von Fremdmaterial, Immunzellen und apoptotischen Zellen aus dem Blut von enormer Wichtigkeit. Sie lässt sich in drei morphologisch und funktionell unterschiedliche Kompartimente einteilen: die rote Pulpa, die weiße Pulpa und die Marginalzone (Marx et al., 2008).

Die rote Pulpa enthält die sogenannten roten Pulpa Makrophagen (F4/80<sup>+</sup>), die für die Phagozytose alter Erythrozyten und für das Recycling von Eisen zuständig sind (den Haan & Kraal 2012; Marx et al. 2008). Sie stellt außerdem einen Speicherort für Erythrozyten, Thrombozyten und für das recycelte Eisen dar (Cesta 2006), welches entweder in Form von Ferritin (Knutson & Wessling-Resnick, 2003) oder Hämosiderin (den Haan & Kraal, 2012) in den Makrophagen gespeichert wird.

Die weiße Pulpa hingegen übernimmt die Immunantwort der Milz. Sie enthält die periarteriolen Lymphgefäßscheiden (PALS) und die Follikel. Die periarteriolen Lymphgefäßscheiden (PALS) bestehen aus T-Lymphozyten, die die Zentralarterien umgeben. Die Follikel hingegen werden von B-Lymphozyten gebildet, in deren Zentrum follikuläre dendritische Zellen (FDCs) ein Netzwerk bilden. Die FDCs können Antigen in Form von Immunkomplexen (Antigen-Antikörper-/Antigen-Komplement-Komplexe) über ihre Fc- (FcγRIIB/CD32; FcεRII/CD23) und Komplement-Rezeptoren (CR1/CR2-CD35/CD21) aufnehmen und über einen langen Zeitraum auf ihrer Oberfläche den B-Lymphozyten präsentieren (El Shikh & Pitzalis 2012). Sie üben somit eine bedeutende Funktion bei der Keimzentrumsreaktion aus und sind zudem für die Entstehung von Antikörper-produzierenden Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen verantwortlich (Cinamon et al., 2008). Neben den FDCs sind dort auch die „tingible body“ Makrophagen lokalisiert, die über den Phosphatidylrezeptor Tim-4 für die Aufnahme apoptotischer B Zellen, die vermehrt während der Keimzentrumsreaktion entstehen, zuständig sind (Wong et al., 2010). Aufgrund ihres zellulären Aufbaus ist die weiße Pulpa für eine schnelle Induktion der Immunantwort gegen Antigene aus dem Blut verantwortlich (Balogh et al., 2004; Nolte et al., 2002). Die rote und die weiße Pulpa werden durch die sogenannte Marginalzone voneinander getrennt (Abbildung 3.3). Diese besteht aus den Marginalzonen B-Zellen, Marginalzonen dendritischen Zellen, Marginalzonen Makrophagen (MZM) und den Metallophilen Marginalzonen Makrophagen (MMM) (Beattie et al., 2006). Die MZM (SIGN-R1) und Marginalzonen B Zellen sind am äußeren Rand der Marginalzone, angrenzend zur roten Pulpa, lokalisiert. Die MMM (CD169, Siglec-1, Sialoadhesin) hingegen bilden einen Ring am inneren Rand der Marginalzone, angrenzend zur weißen Pulpa. Pathogene, die über den Marginalsinus in die Marginalzone gelangen, werden dort von den residenten MZM und den MMM aufgenommen (Mebius & Kraal, 2005; Kraal, 1992). Die Marginalzone weist somit eine Filterfunktion auf und ist gleichzeitig auch ein Ort, an dem Bestandteile des Blutes passiv in die rote Pulpa gelangen oder aktiv in die weiße Pulpa transportiert werden (Mebius et al., 2004).



**Abb. 3.3:** Die Heterogenität von Makrophagen-Subpopulationen in der Milz

Schematische Darstellung der verschiedenen Makrophagen-Subpopulationen in der Milz mit ihren unterschiedlichen Differenzierungs- und Rezeptorantigenen. Die immunfluoreszenzhistologischen Bilder zeigen die typischen Expressionsmarker einiger bedeutender Makrophagen-Subpopulationen in der Milz.

Rote Pulpa Makrophagen: F4/80

Marginalzonen Makrophagen (MZM): SIGN-R1

Metallophile Marginalzonen Makrophagen (MMM): CD169

Modifiziert nach Kraal 1992.

### 3.1.3.2 Lymphknoten

Die Lymphknoten sind im Vergleich zur Milz für die Aufnahme von Pathogenen aus der extrazellulären Flüssigkeit (Lymphe) verantwortlich. Sie sind im ganzen Körper verteilt und lassen sich in eine subkapsuläre Zone, den Kortex und die Medulla einteilen (Junt et al., 2008). Über die afferenten Lymphgefäße gelangen freie Pathogene oder pathogen-beladene dendritische Zellen (DCs) aus der Lymphe in die subkapsuläre Zone. Diese enthält spezialisierte Makrophagen, die Subkapsular Sinus Makrophagen (SCS, CD169<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>), die freie Pathogene aus der Lymphe herausfiltern können (Iannacone et al., 2010; Junt et al., 2007) und somit funktionell mit den Metallophilen Marginalzonen Makrophagen der Milz vergleichbar sind. Die Pathogen-beladenen dendritischen Zellen können hingegen direkt das Antigen in die T-Zell-Zone transportieren und dort eine Immunantwort induzieren. Der Kortex lässt sich in eine B-Zell-Zone und eine T-Zell-Zone

einteilen. Die B-Zellen sind in Follikeln angeordnet und sind im äußeren Cortex nahe der subkapsulären Zone lokalisiert. Die T-Zellen befinden sich hingegen in der Parakorticalzone (Parakortex). Diese ist zwischen der B-Zell-Zone und der Medulla lokalisiert. Die Medulla hat ebenfalls die Aufgabe, Pathogene oder tote Zellen mit den dort ansässigen Makrophagen aus der Lymphe zu filtern (Gray & Cyster, 2012), bevor diese den Lymphknoten über die efferenten Lymphgefäße wieder verlässt.

## **3.2 Virusmodelle**

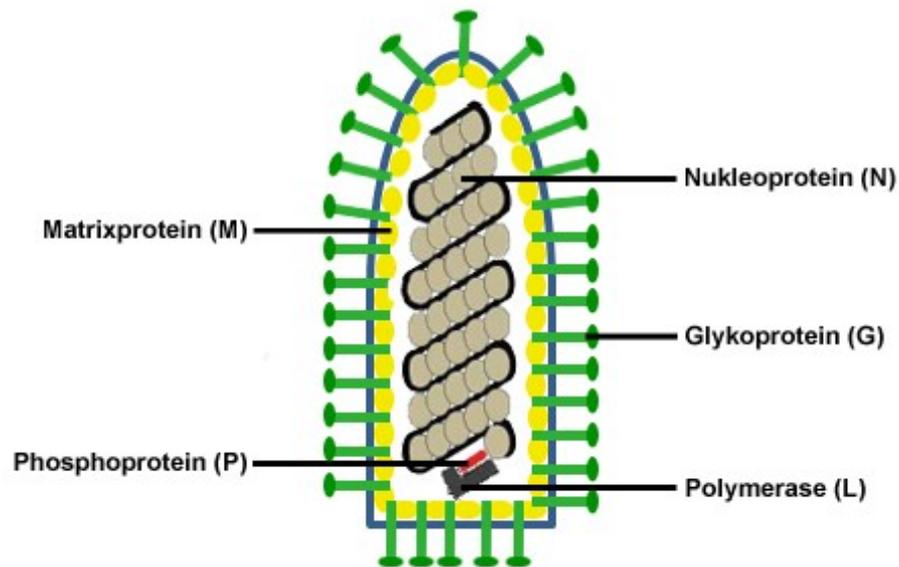
Virusmodelle, die tierexperimentell am häufigsten zur Analyse einer viralen Immunantwort verwendet werden, sind das Vesicular Stomatitis Virus (VSV) und das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV).

### **3.2.1 Das Vesicular Stomatitis Virus (VSV)**

Das Vesicular Stomatitis Virus (VSV) ist ein umhülltes, nicht-segmentiertes, Einzelstrang RNA Virus mit negativer Polarität, welches zur Familie der Rhabdoviridae gehört. Ein wichtiger human- und tierpathogener Vertreter der Familie der Rhabdoviridae ist das Rabiesvirus (Tollwutvirus).

Das Vesicular Stomatitis Virus wird in zwei unterschiedliche Serotypen eingeteilt: das VSV New Jersey (VSVNJ) und das VSV Indiana (VSVI) Virus. Der Serotyp VSV Indiana kann in drei weitere unterschiedliche serologische Gruppen unterteilt werden (Indiana 1-3), wobei VSV Indiana 1 den klassischen Indiana Virusstamm repräsentiert (Federer et al., 1967). VSV New Jersey stellt im Vergleich zum VSV Indiana den virulenteren Stamm dar (Rodriguez, 2002; Stallknecht et al., 2001). Dies lässt sich auf die biologischen Unterschiede der Glykoproteine beider Serotypen zurückführen (Martinez & Wertz, 2005). Das virale Genom des Vesicular Stomatitis Virus besteht aus fünf Genen, die für das Nukleoprotein (N, 60 kD), das Phosphoprotein (P, 40-45 kD), die virale Polymerase (L, 190 kD), das Matrixprotein (M, 25-26 kD) und das Glykoprotein (G, 64-68 kD) kodieren (Abbildung 3.4).

Die Funktionen der unterschiedlichen Proteine sind in Tabelle 3.2 näher erläutert.



**Abb.3.4:** Schematischer Aufbau des Vesicular Stomatitis Virus (VSV)

Das Nukleokapsid setzt sich aus der viralen einzelsträngigen RNA, dem Nukleoprotein (N), dem Phosphoprotein (P) und der viralen Polymerase (L) zusammen. Die Virushülle wird vom Glykoprotein (G) und dem Matrixprotein (M) gebildet. Modifiziert nach Rose & Whitt 2001.

**Tab.3.2 :** Die Proteine des Vesicular Stomatitis Virus und dessen Funktionen

Proteine	Funktion
<b>Nukleoprotein (N)</b>	Bindet an die virale RNA und ist für die Transkription, die Replikation und die Zusammensetzung des Virus verantwortlich (Green et al., 2006).
<b>Phosphoprotein (P)</b>	Ist ein Cofaktor der RNA-Synthese (Rameh et al., 2012).
<b>Polymerase (L)</b>	Fungiert als RNA-abhängige-RNA-Polymerase (Ogino, 2013).
<b>Matrixprotein (M)</b>	Ist mit der Innenseite der Virusmembran assoziiert und weist eine wichtige Funktion in der Virusmorphogenese auf (Modrow et al., 2010).
<b>Glykoprotein (G)</b>	Bildet trimere Komplexe auf der Virusoberfläche und ist für die Adsorption der Virionen an die Zellrezeptoren auf der Wirtszelloberfläche sowie für die Fusion der viralen und endosomalen Membranen nach Endocytose des Virions verantwortlich (Albertini et al., 2012; Roche et al., 2008; Martinez & Wertz, 2005; Martinez et al., 2003; Carneiro et al., 2003). Die Fusion zwischen den viralen und endosomalen Membranen ist ein pH-abhängiger Prozess und optimal bei pH 6 (Roche et al., 2008; Lyles & Rupprecht, 2007; Roche & Gaudin, 2004).

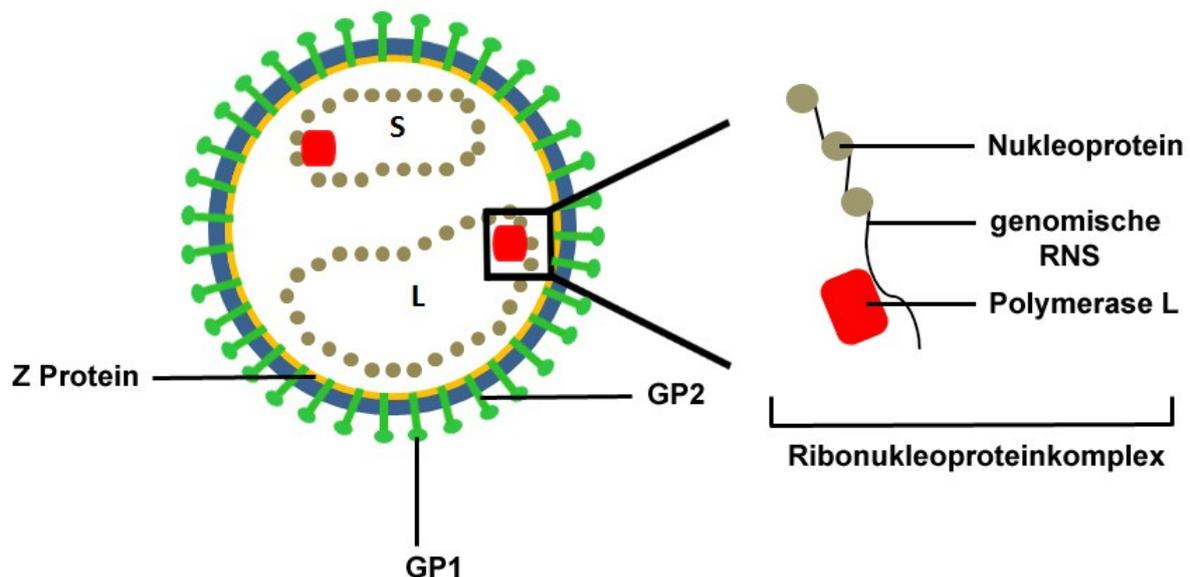
Das Nukleoprotein (N), die RNA-abhängige RNA Polymerase (L) und das Phosphoprotein (P) bilden gemeinsam mit der viralen RNA das Nucleocapsid, das eine Rolle in der Transkription und Replikation des Virus spielt (Luo, 2012).

Das Vesicular Stomatitis Virus (VSV) ist ein zytopathisches Virus, das bedeutet, dass eine Infektion der Zelle mit VSV innerhalb kurzer Zeit mit morphologischen Veränderungen und endgültig mit einer Zell-Lyse einhergeht. Das Virus ist durch einen breiten Wirtstropismus gekennzeichnet und kann somit Rinder, Pferde und Schweine infizieren (Howerth et al., 2006; Martinez & Wertz, 2005). Eine Infektion mit VSV führt zur Stomatitis Vesicularis, einer Erkrankung, die durch Fieber, Vesikelbildung (Bläschenbildung) um Maul, Zitzen und Kronsaum sowie durch starken Speichelfluss und Lahmheit der Extremitäten gekennzeichnet ist. Sie weist starke Ähnlichkeit zur Maul-und-Klauenseuche, eine der ansteckendsten Tiererkrankungen, auf. Das Virus kann über ein breites Spektrum von Arthropoden, die einen Teil des natürlichen Lebenszyklus von VSV darstellen (Reis Júnior et al., 2009), übertragen werden. Dazu gehören zahlreiche Vertreter der Ordnung Diptera (Zweiflügler) wie z.B. Sandfliegen (Psychodidae), Kriebelmücken (Simuliidae) (Mead et al., 1997, 1999, 2004), Stechmücken (Culicidae) (Liu & Zee, 1976) und die Gnizen (Ceratopogonidae) (Perez de Leon & Tabachnick, 2006). Das Virus kann aber auch über einen direkten Tier zu Tier Kontakt (Stallknecht et al., 2001) oder indirekt über kontaminierte Instrumente übertragen werden. Dies ist möglich, wenn kleine Läsionen in der Haut vorliegen, über die das Virus in den Organismus gelangen kann. Laborexperimente haben gezeigt, dass eine intranasale, intradermale und intravenöse Applikation des Virus ebenfalls zu einer Infektion führen kann (Howerth et al., 1997). Das Vesicular Stomatitis Virus kann auch Nagetiere und den Menschen infizieren. In Nagetieren führt VSV zu einer systemischen Infektion, die mit einer hohen Viruslast im Blut (Virämie) und mit einer Infektion des Zentralnervensystems (ZNS) einhergeht (Cornish et al., 2001; Bi et al., 1995). Menschen hingegen zeigen nur eine milde systemische Erkrankung mit Grippe-ähnlichen Symptomen (Letchworth et al., 1999; Tesh et al., 1969). VSV wird aufgrund seines relativ einfachen Aufbaus, seiner hohen Replikationsfähigkeit, einem schnellen Krankheitsverlauf (Letchworth et al., 1999) und seiner starken Sensitivität gegenüber dem antiviral-wirkenden Interferon (Balachandran & Barber, 2000) häufig als Virusmodell verwendet. Es eignet sich zudem sehr gut um die Aktivierung von B-Zellen zu untersuchen, da VSV eine T-Zell-unabhängige neutralisierende IgM Antwort und eine IgG Antwort, die stets CD4 T-Zellen-abhängig ist, induzieren kann (Charan & Zinkernagel, 1986).

### 3.2.2 Das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV)

Das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) gehört zur Familie der Arenaviridae. Diese Familie wird aufgrund ihrer geographischen, phylogenetischen und serologischen Unterschiede in die Altwelt- und Neuweltarenaviren eingeteilt (Urata & Yasuda, 2012). Das LCMV stellt einen wichtigen Vertreter der Altweltarenaviren dar, zeigt aber im Vergleich zu anderen Vertretern dieser Familie nicht die charakteristische Eigenschaft, meist tödliche hämorrhagische Fieber im Menschen zu verursachen.

Das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) ist ein nicht-zytopathisches, umhülltes, negatives Einzelstrang RNA Virus. Die RNA ist bi-segmentiert und besteht aus der S (ca. 3.5 kb) und der L (ca. 7.3 kb) RNA. Die S RNA kodiert das Nukleoprotein (NP, 63 kDa) und das virale Vorläufer-Glykoprotein (GPC, 70-75kDa). Die L RNA hingegen kodiert das (RING) Finger Protein Z (11 kDa) und die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase L (ca. 200 kDa). Das virale Vorläufer-Glykoprotein (GPC) wird post-translationell von der Protease SKI-1/S1P (Subtilisin-Kexin-Isozyme-1 / Site 1 protease) in das GP1 (40-46 kDa) und GP2 (35 kDa) Protein gespalten (Pinschewer et al., 2003; Beyer et al., 2003; Lenz et al., 2001).



**Abb.3.5:** Aufbau des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV)

Die Virionen des LCMV sind von einer Lipid-Hülle umgeben und tragen auf ihrer Oberfläche die Glykoproteine (GP1 und GP2), die mit den Z-Proteinen verbunden sind. Die virale genomische RNA ist bi-segmentiert und besteht aus den beiden zirkulären Ribonukleinsäuren L und S, die mit den Nukleoproteinen und der Polymerase L assoziiert sind und gemeinsam den Ribonukleoproteinkomplex bilden. Modifiziert nach Lapošová et al., 2013.

Die Funktionen der einzelnen Proteine sind in Tabelle 3.3 näher erklärt.

**Tab.3.3:** Die Proteine des Lympozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) und dessen Funktionen

Protein	Funktion
<b>GPC (70-75 kDa)</b>	GP1 und GP2 bilden trimere Komplexe auf der Virusoberfläche (Spikes). Das GP1 ist an der Spitze jedes Spikes lokalisiert.
	<b>GP1 (40-46 kDa)</b> GP1 ist für die Interaktion des Virus mit dem Rezeptor auf der Wirtszelloberfläche verantwortlich (Emonet et al., 2011; Borrow et al., 2010). Der Rezeptor des LCMV ist das $\alpha$ -Dystroglycan, welches hauptsächlich auf dendritischen Zellen exprimiert wird (Oldstone & Campbell, 2011).
	<b>GP2 (35 kDa)</b> Verbindet das GP1 mit der Virusoberfläche. Es vermittelt zudem die Fusion der viralen Membran (Eschli et al., 2007).
<b>Z (11kDa)</b>	Ist für den Zusammenbau und die Freisetzung des Virus durch Knospung zuständig (Urata & Yusada, 2012). Funktionell ist das Z Protein mit dem M Protein des VSV vergleichbar.
<b>L (250 kDa)</b>	Ist eine RNA-abhängige RNA Polymerase und Bestandteil des Ribonukleoproteinkomplex (Lee et al., 2002).
<b>NP (63 kDa)</b>	Bestandteil des Ribonukleoproteinkomplex. Es ist außerdem ein Inhibitor der Typ I Interferon Produktion (Zhou et al., 2010; Martínez-Sobrido et al., 2006).

Das Nukleoprotein und die RNA-abhängige RNA Polymerase L bilden gemeinsam mit der viralen RNA den Ribonukleoproteinkomplex, der eine Rolle in der Transkription und Replikation des Virus spielt (Cornu & de la Torre, 2001).

LCMV ist ein etabliertes Virusmodell für die Untersuchung akuter und persistierender viraler Infektionen (Oldstone 2002; Zinkernagel 2002). Die LCMV Stämme Armstrong (Arm) und WE führen zu einer akuten Infektion, die innerhalb von 8 Tagen durch eine starke CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort kontrolliert werden kann (Teijaro et al., 2013). Die LCMV Stämme Clone 13 und Docile hingegen, die durch eine schnelle Replikationsfähigkeit des Virus gekennzeichnet sind, führen hingegen zu einem Erschöpfungszustand (engl. exhaustion) der zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und einer damit einhergehenden Viruspersistenz in zahlreichen peripheren Organen (Moskophidis et al., 1993). Dieser Erschöpfungszustand ist durch einen Verlust der T-Zell-Effektorfunktionen oder sogar durch eine vollständige Zerstörung virus-spezifischer Effektor-T-Zellen gekennzeichnet (Wherry 2011; Yi et al., 2010). Der primäre Wirt des Lympozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) ist die Hausmaus (*Mus musculus*). Eine Replikation des Virus kann aber auch in anderen Nagetieren erfolgen (Parker et al., 1976). Da LCMV eine Zoonose darstellt, kann es vom Tier auf den Menschen übertragen werden. Dies kann beispielsweise durch die Inhalation Virus-infizierter Aerosole, Kontakt mit infizierten Exkrementen oder durch Bisse infizierter Nagetiere erfolgen (Barton & Mets, 1999, 2001). Es sind auch Fälle bekannt, bei denen nach Organtransplantationen eine Übertragung des Virus von Mensch zu Mensch (Spender auf Empfänger) (MacNeil et al., 2012; Amman et al., 2007; Fischer et al., 2006; Barton, 2006) oder, während der Schwangerschaft, von der Mutter auf den Fötus (Anderson et al., 2013; Hannachi et al., 2011; Meritet et al., 2009; Bonthius et al., 2007) stattgefunden hat. Eine LCMV Infektion beim Menschen kann entweder asymptomatisch verlaufen oder durch leichte Grippe-ähnliche Symptome gekennzeichnet sein. Im schlimmsten Fall kann es jedoch zur Ausbildung einer aseptischen Meningitis oder Meningoenzephalitis (Jamieson et al., 2006) oder einer Chorioretinitis (Zinkernagel et al., 2009; Barton et al., 2002) kommen. Zurzeit gibt es keine spezifische Therapie gegen eine LCMV Infektion. Eine Behandlung mit Ribavirin, einem Guanosinanalogen, kann jedoch die Symptome einer LCMV Infektion durch Inhibition der viralen Replikation reduzieren.

### **3.3 T-Zell-Toleranz und Autoimmunität**

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, im Körper eingedrungene Pathogene, Toxine und andere Fremdstoffe so schnell wie möglich zu erkennen und anschließend zu eliminieren. Dabei ist es besonders wichtig, dass der Körper zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen unterscheiden kann. Eine fehlende Immunreaktion auf körpereigene Strukturen bezeichnet man als Selbsttoleranz. Die Selbsttoleranz lässt sich in eine zentrale und periphere Toleranz einteilen. Die zentrale Toleranz findet in den primär lymphatischen Organen wie dem Thymus und dem Knochenmark statt. Dort werden die Thymozyten (T-Vorläuferzellen) während ihrer Entwicklung zu T-Zellen auf ihre Selbstreaktivität hin überprüft (Kyewski & Klein, 2006). Um dies zu ermöglichen,

werden den Thymozyten über die medullären Thymusepithelzellen sowie über dendritische Zellen und Makrophagen im Thymus vorkommende Antigene präsentiert (Schütt & Bröker, 2011). Neben den thymuseigenen Antigenen ist es den medullären Thymusepithelzellen mit Hilfe des Transkriptionsfaktors Autoimmune-Regulator (AIRE) außerdem möglich, periphere gewebespezifische Antigene, die sonst im Thymus nicht exprimiert werden, den T-Vorläuferzellen zu präsentieren (Carpenter & Bosselut, 2010; Kont et al., 2008; Derbinski et al., 2005). Alle Thymozyten, die Selbstpeptid über MHC-Proteine mit hoher Affinität binden, werden durch negative Selektion eliminiert. Somit wird gewährleistet, dass autoreaktiven T-Zellen mit hoher Affinität für „selbst“ eliminiert werden. Einigen der potenziell autoreaktiven Zellen gelingt es jedoch, dieser Selektion zu entgehen und in die Peripherie zu gelangen. Dort gibt es weitere Toleranzmechanismen, die die autoreaktiven T-Zellen unter Kontrolle halten. Zu diesen peripheren Toleranzmechanismen gehören die Ignoranz, die Anergie, die Deletion, die Immundeviation und die Regulation/Suppression (Lutz, 2006). Die Selbsttoleranz ist nicht angeboren, sondern ist eine Eigenschaft, die während der Lymphozytenentwicklung erworben wird (Schütt & Bröker, 2011; Raulet & Vance, 2006; Hogquist et al., 2005). Eine dauerhafte Präsenz bestimmter Antigene ist hierbei essenziell für die Genese und den Erhalt der Selbsttoleranz (Hof & Dörries, 2009). Ein Verlust der Selbsttoleranz führt zur Autoimmunität. Erkrankungen die sich aus dieser Autoimmunität ergeben bezeichnet man als Autoimmunerkrankungen (Grieco et al., 2011). Hierbei richtet sich das eigene Immunsystem gegen körpereigene Zellen oder Gewebe. In diesem Zusammenhang spielen vor allem autoreaktive T-Lymphozyten, also sich gegen eigenes Gewebe richtende T-Zellen, ebenso wie im Blut vorkommende Autoantikörper eine Rolle (Murphy et al., 2009). Wie es jedoch zu einem Verlust der Selbsttoleranz kommt und somit die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigt werden, ist trotz intensiver Forschung noch unzureichend geklärt. Folglich ist auch keine Therapie möglich, die sich auf die Ursache der Erkrankung bezieht. Eine Behandlung kann aus diesem Grund lediglich die Immunantwort unterdrücken, beispielsweise durch die Gabe von Immunsuppressiva, oder durch die Verabreichung von anti-inflammatorischen Medikamenten entzündungshemmend wirken und so die Symptome reduzieren. Nur so ist es möglich Körpergewebe vor einer weiteren Zerstörung durch einen Autoimmunprozess zu schützen. Man vermutet, dass es sich bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Neben einer genetischen Prädisposition (Maus: MHC-Lokus, Mensch: HLA-Antigene) stehen auch Umweltfaktoren, wie zum Beispiel virale (Ramondetti et al., 2012) und bakterielle (Masala et al., 2011) Infektionen, Toxine und Bestandteile in der Nahrung (Cavallo et al., 1996) unter Verdacht, Autoimmunerkrankungen zu induzieren. Es wird von einer immunologischen Kreuzreaktion (Molekulare Mimikry) ausgegangen, die durch Antigene in Nahrungsbestandteilen oder durch virale und bakterielle Antigene ausgelöst wird. Diese Kreuzreaktion kommt durch die sequenzielle oder strukturelle Ähnlichkeit von Molekülen

zwischen dem Wirt und den Mikroorganismen zustande (Gowthaman & Eswarakumar, 2013). Eine andere Möglichkeit besteht in der Aktivierung von autoreaktiven Lymphozyten durch sog. Superantigene oder durch eine Bystander-Aktivierung. Superantigene sind Antigene, die entweder bakteriellen oder viralen Ursprungs sind oder durch Mykoplasmen produziert werden können und eine unspezifische Aktivierung von T-Zellen verursachen können (Brodziak et al., 2012). Unter einer Bystander-Aktivierung hingegen versteht man die Aktivierung Pathogen-spezifischer und autoreaktiver T-Zellen während einer Infektion. Dies ist möglich, wenn während einer Entzündungsreaktion auch körpereigene, gewebespezifische Antigene freigesetzt werden, die gemeinsam mit den Pathogenen von dendritischen Zellen aufgenommen, prozessiert und den T-Zellen präsentiert werden (Neumann, 2008).

Weltweit leiden rund 100 Millionen Menschen an über 80 verschiedenen Autoimmunerkrankungen (Lis et al., 2012). Eine Autoimmunerkrankung kann entweder organspezifisch, systemisch, d.h. den ganzen Körper betreffend, oder intermediär verlaufen. Die intermediäre Verlaufsform kann eine Mischform der organspezifischen und systemischen oder ein vorübergehender Wechsel von der einen zur nächsten Verlaufsform darstellen.

### **3.3.1 Diabetes mellitus Typ I**

Ein Beispiel für eine Autoimmunerkrankung, die organspezifisch verläuft, ist der Diabetes mellitus Typ I. Nach dem deutschen Gesundheitsbericht Diabetes 2014 sind allein in Deutschland zurzeit rund 300.000 Menschen an einem Diabetes mellitus Typ I erkrankt und mit jedem Jahr nimmt die Anzahl der an Diabetes erkrankten Menschen kontinuierlich zu. Der Diabetes mellitus Typ I ist gekennzeichnet durch eine Zerstörung der Insulin-produzierenden  $\beta$ -Inselzellen im Pankreas durch autoreaktive  $CD8^+$  T-Zellen (Coppieters & von Herrath, 2011; Hassan et al., 2012; Oehen et al., 1992). Eine Zerstörung der  $\beta$ -Inselzellen von 80-90 % führt zu einer Manifestation dieser Erkrankung (Ghazarian et al., 2013; Van Belle et al., 2009). Neben den zytotoxischen T-Zellen ( $CD8^+$ ), sind auch andere Immunzellen wie  $CD4^+$  T-Helferzellen, B-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK), Makrophagen und dendritische Zellen an der Entstehung eines Typ I Diabetes beteiligt (Lehuen et al., 2010). Diese Erkrankung ist irreversibel und beginnt meist in der Kindheit, der Jugend oder im frühen Erwachsenenalter. Neben einer genetischen Prädisposition stehen auch hier Umweltfaktoren wie Viren, Bakterien, Diäten und Toxine unter Verdacht, Auslöser für die Entstehung und die Aufrechterhaltung dieser Erkrankung zu sein (Jaeckel et al., 2002). Das von den  $\beta$ -Inselzellen im Pankreas produzierte Insulin ist für die Regulation des Blutzuckerspiegels von enormer Wichtigkeit. Es sorgt dafür, dass mit der Nahrung aufgenommene Kohlenhydrate aus dem Blut in die Zellen geschleust werden. Die Skelettmuskelzellen und die Leber sind in der Lage viel Glukose aufzunehmen und diese in Form von Glykogen zu speichern oder in Energie umzuwandeln. Der Gegenspieler vom

Insulin ist das Glukagon. Dieses wird von den alpha-Inselzellen im Pankreas produziert (Youos, 2011) und ist für den Abbau des Glykogens zuständig. Das Glukagon wird sezerniert, wenn der Blutzuckerspiegel den Normbereich unterschreitet. Es ist somit für den Erhalt des Blutzuckerspiegels essenziell (González-Vélez et al., 2012). Werden die Kohlenhydrate nicht aus dem Blut entfernt zeigt sich dies in einem erhöhten Blutzuckerspiegel (Hyperglykämie). Eine anhaltende Hyperglykämie kann zu Schädigungen der Augen, Nieren und Nerven führen sowie an der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen beitragen (Zaret & White, 2010). Neben der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels hat Insulin auch einen entscheidenden Einfluss auf den Fettstoffwechsel des Körpers (Culina et al., 2013). Ein Insulinmangel kann zurzeit nur durch tägliche subkutane Insulinsubstitutionen ausgeglichen werden. Trotz täglicher Insulin Injektionen können Komplikationen und dauerhafte Schädigungen auftreten, die sich entweder aus einem therapiebedingten Insulinüberschuss, einem Insulinmangel oder durch die Beeinflussung anderer Stoffwechselwege ergeben. Aus diesem Grund ist es wichtig die tatsächliche(n) Ursache(n) dieser Erkrankung aufzudecken und somit neue Angriffspunkte für die Behandlung eines Typ I Diabetes mellitus zu finden.

### **3.3.2 Mausmodelle des Diabetes mellitus Typ I**

Im Laufe der letzten Jahrzehnte sind unterschiedliche Mausmodelle für eine Untersuchung des Diabetes mellitus Typ I entwickelt worden. Man unterscheidet zwischen Modellen, in denen der Typ I Diabetes spontan entsteht wie z.B. bei dem NOD (engl. none obese diabetic)-Maus-Modell oder denen die durch pharmakologische Substanzen wie bei dem multiplen low-dose-Streptozotocin-Modell, durch Pathogene wie bei dem RIP-GP und RIP-NP Mausmodell oder durch bestimmte Transfermodelle induziert werden kann (Van Belle et al., 2009). Alle diese genannten Mausmodelle sollen dazu beitragen, sich mit unterschiedlichen Aspekten dieser Erkrankung zu befassen, sowie die zellulären und molekularen Mechanismen, die an der Entstehung dieser Autoimmunerkrankung involviert sind, besser zu verstehen. Das Ziel soll letztendlich die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten sein.

#### **3.3.2.1 Das RIP-GP Mausmodell**

Ein sehr gutes Mausmodell für die Untersuchung eines Typ I Diabetes stellt das RIP-GP Mausmodell dar. Es handelt sich um eine transgene Mauslinie, in der das Glykoprotein (GP) vom LCMV auf den  $\beta$ -Inselzellen im Pankreas unter dem Ratteninsulinpromoter exprimiert wird (Ohashi et al., 1991; Oldstone et al., 1991). In diesen Mäusen entstehen im Knochenmark schwach und stark autoreaktive CD8<sup>+</sup> Vorläufer T-Zellen, die spezifisch für das LCMV Glykoprotein sind. Zur weiteren Differenzierung

wandern diese schließlich in den Thymus ein. Die fehlende Expression und Präsentation vom LCMV-GP im Thymus führt dazu, dass diese autoreaktiven T-Zellen nicht negativ selektioniert werden können. Sie entkommen dem Toleranzmechanismus und gelangen somit in die Peripherie. In naiven RIP-GP Mäusen erkennen die autoreaktiven T-Zellen das LCMV Glykoprotein, das auf den  $\beta$ -Inselzellen im Pankreas exprimiert wird, als körpereigen. Sie sind somit ignorant oder tolerant gegenüber dem Glykoprotein des Virus und entwickeln keinen spontanen Autoimmundiabetes. Nach einer Infektion dieser Mäuse mit LCMV erkennen und attackieren die autoreaktiven Virus-spezifischen T-Zellen die infizierten Zellen ebenso wie das LCMV Glykoprotein, das auf den  $\beta$ -Inselzellen im Pankreas exprimiert wird. Ein Angriff der  $\beta$ -Inselzellen, die für die Insulinproduktion verantwortlich sind, führt schließlich zur vollständigen Zerstörung dieser Zellen und die Mäuse werden hyperglykämisch. In diesen Mäusen kann innerhalb von 10-14 Tagen (Christen et al., 2010) ein dem Typ I Diabetes ähnlicher Phänotyp induziert werden.

### **3.3.2.2 Das RIP-NP Mausmodell**

Die RIP-NP Mäuse exprimieren das Nukleoprotein vom LCMV als Transgen unter dem Ratteninsulinpromoter (RIP) auf den  $\beta$ -Inselzellen im Pankreas (Oldstone et al., 1991) sowie im Thymus. Durch die Expression des LCMV-NP im Thymus kommt es zu einer intrathymischen Deletion der hochaffinen, autoreaktiven  $CD8^+$  T-Zellen. Dabei gelangen nur die autoreaktiven  $CD8^+$  T-Zellen mit geringer Affinität zu Selbstantigenen in die Peripherie. Ohne eine Infektion tolerieren die Mäuse das Transgen im Pankreas. Eine Infektion der Mäuse mit LCMV führt hingegen zu einer langsamen Zerstörung der  $\beta$ -Inselzellen im Pankreas. Nach ca. 1 bis 6 Monaten manifestiert sich auch dort ein Typ I Diabetes (Autoimmundiabetes), der im Vergleich zum RIP-GP Mausmodell von  $CD4^+$  T-Zellen abhängig ist (Christen et al., 2010).

### **3.3.3 Immunsupprimierende Medikamente**

Um die Funktion des Immunsystems zu unterdrücken, werden immunsupprimierende Medikamente eingesetzt. Zurzeit unterscheidet man vier große Gruppen von Wirkstoffen (Tabelle 3.4), die allerdings nicht nur allein zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen, sondern auch bei allergischen Reaktionen, Tumorerkrankungen oder nach Organtransplantationen zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen (engl. Graft versus Host Disease) eingesetzt werden.

**Tab. 3.4:** Immunsupprimierende Medikamente und deren Wirkmechanismen

Wirkstoffgruppe	Wirkstoffbeispiele	Wirkmechanismus
<b>1. Kortikosteroide</b>	Kortison Prednison	Können inflammatorische Gene, durch Blockierung der Histon Acetyltransferase, inhibieren und zugleich eine Reihe anti-inflammatorischer Gene aktivieren (Barnes, 2006, 2010).
<b>2. Zytotoxische Medikamente</b>	Methotrexat	Inhibiert die Interaktion von IL-1 mit dem IL-1R (Brody et al., 1993). Hat Einfluss auf die Proliferation von Lymphozyten (Kovarik, 2013).
<b>3. Pilz- und Bakterienwirkstoffe</b>	Cyclosporin A	Beeinflusst die Expression von IL-2 und des IL2R (Gründemann et al., 2013).
<b>4. Biologika</b>	Basiliximab	Inhibition des Interleukin-2 Rezeptors (IL-2R) (Kovarik, 2013).

Aufgrund von teilweise starken Nebenwirkungen, die diese Medikamente verursachen, ist der Einsatz begrenzt. Das Ziel der Wissenschaft ist es, immer wieder neue und bessere Medikamente mit weniger Nebenwirkungen zu entwickeln.

Tunicamycin ist ein Medikament, welches wegen seiner antibiotischen und antiviralen Eigenschaften bekannt ist (Takatsuki et al., 1971) und möglicherweise immunsupprimierend wirksam ist.

Tunicamycin wird von verschiedenen Bakterien der Gattung *Streptomyces* produziert und ist als ein Inhibitor der Proteinglykosylierung bekannt (Price & Tsvetanova, 2007). Die Proteinglykosylierung stellt eine der bedeutendsten Schritte der Proteinmodifikation dar und ist besonders wichtig für die Faltung, Stabilität, Funktionalität und den Transport der Proteine und bietet zugleich einen Schutz vor proteolytischem Abbau. Durch eine Tunicamycin-abhängige Inhibition des Enzyms GlcNAc phosphotransferase (GPT) wird der Transport von N-Acetylglukosamin-1-phosphat auf Dolicholmonophosphat blockiert und somit die N-glykosidische Modifikation von Proteinen verhindert. Dies führt zu einem ER-Stress und einem Stillstand des Zellzyklus in der späten G1-Phase (Han et al., 2013; Wang et al. 2011).

### 3.4 Fragestellung und Zielsetzung

Wie es dem angeborenen Immunsystem einerseits gelingt, eine Virusinfektion durch die Produktion von Typ I Interferon einzudämmen, und andererseits ausreichend virales Antigen für die Präsentation und Aktivierung adaptiver Immunzellen zu produzieren, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Das Ziel war es, zunächst anhand zweier unterschiedlicher Virusmodelle Zellen mit vermehrtem Virusaufkommen mit Hilfe immunfluoreszenzmikroskopischer Gewebeuntersuchungen auffindig zu machen und diese durch Zellseparation sowie den Einsatz unterschiedlicher knock-out Mausmodelle näher zu charakterisieren. Darauf aufbauend sollte der Einfluss dieser Zellen auf die Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems mit Hilfe immunologischer Methoden bestimmt werden. Im Anschluss und in Abhängigkeit der Resultate war es die Aufgabe, die Relevanz einer Virusinfektion in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu analysieren. Als Autoimmunmodell sollte der Typ I Diabetes (Autoimmundiabetes) dienen. Inwieweit eine Inhibition der viralen Replikation die Produktion von kreuzreaktiven Antigenen beeinflusst, die hauptsächlich für die Zerstörung der Selbsttoleranz angesehen werden, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Die Herausforderung bestand darin, mögliche Anhaltspunkte für die Prävention dieser Autoimmunerkrankung in einem für Typ I Diabetes anerkannten Mausmodell sowie in verschiedenen knock-out Mausmodellen mit Hilfe immunologischer und molekularbiologischer Methoden zu erarbeiten. Inwieweit hierbei das Antibiotikum Tunicamycin immunsupprimierende Eigenschaften aufweist und als mögliches Therapeutikum für einen Typ I Diabetes genutzt werden kann, sollte des Weiteren in dieser Arbeit analysiert werden.

## 4. ERGEBNISSE

### 1. Publikation

#### 4.1 **Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus**

**Honke N**, Shaabani N, Cadeddu G, Sorg UR, Zhang DE, Trilling M, Klingel K, Sauter M, Kandolf R, Gailus N, van Rooijen N, Burkart C, Baldus SE, Grusdat M, Löhning M, Hengel H, Pfeffer K, Tanaka M, Häussinger D, Recher M, Lang PA, Lang KS

Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus.

*Nat Immunol* 2012; **13**(1):51-7 .doi: 10.1038/ni.2169.

Die Rechte dieser Publikation liegen beim Journal *Nature Immunology*.

Die Originalarbeit kann über die National Library of Medicine

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) oder den Link des Herausgebers

(<http://www.nature.com/ni/index.html>) eingesehen und heruntergeladen werden.

## Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus

Nadine Honke<sup>1</sup>, Namir Shaabani<sup>1</sup>, Giuseppe Cadeddu<sup>2</sup>, Ursula R Sorg<sup>3</sup>, Dong-Er Zhang<sup>4</sup>, Mirko Trilling<sup>5</sup>, Karin Klingel<sup>6</sup>, Martina Sauter<sup>6</sup>, Reinhard Kandolf<sup>6</sup>, Nicole Gailus<sup>1</sup>, Nico van Rooijen<sup>7</sup>, Christoph Burkart<sup>4</sup>, Stephan E Baldus<sup>2</sup>, Melanie Grusdat<sup>1</sup>, Max Löhning<sup>8</sup>, Hartmut Hengel<sup>5</sup>, Klaus Pfeffer<sup>3</sup>, Masato Tanaka<sup>9</sup>, Dieter Häussinger<sup>1</sup>, Mike Recher<sup>10,13</sup>, Philipp A Lang<sup>1,11,13</sup> & Karl S Lang<sup>1,12,13</sup>

The innate immune system limits viral replication via type I interferon and also induces the presentation of viral antigens to cells of the adaptive immune response. Using infection of mice with vesicular stomatitis virus, we analyzed how the innate immune system inhibits viral propagation but still allows the presentation of antigen to cells of the adaptive immune response. We found that expression of the gene encoding the inhibitory protein Usp18 in metallophilic macrophages led to lower type I interferon responsiveness, thereby allowing locally restricted replication of virus. This was essential for the induction of adaptive antiviral immune responses and, therefore, for preventing the fatal outcome of infection. In conclusion, we found that enforced viral replication in marginal zone macrophages was an immunological mechanism that ensured the production of sufficient antigen for effective activation of the adaptive immune response.

The innate immune system limits viral replication during systemic infection via the production of type I interferon. Lack of the receptor for type I interferon promotes viral replication and leads to viral persistence and the death of virus-infected animals<sup>1,2</sup>. Macrophages are key participants during type I interferon-mediated suppression of virus<sup>3–6</sup>. With their potent phagocytic ability, macrophages act as a first line of defense against pathogens entering tissues. Splenic red pulp, marginal zone macrophages and Kupffer cells are associated with the endothelium and can capture antigens from the blood vessel lumen<sup>5,7,8</sup>. They clear the blood of immune complexes and complex particles of high molecular mass, including virus particles<sup>7–9</sup>. Phagocytosis of the virus is followed by suppression of viral replication in a type I interferon-dependent manner<sup>4,5</sup>. This mechanism suppresses the spread of virus but limits the amount of antigen available for priming of the adaptive immune system.

Binding of type I interferon leads to dimerization of type I interferon receptors, which phosphorylates and activates the tyrosine kinases Tyk2 and Jak1. These kinases recruit the transcription factors STAT1 and STAT2. The STAT proteins form homodimers and heterodimers that can translocate to the nucleus and initiate the transcription of type I interferon-stimulated genes<sup>10</sup>. More than 300 genes are

regulated by interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) or IFN- $\beta$ <sup>11</sup>. Examples of genes that exert antiviral activity are *Isg15* (interferon-stimulated gene 15), *Mx1* (myxovirus resistance 1), *Oas1* (2'5'-oligoadenylate synthetase 1), *Eif2ak2* (protein kinase R) and *Rnasel* (ref. 2). A potent inhibitor of this signaling cascade is Usp18 (UBP43)<sup>12</sup>, which binds to the Jak1-binding site of the receptor for IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  and inhibits its phosphorylation<sup>12,13</sup>. Accordingly, Usp18 deficiency in mice leads to high type I interferon sensitivity and limited viral replication after viral infection<sup>12</sup>. However, it remains unclear how Usp18 expression in various cell types influences the overall immune response.

In addition to controlling viral replication, cells of the innate immune response initiate the priming of cells of the adaptive immune response. Priming usually occurs in secondary lymphoid organs, such as lymph nodes and spleen. Antigens from the lymph can be captured by cells in the subcapsular zone of the lymph node, whereas antigens from the blood are filtered in the spleen by macrophages from the red pulp and the marginal zone<sup>14</sup>. Metallophilic macrophages in the marginal zone are characterized by the expression of the C-type lectin CD169 (siglec-1)<sup>15</sup>. CD169<sup>+</sup> macrophages present captured virus antigen directly to B cells<sup>16</sup>. Fibroblastic reticular cells form conduits together with type I and type III collagen<sup>17</sup>. These channels

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany. <sup>2</sup>Institute for Pathology, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany. <sup>3</sup>Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany. <sup>4</sup>Department of Pathology, Division of Biological Sciences and Moores University of California San Diego Cancer Center, University of California San Diego, La Jolla, California, USA. <sup>5</sup>Institute for Virology, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany. <sup>6</sup>Department of Molecular Pathology, Eberhard Karls University Tübingen, Tübingen, Germany. <sup>7</sup>Department of Molecular Cell Biology, Faculty of Medicine, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands. <sup>8</sup>Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité-University Medicine Berlin and German Rheumatism Research Center, Berlin, Germany. <sup>9</sup>Laboratory for Innate Cellular Immunity, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, Yokohama, Japan. <sup>10</sup>Division of Immunology, Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. <sup>11</sup>Campbell Family Institute for Breast Cancer Research, Ontario Cancer Institute, University Health Network, Toronto, Ontario, Canada. <sup>12</sup>Institute for Immunology, University of Essen, Essen, Germany. <sup>13</sup>These authors contributed equally to this manuscript. Correspondence should be addressed to K.S.L. (karlsebastian.lang@uk-essen.de) or P.A.L. (philipp.lang@gmx.net).

Received 3 August; accepted 19 October; published online 20 November 2011; doi:10.1038/ni.2169

ARTICLES

reach into the marginal zone of the spleen and can distribute antigens from metallophilic macrophages through the splenic white pulp<sup>18</sup>. Resident dendritic cells (DCs) take up these antigens and present them to T cells<sup>18</sup>.

The amount of presented antigen limits the adaptive immune response<sup>19–23</sup>. *In vitro* studies have shown that at least ten complexes of peptide and major histocompatibility complex are required for the formation of an immunological synapse between DCs and T cells<sup>24</sup>. *In vivo* induction of T cell proliferation in the lymph node requires DCs with around  $2 \times 10^4$  complexes of peptide and major histocompatibility complex<sup>25</sup>. Low-affinity T cell antigen receptors require a larger antigen dose than do high-affinity T cell antigen receptors<sup>26</sup>. Such findings suggest that a larger antigen dose improves T cell immunity. Consistently, application of a low dose of inactivated, replication-incompetent virus leads to limited induction of neutralizing antibodies, whereas replicating virus leads to a strong antibody response<sup>27</sup>. However, the existence of a specific compartment that would promote viral replication and increase the presented antigen to improve the adaptive immune response remains unknown.

In this study, using mouse vesicular stomatitis virus (VSV), we found that CD169<sup>+</sup> macrophages in the marginal zone of the spleen formed a compartment of enhanced viral replication. Early after infection, red pulp macrophages in the spleen and Kupffer cells in the liver captured virus and effectively suppressed viral replication in a type I interferon-dependent manner. In contrast, CD169<sup>+</sup> macrophages captured virus but did not respond to type I interferon and thus allowed anatomically restricted viral replication in the splenic marginal zone. Enhanced replication in CD169<sup>+</sup> macrophages was linked to overexpression of *Usp18*. *Usp18*<sup>-/-</sup> mice had little viral replication in CD169<sup>+</sup> macrophages. The lack of either CD169<sup>+</sup> cells or *Usp18* led to impaired and delayed adaptive immunity to VSV. The delayed induction of antibodies in *Usp18*<sup>-/-</sup> mice led to the distribution of virus to neuronal tissue and to the death of mice. Together our findings suggest that enforced viral replication in CD169<sup>+</sup> macrophages promotes the adaptive immune response and guarantees survival after infection with a prototypic cytopathic virus.

RESULTS

CD169<sup>+</sup> metallophilic macrophages allow viral replication

To determine how the reticuloendothelial system inhibits the spread of systemic virus while presenting sufficient amounts of antigen to cells of the adaptive immune response, we first analyzed the virus-capturing ability of macrophages after intravenous infection. We treated mice with clodronate liposomes to deplete them of macrophages before VSV infection<sup>16</sup>. Replicating virus was detectable in the blood for more than 60 min without macrophages (Fig. 1a). This suggested that macrophages have a crucial role in virus uptake. In mice lacking spleen and lymph nodes (alymphoplasia (*aly/aly*) mice given splenectomy)<sup>28</sup>, virus inoculate was taken up efficiently (Fig. 1a), which suggested that without macrophages in the spleen, macrophages from other tissues, such as liver Kupffer cells, sufficiently took up virus. This indicated that macrophages in lymphoid and nonlymphoid compartments participated in systemic virus clearance.

We next analyzed viral production after uptake by macrophages. We detected replicating virus 1 h and 7 h after infection in the spleen, whereas we detected no virus in other tissues (Fig. 1b). To analyze viral replication without macrophages after intravenous infection, we depleted mice of macrophages by injection of clodronate liposomes and noticed enhanced replication of VSV in several organs (Fig. 1c). Accordingly, mice depleted of macrophages were highly susceptible to VSV infection (Fig. 1d). These observations indicated

that macrophages were crucial for the control of VSV replication in nonlymphoid tissue. To test the hypothesis that type I interferon suppresses VSV replication in macrophages, we infected mice lacking the IFN- $\alpha$  receptor (*Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice; called ‘*Ifnar*<sup>-/-</sup> mice’ here) with VSV intravenously. *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice had excessive VSV replication in the liver, lung, kidney, spleen, thymus and brain, whereas wild-type mice had infectious VSV only in the spleen (Fig. 1e). These results showed that macrophages in nonlymphoid tissues captured the virus and suppressed its replication in a type I interferon-dependent manner. In ‘macrophage-competent’ wild-type mice, we detected infectious virus particles only in the spleen (Fig. 1b). This suggested that type I interferon-dependent suppression of viral replication in macrophages was limited in the spleen.

To investigate the mechanism of the enhanced viral replication in the spleen, we next assessed viral protein expression by immunohistological analysis of spleen and liver tissue 7 h after VSV infection. We detected VSV glycoprotein in the spleen but not in the liver (Fig. 1f). Immunohistological analysis showed that CD169<sup>+</sup> metallophilic macrophages allowed expression of VSV proteins (Fig. 1g). After administration of ultraviolet (UV) light-inactivated VSV, we did not detect glycoprotein expression in CD169<sup>+</sup> cells (Fig. 1h), which supported the hypothesis that VSV actively replicates in these cells. To address the contribution of CD169<sup>+</sup> macrophages to VSV replication, we used mice that express the diphtheria toxin receptor under control of the *Cd169* promoter (CD169-DTR mice)<sup>29</sup>. Treatment with diphtheria toxin depletes these mice of CD169<sup>+</sup> macrophages. We generated bone marrow chimeras by transferring bone marrow from control wild-type or CD169-DTR mice into irradiated wild-type recipients. After reconstitution, we treated chimeric mice with diphtheria toxin and infected them with VSV intravenously. Administration of diphtheria toxin depleted mice of CD169<sup>+</sup> macrophages in the spleen (Fig. 1i). Immunohistological staining of VSV in the marginal zone was not detectable in mice depleted of CD169<sup>+</sup> macrophage but was detectable in diphtheria-treated wild-type chimeric mice (Fig. 1i), which suggested that CD169<sup>+</sup> macrophages in the marginal zone enforced viral replication, whereas conventional macrophages in the red pulp suppressed virus propagation. Spleen sections from *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice showed VSV replication in F4/80<sup>+</sup> red pulp macrophages and in CD169<sup>+</sup> macrophages (Fig. 1j). Spleen sections from wild-type mice showed VSV replication only in CD169<sup>+</sup> macrophages (Fig. 1j). In agreement with that result, *Ifnar*<sup>-/-</sup> Kupffer cells expressed VSV glycoprotein in the liver, but wild-type Kupffer cells did not (Fig. 1j). These findings suggested that in wild-type mice, Kupffer cells and red pulp macrophages suppressed viral replication in a type I interferon-dependent manner, whereas CD169<sup>+</sup> macrophages were resistant to the effects of type I interferon. We conclude that early uptake of virus by macrophages followed by type I interferon-mediated suppression of replication is essential for the control of VSV infection and the survival of mice. CD169<sup>+</sup> macrophages, however, allow viral replication in the presence of type I interferon.

Usp18 in CD169<sup>+</sup> macrophages enhances viral replication

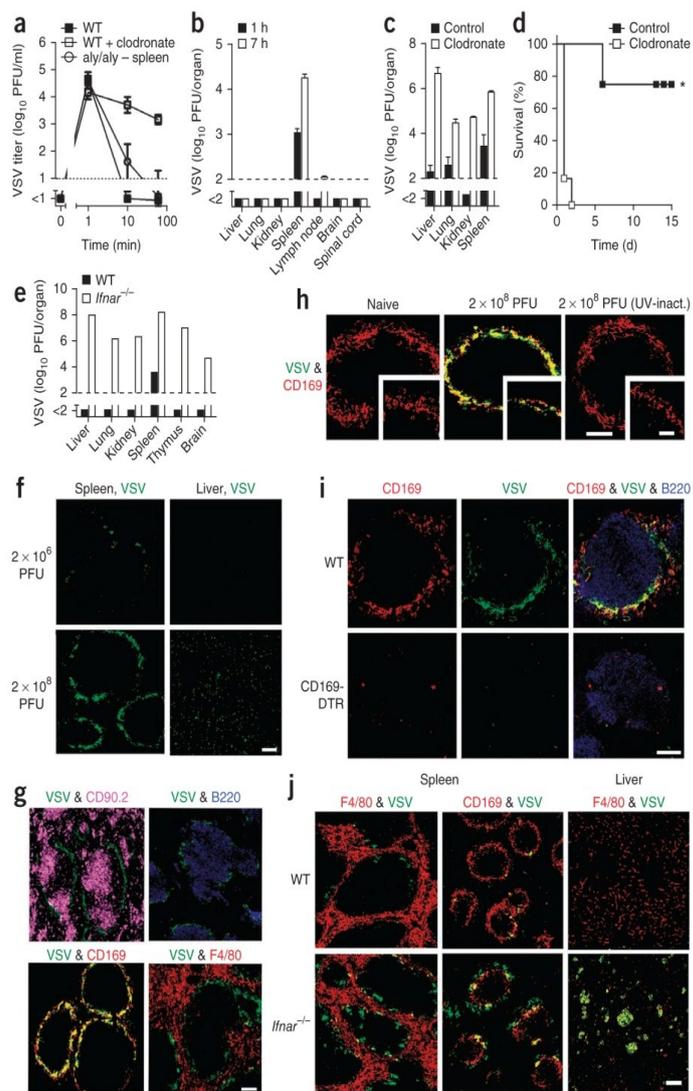
We next investigated the mechanism underlying the enforced viral replication in CD169<sup>+</sup> macrophages. Because *Usp18* inhibits the type I interferon signaling pathway, competing with Jak1 (refs. 12,13), we hypothesized that *Usp18* expression might allow VSV replication in CD169<sup>+</sup> macrophages. We did *in situ* hybridization of *Usp18* during VSV infection. *Usp18* was upregulated during infection in the lymph follicle and the marginal zone but not in the red pulp (Supplementary Fig. 1). To directly compare the expression of *Usp18* in CD169<sup>+</sup> and F4/80<sup>+</sup> macrophages, we sorted F4/80<sup>+</sup> and CD169<sup>+</sup> macrophages by magnetic-activated cell sorting and flow cytometry

© 2012 Nature America, Inc. All rights reserved.



**Figure 1** CD169<sup>+</sup> metallophilic macrophages allow viral replication in the spleen, but red pulp macrophages and Kupffer cells do not. **(a)** Blood titers of VSV in alymphoplasia mice given splenectomy (*aly/aly* – spleen), C57BL/6 mice depleted of macrophages (WT + clodronate), and control C57BL/6 wild-type mice (WT; *n* = 4 per group) injected intravenously with  $2 \times 10^6$  PFU of VSV. **(b)** VSV titers of C57BL/6 mice (*n* = 5) infected intravenously with  $2 \times 10^6$  PFU of VSV. **(c,d)** Viral replication, measured after 16 h **(c)**, and survival **(d)** of mice depleted of macrophages (clodronate) or injected with empty liposome (control) and infected intravenously 1 d later with  $2 \times 10^7$  PFU of VSV (*n* = 5 **(c)** or 4–6 **(d)** mice per group). **(e)** VSV titers of wild-type and *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice (*n* = 2 per group) 16 h after intravenous infection with  $2 \times 10^6$  PFU of VSV.

**(f)** Immunofluorescence in spleen and liver sections from C57BL/6 mice (*n* = 3) 7 h after intravenous infection with  $2 \times 10^6$  PFU or  $2 \times 10^8$  PFU, stained for VSV glycoprotein (green). **(g)** Immunofluorescence of spleen sections from C57BL/6 mice (*n* = 3) 7 h after intravenous infection with  $2 \times 10^8$  PFU of VSV, stained for VSV glycoprotein (green), B220 (B cells; blue), CD90.2 (T cells; magenta), F4/80 (macrophages; red) and CD169 (metallophilic macrophages; red). **(h)** Immunofluorescence of spleen sections from C57BL/6 mice (*n* = 3 per group) 7 h after intravenous infection with  $2 \times 10^8$  PFU of active VSV or  $2 \times 10^8$  PFU of UV light-inactivated VSV, stained for VSV glycoprotein (green) and CD169 (red). **(i)** Immunofluorescence of spleen sections from C57BL/6 bone marrow chimeras (*n* = 4 per group) reconstituted with CD169-DTR or wild-type bone marrow cells as control, treated intraperitoneally with diphtheria toxin and infected intravenously 3 d later with  $2 \times 10^8$  PFU of VSV, stained for VSV glycoprotein (green) and CD169 (red) 7 h after infection. **(j)** Immunofluorescence of spleen and liver sections from wild-type and *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice (*n* = 3 per genotype) 16 h after intravenous infection with  $2 \times 10^6$  PFU of VSV, stained for F4/80 (red), CD169 (red) and VSV glycoprotein (green). Scale bars, 100  $\mu$ m (main images) or 20  $\mu$ m (insets). \**P* < 0.01 (Student's *t*-test). Data are representative of two **(a–d,i)** or one of two **(e–h, j)** experiments (mean  $\pm$  s.e.m. **(a)** or mean and s.e.m. **(b,c)**).



© 2012 Nature America, Inc. All rights reserved. mpj

(Supplementary Fig. 2) and measured *Usp18* mRNA expression by quantitative RT-PCR. The expression of *Usp18* was significantly higher in CD169<sup>+</sup> cells than in CD169<sup>-</sup>F4/80<sup>+</sup> macrophages (Fig. 2a). To further confirm enhanced *Usp18* expression in CD169<sup>+</sup> macrophages, we did laser-capture microdissection of cells from the marginal zone and red pulp (Supplementary Fig. 3). Cells isolated from the marginal zone had higher expression of *Usp18* than did cells from the red pulp (Fig. 2b). To determine whether differences in *Usp18* expression can directly affect interferon-dependent VSV suppression, we transfected HeLa human cervical cancer cells with increasing concentrations of *Usp18* expression plasmids<sup>13</sup>. In addition we used treatment with IFN- $\alpha$ 2 because HeLa cells respond well to this interferon subtype. In the presence of IFN- $\alpha$ 2, *Usp18* expression enhanced VSV replication in a dose-dependent manner (Fig. 2c). To further determine whether the expression of *Usp18* in CD169<sup>+</sup> macrophages was responsible for enhanced VSV replication *in vivo*, we infected *Usp18*<sup>-/-</sup> mice with

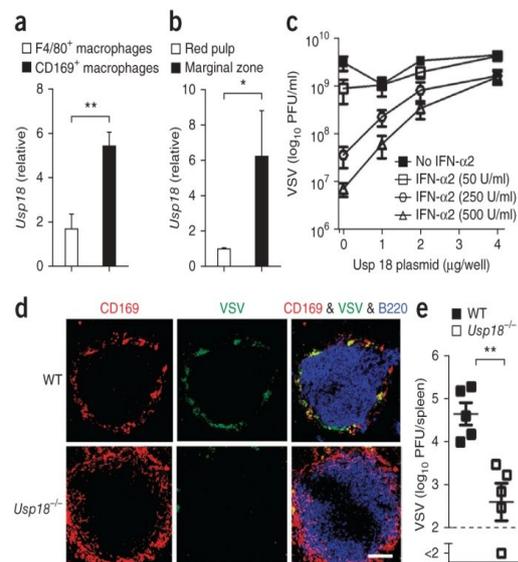
VSV intravenously. Immunohistological analysis showed that the distribution of CD169<sup>+</sup> macrophages was similar in *Usp18*<sup>-/-</sup> mice and wild-type mice. However, we detected little expression of viral proteins in CD169<sup>+</sup> macrophages from *Usp18*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2d). VSV replication in the spleen of *Usp18*<sup>-/-</sup> mice was significantly lower than that in wild-type mice (Fig. 2e). Together these results indicated that expression of *Usp18* in CD169<sup>+</sup> macrophages in the lymph follicle was essential for the enforced replication of VSV.

**VSV replication promotes adaptive immunity**

Next we analyzed the physiological role of VSV replication in metallophilic macrophages. Intravenous immunization with inactive (UV light-inactivated) virus leads to a limited adaptive immune response<sup>27,30</sup>. We hypothesized that enforced viral replication in CD169<sup>+</sup> macrophages could promote adaptive immunity. Inactivation of VSV replication by UV light limited the

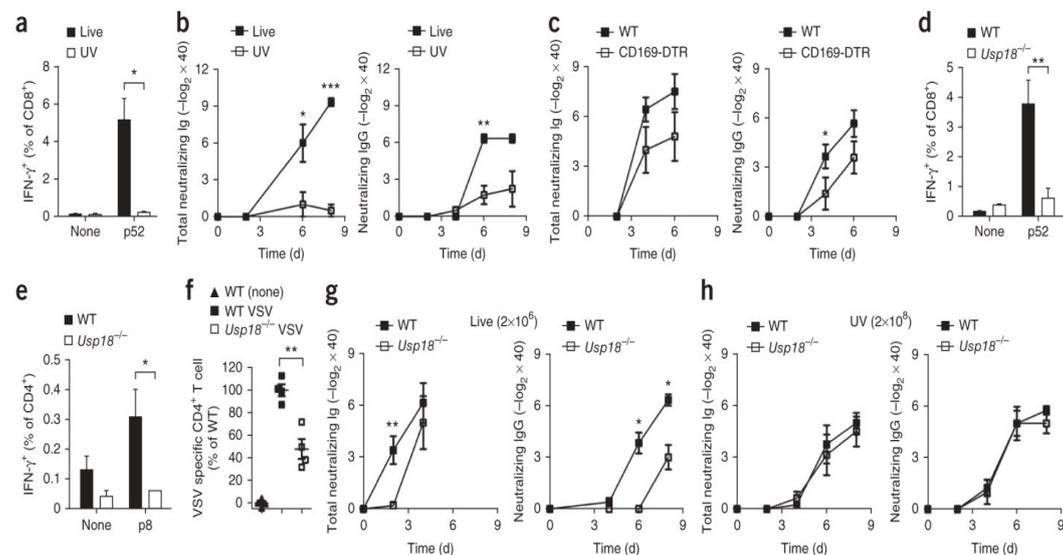
ARTICLES

**Figure 2** Expression of *Usp18* in CD169<sup>+</sup> cells is responsible for enhanced viral replication. (a) Expression of *Usp18* mRNA in CD169<sup>+</sup> macrophages and F4/80<sup>+</sup> macrophages sorted from naive C57BL/6 mice ( $n = 4-5$ ), presented relative to the expression of *Gapdh* (encoding glyceraldehyde phosphate dehydrogenase). (b) Expression of *Usp18* mRNA in marginal zone tissue and red pulp tissue isolated by laser-capture microdissection from spleen sections from naive C57BL/6 mice ( $n = 4$ ), presented relative to *Gapdh* expression. (c) VSV titers in supernatants of HeLa cells ( $n = 6$  replicates) transfected with various concentrations of *Usp18*-expressing plasmid, infected with VSV (multiplicity of infection, 0.01) and treated 24 h later with various concentrations of recombinant IFN- $\alpha 2$  (key), assessed 24 h after infection. (d) Immunofluorescence of spleen sections from wild-type or *Usp18*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 3$  per genotype) 7 h after intravenous infection with  $2 \times 10^8$  PFU of VSV, stained for VSV glycoprotein (green), CD169 (red) and B220 (blue). Scale bar, 100  $\mu$ m. (e) Spleen VSV titers from wild-type or *Usp18*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 5$  per genotype) 7 h after intravenous infection with  $2 \times 10^6$  PFU of VSV. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  (Student's *t*-test). Data are representative of two (a,b,d,e) or three (c) experiments (mean and s.e.m. (a,b) or mean  $\pm$  s.e.m. (c,e)).



virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell response (Fig. 3a). Lack of replicating VSV blunted the induction of total neutralizing immunoglobulins (IgM and IgG) and of neutralizing IgG (Fig. 3b). Next we addressed the involvement of CD169<sup>+</sup> metallophilic macrophages during activation of the adaptive immune response. The antiviral B cell response in C57BL/6 mice that had received transplantation of CD169-DTR bone marrow and had been treated with diphtheria toxin before intravenous infection with VSV was delayed and diminished relative to that of C57BL/6 mice that had received wild-type bone marrow

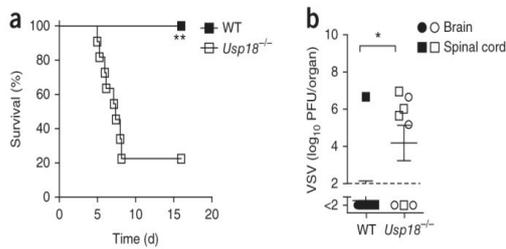
transplants and had been treated with diphtheria toxin (Fig. 3c). To explore the role of *Usp18* in activation of the adaptive immune system, we analyzed adaptive immune responses in *Usp18*<sup>-/-</sup> mice after intravenous infection with VSV. *Usp18*-deficient mice had a very impaired VSV-specific CD8<sup>+</sup> T cell response relative to that of



**Figure 3** VSV replication in the spleen is required for efficient T cell and B cell responses. (a) Intracellular staining of IFN- $\gamma$  in splenocytes obtained from C57BL/6 mice ( $n = 3$ ) 7 d after intravenous immunization with replicating VSV (Live;  $2 \times 10^6$  PFU) or UV light-inactivated VSV (UV;  $2 \times 10^6$  PFU) and 6 h after no restimulation (none) or restimulation with VSV-derived major histocompatibility complex class I-restricted p52 peptide (p52). (b) VSV-neutralizing antibodies from C57BL/6 mice ( $n = 3-4$ ) after intravenous immunization as in a. (c) VSV-neutralizing antibodies from C57BL/6 bone marrow chimeras ( $n = 5-6$  per group) reconstituted with CD169-DTR cells or wild-type cells (control), treated intraperitoneally with diphtheria toxin and infected intravenously 3 d later with  $2 \times 10^6$  PFU of VSV. (d,e) Intracellular IFN- $\gamma$  staining of splenocytes derived from wild-type or *Usp18*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 5$  (d) or 3 (e) mice per group) infected intravenously with  $2 \times 10^6$  PFU VSV and not restimulated or restimulated with p52 peptide (d) or with the VSV-derived major histocompatibility complex class II-restricted p8 peptide (e). (f) Population expansion of CD4<sup>+</sup> T cells with transgenic expression of a VSV-specific T cell antigen receptor (L7 cells) after transfer into wild-type and *Usp18*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 4$  per genotype), followed by no infection (none) or intravenous infection with  $2 \times 10^6$  PFU of VSV 1 d later, assessed 3 d after infection and presented relative to expansion in VSV-infected wild-type mice, set as 100%. (g,h) VSV-neutralizing antibodies from wild-type and *Usp18*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 3-6$  (g) or 7-8 (h) mice per genotype) infected intravenously with  $2 \times 10^6$  PFU of VSV (g) or immunized with  $2 \times 10^8$  PFU of UV light-inactivated VSV (h). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  (Student's *t*-test). Data are representative of one of two (a,b) or two (c-f) or three (g,h) experiments (mean and s.e.m. (a,d,e) or mean  $\pm$  s.e.m. (b,c,f-h)).

© 2012 Nature America, Inc. All rights reserved.





**Figure 4** Defective induction of the adaptive immune response leads to the spread of VSV into the brain. Survival (a) and VSV titers in the brain and/or spinal cord (b) of wild-type and *Usp18*<sup>-/-</sup> mice (*n* = 7–11 (a) or 4–5 (b) mice per genotype) after intravenous infection with 2 × 10<sup>6</sup> PFU VSV, assessed 7–8 d after infection in b. \**P* < 0.05 and \*\**P* < 0.01 (Student's *t*-test). Data are representative of three experiments (mean ± s.e.m. in b).

wild-type mice (Fig. 3d). Additionally, the CD4<sup>+</sup> T cell response was lower in *Usp18*<sup>-/-</sup> mice than in wild-type mice (Fig. 3e).

Next we analyzed whether the observed fewer VSV-specific CD4<sup>+</sup> T cells depended on defective antigen presentation early after infection. We transferred splenocytes from mice with transgenic expression of a VSV-specific T cell antigen receptor (L7 mice) into VSV-infected wild-type and *Usp18*<sup>-/-</sup> mice<sup>31</sup>. The population expansion of adoptively transferred CD4<sup>+</sup> T cells was significantly lower in *Usp18*<sup>-/-</sup> mice than in wild-type mice (Fig. 3f). This suggested that *Usp18* deficiency in antigen-presenting cells was responsible for the lower population expansion of VSV-specific CD4<sup>+</sup> T cells in *Usp18*<sup>-/-</sup> mice *in vivo*, but *Usp18* deficiency in T cells was not.

Next we analyzed B cell responses. *Usp18*<sup>-/-</sup> mice had a delayed VSV-neutralizing IgM response and delayed formation of VSV-neutralizing IgG antibodies after infection with live VSV (Fig. 3g). To assess whether the delayed antibody induction in *Usp18*<sup>-/-</sup> mice was due to less replication of VSV, we immunized wild-type and *Usp18*<sup>-/-</sup> mice with nonreplicating UV light-inactivated VSV. To induce measurable antibody titers, we used 100× the dose of UV light-inactivated VSV. Immunization with replication-deficient UV light-inactivated VSV did not lead to any difference between wild-type and *Usp18*<sup>-/-</sup> mice in the induction of VSV-specific B cell responses (Fig. 3h). This suggested that the differences in VSV replication activity were responsible for the differences in antibody induction. Together these findings indicated that the replication of VSV in metallophilic macrophages was essential for the induction of an efficient adaptive immune response.

***Usp18* in DCs allows live virus-derived antigen presentation**

DCs are professional antigen-presenting cells and therefore probably contribute to the activation of the adaptive immune system during VSV infection. Some DCs expressed VSV glycoprotein at later time points of infection (Supplementary Fig. 4). We investigated whether replication of VSV in DCs might contribute to activation of the adaptive immune system. Active viral replication in DCs is correlated with T cell priming<sup>32</sup>. We infected *in vitro*-generated wild-type and *Usp18*<sup>-/-</sup> DCs with VSV and added transgenic CD4<sup>+</sup> T cells 2 h later. We observed less T cell proliferation in cocultures with virus-infected *Usp18*<sup>-/-</sup> DCs than in those with wild-type DCs (Supplementary Fig. 4). Next we analyzed the activation capacity of *Usp18*<sup>-/-</sup> DCs in the presence of nonreplicating virus. Coculture of DCs with 100× more UV light-inactivated VSV particles showed greater activation of T cells without *Usp18*. Peptide-labeled DCs induced proliferation in peptide-specific CD8<sup>+</sup> T cells independently of *Usp18* expression

(Supplementary Fig. 4). Together these findings indicated that *Usp18* expression in DCs enhanced the presentation of replicating antigen.

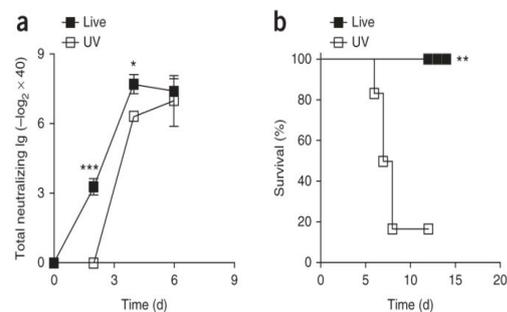
**Enforced VSV replication promotes survival**

We found that replication of VSV in the spleen was necessary for neutralizing antibody production. Such neutralizing antibodies are essential for control of VSV<sup>33</sup>. Next we investigated whether *Usp18*-mediated viral replication in lymph follicles would be beneficial for survival during VSV infection. After intravenous infection with VSV, *Usp18*<sup>-/-</sup> mice showed typical VSV-mediated paralysis and died 1 week after infection, whereas wild-type mice survived VSV infection (Fig. 4a). The paralysis and death of *Usp18*<sup>-/-</sup> mice could have been explained by the spread of VSV into the spinal cord or the brain (Fig. 4b). We concluded that *Usp18*-mediated enforced VSV replication in CD169<sup>+</sup> macrophages promoted adaptive immunity to guarantee fast neutralization of infectious VSV and survival of the infected host.

Next we analyzed whether enforced viral replication in lymph follicles and spleen would be beneficial for the survival of VSV peripherally. Intranasal administration of VSV leads to fast spread of VSV to the central nervous system<sup>34</sup>. Given our data, we speculated that with this infection route, viral replication in lymphoid tissue is limited and that this would lower the adaptive immune response to VSV. To directly determine whether enforced replication of virus in the spleen could prevent spread of VSV from peripheral sites to central nervous system, we infected mice intranasally with VSV. In addition, we infected mice by intravenous injection with 2 × 10<sup>6</sup> plaque-forming units (PFUs) of replication-competent VSV or UV light-inactivated VSV. Mice that received live virus intravenously in addition to intranasal infection with VSV had higher titers of neutralizing antibody (Fig. 5a) and survived the infection (Fig. 5b). Mice that received UV light-inactivated VSV had lower antibody titers and died of intranasal VSV infection (Fig. 5a,b). Thus, intravenous infection with live VSV induced protective adaptive immunity and protected mice from lethal intranasal infection with VSV.

**Lymphotoxin-β receptor mediates enforced viral replication**

Lymphotoxins are important for the development and function of various cells of the innate immune response, including DCs and CD169<sup>+</sup> macrophages<sup>35,36</sup>. We speculated that lymphotoxins are involved in the process of enforced viral replication. VSV glycoprotein expression was considerably impaired in the spleen of mice



**Figure 5** Replication of VSV in the spleen protects mice from lethal intranasal infection. VSV-neutralizing antibodies (a) and survival (b) of wild-type mice (*n* = 6–7 mice per genotype) infected intranasally with 5 × 10<sup>5</sup> PFU of live VSV and injected intravenously with 2 × 10<sup>6</sup> PFU of live VSV or 2 × 10<sup>6</sup> PFU of UV light-inactivated VSV. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 (Student's *t*-test). Data are representative of two experiments (mean ± s.e.m. in a).

© 2012 Nature America, Inc. All rights reserved.



ARTICLES

deficient in the receptor for lymphotoxin-b (*Ltbr*<sup>-/-</sup> mice), which correlated with the low number of CD169<sup>+</sup> metallophilic macrophages (Supplementary Fig. 5). Accordingly, early viral titers in the spleen were much lower in *Ltbr*<sup>-/-</sup> mice than in wild type mice after VSV infection (Supplementary Fig. 5), which suggested that lymphotoxins were involved in the process of enforced viral replication. CD8<sup>+</sup> T cell responses were impaired in *Ltbr*<sup>-/-</sup> mice (Supplementary Fig. 5). In agreement with those results, the VSV-specific B cell response was delayed in *Ltbr*<sup>-/-</sup> mice (Supplementary Fig. 5). *Ltbr*<sup>-/-</sup> mice developed typical VSV-mediated paralysis and died 7 d after infection (Supplementary Fig. 5). The death of *Ltbr*<sup>-/-</sup> mice could have been explained by VSV propagation in the brain or spinal cord or both (Supplementary Fig. 5). These data showed that lymphotoxins influenced early viral replication and this might have partially contributed to the immunodeficiency in these mice.

DISCUSSION

In this study, we found that CD169<sup>+</sup> metallophilic macrophages allowed viral replication for the promotion of adaptive immunity. Macrophages of the spleen and the liver captured viral particles after systemic virus infection. Red pulp macrophages and Kupffer cells suppressed viral replication in a type I interferon-dependent manner. CD169<sup>+</sup> macrophages had higher expression of *Usp18*, and the subsequent type I interferon resistance enforced viral replication. Either a lack of CD169<sup>+</sup> macrophages or deficiency in *Usp18* led to limited viral replication in the spleen. Low viral titers in the spleen led to impaired priming of the adaptive immune system. Lack of neutralizing antibodies in *Usp18*<sup>-/-</sup> mice allowed the spread of virus from low replication at peripheral sites to neuronal tissue, thus leading to paralysis and death of the mice.

The innate immune response is a double-edged sword. Type I interferon production inhibits viral replication, and this inhibition is crucial to the prevention of virus distribution<sup>1</sup>. In addition, type I interferon enhances proteasomal degradation and cross-priming<sup>37,38</sup>, upregulates costimulatory molecules on DCs<sup>39</sup> and increases the proliferative ability of activated T cells<sup>40</sup> and B cells<sup>41</sup>. Our findings have confirmed published studies indicating that macrophages capture virus particles and suppress viral replication in the red pulp of the spleen and the liver<sup>5</sup>. However, the inhibition of viral replication decreases the amount of antigen that can be presented to the adaptive immune system. The amount of antigen is positively correlated with the degree of stimulation of the adaptive immune system<sup>25,26</sup>. Our findings suggest that viral replication is required for the promotion of T cell priming and the production of neutralizing antibodies.

CD169<sup>+</sup> macrophages are situated to promote such viral replication. They reach into the marginal sinus and filter pathogens from the bloodstream<sup>6</sup>. Their anatomical location in the spleen allows the presentation of antigen to B cells<sup>14,16,35</sup>. Additionally, CD169<sup>+</sup> cells connect to fibroblastic reticular cell conduits, which can transport antigen to DCs in the T cell zone<sup>18</sup>. CD169<sup>+</sup> cells are important for the presentation of virus to plasmacytoid DCs and therefore are essential for activation of the innate immune system<sup>42</sup>. For subcutaneous infection with VSV, the induction of protective type I interferon has been reported only in the presence of VSV replication in the lymph node<sup>42</sup>. This observation could suggest that enforced viral replication is important not only for activation of the adaptive immune system but also for activation of the innate immune system.

Several signaling molecules influence the responsiveness of cells to type I interferon<sup>43</sup>. Therefore, enhanced expression of suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins could contribute to the type I interferon unresponsiveness of CD169<sup>+</sup> macrophages<sup>2,10,43</sup>.

Indeed, we found enhanced basal expression of *Socs1* and *Socs3*, but not of *Oas1* or *Isg15*, in CD169<sup>+</sup> macrophages (data not shown). Therefore, in addition to *Usp18*, SOCS1 and SOCS3 may act synergistically to allow VSV replication in CD169<sup>+</sup> macrophages. In this study, we focused on the role of *Usp18* and its influence on VSV replication.

Lack of *Usp18* led to VSV replication in the brain and spinal cord, early paralysis and death after systemic infection with  $2 \times 10^6$  PFU of VSV. *Usp18* deficiency prevents death after intracranial infection with 10 PFU of VSV<sup>12</sup>. Control of viral replication during infection via an intracranial route depends only on the innate immune response. In contrast, the adaptive immune response is essential for the prevention of lethal VSV infection during systemic intravenous infection with  $2 \times 10^6$  PFU of VSV<sup>33,44</sup>. Therefore, the expression of *Usp18*, although it may locally augment VSV replication in the spleen, is of overall benefit for the host during systemic infection.

It remains to be investigated how the mechanism of enforced viral replication contributes to adaptive immune responses to other viruses and to vaccination strategies for human pathogenic viruses. Through the use of the noncytopathic lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), we found that enforced viral replication also contributed to the adaptive immune response to this virus (data not shown). Published studies have indicated that in the case of human pathogenic viruses, replicating viruses elicit a stronger neutralizing antibody response than do inactivated virus particles<sup>45,46</sup>. Several live attenuated vaccines provide sufficient protection, whereas inactivated vaccines do not induce a protective antibody response (for example, vaccines against rubella, measles, mumps, yellow fever, varicella and chicken pox). Vaccination with active rubella virus or poliovirus induces long-term protective IgG responses and also induces the production of IgA<sup>45,46</sup>. IgA can very efficiently neutralize poliovirus in the gut; therefore, immunization with active virus would not only provide longer protection but also be beneficial in disrupting the chain of infection. We speculate that *Usp18* expression in the splenic marginal zone may enforce polioviral replication and induce rapid protective neutralizing antibodies. Indeed, although type I interferon suppresses poliovirus in several cell types, in type I interferon-competent mice, virus replicates in the marginal zone<sup>47</sup>. It remains to be determined whether this replication depends on *Usp18* expression and whether it is essential for the induction of IgA.

We found that the absence of *Usp18* in DCs was important for the activation of CD4<sup>+</sup> T cells during immunization with live virus. That finding suggested that immune activation at later stages of VSV infection depended on *Usp18* expression and viral replication in DCs. During influenza virus infection, active viral replication in DCs leads to greater antiviral T cell responses<sup>32</sup>. It remains to be addressed whether enforced viral replication contributes to the strong costimulatory ability of DCs.

CD169<sup>+</sup> macrophages may enhance the amount of foreign virus antigen through enforced viral replication, so that immunological ignorance is converted into immune activation. In the RIP-GP model of virus-induced autoimmune diabetes, limited viral replication or soluble antigen cannot induce diabetes<sup>48–50</sup>. That finding is explained mainly by limited costimulation and limited inflammatory signals in beta-islet cells<sup>49,50</sup>. Given our findings, we propose that the lack of antigen amplification in CD169<sup>+</sup> macrophages may be related to the lack of diabetes during immunization with soluble nonreplicating antigen. In conclusion, we found here that enforced viral replication was triggered by *Usp18* expression in CD169<sup>+</sup> metallophilic macrophages and led to anatomically restricted viral replication and to rapid production of virus-neutralizing antibodies, thereby preventing fatal disease.

© 2012 Nature America, Inc. All rights reserved. mpj

**METHODS**

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/natureimmunology/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Immunology website.

**ACKNOWLEDGMENTS**

We thank D. Kolakofsky (University of Geneva) for VSV; and K. Schätzel for technical support. Supported by the Alexander von Humboldt Foundation (SKA-2008 to K.S.L. and SKA-2010 to P.A.L.), Collaborative Research Center SFB575, Experimental Hepatology (coordinator, D.H.); Deutsche Forschungsgemeinschaft grant LA1419/3-1 to K.S.L. and SFB-TR19 to K.K. and R.K.; FOR729 to K.P.; SFB/Transregio 60 (coordinator, M. Roggendorf), the MOI Mancho Graduate School (Jürgen Mancho Foundation), the Swiss National Science Foundation (PASPMP3-127678/1 to M.R.) and the US National Institutes of Health (R01 HL091549 for *Usp18*-related work in the D.-E.Z. laboratory).

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

N.H. planned and did most experiments; N.S. planned and did several experiments; G.C. and S.E.B. did laser-capture dissection; U.R.S. contributed to *Ltbr*<sup>-/-</sup> mouse experiments; D.-E.Z. contributed to experiments on *Usp18*; M.T. and C.B. contributed to transfection experiments; K.K., M.S. and R.K. did and interpreted *in situ* hybridization; N.G. did *in vitro* experiments; N.v.R. contributed to macrophage depletion experiments; M.G. did *in vitro* stimulation of DCs; M.L., H.H., K.P., M.T., D.H. and M.R. discussed and interpreted data and helped to write the manuscript; and P.A.L. and K.S.L. initiated and designed the study and wrote most of the manuscript.

**COMPETING FINANCIAL INTERESTS**

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/natureimmunology/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

1. Müller, U. *et al.* Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* **264**, 1918–1921 (1994).
2. Sadler, A.J. & Williams, B.R. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 559–568 (2008).
3. Aichele, P. *et al.* Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *J. Immunol.* **171**, 1148–1155 (2003).
4. Cervantes-Barragán, L. *et al.* Type I IFN-mediated protection of macrophages and dendritic cells secures control of murine coronavirus infection. *J. Immunol.* **182**, 1099–1106 (2009).
5. Lang, P.A. *et al.* Tissue macrophages suppress viral replication and prevent severe immunopathology in an interferon-I-dependent manner in mice. *Hepatology* **52**, 25–32 (2010).
6. Seiler, P. *et al.* Crucial role of marginal zone macrophages and marginal zone metallophil in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2626–2633 (1997).
7. Steiniger, B. & Barth, P. Microanatomy and function of the spleen. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **151**, III–IX, 1–101 (2000).
8. Wardle, E.N. Kupffer cells and their function. *Liver* **7**, 63–75 (1987).
9. Kraal, G., Ter Hart, H., Meelhuizen, C., Venneker, G. & Claassen, E. Marginal zone macrophages and their role in the immune response against T-independent type 2 antigens: modulation of the cells with specific antibody. *Eur. J. Immunol.* **19**, 675–680 (1989).
10. Platanius, L.C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 375–386 (2005).
11. Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R. & Silverman, R.H. Identification of genes differentially regulated by interferon  $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\gamma$  using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15623–15628 (1998).
12. Ritchie, K.J. *et al.* Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection. *Nat. Med.* **10**, 1374–1378 (2004).
13. Malakhova, O.A. *et al.* UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity. *EMBO J.* **25**, 2358–2367 (2006).
14. Junt, T., Scandella, E. & Ludewig, B. Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 764–775 (2008).
15. Oetke, C., Kraal, G. & Crocker, P.R. The antigen recognized by MOMA-1 is sialoadhesin. *Immunol. Lett.* **106**, 96–98 (2006).
16. Junt, T. *et al.* Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* **450**, 110–114 (2007).
17. Gretz, J.E., Anderson, A.O. & Shaw, S. Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. *Immunol. Rev.* **156**, 11–24 (1997).
18. Sixt, M. *et al.* The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* **22**, 19–29 (2005).
19. Aichele, P., Brduscha-Riem, K., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H. & Pircher, H. T cell priming versus T cell tolerance induced by synthetic peptides. *J. Exp. Med.* **182**, 261–266 (1995).
20. Izzi, G., Karjalainen, K. & Lanzavecchia, A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* **8**, 89–95 (1998).
21. Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat. Immunol.* **2**, 487–492 (2001).
22. Zinkernagel, R.M. Localization dose and time of antigens determine immune reactivity. *Semin. Immunol.* **12**, 163–171, discussion 257–344 (2000).
23. Zinkernagel, R.M. *et al.* Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol. Rev.* **156**, 199–209 (1997).
24. Irvine, D.J., Purbhoo, M.A., Krogsgaard, M. & Davis, M.M. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* **419**, 845–849 (2002).
25. Henrickson, S.E. *et al.* T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation. *Nat. Immunol.* **9**, 282–291 (2008).
26. Holler, P.D. & Kranz, D.M. Quantitative analysis of the contribution of TCR/pepMHC affinity and CD8 to T cell activation. *Immunity* **18**, 255–264 (2003).
27. Bachmann, M.F., Bast, C., Hengartner, H. & Zinkernagel, R.M. Immunogenicity of a viral model vaccine after different inactivation procedures. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **183**, 95–104 (1994).
28. Miyawaki, S. *et al.* A new mutation, *aly*, that induces a generalized lack of lymph nodes accompanied by immunodeficiency in mice. *Eur. J. Immunol.* **24**, 429–434 (1994).
29. Miyake, Y. *et al.* Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *J. Clin. Invest.* **117**, 2268–2278 (2007).
30. Bachmann, M.F., Kundig, T.M., Kalberer, C.P., Hengartner, H. & Zinkernagel, R.M. Formalin inactivation of vesicular stomatitis virus impairs T-cell- but not T-help-independent B-cell responses. *J. Virol.* **67**, 3917–3922 (1993).
31. Freer, G. *et al.* Role of T helper cell precursor frequency on vesicular stomatitis virus neutralizing antibody responses in a T cell receptor  $\beta$  chain transgenic mouse. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1410–1416 (1995).
32. Nonacs, R., Humborg, C., Tam, J.P. & Steinman, R.M. Mechanisms of mouse spleen dendritic cell function in the generation of influenza-specific, cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **176**, 519–529 (1992).
33. Bründler, M.A. *et al.* Immunity to viruses in B cell-deficient mice: influence of antibodies on virus persistence and on T cell memory. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2257–2262 (1996).
34. Plakhov, I.V., Arlund, E.E., Aoki, C. & Reiss, C.S. The earliest events in vesicular stomatitis virus infection of the murine olfactory neuroepithelium and entry of the central nervous system. *Virology* **209**, 257–262 (1995).
35. Junt, T. *et al.* Expression of lymphotoxin  $\beta$  governs immunity at two distinct levels. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2061–2075 (2006).
36. Ware, C.F. Targeting lymphocyte activation through the lymphotoxin and LIGHT pathways. *Immunol. Rev.* **223**, 186–201 (2008).
37. Seifert, U. *et al.* Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* **142**, 613–624 (2010).
38. Le Bon, A. *et al.* Cross-priming of CD8<sup>+</sup> T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.* **4**, 1009–1015 (2003).
39. Longhi, M.P. *et al.* Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4<sup>+</sup> Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J. Exp. Med.* **206**, 1589–1602 (2009).
40. Kolumam, G.A., Thomas, S., Thompson, L.J., Sprent, J. & Murali-Krishna, K. 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**, 637–650 (2005).
41. Fink, K. *et al.* Early type I interferon-mediated signals on B cells specifically enhance antiviral humoral responses. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2094–2105 (2006).
42. Iannaccone, M. *et al.* Subcapsular sinus macrophages prevent CNS invasion on peripheral infection with a neurotropic virus. *Nature* **465**, 1079–1083 (2010).
43. Yoshimura, A. Negative regulation of cytokine signaling. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **28**, 205–220 (2005).
44. Battegay, M. *et al.* Antiviral immune responses of mice lacking MHC class II or its associated invariant chain. *Cell. Immunol.* **167**, 115–121 (1996).
45. Ogra, P.L., Karzon, D.T., Righthand, F. & MacGillivray, M. Immunoglobulin response in serum and secretions after immunization with live and inactivated poliovaccine and natural infection. *N. Engl. J. Med.* **279**, 893–900 (1968).
46. Ogra, P.L., Kerr-Grant, D., Umana, G., Dzierba, J. & Weintraub, D. Antibody response in serum and nasopharynx after naturally acquired and vaccine-induced infection with rubella virus. *N. Engl. J. Med.* **285**, 1333–1339 (1971).
47. Ida-Hosonuma, M. *et al.* The  $\alpha\beta$  interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J. Virol.* **79**, 4460–4469 (2005).
48. Ohashi, P.S. *et al.* Induction of diabetes is influenced by the infectious virus and local expression of MHC class I and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Immunol.* **150**, 5185–5194 (1993).
49. Lang, K.S. *et al.* Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat. Med.* **11**, 138–145 (2005).
50. Millar, D.G. *et al.* Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity *in vivo*. *Nat. Med.* **9**, 1469–1476 (2003).

© 2012 Nature America, Inc. All rights reserved.



**ONLINE METHODS**

**Mice.** *Usp18*<sup>-/-</sup> mice were bred heterozygously onto a Sv129 × C57BL/6 background F<sub>4</sub>. *Usp18*<sup>-/-</sup> mice were directly compared with littermate controls. All other mice used in this study were maintained on a C57BL/6 background. During survival experiments, the health status of the mice was checked twice daily. After the appearance of clinical signs of VSV replication in the central nervous system, such as paralysis, mice were removed from the experiment and considered dead. Animal experiments were done with the authorization of Veterinäramt Nordrhein-Westfalen (Düsseldorf, Germany) and in accordance with the German law for animal protection, the institutional guidelines of the Ontario Cancer Institute, or both.

**Bone marrow chimeras.** For the generation of bone marrow chimeras, C57BL/6 mice were irradiated with 1,050 rads. After 24 h, mice were reconstituted intravenously with 1 × 10<sup>7</sup> bone marrow cells. At 15 d later, all mice were treated with 200 μl clodronate liposomes to guarantee donor-derived origin of marginal zone macrophages. At 35 d after reconstitution, mice were used for experiments.

**Depletion of macrophages.** For the depletion of CD169<sup>+</sup> macrophages, diphtheria toxin (30 μg per kg body weight) was injected into each mouse intraperitoneally (Sigma-Aldrich). For depletion of complete macrophages, 200 μl clodronate liposomes were injected intravenously. Control mice were injected with empty liposomes.

**Generation of DCs.** Bone marrow cells from wild-type and *Usp18*<sup>-/-</sup> mice were cultured for 9 d with mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (4 ng/ml; Pan Biotech). IFN-α4 was from PBL Interferonsource.

**Virus.** VSV (Indiana strain, Mudd-Summers isolate), was originally obtained from D. Kolakofsky. Virus was propagated on BHK-21 hamster kidney fibroblasts at a multiplicity of infection of 0.01 and was then 'plaqueed' onto Vero cells. VSV was inactivated for 10 min with UV light. Peptides were from the Peptide Group.

**Neutralizing antibody assay.** Serum was prediluted (1:40). The complement system was inactivated for 30 min at 56 °C. For analysis of IgG kinetics, diluted samples were treated with β-mercaptoethanol (0.1 M) for removal of IgM. Serum was titrated 1:2 over 12 steps and incubated with 1 × 10<sup>3</sup> PFU of VSV. After 90 min of incubation, the virus-serum mixture was 'plaqueed' on Vero cells. Overlay was added after 1 h. Plaques were counted 24 h later by crystal violet staining.

**Histology.** Histological analyses of snap-frozen tissue used monoclonal antibody to VSV glycoprotein (Vi10; made in-house). Anti-CD45R (B220; RA3-6B2) and anti-CD90.2 (53-2.1) were from eBioscience. Red pulp macrophages were stained with anti-F4/80 (BM8; eBiosciences) and DCs were stained with anti-CD11c (N418; eBiosciences). Anti-CD169 (MOMA-1) was from Abcam.

**In situ hybridization.** *Usp18* mRNA was located through use of the clone pBK-CMV-mUBP43 containing full-length mouse *Usp18* cDNA. Tissue sections (5 μm in thickness) were dewaxed and hybridized as described<sup>51</sup>. Hybridization mixtures contained <sup>35</sup>S-labeled RNA antisense or sense control probes obtained from full-length mouse *Usp18* (500 ng/ml) in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50% (vol/vol) deionized formamide, 600 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.02% (wt/vol) polyvinylpyrrolidone, 0.02% (vol/vol) Ficoll, 0.05% (wt/vol) BSA, 10% (wt/vol) dextrane sulfate, 10 mM dithiothreitol, denatured sonicated salmon sperm DNA (200 μg/ml) and rabbit liver tRNA

(100 μg/ml). Hybridization with RNA probes proceeded for 18 h at 42 °C. Slides were then washed as described followed by 1 h at 55 °C in 2× standard saline citrate. Unhybridized single-stranded RNA probes were digested for 30 min at 37 °C with RNase A (20 μg/ml) in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 0.5 M NaCl. Tissue slide preparations were exposed to autoradiography film for 3 weeks and stained with hematoxylin and eosin.

**Laser-capture microdissection.** Frozen tissue sections (10 μm in thickness) were cut under RNase-free conditions. On the day of microdissection, sections were either stained with biotin-anti-CD169 (MOMA-1; Abcam), and streptavidin-peroxidase or with a HistoGene Frozen Section Staining Kit according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). For dehydration, slides were incubated for 30 s consecutively in 75%, 95% and 100% (vol/vol) ethanol and then for 5 min in xylene. After the dehydration procedure, sections were air-dried for 12 min. Samples of spleen tissue were captured from the stained slides on Capsure HS LCM caps by using a PixCell II laser capture microscope (Applied Biosystems) with the laser pulse power set at 75 mW and a threshold voltage of 200 mV.

**Total RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative real-time PCR.** Total RNA was extracted from cells on CapSure HS LCM caps (Applied Biosystems) with a PicoPure RNA isolation kit according to the manufacturer's protocol (Arcturus; Applied Biosystems). RNA from sorted cells was isolated with an RNA Mini Kit (Qiagen). RNA was reverse-transcribed to cDNA with a Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen). Expression of *Gapdh* and *Usp18* was analyzed with primers from Applied Biosystems Mm00449455\_m1 and Mm03302249\_g1. Expression was normalized to that of *Gapdh* and compared for the study groups.

**Flow cytometry.** Lymphocytes were stained with anti-CD8 (53-6.7; BD Biosciences), anti-CD4 M1/70; eBiosciences and anti-IFN-γ (XMGI.2; eBiosciences) after 6 h of restimulation with VSV antigen p8 peptide or p52 peptide. For staining of CD169<sup>+</sup> macrophages, 36 μg biotin-anti-CD169 (MOMA-1; Abcam) was injected intravenously. After 15 min, spleens were digested with Liberase and DNase. CD169<sup>+</sup> macrophages were stained with streptavidin-phycoerythrin (eBiosciences) in combination with anti-CD11b (RA3-6B2; eBiosciences) or anti-F4/80 (BM8; eBiosciences).

**Sorting of macrophages and T cells.** Biotin-anti-CD169 (36 μg; Abcam) was injected into C57BL/6 mice. After 10 min, splenocytes were digested with Liberase DNase (Roche) and stained with anti-biotin microbeads (Miltenyi) and streptavidin-phycoerythrin (eBiosciences) or with phycoerythrin-anti-F4/80 (BM8; eBiosciences) and anti-PE microbeads (Miltenyi). After 30 min of incubation, splenocytes were sorted by magnetic-activated cell sorting. CD169<sup>+</sup> cells were additionally sorted by flow cytometry. T cells were sorted with a MACS (130-090-861; Miltenyi) kit.

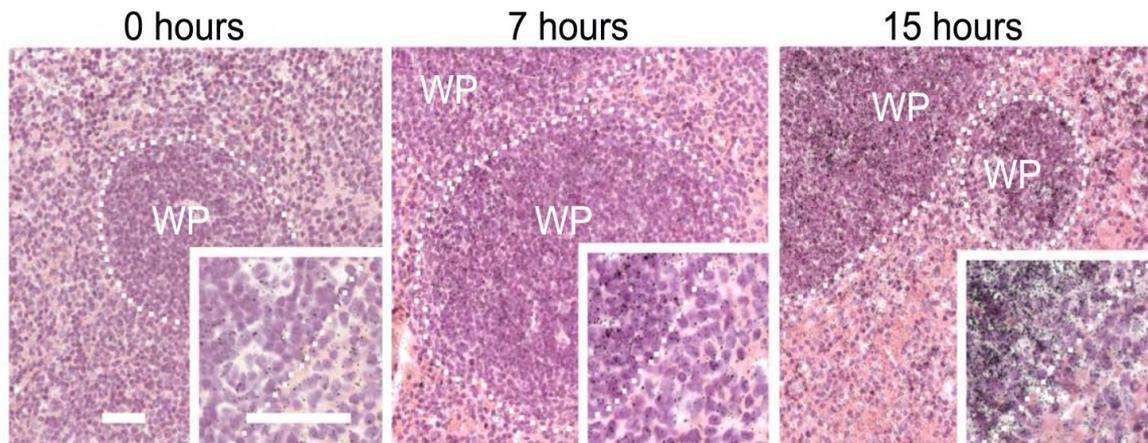
**Transfection with *Usp18* plasmid.** For transcription of *Usp18*, the construct pcDNA3-hUSP18 was used (C.B. Fan, J.B. and D.-E.Z., unpublished data). HeLa cells (1 × 10<sup>6</sup>) were transfected, through the use of a Superfect-Kit (Qiagen), with 4 μg DNA derived from *Usp18*-expressing plasmid and empty vector at various ratios. IFN-α2 was from PBL Interferonsource.

**Statistical analysis.** Student's *t*-test was used to detect significant differences between two groups. *P* values of less than 0.05 were considered significant.

51. Klingel, K. *et al.* Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of viral replication, tissue damage, and inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 314–318 (1992).

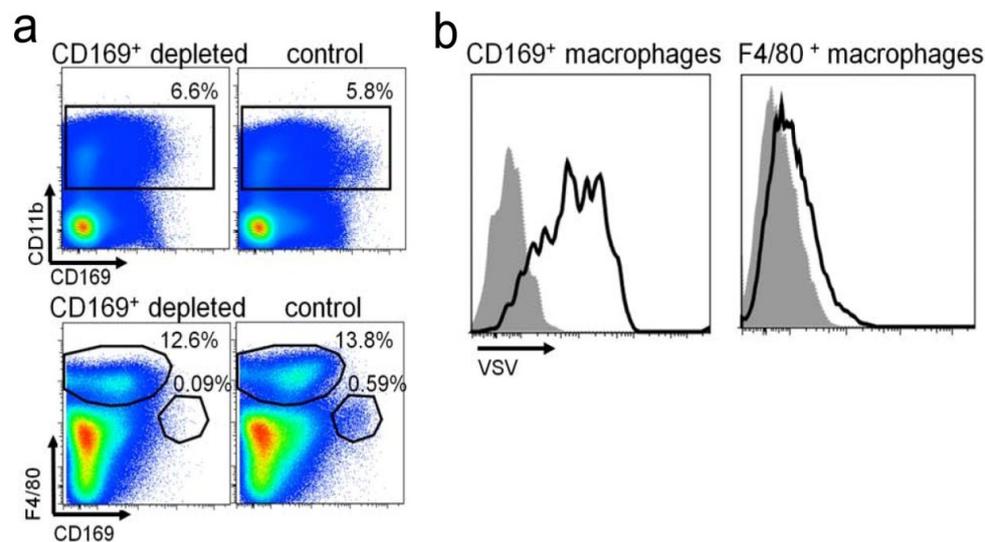
© 2012 Nature America, Inc. All rights reserved.





**Supplementary Figure 1: *Usp18* is up-regulated in the lymph follicle during VSV infection**

*Usp18* in situ hybridization of spleen sections from C57BL/6 mice after intravenous infection with  $2 \times 10^6$  PFU of VSV at 0, 7 and 15 hours post infection. One of  $n = 3$  representative stains is shown. Sense-control staining was negative. White dots indicate the border between red and white pulp (WP, lymph follicle). Scale bar 100  $\mu$ m; scale bar of insert, 20  $\mu$ m.



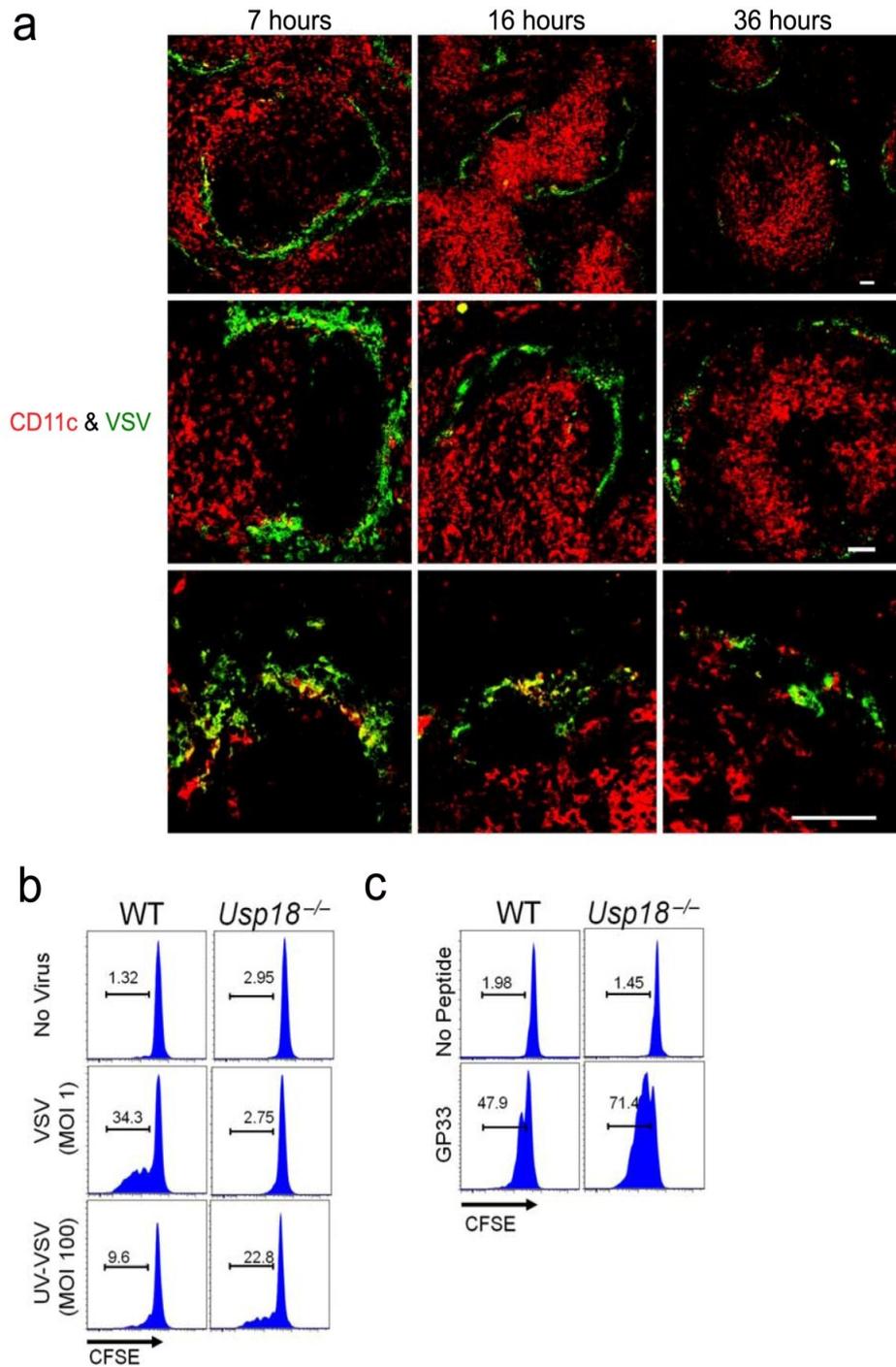
**Supplementary Figure 2: Detection of VSV in CD169<sup>+</sup> macrophages by FACS**

(a) FACS staining of splenocytes from C57BL/6 bone marrow chimeras reconstituted with CD169-DTR or wild-type bone marrow cells as control, treated intraperitoneally with diphtheria toxin (30  $\mu$ g/kg body weight) and infected intravenously 3 days later with  $2 \times 10^8$  PFU of VSV and stained with immunofluorescence antibodies for CD169, F4/80, and CD11b 7 hours post infection (One of two stainings is shown). (b) FACS staining of splenocytes from C57BL/6 mice infected intravenously with  $2 \times 10^8$  PFU of VSV and stained for VSV-GP, CD169 and F4/80 7 hours post infection. Shown are cells gated on CD169 or F4/80. Grey area represents isotype control. Back line shows staining with anti-VSV glycoprotein (VSV-GP). One of two representative stains is shown.



**Supplementary Figure 3: Visualization of micro-dissected areas**

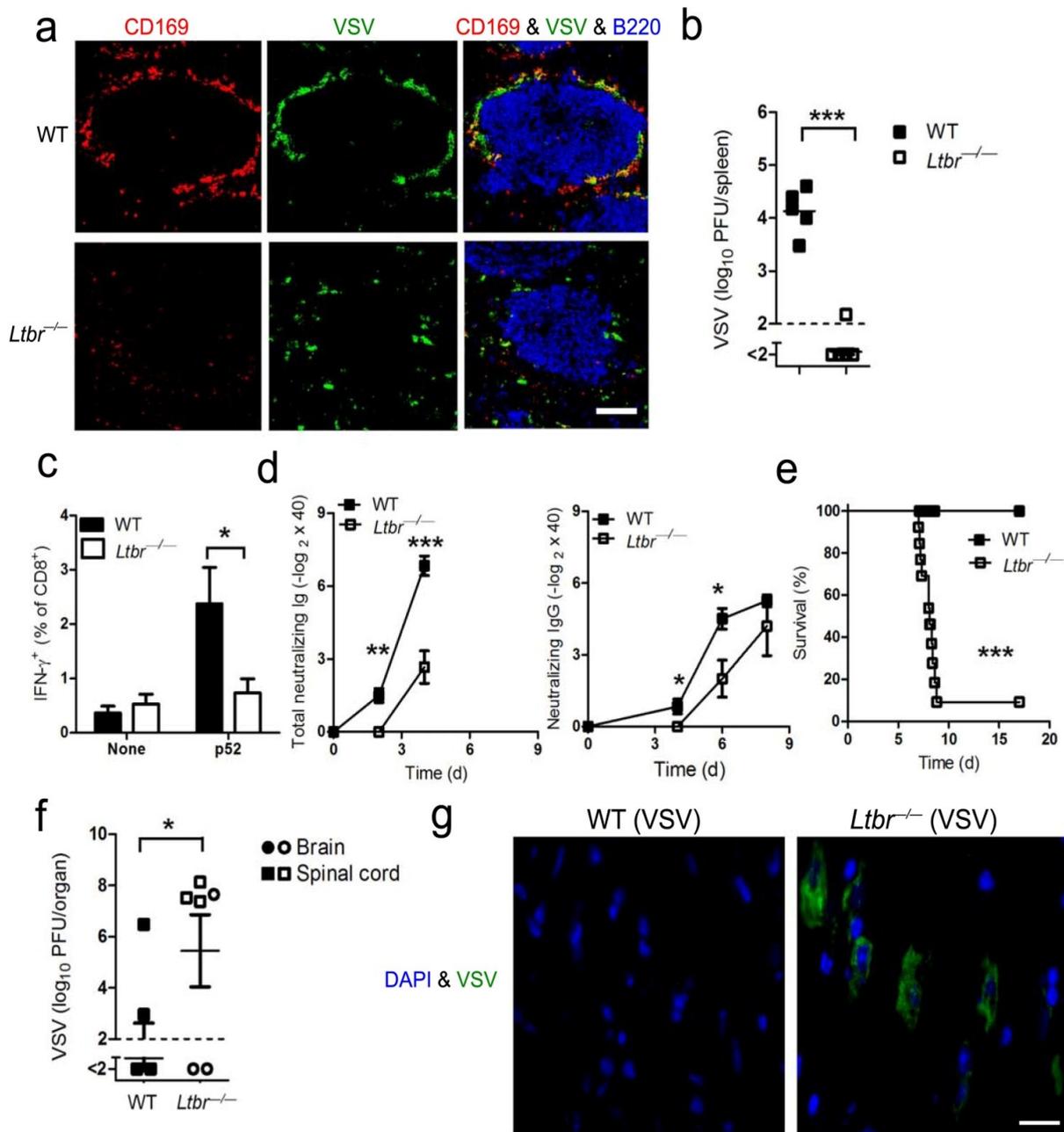
Histology of snap-frozen tissue from spleen sections stained for CD169 and dissected using laser capture technique. Slides show tissue before microdissection, tissue after microdissection, and captured micro-dissected cells.



**Supplementary Figure 4: Enhanced antigen presentation of live virus in *Usp18* competent dendritic cells**

**(a)** Immunofluorescence in spleen sections from C57BL/6 mice infected intravenously with  $2 \times 10^8$  PFU and stained with antibodies for VSV glycoprotein (VSV-GP; green) and dendritic cell marker (CD11c; red) 7, 16 and 36 hours after infection. Various magnifications are shown. One of three representative slides is shown. Scale bar, 50  $\mu$ m. **(b)** Proliferation of T cells in cocultures of CFSE-labeled T cells from mice carrying a VSV-specific T-cell receptor as a transgene (L7 mice) and DCs generated from WT and *Usp18*<sup>-/-</sup> bone marrow and incubated with live VSV (MOI 1) or with UV-inactivated VSV (MOI 100) together with IFN- $\alpha$ 4 (50 U/mL) two hours before T cells were added, analyzed 60 hours post infection (One of 3 representative stainings is shown). **(c)** Proliferation of T cells in cocultures of CFSE-labeled purified T cells from a mouse carrying a LCMV-GP33-specific CD8<sup>+</sup> T-cell receptor as a transgene (P14 mice) and DCs generated from WT and *Usp18*<sup>-/-</sup> bone marrow and labeled with MHC-I restricted epitope GP33 in the presence of IFN- $\alpha$ 4 (50 U/mL) two hours before T cells were added, analyzed 60 hours post labeling (One of 3 representative stainings is shown).

Nature Immunology doi:10.1038/ni.2169



**Supplementary Figure 5: Lymphotoxin-β receptor is essential for replication of VSV in the spleen, for activation of adaptive immune cells and for survival of VSV infection**

(a) Immunofluorescence in spleen sections from WT and *Ltbr*<sup>-/-</sup> mice infected intravenously with 2×10<sup>8</sup> PFU and stained with antibodies for VSV glycoprotein (VSV-GP; green), CD169 (red) and B220 (blue) 7 hours after infection (One of three representative slides is shown). Scale bar, 100µm. (b) Virus titers from WT and *Ltbr*<sup>-/-</sup> mice infected intravenously with 2×10<sup>6</sup> PFU determined 7 hours post infection (*n* = 5, pooled from two experiments). (c) Intracellular IFN-γ staining of splenocytes derived from WT or *Ltbr*<sup>-/-</sup> mice infected intravenously with 2×10<sup>6</sup> PFU VSV and restimulated for 6 hours with the VSV-derived MHC-I restricted p52-peptide analyzed 7 days post infection (*n* = 5). (d, e) VSV-neutralizing antibodies (d) and survival (e) from WT or *Ltbr*<sup>-/-</sup> mice infected intravenously with 2×10<sup>6</sup> PFU VSV (d, *n* = 4 - 6, pooled from three experiments e, *n* = 11, pooled from three experiments). (f, g) Virus titers (f) and immunofluorescence of brain sections stained for VSV-GP (green) and DAPI (blue) (g) from WT or *Ltbr*<sup>-/-</sup> mice infected intravenously with 2×10<sup>6</sup> PFU VSV 7 days after infection (f, *n* = 4; g, *n* = 3; pooled from two experiments). Scale bar, 20 µm; \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001

Nature Immunology doi:10.1038/ni.2169

**Abkürzungsverzeichnis (List of abbreviations):**

**Aly:** alymphoplasia

**DTR:** diphtheria toxin receptor

**Eif2ak2 (=PKR):** protein kinase R

**Fig.:** figure

**d:** days

**DCs:** dendritic cells

**Gapdh:** glyceraldehyde phosphate dehydrogenase

**GP:** glycoprotein

**h:** hours

**IFN- $\alpha$ :** interferon-alpha

**Ifnar1<sup>-/-</sup>:** interferon alpha receptor Typ I

**IFN- $\beta$ :** interferon-beta

**IFN- $\gamma$ :** interferon-gamma

**IgA:** immunglobuline A

**IgG:** immunglobuline G

**IgM:** immunglobuline M

**Isg15:** interferon-stimulated gene 15

**Jak1:** janus activated kinase 1

**LCMV:** lymphocytic choriomeningitis virus

**Ltbr<sup>-/-</sup>:** lymphotoxin beta receptor knock-out

**Mx1:** myxovirus resistance 1

**Oas1:** 2'5'-oligoadenylate synthetase 1

**PFUs:** plaque-forming units

**P8:** peptide 8

**P52:** peptide 52

**RIP:** rat insulin promoter

**Rnasel:** ribonuclease L

**STAT:** signal transducer and activator of transcription

**Tyk2:** tyrosine kinase 2

**Usp18/UBP43:** ubiquitin specific protease 18 / ubiquitin binding protein 43

**UV:** ultraviolet

**VSV:** vesicular stomatitis virus

**WT:** wild-type

$\mu\text{m}$ : micrometer

## Abbildungsverzeichnis (List of tables)

**Fig. 1:** CD169<sup>+</sup> metallophilic macrophages allow viral replication in the spleen, but red pulp macrophages and Kupffer cells do not

**(a):** VSV blood titers

**(b):** VSV titers

**(c):** Viral replication

**(d):** Survival

**(e):** VSV titers of wild-type and *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice

**(f):** Immunofluorescence of spleen and liver sections from C57BL/6 mice, stained for VSV (green)

**(g):** Immunofluorescence of spleen sections from C57BL/6 mice, stained for VSV (green), B220 (B cells; blue), CD90.2 (T cells; magenta), F4/80 (macrophages; red) and CD169 (metallophilic macrophages; red)

**(h):** Immunofluorescence of spleen sections from C57BL/6 mice, stained for VSV (green) and CD169 (red)

**(i):** Immunofluorescence of spleen sections from C57BL/6 bone marrow chimeras reconstituted with CD169-DTR or wild-type bone marrow, stained for VSV (green) and CD169 (red)

**(j):** Immunofluorescence of spleen and liver sections from wild-type and *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice, stained for F4/80, CD169 (red) and VSV (green)

**Fig. 2:** Expression of *Usp18* in CD169<sup>+</sup> cells is responsible for enhanced viral replication

**(a):** Expression of *Usp18* mRNA in CD169<sup>+</sup> and F4/80<sup>+</sup>-macrophages

**(b):** Expression of *Usp18* mRNA in marginal zone tissue and red pulp tissue

**(c):** VSV titers in supernatants of HeLa cells transfected with various concentrations of *Usp18*-expressing plasmid

**(d):** Immunofluorescence of spleen sections from wild-type or *Usp18*<sup>-/-</sup> mice, stained for VSV (green), CD169 (red) and B220 (blue)

**(e):** VSV titers in the spleen from wild-type or *Usp18*<sup>-/-</sup> mice

**Fig. 3:** VSV replication in the spleen is required for efficient T cell and B cell responses

- (a):** Intracellular staining of IFN- $\gamma$  in splenocytes obtained from C57BL/6 mice 7d after intravenous immunization with replicating VSV (Live;  $2 \times 10^6$  PFU) or UV light-inactivated VSV (UV;  $2 \times 10^6$  PFU) and 6h after no restimulation (none) or restimulation with VSV-derived major histocompatibility complex class I-restricted p52 peptide (p52)
- (b):** VSV-neutralizing antibodies from C57BL/6 mice after intravenous immunization with replicating VSV (Live;  $2 \times 10^6$  PFU) or UV light-inactivated VSV (UV;  $2 \times 10^6$  PFU)
- (c):** VSV-neutralizing antibodies from C57BL/6 bone marrow chimeras reconstituted with CD169-DTR cells or wild-type cells d3 after infection with VSV ( $2 \times 10^6$  PFU)
- (d):** Intracellular IFN- $\gamma$  staining of splenocytes derived from wild-type or *Usp18*<sup>-/-</sup> mice infected intravenously with  $2 \times 10^6$  PFU VSV and not restimulated or restimulated with p52 peptide
- (e):** Intracellular IFN- $\gamma$  staining of splenocytes derived from wild-type or *Usp18*<sup>-/-</sup> mice infected intravenously with  $2 \times 10^6$  PFU VSV and not restimulated or restimulated with the VSV-derived major histocompatibility complex class II-restricted p8 peptide
- (f):** Expansion of CD4<sup>+</sup> T cells with transgenic expression of a VSV-specific T cell antigen receptor (L7 cells) after transfer into wild-type and *Usp18*<sup>-/-</sup> mice, followed by no infection (none) or intravenous infection with  $2 \times 10^6$  PFU of VSV 1 d later, assessed 3 d after infection and presented relative to expansion in VSV-infected wild-type mice, sets as 100 %.
- (g):** VSV-neutralizing antibodies from wild-type and *Usp18*<sup>-/-</sup> mice infected intravenously with  $2 \times 10^6$  PFU of VSV
- (h):** VSV-neutralizing antibodies from wild-type and *Usp18*<sup>-/-</sup> mice immunized with  $2 \times 10^8$  PFU of UV light-inactivated VSV

**Fig. 4:** Defective induction of the adaptive immune response leads to the spread of VSV into the brain

- (a):** Survival
- (b):** VSV titers in the brain and/or spinal cord

**Fig. 5:** Replication of VSV in the spleen protects mice from lethal intranasal infection

- (a):** VSV-neutralizing antibodies
- (b):** Survival

**Supplementary Figures:**

**Suppl. Fig. 1:** *Usp18* is up-regulated in the lymph follicle during VSV infection

**Suppl. Fig. 2:** Detection of VSV in CD169<sup>+</sup> macrophages by FACS

**Suppl. Fig. 3:** Visualization of micro-dissected areas

**Suppl. Fig. 4:** Enhanced antigen presentation of live virus in *Usp18* competent dendritic cells

**Suppl. Fig. 5:** Lymphotoxin- $\beta$  receptor is essential for replication of VSV in the spleen, for activation of adaptive immune cells and for survival of VSV infection

## Anteilerklärung

### 1. Publikation:

**Honke N**, Shaabani N, Cadeddu G, Sorg UR, Zhang DE, Trilling M, Klingel K, Sauter M, Kandolf R, Gailus N, van Rooijen N, Burkart C, Baldus SE, Grusdat M, Löhning M, Hengel H, Pfeffer K, Tanaka M, Häussinger D, Recher M, Lang PA, Lang KS

Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus.

*Nat Immunol* 2012; **13**(1):51-7 .doi: 10.1038/ni.2169.

<b>Name des Journals:</b>	<i>Nature Immunology</i>
<b>Impact factor (Stand 2013):</b>	26,199
<b>Anteil an Experimenten dieser Arbeit (%):</b>	60 %
<b>Autor:</b>	Erstautor
<b>Beitrag an dieser Arbeit:</b>	Frau Nadine Honke war für den größten Teil der Durchführung und Auswertung der praktischen Experimente sowie für das experimentelle Design verantwortlich. Sie war an der Manuskripterstellung wesentlich beteiligt.

---

Nadine Honke

---

Prof. Dr. Karl Lang

## 2. Publikation

### 4.2 ***Usp18* driven enforced viral replication in dendritic cells contributes to break of immunological tolerance in autoimmune diabetes**

**Honke N**, Shaabani N, Zhang DE, Xu HC, Häussinger D, Recher M, Löhning M, Lang PA, Lang KS

*Usp18* driven enforced viral replication in dendritic cells contributes to break of immunological tolerance in autoimmune diabetes

*PLoS Pathog* 2013; **9**(10):e1003650. doi:10.1371/journal.ppat.

Die Rechte dieser Publikation liegen beim Journal *PLoS Pathogen*. Die Originalarbeit kann über die National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) oder den Link des Herausgebers (<http://www.plospathogen.org>) eingesehen und heruntergeladen werden.

# *Usp18* Driven Enforced Viral Replication in Dendritic Cells Contributes to Break of Immunological Tolerance in Autoimmune Diabetes

Nadine Honke<sup>1,2,3</sup>, Namir Shaabani<sup>1,2,3</sup>, Dong-Er Zhang<sup>3</sup>, George Iliakis<sup>4</sup>, Haifeng C. Xu<sup>1,2</sup>, Dieter Häussinger<sup>2</sup>, Mike Recher<sup>5</sup>, Max Löhning<sup>6</sup>, Philipp A. Lang<sup>2,3</sup>, Karl S. Lang<sup>1,2,3\*</sup>

**1** Institute of Immunology, Faculty of Medicine, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany, **2** Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany, **3** Department of Pathology, Division of Biological Sciences and Moores UCSD Cancer Center, University of California, San Diego, La Jolla, California, United States of America, **4** Institute of Medical Radiation Biology, Faculty of Medicine, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany, **5** Clinic for Primary Immunodeficiencies, Medical Outpatient Unit, and Immunobiology, Department of Biomedicine, University Hospital Basel, Basel, Switzerland, **6** Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité – University Medicine Berlin and German Rheumatism Research Center (DRFZ), Berlin, Germany

## Abstract

Infection with viruses carrying cross-reactive antigens is associated with break of immunological tolerance and induction of autoimmune disease. Dendritic cells play an important role in this process. However, it remains unclear why autoimmune-tolerance is broken during virus infection, but usually not during exposure to non-replicating cross-reactive antigens. Here we show that antigen derived from replicating virus but not from non-replicating sources undergoes a multiplication process in dendritic cells in spleen and lymph nodes. This enforced viral replication was dependent on *Usp18* and was essential for expansion of autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells. Preventing enforced virus replication by depletion of CD11c<sup>+</sup> cells, genetically deleting *Usp18*, or pharmacologically inhibiting of viral replication blunted the expansion of autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells and prevented autoimmune diabetes. In conclusion, *Usp18*-driven enforced viral replication in dendritic cells can break immunological tolerance and critically influences induction of autoimmunity.

**Citation:** Honke N, Shaabani N, Zhang D-E, Iliakis G, Xu HC, et al. (2013) *Usp18* Driven Enforced Viral Replication in Dendritic Cells Contributes to Break of Immunological Tolerance in Autoimmune Diabetes. PLoS Pathog 9(10): e1003650. doi:10.1371/journal.ppat.1003650

**Editor:** Matthias G. von Herrath, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, United States of America

**Received:** March 11, 2013; **Accepted:** August 6, 2013; **Published:** October 24, 2013

**Copyright:** © 2013 Honke et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported by the Alexander von Humboldt Foundation (SKA-2008 to KSL and SKA-2010 to PAL), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) with CRC974, CRC/TRR60 and LA1419/5-1. This work was also supported by the US National Institutes of Health (R01 HL091549 in the DEZ laboratory). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: karlsebastian.lang@uk-essen.de

These authors contributed equally to this manuscript.

## Introduction

Autoimmune diabetes in humans is characterized by immunological destruction of beta islet cells in the pancreas; this cellular destruction leads to hyperglycemia [1]. T cells specific for beta islet cell antigens play an important role in the development of the disease and have been found to arise after exposure to viruses that contain cross-reactive epitopes [2–4]. Viruses known to contain cross-reactive epitopes are enterovirus, rubella virus, and rotavirus. Infection with these viruses is often found during the onset of diabetes [5–7]. Recent evidence of the ability of viruses to induce diabetes comes from epidemiological and genetic analyses, which have shown that functional polymorphisms in interferon-regulating genes are strongly associated with autoimmune diabetes [8–10]. Thus, viral infection is associated with the onset of autoimmune diabetes in humans, and molecular mimicry is an obvious explanation for the immunological destruction of pancreatic beta cells. Besides viruses, several other pathogens and environmental proteins, such as bovine serum albumin (BSA) and beta-casein, carry cross-reactive epitopes to beta islet cells [11–13]. Because both substances are found in cow milk, many people are

exposed to those antigens. However, this exposure is not strongly linked to the induction of autoreactive T cells or to the occurrence of autoimmune diabetes [14,15]. Several bacterial species (e.g. *Escherichia coli*, *Pseudomonas* species, and *Campylobacter*) are known to carry epitopes that are cross-reactive to beta islet cells [16,17]. Although infection with these opportunistic pathogens will lead to presentation of cross-reactive beta islet antigens in combination with high amounts of bacterial Toll-like receptor (TLR) ligands, the contribution of these bacteria to the incidence of diabetes remains uncertain [18]. Thus, cross-reactive viruses, are more efficient than other cross-reactive antigens in breaking immunologic tolerance.

During the onset of autoimmune diabetes, antigen presenting cells (APCs) in secondary lymphoid organs (SLO) are key players in regulating immunological tolerance and immune activation [1]. With their ability to express costimulatory molecules, APCs like dendritic cells (DCs) or macrophages efficiently prime antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells [1,19]. DCs express costimulatory molecules after antigen uptake in combination with pattern recognition receptor ligation. Therefore activation of pattern recognition receptors by pathogen-derived patterns is an important

**Author Summary**

Autoimmune diabetes in humans is linked to infection with viruses, which carry cross-reactive antigens. Virus derived cross-reactive antigens break immunological tolerance to pancreatic islets, which initiates disease. Several other non-viral sources of cross-reactive antigens are known, however they usually fail to induce diabetes. Here we found that viral antigen underwent an *Usp18* dependent replication in dendritic cells. This mechanism was essential to generate sufficient amounts of cross-reactive antigen and to expand autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells. Blocking of virus replication by either depletion of dendritic cells, genetic depletion of *Usp18* or pharmacological inhibition of replication blunted expansion of autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells and prevented diabetes. In conclusion we found that enforced virus replication broke the tolerance to self-antigen, which partially explains the strong association of autoimmune diseases with virus infections.

mechanism by which DCs can differentiate between self-antigen and foreign antigen. In addition to costimulatory molecules, the amount of antigen presented is important in determining whether tolerance induction or immune activation will occur [20,21]. A low amount of presented antigen on DCs induces immunological tolerance against this antigen, even if it is presented in parallel with costimulatory signals [22,23]. In contrast, DCs loaded with high amounts of antigen may induce immune activation even in the absence of costimulatory molecule expression [22,24,25]. Thus, the amount of presented antigen is another independent factor that determines tolerance induction or immune activation. We recently reported that CD169<sup>+</sup> macrophages enforce virus replication, which enhances adaptive immune response [26]. If dendritic cells participate in antigen amplification and how this affects immunological tolerance remains unknown. To examine the importance of enforced viral replication in the context of autoimmune diabetes, we studied the induction of autoimmune diabetes in the RIP-GP mouse model [27]. In this model the glycoprotein (GP) of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) is expressed as a transgene under the control of the rat insulin promoter (RIP). Following LCMV infection, LCMV-GP specific CD8<sup>+</sup> T cells are primed and destroy the LCMV-GP expressing insulin producing pancreatic islet cells leading to autoimmune diabetes.

**Results**

**Depletion of dendritic cells blunted early virus replication and prevented autoimmune diabetes**

To analyze the contribution of dendritic cells in LCMV replication, we used CD11c-DTR mice. Treatment of CD11c-DTR mice with diphtheria toxin depletes dendritic cells [28]. Lack of dendritic cells completely blunted early LCMV replication in spleen and lymph nodes (Figure 1A). Reduced LCMV replication in the CD11c<sup>+</sup> compartment impaired viral antigen expressed within the spleen as assessed by immune-histology (Figure 1B). This reduction of replicating antigen in the spleen correlated with the lack of induced interferon-alpha (Figure 1C). Subsequently, the LCMV-specific CD8<sup>+</sup> T cell response against LCMV-GP was blunted in the absence of dendritic cells (Figure 1D) and CD8<sup>+</sup> T cell-mediated autoimmune diabetes was prevented (Figure 1E). In the absence of DCs virus could not be controlled and persisted in the blood (Figure 1F). This secondary virus propagation was most

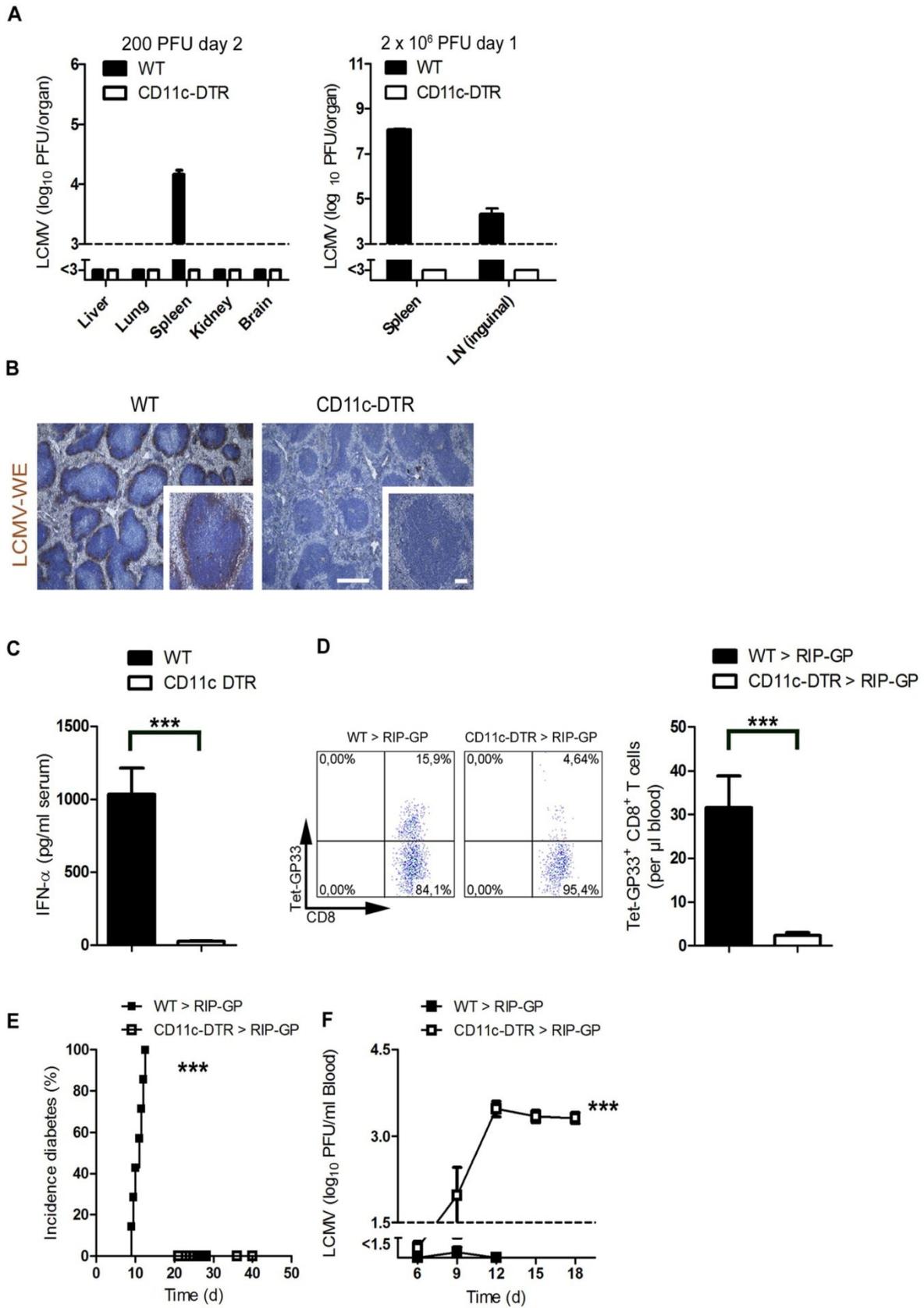
likely due to the lack of innate and adaptive immune response [29,30].

**Pharmacologic reduction of viral replication inhibits onset of autoimmune diabetes**

Besides enhancing early LCMV replication, dendritic cells are known to initiate the immune response by potent expression of costimulatory molecules (Figure S1). To see whether virus replication, and not other dendritic cell functions were essential to initiate autoimmune diabetes we treated mice with the anti-viral drug Ribavirin, which can efficiently suppress LCMV replication [31]. Indeed Ribavirin treatment was associated with significantly suppressed early LCMV replication (Figure 2A). In line with that innate antiviral IFN- $\alpha$  production was reduced in Ribavirin treated mice (Figure 2B). Reduced early virus replication blunted LCMV-specific CD8<sup>+</sup> T cell priming and prevented onset of diabetes (Figure 2C and D). These data imply that indeed early virus replication in dendritic cells is essential to break immunological tolerance.

**Expression of *Usp18* in dendritic cells contributes to early virus replication and onset of diabetes**

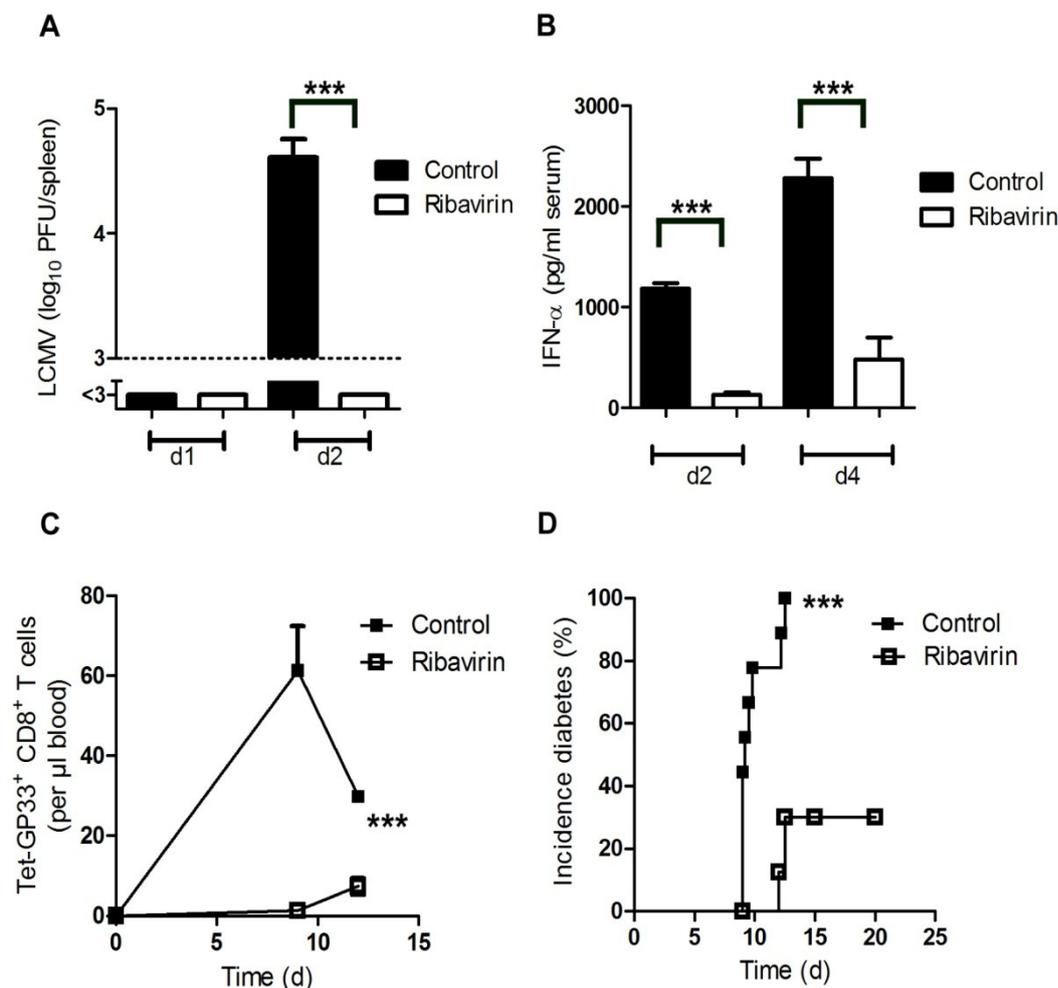
We found that LCMV replicated in dendritic cells in spleen and lymph nodes. In other organs no virus replication was detected, due to suppression of virus replication by IFN-I (Figure 3A). Therefore we wondered whether expression of endogenous inhibitors of IFN-I signaling in dendritic cells contributed to LCMV replication in dendritic cells. *Usp18* (UBP43) binds to the Jak1 binding site of the type I interferon receptor and inhibits its phosphorylation [32]. Therefore *Usp18* is a very efficient IFN-I inhibitor. First we analyzed expression of UBP43 in dendritic cells. Naïve dendritic cells, but not bone marrow-derived macrophages or fibroblasts, exhibited high expression of UBP43 (Figure 3B). Absence of UBP43 in *Usp18*<sup>-/-</sup> mice [33] reduced LCMV replication in DCs *in vitro* (Figure 3C) and was associated with reduced LCMV replication in spleen and lymph nodes *in vivo* (Figure 3D). These findings demonstrate that LCMV replication is enforced in dendritic cells as a consequence of *Usp18* expression. To test the role of *Usp18* in priming virus specific CD8<sup>+</sup> T cells we infected WT and *Usp18*<sup>-/-</sup> mice with 200 PFU LCMV. The absence of *Usp18* strongly impaired expansion of antiviral CD8<sup>+</sup> T-cells in the spleen till day 7 (Figure 3E). Reduced frequencies of virus specific CD8<sup>+</sup> T cells were in line with reduced numbers of IFN- $\gamma$  producing CD8<sup>+</sup> T cells after restimulation (Figure 3F). In the blood *Usp18*<sup>-/-</sup> mice showed limited frequencies of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 3G). Although CD8<sup>+</sup> T cells were reduced virus could be controlled in *Usp18*<sup>-/-</sup> mice (Figure S2). Next we generated bone marrow chimeras by transferring *Usp18*<sup>-/-</sup> bone marrow into irradiated RIP-GP mice to analyze the role of *Usp18* on virus induced autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells. Lack of *Usp18* on bone marrow derived cells blunted autoreactive CD8<sup>+</sup> T cell response (Figure 3H). To underline the role of *Usp18* in CD11c expressing cells we generated mixed bone marrow chimeras by using *Usp18*<sup>-/-</sup> bone marrow mixed 1:1 with bone marrow from CD11c-DTR mice in C57BL/6 wild-type mice. Diphtheria toxin treatment of these chimeric mice will deplete *Usp18*-competent DCs derived from CD11c-DTR mice but not *Usp18*-deficient DCs. Control mice were given a 1:1 mixture of WT and CD11c-DTR bone marrow. Thirty days later, mice were treated with diphtheria toxin. After infecting these mice with LCMV we observed reduced expansion of islet-specific CD8<sup>+</sup> T cells, implying that *Usp18* affects virus replication in DCs intrinsically (Figure 3I). Next we infected irradiated RIP-GP mice



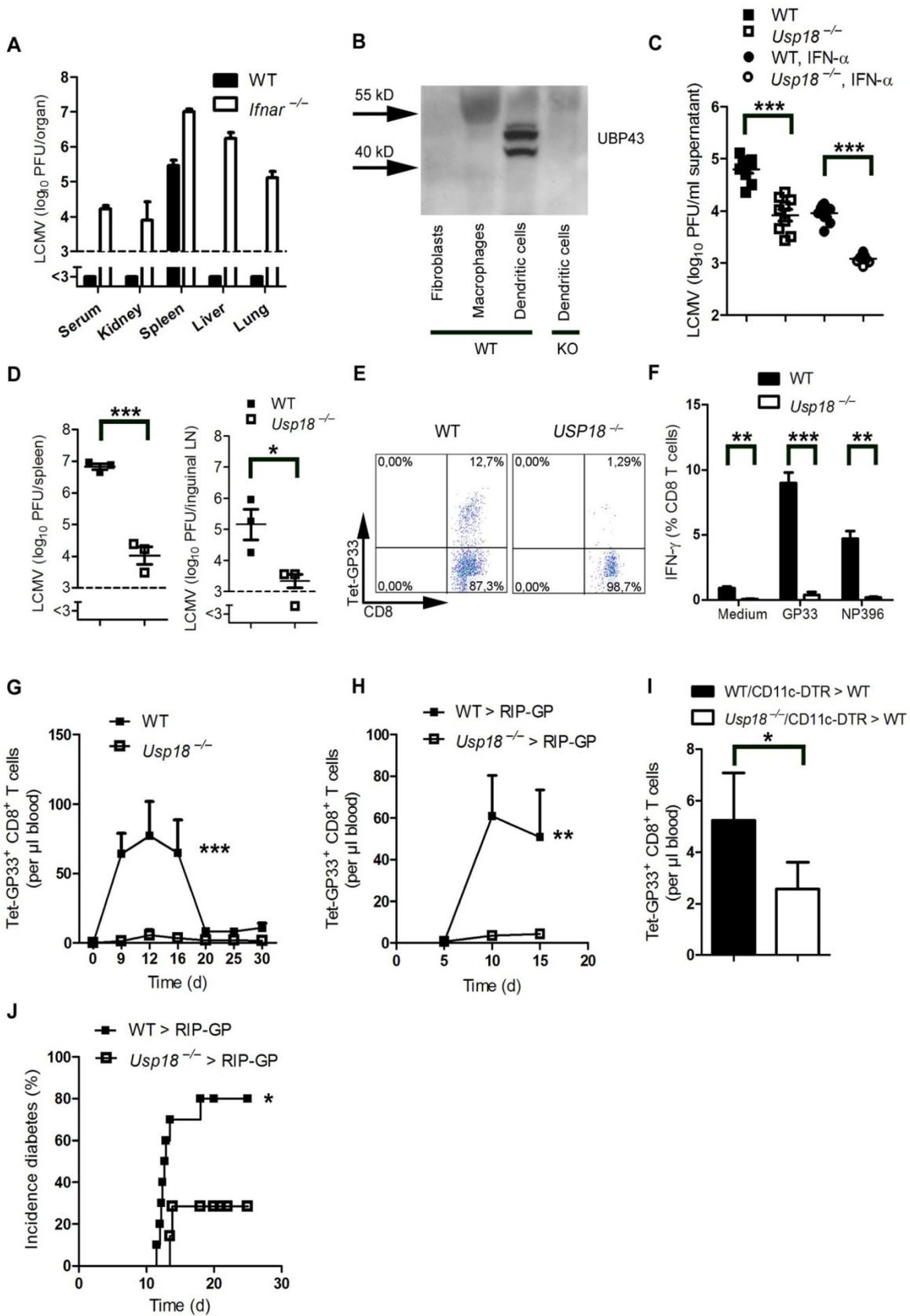
**Figure 1. Depletion of dendritic cells blunted early viral replication and prevented autoimmune diabetes.** (A) CD11c-DTR mice and C57BL/6 mice were treated intraperitoneally with diphtheria toxin (30 µg/kg) on day -3. Mice were infected with LCMV (200 PFU) or LCMV ( $2 \times 10^6$  PFU) on day 0. Viral titers were analyzed at the indicated time points in different organs (200 PFU  $n=6$  and  $2 \times 10^6$  PFU,  $n=3$ ). (B) C57BL/6 and CD11c-DTR mice were treated intraperitoneally with diphtheria toxin (30 µg/kg) on day -3 and then infected with LCMV ( $2 \times 10^6$  PFU) on day 0. After one day, immunohistologic staining for LCMV-NP was performed on spleen sections ( $n=3$ , scale bar main images 500 µm, insets 100 µm). (C) CD11c-DTR mice and control WT mice were treated with 30 µg/kg diphtheria toxin on day -3. On day 0 mice were infected with  $2 \times 10^6$  PFU LCMV. After two days IFN- $\alpha$  was measured in the serum by ELISA ( $n=6$ ). (D-F) RIP-GP mice were lethally irradiated and one day later reconstituted with  $10^7$  bone marrow cells from either CD11c-DTR mice or C57BL/6 mice as control animals. Thirty days later, mice were treated intraperitoneally with diphtheria toxin (10 µg/kg) on days -1, 2, 5, and 8 and were infected intravenously with 200 PFU LCMV-WE on day 0. A representative dot plot and the quantification of virus specific GP33<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells analyzed on day 8 in the blood with FACS analysis is shown ( $n=10-14$ , D). The incidence of diabetes was determined by measuring serum glucose concentrations after LCMV infection ( $n=7-11$ , E). Virus titers were analyzed in the blood at different time points after infection by plaque assay ( $n=5-11$ , F). \*\*\*  $P<0.001$  (Student's *t*-test) (C and D), Log-rank (Mantel-Cox) (E) two-way analysis of variance (ANOVA) (F).  
doi:10.1371/journal.ppat.1003650.g001

that had been reconstituted with bone marrow from *Usp18*<sup>-/-</sup> or WT mice with LCMV. The absence of autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells in *Usp18* deficient mice reduced the incidence of autoimmune diabetes,

although mice still could control LCMV infection (Figure 3J). In conclusion, lack of *Usp18* in CD11c<sup>+</sup> cells reduced priming of islet-specific CD8<sup>+</sup> T cells and prevented induction of diabetes.



**Figure 2. Pharmacologic inhibition of viral replication inhibits onset of autoimmune diabetes.** (A–B) C57BL/6 mice were treated intraperitoneally with Ribavirin (5 mg daily), starting on day -3. On day 0, mice were infected with 200 PFU LCMV. LCMV titers in the spleen were measured by plaque assay on days 1 and 2 after infection ( $n=5-7$ , A). Levels of IFN- $\alpha$  was measured in the serum by ELISA ( $n=4-5$ , B). (C–D) RIP-GP mice were treated intraperitoneally with Ribavirin (5 mg daily), starting on day -3. On day 0, mice were infected with 200 PFU of LCMV-WE. Numbers of islet-specific CD8<sup>+</sup> T cells were determined by tetramer staining and flow cytometry (C,  $n=4$ ). The onset of diabetes was assessed by measuring serum glucose concentrations at the indicated time points (D,  $n=9$ ). \*\*\*  $P<0.001$  (Student's *t*-test) (A and B), two-way analysis of variance (ANOVA) (C) or Log-rank (Mantel-Cox) (D).  
doi:10.1371/journal.ppat.1003650.g002



**Figure 3. Expression of *Usp18* in dendritic cells guarantees early viral replication and onset of autoimmune diabetes.** (A) WT and *Irfar*<sup>-/-</sup> mice were infected with 200 PFU of LCMV-WE. Viral titers were analyzed in various organs by plaque assay on day 4 (n=4). (B) Expression of UBPA3 (protein encoded by *Usp18*) was assessed by Western blot in bone marrow-derived dendritic cells, macrophages, and fibroblasts (n=3). Dendritic cells from *Usp18*<sup>-/-</sup> mice served as a control for antibody specificity. (C) Bone marrow-derived dendritic cells from WT or *Usp18*<sup>-/-</sup> mice were infected with LCMV *in vitro* (MOI=1) or left uninfected. In addition, cells were treated with recombinant IFN- $\alpha$  (50 U/ml) or left untreated. After 48 hours, LCMV titers were measured in the culture supernatants by plaque assay (n=9). (D) WT and *Usp18*<sup>-/-</sup> mice were infected with LCMV 2 $\times$ 10<sup>6</sup> PFU. After one day viral titers were measured in the spleen and lymph nodes by plaque assay (n=3). (E) FACS analysis of GP33<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells measured in splenocytes from WT or *Usp18*<sup>-/-</sup> mice on day 7 after infection with 200 PFU LCMV-WE (One of three is shown). (F) FACS analysis of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> GP33<sup>+</sup>/and NP396<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells measured in splenocytes from WT or *Usp18*<sup>-/-</sup> mice on day 7 after infection with 200 PFU LCMV-WE six hours after restimulation with GP33-peptide (n=3–4). (G) FACS analysis of GP33<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells measured in blood from WT or *Usp18*<sup>-/-</sup> mice at different time points after infection with 200 PFU LCMV-WE (n=4–6, G). (H) RIP-GP mice were lethally irradiated and one day later were reconstituted with 10<sup>7</sup> bone marrow from either *Usp18*<sup>-/-</sup> mice or WT littermate control mice. Thirty days later, mice were infected with 200 PFU LCMV. GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the blood were counted by flow cytometry at the indicated time points after LCMV infection (n=4). (I) C57BL/6 mice were lethally irradiated and one day later were reconstituted with a 1:1 mixture of bone marrow derived from *Usp18*<sup>-/-</sup> and CD11c-DTR mice or from WT and CD11c-DTR mice as control animals. Thirty days later, mice were treated intraperitoneally with diphtheria toxin (10  $\mu$ g/kg) on days -1, 2, 5, and 8 and were infected intravenously with 2 $\times$ 10<sup>6</sup> PFU LCMV-WE on day 0 (n=4). GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells were assessed in peripheral blood 8 days after LCMV infection by tetramer staining and flow cytometric analysis. Results of 2 experiments are pooled. (J) RIP-GP mice were lethally irradiated and one day later were reconstituted with 10<sup>7</sup> bone marrow cells from either *Usp18*<sup>-/-</sup> mice or WT littermate control mice and were infected with 200 PFU of LCMV 30 days later. The incidence of autoimmune diabetes was determined by measuring serum glucose concentrations at the indicated time points (n=7–10). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$  (Student's t-test) (C, D, F and I), two-way analysis of variance (ANOVA) (G and H) or Log-rank (Mantel-Cox) (J). doi:10.1371/journal.ppat.1003650.g003

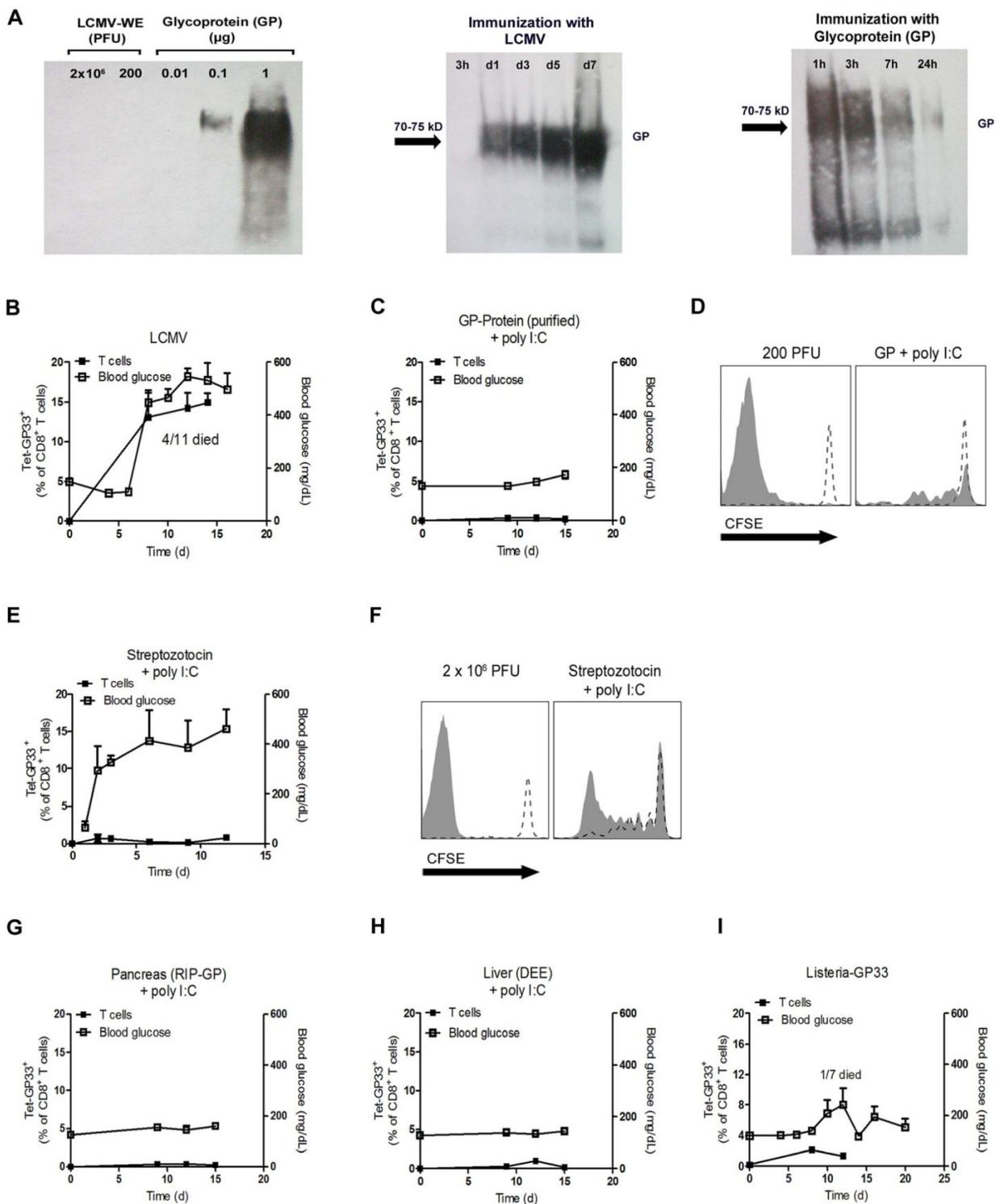
### Only replicating autoantigen is efficient in inducing autoimmune diabetes

We speculated that infection with replicating virus might be associated with the production of much higher amounts of autoantigen than treatment with soluble autoantigen. Western blot analysis showed that the initial virus inoculate did not contain measurable LCMV-GP as assessed by western blotting while 0.1  $\mu$ g purified glycoprotein (GP) was clearly detectable (Figure 4A). In contrast, LCMV-GP was detected in increasing amounts in spleen lysates for up to 7 days following LCMV infection (Figure 4A). In contrast, immunization with 2  $\mu$ g soluble LCMV-GP was associated with detectable LCMV-GP in the spleen for only 24 hours (Figure 4A). This finding indicated that the amount of antigen expressed in the spleen correlates with active replication of LCMV. Infecting RIP-GP mice with LCMV led to expansion of LCMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells associated with induction of autoimmune diabetes to 100% of the mice, as demonstrated by elevated serum glucose concentrations (Figure 4B) [27]. To compare the immunogenicity of replicating virus with soluble antigen, we immunized RIP-GP mice with soluble LCMV-glycoprotein (LCMV-GP) together with the TLR ligand poly-inosinic-polycytidylic acid (poly I:C) at concentrations known to induce potent innate immune responses [34]. In contrast to replicating virus, soluble LCMV-GP failed to induce measurable numbers of GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood, and diabetes was not induced (Figure 4C). Transferring CFSE-labeled LCMV-specific transgenic CD8<sup>+</sup> T cells (derived from P14 mice [35]) into mice immunized with soluble LCMV-GP and poly I:C revealed that nonreplicating LCMV-GP induced detectable but limited CD8<sup>+</sup> T cell proliferation *in vivo* (Figure 4D). To determine whether self-antigen released during the damage of beta islet cells in conjunction with poly I:C treatment could activate LCMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells, we treated RIP-GP mice with Streptozotocin, which is directly toxic to beta islet cells [36]. Streptozotocin treatment in combination with poly I:C as an innate immune activator induced diabetes in RIP-GP mice (Figure 4E). However, induction of diabetes was most likely due to the direct toxic effects of Streptozotocin, since GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells were not detected in peripheral blood after Streptozotocin treatment (Figure 4E). To analyze the ability of the released LCMV-GP in this experimental setting to activate autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells, we transferred CFSE labeled GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells into RIP-GP mice and then treated them with Streptozotocin plus poly I:C. CFSE-labeled LCMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells showed detectable but

limited proliferation (Figure 4F). This finding suggested that even massive destruction of pancreatic islet cells was not sufficient to break the immunological tolerance of GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells even in the presence of an inflammatory environment induced by poly I:C treatment. Next, we administered RIP-GP mouse-derived pancreatic homogenates to naïve RIP-GP mice, again in combination with poly I:C to stimulate innate immunity. This treatment led to very limited expansion of GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells and was not associated with induction of autoimmune diabetes (Figure 4G). Similarly, administration of liver homogenates derived from DEE mice [37] which express the LCMV-GP under the actin promoter in combination with poly I:C to RIP-GP mice only led to limited expansion of LCMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells and did not induce autoimmune diabetes (Figure 4H). Autoimmune diabetes was also not induced in RIP-GP mice infected with listeria expressing the glycoprotein of LCMV (Listeria-GP) again correlated with limited expansion of LCMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 4I). In summary, we found that non- or poorly-replicating antigen, even in combination with innate immune activation, is very inefficient in priming of autoantigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells. Only virus infection, supported by the *Usp18* driven enforced virus replication process in CD11c<sup>+</sup> APCs is efficient in breaking immunologic tolerance to pancreatic islet cells in our model.

### Lack of early virus replication limits break of tolerance in RIP-NP diabetes model

The LCMV RIP-GP model is a model of acute onset of diabetes. The concurrent activation of the adaptive and innate immune response is essential to induce diabetes in this model [34]. In humans diabetes is often induced over a long period of time or in two or more events [38]. We found that enforced virus replication is activating both innate and adaptive immune response. Therefore it remains questionable if early virus replication can impact on diabetes in a model which is almost independent of innate immune activation. To get insights we infected RIP-NP mice with 200 PFU LCMV-WE. RIP-NP mice show partial expression of LCMV-NP in the thymus and therefore typically show a delayed onset of diabetes [39,40]. Similar to our previous results, induction of antiviral LCMV-GP-specific CD8<sup>+</sup> T cells was reduced by Ribavirin treatment in the RIP-NP mice (Figure 5A). Induction of autoreactive LCMV-NP-specific CD8<sup>+</sup> T cells was in addition limited in the absence of enforced virus replication (Figure 5B). In line with these results mice treated with



**Figure 4. Only replicating antigen is efficient in breaking autoimmune tolerance.** (A) Initial LCMV inoculate (2 × 10<sup>6</sup> PFU and 200 PFU) and purified LCMV glycoprotein (GP) (0.01, 0.1, 1 µg) were stained for LCMV-GP by Western blot analysis. After immunization of C57BL/6 mice with live LCMV (200 PFU, i.v.) and purified LCMV glycoprotein (GP, 2 µg, i.v.), spleen lysates were analyzed by Western blot for LCMV-GP expression at the indicated time points. (B) RIP-GP mice were infected intravenously with 200 PFU of LCMV-WE. The number of GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells was determined by tetramer staining and flow cytometry, and serum glucose concentration was determined at the indicated time points (n = 4–11). (C) RIP-GP mice were immunized intravenously with 2 µg purified LCMV-GP in combination with poly I:C (100 µg). The number of autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells was determined by tetramer staining and flow cytometry, and serum glucose concentration was determined at the indicated time points (n = 4). (D) 10<sup>7</sup> Splenocytes from P14/CD45.1 mice were labeled with CFSE and adoptively transferred into C57BL/6 mice. After 24 hours, C57BL/6 mice were

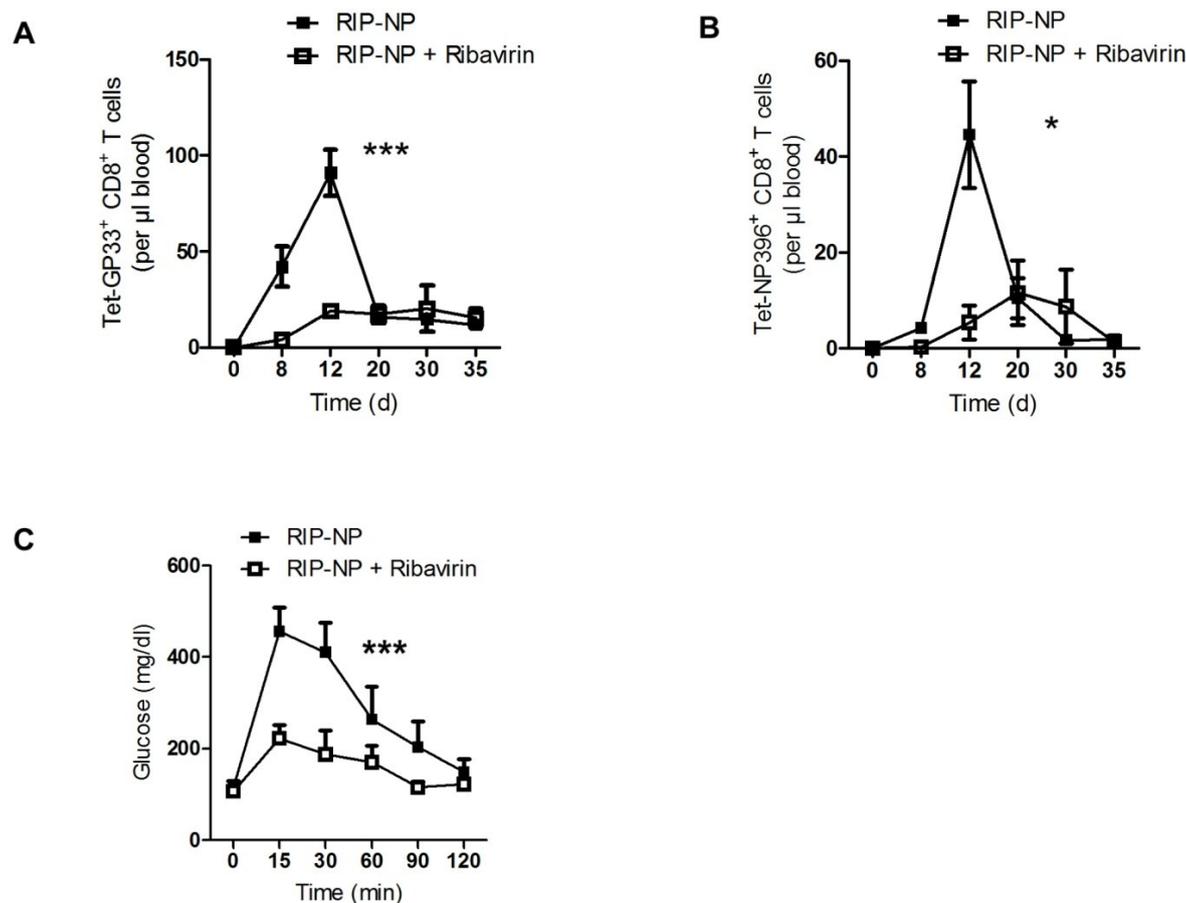
left uninfected (both histogram blots, dotted line) or infected with 200 PFU LCMV-WE (left histogram blot, filled area) or immunized with 2 µg LCMV-GP (n=3, right histogram blot, filled area). Proliferation of CD45.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells was assessed by CFSE dilution in spleen 6 days after transfer. Histograms show cells gated on CD45.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells. One representative set of data is shown. (E) RIP-GP mice were treated intraperitoneally with Streptozotocin (5 mg) and intravenously with poly I:C (100 µg). The number of islet-specific CD8<sup>+</sup> T cells was determined by tetramer staining and flow cytometry, and serum glucose concentration was determined at the indicated time points (n=3). (F) 10<sup>7</sup> Splenocytes from P14/CD45.1 mice were labeled with CFSE and transferred into RIP-GP mice or C57BL/6 mice. After 24 hours, RIP-GP mice were treated either left untreated (right histogram blot, dotted line) or were treated intraperitoneally with 5 mg Streptozotocin and intravenously with poly I:C (100 µg, right histogram blot, filled area). C57BL/6 mice were either left untreated (left histogram blot, dotted line) or infected with 2 × 10<sup>6</sup> PFU LCMV (left histogram blot, filled area). Proliferation of CD45.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells was assessed by CFSE dilution in the spleen 6 days after transfer (n=3). Blots show cells gated on CD45.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells. One representative set of data is shown. (G) RIP-GP mice were immunized intraperitoneally with homogenized pancreas (40 mg) from RIP-GP mice and intravenously with poly I:C (100 µg). The number of islet-specific CD8<sup>+</sup> T cells was determined by tetramer staining and flow cytometry, and serum glucose concentrations were determined at the indicated time points (n=4). (H) RIP-GP mice were immunized intraperitoneally with homogenized liver derived from DEE mice (100 mg) and immunized intravenously with poly I:C (100 µg). The number of islet-specific CD8<sup>+</sup> T cells was determined by tetramer staining and flow cytometry, and serum glucose concentration was determined at the indicated time points (n=4). (I) RIP-GP mice were infected with 10<sup>3</sup> CFU of *Listeria*-GP33 intravenously. Number of islet-specific CD8<sup>+</sup> T cells was determined by tetramer staining and flow cytometry, and serum glucose concentration was measured at the indicated time points (n=4–7).  
doi:10.1371/journal.ppat.1003650.g004

Ribavirin showed enhanced beta islet function compared to control mice (Figure 5C).

**Discussion**

In this study we examined why replicating self-antigen is much more efficient in breaking autoimmune tolerance than the

exposure to nonreplicating self-antigen. Our findings emphasize that the development of autoimmune diabetes requires active autoantigen replication in specialized APCs that are characterized by the expression of *Usp18*, a known inhibitor of type I interferon signaling [32]. Since *Usp18* expressing APCs are not responsive to the antiviral actions of type I interferons, they act as endogenous “replicators” of autoantigen.



**Figure 5. Ribavirin blunts auto-reactivity in RIP-NP diabetes model.** RIP-NP mice were treated intraperitoneally with Ribavirin (5 mg daily), starting on day -3. On day 0, mice were infected with 200 PFU of LCMV-WE. (A) Numbers of virus-specific Tet-GP33<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were determined by tetramer staining and flow cytometry (n=5–6). (B) Numbers of autoreactive Tet-NP396<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were determined by tetramer staining and flow cytometry (n=5–6). (C) On day 50 glucose tolerance test was performed (n=5–6). \* P<0.05 and \*\*\* P<0.001 two-way analysis of variance (ANOVA).  
doi:10.1371/journal.ppat.1003650.g005

Recently we found that expression of *Usp18* in CD169<sup>+</sup> macrophages is important for initiating neutralizing antibodies against vesicular stomatitis virus [26]. In light of our data here we suggest that this mechanism is also of importance in dendritic cells for initiating innate and adaptive immune response against LCMV. In addition to LCMV replication, high expression of *Usp18* in DCs could explain the long-known phenomenon that DCs can be easily infected with several viruses [41]. Administration of autoantigen in various non-replicating forms only led to very limited activation and expansion of autoimmune CD8<sup>+</sup> T cells, suggesting that the mechanism of enforced virus replication could be an essential factor allowing the immune system to differentiate between foreign and self-antigen.

In addition to (auto)antigen amplification, *Usp18* may have other functions in DCs. Indeed, lack of *Usp18* expression reduces the number of CD11b<sup>+</sup> dendritic cells by 50% [42]. We found that after treatment with poly I:C, expression of MHC I and the costimulatory molecule CD80 was enhanced in *Usp18*<sup>-/-</sup> DCs compared to WT DCs (data not shown), implying that there is no general activation defect in *Usp18*-deficient DCs. In fact, the absence of IFN signaling (as in WT DCs), rather than enhanced interferon signaling (as in *Usp18*<sup>-/-</sup> DCs), impairs DC functions such as proteasomal degradation, cross-priming [43,44], and costimulation [45]. Therefore, we hypothesize that lack of antigen amplification is the major defect in *Usp18*<sup>-/-</sup> DCs.

Immunohistological co-stainings revealed that LCMV replicates in the spleen mainly in CD169<sup>+</sup> macrophages and CD11c<sup>+</sup> cells (data not shown). Depletion of both cell types in CD11c-DTR mice completely blunted early LCMV replication in the spleen, while depletion of CD169<sup>+</sup> macrophages in CD169-DTR mice showed no reduction in early LCMV titers (data not shown). This suggests that contribution of LCMV replication in CD169<sup>+</sup> macrophages to total splenic LCMV replication is minor.

The results of several studies suggest that viral infection may be linked to the onset of human autoimmune diabetes. Using mouse models, we and others have demonstrated that this association can be explained by the activation of pattern recognition receptors during disease onset [34,46]. Especially IFN-I enhances antigen presentation and induces an inflammatory status in beta islet cells [34]. Recent genetic analyses have indeed found that genes regulating the interferon response are important contributors to onset of diabetes [8,9,47,48]. In particular, enhancement of the activity of the pattern recognition receptor RIG I is linked to a high risk of diabetes onset [47]. Therefore enhanced activity of *Usp18* in beta islet cells would limit IFN-I signaling in these cells and could prevent diabetes during exposure to IFN-I [49]. We found here that lack of *Usp18* in dendritic cells prevented enforced virus replication and would therefore limit induction of autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells, but also induction of IFN-I production. Therefore we would suggest that *Usp18* expression in dendritic cells could drive autoimmune diabetes by promoting activation of cross-reactive CD8<sup>+</sup> T cells, but also by induction of high levels of IFN-I. Whether indeed the expression of interferon inhibitors such as *Usp18* in certain cell types contributes to the risk of human diabetes remains to be tested.

It still remains to be explained how bacteria, that express cross-reactive antigen might contribute to autoimmune diabetes induction. In humans there is no clear link between certain bacterial infection and onset of diabetes [18]. We found, using recombinant LCMV-GP33 expressing facultative intracellular *Listeria monocytogenes* that indeed low doses of systemic bacterial infection did not induce diabetes in RIP-GP mice. While this suggests that amplification of virus antigen was more efficient to

break immunological tolerance, the contribution of intracellular bacterial amplification to the overall autoimmune activation remains to be studied.

We demonstrate here an *Usp18* driven mechanism which allows replicating virus, but not non-replicating autoantigen to break immunological tolerance. Blocking *Usp18* may be a potential target for pharmacological interference in the early pathogenic steps leading to the induction of autoimmune diabetes in humans.

## Methods

### Mice

All experiments were performed with the animals housed in single ventilated cages, with the authorization of Veterinäramt Nordrhein Westfalen (Düsseldorf, Germany) in accordance with the German law for animal protection or institutional guidelines of the Ontario Cancer Institute. Project was licensed under identification number (84-02.04.2011, A246). Rat insulin promoter-glycoprotein (RIP-GP) or promoter-nucleoprotein (RIP-NP) mice [27,39], which express the LCMV glycoprotein or LCMV nucleoprotein respectively as a transgene under the rat insulin promoter, were used for the analysis of autoimmune diabetes and were maintained on a C57BL/6 background. P14 mice expressing a LCMV-GP33-41 specific TCR as a transgene were used for adoptive transfer experiments and were also maintained on a C57BL/6 background [35]. Mice expressing CD45.1 were used to track cells in adoptive transfer experiments. DEE mice express LCMV-GP under the actin promoter [37]. *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice [34] and CD11c-DTR mice [28] were maintained on C57BL/6 background. *Usp18*<sup>-/-</sup> mice were generated in the Zhang lab and bred heterozygously on a Sv129×C57BL/6 background F4 and directly compared with littermate control animals.

### Lymphocyte transfer

Splenocytes from P14 mice expressing CD45.1 were labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, 1 μM, Invitrogen) and were injected intravenously into RIP-GP or C57BL/6 mice. One day later, mice were infected with LCMV-WE (200 PFU or 2×10<sup>6</sup> PFU) or with purified LCMV glycoprotein or were treated with Streptozotocin (5 mg). Five days after LCMV infection, the proliferation of P14 T cells was assessed in the spleen by CFSE dilution and flow cytometry.

### Bone marrow chimeras

For the generation of bone marrow chimeras, recipient mice were irradiated with 9.5 Gy (320 kV X-rays, 3 Gy/min, 0.35 mm copper +1.5 mm aluminium filter; Pantak-Seifert, Ahrensburg, Germany) on day -1. On the next day, 10<sup>7</sup> bone marrow cells were transferred. After 15 days Clodronate-Liposomes were administered to ensure macrophages exchange in *Usp18*<sup>-/-</sup>>RIP-GP, WT>RIP-GP, CD11c-DTR>RIP-GP, WT>RIP-GP, WT/CD11c-DTR>WT and *Usp18*<sup>-/-</sup>/CD11c-DTR>WT chimeras. Infections with LCMV were performed after 30 days.

### Cell culture, generation of murine primary cells

To generate primary macrophages, we isolated bone marrow from femurs and tibias of mice and eliminated erythrocytes. Bone marrow cells were cultured in very low endotoxin Dulbecco's Modified Eagle Medium (VLE-DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) and 0.1% (v/v) β-mercaptoethanol (β-ME) and 20% (v/v) macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). On day 9 or 10 of differentiation, cells were harvested for use in subsequent experiments. To generate primary fibroblasts,

we removed the lungs of mice and digested them with DNase and Liberase for 60 min at 37°C. After being flushed through a strainer, cells were cultivated in DMEM supplemented with 10% (v/v) FCS and penicillin-streptomycin glutamine (PSG). On day 3, adherent cells were rinsed with fresh growth medium. After 3 more days of cultivation, differentiated fibroblasts were split. On day 10, fibroblasts were used for experiments. To generate conventional dendritic cells (cDCs) we isolated bone marrow taken from femurs and tibias of mice. Erythrocytes were eliminated. We cultured bone marrow cells in very low endotoxin Dulbecco's Modified Eagle Medium (VLE-DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) in the presence of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). On day 3 of differentiation, an equal volume of growth medium was added. Growth medium was exchanged on day 6 of differentiation. On day 9 or 10 of differentiation, cells were harvested for use in subsequent experiments.

### Virus and plaque assay

LCMV strain WE was originally obtained from F. Lehmann-Grube (Heinrich Pette Institute, Hamburg, Germany) and was propagated in L929 cells. Mice were infected intravenously with LCMV at the indicated doses. Viral titers were measured in a plaque-forming assay using MC57 cells as previously described [30].

### Bacteria

*Listeria monocytogenes* (L.m.) expressing the LCMV-GP33 as transgene was grown overnight in brain-heart infusion broth or thawed from frozen aliquots, washed two times in phosphate-buffered saline (PBS), and injected intravenously in 200  $\mu$ l into the tail vein.  $10^3$  CFU of *L.m.* intravenously was used as low-dose infection.

### Pharmaceutical compounds

Ribavirin (Essexpharma, Belgium) was administered intraperitoneally (5 mg daily) starting on day -3 before LCMV infection. Streptozotocin was administered (5 mg) intraperitoneally once on day 0. Twelve hours later, 400  $\mu$ l of glucose solution (20% in PBS) was injected intraperitoneally to prevent severe hypoglycemia. Diphtheria toxin was injected intraperitoneally at a dose of 30  $\mu$ g/kg or 10  $\mu$ g/kg as indicated. For immune activation, 100  $\mu$ g poly (I:C) (Amersham) was given intravenously per mouse.

### Immunization with LCMV-GP

HEK-GP cells, which express the LCMV glycoprotein (GP), were cultured in 40 mL DMEM +10% FCS and Hygromycin B (300  $\mu$ g/mL) in a 150-cm<sup>2</sup> tissue culture flask. After approximately 80% of the cells were confluent, cells were washed twice with PBS and cultured in 8 mL DMEM with no supplements. After 48 hours the supernatant was harvested, and the LCMV-GP that was released by the cells into the supernatant was purified with sepharose PD-10 desalting columns (GE Healthcare). Liver tissue derived from DEE mice was smashed in 1 ml PBS using tissue lyser (Qiagen). Mice were immunized intraperitoneally with 100 mg in 200  $\mu$ l PBS. Pancreas tissue derived from RIP-GP mice was smashed in 1 ml PBS using tissue lyser (Qiagen). Mice were immunized intraperitoneally with 40 mg in 200  $\mu$ l PBS.

### Flow cytometry

Tetramers were provided by the National Institutes of Health (NIH) Tetramer Facility. 20  $\mu$ l blood was stained with

allophycocyanin (APC)-labeled GP33 MHC class I tetramers (GP33/H-2Db) for 15 minutes at 37°C. After incubation, the samples were stained with anti-CD8 peridinin-chlorophyll-protein-complex (PerCP; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) for 30 minutes at 4°C. Erythrocytes were then lysed using 1 ml BD lysing solution (BD Biosciences); washed 1 $\times$  and analyzed with flow cytometer. Absolut numbers of GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells/ $\mu$ l blood were calculated from FACS analysis using fluorescing beads (BD Biosciences).

### Blood glucose measurement, glucose tolerance test

Serum glucose concentrations were measured with a contour meter (Bayer, Leverkusen). Mice were considered diabetic if the glucose concentration was higher than 200 mg/dl. For glucose tolerance test, mice were fasted for 15 hours and then received a single intraperitoneally injection of 2 mg/g body weight glucose (Merck). Blood glucose was measured immediately before injection and then at 15, 30, 60, 90 and 120 minutes after injection.

### ELISA

IFN- $\alpha$  ELISA was performed according to the protocol of the manufacturers (PBL Interferon source).

### Histology

Conventional histology was performed as previously described [50]. Briefly, snap-frozen tissue was stained with rat anti-mouse polyclonal antibody to LCMV nucleoprotein (VL4; made in-house). Polyclonal anti-rat biotin antibody (eBioscience) and anti-biotin streptavidin peroxidase (Thermo Scientific) were then used before visualization with a 2-solution DAB staining kit (Invitrogen).

### Western blot

Proteins were isolated with trizol and solubilised with 10 M urea/50 mM DTT. Protein lysates were normalized for total protein (Bio-Rad). Proteins were analyzed by electrophoresis under denaturing conditions using 4–20% SDS ClearPAGE and blotted onto nitrocellulose membranes (Whatman). LCMV-GP was stained with KL25 antibody (made in-house) or UBP43 (Santa Cruz 98431)

### Statistical analysis

If not differently stated data are expressed as means and S.E.M. Student's *t*-test was used to detect statistically significant differences between groups, or Log-rank (Mantel-Cox) test to detect statistically significant differences of incidence of diabetes. Significant differences between several groups were detected by two-way analysis of variance (ANOVA). The level of statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

### Supporting Information

**Figure S1 Dendritic cells are activated during LCMV infection.** C57/BL6 mice were infected with  $2 \times 10^6$  PFU of LCMV. Expression of MHC-I and CD86 on splenic dendritic cells was analyzed at the indicated time points. Dotted line indicates staining with isotype antibody. (TIIF)

**Figure S2 *Usp18*<sup>-/-</sup> mice can cope with LCMV infection.** Virus titers in the spleen of WT or *Usp18*<sup>-/-</sup> mice measured on day 5 and 30 after infection with 200 PFU LCMV-WE using in plaque assay (n = 4) \*\*\*  $P < 0.001$  (Student's *t*-test). (TIIF)

**Acknowledgments**

We gratefully thank Konstanze Schätzel and Patricia Spieker for technical support. We thank Wolfgang-Ulrich Müller for his help with generating bone marrow chimeras. The National Institutes of Health (NIH, USA) Tetramer Core Facility provided the tetramers.

**Author Contributions**

Conceived and designed the experiments: NH NS DH PAL KSL. Performed the experiments: NH NS HCX. Analyzed the data: NH NS MR ML KSL. Contributed reagents/materials/analysis tools: DEZ GI. Wrote the paper: NH NS PAL KSL.

**References**

- Lehuen A, Diana J, Zaccane P, Cooke A (2010) Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nature reviews Immunology* 10: 501–513.
- Hyoty H, Taylor KW (2002) The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia* 45: 1353–1361.
- Roep BO, Hiemstra HS, Schloot NC, De Vries RR, Chaudhuri A, et al. (2002) Molecular mimicry in type 1 diabetes: immune cross-reactivity between islet autoantigen and human cytomegalovirus but not Cocksackie virus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 958: 163–165.
- Schloot NC, Willemen SJ, Duinkerken G, Drijfhout JW, de Vries RR, et al. (2001) Molecular mimicry in type 1 diabetes mellitus revisited: T-cell clones to GAD65 peptides with sequence homology to Cocksackie or proinsulin peptides do not crossreact with homologous counterpart. *Human immunology* 62: 299–309.
- Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL (1979) Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *The New England journal of medicine* 300: 1173–1179.
- Ramondetti F, Sacco S, Comelli M, Bruno G, Falorni A, et al. (2012) Type 1 diabetes and measles, mumps and rubella childhood infections within the Italian Insulin-dependent Diabetes Registry. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 29: 761–766.
- Stene LC, Oikarinen S, Hyoty H, Barriga KJ, Norris JM, et al. (2010) Enterovirus infection and progression from islet autoimmunity to type 1 diabetes: the Diabetes and Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetes* 59: 3174–3180.
- Foxman EF, Iwasaki A (2011) Genome-virome interactions: examining the role of common viral infections in complex disease. *Nature reviews Microbiology* 9: 254–264.
- Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, Field S, Burren O, et al. (2006) A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nature genetics* 38: 617–619.
- von Herrath M (2009) Diabetes: A virus-gene collaboration. *Nature* 459: 518–519.
- Pietro Paolo M, Castano L, Babu S, Buelow R, Kuo YL, et al. (1993) Islet cell autoantigen 69 kD (ICA69). Molecular cloning and characterization of a novel diabetes-associated autoantigen. *The Journal of clinical investigation* 92: 359–371.
- Karjalainen J, Martin JM, Knip M, Ilonen J, Robinson BH, et al. (1992) A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 327: 302–307.
- Cavallo MG, Fava D, Monetti L, Barone F, Pozzilli P (1996) Cell-mediated immune response to beta casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implications for disease pathogenesis. *Lancet* 348: 926–928.
- Atkinson MA, Bowman MA, Kao KJ, Campbell L, Dush PJ, et al. (1993) Lack of immune responsiveness to bovine serum albumin in insulin-dependent diabetes. *The New England journal of medicine* 329: 1853–1858.
- Vaarala O, Klemetti P, Savilahti E, Reijonen H, Ilonen J, et al. (1996) Cellular immune response to cow's milk beta-lactoglobulin in patients with newly diagnosed IDDM. *Diabetes* 45: 178–182.
- Judkowski VA, Alicotti GM, Sarvetnick N, Pinilla C (2004) Peptides from common viral and bacterial pathogens can efficiently activate diabetogenic T-cells. *Diabetes* 53: 2301–2309.
- Masala S, Paccagnini D, Cossu D, Brezar V, Pacifico A, et al. (2011) Antibodies recognizing Mycobacterium avium paratuberculosis epitopes cross-react with the beta-cell antigen ZnT8 in Sardinian type 1 diabetic patients. *PLoS one* 6: e26931.
- Lammi N, Karvonen M, Tuomilehto J (2005) Do microbes have a causal role in type 1 diabetes? *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 11: RA63–69.
- Turley SJ, Fletcher AL, Elpek KG (2010) The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. *Nature reviews Immunology* 10: 813–825.
- Zinkernagel RM (2000) Localization dose and time of antigens determine immune reactivity. *Semin Immunol* 12: 163–171.
- Zinkernagel RM, Ehl S, Aichele P, Oehen S, Kundig T, et al. (1997) Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev* 156: 199–209.
- George TC, Bilsborough J, Viney JL, Norment AM (2003) High antigen dose and activated dendritic cells enable Th cells to escape regulatory T cell-mediated suppression in vitro. *European journal of immunology* 33: 502–511.
- Kang HK, Liu M, Datta SK (2007) Low-dose peptide tolerance therapy of lupus generates plasmacytoid dendritic cells that cause expansion of autoantigen-specific regulatory T cells and contraction of inflammatory Th17 cells. *Journal of immunology* 178: 7849–7858.
- Lang KS, Recher M, Navarini AA, Harris NL, Lohning M, et al. (2005) Inverse correlation between IL-7 receptor expression and CD8 T cell exhaustion during persistent antigen stimulation. *European journal of immunology* 35: 738–745.
- Aichele P, Brduscha-Riem K, Zinkernagel RM, Hengartner H, Pircher H (1995) T cell priming versus T cell tolerance induced by synthetic peptides. *The Journal of experimental medicine* 182: 261–266.
- Honke N, Shaabani N, Cadeddu G, Sorg UR, Zhang DE, et al. (2012) Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus. *Nature immunology* 13: 51–57.
- Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, et al. (1991) Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65: 305–317.
- Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G-I, De los Santos K, et al. (2002) In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17: 211–220.
- Recher M, Lang KS, Navarini A, Hunziker L, Lang PA, et al. (2007) Extralymphatic virus sanctuaries as a consequence of potent T-cell activation. *Nature medicine* 13: 1316–1323.
- Lang PA, Contaldo C, Georgiev P, El-Badry AM, Recher M, et al. (2008) Aggravation of viral hepatitis by platelet-derived serotonin. *Nature medicine* 14: 756–761.
- Gessner A, Lother H (1989) Homologous interference of lymphocytic choriomeningitis virus involves a ribavirin-susceptible block in virus replication. *Journal of virology* 63: 1827–1832.
- Malakhova OA, Kim KI, Luo JK, Zou W, Kumar KG, et al. (2006) UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity. *EMBO J* 25: 2358–2367.
- Ritchie KJ, Hahn CS, Kim KI, Yan M, Rosario D, et al. (2004) Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection. *Nat Med* 10: 1374–1378.
- Lang KS, Recher M, Junt T, Navarini AA, Harris NL, et al. (2005) Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nature medicine* 11: 138–145.
- Pircher H, Burki K, Lang R, Hengartner H, Zinkernagel RM (1989) Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 342: 559–561.
- Lenzen S (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51: 216–226.
- Hunziker L, Recher M, Macpherson AJ, Ciurea A, Freigang S, et al. (2003) Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections. *Nature immunology* 4: 343–349.
- Coppieters KT, Wiberg A, von Herrath MG (2012) Viral infections and molecular mimicry in type 1 diabetes. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 120: 941–949.
- von Herrath MG, Dockett J, Oldstone MB (1994) How virus induces a rapid or slow onset insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model. *Immunity* 1: 231–242.
- Christen S, Coppieters K, Rose K, Holdener M, Bayer M, et al. (2013) Blockade but not overexpression of the junctional adhesion molecule C influences virus-induced type 1 diabetes in mice. *PLoS one* 8: e54675.
- Freigang S, Probst HC, van den Broek M (2005) DC infection promotes antiviral CTL priming: the 'Winkelried' strategy. *Trends in immunology* 26: 13–18.
- Cong XL, Lo MC, Reuter BA, Yan M, Fan JB, et al. (2012) Usp18 promotes conventional CD11b+ dendritic cell development. *Journal of immunology* 188: 4776–4781.
- Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, et al. (2010) Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 142: 613–624.
- Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, et al. (2003) Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* 4: 1009–1015.
- Longhi MP, Trumplheller C, Idoyaga J, Caskey M, Matos I, et al. (2009) Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J Exp Med* 206: 1589–1602.
- Millar DG, Garza KM, Odermatt B, Elford AR, Ono N, et al. (2003) Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo. *Nature medicine* 9: 1469–1476.
- Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M, Todd JA (2009) Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science* 324: 387–389.
- Heinig M, Petretto E, Wallace C, Bottolo L, Rotival M, et al. (2010) A transacting locus regulates an anti-viral expression network and type 1 diabetes risk. *Nature* 467: 460–464.

*Usp18* Contributes to Break Immunological Tolerance

49. Santin I, Moore F, Grieco FA, Marchetti P, Brancolini C, et al. (2012) USP18 is a key regulator of the interferon-driven gene network modulating pancreatic beta cell inflammation and apoptosis. *Cell death & disease* 3: e419.
50. Lang KS, Georgiev P, Recher M, Navarini AA, Bergthaler A, et al. (2006) Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling. *The Journal of clinical investigation* 116: 2456–2463.

## Abkürzungsverzeichnis (List of abbreviations)

<b>ANOVA:</b>	analysis of variance
<b>APCs:</b>	antigen presenting cells
<b>APC-labeled:</b>	allophycocyanin-labeled
<b>BSA:</b>	bovine serum albumin
<b>CFSE:</b>	carboxyfluorescein succinimidyl ester
<b>CFU:</b>	colony forming unit
<b>DAB:</b>	3,3`diaminobenzidine
<b>DCs:</b>	dendritic cells
<b>DFG:</b>	Deutsche Forschungsgemeinschaft
<b>DMEM:</b>	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
<b>ELISA:</b>	enzyme-linked immunosorbent assay
<b>FACS:</b>	fluorescence-activated cell sorting
<b>FCS:</b>	fetal calf serum
<b>GP:</b>	glycoprotein
<b>HEK:</b>	Human Embryonic Kidney
<b>IFN-<math>\alpha</math>:</b>	Interferon-alpha
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	Interferon-gamma
<b>kg:</b>	kilogram
<b>LCMV:</b>	lymphocytic choriomeningitis virus
<b>L.m.:</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>MHC:</b>	major histocompatibility complex
<b>mg:</b>	milligram
<b>mL:</b>	milliliter
<b>MOI:</b>	multiplicity of infection
<b>NP:</b>	nucleoprotein
<b>PBS:</b>	phosphate-buffered saline
<b>PD-10:</b>	protein desalting-10
<b>PerCP:</b>	peridinin-chlorophyll-protein-complex
<b>PFU:</b>	plaque forming unit
<b>Poly I:C :</b>	polyinosinic-polycytidylic acid
<b>%:</b>	percent
<b>rad:</b>	radiation absorbed dose
<b>RIG-I:</b>	retinoic acid-inducible gene 1
<b>RIP:</b>	rat insulin promoter

<b>S.E.M.:</b>	standard error of the mean
<b>SLO:</b>	secondary lymphoid organs
<b>TLR:</b>	toll-like receptor
<b>µg:</b>	microgram
<b>µL:</b>	microliter
<b>µm:</b>	micrometer
<b>µM:</b>	micromolar
<b>Usp18 (UBP43):</b>	Ubiquitin specific protease 18 (Ubiquitin binding protein 43)
<b>VL4:</b>	hybridoma producing antibody against LCMV nucleoprotein
<b>WT:</b>	wild-type

## Abbildungsverzeichnis (List of tables)

**Fig.1:** Depletion of dendritic cells blunted early viral replication and prevented autoimmune diabetes

- (A): LCMV titers in different organs of WT and CD11c-DTR mice
- (B): Immunohistologic staining for LCMV-NP on spleen sections
- (C): IFN- $\alpha$  concentration in the blood serum of infected mice
- (D): Representative dot plot and virus-specific GP33<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in the blood
- (E): Incidence of diabetes
- (F): LCMV titers in the blood at different time points

**Fig.2:** Pharmacologic inhibition of viral replication inhibits onset of autoimmune diabetes

- (A): LCMV titers in the spleen
- (B): IFN- $\alpha$  concentration in the blood serum
- (C): Number of islet-specific CD8<sup>+</sup> T cells
- (D): Onset of diabetes

**Fig.3:** Expression of *Usp18* in dendritic cells guarantees early viral replication and onset of autoimmune diabetes

- (A): LCMV titers in different organs of WT and *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice
- (B): *In vitro* bone marrow-derived dendritic cells, macrophages, and fibroblasts stained for UBP43 for western blot analysis
- (C): LCMV titers in the culture supernatant of *in-vitro* bone marrow-derived dendritic cells of WT and *Usp18*<sup>-/-</sup> mice
- (D): LCMV titers in the spleen and lymph node of WT and *Usp18*<sup>-/-</sup> mice
- (E): FACS analysis of GP33<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in splenocytes from LCMV infected WT and *Usp18*<sup>-/-</sup> mice
- (F): FACS analysis of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> GP33<sup>+</sup> /and NP396<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in splenocytes from WT or *Usp18*<sup>-/-</sup> after infection with LCMV and restimulation with GP33-peptide
- (G): FACS analysis of GP33<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in the blood from WT or *Usp18*<sup>-/-</sup> mice after LCMV-WE infection
- (H): GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the blood of bone marrow chimeric mice after LCMV infection
- (I): GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells of bone marrow chimeric mice in the peripheral blood on after infection
- (J): Incidence of autoimmune diabetes in bone marrow chimeric mice at the indicated time points

**Fig.4:** Only replicating antigen is efficient in breaking autoimmune tolerance

- (A): Initial LCMV inoculate and purified LCMV glycoprotein (GP) were stained for LCMV-GP by Western blot analysis
- (B): GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells and glucose concentration in RIP-GP mice after LCMV-WE infection
- (C): Autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells and glucose concentration after immunization with purified LCMV-GP in combination with poly I:C
- (D): Proliferation of CD45.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in WT mice assessed by CFSE dilution after splenocytes transfer
- (E): GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells and glucose concentration after treatment with streptozotocin in combination with poly I:C
- (F): Proliferation of CD45.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells assessed by CFSE dilution after splenocytes transfer
- (G): GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells and glucose concentration after treatment with homogenized pancreas from RIP-GP mice in combination with poly I:C
- (H): GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells and glucose concentration after treatment with homogenized liver derived from DEE mice in combination with poly I:C
- (I): GP33-specific CD8<sup>+</sup> T cells and glucose concentration after immunization with Listeria-GP33

**Fig.5:** Ribavirin blunts auto-reactivity in RIP-NP diabetes model

- (A): Number of virus-specific GP33<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells
- (B): Number of autoreactive NP396<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells
- (C): Glucose tolerance test day 50

**Figure S1:** Dendritic cells are activated during LCMV infection

**Figure S2:** Usp18<sup>-/-</sup> mice can cope with LCMV infection

## Anteilerklärung

### 2. Publikation:

Honke N\*, Shaabani N\*, Zhang DE, Tanaka M, Häussinger D, Recher M, Lang PA, Lang KS

*Usp18* driven enforced viral replication in dendritic cells contributes to break of immunological tolerance in autoimmune diabetes

*PLoS Pathog* 2013; 9(10):e1003650. doi:10.1371/journal.ppat.

<b>Name des Journals:</b>	<i>PlosPathogen</i>
<b>Impact factor (Stand 2013):</b>	8,136
<b>Anteil an Experimenten dieser Arbeit (%):</b>	48 %
<b>Autor:</b>	Erstautor (* geteilte Erstautorschaft)
<b>Beitrag an dieser Arbeit:</b>	Frau Nadine Honke führte einen großen Teil der praktischen Experimente und Auswertungen der Versuche durch. Außerdem war Sie am experimentellen Design und entscheidend an der Manuskripterstellung beteiligt.

---

Nadine Honke

---

Prof. Dr. Karl Lang

### 3. Publikation

#### 4.3 **Tunicamycin inhibits diabetes**

Shaabani N, **Honke N**, Lang PA, Görg B, Proksch P, Gailus N, Gotoh T, Häussinger D, Lang KS

Tunicamycin inhibits diabetes.

*Cell Physiol Biochem* 2012; **29**(3-4):595-602.doi: 10.1159/000338513.

Die Rechte dieser Publikation liegen beim Journal *Cellular Physiology and Biochemistry*. Die Originalarbeit kann über die National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) oder den Link des Herausgebers (<http://www.karger.com>) eingesehen und heruntergeladen werden.

## Tunicamycin Inhibits Diabetes

Namir Shaabani<sup>1,2</sup>, Nadine Honke<sup>1,2</sup>, Philipp A. Lang<sup>1</sup>, Boris Görg<sup>1</sup>, Peter Proksch<sup>3</sup>, Nicole Gailus<sup>1,2</sup>, Tomomi Gotoh<sup>4</sup>, Dieter Häussinger<sup>1</sup> and Karl S. Lang<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious diseases, University of Düsseldorf, Germany; <sup>2</sup>Institute for Immunology, University Medical Center Essen, Germany; <sup>3</sup>Institute of Pharmaceutical Biology and Biotechnology, University of Düsseldorf, Germany; <sup>4</sup>Department of Molecular Genetics, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Japan

### Key Words

Tunicamycin • Endoplasmic reticulum stress • Oxidative stress • Lymphocytic choriomeningitis virus • Diabetes

incidence of virus-induced diabetes and improved survival rates. Conclusion: Tunicamycin may offer therapeutic opportunities for T cell-mediated autoimmune diseases such as diabetes.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

### Abstract

Background: Autoimmune diseases are characterized by a breakdown of immunologic tolerance, and this breakdown can lead to life-threatening or lifelong disorders. Moreover, drugs that are used to treat these diseases are few in number and are associated with many serious adverse effects. Methods: We used the rat insulin promoter-glycoprotein mouse model to analyze the role of tunicamycin in the process of autoimmune diabetes; the P14 mouse model to analyze the effect of tunicamycin on CD8<sup>+</sup> T cells; *chop* knockout mice to analyze the role of tunicamycin on an endoplasmic reticulum stress model; and fluorescence-activated cell sorting, quantitative real-time polymerase chain reaction, and histologic methods. Results: We found that a single dose of tunicamycin reduced the activation and pancreatic infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells. This activity delayed the

### Introduction

Diabetes mellitus is an insulin homeostasis disorder characterized by metabolic abnormalities in carbohydrate and lipid metabolism. Type 1 diabetes is primarily immune-mediated. The loss of beta cells is due to a T cell-mediated autoimmune attack, which results in the failure of the pancreas to produce insulin [1-5].

Tunicamycin is produced by the bacterium *Streptomyces lysosuperificus* and is a mixture of homologous nucleoside antibiotics that inhibit the enzyme GlcNAc phosphotransferase (GPT). GPT catalyzes the transfer of N-acetylglucosamine-1-phosphate from UDP-N-acetylglucosamine to dolichol phosphate, which blocks the synthesis of asparagine-linked glycoproteins. Tunicamycin inhibits the synthesis of all N-linked glycoproteins (N-glycans) and causes cell cycle arrest in

### KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2012 S. Karger AG, Basel  
1015-8987/12/0294-0595\$38.00/0

Accessible online at:  
www.karger.com/cpb

Karl Lang, MD  
Institute of Immunology, University of Duisburg-Essen  
Medical School Essen, Hufelandstr. 55, D-45147 Essen (Germany)  
Tel. +49 201 723-4273 or +49 177 559-4925  
E-Mail karlsebastian.lang@uk-essen.de

the G1 phase. In addition, it is used in biology as an experimental tool that induces an unfolded protein response [6-11].

In this study we analyzed the effects of tunicamycin in suppressing the immune response. We found that a single dose of tunicamycin significantly reduces T-cell proliferation and delays the incidence of diabetes in a model of virus-induced type 1 diabetes.

## Materials and Methods

### *Mice, treatment, viruses*

Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) strain WE was originally obtained from F. Lehmann-Grube (Heinrich Pette Institute, Hamburg, Germany) and was propagated in L929 cells. Virus titers were measured with a focus-forming assay as described previously [12]. All mice used in this study were maintained on the C57BL/6 genetic background. Rat insulin promoter-glycoprotein (RIP-GP) mice, which express the LCMV glycoprotein as a transgene under the rat insulin promoter, were used for analysis of autoimmune diabetes [13]. P14/CD45.1 mice expressing the LCMV GP33 peptide-specific T-cell receptor (TCR) as a transgene were used for T-cell studies [14]. KL25 knockin mice express a LCMV specific B cell receptor [15]. Mice lacking the *chop* gene were maintained on the C57BL/6 background [16]. Animals were kept in single ventilated cages. Animal experiments were carried out with the authorization of the Veterinäramt of Nordrhein Westfalen, Germany, and in accordance with the German laws for animal protection, the institutional guidelines of the Ontario Cancer Institute, or both. Mice exhibiting symptoms of sickness or showing substantial weight loss during LCMV infection were considered dead for purposes of statistical analysis and were euthanized. Tunicamycin was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) for intravenous treatment of the animals.

### *Diabetes measurement*

Blood glucose concentrations were measured with an Elite Meter (Bayer, Tarrytown, NY). Mice were considered to be diabetic if the glucose concentration was higher than 14 mM for 2 consecutive days.

### *Histology*

In virus infection experiments, histologic analyses were performed on snap-frozen tissue [12]. Sections of pancreas were stained with the rat monoclonal antibodies anti-CD8 (BD Pharmingen, San Diego, CA), with anti-major histocompatibility complex I (MHC-I) (eBioscience, San Diego, CA), and with guinea pig anti-insulin (Dako, Carpinteria, CA).

### *Fluorescence-activated cell sorting analysis*

Tetramer staining, surface staining, and intracellular fluorescence-activated cell sorting (FACS) staining were performed as described previously [12]. Briefly, splenocytes or

peripheral blood lymphocytes were stained with allophycocyanin (APC)-labeled GP33 MHC class I tetramers (GP33/H-2Db) for 15 minutes at 37°C. They were then stained with anti-CD8 peridinin chlorophyll protein complex (PerCP; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) for 30 minutes at 4°C. Tetramers were provided by the National Institutes of Health (NIH) Tetramer Facility.

### *Lymphocyte transfer*

Splenocytes from P14/CD45.1 mice were labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) and injected intravenously into 4 groups of mice. On the next day, 2 groups were infected with  $2 \times 10^4$  plaque-forming units (PFU) LCMV-WE. After 12 hours, one group of the uninfected and infected mice was given 20 nmol of tunicamycin intravenously; the other mice served as a control group and were left uninfected.

### *In vitro T-cell proliferation*

The proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells *in vitro* without antigen was performed as described previously [17]. Briefly, T cells were sorted with the MACS Pan T Cell Isolation Kit (130-090-861, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) and then labeled with CFSE. T-cell activation was achieved in a 24-well plate coated with anti-CD3 (5 µg/mL; 14-0031-85, eBioscience) with or without soluble anti-CD28 (2 µg/mL; 553294, BD Pharmingen).

### *Reverse-transcription polymerase chain reaction*

Total RNA was extracted from splenocytes with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA was quantified with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany). The RNA was reverse-transcribed into cDNA by using the Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Gene expression analysis was performed with assays from Applied Biosystems (Carlsbad, CA; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [GAPDH] [4352339E-0806018], *Chop* [Mm00492097\_m1], interferon-gamma [IFN-γ] [Mm99999071\_m1]), and interleukin-2 [IL-2] [Mm99999222-m1]). Gene expression values were then calculated with the ddCt method; the mean of the control group was used as a calibrator to which all other samples were compared. Relative quantities (RQs) were determined with the equation  $RQ = 2^{-ddCt}$ .

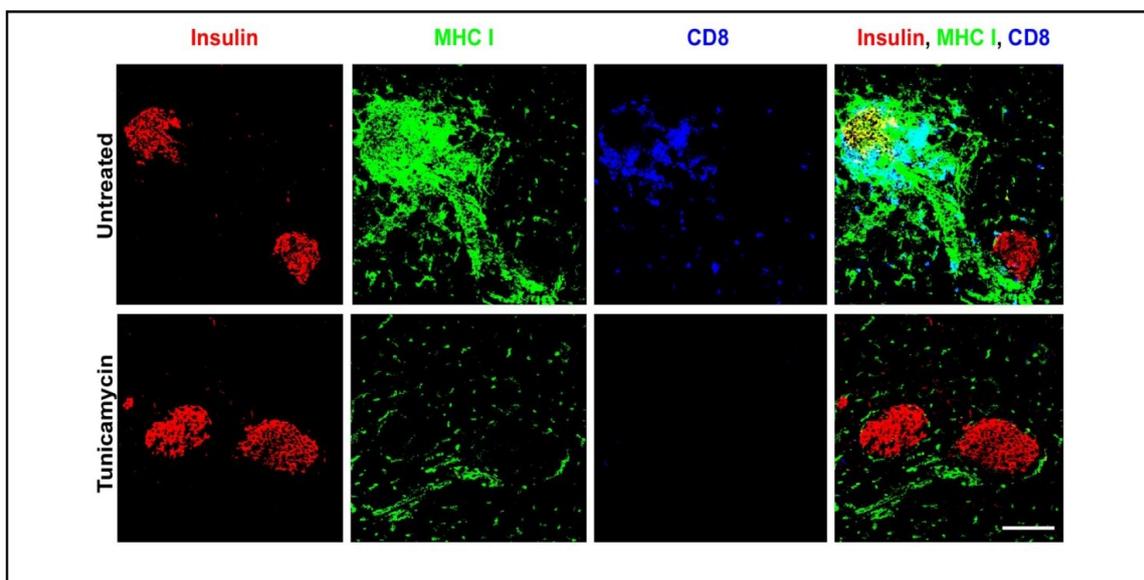
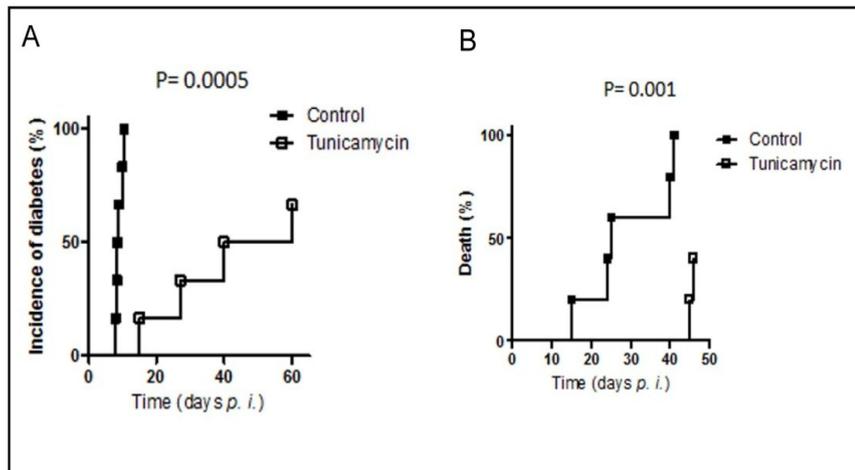
### *In vivo killer assay*

C57BL/6 mice were infected with 200 PFU of LCMV-WE. On day 7, CD45.1<sup>+</sup> splenocytes were labeled either with GP33 peptide or with CFSE and were transferred to the infected mice in a ratio of 1:1. After 30 minutes, the number of GP33-labeled splenocytes was compared to the number of CFSE-labeled peptide-negative splenocytes.

### *Statistical analysis*

Data are expressed as means ± S.E.M. Differences between two groups were analyzed for statistical significance with Student's *t*-test. Statistical significance was set at the level of  $P < 0.05$ .

**Fig. 1.** Tunicamycin inhibits lymphocytic choriomeningitis virus-induced diabetes. **A:** Rat insulin promoter-glycoprotein (RIP-GP) mice, expressing the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) glycoprotein under the rat insulin promoter, were infected with 200 plaque-forming units (PFU) LCMV-WE. One group of mice was treated with 20 nmol tunicamycin on day 4 after infection. Induction of diabetes was monitored (n = 6). **B:** Survival of mice was analyzed (n = 6).



**Fig. 2.** Tunicamycin reduces the infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells to the pancreas. Rat insulin promoter-glycoprotein (RIP-GP) mice were infected with 200 PFU LCMV-WE. One group of mice was treated with 20 nmol tunicamycin on day 4 after infection. On day 6, mice were killed, and beta-islet cells were stained with immune fluorescence antibodies (n = 3). Scale bar, 100  $\mu$ m.

## Results

### *Tunicamycin inhibits LCMV-induced diabetes*

To analyze the role of tunicamycin in diabetes we used RIP-GP mice, which express a viral antigen (LCMV glycoprotein) under the rat insulin promoter. Priming of CD8<sup>+</sup> T cells with LCMV-WE induces the proliferation of  $\beta$ -islet epitope-specific CD8<sup>+</sup> T cells; these cells subsequently destroy pancreatic  $\beta$ -islet cells, and this destruction leads to diabetes [13]. To test the effect of

tunicamycin in diabetes, we infected RIP-GP mice with 200 PFU LCMV-WE (day 0) and then treated one group of mice additionally with 20 nmol tunicamycin on day 4. Treatment with tunicamycin substantially delayed the onset of diabetes; mice treated with tunicamycin did not show any obvious sign of disease until day 15. In contrast, diabetic mice that were not given tunicamycin exhibited high glucose concentrations beginning on day 10 and died within 40 days (Fig. 1 A, B).

*Tunicamycin reduces the infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells to the pancreas*

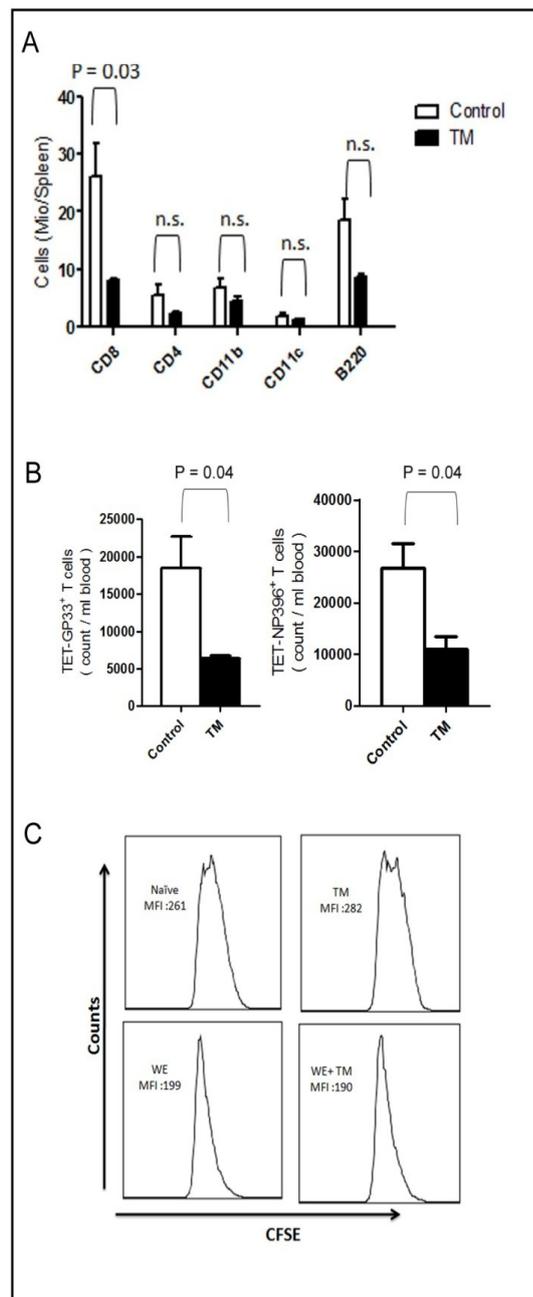
To investigate the effect of tunicamycin on the infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells to the pancreas, we used 2 groups of RIP-GP mice that had been infected with LCMV-WE. One group was treated intravenously with 20 nmol tunicamycin on day 4, and the other group was left untreated. After 6 days of infection, mice were killed. Pancreas slices were stained with fluorescence antibodies against  $\beta$ -islet cells, CD8<sup>+</sup> T cells, and MHC-I. Treatment with tunicamycin reduced the infiltration of T cells and the expression of MHC-I (Fig. 2).

*Tunicamycin induces rapid apoptosis in proliferating T cells*

To investigate whether tunicamycin specifically reduces the number of CD8<sup>+</sup> T cells and whether its suppressive activity also affects other immune cells, we infected mice with 200 PFU LCMV and administered 20 nmol tunicamycin on day 6. On day 8, mice were killed and immune cells were counted. We found that the administration of tunicamycin primarily reduced the number of CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 3 A). The main reduction was in NP396-specific and GP33-specific T cells (Fig. 3 B). Moreover, we analyzed the effect of tunicamycin on the proliferation of specific B cells. We used B cells from the spleens of KL25 mice, which are specific for LCMV-GP. The B cells were labeled with CFSE and incubated with LCMV with or without 10  $\mu$ M tunicamycin. We did not find obvious effect of tunicamycin on the proliferation of these specific B cells (Fig. 3 C).

*Tunicamycin acts directly on T cells*

To determine whether the reduction in the number of CD8<sup>+</sup> T cells is direct, we transferred CFSE-labeled splenocytes from P14/CD45.1 mice into 4 groups of C57BL/6 mice. One group was infected with  $2 \times 10^4$  PFU of LCMV-WE; the second group was also infected ( $2 \times 10^4$  PFU) and was additionally treated with 20 nmol tunicamycin on day 1; the third group was not infected but was only treated with 20 nmol tunicamycin; and the fourth group served as a control group. The mice were killed on day 3, and the proliferation of the labeled splenocytes was analysed in FACS. The addition of tunicamycin in the absence of T-cell activation had only a mild influence on the survival of CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 4A, B). T-cell activation in the absence of tunicamycin led to rapid CFSE dilution and expansion of CD8<sup>+</sup> T cells. In the presence of tunicamycin, the number of CD8<sup>+</sup> T cells decreased rapidly to a level even lower than the original



**Fig. 3.** Tunicamycin primarily kills CD8<sup>+</sup> T cells. A-B: C57BL/6 mice were infected with 200 PFU LCMV-WE. On day 6 after infection, one group of mice was treated with 20 nmol tunicamycin. On day 8, mice were killed, and numbers of subsets of cells in the spleen (A) (n = 3) and of LCMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the blood (B) were counted (n = 3). One of two similar experiments is shown. C: Two million KL25 splenocytes were labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) and activated with LCMV-WE in the presence or absence of 10  $\mu$ M tunicamycin. After 48 h, B-cell proliferation was measured by fluorescence-activated cell sorting (FACS) (n = 4).

**Fig. 4.** Tunicamycin acts directly on T cells. A-B: P14/CD45.1 splenocytes were labeled with CFSE and transferred to C57BL/6 mice. Mice were then infected with LCMV-WE or left uninfected in the presence or absence of 20  $\mu$ mol tunicamycin. The proliferation capability (A) and the number (B) of T cells were determined by FACS (n = 3). C-D: MACS-sorted T cells were labeled with CFSE and stimulated with anti-CD3 and with or without anti-CD28, in the presence or absence of 10  $\mu$ M tunicamycin. After 3 days, the CFSE content (C) and the absolute number of CD8<sup>+</sup> T cells (D) determined by FACS (n = 6). E: C57BL/6 mice were treated with 20  $\mu$ mol tunicamycin or left untreated. P14/CD45.1 splenocytes were labeled with CFSE and transferred to the mice with or without LCMV-WE infection. The proliferation of T cells was determined by FACS (n = 4).

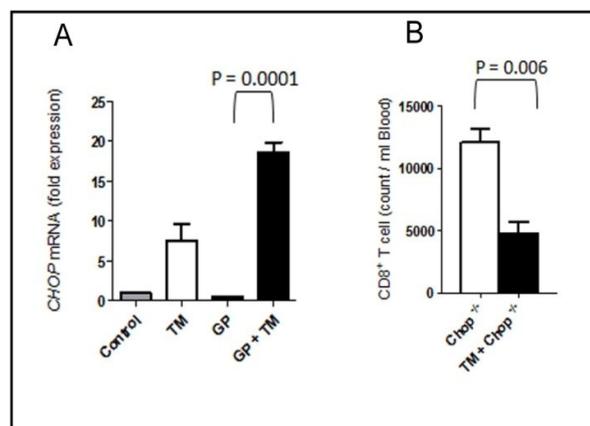
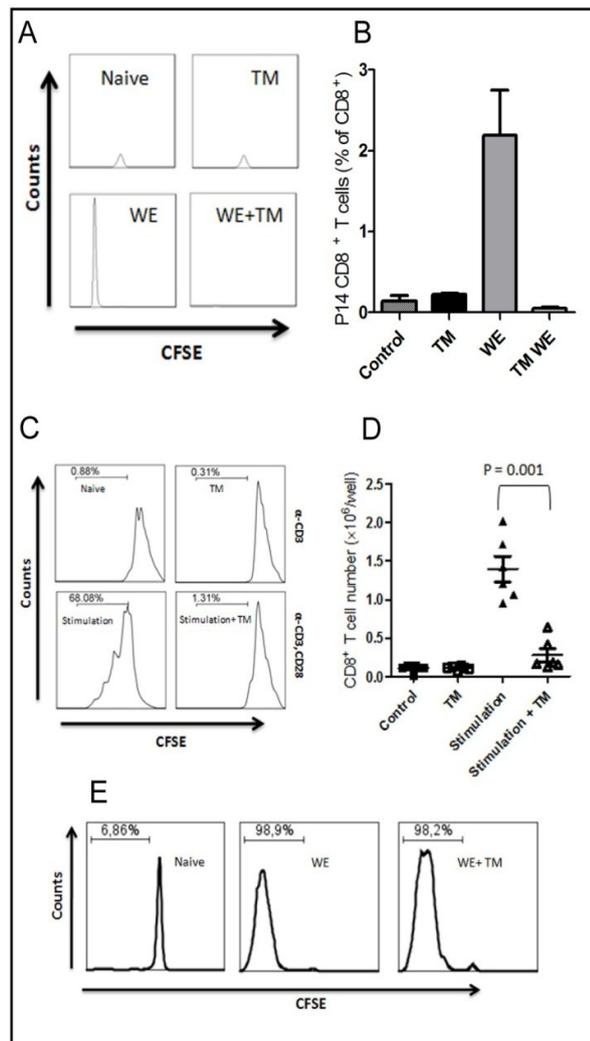
cell count (Fig. 4 A, B). This finding suggests that activated T cells are highly sensitive to treatment with tunicamycin but that non-activated T cells are only slightly sensitive to this treatment.

To eliminate the effect of tunicamycin on the expression of MHC-I, we cultured CFSE-labeled CD8<sup>+</sup> T cells in anti-CD3-coated 24-well plates and stimulated them with or without CD28. One group each of the stimulated and unstimulated cells was treated with tunicamycin on day 0. After 3 days, the absolute number of CD8<sup>+</sup> T cells and the CFSE content were measured with FACS. Tunicamycin directly inhibited the Proliferation of the CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 4 C, D), and this finding excluded the possibility that tunicamycin affects the antigen-presenting pathway.

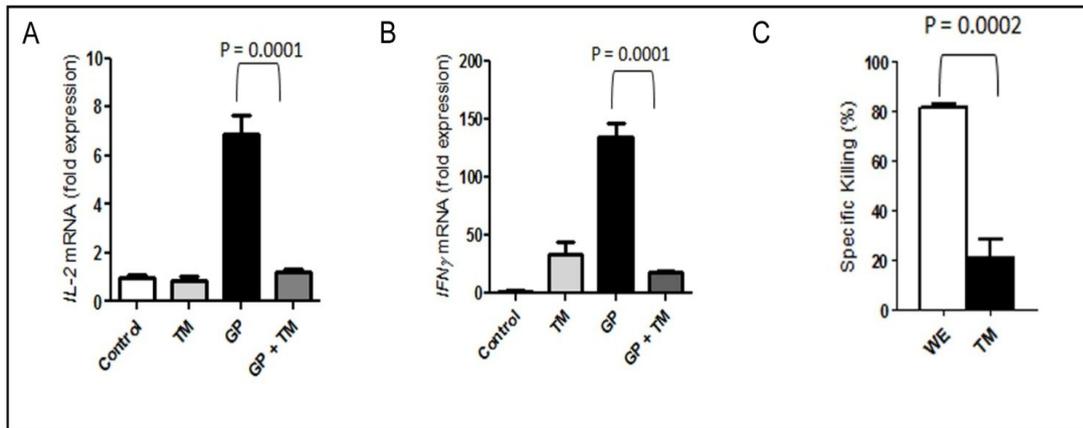
To restrict the effect of tunicamycin on MHC-I, we treated C57BL/6 mice with tunicamycin. Twelve hours later we injected mice with CFSE-labeled splenocytes from P14/CD45.1 mice. After 48 hours, the proliferation of the transferred CD8<sup>+</sup> T cells was measured with FACS and was found to be at a normal level (Fig. 4 E).

*Tunicamycin increases the expression of the chop gene in T cells*

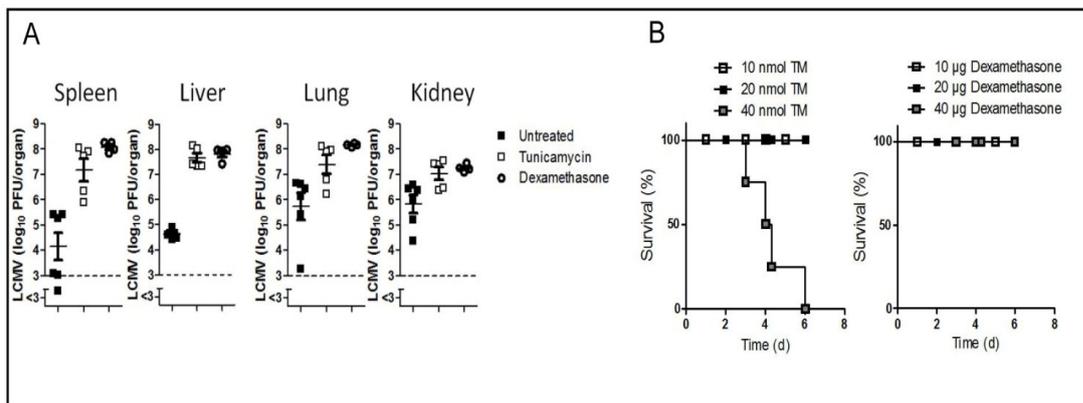
Tunicamycin has a strong effect on endoplasmic reticulum (ER) stress and specifically on the *chop* gene; under circumstances of stress this effect can lead to apoptosis [18-20]. Therefore, we next measured the expression of *chop* mRNA in T cells. We stimulated splenocytes from P14 mice with GP33 and incubated the cells with 10  $\mu$ M tunicamycin for 48 hours. Tunicamycin increased the expression of *chop* (Fig. 5 A). To determine whether this enhanced *chop* expression was the reason for the reduced proliferation of T cells, we injected *chop*<sup>-/-</sup> mice



**Fig. 5.** Tunicamycin induces the expression of *chop* in T cells. A: P14 splenocytes were activated with GP33 peptide in the presence or absence of 10  $\mu$ M tunicamycin. After 48 hours, *chop* gene expression was measured (n = 6). B: *Chop* knockout mice and C57BL/6 mice were infected with  $2 \times 10^6$  PFU LCMV-WE. On day 4, mice were treated with 20 nmol of tunicamycin. CD8<sup>+</sup> T cells in the blood were counted on day 8 (n = 3).



**Fig. 6.** Tunicamycin reduces the expression of interleukin 2 and interferon  $\gamma$ . A-B: After being cultured in a 24-well plate,  $4 \times 10^6$  P14 splenocytes were activated with GP33 peptide in the presence or absence of  $10 \mu\text{M}$  tunicamycin. After 24 hours, RNA was isolated, and the expression of interleukin-2 (IL-2, A) and interferon gamma (IFN- $\gamma$ , B) mRNA was measured by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) (n = 6). C: C57BL/6 mice were infected with 200 PFU of LCMV-WE strain. On day four, mice were treated with 20 nmol of tunicamycin intravenously. On day 8 after infection, the cytotoxic capability of CD8<sup>+</sup> T cells was determined with an *in vivo* killer assay (n = 4).



**Fig. 7.** The comparison of tunicamycin to dexamethasone. A: C57BL/6 mice were infected with  $2 \times 10^6$  PFU LCMV-WE. On day 4, mice were treated once with 20 nmol of tunicamycin intravenously, or daily with 20  $\mu\text{g}$  of dexamethasone intraperitoneally. Viral titers were analyzed on day 11 after infection (n = 4-6). B: C57BL/6 mice were injected with 10, 20, or 40 nmol tunicamycin or with 10, 20, or 40  $\mu\text{g}$  of dexamethasone. Survival was monitored.

with  $2 \times 10^6$  PFU LCMV-WE, with or without 20 nmol of tunicamycin. We found that *chop*<sup>-/-</sup> mice were also sensitive to tunicamycin, a finding suggesting that factors other than *chop* contributed to the rapid death of CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 5 B).

*Tunicamycin inhibits the production of cytokines by proliferated T cells*

T cells begin to produce cytokines after activation. This cytokine production enhances proliferation (IL-2) and is beneficial for controlling the virus (IFN- $\gamma$ ) [21, 22]. We

used real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) to measure the mRNA expression of IL-2 and IFN- $\gamma$  by T cells. Splenocytes from P14 mice were stimulated with GP33 peptide and were either treated with  $10 \mu\text{M}$  tunicamycin for 48 hours or left untreated. Tunicamycin reduced gene expression (Fig. 6 A, B), a finding suggesting that cytokine production is also affected by tunicamycin.

Next we measured the cytotoxic activity of CD8<sup>+</sup> T cells after tunicamycin treatment. The cytolytic activity of CD8<sup>+</sup> T cells was significantly reduced when mice were treated with tunicamycin (Fig. 6 C).

Next we compared the immunosuppressive effects of tunicamycin to those of a standard immunosuppressive therapy (dexamethasone). First, we analyzed the ability of both regimens to control the virus and found that both treatments led to the persistence of LCMV (Fig. 7 A). Toxicity studies showed that once the dose was increased, the administration of tunicamycin led to death (Fig. 7 B). This finding suggests that the therapeutic window of tunicamycin is narrow.

**Discussion**

In this study we found that tunicamycin can prevent type 1 diabetes by reducing the proliferation of T cells, primarily active antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells. This strong effect of tunicamycin could also be important for treating other types of diseases that are related to autoimmune responses. However, because of the narrow application window of tunicamycin, specific cell toxicity will probably be required. The results of this study may also suggest a new approach to the treatment of diabetes in humans, once the therapeutic dose, the proper route of administra-

tion, and the accompanying adverse effects have been determined.

**Acknowledgements**

We thank K. Schätzel for technical support. The authors also acknowledge the NIH Tetramer Facility for providing the tetramers used in the study. This study was supported by the Sonderforschungsbereich SFB974, Experimentelle Hepatologie (Sprecher: Prof. Dieter Häussinger). K.S.L. was funded by the Sofja Kovalevskaja Award from the Alexander von Humboldt Foundation. In addition, this study was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG LA 1419/3-1). This work was also supported by the MOI Manchot Graduate School (Jürgen Manchot Foundation).

K.S.L. studied and wrote the manuscript; N.S. performed most of the experiments and prepared the initial manuscript; N.H. performed many experiments; B.G and N.G. performed experiments; P.A.L., P.P., and D.H. analyzed the data; and T.M. helped with experiments regarding *chop* knockout mice.

**References**

<p>▶1 Van den Driessche A, Eenkhoorn V, Van Gaal L, De Block C: Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: A clinical review. <i>Neth J Med</i> 2009;67:376-387.</p> <p>▶2 Pozzilli P, Di Mario U: Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of the adult): definition, characterization, and potential prevention. <i>Diabetes Care</i> 2001;24:1460-1467.</p> <p>▶3 Pinschewer DD, Ochsenbein AF, Odermatt B, Brinkmann V, Hengartner H, Zinkernagel RM: FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory. <i>J Immunol</i> 2000;164:5761-5770.</p> <p>▶4 Lang PA, Merkler D, Funkner P, Shaabani N, Meryk A, Krings C, Barthuber C, Recher M, Brueck W, Haeussinger D, Ohashi PS, Lang KS: Oxidized ATP inhibits T-cell-mediated autoimmunity. <i>Eur J Immunol</i> 2010;40:2401-2408.</p> <p>▶5 Fairweather D, Rose NR: Type 1 diabetes: virus infection or autoimmune disease? <i>Nat Immunol</i> 2002;3:338-340.</p>	<p>▶6 Olden K, Pratt RM, Yamada KM: Selective cytotoxicity of tunicamycin for transformed cells. <i>Int J Cancer</i> 1979;24:60-66.</p> <p>▶7 Noda I, Fujieda S, Seki M, Tanaka N, Sunaga H, Ohtsubo T, Tsuzuki H, Fan GK, Saito H: Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin enhances sensitivity to cisplatin in human head-and-neck carcinoma cells. <i>Int J Cancer</i> 1999;80:279-284.</p> <p>▶8 Prives J, Bar-Sagi D: Effect of tunicamycin, an inhibitor of protein glycosylation, on the biological properties of acetylcholine receptor in cultured muscle cells. <i>J Biol Chem</i> 1983;258:1775-1780.</p> <p>▶9 Watson A, Bach FH: The role of gp70 in the target antigen recognized by murine leukemia virus immune cytotoxic T-lymphocytes. <i>Int J Cancer</i> 1980;26:483-494.</p>	<p>▶10 Martinez JA, Torres-Negrón I, Amigó LA, Roldán RA, Mendéz A, Banerjee DK: Tunicamycin inhibits capillary endothelial cell proliferation by inducing apoptosis. Targeting dolichol-pathway for generation of new anti-angiogenic therapeutics. <i>Adv Exp Med Biol</i> 2000;476:197-208.</p> <p>▶11 Tordai A, Brass LF, Gelfand EW: Tunicamycin inhibits the expression of functional thrombin receptors on human T-lymphoblastoid cells. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 1995;206:857-862.</p> <p>▶12 Lang KS, Georgiev P, Recher M, Navarini AA, Bergthaler A, Heikenwalder M, Harris NL, Junt T, Odermatt B, Clavien PA, Pircher H, Akira S, Hengartner H, Zinkernagel RM: Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling. <i>J Clin Invest</i> 2006;116:2456-2463.</p>
--	---	--

- ▶13 Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, Malissen B, Zinkernagel RM, Hengartner H: Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 1991;65:305-317.
- ▶14 Pircher H, Bürki K, Lang R, Hengartner H, Zinkernagel RM: Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 1989;342:559-561.
- ▶15 Hangartner L, Senn BM, Ledermann B, Kalinke U, Seiler P, Bucher E, Zellweger RM, Fink K, Odermatt B, Bürki K, Zinkernagel RM, Hengartner H: Antiviral immune responses in gene-targeted mice expressing the immunoglobulin heavy chain of virus-neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12883-12888.
- ▶16 Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M: Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ* 2004;11:390-402.
- ▶17 Blais ME, Gérard G, Martinic MM, Roy-Proulx G, Zinkernagel RM, Perreault C: Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses? *Blood* 2004;103:3102-3110.
- ▶18 Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ: Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest* 2008;118:3378-3389.
- ▶19 Chen G, Fan Z, Wang X, Ma C, Bower KA, Shi X, Ke ZJ, Luo J: Brain-derived neurotrophic factor suppresses tunicamycin-induced upregulation of CHOP in neurons. *J Neurosci Res* 2007;85:1674-1684.
- ▶20 Vanderford NL: Defining the regulation of IL-1 $\beta$ - and CHOP-mediated  $\beta$ -cell apoptosis. *Islets* 2010;2:334-336.
- ▶21 Ohteki T, Parsons M, Zakarian A, Jones RG, Nguyen LT, Woodgett JR, Ohashi PS: Negative regulation of T cell proliferation and interleukin 2 production by the serine threonine kinase GSK-3. *J Exp Med* 2000;192:99-104.
- ▶22 Schwiebert EM: Underlying purinergic signaling contributes to T lymphocyte activation in tissue repair. Focus on "shockwaves increase the T-cell proliferation and IL-2 expression through ATP release, P2X7 receptors, and FAK activation". *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;298:C446-447.

**Abkürzungsverzeichnis (list of abbreviations):**

<b>APC-labeled:</b>	allophycocyanin-labeled
<b>CFSE:</b>	carboxyfluorescein succinimidyl ester
<b>Chop:</b>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein
<b>DMSO:</b>	dimethyl sulfoxide
<b>ER:</b>	endoplasmic reticulum
<b>FACS:</b>	fluorescence-activated cell sorting
<b>GAPDH:</b>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<b>GPT:</b>	GlcNAc phosphotransferase
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	interferon-gamma
<b>IL-2:</b>	interleukin-2
<b>LCMV:</b>	lymphocytic choriomeningitis virus
<b>MHC-I:</b>	major histocompatibility complex-I
<b>mRNA:</b>	messenger RNA
<b>PerCp:</b>	peridinin chlorophyll protein complex
<b>RIP-GP:</b>	rat insulin promoter-glycoprotein
<b>RT-PCR:</b>	real-time polymerase chain reaction
<b>TCR:</b>	T-cell receptor

## Abbildungsverzeichnis (List of figures)

**Fig. 1:** Tunicamycin inhibits lymphocytic choriomeningitis virus-induced diabetes

- A: Incidence of diabetes
- B: Survival

**Fig. 2:** Tunicamycin reduces the infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells to the pancreas

**Fig. 3:** Tunicamycin primarily kills CD8<sup>+</sup> T cells

- A: Reduction of CD8<sup>+</sup> T cell number
- B: Reduction of GP33<sup>+</sup>- and NP396<sup>+</sup>-virus-specific T cells
- C: B cell proliferation

**Fig. 4:** Tunicamycin acts directly on T cells

- A: Proliferation capability of T cells
- B: Analysis of T cell number
- C: CFSE content of CD8<sup>+</sup> T cells
- D: Absolute number of CD8<sup>+</sup> T cells
- E: Proliferation of T cells

**Fig. 5:** Tunicamycin induces the expression of *chop* in T cells

- A: *Chop* gene expression
- B: Number of CD8<sup>+</sup> T cells in untreated/treated *chop*<sup>-/-</sup> mice

**Fig. 6:** Tunicamycin reduces the expression of interleukin 2 and interferon  $\gamma$

- A: Expression of interleukin-2 (IL-2)
- B: Expression of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )
- C: *In vivo* killer assay

**Fig. 7:** The comparison of tunicamycin to dexamethasone

- A: Viral titers of different organs
- B: Survival

## Anteilerklärung

### 3. Publikation:

Shaabani N, **Honke N**, Lang PA, Görg B, Proksch P, Gailus N, Gotoh T, Häussinger D, Lang KS

Tunicamycin inhibits diabetes.

*Cell Physiol Biochem* 2012; **29**(3-4):595-602

**Name des Journals:**

*Cellular Physiology and Biochemistry*

**Impact factor (Stand 2013):**

3,415

**Anteil an Experimenten dieser Arbeit (%):**

20%

**Autor:**

Co-Autor

**Beitrag an dieser Arbeit:**

Frau Nadine Honke ist für die Durchführung sämtlicher Experimente in diesem Manuskript verantwortlich (vor allem: der Immunhistofluoreszenz-Bilder und an einem großen Teil der qRT-PCR Analysen). Sie war zudem an der Manuskripterstellung beteiligt.

---

Nadine Honke

---

Prof. Dr. Karl Lang

## 5. ALLGEMEINE DISKUSSION

Als das größte sekundäre lymphatische Organ spielt die Milz eine besondere Rolle bei der Aufnahme von Pathogenen aus dem Blut (den Haan & Kraal, 2012). Neben den dort lokalisierten Immunzellen ist vor allem, das durch eine Virusinfektion induzierte Typ I Interferon (IFN), ein Zytokin mit stark antiviralen Eigenschaften, für die Kontrolle eines Virus essenziell (Francois-Newton et al., 2012). Wie es dem angeborenen Immunsystem dabei gelingt eine Virusinfektion durch die Produktion von Typ I Interferon einzudämmen und zugleich ausreichend virales Antigen für die Präsentation und die Aktivierung adaptiver Immunzellen bereitzustellen, blieb trotz intensiver Forschung bisher unerklärt und wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Erste neue Erkenntnisse konnten anhand von immunfluoreszenzhistologischen Untersuchungen erzielt werden, mit denen gezeigt werden konnte, dass die CD169<sup>+</sup> metallophilen Makrophagen in der Marginalzone der Milz im Vergleich zu anderen im Körper lokalisierten Makrophagen eine Replikation des zytopathischen Vesicular Stomatitis Virus (VSV) zulassen (Honke et al., 2012). Schon in zahlreichen früheren Studien konnte beobachtet werden, dass auch andere Viren sowie Bakterien und Parasiten von den CD169<sup>+</sup> Makrophagen der Milz aufgenommen werden und sich dort vermehren können (Heikema et al., 2010; Beattie et al., 2006; Seiler et al., 1997). Die Ursache hierfür blieb bisher in allen Publikationen unerklärt. Die Architektur der Milz scheint hierbei ein entscheidender Faktor zu sein. Das Blut, das über den Marginalsinus in die Milz gelangt, wird von der weißen Pulpa zu den in der roten Pulpa lokalisierten roten Pulpa Makrophagen geleitet (Mebius & Kraal, 2005). Dies bedeutet, dass infektiöse Partikel, die in die Marginalzone gelangen und sich dort in den CD169<sup>+</sup> Makrophagen vermehren anschließend in die weiße Pulpa transportiert werden oder von den roten Pulpa Makrophagen phagozytiert werden bevor sie wieder zurück in den Blutkreislauf gelangen. Durch die besondere Lokalisation der metallophilen Marginalzonenmakrophagen (CD169<sup>+</sup>) in der Milz wird eine virale Replikation zugelassen, ohne dass sich das Virus in anderen suszeptiblen Organen ausbreiten kann. Wie eine Ausbreitung von Viren in andere Organe unterbunden werden kann, lässt sich mit einer starken Interferonreaktionsfähigkeit einiger Makrophagen erklären. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die roten Pulpa Makrophagen gut auf Typ I Interferon ansprechen und eine Replikation des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) supprimieren (Honke et al., 2012). Dadurch ließ sich eine Ausbreitung von infektiösem Virus in andere Organe lokal begrenzen. Eine zweite Verteidigungslinie bilden die in der Leber lokalisierten Kupffer-Zellen. Venöses Blut, das infektiöse Viruspartikel enthält, kann direkt aus der Milz in die Leber fließen und von den dort anzutreffenden Kupffer-Zellen phagozytiert werden. Diese Makrophagen reagieren ebenfalls gut auf Typ I-Interferon und inhibieren die Replikation phagozytierter Viruspartikel (Honke et al., 2012; Lang et al., 2010). Aufgrund einer starken Interferonsensitivität (Balachandran & Barber, 2000) und

Zytopathogenität (Irie et al., 2012) wurde das Vesicular Stomatitis Virus (VSV) in dieser Arbeit als Modellinfektionssystem gewählt. Es konnte bewiesen werden, dass dieses Virus trotz seines sehr engen Zelltropismus und seines starken Ansprechens auf Interferon in den CD169<sup>+</sup> Makrophagen der Milz replizieren kann (Honke et al., 2012). Für zahlreiche andere Viren wie dem murinen Cytomegalovirus (mCMV), dem Maus Hepatitis Virus (MHV), dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) und dem Vaccinia Virus (VACV, VV) konnte in gleicherweise gezeigt werden, dass sie neben ihrem eigentlichen Gewebetropismus auch in der Milz replizieren können (Cervantes-Barragan et al., 2009; Lang et al. 2009; Müller et al. 1994; Manning et al. 1992). Eine Replikation in der Milz ist hier allerdings nur teilweise auf eine Reaktion auf Typ I Interferon oder anti-virale Gene zurückzuführen, die zwar den Gewebetropismus bestimmen aber nicht unbedingt auch den Milztropismus erklären können (Lang et al., 2009; Manning et al., 1992).

Warum die roten Pulpa Makrophagen in der Milz oder die Kupffer-Zellen in der Leber besser auf Typ I Interferon ansprechen als die CD169<sup>+</sup> Makrophagen der Milz, blieb über die Jahre hinweg unbeschrieben und konnte erst mit der Entdeckung eines neuen Mechanismus in dieser Dissertation aufgeklärt werden (Honke et al., 2012). Aus früheren Publikationen ist bereits bekannt, dass zahlreiche Signalmoleküle die Typ I Interferon Antwort der Zellen beeinflussen können (Yoshimura, 2005). Eine reduzierte Expression des Interferonrezeptors, der signaltransduzierenden Transkriptionsaktivatoren (STAT1/2) oder der Janus aktivierenden Kinase (JAK) und (oder) eine verstärkte Expression Interferon-induzierter Gene wie die Suppressoren des Zytokin Signalweges (SOCS, suppressors of cytokine signaling) (Sadler & Williams 2008; Plataniias, 2005; Yoshimura, 2005) oder der Ubiquitin-spezifischen Proteasen (Malakhova et al., 2006) könnte die Typ I Interferon Resistenz der CD169<sup>+</sup> Makrophagen der Milz erklären. Um herauszufinden welcher Mechanismus hinter einer verstärkten Virusreplikation steckt, wurde speziell die Rolle von UBP43 (*Usp18*), das für seine starke Suppression des Interferonsignalweges bekannt ist (Malakhova et al., 2006), im Detail in den CD169<sup>+</sup> Makrophagen analysiert. Mit Hilfe des *Usp18*<sup>-/-</sup> Mausmodells konnte herausgefunden werden, dass eine genetische Depletion von *Usp18* die Virusreplikation stark inhibiert. Dies weist daraufhin, dass *Usp18* in diesen Zellen eine dominante Rolle in der Inhibition des Typ I Interferonsignalweges spielen muss. Diese Feststellung ließ sich durch eine laser-unterstützte Mikrodisektion sowie einer Sortierung der CD169<sup>+</sup> Zellen mittels MACS (engl. magnetic activated cell sorting) und Durchflusszytometrie (FACS, engl. fluorescence activated cell sorting) bestärken. Durch eine anschließende Bestimmung der *Usp18* Genexpression der isolierten Zellen mit Hilfe einer quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) konnte eine signifikant höhere basale Expression von *Usp18* in den CD169<sup>+</sup> Makrophagen der Milz im Vergleich zu den F4/80<sup>+</sup> roten Pulpa Makrophagen nachgewiesen werden. Diese Befunde sprechen dafür, dass eine verstärkte Virusreplikation in den CD169<sup>+</sup> Zellen der Milz mit einer Überexpression von *Usp18* korreliert (Honke et al., 2012).

Es konnte herausgefunden werden, dass neben den Inhibitoren des Interferonsignalweges auch der Lymphotoxin beta Rezeptor, ein Mitglied aus der Familie der Tumornekrosefaktoren, Einfluss auf den Prozess einer forcierenden Virusreplikation hat. Dies lässt sich damit erklären, dass der Lymphotoxin- $\alpha/\beta$  Signalweg wichtig für die Organogenese der lymphoiden Gewebe (Upadhyay & Fu, 2013) und für den Erhalt der Milzstruktur (Zindl et al., 2009) ist. Dabei wird speziell die Entwicklung der  $CD169^+$  Makrophagen in der Milz (Ware, 2008; Yu et al., 2002) und im Lymphknoten beeinflusst (Phan et al., 2009). Um zu verstehen, welche Bedeutung hinter einer forcierenden Virusreplikation in den metallophilen Marginalzonen Makrophagen der Milz steckt, wurde die Aktivierung des adaptiven Immunsystems näher untersucht. In dieser Arbeit konnte anschaulich gezeigt werden, dass eine *Usp18*-abhängige forcierende Replikation des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) in den  $CD169^+$  Zellen der Milz, trotz der starken Zytopathogenität des Virus, von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung von T-Lymphozyten und für die Produktion neutralisierender Antikörper durch B-Lymphozyten ist. Erst durch eine effiziente Aktivierung des adaptiven Immunsystems konnte das Überleben einer intravenösen Infektion mit einem zytopathischen Virus, wie dem VSV, garantiert werden. Ein genetischer knockout von *Usp18* oder des Lymphotoxinbetarezeptors (LT $\beta$ R) sowie eine Depletierung der  $CD169^+$  Makrophagen führte hingegen zu einer ineffizienten T- und B-Zellantwort, die schließlich mit der Verbreitung des Virus in die neuronalen Gewebe und dem Tod der Versuchstiere einherging (Honke et al., 2012). Dieser Befund könnte ebenfalls durch die besonders günstige anatomische Lage der  $CD169^+$  Zellen um den Milzsinus und zu anderen Zellen des adaptiven Immunsystems erklärt werden, die durch den engen Kontakt eine schnelle Immunantwort ermöglichen. Das lymphoide Strukturen besonders wichtig für die Induktion einer adaptiven Immunantwort sind konnte anhand unterschiedlicher Publikationen bereits dargestellt werden (Zeng et al., 2012; Matter et al., 2011; Müller et al., 2002). Untersuchungen anderer Wissenschaftler haben gezeigt, dass die  $CD169^+$  Makrophagen direkt oder indirekt zur Aktivierung adaptiver Immunzellen beitragen können. Direkt, indem sie das Virus sofort den Lymphozyten präsentieren und diese damit aktivieren können (Hickman et al., 2008; Junt et al., 2007). Indirekt, indem sie das Virus zunächst auf andere Antigen-präsentierende Zellen wie die  $CD8^+$  dendritischen Zellen transferieren, die dann über eine Kreuzpräsentation zur Aktivierung adaptiver Immunzellen beitragen können (Backer et al., 2010). Insgesamt konnten die erzielten Ergebnisse einen neuen Mechanismus der Virusreplikation aufdecken, dessen Bedeutung einerseits in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems liegt und mit einer verstärkten Präsentation von Antigen einhergeht und andererseits für eine starke Aktivierung des adaptiven Immunsystems sorgt, das insbesondere für eine vollständige Eliminierung des Virus essenziell ist (Honke et al., 2012). Während die Prozessierung und Präsentation von Antigen ein gut untersuchtes Kennzeichen des angeborenen Immunsystems darstellt (Burster, 2013; Mantegazza et al., 2013), sind die Mechanismen der Antigenproduktion hingegen noch unzureichend

definiert. Einen ersten Schritt konnte der in dieser Arbeit entdeckte Mechanismus der Virusreplikation liefern, mit dem Antigen gezielt durch eine verstärkte Expression von *Usp18* produziert werden kann (Honke et al., 2012). Inwieweit der neu entdeckte Mechanismus auch auf andere Viren zutrifft, ist bisher noch unzureichend geklärt. Erste Resultate ließen sich durch Untersuchungen mit dem nicht-zytopathischen Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) aus der Familie der Arenaviridae erzielen. Während einer Infektion mit LCMV konnte herausgefunden werden, dass eine virale Replikation ebenfalls stark abhängig von der Expression von *Usp18* in den CD169<sup>+</sup> Makrophagen sowie den CD11c<sup>+</sup> dendritischen Zellen ist (Honke et al., 2013). Dieser Befund offenbarte, dass eine forcierende Virusreplikation auch für die Aktivierung einer adaptiven Immunantwort gegen ein nicht-zytopathisches Virus von Bedeutung sein kann. Eine größere Relevanz des beschriebenen Mechanismus könnte aber eher in dem Überleben einer Infektion mit einem zytopathischen Virus wie dem VSV liegen, da in diesem Fall eine schnelle Induktion neutralisierender Antikörper essenziell ist, um die Ausbreitung von Virus in die neuronalen Gewebe zu verhindern (Honke et al., 2012). Im Menschen ist dieses Szenario primär mit einer Infektion mit dem Rabiesvirus oder dem Poliovirus zu vergleichen. Inwiefern eine forcierende Virusreplikation an der Induktion einer Immunantwort gegen diese Viren involviert ist, bleibt die Aufgabe zukünftiger Untersuchungen. Das Virus während einer Infektion nur für eine bestimmte Zeit von den CD169<sup>+</sup> Makrophagen präsentiert wird und anschließend nach erfolgreicher Aktivierung des adaptiven Immunsystems schließlich eliminiert wird, konnte anhand eigener noch unveröffentlichter Daten gezeigt werden. Dabei wurde festgestellt, dass die CD169<sup>+</sup> Zellen in der Milz nach Infektion mit LCMV selbst das Ziel zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden können und über einen Perforin-abhängigen Effektormechanismus zerstört werden. Über ähnliche Befunde konnten andere Wissenschaftler nach einer Infektion mit dem Parasiten *Plasmodium chabaudi* berichten (Beattie et al., 2006). Dies könnte einen Schutzmechanismus des Körpers darstellen, der nach erfolgreicher Aktivierung des adaptiven Immunsystems nun das Pathogen vollständig aus dem Organismus eliminieren möchte. Inwieweit eine Zerstörung der CD169<sup>+</sup> Makrophagen in diesem Zusammenhang eine klinische Relevanz beispielsweise bei einer Ko-Infektion hat, ist bisher noch unklar und bleibt die Aufgabe zukünftiger Untersuchungen. Eine Funktionalität des Mechanismus einer forcierenden Virusreplikation konnte bisher nur für eine intravenöse Eintrittsroute des Virus in den Körper gezeigt werden. Da zahlreiche Viren nicht über den intravenösen Weg in den Körper gelangen, sondern über die Schleimhäute der Atemwege oder subkutan über Insektenstiche in den Körper eindringen, bleibt es bei diesen Fällen diskutabel wie adaptive Immunantworten gegen solche Viren entstehen. Für das Vesicular Stomatitis Virus konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass dieses bei einer subkutanen Infektion, die einen Insektenbiss imitieren soll, von den CD11b<sup>+</sup> und CD169<sup>+</sup> Subkapsular Sinusmakrophagen im Lymphknoten aufgenommen wird und somit eine Streuung der Viren in das Zentralnervensystem

vorgebeugt werden kann (Iannacone et al., 2010; Junt et al., 2007). Auch für das murine Cytomegalovirus haben Wissenschaftler bewiesen, dass dieses nach einer intraperitonealen Infektion als freies Virus in die Lymphknoten gelangt und dort die Subkapsular Sinusmakrophagen infiziert (Hsu et al., 2009). Der in dieser Dissertation neu beschriebene und entdeckte Mechanismus einer forcierenden Virusreplikation blieb von den Autoren jedoch unerklärt und hätte demnach mit einer Typ I Interferon Resistenz der CD169<sup>+</sup> Makrophagen, die eine Virusreplikation innerhalb dieser Zellen erlaubt, erklärt werden können. Inwieweit eine Virusreplikation bereits in der Peripherie zugelassen wird und ob eine forcierende Virusreplikation im Lymphknoten ebenfalls auf eine verstärkte *Usp18* Expression zurückzuführen ist, bleibt weiterhin zu analysieren. Zusammenfassend konnte herausgefunden werden, dass eine Typ I Interferon-abhängige Überexpression von *Usp18* in einzelnen Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems eine frühe und kontrollierte Virusreplikation in der Milz zulässt und gleichzeitig einen Schutz vor der Ausbreitung des Virus in die peripheren Organe bietet. Somit wird gewährleistet, dass das Virus einerseits bekämpft wird andererseits jedoch ausreichend virales Antigen für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems bereitgestellt wird. Dabei ist eine effektive B- und T-Zellantwort essenziell, um eine vollständige Eliminierung des Virus zu erreichen und somit eine Expansion von Virus in die neuronalen Gewebe, die mit dem Tod der Versuchstiere einhergehen würde, zu verhindern (Honke et al., 2012). Unter Berücksichtigung dieses neu entdeckten Mechanismus wurde des Weiteren untersucht, welche Bedeutung eine forcierende Virusreplikation auf die Zerstörung der Selbsttoleranz hat und somit auf die Entstehung einer Autoimmunerkrankung wie beispielsweise einem Autoimmundiabetes (Typ I Diabetes). Hierbei sollte insbesondere die Rolle der Antigenpräsentation während einer systemischen Infektion mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) analysiert werden. Es konnte anschaulich gezeigt werden, dass lösliches nicht-replizierendes Antigen im Gegensatz zu replizierendem Antigen nicht ausreichend ist einen Typ I Diabetes in einem Diabetes empfänglichen Maus-Modell (RIP-GP) zu induzieren. Nur eine aktive Replikation von Selbst-Antigen konnte die Toleranz in diesen Mäusen brechen und eine Erkrankung in den RIP-GP Mäusen induzieren. Dabei führte ein effektiver Transport von Virus in die sekundär lymphatischen Organe gefolgt von einer *Usp18*-abhängigen Replikation von Virus (LCMV) in dendritischen Zellen zu einer verlängerten Antigenpräsentation und zur Entstehung und Expansion potenziell auto-reaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die zu einer Entstehung eines Typ I Diabetes beitragen (Honke et al., 2013). Diese Daten können letztendlich eine Erklärung dafür liefern, warum Autoimmunerkrankungen hauptsächlich mit Virusinfektionen assoziiert werden (Ghazarian et al., 2013; Jun & Yoon, 2003). Wie in dieser Arbeit festgestellt wurde, begrenzt die Menge des präsentierten Antigens die adaptive Immunantwort. *In-vitro* Studien haben gezeigt, dass bereits 10 Peptid-MHC (pMHC) Komplexe zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen ausreichen, um eine immunologische Synapse zu bilden (Irvine et al., 2002). *In-*

*in vivo* werden allerdings für eine Induktion der T-Zellproliferation im Lymphknoten dendritische Zellen (DCs) mit etwa  $2 \times 10^4$  pMHC Komplexen benötigt (Henrickson et al., 2008). Die Dauer der anfänglichen Priming-Phase korreliert hierbei sehr stark mit der Menge an präsentiertem Antigen (Henrickson et al., 2008). Dies legt nahe, dass nur eine verlängerte Exposition mit ansteigenden Antigendosen in der Lage ist, eine ausreichende  $CD8^+$  T-Zell-Antwort zu induzieren. Dies steht im Einklang mit unserem Befund, dass nur große Mengen an Antigenen die immunologische Ignoranz/Toleranz in RIP-GP Mäuse brechen können. Dabei konnte gezeigt werden, dass nur eine Replikation von Virus in dendritischen Zellen die Verfügbarkeit einer großen Menge an Antigen für mehrere Tage garantieren kann (Honke et al., 2013). Weder eine Immunisierung mit *in-vitro* generierten Lysaten von LCMV-GP exprimierenden Zellen noch die direkte Freisetzung von pankreatischen Selbstantigenen während einer Behandlung mit Streptozotocin konnte dieselbe Menge an LCMV-GP in der Milz erzielen. Folglich stellt eine Vermehrung von Virusantigen durch eine *Usp18*-abhängige Expression in dendritischen Zellen des angeborenen Immunsystems einen effektiven Mechanismus dar, welcher das Virusantigen erhöht und folglich eine starke anti-virale Immunantwort garantiert (Honke et al., 2013). Neben dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) wurde eine Replikation in dendritischen Zellen auch für zahlreiche andere Viren beobachtet (Freigang et al., 2005). Inwiefern diese Replikation in gleicherweise von der Expression von *Usp18* abhängig ist, muss erst in weiteren Studien geklärt werden. Jahrelang ist man davon ausgegangen, dass Gewebeschäden des Zielorgans zu einem Abtransport von Antigen über die Lymphe in die lymphoiden Gewebe führen und diese in parallel mit „Gefahrsignalen“ für das Priming von autoreaktiven T-Zellen verantwortlich sind. Mit Hilfe von *in-vivo* Mausexperimenten konnte in dieser Arbeit hingegen gezeigt werden, dass lösliches Antigen, welches vom geschädigten Gewebe freigesetzt wird, zwar zu einer Inflammation führt, dass diese aber nicht ausreicht, um eine adaptive Immunantwort gegen Selbstantigene zu induzieren (Honke et al. 2013). Selbst wenn ein Autoantigen parallel zu einer Virusinfektion freigesetzt wird, wie z.B. während einer Infektion mit dem zytopathischen Coxsackie-Virus, werden durch die Replikation des Virus zwar zusätzliche Gefahrsignale induziert, trotzdem werden T-Zellen, die sich gegen die  $\beta$ -Inselzellen richten, kaum generiert. Die anti-virale Immunantwort wird hingegen effektiv stimuliert (Horwitz et al., 2002). Eine Immunisierung der RIP-GP Mäuse mit Pankreashomogenat, LCMV-GP exprimierendem Leberhomogenat und LCMV-GP Protein-Lysat führte zu keiner messbaren autoreaktiven  $CD8^+$  T-Zell-Antwort, obwohl parallel ein TLR-Ligand (Poly I:C) verabreicht wurde. Diese Menge an Proteinen ist wahrscheinlich größer als die Gesamtmenge an Selbst-Antigen, welches auf den  $\beta$ -Inselzellen im Pankreas exprimiert wird. Dieser Befund spricht dafür, dass es eher unwahrscheinlich ist, dass eine Induktion von Typ I Diabetes auf eine Freisetzung von Selbstantigenen zurückzuführen ist. Stattdessen konnte illustrativ gezeigt werden, dass nur Antigen (wie beispielsweise virales Selbst-

Antigen), das stark in dendritischen Zellen des angeborenen Immunsystems amplifiziert wird, die Fähigkeit besitzt eine effiziente Menge an Antigen zu produzieren, um somit auto-reaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren (Honke et al., 2013). Da nicht-replizierendes Selbst-Antigen nicht in den dendritischen Zellen des angeborenen Immunsystems amplifiziert werden kann, dürfte dies ein sehr einfacher aber effizienter Mechanismus sein, mit dem das Immunsystem zwischen nicht-replizierendem Autoantigen und viralem Autoantigen unterscheiden kann. Obwohl sich Bakterien ebenfalls stark im Körper vermehren und zahlreiche unterschiedliche Arten von Bakterien auch kreuzreaktive Epitope zu den  $\beta$ -Inselzellen des Pankreas tragen (Masala et al., 2011; Judkowski et al., 2004), ist es bisher immer noch unklar welche Relevanz Bakterien in der Entstehung eines Typ I Diabetes haben (Lammi et al., 2005). Experimente im RIP-GP Mausmodell mit dem fakultativ intrazellulären, rekombinanten Bakterium *Listeria monocytogenes*-GP33 (*Listeria*-GP33), welches das Glykoprotein vom Lymphozytären Choriomeningitis Virus exprimiert, haben gezeigt, dass eine Infektion zwar zu einer begrenzten Proliferation virus-spezifischer CD8 T-Zellen führt aber keinen Diabetes induzieren kann (Honke et al., 2013). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Listerien bei einer systemischen Infektion primär Makrophagen (Irikura et al., 1999) statt dendritische Zellen infizieren. In inaktivierten Makrophagen können sich die Listerien durch einen Abbau der phagosomalen Membran mit Hilfe ihrer Virulenzfaktoren vor einem enzymatischen Verdau schützen und sich ungehindert im Zytosol vermehren ohne vom Immunsystem erkannt zu werden (Lam et al., 2012). Aktivierte Makrophagen können hingegen eine Vermehrung von Listerien inhibieren und bakterielle Antigene präsentieren (Shaughnessy & Swanson, 2007). Dies könnte unter anderem aufklären, warum es nur zu einer begrenzten Proliferation virus-spezifischer CD8-T-Zellen kommt. Diese Menge an virus-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen scheint nicht ausreichend zu sein, um einen Typ I Diabetes zu induzieren. Diese Vermutung lässt sich anhand einer früheren Publikation bestätigen, in der gezeigt werden konnte, dass die Frequenz an virus-spezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zunächst einen bestimmten Grenzwert (Threshold) überschreiten muss, damit eine Autoimmunerkrankung induziert werden kann (Sevilla et al., 2000). Das eine virale Replikation mit einer starken angeborenen und erworbenen Immunantwort korreliert, ließ sich durch eine starke Vermehrung von Virusantigen in dendritischen Zellen und dessen Präsentation über einen längeren Zeitraum erklären. Es bleibt jedoch immer noch diskutabel, ob zusätzliche Mechanismen zu einer verstärkten adaptiven Immunaktivierung beitragen. Die Lokalisation des Antigens könnte hierbei ein zusätzlicher Faktor sein; ebenso könnten weitere Suppressoren des Interferonsignalweges hier in Betracht kommen. Bisher ließ sich in dieser Dissertation eine erhöhte Expression von *Usp18* in vereinzelt Populationen angeborener, antigenpräsentierender Immunzellen der Milz beschreiben, die für eine starke intrazelluläre Amplifikation von Antigen verantwortlich ist (Honke et al., 2012, 2013). Nicht replizierendes Autoantigen, das gewöhnlich in den peripheren Organen produziert wird,

muss nach dem Transfer zu den lymphoiden Organen kreuzpräsentiert werden. Der Transport und die Kreuzpräsentation könnten zum Verlust von Antigen führen und erklären, warum kreuzpräsentierte Antigene in ihrer Konzentration häufig niedriger sind als Antigen, welches von der Virus-infizierten Zelle direkt bereitgestellt wird und über MHC-Komplexe präsentiert wird. Zusätzlich führt eine Replikation von Virus im Vergleich zum kreuzpräsentierten Antigen zu einer Induktion bestimmter Zytokine. Diese können letztendlich zu einer besseren Immunaktivierung beitragen. Es bleibt fraglich, ob dieser Befund verallgemeinert werden kann und somit auf andere Autoimmunerkrankungen übertragbar ist, insbesondere auf Autoimmunerkrankungen, deren Induktion nicht im Zusammenhang mit einer Virusinfektion steht. Wie auto-reaktive Lymphozyten während dieser Erkrankungen initiiert werden, bleibt weiterhin kontrovers und ist Bestandteil neuer wissenschaftlicher Untersuchungen. Eine mögliche Erklärung könnte unter anderem in der Unwissenheit über die Existenz eines latenten Virus liegen. Dabei könnte eine zusätzliche Reaktivierung durch endogene Retroviren schließlich zu einer Ausbreitung solch eines Virus führen, welches unter Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR) in den CD169<sup>+</sup> Makrophagen vermehrt wird und zur Aktivierung auto-reaktiver T-Zellen und/oder B-Zellen beiträgt. Hinweise für solch einen Mechanismus stammen beispielsweise von der Erkrankung der Multiplen Sklerose (MS), bei der tatsächlich in einigen Patienten eine Interaktion von endogenen Retroviren und Herpes Viren mit der Erkrankung assoziiert werden konnten (Christensen, 2005) und bei der eine anti-virale Therapie mit Interferon-beta (IFN- $\beta$ ) erfolgreich ist (Henig et al., 2013; Loma & Heyman, 2011; Sarasin-Filipowicz et al., 2009). Bisher gibt es jedoch noch keinen ausreichenden Beweis, ob solch ein Mechanismus tatsächlich kontinuierlich während dieser Autoimmunerkrankung stattgefunden hat. Solange noch Unklarheit über die Ursache/n der Entstehung von Autoimmunerkrankungen herrscht, besteht eine Therapie einzig und allein in der Behandlung von Symptomen, oder der Gabe von anti-inflammatorischen, immunsupprimierenden oder immunmodulierenden Medikamenten (Kovarik, 2013). Aufgrund von Nebenwirkungen dieser Medikamente und der Tatsache, dass sie keinen kurativen Effekt haben, ist es von besonderem Interesse für die Patienten neue Medikamente zu entwickeln, die Nebenwirkungen zu reduzieren und den Krankheitsprozess besser kontrollieren zu können. Einen weiteren Schritt in diese Richtung konnte im Rahmen dieser Arbeit mit dem als Antibiotikum bekannten Tunicamycin geleistet werden. Inwieweit dieses Medikament weniger Nebenwirkungen aufweist als andere Medikamente ist, bisher noch unbekannt. Es wurde herausgefunden, dass Tunicamycin nicht nur ein Inhibitor der N-Glykosylierung ist (Goddard-Borger & Withers, 2012), sondern auch eine immunsupprimierende Wirkung aufweist. Bereits eine einzelne Dosis von Tunicamycin konnte in einem für Typ I Diabetes geeigneten Mausmodell (RIP-GP) die Aktivierung und Infiltration von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in das Pankreas reduzieren und somit die Entstehung eines virus-induzierten Diabetes inhibieren (Shaabani et al., 2012). Dadurch ließ sich ein

Überleben der Versuchstiere garantieren. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (engl. FACS, fluorescence activating cell sorting) konnte anschaulich gezeigt werden, dass Tunicamycin primär eine direkte Wirkung auf die proliferierenden virus-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen hat und in ihnen Apoptose induzieren kann. Wie sich bereits für andere immunsupprimierende Medikamente herausgestellt hat inhibiert Tunicamycin ebenfalls die Produktion proinflammatorischer Zytokine (Kovarik, 2013; Lang et al., 2010). Hierbei ist vor allem die Expression von IL-2 betroffen, welches Einfluss auf die Proliferation von T-Zellen hat (Ribot et al., 2012), aber auch die Expression von IFN- $\gamma$ , dessen vielfältige Funktionen unter anderem in der Aktivierung anderer Immunzellen sowie in der Kontrolle einer Virusinfektion liegt (Schroder et al., 2004). Mit Hilfe von quantitativen Real Time-PCR Analysen konnte eine Tunicamycin-abhängige reduzierte Expression von IL-2 und IFN- $\gamma$  in T-Zellen festgestellt werden. Neben einer Inhibition der Zytokinproduktion führt eine einmalige Gabe von Tunicamycin zu einer Reduktion der zytotoxischen Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mittels eines *in-vitro* Zytotoxizitätstests ermittelt wurde. Ein Vergleich der immunsupprimierenden Wirkung von Tunicamycin mit dem Standardtherapeutikum Dexamethason zeigte anhand einer Dosiskinetik, dass der Anwendungsbereich von Tunicamycin allerdings sehr begrenzt ist, und dass sich ein Überschreiten des Dosisbereichs in dem Tod der Versuchstiere manifestierte (Shaabani et al., 2012). Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit das Antibiotikum Tunicamycin als ein neues immunsupprimierendes Medikament entdeckt werden. Inwieweit diese gewonnenen Erkenntnisse in die Praxis umgesetzt werden können und sich neue therapeutische Möglichkeiten mit geringeren Nebenwirkungen für die Behandlung von T-Zell-vermittelten/-abhängigen Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise einem Typ I Diabetes ergeben, bleibt Bestandteil weiterer Untersuchungen. Hierzu müssten zunächst die Applikationsweise und Dosis des Tunicamycins sowie mögliche Nebenwirkungen bestimmt werden, bevor Tunicamycin als Immunsuppressivum beim Menschen angewendet werden kann.

**Schlussfolgerung / Ausblick**

Der in der vorliegenden Arbeit neu entdeckte und beschriebene Mechanismus einer *Usp18*-abhängigen forcierenden Virusreplikation könnte für ein breites Spektrum an immunologischen Erkrankungen und deren Therapie bedeutsam sein. Insbesondere jede Form von Autoimmunerkrankungen oder inflammatorischen Prozessen, die auf eine Virusinfektion zurückzuführen sind, könnten durch den beschriebenen Mechanismus beeinflusst werden.

Dabei könnten sich folgende Anwendungsmöglichkeiten ergeben:

1. Durch eine Reduktion der Virusreplikation in der Milz, beispielsweise durch die Gabe von anti-viralen Medikamenten oder durch eine Blockierung der *Usp18* Expression könnte die Wahrscheinlichkeit für die Manifestation einer Autoimmunerkrankung verringert werden.
2. Andererseits ließe sich durch eine Erhöhung der Virusreplikation in der Milz oder durch eine Vakzinierung, die antivirale Immunantwort verbessern.

Allerdings bleiben immer noch Fragen offen, inwieweit dieser Mechanismus auch Einfluss auf einen chronischen Infektionsverlauf hat oder therapeutisch umgesetzt werden kann.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

**Aichele P, Brduscha-Riem K, Zinkernagel RM, Hengartner H & Pircher H**

T cell priming versus T cell tolerance induced by synthetic peptides  
*J Exp Med* 1995; **182**(1):261-266

**Aichele P, Zinke J, Grode L, Schwendener RA, Kaufmann SH & Seiler P**

Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses  
*J Immunol* 2003; **171**(3):1148-55

**Albertini AA, Baquero E, Ferlin A & Gaudin Y**

Molecular and cellular aspects of rhabdovirus entry  
*Viruses* 2012; **4**(1):117-39

**Amit M, Laider-Trejo L, Shalom V, Shabtay-Orbach A, Krelin Y & Gil Z**

Characterization of the melanoma brain metastatic niche in mice and humans  
*Cancer Med* 2013; **2**(2):155-63

**Amman BR, Pavlin BI, Albariño GC, Comer JA, Erickson BR, Oliver JB, Sealy TK, Vincent MJ, Nichol ST, Paddock CD, Tumpey AJ, Wagoner KD, Glauer RD, Smith KA, Winpisinger KA, Parsely MS, Wyrick P, Hannafin CH, Bandy U, Zaki S, Rollin PE & Ksiazek TG**

Pet rodents and fatal lymphocytic choriomeningitis in transplant patients  
*Emerg Infect Dis* 2007; **13**(5):719-25

**Anderson JL, Levy PT, Leonard KB, Smyser CD, Tychsens L & Cole FS**

Congenital Lymphocytic Choriomeningitis Virus: When to Consider the Diagnosis  
*J Child Neurol* 2013; [Epub ahead of print]

**Ank N, Iversen MB, Bartholdy C, Staeheli P, Hartmann R, Jensen UB, Dagnaes-Hansen F, Thomsen AR, Chen Z, Haugen H, Klucher K & Paludan SR**

An important role for type III (IFN- $\lambda$ /IL-28) in TLR-induced antiviral activity  
*J Immunol* 2008; **180**(4):2474-85

**Ank N & Paludan SR**

Type III IFNs: new layers of complexity in innate antiviral immunity  
*Biofactors* 2009; **35**(1):82-7

**Atkinson MA, Bowman MA, Kao KJ, Cambell L, Dush PJ, Shah SC, Simell O & Maclaren NK**

Lack of immune responsiveness to bovine serum albumin in insulin-dependent diabetes  
*N Engl J Med* 1993; **329**(25):1853-8

**Bachmann MF, Kundig TM, Kalberer CP, Hengartner H & Zinkernagel RM**

Formalin inactivation of vesicular stomatitis virus impairs T-cell- but not T-help-independent B-cell responses  
*J Virol* 1993; **67**(7):3917-22

**Bachmann MF, Bast C, Hengartner H & Zinkernagel RM**

Immunogenicity of a viral model vaccine after different inactivation procedures  
*Med Microbiol Immunol* 1994; **183**(2):95-104

**Backer R, Schwandt T, Greuter M, Oosting M, Jüngerkes F, Tüting T, Boon L, O'Toole T, Kraal G, Limmer A & den Haan JM**

Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8<sup>+</sup> dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells

*Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**(1):216-21

**Balachandran S & Barber GN**

Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors

*IUBMB Life* 2000; **50**(2):135-8

**Balogh P, Horvath G & Szakal AK**

Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen

*J Histochem Cytochem* 2004; **52**(10):1287-98

**Barnes PJ**

Corticosteroid effects on cell signaling

*Eur Respir J* 2006; **27**(2): 413-26

**Barnes PJ**

Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation

*J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; **120**(2-3):76-85

**Bar-On L. & Jung S**

Defining dendritic cells by conditional and constitutive cell ablation

*Immunol Rev* 2010; **234**(1):76-89

**Barton LL & Mets MB**

Lymphocytic choriomeningitis virus: pediatric pathogen and fetal teratogen

*Pediatr Infect Dis J* 1999; **18**(6):540-1

**Barton LL & Mets MB**

Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: decade of rediscovery

*Clin Infect Dis* 2001; **33**(3):370-4

**Barton LL, Mets MB & Beauchamp CL**

Lymphocytic choriomeningitis virus: emerging fetal teratogen

*Am J Obstet Gynecol* 2002; **187**(6):1715-6

**Barton LL**

LCMV transmission by organ transplantation

*N Engl J Med* 2006; **355**(16):1737-8

**Battegay M, Bachmann MF, Burhkart C, Viville S, Benoist C, Mathis D, Hengartner H & Zinkernagel RM**

Antiviral immune responses of mice lacking MHC class II or its associated invariant chain

*Cell Immunol* 1996; **167**(1):115-121

**Beattie L, Engwerda CR, Wykes M & Good MF**

CD8<sup>+</sup> T Lymphocyte-mediated loss of marginal metallophilic macrophages following infection with

*Plasmodium chabaudi chabaudi AS*

*J Immunol* 2006; **177**(4):2518-26

**Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, Allan RS, Weitasiak M, Shortman K, Carbone FR, Brooks AG & Heath WR**

Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103<sup>+</sup> dendritic cells  
*Nat Immunol* 2009; **10**(5):488-95

**Belz GT & Nutt SL**

Transcriptional programming of the dendritic cell network  
*Nat Rev Immunol* 2012; **12**(2):101-13 / Erratum in *Nat Rev Immunol* 2013; **13**(2):149

**Beyer WR, Pöplau D, Garten W, von Laer D & Lenz O**

Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P

*J Virol* 2003; **77**(5):2866-72

**Bi Z, Barna M, Komatsu T & Reiss CS**

Vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system activates both innate and acquired immunity

*J Virol* 1995; **69**(10):6466-72

**Bishop GA & Hostager BS**

Signaling by CD40 and its mimics in B cell activation

*Immunol Res* 2001; **24**(2):97-109

**Blais ME, Gérard G, Martinic MM, Roy-Proulx G, Zinkernagel RM & Perreault C**

Do thymically and strictly extrathymically developing T cells generate similar immune responses?

*Blood* 2004; **103**(8):3102-10

**Bogunovic D, Boisson-Dupuis S & Casanova JL**

ISG15: leading a double life as a secreted molecule

*Exp Mol Med* 2013; **45**:e18

**Bonthius DJ, Wright R, Tseng B, Barton L, Marco E, Karacay B & Larsen PD**

Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: spectrum of disease

*Ann Neurol* 2007; **62**(4):347-55

**Bordon EC & Williams BR**

Interferon-stimulated genes and their protein products: what and how?

*J Interferon Cytokine Res* 2011; **31**(1):1-4

**Borrow P, Martínez-Sobrido L & de la Torre JC**

Inhibition of the type I interferon antiviral response during arenavirus infection

*Viruses* 2010; **2**(11):2443-80

**Bretscher P & Cohn M**

A theory of self-nonsel self discrimination

*Science* 1970; **169**(3950):1042-9

**Brody M, Böhm I & Bauer R**

Mechanism of action of methotrexate: experimental evidence that methotrexate blocks the binding of interleukin 1 beta to the interleukin 1 receptor on target cells

*Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993; **31**(10):667-74

**Brodziak A, Ziółko E, Muc-Wierzgoń M, Nowakowska-Zajdal E, Kokot T & Klakla K**

The role of human endogenous retroviruses in the pathogenesis of autoimmune diseases  
*Med Sci Monit* 2012; **18**(6):RA80-8

**Bründler MA, Aichele P, Bachmann M, Kitamura D, Rajewsky K & Zinkernagel RM**

Immunity to viruses in B cell deficient mice: influence of antibodies on virus persistence and on T cell memory  
*Eur J Immunol* 1996; **26**(9):2257-2262

**Burster T**

Processing and regulation mechanisms within antigen presenting cells: a possibility for therapeutic modulation  
*Curr Pharm Des* 2013; **19**(6):1029-42

**Campbell KS & Hasegawa J**

Natural killer cell biology: An update and future directions  
*J Allergy Clin Immunol* 2013; **132**(3):536-44

**Cantrell DA**

T-cell antigen receptor signal transduction  
*Immunology* 2002; **105**(4):369-74

**Carlsen HS, Haraldsen G, Brandtzaeg P & Baekkevold ES**

Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules  
*Blood* 2005; **106**(2):444-6

**Carneiro FA, Stauffer F, Lima CS, Juliano MA, Juliano L & Da Poian AT**

Membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus depends on histidine protonation  
*J Biol Chem* 2003; **278**(16):13789-94

**Carpenter AC & Bosselut R**

Decision checkpoints in the thymus  
*Nat Immunol* 2010; **11**(8):666-73

**Cavallo MG, Fava D, Monetini L, Barone F & Pozzilli P**

Cell-mediated immune response to beta casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implications for disease pathogenesis  
*Lancet* 1996; **348**(9032):926-8

**Cervantes-Barragan L, Kalinke U, Züst R, König M, Reizis B, López-Macías C, Thiel V & Ludewig B**

Type I IFN-mediated protection of macrophages and dendritic cells secures control of murine coronavirus infection  
*J Immunol* 2009; **182**(2):1099-106

**Cesta MF**

Normal structure, function, and histology of the spleen  
*Toxicol Pathol* 2006; **34**(5):455-65

**Charan S & Zinkernagel RM**

Antibody mediated suppression of secondary IgM response in nude mice against vesicular stomatitis virus

*J Immunol* 1986; **136**(8):3057-61

**Chen G, Fan Z, Wang X, Ma C, Bower KA, Shi X, Ke ZJ & Luo J**

Brain-derived neurotrophic factor suppresses tunicamycin-induced upregulation of CHOP in neurons

*J Neurosci Res* 2007; **85**(8):1674-84

**Christen S, Coppieters K, Rose K, Holdener M, Bayer M, Pfeilschifter JM, Hintermann E, von Herrath MG, Aurrand-Lions M, Imhof BA & Christen U**

Blockade but not overexpression of the junctional adhesion molecule C influences virus-induced type 1 diabetes in mice

*PLoS One* 2013; **8**(1):e54675

**Christen U, Hintermann E, Holdener M & von Herrath MG**

Viral triggers for autoimmunity: is the 'glass of molecular mimicry' half full or half empty?

*J Autoimmun* 2010; **34**(1):38-44

**Christensen T**

Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses

*Rev Med Virol* 2005; **15**(3):179-211

**Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW Jr & Cyster JG**

Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport

*Nat Immunol* 2008; **9**(1):54-62

**Colonna M, Trinchieri G & Liu YJ**

Plasmacytoid dendritic cells in immunity

*Nat Immunol* 2004; **5**(12):1219-26

**Cong XL, Lo MC, Reuter BA, Yan M, Fan JB & Zhang DE**

Usp18 promotes conventional CD11b<sup>+</sup> dendritic cell development

*J Immunol* 2012; **188**(10):4776-8

**Coppieters KT & von Herrath MG**

Viruses and cytotoxic T lymphocytes in type 1 diabetes

*Clinic Rev Allergy Immunol* 2011; **41**(2):169-78

**Coppieters KT, Wiberg A & von Herrath MG**

Viral infections and molecular mimicry in type 1 diabetes

*APMIS* 2012; **120**(12):941-9

**Cornish TE, Stallknecht DE, Brown CC, Seal BS & Howerth EW**

Pathogenesis of experimental vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) infection in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*)

*Vet Pathol* 2001; **38**(4):396-406

**Cornu TI & de la Torre JC**

RING finger Z protein of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) inhibits transcription and RNA replication of an LCMV S-segment minigenome  
*J Virol* 2001; **75**(19):9415-26

**Culina S, Brezar V & Mallone R**

Insulin and type 1 diabetes: immune connections  
*Eur J Endocrinol* 2013; **168**(2):R19-31

**de Weerd NA, Samarajiwa SA & Hertzog PJ**

Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions  
*J Biol Chem* 2007; **282**(28):20053-7

**Den Haan JM & Kraal G**

Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen  
*J Innate Immun* 2012; **4**(5-6):437-45

**Derbinski J, Gäbler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenroth M, Peltonen L, Walter J & Kyewski B**

Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels  
*J Exp Med* 2005; **202**(1):33-45

**Der SD, Zhou A, Williams BR & Silverman RH**

Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**(26):15623-8

**Di Domizio J, Blum A, Gallagher-Gambarelli M, Molens JP, Chaperot L & Plumas J**

TLR 7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN  
*Blood* 2009; **114**(9):1794-802

**El Shikh ME & Pitzalis C**

Follicular dendritic cells in health and disease  
*Front Immunol* 2012; **3**:292

**Emonet SE, Urata S & de la Torre JC**

Arenavirus reverse genetics: new approaches for the investigation of arenavirus biology and development of antiviral strategies  
*Virology* 2011; **411**(2):416-25

**Eschli B, Zellweger RM, Wepf A, Lang KS, Quirin K, Weber J, Zinkernagel RM & Hengartner H**

Early antibodies specific for the neutralizing epitope on the receptor binding subunit of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein fail to neutralize the virus  
*J Virol* 2007; **81**(21):11650-7

**Fairweather D & Rose NR**

Type 1 diabetes: virus infection or autoimmune disease?  
*Nat Immunol* 2002; **3**(4):338-40

**Federer KE, Burrows R & Brooksby JB**

Vesicular stomatitis virus—the relationship between some strains of the Indiana serotype  
*Res Vet Sci* 1967; **8**(1):103-17

**Fehr T, Bachmann MF, Bluethmann H, Kikutani H, Hengartner H & Zinkernagel RM**

T-independent activation of B cells by vesicular stomatitis virus: no evidence for the need of a second signal  
*Cell Immunol* 1996; **168**(2):184-92

**Fink K, Lang KS, Manjarrez-Orduno N, Junt T, Senn BM, Holdener M, Akira S, Zinkernagel RM & Hengartner H**

Early type I interferon-mediated signals on B cells specifically enhance antiviral humoral responses  
*Eur J Immunol* 2006; **36**(8):2094-105

**Fischer SA, Graham MB, Kuehnert MJ, Kotton CN, Srinivasan A, Marty FM, Comer JA, Guarner J, Paddock CD, DeMeo DL, Shieh WJ, Erickson BR, Bandy U, DeMaria A Jr, Davis JP, Delmonico FL, Pavlin B, Likos A, Vincent MJ, Sealy TK, Goldsmith CS, Jernigan DB, Rollin PE, Packard MM, Patel M, Rowland C, Helfand RF, Nichol ST, Fishman JA, Ksiazek T, Zaki SR & LCMV in Transplant Recipients Investigation Team**

Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation  
*N Engl J Med* 2006; **354**(21):2235-49

**Förster R, Davalos-Misslitz AC & Rot A**

CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance  
*Nat Rev Immunol* 2008; **8**(5):362-71

**Foxman EF & Iwasaki A**

Genome-virome interactions: examining the role of common viral infections in complex disease  
*Nat Rev Microbiol* 2011; **9**(4):254-264

**Francois-Newton V, Livingstone M, Payelle-Brogard B, Uzé G & Pellegrini S**

USP18 establishes the transcriptional and anti-proliferative interferon  $\alpha/\beta$  differential  
*Biochem J* 2012; **446**(3):509-16

**Freer G, Burkhardt C, Rülcke T, Ghelardi E, Rohrer UH, Pircher H, Zinkernagel RM & Hengartner H**

Role of T helper cell precursor frequency on vesicular stomatitis virus neutralizing antibody responses in a T cell receptor beta chain transgenic mouse  
*Eur J Immunol* 1995; **25**(5):1410-6

**Freigang S, Probst HC & van den Broek M**

DC infection promotes antiviral CTL priming: the 'Winkelried' strategy  
*Trends Immunol* 2005; **26**(1):13-18

**Friedman RM**

Clinical uses of interferons  
*Br J Clin Pharmacol* 2008; **65**(2):158-62

**Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ & Koyasu S**

IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge  
*Trends Immunol* 2001; **22**(10):556-60

**Gad HH, Dellgren C, Hamming OJ, Vends S, Paludan SR & Hartmann R**

Interferon-lambda is functionally an interferon but structurally related to the interleukin-10 family  
*J Biol Chem* 2009; **284**(31):20869-75

**Gehrie E, Van der Touw W, Bromberg JS & Ochando JC**

Plasmacytoid dendritic cells in tolerance  
*Methods Mol Biol* 2011; **677**:127-47

**George TC, Bilsborough J, Viney JL & Norment AM**

High antigen dose and activated dendritic cells enable Th cells to escape regulatory T cell-mediated suppression in vitro  
*Eur J Immunol* 2003; **33**(2):502-11

**Géssner A & Lothar H**

Homologous interference of lymphocytic choriomeningitis virus involves a ribavirin-susceptible block in virus replication  
*J Virol* 1989; **63**(4):1827-32

**Ghazarian L, Diana J, Simoni Y, Beaudoin L & Lehuen A**

Prevention or acceleration of type 1 diabetes by viruses  
*Cell Mol Life Sci* 2013; **70**(2):239-55

**Gilliet M, Cao W & Liu YJ**

Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases  
*Nat Rev Immunol* 2008; **8**(8):594-606

**Goddard-Borger ED & Withers SG**

Natural product biosynthesis: Tackling tunicamycin  
*Nat Chem* 2012; **4**(7):520-1

**González-Navajas JM, Lee J, David M & Raz E**

Immunomodulatory functions of type I interferons  
*Nat Rev Immunol* 2012; **12**(2):125-35

**González-Vélez V, Dupont G, Gil A, González A & Quesada I**

Model for glucagon secretion by pancreatic  $\alpha$ -cells  
*PLoS One* 2012; **7**(3):e32282

**Gordon S**

Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response  
*Cell* 2002; **111**(7):927-30

**Gotoh T, Terada K, Ovodomari S & Mori M**

Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and Chop-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria  
*Cell Death Differ* 2004;**11**(4):390-402

**Gowthaman U & Eswarakumar VP**

Molecular mimicry: Good artists copy, great artists steal  
*Virulence* 2013; **4**(6):433-4

**Gray EE & Cyster JG**

Lymph node macrophages  
*J Innate Immun* 2012; **4**(5-6):424-36

**Green TJ, Zhang X, Wertz GW & Luo M**

Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA Complex  
*Science* 2006; **313**(5785):357-60

**Gretz JE, Anderson AO & Shaw S**

Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex  
*Immunol Rev* 1997; **156**:11-24

**Grieco FA, Vendrame F, Spagnuolo I & Dotta F**

Innate immunity and the pathogenesis of type 1 diabetes  
*Semin Immunopathol* 2011; **33**(1):57-66

**Gründemann C, Thell K, Lengen K, Garcia-Käufer M, Huang YH, Huber R, Craik DJ, Schabbauer G & Gruber CW**

Cyclotides suppress human T-Lymphocyte proliferation by an Interleukin 2-dependent mechanism  
*PLoS One* 2013; **8**(6):e68016

**Han C, Jin L, Mei Y & Wu M**

Endoplasmic reticulum stress inhibits cell cycle progression via induction of p27 in melanoma cells  
*Cell Signal* 2013; **25**(1):144-9

**Hangartner L, Senn BM, Ledermann B, Kalinke U, Seiler P, Bucher E, Zellweger RM, Fink K, Odermatt B, Bürki K, Zinkernagel RM & Hengartner H**

Antiviral immune responses in gene-targeted mice expressing the immunoglobulin heavy chain of virus-neutralizing antibodies  
*Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**(22):12883-8

**Hannachi N, Freymuth F, Luton D, Herlicoviez M, Oury JF, Boukadida J & Lebon P**

Lymphocytic choriomeningitis virus and fetal anomalies  
*Pathol Biol (Paris)* 2011; **59**(4):e85-7

**Hashimoto D, Miller J & Merad M**

Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo  
*Immunity* 2011; **35**(3):323-35

**Hassan GA, Sliem HA, Ellethy AT & Salama Mel-S**

Role of immune system modulation in prevention of type 1 diabetes mellitus  
*Indian J Endocrinology Metab* 2012; **16**(6):904-9

**Heath WR & Carbone FR**

Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces  
*Nat Immunol* 2009; **10**(12):1237-44

**Heikema AP, Bergman MP, Richards H, Crocker PR, Gilbert M, Samsom JN, van Wamel WJ, Endtz HP & van Belkum A**

Characterization of the specific interaction between sialoadhesin and sialylated *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides

*Infect Immun* 2010; **78**(7):3237-46

**Heinig M, Petretto E, Wallace C, Bottolo L, Rotival M, Lu H, Li Y, Sarwar R, Langley SR, Bauerfeind A, Hummel O, Lee YA, Paskas S, Rintisch C, Saar K, Cooper J, Buchan R, Gray EE, Cyster JG, Cardiogenics Consortium, Erdmann J, Hengstenberg C, Maouche S, Ouwehand WH, Rice CM, Samani NJ, Schunkert H, Goodall AH, Schulz H, Roeder HG, Vingron M, Blankenberg S, Münzel T, Zeller T, Szymczak S, Ziegler A, Tiret L, Smyth DJ, Pravenec M, Aitman TJ, Cambien F, Clayton D, Todd JA, Hubner N & Cook SA**

A trans-acting locus regulates an anti-viral expression network and type 1 diabetes risk

*Nature* 2010; **467**(7314):460-4

**Henig N, Avidan N, Mandel I, Staun-Ram E, Ginzburg E, Paperna T, Pinter RY & Miller A**

Interferon-beta induces distinct gene expression response patterns in human monocytes versus T cells

*PLoS One* 2013; **8**(4):e62366

**Henrickson SE, Mempel TR, Mazo IB, Liu B, Artyomov MN, Zheng H, Peixoto A, Flynn MP, Senman B, Junt T, Wong HC, Chakraborty AK & von Andrian UH**

T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation

*Nat Immunol* 2008; **9**(3):282-291

**Hervas-Stubbs S, Perez-Grazia JL, Rouzaut A, Sanmamed MF, Le Bon A & Melero I**

Direct effects of type I interferons on cells of the immune system

*Clin Cancer Res* 2011; **17**(9):2619-27

**Hickman HD, Takeda K, Skon CN, Murray FR, Hensley SE, Loomis J, Barber GN, Bennink JR & Yewdell JW**

Direct priming of antiviral CD8<sup>+</sup> T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes

*Nat Immunol* 2008; **9**(2):155-165

**Hivroz C, Clemin K, Tourret M & Bohineust A**

Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells

*Crit Rev Immunol* 2012; **32**(2):139-55

**Hof H & Dörries R**

Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie

4. vollständig und überarbeitete und erweiterte Auflage 2009

Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart

**Hogquist KA, Baldwin TA & Jameson SC**

Central tolerance: learning self-control in the thymus

*Nat Rev Immunol* 2005; **5**(10):772-82

**Holler PD & Kranz DM**

Quantitative analysis of the contribution of TCR/pepMHC affinity and CD8 to T cell activation

*Immunity* 2003; **18**(2):255-264

**Honke N, Shaabani N, Cadeddu G, Sorg UR, Zhang DE, Trilling M, Klingel K, Sauter M, Kandolf R, Gailus N, van Rooijen N, Burkart C, Baldus SE, Grusdat M, Löhninh M, Hengel H, Pfeffer K, Tanaka M, Häussinger D, Recher M, Lang PA & Lang KS**

Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus.

*Nat Immunol* 2012; **13**(1):51-7

**Honke N, Shaabani N, Zhang DE, Xu HC, Häussinger D, Recher M, Löhning M, Lang PA, Lang KS**

*Usp18* driven enforced viral replication in dendritic cells contributes to break of immunological tolerance in autoimmune diabetes.

*PLoS Pathog* 2013; **9**(10):e1003650

**Horwitz MS, Ilic A, Fine C, Rodriguez E & Sarvetnick N**

Presented antigen from damaged pancreatic beta cells activates autoreactive T cells in virus-mediated autoimmune diabetes

*J Clin Invest* 2002; **109**:79-87

**Howerth EW, Stallknecht DE, Dorminy M, Pisell T & Clarke GR**

Experimental vesicular stomatitis in swine: effects of route of inoculation and steroid treatment

*J Vet Diagn Invest* 1997; **9**(2):136-42

**Howerth EW, Mead DG, Mueller PO, Duncan L, Murphy MD & Stallknecht DE**

Experimental vesicular stomatitis virus infection in horses: effect of route of inoculation and virus serotype

*Vet Pathol* 2006; **43**(6):943-55

**Hsu KM, Pratt JR, Akers WJ, Achilefu SI & Yokoyama WM**

Murine cytomegalovirus displays selective infection of cells within hours after systemic administration

*J Gen Virol* 2009; **90**(Pt 1):33-43

**Hunziker L, Recher M, Macpherson AJ, Ciurea A, Freigang S, Hengartner H & Zinkernagel RM**

Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections

*Nature Immunol* 2003; **4**(4):343-49

**Hyöty H & Taylor KW**

The role of viruses in human diabetes

*Diabetologia* 2002; **45**(10):1353-61

**Iannaccone M, Moseman EA, Tonti E, Bosurgi L, Junt T, Henrickson SE, Whelan SO, Guidotti LG & von Andrian UH**

Subcapsular sinus macrophages prevent CNS invasion on peripheral infection with a neurotropic virus

*Nature* 2010; **465**(7301):1079-83

**Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Yoshikawa T, Nagata N, Sato Y, Sata T, Yoneyama M, Fujita T, Taya C, Yonekawa H & Koike S**

The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus

*J Virol* 2005; **79**(7):4460-9

**Iezzi G, Karjalainen K & Lanzavecchia A**

The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells  
*Immunity* 1998; **8**(1):89-95

**Irie T, Liu Y, Drolet BS, Carnero E, García-Sastre A & Harty RN**

Cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus is regulated by the PSAP motif of M protein in a species-dependent manner  
*Viruses* 2012; **4**(9):1605-18

**Irikura VM, Hirsch E & Hirsh D**

Effects of interleukin-1 receptor antagonist overexpression on infection by *Listeria monocytogenes*  
*Infect Immun* 1999; **67**(4):1901-9

**Irvine DJ, Purbhoo MA, Krogsaard M & Davis MM**

Direct observation of ligand recognition by T cells  
*Nature* 2002; **419**(6909):845-9

**Isaacs A & Lindenmann J**

Virus interference I. The interferon  
*Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957; **147**(927):258-67

**Jaeckel E, Manns M & von Herrath M**

Viruses and diabetes  
*Ann N Y Acad Sci* 2002; **958**:7-25

**Jamieson DJ, Kourtis AP, Bell M & Rasmussen SA**

Lymphocytic choriomeningitis virus: an emerging obstetric pathogen?  
*Am J Obstet Gynecol* 2006; **194**(6):1532-6

**Jeon YJ, Yoo HM & Chung CH**

ISG15 and immune diseases  
*Biochim Biophys Acta* 2010; **1802**(5):485-96

**Judkowski VA, Allicotti, GM, Sarvetnick N & Pinilla C**

Peptides from common viral and bacterial pathogens can efficiently activate diabetogenic T-cells  
*Diabetes* 2004; **53**(9):2301-9

**Jun HS & Yoon JW**

A new look at viruses in type 1 diabetes  
*Diabetes Metab Res Rev* 2003; **19**(1):8-31

**Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR & Lang RA**

In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens  
*Immunity* 2002; **17**(2):211-20

**Junt T, Tumanov AV, Harris N, Heikenwalder M, Zeller N, Kuprash DV, Aguzzi A, Ludewig B, Nedospasov SA & Zinkernagel RM**

Expression of lymphotoxin beta governs immunity at two distinct levels  
*Eur J Immunol* 2006; **36**(8):2061-75

**Junt T, Moseman EA, Iannacone M, Massberg S, Lang PA, Boes M, Fink K, Henrickson SE, Shayakhmetov DM, Di Paolo NC, van Rooijen N, Mempel TR, Whelan SP & von Andrian UH**  
Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells

*Nature* 2007; **450**(7166):110-4

**Junt T, Scandella E & Ludewig B**

Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence

*Nat Rev Immunol* 2008; **8**(10):764-75

**Kang D, Jiang H, Wu Q, Pestka S & Fisher PB**

Cloning and characterization of human ubiquitin-processing protease-43 from terminally differentiated human melanoma cells using a rapid subtraction hybridization protocol RaSH

*Gene* 2001; **267**(2):233-42

**Kang, HK, Liu M & Datta SK**

Low-dose peptide tolerance therapy of lupus generates plasmacytoid dendritic cells that cause expansion of autoantigen-specific regulatory T cells and contraction of inflammatory Th17 cells

*J Immunol* 2007; **178**(12):7849-58

**Karjalainen J, Martin JM, Knip M, Ilonen J, Robinson BH, Savilahti, Akerblom HK & Dosch HM**

A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus

*N Engl J Med* 1992; **327**(5):302-7

**Kim KI & Zhang DE**

ISG15, not just another ubiquitin-like protein

*Biochem Biophys Res Commun* 2003; **307**(3):431-4

**Kim KI, Giannakopoulos NV, Virgin HW & Zhang DE**

Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation

*Mol Cell Biol* 2004; **24**(21):9592-600

**Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G & Kandolf R**

Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of viral replication, tissue damage, and inflammation

*Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**(1):314-8

**Knutson M & Wessling-Resnick M**

Iron metabolism in the reticuloendothelial system

*Crit Rev Biochem Mol Biol* 2003; **38**(1):61-88

**Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J & Murali-Krishna K**

Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection

*J Exp Med* 2005; **202**(5):637-50

**Kont V, Laan M, Kisand K, Merits A, Scott HS & Peterson P**

Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens

*Mol Immunol* 2008; **45**(1):25-33

**Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H & Donnelly RP**

IFN- $\lambda$ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex  
*Nat Immunol* 2003; **4**(1):69-77

**Kovarik J**

From immunosuppression to immunomodulation: current principles and future strategies  
*Pathobiology* 2013; **80**(6):275-81

**Kraal G, Ter Hart H, Meelhuizen C, Venneker G & Claassen E**

Marginal zone macrophages and their role in the immune response against T-independent type 2 antigens: modulation of the cells with specific antibody  
*Eur J Immunol* 1989; **19**(4):675-80

**Kraal G**

Cells in the marginal zone of the spleen  
*Int Rev Cytol* 1992; **132**:31-74

**Kraal G & Mebius R**

New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen  
*Int Rev Cytol* 2006; **250**:175-215

**Kurts C, Kosaka H, Carbone FR, Miller JF & Heath WR**

Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells  
*J Exp Med* 1997; **186**(2):239-45

**Kurts C, Cannarile M, Klebba I & Brocker T**

Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells *in vivo*  
*J Immunol* 2001; **166**(3):1439-42

**Kurts C, Robinson BW & Knolle PA**

Cross-priming in health and disease  
*Nat Rev Immunol* 2010; **10**(6):403-14

**Kurts C**

Molecular and cell-biological mechanisms of antigen cross-presentation  
*Front Immunol* 2013; **4**:51

**Kyewski B & Klein L**

A central role for central tolerance  
*Annu Rev Immunol* 2006; **24**:571-606

**Lam GY, Czuczman MA, Higgins DE & Brumell JH**

Interactions of *Listeria monocytogenes* with the autophagy system of host cells  
*Adv Immunol* 2012; **113**:7-18

**Lammi N, Karvonen M & Tuomilehto J**

Do microbes have a causal role in type 1 diabetes?  
*Med Sci Monit* 2005; **11**(3):RA63-9

**Lande R & Gilliet M**

Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses  
*Ann N Y Acad Sci* 2010; **1183**:89-103

**Lang KS, Recher M, Junt T, Navarini AA, Harris NL, Freigang S, Odermatt B, Conrad C, Ittner LM, Bauer S, Luther SA, Uematsu S, Akira S, Hengartner H & Zinkernagel RM**

Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease  
*Nat Med* 2005; **11**(2):138-145

**Lang KS, Recher M, Navarini AA, Harris NL, Löhning M, Junt T, Probst HC, Hengartner H & Zinkernagel RM**

Inverse correlation between IL-7 receptor expression and CD8 T cell exhaustion during persistent antigen stimulation  
*Eur J Immunol* 2005; **35**(3):738-45

**Lang KS, Georgiev P, Recher M, Navarini AA, Bergthaler A, Heikenwalder M, Harris NL, Junt T, Odermatt B, Clavien PA, Pircher H, Akira S, Hengartner H & Zinkernagel RM**

Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling  
*J Clin Invest* 2006; **116**(9):2456-63

**Lang PA, Contaldo C, Georgiev P, El-Badry AM, Recher M, Kurrer M, Cervantes-Barragan L, Ludewig B, Calzascia T, Bolinger B, Merkler D, Odermatt B, Bader M, Graf R, Clavien PA, Hegazy AN, Löhning M, Harris NL, Ohashi PS, Hengartner H, Zinkernagel RM & Lang KS**

Aggravation of viral hepatitis by platelet-derived serotonin  
*Nat Med* 2008; **14**(7):756-61

**Lang PA, Cervantes-Barragan L, Verschoor A, Navarini AA, Recher M, Pellegrini M, Flatz L, Bergthaler A, Honda K, Ludewig B, Ohashi PS & Lang KS**

Hematopoietic cell-derived interferon controls viral replication and virus-induced disease  
*Blood* 2009; **113**(5):1045-52

**Lang PA, Recher M, Honke N, Scheu S, Borkens S, Gailus N, Krings C, Meryk A, Kulawik A, Cervantes-Barragan L, Van Rooijen N, Kalinke U, Ludewig B, Hengartner H, Harris N, Häussinger D, Ohashi PS, Zinkernagel RM & Lang KS**

Tissue macrophages suppress viral replication and prevent severe immunopathology in an interferon- $\lambda$ -dependent manner in mice  
*Hepatology* 2010; **52**(1):25-32

**Lang PA, Merkler D, Funkner P, Shaabani N, Meryk A, Krings C, Barthuber C, Recher M, Brueck W, Haeussinger D, Ohashi PS & Lang KS**

Oxidized ATP inhibits T-cell-mediated autoimmunity  
*Eur J Immunol* 2010; **40**(9):2401-8

**Lanzavecchia A & Sallusto F**

Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination  
*Nat Immunol* 2001; **2**(6):487-92

**Lapošova K, Pastorekova S & Tomašková J**

Lymphocytic choriomeningitis virus: invisible but not innocent  
*Acta Virol* **2013**; **57**(2):160-70

**Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, Borrow P & Tough DF**

Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon  
*Nat Immunol* 2003; **4**(10):1009-15

**Lee KJ, Perez M, Pinschewer DD & de la Torre JC**

Identification of the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) proteins required to rescue LCMV RNA analogs into LVMV-like particles  
*J Virol* 2002; **76**(12):6393-7

**Lehuen A, Diana J, Zaccane P & Cooke A**

Immune cell crosstalk in type 1 diabetes  
*Nat Rev Immunol* 2010; **10**(7):501-13

**Lenschow DJ**

Antiviral Properties of ISG15  
*Viruses* 2010; **2**(10):2154-68

**Lenz O, ter Meulen J, Klenk HD, Seidah NG & Garten W**

The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P  
*Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**(22):12701-5

**Lenzen S**

The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes  
*Diabetologia* 2008; **51**(2):216-26

**Letchworth GJ, Rodriguez LL & Del carrera J**

Vesicular Stomatitis  
*Vet J* 1999, **157**(3):239–60

**Li XL, Blackford JA, Judge CS, Liu M, Xiao W, Kalvakolanu DV & Hassel BA**

RNase-L-dependent destabilization of interferon-induced mRNAs. A role for the 2-5A system in attenuation of the interferon response  
*J Biol Chem* 2000; **275**(12):8880-8

**Li J, Peet GW, Balzarano D, Li X, Massa P, Barton RW & Marcu KB**

Novel NEMO/IkappaB kinase and NF-kappa B target genes at the pre-B to immature B cell transition  
*J Biol Chem* 2001; **276**(21):18579-90

**Liechtenstein T, Dufait I, Bricogne C, Lanna A, Pen J, Breckpot K & Escors D**

PD-L1/PD-1 Co-Stimulation, a Brake for T cell Activation and a T cell Differentiation Signal  
*J Clin Cell Immunol* 2012; S12

**Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, Hinz B, Cyster JG & Luther SA**

Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells  
*Nat Immunol* 2007; **8**(11):1255-65

**Lipscomb MF & Masten BJ**

Dendritic cells: immune regulators in health and disease.  
*Physiol Rev* 2002; **82**(1):97-130

**Lis J, Jarzab A & Witkowska D**

Molecular mimicry in the etiology of autoimmune diseases  
*Postepy Hig Med Dosw* 2012; **66**:475-91

**Liu IK & Zee YC**

The pathogenesis of vesicular stomatitis virus, serotype Indiana, in *Aedes aegypti* mosquitoes  
 I. Intrathoracic injection  
*Am J Trop Med Hyg* 1976; **25**(1):177-85

**Loma I & Heyman R**

Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment  
*Curr Neuropharmacol.* 2011; **9**(3):409-16

**Longhi MP, Trumpfheller C, Idoyaga J, Caskey M, Matos I, Kluger C, Salazar AM, Colonna M & Steinman RM**

Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant  
*J Exp Med* 2009; **206**(7):1589-1602

**Lopez BG, Tsai MS, Baratta JL, Longmuir KJ & Robertson RT**

Characterization of Kupffer cells in livers of developing mice  
*Comp Hepatol* 2011; **10**(1):2

**Luo M**

The nucleocapsid of vesicular stomatitis virus  
*Sci China Life Sci* 2012; **55**(4):291-300

**Lutz MB**

Differentiation stages and subsets of tolerogenic dendritic cells  
 In *Handbook of Dendritic Cells  
 Biology, Diseases and Therapy* 2006  
 Lutz MB, Romani N & Steinkasserer A, eds. VCH-Wiley, Weinheim. p517-43

**Lyles DS & Rupprecht CE**

Rhabdoviridae, p.1363-1408  
 In D.M. Kribe & P.M. Howley (ed.)  
*Fields Virology*, 5<sup>th</sup> ed. vol. 1 Lippincott Williams & Williams, Philadelphia, 2007

**MacNeil A, Ströher U, Farnon E, Campbell S, Cannon D, Paddock CD, Drew CP, Kuehnert M, Knust B, Gruenenfelder R, Zaki SR, Rollin PE, Nichol ST & LCMV Transplant Investigation Team**

Solid organ transplant-associated lymphocytic choriomeningitis. United States, 2011  
*Emerg Infect Dis* 2012; **18**(8):1256-62

**Malakhov MP, Malakhova OA, Kim KI, Ritchie KJ & Zhang DE**

UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins  
*J Biol Chem* 2002; **277**(12):9976-81

**Malakhova O, Malakhov M, Hetherington C & Zhang DE**

Lipopolysaccharide activates the expression of ISG15-specific protease UB43 via interferon regulatory factor 3  
*J Biol Chem* 2002; **277**(17):14703-11

- Malakhova OA, Kim KI, Luo JK, Zou W, Kumar KG, Fuchs SY, Shuai K & Zhang DE**  
UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity  
*EMBO J* 2006; **25**(11):2358-67
- Malmgaard L**  
Induction and regulation of IFNs during viral infections  
*J Interferon Cytokine Res* 2004; **24**(8):439-54
- Manning WC, Stoddart CA, Lagenaur LA, Abenes GB & Mocarski ES**  
Cytomegalovirus determinant of replication in salivary glands  
*J Virol* 1992; **66**(6):3794-802
- Mantegazza AR, Magalhaes JG, Amigorena S & Marks MS**  
Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II  
*Traffic* 2013; **14**(2):135-52
- Martinez JA, Torres-Negrón I, Amigó LA, Roldán RA, Mendéz A & Banerjee DK**  
Tunicamycin inhibits capillary endothelial cell proliferation by inducing apoptosis. Targeting dolichol-pathway for generation of new anti-angiogenic therapeutics  
*Adv Exp Med Biol* 2000; **476**:197-208
- Martinez I, Rodriguez LL, Jimenez C, Pauszek SJ & Wertz GW**  
Vesicular stomatitis virus glycoprotein is a determinant of pathogenesis in swine, a natural host  
*J Virol* 2003; **77**(14):8039-47
- Martinez IG & Wertz GW**  
Biological differences between vesicular stomatitis virus Indiana and New Jersey serotype glycoproteins: identification of amino acid residues modulating pH-dependent infectivity  
*J Virol* 2005; **79**(6):3578-85
- Martínez-Sobrido L, Zúñiga EI, Rosario D, García-Sastre A & de la Torre JC**  
Inhibition of the type I interferon response by the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus  
*J Virol* 2006; **80**(18):9192-9
- Marx A, Hartmann M, Zettl A, Müller-Hermelink HK & Rüdiger T**  
Functional splenic pathology and differential diagnosis in splenectomy  
*Pathologe* 2008; **29**(2):109-14
- Masala S, Paccagnini D, Cossu D, Brezar V, Pacifico A, Ahmed N, Mallone R & Sechi LA**  
Antibodies recognizing *Mycobacterium avium* paratuberculosis epitopes cross-react with the beta-cell antigen ZnT8 in Sardinian type 1 diabetic patients  
*PLoS One* 2011; **6**(10):e26931
- Matter MS, Hilmenyuk T, Claus C, Marone R, Schürch C, Tinguely M, Terracciano L, Luther SA & Ochsenein AF**  
Destruction of lymphoid organ architecture and hepatitis caused by CD4+ T cells  
*PLoS One* 2011; **6**(9):e24772
- Mead DG, Mare CJ & Cupp EW**  
Vector competence of select black fly species for vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype)  
*Am J Trop Med Hyg* 1997; **57**(1):42-8

**Mead DG, Maré CJ & Ramberg FB**

Bite transmission of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) to laboratory mice by *Simulium vittatum* (Diptera:Simuliidae)  
*J Med Entomol* 1999; **36**(4):410-3

**Mead DG, Gray EW, Noblet R, Murphy MD, Howerth EW & Stallknecht DE**

Biological transmission of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) by *Simulium vittatum* (Diptera:Simuliidae) to domestic swine (*Sus scrofa*)  
*J Med Entomol* 2004; **41**(1):78-82

**Mebius RE, Nolte MA & Kraal G**

Development and function of the splenic marginal zone  
*Crit Rev Immunol* 2004; **24**(6):449-64

**Mebius RE & Kraal G**

Structure and function of the spleen  
*Nat Rev Immunol* 2005; **5**(8):606-16

**Meritet JF, Krivine A, Lewin F, Poissonnier MH, Poizat R, Loget P, Rozenberg F & Lebon P**

A case of congenital lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection revealed by hydrops fetalis  
*Prenat Diagn* 2009; **29**(6):626-7

**Meyer O**

Interferons and autoimmune disorders  
*Joint Bone Spine* 2009; **76**(5):464-73

**Millar DG, Garza KM, Odermatt B, Elford AR, Ono N, Li Z & Ohashi PS**

Hsp70 promotes antigen-presenting Cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo  
*Nat Med* 2003; **9**(12):1469-76

**Miyake Y, Asano K, Kaise H, uemura M, Nakayama M & Tanaka M**

Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens  
*J Clin Invest* 2007; **117**(8):2268-78

**Miyawaki S, Nakamura Y, Suzuka H, Koba M, Yasumizu R, Ikehara S & Shibata Y**

A new mutation, aly, that induces a generalized lack of lymph nodes accompanied by immunodeficiency in mice  
*Eur J Immunol* 1994; **24**(2):429-34

**Modrow S, Falke D, Truyen U & Schätzl H**

Molekulare Virologie  
3.Auflage 2010  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

**Morales DJ & Lenschow DJ**

The antiviral activities of ISG15  
*J Mol Biol* 2013; **425**(24):4995-5008

**Moser M & Murphy KM**

Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development  
*Nat Immunol* 2000; **1**(3):199-205

**Moskophidis D, Lechner F, Pircher H & Zinkernagel RM**

Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells  
*Nature* 1993; **362**(6422):758-61

**Movita D, Kreefft K, Biesta P, van Oudenaren A, Leenen PJ, Janssen HL & Boonstra A**

Kupffer cells express a unique combination of phenotypic and functional characteristics compared with splenic and peritoneal macrophages  
*J Leukoc Biol* 2012; **92**(4):723-33

**Müller S, Hunziker L,ENZLER S, Bühler-Jungo M, Di Santo JP, Zinkernagel RM & Mueller C**

Role of an intact splenic microarchitecture in early lymphocytic choriomeningitis virus production  
*J Virol* 2002; **76**(5):2375-83

**Müller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Paclovic J, Zinkernagel RM & Aguet M**

Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense  
*Science* 1994; **264**(5167):1918-21

**Murphy K, Travers P & Walport M**

Janeway Immunologie  
 7. Auflage 2009  
 Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

**Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M & Todd JA**

Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes  
*Science* 2009; **324**(5925):387-9

**Neumann J**

Immunbiologie: Eine Einführung  
 Springer-Verlag Heidelberg 2008

**Ng D & Gommerman JL**

The regulation of immune responses by DC derived type I IFN  
*Front in Immunol* 2013; **4**(94)

**Noda I, Fujieda S, Seki M, Tanaka N, Sunaga H, Ohtsubo T, Tsuzuki H, Fan GK & Saito H**

Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin enhances sensitivity to cisplatin in human head-and-neck carcinoma cells  
*Int J Cancer* 1999; **80**(2):279-84

**Nolte MA, Hamann A, Kraal G & Mebius RE**

The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors  
*Immunology* 2002; **106**(3):299-307

**Nolte MA, Arens R, Kraus M, van Oers MH, Kraal G, van Lier RA & Mebius RE**

B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone  
*J Immunol* 2004; **172**(6):3620-7

**Nonacs R, Humborg C, Tam JP & Steinman RM**

Mechanisms of mouse spleen dendritic cell function in the generation of influenza-specific, cytolytic T lymphocytes

*J Exp Med* 1992; **176**(2):519-29

**Oehen S, Ohashi PS, Aichele P, Bürki K, Hengartner H & Zinkernagel RM**

Vaccination or tolerance to prevent diabetes

*Eur J Immunol* 1992; **22**(12):3149-53

**Oetke C, Vinson MC, Jones C & Crocker PR**

Sialoadhesin-deficient mice exhibit subtle changes in B- and T-cell populations and reduced Immunoglobulin M levels

*Mol Cell Biol* 2006; **26**(4):1549-57

**Oetke C, Kraal G & Crocker PR**

The antigen recognized by MOMA-I is sialoadhesin

*Immunol Lett* 2006; **106**(1):96-8

**Ogino T**

In vitro capping and transcription of rhabdoviruses

*Methods* 2013; **59**(2):188-98

**Ogra PL, Karzon DT, Righthand F & MacGillivray M**

Immunoglobulin response in serum and secretions after immunization with live and inactivated poliovaccine and natural infection

*N Engl J Med* 1968; **279**(17):893-900

**Ogra PL, Kerr-Grant D, Umana G, Dzierba J & Weintraub D**

Antibody response in serum and nasopharynx after naturally acquired and vaccine-induced infection with rubella virus

*N Engl J Med* 1971; **285**(24):1333-9

**Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, Malissen B, Zinkernagel RM & Hengartner H**

Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice

*Cell* 1991; **65**(2):305-17

**Ohashi PS, Oehen S, Aichele P, Pircher H, Odermatt B, Herrera P, Higuchi Y, Buerki K, Hengartner H & Zinkernagel RM**

Induction of diabetes is influenced by the infectious virus and local expression of MHC class I and tumor necrosis factor-alpha

*J Immunol* 1993; **150**(11):5185-94

**Ohteki T, Parson M, Zakarian A, Jones RG, Nguyen LT, Woodgett JR & Ohashi PS**

Negative regulation of T cell proliferation and interleukin 2 production by the serine threonine kinase GSK-3

*J Exp Med* 2000; **192**(1):99-104

**Olden K, Pratt RM & Yamada KM**

Selective cytotoxicity of tunicamycin for transformed cells

*Int J Cancer* 1979; **24**(1):60-6

**Oldstone MB, Nerenberg M, Southern P, Price J & Lewicki H**

Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response  
*Cell* 1991; **65**(2):319-31

**Oldstone MB**

Biology and pathogenesis of lymphocytic choriomeningitis virus infection  
*Curr Top Microbiol Immunol* 2002; **263**:83-117

**Oldstone MB & Campbell KP**

Decoding arenavirus pathogenesis: Essential roles for alpha-dystroglycan-virus interactions and the immune response  
*Virology* 2011; **411**(2):170-9

**Osiak A, Utermöhlen O, Niendorf S, Horak I & Knobeloch KP**

ISG15, an interferon-stimulated ubiquitin-like protein, is not essential for STAT1 signaling and responses against vesicular stomatitis and lymphocytic choriomeningitis virus  
*Mol Cell Biol* 2005; **25**(15):6338-45

**O'Sullivan B & Thomas R**

CD40 and dendritic cell function  
*Crit Rev Immunol* 2003; **23**(1-2):83-107

**Parker JC, Igel HJ, Reynolds RK, Lewis AM Jr & Rowe WP**

Lymphocytic choriomeningitis virus infection in fetal, newborn, and young adult Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*)  
*Infect Immun* 1976; **13**(3):967-81

**Parker DC**

T cell-dependent B cell activation  
*Annu Rev Immunol* 1993; **11**:331-60

**Perez de Leon AA & Tabachnick WJ**

Transmission of vesicular stomatitis New Jersey virus to cattle by the biting midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae)  
*J Med Entomol* 2006; **43**(2):323-9

**Phan TG, Green JA, Gray EE, Xu Y & Cyster JG**

Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation  
*Nat Immunol* 2009; **10**(7):786-93

**Pietro Paolo M, Castaño L, Babu S, Buelow R, Kuo YL, Martin S, Martin A, Powers AC, Prochazka M & Naggert J**

Islet cell autoantigen 69 kD (ICA69). Molecular cloning and characterization of a novel diabetes-associated autoantigen  
*J Clin Invest* 1993; **92**(1):359-71

**Pinschewer DD, Ochsenbein AF, Odermatt B, Brinkmann V, Hengartner H & Zinkernagel RM**

FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory  
*J Immunol* 2000; **164**(11):5761-70

**Pinschewer DD, Perez M & de la Torre JC**

Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication

*J Virol* 2003; **77**(6):3882-7

**Pircher H, Bürki K, Lang R, Hengartner H & Zinkernagel RM**

Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen

*Nature* 1989; **342**(6249):559-61

**Plakhov IV, Arlund EE, Aoki C & Reiss CS**

The earliest events in vesicular stomatitis virus infection of the murine olfactory neuroepithelium and entry of the central nervous system

*Virology* 1995; **209**(1):257-62

**Platanias, L.C.**

Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling

*Nat Rev Immunol* 2005; **5**(5):375-86

**Potu H, Sgorbissa A & Brancolini C**

Identification of USP18 as an important regulator of the susceptibility to IFN- $\alpha$  and drug-induced apoptosis

*Cancer Res* 2010; **70**(2):655-65

**Pozzilli P & Di Mario U**

Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of the adult): definition, characterization, and potential prevention

*Diabetes Care* 2001; **24**(8):1460-7

**Price NPJ & Tsvetanova B**

Biosynthesis of the tunicamycins: a review

*J Antibiot (Tokyo)* 2007; **60**(8):485-91

**Prives J & Bar-Sagi D**

Effect of tunicamycin, an inhibitor of protein glycosylation, on the biological properties of acetylcholine receptor in cultured muscle cells

*J Biol Chem* 1983; **258**(3):1775-80

**Rameh AA, Morin B, Schenk AD, Linag B, Heinrich BS, Brusica V, Walz T & Whelan SP**

Critical phosphoprotein elements that regulate polymerase architecture and function in vesicular stomatitis virus

*Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**(36):14628-33

**Ramondetti F, Sacco S, Comelli M, Bruno G, Falorni A, Iannilli A, d'Annunzio G, Iafusco D, Songini M, Toni S, Cherubini V, Carle F & RIDI Study Group**

Type 1 diabetes and measles, mumps and rubella childhood infections within the Italian Insulin-dependent Diabetes Registry

*Diabet Med* 2012; **29**(6):761-6

**Randall RE & Goodbourn S**

Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures

*J Gen Virol* 2008; **89**(Pt 1):1-47

**Raulet DH & Vance RE**

Self tolerance of natural killer cells  
*Nat Rev Immunol* 2006 Jul; **6**(7):520-31

**Recher M, Lang KS, Navarini A, Hunziker L, Lang PA, Fink K, Freigang S, Georgiev P, Hangartner L, Zellweger R, Bergthaler A, Hegazy AN, Eschli B, Theocharides A, Jeker LT, Merkler D, Odermatt B, Hersberger M, Hangartner H & Zinkernagel RM**

Extralymphatic virus sanctuaries as a consequence of potent T-cell activation  
*Nat Med* 2007; **13**(11):1316-23

**Reis Júnior JL, Mead D, Rodriguez LL & Brown CC**

Transmission and pathogenesis of vesicular stomatitis viruses  
*Braz J Vet Pathol* 2009; **2**(1):49-58

**Ribot JC, Debarros A, Mancio-Silva L, Pamplona A & Silva-Santos B**

B7-CD28 costimulatory signals control the survival and proliferation of murine and human  $\gamma\delta$  T cells via IL-2 production  
*J Immunol* 2012; **189**(3):1202-8

**Ritchie KJ, Hahn CS, Kim KI, Yan M, Rosario D, Li L, de la Torre JC & Zhang DE**

Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection  
*Nat Med* 2004; **10**(12): 1374-8

**Roche S & Gaudin Y**

Evidence that rabies virus forms different kinds of fusion machines with different pH thresholds for fusion  
*J Virol* 2004; **78**(16):8746-52

**Roche S, Albertini AA, Lepault J, Bressanelli S & Gaudin Y**

Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited  
*Cell Mol Life Sci* 2008; **65**(11):1716-28

**Rock KL & Shen L**

Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance  
*Immunol Rev* 2005; **207**:166-83

**Rodríguez LL**

Emergence and re-emergence of vesicular stomatitis in the United States  
*Virus Res* 2002; **85**(2):211-9

**Roep BO, Hiemstra HS, Schloot NC, De Vries RR, Chaudhuri A, Behan PO & Drijfhout JW**

Molecular mimicry in type 1 diabetes: immune cross-reactivity between islet autoantigen and human cytomegalovirus but not Coxsackie virus  
*Ann N Y Acad of Sci* 2002; **958**:163-5

**Rose JK & Whitt MA**

Rhabdoviridae: The viruses and their replication  
 p 1221-44  
*In* Knipe DM, Howley PM (ed).  
*Fields Virology*, Fourth ed. Vol.1. 2001

**Sadler AJ & Williams BR**

Interferon-inducible antiviral effectors  
*Nat Rev Immunol* 2008; **8**(7):559-68

**Santana-de Anda K, Gómez-Martín D, Soto-Solís R & Alcocer-Varela J**

Plasmacytoid dendritic cells: Key players in viral infections and autoimmune diseases  
*Semin Arthritis Rheum* 2013; pii:S0049-0172(13)00005-X

**Santin I, Moore F, Grieco FA, Marchetti P, Brancolini C & Eizirik DL**

USP18 is a key regulator of the interferon-driven gene network modulating pancreatic beta cell inflammation and apoptosis  
*Cell Death Dis* 2012; **3**:e419

**Sarasin-Filipowicz M, Wang X, Yan M, Duong FH, Poli V, Hilton DJ, Zhang DE & Heim MH**

Alpha interferon induces long-lasting refractoriness of JAK-STAT signaling in the mouse liver through induction of USP18/UBP43  
*Mol Cell Biol* 2009; (17):4841-51

**Satpathy AT, Wu X, Albring JC & Murphy KM**

Re(de)fining the dendritic cell lineage  
*Nat Immunol* 2012; **13**(12):1145-54

**Schlöot NC, Willemsen SJ, Duinkerken G, Drijfhout JW, de Vries RR & Roep BO**

Molecular mimicry in type 1 diabetes mellitus revisited: T-cell clones to GAD65 peptides with sequence homology to Coxsackie or proinsulin peptides do not crossreact with homologous counterpart  
*Hum Immunol* 2001; **62**(4):299-309

**Schmidt SV, Nino-Castro AC & Schultze JL**

Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation  
*Front Immunol* 2012; **3**:274

**Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T & Hume DA**

Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions  
*J Leukoc Biol* 2004; **75**(2):163-89

**Schütt C & Bröker B**

Grundwissen Immunologie  
 3. Auflage 2011  
 Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

**Schwiebert EM**

Underlying purinergic signaling contributes to T lymphocyte activation in tissue repair. Focus on "shockwaves increase the T-cell proliferation and IL-2 expression through ATP release, P2X7 receptors, and FAK activation"  
*Am J Physiol Cell Physiol* 2010; **298**(3):C446-7

**Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schröter F, Prozorovski T, Lange N, Steffen J, Rieger M, Kuckelkorn U, Aktas O, Kloetzel PM & Krüger E**

Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress  
*Cell* 2010; **142**(4):613-24

- Seiler P, Aichele P, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM & Schwendener RA**  
Crucial role of marginal zone macrophages and marginal zone metallophilic cells in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus infection  
*Eur J Immunol* 1997; **27**(10):2626-33
- Sevilla N, Homann D, von Herrath M, Rodriguez F, Harkins S, Whitton JL & Oldstone MB**  
Virus-induced diabetes in a transgenic model: role of cross-reacting viruses and quantitation of effector T cells needed to cause disease  
*J Virol* 2000; **74**(7):3284-92
- Shaabani N, Honke N, Lang PA, Görg B, Proksch P, Gailus N, Gotoh T, Häussinger D, Lang KS**  
Tunicamycin inhibits diabetes.  
*Cell Physiol Biochem* 2012; **29**(3-4):595-602
- Shaffer AL, Rosenwald A & Staudt LM**  
Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation  
*Nat Rev Immunol* 2002; **2**(12):920-32
- Shapiro-Shelef M & Calame K**  
Regulation of plasma-cell development  
*Nat Rev Immunol* 2005; **5**(3):230-42
- Shaughnessy LM & Swanson JA**  
The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection  
*Front Biosci* 2007; **12**:2683-92
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S & Liu YJ**  
The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood  
*Science* 1999; **284**(5421):1835-7
- Sixt M, Kanazawa N, Selg M, Samson T, Roos G, Reinhardt DP, Pabst R, Lutz MB & Sorokin L**  
The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node  
*Immunity* 2005; **22**(1):19-29
- Skaug B & Chen ZJ**  
Emerging role of ISG15 in antiviral immunity  
*Cell* 2010; **143**(2):187-90
- Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, Field S, Burren O, Smink LJ, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Widmer B, Dunger DB, Savage DA, Walker NM, Clayton DG & Todd JA**  
A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region  
*Nature Genet* 2006; **38**(6):617-9
- Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S & Kaufman RJ**  
Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes  
*J Clin Invest* 2008; **118**(10):3378-89

**Song C, Luo L, Lei Z, Li B, Liang Z, Liu G, Li D, Zhang G, Huang B & Feng ZH**

IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma  
*J Immunol* 2008; **181**(9):6117-24

**Stallknecht DE, Perzak DE, Bauer LD, Murphy MD & Howerth EW**

Contact transmission of vesicular stomatitis virus New Jersey in pigs  
*Am J Vet Res* 2001, **62**(4):516-20

**Stefater JA 3rd, Ren S, Lang RA & Duffield JS**

Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration  
*Trends Mol Med* 2011; **17**(12):743-52

**Steiniger, B. & Barth, P**

Microanatomy and function of the spleen  
*Adv Anat Embryol Cell Biol* 2000; **151**:III-IX, 1-101

**Steinman RM & Cohn ZA**

Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice.  
I. Morphology, quantitation, tissue distribution  
*J Exp Med* 1973; **137**(5):1142-62

**Steinman RM, Hawiger D & Nussenzweig MC**

Tolerogenic dendritic cells  
*Annu Rev Immunol* 2003; **21**:685-711

**Stene LC, Oikarinen S, Hyöty H, Barriga KJ, Norris JM, Klingensmith G, Hutton JC, Erlich HA, Eisenbarth GS & Rewers M**

Enterovirus infection and progression from islet autoimmunity to type 1 diabetes: the Diabetes and Autoimmunity Study in the Young (DAISY)  
*Diabetes* 2010; **59**(12):3174-80

**Swiecki M & Colonna M**

Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity and tolerance  
*Immunol Rev* 2010; **234**(1):142-62

**Takatsuki A, Arima K & Tamura G**

Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin  
*J Antibiot (Tokyo)* 1971; **24**:215-223

**Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD & Gordon S**

Macrophage receptors and immune recognition  
*Annu Rev Immunol* 2005; **23**:901-44

**Teijaro JR, Ng C, Lee AM, Sullivan BM, Sheehan KC, Welch M, Schreiber RD, de la Torre JC & Oldstone MB**

Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling  
*Science* 2013; **340**(6129):207-11

**Tesh RB, Peralta PH & Johnson KM**

Ecologic studies of vesicular stomatitis virus I. Prevalence of infection among animals and humans living in an area of endemic VSV activity  
*Am J Epidemiol* 1969; **90**(3):255-61

**Thaiss CA, Semmling V, Franken L, Wagner H & Kurts C**

Chemokines: a new dendritic cell signal for T cell activation  
*Front Immunol* 2011; **2**:31

**Thauland TJ & Parker DC**

Diversity in immunological synapse structure  
*Immunology* 2010; **131**(4):466-72

**Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B & Kono DH**

Type I interferons ( $\alpha/\beta$ ) in immunity and autoimmunity  
*Annu Rev Immunol* 2005; **23**:307-36

**Tordai A, Brass LF & Gelfand EW**

Tunicamycin inhibits the expression of functional thrombin receptors on human T-lymphoblastoid cells  
*Biochem Res Commun* 1995; **206**(3):857-62

**Turley SJ, Fletcher AL & Elpek KG**

The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs  
*Nat Rev Immunol* 2010; **10**(12):813-25

**Upadhyay V & Fu YX**

Lymphotoxin signalling in immune homeostasis and the control of microorganisms  
*Nat Rev Immunol* 2013; **13**(4):270-9

**Urata S & Yasuda J**

Molecular mechanism of arenavirus assembly and budding  
*Viruses* 2012; **4**(10):2049-79

**Vaarala O, Klemetti P, Savilahti E, Reijonen H, Ilonen J & Akerblom HK**

Cellular immune response to cow's milk beta-lactoglobulin in patients with newly diagnosed IDDM  
*Diabetes* 1996; **45**(2):178-82

**Van Belle TL, Taylor P & von Herrath MG**

Mouse Models for Type 1 Diabetes  
*Drug Discovery Today Dis Models* 2009; **6**(2):41-5

**Van den Driessche A, Eenkhoorn V, Van Gaal L & De Block C**

Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review  
*Neth J Med* 2009; **67**(11):376-87

**Vanderford NL**

Defining the regulation of IL-1 $\beta$ , - and CHOP-mediated  $\beta$ -cell apoptosis  
*Islets* 2010; **2**(5):334-6

**van Pesch V, Lanaya H, Renaud JC & Michiels T**

Characterization of the murine alpha interferon gene family  
*J Virol* 2004; **78**(15):8219-28

**van Spriël AB & de Jong EC**

Dendritic cell science: more than 40 years of history  
*J Leukoc Biol* 2013; **93**(1):33-8

**von Herrath MG, Dockter J & Oldstone MB**

How virus induces a rapid or slow onset insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model  
*Immunity* 1994; **1**(3):231-42

**von Herrath M**

Diabetes: A virus-gene collaboration  
*Nature* 2009; **459**(7246):518-9

**Wang X, Eno CO, Altman BJ, Zhu Y, Zhao G, Olberding KE, Rathmell JC & Li C**

ER stress modulates cellular metabolism  
*Biochem J* 2011; **435**(1):285-96

**Wardle EN**

Kupffer cells and their function  
*Liver* 1987; **7**(2):63-75

**Ware CF**

Targeting lymphocyte activation through the lymphotoxin and LIGHT pathways  
*Immunol Rev* 2008; **223**:186-201

**Watson A & Bach FH**

The role of gp70 in the target antigen recognized by murine leukemia virus immune cytotoxic T-lymphocytes  
*Int J Cancer* 1980; **26**(4):483-94

**Wermeling F, Karlsson MCI & McGaha T L**

An anatomical view on macrophages in tolerance  
*Autoimmun Rev* 2009; **9**(1):49-52

**Wesolowski J & Paumet F**

The impact of bacterial infection on mast cell degranulation  
*Immunol Res* 2011; **51**(2-3):215-26

**Wherry EJ**

T cell exhaustion  
*Nat Immunol* 2011; **12**(6):492-9

**Wong K, Valdez PA, Tan C, Yeh S, Hongo JA & Ouyang W**

Phosphatidylserine receptor Tim-4 is essential for the maintenance of the homeostatic state of resident peritoneal macrophages  
*Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**(19):8712-7

**Wynn TA, Chawla A & Pollard JW**

Macrophage biology in development, homeostasis and disease  
*Nature* 2013; **496**(7446):445-55

**Yi JS, Cox MA & Zajac AJ**

T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion  
*Immunology* 2010; **129**(4):474-81

**Yoon JW, Austin M, Onodera T & Notkins AL**

Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis  
*N Engl J Med* 1979; **300**(21):1173-9

**York MR, Nagai T, Mangini AJ, Lemaire R, van Seventer JM & Lafyatis R**

A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists  
*Arthritis Rheum* 2007; **56**(3):1010-20

**Yoshimura A**

Negative regulation of cytokine signaling  
*Clin Rev Allergy Immunol* 2005; **28**(3):205-20

**Youos JG**

The role of  $\alpha$ -,  $\delta$ - and F cells in insulin secretion and action  
*Diabetes Res Clin Pract* 2011; 93 Suppl 1:S25-6

**Yu P, Wang Y, Chin RK, Martinez-pomares L, Gordon S, Kosco-Vibois MH, Cyster J & Fu YX**

B cells control the migration of a subset of dendritic cells into B cell follicles via CXC chemokine ligand 13 in a lymphotoxin-dependent fashion  
*J Immunol* 2002; **168**(10):5117-23

**Yuseff MI, Pierobon P, Reversat A & Lennon-Duménil AM**

How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity  
*Nat Rev Immunol* 2013; **13**(7):475-86

**Zaret KS & White MF**

Diabetes forum: Extreme makeover of pancreatic alpha-cells  
*Nature* 2010; **464**(7292):1132-3

**Zaynagetdinov R, Sherrill TP, Kendall PL, Segal BH, Weller KP, Tighe RM & Blackwell TS**

Identification of Myeloid Cell Subsets in Murine Lungs Using Flow Cytometry  
*Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; **49**(2):180-9

**Zeng M, Haase AT & Schacker TW**

Lymphoid tissue structure and HIV-1 infection: life or death for T cells  
*Trends Immunol* 2012; **33**(6):306-14

**Zhang D & Zhang DE**

Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system  
*J Interferon Cytokine Res* 2011; **31**(1):119-30

**Zhou S, Cerny AM, Zacharia A, Fitzgerald KA, Kurt-Jones EA & Finberg RW**

Induction and inhibition of type I interferon responses by distinct components of lymphocytic choriomeningitis virus  
*J Virol* 2010; **84**(18):9452-62

**Ziegler E, Oberbarnscheidt M, Bulfone-Paus S, Förster R, Kunzendorf U & Krautwald S**

CCR7 signaling inhibits T cell proliferation  
*J Immunol* 2007; **179**(10):6485-93

**Zindl CL, Kim TH, Zeng M, Archambault AS, Grayson MH, Choi K, Schreiber RD & Chaplin DD**  
The lymphotoxin LTalpha(1)beta(2) controls postnatal and adult spleen marginal sinus vascular structure and function  
*Immunity* 2009; **30**(3):408-20

**Zinkernagel RM, Ehl S, Aichele P, Oehen S, Kündig T & Hengartner H**  
Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity.  
*Immunol Rev* 1997; **156**:199-209

**Zinkernagel RM**  
Localization dose and time of antigens determine immune reactivity  
*Semin Immunol* 2000; **12**(3):163-171; discussion 257-344

**Zinkernagel RM**  
Lymphocytic choriomeningitis virus and immunology  
*Curr Top Microbiol Immunol* 2002; **263**:1-5

**Zinkernagel MS, Bolinger B, Krebs P, Onder L, Miller S & Ludewig B**  
Immunopathological basis of lymphocytic choriomeningitis virus-induced chorioetinitis and keratitis  
*J Virol* 2009; **83**(1):159-66

## 7. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Die Bedeutung einer forcierenden Virusreplikation auf die Aktivierung des adaptiven Immunsystems und Zerstörung der Selbsttoleranz“ selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Tag der Abgabe:

---

Nadine Honke

## 8. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Karl Lang für die Vergabe des Promotionsthemas und für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu können. Des Weiteren möchte ich mich für seine intensive Betreuung, Hilfsbereitschaft und ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein besonderer Dank gilt vor allem allen Co-Autoren ohne die, diese kumulative Dissertation nicht möglich gewesen wäre: Prof. Dr. Stephan E Baldus, Dr. Christoph Burkart, Dr. Giuseppe Cadeddu, Dr. Nicole Gailus, Dr. Tomoti Gotoh, Dr. Boris Görg, Melanie Grusdat, Prof. Dr. Dieter Häussinger, Prof. Dr. Hartmut Hengel, Prof. Dr. George Iliakis, Prof. Dr. Reinhard Kandolf, Prof. Dr. Karin Klingel, Prof. Dr. Karl Sebastian Lang, Dr. Philipp A Lang, Prof. Dr. Max Löhning, Prof. Dr. Klaus Pfeffer, Prof. Dr. Peter Proksch, Dr. Mike Recher, Dr. Nico van Rooijen, Dr. Martina Sauter, Namir Shaabani, Dr. Ursula Sorg, Prof. Dr. Masato Tanaka, Prof. Dr. Mirko Trilling, Haifeng Chris Xu, Prof. Dr. Dong-Er-Zhang.

Bei Frau Konstanze Schätzel und Frau Patricia Spieker möchte ich mich für die gute Pflege der Versuchstiere und für ihren tollen Job im Labor bedanken.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie in Düsseldorf und des Instituts für Immunologie in Essen für die Hilfsbereitschaft und dafür, dass sie für mich die letzten Jahre einfach unvergesslich gemacht haben. Hierbei möchte ich mich insbesondere bei Frau Prof. Dr. Hardt, Dr. Aleks Pandyra und Katja Merches bedanken.

Ein besonderer Dank gilt hier meinem Partner Namir Shaabani, der stets ein offenes Ohr für mich hatte und durch seine optimistische Art immer eine Lösung für ein Problem fand. Hiermit vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit und die lustige Zeit im Labor.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie und meinen Freunden, die während dieser Zeit viel Geduld, Rücksicht und Verständnis gezeigt haben, mich bedingungslos unterstützt und aufgemuntert haben und immer für mich da waren. Vielen, vielen Dank.

Danke euch allen!

## 9. PUBLIKATIONEN

- (1) Lang PA, Recher M, **Honke N**, Scheu S, Borkens S, Gailus N, Krings C, Meryk A, Kulawik A, Cervantes-Barragan L, Van Rooijen N, Kalinke U, Ludewig B, Hengartner H, Harris N, Häussinger D, Ohashi PS, Zinkernagel RM, Lang KS

Tissue macrophages suppress viral replication and prevent severe immunopathology in an interferon-I-dependent manner in mice

*Hepatology* 2010; **52**(1):25-32. doi: 10.1002/hep.23640.

- (2) **Honke N**, Shaabani N, Cadeddu G, Sorg UR, Zhang DE, Trilling M, Klingel K, Sauter M, Kandolf R, Gailus N, van Rooijen N, Burkart C, Baldus SE, Grusdat M, Löhning M, Hengel H, Pfeffer K, Tanaka M, Häussinger D, Recher M, Lang PA, Lang KS

Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus.

*Nat Immunol* 2012; **13**(1):51-7. doi:10.1038/ni.2169.

- (3) Shaabani N, **Honke N**, Lang PA, Görg B, Proksch P, Gailus N, Gotoh T, Häussinger D, Lang KS

Tunicamycin inhibits diabetes.

*Cell Physiol Biochem* 2012; **29**(3-4):595-602. doi:10.1159/000338513

- (4) Recher M, Burns SO, de la Fuente MA, Volpi S, Dahlberg C, Walter JE, Moffitt K, Mathew D, **Honke N**, Lang PA, Patrizi L, Falet H, Keszei M, Mizui M, Csizmadia E, Candotti F, Nadeau K, Bouma G, Delmonte OM, Frugoni F, Fomin AB, Buchbinder D, Lundequist EM, Massaad MJ, Tsokos GC, Hartwig J, Manis J, Terhorst C, Geha RS, Snapper S, Lang KS, Malley R, Westerberg L, Thrasher AJ, Notarangelo LD

B cell-intrinsic deficiency of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) causes severe abnormalities of the peripheral B-cell compartment in mice

*Blood* 2012; **119**(12):2819-28. doi: 10.1182/blood-2011-09-379412.

- (5) Lang PA, Shaabani N, Borkens S, **Honke N**, Scheu S, Booth S, Brenner D, Meryk A, Barthuber C, Recher M, Mak TW, Ohashi PS, Häussinger D, Griffiths GM, Thrasher AJ, Bouma G, Lang KS

Reduced type I interferon production by dendritic cells and weakened antiviral immunity in patients with Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency

*J Allergy Clin Immunol.*2013; **131**(3):815-24. doi: 10.1016/j.jaci.2012.08.050.

- (6) Lang PA, Xu HC, Grusdat M, McIlwain DR, Pandyra AA, Harris IS, Shaabani N, **Honke N**, Maney SK, Lang E, Pozdeev VI, Recher M, Odermatt B, Brenner D, Häussinger D, Ohashi PS, Hengartner H, Zinkernagel RM, Mak TW, Lang KS

Reactive oxygen species delay control of lymphocytic choriomeningitis virus

*Cell Death Differ.* 2013; **20**(4):649-58. doi: 10.1038/cdd.2012.167.

- (7) Lang KS, Lang PA, Meryk A, Pandyra AA, Boucher LM, Pozdeev VI, Tusche MW, Göthert JR, Haight J, Wakeham A, You-Ten AJ, McIlwain DR, Merches K, Khairnar V, Recher M, Nolan GP, Hitoshi Y, Funkner P, Navarini AA, Verschoor A, Shaabani N, **Honke N**, Penn LZ, Ohashi PS, Häussinger D, Lee KH, Mak TW

Involvement of Toso in activation of monocytes, macrophages, and granulocytes

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; **110**(7):2593-8. doi: 10.1073/pnas.1222264110.

- (8) **Honke N**, Shaabani N, Zhang D-E, Iliakis G, Xu HC, Häussinger D, Recher M, Löhning M, Lang PA, Lang KS

*Usp18* driven enforced viral replication in dendritic cells contributes to break of immunological tolerance in autoimmune diabetes

*PLoS Pathog* 2013; **9**(10):e1003650. doi:10.1371/journal.ppat.1003650

## 10. ANHANG

### 10.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>AIRE:</b>	Autoimmun-Regulator
<b>APC:</b>	Antigen-präsentierende Zelle (engl. antigen-presenting cell)
<b>Arm:</b>	Armstrong
<b>BCR:</b>	B Zellrezeptor (engl. B cell receptor)
<b>CCL:</b>	Chemokine (C-C Motiv) Ligand
<b>CCR:</b>	Chemokine (C-C Motiv) Rezeptor
<b>CD:</b>	engl. cluster of differentiation
<b>cDCs:</b>	konventionelle dendritische Zellen (engl. conventional dendritic cells)
<b>CD40L:</b>	engl. cluster of differentiation 40 Ligand
<b>CR:</b>	Komplementrezeptor (engl. complement receptor)
<b>DCs:</b>	dendritische Zellen (engl. dendritic cells)
<b>E:</b>	Enzym
<b>EFP:</b>	engl. estrogen-responsive finger protein
<b>FACS:</b>	Durchflusszytometrie (engl. fluorescence activated cell sorting)
<b>FcγRIIB:</b>	Fc gamma Rezeptor 2B
<b>FcεRII:</b>	Fc epsilon Rezeptor (engl. receptor II for the Fc region of Immunglobulin E)
<b>FDCs:</b>	Follikular dendritische Zellen (engl. follicular dendritic cells)
<b>FRZs:</b>	Fibroblastische retikuläre Zellen
<b>G:</b>	Glykoprotein
<b>GP:</b>	Glykoprotein
<b>GPc:</b>	virales Vorläufer Glykoprotein
<b>GPT:</b>	GlcNAcphosphotransferase
<b>HERC:</b>	engl. homologous to E6 associated protein carboxy-terminus and RCC1 domain protein
<b>HEVs:</b>	hochendotheliale Venolen (engl. high endothelial venules)
<b>HLA:</b>	humanes Leukozytenantigen-System (engl. human leukocyte antigen)
<b>IFN-α:</b>	Interferon-alpha
<b>IFN-β:</b>	Interferon-beta
<b>IFN-δ:</b>	Interferon-delta
<b>IFN-γ:</b>	Interferon-gamma
<b>IFN-ε:</b>	Interferon-epsilon
<b>IFN-κ:</b>	Interferon-kappa

<b>IFN-λ:</b>	Interferon-lambda
<b>IFN-ω:</b>	Interferon-omega
<b>IFNAR:</b>	Interferon-alpha-Rezeptor
<b>IFNGR:</b>	Interferon-gamma-Rezeptor
<b>IFN-λR:</b>	Interferon-lambda-Rezeptor
<b>Ig:</b>	Immunglobulin
<b>IL:</b>	Interleukin
<b>IL-28Rα:</b>	Interleukin-28 Rezeptor alpha
<b>IL-10Rβ:</b>	Interleukin-10 Rezeptor beta
<b>IRF9:</b>	Interferon-regulatorischer Faktor 9
<b>ISGs:</b>	Interferon-stimulierende Gene (engl. interferon-stimulated genes)
<b>ISGF3:</b>	Interferon-stimulierender Genfaktor 3 (engl. interferon-stimulated gene factor 3)
<b>ISRE:</b>	Interferon-stimulierendes Antwort-Element (engl. interferon stimulated response element)
<b>JAK:</b>	Janus aktivierende Kinase
<b>L:</b>	virale Polymerase
<b>LCMV:</b>	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
<b>LPS:</b>	Lipopolysaccharid
<b>LTβR:</b>	Lymphotoxin beta Rezeptor
<b>M:</b>	Matrixprotein
<b>MACS:</b>	engl. magnetic activated cell sorting
<b>MALT:</b>	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
<b>mCMV:</b>	Murine Cytomegalovirus
<b>MHC:</b>	Haupthistkompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
<b>MHV:</b>	Maus Hepatitis Virus
<b>MMM:</b>	Metallophile Marginalzonen Makrophagen
<b>MS:</b>	Multiple Sklerose
<b>Mx 1:</b>	engl. Myxovirus resistance 1
<b>myDCs:</b>	myeloide dendritische Zellen (engl. myeloid dendritic cells)
<b>MZM:</b>	Marginalzonen Makrophagen
<b>N:</b>	Nukleoprotein
<b>NK:</b>	Natürliche Killerzellen
<b>NOD:</b>	engl. none obese diabetic
<b>NOD Rezeptor:</b>	engl. nucleotide-binding oligomerization domain protein receptor
<b>NP:</b>	Nukleoprotein

<b>Oas1:</b>	engl. 2`5`-oligoadenylate synthetase
<b>P:</b>	Phosphoprotein
<b>PALS:</b>	periarteriöläre Lymphgefäßscheide
<b>PAMPS:</b>	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. pathogen-associated molecular pattern)
<b>PCR:</b>	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
<b>pDCs:</b>	plasmazytoide dendritische Zellen (engl. plasmacytoid dendritic cells)
<b>PKR:</b>	Proteinkinase R
<b>Poly I:C:</b>	engl. polyinosinic-polycytidylic acid
<b>PRR:</b>	Mustererkennungsrezeptoren (engl. pattern recognition receptors)
<b>qRT-PCR:</b>	engl. quantitative real-time-polymerase chain reaction
<b>RIP:</b>	Ratteninsulinpromoter
<b>Rnase L:</b>	Ribonuclease L
<b>RNA:</b>	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
<b>SCS:</b>	Subkapsuläre Sinusmakrophagen (engl. subcasular sinus macrophages)
<b>SKI-1/S1P:</b>	Subtilisin-Kexin-Isozyme-1/Site 1 protease
<b>SOCS:</b>	engl. suppressors of cytokine signaling
<b>STAT:</b>	signaltransduzierende Transkriptionsaktivatoren
<b>TH:</b>	T-Helferzelle
<b>TLR:</b>	Toll-like Rezeptoren
<b>Treg:</b>	regulatorische T-Zelle
<b>Tyk2:</b>	Tyrosin Kinase 2
<b>u.a.:</b>	und andere
<b>UbchH8:</b>	engl. Ubiquitin-conjugating enzyme H8
<b>UBE1L:</b>	engl. Ubiquitin-activating enzyme 1-like
<b>UBP43:</b>	Ubiquitin-bindendes Protein 43 (engl. ubiquitin binding protein 43)
<b>Usp18:</b>	Ubiquitin-spezifische Protease 18 (engl. ubiquitin specific protease 18)
<b>VACV:</b>	Vaccinia Virus
<b>VSVI:</b>	VSV Indiana
<b>VSVNJ:</b>	VSV New Jersey
<b>VSV:</b>	Vesicular Stomatitis Virus
<b>VV:</b>	Vaccinia Virus
<b>Z:</b>	(RING) Finger Protein
<b>ZNS:</b>	Zentralnervensystem

**10.2           Abbildungsverzeichnis**

- Abb.3.1:       Der Typ I Interferonsignalweg
- Abb.3.2:       ISG15 Enzymkaskade
- Abb.3.3:       Die Heterogenität von Makrophagen-Subpopulationen in der Milz
- Abb.3.4:       Schematischer Aufbau des Vesicular Stomatitis Virus (VSV)
- Abb.3.5:       Aufbau des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV)

**10.3           Tabellenverzeichnis**

- Tab.3.1:       Die Bezeichnung und Oberflächenmarker von Makrophagen unterschiedlicher Organe
- Tab.3.2:       Die Proteine des Vesicular Stomatitis Virus und dessen Funktionen
- Tab.3.3:       Die Proteine des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) und dessen Funktionen
- Tab.3.4:       Immunsupprimierende Medikamente und deren Wirkmechanismen