

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. H-J. Gabius

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. B. Kaspers

**Die Bedeutung von Interferon alpha und
Interferon gamma
auf den Verlauf der Marekschen Krankheit
beim Haushuhn**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Olof Harlin

aus Karlstad, Schweden

München 2003

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Referent: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers
Korreferent: Univ.-Prof. Dr R. Korbel

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>7</u>
<u>2</u>	<u>LITERATURÜBERSICHT</u>	<u>9</u>
<u>2.1</u>	<u>Interferone</u>	<u>9</u>
<u>2.1.1</u>	<u>Einteilung der Interferone</u>	<u>10</u>
<u>2.1.2</u>	<u>Typ I-Interferone</u>	<u>10</u>
<u>2.1.3</u>	<u>Typ II-Interferone</u>	<u>14</u>
<u>2.2</u>	<u>Mareksche Krankheit</u>	<u>17</u>
<u>2.2.1</u>	<u>Geschichte</u>	<u>17</u>
<u>2.2.2</u>	<u>Mareks disease Virus</u>	<u>18</u>
<u>2.2.3</u>	<u>Pathogenese</u>	<u>20</u>
<u>2.2.4</u>	<u>Bekämpfung</u>	<u>23</u>
<u>2.2.5</u>	<u>Die Immunreaktion auf Marek's disease Virus Infektionen</u>	<u>23</u>
<u>3</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>31</u>
<u>3.1</u>	<u>Tiere und Tierhaltung</u>	<u>31</u>
<u>3.2</u>	<u>Materialien</u>	<u>31</u>
<u>3.2.1</u>	<u>Zelllinien</u>	<u>31</u>
<u>3.2.2</u>	<u>Antikörper</u>	<u>32</u>
<u>3.2.3</u>	<u>Primers</u>	<u>33</u>
<u>3.2.4</u>	<u>Virus</u>	<u>33</u>
<u>3.2.5</u>	<u>Zellkulturmedien und Zusätze</u>	<u>33</u>
<u>3.2.6</u>	<u>Puffer und Lösungen</u>	<u>35</u>
<u>3.3</u>	<u>Methoden</u>	<u>41</u>
<u>3.3.1</u>	<u>Zellkultivierung</u>	<u>41</u>
<u>3.3.2</u>	<u>Zellzählung</u>	<u>41</u>
<u>3.3.3</u>	<u>Einfrieren von Zellen</u>	<u>41</u>
<u>3.3.4</u>	<u>Gewinnung von primären Hühnerfibroblasten (CEC)</u>	<u>42</u>
<u>3.3.5</u>	<u>Virusvermehrung</u>	<u>43</u>
<u>3.3.6</u>	<u>Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen ChIFN-b</u>	<u>43</u>
<u>3.3.7</u>	<u>Aufreinigung der IgG Fraktion aus polyklonalen Antiserum oder Zellkulturüberstand</u>	<u>44</u>
<u>3.3.8</u>	<u>Bioassay zur Bestimmung der antiviralen Aktivität (antiviraler Assay) in Anlehnung an Lewis et al. (LEWIS 1987)</u>	<u>45</u>
<u>3.3.9</u>	<u>Nitritbestimmung in Zellkulturüberständen (NO-Assay) in Anlehnung an Green et al. (GREEN et al. 1982)</u>	<u>46</u>

3.3.10	Plaque Assay zur Bestimmung der plaquebildenden Einheiten des Marek disease Virus	46
3.3.11	Quantifizierung der PFU mittels MDV-spezifischer Antigene	47
3.3.12	DNA Isolierung aus Hühnerblut	47
3.3.13	DNA Isolierung aus Milzzellen	48
3.3.14	DNA Isolierung aus Federfollikelepithel	48
3.3.15	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	48
3.3.16	Agarose-Gelelektrophorese	49
4	ERGEBNISSE	50
4.1	Typ I Interferone	50
4.1.1	Nachweis der antivirale Aktivität in MDV infizierte CEC	50
4.1.2	Neutralisation der antiviralen Aktivität	51
4.1.3	Einfluss von IFN-α auf die MDV-Infektion <i>in vitro</i>	55
4.1.4	Einfluss von IFN-α auf MDV-infizierte Hühner	58
4.2	Typ II Interferone	65
4.2.1	Nachweis der IFN-γ Aktivität in MDV infizierte CEC	65
4.2.2	Einfluss von IFN-γ auf MDV infizierte CEC	67
4.2.3	Einfluss von IFN-γ auf den Krankheitsverlauf MDV-infizierter Hühner	70
5	DISKUSSION	74
5.1	Typ I und II Interferone, <i>in vitro</i> Studien	75
5.1.1	Charakterisierung der antiviralen Aktivität in MDV infizierten Zellkulturüberständen	75
5.1.2	Einfluss der Interferone auf die Virusreplikation.	76
5.2	Typ I und II Interferone, <i>in vivo</i> Studien	78
6	ZUSAMMENFASSUNG	82
7	SUMMARY	84
8	LITERATURVERZEICHNIS	86

ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody-dependent cellular cytotoxicity)
AS	Aminosäuren
BAC	Bacterial artificial chromosome
CD	Cluster of Differentiation
CEC	Hühner Embryofibroblasten (Chicken embryocells)
ChIFN	Chicken Interferon
CKC	Hühner Nierenzellen (Chicken Kidney cells)
Con-A	Concanavalin A
cpE	zytopathogener Effekt (Cytopathic effect)
CRA	Chromrelease Assay
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyten
DEC	Entenembryozellen (Duck embryocells)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleid Säure
dsRNA	doppelsträngige RNA
E.Coli	Escherichia Coli
eIF-2	eukarotischer Initiationsfaktor 2
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase
FFE	Federfollikelepithel
FIA	Freund's inkomplette Adjuvanz
gB	Glykoprotein B
GBP	Guanylatbindendes Protein
hIFN	Humanes Interferon
HVT	Putenherpesvirus (Herpesvirus of turkey)

IFN	Interferon
IFT	Immunfluoreszenztest
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase
IRF	Interferon regulierende Faktor
Jak	Januskinase
LSL	Lohmann selected leghorn
mAk	Monoklonaler Antikörper
MATSA	Marek's disease associated surface antigen
MD	Marek's disease
MDV	Marek's disease virus
MHC	Haupthistokompatibilitäts Komplex (Major histocompatibility complex)
mRNA	boten RNA (messenger RNA)
NDV	Newcastle disease virus
NK	Natürliche Killerzellen
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthetase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthetase
ORF	Offene Leseramen (open readingframe)
PBL	Periphere Blutlymphyten
PFU	Plauebildende Einheit (plaqueforming unit)
PKR	Protein Kinase
Poly I:C	Polyinosol-polycytidyl Säure
POD	Peroxidase

REV	Retikuloendotheliose Virus
rFPV	rekombinantes felines Parvovirus
RNA	Ribonukleotid Säure
Stat	Signaltransducer and activator of transcription
SPF	Specific pathogenfree
TCR	T-Zell Receptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrose Faktor alpha
vIL-8	IL-8 virale Herkunft
VSV	Vesikulostomatitis Virus
ZNS	Zentrale Nervensystem

1 Einleitung

Seit den 60iger Jahren wird das Haushuhn als Modelltier für Studien zur Funktion und Phylogenese des Immunsystems erfolgreich eingesetzt. Grund hierfür sind der einfache Zugang zum Hühnerembryo und die Möglichkeit das lymphoide System durch Manipulation der Bursa Fabricii und des Thymus gezielt zu untersuchen. Zugleich wurden auch zahlreiche, für die Geflügelwirtschaft relevanten Infektionserkrankungen beim Huhn studiert und verschiedene Krankheitsmodelle mit Relevanz für den Menschen entwickelt. Besondere Aufmerksamkeit erhielten hier die Mareksche Krankheit (MD) als Modell für onkogene humane Viren, wie das Herpes Simplex Virus, das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (humanes Herpesvirus 8) und das Epstein-Barr Virus.

Zunehmend erwies sich aber der Mangel an Reagenzien und geeigneten Werkzeugen zur Untersuchungen des Hühnerimmunsystems als Nachteil. Dies galt auch für weiterführende Arbeiten zur Bedeutung der Interferone in der Pathogenese der Mareksche Erkrankung. Erst die kürzlich erfolgte Identifizierung, Klonierung und funktionelle Charakterisierung der Hühner-Interferone ermöglicht nun eine eingehende Untersuchung ihrer Funktion bei der Marekschen Krankheit.

Das Marek Disease Virus, ein zu Lymphomen führende alpha-Herpesvirus, gehört zu den bedeutensten Krankheitserregern in der Geflügelindustrie. Die meisten Bestände werden früher oder später mit dem Virus konfrontiert. In Deutschland besteht eine Impfpflicht. Als großes Problem hat sich die im Feld beobachtete stufenweise Virulenzsteigerung des Virus erwiesen, der durch die Verwendung zunehmend virulenter Impfviren entgegengewirkt werden soll. Die Impfung gegen MD ist auch aus einem anderen Grund problematisch. Die in den meisten Ländern mit intensiver Geflügelwirtschaft, genutzten Impfstoffe sind zellassozierte Lebendimpfstoffe, die bis zum Verimpfung in flüssigem Stickstoff gelagert werden müssen. Die Entwicklung potenter, nicht zellassoziierter Impfstoffe ist daher von weitgehender Bedeutung. Dies setzt eine umfassende Kenntnis der Wirt-Virus-Interaktion voraus.

Da MDV sowohl zu lytischen Infektion der B- und T-Lymphozyten, als auch zur Bildung von T-Zell-Lymphomen führt, sind insbesondere Kenntnisse der Reaktion des Immunsystems von Bedeutung. In dieser Arbeit sollte, aufbauend auf früheren Beobachtungen, die Bedeutung des Interferonsystems in der Marekschen Erkrankung untersucht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Interferone

Interferon wurde 1957 von Isaacs und Lindenmann (ISAACS and LINDENMANN 1957; MESTER and ROUSE 1991) durch ihre Arbeiten an Hühnerembryonen entdeckt. Sie fanden in der Chorioallantoismembran von virusinfizierten Hühnerembryonen einen löslichen Faktor, der in der Lage war die Vermehrung von Influenza A-Virus in anderen Zellen zu hemmen. Der Faktor wurde nach seiner Interferenz mit der Virusreplikation als Interferon bezeichnet. Aufgrund der geringen Interferonkonzentrationen in Zellkulturüberständen von primären Zellen, gelang es erst 1976 das erste Interferon (IFN) zu reinigen und zu charakterisieren (KNIGHT 1976). Es erwies sich aber als schwierig und aufwändig reine Interferonpräparationen zu gewinnen und erst mit der Entwicklung der Gentechnologie war es möglich, rekombinante Interferone in ausreichenden Mengen für weitere biochemische und funktionelle Studien zu gewinnen. Als erstes Interferon wurde humanes Interferon- α (hIFN- α) kloniert (WECK et al. 1981). 1982 folgte die Klonierung von humanem Interferon- β (hIFN- β) (DWORKIN-RASTL et al. 1982) und kurz darauf die des murinen Interferon- γ (mIFN- γ) (GRAY and GOEDEL 1983). Hühner Interferon- α (ChIFN- α) wurde 1994 erstmals kloniert und weitgehend charakterisiert (SEKELLICK et al. 1994). Da sich die Forschung an Interferonen initial auf die Untersuchung der antiviralen Eigenschaft konzentrierte, wurden die vielfältigen Wirkungsweisen dieser Substanzen auf das Immunsystem und die Regulation des Zellwachstums erst viel später entdeckt (TAYLOR-PAPADIMITROU 1980; FRIEDMANN and VOGEL 1983). Auch heute noch werden die Interferone aufgrund ihrer antiviralen Eigenschaften definiert.

2.1.1 Einteilung der Interferone

Interferone wurden zunächst anhand ihrer zellulären Herkunft in Leukozyten-, Fibroblasten- und Immuninterferon eingeteilt. Es konnte aber mit Antiseren gegen die verschiedenen Interferonen nachgewiesen werden, dass Leukozyten- und Fibroblasteninterferone nicht ausschließlich von den genannten Zellarten produziert wurden. Daraufhin wurden die Interferone 1980 in drei Hauptklassen; α , β und γ , eingeteilt (STEWART et al. 1980) und eine bis heute geltende Definition wurde festgelegt. Demnach wird ein Interferon definiert als ein Protein das in homologen Zellen durch einen metabolischen Prozess, der die Synthese von RNA und Protein beinhaltet, produziert und eine nicht virusspezifische, antivirale Aktivität entfaltet. Die Synthese von IFN- α , ehemals Leukozyteninterferon und IFN- β , ehemals Fibroblasteninterferon, wird durch virale Infektionen oder bakterielle Stimulation verschiedener Zellen induziert. Sie werden aufgrund ihrer hohen Temperatur- und Säurestabilität den Typ I-Interferonen zugeordnet. IFN- γ , ehemals Immuninterferon, wird von mitogen- oder antigenstimulierten T-Zellen (BOCCI 1988) und natürlichen Killerzellen (NK) (TRINCHIERI et al. 1984) sezerniert, es ist temperatur- und säurelabil und wird als Typ II-Interferon bezeichnet.

Trotz der strukturellen Unterschiede zwischen Typ I und II Interferone, der unterschiedlichen Rezeptorsysteme, die diese Interferone nutzen (MOGENSEN et al. 1999), der divergierenden Signaltransduktionswege (MULLER et al. 1994; STARK et al. 1998) sowie des variierenden Spektrums der jeweils induzierten Gene (SEN and LENGYEL 1992b), können viele Wirkungen der IFNs von beiden Subtypen in unterschiedlichem Grad induziert werden (DEMAEYER and DEMAEYER-GUIGNARD 1988; BILLIAU 1996). Die Überlappung der intrazellulären Signalwege der Interferontypen wird hierfür im wesentlichen verantwortlich gemacht (STARK et al. 1998; MOGENSEN et al. 1999).

2.1.2 Typ I-Interferone

In der Gruppe der Typ I Interferone werden fünf Proteine unterschieden (α , β , κ , τ , ω), IFN- α und - β sind dabei im Immunsystem die wohl interessantesten Vertreter. IFN- α und IFN- β werden vor allem von virusinfizierten T- und B-Lymphozyten und von Makrophagen gebildet, können aber von den meisten Zellarten nach einer

viralen Infektion produziert werden. Sie sind zehn- bis hundertmal stärker antiviral wirksam als Typ II-Interferone (FARRAR and SCHREIBER 1993). Für IFN- α sind beim Menschen 26 Gene bekannt, die über 85% homolog sind. Beim Huhn sind 10 Gene für das ChIFN- α beschrieben worden (SICK et al. 1996). Die Genfamilie der humanen IFN- α kodiert für etwa 12 verschiedene Proteine mit Molekulargewichten um 20 kDa, die aus monomeren Polypeptidketten mit einer Länge von 165 oder 166 Aminosäuren bestehen (ZOON et al. 1992). Für humanes IFN- β ist bisher nur ein einziges Gen kloniert worden, das für ein 166 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 20 kDa kodiert. Auf Proteinebene bestehen 34% Sequenzhomologie und auf der genomischen Ebene 30% Homologie zu den α -Interferonen (DERYNCK et al. 1980). In Huhn ist analog zum humanen IFN- β nur ein einziges Gen vorhanden, es kodiert für einen 203 AS langes Peptid (SICK et al. 1996). In *E.Coli* oder COS-Zellen exprimiertes ChIFN- β ist antiviral aktiv, entfaltet aber nur 5% der antivirale Aktivität des rChIFN- α (SICK et al. 1996). Die IFN- β -Synthese findet in virusinfizierten Makrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen statt. Eine Expression des ChIFN- β Gens ist im Gegensatz zu der des ChIFN- α Gens in Hühner, die mit Imidazoquinolin S-28463 behandelt wurden, nicht zu finden (SICK et al. 1998).

Die Gene für IFN- α und IFN- β besitzen keine Introns und scheinen von einem gemeinsamen Vorläufer abzustammen (ZOON et al. 1992). Alle Typ I-Interferone binden an den gleichen Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzellen (LUTFALLA et al. 1992). Die große Ähnlichkeit der Typ I-Interferone wird auch durch ihre gemeinsamen Eigenschaften verdeutlicht, wie die gute antivirale Wirksamkeit, die hohe pH- und Temperaturstabilität und der gleiche molekulare Aufbau.

Die IFN- α/β Moleküle binden an einen Rezeptor, der aus zwei Einheiten besteht. Es sind mehrere Komponenten des Rezeptors bekannt, für ein adäquates Signal sind aber im wesentlichen der IFNAR1 (Typ-I Interferon Rezeptor) und IFNAR2c zuständig (NOVICK et al. 1994; LUTFALLA et al. 1995). Nach erfolgreicher Bindung an die beiden Rezeptoreinheiten erfolgt die Aktivierung des Jak (Januskinase)-Stat (Signal transducers and activators of transcription) Signaltransduktionswegs. Bis jetzt sind vier Jak-Moleküle und sieben Stat-Moleküle im Mammaliensystem bekannt. Dieser Signalweg wird von mehreren Zytokinen benutzt um die Transkription bestimmter Gene zu induzieren (DARNELL et al. 1994; LEVY et al. 1995; SCHINDLER and DARNELL 1995; LEAMAN et al. 1996;

LEAMAN 1998). Die unterschiedliche Wirkung der verschiedenen Zytokine wird dadurch erreicht, dass unterschiedlicher Jaks und/oder Stats aktiviert werden (IHLE and KERR 1995; DARNELL 1996; IHLE 1996; SEN and RANSOHOFF 1997; DARNELL 1998). Im aviären System sind Studien durchgeführt worden die auf einen funktionellen Jak-Stat-Signaltransduktionsweg hinweisen (SCHUMACHER et al. 1994; JUNGWIRTH et al. 1995; HEUSS et al. 1998; ZOLLER et al. 2000). Die entsprechende IFNAR1 und -2 bei Huhn sind kürzlich kloniert worden (REBOUL et al. 1999), was einmal mehr darauf hindeutet, dass viele Funktionen des Zytokinsystems bei Säugetieren und Vögeln konserviert sind. Nach Aktivierung des Typ I-Interferonrezeptors verbinden sich mehrere aktivierte Stat-Moleküle zu Homo- oder Heterodimeren. Nach Bindung von p48, einem Mitglied der IRF-Familie (Interferon regulatory factor), einen IFN-stimulierende Gen Faktor (ISGF) bilden und folglich an IFN-stimulierte Regulations Elemente (ISRE) binden. Der in diesem Fall gebildete ISRE-3 unterstützt die meisten IFN- α/β und ein paar IFN- γ regulierte Gene (STARK et al. 1998).

Die antivirale Aktivität der Interferone greift in nahezu jeden Schritt der Virusreplikation ein (VILCEK and SEN 1996). Beschrieben wurden u.a. Interferenzen mit dem Eintritt von Viren in die Wirtszelle, dem Uncoating-Prozess (Simian-Virus 40, Retroviren), der Transkription (Influenza, Vesiculostomatitis-Virus (VSV)), der RNA-Stabilität (Picornavirus), dem Translationsprozess (Reovirus, Adenovirus, Vaccinia-Virus), der Reifung, „Verpackung“ und Virusfreisetzung (Retrovirus, VSV).

Die am besten charakterisierten IFN-induzierten antiviralen Aktivitäten sind die Aktivierung der dsRNA abhängigen Proteinkinase (PKR), des 2',5'-oligoadenylase-System (2-5A) und die der MX-Proteine. Die PKR liegt in einer inaktiven Form vor und wird durch Bindung an doppelsträngigen RNA, einem Zwischenprodukt der Virusreplikation, aktiviert (CARPICK et al. 1997). Infolge der Aktivierung der PKR wird das eIF-2-Alpha-Protein inaktiviert, ein eukaryotischer Initiationsfaktor an der kleineren ribosomalen Untereinheit, welches in virusinfizierten Zellen für die Translation viraler mRNA von großer Bedeutung ist (SAMUEL 1987; STAEHELI 1990; LENGYEL 1993). Das 2-5A-System wird auch von dsRNA stimuliert um kurze 2',5'-oligoadenylaten zu produzieren welche dann die 2-5 A-abhängige RNase L aktivieren (KERR and BROWN 1978; WRESCHNER et al. 1981; SILVERMAN and CIRINO 1997). Durch die RNaseL wird einzelsträngige RNA gespalten

(FLOYD-SMITH et al. 1981; WRESCHNER et al. 1981; CARROLL et al. 1996). Die Funktionen der Mx-Proteine sind vielfältig und sind nicht ganz aufgeklärt. Es wird aber vermutet, dass unter anderem die Aktivität oder das „Trafficking“ der viralen Polymerasen inhibiert wird (STRANDEN et al. 1993). Viele von den mehr als 30 IFN-induzierten Proteinen sind noch schlecht charakterisiert, viele dürften aber ebenfalls eine antivirale Aktivität entfalten.

Neben den beschriebenen Wirkungen induzieren Typ I Interferone über IRF-1 (Interferon regulatory factor 1) auch eine erhöhte Expression der MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche (CHANG et al. 1992; REIS et al. 1992) und bewirken so eine effektivere Entwicklung der zytotoxischen T-Zellantwort gegenüber virusinfizierten Zellen (BOEHM et al. 1997).

Das humane IFN- α , entweder als IFN- α 2b oder IFN- α 2a, wird inzwischen auch in der Therapie mehrere Krankheiten eingesetzt. Zu nennen sind hier die „hairy cell leukaemia“, HIV-assoziierte Kaposi's Sarkome, kutane Basalzellkarzinome und Hepatitis B und C (STUART-HARRIS et al. 1992). Mehrere Studien zeigten die Bedeutung einer frühen und prägnanten IFN- α / β Produktion in Mäuse auf, die gegen Herpesvirus resistent waren, sowie eine fehlende Produktion der gleichen Zytokine in empfänglichen Linien (LEBEL and HIRSH 1985; LOPEZ 1985b). Ferner konnten sowohl natürliche Resistenz, als auch die durch Immunmodulatoren induzierte Resistenz gegen Herpesvirusinfektionen durch Applikation von Antisera gegen IFN- α oder IFN- β aufgehoben werden (LOPEZ 1985a; KUNDER et al. 1993). Zahlreiche Studien haben die lokale Hemmung der Herpesvirus-Vermehrung durch Typ I Interferone bewiesen (TANAKA et al. 1998; BIRON et al. 1999; GOODBOURN et al. 2000). Auch für aviäre Interferone wurde gezeigt, dass sie *in vivo* antivirale Effekte haben. So wurde in Roussarkomavirus infizierten genetisch resistenten Hühnern (CB-Stamm), behandelt mit monoklonaler Antikörper gegen ChIFN- α , ein Progression der Tumorbildung festgestellt, dadurch wurde ein Effekt von IFN- α auf die Neoplasie festgestellt (PLACHY et al. 1999). Versuche *in vitro* bestätigten den effektive Schutz des Enten IFN- α und - β gegen das Hepatitis-Virus B (SCHULTZ et al. 1995; SCHULTZ and CHISARI 1999a; SCHULTZ et al. 1999b).

2.1.3 Typ II-Interferone

IFN- γ ist der einzige Vertreter der Typ II-Interferone und erstmals 1965 beschrieben worden (WHEELOCK 1965). Es wird von mitogen- bzw. antigenstimulierten T-Zellen (MARCUCCI et al. 1981; MORRIS et al. 1982; BIRON 1997) oder von aktivierten Natürliche Killerzellen (NK) gebildet (BIRON 1997). Bisher wurde für das humane IFN- γ nur ein einziges Gen beschrieben, das aus vier Exons und drei Introns besteht (GRAY and GOEDEL 1982a; GRAY et al. 1983). Inzwischen ist das IFN- γ von mehreren Spezies kloniert, die Sequenzhomologien sind allerdings gering. Das humane, biologisch aktive IFN- γ ist ein Homodimer aus zwei identisch glykosylierte Polypeptidketten mit einer Größe zwischen 20 und 25 kDa (abhängig von der Glykosylierungsgrad). Die beiden Moleküle sind durch eine nicht kovalente Bindung verbunden (NAGATA et al. 1987), die Peptidketten bestehen aus je 143 Aminosäuren (AS) (GRAY et al. 1982a; GRAY et al. 1982b). Aufgrund der homodimeren Form ist das biologisch aktive IFN- γ Molekül sehr empfindlich gegenüber niedrigen pH-Werten (< 5) und hohen Temperaturen ($> 50^{\circ}\text{C}$) (PACE et al. 1985). Für das Hühner-IFN- γ wurde ein Molekulargewicht von 18 kDa errechnet (DIGBY and LOWENTHAL 1995; WEINING et al. 1996).

IFN- γ wird von T-Lymphozyten infolge eines antigenen oder mitogenen Stimulus gebildet (MARCUCCI et al. 1981). *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass eine direkte Stimulation des T-Zellrezeptors mittels spezifischer Antikörper, aber auch durch Mitogene wie Concavalin A oder Phythämagglutinin (BHATTACHARYYA et al. 1987) oder die Zellaktivierung durch Pharmaka wie Phorbolster und Kalziumionophore (GAJEWSKI et al. 1989) zu einer IFN- γ Sekretion führt. Für die erfolgreiche T-Zellantwort reicht die alleinige Stimulation des T-Zellrezeptors aber nicht aus, vielmehr ist ein zusätzliches Signal durch das CD28-Molekül erforderlich. Die kostimulierenden CD28-Liganden CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) finden sich auf antigenpräsentierenden Zellen. Eine gleichzeitige Stimulation des T-Zellrezeptors und des CD28-Moleküls führte zu einer verstärkten Proliferation und Zytokinproduktion vor allem von IFN- γ , IL-2 und TNF- α (THOMPSON et al. 1989). Auch NK-Zellen werden durch bakterielle und andere mikrobielle Produkte zur IFN- γ Synthese stimuliert (BANCROFT 1993), sie benötigen allerdings zusätzlich TNF- α

als Kofaktor (WHERRY et al. 1991). *In vitro* produzieren NK-Zellen IFN- γ vor allem nach Stimulation mit Interleukin-2 (IL-2) oder IL-12 (TRINCHIERI et al. 1984; TRINCHIERI et al. 1992).

IFN- γ entfaltet seine Aktivität über einen spezifischen Rezeptor, der von dem der Typen I-Interferone verschieden ist. Er wird bei Mensch und Maus auf allen Zellen außer auf Erythrozyten exprimiert (ANDERSON et al. 1982; CELADA et al. 1985; LITTMAN et al. 1985; AGUET and MERLIN 1987). Durch die Bindung eines IFN- γ Moleküls an zwei IFN- γ -Rezeptormoleküle kommt es zur Signaltransduktion in der Zelle. Die Dimerisierung des IFN- γ -Rezeptors wird nur von IFN- γ in seiner homodimeren Form ausgelöst und ist für die biologische Aktivität eine Voraussetzung (FOUNTOULAKIS et al. 1992). Die Bindung führt zur Expression einer Vielzahl von Proteinen (SEN and LENGYEL 1992a). Unter anderem werden die Transkription der Gene für IRF-1, GBP, iNOS und MHC-II durch den hIFN- γ und ChIFN- γ induziert (WEINING et al. 1996; YEH et al. 1999). Unter den vielen Aktivitäten des IFN- γ stehen die Makrophagen-aktivierenden Eigenschaften, der Einfluss auf die MHC-Gene, die antiproliferativen Eigenschaften und der Einfluss auf die Differenzierung von T-Helferzellen (Th1-Immunantwort) im Vordergrund.

Die Makrophagen-aktivierende Aktivität des IFN- γ ist 100.000 bis 10.000 mal stärker als die der Typ I-Interferone (PACE et al. 1985) und es wird als der bedeutendste Makrophagen-aktivierende Faktor (MAF) im Säugersystem bewertet (PERUSSIA et al. 1983), analoge Funktionen sind im aviären System auch nachgewiesen worden (WEINING et al. 1996). Nach Stimulation mit IFN- γ kommt es in den Makrophagen zur Bildung von mikrobizid wirkenden Substanzen wie der von Arachnoidonsäuremetaboliten, sowie von Zytokinen und reaktiven Sauerstoffverbindungen (NATHAN 1987). Auch Stickstoffmonoxid (NO) ist eine der IFN- γ induzierten Substanzen (STUEHR and MARLETTA 1987), die bei der Abwehr von Bakterien (FLESCH and KAUFMANN 1991), Viren (KARUPIAH et al. 1993), Parasiten (GREEN et al. 1990; JAMES and HIBBS 1990) und Pilzen (GRANGER et al. 1988; CENCI et al. 1993) aufgrund ihrer zytotoxischen und zytostatischen Eigenschaften eine bedeutende Rolle spielen (LOWENSTEIN et al. 1994). Es hat sich gezeigt, dass IFN- γ alleine eine hohe NO-Syntheserate induzieren kann, eine maximale Produktion wurde aber erst durch Kostimulation mit LPS (Lipopolysaccharid) (XIE et al. 1992) oder TNF- α (DING et al. 1988) erreicht.

Die antivirale Aktivität des Typ II-Interferons wird einerseits durch seine Fähigkeit vermittelt, ebenso wie Typ I-Interferone eine verstärkte Expression viraler Antigene durch Erhöhung der Anzahl von MHC-I Molekülen auf infizierten Zellen zu bewirken. Zusätzlich wird aber auch die MHC-II vermittelte Antigenpräsentation auf Zellen der myelomonozytären Reihe (STEEG et al. 1982; BASHAM and MERIGAN 1983; DIJKMANS and BILLIAU 1988; IJZERMANS and MARQUET 1989) induziert und auf diesem Weg das spezifische Immunsystem aktiviert. Diese Eigenschaft der IFN- γ ist auch auf Endothel- und Bindegewebszellen (POBER et al. 1983), Epithelzellen (BERRIH et al. 1985) und auf neuronalen Zellen (OWENS et al. 1994) nachgewiesen.

Die antiproliferativen Eigenschaften des IFN- γ reichen von antiproliferativen bis zur zytotoxischen Wirkungen auf bestimmte Tumorzellen (TYRING et al. 1982). Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Expression von Protoonkogenen und Onkogenen mit IFN- γ zu hemmen und damit die Zellteilungsraten zu senken sind (BOCCI 1988). Aufgrund dieser Studien wurde IFN- γ auch in der Tumorthherapie eingesetzt. So konnte bei einigen Patienten mit myelogenen Leukosen durch IFN- γ Gabe eine deutliche Verbesserung erreicht werden (KURZROCK et al. 1987).

Der Einfluss des IFN- γ auf die Differenzierung von CD4-positiven (CD⁺) T-Helferzellen (Th) manifestiert sich in seiner Wirkung auf die Entwicklung von Th1-Zellen aus Th0-Zellen und folglich der Entwicklung einer zellulär dominierten Immunantwort (COFFMAN and MOSMANN 1991). Die noch undifferenzierten Th0-Zellen werden entweder durch IL-12 oder durch IL-4 in ihrer weiteren Entwicklung zu Th1- bzw. Th2-Zellen getrieben. Unter dem Einfluss von IL-12, welches von Makrophagen, NK-Zellen und dendritischen Zellen nach Infektion mit intrazellulären Erregern (z.B. Viren, Listerien oder Mykobakterien) gebildet wird, entwickeln sich IFN- γ , IL-2 und TNF- α bildende Th1-Zellen (MOSMANN et al. 1986). Die IFN- γ Synthese induziert einen positive Feedback-Mechanismus der zu einer erhöhten Expression hochaffiner IL-12 Rezeptoren auf der Oberfläche von den Th1-Zellen führt (GOLLOB et al. 1997) und gleichzeitig eine verstärkte IL-12 Sekretion durch Makrophagen induziert (TRINCHIERI 1995). Die Folge ist eine Verstärkung der Th1-Antwort. Demgegenüber kommt es unter dem Einfluss von IL-4, dessen initiale Quelle noch weitgehend unbekannt ist, zur Differenzierung so genannter Th2-Zellen und zur Synthese von IL-4, IL-5 und IL-13. Durch ihre B-Zell

aktivierenden Eigenschaften induzieren diese Zytokine dann eine humorale Immunantwort (ROCKEN et al. 1992; KAMOGAWA et al. 1993).

2.2 Mareksche Krankheit

2.2.1 Geschichte

Die Mareksche Krankheit (MD) wurde zuerst von József Marek (MAREK 1907) beschrieben, er beobachtete eine Paralyse oder Parese der Ständer und Flügeln in Hühnern und vermutete eine inflammatorische Infektion der peripheren Nerven. Aufgrund die histologische Befunde, klassifizierte er sie als Polyneuritis. In der ersten größeren Studie der „Hühnerlähmung“ (PAPPENHEIMER 1926), wurde zusätzlich zu der Polyneuritis bei etwa 10% der Krankheitsfälle viszerale Lymphome observiert. Der Terminus „Neurolymphomatose“ wurde eingeführt und es wurden Beweise für eine infektiöse Ursache der Krankheit geliefert indem gesunde Hühner mit Gewebe von paralysierten Tieren inokuliert wurden. In den folgenden Jahren wurde die Krankheit weltweit registriert. In den 30iger, 40iger und vor allem in der 50iger Jahren als die Geflügelhaltung in großem Stil zunahm wurden MD und die lymphoiden Leukose vermehrt beobachtet. Aufgrund der pathologisch-anatomischen Befunde und der bei beiden Krankheiten auftretenden viszerale Lymphome, kam es zur Beschreibung der Erkrankungen unter dem Begriff „Aviären Leukose Komplex“. Erst in den späten 60iger Jahren gelang es zwei von einander unabhängigen Gruppen das Virus der MD durch Kokultivierung von MD-Lymphomzellen mit Hühnernieren-(CKC) bzw. Entenembryo-(DEC) Zellkulturen zu isolieren und als zellassoziertes Herpesvirus zu identifizieren (CHURCHILL and BIGGS 1967; NAZERIAN et al. 1968b). Anschließend gelang es mittels Immunfluoreszenz der Nachweis von virusspezifischem Antigen im Federfollikelepithel (FFE) von MDV-infizierten Küken (CALNEK and HITCHNER 1969) und in Folgeexperimenten wurde die Ausscheidung das Virus über das FFE nachgewiesen (CALNEK et al. 1970). Somit konnte der Übertragungsweg des Virus aufgeklärt werden. Durch die Entdeckung des Erregers der Mareksche Krankheit (MD) eröffneten sich die Möglichkeiten, die Eigenschaften des Virus, die Pathogenese und die Immunologie der MD genau zu studieren. Heute ist die Krankheit weltweit in allen Ländern mit bedeutender Geflügelproduktion vorhanden (PURCHASE 1985). Man geht davon aus, dass es in

jeder Haltung zu Verlusten kommt aber da die Meldesysteme oft mangelhaft sind, ist es schwierig die genaue Zahlen der Verluste festzustellen.

2.2.2 Mareks disease Virus

Das Virus der Mareksche Krankheit gehört zu den Herpesviren. Es ist das einzige DNA Virus, das beim Huhn zu Neoplasien führt und wird daher getrennt von der Leukose/Sarkom-Gruppe als tumoröse Erkrankung viraler Genese klassifiziert. Es wurde zunächst aufgrund seines Lymphotrophismus und anderer biologischer Eigenschaften den Gammaherpesviren zugeordnet (ROIZMAN et al. 1981). Die aus der Genomanalyse gewonnenen Daten führten schließlich zu einer neuen Klassifizierung unter den Alphaherpesvirinae. Die Virusstämme lassen sich entweder den pathogenen (Serotyp 1) oder den apathogenen (Serotyp 2) MDV-Stämmen zuteilen. Daneben gibt es noch das eng verwandte „herpesvirus of Turkey“ (HVT) als dritten Serotyp (VON BÜLOW and BIGGS 1975a; VON BÜLOW and BIGGS 1975b). Diese zunächst serologische Klassifikation basierte auf dem Immunfluoreszenztest (IFT), der Agar-Gel-Präzipitation und dem Neutralisationstest, sie wurde nachfolgend durch den IFT mit typenspezifischen monoklonalen Antikörpern (mAk) (LEE et al. 1983), spezifischen Lektinen (MALKINSON et al. 1986) und durch den Nachweis von Unterschieden in der viralen DNA bei der Anwendung von Restriktionsendonukleasen (HIRAI et al. 1979; ROSS et al. 1983; SILVA and BARNETT 1991) bestätigt. MDV-1 wird als gallides Herpesvirus 2 (GHV-2), MDV-2 als gallides Herpesvirus 3 (GHV-3) und HVT als meleagrides Herpesvirus klassifiziert. Alle drei Viren gehören zu dem neuen Genus „Marek’s disease-like viruses“ in den Alphaherpesvirinae (VAN REGENMORTEL et al. 1999).

2.2.2.1 Serotyp 1

Die Viren die zum Serotyp 1 gehören, umfassen alle pathogenen MDV-Stämme sowie ihre attenuierten Varianten. Die Pathogenität korreliert mit der Onkogenität der Stämme und aus diesen Gründen verwendet man den Begriff onkogen für pathogen und nichtonkogen für apathogen. Der Pathotyp eines Virusstammes wird deswegen nach dessen Onkogenität und der Fähigkeiten MD in geimpften, empfänglichen Hühnerlinien und in genetisch resistenten Hühnern zu verursachen, eingestuft. So wird ein MDV als *sehr hoch onkogener* MDV-Pathotyp eingestuft

wenn es bei vakzinierten, genetisch resistenten Tieren eine hohe Lymphomrate und bei genetisch empfänglichen nicht vakzinierten Hühnerstämmen ein Frühmortalitätssyndrom ohne Lymphome verursacht. Diese Variante wird auch als „very virulent Marek’s disease viruses“ (vvMDV) bezeichnet (WITTER 1983). Zu dieser Gruppe zählen Isolate wie MD5 und MD11 (WITTER 1980), Ala-8 und Ala-9 (EIDSON et al. 1981), RB1B (SCHAT 1982) und EU-1 (T.F. Davison, F. Fehler persönliche Kommunikation). Darüber hinaus wurden kürzlich Virusstämme isoliert die darauf hinweisen, dass ein Progression der Virulenz auftritt und so genannte vv+ Pathotyp im Feld auftreten (WITTER 1997).

Hoch onkogene MDV-Stämme, auch als „virulent MDV“ (vMDV) bezeichnet, induzieren bei genetisch empfänglichen Hühnern, jedoch nicht bei genetisch resistenten, eine hohe Mortalität mit hoher Lymphomrate und unterschiedlicher Häufigkeit von Nervenveränderungen. Vertreter dieser Gruppe sind JM (SEVOIAN et al. 1962), HRPS-16 (PURCHASE and BIGGS 1967) und GA (EIDSON and SCHMITTLE 1968).

Mittelgradig bis schwach onkogene MDV-Stämme auch „mild MDV“ (mMDV) oder klassische MD genannt, verursachen bei genetisch empfänglichen Tieren vor allem Nervenveränderungen und in wesentlichen geringer Frequenz Lymphome, wobei in erster Linie Tumoren der Gonaden auftreten. Die Mortalitätsrate ist verhältnismäßig gering. Beispiele hierfür sind die Stämme HPRS-17 (PURCHASE et al. 1967) und Conn-A (CHOMIAK et al. 1967). In der Serotyp 1 Gruppe kommen auch Virus-Stämme vor, die als *minimal onkogen* bezeichnet werden. Sie verursachen nur in genetisch hoch empfänglichen Tieren Nervenveränderungen und Tumoren. Hier sind CU-2 (CALNEK et al. 1979) und das als Impfvirus bekannte CVI 988 (RISPENS et al. 1972a; RISPENS et al. 1972b) die bekanntesten Vertreter.

2.2.2.2 Serotyp 2

Zu dieser Gruppe gehören die natürlich vorkommenden nichtonkogenen (nichtpathogenen) MDV-Stämmen. Vertreter sind HRPS-24 (BIGGS 1972), HN-1 (CHO and KENZY 1972) und SB-1 (SCHAT and CALNEK 1978a).

2.2.2.3 Serotyp 3

Umfasst das mit dem MDV eng verwandte „Herpesvirus of Turkey“ (HVT). Vertreter dieses Serotyps sind FC 126 (WITTER et al. 1970), HPRS26 und WTHV-1. Dieser Serotyp ist für das Huhn apathogen.

2.2.2.4 Morphologie und Genom

In einer ganzen Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass MDV und HVT die typische Morphologie von Herpesviren besitzen (OKADA et al. 1972). Die Nukleokapside werden gewöhnlich im Zellkern und gelegentlich im Zytoplasma produktiv infizierter Zellen gefunden. Die Umhüllung der Nukleokapside erfolgt durch Budding an der inneren Kernmembran. Einschlusskörperchen kommen häufig im Zytoplasma des FFE als unbehüllte Virionen vor. Wie bei allen Herpesviren besteht auch das MDV-Genom aus einer linearen doppelsträngigen DNA. Es hat eine Größe von 180 kb (SILVA et al. 2001) und ist von einem etwa 100 nm großen Nukleokapsid umschlossen. Das Nukleokapsid ist aus 162 zylindrischen Kapsomeren zusammengesetzt (CHURCHILL et al. 1967; EPSTEIN et al. 1968; NAZERIAN and BURMESTER 1968a) und ist von Tegument und Hülle umschlossen. Inzwischen sind mehrere Genome von MDV-1, Teile von MDV-2 und das komplette Genom von HVT sequenziert (SILVA et al. 2001). Es ist auch gelungen das komplette Genom von MDV-1 als „bacterial artificial chromosome“ (BAC) in *Escherichia coli* (*E.coli*) zu klonieren (SCHUMACHER et al. 2000). Dieses Werkzeug ermöglicht nun mit zellfreiem Virus zu arbeiten, das Genom des MDV gezielt zu manipulieren und Untersuchungen und Vergleichen der Pathogenität und Virulenz durchzuführen (DORANGE et al. 2002; TISCHER et al. 2002).

2.2.3 Pathogenese

Die Pathogenese der MD ist einerseits vom Serotyp und der Onkogenität des Virus abhängig andererseits von Genotyp, Alter, Geschlecht und Immunkompetenz des Wirtes. Die zu Lymphomen führende MDV-Infektion wird in vier Phasen eingeteilt:

- 1) Frühe zytolytische Phase
- 2) Latente Phase
- 3) Latente und zytolytische Phase
- 4) Transformierende Phase

Die beiden ersten Phasen kommen streng von einander getrennt vor, die restlichen Phasen der Krankheit sind gleichzeitig aber in unterschiedlichen Zellpopulationen zu finden. Die initiale Infektion mit dem Virus erfolgt über die Atemwege. Da infektiöses, zellgebundenes MDV im FFE infizierter Hühner zu finden ist, nimmt

man an, dass die Infektion durch Inhalation von Staub erfolgt. Die Rolle der Lunge als primär infiziertes Organ hat sich experimentell nicht bestätigt (PURCHASE 1970; PHILLIPS and BIGGS 1972; ADDINGER and CALNEK 1973). Es wird aber angenommen, dass das Virus in der Lunge von phagozytierenden Zellen aufgenommen wird und so in die lymphatischen Organe, wie der Bursa Fabricii, dem Thymus und der Milz transportiert wird. In diesen Organen bekommt das Virus Zugang zu den Lymphozyten und eine produktive, zytolytische Infektion vor allem der B-Lymphozyten (CALNEK et al. 1981; SCHAT et al. 1981; SHEK et al. 1983; BAIGENT and DAVISON 1999) aber auch weniger T-Lymphozyten (BAIGENT et al. 1999) wird 3-6 Tage nach erstmaliger Infektion nachweisbar. Die nekrotisierende Infektion provoziert eine akute Entzündung mit vielfältiger Zellbeteiligung durch Makrophagen, T und B-Lymphozyten und Granulozyten. Die betroffenen Organe (Bursa Fabricii, Thymus und Milz) atrophieren. Klinische Zeichen sind Apathie, Anorexie und ein sehr schlechter Habitus. Nach etwa 7 Tagen schlägt die lymphoide Infektion von einer produktiven in eine latente um, zugleich lässt sich eine Besserung des Allgemeinbefindens der Hühner beobachten. In diesem Stadium kann das Virus in den lymphoiden Organen in CD4⁺ T-Lymphozyten und in einem sehr kleinen Teil der B-Lymphozyten nachgewiesen werden (SHEK et al. 1983; CALNEK et al. 1984; CALNEK et al. 1984b; HIRAMOTO et al. 1996; MORIMURA et al. 1998; LEE et al. 1999). Zugleich ist eine Virämie der peripheren Blutlymphozyten (PBL) zu beobachten. Die Infektion der Immunzellen aktiviert die Makrophagen und eine transiente Immunsuppression wird beobachtet (LEE et al. 1978b) mit gleichzeitiger, transzierter Hyperplasie der Milz. In der nachfolgenden Phase wird das Virus durch die Virämie in die meisten Organe verteilt und induziert eine zweite zytolytischen Infektion. Dabei werden Zellinfiltrate entzündlicher Zellen und immunkompetenter Lymphozyten in den betroffenen Geweben gefunden. Von allen zytolytisch infizierten Geweben wird nur im FFE infektiöses, zellfreies Virus produziert (CALNEK et al. 1970). Sowohl die latente Infektion der Blutleukozyten und die der Milzlymphozyten als auch die produktive Infektion der FFE sind lebenslange Geschehen, die sich unabhängig davon entwickeln, ob der Wirt Symptome der MD zeigt oder nicht (WITTER et al. 1971). Schon eine Woche nach der Infektion kann es zu einer transienten Paralyse kommen. Die Paralyse betrifft unterschiedliche Nerven, daher können die Symptome individuell sehr unterschiedlich ausfallen. Häufig beobachtete Zeichen sind Torticollis, Kropfparalyse, steifer Gang bis vollständige

Paralyse der Ständer. Nachdem die Impfpfrophylaxe sich durchgesetzt hat, kommen diesen Symptomen aber eher selten vor.

Schon 12 Tage nach der Infektion aber auch Wochen und Monate danach können oft nur mikroskopisch erkennbare aber auch makroskopisch sichtbare Läsionen in einer Vielzahl von Organen, darunter in den lymphoiden und viszerale Organen, der Muskulatur, der Haut, den Augen, den peripheren Nerven und dem Gehirn beobachtet werden. Die Lymphome können eine erhebliche Größe erreichen, was im betroffenen Organ funktionelle Schäden hervorruft und Paralyse (bei nervöser Beteiligung), Blindheit (bei okularer Beteiligung), Kachexie (besonders bei viszeraler Beteiligung) und Tod zur Folge haben kann. Die Lymphome sind aus einer Mischung von inflammatorischen Zellen, aktivierten und nicht aktivierten Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen und neoplastisch veränderten T-Lymphozyten zusammengesetzt (HUDSON and PAYNE 1973; PAYNE et al. 1974; PAYNE et al. 1976). Mit der Etablierung stabiler MD Tumorzelllinien wurde auch die Charakterisierung der entarteten Zellpopulation ermöglicht und es wurde klar, dass die Lymphome aus T-Zellen bestehen (NAZERIAN and SHARMA 1975; MATSUDA et al. 1976; NAZERIAN et al. 1977; ROSS et al. 1977; SCHAT et al. 1989; SCHAT et al. 1991). Es sind mehrere Untersuchungen hinsichtlich des Phänotyps der neoplastisch veränderten Zellen durchgeführt worden. Die heutige Ansicht ist die, dass die veränderten Zellen drei Kriterien erfüllen müssen um entarten zu können (CALNEK et al. 1998): 1.) die Zellen müssen zum Zeitpunkt und am Ort der aktiven Infektion verfügbar sein, 2.) sie müssen die virale Replikation unterdrücken können, entweder spontan oder unter dem Einfluss exogener Inhibitoren und 3.) sie müssen mit einer Proliferation auf Exposition an virale Gene die den Transformation direkt oder indirekt beeinflussen antworten. Nach diesen Punkten würde aktivierte T-Zellen (vor allem CD4⁺) und nicht B-Zellen in Frage kommen. Bei der MDV Infektion der Pute wurde aber B- und T-Zell-Lymphome beobachtet (POWELL and RENNIE 1984; NAZERIAN and SHARMA 1985) und es kommt nicht zu der zytolytischen Infektion in den lymphoiden Organen wie bei der Huhn (ELMUBARAK et al. 1981; POWELL et al. 1984). In einigen Fällen verläuft das Krankheitsverlauf perakut und der Tod tritt ein bevor klinische Symptome sich entwickeln können.

2.2.4 Bekämpfung

Die ersten Versuchen die Krankheit in den Geflügelbeständen zu kontrollieren, machte sie die Resistenzzüchtung zunutze. Als problematisch erwies sich allerdings, dass bis zu 14 genetische Loci an der Resistenz bzw. Empfänglichkeit gegenüber der MD beteiligt sind, eine Tatsache, die die Züchtung erheblich komplizierte (BACON et al. 2000). Seit den frühen 70iger Jahren wird die Krankheit erfolgreich mittels Immunprophylaxe bekämpft. In den 60iger Jahren lag die Inzidenz der MD in den Hühnerhaltungen noch bei 20-30%, Berichte mit bis zu 60% erkrankter Tiere waren nicht selten. Mit der Einführung der Impfung sank die Morbidität erheblich und folglich wurden die ökonomischen Verluste deutlich geringer. So wurden zum Beispiel vor dem Einführen der Vakzination in den USA 1,5% aller Broiler nach dem Schlachten aufgrund MD-bedingten Läsionen verworfen (1970). 1999 war diese Zahl auf 0,0121 % gesunken, was eine Reduktion von über 99% entspricht (WITTER 2001). Durch die bis heute noch einzigartige Möglichkeit gegen ein onkogenes Virus zu impfen wurde das Huhn auch als Modellsystem zur Forschung über onkogene humane Viren angesehen, was auch zu erheblichen Fortschritten in der Marek-Forschung führte. Die heute verwendeten Impfstoffe unterscheiden sich im Serotyp der verwendeten Impfviren. Zur Anwendung kommen attenuierte Viren der Serotyp 1 und 2 oder nicht attenuierte Viren der Serotyp 2 und 3. Im Feld werden monovalente, aber auch bivalente Impfstoffe eingesetzt. Als besonders effektiv hat sich der zellassozierte CVI 988-Impfstamm (RISPENS et al. 1972b) erwiesen. Problematisch ist nach wie vor die Tatsache, dass für einen effektiven Schutz Lebendimpfstoffe benutzt werden müssen, die zudem als zellassozierte Viren verimpft werden. Diese Impfstoffe müssen bei -196°C gelagert und verschickt werden, ein mit erheblichen Problemen verbundenes Verfahren.

2.2.5 Die Immunreaktion auf Marek's disease Virus Infektionen

Wie zuvor bereits beschrieben, kann die Infektion in mehrere von einander getrennte Phasen unterteilt werden, in denen jeweils Komponenten des angeborenen und des erworbenen Immunsystem eine wichtige Rolle spielen. In der ersten Phase repliziert das Virus in lymphoiden Zellen, primär in B-Lymphozyten, wobei es zu einer lytischen Infektion kommt. In deren Folge kommt es zur Suppression der humoralen

Immunantwort. Durch die Infektion werden T-Lymphozyten aktiviert, welche nach dem Kontakt mit infizierten B-Zelle ebenfalls infiziert werden (KALETA 1977). In der folgenden Phase etabliert sich eine latente Infektion. Diese Phase ist sehr schlecht verstanden, es wird aber angenommen, dass mehrere Faktoren, darunter die Immunreaktion, spezifische zelluläre sowie virale Gene, eine bedeutende Rolle spielen (MORGAN et al. 2001). Im der Latenz folgenden Stadium entwickeln sich Tumore. Deren Umfang und Organverteilung ist von der genetischen Resistenz der Tiere, dem Immunstatus des Wirtes und natürlich von der Virulenz des Virus abhängig (BACON et al. 2000; SCHAT and DAVIES 2000a; SCHAT and XING 2000b). Das pathologische Bild der MD wird aber auch durch der Einflüsse moduliert, zu nennen sind maternale Antikörper, der Impfstatus, Stress sowie Substanzen und Erreger, die immunsuppressiv wirken.

2.2.5.1 Die spezifische Immunantwort auf eine MDV-Infektion

Die erworbene Immunantwort ist primär von der Entwicklung antigenspezifischer Antikörper und zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) abhängig. Beiden Komponenten des adaptiven Immunsystems wurde eine wichtige Rolle in der protektiven Immunität während einer Herpesvirus-Infektion zugeschrieben (MESTER et al. 1991). Beiden Formen der Immunantwort sind auch als Reaktion auf natürliche MDV-1 Infektion und nach Vakzination gegen MD beschrieben.

Humorale Immunantwort

Durch die relativ komplexe Struktur des MDV ergeben sich eine Vielzahl von Epitopen gegen die spezifische Antikörper gebildet werden. So gelang es (VAN ZAANE et al. 1982) in Immunpräzipitationsversuchen mit Seren von rekonvaleszenten Hühnern 35 virus-spezifische Proteine, von denen über die Hälfte glykosiliert waren, zu identifizieren. Nachfolgende Untersuchungen im Antikörpern gegen das Glykoprotein B (gB) zeigten, dass diese zellfreies Virus neutralisieren können (IKUTA et al. 1984). Es wurden zudem mehrere Studien zur Bedeutung neutralisierender Antikörper gegen die Glykoproteinen C, D, G, E und I durchgeführt, ohne aber eindeutige Ergebnisse zu erzielen (LEE and WITTER 1991; BRUNOVSKIS et al. 1992; JANG et al. 1996; ANDERSON et al. 1998). Von Lee et al. (LEE et al. 1991) wurde festgestellt dass auch nicht-neutralisierende Antikörper eine schützende Immunität induzieren können. Auch den maternalen Antikörpern

scheint eine Bedeutung zuzukommen, dass sie sowohl die Morbidität, als auch die Mortalität und die Tumorbildung reduzieren (CHUBB and CHURCHILL 1969; BURGOYNE and WITTER 1973; PAYNE and RENNIE 1973). Die Zugabe oder das natürliche Vorkommen von maternalen Antikörpern kann aber auch die Effizienz von *in ovo* oder neonatal applizierten Impfstoffen negativ beeinflussen (CALNEK and SMITH 1972; EIDSON et al. 1973; KING et al. 1981; SHARMA and GRAHAM 1982). Es wird angenommen, dass dieses Phänomen auf der Neutralisierung des Impfvirus beruht, und dass daher die zellfreien Impfstoffen empfindlicher sind, als die zellassozierten (CALNEK et al. 1972; WITTER and BURMEISTER 1972; BURGOYNE et al. 1973). Bei den genannten Beobachtungen muss aber daran erinnert werden, dass MDV ein zellassoziertes Virus ist und so durch sein ständiges „intrazelluläres Versteck“ einer effektiven Neutralisation durch Antikörper entgeht.

Zellvermittelte Immunantwort

Eine zellvermittelte, erworbene Immunantwort spielt bei der Bekämpfung aller Herpesvirus-Infektionen eine bedeutende Rolle. Dies gilt insbesondere für das streng zellassozierte MDV, für das die Lyse infizierter Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) als ein wichtiger Effektormechanismus angesehen wird (SCHAT et al. 1984). Erstmals konnte dies von Sharma und Coulson durch Zytotoxizitätsversuche mit der MD-Lymphomzelllinie MSB-1 (SHARMA and COULSON 1977) aufgezeigt werden. Die Autoren postulierten, dass die zytotoxische Reaktion gegen ein so genanntes „Marek´s disease associated surface antigen“ (MATSA) gerichtet war, allerdings zeigte sich nachfolgend, dass durch Entfernen der MATSA-Molekül von der Zellmembran die zytotoxische Reaktion nicht beeinflusst wurde (SCHAT and MURTHY 1980). In späteren Untersuchungen wurde zudem festgestellt, dass MATSA auch an der Oberfläche von nicht transformierten, aktivierten T-Zellen vorkommt und dass es sich nicht um ein MDV spezifisches Antigen handelte (MCCOLL et al. 1987). Ross konnte in seinen Studien aufzeigen, dass MDV-aktivierte PBL die Plaquebildung durch MDV-infizierte Lymphomzellen inhibieren können und dass diese Zellen die virale Vermehrung in CKC reduzieren (ROSS 1977). Auch in dieser Studie blieb der Ursprung der Effektorzellen unbekannt. Pratt et al. konnten zeigen, dass durch

Retikuloendotheliosevirus (REV) transformierte Zelllinien nach stabiler Transfektion mit MDV-Expressionsvektoren durch isogene MDV-spezifische Effektorzellen lysiert wurden (PRATT et al. 1992a; PRATT et al. 1992b). Es wurde bei einer so entstandene REV-Zelllinie (CU211) festgestellt, dass das vom MDV-spezifischen Gen ICP4, exprimierte Phosphoprotein pp38 in der Lage war ein CTL antwort zu hervorrufen (OMAR and SCHAT 1996b). In der gleichen Studie wurden auch andere MDV spezifische Gene (Meq, gB, ORF A41, ORF-A und ORF L1) stabil in REV transformierte Zelllinien transfiziert und daraufhin getestet, ob sie eine CTL Antwort auslösen. Die Effektorzellen wurden dabei als klassische $CD4^-CD8^+$, $TCR\alpha\beta^+$ CTLs charakterisiert.

2.2.5.2 Die unspezifische Immunantwort auf MDV-Infektionen

Zum unspezifischen Immunsystem gehört eine Vielzahl von zellulären und löslichen Komponenten, darunter Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK), Komplementfaktoren und Zytokine. Das angeborene Abwehrsystem bietet einen ersten Schutz gegen die Manifestation eines Erregers und ist charakterisiert durch seine sehr schnelle Aktivierung und das Fehlen eines immunologischen Gedächtnisses. Da das spezifische und das nicht spezifische Immunsystem in erheblichem Maße miteinander interagieren, ist es nicht immer möglich eine klare Grenze zwischen den Systemen zu ziehen. So ist beispielsweise Interferon- γ (IFN- γ) ein essentieller Makrophagenaktivator, spielt aber auch eine herausragende Rolle in der Ausbildung einer Th1-Immunantwort und eine CTL-Antwort (WHITTON 1998).

Makrophagen

Aufgrund der Fähigkeit zur Produktion von zahlreichen Zytokinen, der Phagozytose von Pathogenen und der Verarbeitung und Präsentation von Antigenen über den MHC-II vermittelten Weg nehmen Makrophagen eine zentrale Rolle in der Wirt-Erreger Interaktion ein. Da es bis heute schwierig ist, ruhende Makrophagen beim Huhn zu gewinnen, besteht ein deutlicher Wissensrückstand im Vergleich mit der Forschung an Säugetieren (QURESHI et al. 2000). Es gibt aber mehrere Studien die darauf hinweisen, dass Makrophagen eine bedeutende Rolle in der MD spielen. So wurde gezeigt, dass das MDV zwar von Makrophagen phagozytiert werden, in den Zellen aber nicht replizieren kann (HAFFER and SEVOIAN 1979; HAFFER et al. 1979; BÜLOW and KLASSEN 1983). Allgemein akzeptiert, wenn auch nicht wirklich

bewiesen, ist die Vorstellung, dass die Phagozytose des MDV eine Rolle bei der Aufnahme und dem Transport des Virus von der Eintrittspforte in der Lunge zur Milz spielt, wo es 36 bis 48 Stunden nach der Infektion gefunden werden kann (SCHAT et al. 2000b). Ein interessantes Phänomen ist dabei das Fehlen einer Reaktion der Splenozyten auf T-Zell Mitogene während der frühen zytolytischen Phase nach Infektion mit allen drei Serotypen (LEE et al. 1978a; SCHAT et al. 1978b) bei gleichzeitigem Vorhandensein einer MDV-antigenspezifischen CTL Reaktion (OMAR and SCHAT 1996a). Wurden die Makrophagen aus Milzzellpräparationen von MDV-infizierten Küken entfernt, konnte die Antwort auf die mitogene Stimulation wiederhergestellt werden. Dieser Befund wurde dahingehend interpretiert, dass Makrophagen für die Immunsuppression während der frühen zytolytischen Phase verantwortlich sind (LEE et al. 1978b). Es wurde vermutet (SCHAT et al. 2000b), dass aktivierte Milzmakrophagen Stickstoffmonoxid (NO) produzieren, welches einen starken antiproliferativen und damit immunsuppressiven Effekt hat. Der Nachweis erhöhter mRNA-Transkription der induzierbaren Isoform der Stickstoffsynthase in der Milz zwischen dem 6. und 9. Tag nach der Infektion (XING and SCHAT 2000a), erhöhter NO_2^- -Serumkonzentration und einer erhöhten NO-Produktion in der Milz während dieser Zeit unterstützen die Hypothese (SCHAT and MARKOWSKI GRIMSRUD 2001). *In vitro* hemmen MDV-aktivierte Makrophagen zudem die Virusreplikation in CKC (KODOMA et al. 1979b) und führen zu reduzierten Virustitern in Splenozyten (LEE 1979; POWELL et al. 1983a). *In vivo* Studien mit dem Ziel der Aktivierung von Makrophagen durch z.B. eine einmalige Injektionen von Silicon (HIGGINS and CALNEK 1976) oder „Brewer’s thioglycolat Brühe“ (GUPTA et al. 1989) zeigte eine reduzierte Virusreplikation und verspätete Tumorbildung. Übereinstimmend damit führte die Depletion von Makrophagen durch mehrmalige Injektionen von Silicon (GUPTA et al. 1989), die Behandlung mit anti-Makrophagenseren (HAFFER and SEVOIAN 1979) oder wiederholte Gaben von Levamisol (KODAMA et al. 1980) zu einer erhöhten Virusreplikation und frühzeitigen Mortalität.

Natürliche Killerzellen

Bei Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) handelt es sich um Lymphozyten mit zahlreichen zytoplasmatischen Granula, die weder der B- noch der T-Zelllinie zugeordnet werden. Sie können bestimmte Tumorzellen töten und sind wichtige

Effektorzellen in der Abwehr von Virusinfektionen und anderen intrazellulären Erregern. Sie spielen zudem in der so genannten Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) eine hervorragende Rolle. Diese Zellen können verschiedene Zellarten lysieren wenn deren Expression von MHC Klasse I Antigenen gehemmt ist, ein Phänomen, welches häufig bei viralen Infektionen und Neoplasien beobachtet wird (TAY et al. 1998). Beim Huhn wurden mehrere, morphologisch unterschiedliche Zellarten mit NK-Zell ähnlicher Aktivität beschrieben (MANDI et al. 1985; SCHAT et al. 1986; SIEMINSKI-BRODZINA and MASHALY 1991). Da aber spezifische Oberflächenmarker für NK-Zellen fehlen (GOBEL et al. 1996) wurden bisher alle Studien über NK-Zellaktivitäten bei der MD mit bestenfalls partiell gereinigten Zellpräparationen aus Milz, Blut oder Tumoren durchgeführt. Zusammengefasst zeigen diese Studien, dass die mutmaßlichen NK-Zellen schlecht oder nicht in der Lage sind, MDV infizierte bzw. transformierte Zellen zu lysieren (LAM and LINNA 1979; SHARMA and COULSON 1979; SHARMA and OKAZAKI 1981). Allerdings konnte gezeigt werden, dass nach Vakzination mit HVT oder SB-1 (MDV-1 Zelllinie) die NK-Zellaktivität in Milzzellsuspensionen gegenüber LSCC-RP9 Zielzellen, einer durch aviäres Leukosevirus transformierten Zelllinie, deutlich erhöht war (SHARMA 1981; HELLER and SCHAT 1987). Zudem wurden mehrere Studien zur Bedeutung von NK-Zell aktivierenden Zytokinen durchgeführt. Es gelang Ding et al. eine erhöhte NK-Zellaktivität nach Injektionen von polyinosol-polycytidyl Säure (poly I:C), einem IFN- α Induktor, nachzuweisen (DING and LAM 1986). Die gleiche Beobachtung wurde von Keller (KELLER 1992) nach Injektion von Überständen einer MDV-1 Zelllinie (JMV-1) in Hühner gemacht. Diese Studien unterstützen die Hypothese, dass IFN- α/β für die Aktivierung von Säuger-NK-Zellen wichtig ist (BIRON 1997). IL-12 aktivierte NK-Zellen bilden erhebliche Mengen an IFN- γ (KOBAYASHI et al. 1989; BIRON and GAZZINELLI 1995; ORANGE and BIRON 1996; ROMANI et al. 1997) und beeinflussen so die Induktion antiviraler Mechanismen in den Zielzellen (LUCIN et al. 1994) oder wirken indirekt antiviral durch die Induktion des iNOS/NO-Wegs in Makrophagen (MACMICKING et al. 1997; TAY and WELSH 1997).

Zytokine und lösliche Faktoren

Zu dem am besten untersuchten Zytokinen in der MDV Infektion, gehören die Interferone. Schat et al. konnte in Überständen von MDV-infizierten CEC und CKC-Zellkulturen einen Faktor mit antiviraler Aktivität nachgewiesen (SCHAT and GONZALES 1974). Vergleichbare Versuche mit HVT infizierten Kulturen konnten dagegen keine Induktion einer antiviralen Aktivität aufzeigen. Allerdings war es nicht möglich ein Superinfektion in den HVT infizierten CKC-Zellkulturen mit NDV (Newcastle disease Virus) zu etablieren (KALETA and BANKOWSKI 1972b). In Übereinstimmung mit den *in vitro* Versuchen konnte in Tierversuchen mit MDV und HVT-infizierten Hühnern eine Typ I IFN-Produktion nach MDV-Infektion nicht aber nach Infektion mit HVT nachgewiesen werden (KALETA and BANKOWSKI 1972c). Ebenso fanden Hong und Sevoian (HONG and SEVOIAN 1971) eine erhöhte IFN-Produktion in MDV-infizierten Hühnern, wobei MDV-empfindliche Hühnerlinien geringere IFN-Mengen als Tieren einer resistenten Linie produzierte. Volpini et al. (VOLPINI et al. 1995) und Buscaglia und Calnek (BUSCAGLIA and CALNEK 1988) zeigten, dass die Expression viraler Antigene in MDV-infizierten Splenozyten durch die Behandlung mit konditionierten Medien von Con-A stimulierten Hühnermilzzellen, heruntersetzt war. Volpini et al. und Levy et al. (VOLPINI et al. 1995; LEVY et al. 1999) fanden eine Abnahme der Infektiosität in mit nativem IFN behandelten CEC-Zellkulturen und, verbunden damit, eine Abnahme der Expression von pp38- und gB auf der Oberfläche MDV- und HVT-infizierter Zellen. Bei Untersuchungen von MDV-infizierten Milzzellen konnte zwar eine erhöhte Expression der IFN- γ und iNOS mRNA festgestellt werden, eine IFN- α Induktion war aber nicht vorhanden (XING et al. 2000a). In der selben Studie wurde sowohl eine IL-1 β als auch eine IL-8 Induktion nachgewiesen, wobei letztere vermutlich die Expression des im MDV-Genom nachgewiesenen IL-8-Homologs (vIL-8) widerspiegelt (PARCELLS et al. 2001).

Mehrere *in vivo* und *in vitro* Studien beschreiben die Synthese von IFN- γ während der MDV Infektion, sowie eine durch IFN- γ induzierte NO-Produktion. Die bedeutende Rolle, die NO in der Immunantwort gegenüber einer Reihe von DNA-Viren spielt, ist durch zahlreiche Untersuchungen an Säugetieren dokumentiert

(REISS and KOMATSU 1998). Im MDV-Modell konnte gezeigt werden, dass die Virusreplikation dosisabhängig gehemmt wurde, wenn die CEC-Kulturen mit S-nitroso-N-penicillinamin (SNAP), einem NO-Donator, behandelt wurden. Zudem zeigte sich, dass die NO-Produktion in Zellen von resistenten Hühnerlinien erheblich höher war als die in Zellen von empfänglichen Tieren (XING and SCHAT 2000b). In einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass NO-induzierenden Substanzen, IFN- γ und S-nitroso-N-acetylpenicillinamin (SNAP), die Vermehrung von MDV-1 in Hühnerembryozellkulturen hemmen konnte. Wenn Makrophagen mit IFN- γ für 24 Stunden vorbehandelt und anschließend in eine MDV-infizierte Zellkultur gegeben wurden, konnte eine NO-Produktion und gleichzeitig eine deutliche Plaque-Reduktion festgestellt werden. Wurde zugleich ein iNOS-Inhibitor (L-NMMA) zugegeben, stieg zwar der Plaquezahl wieder an, allerdings nicht auf der gleichen Höhe wie in den unbehandelten Kontrollen (DJERABA et al. 2000). Dieser Befund deutet darauf hin, dass IFN- γ produziertes NO nur ein Teil der antiviralen Aktivität von IFN- γ stimulierten Makrophagen induziert. In weiteren Versuchen gelang es in der gleichen Gruppe eine ähnliche iNOS-Expression, NO-Produktion und ein vergleichbares Zytokinmuster in genetisch resistenten Hühnern und in empfänglichen Tieren die gegen MD vakziniert worden waren, nachzuweisen (DJERABA et al. 2002b). Erst kürzlich ist durch Aktivierung der Makrophagen mit cMGF (chicken myelomonocytic growthfactor) in MDV-1 infizierten Hühnern eine erhöhte Expression des iNOS-Gens sowie von IFN- γ und das K203 (makrophagen inflammatorisches Protein) gelungen. Es wurden zudem erhöhte systemische NO-Werte und zirkulierende Monozyten beobachtet, die Mortalität und Tumorbildung wurde deutlich herabgesetzt. Zusätzlich konnte durch der gleichzeitige Impfung mit HVT und cMGF der Tod der Tieren durch MDV-1 verhindert werden und die Tumorbildung deutlich reduziert werden (DJERABA et al. 2002a).

3 Material und Methoden

3.1 Tiere und Tierhaltung

Hühner

Für die Tierversuche wurden SPF-Tiere der Linie Lohmann Selected Leghorn¹ (LSL) verwendet. Die Tiere wurden in Gitterrostkäfigen gehalten und erhielten handelsübliches Küken- und Junghennenalleinfutter² sowie Wasser ad libitum.

Kaninchen

Die Kaninchen, die für die Herstellung polyklonaler Antiseren verwendet wurden, stammten aus hauseigener Zucht. Sie wurden einzeln oder in Gruppen von zwei Tieren in Bodenhaltung gehalten. Gefüttert wurden sie mit handelsüblichem Alleinfutter³ für Kaninchen sowie Wasser ad libitum.

3.2 Materialien

3.2.1 Zelllinien

HD11 Die Hühnermakrophagenzelllinie wurde von Th. Graf⁴ zur Verfügung gestellt (BEUG et al. 1979)

¹ Lohmann Animal Health, Cuxhaven

² Baywa, München

³ Altamin, München

⁴ Europäisches Molekularbiologie Labor (EMBL), Heidelberg

CEC-32 Wachtelembryozelllinie (KAADEN et al. 1982; ZÖLLER et al. 2000)

3.2.2 Antikörper

3.2.2.1 Primäre monoklonaler Antikörper

- 8A9 Ratten Heterohybridomzelllinie, sie produziert einen neutralisierenden Ak gegen ChIFN- α (STAMM 1997)
- 2K11⁵ mAk gegen das Glykoprotein B des MDV
- VAJ-1⁶ mAk gegen das Phosphoprotein 38 des MDV
- 1E12⁷ mAk gegen ChIFN- γ (LAMBRECHT et al. 2000)

3.2.2.2 Sekundäre, kommerziell erhältliche Antikörper

- Anti-Hühner IgG Biotin-konjugiert (Ursprung Kaninchen)⁸
- Anti-Maus IgG, γ -Ketten spezifisch, POD-konjugiert (Ursprung Ziege)⁹
- Anti-Kaninchen IgG, POD-konjugiert (Ursprung Ziege)¹⁰

Für die Biotin-Streptavidin Bindung wurde Streptavidin-Peroxidase (polymer)¹¹ benutzt

⁵ Freundlicherweise von Dr. J. F. Vautherot, L.V.M., INRA, Centre de Recherches de Tours, Frankreich, zur Verfügung gestellt

⁶ Freundlicherweise von Dr. V. Zelnik, Institut of Virology, Slovak Academy of Sciences, Slovakei, zur Verfügung gestellt

⁷ Freundlicherweise von Dr. B. Lambrecht, Section of Avian Virology and Biotechnology, Veterinary and Agrochemical Research Centre, Brüssel, Belgien, zur Verfügung gestellt

⁸ Promega, Madison, VVI, USA

⁹ Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

¹⁰ Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

¹¹ Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

3.2.3 Primers

ICP4¹²:

327 Basenpaare

Primer sense: aat gag cga act gcc tca cac aac

Primer antisense: gat cgc cca cca cga tta cta cct

Anealing Temperatur: 60°C

Zyklenzahl: 35

3.2.4 Virus

RB1B¹³ very virulent (vv) MDV-1

CVI 988¹⁴ Rispens-Impfstamm, „mild virulent“ MDV-1, TAD VacForte

EU-1¹⁵ hochpathogenen (vv⁺) MDV-1

VSV¹⁶ Vesikulostomatitisvirus, Indiana

3.2.5 Zellkulturmedien und Zusätze

3.2.5.1 Medium zur Kultivierung von primären Hühnerembryofibroblasten (CEC)

Wachstumsmedium

RPMI 1640 mit Glutamax¹⁷

5% FCS (inaktiviert bei 56°C für 30 min.)

Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100µg/ml¹⁸

¹² Biometra, Göttingen

¹³ Freundlicherweise von Dr. TF. Davison, Institute for Animal Health, Compton, UK, zur Verfügung gestellt

¹⁴ Freundlicherweise von Lohmann Animal Health, Cuxhaven, zur Verfügung gestellt.

¹⁵ Freundlicherweise von Dr. F. Fehler, Lohmann Animal Health, Cuxhaven, zur Verfügung gestellt

¹⁶ Freundlicherweise von Dr. M. Büttner, Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, zur Verfügung gestellt

¹⁷ Gibco BRL, Eggenstein

¹⁸ Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

Erhaltungsmedium

RPMI 1640 mit Glutamax

1% FCS

Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100µg/ml

3.2.5.2 Medium zur Kultivierung von HD11 Zellen

RPMI 1640 mit Glutamax

8% FCS

2% Hühnerserum¹⁹ (inaktiviert bei 56°C für 30 min.)

Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100µg/ml

3.2.5.3 Medium zur Kultivierung von CEC-32 Zellen

DMEM high glucose²⁰

8% FCS

2% CHS

Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100µg/ml

3.2.5.4 Einfriermedium

90% FCS

10% Dimethylsulfoxid (DMSO)²¹

Bei -20°C lagern

¹⁹ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

²⁰ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

²¹ Applichem, Darmstadt

3.2.6 Puffer und Lösungen

3.2.6.1 Allgemeine Puffer

Posphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): (pH 7,2)

40g NaCl²²

7,2g Na₂HPO₄ x 2H₂O²³

1g KCl²⁴

1g KH₂PO₄

Ad 5000ml Aqua dest.

PBS-Tween:

Zur Herstellung von PBS-Tween (PBST) wurden 0,5 ml Tween 20²⁵ pro 1000 ml PBS zugesetzt.

3.2.6.2 Puffer für der Affinitätschromatographie an Protein-G-Sepharose

Startpuffer (20 mM Phosphatpuffer):

Lösung 1: 1,424g Na₂HPO₄ x 2H₂O ad 400 ml Aqua dest.

Lösung 2: 0,936g NaH₂PO₄ x H₂O²⁶ ad 300 ml Aqua dest.

Durch Zugabe von Lösung 2 in Lösung 1 den pH Wert auf 7,0 einstellen

Elutionspuffer: (pH 2,5)

3,75g Glycin²⁷

ad 500 ml Aqua dest.

²² Applichem, Darmstadt

²³ Applichem, Darmstadt

²⁴ Applichem, Darmstadt

²⁵ Applichem, Darmstadt

²⁶ Applichem, Darmstadt

²⁷ Applichem, Darmstadt

Dialysepuffer : (pH 7,8)

1,65g K_2HPO_4 ²⁸
29,03g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
45,00g NaCl
ad 5000 ml Aqua dest.

3.2.6.3 Puffer und Lösungen für ELISA-Tests

Beschichtungspuffer: (pH 9,6)

3,11g Na_2CO_3
6,00g NaHCO_3
ad 1000 ml Aqua dest.

Blockierungspuffer :

PBS

4% Magermilchpulver²⁹

TMB-Puffer (Natriumacetat-Zitrat Puffer 0,1 M):

Lösung 1: 8,2 g Na-Acetat³⁰ ad 1000 ml Aqua bidest.

Lösung 2: 3,15g Citronensäure³¹ ad 1000 ml Aqua bidest

Lösung 2 in Lösung 1 zugeben bis pH 5,0 erreicht ist.

Tetramethylbenzidin (TMB) Stammlösung:

6 mg/ml TMB³² in DMSO gelöst

²⁸ Applichem, Darmstadt

²⁹ Naturaflo®r®, Töpfer, Dietmannsried

³⁰ Applichem, Darmstadt

³¹ Applichem, Darmstadt

³² Böhlinger, Mannheim

TMB-Substratlösung:

10ml warmer TMB-Puffer (37°C)

332µl TMB-Stammlösung

3 µl H₂O₂³³ (30 %)

Direkt vor der Verwendung ansetzen

Stopreagenz:

1M H₂SO₄³⁴

3.2.6.4 Lösungen für die Nitritbestimmung

Lösung A:

1 g Sulfanilamid³⁵ in 100ml Phosphorsäure (2,5%)³⁶ unter Rühren bei Raumtemperatur lösen. Lagerung lichtgeschützt bei 4°C.

Lösung B:

0,3 g Naphthylethylendiamin³⁷ in 100ml Phosphorsäure (2,5%)³⁸ unter Rühren bei Raumtemperatur lösen. Lagerung lichtgeschützt bei 4°C.

Lösung C:

Direkt vor der Anwendung durch mischen gleicher Teile der Lösungen A und B hergestellt.

NO-Standard (1mM-NaNO₂-Lsg):

6,9 mg NaNO₂

ad 100 ml Aqua bidest

³³ AppliChem, Darmstadt

³⁴ AppliChem, Darmstadt

³⁵ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

³⁶ AppliChem, Darmstadt

³⁷ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

³⁸ AppliChem, Darmstadt

3.2.6.5 Färbe und Fixierungslösungen

Methanol/Aceton- Lösung:

50 % Methanol³⁹

50% Aceton⁴⁰

Bei -20°C lagern

Blockierungspuffer:

5% FCS in PBS

Verdünnungspuffer für sekundäre Antikörper:

1% Bovines Serumalbumin (BSA) (V Fraktion)⁴¹ in PBST

Substratpuffer:

0,1 M Natriumacetat⁴² in Aqua dest. Verdünnt (pH 4,8)

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)⁴³-Stammlösung:

4 mg/ml AEC in N, N-Dimethylformamid (DMF)⁴⁴, lösen im Dunklen bei 4°C lagern

AEC-Entwicklungslösung:

5% AEC-Stammlösung

2,5% H₂O₂⁴⁵

in Substratpuffer direkt vor Verbrauch ansetzen.

³⁹ Merck, Darmstadt

⁴⁰ AppliChem, Darmstadt

⁴¹ Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

⁴² AppliChem, Darmstadt

⁴³ Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

⁴⁴ Fluka, Buchs-Neu-Ulm

⁴⁵ AppliChem, Darmstadt

3.2.6.6 Puffer und Lösungen für der DNA-Gewinnung

Federpufferstammlösung:

10 mM Tris-Cl⁴⁶ (pH 8)

10 mM EDTA⁴⁷

100 mM NaCl⁴⁸

2% Natriumdodecylsulfat (SDS)⁴⁹

Proteinase K Stammlösung:

20 mg/ml Proteinase K⁵⁰

ad Aqua dest.

Bei -20°C lagern

DL-Dithiothieitol (DTT)⁵¹-Stammlösung (1 M)

0,01 mol DTT

ad 10 ml Aqua dest.

Bei -20°C lagern

Federpuffer:

250 µg/ml Proteinase K

40 mM DTT

in Federpufferstammlösung direkt vor Verbrauch lösen

⁴⁶ AppliChem, Darmstadt

⁴⁷ Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

⁴⁸ AppliChem, Darmstadt

⁴⁹ Fluka, Buchs-Neu-Ulm

⁵⁰ Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

⁵¹ Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

3.2.6.7 Puffer für die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Master-Mix (für 1 Probe):

1,5 Taq-Puffer (10x)⁵²

1,5 µl dNTP (2 mM)⁵³

3 µl Primer sense (10 pM)

3 µl Primer antisense (10 pM)

2,8µl RNase freies Aqua bidest.⁵⁴

0,2 µl Taq polymerase⁵⁵

Der Master-Mix wurde gekühlt und kurz vor dem Verbrauch fertig gestellt.

3.2.6.8 Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

6x Probenpuffer⁵⁶:

0,2 % Bromphenolblau⁵⁷

0,2 % Xylencyanol FF⁵⁸

60 % Glycerol⁵⁹

60 mM EDTA

TBE Puffer (10x):

108 g TRIS⁶⁰

55 g Borsäure⁶¹

40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

ad 1000 ml Aqua dest.

⁵² Finnenzymes, Biometra, Göttingen

⁵³ Finnenzymes, Biometra, Göttingen

⁵⁴ Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

⁵⁵ Finnenzymes, Biometra, Göttingen

⁵⁶ MBI Fermentas, St. Leon-Rot

⁵⁷ Merck, Darmstadt

⁵⁸ Bio-Rad, Hercules, CA, USA

⁵⁹ AppliChem, Darmstadt

⁶⁰ ICN Biochemicals, Aurora, OH, USA

⁶¹ Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

3.3 Methoden

3.3.1 Zellkultivierung

Alle Zellen wurden bei einer CO₂-Spannung von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % kultiviert. Bei Hühnerzellen lag die Temperatur bei 40°C, bei Säugerzellen bei 37°C.

Die eingefrorenen Zellen wurden nach dem Auftauen in 50 ml des entsprechenden Zellkulturmediums aufgenommen, zweimal für 10 min bei 400 x g zentrifugiert, in 10 ml Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen so lange inkubiert bis sich ein dichter Zellrasen gebildet hatte.

Behandlung adhärent wachsende Zellen (HD11, CEC-32, primäre CEC):

Zum Ablösen der adhärent wachsenden HD11-Zellen wurden diese mit einem Zellschaber⁶² vom Boden der Zellkulturflasche abgeschabt.

CEC-32 Zellen und primäre CEC wurden mit Trypsin-EDTA⁶³ für 10 min bei 37°C inkubiert.

Die Zellsuspensionen wurden in das jeweilige Medium aufgenommen und zweimal durch Zentrifugation bei 400 x g für 10 min gewaschen, resuspendiert und vor der weiteren Verwendung in 10 ml Medium aufgenommen und gezählt.

3.3.2 Zellzählung

Zur Ermittlung der Zahl und Viabilität der Zellen 1:2 mit Trypanblau vermischt. Die Zählung erfolgte in einer modifizierten Neubauer-Zählkammer⁶⁴.

3.3.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zelllinien wurden 1×10^7 Zellen in einem Kryoröhrchen⁶⁵ durch Zentrifugation bei 400 x g und 4°C pelletiert und in 1,8 ml Einfriermedium resuspendiert. Das Röhrchen wurde in einer Einfrierbehälter (Cryo 1°C Freezing

⁶² Nalge Nunc International, Wiesbaden-Bierbach

⁶³ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

⁶⁴ Brand GmbH & Co. KG, Wertheim

⁶⁵ Nalge Nunc International, Wiesbaden-Bierbach

Container⁶⁶) über Nacht bei -80°C eingefroren und anschließend bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3.4 Gewinnung von primären Hühnerfibroblasten (CEC)

10 bis 12 bebrütete Eier (10 Tag) wurden mit Incidur-Spray⁶⁷ desinfiziert. Anschließend wurden die Eier am spitzen Pol geöffnet und die Schalen entfernt. Der Embryo wurde mit einer sterilen Pinzette entnommen und in eine sterile Glas-Petrischale abgelegt. Die Embryonen wurden so angeordnet, dass sie mit der Rumpfseite dem Zentrum der Schale zugewandt sind, und die Köpfe über dem Rand der Schale lagen. Durch leichtes Drehen des Schalendeckels, wurden sie dekapitiert. Die Rumpfe wurden in der Petrischale mit etwas PBS gewaschen, und Herz, Leber und Magen-Darm-Trakt wurden entfernt. Anschließend wurden die Embryonen in einen mit PBS gefüllten Erlenmeyerkolben überführt, und unter Verwendung eines Magnetrührers erneut für 5 Minuten gewaschen. Danach wurde der Kolben auf eine geneigte Unterlage gestellt, um eine optimale Sedimentation der Embryonen zu erreichen. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, und ein erneuter Waschschrift angeschlossen.

Um eine Einzelzellsuspension zu erlangen, musste ein Gewebeverdau mit einer 5%igen Trypsin-PBS Lösung erfolgen. Dazu wurden ca. 30 ml dieser Lösung in den Erlenmeyerkolben gegossen, welche für 30 Minuten bei 37°C unter ständigem Rühren einwirkte. Erneut wurde der Kolben auf eine geneigte Unterlage gestellt, um eine Sedimentation großer, unverdaulicher Gewebsteile zu erreichen. Der Überstand wurde vorsichtig in 50-ml-Zentrifugenröhrchen dekantiert, wobei die Portion pro Röhrchen 25 ml nicht überschreiten sollte. Die Röhrchen wurden mit Wachstumsmedium aufgefüllt und für 10 Minuten bei $400 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Wachstumsmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde durch ein steriles Metallsieb in ein neues 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension der Pellets wurde die Zellkonzentration der Suspension ermittelt.

Um innerhalb eines Tages einen Monolayer zu gewinnen, wurden die Zellen in einer Dichte von $7,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät.

⁶⁶ Nalge Nunc International, Wiesbaden-Bierbach

⁶⁷ Henkel Hygiene, Düsseldorf

3.3.5 Virusvermehrung

Um hochtitrige Präparationen des MDV-1 Stammes RB1B⁶⁸ zu gewinnen wurde Monolayer von primären CEC mit einer geringen Virusdosis (500 PFU/ml) in einer 80 cm² Zellkulturflasche infiziert. Die Zellkulturen wurde so lange inkubiert bis sie sich von dem Boden der Flasche ablösten, dann wurden die Zellen abgenommen, einmal bei 400 x g für 10 min zentrifugiert in frisches Medium aufgenommen und erneut auf primäre CEC gegeben. Der Inhalt einer Zellkulturflasche wurde auf vier neuen Flaschen aufgeteilt. Diese Passagierung wurde 5-6 mal wiederholt. Zum Schluss wurden die infizierten Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Virustiter wurde im Plaque-Assay ermittelt.

3.3.6 Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen ChIFN-b

3.3.6.1 Immunisierungen:

Zur Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen ChIFN- β wurden zwei Kaninchen mit rekombinaten, aus *E.coli* gereinigten ChIFN- β ⁶⁹ (SICK et al. 1996) immunisiert. Für die Erstimmunisierung wurden 1 ml einer Lösung mit 400 μ g/ml ChIFN- β und 1 ml Freund's inkompletten Adjuvans⁷⁰ (FIA) versetzt. Nach Emulgation durch mehrfaches Auf- und Abziehen durch eine Kanüle (0,4 mm Durchmesser) wurden jedem Kaninchen 0,5 ml der Lösung an der seitlichen Brustwand subcutan injiziert. Für die Booster-Immunisierungen im Abstand von vier Wochen wurde ebenfalls FIA als Adjuvanz verwendet.

3.3.6.2 Gewinnung der Antiseren

In zwei- bis dreiwöchigem Abstand wurden den Kaninchen ca. 20 bis 30 ml Blut aus der Arteria auricularis media entnommen und für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Nachdem das Blut über Nacht bei 4°C gelagert wurde, wurde das Serum steril abgenommen, in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zwei Mal für 15 min

⁶⁸ Freundlicherwiese von Dr. T.F. Davison, Institute for Animal Health, Compton, UK, zur Verfügung gestellt

⁶⁹ Freundlicherwiese von Prof. Dr. P. Staeheli, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie, Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt

⁷⁰ Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

bei 400 x g zentrifugiert. Zum Schluss wurde das gewonnene Antiserum in ein steriles Röhrchen gegeben und bei -20°C bis zu weiteren Verwendung gelagert.

3.3.6.3 Bestimmung der Wirksamkeit des Antiserums mittels „Enzyme linked Immunoabsorbant Assay“ (ELISA)

Die Spezifität der gewonnenen polyklonalen Antiseren wurde mittels eines ELISA gegen ChIFN- β ⁷¹ nachgewiesen. Dafür wurde eine 96-Lochplatte (Maxisorb[®])⁷² mit 100 μl ChIFN- β (in Beschichtungspuffer verdünnt) bei 4°C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag dreimal mit PBST gewaschen. Die Platte wurde danach eine Stunde mit 200 μl Blockierungspuffer bei 37°C inkubiert und wiederum sechsmal gewaschen. Anschließend wurden in jeder Kavität 50 μl des 1:200 in PBS verdünnten Antiserum aufgetragen und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte sechsmal mit PBST gewaschen. Zu jeder Kavität wurde der sekundäre Antikörper (Antikaninchen-IgG-POD-konjugiert) (50 μl /Kavität, 1:14.000 verdünnt in PBST)) pipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde erneut sechsmal in PBST gewaschen. Für die Auswertung wurden 50 μl TMB-Substratlösung pro Kavität zugegeben, 10 min im Dunkeln inkubiert und danach mit 1 M Schwefelsäure (50 μl /Kavität) versetzt um die Farbreaktion zu stoppen. Der Extinktion wurde im ELISA-Reader⁷³ bei 450 nm gemessen.

3.3.7 Aufreinigung der IgG Fraktion aus polyklonalen Antiserum oder Zellkulturüberstand

Die Zellkulturüberstände oder das gewonnene Serum wurden mittels Affinitätschromatographie an Protein-G-Sepharose (AKERSTROM et al. 1985) gereinigt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf die Säule 45 min bei 4°C und 45.000x g zentrifugiert und anschließend steril filtriert. Nach dem Waschen der Säule mit Startpuffer wurden 2-5 ml IFN- β -Antiserum oder 600 ml Zellkulturüberstand der mAk produzierenden Hybridomzelllinien 1:2 mit Startpuffer verdünnt und die Probe mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min. aufgetragen.(Nachdem die ganze

⁷¹ Freundlicherweise von Dr. P.Sthaeheli, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie, Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt.

⁷² Nalge Nunc International, Wiesbaden-Bierbach

⁷³ Tecan, Sunrise Remote Control Reader, SLT, Salzburg, AUS

Probenlösung aufgetragen war, wurde solange mit Startpuffen waschen bis die Extinktion die Basiswertes wieder erreichte. Anschließend wurde die gebundene IgG Fraktion mit Elutionspuffer eluiert und mit 1 M Tris-HCl neutralisiert. Das Eluat wurde in einem Dialyseschlauch⁷⁴ in Dialysepuffer umgepuffert.) Der so gereinigte Antikörperlösung wurde steril filtriert und die IgG-Konzentration bei 280 nm photometrisch bestimmt (JOHNSTONE and THORPE 1987).

3.3.8 Bioassay zur Bestimmung der antiviralen Aktivität (antiviraler Assay) in Anlehnung an Lewis et al. (LEWIS 1987)

Dieser Test dient zur Bestimmung der induzierten antiviralen Aktivität in Zellkulturüberstand, die auf dem Vorhandensein von Typ I IFNs beruht. 1×10^5 Zellen der CEC-32 Zelllinie wurden pro Kavität einer 96-Loch-Zellkulturplatte ausgesät und so lange bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis ein dichten Zellrasen gewachsen war. Anschließend wurden die Überstände verworfen und die Zellen für 24 Stunden mit den zu testenden Zellkulturüberständen bzw. Interferonlösungen inkubiert. Nach erneutem Entfernen der Überstände wurden die Zellen mit Vesikulostomatitis-Virus infiziert (100µl/Kavität). Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurde der Test durch lichtmikroskopische Beurteilung des zytopathogenen Effektes (cpE) ausgewertet. Zur Dokumentation und Quantifizierung wurden die Zellen nach der Methode von Dijkmans et al. (DIJKMANS et al. 1989) mit Neutralrot gefärbt. Dazu wurden je 200µl einer Neutralrotlösung⁷⁵ (1:66 Verdünnt) zu jeder Kavität gegeben, nach zweistündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Platte fünfmal mit PBS gewaschen und getrocknet. Um die Extinktion des von den noch lebenden Zellen aufgenommenen Neutralrots zu messen, wurden die Platten mit einer 3 M Guanidin-HCl-Lösung⁷⁶ für fünf Minuten auf einem Plattenschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 540 nm im ELISA-Reader⁷⁷ bestimmt. Als Negativkontrolle dienten vier Kavitäten, in denen die Zellen in Medium ohne VSV kultiviert wurden und als Positivkontrolle vier weitere Kavitäten, die nur VSV-haltiges Medium erhielten.

⁷⁴ Roth, Karlsruhe

⁷⁵ Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

⁷⁶ Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

⁷⁷ Tecan, Sunrise Remote Control Reader, SLT, Salzburg, AUS

3.3.9 Nitritbestimmung in Zellkulturüberständen (NO-Assay) in Anlehnung an Green et al. (GREEN et al. 1982)

Primäre Makrophagen (1×10^5 Zellen/Kavität) oder HD11 Zellen (1×10^5 Zellen/Kavität) wurden für 24 Stunden oder 48 Stunden mit den zu testenden Proben bei 40°C und 5% CO₂ inkubiert. Das von IFN- γ -stimulierten Makrophagen gebildete Stickstoffmonoxid (NO) reagiert in wässrigen Lösungen zu den stabileren Produkten Nitrat (NO₃⁻) und Nitrit (NO₂⁻) in einem Verhältnis von 2:3 um. Mit Hilfe der Griess-Reaktion kann die Nitritkonzentrationen in den Zellkulturüberständen photometrisch gemessen werden. Hierzu wurden je 50 μ l der zu testenden Lösung in die Kavitäten einer 96-Lochplatte pipettiert und mit je 50 μ l Griess-Reagenz (Lösung C, siehe 3.2.6.4) versetzt. Die Farbreaktionen wurde bei 540 nm in den ELISA-Reader⁷⁸ quantifiziert. Aus den Extinktionswerten einer Verdünnungsreihe der Natriumnitrit-Stammlösung wurde eine Regressionsgerade erstellt und anhand dieser, die Nitritkonzentration der Proben ermittelt.

3.3.10 Plaque Assay zur Bestimmung der plaquebildenden Einheiten des Marek disease Virus

Zur Quantifizierung der plaquebildenden Einheiten (PFU) einer MDV-infizierten CEC-Kultur wurden je 2 ml/Kavität ($7,5 \times 10^5$ Zellen/ml) einer Zellkulturplatte mit sechs Kavitäten (9,6 cm²) ausgesät und bei 40°C und 5% CO₂ inkubiert. 12 Stunden nach Inkubation wurden alle nicht-adhären Zellen durch zwei Waschschriffe mit PBS entfernt, und weiter inkubiert bis sich ein dichte Zellrasen gebildet hat. Die Zellkulturen wurden ab diesem Schritt mit Erhaltungsmedium kultiviert. Zur Infektion wurden MDV infizierte Zellen auf die Kulturen titriert.

Die infizierten Zellkulturen wurden so lange inkubiert bis sich ein deutlicher cpE zeigte (ca. 6 Tage nach Infektion). Die gebildeten Plaques wurden durch Färbung mit den monoklonalen Antikörper 2K11 oder VAJ-1 (siehe 3.4.11) ermittelt und mikroskopisch gezählt.

Falls der antivirale Effekt von Zytokinen in vitro geprüft werden sollte, wurde das Zytokin 12 Stunden vor der Infektion zugefügt, zusammen mit dem Virus oder nach der Infektion hineingegeben.

⁷⁸ Tecan, Sunrise Remote Control Reader, SLT, Salzburg, AUS

3.3.11 Quantifizierung der PFU mittels MDV-spezifischer Antigene

Die infizierten CEC-Kulturen wurden zweimal mit PBS gewaschen, dann in einer eiskalten Methanol/Ethanol Lösung (1:1) bei -20°C für 10 min fixiert und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit Blockierungspuffer für 1 Stunde bei 37°C blockiert. Die Zellen wurden entweder mit den Antikörpern 2K11 (1:500 in Blockierungspuffer verdünnt) oder VAJ-1 (1:500 in Blockierungspuffer verdünnt) 1 Stunde bei 37°C inkubiert und danach dreimal mit PBST gewaschen. Die mit dem 2K11 inkubierten Zellkulturen wurden anschließend mit einem gegen murines IgG gerichteten, POD-konjugierten Antikörper (1:500 in PBST mit 1% BSA verdünnt) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die mit dem VAJ-1 behandelten CEC-Kulturen wurden nach der Inkubation und den Waschschritten mit einem gegen Hühner-IgG gerichteten biotinylierten Antikörper (1:500 in PBST mit 1% BSA verdünnt) inkubiert, drei mal mit PBST gewaschen und anschließend mit Streptavidin-POD (1:1.000 in PBST mit 1% BSA verdünnt) 1 Stunde inkubiert. Zum Anfärben der Zellkulturen wurden sie mit AEC-Entwicklungslösung im Dunklen solange inkubiert, bis ein deutlicher Farbumschlag zu sehen war. Die Platten wurden zum Schluss mehrmals mit Aqua dest. gespült um die Farbreaktion zu enden. Die rötlich gefärbten Plaques wurden unter dem Mikroskop gezählt.

3.3.12 DNA Isolierung aus Hühnerblut

Es wurden je Huhn $100\mu\text{l}$ Blut genommen in ein mit $100\mu\text{l}$ Natriumzitat gefülltes Röhrchen überführt. Die Blutproben wurden bei $400 \times g$ für 2 min zentrifugiert und das Plasma abgenommen. Die korpuskulären Blutbestandteile wurden dann in $500\mu\text{l}$ PBS resuspendiert und anschließend mit $500\mu\text{l}$ Percoll⁷⁹ gut gemischt. Die Proben wurden dann 10 min bei $400 \times g$ zentrifugiert und der „Buffycoat“ abgenommen. Anschließend wurde er mit PBS für 10 min bei $800 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in $200 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen. Anschließend wurde die DNA nach dem Protokoll des QIAamp Blood DNA-Kits^{® 80} isoliert. Die gewonnenen Proben wurden bei -20°C gelagert.

⁷⁹ Amersham-Pharmacia, Uppsala, SE

⁸⁰ Qiagen, Hilden

3.3.13 DNA Isolierung aus Milzzellen

Die Milz des Huhnes wurde steril entnommen und in einer sterilen Petrischale nachdem die Milzkapsel entfernt wurde mit einem Skalpell zerkleinert. Die Gewebeteile wurden in ein mit PBS gefülltes Röhrchen überführt und suspendiert. Die Suspension wurde auf 15 ml PBS aufgefüllt und 10 min auf Eist inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein 50 ml Röhrchen mit 10 ml Ficoll⁸¹ gefüllt und mit 10 ml der Zellsuspension vorsichtig überschichtet. Daran schloss sich eine 25-minütige Zentrifugation bei 400 x g an. Die in der Interphase angereicherten Leukozyten wurden mit einer Pipette gewonnen und in ein neues Röhrchen gegeben, in PBS aufgenommen und für 10 min bei 400 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA nach dem Protokoll des QIAamp[®] DNA Blood Kits isoliert. Die isolierten Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.3.14 DNA Isolierung aus Federfollikelepithel

Nachdem Trocknen der Federn wurde ein kurzes Stück(ca. 3 mm) von der Spitze des Federkiesels abgeschnitten in ein Eppendorfröhrchen überführt. Zu jeder Federprobe wurden 200 µl frisch angesetzter Federpuffer zugegeben und die Proben bei 56°C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden je Probe 200 µl Ethanol⁸² und 200 µl AL Buffer, aus dem QIAamp Blood Kit[®] zugegeben und gründlich vermischt. Die folgende Isolierung der DNA wurde nach der Vorschrift des QIAamp[®] DNA Blood Kits durchgeführt. Die Lagerung der erfolgte bei -20 °C.

3.3.15 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Nach der DNA Aufreinigung wurde der Master-Mix (3.2.6.7) in einem getrennten Raum, um eine Kontaminationen der Proben zu verhindern angesetzt. Anschließend wurden 10 µl des Master Mixes mit 4µl der Probe gemischt. Für die PCR wurden folgende Bedingungen gewählt:

Annealingtemperatur:	60°C
Zyklen der Replikation:	35

⁸¹ Amersham-Pharmacia, Uppsala, SE

⁸² Diesterfeld, Nürnberg

3.3.16 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Agarose-Gelelektrophorese wurde 2 % Agarose⁸³ in 1x TBE Puffer gegeben und im Mikrowellengerät solange zum Sieden gebracht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat, anschließend wurde das Gel gegossen. Als Laufpuffer diente der 1x TBE Puffer, die Proben wurden mit 6x Probenpuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Für den Probenlauf wurde eine Spannung von 80 V für 20-40 Minuten, abhängig von der Größe des Gels angelegt. Als Entwickler diente eine Ethidiumbromid⁸⁴-Lösung mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml, die Entwicklungsdauer betrug 40 Minuten. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 302 nm.

⁸³ Gibco BRL, Karlsruhe

⁸⁴ Merck, Darmstadt

4 Ergebnisse

4.1 Typ I Interferone

4.1.1 Nachweis der antivirale Aktivität in MDV infizierte CEC

Schon 1972 gelang es Kaleta et al. eine induzierbare antivirale Aktivität in Überständen von MDV-infizierten CEC nachzuweisen (KALETA and BANKOWSKI 1972a; KALETA et al. 1972b). Eine genauere Charakterisierung dieser Aktivität erfolgte bisher aber nicht. In einer ersten Versuchsreihe wurden daher CEC mit MDV-1 (RB1B oder CVI 988) infiziert. An den folgenden 7 Tagen nach der Infektion (dpi.) wurden täglich Überstände genommen und deren antivirale Aktivität (AVA) im Bioassay (siehe 3.3.8) quantitativ untersucht.

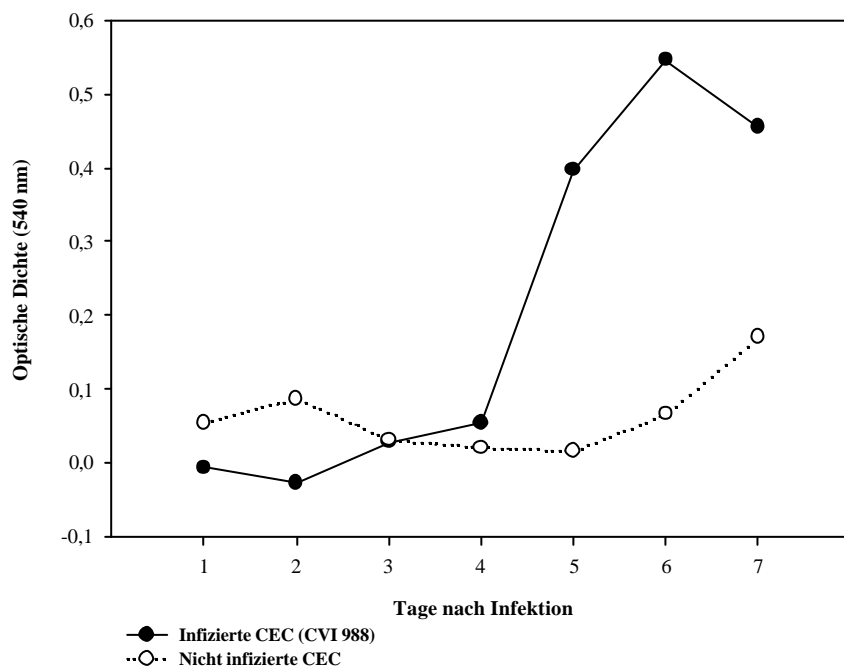


Abb. 1: Antivirale Aktivität in Überstände von MDV (CVI 988) infizierten CEC

CEC-32 Zellen (1×10^5 Zellen/Kavität) wurden für 24 Stunden mit CVI 988 Überständen inkubiert und anschließend mit VSV infiziert. Die optische Dichte (540 nm) korreliert mit der Konzentration der AVA in den getesteten Überständen (Viruskontrolle: 0,049; Mediumkontrolle: 0,545)

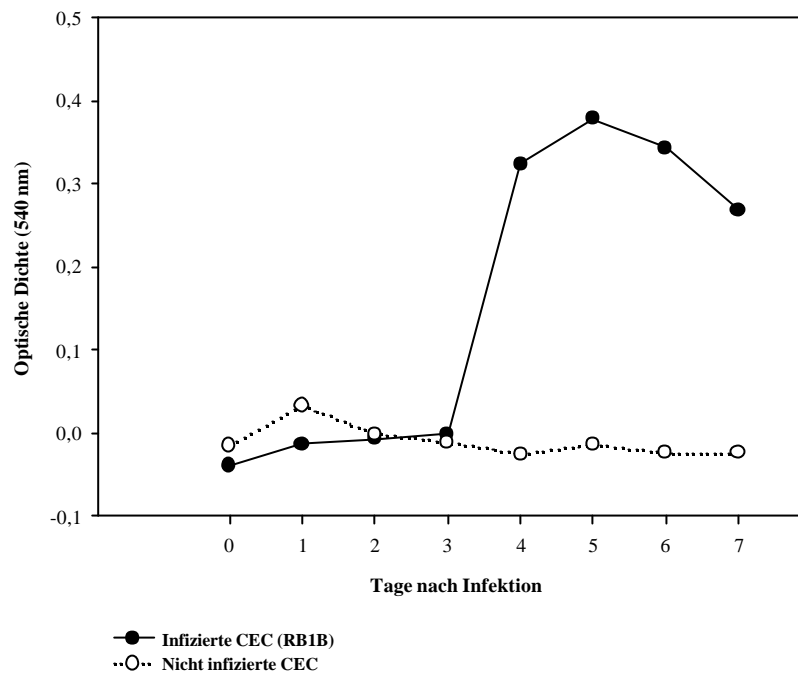


Abb.2: Antivirale Aktivität in Überständen von MDV-1 (RB1B) infizierten CEC

CEC-32 Zellen (1×10^5 Zellen/Kavität) wurden für 24 Stunden mit RB1B Überständen inkubiert und anschließend mit VSV infiziert. Die optische Dichte (540 nm) korreliert mit der Konzentration der AVA in den getesteten Überständen (Viruskontrolle: 0,034; Mediumkontrolle: 0,304)

Wie die Abbildungen 1 und 2 zeigen, war es möglich mit den beiden zur Verfügung stehenden MDV-1 Serotypen die Sekretion einer löslichen, antiviral wirksamen Komponente in infizierte CEC zu induzieren. Diese Aktivität konnte erstmals an Tag vier (RB1B) nachgewiesen werden. Ein Maximum der AVA wurde am Tag fünf (RB1B) beziehungsweise Tag sechs (CVI 988) nach der Infektion der Zellkultur beobachtet.

4.1.2 Neutralisation der antiviralen Aktivität

Die beschriebenen Versuche zeigten, dass Fibroblasten nach MDV-1 Infektion einen löslichen antiviralen Faktor bilden und sezernieren. Um nachzuweisen, dass es sich dabei um ein Interferon handelte, wurden weitere Neutralisationsversuche mit spezifischen Antiseren durchgeführt. Für Hühner IFN- α standen bereits ein neutralisierendes Antiserum und ein neutralisierender monoklonaler Antikörper (mAk) zur Verfügung. Um auch eine antivirale Aktivität des IFN- β nachweisen zu können musste zunächst ein, für dieses Zytokin spezifisches, Antiserum entwickelt werden.

4.1.2.1 Gewinnung und Charakterisierung eines neutralisierenden polyklonalen Antiserums gegen ChIFN- β

Für die Gewinnung eines entsprechenden Antiserums wurden Kaninchen mit rekombinatem gereinigtem ChIFN- β aus *E.coli* mehrfach immunisiert. Die Seren wurden 1:80 mit Medium verdünnt und mit Überständen, von ChIFN- β transfizierten COS-Zellen für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend in dem biologischen Test zum Nachweis der antiviralen Aktivität (3.4.8) eingesetzt. In gleicher Weise wurden rChIFN- α und das Antiserum gegen ChIFN- α sowie der monoklonale Antikörper (8A9) im Nachweisverfahren als Kontrollen mitgeführt.

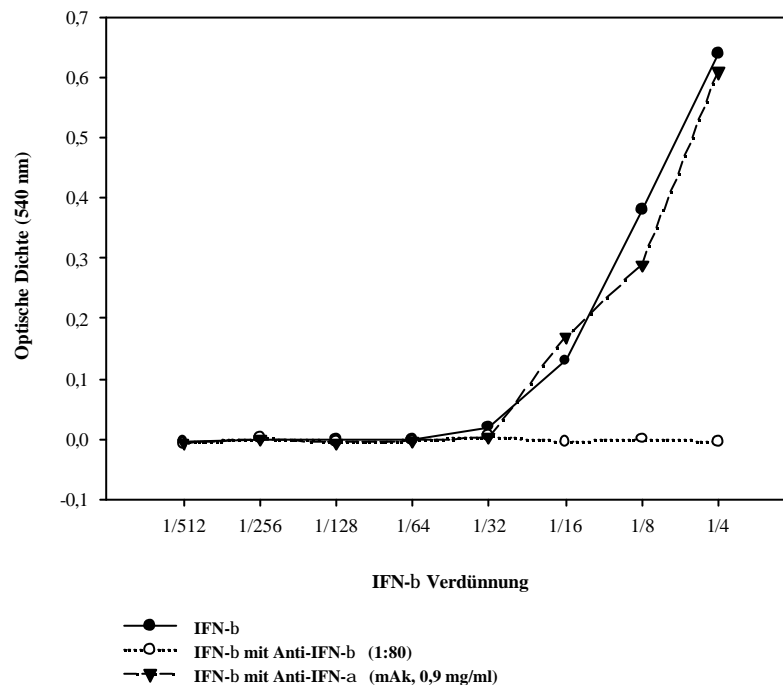


Abb. 3: Neutralisierende Wirkung des polyklonalen Antiserums auf ChIFN- β

Optische Dichte (540 nm), der mit IFN- β /Antiserum-Lösung inkubierten CEC-32 Zellen (1×10^5 Zellen/Kavität). IFN- β wurde in 1:2 Schritten verdünnt, das polyklonale Antiserum konstant in einer 1:80 Verdünnung eingesetzt (Viruskontrolle:0,036, Mediumkontrolle:0,453)

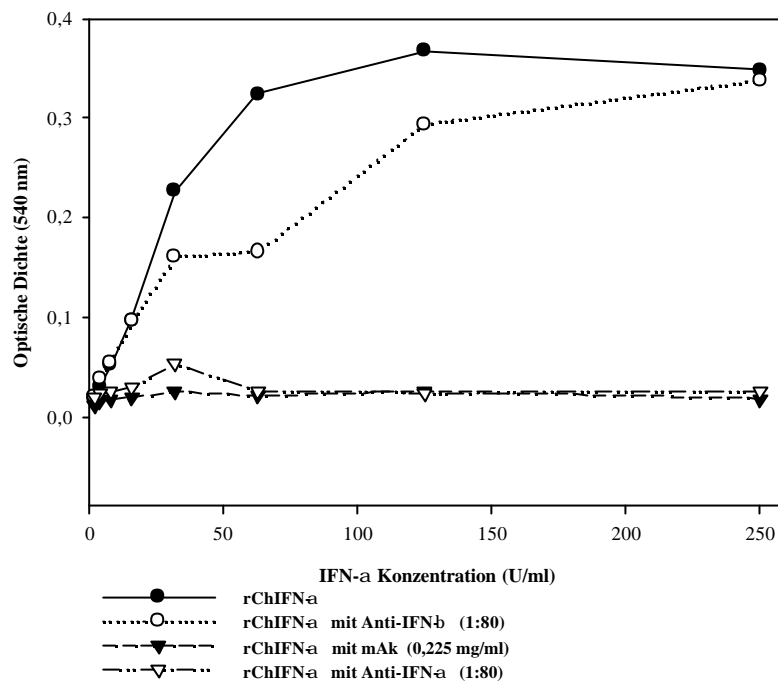


Abb. 4: Neutralisierende Wirkung des polyklonalen Antiserums auf ChIFN-α

Optische Dichte (540 nm), der mit IFN-β/Antiserum-Lösung inkubierten CEC-32 Zellen (1×10^5 Zellen/Kavität). IFN-α wurde in 1:2 Schritten verdünnt, das polyklonale Antiserum konstant in eine 1:80 Verdünnung und der Antikörper konstant 0,225 mg/ml eingesetzt (Viruskontrolle: 0,021, Mediumkontrolle: 0,392)

Die in den Abbildungen 3 und 4 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das Antiserum gegen IFN-β die biologische Aktivität des Zytokins vollständig hemmt.

Dieser Effekt ist spezifisch, da in keinem Versuch eine Hemmung der Aktivität von IFN-α beobachtet wurde (Abb. 4). Wie die gleichzeitig geprüften Kontrollen zeigen, neutralisierte weder das anti-IFN-α Antiserum noch der monoklonale Antikörper 8A9 die antivirale Aktivitäten von IFN-β. Somit standen die notwendigen Werkzeuge für die weiteren Untersuchungen zur Verfügung.

4.1.2.2 Neutralisation der antiviralen Aktivität in Zellkulturüberständen von MDV infizierten Fibroblasten

Für die weiteren Versuche wurden die Überstände MDV infizierter Fibroblastenkulturen genutzt, die die höchsten antiviralen Aktivitäten aufwiesen. Diese Proben wurden in unterschiedlichen Verdünnungen für 24 Stunden bei 37°C mit den spezifischen Antiseren, bzw. dem mAk 8A9 vorinkubiert und anschließend im antiviralen Test analysiert.

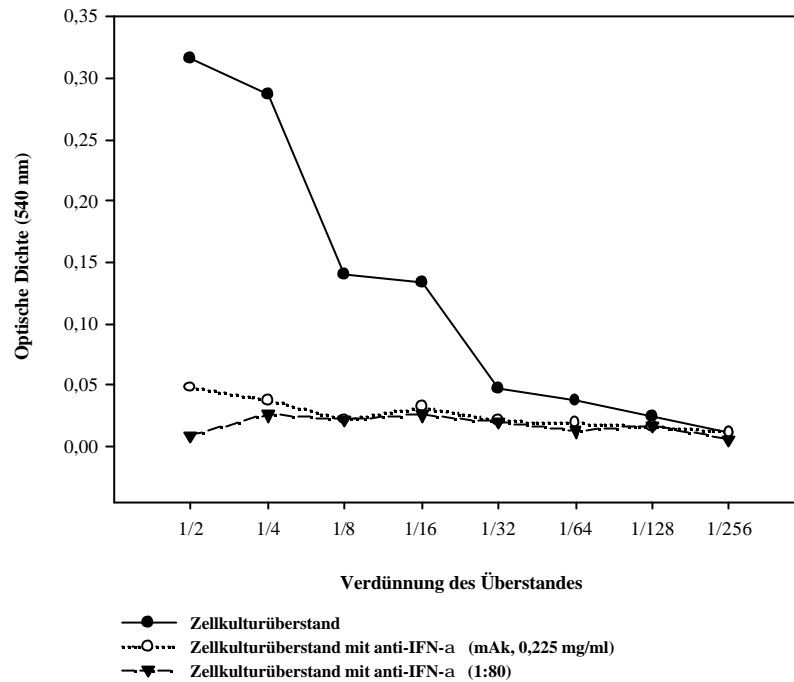


Abb. 5: Neutralisation der antiviralen Aktivität im Überstand einer MDV-1 (RB1B) infizierten Fibroblastenkultur.

Der Fibroblastenzellkulturüberstand wurde in verschiedenen Verdünnungen mit dem mAk 8A9 (0,225 mg/ml) oder dem anti-IFN- α Antiserum (1:80) für 2 Stunden vorinkubiert und anschließend auf CEC-32 Zellen gegeben (Viruskontrolle: 0,020, Mediumkontrolle: 0,391)

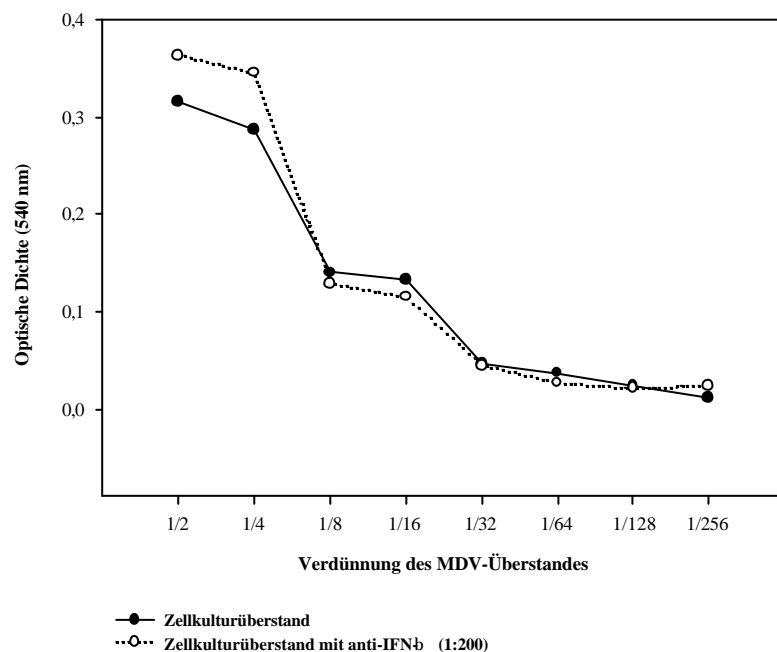


Abb 6: Neutralisation der antiviralen Aktivität im Überstand einer MDV-1 (RB1B) infizierten Fibroblastenkultur.

Der Fibroblastenzellkulturüberstand wurde in verschiedenen Verdünnungen mit dem anti-IFN- β Antiserum (1:80) für 2 Stunden vorinkubiert und anschließend auf CEC-32 Zellen gegeben (Viruskontrolle: 0,028 ; Mediumkontrolle: 0,421)

Wie die Abbildung 5 zeigt, wurde die antivirale Aktivität sowohl durch den mAk 8A9, als auch durch das anti-IFN- α Antiserum vollständig neutralisiert. Durch die Inkubation der MDV-Überstände mit dem polyklonalen Antiserum gegen IFN- β wurde die antivirale Aktivität nicht beeinflusst (Abb. 6). In identisch durchgeführten Neutralisationsversuchen mit MDV-Überständen, die am 4. bzw. 5. Tag nach Infektion gewonnen wurden, wurde der gleiche Effekt der Antiseren und des monoklonalen Antikörpern beobachtet. Diese Daten zeigen, dass die MDV Infektion zur selektiven Induktion der Synthese von IFN- α , nicht aber zu der des IFN- β führt.

4.1.3 Einfluss von IFN-a auf die MDV-Infektion in vitro

Da die bisherigen Versuche klar zeigen, dass eine MDV-Infektion zur IFN- α Synthese führt, sollte im Weiteren die Rolle dieses Zytokins in der MDV-Infektion untersucht werden.

Die Versuche wurden zunächst mit dem apathogenen Impfstamm CVI 988 (Rispons Vac Forte) durchgeführt und anschließend mit einem hochpathogenen MDV-1 Stamm (RB1B) wiederholt, um mögliche unterschiedliche Wirkungen nachzuweisen.

4.1.3.1 Effekte von IFN-a auf MDV-infizierte CEC

Primäre CEC von 10 Tage alte Embryos wurden nachdem sie einen dichten Zellrasen gebildet hatten, für 24 Stunden mit ChIFN- α in unterschiedlichen Konzentrationen vorbehandelt. Anschließend wurden die Kulturen mit MDV (CVI 988) infiziert und für sechs Tage inkubiert. Nachdem die Zellkulturen mit MDV spezifischen Antikörpern gefärbt worden waren, wurde die Plaquezahl ermittelt.

Analog zu dem Versuch mit CVI 988 wurde ein Versuch mit dem hochpathogenen MDV-1 Serotyp RB1B durchgeführt. Die Zellkulturen wurden ebenso für sechs Tage inkubiert und anschließend gefärbt.

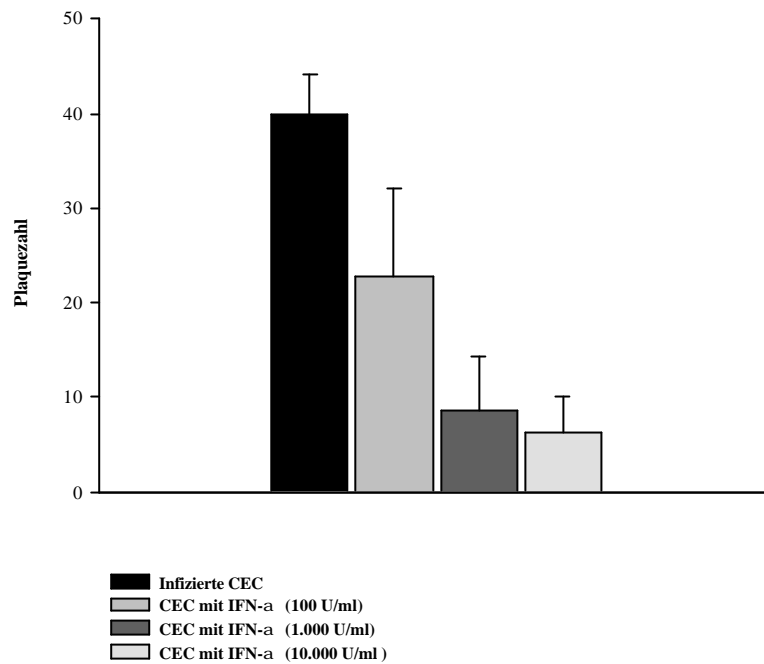


Abb. 7: Effekte von IFN-α auf das Wachstum eines apathogenen MDV-1 Serotyps (CVI 988)

Dargestellt sind die Mittelwerte der Plaquezahlen von je fünf Kavitäten einer 6-Lochzellkulturplatte. Die Zellkulturen wurden mit der mAk 2K11 (anti-gB). Als Kontrolle dienten infizierte nicht behandelte CEC-Kulturen (Virusverdünnung: $1:1 \times 10^5$ der Impfstoffstammlösung)

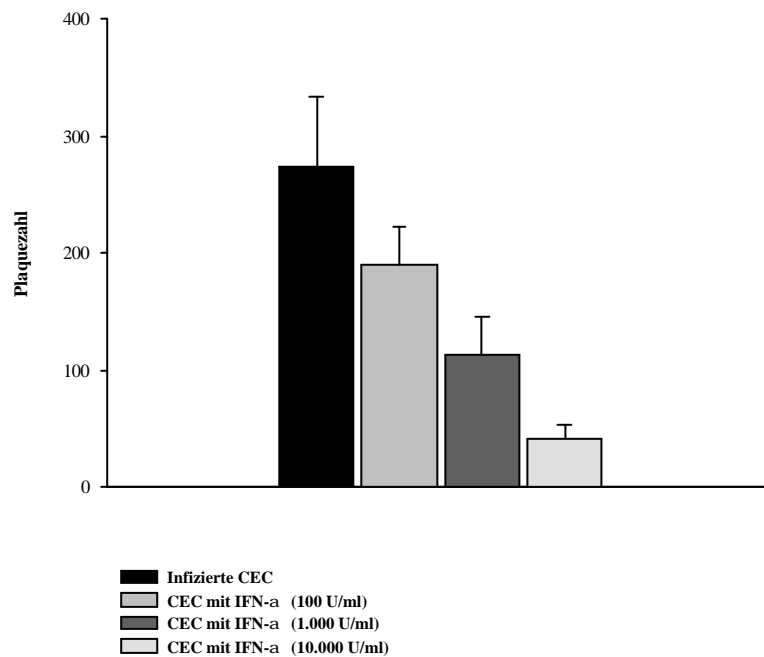


Abb 8.: Effekt von IFN-α auf das Wachstum eines hochpathogenen MDV-1 Serotyps (RB1B)

Dargestellt sind die Mittelwerte der Plaquezahlen von je fünf Kavitäten einer 6-Lochzellkulturplatte. Die Zellkulturen wurden mit der mAk VAJ-1 (anti-pp38). Als Kontrolle dienten infizierte nicht behandelte CEC-Kulturen (Viruskonzentration: 400 PFU/Kavität)

Wie aus den Abbildungen 7 und 8 zu entnehmen ist, führt die Vorbehandlung der Kulturen mit IFN- α zu einer dosisabhängigen Reduktion der Plaquezahlen. Dieser Effekt konnte sowohl für den apathogenen Impfstamm CVI 988 als auch für das hochvirulente Isolat RB1B gezeigt werden.

Da die Kulturen in diesem Versuchsansatz mit IFN- α vorinkubiert worden waren, stellte sich die Frage, ob eine antivirale Wirkung auch erzielt werden kann, wenn das Zytokin gleichzeitig mit dem Virus oder nach Virusinokulation den Kulturen zugesetzt wird.

Für diese Versuche wurden Fibroblasten entweder 24 Stunden mit ChIFN- α vorbehandelt, oder ChIFN- α mit dem Inokulationsvirus zugleich oder 48 Stunden nach Virusinokulation den Kulturen zugesetzt. Als Interferondosis wurden 1.000 U/ml gewählt, da die vorausgegangenen Versuche mit dieser Dosis einen klaren Effekt gezeigt hatten.

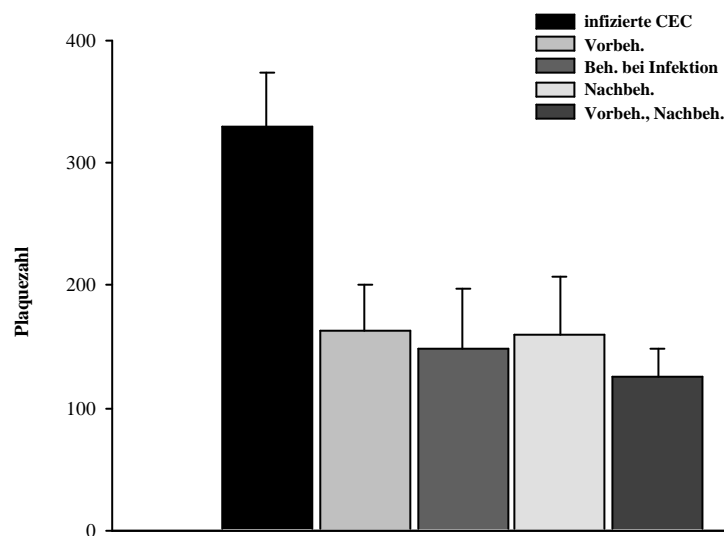


Abb. 9: Plaquezahl IFN- α behandelter Fibroblastenkulturen nach RB1B Infektion

Mittelwert von je fünf Kavitäten einer 6Lochplatte. Die Kulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten behandelt und in einen Fall wiederholt behandelt. Die Plaques wurden sechs Tage nach Infektion mit VAJ-1 (anti-pp38) gefärbt und gezählt. Als Kontrolle diente unbehandelte infizierte CEC (Viruskonzentration: 400 PFU/Delle)

Erklärung der Legende: *Vorbeh.*: Behandlung mit rChIFN- α (1.000 U/ml) 24 Stunden vor der Infektion. *Beh. bei Infektion.*: Gleichzeitige Infektion und Behandlung mit rChIFN- α der Zellkulturen. *Nachbeh.*: Behandlung mit rChIFN- α 48 Stunden nach der Infektion

Wie Abbildung 9 zu entnehmen ist, hatten die unterschiedlichen Zeitpunkte der Behandlung keinen Einfluss auf die antivirale Aktivität. Zu jeden Zeitpunkt zeigte sich aber eine klare Reduktion der Plaquezahlen in folge der Interferon-Behandlung.

Auch die Inkubation mit ChIFN- α 24 Stunden vor Infektion und nochmals 48 Stunden nach Infektion beeinflusste die Plaquezahlen nicht weiter.

4.1.4 Einfluss von IFN-a auf MDV-infizierte Hühner

Die beschriebenen *in vitro* Versuche zeigten, dass IFN- α einen deutlichen Effekt auf die Virusvermehrung hat. Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob diese Zytokinwirkung auch *in vivo* von Relevanz ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden zuvor zwei weitere experimentelle Ansätze gewählt. Zum eine erhielte MDV-infizierte Hühnern rekombinantes ChIFN- α zum anderen wurde das endogene IFN- α durch Applikation eines Antikörpers neutralisiert.

4.1.4.1 Behandlung mit IFN-a

Das Tierversuch wurde bei Lohman Animal Health, Cuxhaven (Tierversuchsnummer: 45/01) durchgeführt. Gruppen mit je zehn Tieren der Linie Lohmann selected leghorn (LSL) wurden unter SPF-Bedingungen gehalten und erhielten ab dem ersten Lebenstag 1.000, 10.000 oder 100.000 U rChIFN- α pro Injektion intra peritoneal (Tabelle 1), die Injektionen der Zytokine wurden während zehn Wochen jeden dritten Tag wiederholt.

Gruppennummer	Behandlung	Verabreichte Menge
1	rChIFN-a	1.000 U
2		10.000 U
3		100.000 U
4	PBS	0,2 ml

Tab. 1: Gruppeneinteilung des Versuches „Einfluss von IFN-a auf MDV-infizierten Hühner“

Die Infektion erfolgte mit einem hochpathogenen (vv⁺) MDV-Stamm (EU-1) am zweiten Lebenstag, durch Injektionen von 0,2 ml Buffycoat-Zellsuspension intra muskulär in den *musculus quadriceps femoralis*. Die Infektionsdosis war zuvor in

Hühner bestimmt worden. Da EU-1 nicht auf Zellkulturen vermehrt werden kann, können keine Angaben zur applizierten Virusdosis gemacht werden. 14 Tage nach der Infektion wurde aus jeder Gruppe drei Tiere euthanasiert und pathologisch untersucht. Um die erfolgreiche Infektion nachzuweisen, wurden von diesen Tieren zuvor Buffycoat-Zellen und Milzzellen gewonnen. Der Nachweis von Virus-DNA erfolgte mittels PCR durch Amplifikation des MDV-spezifischen Gens ICP 4 (Abb. 10).

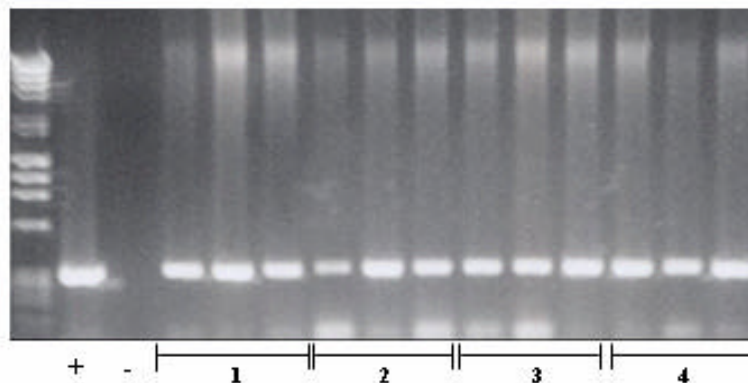


Abb.10: MDV Nachweis in Zellen des „Buffy Coat“ 14 Tage nach Infektion

Agarosegelelektrophorese nach PCR-Amplifikation des MDV-spezifischen Gens ICP4. Es wurde DNA aus Buffycoat-Zellen von je drei Tieren einer Gruppe getestet.

Erklärung der Abbildung: +: Positivkontrolle (EU-1). -: Negativkontrolle (Aqua dest.) **1:** Gruppe 1 (1.000 U rChIFN- α) **2:** Gruppe 2 (10.000 U rChIFN- α) **3:** Gruppe 3 (100.000 U rChIFN- α) **4:** Gruppe 4 (mit PBS behandelt Kontrollgruppe)

Während des Versuches wurde das Gewicht der Vögel wöchentlich bestimmt sowie Blut von jeweils drei Tieren pro Gruppe in der 3, 5, 6, 7 und 8. Woche nach der Infektion entnommen und Buffycoat-Zellen für den qualitativen Virusnachweis präpariert. Gleichzeitig den Blutentnahmen, wurde die Virusausscheidung der Tiere durch Isolierung der DNA aus Federfollikel Epithel (FFE) nachgewiesen.

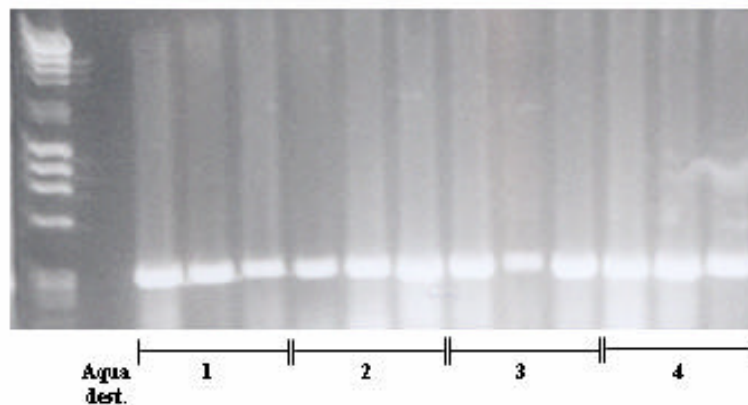


Abb.11: MDV Nachweis in Federfollikelepithel fünf Wochen nach Infektion

Agarosegelelektrophorese nach PCR-Amplifikation des MDV-spezifischen Gens ICP4. Es wurde DNA aus Federfollikelepithel von je drei Tieren einer Gruppe getestet.

Erklärung der Abbildung: Aqua dest.: Negativkontrolle. **1:** Gruppe 1 (1.000 U rChIFN- α). **2:** Gruppe 2 (10.000 U rChIFN- α). **3:** Gruppe 3 (100.000 U rChIFN- α). **4:** Gruppe 4 (mit PBS behandelte Kontrollgruppe).

Wie in Abbildung 10 und 11 zu erkennen ist, zeigten alle vier Gruppen, unabhängig von der Behandlung mit IFN- α eine deutliche Virämie und Virus im Federfollikelepithel. Zusammengenommen zeigen die Daten, dass alle Tiere erfolgreich infiziert und virämisch wurden.

Der Versuch wurde in der zehnten Woche beendet, alle noch lebenden Tieren wurden euthanasiert und ebenso wie die zuvor gestorbenen Tiere seziiert. Charakteristische Befunde, die in allen Gruppen beobachtet wurden, waren eine Atrophie von der Bursa Fabricii und Thymus, Verdickung der Drüsenmagenschleimhaut und das Auftreten der für die MD typischen, infiltrativen Tumore in Milz, Leber, Niere, dem Herz und der Lunge.

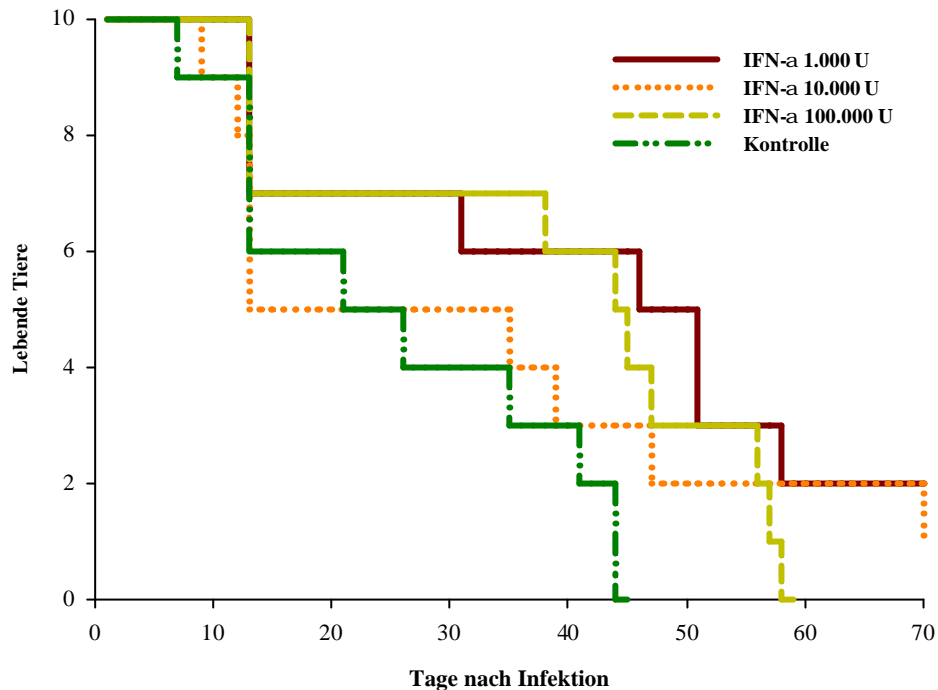


Abb. 12: Mortalitätsrate MDV-infizierter Hühner in Abhängigkeit von der Behandlung der Gruppe

Aufgeführt ist die Mortalität in den mit rChIFN- α oder mit PBS (Kontrolle) behandelten Gruppen. Jeder Gruppe bestand aus 10 Tieren. Am 14. Lebenstag wurden je drei Tiere pro Gruppe zur Virusisolierung entnommen.

Als wichtigster Parameter für die Beurteilung der Zytokineffekte erwies sich die Mortalitätsrate. In Abbildung 12 sind die entsprechenden Kurven für die jeweiligen Gruppen wiedergegeben. In der Kontrollgruppe waren alle Tiere bis zum Ende der sechsten Lebenswoche gestorben. Dagegen lebten in der Gruppe der mit 1.000 U/Injektion behandelt wurde, zu diesem Zeitpunkt noch 60 % der Tiere. Diese, mit der niedrigsten IFN-Dosis behandelten Tiere, zeigte mit 30% Überlebensrate zur Versuchende auch die deutlichste Reaktion auf die Zytokinbehandlung. Die pathologische Untersuchung ergab bei den Tieren, die bis zur Versuchende überlebten, dass sie an MD erkrankt waren. So fanden sich dissiminierte Tumoren in Milz, Leber, Niere und Herz. Ein Schutz vor der MD wurde somit nicht erzielt. Auch für die Gruppen, die mit höheren Dosen an IFN- α behandelt worden war, ergab sich eine deutliche Rechtsverschiebung der Mortalitätskurven, die IFN-Wirkung war aber mit steigender Dosis weniger deutlich.

4.1.4.2 Neutralisation des endogen produzierten IFN- α

Da die Behandlungen mit ChIFN- α zu einer verlängerten Lebensdauer nach einer MDV-Infektion führten, stellte sich die Frage ob endogen produziertes IFN- α eine Rolle im Infektionsgeschehen spielt. Um dies zu untersuchen wurden MDV-Infizierter Küken mit einem monoklonalen Antikörper gegen ChIFN- α (8A9) behandelt. Im gleichen Experiment wurde auch ein Wiederholungsversuch mit rChIFN- α durchgeführt, wobei diesmal niedrigere IFN-Dosen eingesetzt wurden. 15 Küken pro Gruppe wurden ab dem ersten Lebenstag, wiederholt jeden dritten Tag, entweder mit rChIFN- α (250, 1.000 oder 10.000 U/Injektion) oder den monoklonalen Antikörper gegen ChIFN- α (8A9, 100 μ g/Injektion) intra-peritoneal behandelt. Tiere der Kontrollgruppe erhielten PBS im gleichen Volumen. Das Tierversuch wurde bei Lohman Animal Health, Cuxhaven (Tierversuchsnummer: 295/01) durchgeführt.

Gruppen Nummer	Behandlung	Verabreichte Menge
1	rChIFN- α	250 U
2		1.000 U
3		10.000 U
4	mAk (8A9)	100 μ g
5	PBS	0,2 ml

Tab. 2: Gruppeneinteilung des Versuches „Neutralisation des endogenen produzierten IFN- α “

Die Infektion erfolgte am zweiten Lebenstag in der *M.quadriceps femoralis* mit je 0,1 ml Buffycoat-Zellsuspension. Um einen deutlichen Effekt der Antikörperbehandlung beobachten zu können, wurde die Infektionsdosis gegenüber dem ersten Versuch halbiert (siehe 4.1.4.1). Die Tiere wurden täglich beobachtet, 14 Tage und fünf Wochen nach Infektion wurden Buffycoat-Zellen und Federfollikelepithel in allen Gruppen gewonnen und für den Nachweis einer

Infektion mittels PCR aufgearbeitet. Alle vier Gruppen zeigten, unabhängig der Behandlung eine deutliche Virämie und Virus im Federfollikelepithel.

Zehn Wochen nach der Infektion wurden alle noch lebenden Tiere euthanasiert und pathologisch untersucht.

Alle Tiere, die im Lauf des Versuches starben, wurden ebenfalls pathologisch-anatomisch untersucht. Die beobachteten Läsionen unterschieden sich zwischen den verschiedenen Gruppen nicht. Typische Befunde bei der Sektion waren eine Atrophie der Bursa Fabricii, des Thymus und der Milz, eine verdickte Schleimhaut des Drüsenmagens, Tumore in Milz, Leber, Niere, Herz und Lunge. Auch in diesem Versuch erwies sich die Mortalitätsrate als relevanter Messparameter für den Einfluss der Behandlung auf den Krankheitsverlauf (Abb. 13).

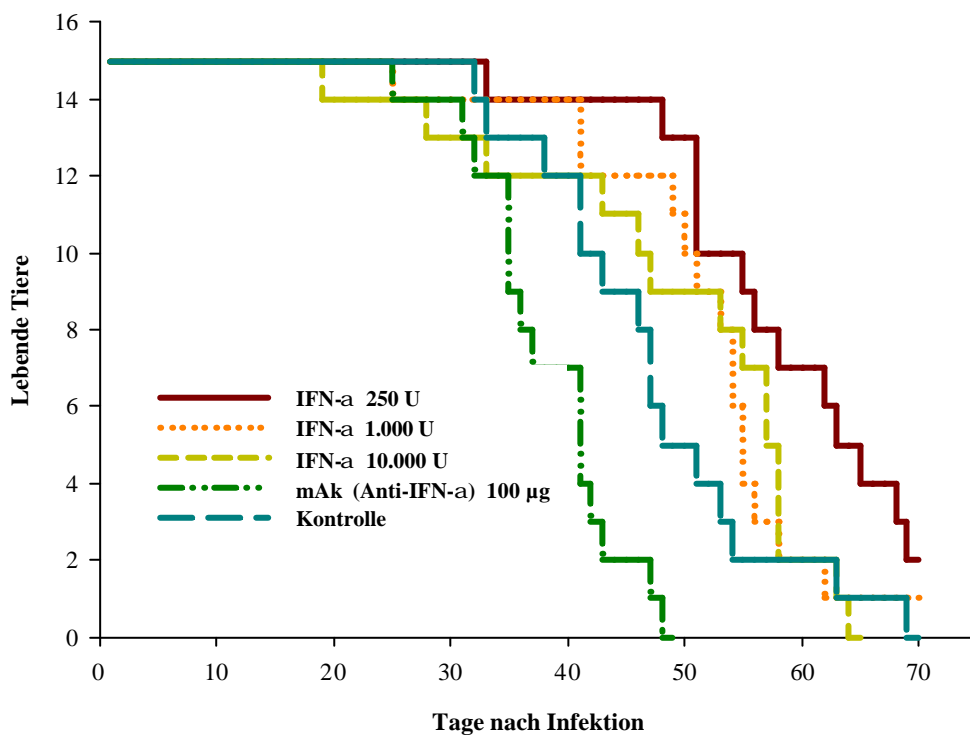


Abb. 13: Mortalitätsrate MDV-infizierter Hühner, nach Behandlung mit rChIFN- α bzw. einem monoklonalen Antikörper gegen ChIFN- α (8A9).

Aufgeführt ist die Mortalitätsrate in den mit rChIFN- α , dem monoklonaler Antikörper gegen ChIFN- α oder PBS (Kontrolle) behandelten Tieren. Jede Gruppe umfasste 15 Tiere.

Wie Abbildung 13 zu entnehmen ist, starben alle Tiere der Kontrollgruppe bis zur 10. Lebenswoche. Dieser, gegenüber dem ersten Versuch um vier Wochen

verzögerte Krankheitsverlauf, ist mit der Halbierung der Infektionsdosis zu erklären. Auch in diesem Versuch ergab sich eine Rechtsverschiebung der Mortalitätskurven der mit IFN- α behandelten Gruppen. Dieser Effekt korrelierte wiederum negativ mit der IFN- α Dosis. Zum Versuchende in der 10. Woche lebten noch 2 von 15 Tieren in der mit 250 U/Injektionen behandelte Gruppe, während die Tiere aller anderen Gruppen zu diesem Zeitpunkt bereits gestorben waren. Alle Tiere wiesen bei der pathologischen-anatomischen Untersuchung deutliche Tumoren auf.

Einen deutlichen Effekt auf die Krankheitsentwicklung hatte die Neutralisation der endogenen IFN- α . Die Tiere dieser Gruppe starben, etwa 2-3 Wochen vor denen der Kontrollgruppe. Dieser Effekt wurde aber nicht in der frühen Phase der Infektion beobachtet, sondern erst ab der 4. Lebenswoche. Somit setzten die Verluste in allen Gruppen nahezu zeitgleich ein, verliefen aber wesentlich schneller in der mit Antikörper behandelten Gruppe.

4.2 Typ II Interferone

4.2.1 Nachweis der IFN- γ Aktivität in MDV infizierte CEC

Neben den Typ I Interferonen, IFN- α und IFN- β , spielt das Typ II Interferon IFN- γ bei der Abwehr virale Infektionen eine wichtige Rolle. Umfassende Daten zur Induktion und Funktion von IFN- γ in der MD liegen bisher in der Literatur nicht vor. Da IFN- γ nur schwach antiviral aktiv ist, wurde die IFN- γ Aktivität nicht über einen Testsystem zum Nachweis der antiviralen Aktivität, sondern über seinen Makrophagen aktivierende Wirkung nachgewiesen.

Embryonale Fibroblastenkulturen wurden mit 400 PFU des MDV-1 RB1B infiziert und Proben in täglichen Abstand von Tag 1 bis Tag 8 nach der Infektion gewonnen. Diese Proben wurden zunächst auf das Vorhandensein von NO_2^- , einen Abbauprodukt von Stickstoffmonoxid (NO), untersucht (Abb. 14).

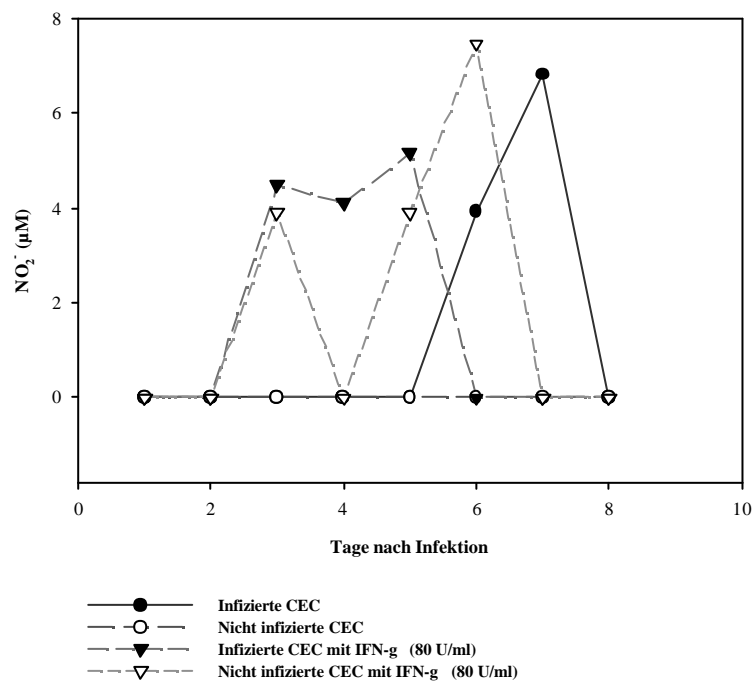


Abb. 14: NO-Produktion in MDV-infizierten CEC

Fibroblastenkulturen wurden mit rChIFN- γ oder MDV (RB1B) oder rChIFN- γ und MDV (RB1B) behandelt. Überstände wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gewonnen, die NO_2^- Konzentration mittels der Griess-Reaktion bestimmt.

Eine NO-Synthese konnte in keiner der nicht-infizierten Kontrollkulturen nachgewiesen werden. Dagegen führte die Infektion mit RB1B nach sechs Tagen zur Sekretion von NO_2^- in den Zellkulturüberstand. Die Behandlung der Kulturen mit rChIFN- γ (in *E.Coli* exprimiert) führte ebenfalls zu einer geringgradigen Sekretion von NO_2^- durch die Fibroblasten.

In einem weiteren biologischen Nachweissystem wurden dieselben Überstände auf die Makrophagenzelllinie HD11 gegeben. Diese Zellen reagieren sehr sensitiv auf IFN- γ mit der Synthese von NO (siehe 3.3.9).

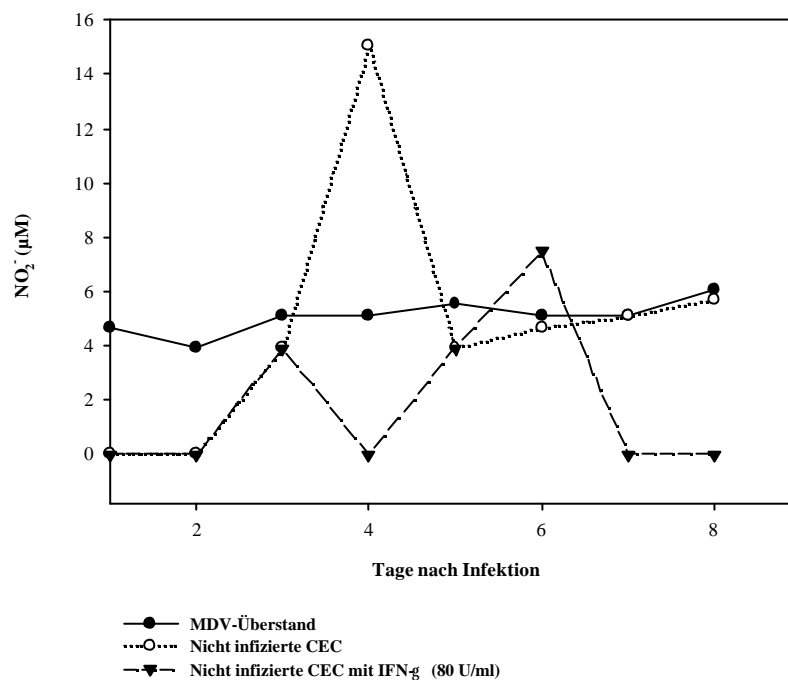


Abb. 15: IFN-g Induktion in MDV infizierten CEC

NO-Konzentrationen in HD11-Zellkulturüberständen 48 Stunden nach Inkubation der Zellkulturen mit MDV-Überstand oder rChIFN- γ . (5×10^5 Zellen/Kavität, Kontrollen: Überstand von rChIFN- γ stimulierten HD11-Zellen und Zellkulturüberstand von nicht stimulierten HD11-Zellen)(Viruskonzentration: 400 PFU/Kavität) (Mediumkontrolle: 4,59 μM ; IFN- γ -stimulierte HD11-Zellen: 221 μM)

Die in Abbildung 15 wiedergegebenen Daten zeigen, dass weder nicht infizierte Fibroblasten noch MDV infizierte Kulturen nennenswerte Mengen an IFN- γ synthetisieren. Praktisch alle Proben lagen im Bereich oder unterhalb der NO_2^- Konzentration des Mediums. Eine Stimulation der HD11-Zellen mit rChIFN- γ führte zur NO_2^- Konzentrationen von 221 μM , einen Wert, der um den Faktor 60 über dem der Negativkontrolle und der MDV-infizierten Kulturen lag. Eine nennenswerte IFN- γ Synthese als Reaktion auf die MDV-Infektion kann damit ausgeschlossen werden.

4.2.2 Einfluss von IFN-g auf MDV infizierte CEC

Analog zu den Experimenten mit IFN- α sollte geprüft werden, ob IFN- γ die Virusreplikation *in vitro* beeinflusst. Dazu wurden Fibroblastenkulturen von 10 Tage alten Hühnerembryonen entweder mit dem Impfvirus CVI 988 oder dem MDV-1 (vv⁺) Stamm RB1B infiziert und für sechs Tage ohne Zusatz oder mit rChIFN- γ in unterschiedlichen Konzentrationen kultiviert. Nach Anfärbung der Kulturen mit MDV-spezifischer monoklonaler Antikörpern wurden die Plaquezahlen bestimmt.

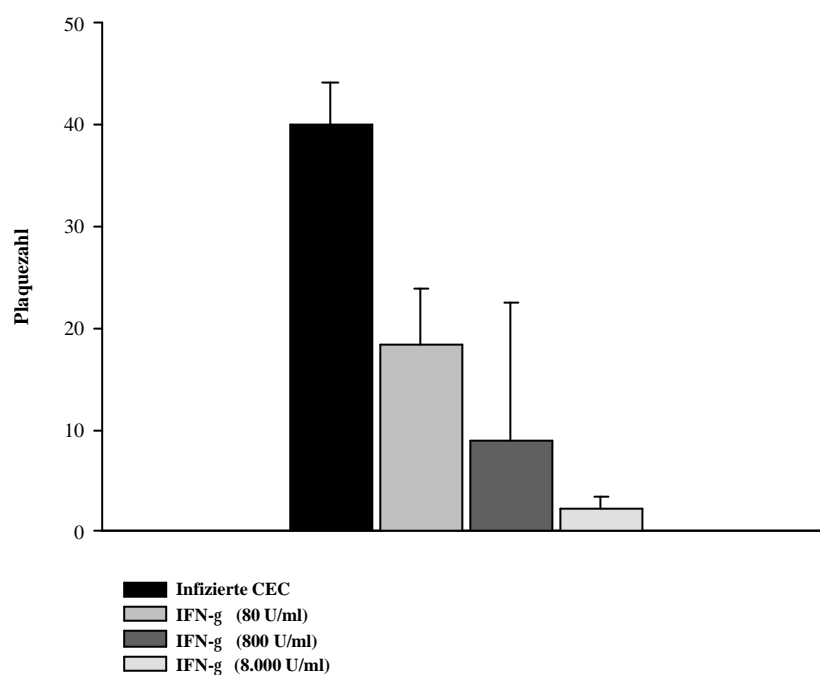


Abb. 16: Effekte von rChIFN-g auf das Wachstum eines apathogenen MDV-1 Serotyps (CVI 988)

Mittelwert der Plaques von je fünf Kavitäten einer Zellkulturplatte mit sechs Kavitäten. Die Zellkulturen wurden mit der mAk 2K11 (Anti-gB) gefärbt und die Plaques gezählt. Als Kontrolle diente nicht infizierte und infizierte nicht behandelte CEC. (Virusverdünnung 1:1x10⁵ der Impfstoffstammlösung)

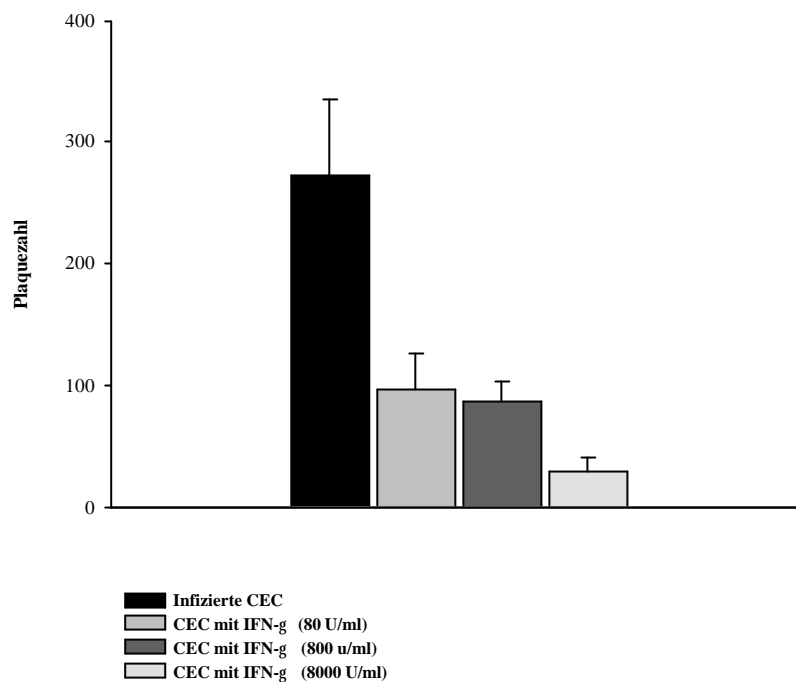


Abb. 17: Effekte von rChIFN-g auf das Wachstum eines hochpathogenen MDV-1 Serotyps (RB1B)

Mittelwert der Plaques von je fünf Kavitäten einer Zellkulturplatte mit sechs Kavitäten. Die Zellkulturen wurden mit der mAk VAJ-1 (anti-pp38) gefärbt und die Plaques gezählt. Als Kontrolle diente infizierte nicht behandelte CEC. (Viruskonzentration: 400 PFU/Delle)

Sowohl in den CVI 988 (Abb. 16) als auch in den RB1B (Abb. 17) infizierten Kulturen wurde eine dosis-abhängige Reduktion der Plaquezahlen durch die IFN- γ Behandlung beobachtet.

Zeitliche Effekte

In einem letzten Ansatz wurden die Kulturen sowohl 24 Stunden vor der Infektion als auch nochmals 48 Stunden nach der Infektion mit IFN- γ behandelt. Wie in Abbildung 18 gezeigt, konnte auch in diesem Experiment eine potentielle Hemmung der Virusreplikation aufgezeigt werden. Die Vorbehandlung und die Behandlung bei der Infektion hatten vergleichbare Effekte. Die Behandlung 48 Stunden nach der Infektion war geringgradig weniger Effektiv, während die zweimalige IFN- γ Gabe zu stärksten Reduktion der Virustiter führte.

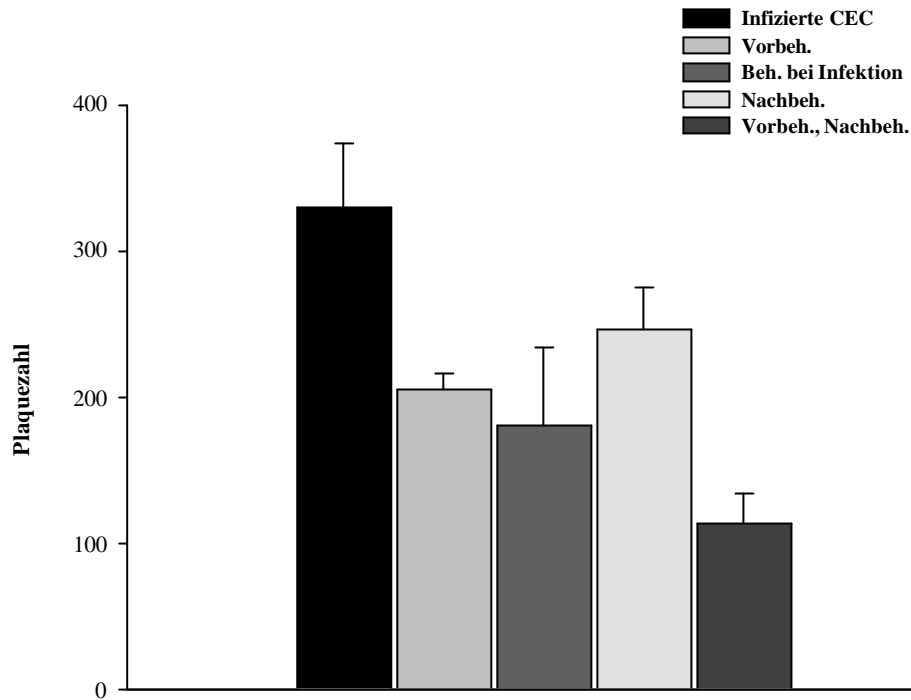


Abb. 18: Einfluss der IFN- γ Behandlung zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Plaquezahlen RB1B infizierter Fibroblasten

Mittelwert von je fünf Kavitäten einer 6Lochplatte. Die Kulturen wurden zu unterschiedlicher Zeitpunkten behandelt bzw. wiederholt behandelt. rChIFN- γ wurde in einer Konzentration von 80 u/ml zugegeben. Die Plaques wurden sechs Tage nach Infektion mit der mAk VAJ-1 (anti-pp38) gefärbt und gezählt. Als Kontrolle diente unbehandelte infizierte CEC. (Viruskonzentration: 400 PFU/Kavität)

Erklärung der Legende: *Vorbeh.*: Behandlung mit rChIFN- γ 24 Stunden vor der Infektion. *Beh. bei Infektion.*: Gleichzeitige Infektion und Behandlung mit IFN- γ der Zellkulturen. *Nachbeh.*: Behandlung mit rChIFN- γ 48 Stunden nach der Infektion

4.2.3 Einfluss von IFN-g auf den Krankheitsverlauf MDV-infizierter Hühner

Da bei den *in vitro* Versuchen ein deutlicher Effekt der IFN- γ Behandlung beobachtet wurde, stellte sich der Frage ob dieses Zytokin auch *in vivo* einen Einfluss auf die Entwicklung der Marekschen Krankheit hat.

Hierzu wurden 4 Gruppen mit je zehn Tieren der Linie LSL ab dem ersten Lebenstag mit 20.000 U, 2.000 U oder 200 U Injektion rChIFN- γ intra-peritoneal behandelt. Die Injektionen erfolgten während zehn Wochen jeden dritten Tag. Das Tierversuch wurde bei Lohman Animal Health, Cuxhaven (Tierversuchsnummer: 45/01) durchgeführt.

Gruppen Nummer	Behandlung	Verabreichte Menge
1	rChIFN-g	200 U*
2		2.000 U*
3		20.000 U*
4	PBS	0,2 ml

*Einheiten nach der von Lowenthal vorgeschlagenen Definition

Tab. 3: Gruppeneinteilung des Versuches: „Einfluss von rChIFN-g auf der Krankheitsverlauf MDV-Infizierter Hühner“

Die Infektion der Tiere mit dem hochpathogenen (vv⁺) MDV-Stamm (EU-1) wurde am zweiten Lebenstag durchgeführt. Die Tiere erhielten indem 0,2 ml Buffycoat-Zellsuspension intra-musculär in der *M. quadriceps femoralis*. 14 Tage nach der Infektion wurden je Gruppe drei Tiere euthanasiert und pathologisch-anatomisch untersucht. Zum Nachweis der Infektion wurden DNA-Proben von Buffycoat-Zellen und Milzzellen mit Hilfe der PCR auf der MDV-spezifischen Gen ICP 4 untersucht (Abb. 19).

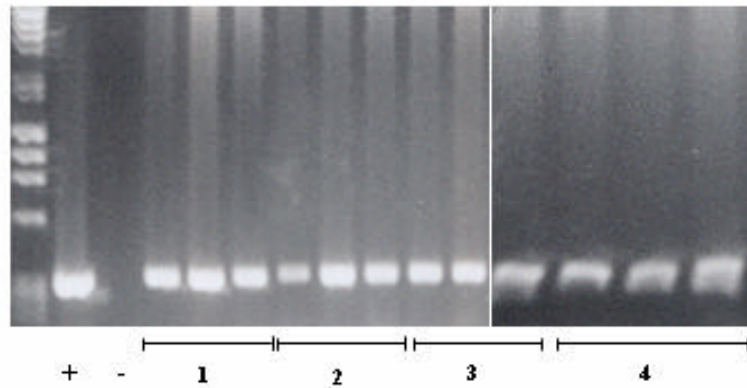


Abb. 19: MDV Nachweis in Buffycoat-Zellen 14 Tage nach Infektion

Agarosegelelektrophorese nach PCR-Amplifikation des MDV-spezifischen Gens ICP4. Es wurde DNA aus Buffycoat-Zellen von je drei Tieren einer Gruppe getestet.

Erklärung der Abbildung: +: Positivkontrolle (EU-1). -: Negativkontrolle (Aqua dest.) **1:** Gruppe 1 (200 U rChIFN- γ) **2:** Gruppe 2 (2.000 U rChIFN- γ) **3:** Gruppe 3 (20.000 U rChIFN- γ) **4:** Gruppe 4 (Kontrollgruppe).

Tiere, die im Verlauf des Versuches starben wurden seziiert und pathologisch-anatomisch untersucht. Die Gewichte der Vögel wurden wöchentlich gemessen, Blut wurde von je drei Tieren pro Gruppe in der 3, 5, 6, 7 und 8. Woche nach der Infektion für den Virusnachweis aus dem Buffycoat gewonnen. Zu den gleichen Zeitpunkten wurde die Virusausscheidung der Tiere durch Nachweis viraler DNA aus Federfollikel Epithel untersucht.

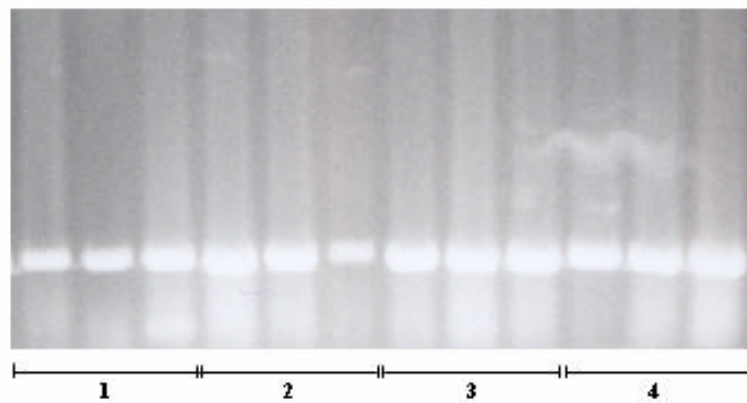


Abb. 20: MDV Nachweis in Federfollikelepithel fünf Wochen nach Infektion

Agarosegelelektrophorese nach PCR-Amplifikation des MDV-spezifischen Gens ICP4. Es wurde DNA aus Federfollikelepithel von je drei Tieren einer Gruppe getestet.

Erklärung der Abbildung: **1:** Gruppe 1 (200 U rChIFN- γ) **2:** Gruppe 2 (2.000 U rChIFN- γ) **3:** Gruppe 3 (20.000 U rChIFN- γ) **4:** Gruppe 4 (Kontrollgruppe).

Wie in Abbildung 20 zu erkennen, wurde in allen 4 Gruppen eine Virämie beobachtet. Ebenso gelang in jedem Fall der Virusnachweis aus dem Federfollikelepithel, ein Hinweis darauf, dass es unabhängig von der Behandlung bei allen Tieren auch zur Virusausscheidung kam.

Zehn Wochen nach der Infektion wurden alle noch lebenden Tiere euthanasiert und pathologisch-anatomisch untersucht. Bei allen gestorbenen und auch bei den zu Versuchende euthanasierten Tieren zeigte die pathologische Untersuchung die für eine MD typischen Befunde. Häufig beobachtete Veränderungen waren eine Atrophie der Bursa Fabricii und des Thymus, eine verdickte Drüsenmagenschleimhaut und die typischen infiltrativen Tumore in der Milz, Leber, Nieren, dem Herz und der Lunge.

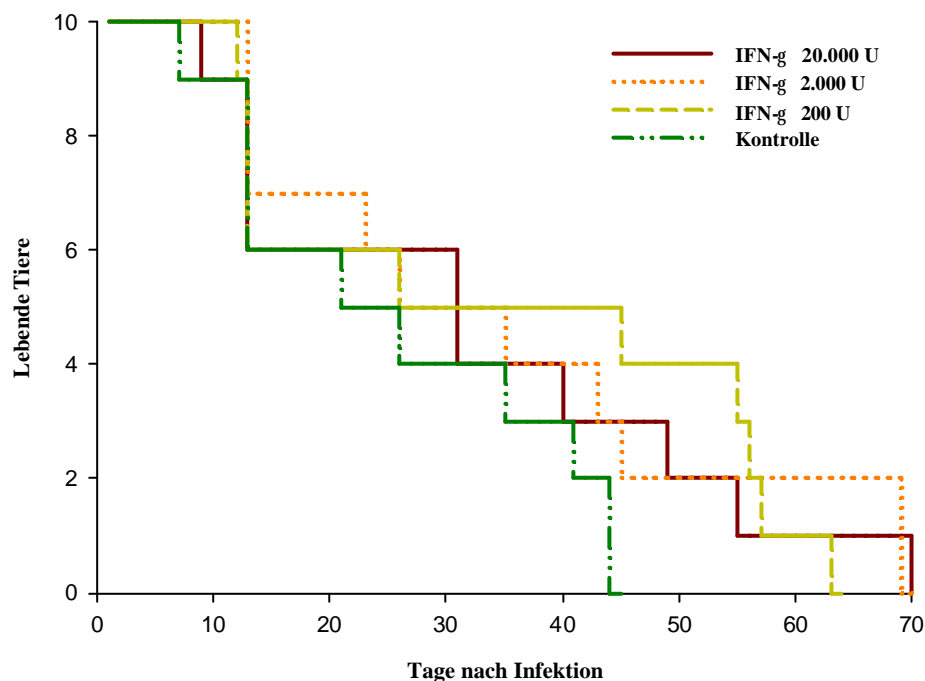


Abb. 21: Mortalitätsindex MDV-infizierten Hühner, behandelt mit rChIFN-a

Aufgeführt ist der Mortalität, der mit IFN- γ oder mit PBS (Kontrolle) behandelten Tieren. Jede Gruppe bestand aus 10 Tiere. Am 14. Lebenstag wurden je Gruppe drei Tiere entnommen zur Virusisolierung.

Die Ergebnisse des Versuches sind in Abbildung 21 zusammengefasst. Die Tiere der Kontrollgruppe waren bis zur 6. Woche alle an der Marekschen Krankheit gestorben. Zu diesem Zeitpunkt lebten in den IFN- γ behandelten Gruppen noch 20-50% der Tiere. Alle IFN- γ behandelten Gruppen zeigten eine verzögerte Mortalität, keines der

Tiere lebte aber länger als 10 Wochen. Zwischen den behandelten Gruppen konnte kein Unterschied zwischen in der Mortalität gesehen werden.

5 Diskussion

Der inhibitorische Effekt von Typ I Interferonen auf Herpesvirusinfektionen wurde in einer Reihe von Studien an unterschiedlichen Herpesvirusmodellen gezeigt (MOSSMAN 2002). Da Typ I Interferone eine direkte und rasch einsetzende, antivirale Abwehr induzieren, wird insbesondere die frühe Phase der viralen Infektion beeinflusst. Dem gegenüber wurden für IFN- γ (Typ II Interferon), aufgrund seiner immunmodulatorischen Funktion, Effekte in späteren Phasen der Infektion beschrieben (MOSSMAN 2002). Auch für das Haushuhn konnte gezeigt werden, dass sowohl Typ I als auch Typ II Interferone virale Infektionen mit onkogenen Viren signifikant beeinflussen können (PLACHY et al. 1999). Erste Arbeiten zur Bedeutung der Interferone bei der MDV-Infektion wurden bereits Anfang der 70iger Jahre durchgeführt. Sie zeigten, dass antivirale Faktoren das Infektionsgeschehen bei der MD positiv beeinflussen (KALETA et al. 1972c; VENGRIS and MARE 1973; SCHAT et al. 1974; KALETA 1977). Da rekombinante Interferone zu dieser Zeit noch nicht zur Verfügung standen, wurden alle diese Studien mit relativ schlecht definierten, natürlichen Interferonpräparationen aus Überständen stimulierter Zellkulturen durchgeführt. Auch neuere Arbeiten nutzten natürliche Interferonpräparationen und bestätigten die älteren Daten *in vitro* Versuchen (LEVY et al. 1999). Da aber auch hier nur partiell gereinigtes Zytokinmaterial eingesetzt wurde, konnten die beobachteten Effekt keinem der Interferone (IFN- α , IFN- β und IFN- γ) zugeordnet werden. Erst kürzlich wurden Arbeiten publiziert, in denen gezeigt wurde, dass rekombinantes Interferon Typ II eine deutliche Hemmung der MDV-Replikation bewirken kann (DJERABA et al. 2000; XING et al. 2000b; DJERABA et al. 2002b). Vergleichbare Untersuchungen mit rekombinantem Typ I Interferon wurden bisher nicht veröffentlicht. Da inzwischen die Interferone IFN- α , IFN- β und IFN- γ in rekombinanter Form und in ausreichender Menge vorliegen, sowie für einige dieser Interferone spezifische Antikörper verfügbar sind, sollte in dieser Arbeit die funktionelle Bedeutung dieser Zytokine in der MDV-Infektion detailliert untersucht werden.

5.1 Typ I und II Interferone, *in vitro* Studien

5.1.1 Charakterisierung der antiviralen Aktivität in MDV infizierten Zellkulturüberständen

Wie bereits diskutiert, wurde von Kaleta et al. (KALETA et al. 1972a) gezeigt, dass MDV infizierte CEC- oder CKC-Kulturen zwischen dem 3. und dem 20. Tag nach der Infektion einen Faktor enthielten, der eine Superinfektion mit NDV verhinderte. Diese Beobachtung legte nahe, dass es sich bei der antiviralen Aktivität um ein Interferon handelte. In weiterführenden Studien zeigte die gleiche Gruppe (KALETA et al. 1972b), dass Überständen von Kulturen, die mit dem pathogenen MDV Ca-1 infiziert wurden, eine Interferonaktivität enthielten, nicht aber Kulturen, die mit dem apathogenen HVT infiziert wurden. Auch Schat et al. (1974) fanden eine deutliche Interferonproduktion in MDV-infizierten Zellkulturen. Diese konnte ab dem 2. Tag nach der Infektion nachgewiesen werden, fand sich aber ebenfalls nur in Kulturen, die mit pathogene MDV Stämmen (PA-5 und JM), nicht aber mit apathogenen Stämmen (PA-3 und FC-126 (HVT)) infiziert wurden. Auch in den eigenen Untersuchungen wurde eine hochgradige Interferonsynthese als Reaktion auf eine MDV Infektion beobachtet (Abb. 1 und 2). Interessanter Weise induzierten sowohl der apathogene (CVI 988) als auch der pathogene (RB1B) MDV-1 Stamm eine Interferonsynthese. Allerdings waren messbare Interferon-Titer erst ab dem 4. (RB1B) bzw. 5. (CVI 988) Tage nach der Infektion feststellbar. Zur weiteren Charakterisierung der antiviralen Aktivität wurden die hochtitrigen Überstände mit spezifischen Antiseren gegen IFN- α und IFN- β inkubiert und anschließend geprüft, ob die antivirale Aktivität neutralisiert wurde. Entsprechende Reagenzien waren für IFN- α in Form eines Antiserums und eines monoklonalen Antikörpers bereits vorhanden (STAMM 1997). Ein IFN- β spezifisches polyklonales Antiserum konnte im Rahmen dieser Arbeit entwickelt werden. Die Neutralisationsexperimente zeigten, dass das Antiserum nur rekombinantes IFN- β nicht aber rIFN- α neutralisierte. Unter Verwendung dieser Reagenzien konnte klar gezeigt werden, dass die durch Serotyp 1 MDV induzierte antivirale Aktivität in CEC Kulturen ausschließlich auf IFN- α zurückzuführen ist. Nicht ausgeschlossen werden kann,

das auch die IFN- β Gentranskription durch MDV-1 induziert wird. Wenn vorhanden, dürfte diese auf der funktionellen Ebene aber kaum eine Rolle spielen, da die hier durchgeführten Arbeiten eine biologisch signifikante Proteinsekretion sicher ausschließen konnte.

Neben IFN- α und IFN- β weist auch IFN- γ eine schwache antivirale Aktivität auf. Die Versuche, eine IFN- γ Sekretion in MDV-1 infizierten CEC-Kulturen nachzuweisen, verliefen durchgehend negativ. Verwendet wurde in diesem Fall nicht der antivirale Test sondern ein wesentlich sensitiver, IFN- γ spezifischer Makrophagenaktivierungstest. Die gemessene IFN- γ Aktivität in den infizierten Kulturen entsprach der in nicht infizierten Kontrollansätzen. In beiden Fällen waren die Messwerte im Bereich des Detektionslimits des verwendeten Bioassays. Eine IFN- γ Synthese durch embryonale Fibroblastenkulturen scheint zudem auch unwahrscheinlich, da IFN- γ durch T-Zellen und NK-Zellen gebildet wird, zwei Zelltypen, die in 10-11 Tage alten Hühnerembryonen nicht nachgewiesen wurden.

In Linie mit Untersuchungen von Xing und Djeraba et al, wurde eine erhöhte NO-Produktion in am MDV-Überständen den sechsten und siebten Tag nach der Infektion festgestellt (4.2.1, Abb. 17). Ferner konnte in dem mit rChIFN- γ behandelten Zellkulturen von embryonalen Hühnerzellen und in nicht stimulierten Zellkulturen der gleichen Zellen einer erhöhten NO-Produktion und eine erhöhte IFN- γ Synthese nach einigen Tagen gemessen werden (4.2.1, Abb. 16 und 17). Die induzierte Menge an IFN- γ war aber ähnlich hoch in den nicht infizierten Zellkulturen und wurde als nicht relevant für einen Schutz gegen MDV gesehen.

5.1.2 Einfluss der Interferone auf die Virusreplikation.

Aufbauend auf den Arbeiten zum Nachweis einer Interferoninduktion in MDV infizierten Zellkulturen berichteten Kaleta et. al (1972) auch, dass Präparationen des antiviralen Faktors die Zahl MDV induzierter Plaques deutlich reduzierten. Da zu diesem Zeitpunkt die Existenz von Typ I und Typ II Interferonen noch unbekannt war, wurde dieser Effekt einem nicht weiter charakterisierten antiviralen Faktor zugeordnet. Mit der Klonierung des IFN- α (SEKELLICK et al. 1994), des IFN- β (SICK et al. 1998) und des IFN- γ (WEINING et al. 1996) wurden die notwendigen Reagenzien für genauere Untersuchungen verfügbar. In der vorliegenden Arbeit wurden daher embryonalen Hühnerfibroblastenkulturen mit rekombinantem Typ I

und Typ II Interferonen behandelt und anschließend mit Serotyp 1 MDV infiziert. Dabei wurde sowohl für IFN- α als auch für IFN- γ ein ausgeprägter dosisabhängiger Effekt der Interferonbehandlung beobachtet. Durch rChIFN- α -Behandlung der Zellkulturen wurde die Plaquezahl bis zu 85 % reduziert (RB1B). Nach Behandlung mit rChIFN- γ wurde sogar eine Plaquereduktion um 90 % erreicht. Das Wachstum des apathogenen Impfvirus (CVI 988) wurde durch Zytokinbehandlung mit rChIFN- α bis zu 78 % und mit rChIFN- γ bis zu 97 % reduziert. Diese Daten ergänzen die Ergebnisse von Xing et al. (XING et al. 2000b) und Djeraba et al. (DJERABA et al. 2000), die allerdings lediglich die Wirkung von IFN- γ untersuchten. Xing et al. (XING et al. 2000b) beschreiben, dass IFN- γ zur Induktion der Expression der NO-Synthase in den Kulturen führt und damit die Bildung von NO induziert. Sie konnten zeigen, dass die Hemmung der NO-Synthese durch L-NMMA zu einer signifikanten Reduktion des IFN- γ Effekts führte. Die Hypothese, dass NO das eigentliche Effektormolekül darstellt, wurde durch Versuche unterstützt, in denen nach Zusatz des NO-Donators SNAP ebenfalls eine deutliche Reduktion der Plaquezahlen bewirkt wurde. Als Zielzelle der IFN- γ Wirkung und damit als Quelle der NO-Bildung vermuten die Autoren Makrophagenvorläufer in den Fibroblastenkulturen. Auch die Gruppe um Djeraba konnte zeigen, dass rChIFN- γ eine deutliche Plaquereduktion bewirkt. Im Gegensatz zu Xing et al. (XING et al. 2000b) konnten sie aber nicht nachweisen, dass dieser Effekt wesentlich von der Synthese von NO abhängig ist. Sie postulieren vielmehr einen zusätzlichen, noch unbekanntem IFN- γ induzierten Faktor der das Viruswachstum hemmen kann. Die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie sind in Einklang mit den Daten von Djeraba et al. (DJERABA et al. 2000). rChIFN- γ hatte einen klaren dosisabhängigen plaquereduzierenden Effekt, führt aber nicht zur Synthese deutlich messbarer NO-Mengen. Die hier gefundenen NO_2^- Konzentrationen in den nicht stimulierten Kulturen und in den IFN- γ behandelten Kulturen lagen im Bereich der Hintergrundwerte des Griess-Tests (Siehe 3.3.2), um den Faktor 60 unter den Werten IFN- γ aktivierter Makrophagen und deutlich niedriger als die von Xing et al. publizierten Werte.

Die ebenfalls beobachtete deutliche Plaquereduktion durch rChIFN- α dürfte dagegen auf der Induktion klassischer antiviraler Mechanismen beruhen, wie im Literaturteil umfassend ausgeführt.

Die Studien zum zeitlichen Effekte der Interferon Behandlung zeigten deutlich, dass die Interferonwirkung auch noch 48 Stunden nach der Infektion voll ausgeprägt ist. Offensichtlich interferiert IFN- α erst in einer späteren Phase mit der Virusreplikation. Auch die IFN- γ Wirkung war bei einer späten Behandlung noch deutlich Nachweisbar. Maximal aktiv war dieses Zytokin aber nur, wenn die Kulturen wiederholt damit behandelt wurden. Wahrscheinlich führt die hohe Empfindlichkeit des Homodimers IFN- γ gegenüber niedrigen pH-Werten und höheren Temperaturen zu einer raschen Degradation des Zytokins in den Kulturen und macht somit den wiederholten Zusatz notwendig. IFN- α ist dagegen außerordentlich stabil und bleibt in den Versuchsansätzen über lange Zeit biologisch aktiv.

5.2 Typ I und II Interferone, *in vivo* Studien

Während die Rolle der Interferone in der MDV-Infektion in mehreren *in vitro* Studien aufgezeigt wurde, findet sich nur wenige Arbeiten zur Bedeutung dieser Zytokine *in vivo*. Eine Hemmung der MDV induzierten Mortalität um bis zu 56% durch Interferone und die Interferon induzierende Substanz „Statolon“ wurde in einer Arbeit von Vengris aufgezeigt (VENGRIS et al. 1973). Auch in dieser Studie wurden native, nur teilweise gereinigte Interferonpräparationen eingesetzt, eine differenzierte Untersuchung der Bedeutung der Typ I und Typ II Interferone war nicht möglich. Dass Interferone auch *in vivo* als Reaktion auf eine MDV Infektion gebildet werden, zeigten Sharma und Mitarbeiter an Präparationen von Lungengewebe (SHARMA 1989). In der hier vorgelegten Arbeit konnte erstmals die Bedeutung dieser Zytokine in einer umfassenden Untersuchung analysiert werden.

Die Behandlung von Tieren mit rChIFN- α , die mit einem hochvirulentem MDV-1 Isolat infiziert wurden, führte zu einer zeitlich verzögerten Mortalität. Interessanterweise konnte ein negativ korrelierter Dosis-Wirkungs-Effekt beobachtet werden. So war die Mortalität in der Kontrollgruppe am 43. Tag nach der Infektion 100%, die der Gruppe 1 mit der niedrigsten IFN-Dosis (IFN- α 1.000 U/Injektion) aber erst 40%. In den beiden Gruppen, die mit höheren IFN- α Dosen behandelt wurden lebten zu diesem Zeitpunkt noch 50 % (100.000 U/Injektion) bzw. 30 % (10.000 U/Injektion) der Tiere. Zehn Wochen nach der Infektion lebten in der

Gruppe 1 (1.000 U/Injektion) noch 2 Tieren (20 %), in der Gruppe 2 (10.000 U/Injektion) lediglich noch 1 Tier (10 %). Die klinische und die pathologisch-anatomische Untersuchung der Tiere zeigte allerdings auch, dass keines der Tiere vor dem Ausbruch der MD geschützt war. Vielmehr führte die IFN- α Behandlung lediglich zu einer Verzögerung im Krankheitsgeschehen und dies unabhängig von der Dosis. Da Interferone vielfache Wirkungen auf den Körper und insbesondere das ZNS haben (sickness behaviour), führten die höheren IFN- α Dosierungen möglicherweise zu einer Verzögerung der Krankheitsentwicklung aber gleichzeitig auch zu einer Reduktion der allgemeinen Widerstandskraft des Körpers. So ist der deutlich bessere Effekt bei niedrigerer Dosierung erklärbar. Vergleichbare Effekte wurden auch in ähnlichen Versuchen mit Herpesviren in anderen Wirtssystemen beobachtet (LOPEZ 1985a; KUNDER et al. 1993).

Im zweiten *in vivo* Versuch wurden Tiere zusätzlich mit einem monoklonalen Antikörper gegen ChIFN- α behandelt. Ziel dieses Versuches war es endogen produziertes IFN- α funktionell zu blockieren. Wenn IFN- α eine Rolle in der Pathogenese der MD spielt, sollte diese nach Hemmung des Zytokins sichtbar werden. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde beobachtet, dass bereits an Tag 48 nach der Infektion 100% der Tiere in der antikörperbehandelten Gruppe gestorben waren. Dagegen lebten zu diesem Zeitpunkt noch 50% der Tiere der Kontrollgruppe und 90% der Tiere, die mit der niedrigsten Dosis an rChIFN- α behandelt wurden (Gruppe 1; 250 U IFN- α /Injektion). In den beiden anderen IFN- α behandelten Gruppen lebten noch 70 % (10.000 U/Injektion) bzw. 40 % (1.000 U/Injektion) der Tiere. Zum Versuchende am 70. Tag nach der Infektion war erneut ein umgekehrter Dosis-Wirkungs-Effekt der IFN-Behandlung zu beobachten. In der Gruppe mit der niedrigsten IFN-Dosis (250 U/Injektion) lebten zu diesem Zeitpunkt noch 20% und in der mit 1.000 U/Injektionen behandelte Gruppe noch 10% der Tiere. In der mit 10.000 U/Injektion behandelten Gruppe waren alle Tiere bereits am 63. Tag und in der Kontrollgruppe am 67. Tag nach der Infektion gestorben. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass IFN- α eine Rolle in der MDV-Abwehr zukommt, dieses Zytokin alleine aber zur Kontrolle der Virusreplikation nicht ausreicht. Insbesondere endogen gebildetes IFN- α vermag offensichtlich den Krankheitsverlauf zu verzögern. Diese Daten stimmen mit Beobachtungen im Herpes-Simplex Virusmodell in der Maus überein (TANAKA et al. 1998; BIRON et al. 1999; GOODBOURN et al. 2000). Dass die Behandlung mit rChIFN- α nicht zu

deutlicheren Effekten führte, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass das endogen gebildete IFN- α bereits einen weitreichenden Schutz bewirkt. Eine Steigerung ist darüberhinaus nur noch in geringem Maße möglich. Dementsprechend deutlich wird der IFN- α Effekt beim Vergleich der antikörperbehandelten Gruppe mit der Gruppe mit der niedrigsten IFN- α Dosierung. Die hier erarbeiteten Daten zeigen erneut, dass IFN- α auch bei nicht Säugervertebraten eine potente antivirale Aktivität *in vivo* entfaltet. Vergleichbare Beobachtungen wurden bisher lediglich von Plachy et al. (PLACHY et al. 1999) in einem Hühner-Rous-Sarkommodell beschrieben.

Da die hier vorgelegten *in vitro* Daten und die Daten anderer Arbeitsgruppe (s.o.) auch für IFN- γ eine potente antivirale Aktivität zeigten, wurde in einem weiteren *in vivo* Experiment die Funktion dieses Zytokins untersucht. Hühner wurden dazu mit rChIFN- γ in unterschiedlichen Dosierungen behandelt, die Durchführung und Auswertung des Versuches entsprach exakt der der IFN- α Versuche. In diesem Experiment waren am 43. Tag nach der Infektion bereits alle Tiere der Kontrollgruppe an MD gestorben. Zu diesem Zeitpunkt lebten noch 50% der Tiere mit der niedrigsten IFN- γ Dosierung (200 U/Injektion), in den beiden höher dosierten Gruppen (2.000 und 20.000 U/Injektion) lebten noch jeweils 30 % der Tiere. Zu Versuchende in der 10. Woche waren die Tiere aller Gruppen gestorben. Insgesamt zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen den Mortalitätskurven der behandelten Gruppen. Behandelte und unbehandelte Tiere unterschieden sich im Verlauf der Krankheitsentwicklung dagegen deutlich, allerdings in geringerem Maße als in den Experimenten zur Wirkung des IFN- α . Auch in diesem Versuch wurden keinerlei Effekte der Zytokinbehandlung auf die Entwicklung der klinischen MD Symptomatik und die Bildung von MD-Tumoren beobachtet.

Die Analyse dieser Daten weist darauf hin, dass IFN- γ nur in sehr begrenztem Umfang an der Kontrolle der MDV-Infektion durch hochpathogene Stämme beteiligt ist. Die in dieser Studie verwendeten Hühner entstammen einer kommerziellen Leghornlinie, sind also nicht auf hohe Resistenz gegenüber MD selektiert. Vaccinierung der Tiere mit dem Rispens Impfstamm führt allerdings zu einer hochgradigen Protektion gegen eine Challenge-Infektion mit dem hier verwandten hochpathogenen Virus EU-1. In Versuchen mit MD resistenten und empfänglichen Hühnerlinien (XING et al. 2000b; DJERABA et al. 2002b) wurde durch Stimulation mit IFN- γ eine erhöhte NO-Produktion in Makrophagen- und CEC-Kulturen der

resistenten Tiere beobachtet und diese Fähigkeit dem besseren antiviralen Schutz zugeordnet. In der hier vorliegenden Arbeit, konnte, wie bereits diskutiert, keine IFN- γ induzierte NO-Synthese in CEC-Kulturen nachgewiesen werden. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass eine IFN- γ Behandlung MD resistenter Hühnerlinien einen deutlicheren Effekt zeigt.

Bisher unbeantwortet ist die Frage nach der Bedeutung des endogenen IFN- γ . Da im Rahmen dieser Untersuchung kein neutralisierender monoklonaler Antikörper gegen IFN- γ zur Verfügung stand, müssen diese Arbeiten bis zur Entwicklung der nötigen Reagenzien verschoben werden.

6 Zusammenfassung

Die durch des Marek Disease Virus (MDV) ausgelöste Mareksche Krankheit ist eine der bedeutesten Krankheiten der Geflügelwirtschaft. Zu den frühen Krankheitserscheinungen gehören Apathie, Anorexie, und eine transiente Paralyse, im weiteren Verlauf der Erkrankung treten Tumoren auf. Die Krankheit ist durch eine hohe Mortalität gekennzeichnet. Die Impfprophylaxe stellt die wichtigste Bekämpfungsmaßnahme dar. Da zunehmend pathogenere Feldstämme auftreten kommt es aber immer wieder zu Impfdurchbrüchen. Um bessere Bekämpfungsmaßnahmen entwickeln zu können, sind detaillierte Kenntnisse der Wirt-Virus-Interaktion notwendig.

Interferone (IFN) sind antiviral wirksame Botenstoffe des Immunsystems. Sie werden aufgrund ihrer Eigenschaften in Typ I (IFN- α und IFN- β) und Typ II (IFN- γ) Interferone unterteilt. Typ I IFNs spielen insbesondere in der frühen Phase einer Virusinfektion eine wichtige Rolle, während IFN- γ als potenter Immunmodulator auch in späteren Phasen der Infektion von Bedeutung ist.

In dieser Arbeit konnte in *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass Embryofibroblastenkulturen auf Infektionen mit dem Impfvirus CVI 988 oder dem hochpathogenen Virusisolat RB1B mit der Synthese eines antiviral wirksamen Faktors reagieren. Neutralisationsexperimente mit spezifischen Antikörpern zeigten, dass es sich dabei um IFN- α nicht aber IFN- β handelte. Ebenso wenig konnte eine Synthese von IFN- γ in diesen Kulturen nachgewiesen werden.

Die Behandlung von infizierten Fibroblastenkulturen mit rekombinatem Hühner IFN- α (rChIFN- α) oder rekombinanten Hühner IFN- γ (rChIFN- γ) führte zu einer hochgradigen Reduktion der Plaquezahlen. Diese konnte auch dann beobachtet werden, wenn die Interferone erst 48 Stunden nach der Infektion der Kulturen zugesetzt wurden.

Diese *in vitro* Studien wurden durch *in vivo* Versuche ergänzt, bei denen leghorn Hennen über einen Zeitraum von 10 Wochen wiederholt entweder mit rChIFN- α oder rChIFN- γ behandelt und mit einem hochpathogenen MDV-1 Isolat (EU-1) infiziert wurden.

Während die Behandlung mit rChIFN- γ nur zu einer geringgradigen Verzögerung der Mortalität führte, konnte mit rChIFN- α eine deutliche Verzögerung erzielt werden. Eine Prävention der MD wurde aber in keinem Fall erzielt. Die funktionelle Bedeutung des IFN- α im Krankheitsverlauf konnte in EU-1 infizierten Tieren durch die Behandlung mit einem neutralisierenden Antikörper gegen ChIFN- α bestätigt werden. Diese Tiere starben 3 Wochen früher an der MD als die unbehandelten Kontrolltiere. Die Studien zeigen, dass Interferone den Krankheitsverlauf deutlich beeinflussen, einen Krankheitsausbruch nach Infektion mit einem hochpathogenen Virus aber nicht verhindern können.

7 Summary

The role of interferon-alpha and interferon-gamma in Marek's disease

Marek's disease virus (MDV) is a herpesvirus causing a lymphoproliferative disorder of domestic chickens worldwide. The early signs of disease like apathy, anorexy and the transient paralysis as well as the symptoms at the later stages (Neoplasia and death) causes large economical problems in the chicken industry. With the development of an effective Vaccine, the first practical vaccine against an oncogenic disease of any type in any species, most of the serious problems were solved. However recent reports describing an increased virulence resulting in vaccine breaks, indicates a demand for better vaccines. To be able to enhance the prophylaxis against Marek's disease virus, the understanding of the interaction between host and virus needs to be expanded.

Interferons are cytokines with antiviral activity. On the basis of their structural and functional features they can be divided into type I (IFN- α and IFN- β) and type II (IFN- γ) interferons. Type I plays an important role during the early phase of viral infections, while IFN- γ has a prominent role later during the infection through its immunomodulatory functions.

In this study it was shown that chicken embryocellcultures responds to the infection with either an apathogenic strain of MDV (CVI 988) or a highly pathogenic strain (RB1B), with the secretion of an antiviral factor. Neutralisation with cytokine specific antibodies revealed that this activity could only be attributed to IFN- α but not IFN- β . In addition, synthesis of IFN- γ was not observed in any of the experiments.

Treatment of MDV infected embryocellcultures with either recombinant chicken IFN- α (rChIFN- α) or recombinant chicken IFN- γ (rChIFN- γ) led to a significant reduction in plaque numbers. This antiviral effect was still observed when cultures were treated 48 hours after infection.

In order to understand the functional role of the IFNs *in vivo*, leghorn birds were repeatedly treated with rChIFN- α or rChIFN- γ for ten weeks starting on the day of hatch. The birds were then challenged on the second day of life with a highly virulent MDV-strain (vv⁺, EU-1).

Treatment with IFN- γ delayed the mortality to a very small degree. In contrast, IFN- α treatment delayed the mortality for 3 weeks. However, prevention of the disease was not achieved regardless of the used IFN- α dose. The functional relevance of IFN- α was further underscored by experiments where birds were treated with a neutralizing monoclonal antibody to ChIFN- α and thereafter infected with the EU-1 strain at the second day of life. Birds in this group died 3 weeks earlier than those in the untreated control group.

These data shows that Interferons play a role in the progression of Mareks disease, however, regardless the IFN-dose applicated, the disease could not be prevented by the cytokines on their own.

8 Literaturverzeichnis

- Addinger, H. K. and Calnek, B. W.** (1973). "Pathogenesis of Marek's Disease: Early Distribution of Virus and Viral Antigens in Infected Chickens". *J Natl Cancer Inst* **50**: 1287-1298.
- Aguet, M. and Merlin, G.** (1987). "Purification of Human Gamma Interferon Receptors by Sequential Affinity Chromatography on Immobilized Monoclonal Antireceptor Antibodies and Human Gamma Interferon". *J Exp Med* **165**: 988-999.
- Akerstrom, B., Brodin, T., Reis, K. and Bjorck, L.** (1985). "Protein G: A Powerful Tool for Binding and Detection of Monoclonal and Polyclonal Antibodies". *J Immunol* **135**: 2589-2592.
- Anderson, A. S., Parcels, M. S. and Morgan, R. W.** (1998). "The Glycoprotein D (Us6) Homolog Is Not Essential for Oncogenicity or Horizontal Transmission of Marek's Disease Virus". *J Virol* **72**: 2548-2553.
- Anderson, P., Yip, Y. K. and Vilcek, J.** (1982). "Specific Binding of 125i-Human Interferon-Gamma to High Affinity Receptors on Human Fibroblasts". *J Biol Chem* **257**: 11301-11304.
- Bacon, L. D., Hunt, H. D. and Cheng, H. H.** (2000). "A Review of the Development of Chicken Lines to Resolve Genes Determining Resistance to Diseases". *Poult Sci* **79**: 1082-1093.
- Baigent, S. and Davison, T. F.** (1999). "Development and Composition of Lymphoid Lesions in the Spleens of Marek's Disease Virus-Infected Chickens: Association with Virus Spread and the Pathogenesis of Marek's Disease". *Avian Pathology* **28**: 287-300.
- Bancroft, G. J.** (1993). "The Role of Natural Killer Cells in Innate Resistance to Infection". *Curr Opin Immunol* **5**: 503-510.
- Basham, T. Y. and Merigan, T. C.** (1983). "Recombinant Interferon-Gamma Increases Hla-Dr Synthesis and Expression". *J Immunol* **130**: 1492-1494.
- Berrih, S., Arenzana-Seisdedos, F., Cohen, S., Devos, R., Charron, D. and Virelizier, J. L.** (1985). "Interferon-Gamma Modulates Hla Class II Antigen Expression on Cultured Human Thymic Epithelial Cells". *J Immunol* **135**: 1165-1171.
- Beug, H., von Kirchbach, A., Doederlein, G., Conscience, J.-F. and Graf, T.** (1979). "Chicken Hematopoietic Cells Transformed by Seven Strains of Defective Avian Leukemia Viruses Display Three Distinct Phenotypes of Differentiation". *Cell* **18**: 375-390.
- Bhattacharyya, L., Haraldsson, M. and Brewer, C. F.** (1987). "Concanavalin A Interactions with Asparagine-Linked Glycopeptides. Bivalency of Bisected Complex Type Oligosaccharides". *J Biol Chem* **262**: 1294-1299.
- Biggs, P. M., Milne, B.S.** (1972). "Biological Properties of a Number of Marek's Disease Virus Isolates". In: *Oncogenesis and herpesviruses*, Internat. Agency for Res. on Cancer: 88-94.
- Billiau, A.** (1996). "Interferon-Gamma: Biology and Role in Pathogenesis". *Adv Immunol* **62**: 61-130.
- Biron, C. A.** (1997). "Activation and Function of Natural Killer Cell Responses During Viral Infections". *Curr Opin Immunol* **9**: 24-34.

- Biron, C. A. and Gazzinelli, R. T.** (1995). "Effects of IL-12 on Immune Responses to Microbial Infections: A Key Mediator in Regulating Disease Outcome". *Curr Opin Immunol* **7**: 485-96.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. and Salazar-Mather, T. P.** (1999). "Natural Killer Cells in Antiviral Defense: Function and Regulation by Innate Cytokines". *Annu Rev Immunol* **17**: 189-220.
- Bocci, V.** (1988). "What Are the Roles of Interferons in Physiological Conditions?" *NIPS* **3**: 201-203.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. and Howard, J. C.** (1997). "Cellular Responses to Interferon-Gamma". *Annual Reviews in Immunology* **15**: 749-795.
- Brunovskis, P., Chen, X. and Velicer, L. F.** (1992). "Analysis of Marek'S Disease Virus Glykoproteins D, I and E." *ProcXIX World's Poultry Congress* **Vol.1**: 118-121.
- Bülöw, V. v. and Klasen, A.** (1983). "Growth Inhibition of Marek'S Disease T-Lymphoblastoid Cell Lines by Chicken Bone-Marrow-Derived Macrophages Activated in Vitro". *Avian Pathology* **12**: 161-178.
- Burgoyne, G. H. and Witter, R. L.** (1973). "Effect of Passively Transferred Immunoglobulins on Marek's Disease". *Avian Dis* **17**: 824-837.
- Buscaglia, C. and Calnek, B. W.** (1988). "Maintenance of Marek's Disease Herpesvirus Latency in Vitro by a Factor Found in Conditioned Medium". *J Gen Virol* **69** (Pt 11): 2809-2818.
- Calnek, B. W., Addlinger, H. K. and Kahn, D. E.** (1970). "Feather Follicle Epithelium: A Source of Enveloped and Infectious Cell-Free Herpesvirus from Marek's Disease". *Avian Dis* **14**: 219-233.
- Calnek, B. W., Carlisle, J. C., Fabricant, J., Murthy, K. K. and Schat, K. A.** (1979). "Comparative Pathogenesis Studies with Oncogenic and Nononcogenic Marek's Disease Viruses and Turkey Herpesvirus". *Am J Vet Res* **40**: 541-548.
- Calnek, B. W., Harris, R. W., Buscaglia, C., Schat, K. A. and Lucio, B.** (1998). "Relationship between the Immunosuppressive Potential and the Pathotype of Marek's Disease Virus Isolates". *Avian Dis* **42**: 124-132.
- Calnek, B. W. and Hitchner, S. B.** (1969). "Localization of Viral Antigen in Chickens Infected with Marek's Disease Herpesvirus". *J Natl Cancer Inst* **43**: 935-49.
- Calnek, B. W., Schat, K. A., Ross, L. J. and Chen, C. L.** (1984). "Further Characterization of Marek's Disease Virus-Infected Lymphocytes. Ii. In Vitro Infection". *Int J Cancer* **33**: 399-406.
- Calnek, B. W., Schat, K. A., Ross, L. J., Shek, W. R. and Chen, C. L.** (1984b). "Further Characterization of Marek's Disease Virus-Infected Lymphocytes. I. In Vivo Infection". *Int J Cancer* **33**: 389-398.
- Calnek, B. W., Shek, W. R. and Schat, K. A.** (1981). "Latent Infections with Marek's Disease Virus and Turkey Herpesvirus". *J Natl Cancer Inst* **66**: 585-590.
- Calnek, W. and Smith, M. W.** (1972). "Vaccination against Marek's Disease with Cell-Free Turkey Herpesvirus: Interference by Maternal Antibody". *Avian Dis* **16**: 954-957.
- Carpick, B. W., Graziano, V., Schneider, D., Maitra, R. K., Lee, X. and Williams, B. R.** (1997). "Characterization of the Solution Complex between the Interferon-Induced, Double-Stranded Rna-Activated Protein Kinase and Hiv-I Trans-Activating Region Rna". *J Biol Chem* **272**: 9510-9516.
- Carroll, S. S., Chen, E., Viscount, T., Geib, J., Sardana, M. K., Gehman, J. and Kuo, L. C.** (1996). "Cleavage of Oligoribonucleotides by the 2',5'-Oligoadenylate-Dependent Ribonuclease L". *J Biol Chem* **271**: 4988-4992.

- Celada, A., Allen, R., Esparza, I., Gray, P. W. and Schreiber, R. D.** (1985). "Demonstration and Partial Characterization of the Interferon-Gamma Receptor on Human Mononuclear Phagocytes". *J Clin Invest* **76**: 2196-2205.
- Cenci, E., Romani, L., Mencacci, A., Spaccapelo, R., Schiaffella, E., Puccetti, P. and Bistoni, F.** (1993). "Interleukin-4 and Interleukin-10 Inhibit Nitric Oxide-Dependent Macrophage Killing of *Candida Albicans*". *Eur J Immunol* **23**: 1034-1038.
- Chang, C. H., Hammer, J., Loh, J. E., Fodor, W. L. and Flavell, R. A.** (1992). "The Activation of Major Histocompatibility Complex Class-I Genes by Interferon Regulatory Factor-1 (Irf-1)". *Immunogenetics*. **35**: 378-384.
- Cho, B. R. and Kenzy, S. G.** (1972). "Isolation and Characterization of an Isolate (Hn) of Marek's Disease Virus with Low Pathogenicity". *Appl Microbiol* **24**: 299-306.
- Chomiak, T. W., Luginbuhl, R. E., Helmboldt, C. F. and Kottaridis, S. D.** (1967). "Marek's Disease. I. Propagation of the Connecticut a (Conn-a) Isolate in Chicks". *Avian Dis* **11**: 646-653.
- Chubb, R. C. and Churchill, A. E.** (1969). "Effect of Maternal Antibody on Marek's Disease". *Vet Rec* **85**: 303-305.
- Churchill, A. E. and Biggs, P. M.** (1967). "Agent of Marek's Disease in Tissue Culture". *Nature* **215**: 528-530.
- Coffman, R. L. and Mosmann, T. R.** (1991). "Cd4+ T-Cell Subsets: Regulation of Differentiation and Function". *Res Immunol* **142**: 7-9.
- Darnell, J. E., Jr.** (1996). "Reflections on Stat3, Stat5, and Stat6 as Fat Stats". *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6221-6224.
- Darnell, J. E., Jr.** (1998). "Studies of Ifn-Induced Transcriptional Activation Uncover the Jak-Stat Pathway". *J Interferon Cytokine Res* **18**: 549-54.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. and Stark, G. R.** (1994). "Jak-Stat Pathways and Transcriptional Activation in Response to Ifns and Other Extracellular Signaling Proteins". *Science* **264**: 1415-1421.
- DeMaeyer, E. and DeMaeyer-Guignard, J.** (1988). "Interferons and Other Regularoty Cytokines". Wiley Interscience.
- Derynck, R., Content, J., DeClercq, E., Volckaert, G., Tavernier, J., Devos, R. and Fiers, W.** (1980). "Isolation and Structure of a Human Fibroblast Interferon Gene". *Nature* **285**: 542-547.
- Digby, M. R. and Lowenthal, J. W.** (1995). "Cloning and Expression of the Chicken Interferon-Gamma Gene". *J. Interferon Cytokine Res.* **15**: 939-945.
- Dijkmans, R. and Billiau, A.** (1988). "Interferon Gamma: A Master Key in the Immune System". *Curr Opin Immunol* **1**: 269-274.
- Dijkmans, R., Decock, B., Heremans, H., Van Damme, J. and Billiau, A.** (1989). "Interferon-Gamma Is Cytotoxic for Normal Mouse Fibroblasts: Enhancement by Tumor Necrosis Factor and Interleukin 1". *Lymphokine Res* **8**: 25-34.
- Ding, A. H. and Lam, K. M.** (1986). "Enhancement by Interferon of Chicken Splenocyte Natural Killer Cell Activity against Marek's Disease Tumor Cells". *Vet Immunol Immunopathol* **11**: 65-72.
- Ding, A. H., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J.** (1988). "Release of Reactive Nitrogen Intermediates and Reactive Oxygen Intermediates from Mouse Peritoneal Macrophages. Comparison of Activating Cytokines and Evidence for Independent Production". *Journal of Immunology* **141**: 2407-2412.
- Djeraba, A., Bernardet, N., Dambrine, G. and Quere, P.** (2000). "Nitric Oxide Inhibits Marek's Disease Virus Replication but Is Not the Single Decisive Factor in Interferon-Gamma-Mediated Viral Inhibition". *Virology* **277**: 58-65.
- Djeraba, A., Musset, E., Bernardet, N., Le Vern, Y. and Quere, P.** (2002b). "Similar Pattern of Inos Expression, No Production and Cytokine Response in Genetic

- and Vaccination-Acquired Resistance to Marek's Disease". *Vet Immunol Immunopathol* **85**: 63-75.
- Djeraba, A., Musset, E., Lowenthal, J. W., Boyle, D. B., Chausse, A. M., Peloille, M. and Quere, P.** (2002a). "Protective Effect of Avian Myelomonocytic Growth Factor in Infection with Marek's Disease Virus". *J Virol* **76**: 1062-1070.
- Dorange, F., Tischer, B. K., Vautherot, J. F. and Osterrieder, N.** (2002). "Characterization of Marek's Disease Virus Serotype 1 (Mdv-1) Deletion Mutants That Lack UI46 to UI49 Genes: Mdv-1 UI49, Encoding Vp22, Is Indispensable for Virus Growth". *J Virol* **76**: 1959-1970.
- Dworkin-Rastl, E., Dworkin, M. B. and Swetly, P.** (1982). "Molecular Cloning of Human Alpha and Beta Interferon Genes from Namalwa Cells". *J Interferon Res* **2**: 575-585.
- Eidson, C. S., Ellis, M. N. and Kleven, S. H.** (1981). "Reduced Vaccinal Protection of Turkey Herpesvirus against Field Strains of Marek's Disease Herpesvirus". *Poult Sci* **60**: 317-22.
- Eidson, C. S., Kleven, S. H. and Anderson, D. P.** (1973). "Efficacy of Cellfree and Cell-Associated Herpesvirus of Turkeys Vaccines in Progeny from Vaccinated Parental Flocks". *Am J Vet Res* **34**: 869-872.
- Eidson, C. S. and Schmittle, S. C.** (1968). "Studies on Acute Marek's Disease. I. Characteristics of Isolate Ga in Chickens". *Avian Dis* **12**: 467-476.
- Elmubarak, A. K., Sharma, J. M., Witter, R. L., Nazerian, K. and Sanger, V. L.** (1981). "Induction of Lymphomas and Tumor Antigen by Marek's Disease Virus in Turkeys". *Avian Dis* **25**: 911-926.
- Epstein, M. A., Achong, B. G., Churchill, A. E. and Biggs, P. M.** (1968). "Structure and Development of the Herpes-Types Virus of Marek's Disease". *J Natl Cancer Inst* **41**: 805-820.
- Farrar, M. A. and Schreiber, R. D.** (1993). "The Molecular Cell Biology of Interferon-Gamma and Its Receptor". *Annu Rev Immunol* **11**: 571-611.
- Flesch, I. E. and Kaufmann, S. H.** (1991). "Mechanisms Involved in Mycobacterial Growth Inhibition by Gamma Interferon-Activated Bone Marrow Macrophages: Role of Reactive Nitrogen Intermediates". *Infect Immun* **59**: 3213-3218.
- Floyd-Smith, G., Slattery, E. and Lengyel, P.** (1981). "Interferon Action: Rna Cleavage Pattern of a (2'-5')Oligoadenylate--Dependent Endonuclease". *Science* **212**: 1030-1032.
- Fountoulakis, M., Zulauf, M., Lustig, A. and Garotta, G.** (1992). "Stoichiometry of Interaction between Interferon Gamma and Its Receptor". *Eur J Biochem* **208**: 781-787.
- Friedmann, R. M. and Vogel, S. N.** (1983). "Interferons with Special Emphasis on the Immune System." *Adv. Immunol.* **34**: 97-140.
- Gajewski, T. F., Schell, S. R., Nau, G. and Fitch, F. W.** (1989). "Regulation of T-Cell Activation: Differences among T-Cell Subsets". *Immunol Rev* **111**: 79-110.
- Gobel, T. W., Chen, C. H. and Cooper, M. D.** (1996). "Avian Natural Killer Cells". *Curr Top Microbiol Immunol* **212**: 107-117.
- Gollob, J. A., Kawasaki, H. and Ritz, J.** (1997). "Interferon-Gamma and Interleukin-4 Regulate T Cell Interleukin-12 Responsiveness through the Differential Modulation of High-Affinity Interleukin-12 Receptor Expression". *Eur J Immunol* **27**: 647-652.
- Goodbourn, S., Didcock, L. and Randall, R. E.** (2000). "Interferons: Cell Signalling, Immune Modulation, Antiviral Response and Virus Countermeasures". *J Gen Virol* **81**: 2341-2364.

- Granger, D. L., Hibbs, J. B., Jr., Perfect, J. R. and Durack, D. T.** (1988). "Specific Amino Acid (L-Arginine) Requirement for the Microbiostatic Activity of Murine Macrophages". *J Clin Invest* **81**: 1129-1136.
- Gray, P. W. and Goeddel, D. V.** (1982a). "Structure of the Human Immune Interferon Gene". *Nature* **298**: 859-863.
- Gray, P. W. and Goeddel, D. V.** (1983). "Cloning and Expression of Murine Immune Interferon Cdna". *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 5842-5846.
- Gray, P. W., Leung, D. W., Pennica, D., Yelverton, E., Najarian, R., Simonsen, C. C., Derynck, R., Sherwood, P. J., Wallace, D. M., Berger, S. L., Levinson, A. D. and Goeddel, D. V.** (1982b). "Expression of Human Immune Interferon Cdna in E. Coli and Monkey Cells". *Nature* **295**: 503-508.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R.** (1982). "Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15n]Nitrate in Biological Fluids". *Anal Biochem* **126**: 131-138.
- Green, S. J., Meltzer, M. S., Hibbs, J. B., Jr. and Nacy, C. A.** (1990). "Activated Macrophages Destroy Intracellular Leishmania Major Amastigotes by an L-Arginine-Dependent Killing Mechanism". *J Immunol* **144**: 278-283.
- Gupta, M., Chauhan, H., Jha, G. and Singh, K.** (1989). "The Role of the Reticuloendothelial System in the Immunopathology of Marek'S Disease". *Vet Microbiol* **20**: 233-234.
- Haffer, K. and Sevoian, M.** (1979). "In Vitro Studies on the Role of the Macrophages of Resistant and Susceptible Chickens with Marek's Disease". *Poult Sci* **58**: 295-297.
- Haffer, K. and Sevoian, M.** (1979). "The Role of Macrophage in Marek'S Disease: In Vitro and in Vivo Studies". *Int J Cancer* **23**: 648-656.
- Haffer, K., Sevoian, M. and Wilder, M.** (1979). "The Role of the Macrophages in Marek's Disease: In Vitro and in Vivo Studies". *Int J Cancer* **23**: 648-656.
- Heller, E. D. and Schat, K. A.** (1987). "Enhancement of Natural Killer Cell Activity by Marek'S Disease Vaccines". *Avian Pathology* **16**: 51-60.
- Heuss, L. T., Heim, M. H., Schultz, U., Wissmann, D., Offensperger, W. B., Staeheli, P. and Blum, H. E.** (1998). "Biological Efficacy and Signal Transduction through Stat Proteins of Recombinant Duck Interferon in Duck Hepatitis B Virus Infection". *J Gen Virol* **79**: 2007-12.
- Higgins, D. A. and Calnek, B. W.** (1976). "Some Effects of Silica Treatment on Marek'S Disease". *Infect Immun* **13**: 1054-1060.
- Hirai, K., Ikuta, K. and Kato, S.** (1979). "Comparative Studies on Marek's Disease Virus and Herpesvirus of Turkey Dnas". *J Gen Virol* **45**: 119-131.
- Hiramoto, W., Takeda, K., Anzai, N., Ogasawara, K., Sakihara, H., Sugiura, K., Seki, S. and Kumagai, K.** (1996). **Reisolation of Marek'S Disease Virus from T Cell Subsets of Vaccinated and Non-Vaccinated Chickens**. in: Current Research on Marek'S Disease.(Ed.) C. H. Silva RF., Coussens PM., Lee LM., Velicer LF. American association of Avian Pathologists, Kennet Square **1996**: 130-135.
- Hong, C. C. and Sevoian, M.** (1971). "Interferon Production and Host Resistance to Type Ii Avian (Marek's) Leukosis Virus (Jm Strain)". *Appl Microbiol* **22**: 818-820.
- Hudson, L. and Payne, L. N.** (1973). "An Analysis of the T and B Cells of Marek's Disease Lymphomas of the Chicken". *Nat New Biol* **241**: 52-53.
- Ihle, J. N.** (1996). "Stats: Signal Transducers and Activators of Transcription". *Cell* **84**: 331-334.
- Ihle, J. N. and Kerr, I. M.** (1995). "Jaks and Stats in Signaling by the Cytokine Receptor Superfamily". *Trends Genet* **11**: 69-74.
- Ijzermans, J. N. and Marquet, R. L.** (1989). "Interferon-Gamma: A Review". *Immunobiology* **179**: 456-473.

- Ikuta, K., Ueda, S., Kato, S. and Hirai, K.** (1984). "Identification with Monoclonal Antibodies of Glycoproteins of Marek's Disease Virus and Herpesvirus of Turkeys Related to Virus Neutralization". *J Virol* **49**: 1014-1017.
- Isaacs, A. and Lindenmann, J.** (1957). "Virus Interference. I. The Interferon." *Proc.R.Soc.Lond.* **147**: 258-267.
- James, S. L. and Hibbs, J. B., Jr.** (1990). "The Role of Nitrogen Oxides as Effector Molecules of Parasite Killing". *Parasitology Today* **6**: 303-305.
- Jang, H.-K., Kitazawa, T., Ono, M., Kawaguchi, Y., Maeda, N., Yokomayama, Y., Tohya, Y., Niikura, M. and Mikami, T.** (1996). "Protection Studies against Marek'S Disease Using Baculovirus-Expressed Glycoproteins B and Dc of Marek'S Disease Virus Type 1". *Avian Pathology* **25**: 5-24.
- Johnstone, A. and Thorpe, R.** (1987). "Preparation of Heavy and Light Chains". In: *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Scientific Publications, Oxford: 55-59.
- Jungwirth, C., Rebbert, M., Ozato, K., Degen, H. J., Schultz, U. and Dawid, I. B.** (1995). "Chicken Interferon Consensus Sequence-Binding Protein (Icsbp) and Interferon Regulatory Factor (Irf) 1 Genes Reveal Evolutionary Conservation in the Irf Gene Family". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**: 3105-3109.
- Kaaden, O. R., Lange, S. and Stiburek, B.** (1982). "Establishment and Characterization of Chicken Embryo Fibroblast Clone Lsc-H32". *In Vitro* **18**: 827-834.
- Kaleta, E.** (1977). "Multiplication, Interference and Interferon Induction of Avian Herpes Viruses: Vaccination against Marek'S Disease." *Zentralblatt Veterinärmedizin* **24**: 406-428.
- Kaleta, E. F. and Bankowski, R. A.** (1972a). "Production of Interferon by the Cal-1 and Turkey Herpesvirus Strains Associated with Marek's Disease". *Am J Vet Res* **33**: 567-571.
- Kaleta, E. F. and Bankowski, R. A.** (1972b). "Viral Interference of Types 1 and 2 Plaque-Producing Agents Derived from Cal-1 Strain of Marek's Disease Herpesvirus and Turkey Herpesvirus". *J Natl Cancer Inst* **48**: 1303-1310.
- Kaleta, E. F. and Bankowski, R. A.** (1972c). "Production of Circulating and Cell-Bound Interferon in Chickens by Type 1 and Type 2 Plaque-Producing Agents of the Cal-1 Strain of Marek's Disease Herpesvirus and Herpesvirus of Turkeys". *Am J Vet Res* **33**: 573-577.
- Kamogawa, Y., Minasi, L. A., Carding, S. R., Bottomly, K. and Flavell, R. A.** (1993). "The Relationship of IL-4- and IFN Gamma-Producing T Cells Studied by Lineage Ablation of IL-4-Producing Cells". *Cell* **75**: 985-995.
- Karupiah, G., Xie, Q. W., Buller, R. M., Nathan, C., Duarte, C. and MacMicking, J. D.** (1993). "Inhibition of Viral Replication by Interferon-Gamma-Induced Nitric Oxide Synthase". *Science* **261**: 1445-1448.
- Keller, L.** (1992). "Protection against Reticuloendotheliosis Virus Strain T Tumours Is Associated with Jmv-1 Culture Supernatant-Enhanced Natural Killer Activity". *Avian Pathology* **21**: 389-399.
- Kerr, I. M. and Brown, R. E.** (1978). "PppA₂p₅'a₂p₅'a: An Inhibitor of Protein Synthesis Synthesized with an Enzyme Fraction from Interferon-Treated Cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 256-260.
- King, D., Page, D., Schat, K. A. and Calnek, B. W.** (1981). "Difference between Influences of Homologous and Heterologous Maternal Antibodies on Response to Serotype-2 and Serotype-3 Marek's Disease Vaccines". *Avian Dis* **25**: 74-81.
- Knight, E., Jr.** (1976). "Interferon: Purification and Initial Characterization from Human Diploid Cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 520-523.

- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B. and Trinchieri, G.** (1989). "Identification and Purification of Natural Killer Cell Stimulatory Factor (Nksf), a Cytokine with Multiple Biologic Effects on Human Lymphocytes". *J Exp Med* **170**: 827-845.
- Kodama, H., Mikami, T. and Izawa, H.** (1980). "Effects of Levamisol on Pathogenesis of Marek'S Disease Virus Infected Chicken Kidney Cells". *J Natl Cancer Inst* **65**: 155-159.
- Kodoma, H., Mikami, T. and Izawa, H.** (1979b). "Inhibitory Effects of Macrophages against Marek'S Disease Virus Plaque Formation in Chicken Kidney Cell Cultures". *J Natl Cancer Inst* **63**: 1367-1271.
- Kunder, S. C., Kelly, K. M. and Morahan, P. S.** (1993). "Biological Response Modifier-Mediated Resistance to Herpesvirus Infections Requires Induction of Alpha/Beta Interferon". *Antiviral Res* **21**: 129-139.
- Kurzrock, R., Talpaz, M., Kantarjian, H., Walters, R., Saks, S., Trujillo, J. M. and Gutterman, J. U.** (1987). "Therapy of Chronic Myelogenous Leukemia with Recombinant Interferon-Gamma". *Blood* **70**: 943-947.
- Lam, K. M. and Linna, T. J.** (1979). "Transfer of Natural Resistance to Marek's Disease (Jmv) with Non-Immune Spleen Cells. I. Studies of Cell Population Transferring Resistance". *Int J Cancer* **24**: 662-667.
- Lambrecht, B., Gonze, M., Meulemans, G. and van den Berg, T. P.** (2000). "Production of Antibodies against Chicken Interferon-Gamma: Demonstration of Neutralizing Activity and Development of a Quantitative Elisa". *Vet Immunol Immunopathol* **74**: 137-144.
- Leaman, D. W.** (1998). "Mechanisms of Interferon Action". *Prog Mol Subcell Biol* **20**: 101-42.
- Leaman, D. W., Leung, S., Li, X. and Stark, G. R.** (1996). "Regulation of Stat-Dependent Pathways by Growth Factors and Cytokines". *Faseb J* **10**: 1578-1588.
- Lebel, F. and Hirsh, M. S.** (1985). **The Role of Interferon in Immunity and Prophylaxis**.in: The Herpesviruses.(Ed.) B. Roizman, Lopez, C. Plenum Press New York. **4**: 371-393.
- Lee, L. F.** (1979). "Macrophage Restriction of Marek's Disease Virus Replication and Lymphoma Cell Proliferation". *J Immunol* **123**: 1088-1091.
- Lee, L. F., Liu, X. and Witter, R. L.** (1983). "Monoclonal Antibodies with Specificity for Three Different Serotypes of Marek's Disease Viruses in Chickens". *J Immunol* **130**: 1003-6.
- Lee, L. F., Sharma, J. M., Nazerian, K. and Witter, R. L.** (1978a). "Suppression and Enhancement of Mitogen Response in Chickens Infected with Marek's Disease Virus and the Herpesvirus of Turkeys". *Infect Immun* **21**: 474-479.
- Lee, L. F., Sharma, J. M., Nazerian, K. and Witter, R. L.** (1978b). "Suppression of Mitogen-Induced Proliferation of Normal Spleen Cells by Macrophages from Chickens Inoculated with Marek's Disease Virus". *J Immunol* **120**: 1554-1559.
- Lee, L. F. and Witter, R. L.** (1991). "Humoral Immune Responses to Inactivated Oil-Emulsified Marek's Disease Vaccine". *Avian Dis* **35**: 452-459.
- Lee, S. I., Ohashi, K., Morimura, T., Sugimoto, C. and Onuma, M.** (1999). "Re-Isolation of Marek's Disease Virus from T Cell Subsets of Vaccinated and Non-Vaccinated Chickens". *Arch Virol* **144**: 45-54.
- Lengyel, P.** (1993). "Tumor-Suppressor Genes: News About the Interferon Connection". *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5893-5895.
- Levy, A. M., Heller, E. D., Leitner, G. and Davidson, I.** (1999). "Effect of Native Chicken Interferon on Mdv Replication". *Acta Virol* **43**: 121-127.

- Levy, D. E., Raz, R., Durbin, J. E., Bluysen, H., Muzaffar, R. and Pisharody, S.** (1995). "Cytoplasmic Transcription Factors: Mediators of Cytokine Signaling". *Agents Actions Suppl* **47**: 79-85.
- Lewis, J. A.** (1987). "Biological Assays for Interferons". In: *Lymphokines and Interferons. A practical approach* (eds.: Clemens, M.J., Morris, A.G. and Gearing, A.J.H.), IRL press, Oxford: 73-87.
- Littman, S. J., Faltynek, C. R. and Baglioni, C.** (1985). "Binding of Human Recombinant ¹²⁵I-Interferon Gamma to Receptors on Human Cells". *J Biol Chem* **260**: 1191-1195.
- Lopez, C.** (1985a). **Natural Resistance Mechanisms in Herpes Virus Infections**. in: *The Herpesviruses*.(Ed.) B. Roizman, Lopez, C. Plenum Press New York. **4**: 37-68.
- Lopez, C.** (1985b). **Natural Resistance Mechanisms in Herpes Simplex Virus Infections**. in: *The Herpesviruses*.(Ed.) B. Roizman, Lopez, C. Plenum Press New York. **4**: 37-68.
- Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L. and Snyder, S. H.** (1994). "Nitric Oxide: A Physiologic Messenger". *Ann Intern Med* **120**: 227-237.
- Lucin, P., Jonjic, S., Messerle, M., Polic, B., Hengel, H. and Koszinowski, U. H.** (1994). "Late Phase Inhibition of Murine Cytomegalovirus Replication by Synergistic Action of Interferon-Gamma and Tumour Necrosis Factor". *J Gen Virol* **75 (Pt 1)**: 101-110.
- Lutfalla, G., Gardiner, K., Proudhon, D., Vielh, E. and Uze, G.** (1992). "The Structure of the Human Interferon Alpha/Beta Receptor Gene". *J Biol Chem* **267**: 2802-2809.
- Lutfalla, G., Holland, S. J., Cinato, E., Monneron, D., Reboul, J., Rogers, N. C., Smith, J. M., Stark, G. R., Gardiner, K., Mogensen, K. E. and et al.** (1995). "Mutant U5a Cells Are Complemented by an Interferon-Alpha Beta Receptor Subunit Generated by Alternative Processing of a New Member of a Cytokine Receptor Gene Cluster". *Embo J* **14**: 5100-5108.
- MacMicking, J., Xie, Q. W. and Nathan, C.** (1997). "Nitric Oxide and Macrophage Function". *Annu Rev Immunol* **15**: 323-350.
- Malkinson, M., Orgad, U. and Becker, Y.** (1986). "Use of Lectins to Detect and Differentiate Subtypes of Marek's Disease Virus and Turkey Herpesvirus Glycoproteins in Tissue Culture". *J Virol Methods* **13**: 129-133.
- Mandi, Y., Seprenyi, G., Pusztai, R. and Beladi, I.** (1985). "Are Granulocytes the Main Effector Cells of Natural Cytotoxicity in Chickens?" *Immunobiology* **170**: 284-292.
- Marcucci, F., Waller, M., Kirchner, H. and Krammer, P.** (1981). "Production of Immune Interferon by Murine T-Cell Clones from Long-Term Cultures". *Nature* **291**: 79-81.
- Marek, J.** (1907). "Multiple Nervenentzündungen (Polyneuritis) Bei Hühnern." *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **15**: 417-421.
- Matsuda, H., Ikuta, K., Miyamoto, H. and Kato, S.** (1976). "Demonstration of a Marek's Disease Tumor-Associated Surface Antigen (Matsa) on Six Cell Lines Derived from Marek's Disease Lymphomas". *Biken J* **19**: 119-123.
- McCull, K. A., Calnek, B. W., Harris, W. V., Schat, K. A. and Lee, L. F.** (1987). "Expression of a Putative Tumor-Associated Surface Antigen on Normal Versus Marek's Disease Virus-Transformed Lymphocytes". *J Natl Cancer Inst* **79**: 991-1000.
- Mester, J. C. and Rouse, B. T.** (1991). "The Mouse Model and Understanding Immunity to Herpes Simplex Virus". *Rev Infect Dis* **13 Suppl 11**: S935-945.

- Mogensen, K. E., Lewerenz, M., Reboul, J., Lutfalla, G. and Uze, G.** (1999). "The Type I Interferon Receptor: Structure, Function, and Evolution of a Family Business". *J Interferon Cytokine Res* **19**: 1069-1098.
- Morgan, R. W., Xie, Q., Cantello, J. L., Miles, A. M., Bernberg, E. L., Kent, J. and Anderson, A.** (2001). "Marek's Disease Virus Latency". *Curr Top Microbiol Immunol* **255**: 223-243.
- Morimura, T., Ohashi, K., Sugimoto, C. and Onuma, M.** (1998). "Pathogenesis of Marek's Disease (Md) and Possible Mechanisms of Immunity Induced by Md Vaccine". *J Vet Med Sci* **60**: 1-8.
- Morris, A. G., Morser, J. and Meager, A.** (1982). "Spontaneous Production of Gamma Interferon and Induced Production of Beta Interferon by Human T-Lymphoblastoid Cell Lines". *Infect Immun* **35**: 533-536.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L.** (1986). "Two Types of Murine Helper T Cell Clone. I. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins". *J Immunol* **136**: 2348-2357.
- Mossman, K. L.** (2002). "Activation and Inhibition of Virus and Interferon: The Herpesvirus Story". *Viral Immunol* **15**: 3-15.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M. and Aguet, M.** (1994). "Functional Role of Type I and Type II Interferons in Antiviral Defense". *Science* **264**: 1918-1921.
- Nagata, K., Izumi, T., Kitagawa, T. and Yoshida, N.** (1987). "Oligomeric Structure of Recombinant Human and Murine Immune Interferons by Means of Sedimentation Equilibrium". *J Interferon Res* **7**: 313-320.
- Nathan, C. F.** (1987). "Secretory Products of Macrophages". *J Clin Invest* **79**: 319-326.
- Nazerian, K. and Burmester, B. R.** (1968a). "Electron Microscopy of a Herpes Virus Associated with the Agent of Marek's Disease in Cell Culture". *Cancer Res* **28**: 2454-2562.
- Nazerian, K. and Sharma, J. M.** (1975). "Detection of T-Cell Surface Antigens in a Marek's Disease Lymphoblastoid Cell Line". *J Natl Cancer Inst* **54**: 277-279.
- Nazerian, K. and Sharma, J. M.** (1985). "Pathogenesis of Marek's Disease in Turkeys". In: Calnek, B.W., Spencer, J.L., (eds.), *Proc. int. Symp. Marek's Dis.* American Association of Avian Pathologists, Kennel Square, PA: 262-267.
- Nazerian, K., Solomon, J. J., Witter, R. L. and Burmester, B. R.** (1968b). "Studies on the Etiology of Marek's Disease. II. Finding of a Herpesvirus in Cell Culture". *Proc Soc Exp Biol Med* **127**: 177-182.
- Nazerian, K., Stephens, E. A., Sharma, J. M., Lee, L. F., Gailitis, M. and Witter, R. L.** (1977). "A Nonproducer T Lymphoblastoid Cell Line from Marek's Disease Transplantable Tumor (Jmv)". *Avian Dis* **21**: 69-76.
- Novick, D., Cohen, B. and Rubinstein, M.** (1994). "The Human Interferon Alpha/Beta Receptor: Characterization and Molecular Cloning". *Cell* **77**: 391-400.
- Okada, K., Fujimoto, Y., Mikami, T. and Yonehara, K.** (1972). "The Fine Structure of Marek's Disease Virus and Herpesvirus of Turkey in Cell Culture". *Jpn J Vet Res* **20**: 57-68.
- Omar, A. R. and Schat, K. A.** (1996a). "Syngeneic Marek's Disease Virus (Mdv)-Specific Cell Mediated Immune Responses against Immediate Early, Late, and Unique Mdv Proteins". *Virology* **222**: 87-99.
- Omar, A. R. and Schat, K. A.** (1996b). "Syngeneic Marek's Disease Virus (Mdv)-Specific Cell-Mediated Immune Responses against Immediate Early, Late, and Unique Mdv Proteins". *Virology* **222**: 87-99.

- Orange, J. S. and Biron, C. A.** (1996). "Characterization of Early Il-12, Ifn- α , and Tnf Effects on Antiviral State and Nk Cell Responses During Murine Cytomegalovirus Infection". *J Immunol* **156**: 4746-4756.
- Owens, T., Renno, T., Taupin, V. and Krakowski, M.** (1994). "Inflammatory Cytokines in the Brain: Does the Cns Shape Immune Responses?" *Immunol Today* **15**: 566-571.
- Pace, J. L., Russell, S. W., LeBlanc, P. A. and Murasko, D. M.** (1985). "Comparative Effects of Various Classes of Mouse Interferons on Macrophage Activation for Tumor Cell Killing". *J Immunol* **134**: 977-981.
- Pappenheimer, A. M., Dunn, L.C., Cone, V.A.** (1926). "Study of Fowl Paralysis (Neuro-Lymphomatosis Gallinarium)". *Storrs Agric. Expert. Sta. Bull.* **143**: 186-200.
- Parcells, M. S., Lin, S. F., Dienglewicz, R. L., Majerciak, V., Robinson, D. R., Chen, H. C., Wu, Z., Dubyak, G. R., Brunovskis, P., Hunt, H. D., Lee, L. F. and Kung, H. J.** (2001). "Marek's Disease Virus (Mdv) Encodes an Interleukin-8 Homolog (Vil-8): Characterization of the Vil-8 Protein and a Vil-8 Deletion Mutant Mdv". *J Virol* **75**: 5159-73.
- Payne, L. N., Frazier, J. A. and Powell, P. C.** (1976). "Pathogenesis of Marek's Disease". *Int Rev Exp Pathol* **16**: 59-154.
- Payne, L. N., Powell, P. C. and Rennie, M.** (1974). "Response of B and T Lymphocytes and Other Blood Leukocytes in Chickens with Marek'S Disease". *Cold. Spring harb. symp. quant. biol.* **39**: 817-826.
- Payne, L. N. and Rennie, M.** (1973). "Pathogenesis of Marek's Disease in Chicks with and without Maternal Antibody". *J Natl Cancer Inst* **51**: 1559-1573.
- Perussia, B., Dayton, E. T., Fanning, V., Thiagarajan, P., Hoxie, J. and Trinchieri, G.** (1983). "Immune Interferon and Leukocyte-Conditioned Medium Induce Normal and Leukemic Myeloid Cells to Differentiate Along the Monocytic Pathway". *J Exp Med* **158**: 2058-2080.
- Phillips, P. A. and Biggs, P. M.** (1972). "Course of Infection in Tissues of Susceptible Chickens after Exposure to Strains of Marek's Disease Virus and Turkey Herpesvirus". *J Natl Cancer Inst* **49**: 1367-1373.
- Plachy, J., Weining, K. C., Kremmer, E., Puehler, F., Hala, K., Kaspers, B. and Staeheli, P.** (1999). "Protective Effects of Type I and Type II Interferons toward Rous Sarcoma Virus-Induced Tumors in Chickens". *Virology* **256**: 85-91.
- Pober, J. S., Collins, T., Gimbrone, M. A., Jr., Cotran, R. S., Gitlin, J. D., Fiers, W., Clayberger, C., Krensky, A. M., Burakoff, S. J. and Reiss, C. S.** (1983). "Lymphocytes Recognize Human Vascular Endothelial and Dermal Fibroblast Ia Antigens Induced by Recombinant Immune Interferon". *Nature* **305**: 726-729.
- Powell, K. C., Hartley, J. W., Mustill, B. and Rennie, M.** (1983a). "Studies in the Role of Macrophages in Marek'S Disease of the Chicken". *J Ret Soc* **34**: 289-297.
- Powell, P. C. and Rennie, M.** (1984). "The Expression of Marek'S Disease Tumor-Associated Surface Antigen in Various Avian Species". *Avian Pathology* **13**: 345-349.
- Pratt, W. D., Morgan, R. W. and Schat, K. A.** (1992a). "Characterization of Reticuloendotheliosis Virus-Transformed Avian T-Lymphoblastoid Cell Lines Infected with Marek's Disease Virus". *J Virol* **66**: 7239-7244.
- Pratt, W. D., Morgan, R. W. and Schat, K. A.** (1992b). "Cell-Mediated Cytolysis of Lymphoblastoid Cells Expressing Marek's Disease Virus-Specific Phosphorylated Polypeptides". *Vet Microbiol* **33**: 93-99.
- Purchase, H. G.** (1970). "Virus-Specific Immunofluorescent and Precipitin Antigens and Cell-Free Virus in the Tissues of Birds Infected with Marek's Disease". *Cancer Res* **30**: 1898-1908.

- Purchase, H. G.** (1985). "Clinical Disease and Its Economic Impact". In: L.N. Payne (ed). Marek's Disease. Martinus Nijhoff, Boston: 17-24.
- Purchase, H. G. and Biggs, P. M.** (1967). "Characterization of Five Isolates of Marek's Disease". Res Vet Sci **8**: 440-449.
- Qureshi, M. A., Heggen, C. L. and Hussain, I.** (2000). "Avian Macrophage: Effector Functions in Health and Disease". Dev Comp Immunol **24**: 103-119.
- Reboul, J., Gardiner, K., Monneron, D., Uze, G. and Lutfalla, G.** (1999). "Comparative Genomic Analysis of the Interferon/Interleukin-10 Receptor Gene Cluster". Genome Res **9**: 242-50.
- Reis, L. F., Harada, H., Wolchok, J. D., Taniguchi, T. and Vilcek, J.** (1992). "Critical Role of a Common Transcription Factor, Irf-1, in the Regulation of Ifn-Beta and Ifn-Inducible Genes". EMBO J. **11**: 185-193.
- Reiss, C. S. and Komatsu, T.** (1998). "Does Nitric Oxide Play a Critical Role in Viral Infections?" J Virol **72**: 4547-4551.
- Rispens, B. H., van Vloten, H., Mastenbroek, N., Maas, H. J. and Schat, K. A.** (1972a). "Control of Marek's Disease in the Netherlands. I. Isolation of an Avirulent Marek's Disease Virus (Strain Cvi 988) and Its Use in Laboratory Vaccination Trials". Avian Dis **16**: 108-125.
- Rispens, B. H., van Vloten, H., Mastenbroek, N., Maas, J. L. and Schat, K. A.** (1972b). "Control of Marek's Disease in the Netherlands. Ii. Field Trials on Vaccination with an Avirulent Strain (Cvi 988) of Marek's Disease Virus". Avian Dis **16**: 126-138.
- Rocken, M., Muller, K. M., Saurat, J. H., Muller, I., Louis, J. A., Cerottini, J. C. and Hauser, C.** (1992). "Central Role for Tcr/Cd3 Ligation in the Differentiation of Cd4+ T Cells toward a Th1 or Th2 Functional Phenotype". J Immunol **148**: 47-54.
- Roizman, B., Carmichael, L. E., Deinhardt, F., de-The, G., Nahmias, A. J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M. and Wolf, K.** (1981). "Herpesviridae. Definition, Provisional Nomenclature, and Taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses". Intervirology **16**: 201-217.
- Romani, L., Puccetti, P. and Bistoni, F.** (1997). "Interleukin-12 in Infectious Diseases". Clin Microbiol Rev **10**: 611-36.
- Ross, L. J., Milne, B. and Biggs, P. M.** (1983). "Restriction Endonuclease Analysis of Marek's Disease Virus DNA and Homology between Strains". J Gen Virol **64** (Pt 12): 2785-90.
- Ross, L. J., Powell, P. C., Walker, D. J., Rennie, M. and Payne, L. N.** (1977). "Expression of Virus-Specific, Thymus-Specific and Tumour-Specific Antigens in Lymphoblastoid Cell Lines Derived from Marek's Disease Lymphomas". J Gen Virol **35**: 219-235.
- Ross, N.** (1977). "Antiviral T Cell-Mediated Immunity in Marek'S Disease". Nature **268**: 644-646.
- Samuel, C. E.** (1987). **Interferon Induction of the Antiviral State Proteins Induced by Interferons and Their Possible Roles in the Antiviral Mechanisms of Action**.in: Interferon Actions.(Ed.) L. M. Pfeffer. CRC Press Boca Raton, FL. p. 110.
- Schat, K. A. and Calnek, B. W.** (1978a). "Characterization of an Apparently Nononcogenic Marek's Disease Virus". J Natl Cancer Inst **60**: 1075-1082.
- Schat, K. A., Calnek, B. W. and Fabricant, J.** (1981). "Influence of the Bursa of Fabricius on the Pathogenesis of Marek's Disease". Infect Immun **31**: 199-207.
- Schat, K. A., Calnek, B. W. and Weinstock, D.** (1986). "Cultivation and Characterization of Avian Lymphocytes with Natural Killer Cell Activity". Avian Pathology **15**: 539-556.

- Schat, K. A., Calnek, B.W.** (1982). "Characterization of Two Highly Onkogenic Strains of Marek's Disease Virus". *Avian Pathology* **11**: 593-605.
- Schat, K. A., Chen, C. L., Calnek, B. W. and Char, D.** (1991). "Transformation of T-Lymphocyte Subsets by Marek's Disease Herpesvirus". *J Virol* **65**: 1408-1413.
- Schat, K. A., Chen, C.-L. H., Lillehoj, H., Calnek, B. W. and D., W.** (1989). **Characterization of Marek's Disease Cell Lines with Monoclonal Antibodies Specific for Cytotoxic and Helper T Cells.** in: Advances in Marek's Disease Research (Ed.) H. S. Kato S., Mikami T., Hirai K. Japanese Association on Marek's Disease Osaka. 220-226.
- Schat, K. A. and Davies, C.** (2000a). **Resistance to Viral Diseases.** in: Breeding for Disease Resistance in Farm Animals. (Ed.) B. S. Axford RFE, Nicholas F, Owen JB. **22**: 225-232.
- Schat, K. A. and Gonzales, J.** (1974). "Interferon Production by Strains of Herpesvirus Associated with Marek's Disease". *Avian disease* **18**: 531-535.
- Schat, K. A. and Markowski Grimsrud, C. J.** (2001). "Immune Responses to Marek's Disease Virus Infection". *Curr Top Microbiol Immunol* **2001**: 25591-255120.
- Schat, K. A. and Murthy, K. K.** (1980). "In Vitro Cytotoxicity against Marek's Disease Lymphoblastoid Cell Lines after Enzymatic Removal of Marek's Disease Tumor-Associated Surface Antigen". *J Virol* **34**: 130-135.
- Schat, K. A., Schinazi, R. F. and Calnek, B. W.** (1984). "Cell-Specific Antiviral Activity of 1-(2-Fluoro-2-Deoxy-Beta-D-Arabinofuranosyl)-5-Iodocytosine (Fiac) against Marek's Disease Herpesvirus and Turkey Herpesvirus". *Antiviral Res* **4**: 259-270.
- Schat, K. A., Schultz, R. D. and Calnek, B. W.** (1978b). **Marek's Disease: Effect of Virus Pathogenicity and Genetic Susceptibility on Response of Peripheral Blood Lymphocytes to Concanavalin-A.** in: Adv Comp Leukosis Res. (Ed.) P. Bentvelzen, Hilgers, J., Yohn, DS. Elsevier Amsterdam. 183-185.
- Schat, K. A. and Xing, Z.** (2000b). "Specific and Nonspecific Immune Responses to Marek's Disease Virus". *Dev Comp Immunol* **24**: 201-221.
- Schindler, C. and Darnell, J. E., Jr.** (1995). "Transcriptional Responses to Polypeptide Ligands: The Jak-Stat Pathway". *Annu Rev Biochem* **64**: 621-651.
- Schultz, U. and Chisari, F. V.** (1999a). "Recombinant Duck Interferon Gamma Inhibits Duck Hepatitis B Virus Replication in Primary Hepatocytes". *J Virol* **73**: 3162-3168.
- Schultz, U., Rinderle, C., Sekellick, M. J., Marcus, P. I. and Staeheli, P.** (1995). "Recombinant Chicken Interferon from Escherichia Coli and Transfected Cos Cells Is Biologically Active". *Eur J Biochem* **229**: 73-76.
- Schultz, U., Summers, J., Staeheli, P. and Chisari, F. V.** (1999b). "Elimination of Duck Hepatitis B Virus Rna-Containing Capsids in Duck Interferon-Alpha-Treated Hepatocytes". *J Virol* **73**: 5459-5465.
- Schumacher, B., Bernasconi, D., Schultz, U. and Staeheli, P.** (1994). "The Chicken Mx Promoter Contains an Isre Motif and Confers Interferon Inducibility to a Reporter Gene in Chick and Monkey Cells". *Virology* **203**: 144-148.
- Schumacher, D., Tischer, B. K., Fuchs, W. and Osterrieder, N.** (2000). "Reconstruction of Marek's Disease Virus Serotype 1 from DNA Cloned as a Bacterial Artificial Chromosome (Bac) and Characterization of a Glycoprotein B (Gb) Negative Mdv-1 Mutant." *Journal of virology* **74**: 11088-11098.
- Sekellick, M. J., Ferrandino, A. F., Hopkins, D. A. and Marcus, P. I.** (1994). "Chicken Interferon Gene: Cloning, Expression, and Analysis". *J Interferon Res* **14**: 71-79.

- Sen, G. C. and Lengyel, P.** (1992a). "The Interferon System - a Bird's Eye View of Its Biochemistry". *J.Biol.Chem.* **267**: 5017-5020.
- Sen, G. C. and Lengyel, P.** (1992b). "The Interferon System. A Bird's Eye View of Its Biochemistry". *J Biol Chem* **267**: 5017-5020.
- Sen, G. C. and Ransohoff, R. M.** (1997). "Transcriptional Regulation in the Interferon System". TX: Landes Bio-Sci.
- Sevoian, M., Chamberline, D. M. and Counter, F.** (1962). "Avian Lymphomatosis. I. Experimental Reproduction If the Neural and Visceral Forms". *Vet.Med.* **57**: 500-501.
- Sharma, J. M.** (1981). "Natural Killer Cell Activity in Chickens Exposed to Marek's Disease Virus: Inhibition of Activity in Susceptible Chickens and Enhancement of Activity in Resistant and Vaccinated Chickens". *Avian Dis* **25**: 882-93.
- Sharma, J. M.** (1989). "In Situ Production of Interferon in Tissues of Chickens Exposed as Embryos to Turkey Herpesvirus and Marek's Disease Virus". *Am J Vet Res* **50**: 882-886.
- Sharma, J. M. and Coulson, B. D.** (1977). "Cell-Mediated Cytotoxic Response to Cells Bearing Marek's Disease Tumor-Associated Surface Antigen in Chickens Infected with Marek's Disease Virus". *J Natl Cancer Inst* **58**: 1647-1651.
- Sharma, J. M. and Coulson, B. D.** (1979). "Presence of Natural Killer Cells in Specific-Pathogen-Free Chickens". *J Natl Cancer Inst* **63**: 527-531.
- Sharma, J. M. and Graham, C. K.** (1982). "Influence of Maternal Antibody on Efficacy of Embryo Vaccination with Cell-Associated and Cell-Free Marek's Disease Vaccine". *Avian Dis* **26**: 860-870.
- Sharma, J. M. and Okazaki, W.** (1981). "Natural Killer Cell Activity in Chickens: Target Cell Analysis and Effect of Antithymocyte Serum on Effector Cells". *Infect Immun* **31**: 1078-1085.
- Shek, W. R., Calnek, B. W., Schat, K. A. and Chen, C. H.** (1983). "Characterization of Marek's Disease Virus-Infected Lymphocytes: Discrimination between Cytolytically and Latently Infected Cells". *J Natl Cancer Inst* **70**: 485-491.
- Sick, C., Schultz, U., Munster, U., Meier, J., Kaspers, B. and Staeheli, P.** (1998). "Promoter Structures and Differential Responses to Viral and Nonviral Inducers of Chicken Type I Interferon Genes". *J Biol Chem* **273**: 9749-54.
- Sick, C., Schultz, U. and Staeheli, P.** (1996). "A Family of Genes Coding for Two Serologically Distinct Chicken Interferons". *J.Biol.Chem.* **271**: 7635-7639.
- Sieminski-Brodzina, L. M. and Mashaly, M. M.** (1991). "Characterization by Scanning and Transmission Electron Microscopy of Avian Peripheral Blood Mononuclear Cells Exhibiting Natural Killer-Like (Nk) Activity". *Dev Comp Immunol* **15**: 181-188.
- Silva, R. F. and Barnett, J. C.** (1991). "Restriction Endonuclease Analysis of Marek's Disease Virus DNA: Differentiation of Viral Strains and Determination of Passage History". *Avian Dis* **35**: 487-495.
- Silva, R. F., L.F. Lee and Kutish, G. F.** (2001). "The Genomic Structure of Marek's Disease Virus". In: K.Hirai (Ed.) *Marek's Disease*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: 143-157.
- Silverman, R. H. and Cirino, N.** (1997). In: *mRNA metabolism and post-transcriptional gene regulation*. Ed.: Morris, DR., Harford, JB. New York: Wiley and Sons: 295-309.
- Staeheli, P.** (1990). "Interferon-Induced Proteins and the Antiviral State". *Adv.Virus.Res.* **38**: 147-200.

- Stamm, A.** (1997). "Entwicklung eines Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay zum Quantitativen Nachweis von Hühner-Interferon unter Verwendung monoklonaler Antikörper." Dissertation, Universität München.
- Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H. and Schreiber, R. D.** (1998). "How Cells Respond to Interferons". *Annu Rev Biochem* **67**: 227-264.
- Steeg, P. S., Moore, R. N., Johnson, H. M. and Oppenheim, J. J.** (1982). "Regulation of Murine Macrophage Ia Antigen Expression by a Lymphokine with Immune Interferon Activity". *J Exp Med* **156**: 1780-1793.
- Stewart, W. E. I., Blalock, J. E., Burke, D. C., Chany, C., Dunnick, J. K., Falcoff, E., Friedmann, R. M., Galasso, G. J., Joklik, W. K., Vilcek, J. T., Younger, J. S. and Zoon, K. C.** (1980). "Interferon Nomenclature". *J Immunol* **125**: 2353.
- Stranden, A., Staeheli, P. and Pavlovic, J.** (1993). "Function of the Mouse Mx1 Protein Inhibited by Overexpression of Influenza Virus Pb2". *Virology* **197**: 642-651.
- Stuart-Harris, R. C., Lauchlan, R. and Day, R.** (1992). "The Clinical Application of the Interferons: A Review. NSW Therapeutic Assessment Group". *Med J Aust* **156**: 869-872.
- Stuehr, D. J. and Marletta, M. A.** (1987). "Induction of Nitrite/Nitrate Synthesis in Murine Macrophages by Bcg Infection, Lymphokines, or Interferon-Gamma". *J Immunol* **139**: 518-525.
- Tanaka, N., Sato, M., Lamphier, M. S., Nozawa, H., Oda, E., Noguchi, S., Schreiber, R. D., Tsujimoto, Y. and Taniguchi, T.** (1998). "Type I Interferons Are Essential Mediators of Apoptotic Death in Virally Infected Cells". *Genes Cells* **3**: 29-37.
- Tay, C. H., Szomolanyi-Tsuda, E. and Welsh, R. M.** (1998). "Control of Infections by Nk Cells". *Curr Top Microbiol Immunol* **230**: 193-220.
- Tay, C. H. and Welsh, R. M.** (1997). "Distinct Organ-Dependent Mechanisms for the Control of Murine Cytomegalovirus Infection by Natural Killer Cells". *J Virol* **71**: 267-275.
- Taylor-Papadimitrou, J.** (1980). "Effects of Interferons on Cell Growth and Function". *Interferon* **2**: 13-46.
- Thompson, C. B., Lindsten, T., Ledbetter, J. A., Kunkel, S. L., Young, H. A., Emerson, S. G., Leiden, J. M. and June, C. H.** (1989). "Cd28 Activation Pathway Regulates the Production of Multiple T-Cell-Derived Lymphokines/Cytokines". *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 1333-1337.
- Tischer, B. K., Schumacher, D., Messerle, M., Wagner, M. and Osterrieder, N.** (2002). "The Products of the U110 (Gm) and the U149.5 Genes of Marek's Disease Virus Serotype 1 Are Essential for Virus Growth in Cultured Cells". *J Gen Virol* **83**: 997-1003.
- Trinchieri, G.** (1995). "Natural Killer Cells Wear Different Hats: Effector Cells of Innate Resistance and Regulatory Cells of Adaptive Immunity and of Hematopoiesis". *Semin Immunol* **7**: 83-88.
- Trinchieri, G., Matsumoto-Kobayashi, M., Clark, S. C., Sehra, J., London, L. and Perussia, B.** (1984). "Response of Resting Human Peripheral Blood Natural Killer Cells to Interleukin 2". *J Exp Med* **160**: 1147-1169.
- Trinchieri, G., Wysocka, M., D'Andrea, A., Rengaraju, M., Aste-Amezaga, M., Kubin, M., Valiante, N. M. and Chehimi, J.** (1992). "Natural Killer Cell Stimulatory Factor (Nksf) or Interleukin-12 Is a Key Regulator of Immune Response and Inflammation". *Prog Growth Factor Res* **4**: 355-368.
- Tyring, S., Klimpel, G. R., Fleischmann, W. R., Jr. and Baron, S.** (1982). "Direct Cytolysis by Partially-Purified Preparations of Immune Interferon". *Int J Cancer* **30**: 59-64.

- van Regenmortel, M. H. V., Faquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E., Estes, M. K., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D., Pringle, C. R., R.B., W. and (Ed.)** (1999). "Virus Taxonomy". 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, New York, N.Y.
- Van Zaane, D., Brinkhof, J. M., Westenbrink, F. and Gielkens, A. L.** (1982). "Molecular-Biological Characterization of Marek's Disease Virus. I. Identification of Virus-Specific Polypeptides in Infected Cells". *Virology* **121**: 116-132.
- Vengris, V. E. and Mare, C. J.** (1973). "Protection of Chickens against Marek's Disease Virus Jm-V Strain with Statolon and Exogenous Interferon". *Avian Dis* **17**: 758-767.
- Vilcek, J. and Sen, G. C.** (1996). "In: Fields Virology, Ed.: Bn Fields, Dm Knipe, Pm Howley". Philadelphia: Lippincott-Raven. 3rd ed.: 4792-4796.
- Volpini, L. M., Calnek, B. W., Sekellick, M. J. and Marcus, P. I.** (1995). "Stages of Marek's Disease Virus Latency Defined by Variable Sensitivity to Interferon Modulation of Viral Antigen Expression". *Vet Microbiol* **47**: 99-109.
- von Bülow, V. and Biggs, P. M.** (1975a). "Differentiation between Strains of Marek'S Disease Virus and Turkey Herpesvirus by Immunoflourescence Assays". *Avian Pathology* **4**: 133-146.
- von Bülow, V. and Biggs, P. M.** (1975b). "Precipitating Antigens Associated with Marek'S Disease Viruses and a Herpesvirus of Turkeys". *Avian Pathology* **4**: 147-162.
- Weck, P. K., Apperson, S., May, L. and Stebbing, N.** (1981). "Comparison of the Antiviral Activities of Various Cloned Human Interferon-Alpha Subtypes in Mammalian Cell Cultures". *J Gen Virol* **57**: 233-237.
- Weining, K. C., Schultz, U., Munster, U., Kaspers, B. and Staeheli, P.** (1996). "Biological Properties of Recombinant Chicken Interferon-Gamma". *Eur J Immunol* **26**: 2440-2447.
- Wheelock, E. F.** (1965). "Interferon-Like Virus Inhibitors Induced in Human Leukocytes by Phythemagglutinin". *Science* **149**: 310-311.
- Wherry, J. C., Schreiber, R. D. and Unanue, E. R.** (1991). "Regulation of Gamma Interferon Production by Natural Killer Cells in Scid Mice: Roles of Tumor Necrosis Factor and Bacterial Stimuli". *Infect Immun* **59**: 1709-1715.
- Whitton, J. L.** (1998). "An Overview of Antigen Presentation and Its Central Role in the Immune Response". *Curr Top Microbiol Immunol* **232**: 1-13.
- Witter, R. L.** (1983). "Characteristics of Marek's Disease Viruses Isolated from Vaccinated Commercial Chicken Flocks: Association of Viral Pathotype with Lymphoma Frequency". *Avian Dis* **27**: 113-32.
- Witter, R. L.** (1997). "Increased Virulence of Marek's Disease Virus Field Isolates". *Avian Dis* **41**: 149-63.
- Witter, R. L.** (2001). "Protective Efficacy of Marek's Disease Vaccines". *Curr Top Microbiol Immunol* **255**: 57-90.
- Witter, R. L. and Burmeister, W. P.** (1972). "Differential Effect of Maternal Antibodies on Efficacy of Cellular and Cell-Free Marek'S Disease". *Avian Pathology* **8**: 145-156.
- Witter, R. L., Nazerian, K., Purchase, H. G. and Burgoyne, G. H.** (1970). "Isolation from Turkeys of a Cell-Associated Herpesvirus Antigenically Related to Marek's Disease Virus". *Am J Vet Res* **31**: 525-538.
- Witter, R. L., Sharma, J.M and Fadly, A.M** (1980). "Pathogenicity of Variant Marek'S Disease Virus Isolants in Vaccinated and Unvaccinated Chickens". *Avian Dis* **24**: 210-232.

- Witter, R. L., Solomon, J. J., Champion, L. R. and Nazerian, K.** (1971). "Long-Term Studies of Marek's Disease Infection in Individual Chickens". *Avian Dis* **15**: 346-365.
- Wreschner, D. H., McCauley, J. W., Skehel, J. J. and Kerr, I. M.** (1981). "Interferon Action--Sequence Specificity of the Ppp(A2'p)Na-Dependent Ribonuclease". *Nature* **289**: 414-417.
- Xie, Q. W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A., Troso, T. and Nathan, C.** (1992). "Cloning and Characterization of Inducible Nitric Oxide Synthase from Mouse Macrophages". *Science* **256**: 225-228.
- Xing, Z. and Schat, K. A.** (2000a). "Expression of Cytokine Genes in Marek's Disease Virus-Infected Chickens and Chicken Embryo Fibroblast Cultures". *Immunology* **100**: 70-76.
- Xing, Z. and Schat, K. A.** (2000b). "Inhibitory Effects of Nitric Oxide and Gamma Interferon on in Vitro and in Vivo Replication of Marek's Disease Virus". *J Virol* **74**: 3605-12.
- Yeh, H. Y., Winslow, B. J., Junker, D. E. and Sharma, J. M.** (1999). "In Vitro Effects of Recombinant Chicken Interferon-Gamma on Immune Cells". *J Interferon Cytokine Res* **19**: 687-691.
- Zoller, B., Redman-Muller, I., Nanda, I., Guttenbach, M., Dosch, E., Schmid, M., Zoorob, R. and Jungwirth, C.** (2000). "Sequence Comparison of Avian Interferon Regulatory Factors and Identification of the Avian Cec-32 Cell as a Quail Cell Line". *J Interferon Cytokine Res* **20**: 711-717.
- Zöller, B., Redman-Müller, I., Nanda, I., Guttenbach, M., Dosch, E., Schmid, M., Zoorob, R. and Jungwirth, C.** (2000). "Sequence Comparison of Avian Interferon Regulatory Factors and Identification of the Avian Cec-32 Cell as a Quail Cell Line". *Journal of Interferon and Cytokine Research* **2000**: 711-717.
- Zoon, K. C., Miller, D., Bekisz, J., zur Nedden, D., Enterline, J. C., Nguyen, N. Y. and Hu, R. Q.** (1992). "Purification and Characterization of Multiple Components of Human Lymphoblastoid Interferon-Alpha". *J Biol Chem* **267**: 15210-15216.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Stangassinger bedanke ich mich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Mein besonderen Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kaspers für die Überlassung des Themas, seine hervorragende fachliche Betreuung, und die stets gewährte Unterstützung.

Herrn Dr. F. Fehler sowie Frau C. Winter sei für Ihre Unterstützung während die durchgeführten Tierversuchen und des zur Verfügung gestellten Arbeitsplatzes bei Lohmann animal health gedankt

Herrn Prof. Dr. P. Staeheli danke ich für die Bereitstellung rekombinant hergestellte Zytokin-Präparationen

Herrn Dr. T. F. Davison, Herrn Dr. V. Zelnik und Herrn Dr. J. F. Vautherot danke ich für die zur Verfügung gestellten Antikörpern und Viruspräparationen.

Herrn Dr. C. Grund und die Mitarbeiter am Institut für Geflügelkrankheiten danke ich für die bereitgestellten Zellkulturen.

An dieser Stelle sei allen Mitarbeitern des Labors für die freundliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft gedankt.

Für die Betreuung der Tiere bedanke ich mich bei Frau H. Opitz, Herrn F. Meggendorfer.

Besonders herzlich bedanke ich Dirk Pompetzki und Reinhard Klaas für das Korrekturlesen und für ihre Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Vivi Angelidou sei für ihre Unterstützung und Verständniss während des Studiums der Tiermedizin und Fertigung dieser Arbeit besonders gedankt.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Carl Olof Emil Harlin
Geburtsort: Karlstad, Schweden
Geburtsdatum: 28.07.1972

Schulbildung:

1979 Einschulung an der Björnbodaskolan, Bromma, Stockholm
1989 Wechsel zum Lugnetskolan, Falun, Schweden
06. 1991 Abitur in Wirtschaftswissenschaftlicher Zug an Lignets
Gymnasieskola, Falun, Schweden
06. 1992 Zweites Abitur in Biologie, Physik, Chemie und Mathematik an
der Kommunale und staatliche Erwachsenenbildung

Berufsausbildung:

1992 – 1993 Tätigkeit als Tierpfleger an der Tierärztlichen Klinik Aslund und
Nordström, Borlänge, Schweden
1993 – 1994 Einführungskurs Chemie an der Universität Uppsala, Schweden
02.1994 – 06.1994 Teilnahme am Programm: „Deutschkurse für Ausländer“ an der
Universität München
July 1994 Bestandener „Prüfung zum Nachweis deutscher
Sprachkenntnisse“ (PNDS) an der Ludwig-Maximilian-
Universität München (LMU)
1994 – 2000 Studium der Tiermedizin an der LMU
26.08.2000 Beständenes Staatsexamen
Okt.2000 Approbation als Tierarzt
2000-2003 Promotionsstudium am Institut für Tierphysiologie,
Physiologische Chemie und Tierernährung, LMU