Inhibition zellulärer antiviraler Abwehrmechanismen durch das Hepatitis A-Virus – eine Analyse der beteiligten viralen Faktoren:

Inhibition des IRF-3 -vermittelten Signalweges durch das Nichtstrukturprotein 2B des Hepatitis A-Virus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

im Fachbereich Biologie / Chemie
Universität Bremen

vorgelegt von

Thomas Magulski

November 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Angelika Vallbracht
2. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Schmitz

Danksagung

Meine Doktorarbeit wäre ohne Unterstützung vieler Menschen in dieser Form nicht möglich gewesen. Deshalb geht von Herzen folgender Dank an:

Frau Prof. Dr. Angelika Vallbracht für die Überlassung des Arbeitsplatzes bzw. der nötigen Materialien, vor allem aber auch für ihre Offenheit, Gesprächsbereitschaft und nicht zuletzt für ihre Geduld und dafür, dass sie immer an mich geglaubt hat.

Herrn Prof. Dr. Herbert Schmitz, dessen spontane Bereitschaft zur Erstellung des zweiten Gutachtens nicht selbstverständlich ist.

Besonderer Dank geht an Herrn Dr. habil Andreas Dotzauer für die hervorragende Betreuung und die Hilfe bei der Klärung sämtlicher Probleme und Fragen, die sich im Laufe dieser Arbeit stellten. Sein Engagement weit über die tägliche Arbeitszeit hinaus war mir immer ein sicherer Rückhalt.

An die Doktorandinnen und Doktoranden unserer Arbeitsgruppe: Herrn Volker Fensterl, Frau Sonja Händschke, Herrn Oliver Janssen-Weets und Frau Dajana Paulmann, die mir weit über ein kollegiales Verhältnis hinaus ans Herz gewachsen sind. Vor allem Herrn Dr. Volker Fensterl danke ich für viele anregende Gespräche im beruflichen wie auch im privaten Bereich sowie für das Nutzungsrecht einiger Grafiken und Abbildungen. Zudem Frau Sonja Händschke, die mir gerade in den letzten beiden Jahren meiner Arbeit eine große mentale Stütze gewesen ist. Des Weiteren danke ich allen nicht namentlich erwähnten Kolleginnen und Kollegen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und die den Laboralltag sehr bereichert haben.

Frau Renate Mester und Frau Heike Kettler sowie ihren Vorgängerinnen, die durch ihr Engagement und ihre Freundlichkeit allzeit einen reibungslosen Laborbetrieb ermöglicht haben.

Meiner Lebensgefährtin Susann Blödorn für die tatkräftige Unterstützung, insbesondere für das wiederholte Korrekturlesen sowie die vielen Opfer, die sie für das Gelingen dieser Arbeit erbringen musste und deren Verständnis ich mir immer gewahr sein konnte.

Und selbstverständlich meiner Familie, die mir sowohl Studium als auch Promotion ermöglicht hat und mich in allen Entscheidungen vorbehaltlos unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Akronyme 3

1. Einleitung

1.1 Das Interferonsystem 5
1.2 Interferon-β-Induktion 7
1.3 Beeinflussung des Interferonsystems 10
1.4 Das Hepatitis A-Virus 12
1.5 Zielsetzung 16

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika 18
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien 18
2.1.3 Enzyme, Proteine und Antikörper 20
2.1.4 Geräte 20
2.1.5 Kits und Standards 22
2.1.6 Kompetente Bakterien 22
2.1.7 Plasmide 24
2.1.8 Primer für die PCR 25
2.1.9 Puffer und Lösungen 27
2.1.10 Serum für Zellkultur 34
2.1.11 Verbrauchsmaterialien 34
2.1.12 Viren 35
2.1.13 Zellen 36

2.2 Methoden

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese für DNA 37
2.2.2 CAT-ELISA 37
2.2.3 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA 37
2.2.4 Diskontinuierliche Polyacryamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 38
2.2.5 Endpunkttitration eines Hepatitis A-Viruspools ($TCID_{50}$) 39
2.2.6 Endpunkttitration eines Newcastle Disease-Viruspools ($TCID_{50}$) 39
2.2.7 Freeze & Thaw-Lyse zur Proteinextraktion 40
2.2.8 Herstellung eines polyklonalen α-HAV-2B Antikörperserums 40
2.2.9 Herstellung eines Viruspools (Hepatitis A-Virus) 41
2.2.10 Herstellung eines Viruspools (Newcastle Disease-Virus) 41
2.2.11 Herstellung von Expressionsvektoren auf Basis des Vektors pcDNA3.1/*myc*-His und pI.18 41
2.2.12 Immunoblot 42
2.2.13 Indirekte Immunfluoreszenz zur HAV-VP1 und HAV-2B-Detektion 43
2.2.14 Indirekte Immunfluoreszenz zur HAV-Detektion 44
2.2.15 Infektion mit Hepatitis A-Virus (HAV) 44
2.2.16 Infektion mit Newcastle Disease-Virus (NDV) zur IFN-β-Induktion 45
2.2.17 Ligation von Expressionsplasmiden 45
2.2.18 Luciferase-Assay 45
2.2.19 Mycoplasmentest per PCR (VenorGeM) 46
2.2.20 PCR zur Amplifikation der zu inserierenden viralen DNA der verschiedenen HAV-Proteine 46
2.2.21 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA aus wässriger Lösung 47
2.2.22 Phenol-Ether-Extraktion von DNA aus LMP-Agarose-Gel 47
2.2.23 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA 48
2.2.24 Plasmidpräparation (Maxiprep) 49
2.2.25 Poly(IC)-Transfektion mittels DEAE-Dextran 49
2.2.26 Proteinbestimmung nach Bradford 50
2.2.27 Restriktionsspaltungsanalyse von Plasmid-DNA 50
2.2.28 Schnellpräparation bakterieller Plasmid-DNA (Miniprep) 51
2.2.29 Transfektion mittels Calciumphosphat-Methode 52

2.2 Methoden (Fortsetzung)

2.2.30 Transfektion mittels *jetPEI transfection reagent* ... 52
2.2.31 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien ... 52
2.2.32 Zellkultur FRhK-4 ... 53
2.2.33 Zellzahlbestimmung ... 53

3. Ergebnisse

3.1 Suppression der IFN-β-Enhancer-abhängigen Reportergenexpression durch HAV: Eingrenzung des Effekts auf genomische Teilbereiche ... 54

3.1.1 Effekt einer Transfektion der replikationsinkompetenten cDNA-Variante pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ des HAV auf die Induktion des IFN-β-Enhancers: Replikationsunabhängige Suppression durch pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ ... 54
3.1.2 Effekt einer Cotransfektion der genomischen Teilbereiche P1, P2 und P3 des HAV auf die Induktion des IFN-β-Enhancers: Suppression durch P1, P2 und P3 ... 56
3.1.3 Effekt einer Transfektion der genomischen Teilbereiche P1, P2 und P3 des HAV auf die Induktion des IFN-β-Enhancers: Suppression durch Protein P2 ... 57
3.1.4 Effekt einer Transfektion der HAV P2-Proteine 2A, 2AB, 2B, 2BC und 2C auf die Induktion des IFN-β-Enhancers: Suppression durch Protein 2B ... 59

3.2 Steigerung der plasmidvermittelten Expressionsraten von HAV-Proteinen durch Verwendung des Intronvektors pI.18 ... 61

3.3 Screening der pI.18-basierten Expressionsvektoren: Effekt einer Transfektion der HAV-Proteine VP1 und 2B auf die Induktion des IFN-β-Enhancers: Suppression durch Protein 2B ... 63

3.4 Zusammenfassender Überblick der Effekte einer Transfektion von HAV-Proteinen auf die Induktion der IFN-β-Enhancer-abhängigen Reportergenexpression: Suppression durch HAV 2B und die es enthaltenden Oligoproteine ... 66

3.5 Expressionsnachweis des HAV-Proteins 2B ... 67

3.5.1 Immunoblot gegen HAV-Protein 2B negativ ... 68
3.5.2 HAV-Protein 2B mittels indirekter Immunfluoreszenz nachweisbar ... 68

3.6 Suppression der PRD III-I-abhängigen Luciferase-Expression ... 70

3.6.1 Suppression der PRD III-I-abhängigen Luciferase-Expression durch HAV 2B ... 70
3.6.2 Suppression der RIG-I-induzierten IRF-3-Aktivierung durch HAV 2B ... 71

4. Diskussion ... 73

5. Zusammenfassung ... 89

6. Literatur ... 90

Anhang ... 99

Abkürzungen und Akronyme

Aufgrund der großen Anzahl der verwendeten Abkürzungen sind an dieser Stelle nur die für das inhaltliche Verständnis der Arbeit wesentlichen aufgeführt. Zudem werden die meisten Abkürzungen bei ihrem ersten Vorkommen im Text direkt erklärt.

Ac	Acetylrest
AKT	zelluläres Homolog des v-akt-Onkogens des transformierenden murinen Retrovirus AKT8 (= PKB)
ALT, AST	Alanin-Aminotransferase (= GPT), Aspartat-Aminotransferase (= GOT)
AP-1	Activating protein 1 (c-JUN/c-Fos; allgemein die ATF- und JUN-Familie-Komplexe)
ATF-2	Activating transcription factor 2
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (Proteinfamilie)
bp	Basenpaare
CARD	Caspase recruitment domain
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CBP	CREB-binding protein (homolog zu p300; CREB = cAMP response element binding protein)
CD4, CD8	Cluster of differentiation protein 4 bzw. 8 (Oberflächenmarker für T-Zellen)
cIAP	cellular inhibitor of apoptosis (Proteinfamilie)
c-JUN	cellular v-jun-homolog (v-jun = Onkogen in Avian Sarcoma Virus 17)
CMV	Cytomegalievirus (*Herpesviridae*)
CPE	Cytopathischer Effekt
CTL	Cytotoxischer T-Lymphocyt
DEAE	Diethyl-aminoethyl (positiv geladener Substituent des DEAE-Dextrans)
DEPC	"Diethylpyrocarbonat" (Diethyldicarbonat)
DNA-PK	DNA-abhängige Protein-Kinase
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s Medium
DRAF1	dsRNA-activated factor (p300/CBP + IRF-3)
dsRNA	doppelsträngige Ribonucleinsäure (RNA)
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
eIF2α	eukaryotic (translation) initiation factor 2α
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FADD	Fas-associated Death domain (= MORT-1)
FCS	Fetal calf serum (= FBS)
FITC	Fluorescein-isothiocynanat
FRhK-4	Fetal Rhesus monkey kidney-Zell-Linie 4
GCN5	hefehomologe Histonacetyltransferase, GCN5/PCAF-Familie
GFP	Green fluorescent protein
H^+	Proton
HAV	Hepatitis A-Virus (*Picornaviridae*)
HAV-cr1	HAV cellular receptor 1 (= TIM-1)
HcRed	Rot fluoreszierendes Protein aus *Heteractis crispa*
HDAC	Histon-Desacetylase
HEK293	human embryonic kidney 293 (= 293; Adenovirus 5-transformierte Zell-Linie)
HMG-I(Y)	High mobility group-Protein-I(Y) (neue Nomenklatur: HMG-A1)
IFN	Interferon
IgA/M/G	Immunglobulin A, M, G
IκB	Inhibitor of NF-κB (Familie: IκB-α, β, γ, ε)
IKK	IκB kinase (IKKα = IKK1, IKKβ = IKK2; IKKγ = NEMO; IKKε = IKK-i)
IRES	Internal ribosome entry site
IRF	Interferon regulatory factor
ISG	Interferon-stimulated gene
ISGF3	ISG-factor 3 (STAT1 + STAT2 + IRF-9)
ISRE	Interferon-stimulated response element
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LCPS	Luminescence counts per second
LGP2	Laboratory of Genetics and Physiology gene 2
Luc	Luciferase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAVS	Mitochondrial antiviral signaling (= IPS-1, VISA, CARDIF)
MDA-5	Melanoma differentiation-associated gene-5 (= HELICARD, RH116)

mDC	myeloide Dendritische Zelle
MEKK1	MAPK/ERK kinase kinase 1
MHC	Major histocompatibility complex (I und II)
MKK	MAPK kinase
MOI	Multiplicity of infection (Infektionsverhältnis Viren/Zelle)
MRC-5	Medical research council-Zell-Linie 5 (humane embryonale Lungenfibroblasten)
NAK	NF-κB-activating kinase (= TBK1)
NAP1	NAK-associated protein 1
NDV	Newcastle disease virus (*Paramyxoviridae*)
NEMO	NF-κB essential modulator (= IKKγ)
NES	Nuclear export signal
NF-κB	Nuclear Factor κB (Familie: RelA/p65, RelB, c-Rel, p50, p52)
NK	Natural killer cell
NLS	Nuclear localization signal
NRF	NF-κB-repressing factor
NTR	nicht-translatierte Region
OAS	2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase
OD_{260}	Optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge
ORF	Open reading frame
→	Phosphorylierung an Serin-/Threonin-/Tyrosinresten
p300	300 Kilodalton-Protein, E1A-bindend (homolog zu CBP)
p38	Mitogen-activated protein kinase 38 kDa
PACT	PKR-activating protein (= RAX)
PBS	Phosphate buffered saline
PCAF	p300/CBP associated factor (Histonacetyltransferase)
pDC	plasmacytoide Dendritische Zelle
p.i.	post infection
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
PIASy	Protein inhibitor of activated STAT y
PIP_3	Phosphatidyl-inositol-3,4,5-trisphosphat
PKR	Protein kinase, dsRNA-activated
poly(IC)	poly-Inosinsäure:poly-Cytidylsäure (= poly(I:C), poly(I)*poly(C), pIC)
PRD	Positive regulatory domain (IV, III-I, II) des IFN-β-Enhancers
PRDI-BF1	PRDI-binding factor 1 (= BLIMP-1)
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (Chemokin)
RIG-I	Retinoic acid-induced gene I (= RHIV-1)
RIG-IC	RIG-I C-Terminus (ohne CARD-Domäne)
RIP1	Receptor interacting protein-1
RNase L	latente Ribonuclease
rpm	revolutions per minute (U/min)
RT	Room temperature (etwa 20°C)
RT-PCR	Reverse transcription & polymerase chain reaction
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	short interfering RNA
ssRNA	einzelsträngige (single-stranded) RNA
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SV40	Simian virus 40 (*Papovaviridae*)
SWI/SNF	ATP-abh. Chromatin-Remodeling-Komplex; Hefe-Homologe: Switch defective/Sucrose non-fermenter
TAB	TAK1-binding protein
TAK1	TGF-β-activated kinase 1
TANK	TRAF-associated NF-κB-activator (= I-TRAF)
TBK1	TANK-binding kinase 1 (= NAK, T2K)
TBP	TATA-Box binding protein (in TFIID-Komplex)
$TCID_{50}$	Tissue culture infectious dose 50% (mittlere Zellkulturinfektionsdosis)
TFIID	Transkriptionsfaktor D der RNA-Polymerase II (Komplex)
T_H	T-Helfer-Zelle
TIR	Toll-/IL-1-receptor homology domain
TLR	Toll-like receptor (Familie: TLR1-10)
TRAF	Tumor necrosis factor-receptor associated factor (Familie TRAF1-6)
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (= APO-2L)
TRIF	TIR-domain containing adapter inducing IFN-β (= TICAM-1, Lps2)
TYK	Tyrosin-Kinase
Ub	Ubiquitin
VAF	Virus-activated factor (p300/CBP + IRF-3 + IRF-7)
VAK	Virus-activated kinase (IRF-3-Kinase-Komplex mit TBK1 / IKKε u.a.)
VP	Virusprotein
VT	Volumenteil
w/v	weight / volume (Masse pro Volumen)

1. Einleitung

1.1 Das Interferonsystem

Die Entdeckung der Interferone geht auf das Jahr 1957 zurück, in dem erstmalig ein von Chorioallantoismembran-Zellen sezerniertes Protein beschrieben wurde, das in der Lage war, die Replikation von Wildtyp-Influenzaviren zu hemmen, nachdem jene Zellen zuvor mit hitzeinaktiviertem Influenzavirus behandelt worden waren. Alick Isaacs und Jean Lindemann benannten dieses Makromolekül daraufhin, seiner interferierenden Wirkung entsprechend, Interferon (*67*).

Mittlerweile umfasst die Familie der Interferone eine Vielzahl von Glykoproteinen, die man zu den Interleukinen zählt. Klassischerweise werden sie in Typ I- und Typ II-Interferone unterteilt. Zu den Typ I-Interferonen zählen hierbei die dreizehn Subtypen des Interferon-α (IFN-α), ein Subtyp des Interferon-β (IFN-β) sowie Interferon -ε, –κ, -τ, und –ζ. Der einzige Vertreter der Typ II-Interferone ist das Interferon-γ. Seit 2003 wird noch ein Typ III-Interferon beschrieben, dem 3 Subtypen des Interferon-λ angehören (= IL-28/29, Rezeptor IL-10R/IL-28R). Während IFN-α vornehmlich von Leukozyten gebildet wird, kann IFN-β von einer Vielzahl von ganz unterschiedlichen Zelltypen gebildet werden, wobei sich Fibroblasten als potente Sezernenten erwiesen haben. IFN-γ wird hauptsächlich von inflammatorischen T-Zellen sowie NK-Zellen gebildet, wenn diese zuvor mit Interleukinen stimuliert wurden.

Interferone spielen eine zentrale Rolle bei der Immunantwort. Während IFN-γ (Typ II-Interferon) eher im späteren Infektionsverlauf auftritt und zur Aktivierung von Makrophagen dient und daher der spezifischen Immunantwort zuzuordnen ist, stellen Typ I-Interferone, als ein Teil der unspezifischen Immunantwort, die früheste Abwehrmaßnahme eines infizierten Organismus dar. Sie interferieren völlig unspezifisch mit der Replikation von Viren aller Art, da sie den sie umgebenden Gewebeverband einer infizierten und IFN-α/β sezernierenden Zelle vor einer Virusinfektion schützen. Obwohl Interferone vornehmlich auf benachbarte Zellen, somit eher parakrin wirken, kann das sezernierte IFN auch in der sezernierenden Zelle zu einer Hochregulation der Interferon-stimulierten Gene (ISG) führen (autokrin).

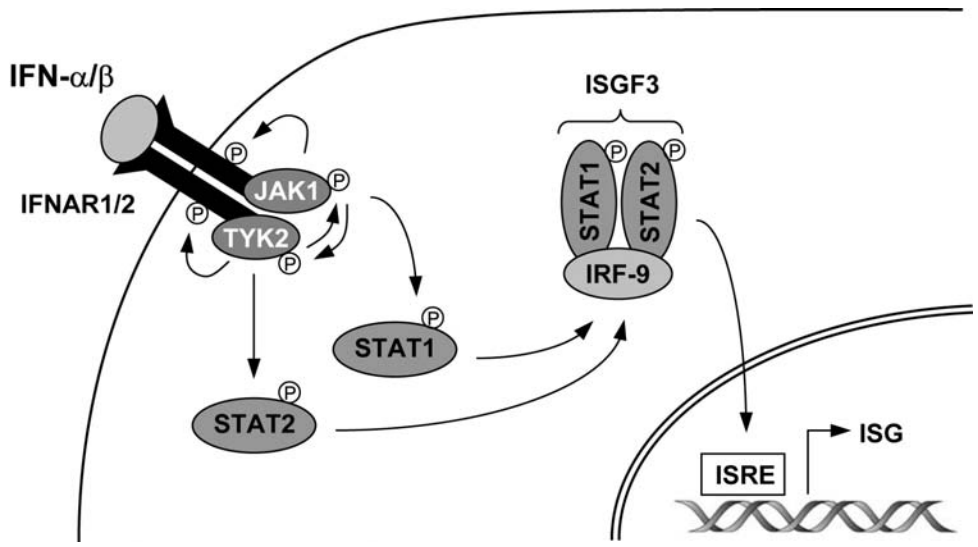


Abb. 1: JAK-STAT-Weg. IFN-α/β bindet an die IFN-α/β-Rezeptor-Untereinheiten IFNAR1 und 2, daraufhin phosphorylieren die assoziierten Janus-Kinasen JAK1 und TYK2 einander; die Phosphorylierung des Rezeptors führt zur Rekrutierung der STAT-Proteine (*Signal transducer and activator of transcription*), welche nach ihrer JAK1/TYK2-vermittelten Aktivierung mit IRF-9 den ISGF3-Komplex (*ISG-factor 3*) bilden und im Zellkern über die Bindung des ISRE (*Interferon-stimulated response element*) die Induktion von ISGs (*Interferon-stimulated genes*) einleitet. (mod.; mit Genehmigung V.Fensterl)

Die Induktion eines so genannten antiviralen Status erfolgt über die Bindung von Typ I-Interferon an den IFN-α/β-Rezeptor (Abb. 1; *12*). Diese Anlagerung induziert eine Signalkaskade, die JAK-STAT-Weg genannt wird und zur Expression verschiedener Gene (ISG) führt, die in der Zelle den antiviralen Status bewirken. Die Bezeichnung JAK-STAT-Weg leitet sich aus den beteiligten Proteinen ab, die zur Expression der ISG führen. Nach IFN-α/β Bindung an den extrazellulären Teil des IFN-α/β-Rezeptors transphosphorylieren sich die mit der cytoplasmatischen Rezeptordomäne assoziierten Janus-Kinasen JAK1 und TYK2. Diese können nun die Proteine STAT1 und STAT2 phosphorylieren, woraufhin diese dimerisieren und mit rekrutiertem IRF-9 den Interferon-stimulierten-Gen-Faktor 3 bilden. Dieser transloziert in den Nukleus und assoziiert mit dem *Interferon-stimulated response element* (ISRE), das die Expression der ISG reguliert und deren Expression initiiert (*86*). Zu den ISG zählen eine Vielzahl von Proteinen wie zum Beispiel Proteinkinase R (PKR), OAS, Mx-Proteine, Adenosin-Desaminase 1 (ADAR1), p56/ISG56 und ISG20. Gemeinsam ist ihnen die Eigenschaft, die Replikation von Viren negativ zu beeinflussen, was auf völlig unterschiedlichen Mechanismen basiert, die hier allerdings nicht weiter erörtert werden sollen (*12, 25, 32, 42, 43, 56, 63, 107, 108, 114*).

Festzuhalten ist: Typ I-Interferone wirken virusunspezifisch und unterbinden oder verlangsamen die Replikation von Viren in einem frühen Stadium der Infektion. Sofern dieses nicht zur Eliminierung des Virus führt, verschafft diese Eigenschaft dem spezifischen Immunsystem des infizierten Organismus genügend Zeit, eine T- oder B-Zell-Antwort zu etablieren.

1.2 Interferon-β-Induktion

Induziert wird die Transkription von IFN-β hauptsächlich durch virale Nukleinsäuren, wobei insbesondere die zellfremde dsRNA ein potenter Induktor ist, die sowohl intrazellulär über verschiedene Sensorproteine als auch extrazellulär über den *Toll-like Rezeptor 3* (TLR3) detektiert werden kann (70). (Die kompletten Signalwege sind für die intrazelluläre Detektion in Abbildung 2 und für die extrazelluläre im Anhang dargestellt.)

Betrachtet man die Initiation der Interferon-β-Induktion etwas genauer (Abb. 3), so stellt man fest, dass für Kontrolle der Transkription des IFN-β Gens ein der TATA-Box vorgeschalteter *Enhancer* verantwortlich ist, der 102 Nukleotide (nt) vor Transkiptionsstart beginnt (*90, 95*). Dieser gliedert sich in drei *Positive regulatory domains* (PRD) sowie eine *Negative regulatory domain* (NRD; *95*). Die Nomenklatur dieser lautet: PRD II, PRD III-I, PRD IV und NRD I. An diese binden nach Detektion viraler Nukleinsäure verschiedene Transkriptionsfaktoren, transkriptionelle Coaktivatoren und architektonische Proteine.

Dieses als Enhanceosom bezeichnete Gebilde ist Gegenstand nachfolgender Auseinandersetzung. Es setzt sich zusammen aus dem *Activating transcription factor 2* (ATF-2) und dem *cellular v-jun homolog (c-JUN)*, die zusammen ein Heterodimer bilden, das an die PRD VI bindet. Zudem lagern sich an die nachfolgende PRD III-I Homodimere des *Interferon regulatory factor 3* (IRF-3) oder Heterodimere aus IRF-3 und IRF-7 an, wobei sich an diese „Doppeldomäne“ (bestehend aus PRD I und PRD III) zwei IRF Dimere anlagern (*95, 103, 106*). Die PRD II schließlich bildet die Bindestelle für den dimeren *Nuclear Factor-κB* (NF-κB). Hinzu kommen noch die transkriptionalen Coaktivatoren p300 oder das homologe *CREB-binding protein* (CBP), die von jedem der Transkriptionsfaktoren rekrutiert werden können und auch an der Induktion vieler weiterer Gene beteiligt sind (*95, 99, 141, 149*). Letzter Bestandteil des IFN-β-Enhanceosoms mit architektonischer Wirkung während dessen Formierung sind zwei high mobility group-Proteine (HMG-I(Y)), deren Bindung eine Krümmung der DNA bewirkt,

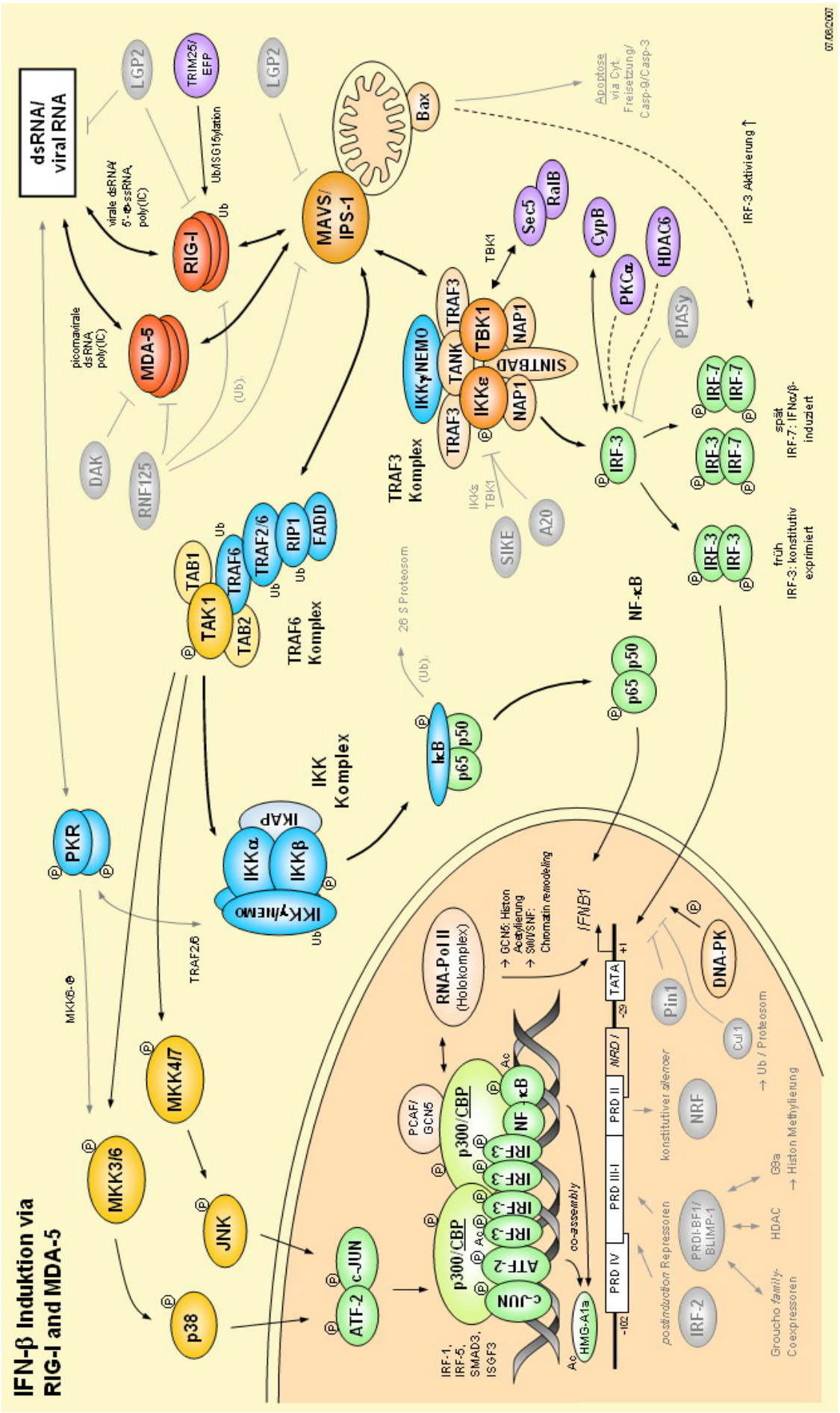


Abb. 2: IFN-β-Induktion durch <u>intrazelluläre</u> dsRNA. Die intrazellulären dsRNA-Rezeptoren RIG-I und MDA-5 vermitteln über ihren Adapter MAVS/IPS-1/VISA/CARDIF die Aktivierung der Signalwege zu IRF-3, NF-κB und ATF-2/c-JUN, resultierend im Aufbau eines Enhanceosoms und der Initiation der Transkription. (mod. mit Genehmigung V. Fensterl)

die die Bindung der übrigen Proteine begünstigt. Dieses Enhanceosom (*45, 77, 131, 147, 148*) ermöglicht nun eine Bindung der RNA-Polymerase II mit dem p300/CBP und die Initiation der IFN-β-Gentranskription (*1, 2, 76, 78, 90*). Solange keiner der zuvor genannten Transkriptionsfaktoren an die entsprechende PRD gebunden hat, wird die Expression des IFN-β-Gens über die NRD I durch den NF-κB repressing factor (NRF) supprimiert.

Die Besonderheit dieser Architektur liegt in einem synergistischen Effekt, der zur Folge hat, dass eine gesteigerte IFN-β-Gentranskription induziert wird. Während jeder der genannten Transkriptionsfaktoren in der Lage ist, eine basale Transkriptionsrate zu initiieren, erfolgt bei gleichzeitiger Bindung aller Komponenten des Enhanceosoms eine überproportionale Steigerung der Gentranskription (*39, 44, 72, 77, 99, 106, 131, 146*). Hierin kann man eine Art Schutzfunktion vor ungewollter IFN-β-Expression sehen, da die einzelnen Transkriptionsfaktoren über eine Vielzahl von Signalmolekülen aktiviert werden können (*65, 105, 115, 153*). Die virale Induktion jedoch bewirkt zwangsläufig eine Aktivierung aller am Enhanceosom beteiligten Proteine.

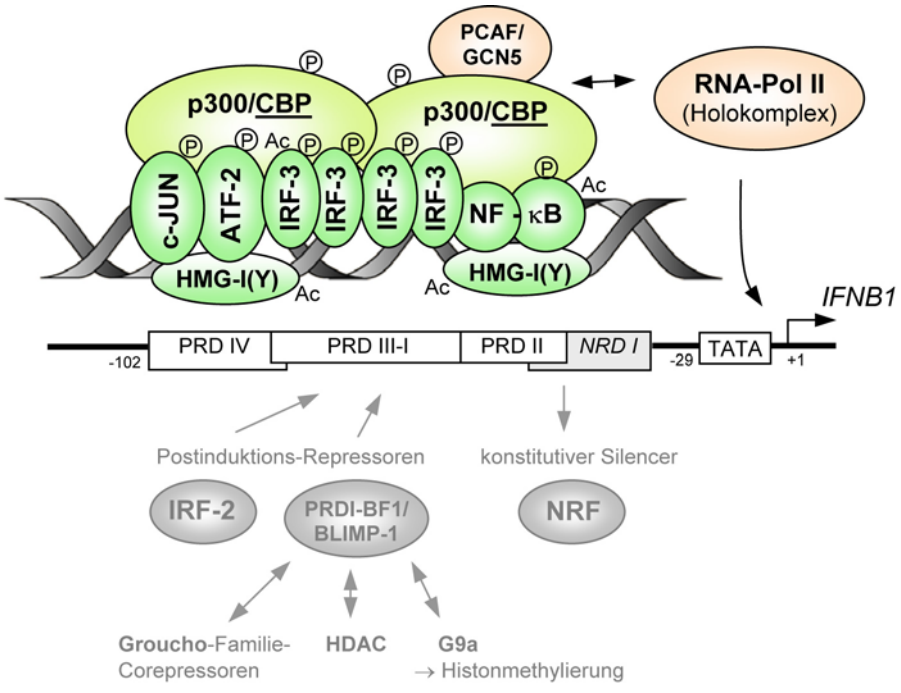


Abb. 3: Das IFN-β-Enhanceosom. Darstellung des assemblierten Transkriptionsfaktorkomplexes (grün) auf dem Enhancer des IFN-β-Gens sowie die Untergliederung des Enhancers in *Positive regulatory domains* (PRD). Die IFN-β-Induktion erfolgt durch Rekrutierung der RNA-Polymerase II. Repressorproteine (grau) sorgen für das postinduktive und konstitutive *Silencing* des IFN-β-Gens. Weitere Erläuterungen siehe Text. (mit Genehmigung V. Fensterl)

1.3 Beeinflussung des Interferonsystems

In Abschnitt 1.1 wurde die antivirale Bedeutung des Typ I-Interfonsystems ausführlich erläutert. Im Zuge einer Virusreplikation werden zwangsläufig Replikationsprodukte gebildet, sei es nun in Form viraler Proteine oder doppelstränger Ribonukleinsäure (dsRNA), die in dieser Form in der Zelle nicht existieren, und daher von den zelleigenen Kontrollmechanismen als fremd erkannt werden können und der Zelle einen Hinweis auf eine mögliche Infektion liefern (*9, 56, 118, 126*).

Es verwundert daher nicht, dass im Zuge des „Wettrüstens" zwischen Wirtszelle und „Parasit" Viren eine Vielzahl von Strategien entwickelt haben, ihre Präsenz zu verschleiern oder das Interferonsystem negativ zu beeinflussen oder ganz auszuschalten, um die eigene Replikation zu gewährleisten. Grundsätzlich kann man zwei Arten von Beeinflussungen unterscheiden: Die eine Möglichkeit besteht darin die Synthese von IFN zu unterbinden und die andere stört/verhindert die *Response* der Zelle auf eine Exposition mit IFN.

Unterbindung der IFN-Wirkung

Viele Viren intervenieren in die Signalsysteme nach einer Exposition der Zelle mit Interferon. Diese Störung der IFN-*Response* kann ganz unterschiedlicher Natur sein. So greift das Influenzavirus gleich mehrfach in das Interferonsystem ein. Zum einen induziert Influenza $p58^{IPK}$ den zellulären Inhibitor der PKR und verhindert damit ebenfalls eine Aktivierung derselben (*128*). Des Weiteren bindet das NS1-Protein dsRNA und verhindert damit die Nutzung gleich zweier essentieller Abwehrsysteme in Form der PKR und auch der 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS; *35, 127, 128, 142*), die beide dsRNA als Aktivatormolekül benötigen. Gerade die PKR besitzt eine zentrale Rolle bei der zellulären Antwort auf virale Infektionen. Sie wird durch IFN-Behandlung („Priming") hochreguliert und ist in mehrere Signalkaskaden involviert. Zum einen kann sie eIF2α phosphorylieren und so die Translation inhibieren, zum anderen kann sie über andere Proteine wie MAP-Kinase MKK6 oder TRAF-Proteine (*tumor necrosis factor receptor-associated factor*) ATF-2 und NF-κB aktivieren (Abb. 2; *6, 53, 122*) Ebenfalls dsRNA binden auch folgende Proteine: Das σ3 des Reovirus, das NSP3 der Rotaviren, das E3L des Vaccinavirus und das OV20.oL des Orf-Virus (*64, 82, 120, 144, 152*). Eine weitere Strategie die PKR an der Aktivierung zu hindern, ist die Bildung von viraler RNA, die an die PKR bindet, diese jedoch nicht aktivieren kann und somit die Bindung des eigentlichen Aktivatormoleküls dsRNA verhindert. Dieses gilt für die virusassoziierte RNA (VAI RNA; *97, 98*) der Adenoviren, die EBER (Epstein-Barr-Virus-encoded-RNA) des Epstein-Barr-Virus (EBV; *121*) und die TAR-

RNA des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV; *62*). Das Polivirus ist zudem in der Lage, über einen noch unbekannten Mechanismus die Degradierung der PKR zu induzieren (*16, 17*).
Außerdem hat die infizierte Zelle die Möglichkeit, durch Phosphorylierung einer Untereinheit des Translationsinitiationsfaktor-2α (eIF-2α) die Translation zu hemmen und Apoptose zu induzieren. Dieses kann durch eine Gruppe von Kinasen erfolgen, zu denen auch die PKR gehört. Das K3L-Protein des Vacciniavirus stellt zum Beispiel ein eIF-2α Homolog dar, das die eIF-2α Phosphorylierung unterbindet (*23, 29, 30*), während hingegen das ICP34.5 Protein des Herpes Simplex-Virus (HSV) die Protein Phosphatase 1 (PP1) zur Dephosphorylierung des eIF-2α rekrutiert (*66*). Beide Proteine verhindern so auf unterschiedliche Weise die Downregulation der Translation und den daraus resultierenden Zelltod. Das humane Papillomavirus-16 (HPV-16) bindet mit seinem E7-Protein das zelluläre IRF-9 und verhindert so die Bildung des ISGF3-Komplexes, wodurch dieser nicht in den Nukleus translozieren und an die ISRE binden kann (*10*). Dadurch kommt es zu keiner Expression der ISG. Ebenfalls die Bildung des ISGF3-Komplexes verhindert das Simian-Virus 5 durch sein V-Protein (*5, 33*), das C-Protein des humanen Parainfluenza-Virus 3 (HPIV-3; *94*) und des Sendai Virus (SeV; *55*)) über bisher unbekannte Mechanismen. Ersteres markiert STAT1 für die proteasomale Degradierung, letztere blockieren dessen Phosphorylierung. Ebenfalls proteasomal degradiert wird STAT2, wenn es zuvor vom humanen Parainfluenza-Virus 2 (HPIV-2) ubiquitiniliert wurde (*109*). Da STAT2 ebenfalls Bestandteil des ISGF3-Komplexes ist, unterbleibt ebenfalls die Expression der ISG. Das E1A-Protein der Adenoviren verringert den Level an IRF-9 und STAT1 (*86*) während eine unbekannte Interaktion beim humanen Cytomegalievirus (HCMV) den Level an IRF-9 und JAK1 reduziert (*101, 102*). Das EBNA-2-Protein des Epstein-Barr-Virus (EBV) reguliert die Expression der Interferon-stimulierten Gene herunter, was vermutlich auf der Beeinflussung der ISRE beruht (*73*). All diese Beispiele zeigen, dass Viren eine Vielzahl von Möglichkeiten entwickelt haben, die Wirkung von Interferonen zu verhindern.

Unterbindung der IFN-Induktion

Die Wirkung von Interferonen zu supprimieren oder in diese regulierend einzugreifen ist allerdings nicht die einzige Möglichkeit, um die eigene Replikation und Transmission zu gewährleisten. Ebenso effektiv ist die Modulation der IFN-Induktion über die Regulation von IRF-3 als essentiellem Mediator. Hierdurch wird bereits die Expression von Interferonen auf transkriptioneller Ebene unterbunden. Dieses erfolgt im Allgemeinen durch die Beeinflussung der *upstream* im IRF-3-aktivierenden Signalweg gelegenen Komponenten. So maskieren das NS1-Protein des Influenza A-Virus und E3L-Protein des Vacciniavirus dsRNA, um eine

Detektion durch RIG-I und MDA-5 zu unterbinden (*35, 127, 142, 144)*. Letzteres kann zudem direkt durch das V-Protein der Paramyxoviren (wie SeV und NDV) gebunden und inhibiert werden (*4, 80*). Die P-Proteine des Rabiesvirus und des *Borna Desease*-Virus sowie das N1L-Protein des Vacciniavirus verringern hingegen die Phosphorylierung von IRF-3 durch Bindung der aktivierenden Kinase TBK-1 (*22, 34, 134*). Während das VP35-Protein des Ebolavirus, das NS1/2-Protein des Respiratorischen Syncytial-Virus und das SARS-Coronavirus die Phosphorylierung von IRF-3 aufgrund eines noch unbekannten Mechnismus inhibieren (*13, 18, 123, 124*), binden das E6-Protein des Humanen Papilloma-Virus 16 und das NSP1-Protein des Rotavirus IRF-3 direkt (*60, 113*), was dieses in seiner Funktion beeinträchtigt und in letzterem Fall sogar zu dessen Degradierung führt (*11*). Einen anderen Weg beschreitet das Thogoto-Virus, dessen ML-Protein nicht die Phosphorylierung von IRF-3 hemmt, sondern dessen Dimerisierung und damit auch Translokation in den Zellkern (*71*).

Das in dieser Arbeit verwendete Hepatitis A-Virus (HAV) beeinflusst das Typ I-Interferonsystem ebenfalls. Im Zuge einer HAV-Infektion kommt es nicht zur Bildung von IFN-β, da dieses bereits auf transkriptioneller Ebene unterbunden wird (*15*). Mithilfe von Reporterplasmiden, die die einzelnen PRD in mehrfacher Anzahl repräsentieren, ließ sich diese Suppression auf den Bereich der PRD III-I und somit IRF-3 eingrenzen (*7, 43, 44, 68*). Hierbei ist allerdings unklar, in welcher Art und Weise die Reduktion der Reportergenexpression vonstattengeht oder welche virale Komponente diese vermittelt. Demzufolge gibt der nächste Abschnitt der Einleitung einen Überblick über das in der Arbeit eingesetzte Hepatitis A-Virus.

1.4 Das Hepatitis A-Virus

Das fäkal-oral übertragene Hepatitis A-Virus gehört zur Familie der *Picornaviridae* und wurde erstmalig 1973 per Elektronenmikroskop in Stuhlproben infizierter Patienten nachgewiesen (*47*). Da es als einziger Vertreter seiner Virusfamilie *in vivo* einen ausgesprochenen Hepatotropismus besitzt, wurde für HAV das Genus der Hepatoviren (*27*) geschaffen, dessen einziger Vertreter es bis heute geblieben ist. Welcher zelluläre Rezeptor die Aufnahme des Virus vermittelt und für den Hepatotropismus verantwortlich ist, konnte bisher nicht identifiziert werden, allerdings gibt es einen Binderezeptor namens HAVcr-1/TIM1 (*7, 46, 74*). Einen ersten Ansatzpunkt zur Erklärung des Lebertropismus liefert der Befund, dass HAV-IgA-Komplexe mittels pIgR (*Polymeric immunoglobin receptor*) von Epithelzellen transcytiert werden können (*36*), um so über das Darmlumen in die Blutbahn zu gelangen, wo sie über den ASGPR (*Asialoglycoprotein*

receptor) Leberzellen infizieren können (*38*). *In vitro* hingegen kann das Hepatitis A-Virus eine Vielzahl verschiedener Zellen produktiv infizieren: humane Lungenfibroblasten und ihre Derivate (z.B. MRC-5), Primaten-Nierenzellen (FRhK-4, BS-C-1, Vero) und Zellen von Meerschweinchen, Delphin und Schwein (*31, 37, 50*). *In vivo* zeigt sich hingegen der bereits erwähnte starke Hepatotropismus, so dass die Leber wohl den einzigen Replikationsort für das Hepatitis A-Virus darstellt.

Die virale Typ A-Hepatitis hat eine Inkubationszeit von etwa 4 Wochen, in der es zur Virämie und der Ausscheidung des Virus über den Stuhl kommt. Beim Auftreten der ersten Symptome wie Übelkeit, Fieber, Appetitlosigkeit und allgemeinem Unwohlsein können bereits Antikörper der Klassen IgM, IgA und IgG nachgewiesen werden. Obwohl es zahlreiche HAV-Stämme mit mehreren Genotypen wie HM175 oder GBM gibt und das Hepatitis A-Virus weltweit verbreitet ist, konnte bislang nur ein einziger Serotyp nachgewiesen werden (*83, 125*). Kurze Zeit nach Auftreten der ersten Symptome kommt es zu einer Gelbsucht (Icterus), die sich in einer Gelbfärbung der Haut und der Augen äußert. Dieses wird durch eine Ablagerung von freiem Bilirubin in der Haut und der Bindehaut des Auges hervorgerufen. Zusätzlich zur Akkumulation von freiem Bilirubin im Serum kommt es im Zuge der Leberentzündung zur Freisetzung von Leberenzymen (ALT, AST). Hierbei ist festzustellen, dass die Zerstörung der Leberzellen nicht durch das Virus selbst, sondern durch CD8-positive cytotoxische T-Zellen erfolgt, die die virusinfizierten Zellen erkennen und zerstören, was zu nekrotischen Veränderungen des Lebergewebes führt (*51, 68, 136, 139*). Nach wenigen Wochen beginnt die Rekonvaleszenz (*84, 125*).

Das Virion des Hepatitis A-Virus verfügt über ein einzelsträngiges RNA-Genom in Positivorientierung, das von einem im Durchmesser 27 µm großen ikosaedrischen Capsid umschlossen wird (*47, 83, 132*). Die Genomlänge beträgt 7,5 kb (Abb. 4; *132*). Das 5'-Ende ist kovalent mit einem viralen Protein assoziiert, welches dieser Funktion entsprechend *Virus protein genome-associated* (VPg) benannt wurde. Das Genom kodiert für einen einzigen *open reading frame* (ORF), der von nicht-translatierten Regionen (NTR) flankiert wird. Die 5'-NTR enthält eine komplexe Sekundärstruktur, die so genannte *Internal ribosome entry site* (IRES; *54*), die cap-unabhängig die Bindung an die Ribosomen vermittelt und somit die Translation initiiert. Hierdurch erhält das virale Genom in Positivorientierung mRNA-Charakter und kann ohne weitere Modifikation translatiert werden. Die 3'-NTR enthält eine einfache Sekundärstruktur und zudem einen poly-A-*Tail* (*133*).

Der ORF codiert für ein einzelnes Polyprotein von 251 kDa Größe und etwa 2225 Aminosäuren Länge. Dieses wird durch die virale Protease 3C in die einzelnen Proteine prozessiert. Der

codierende Bereich des Genoms lässt sich in drei Teilbereiche mit mehreren Einzelproteinen untergliedern. Hierbei beinhaltet die P1-Region die Strukturproteine, die P2- und P3-Region hingegen die Nichtstrukturproteine (Abb. 4; *83, 117, 132*). Die Strukturproteine VP1 bis VP4 bilden das Capsid, wobei je viralem Protein 20 Einheiten benötigt werden.

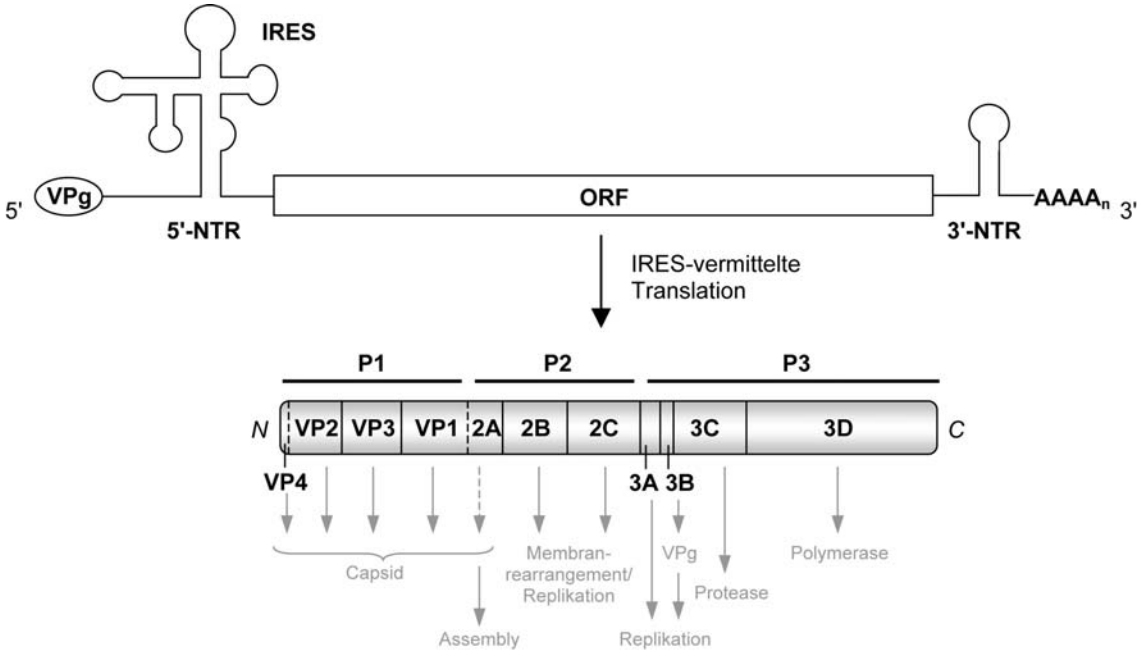


Abb. 4: Genomorganisation und Proteine des Hepatitis A-Virus. Das ssRNA-Genom (oben) untergliedert sich in die 5'-NTR mit IRES (*Internal ribosome entry site*), den *Open reading frame* (ORF), die 3'-NTR und den poly-A-*Tail*. Das 5'-Ende ist kovalent mit dem viralen VPg verbunden. Das direkt translatierte Polyprotein (unten) wird durch die virale 3C-Protease in einzelne Proteine gespalten, die entsprechenden Funktionen sind in grauer Schrift angegeben. Weitere Informationen siehe Text. (mit Genehmigung V. Fensterl)

Die Abspaltung des nicht myristoylierten VP4 vom VP2 erfolgt anscheinend erst im Virion (*52, 110, 130*), da der Proteinnachweis für VP4 bisher nicht gelang und lediglich das Vorläuferprotein VP0 nachgewiesen werden konnte, welches aus VP2 und VP4 besteht (*52*). Das 2A-Protein hat bei HAV im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der *Picornaviridae* (z.B. Poliovirus) keine Proteasefunktion (*110, 111*) und kann 3C-unabhängig abgespalten werden (*96, 111*). Vielmehr scheint ihm eine Rolle beim *assembly* zuzukommen, da es zeitweilig mit VP1 assoziiert das PX bildet (*96, 111*). 2B und 2C bewirken aufgrund ihrer Membranassoziation eine Veränderung intrazellulärer Membransysteme und haben dadurch replikationsfördernden Charakter. 3A besitzt einen hydrophoben Teil und verankert so den Vorläufer 3AB an Membranen, wobei 3B mit dem Genom assoziiert und nach der Abspaltung das VPg bildet. Somit fungiert 3B vermutlich, wie beim Poliovirus, als Primer für die Initiation der Replikation des Genoms durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (3D; *14, 133*). Im Laufe der

Replikation von HAV akkumulieren virale Antigene in der Nähe des Zellkerns (*79*) und die Virionen werden nach dem *assembly* über einen noch unbekannten Weg aus der Zelle ausgeschleust. Hierbei ist zu konstatieren, dass das Virus *in vitro*, bis auf einige hochadaptierte cytopathogene Varianten, persistente Infektionen etabliert (*20, 85, 138, 140*). Diese Persistenz wird durch mehrere Faktoren positiv begünstigt. Zum einen führt die sehr langsame Replikation von HAV kaum zur Kompetition der zellulären Translation und zum anderen kommt es nicht zum *virus-host shutoff*, der bei anderen Mitgliedern der *Picornaviridae* durch das Protein 2A vermittelt wird (*54, 83*). Zudem supprimiert HAV aktiv sowohl die Apoptose-Induktion als auch die Interferon β-Induktion durch verschiedene Trigger, wie z.B. transfiziertes poly(IC) oder NDV (*19, 93*). Gerade Letzteres ist auch *in vivo* wahrscheinlich, da die Gabe von exogenem Interferon in einem frühen Stadium der Infektion das Virus eliminieren kann (*28, 135*). Somit ist HAV in der Lage, die eigene Replikation vor dem Einsetzen der spezifischen Immunantwort zu gewährleisten. Die Persistenz wird zudem durch die *in vitro* fehlende zellvermittelte Immunantwort begünstigt, da die Zerstörung der virusinfizierten Zellen *in vivo* durch CD8-positive cytotoxische T-Zellen und nicht durch die Lyse beim *release* der Virionen erfolgt.

Die fehlende Interferonsekretion durch HAV-infizierte Zellkulturen ist ein lange bekanntes Phänomen und konnte nach Stimulation sowohl mit intra- als auch extrazellulärem poly(IC) (synthetische dsRNA) gezeigt werden (*19, 137*). Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass die Sekretion bereits auf transkriptioneller Ebene supprimiert wird und dabei zelltyp- und virusstammunabhängig ist. Durch IFN-β-Enhancer-Reporterplasmide konnte ein post-transkriptionaler Mechanismus ausgeschlossen und die Suppression auf die Induktion der Transkription des IFN-β-Gens eingegrenzt werden (*15, 19, 93*). Durch Isolation der einzelnen Subdomänen des IFN-β-Enhancers (Abb. 3) und deren Verwendung in Reporterplasmiden konnte eine Beeinflussung der PRD II und der PRD III-I durch HAV nachgewiesen werden. Die PRD II-abhängige Reportergenexpression mit ihrem korrespondierenden Transkriptionsfaktor NF-κB erfuhr hierbei alleinig durch eine HAV-Infektion eine leichte Aktivierung, die sich bei gleichzeitiger Transfektion von poly(IC) bis auf das Doppelte verstärkte, jedoch mit NDV als Induktor supprimiert wurde. Diese Positivregulation scheidet folglich für die Suppression der IFN-β-Induktion aus (*8, 21, 75, 116*). Zudem konnte eine ungehinderte nukleäre Translokation in HAV-infizierten MRC-5-Zellen nachgewiesen werden (*15*). Die PRD III-I-abhängige Reportergenexpression zeigte hingegen analog zum Gesamtenhancer nach poly(IC)-Transfektion eine vollständige Blockade durch HAV (*8, 49, 75*). Somit ist davon auszugehen, dass die PRD III-I mit ihrem korrespondierenden Transkriptionsfaktor IRF-3 oder dessen aktivierenden Signalkaskaden für die Suppression der Interferonsekretion verantwortlich sind.

1.5 Zielsetzung

Die fortschreitenden Untersuchungen zur Aufklärung des zugrunde liegenden Prozesses der Suppression der IFN-β-Induktion in HAV-infizierten Zellkulturen werfen die Frage nach der verantwortlichen viralen Komponente auf, so diese auf ein einzelnes Protein reduzierbar ist. Während nämlich IRF-3 oder dessen aktivierenden Signalkaskaden als verantwortlicher Transkriptionsfaktor nachgewiesen wurde, ist dieses bisher bei keinem viralen Protein der Fall. Hierbei spielen verschiedene Faktoren eine entscheidende Rolle. Zum einen repliziert HAV in Zellkultur ausgesprochen langsam, so dass es bisher nicht möglich war die HAV-Proteine, abgesehen von den Stukturproteinen VP1 - VP4, im Laufe der Replikation nachzuweisen. Zudem existiert kein verlässliches HAV-Expressionssystem, mit dem es möglich wäre, einzelne virale Proteine in ausreichender Menge intrazellulär zu exprimieren.

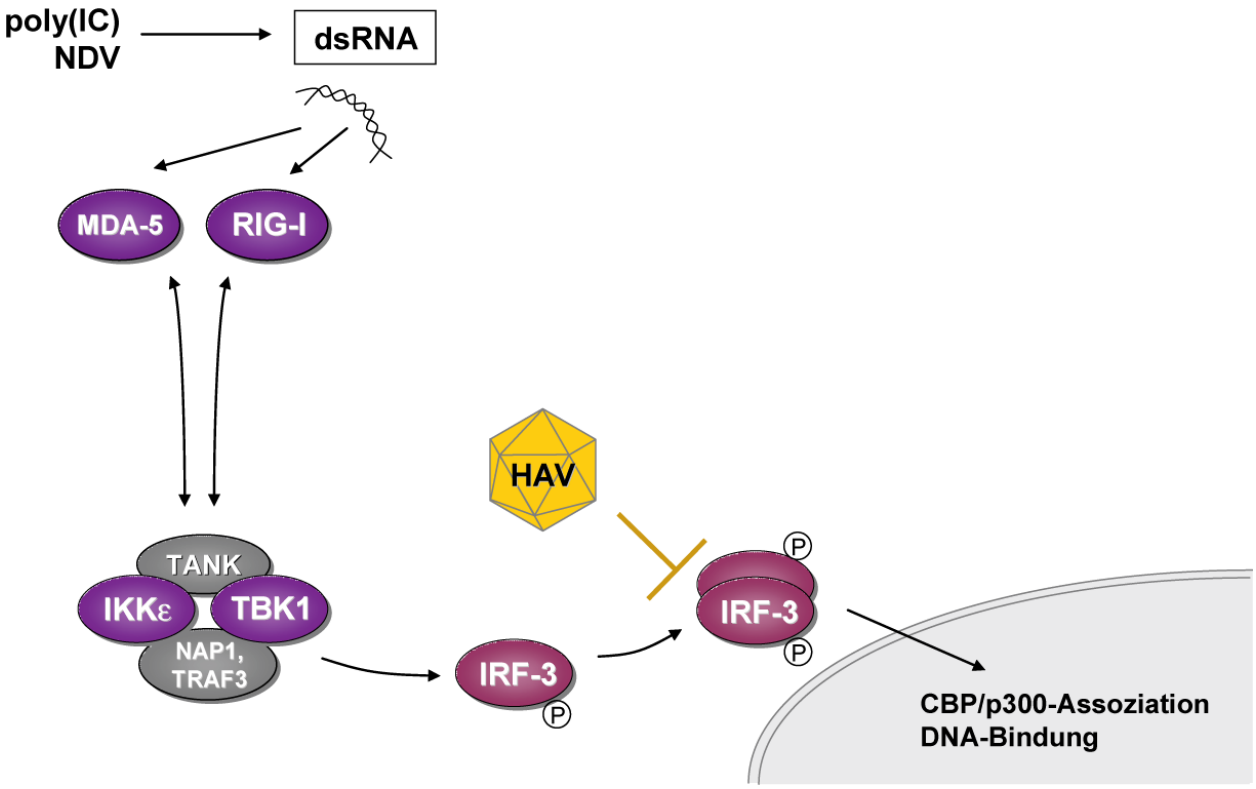


Abb. 5: Signalweg der IRF-3-Aktivierung durch intrazelluläre dsRNA. (mod. mit Genehmigung V. Fensterl)

Abbildung 5 zeigt schematisch den zu Beginn der Arbeit vorliegenden Wissensstand. Dargestellt ist die IRF-3 Aktivierung durch intrazelluläre dsRNA. Parallel zu dieser Arbeit entstanden zwei weitere Doktorarbeiten, die sich mit dem Angriffspunkt von HAV in die IRF-3 aktivierenden

Signalkaskaden beschäftigten. Ziel dieser Arbeit war es zunächst, ein Expressionssystem zu etablieren, das die für HAV bereits gezeigte Suppression der IFN-β-Enhancer- bzw. PRD III-I-vermittelten Reportergenexpression mit Expressionsplasmiden für virale (Oligo-)Proteine bestätigen kann, um so eine Beeinflussung der aktivierenden Signalkaskaden durch HAV auf bestenfalls ein einzelnes virales Effektorprotein eingrenzen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Ampicillin	Serva
G418 (Geneticin)	Sigma
Penicillin (10000 U/ml) / Streptomycin (10mg/ml)	Sigma

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Fluka
Acrylamid	Pharmacia Biotech
Agar "Bacto Agar"	Becton Dickinson
Agarose "LM-MP" low melting point	Roche
Agarose "SeaKem LE"	Cambrex
Ammoniumpersulfat	Serva
Bisacrylamid (Methylenbisacrylamid)	Pharmacia Biotech
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid	Merck
Cäsiumchlorid (CsCl)	Serva
Chloroform	Fluka
DEAE-Dextran (Diethylaminoethyl-Dextran)	Sigma
DEPC ("Diethylpyrocarbonat")	Sigma
Diethylether	Riedel-de Haen
Dinatriumhydrogenphosphat	Riedel-de Haen
DMEM (mit L-Glutamin)	Sigma

DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	Roche
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
EDTA (Ethylendiamin-tetra-acetat)	Sigma
Entwickler & Fixierer "Adefodur"	Adefo
Essigsäure (Eisessig)	Fluka
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Glucose	Janssen Chimica
Glycerol	Riedel-de Haen
Glycerol/PBS (Eindeckmedium)	Euroimmun
Glycin	Roth
Guanidin-thiocyanat	Serva
Harnstoff	Merck
Hefe-Extrakt "Bacto yeast extract"	Becton Dickinson
HEPES	Acros
Immersionsöl Immersol F	Zeiss
Isoamylalkohol (Isopentylalkohol)	Merck
Isopropanol (2-Propanol)	Fluka
jetPEI transfection reagent	Qbiogene
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haen
N-Lauroyl-Sarcosinat (Sarcosyl)	Sigma-Aldrich
Mineral-Öl	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Riedel-de Haen
2-Mercaptoethanol	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Fluka
Natriumhydroxid	Fluka
Paraformaldehyd	Fluka
Phenol (wassergesättigt) "Roti-Aqua-Phenol"	Roth
Phenol (TE-Puffer-gesättigt) "Roti-Phenol"	Roth
poly(IC) (Poly-Inosinsäure:poly-Cytidylsäure)	Sigma
Saccharose	Acros

Salzsäure (HCl)	Merck
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Pharmacia Biotech, Roth
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Sigma
Trinatriumcitrat	Roth
Tris Base [Tris(hydroxymethyl)-aminomethan]	Sigma, Roth
Triton X-100	Serva
Trockenmagermilch	Saliter
Trypan Blue	Sigma
Trypton "Bacto Tryptone"	Becton Dickinson
Tween-20	Serva

2.1.3 Enzyme, Proteine und Antikörper

Alkalische Phosphatase	Roche
Antikörper Kaninchen-anti HAV-VP1, polyklonal	A. Dotzauer, Doktorarbeit
Antikörper Kaninchen-anti HAV-2B, polyklonal	Genovac
Antikörper Maus-anti-HAV "7E7", monoklonal	Mediagnost
Antikörper Ziege-anti-Maus, FITC-konjugiert	Kierkegaard & Perry (KPL)
Antikörper Ziege-anti-Maus, Texas Red-konjugiert	Kierkegaard & Perry (KPL)
Antikörper Ziege-anti-Maus, Peroxidase (HRP)-konjugiert	Santa Cruz
Bovines Serumalbumin, BSA (Fraktion V)	Roche
Klenow-Fragment (von *E. coli* DNA-Pol. I) mit 10x Puffer	Invitrogen
Lysozym (aus Hühnereiklar)	Serva
Restriktionsendonucleasen mit 10x Puffer	Roche
RNase A	Roche
T4 DNA-Ligase mit 10x Puffer	Roche
Taq-Polymerase	Eppendorf
Trypsin-EDTA	Sigma

2.1.4 Geräte

Analysenwaage BP 61	Sartorius

Analysenwaage MC 1	Sartorius
Begasungsbrutschränke	Heraeus
Blotting-Kammer (TE Series Transphor Epho Unit)	Hoefer
ELISA-Reader mit Software SOFTmaxPRO	Molecular Devices
Elektrophorese-Kammer (PAGE) "Mighty Small II" SE250	Hoefer
Entwicklermaschine SRX-101	Konica
Epifluoreszenzmikroskop "Axioskop 2" (HAL100 & HBO100)	Carl Zeiss
Fluoreszenzfilter-Sets 09 (450-490 nm) und 15 (546 nm)	Carl Zeiss
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Assistent
Gelkammern für Agarose-Gelelektrophorese	Bio-Rad
Gel-Gießkammer (PAGE) "Mighty Small" SE245	Hoefer
Glaspipetten	Hirschmann EM
Glaswaren	Schott, Brand, B.Braun
Inkubator Certomat HK	B.Braun Biotech Int.
Kolbenhub-Pipetten (Multipipetten, µl-Pipetten)	Eppendorf, Gilson
Kühlblock TR-L 288 (für Ligation)	Liebisch
Kühlzentrifuge 5403	Eppendorf
Lichtmikroskop Wilovert S	Hund
Lumineszenz-Counter "Trilux 1450 MicroBeta" mit Software	Wallac
Magnetrührtisch RCT basic	Ika Labortechnik
Mehrkanalpipetten (8-fach)	Eppendorf
Messzylinder	VitLab
PCR-Cycler "Gene Amp PCR Sytem 2400"	Perkin Elmer
pH-Meter pH 537	WTW
Pipettierhilfe "Acuboy"	TecNoMara
Pipettierhilfe "Pipetboy acu"	Integra Biosciences
Power Supply 200/2.0	Bio-Rad
Quarzküvetten Suprasil	Hellma
Refraktometer	Optronic
Saugpumpe Vacuboy (Sauger)	Integra Biosciences
Schüttler Certomat S	B.Braun Biotech Int.
Schweißgerät (Tube Sealer für Quick Seal)	Beckman
Sofortbildkamera MP4^{+}	Polaroid
SpeedVac SC 110 Vakuumzentrifuge	Savant
Spektralphotometer DU 640	Beckman

Sterilbank Clean Air	Haan
Sterilbank LaminAir HB 2448	Heraeus
Taumler "Red Rotor"	Hoefer
Thermomixer 5436 (für Reaktionsgefäße)	Eppendorf
Tischzentrifuge GS-6R mit Rotor GH 3.7 (für Falcons)	Beckman
Tischzentrifuge 5415 C (für Cups)	Eppendorf
Ultraschallgerät UW 200	Bandelin
Ultrazentrifuge LE-70 mit Rotor Typ FW 65	Beckman
UV-Handlampe VL-6C	Serva
UV-Transluminator "Mighty Bright"	Hoefer
Vakuum-Saugpumpe (Membranpumpe)	Vacuubrand
Vortexer VF2	Ika Labortechnik
Wasserbad (37 °C)	Memmert
Zentrifuge RC28S mit Rotor F-28/50 und F-16/250	Sorvall

2.1.5 Kits und Standards

CAT-ELISA	Roche
DNA-Längenstandard "1kb ladder"	Invitrogen
DNA Molecular weight marker VIII	Roche
ECL Detection reagent (für Immunoblot)	Amersham
Luciferase Assay System	Promega
Protein Assay Dye Reagent (5x Bradford-Reagens)	Bio-Rad
Protein-Marker (pre-stained, low-range für SDS-PAGE)	Bio-Rad
VenorGeM PCR-based Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs

2.1.6 Kompetente Bakterien

Escherichia coli, Stämme HB101, C600

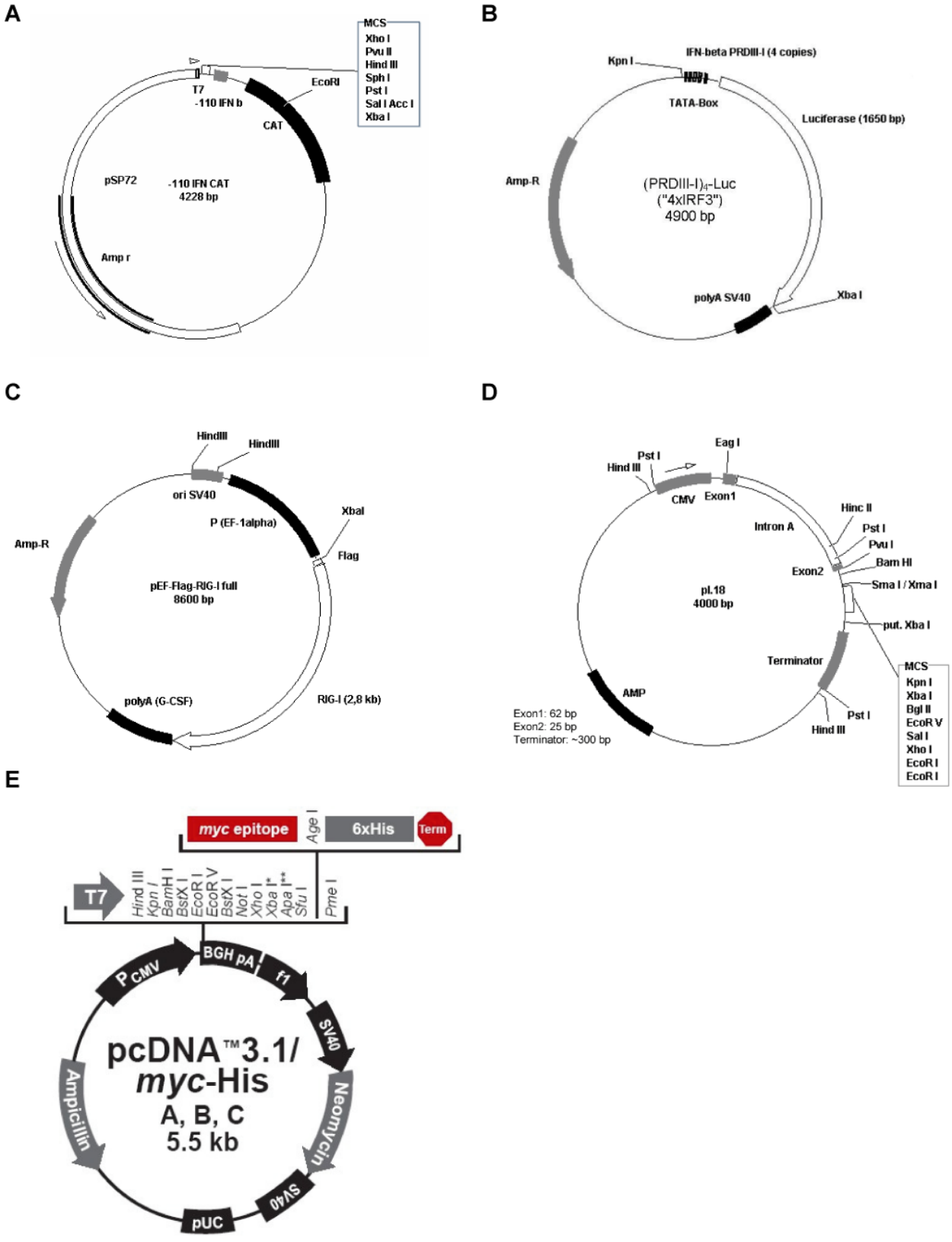


Abb. 6: Plasmidkarten. (**A-E**) Darstellung einiger der eingesetzten Plasmide mit Genen und Promotoren, Resistenz-Genen und Restriktionsenzym-Schnittstellen. Erläuterungen siehe Text.

2.1.7 Plasmide

(-110-IFN-β)-CAT: Reporterplasmid; enthält das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen unter der Kontrolle des humanen Interferon-β-Enhancer/Promotors (bp -116 bis +11). Das Plasmid wurde freundlicherweise von Tom Maniatis (Dept. of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt (*131*; Abb 6 A).

p125-Luc (IFN-β-Luc): Reporterplasmid; enthält das Leuchtkäfer-Luciferase-Gen unter der Kontrolle des Interferon-β-Enhancer/Promotors (bp -125 bis +17). Das Plasmid wurde freundlicherweise von Takashi Fujita (Department of Tumor Cell Biology, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan) zur Verfügung gestellt (*151*).

$(PRDIII\text{-}I)_4$-Luc ("4xIRF3"): Reporterplasmid; enthält das Leuchtkäfer-Luciferase-Gen unter der Kontrolle vierer *Repeats* der PRDIII-I des humanen Interferon-β-Enhancers (IRF-3-Bindestelle). Der Basisvektor ist pGL3 (Promega) inklusive einer TATA-Box. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Stephan Ludwig (Institute of Molecular Medicine, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany) zur Verfügung gestellt (*41*; Abb. 6 B).

pEF-Flag-RIG-I full: Expressionsvektor; enthält die cDNA des humanen full-length RIG-I in N-terminaler Fusion mit einem FLAG-tag unter der Kontrolle des EF-1α-Promotors, der Basisvektor ist pEF-BOS. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Takashi Fujita (Department of Tumor Cell Biology, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan) zur Verfügung gestellt (*150*; Abb. 6 C).

pI.18: Expressionsvektor, enthält eine, von zwei Exonsequenzen (Splice-Donor/Akzeptor) flankierte, Intron A-Sequenz, die im Zuge der mRNA-Reifung herausgeschnitten wird. Dieses führt zu einer stark gesteigerten Expression. pI.18 wurde zur Expression von HAV-Proteinen verwendet, nachdem zuvor die entsprechenden cDNA Sequenzen per PCR amplifiziert und in den Vektor inseriert wurden. Das Plasmid wurde freundlicherweise von J. Robertson (National Institute for Biological Standards and Control, Herfortshire, U.K.) zur Verfügung gestellt (Abb. 6 D).

pcDNA3.1/*myc*-His: Expressionsvektor; wurde zur Expression von HAV-Proteinen verwendet, nachdem zuvor die entsprechenden cDNA Sequenzen per PCR amplifiziert und in den Vektor inseriert wurden. Das Plasmid stammt von der Firma Invitrogen (Abb. 6 E).

pHcRed-Tandem-N1: Expressionsvektor; enthält die cDNA des rot fluoreszierenden Proteins HcRed der Leder-Anemone *Heteractis crispa* in zweifacher, fusionierter Kopie unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Für die Selektion enthält der Vektor ein Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen. Das Plasmid stammt von der Firma Evrogen.

2.1.8 Primer für die PCR

Alle Oligonucleotid-Primer beziehen sich auf die Sequenz des Hepatitis A-Virus Stamm HM175 und wurden von der Firma Roth synthetisiert. Allen sense-Primern wurde zur proteinspezifischen Sequenz (unten für die einzelnen Primer aufgelistet) 5'-terminal eine zusätzliche Sequenz angefügt, die neben 5 unspezifischen Nukleotiden (grün) die *Kpn I*-Schnittstelle, eine Kozak-Sequenz (hellblau) sowie das Startcodon (orange) inserierte. Den antisense-Primern wurde ebenfalls eine zusätzliche Sequenz angefügt, die das STOP-Codon (rot), die *EcoR V*-Schnittstelle und ebenfalls 5 unspezifische Nukleotide (grün) anfügte.

nicht sequenzspezifische Regionen

5'-terminal GGTTGGGTACCACCATG
3'-terminal TAGATATCCGGCG

HAV-VP1	*sense*	GTTGGAGATGATTCTGGAGG
	antisense	TTCGGTACAATAGGTGACTT
		(819 bp Amplifikat)
HAV-VP2	*sense*	GACATTGAGGAAGAGCAAAT
	antisense	ATTGAGGAGAAAGATGTGTT
		(666 bp Amplifikat)
HAV-VP3	*sense*	ATGAGAAATGAATTTAG

	antisense	GATACCTACAATGATGTGTT
		(738 bp Amplifikat)
HAV-VP4	*sense*	TCTAGACAAGG
	antisense	TGGTGTAGGACAGAAACCGT
		(69 bp Amplifikat)
HAV-2A	*sense*	TCAATGATGAGCAGAATTGC
	antisense	ACTTCCCTGACAAAAGTGTT
		(216 bp Amplifikat)
HAV-2B	*sense*	GCCAAAATTTCTCTTTTTTA
	antisense	ACTACCTCAATTCCTGAGTC
		(753 bp Amplifikat)
HAV-2C	*sense*	AGTTTTTCCAACTGGTTAA
	antisense	AGTACCTCAACACCAGAGTC
		(1005 bp Amplifikat)
HAV-3A	*sense*	GGAATTTCAGATGATGATAA
	antisense	TTCTTGGTTAGGGTCGACTT
		(222 bp Amplifikat)
HAV-3B	*sense*	GGGGTATATTATGGTGTAAC
	antisense	GTCTAGGTCATCTTAGAGTC
		(69 bp Amplifikat)
HAV-3C	*sense*	TCAACTTTGGAAATAGCAGG
	antisense	TATTCTTTTAACTTTCAGTC
		(667 bp Amplifikat)
HAV-3D	*sense*	AGAATTATGAAAGTGGAGTT
	antisense	CAAAGTAAACACTTGAAAGT
		(1467 bp Amplifikat)

2.1.9 Puffer und Lösungen

PBS (pH 7,4)	140 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	6,5 mM Na_2HPO_4
	1,5 mM KH_2PO_4

Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE	2 M Tris
	0,25 M Natriumacetat
	5 mM EDTA
	pH 7,8 einstellen
	für Gebrauch Verdünnung in Aqua dest. auf 1x
DNA-Probenpuffer	40 % (w/v) Saccharose
	1 mM EDTA (pH 8,0)
	0,1 % (w/v) SDS
	0,05 % (w/v) Bromphenolblau
DNA-Größenstandard	60 µl DNA-Marker "1kb ladder" bzw. 73 µl Marker "VIII"
	40 µl 10x TAE
	100 µl DNA-Probenpuffer
	300 µl Aqua dest.
	Inkubation 10 min bei 56 °C, Lagerung bei –20 °C
Ethidiumbromid-Suspension	10 mg/ml in 20 mM Tris (pH 8,0)

Bakterienkultur

LB-Medium	10 g Trypton

	5 g Hefe-Extrakt 8 g NaCl *ad* 1 Liter mit Aqua dest., autoklavieren Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin bei Benutzung
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar (15 g/l) autoklavieren, Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin
LB^{++}-Medium	LB-Medium mit 20 mM $MgSO_4$ und 10 mM KCl
Ampicillin-Stammlösung	50 mg/ml Amp in autoklaviertem Aqua dest. suspendieren, Lagerung bei –20 °C

<u>Calciumphosphat-Transfektion</u>

TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA natriumfrei pH 7,8 einstellen mit 1 M HCl autoklavieren
Calciumchloridlösung	2 M $CaCl_2$ in Aqua dest. autoklavieren
2x HBS	50 mM HEPES 1,5 mM Na_2HPO_4 280 mM NaCl pH 7,1 präzise einstellen mit 5 M NaOH sterilfiltrieren
Glycerol-Schocklösung	Glycerol 1:3 in Aqua dest. (= 30 %) autoklavieren bei 100 °C 1:2 in 2x HBS verdünnen (= 15 % Schocklösung)

Freeze & Thaw Lyse zur Proteingewinnung

Tris-HCl	250 mM Tris pH 7,5 einstellen mit HCl autoklavieren
TEN	40 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA (pH 8,0) 150 mM NaCl autoklavieren

Indirekte Immunfluoreszenz zur HAV-VP1 und HAV-2B-Detektion

Paraformaldehyd (4 %)	1 g Paraformaldehyd *ad* 25 ml PBS über Nacht auf Magnetrührer sterilfiltrieren bei RT mindestens 14 Tage haltbar
Triton X-100 (0,2 %)	200 µl in 100 ml PBS lösen

Indirekte Immunfluoreszenz zur HAV-Detektion

Aceton (90 %)	90 ml Aceton *ad* 100 ml PBS
Triton X-100 (0,2 %)	200 µl in 100 ml PBS lösen

jetPEI-Transfektion

150 mM NaCl	0,8766 g Natriumchlorid *ad* 100 ml DEPC-Wasser, autoklavieren

Schnellpräparation bakterieller Plasmid-DNA (Miniprep)

Lösung 1	50 mM Glucose 10 mM EDTA 10 mM Tris pH 8,0 einstellen mit HCl autoklavieren bei 100 °C kurz vor Gebrauch 2 mg/ml Lysozym dazu
Lösung 2	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS frisch ansetzen
Lösung 3	3 M Natriumacetat pH 4,8 mit Eisessig einstellen

Plasmidpräparation (Maxiprep) nach Sambrook et al., 1989, verändert

2 M Tris	pH 8,0 mit HCl einstellen
0,5 M EDTA	pH 8,0 mit NaOH einstellen
TES	50 mM Tris (pH 8,0) 5 mM EDTA (pH 8,0) 50 mM NaCl
STET	50 mM Tris (pH 8,0) 50 mM EDTA (pH 8,0) 8 % (w/v) Saccharose 5 % (w/v) Triton X-100 frisch ansetzen
Lysozymlösung	20 mg/ml Lysozym in 20 mM Tris (pH 8,0)

	frisch ansetzen
Sarcosyl 1 %	1 % (w/v) in 20 mM Tris (pH 8,0) frisch ansetzen
NaCl-gesätt. Isopropanol	Isopropanol ausschütteln in 10 mM Tris (pH 8,0) / 1 mM EDTA, gesättigt mit NaCl
Cäsiumchlorid-Lösung	50 g CsCl in 65 ml 20 mM Tris (pH 8,0) lösen Refraktionsindex mit 20 mM Tris auf 1,3865 einstellen
Ethidiumbromid-Suspension	10 mg/ml in Aqua dest.
5 mM Trispuffer	2 M Tris (pH 8,0) 1:400 mit Aqua dest. verdünnen

<u>Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA aus wässriger Lösung</u>

Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol	25:24:1 (v/v)
3M Natrium-Acetat (pH4,8)	

<u>Phenol-Ether-Extraktion von DNA aus LMP-Agarose-Gel</u>

Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol	25:24:1 (v/v)
3M Natrium-Acetat (pH4,8)	
Ether (wasser-gesättigt)	Diethylether mit 1 VT Aqua dest. schütteln, warten, obere Phase nutzen

poly(IC)-Transfektion mittels DEAE-Dextran

DEAE-Dextran	10 mg/ml in autoklaviertem Aqua dest. sterilfiltrieren, Lagerung bei 4 °C
poly(IC)	2 mg/ml in RNase-freiem Aqua dest., Lagerung bei −80 °C

Proteinbestimmung nach Bradford

BSA-Stammlösung	10 mg/ml BSA in 0,25 M Tris-HCl (pH 7,5) verdünnen mit Tris-HCl für diverse Standards (0,25 - 4 mg/ml)
1x Bradford-Reagens	5x Bradford-Reagens (Bio-Rad Protein Assay) auf 1x verdünnen mit Aqua dest., filtrieren mit Schleicher & Schuell "Schwarzband"-Filterpapier, lichtgeschützt bis 14 Tage haltbar

SDS-PAGE & Immunoblot (PAGE nach Laemmli, 1970, verändert)

Lower Tris (pH 8,8)	1,5 M Tris Base 0,4 % SDS pH 8,8 einstellen mit HCl
Upper Tris (pH 6,8)	0,5 M Tris Base 0,4 % SDS pH 6,8 einstellen mit HCl
Acrylamid/Bisacrylamid	29 % Acrylamid (w/v) 1 % Bisacrylamid (w/v) filtrieren, bei 4 °C lichtgeschützt drei Monate haltbar
Ammoniumpersulfat (10 %)	100 mg APS pro ml Aqua dest.

	bei 4 °C vier Wochen haltbar
Trenngel (10 %)	10 ml Volumen für 2 kleine Gele: 3,3 ml Acrylamid/Bisacrylamid-stock (30 %) 2,6 ml Lower Tris pH 8,8 4,1 ml Aqua dest. 10 min entgasen per Saugpumpe 50 µl Ammoniumpersulfat und 5 µl TEMED zugeben schwenken, aspirieren, Gel gießen
Sammelgel (3 %)	10 ml Volumen für 2 kleine Gele: 1 ml Acrylamid/Bisacrylamid-stock (30 %) 2,6 ml Lower Tris pH 8,8 6,4 ml Aqua dest. 10 min entgasen per Saugpumpe 50 µl Ammoniumpersulfat und 10 µl TEMED zugeben schwenken, aspirieren, Gel gießen
Protein-Probenpuffer	40 % Saccharose (w/v) 12 % SDS (w/v) 62,5 mM Upper Tris 0,025 % Bromphenolblau (w/v) 8 % 2-Mercaptoethanol (v/v) bei –20 °C lagern
Elektrophorese-Puffer	192 mM Glycin 25 mM Tris Base 1 % SDS
Renaturierungspuffer	50 mM Natriumchlorid 10 mM Tris pH 7,0 (aus 1 M Tris pH 7,0 stock) 4 M Harnstoff 0,1 mM DTT
Blotting-Puffer	192 mM Glycin

	25 mM Tris bei 4 °C lagern
TBS (pH 8,0)	2 mM Tris Base 137 mM Natriumchlorid pH 8,0 einstellen mit HCl bei 4 °C lagern
TBST	TBS pH 8,0 0,1 % Tween-20 bei 4 °C lagern
TBST/Trockenmagermilch	TBST 5 % Trockenmagermilch (w/v) bei 4 °C lagern
0,1 % Bromphenolblau	50 mg Bromphenolblau in 50 ml Aqua dest.

2.1.10 Serum für Zellkultur

Fetal calf serum (FCS)	Gibco BRL

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

24-Well-plates, Nunclon Δ	Nunc
96-Well-plates, Nunclon Δ	Nunc
Bakterienröhrchen 14 ml	Greiner
Biomax MR Filme 18x40 cm	Kodak
Chamber slides, 8-Well, Plastik	Labtek/Nunc
Combitips	Eppendorf
Deckgläschen (24x60 mm)	Omnilab

Dialyseschläuche (MW cutoff 14 kDa) "ultrapure", "Visking"	Gibco, Serva
Einmal-Küvetten 1,5ml Plasik	Plastibrand, Nerbe plus
Filterpapier "Schwarzband"	Schleicher & Schuell
Kanülen (0,9x40 mm / 0,45x25 mm)	B. Braun
Kimwipes lite (Wischtücher)	Kimberly-Clark
Nitrocellulose-Membran "Protran"	Schleicher & Schuell
Quick-Seal-Röhrchen (Polyallomer)	Beckman
Parafilm "M"	American National Can
Pasteur-Pipetten	Brand
PCR-Cups 200 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen 200 & 1000µl "Standartips / epTips"	Eppendorf
Reaktionsgefäße 1,5 + 2 ml (Cups)	Eppendorf
Sample plates (96-Well) 1450-401 (Luminometer)	Wallac
Sofortbilder 667 Filmpack	Polaroid
Spritzen	B. Braun
Sterilfilter für Spritzen "Millex"	Millipore
Whatman Chromatographie-Papier	Whatman
Zellkulturflaschen (80 + 185 cm²), Nunclon Δ	Nunc
Zellkulturschalen (6cm + 10cm), Nunclon Δ	Nunc
Zentrifugenröhrchen ("Falcons", 15 + 50 ml)	Greiner

2.1.12 Viren

Hepatitis A-Virus (HAV): HAV/7 (*26*) als Variante des Stammes HM175, $TCID_{50}$ = $5{,}62*10^6$/ml bzw. $9{,}55*10^5$/ml, passagiert in FRhK-4-Zellen.

Newcastle Disease-Virus (NDV): NDV-Stamm R 05/93, $TCID_{50}$ = $4{,}37*10^6$ oder $3{,}72*10^6$ (GFP-Experimente) bzw. $1*10^7$/ml (Reportergenexperimente), erhalten von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Insel Riems; passagiert in FRhK-4-Zellen.

2.1.13 Zellen

FRhK-4: fetale Rhesusaffen-Nierenzellen (CBER/FDA, Department of Virology, Bethesda Maryland, USA). Epithelartige, nicht transformierte Zellen, Passagen 32-73.

2.2 Methoden

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese für DNA

Um DNA-Moleküle aufzutrennen, wurden unter Zusetzung von 0,4 µg/ml Ethidiumbromid 1%ige horizontale Agarosegele in TAE-Puffer verwendet und für 1 h eine konstante Spannung von 1 bis 5 V/cm Elektrodenabstand angelegt. Die Zugabe eines Probenpuffers erhöhte die Dichte der Proben. Das maximale Verdünnungsverhältnis zur DNA-Lösung betrug hierbei 1:6, wobei als Längenstandard 4 bis 10 µl eines DNA-Größenmarkers (1 kb DNA-Leiter) mit einer Konzentration von 120 ng DNA/µl fungierte. Mithilfe eines UV-Transilluminators wurden die Gele bei 256 nm ausgewertet und über Sofortbilder dokumentiert.

2.2.2 CAT-ELISA

Der CAT-ELISA wurde nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt und mithilfe eines ELISA-Readers durch Messung der Absorbanz bei 405 nm (Referenzwellenlänge: 490 nm) photometrisch ausgewertet.

2.2.3 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um eine Religation zu verhindern, wurden die linearisierten Plasmide zur Expressions-vektorherstellung mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Das Prozedere verlief wie folgt: Zunächst wurden 5 µg DNA in 225 µl destilliertem Wasser verdünnt sowie 25 µl 10x Dephosphorylierungspuffer und 1 U alkalische Phosphatase zugesetzt. Nach 30-minütiger Inkubationsphase bei 56 °C im Thermocycler wurde erneut 1 U alkalische Phosphatase zugesetzt und für weitere 30 min bei 56 °C im selben inkubiert. Hiernach erfolgte die chemische Inaktivierung der alkalischen Phosphatase durch Zusetzung von 30 µl 100 mM EGTA pH 8.0 und 20 µl H_2O sowie eine Hitzeinaktiverung durch Behandlung der Lösung für 30 min bei 65 °C. Im Anschluss wurde die DNA-Lösung per Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt.

2.2.4 Diskontinuierliche Polyacryamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970, verändert

Ein denaturierendes SDS-Polyacrylamid-Gel fand Einsatz bei der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach Masse. Die Proteine wurden dabei zunächst im 3 % Sammelgel an der Grenze zum 10 % Trenngel konzentriert und in letzterem dann der Masse nach aufgetrennt.

Vor dem Zusammensetzen der Gelkammer „Mighty Small“ wurden die Spacer, Kämme, Glas- und Keramikplatten in 3 Schritten mit 2-Propanol und Ethanol gereinigt. Das 10 % Trenngel (siehe Material) wurde für 10 min mittels Vakuumpumpe entgast. Nach dem Versetzen mit TEMED und Ammoniumpersulfat wurde zügig geschwenkt, nach mehrmaligem Aspirieren in die Gelkammer überführt und anschließend mit 0,1 % SDS überschichtet, da ein Kontakt mit Sauerstoff die Polymerisierung hemmen und zum Kettenabbruch führen würde. Die Polymerisierung erfolgte über Nacht bei RT. Am darauffolgenden Tag wurde das Trenngel mit einem analog hergestellten 3%igem Sammelgel überschichtet und die Kämme wurden eingesetzt, woran sich die Vorbereitung der einzusetzenden Proben in der einstündigen Polymersierungszeit anschloss. Diese beinhaltete die Versetzung von 20 µg Protein mit Proteinprobenpuffer (maximal 1:6) auf ein maximales Gesamtvolumen von 25 µl. Nach zweimaliger Behandlung mit Ultraschall für jeweils 1 min wurden die Proben bei 95 °C denaturiert, wobei der Proteinmarker (5 µl) lediglich mit Probenpuffer auf 25 µl aufgefüllt wurde. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurden die Gele in die Elektrophorese-Kammer überführt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Nun erfolgte das Entfernen der Kämme und die entstandenen Taschen wurden zunächst zur besseren Visualisierung per Spritze mit 0,1 % Bromphenolblau und danach mit Elektrophoresepuffer gespült. Proben und Proteinmarker wurden aufgetragen, schließlich wurde die Elektrophorese für etwa 2 h bei 80 V durchgeführt. Anschließend wurden das Gel der Elektrophorese-Kammer entnommen und für 30 min in Renaturierungspuffer auf dem Taumler bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden je Gel eine Nitrocellulosemembran und je vier Whatman-Papiere entsprechender Größe zugeschnitten. Diese wurden, ebenso wie das Gel, im Anschluss an die Denaturierung für 30 min in Blotting-Puffer auf dem Taumler bei RT inkubiert. Im Anschluss hieran konnte ein Immunoblot (Western-Blot) erfolgen.

2.2.5 Endpunkttitration eines Hepatitis A-Viruspools ($TCID_{50}$)

FRhK-4 Zellen wurden im Verhältnis 1:5 in 96-Well-Platten umgesetzt und bei 37 °C und 5 % CO_2 über Nacht inkubiert. Es folgte die Erstellung der Verdünnungsreihen: Je 1 *mock*- und Virus-Lysat wurden aufgetaut, dreimal 20 s mit Ultraschall behandelt und von 1:10 bis $1:10^{11}$ in Reaktionsgefäßen verdünnt, indem je 900 µl 1 % FCS/DMEM vorgelegt und, nach Zugabe von 100 µl Virus-Suspension in die 1:10 Verdünnung, jeweils 100 µl in die nächste überführt wurden. Von den 96-Well-Platten konnte nun das Medium entfernt werden. Nach einem Waschschritt mit steriler PBS wurde den Spalten 1-11 je 100 µl der entsprechenden Verdünnung zugesetzt. Als Kontrolle wurde das 12. Well jeder Reihe lediglich mit 100 µl 1 % FCS/DMEM beschickt. Nach Inkubation für 2 h bei 37 °C und 5 % CO_2 konnte das Inoculum abgenommen und einmal mit 1 % FCS/DMEM gewaschen werden. Anschließend inkubierten die Zellen mit 200 µl 1 %FCS/DMEM für 14 Tage bei 34 °C und 5 % CO_2. Die Auswertung erfolgte per Immunfluoreszenz, wozu die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 150 µl 90 % Aceton für 20 min bei -20 °C fixiert wurden. Um eine Denaturierung der Antikörper durch das Aceton zu vermeiden, wurden die Zellen vor der Inkubation mit dem primären Antikörper (Maus-anti-HAV IgG „7E7“; 1:800 in PBS) für 45 min bei 37 °C und 5 % CO_2 dreimal mit PBS gewaschen. Es schlossen sich 3 weitere Waschschritte mit PBS und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Ziege-anti-Maus, FITC-konjugiert; 1:80 in PBS) für ebenfalls 45 min bei 37 °C und 5 % CO_2 an. Abschließendes dreimaliges Waschen mit PBS entfernte unspezifisch gebundene Antikörper und ermöglichte die Auswertung am Immunfluoreszenzmikroskop. Die Bestimmung des Virustiters in $TCID_{50}$ erfolgte mithilfe der Kärbergleichung. Hierbei galt ein Well als positiv, so sich eine einzige Zelle als HAV-infiziert nachweisen ließ.

2.2.6 Endpunkttitration eines Newcastle Disease-Viruspools ($TCID_{50}$)

FRhK-4 Zellen wurden im Verhältnis 1:5 in 96-Well-Platten umgesetzt und bei 37 °C und 5 % CO_2 bis zur Konfluenz inkubiert (ca. 48 h). Es folgte die Erstellung der Verdünnungsreihen: Je 1 *mock*- und Virus-Lysat wurden aufgetaut, dreimal 20 s mit Ultraschall behandelt und von 1:10 bis $1:10^{11}$ in Reaktionsgefäßen verdünnt, indem je 900 µl 1 % FCS/DMEM vorgelegt und, nach Zugabe von 100 µl Virus-Suspension in die 1:10 Verdünnung, jeweils 100 µl in die nächste überführt wurden. Von den 96-Well-Platten konnte nun das Medium entfernt werden. Nach einem Waschschritt mit steriler PBS wurde den Spalten 1-11 je 100 µl der entsprechenden Verdünnung zugesetzt. Als Kontrolle wurde das 12. Well jeder Reihe lediglich mit 100 µl 1 %

FCS/DMEM beschickt. Nach Inkubation für 2 h bei 37 °C und 5 % CO_2 konnte das Inoculum abgenommen und einmal mit steriler PBS gewaschen werden. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl 1 %FCS/DMEM überschichtet und bis zur vollständigen Zerstörung des Zellrasens durch virusspezifischen CPE in den höheren Verdünnungen inkubiert (ca. 6-10 Tage). Die Bestimmung des Virustiters erfolgte durch lichtmikroskopische Auswertung des CPE und anschließender Berechnung der $TCID_{50}$ mithilfe der Kärbergleichung.

2.2.7 Freeze & Thaw-Lyse zur Proteinextraktion

Zur Extraktion der Proteine wurden die Zellkulturüberstände entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 1 ml TEN-Lösung je 6 cm-Zellkulturschale hinzugegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit auf Eis konnten die Zellen abgespült und in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Um jegliche Zellen abzulösen, wurde ein weiteres Mal mit 100 µl TEN-Lösung nachgespült. Nach der Zentrifugation der Reaktionsgefäße für 1 min bei 14000 rpm und 4 °C wurde das Pellet in 100 µl 0,25 M Tris•HCL pH 7,5 aufgenommen, die Proben in einem Trockeneis/Ethanol Gemisch (ca. -80 °C) für 5 min eingefroren und in einem Inkubationsschüttler bei 37 °C 5 min lang aufgetaut. Insgesamt wurden die Proben dreimal eingefroren und aufgetaut, was ein Aufknacken der Zellen und ein Freisetzen der intrazellulären Proteine zur Folge hatte. Der sich anschließende Zentrifugationsschritt für 5 min bei 14000 rpm und 4 °C entfernte die Zelltrümmer, somit konnte der proteinhaltige Überstand abgenommen und nach Überführung in neue Eppendorf-Gefäße bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert werden.

2.2.8 Herstellung eines polyklonalen α-HAV-2B Antikörperserums

Zum Nachweis von HAV-2B im Immunoblot wurde die Herstellung eines polyklonalen α-HAV-2B Serums bei der Freiburger Firma Genovac in Auftrag gegeben. Basis hierfür bildeten 2 synthetisch hergestellte Peptide, die aufgrund ihrer potentiellen Antigenität von einem Computergrogramm ausgewählt wurden. Peptid 1 umfasste dabei die Aminosäuren 55-68 von HAV-2B, Peptid 2 hingegen umspannte die Aminosäuren 98-111. Immunisiert wurden 2 Kaninchen mit einem Mix aus beiden Peptiden. Die Testung auf Antikörper erfolgte per ELISA gegen die Peptide. Nach 6 Wochen wurde erneut Blut entnommen und per ELISA getestet. Weitere 3 Wochen später wurden die Tiere mit einer abschließenden Bestimmung des Antkörpertiters per ELISA-Test ausgeblutet. Die beiden polyklonalen α-HAV-2B Seren wurden sowohl im Immunoblot als auch in der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzt.

2.2.9 Herstellung eines Viruspools (Hepatitis A-Virus)

Zur Infektion mit HAV wurden FRhK-4 Zellen in eine 185cm^2-Zellkulturflasche umgesetzt, sodass nach einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen die geeignete Zelldichte von 80 % konfluent gewachsener Zellen erreicht war. Hierzu wurde ein Inoculum aus 1 ml Virus-Lysat und 4 ml 1 % FCS/DMEM verwendet und für 2 h bei 34 °C und 5 % CO_2 auf den Zellen unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Es folgten die Abnahme des Inoculums, das dreimalige Waschen des Zellrasens mit PBS und die Zugabe von 25 ml des Erhaltungsmediums (1 % FCS/DMEM). Nach 7 Tagen Kultivierung bei 34 °C und 5 % CO_2 wurden 10 ml Erhaltungsmedium hinzugefügt, um nach weiteren 7 Tage bei gleichen Bedingungen die Zellen durch dreimaliges Einfrieren (-80 °C) und Auftauen (RT) zu lysieren. Die Lysate konnten anschließend in Falcon-Röhrchen überführt und dreimal für 20 s mit Ultraschall behandelt werden. Überflüssige Zellbestandteile wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 3000 rpm (Tischzentrifuge GS-6R) pelletiert, sodass der der Überstand in 1 ml Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert werden konnte. Die Bestimmung des Virustiters in $TCID_{50}$ erfolgte durch Endpunkttitration.

2.2.10 Herstellung eines Viruspools (Newcastle Disease-Virus)

FRhK-4 Zellen wurden im Verhältnis 1:5 in eine 185 cm^2-Zellkulturflasche gesplittet, um nach dem Erreichen der Konfluenz (ca 2-3 Tage) zunächst mit steriler PBS gewaschen und mit NDV inoculiert zu werden. Hierbei kamen 0,5 ml NDV-Suspension in 19,5 ml 1 %FCS/DMEM zum Einsatz. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 so lange inkubiert, bis etwa die Hälfte der Zellkultur durch virusinduzierte Apoptose zerstört war (etwa 5-7 Tage). Der virushaltige Überstand konnte dann in Falcon-Röhrchen überführt und Zelltrümmer durch 7-minütige Zentrifugation bei 1500 rpm in einer GS-6R Tischzentrifuge entfernt werden. Der virushaltige Überstand wurde zu 1 ml in Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Bestimmung des Virustiters in $TCID_{50}$ durch Endpunkttitration bei -80 °C gelagert.

2.2.11 Herstellung von Expressionsvektoren auf Basis des Vektors pcDNA3.1/*myc*-His und pI.18

Zwecks Expression definierter viraler Proteine in eukaryotischen Zellen wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1/$_{myc\text{-His}}$ (Invitrogen) eingesetzt. Die Einklonierung der einzelnen

Proteinabschnitte in den Vektor erfolgte unter Verwendung der Enzyme Kpn I und EcoR V, die Bestandteil der *multiple cloning site* (MCS) sind. Die einzufügenden viralen Sequenzen wurden per PCR hergestellt (siehe Abschnitt 2.2.19) und trugen flankierend dieselben Schnittstellen. 10 µg des Vektors wurden mit je 10 U der Enzyme für 2 h bei 37 °C im Thermomixer 5436 inkubiert.
Der Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µl Kpn I [10 U/µl]
1 µl EcoR V [10 U/µl]
5 µl BSA [1mg/ml]
5 µl Restriktionspuffer B (SureCut; Roche)
ad 50 µl Aqua. Dest.

Im Anschluss konnten die Restriktionsschnitte in einem 0,6%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden, um die Vollständigkeit der Linearisierung zu überprüfen (1,5 bis 2 h bei 60-80 V). Die Verwendung von LMP-Agarose (*low melting point*) ermöglichte eine Trennung der DNA von den übrigen Bestandteilen des Schnittansatzes wie BSA, Restriktionspuffer oder den Enzymen. Nach Beendigung des Gellaufs wurde unter UV-Licht die Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten, die das linearisierte Plasmid enthielt und aus der im Anschluss die DNA mittels Phenol-Ether-Extraktion (siehe Abschnitt 2.2.21) aus dem LMP-Gel extrahiert wurde. Es folgte die Dephosphorylierung des linearisierten Plasmids (siehe Abschnitt 2.2.3).

Der Vektor pI.18 (erhalten von J. Robertson, NIBSC, UK) wurde in identischer Weise behandelt, da die MCS ebenfalls die Schnittstellen für Kpn I und EcoR V enthielt.

2.2.12 Immunoblot

Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden diese per Elektroblot auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Dieses Vorgehen ermöglichte eine Behandlung mit Antikörpern, die wiederum eine spezifische Detektion über eine enzymatisch vermittelte Lichtreaktion zuließen. Durch Filmbelichtung konnten so die gesuchten Proteine identifiziert werden. Hierzu wurde das im Vorfeld mit Blotting-Puffer behandelte Gel auf die Nitrocellulosemembran gelegt und von je 2 Whatman-Papieren eingeschlossen. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte in der mit Blotting-Puffer gefüllten Blotting-Kammer durch Anlegen einer Stromstärke von 1,6-1,8 A für 2 h bei 4 °C. Nach diesem Transfer wurden

unspezifische Bindestellen mit TBST/Trockenmagermilch für 4 h bei RT auf dem Taumler blockiert. Der primäre Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen 1:1000 in TBST/Trockenmagermilch) inkubierte dann über Nacht bei 4 °C auf dem Taumler. Am nächsten Morgen wurden nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST für 5 min bei RT auf dem Taumler entfernt, um den sekundären Antikörper (Maus-anti-Ziege-HRP 1:400 in TBST/Trockenmagermilch) für 5 h bei RT auf dem Taumler inkubieren zu lassen. Während einer erneuten dreimaligen Waschung mit TBST wurde das ECL-Reagenz (enhanced chemiluminescence) vorbereitet, das als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase) diente. Nach 1-minütiger Einwirkzeit auf der Membran wurde ein Kodak Biomax-Film in der Dunkelkammer aufgelegt und für 20-120 s belichtet. Anschließend konnte der Film in der Entwicklermaschine entwickelt und fixiert werden, um die Größe und relative Menge der Proteine anhand der Schwärzungen zu ermitteln.

2.2.13 Indirekte Immunfluoreszenz zur HAV-VP1 und HAV-2B-Detektion

HAV-VP1 und HAV-2B-Antigen in infizierten/transfizierten Zellen wurde unter Verwendung einer indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen, für die folgende Antikörper eingesetzt wurden: α-HAV-VP1, α-HAV-2B und α-rabbit-FITC

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden FRhK-4-Zellen in C*hamber slides* umgesetzt und am nächsten Tag mit 0,8 µg Leer- (pI.18) bzw. Expressionsvektor (pI.18-2B) sowie 0,2 µg pHcRed-Tandem-N1 transfiziert. 48 h nach der Transfektion und dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd in PBS für 10 min bei RT, um die Zellen anschließend für 15 min mit 0,2 % Triton X-100 in PBS ebenfalls bei RT zu permeabilisieren. Auf dreimaliges Waschen mit PBS folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 10 % FCS in PBS für 1 h bei 37 °C. Bevor mit primärem Antikörper (α-HAV 2B, 1:100 verdünnt in 1 % FCS in PBS) für 1 h bei 37 °C inkubiert werden konnte, galt es, die Zellen erneut dreimal mit PBS zu waschen. Die Inkubation des sekundären Antikörpers (GAR-FITC, 1:75 verdünnt in 1 % FCS in PBS) dauerte ebenfalls 1 h bei 37 °C. Vor der Auswertung am Epifluoreszenzmikroskop (400-fache Vergrößerung) unter Verwendung entsprechender Anregungswellenlängen wurden die Zellen abschließend dreimal mit PBS gewaschen, getrocknet und anschließend mit Eindeckmedium (Glycerol/PBS) überschichtet. Zur Auswertung wurde zudem ein Deckglas aufgelegt.

2.2.14 Indirekte Immunfluoreszenz zur HAV-Detektion

HAV-Antigene in infizierten Zellen wurden unter Verwendung einer indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen, für die folgende Antikörper eingesetzt wurden: Klon 7E7 der Klasse IgG2A von der Maus, ein HAV-spezifischer, neutralisierender, monoklonaler Antikörper, diente hierbei als primärer Antikörper, sekundärer Antikörper war ein FITC-markierter Antikörper von der Ziege gegen IgG (H- und L- Ketten) der Maus. Beide Antikörper wurden mit einer Konzentration von 6,3 µg/ml in PBS für diese Immunfluoreszenz eingesetzt. Um den Farbkontrast zur grünen Fluoreszenz zu erhöhen, enthielt die sekundäre Antikörperlösung im Weiteren 0,25 % Evans Blue, welches den zellulären Hintergrund bei der Fluoreszenzmikroskopie rot färbte. In Mikrotiterplatten oder auf Objektträgern mit Flexiperm-Aufsatz wurden Kulturen von den zu untersuchenden Zellen angelegt. Nachdem das Medium entfernt und die Zellen mit einer 90%igen Aceton-Lösung bei –20 °C für 20 min fixiert wurden, entfernte dreimaliges Waschen mit PBS überschüssiges Aceton. Im Anschluss konnten die noch feuchten Zellen mit dem ersten Antikörper überschichtet und bei 37 °C für 1 h inkubiert werden. Die Entfernung ungebundener Antikörper erfolgte durch dreimaliges Waschen mit PBS, um im Anschluss die wiederum noch feuchten Zellen mit dem sekundären Antikörper zu überschichten. Die Inkubation dauerte erneut 1 h bei 37 °C. Vor Auswertung der Präparate mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden zum einen nichtgebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt und zum anderen die Zellen mit PBS oder einem Deckglas vor dem Austrocknen geschützt.

2.2.15 Infektion mit Hepatitis A-Virus (HAV)

Zur Infektion mit HAV wurden mykoplasmenfreie Zellkulturen in definierter Menge (z.B. 4 x 10^5 Zellen/6 cm-Zellkulturschale) umgesetzt, sodass nach einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen die geeignete Zelldichte von 80 % konfluent gewachsener Zellen erreicht war. Für die Infektion war es erforderlich, die Viren für die benötigte MOI in einem möglichst kleinen Volumen des Inokulums zu verwenden (z.B. 500 µl für eine 6 cm-Schale) und für 2 h bei 34 °C und 5 % CO_2 auf den Zellen unter gelegentlichem Schwenken zu inkubieren. Vor der Kultivierung der HAV-infizierten Zellen bei 34 °C und 5 % CO_2 erfolgten die Abnahme des Inokulums, das dreimalige Waschen des Zellrasens mit PBS und die Zugabe des Erhaltungsmediums.

2.2.16 Infektion mit Newcastle Disease-Virus (NDV) zur IFN-β-Induktion

Zur Reportergeninduktion mit NDV wurden zunächst 6cm-Schalen mit FRhK-4 Zellen 24 h nach der Transfektion einmal mit steriler PBS gewaschen und anschließend mit 10^5 infektiösen Einheiten ($TCID_{50}$) in 2,5 ml 1 %FCS/DMEM inoculiert, was einer MOI von 0,1 entsprach. Bis zur Proteinextraktion 18 h später inkubierten die Zellen bei 37 °C und 5 % CO_2.

2.2.17 Ligation von Expressionsplasmiden

Die Ligation diente der Verbindung der per PCR amplifizierten HAV-Proteine mit den linearisierten und dephosphorylierten Expressionsvektoren. Obwohl ein Verhältnis „Insert zu Vektor“ von 1:1 (äquimolar) in der Theorie postuliert wird, ließen sich die besten Ergebnisse mit 5:1 erzielen. So sich das Insert nicht in wässriger Lösung, sondern in einem LMP-Gelstück befand, musste dieses bei 68 °C geschmolzen werden und zudem der Ligationsansatz auf 37 °C vorgewärmt werden. In diesem Fall beinhaltete der Ligationsansatz kein Enzym, da dieses erst nach Vermischung mit dem Insert zugegeben wurde. Die Ligation des linearisierten Leervektors (0,5 pmol) mit dem per PCR amplifizierten Insert (je nach Verhältnis 1 – 2,5 pmol) wurde durch Zusetzen von 5 µl 10x Ligase-Puffer, 2,5 µg BSA und 1 U T4 DNA-Ligase in insgesamt 50 µl Reaktionsvolumen vorbereitet. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C und 60 min Inkubation bei RT fand die Ligationsreaktion bei 14 °C im Kühlblock über Nacht statt. Am nächsten Tag wurde erneut 1 U Ligase zugesetzt und noch einmal 2 h bei 14 °C inkubiert. Schließlich konnten die Ansätze in kompetente Bakterien transformiert werden.

2.2.18 Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay (Promega) ermöglichte die Messung der Luciferase-Reportergenaktivität in Proteinextrakten. Hierbei konnten im Luminometer nach Zugabe von Leuchtkäfer-Luciferin als Substrat Lichtquanten gemessen werden. 20 µg Proteinextrakt wurden mit 1x Lysereagenz (*CCLR*, Promega) auf 20 µl aufgefüllt, was einer Konzentration von 1 µg/µl entsprach. Die Proben wurden in *96-Well Sample Plates* mit Rundboden überführt und mit 100 µl Luciferase-Substrat (*luciferase assay reagent*, Promega) versetzt. Die Messung erfolgte nach in Zeiträumen von je 10 s im Wallac Luminometer.

2.2.19 Mycoplasmentest per PCR (VenorGeM)

Der Mykoplasmen-Test wurde nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Bei dem Nachweisverfahren handelte es sich um einen ELISA zum Nachweis der Mykoplasmen *M. arginini*, *M. hyorhinis*, *M. laidlawii* und *M. orale*. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Absorbanz bei 405 nm im ELISA-Reader.

2.2.20 PCR zur Amplifikation der zu inserierenden viralen DNA der verschiedenen HAV-Proteine

Um Bestandteile des HAV-Genoms, das für ein einzelnes Polyprotein codiert, zu erhalten, wurde die Sequenz der jeweiligen Proteine durch PCR amplifiziert. Als Template diente hierbei der Vektor pHAV/7, der die komplette cDNA-Sequenz des Hepatitis A-Virus enthält. Über den *sense* Primer wurde am N-Terminus die Kozak-Sequenz (ACCACC) und eine Kpn I Schnittstelle angefügt, während der *antisense* Primer ein Stop-Codon und eine EcoR V Schnittstelle beinhaltete. Die Kozak-Sequenz sollte hierbei die Initiation der Translation verbessern, wohingegen die Schnittstellen der Insertion in verschiedene Expressionsvektoren dienten. Da ein Polyprotein in seiner Sequenz zwischen den einzelnen Proteinen kein Stop-Codon beinhaltet, wurde zur Terminierung der Translation im Expressionsvektor über den *antisense* Primer C-terminal ein STOP-Codon eingefügt.

Jeder Ansatz beinhaltete folgende Reagenzien in den angegebenen Mengen:

- 3 µl pHAV/7 [27ng/µl]
- 5 µl 10x PCR-Puffer
- 8 µl Desoxynukleosidtriphosphat-Mix [je 1,25 mM]
- 1 µl sense-Primer [20 pmol/µl]
- 1 µl antisense Primer [20 pmol/µl]
- 1 µl Taq DNA-Polymerase [1 U/µl]
- ad 50 µl Aqua dest.

Nach kurzem *down spin* der Ansätze um Flüssigkeitsreste von der Gefäßwand zu entfernen, wurden die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt und die PCR mit folgenden Parametern gestartet: - 2 min 94 °C

- 1 min 94 °C
- 2 min 60 °C } 30 Zyklen
- 3 min 72 °C
- 10 min 72 °C

Ziel der sich anschließenden Klenow-Auffüllreaktion war es, eventuell unvollständig synthetisierte N-terminale Überhänge zum Doppelstrang aufzufüllen. Hierzu wurden zu jedem Ansatz 4 µl 0,1 M $MgCl_2$ und 4 µl Klenow-Fragment [0,5 U/µl] pipettiert sowie der Ansatz eine ½ h bei RT inkubiert. Das PCR-Produkt konnte zum einen durch elektrophoretische Auftrennung im LMP-Gel auf die richtige Größe hin überprüft und zum anderen per Phenol-Ether-Extraktion aufgereinigt werden.

2.2.21 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA aus wässriger Lösung

Um DNA aus wässriger Lösung von unerwünschten Bestandteilen wie Restriktionspuffern oder Enzymen zu trennen, wurde eine Phenol-Chlorofrom-Extraktion durchgeführt.
In einem Reaktionsgefäß wurde einer DNA-Lösung 1 Volumenteil (VT) Phenol zugesetzt, die Probe 2 min geschüttelt und anschließend 2 min bei 14000 rpm (Tischzentrifuge 5415 C) zentrifugiert, um die obere wässrige Phase anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführen zu können. Nach Zugabe von 1 VT Phenol/Chloroform (1:1) wurde abermals 2 min geschüttelt und danach bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Prozedur wiederholte sich, nachdem die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß mit 1 VT Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) überführt wurde. Die entstandene obere wässrige Phase wurde abgenommenen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und schließlich zur Fällung der DNA 2,5 VT 100 % Ethanol (-20 °C) und 1/10 VT 3M Natrium-Acetat zugesetzt. Die Fällung der DNA erfolgte für 60 min bei -80 °C, um sie anschließend durch Zentrifugation für 20 min bei 14000 rpm (Tischzentrifuge 5415 C) zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und es schlossen sich 2 Waschschritte mit 1 ml 70 % Ethanol (-20 °C; s.o.) an. Abschließend konnten die DNA-Pellets in der SpeedVac getrocknet und in Aqua dest. aufgenommen werden.

2.2.22 Phenol-Ether-Extraktion von DNA aus LMP-Agarose-Gel

Im Gegensatz zur Extraktion von DNA aus wässriger Lösung per Phenol-Chloroform-Extraktion musste DNA aus einem LMP-Gel mittels Phenol-Ether-Extraktion extrahiert werden.

Vorbereitend waren zunächst die LMP-Gelstücke auf 56 °C zu erwärmen, was eine Verflüssigung der LMP-Agarose bewirkte, die zur Extraktion der DNA notwendig war. Aqua dest. und Phenol wurden auf 56 °C erwärmt, da ein Zusetzen dieser Flüssigkeiten zum erwärmten LMP-Gel ein Abkühlen und somit Erhärten der Agarose nach sich zöge, wodurch die gewünschte Extraktion verhindert würde. Nach Bestimmung des Volumens der flüssigen LMP-Agarose wurde zunächst mit Aqua dest. auf 500 µl aufgefüllt und dieser Lösung in einem Reaktionsgefäß 1Volumenteil (VT) Phenol zugesetzt. Im Anschluss wurde die Probe 2 min gevortext und 2 min bei 14000 rpm (Tischzentrifuge 5415 C) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase war anschließend in ein neues Reaktionsgefäß zu überführen, wobei darauf zu achten war, die gelhaltige Interphase nicht mitzuführen. Nach Zugabe von 1 VT Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde 2 min geschüttelt und danach bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach Überführung der oberen wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wiederholte sich die Prozedur noch einmal mit 1 VT Phenol. Um das Phenol nun aus der Lösung zu entfernen, wurde der abgenommenen und in ein neues Reaktionsgefäß überführten oberen Phase 2,5 VT wassergesättigter Ether zugefügt. Nach 2-minütigem Schütteln und anschließender 2-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm konnte die obere etherhaltige Phase abgenommen und verworfen werden. Die untere wässrige und die DNA beinhaltende Phase wurde noch zweimal mit wassergesättigtem Ether gewaschen (s.o.). Für die 60-minütige Fällung bei -80 °C wurden der wässrigen Phase 2,5 VT 100 % Ethanol (-20 °C) und 1/10 VT 3M Natrium-Acetat (pH 4,8) zugesetzt. Die Pelletierung der gefällten DNA erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 14000 rpm (Tischzentrifuge 5415 C). Der Überstand wurde verworfen und es schlossen sich 2 Waschschritte mit 1 ml 70 % Ethanol (-20 °C) an (s.o.). Nach Trocknung der Pellets in der SpeedVac konnte die DNA in Aqua dest. aufgenommen werden.

2.2.23 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm ließ sich die Konzentration von Nukleinsäuren bestimmen, wobei eine OD_{260} 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entsprach. Die Reinheit der Präparation wurde aus dem Verhältnis der Absorbanz von 260 nm und 280 nm ermittelt. Bei einer reinen Nukleinsäurelösung betrug der Quotient A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2,0.

2.2.24 Plasmidpräparation (Maxiprep) *nach Sambrook et al., 1989, verändert*

Hierbei wurde zunächst 500 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angesetzt, mit 1 ml einer frischen Bakterienübernachtkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C unter stetigem Schütteln inkubiert. In einem F-16/250-Rotor (Sorvall) wurden die Bakteriensuspensionen zentrifugiert, und zwar bei 4 °C für eine Dauer von 20 min und bei 4000 rpm. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 20 ml TES-Puffer resuspendiert und die Bakteriensuspension erneut zentrifugiert, nun jedoch bei 5000 rpm und für 10 min. In 25 ml frisch angesetztem STET-Puffer aufgenommen, wurde das Pellet schließlich in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben überführt. Um die Zellen zu lysieren, wurde 1 ml Lysozym-Lösung hinzugegeben und die Suspension für 40 s über dem Bunsenbrenner aufgekocht. Im Anschluss an die Zentrifugation dieser zähflüssigen Masse in einem F-28/50-Rotor (Sorvall) bei 16000 rpm und für 45 min, wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und für 10 min einer Temperatur von –80 °C ausgesetzt, wobei die Präzipitation der DNA erfolgte. Hiernach galt es, die DNA durch Zentrifugation für 60 min und bei 12000 rpm im F28/50-Rotor zu pelletieren, sie 10 min im Vakuum zu trocknen und in 8,7 ml Sarkosyl-Lösung zu resuspendieren. Nachdem sowohl 9,4 g Cäsiumchlorid als auch 900 µl Ethidiumbromid-Lösung zugegeben wurden, erfolgte für 24 h bei 20 °C eine isopyknische Zentrifugation im Typ FW 65-Rotor (Beckman) bei 50000 rpm. Mit einer Spritze (Kanüle 1,2 x 50 mm) wurde die Plasmidbande unter UV-Licht abgezogen, mit einer Cäsiumchlorid-Lösung (Refraktionsindex 1,3865) auf 12 ml aufgefüllt und für 24 h bei 20 °C und 50000 rpm im Typ FW65-Rotor zentrifugiert. Dem wiederholten Abziehen der Plasmidbande folgte die Befreiung der Lösung vom Ethidiumbromid, indem diese mit NaCl-gesättigtem Isopropanol aussgeschüttelt wurde. Die über Nacht dauernden abschließenden Dialyse, bei der das Cäsiumchlorid gegen mehrmals erneuerten 5 mM Tris-Puffer (pH 8,0) entfernt wurde, ermöglichte die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration sowie die der Reinheit der Präparation. Die Überprüfung der Plasmididentität fand durch eine Restriktionsenzymspaltung von 500 ng der DNA statt.

2.2.25 Poly(IC)-Transfektion mittels DEAE-Dextran

Die DEAE-Dextran-Transfektion wurde angewandt, um poly(IC) in FRhK-4 Zellen zu transfizieren und somit die Reportergenexpression zu induzieren. Es kamen Konzentrationen von 2 mg/ml Poly I:C und 10 mg/ml DEAE-Dextran zur Verwendung, und die Induktion wurde in

einem Volumen von 2 ml je 6 cm-Zellkulturschale für 2 h bei 37 °C durchgeführt Nachfolgend aufgeführte Lösungen bildeten einen Ansatz:

1960 µl DMEM (ohne FCS, Penicillin/Streptomycin und Fungizone)

20 µl DEAE-Dextran

20 µl Poly(I)•Poly(C)

Mock-Ansätze (Negativkontrolle) wurden lediglich mit 2 ml DMEM (ohne FCS, Penicillin/Streptomycin und Fungizone) behandelt und DEAE-mock-Ansätze (zwecks Kontrolle, ob DEAE-Dextran allein eine Induktion vermittelt) enthielten statt des poly(IC) 20 µl PBS.

Nach der 2-stündigen Inkubationszeit wurde mit HBSS gewaschen und die Zellen wurden mit 2 ml Erhaltungsmedium bis zur Probenentnahme inkubiert.

2.2.26 Proteinbestimmung nach Bradford

Um gleiche Proteinmengen für den CAT-ELISA einzusetzen, wurde der Proteingehalt mithilfe von Bradford Reagenz und einer Eichkurve bestimmt.
Hierzu wurde 5x Bradford Reagenz 1:5 verdünnt und filtriert. 5 µl der zu untersuchenden Proben wurden dann mit 1 ml 1x Bradford Reagenz gemischt und die Absorbanz nach 20 min photometrisch bei 595 nm bestimmt. Anhand einer Eichkurve war der Proteingehalt zu errechnen.

2.2.27 Restriktionsspaltungsanalyse von Plasmid-DNA

Die Plasmide wurden zur Überprüfung ihrer Identität mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen an definierten Stellen geschnitten, um schließlich die erhaltenen Fragmente gelelektrophoretisch auftrennen zu können. Hierbei unterschieden sich die Schnittansätze von Mini- und Maxiprep, da die Aussage der Miniprep rein qualitativ war und die Agarose-Gelelektrophorese nach der Maxiprep durch den Einsatz einer definierten DNA-Menge zudem quantitativen Charakter besaß.

Nach Miniprep bestand ein Ansatz aus:

20 µl isolierte DNA-Lösung

3 µl 10x Reaktionspuffer

3 U von jedem Restriktionsenzym

2 µl RNase A [10mg/ml]

ad 30 µl mit Aqua dest.

Dieser wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert und über Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet.

Nach Maxiprep bestand ein Ansatz aus:

500 g Plasmid-DNA

3 µl 10x Reaktionspuffer

3 U von jedem Restriktionsenzym

ad 30 µl mit Aqua dest.

Dieser wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und über Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet.

2.2.28 Schnellpräparation bakterieller Plasmid-DNA (Miniprep)

Ziel der Methode war es, rekombinante Bakterienklone über Restriktionsenzymspaltung ihrer Plasmid-DNA und anschließender Agarose-Gelelektrophorese zu identifizieren.

Hierzu wurden Bakterienkolonien, die bei der Transformation entstanden waren, abgenommen und in je 3 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) überführt und dann bei 37 °C über Nacht inkubiert. Dieser Übernachtkultur wurde 1 ml entnommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 30 s bei 9000 rpm in einer Beckmann Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach der Abnahme des LB-Mediums wurde jedes Pellet in 100 µl Lösung 1 resuspendiert (vortexen) und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Dem erneuten Vortexen folgte, nach Zugabe von 100 µl Lösung 2, eine 5-minütige Inkubation bei 60 °C im Thermoblock. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde Lösung 3 zugesetzt, gevortext und schließlich zentrifugierten die Proben für 10 min bei 14000 rpm, nachdem sie zuvor für 15-30 min auf Eis gestellt worden waren. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA mit 1 ml Ethanol abs. bei -80 °C für 15 min präzipitiert. Abschließend erfolgte ein letzter

Zentrifugationsschritt für 10 min bei 14000 rpm. Das Pellet wurde nach zweimaligem Waschen mit 70%igem Ethanol und Trocknung in der Speed Vac in 50 µl Aqua dest. aufgenommen.

2.2.29 Transfektion mittels Calciumphosphat-Methode

Zunächst wurden die DNA-Lösungen (je 5 µg DNA) mit TE-Puffer auf 219 µl aufgefüllt. Danach erfolgte unter ständigem Schütteln die Präzipitation der DNA durch Auftropfen von 31 µl $CaCl_2$. Diese Lösung wurde wiederum auf 250 µl 2x HBS aufgetropft, stetig geschwenkt und für 15 bis 30 min auf Eis inkubiert. 500 µl dieses Transfektionsgemischs konnten im Anschluss auf 2 ml Erhaltungsmedium in 6 cm-Zellkulturschalen mit FRhK-4 Zellen (70-80 % Konfluenz) aufgetropft werden. Die Zellen inkubierten danach für 3 h bei 37 °C und 5 % CO_2. Abschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Glycerolschocklösung, die 90 s lang bei RT auf den Zellen blieb und danach zweimal mit Medium abgewaschen wurde. Nach dem Glycerolschock erhielten die Ansätze die übliche Menge (ca. 4 ml) Erhaltungsmedium und konnten bei Inkubations-bedingungen kultiviert werden.

2.2.30 Transfektion mittels *jetPEI transfection reagent*

In einem Großteil der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde jetPEI (Qbiogene) als Transfektionsreagenz eingesetzt, um Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen einzuschleusen. Die Zellen für die Transfektion wurden einen Tag vorher in einem solchen Verhältnis gesplittet (1:8 – 1:10), dass eine Konfluenz von 60-80 % bei Transfektion vorlag. Einzuschleusende DNA-Menge [µg] und jetPEI [µl] standen unter den gewählten Reaktionsbedingungen jeweils im Verhältnis 1:2. FRhK-4 Zellen in 6 cm-Schalen wurden daher mit 5 µg Plasmid-DNA und 10 µl jetPEI transfiziert, während bei 6-well Platten aufgrund der etwa halbierten Fläche 2,5 µg Plasmid-DNA mit 5 µl jetPEI eingesetzt wurden. Die Durchführung erfolgte gemäß der Angaben des Herstellers, zusätzlich wurde 24 h nach der Transfektion ein Mediumwechsel der Ansätze mit Erhaltungsmedium durchgeführt.

2.2.31 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Es wurden kompetente Bakterien (*Hb*101) aufgetaut und 10 min auf Eis gehalten. Für 30 µl Bakteriensuspension wurde 1 µl einer DNA-Lösung zugesetzt (1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt)

und dann 20 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 2 min. Nach diesem wurde der Ansatz wieder für 2 min auf Eis gestellt, bevor ihm 320 µl LB^{++} Medium zugesetzt wurden. Nach 1 h Inkubationszeit bei 37 °C auf einem Inkubationsschüttler konnten die Bakterien auf LB-Agarplatten (mit 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht bebrütet werden.

2.2.32 Zellkultur FRhK-4

Um FRhK-4 Zellen bei 37 °C und 5 % CO_2 zu kultivieren, wurden dem DMEM 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin beigesetzt. Als Wachstumsmedium wurde DMEM mit einem 10%igen FCS-Anteil verwendet. Für die Kultivierung konfluent gewachsener Kulturen reichte eine 1%ige FCS-Konzentration als Mediumzusatz aus, wobei zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel erfolgte. Eine Passagierung der Zellen war mit einem maximalen Verhältnis von 1:10 (FRhK-4) möglich, wobei Trypsin mit 0,2 g/l Natrium-EDTA zum Ablösen der Zellen verwendet wurde.

2.2.33 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl einer Zellsuspension wurde mithilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Entsprechend wurde die Suspension mit dem gleichen Volumen einer 0,2%igen Trypanblau-Lösung gemischt, so dass die Konzentration der Zellsuspension durch Multiplikation mit Kammer- und Verdünnungsfaktor bestimmt werden konnte. Hierbei konnten vitale und nekrotische Zellen unterschieden werden, da sich letztere durch Trypanblau anfärben.

3. Ergebnisse

3.1 Suppression der IFN-β-Enhancer-abhängigen Reportergenexpression durch HAV: Eingrenzung des Effekts auf genomische Teilbereiche

Im ersten Abschnitt des Ergebnisteils geht es um die genauere Untersuchung der von HAV bekannten Suppression der IFN-ß-Enhancer-abhängigen Reportergenexpression. Hierzu wurden verschiedene virale Proteine in Expressionsplasmide einkloniert, um den Suppressionseffekt auf kleinere genomische Teilbereiche einzugrenzen. Zudem stellte sich die Frage, ob für den supprimierenden Effekt eine Replikation von HAV notwendig ist. Um dieses zu überprüfen, wurde der Vektor pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ konstruiert, der die cDNA von HAV/7 exprimiert, der allerdings die ersten 351 Nukleotide deletiert wurden, was in etwa der Hälfte der 5'-terminal gelegenen IRES-Struktur entspricht. Diese ist für die Replikation des Virus zwingend notwendig, da zum einen über diese die Bindung an die Ribosomen zur Translationsinitiation erfolgt und zum anderen das VPg kovalent an den N-Terminus gebunden ist, das als Primer für die Replikation des Genoms fungiert. Durchgeführt wurden sämtliche Experimente als transiente Transfektion mittels des Transfektionsreagenzes jetPEI. In einer früheren Arbeit unseres Institutes konnte bereits gezeigt werden, dass zum einen die gewählte Menge des jetPEI nicht toxisch für die verwendeten FRhK-4 Zellen ist und es sich zum anderen um eine strikte Cotransfektion der zu transfizierenden Plasmide handelt. Weitere Versuche zeigten, dass das optimale Verhältnis von Transfektionreagenz zu dem zu transfizierenden Plasmid 1 µg Plasmid zu 2 µl jetPEI für eine 6cm-Schale mit FRhK-4 Zellen (ca. 80% Konfluenz) beträgt.

3.1.1 Effekt einer Transfektion der replikationsinkompetenten cDNA-Variante pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ des HAV auf die Induktion des IFN-β-Enhancers: Replikationsunabhängige Suppression durch pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$

Um die Notwendigkeit einer Replikation für das Auftreten der supprimierenden Eigenschaft des Hepatitis A-Virus auf die Interferon-β-Expression in FRhK-4-Zellen genauer zu untersuchen, wurde die klonierte cDNA von HAV/7 als Expressionsvektor eingesetzt. Bei dieser Deletionsmutante (pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$) wurde etwa die Hälfte der IRES-Sequenz deletiert, was

darin resultierte, dass aufgrund ausbleibender Genomreplikation keine infektiösen Virionen gebildet werden konnten (Daten nicht gezeigt) und so der reduzierende Effekt auf das exprimierte Polyproteine und nicht etwa auf eine Replikation des Virus zurückzuführen war (siehe 3.1). Die Transfektion am Vortag umgesetzter und zu 80 Prozent konfluent gewachsener FRhK-4 Zellen mittels des Transfektionsreagenzes jetPEI erfolgte zusammen mit einem Reporterplasmid namens (-110IFN-β)-CAT [eine Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) unter Kontrolle des humanen IFN-β-Enhancers]. Hierbei kamen 2µg Reporterplasmid und 3 µg des jeweiligen Expressionsplasmides zum Einsatz. Als Negativkontrolle diente der zugrunde liegende Leervektor pcDNA3.1/*myc*-His.

Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit NDV (MOI~0,1) infiziert bzw. wurde als Negativkontrolle ein Mediumwechsel durchgeführt. Weitere 18 h später erfolgte die Proteinextraktion mittels *freeze-thaw-lysis*, im Anschluss wurde mit 100µg Proteineinsatz der Reportergennachweis per CAT-ELISA durchgeführt.

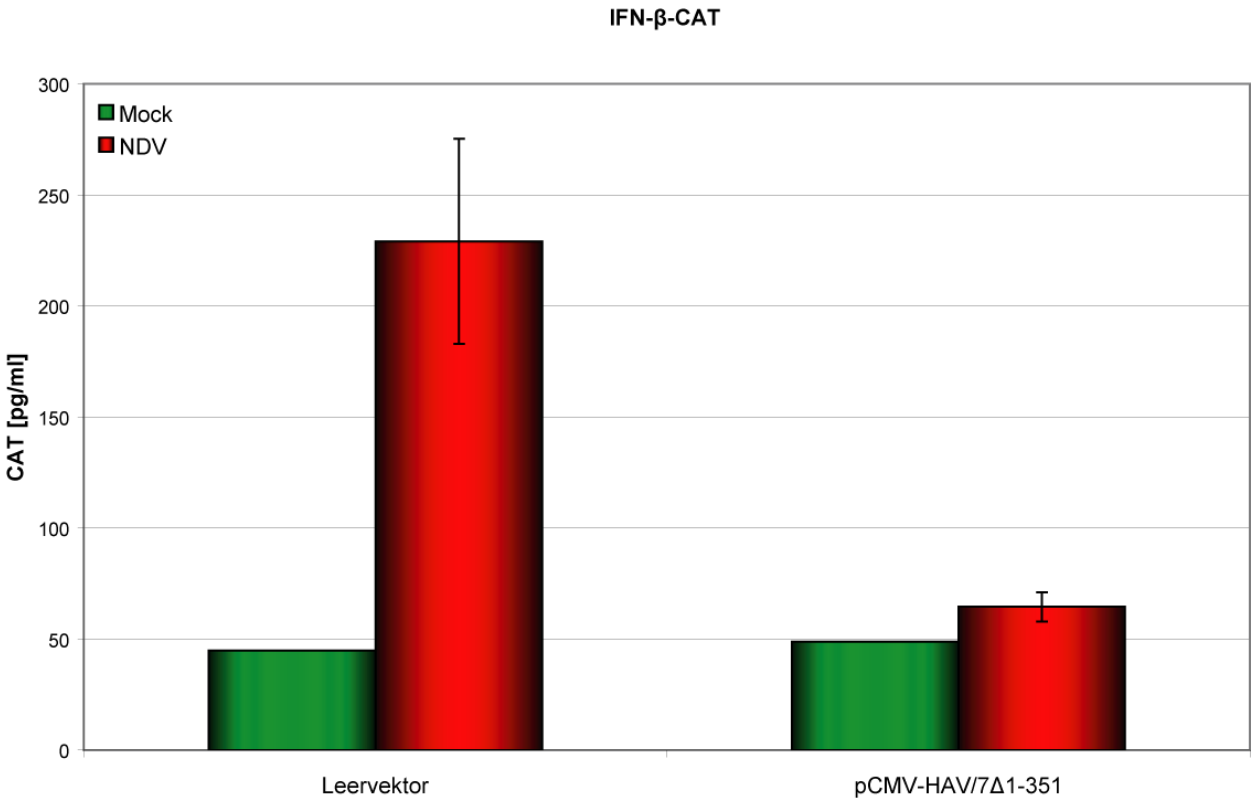


Abb. 7: Effekt einer Transfektion der replikationsinkompetenten cDNA-Variante pCMV-HAV/7$_{\Delta 1\text{-}351}$ des HAV auf die Induktion des IFN-β-Enhancers: Replikationsunabhängige Suppression durch pCMV-HAV/7$_{\Delta 1\text{-}351}$. FRhK 4-Zellen wurden in 6cm-Schalen umgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 3 µg Leer- oder Expressionsvektor + 2µg Reporterplasmid [(-110-IFN-β)-CAT] transfiziert. 24 h danach erfolgte eine Mediumbehandlung oder eine NDV-Infektion (MOI~0,1) und weitere 18 h später wurden die Zellen lysiert, um 100µg Protein in den CAT-ELISA einzusetzen. Die Abszisse repräsentiert die jeweilig exprimierten viralen Proteine. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen.

Das Ergebnis zeigte, dass die replikationsinkompetente Deletionsmutante pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ die gleiche Fähigkeit zur Suppression der IFN-β-Enhancer-abhängigen Reportergenexpression besitzt wie das Hepatitis A-Virus (Abb. 7). Daher muss der supprimierende Effekt auf die Anwesenheit und Funktion viraler Proteine zurückzuführen sein.

3.1.2 Effekt einer Cotransfektion der genomischen Teilbereiche P1, P2 und P3 des HAV auf die Induktion des IFN-β-Enhancers: Suppression durch Cotransfektion von P1, P2 und P3

Um, nach Ausschluss der Notwendigkeit einer Replikation, die supprimierende Eigenschaft auf die Interferon-β-Expression des Hepatitis A-Virus in FRhK-4-Zellen genauer zu untersuchen und eventuell bezüglich eines bestimmten viralen Proteins eingrenzen zu können, wurden - wie in 2.2.10. beschrieben - Expressionsplasmide auf Basis des pcDNA3.1/*myc*-His für die drei Teilbereiche des HAV-Genoms konstruiert. Hierbei wurde C-terminal ein Stop-Codon eingefügt, so dass unmarkierte Proteine exprimiert wurden, um eine mögliche negative Beeinflussung der Proteinfunktion ausschließen zu können. Mit diesen erfolgte dann die Transfektion zusammen mit einem Reporterplasmid namens (-110IFN-β)-CAT [eine Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) unter Kontrolle des humanen IFN-β-Enhancers] am Vortag umgesetzter und zu 80 Prozent konfluent gewachsener FRhK-4 Zellen mittels des Transfektionsreagenzes jetPEI. Hierbei kamen 2µg Reporterplasmid und 3 µg des jeweiligen Expressionsplasmides zum Einsatz. Im Falle der Transfektion mehrerer viraler Expressionsplasmide errechnete sich die Menge des jeweiligen Plasmides aus [3µg/Anzahl der Plasmide], was in diesem Fall 1 µg entspricht, da 3 Expressionsplasmide cotransfiziert wurden. Als Negativkontrolle diente der zugrunde liegende Leervektor pcDNA3.1/*myc*-His. Zu Vergleichszwecken kam die klonierte cDNA von HAV/7 als Expressionsvektor zum Einsatz. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit NDV (MOI~0,1) infiziert bzw. wurde als Negativkontrolle ein Mediumwechsel durchgeführt. Weitere 18 h später erfolgte die Proteinextraktion mittels *freeze-thaw-lysis*, im Anschluss wurde mit 100µg Proteineinsatz der Reportergennachweis per CAT-ELISA durchgeführt.
Wie zu erwarten induzierte die NDV-Infektion eine starke Reportergenexpression, wohingegen eine alleinige Behandlung der Zellen mit Medium keine Induktion zeigte. Die Transfektion von pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ reduzierte die IFN-β-Enhancer-vermittelte CAT-Expression vollständig (Abb. 8). Die Suppression, die eine Cotransfektion der drei genomischen Teilbereiche P1, P2 und P3 von HAV vermittelte war allerdings in ihrer Ausprägung stark abgeschwächt.

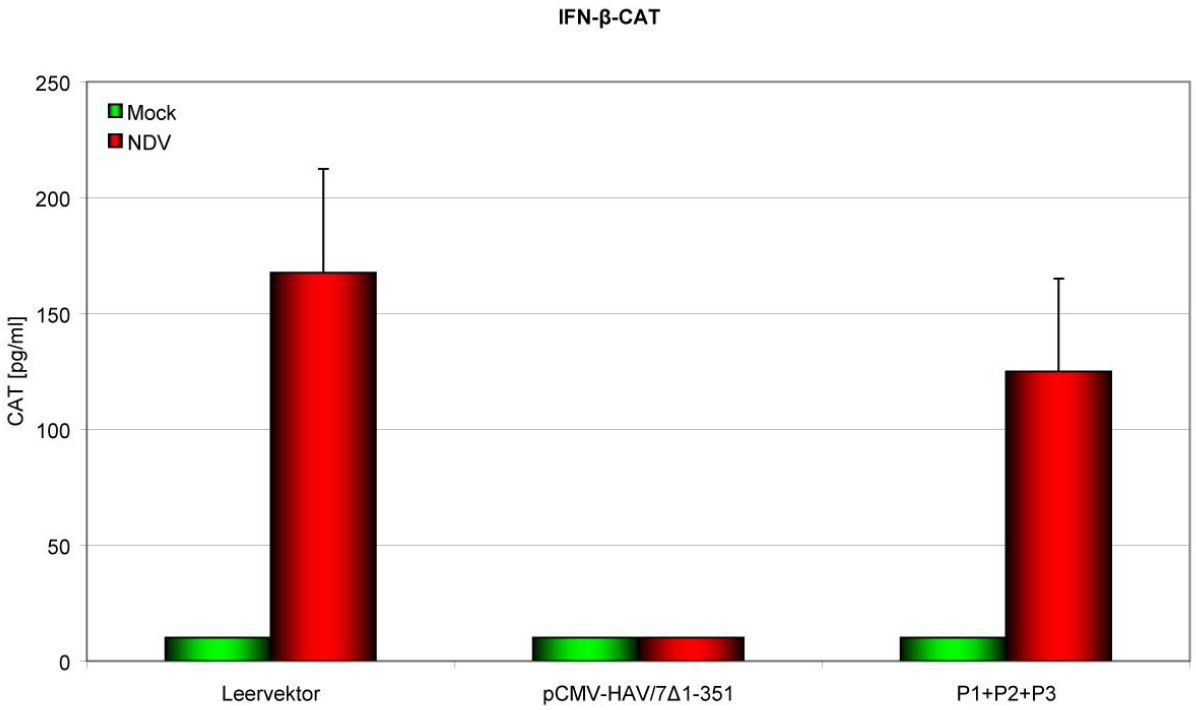


Abb. 8: Effekt einer Cotransfektion der genomischen Teilbereiche P1, P2 und P3 des HAV auf die Induktion des IFN-β-Enhancers: Suppression durch pCMV-HAV/7$_{\Delta 1\text{-}351}$ und P1+P2+P3. FRhK 4-Zellen wurden in 6cm-Schalen umgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 3 µg Leer- oder Expressionsvektor + 2µg Reporterplasmid [(-110-IFN-β)-CAT] transfiziert. 24 h danach erfolgte eine Mediumbehandlung oder eine NDV-Infektion (MOI~0,1) und weitere 18 h später wurden die Zellen lysiert, um 100µg Protein in den CAT-ELISA einzusetzen. Die Abszisse repräsentiert die jeweilig exprimierten viralen Proteine. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen.

Eine Erklärung hierfür könnte die geringere Menge der jeweiligen Expressionsplasmide gewesen sein, da von P1, P2 und P3 je 1 µg DNA eingesetzt wurde, um die Gesamtmenge von 5 µg nicht zu überschreiten, wohingegen 3 µg des pCMV-HAV/7$_{\Delta 1\text{-}351}$ eingesetzt werden konnten. Zudem besteht die Möglichkeit, dass durch die virale Protease 3C eine Prozessierung des Polyproteins erfolgte, bei der teilbereichsübergreifende Prozessierungsintermediate enstanden, die eine stärkere Suppression vermitteln, als die voneinander getrennten genomischen Teilbereiche.

3.1.3 Effekt einer Transfektion der genomischen Teilbereiche P1, P2 und P3 des HAV auf die Induktion des IFN-β-Enhancers: Suppression durch Protein P2

Da die Cotransfektion der genomischen Teilbereiche von HAV im Vergleich zu pCMV-HAV/7$_{\Delta 1\text{-}351}$ kaum zur Supprimierung der IFN-β-Enhancer-vermittelten CAT-Expression führte,

wurden die Teilbereiche einzeln und in höherer Menge (3 µg DNA statt 1µg) mit dem IFN-β-CAT-Reporterplasmid [(-110-IFN-β)-CAT] transfiziert.

Zu diesem Zweck wurden FRhK-4-Zellen (ca. 80%ige Konfluenz) mit 2 µg (-110-IFN-β)-CAT und 3µg des entsprechenden Expressionsplasmides per jetPEI cotransfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte eine NDV-Infektion (MOI~0,1) oder als Negativkontrolle ein Mediumwechsel. Weitere 18h später wurde die Proteine extrahiert und anschließend 100 µg Protein in den CAT-ELISA eingesetzt.

Die Ergebnisse bestätigten den vorherigen Befund einer leichten Suppression der IFN-β-Enhancer-abhängigen CAT-Expression nach Cotransfektion der drei Teilbereiche des HAV-Genoms. Des Weiteren wurde ersichtlich, dass diese Suppression ausschließlich durch HAV P2 vermittelt wurde und die anderen Teilbereiche keine reduzierenden Eigenschaften zeigten (siehe Abb. 9) Hieran wurde deutlich, dass die supprimierende Eigenschaft von HAV durch den Bereich der P2 oder einer/mehrerer ihrer Unterproteine vermittelt wird.

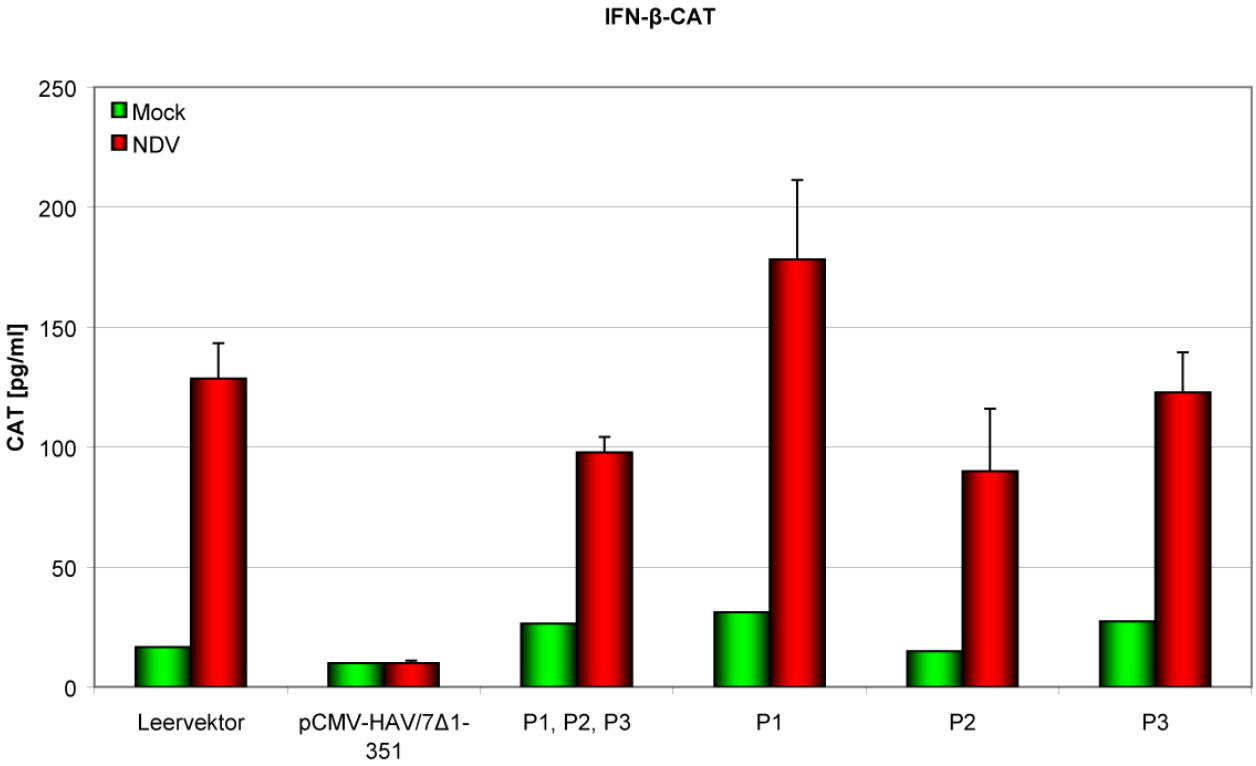


Abb. 9: Effekt einer Transfektion der genomischen Teilbereiche P1, P2 und P3 des HAV auf die Induktion des IFN-β-Enhancers: Suppression durch Protein P2. FRhK 4-Zellen wurden in 6cm-Schalen umgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 3 µg Leer- oder Expressionsvektor + 2µg Reporterplasmid [(-110-IFN-β)-CAT] transfiziert. 24 h danach erfolgte eine Mediumbehandlung oder eine NDV-Infektion (MOI~0,1) und weitere 18 h später wurden die Zellen durch freeze-thaw-lysis lysiert, um 100µg Protein in den CAT-ELISA einzusetzen. Die Abszisse repräsentiert die jeweilig exprimierten Proteine. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen.

3.1.4 Effekt einer Transfektion der HAV P2-Proteine 2A, 2AB, 2B, 2BC und 2C auf die Induktion des IFN-β-Enhancers: Suppression durch Protein 2B

Um den genomischen Teilbereich P2 genauer zu untersuchen, wurde er in seine Bestandteile 2A, 2B und 2C, sowie die Oligoproteine 2AB und 2BC als mögliche Intermediate der Prozessierung zerlegt und diese in Expressionsplasmide auf Basis des pcDNA3.1 (siehe 2.2.10.) einkloniert.
3 µg dieser wurden dann zusammen mit 2µg (-110-IFN-β)-CAT in FRhK 4-Zellen transfiziert, die 24 h zuvor in 6cm-Schalen umgesetzt wurden und zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 80% Konfluenz aufwiesen. 24 h nach der Transfektion erfolgte dann die Induktion mit poly(IC), was als funktionell äquivalent zur NDV-Infektion demonstriert wurde (Daten nicht gezeigt) und weitere 18h später wurden die Proteine per *freeze-thaw-lysis* extrahiert und 100 µg in den CAT-ELISA eingesetzt.

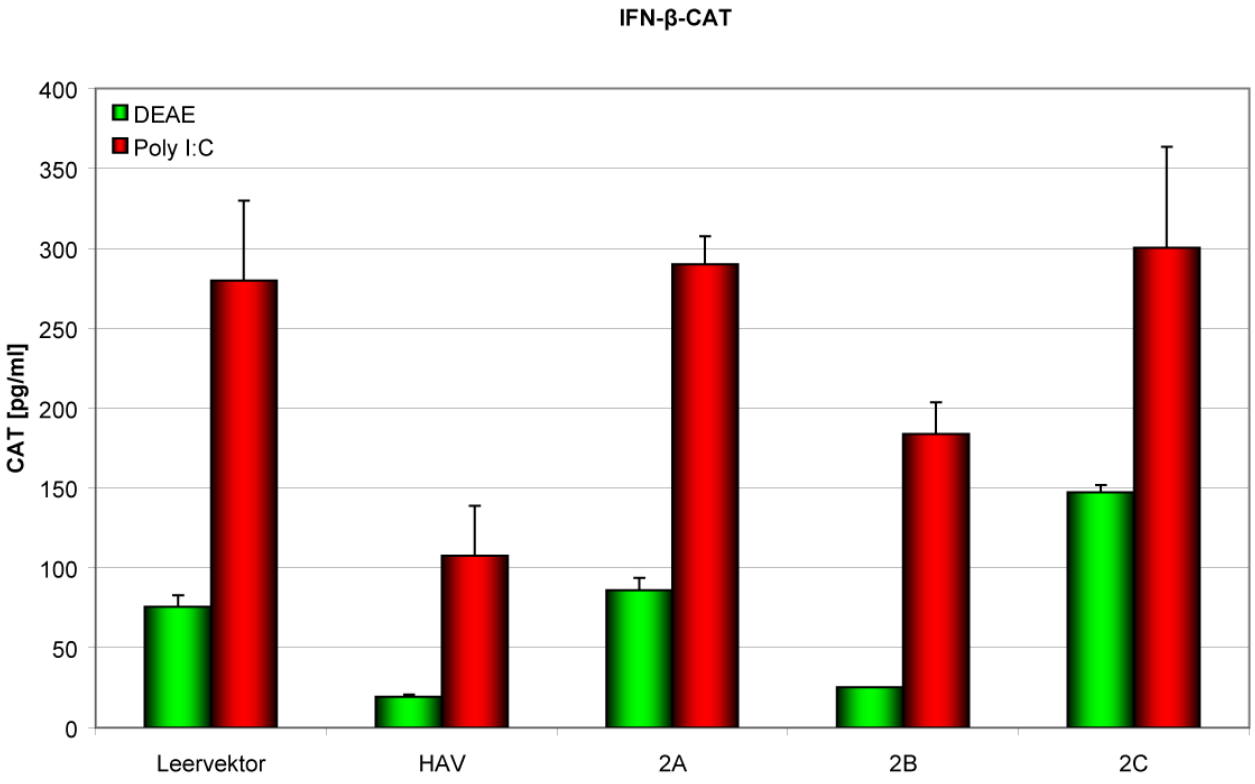


Abb. 10: Effekt einer Transfektion der HAV P2-Proteine 2A, 2B und 2C auf die Induktion des IFN-β-Enhancers. FRhK 4-Zellen wurden in 6cm-Schalen umgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 3 µg Leer- oder Expressionsvektor + 2µg Reporterplasmid [(-110-IFN-β)-CAT] transfiziert. 24 h danach erfolgte eine Mediumbehandlung oder eine HAV-Infektion (MOI~1). Weitere 24 h später wurden die Zellen mit Medium oder Poly I:C (10µg/ml)) induziert und wiederum 18 h später durch freeze-thaw-lysis lysiert, um 100µg Protein in den CAT-ELISA einzusetzen. Die Abszisse repräsentiert die jeweilig exprimierten Proteine. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen.

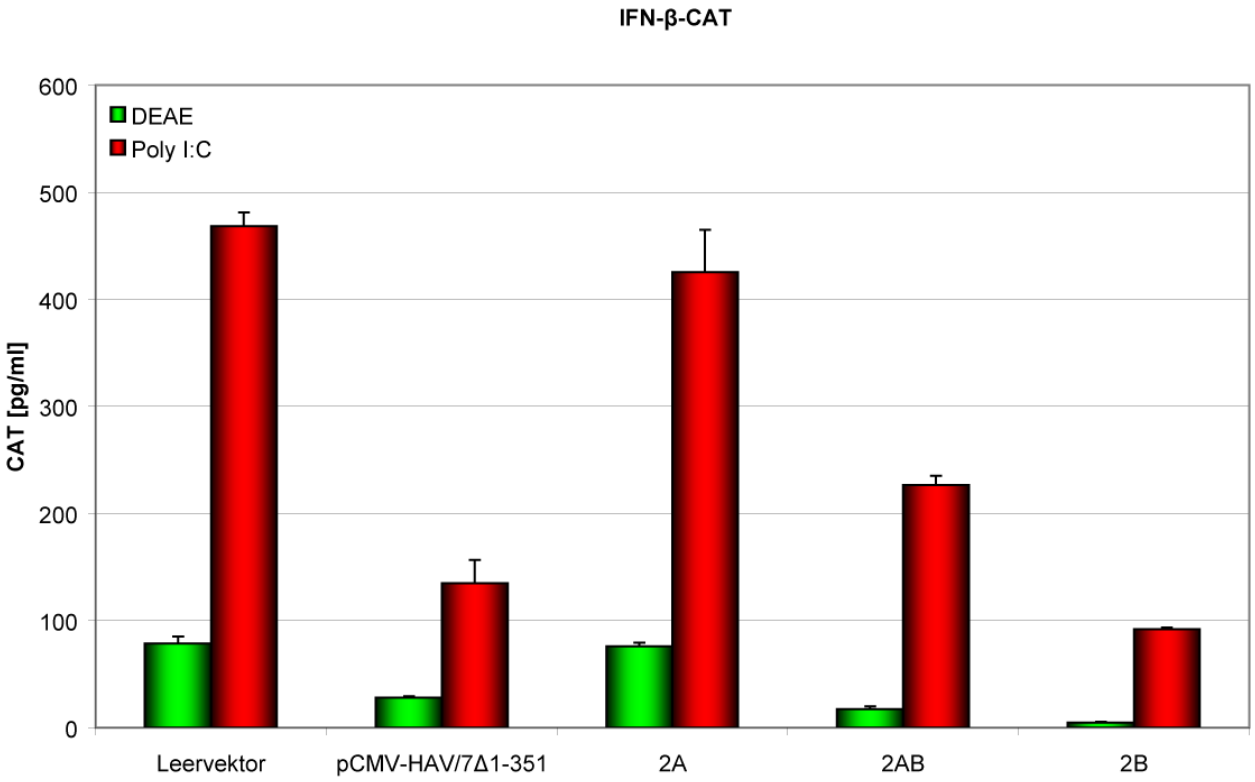


Abb. 11: Effekt einer Transfektion der HAV P2-Proteine 2A, 2AB, 2B auf die Induktion des IFN-β-Enhancers. FRhK 4-Zellen wurden in 6cm-Schalen umgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 3 µg Leer- oder Expressionsvektor + 2µg Reporterplasmid [(-110-IFN-β)-CAT] transfiziert. 24 h danach erfolgte eine Mediumbehandlung. Weitere 24 h später wurden die Zellen mit Medium oder Poly I:C (10µg/ml)) induziert und wiederum 18 h später durch freeze-thaw-lysis lysiert, um 100µg Protein in den CAT-ELISA einzusetzen. Die Abszisse repräsentiert die jeweilig exprimierten Proteine. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen.

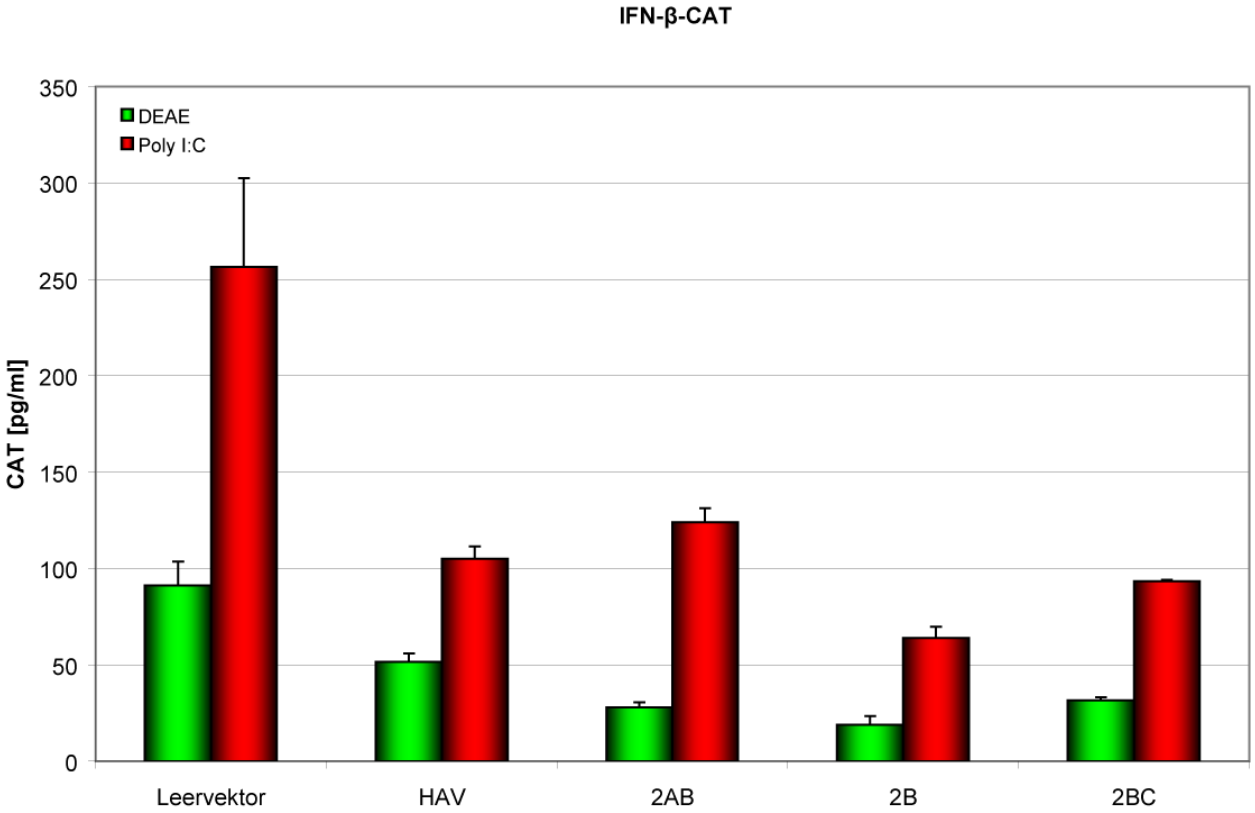


Abb. 12: Effekt einer Transfektion der HAV P2-Proteine 2AB, 2B und 2BC auf die Induktion des IFN-β-Enhancers. FRhK 4-Zellen wurden in 6cm-Schalen umgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 3 µg Leer- oder Expressionsvektor + 2µg Reporterplasmid [(-110-IFN-β)-CAT] transfiziert. 24 h danach erfolgte eine Mediumbehandlung oder eine HAV-Infektion (MOI~1). Weitere 24 h später wurden die Zellen mit Medium oder Poly I:C (10µg/ml)) induziert und wiederum 18 h später durch freeze-thaw-lysis lysiert, um 100µg Protein in den CAT-ELISA einzusetzen. Die Abszisse repräsentiert die jeweilig exprimierten Proteine. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen.

Dieses Vorgehen wurde im Zuge einer, zu Vergleichszwecken in die Experimente eingeführten, HAV-Infektion (Abb. 10 und 12) statt der Transfektion mit pCMV-HAV/7$_{\Delta 1\text{-}351}$ (Abb. 11) wie folgt modifiziert: FRhK-4 Zellen wurden 24 h nach dem Umsetzen mit HAV/7 (MOI~1) für 2 h infiziert und weitere 24 h später mit Leervektor und Reporterplasmid transfiziert. Weitere 24 h nach der Transfektion erfolgte hierbei die Induktion mit Poly I:C, um die Proteine dann 18 h später per *freeze-thaw-lysis* extrahieren und in den CAT-ELISA einsetzen zu können. Ansätze, die mit viralen Expressionsplasmiden cotransfiziert wurden, blieben uninfiziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass nur die alleinige Expression des viralen Nichtstrukturproteins 2B zu einer Supprimierung der IFN-β-Enhancer-vermittelten CAT-Expression führt, die in ihrer Ausprägung in etwa dem Supprimierungsgrad einer HAV-Infektion oder auch einer pCMV-HAV/7$_{\Delta 1\text{-}351}$ Transfektion entspricht (Abb. 10, 11 und 12). Ähnliches war für 2A und 2C nicht zu beobachten (Abb. 10 und 11). Zudem ließ sich zeigen, dass die 2B enthaltenden Proteinintermediate 2AB und 2BC (Abb. 11 und 12) ebenfalls zur Supprimierung der Reportergentranslation führten, wobei diese allerdings nicht so ausgeprägt war, wie dies nach alleiniger Expression von 2B oder durch eine HAV-Infektion (Abb. 10 und 12) bzw. Transfektion mit pCMV-HAV/7$_{\Delta 1\text{-}351}$ (Abb. 11) der Fall gewesen ist.

3.2 Steigerung der plasmidvermittelten Expressionsraten von HAV-Proteinen durch Verwendung des Intronvektors pI.18

Die bisherigen Experimente zeigen bereits eine deutliche Beteiligung des Nichtstrukturproteins HAV-2B bei der von HAV bekannten Suppression der IFN-β-Enhancer-vermittelten Reportergenexpression. Da die Expression viraler Proteine auf Basis des pcDNA3.1 kleineren Schwankungen unterliegen kann, sollte das Strukturprotein VP1 von HAV im Immunoblot nachgewiesen werden. HAV-VP1 wurde aufgrund des Vorhandenseins eines α-HAV-VP1 Antikörpers ausgewählt. Die Ergebnisse dieser Immunoblots ergaben, dass HAV-VP1 mittels α-HAV-VP1 zwar bei einer HAV-Infektion nachweisbar war, dieses bei Expression über pCDNA3.1-VP1 jedoch nicht gelang (Ergebnisse nicht gezeigt). Daher wurden die Erfahrungen einer Freiburger Arbeitsgruppe mit dem Expressionsvektor pI.18 genutzt, der zwischen Promotor und *multiple cloning site* (MCS) eine von zwei Exon Sequenzen (Splice-Donor/Akzeptor) flankierte Intron A Sequenz enthielt, die im Zuge der mRNA-Reifung herausgeschnitten wird (RNA-Splicing), was zu einer erheblichen Steigerung der Expressionsraten führt (persönl. Mitteilung G. Blakqori). Daher wurden die bisher eingesetzten cDNAs für die HAV Proteine in den Vektor pI.18 umkloniert, um eine effizientere, stabilere und damit kleineren Schwankungen

unterliegende Expression der viralen Proteine zu gewährleisten. Dieses sollte zudem den Nachweis per Immunoblot ermöglichen, da bisher direkte Nachweise im Western-Blot gegen HAV-Proteine ohne Vaccinia-basiertes Expressionssystem nicht möglich waren. Der Expressionsnachweis sollte nach erfolgreichem Screening über einen spezifischen direkt bindenden Antikörper erfolgen, der nach Identifikation des Effektorproteins in Auftrag gegeben werden sollte. Die Proteinextrakte aller *Screening*-Experimente wurden daher für den ausstehenden Expressionsnachweis aufgehoben. Auf die Markierung der exprimierten Proteine wurde zunächst aus funktionellen Gründen verzichtet, um den immensen Arbeitsaufwand der Klonierungsarbeiten nicht zu verdoppeln. Zudem war zu diesem Zeitpunkt noch nicht absehbar, ob ein N- oder C-terminaler Anhang die supprimierenden Eigenschaften eines möglichen Effektorproteins neutralisieren würde.

Die Immunoblots zum Nachweis von HAV VP1, das durch pcDNA3.1-VP1 in FRhK-4-Zellen exprimiert wurde, blieben - wie bereits erwähnt - erfolglos. Andere Arbeitsgruppen verwenden zur Expression von HAV Proteinen Vaccinia-Virus-basierte Expressionssysteme, die einen Nachweis im Immunoblot ermöglichen. Allerdings ist die Nutzung dieser Expressionssysteme für Untersuchungen der IFN-β-Suppression ungeeignet, da mehrere Vaccinia-Virus-Proteine mit dem aktivierenden Signalweg zur IFN-β-Expression interferieren. So bindet E3L dsRNA und maskiert diese für RIG-I und MDA-5, so dass keine IRF-3 Aktivierung durch dsRNA als Induktor der IFN-β-Expression erfolgen kann. Dieser ist allerdings für die in dieser Arbeit durchgeführten Reportergen-Transfektionsexperimente in Form von poly(IC) oder NDV essentiell. Zudem bindet N1L TBK-1, welches einen Bestandteil des VAK-Komplexes darstellt und beeinträchtigt so ebenfalls die IFN-β-Expression. Ein weiterer Grund, der gegen die Verwendung von Vaccina-Virus-basierten Expressionssystemen sprach, war der mangelnde Impfschutz gegen Vaccinia-Virus. Daher sollte ein nicht-virales Expressionssystem etabliert werden, das dennoch so hohe Expressionsraten gewährleisten sollte, dass ein Nachweis der exprimierten Proteine per Western-Blot geführt werden kann, weshalb nun die Expressionsrate des pI.18-VP1 mit pcDNA3.1-VP1 verglichen wurde, um eventuell höhere Expressionsraten in den Experimenten einsetzen zu können.

Hierzu wurden FRhK-4 Zellen in 6cm-Schalen umgesetzt (1:8) und 24 h später mit 5µg Leervektor oder 5µg des entsprechenden VP1 Expressionsplasmides transfiziert. Zudem wurde als Positivkontrolle parallel zur Transfektion eine HAV/7 Infektion (MOI~1) durchgeführt. Die Proteinextraktion erfolgte per *freeze-thaw-lysis* 72h nach der Transfektion, wobei täglich das Medium gewechselt wurde.

Der Immunoblot wurde wie in 2.2.11. beschrieben mit 50 und 75µg Protein durchgeführt. Die Auswertung zeigte deutlich die gesteigerte Expressionsrate des pI.18 gegenüber dem pcDNA3.1 (Abb. 13). Während auch dieses Mal der Nachweis von VP1, das durch pcDNA3.1 exprimiert wurde, misslang, konnte das mithilfe des pI.18 translatierte VP1 deutlich nachgewiesen werden. Hierbei übersteigt die Menge an viralem Protein die vom Virus bei einer Infektion mit der MOI~1 gebildete VP1 Menge. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde entschieden, zukünftig den pI.18 als Expressionsvektor zu verwenden.

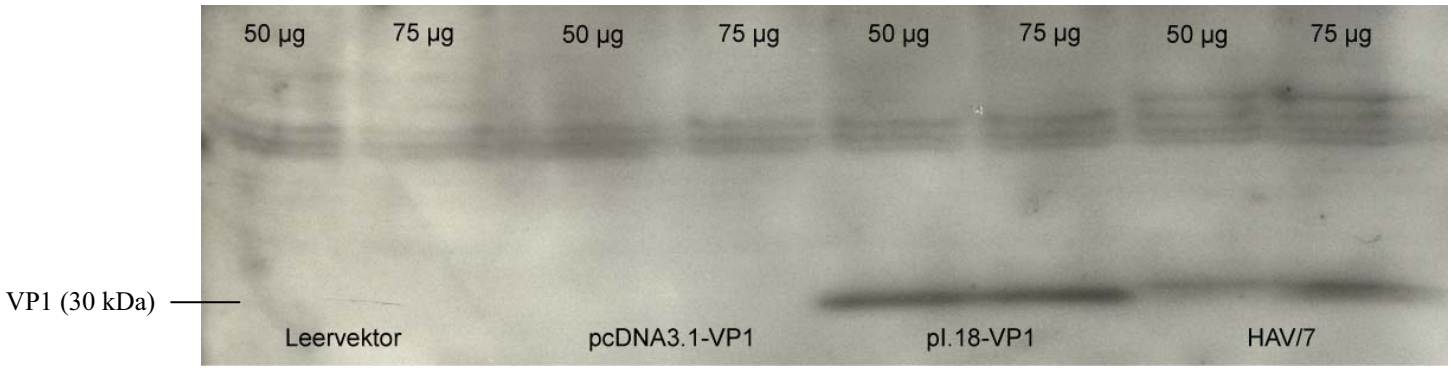


Abb. 13: Steigerung der plasmidvermittelten Expressionsraten von HAV-Proteinen durch Verwendung des Intronvektors pI.18. FRhK 4-Zellen wurden in 6cm-Schalen umgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 5µg Leer- oder VP1-Expressionsvektor transfiziert. 72 h später wurden die Zellen durch freeze-thaw-lysis lysiert um 50 und 75 µg dieser Proteine zum Proteinnachweis mit α-VP1 Antikörper in SDS-Page und Immunoblot einsetzen zu können.

3.3 *Screening* der pI.18-basierten Expressionsvektoren: Effekt einer Transfektion der HAV-Proteine VP1 und 2B auf die Induktion des IFN-β-Enhancers: Suppression durch Protein 2B

Aus Kostengründen wurde eine laborinterne Umstellung des Nachweissystems vom Reportergen CAT auf Luc vorgenommen; die Verwendung eines ELISAs ist eine wesentlich teurere Nachweismethode als eine Lumineszenzmessung. Der Kostenfaktor fällt hier in etwa 5:1 gegen den ELISA aus, was bedeutet, dass mit der Verwendung Luciferase basierter Reporterplasmide zum gleichen Preis fünfmal mehr Proben untersucht werden können. Daher hat sich Luciferase weltweit als Reportergen durchgesetzt und die meisten Reporterplasmide basieren mittlerweile auf einer Luciferase. Statt des bisher eingesetzten (-110-IFN-β)-CAT wurde als IFN-β-Enhancer Konstrukt p125-Luc verwendet. Beides sind Reporterplasmide, bei denen das Reportergen unter Kontrolle des humanen IFN-β-Enhancer/Promotors steht; das Chloramphenicol-Acetyl-

transferase-Gen im (-110-IFN-β)-CAT (bp -116 bis +11) und das Luciferase-Gen im p125-Luc (bp -125 bis +17). Aufgrund der fast identischen Kontrollregion (+9 bp N-terminal und 6 bp C-terminal im Vergliech in p125-Luc) ist zwar davon auszugehen, dass die Plasmide sich identisch verhalten, dennoch sollte dieses noch einmal verifiziert werden. Hierzu wurden FRhK 4-Zellen in 6cm-Schalen umgesetzt (1:8) und am darauf folgenden Tag (80%ige Konfluenz) mit Medium behandelt oder mit HAV/7 infiziert (MOI~1). 24 h später erfolgte die Transfektion mit 5µg DNA. Dabei wurden jeweils 1,25 µg Reporterplasmid und 3,75 µg an Expressionsplasmiden eingesetzt. Für den Ansatz mit P1, P2 und P3 bedeutete dieses jeweils 1,25 µg im Falle von 2B wegen der Vergleichbarkeit 1,25 µg Expressionsplasmid und 2,5 µg Leervektor, um die Gesamtmenge von 5µg transfizierter DNA zu erreichen. Weitere 24 h später erfolgte die Induktion des Reportergens durch eine NDV-Infektion (MOI~0,1) und nach 18 h konnte die Proteinextraktion per *freeze-thaw-lysis* erfolgen. 100µg Proteinextrakt wurden dann zum Nachweis in den CAT-ELISA eingesetzt.

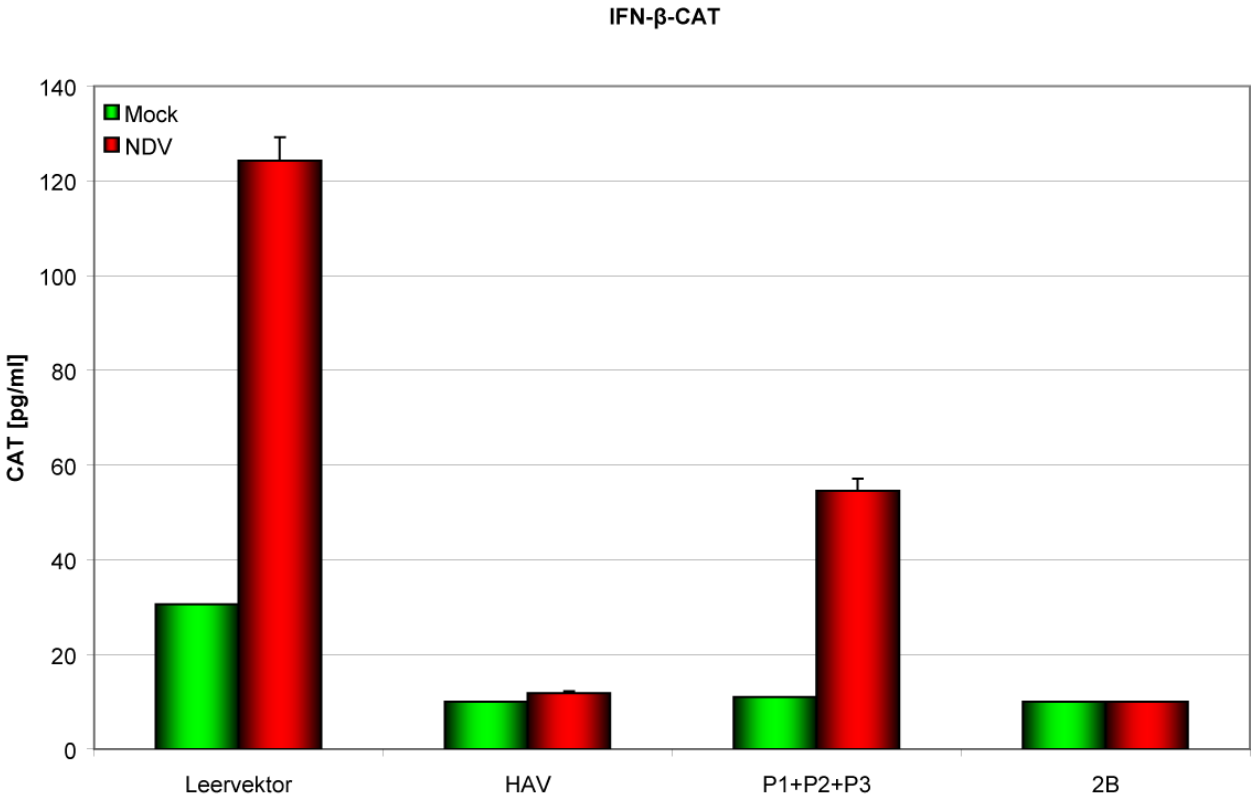


Abb. 14: Effekt einer Cotransfektion der genomischen Teilbereiche P1, P2 und P3 sowie einer Transfektion von Protein 2B des HAV auf die Induktion des IFN-β-Enhancers. FRhK 4-Zellen wurden in 6cm-Schalen umgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 3,75 µg Leer- oder Expressionsvektor + 1,25 µg Reporterplasmid [(-110-IFN-β)-CAT] transfiziert. 24 h danach erfolgte eine Mediumbehandlung oder eine HAV-Infektion (MOI~1). Weitere 24 h später wurden die Zellen mit NDV (MOI~0,1) infiziert und wiederum 18 h später durch freeze-thaw-lysis lysiert, um 100 µg Protein in den CAT-ELISA einzusetzen. Die Abszisse repräsentiert die jeweilig exprimierten Proteine. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen.

Die Suppression der IFN-β-Enhancer-vermittelten Reportergenexpression, wie sie auch bei einer HAV-Infektion zu beobachten ist, war auch für durch pI.18 exprimierte virale Proteine, zu beobachten. Hierbei zeigte sich zudem deutlich, dass bei der Transfektion von pI.18-2B die Expression des Reportergens, im Gegensatz zur pcDNA3.1 vermittelten Expression (Abb. 10), wie bei einer HAV-Infektion, nahezu vollständig supprimiert wurde (Abb. 14 und 15). Auch die Suppression, die durch die Cotransfektion von P1, P2 und P3 erreicht wurde, erwies sich als ausgeprägter im Vergleich zu den pcDNA3.1 Pendants. Festzuhalten bleibt zudem, dass die supprimierende Eigenschaft von 2B die der P2-Region deutlich überstieg (Abb. 14, in P1+P2+P3 enthalten).

Eine Transfektion mit HAV-Protein VP1 sollte aufzeigen, dass eine Suppression nicht allein aufgrund der Kompetition der zu exprimierenden Plasmide (Reporter- und Expressionsplasmid) untereinander sowie der normalen zelleigenen Translation um die zelluläre Translationsmaschinerie erfolgte. Der Einsatz von p125-Luc als Reporterplasmid zeigte keine Unterschiede im Hinblick auf die Ergebnisse, die bereits mit (-110-IFN-β)-CAT erzielt wurden. Sie korrelieren vollständig (Abb. 14 und 15).

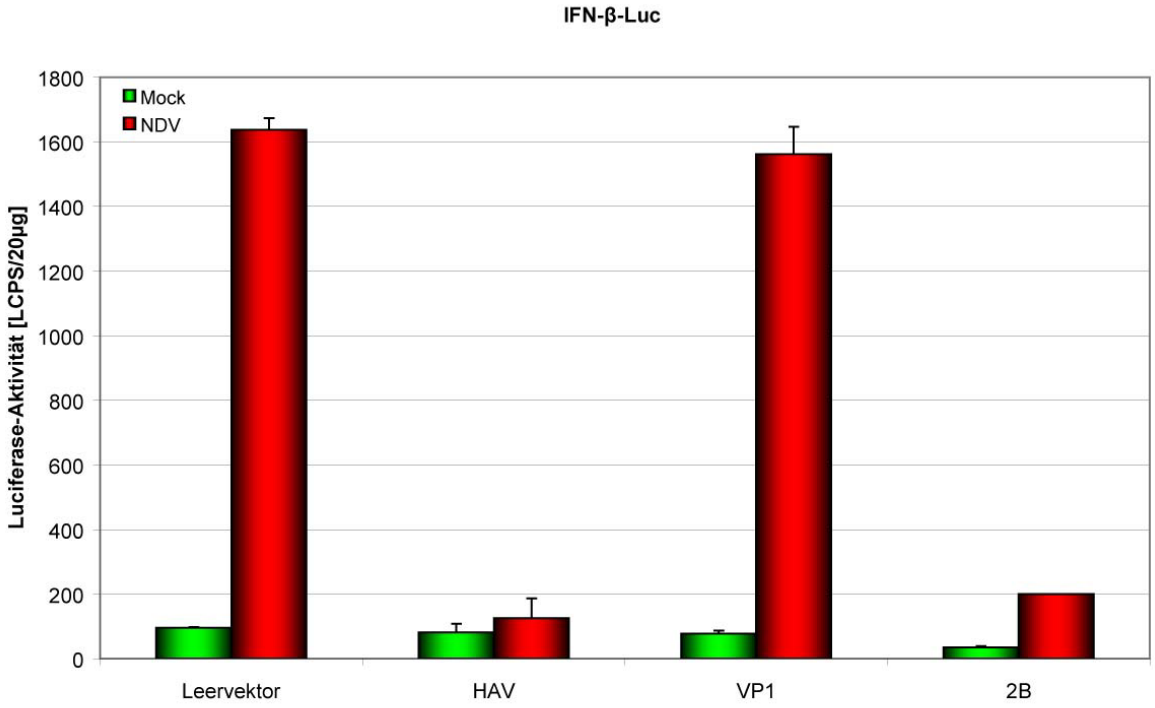


Abb. 15: Effekt einer Transfektion der HAV-Proteine VP1 und 2B auf die Induktion des IFN-β-Enhancers. FRhK 4-Zellen wurden in 6cm-Schalen umgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 3,75 µg Leer- oder Expressionsvektor + 1,25 µg Reporterplasmid (p125-Luc) transfiziert. 24 h danach erfolgte eine Mediumbehandlung oder eine HAV-Infektion (MOI~1). Weitere 24 h später wurden die Zellen mit NDV (MOI~0,1) infiziert und wiederum 18 h später durch freeze-thaw-lysis lysiert, um 20 µg Protein in den Luciferase-*Assay* einzusetzen. Die Abszisse repräsentiert die jeweilig exprimierten Proteine. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen.

Die Induktion mit NDV führte auch beim p125-Luc zu einer starken Reportergenexpression, die durch eine HAV-Infektion nahezu vollständig supprimiert wurde (Abb. 15). Wie erwartet, zeigte auch die Transfektion mit pI.18-2B einen ähnlichen Effekt. Wichtig bei diesem Experiment war allerdings die Bestätigung, dass es sich bei der Supprimierung nicht um einen kompetitiven Effekt hinsichtlich der Translationskapazitäten der Zelle handelt, sondern spezifisch HAV bzw. 2B allein zuzuschreiben ist.

3.4 Zusammenfassender Überblick der Effekte einer Transfektion von HAV-Proteinen auf die Induktion der IFN-β-Enhancer-abhängigen Reportergenexpression: Suppression durch HAV 2B und die es enthaltenden Oligoproteine

Tabelle 1 zeigt als Übersicht die reduzierenden Eigenschaften aller per Expressionsvektor in den Experimenten exprimierten Proteine in Bezug auf die IFN-β-Enhancer-abhängige CAT-Expression. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die fett gedruckten Proteine sind im Rahmen dieser Arbeit im Ergebnisteil dargestellt. Alle anderen wurden im Rahmen von Projektarbbeiten untersucht, die alle vom Autor betreut aber aufgrund einer fehlenden supprimierenden Eigenschaft allerdings nicht in diese Arbeit aufgenommen wurden.

Auffällig an den Ergebnissen ist die fast vollständige Suppression der Reportergenexpression durch HAV/7, pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ und HAV-2B. Neben HAV beinhaltete auch pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ alle HAV Proteine mit dem Unterschied, dass HAV replizieren und somit die Expression der viralen Proteine ansteigen kann, während hingegen pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ replikationsinkompetent ist.

Aufgrund der Deletion der halben 5'-NTR (351 Nukleotide) handelt es sich bei pCMV-HAV/7Δ1-351 um eine replikationsinkompetente Variante, denn das VPg ist kovalent an das 5'-Ende des viralen Genoms gebunden und dient als „Primer" für die Replikation der RNA durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase. Somit wird die Menge an viralem Protein allein durch das Expressionsplasmid reguliert, wie es bei der Expression von 2B der Fall ist. Zudem lässt sich der Tabelle entnehmen, dass bei einer Transfektion von Oligoproteinen, die 2B enthalten, wie P2, 2AB, 2BC oder VP1-P2 ebenfalls eine Reduktion zu beobachten ist, die allerdings mit zunehmender Länge des Oligoproteins in ihrer Ausprägung abnimmt. Deutlich wird, dass auch, wenn 2B nicht durch die virale Protease 3C aus dem Oligoprotein herausgespalten werden kann

(Proteasefunktion von 3D ist vermutlich kontextabhängig), die supprimierende Wirkung anteilig erhalten bleibt.

Tab. 1: Effekt einer Transfektion von HAV-Proteinen auf die Induktion der IFN-β-Enhancer-abhängigen Reportergenexpression: Suppression durch HAV 2B und die es enthaltenden Oligoproteine

HAV-Proteine und Intermediate	Nukleotid-positionen[1]	(-110-IFN-β)-CAT		
		Reduktion [%]	Standard-abweichung	Induktor
HAV-Infektion (HAV/7)	1-7415	91,38%	4,01%	NDV
pCMV-HAV/7$_{\Delta 1-351}$	352-7415	97,17%	4,01%	NDV/polyIC
P1+P2+P3	735-7415	44,25%	15,13%	NDV
P1 (VP4-3-2-1)	735-3026	keine Reduktion	-	NDV
P2 (2A-B-C)	3027-5000	45,41%	12,50%	NDV
P3 (3A-B-C-D)	5001-5222	13,98%	0,79%	NDV
VP1-P2	2208-5000	60,78%	39,22%	NDV
VP1	2208-3026	keine Reduktion	-	polyIC
VP1-2A	2208-3242	keine Reduktion	-	polyIC
VP2	804-1469	keine Reduktion	-	polyIC
VP3	1470-2207	keine Reduktion	-	polyIC
VP4	735-803	keine Reduktion	-	polyIC
2A	3027-3242	keine Reduktion	-	polyIC
2AB	3027-3995	75,69%	0,00%	polyIC
2B	3243-3995	88,06%	11,39%	polyIC/NDV
2BC	3243-5000	62,61%	0,00%	polyIC
2C	3996-5000	25,04%	0,00%	polyIC
3A	5001-5222	n.d.[2]	-	polyIC
3AB	5001-5291	n.d.[2]	-	polyIC
3B	5223-5291	n.d.[2]	-	polyIC
3C	5292-5948	keine Reduktion	-	polyIC
3D	5949-7415	keine Reduktion	-	polyIC

[1] Nummerierung bezieht sich auf HAV Stamm HM175;
[2] nicht bestimmt

3.5 Expressionsnachweis des HAV-Proteins 2B

In den Experimenten wurden unmarkierte Proteine eingesetzt, da eine zusätzlich angehängte Sequenz die supprimierenden Eigenschaften eines möglichen Effektorproteins hätte beeinflussen können. Dieses lässt sich an den Polyproteinen 2AB und 2BC erahnen, die nicht annähernd dieselbe Fähigkeit zur Supprimierung der IFN-β-Enhancer-vermittelten Reportergenexpression aufweisen wie HAV 2B (siehe Tab. 1). Daher wurde die Herstellung eines polyklonalen Kaninchen-Antiserums gegen 2B-Peptide bei der Firma Genovac (Freiburg) in Auftrag gegeben.

Diese Antikörper konnten daraufhin in Immunoblots und Immunfluoreszenz-Assays auf ihre Spezifität hin untersucht werden.

3.5.1 Immunoblot gegen HAV-Protein 2B negativ

Um 2B über ein polyklonales α-2B-Antiserum nachweisen zu können, wurden zunächst FRhK 4-Zellen in 6 cm-Schalen umgesetzt und dann 24 h später mit der maximalen Menge von 5µg des entsprechenden Expressionsplasmids transfiziert bzw. mit HAV/7 infiziert (MOI~1). Zum Einsatz kamen hierbei der Leervektor pI.18 als Negativkontrolle, pI.18-VP1 als Positivkontrolle für die Expression via Expressionsplasmid, pI.18-2B und als zusätzliche Positivkontrolle eine HAV Infektion. 72 h nach der Transfektion (mit täglichen Mediumwechseln) wurden die Proteine per *freeze-thaw lysis* extrahiert und anschließend in den Immunoblot eingesetzt. Dieser wurde wie in 2.2.31. beschrieben durchgeführt. Dieses Experiment wurde mehrfach mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen (1:100 - 1:1000 Verdünnung) sowie verschiedenen Proteinmengen (50 und 75 µg Protein) durchgeführt. Zudem wurden weitere Proben nach zuvor beschriebenem Schema hergestellt, bei denen die Proteinextraktion nicht per *freeze-thaw-lysis*, sondern über Lysepuffer erfolgte, um die für HAV-2B postulierte Membranassoziierung aufzulösen. Im zu erwartenden Größenbereich von HAV-2B (ca. 28 kDa) war sowohl im Vergleich zum Leervektor als auch zu allen anderen eingesetzten Proben keine spezifische Bande zu erkennen. Im Gegensatz hierzu ließ sich wiederum deutlich die vom exprimierten VP1 stammende Bande (ca. 30 kDa) nachweisen (Ergebnisse nicht gezeigt), was bei Verwendung des pcDNA3.1 bisher nicht gelungen war (Abb. 13).
Somit bleibt festzuhalten, dass das polyklonale α-HAV 2B Antiserum nicht zum Nachweis im Immunoblot geeignet ist, wobei dieses nicht an einer mangelnden Spezifität liegen muss, sondern ebenfalls an einer nicht gelungenen Extraktion von 2B liegen kann, da in der Literatur im Zusammenhang mit 2B und 2BC eine Membranassoziation postuliert wird (Gosert et al., 2000), die vermutlich irreversibel ist. Somit wäre 2B nicht in der löslichen Fraktion einer Proteinextraktion nachweisbar.

3.5.2 HAV-Protein 2B mittels indirekter Immunfluoreszenz nachweisbar

Nach dem Scheitern eines Nachweises von 2B über einen Immunoblot, wurde der Versuch unternommen, es im Immunfluoreszenztest nachzuweisen.

Hierzu wurden FRhK-4-Zellen in C*hamber slides* umgesetzt und am nächsten Tag mit 0,8 µg Leer- (pI.18) bzw. Expressionsvektor (pI.18-2B) und 0,2 µg pHcRed-Tandem-N1 transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Auswertung am Epifluoreszenzmikroskop (400fache Vergrößerung) unter Verwendung entsprechender Anregungswellenlängen.

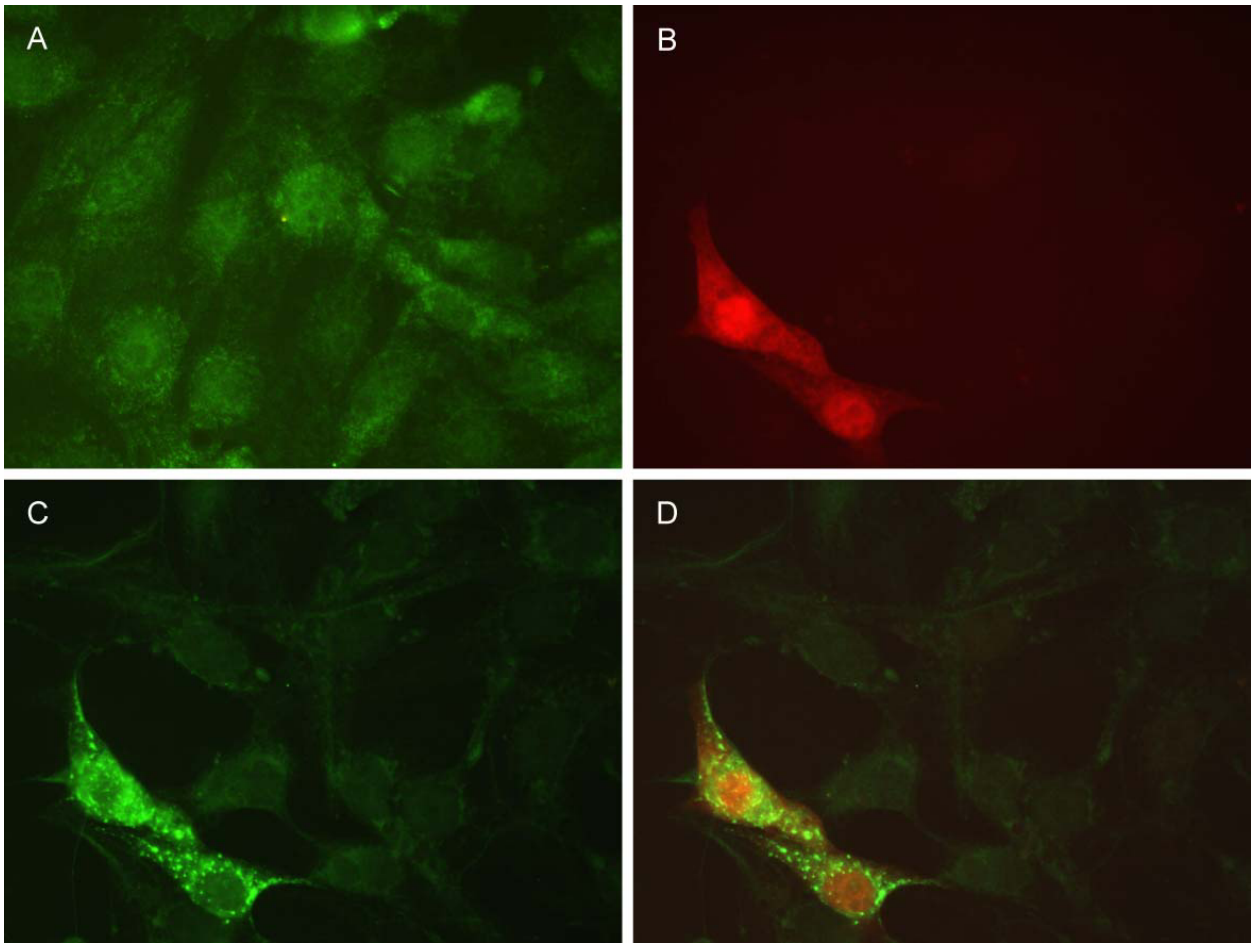


Abb. 16: Immunfluoreszenz zum Nachweis von HAV-2B. FRhK 4-Zellen wurden in *Chamber slides* umgesetzt und 24 h später mit 0,8 µg Leer- (pI.18, A) bzw. Expressionsvektor (pI.18-2B B – D) und 0,2 µg pHcRed-Tandem-N1 transfiziert. 48 h später (bei täglichem Mediumwechsel) erfolgte die Auswertung nach Paraformaldehyd-Fixierung am Epifluoreszenzmikroskop unter Verwendung entsprechender Anregungswellenlängen. Antigennachweis erfolgte mittels α-2B-Antiserum (sekundärer Antikörper FITC-konjugiert). Vergrößerung 400x.

Die Immunfluoreszenz zeigt deutlich im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten FrhK-4-Zellen (Abb. 16 A) eine granuläre Struktur in den mit pI.18-2B transfizierten Zellen (Abb. 16 C). Die Cotransfektion von pHcRed-Tandem-N1 diente der Identifizierung der transfizierten Zellen, da eine Cotransfektion mit jetPEI erwiesenermaßen strikt ist. Somit sind lediglich die rot-lumineszenten Zellen auf eine 2B-Expression hin zu untersuchen (Abb. 16 B). Abbildung 16 D

zeigt diesen Zusammenhang noch einmal mit Kombinationsfilter. Somit ist das polyklonale α-2B-Antiserum trotz der negativen Ergebnisse im Immunoblot als spezifisch zu erachten und der Nachweis von endogen exprimiertem HAV-2B positiv.

3.6 Suppression der PRD III-I-abhängigen Luciferase-Expression

Da unsere Arbeitsgruppe parallel noch an der Aufklärung des Angriffspunktes von HAV in die zellulären Signalwege der IFN-β-Induktion arbeitete, konnten wir bereits zeigen, dass ein Angriffspunkt von HAV im Bereich der aktivierenden Signalkaskaden zum IRF-3, genauer gesagt zwischen RIG-I/MDA-5 und TBK1/IKKε, liegen muss. Somit muss ein mögliches virales Effektorprotein die Suppression der PRDIII-I-vermittelten Reportergenexpression bewirken.

3.6.1 Suppression der PRD III-I-abhängigen Luciferase-Expression durch HAV 2B

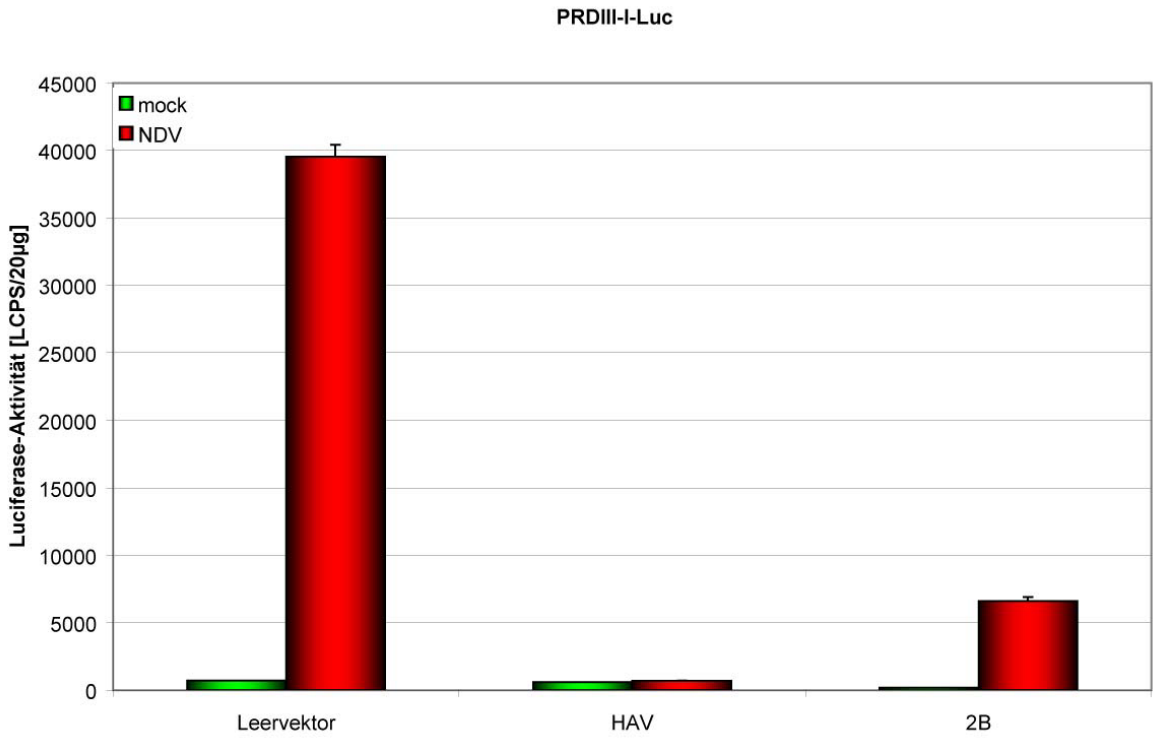


Abb. 17: Suppression der PRDIII-I-abhaengigen Luciferase-Expression durch HAV 2B. FRhK 4-Zellen wurden 10 Tage nach HAV/7-Infektion (MOI~1) bzw. Mock-Infektion in 6cm-Schalen umgesetzt. Am folgenden Tag wurde die Infektion per Immunfluoreszenztest kontrolliert und die Zellen mit 2 µg Leer- oder Expressionsvektor + 1 µg Reporterplasmid [$(PRDIII-I)_4$-Luc] transfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit NDV (MOI~0,1) infiziert und wiederum 18 h später durch freeze-thaw-lysis lysiert, um 100 µg Protein in den Luciferase-*Assay* einzusetzen. Die Abszisse repräsentiert die jeweilig exprimierten Proteine. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen.

Zunächst einmal sollte eine supprimierende Wirkung von 2B auf die PRD III-I-vermittelte Luciferase-Expression untersucht werden.
Zu diesem Zwecke wurden mock- oder 10 Tage mit HAV/7 infizierte (MOI~1) FRhK 4-Zellen in 6cm-Schalen umgesetzt. Die Transfektion (ca. 80% Konfluenz) erfolgte aufgrund der Änderung laborinterner Standards mit 1µg Reporterplasmid und 2 µg des jeweiligen Expressionsplasmides, wobei mit dem entsprechenden Leervektor die Gesamtmenge an transfizierter DNA auf 5µg aufgefüllt wurde. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Induktion mit Medium oder eine NDV-Infektion (MOI~0,1). So konnten weitere 18h später die Proteine per *freeze-thaw-lysis* extrahiert und 20µg in den *Luciferase-Assay* eingesetzt werden.
Das Ergebnis bestätigte die Befunde in Bezug auf die Reportergenexpression unter Kontrolle der PRD III-I, die bereits von unserer Arbeitsgruppe für HAV gezeigt werden konnten. Das Experiment zeigte deutlich, dass die alleinige Expression von 2B die PRD III-I-vermittelte Luciferase Expression um über 80% reduzierte und 2B damit dasselbe Verhalten wie eine HAV-Infektion aufwies (Abb. 17).

3.6.2 Suppression der RIG-I-induzierten IRF-3-Aktivierung durch HAV 2B

Retinoic acid-induced gene I (RIG-I) stellt einen intrazellulären dsRNA-Rezeptor dar, der mithilfe seiner C-terminalen Helicasedomäne ds RNA binden kann (siehe Einleitung Abb. 5). Die Signaltransduction, die zu einer Aktivierung von IRF-3 und somit der Transkription des IFN-β-Genes führt, wird über die N-terminale CARD-Domäne vermittelt. Ohne zusätzlichen Stimulus in Form von ds RNA kann durch Überexpression von RIG-I IFN-β induziert werden, was möglicherweise durch eine Oligomerisierung von RIG-I mitels CARD-Domäne ausgelöst wird. In einer parallel durchgeführten Doktorarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass HAV die durch Überexpression der zellulären RNA-Helikase RIG-I induzierte PRD III-I-vermittelte Reportergenexpression unterbinden kann. Somit galt es denselben Effekt auch für 2B zu zeigen, um es als mögliches Effektorprotein bestätigen zu können.
Wie im vorangegangen Experiment wurden 10 Tage mock- oder HAV/7 infizierte (MOI~1) FRhK 4-Zellen in 6cm-Schalen umgesetzt. 24 h später erfolgte die Transfektion (ca. 80 %ige Konfluenz) von 1 µg Reporterplasmid ($(PRDIII-I)_4$-Luc, 2 µg des entsprechenden viralen Expressionsplasmids (pI.18-P1, pI.18-P2, pI.18-2B) sowie zur Induktion 2 µg pEF-Flag-RIG-I bzw. als Negativkontrolle dessen Leervektor pEF-BOS. Da in diesem Experiment keine zusätzliche Induktion erfolgte, sondern diese durch die Überexpression von RIG-I ausgelöst

werden sollte, wurde bereits 24 h nach der Transfektion die Proteinextraktion per *freeze-thaw-lysis* durchgeführt. Anschließend wurden 20 µg Protein in den *Luciferase-Assay* eingesetzt.
Die Ergebnisse zeigten 2B als potenten Suppressor der RIG-I induzierten PRD III-I-vermittelten Reportergenexpression. Auch die partielle Reduktion durch das 2B beinhaltende Oligoprotein P2 deckte sich mit den bisherigen Ergebnissen (Abb. 18).

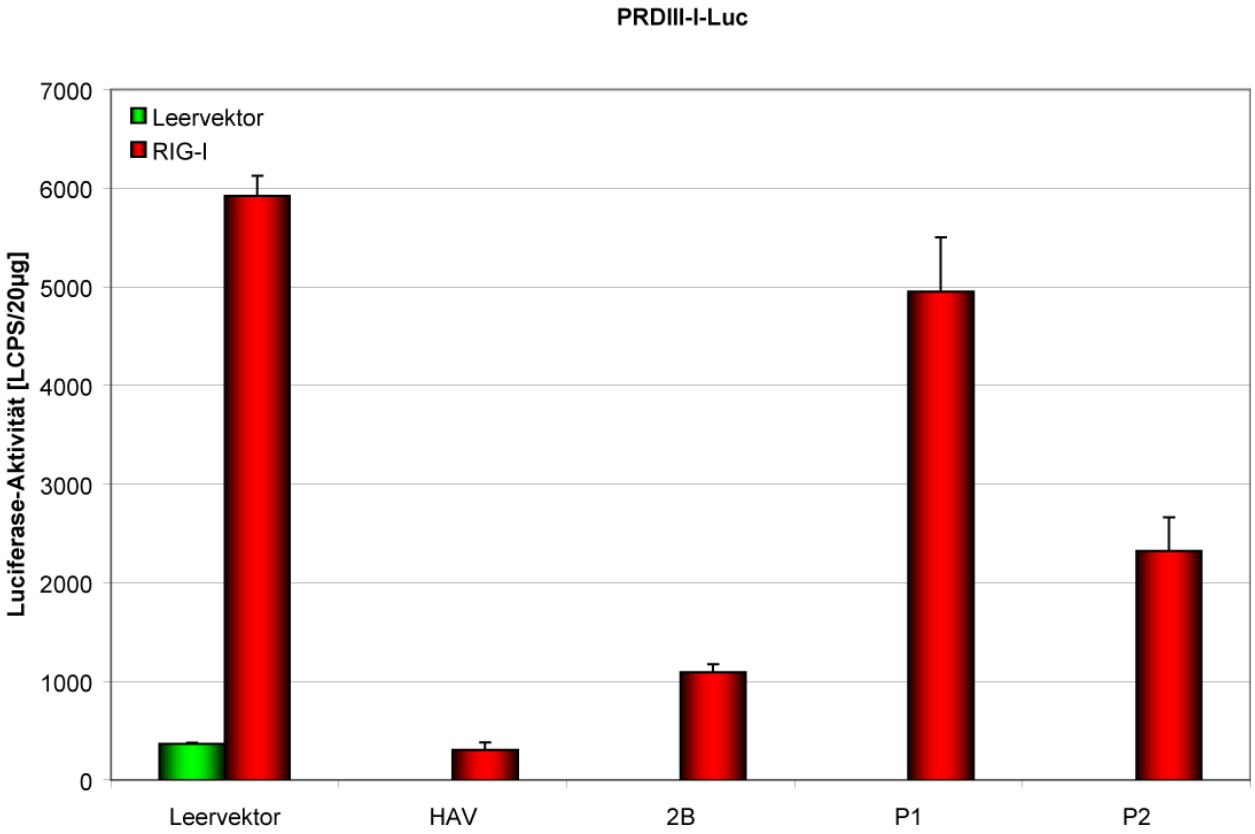


Abb. 18: Suppression der RIG-I-induzierten IRF-3-Aktivierung durch HAV 2B. FRhK 4-Zellen wurden 10 Tage nach HAV/7-Infektion (MOI~1) bzw. Mock-Infektion in 6cm-Schalen umgesetzt. Am folgenden Tag wurde die Infektion per Immunfluoreszenztest kontrolliert und die Zellen mit 2 µg Leer- oder Expressionsvektor, 2 µg RIG-I + 1 µg Reporterplasmid [$(PRDIII\text{-}I)_4$-Luc] transfiziert. 24 h später wurden die Zellen durch freeze-thaw-lysis lysiert, um 20 µg Protein in den *Luciferase-Assay* einzusetzen. Die Abszisse repräsentiert die jeweilig exprimierten Proteine. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das HAV Protein 2B dieselben supprimierenden Eigenschaften sowohl im Hinblick auf die IFN-β-Induktion als auch die IRF-3-abhängige Reportergenexpression wie das Virus selbst aufweist. Es ist daher der wahrscheinlichste Kandidat für eine Beeinflussung der zellulären Signalwege (vgl. Tab. 1).

4. Diskussion

Alick Issacs und Jean Lindenmann beschrieben im Jahre 1957 ein Makromolekül, das von Zellen der Chorioallantiosmembran sezerniert wurde, nachdem diese mit hitzeinaktiviertem Influenzavirus inkubiert worden waren. Es hatte die Eigenschaft mit der Replikation von Wildtyp-Influenzaviren zu interferieren und wurde dementsprechend Interferon genannt. Diese Entdeckung legte den Grundstein für die Erforschung der Induktion und der Wirkung der Interferone und in der Folge auch für die Wirkungsweise des unspezifischen Immunsystems (*67*). Während sich zu Anfang die Untersuchungen auf den zellulären Wirt beschränkten, folgte drei Jahre später, ebenfalls durch Jean Lindemann, die Beschreibung eines Phänomens, das „Inverse Interferenz“ genannt wurde (*89*). Hierbei handelte es sich um die fehlende Induktion von Interferon in der frühen Infektionsphase des Wildtyp-Influenzavirus und zudem der Blockade der Interferoninduktion bei gleich- oder nachzeitiger Infektion mit hitzeinaktiviertem Influenzavirus. Dadurch konnte erstmalig die aktive Suppression der Interferoninduktion durch ein Virus konstatiert werden. Seither sind eine Vielzahl viraler IFN-Suppressoren beschrieben worden, die auf ganz unterschiedliche Art und Weise die Inteferonexpression beeinflussen.

Das in dieser Arbeit untersuchte Hepatitis A-Virus induziert ebenfalls in Zellkultur keine Interferonsekretion. Erste Untersuchungen zeigten, dass die Suppression der IFN-Expression bereits auf transkriptioneller Ebene inhibiert wird, da in HAV-infizierten Zellkulturen nach poly(IC)-Transfektion keine mRNA für das IFN-β-Gen nachgewiesen werden kann (*19, 137*). Durch den Einsatz von Reporter-Transfektionsexperimenten, sowohl transient als auch stabil, konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass diese aktive Suppression nur im Bereich der PRDIII-I des humanen IFN-β-Enhancers erfolgt, während die PRDIV nicht negativ reguliert und die PRDII nach poly(IC)-Stimulus sogar verstärkt aktiviert wird (*15, 21*) . Infolgedessen wurde das Augenmerk verstärkt auf die PRDIII-I und den dort bindenden Transkriptionsfaktor IRF-3 gerichtet. Eine Doktorarbeit aus dem Jahre 2005 (*48*) befasste sich schließlich mit den Signalwegen, die zur IRF-3-Aktivierung führen (siehe auch Abb. 5). Die Ergebnisse jener Arbeit zeigen, dass die nucleäre Translokation von IRF-3 in HAV-infizierten Zellen blockiert wird und das virale *Target* vermutlich der RIG-I-Adapter MAVS ist (inzwischen bestätigt).

Die Eigenschaft, die IFN-Sekretion unterbinden zu können, ist für HAV von zentraler Bedeutung, da das IFN-sensitive Virus sehr langsam repliziert und somit besonders anfällig für eine Negativregulation der viralen Replikation durch das unspezifische Immunsystem ist.

Infolgedessen wäre eine produktive Infektion des Hepatitis A-Virus vor der Etablierung einer spezifischen Immunantwort nicht gewährleistet, so dass die aktive Suppression der IFN-β-Induktion auch *in vivo* eine probate Möglichkeit ist, das unspezifische Immunsystem bis zum Einsetzen der spezifischen Immunantwort zu unterwandern, um schließlich die eigene Replikation zu gewährleisten.
Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, ein verlässliches Expressionssystem für die einzelnen HAV-Proteine zu entwickeln und über Reporter-Transfektionsexperimente die Proteine bezüglich ihrer supprimierenden Eigenschaften auf die IFN-β-Induktion zu untersuchen. Bestenfalls ließe sich ein einzelnes Protein identifizieren, das diese Suppression vermittelt.

Bevor mit den Reporter-Transfektionsexperimenten begonnen werden konnte, wurde zunächst einmal ein geeigneter Expressionsvektor gesucht. Bisherige Untersuchungen, bei denen HAV-Proteine in eukaryotische Zellen eingebracht wurden, verwendeten entweder Vaccinia-Virus-basierte Expressionssysteme oder es wurden *in vitro* Transkripte oder *in vitro* Translate transfiziert. Verschiedene Proteine des Vaccinia-Virus beeinflussen allerdings die IFN-β-Expression. So bindet E3L zum einen dsRNA und maskiert diese für RIG-I und MDA-5 (*120, 144*), so dass keine IRF-3 Aktivierung durch dsRNA als Induktor der IFN-β-Expression erfolgen kann und zum anderen inaktiviert es das 2-5' Oligoadenylatsystem (*112*). Die Reportergenexpression über dsRNA in Form des dsRNA-Analogons poly(IC) oder des dsRNA-Replikationsintermediates bei einer NDV-Infektion zu induzieren war allerdings für die in dieser Arbeit durchgeführten Reportergen-Transfektionsexperimente essentiell. Des Weiteren bindet N1L TBK-1 (*34*), welches einen Bestandteil des VAK-Komplexes darstellt und interferiert so ebenfalls direkt mit der IFN-β-Expression. K3L hingegen kann die PKR direkt binden und somit inaktivieren (*16, 17*). Für eine handvoll weiterer Proteine sind zudem Beeinflussungen nicht direkt an der IRF-3-Aktivierung beteiligter zellulärer Faktoren beschrieben, so dass indirekte Beeinflussungen der IFN-β-Expression nicht ausgeschlossen werden können. Zudem kam der Einsatz von rekombinantem Vaccinia-Virus aufgrund des, durch die Eradikation der Pocken Ende der 70er Jahre hervorgerufenen, mangelnden Impfschutzes nicht in Frage und da die Transfektion von *in vitro* hergestellten Transkripten oder Translaten sehr störungsanfällig ist, sollte schlussendlich ein kommerzieller Expressionsvektor zum Einsatz kommen. Dieser sollte unter anderem einen CMV-Promotor und eine Ampicillin-Resistenz beinhalten sowie die Möglichkeit offerieren, einklonierte Proteine mit einem Tag versehen zu können. Die Klonierung der viralen Expressionsplasmide erfolgte daher auf Basis des Vektors pcDNA3.1/myc-His der Firma Invitrogen, der alle zuvor genannten Anforderungen erfüllte.

Die Infektion unterschiedlichster Zellkulturen (FRhK-4, MRC-5, U937, HepG2) mit HAV resultiert in einer Suppression der IFN-β-Expression auf Transkriptionsebene (*15, 19, 93*). Untersuchungen, die dieses Phänomen beschreiben, wurden vor Beginn dieser Arbeit immer mittels Infektion eines replikationskompetenten Virus durchgeführt. Die Frage nach der Notwendigkeit der Replikation blieb hingegen unbeantwortet. Daher wurde eine *full length* cDNA Variante namens pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ kloniert, bei der 5'-terminal 351 Basenpaare deletiert wurden; mit dem Ergebnis, dass die erste Hälfte der 5'-terminal gelegenen IRES-Struktur fehlt, mit der auch die Bindestelle für das VPg entfernt wurde, das wiederum einen Primer für die Vervielfältigung der viralen mRNA darstellt. Folglich ist eine Replikation des Virus unterbunden und es werden keine infektiösen Virionen gebildet (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis zeigte, dass eine Replikation für die Suppression der IFN-β-Enhancer-abhängigen Reportergenexpression nicht nötig war (Abb. 7). Die alleinige Anwesenheit von viralen Proteinen reichte aus, um die NDV-induzierte IFN-β-Enhancer-abhängige CAT-Expression zu supprimieren. Daher galt es durch den Einsatz von Expressionsplasmiden für die viralen Proteine zunächst die Funktion der einzelnen Bestandteile des HAV-Polyproteins zu untersuchen. Zudem stellte sich die Frage, ob die Unversehrtheit des Polyproteins bei der Suppressison zwingend ist. Denkbar hierfür wäre eine kontextabhängige Spaltung des viralen Polyproteins durch die virale Protease 3C. Die Zerlegung des HAV-Polyproteins in die drei genomischen Teilbereiche und deren anschließende Cotransfektion sollte dieser Fragestellung Rechnung tragen. Das Ergebnis zeigte, dass die Transfektion der Deletionsmutante pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ die IFN-β-Enhancer-abhängige CAT-Expression vollständig supprimiert (Abb. 7 und 8). Die Cotransfektion der genomischen Teilbereiche von HAV P1, P2 und P3 ergab ebenfalls eine Suppression, wenngleich diese auch schwächer ausgeprägt war. Mit Blick auf das Transfektionsreagenz jetPEI ist wichtig zu erwähnen, dass bereits gezeigt werden konnte, dass bei einer Cotransfektion mehrerer Plasmide die transfizierten Zellen immer alle transfizierten Plasmide beinhalten. Sie ist daher als strikt anzusehen (*48*). Somit ist auszuschließen, dass bei der Cotransfektion mehrerer Expressionsplasmide die transfizierten Zellen nicht alle gewünschten Plasmide (Reporter- und Expressionplasmide) enthalten und es so zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen kommt. Die Tatsache, dass die Suppression der CAT-Expression, die durch die Transfektion von pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ vermittelt wird, um so viel stärker ausfällt als bei der Cotransfektion von P1, P2 und P3, kann zwei Ursachen haben: Zum einen wird bei pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ ein Polyprotein exprimiert und nicht wie bei der Cotransfektion voneinander getrennte Teilbereiche. Sollte die Funktion der viralen Protease 3C

kontextabhängig sein, so ist vorstellbar, dass das bei der Transfektion von pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ entstehende Polyprotein durch die virale Protease 3C in Vorläuferproteine prozessiert wird, die eine stärkere supprimierende Wirkung als die voneinander getrennten genomischen Teilbereiche P1, P2 und P3 aufweisen. Zum anderen handelt es sich bei pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ und den pcDNA3.1/myc-His basierten Expressionsvektoren um Plasmide mit unterschiedlicher Basis, die bei gleicher DNA Menge in ihrer Expressionseffizienz variieren können, obwohl beide den gleichen CMV-Promotor beinhalten. Festzuhalten bleibt, dass eine Replikation von HAV für die Suppression der IFN-β-Expression nicht erforderlich ist und diese auch bei der Transfektion viraler Expressionsplasmide auftritt.

Infolge der neu gewonnen Erkenntnisse bezüglich der replikationsunabhängigen Suppression der IFN-β-Expression ging es um die Klärung der Frage nach der Notwendigkeit der Prozessierung des HAV-Polyproteins durch die virale Protease 3C. Die unterschiedlichen Ausprägungen der Suppression lassen diese Notwendigkeit zunächst vermuten, da eine kontextabhängige Prozessierung durch 3C wahrscheinlich ist.
Zu diesem Zweck wurden zusätzlich zu der Transfektion von pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ und der Cotransfektion der P1, P2 und P3 die genomischen Teilbereiche einzeln transfiziert. Somit waren die P1 und die P2 unzugänglich für die virale Protease, da diese nur in der P3 enthalten war. Die Ergebnisse dieses Experiments bestätigten zunächst einmal die zuvor gemachten Erkenntnisse hinsichtlich pCMV-HAV/$7_{\Delta 1\text{-}351}$ und der Cotransfektion (Abb. 8 und 9). Verblüffend war allerdings, dass die Suppression nicht wie evtl. anzunehmen durch die P3 mit der darin enthaltenden viralen Protease vermittelt wurde. Die P2-Region hingegen zeigte dieselbe Suppression der IFN-β-Expression, wie es bereits die Cotransfektion aller drei genomischen Teilbereiche von HAV vermittelte (Abb. 9). Dieses Ergebnis ist umso erstaunlicher, da eine Prozessierung der P2 ohne die virale Protease 3C nach dem momentanen Verständnis einer HAV-Infektion nicht logisch erscheint, zumal bei bisherigen Untersuchungen keine zelluläre Protease beschrieben wurde, die diese Funktion übernehmen könnte. Plausibel erscheint jedoch, dass die Spaltung der P2 gar nicht erforderlich ist, um eine Suppression der IFN-β-Expression zu vermitteln. Das Oligoprotein P2, bestehend aus den Nichtstrukturproteinen 2A, 2B und 2C, könnte unprozessiert den supprimierenden Effekt vermitteln. Denkbar sind hier sowohl enzymatische Funktionen, die zur Spaltung oder Degradierung eines an der IFN-β-Expression beteiligten zellulären Proteins führen als auch Protein-Protein-Interaktionen, die dessen Funktion durch direkte Bindung negativ beeinflussen.

Um das Oligoprotein P2 aufgrund seiner supprimierenden Eigenschaft genauer zu untersuchen, wurde es in seine Unterproteine zerlegt und diese ebenfalls in Expressionvektoren kloniert. Hierbei handelte es sich um die Proteine 2A, 2B und 2C sowie 2AB und 2BC, die in der P2 benachbart vorliegen. Anzumerken bleibt, dass 2AB und 2BC bei bisherigen Untersuchungen nicht als Replikationsintermediat detektiert wurden. Zudem liegt 2A vermutlich mit VP1 assoziiert vor und spielt eine entscheidende Rolle bei der Reifungsspaltung von HAV (*110, 111*). Die genomischen Teilbereiche P1 und P3 wurden im Rahmen von Projektarbeiten (vom Autor betreut) ebenso zerlegt und ausgetestet, zeigten jedoch auch in prozessierter Form keine Suppression der IFN-β-Expression (Tab. 1).
Die Ergebnisse der Reportergen-Transfektionsexperimente mit den untergeordneten P2-Proteinen ergaben zunächst, dass die Proteine 2A und 2C keinerlei supprimierende Eigenschaft besitzen (Abb. 10 und 11). Allerdings gewannen sie diese in Kombination mit 2B, als 2AB und 2BC hinzu (Abb. 11 und 12). Die stärkste und damit mit einer HAV-Infektion identische Wirkung vermittelte 2B allein (Abb. 10 – 12). Daher ist davon auszugehen, dass die supprimierende Wirkung von 2AB und 2BC durch 2B vermittelt wurde, denn die Kombination mit 2A und 2C hatte eine Abschwächung der Suppression im Vergleich zu 2B allein zur Folge. Im Gegenzug ermöglichte 2B allerdings erst die supprimierende Eigenschaft von 2AB und 2BC.
Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass HAV-2B ein potentielles Effektorprotein für die Suppression der IFN-β-Expression darstellt.

Bei allen bisherigen Experimenten kamen Expressionsplasmide zum Einsatz, die auf Basis des pcDNA3.1/myc-His kloniert wurden. Diese wiesen je nach Protein reproduzierbare supprimierende Eigenschaften auf. Allerdings fehlte bei allen Experimenten der Expressionsnachweis der eingebrachten Proteine. Dieser sollte per Immunoblot gegen das potentielle Effektorprotein erfolgen, weshalb die Proteinextrakte aller Experimente aufgehoben wurden. Der entsprechende Antikörper für den Nachweis per Immunoblot sollte nach der Identifikation eines potentiellen Kandidaten in Auftrag gegeben werden. Unsere Arbeitsgruppe besitzt allerdings ein polyklonales α-VP1-Serum, weshalb die Expressionseigenschaften des verwendeten Vektors anhand der Expression von VP1 durch pcDNA3.1-VP1 überprüft werden sollten. Ein allerdings erfolgloses Vorhaben, da sich das Protein VP1 zwar im Laufe einer HAV-Infektion in FRhK-4 Zellen deutlich nachweisen ließ, dieses per Expressionsplasmid allerdings nicht gelang (Ergebnisse nicht gezeigt). Offensichtlich war die Expressionsrate des pcDNA3.1/myc-His für eine funktionelle Suppression der IFN-β-Expression ausreichend, für den Nachweis per Immunoblot aber zu gering. Dadurch wäre ein nachträglicher Nachweis der

Proteinexpression vermutlich nicht möglich gewesen. Aus diesem Grund wurden die Erfahrungen einer Freiburger Arbeitsgruppe mit dem Expressionsvektor pI.18 genutzt, der zwischen Promotor und *multiple cloning site* (MCS) eine von zwei Exon Sequenzen (Splice-Donor/Akzeptor) flankierte Intron A Sequenz enthielt, die im Zuge der mRNA-Reifung herausgeschnitten wird (RNA-Splicing), was zu einer erheblichen Steigerung der Expressionsraten führt (persönl. Mitteilung G. Blakqori). Folglich wurde zunächst die cDNA für VP1 in pI.18 umkloniert, um eine effizientere Expression der viralen Proteine und somit einen Nachweis per Immunoblot zu überprüfen. Hierzu konnte die in den pcDNA3.1/myc-His inserierte Sequenz aus dem bestehenden VP1 Expressionsplasmid herausgeschnitten und in den pI.18 fusioniert werden, da auch der pI.18 in der MCS die Schnittstellen für KpnI und EcoRV besitzt. Das Ergebnis des Immunoblots mit α-VP1-Antikörper bestätigte deutlich die für pI.18 postulierten hohen Expressionsraten am Beispiel von VP1, das per pI.18-VP1 exprimiert wurde, während der Nachweis per pcDNA3.1-VP1 erneut erfolglos blieb (Abb. 13). Um einen späteren Nachweis eines Effektorproteins aus den gesammelten Proteinextrakten zu ermöglichen, wurden die inserierten cDNA Sequenzen für P1, P2 und P3 sowie für 2B aus den bestehenden HAV-Expressionsplasmiden auf Basis des pcDNA3.1/myc-His herausgeschnitten und in den pI.18 einkloniert. Bei den nachfolgenden Experimenten fanden lediglich Expressionsvektoren auf Basis des pI.18 Verwendung.

Im Immunoblot zeigten sich bereits die hervorragenden Expressionseigenschaften des pI.18. Funktionell lagen allerdings noch keine Ergebnisse für den pI.18 vor, weshalb die bisher gemachten Erkenntnisse, die HAV-2B als potentielles Effektorprotein aufzeigten, mit pI.18-basierten Expressionsplasmiden bestätigt wurden (Abb. 14). Die Transfektion von pI.18-2B supprimierte die IFN-β-abhängige CAT-Expression, analog zu der HAV-Infektion, nahezu vollständig. Die Cotransfektion der genomischen Teilbereiche P1, P2 und P3 reduzierte die Reportergenexpression um etwa 50 %. Noch zuvor war bei der Verwendung der pcDNA3.1/myc-His basierten Expressionsplasmide die Suppression zwar erkennbar, aber eine fünfzig prozentige Reduktion konnte bei den Versuchsansätzen nie erreicht werden. Beides bestätigt die hervorragenden Expressionseigenschaften des pI.18-Vektors, die sich nicht nur im Immunoblot, sondern auch auf funktioneller Ebene widerspiegeln.

Um ausschließen zu können, dass die starke Expression durch Überlastung der zellulären Translationsmaschinerie zu einem reduzierenden Effekt führte (Kompetition) und damit unspezifisch wäre, wurde die Cotransfektion von P1, P2 und P3 durch die Transfektion von

pI.18-VP1 ersetzt. Für das Strukturprotein wurde bereits gezeigt, dass es keine supprimierenden Eigenschaften hinsichtlich der hier untersuchten Reportergenexpressionen besitzt (Tab. 1). Die Ergebnisse bestätigten die zuvor gemachten Daten. Während die Expression des Strukturproteins VP1 zu keiner Reduktion der IFN-β-Enhancer-abhängigen Luc-Expression führte, supprimierten sowohl eine HAV-Infektion als auch die Transfektion des Expressionsplasmides für das Nichtstrukturproteins 2B die Reportergenexpression nahezu vollständig (Abb. 15). Somit konnte am Beispiel von VP1 ausgeschlossen werden, dass die Suppression falsch positiv war, da die alleinige Expression eines Proteins keine Kompetition der an der Translation beteiligten Komponenten in Bezug auf die Reportergenexpression nach sich zog. Durch Cotransfektion von pHcRed-Tandem-N1 und HAV-2B konnte außerdem ausgeschlossen werden, dass HAV-2B die zelluläre Proteinbiosynthese der transfizierten Zellen supprimiert, da keine Unterschiede in der HcRed-Expression zwischen HAV-2B und nicht HAV-2B-transfizierten Zellen erkennbar waren (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch zeigten sich keine Vitalitätsunterschiede zwischen HAV-2B transfizierten und nicht-transfizierten Zellen, die auf eine Inhibition der zellulären Proteinbiosynthese rückschließen lassen hätten. Daher handelte es sich bei der Suppression der IFN-β-Enhancer-abhängigen Reportergenexpression um einen, von 2B vermittelten - und in der Ausprägung ebenso starken - spezifischen Effekt, wie er auch bei einer HAV-Infektion auftritt.

Parallele Arbeiten wiesen bereits nach, dass HAV die transkriptionale Aktivität von IRF-3 inhibiert (*8, 48, 75*). Daher galt es zu untersuchen, ob die supprimierende Eigenschaft von 2B auch bei der PRDIII-I-abhängigen Reportergenexpression auftritt. Diese *Positive regulatory domain* (PRD) ist der mittig gelegene Teil des humanen IFN-β-Enhancers und bildet die Bindungsstelle für aktiviertes IRF-3 (vgl. Abb. 3). Zu diesem Zweck wurde Leervektor oder pI.18-2B in FRhK-4 Zellen transfiziert. Die Positivkontrolle für die Suppression stellten für 10 Tage HAV-infizierte FRhK-4 Zellen dar, die lediglich mit Leervektor transfiziert wurden. Die Verwendung von bereits seit 10 Tagen mit HAV-infizierten Zellen wurde notwendig, da die Reporterkonstrukte mit Luciferase-Gen die beste Funktion aufwiesen, wenn zwischen Transfektion und Induktion maximal 24 h lagen. Die zuvor eingesetzten und aufgrund eines laborinternen Wechsels der Reportergennachweisverfahren nun nicht mehr verwendeten CAT-Reporterplasmide zeigten auch noch 48 h nach der Transfektion eine gute Induzierbarkeit. Somit war eine HAV-Infektion am Tag nach der Transfektion für den CAT-Nachweis praktikabel, allerdings für die Luciferase-Reporterplasmide nicht mehr möglich. Zudem war die Transfektionseffizienz, die mit jetPEI erzielt wurde, stark von einer zeitlichen Nähe zum Umsetzen der Zellen abhängig. Daher wurden die FRhK-4 Zellen für die Experimente 10 Tage

vor dem eigentlichen Experiment mit HAV infiziert, um diese für die Transfektion frisch umsetzen zu können; ein Umsetzen dieser Zellen sollte nicht zweimal innerhalb von einer Woche erfolgen. Die Veränderungen in der zeitlichen Abfolge sorgten für das optimale Vorgehen. Das Ergebnis bestätigte die zuvor mit dem Gesamtenhancer gemachten Ergebnisse, da 2B auch die PRDIII-I-abhängige Reportergenexpression nahezu vollständig supprimierte (Abb. 17). Die HAV-Infektion zeigte hierbei einen noch stärkeren supprimierenden Effekt, allerdings hatte HAV im Vergleich zu den vorherigen Experimenten auch eine Woche länger Zeit, um zu replizieren, weshalb eine höhere Anzahl viraler Proteine im Vergleich zu den vorherigen Experimenten mit HAV-Infektion in der Zelle vorlag. Somit war nicht zu erwarten, dass die achtundvierzigstündige Expression via Expressionsplasmid zu einer in ihrer Ausprägung mit HAV identischen Suppression führe. Allerdings entsprach sie im Vergleich zum Leervektor einer fast 90 prozentigen Suppression, was für die enorm starke Expression durch den pI.18-2B spricht und ein weiteres Mal deutlich für 2B als Effektorprotein sprach.

Als letzte funktionelle Untersuchung wurde die Fähigkeit von 2B zur Suppression der RIG-I-induzierten IRF-3 Aktivierung durchgeführt. Grundlage hierfür stellten Ergebnisse einer parallelen Doktorarbeit dar, die zeigen konnte, dass die Überexpression der RNA-Helicas RIG-I sowohl zu einer starken IFN-β-Enhancer- als auch einer PRDIII-I-Induktion führte, die ebenso wie eine poly(IC)-Transfektion oder NDV-Infektion vollständig von HAV supprimiert wurde (*48*). Diese Induktion zu supprimieren, war ein weiteres Kriterium, das ein potentielles Effektorprotein zu erfüllen hatte. Daher wurde der Effekt einer Überexpression von RIG-I auf die PRDIII-I-abhängige Luciferase-Expression in FRhK-4 Zellen untersucht. Wie zu erwarten war, bestätigten sich auch hierbei die Erwartungen und die Ergebnisse, die bisher in dieser Arbeit gewonnen wurden (Abb. 18). Die Überexpression von RIG-I resultierte in einer robusten Luciferase-Expression, die von HAV vollständig supprimiert wurde. Der genomische Teilbereich P1 hingegen supprimierte diese kaum, während die HAV-2B beinhaltende P2-Region eine über fünfzigprozentige Reduktion aufwies. Dieses Ergebnis hinsichtlich der P2 deckte sich mit der Untersuchung der Cotransfektion aller drei genomischen Teilbereiche (Abb. 17), wobei davon auszugehen ist, dass der dort auftretende Effekt auch auf die P2 zurückzuführen war. HAV-2B supprimierte sowohl die IFN-β- als auch die PRDIII-I-abhängige Reportergenexpression deutlich, insbesondere mit pI.18-basierten Expressionsplasmiden konnte eine nahezu vollständige Suppression nachgewiesen werden.
Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass nach Abschluss aller Reporter-Transfektionsexperimente das HAV-Nichtstrukturprotein 2B dieselben supprimierenden

Eigenschaften im Hinblick auf die IFN-β-Induktion aufwies wie das Virus selbst. Infolgedessen ist es der wahrscheinlichste Kandidat für eine Beeinflussung der zellulären Signalwege, die zur IFN-β-Genexpression führen.

Nachdem alle erzielten Ergebnisse für 2B als Effektorprotein für die Suppression der IFN-β-Enhancer- und auch PRDIII-I-abhängigen Genexpression sprachen, wurde ein Antikörper gegen HAV-2B bei der Firma Genovac (Freiburg) in Auftrag gegeben, um einen Expressionsnachweis per Immunoblot für 2B durchführen zu können. Es handelte sich dabei um ein polyklonales α-HAV-2B Serum. Hierfür wurden 2 Kaninchen mit einem Peptidmix aus jeweils 2 Peptiden immunisiert. Die beiden Peptide wurden aufgrund ihrer potentiellen Antigenität von einem speziellen Computerprogramm ausgewählt. Peptid 1 umfasste dabei die Aminosäuren 55-68 von HAV-2B, Peptid 2 hingegen umspannte die Aminosäuren 98-111. Die Testung auf Antikörper erfolgte per ELISA gegen die Peptide. Nach 6 Wochen wurde erneut Blut entnommen und per ELISA getestet. Weitere 3 Wochen später wurden die Tiere mit einer abschließenden Bestimmung des Antkörpertiters per ELISA-Test ausgeblutet. Diese Antikörper kamen dann bei Immunoblots zum Einsatz, deren Ziel der Nachweis von HAV-2B gewesen ist und die sich methodisch an dem Nachweis von VP1 per Western-Blot orientierten (vgl. 3.2). Allerdings gelang der Nachweis in keinem der Experimente. Die Proteinextrakte der mit pI.18-2B transfizierten FRhK-4 Zellen zeigten dasselbe Bandenmuster wie die mit Leervektor transfizierten (Daten nicht gezeigt). Ebenso war kein Unterschied zwischen dem Nullserum und den mit Antikörper behandelten Proteinlysaten zu erkennen. Das Auftreten einer spezifischen Bande von 28 kDa Größe war nicht gegeben. Hierfür sind verschiedene methodische Gründe anzunehmen; die falsche Antikörperkonzentration, eine zu gering eingesetzte Proteinmenge oder die fehlerhafte Blockierung unspezifischer Bindestellen. Die Verdünnung der α-2B-Antiseren variierte in den verschiedenen Immunoblots von 1:100 bis 1:1000, wobei das dabei entstandene unspezifische Bandenmuster in allen Fällen ausgeprägt und gut erkennbar war. Zusätzlich zu 2B wurde bei allen Immunoblots auch Proteinextrakt von FRhK-4 Zellen aufgetragen, die mit pI.18-VP1 transfiziert wurden, um per α-VP1 Antikörper exprimiertes VP1 nachzuweisen. Dieses wurde als Vergleich mitgeführt, um zum einen die korrekte Funktion des Immunoblots zu überprüfen und zum anderen VP1, das eine Größe von etwa 30 kDa besitzt, als zusätzlichen Größenmarker fungieren zu lassen. Die eingesetzten Verdünnungen der Antikörper waren äquivalent und im Gegensatz zum 2B-Nachweis waren alle VP1-Nachweise positiv. Die eingesetzten Proteinmengen betrugen 50 und 75 µg. Wie im Falle der Antiserenverdünnungen waren die VP1-Nachweise positiv, das Bandenmuster des α-2B Immunoblots hingegen war

identisch und variierte lediglich in der Intensität (Daten nicht gezeigt). Um den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren, wurden Blockierungen von 5h und über Nacht durchgeführt, wobei keine Änderung des Bandenmusters eintrat. Die Erhöhung der Waschschritte vor der Auswertung sowie deren Verlängerung resultierten in einer vollständigen Entfernung der gebundenen Antikörper, ob spezifisch oder unspezifisch, sodass keinerlei Banden mehr erkennbar waren. In diesem Zusammenhang wurde auch die Expositionsdauer der Nitrozellulosemembranen mit den Photofilmen von fünfzehn Sekunden bis zwei Minuten variiert, was allerdings nur zu einer Erhöhung der Intensität aller Banden mit zunehmender Expositionsdauer führte (Daten nicht gezeigt). Somit ist zunächst festzuhalten, dass die Änderungen der experimentellen Bedingungen die Nachweisbarkeit von VP1 im Immunoblot nur negativ beeinflussen, wenn eine Verlängerung der Waschritte vor der Exposition der Membranen mit dem Lumineszenzsubstrat für die HRP erfolgte. In allen anderen Fällen war die Expression des Strukturproteins nachweisbar. Im Gegensatz hierzu ließ sich 2B nie detektieren, ebenso unverändert blieb der unspezifische Hintergrund. Es war daher anzunehmen, dass das polyklonale α-2B-Antiserum die Peptide, gegen die es gerichtet ist, zwar im ELISA-Test erkennen und binden kann, dieses allerdings im Immunoblot mit dem gesamten Protein nicht funktioniert.

Um die Möglichkeit einer mangelnden Antikörper-Antigen-Bindung zu überprüfen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz pI.18-2B transfizierter FRhK-4 Zellen durchgeführt. Die transfizierten Mengen und die Dauer des Experimentes entsprachen zu Vergleichszwecken den experimentellen Bedingungen der Reporter-Transfektionsexperimente, wobei pHcRed-Tandem das Reporterplasmid ersetzte. Es diente zur Lokalisation der mit pI.18-2B transfizierten Zellen, da, wie zuvor beschrieben, die Transfektion mehrerer Plasmide mit dem Transfektionsreagenz jetPEI strikt ist. Die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenzen zeigten deutlich, dass HAV-2B in FRhK-4 Zellen exprimiert wird (Abb. 16). Die Grünfluoreszenz des FITC-markierten sekundären Antikörpers hob sich deutlich vom unspezifischen Hintergrund ab. Zudem war zu beobachten, dass innerhalb des Cytoplasmas granuläre Strukturen auftraten, in denen vermehrt HAV-2B gebunden wurde. Insbesondere in unmittelbarer Nähe des Zellkerns befand sich viel Antigen, wobei im Zellkern selbst kein HAV-2B nachzuweisen war. Auszuschließen war demnach, dass das polyklonale α-2B-Antiserum HAV-2B nicht binden kann. Somit musste für die fehlende Nachweisbarkeit im Immunoblot eine andere Ursache als eine mangelnde Antikörper-Antigen-Bindung verantwortlich sein.

Weshalb also konnte HAV-2B zwar in der indirekten Immunfluoreszenz jedoch nicht im Immunoblot nachgewiesen werden? Um dieser Frage nachzugehen gibt es zunächst einmal zwei grundsätzlich verschiedene Annahmen zu betrachten.

Die erste setzt voraus, dass das α-2B-Antiserum das Antigen zwar gebunden hat, dieses allerdings nicht bei der zu erwartenden Größe von 28 kDa nachzuweisen war. Hierfür sind mehrere Szenarien denkbar. Eine Di- oder Oligomerisierung des HAV-2B-Proteins nach der Translation würde die nachzuweisenden Bande auf das Doppelte bzw. Vielfache von 28 kDa anheben. Da der unspezifische Hintergrund bei höheren Proteinmassen stärker ausgeprägt war, könnte diese Bande im „Proteinrauschen“ untergegangen sein. Betrachtet man allerdings die immense Stärke der Expression von HAV-2B in der indirekten Immunfluoreszenz, so sollte eine durch Di- oder Oligomerisierung verschobene Bande dennoch aus dem Hintergrund hervortreten. Auch eine potentielle Protein-Protein-Interaktion von HAV-2B mit einem zellulären Protein kann aus dem gleichen Grund ausgeschlossen werden, da keine Unterschiede zwischen den Proteinextrakten der mit Leervektor und der mit pI.18-2B transfizierten FRhK-4-Zellen festzustellen waren.

Die zweite Theorie betrachtet die Gründe, die zu einer mangelnden Antikörper-Antigen-Bindung im Immunoblot geführt haben könnten. Die Inkubationsbedingungen wie pH-Wert, Salzkonzentration, Temperatur und Inkubationszeit unterscheiden sich im Immunoblot grundlegend von denen der indirekten Immunfluoreszenz und haben starke Auswirkungen auf Affinität und Avidität des Antikörperserums. Daher besteht die Möglichkeit, dass das Antkörperserum den Nachweis in der indirekten Immunfluoreszenz zwar ermöglicht, ihn im Immunoblot aufgrund einer geänderten Affinität allerdings ausschließt. Die fehlende Affinität könnte allerdings auch eine andere Ursache haben; die Immunisierung der Kaninchen erfolgte mit zwei Peptiden von jeweils 14 Aminosäuren Länge, die, wie bereits dargelegt, aufgrund ihrer potentiellen Antigenität ausgewählt wurden. Das HAV-Protein 2B hat eine Gesamtlänge von 251 Aminosäuren; somit machen die antigenen Bereiche jeweils etwa 6,5 % der Gesamtlänge des nachzuweisenden Proteins aus. In der indirekten Immunfluoreszenz war deutlich zu erkennen, dass dieses für eine spezifische Erkennung des Antigens via Antikörper ausreichend ist. Allerdings galt dieses nicht für den Immunoblot. Zunächst einmal liegen bei einem Immunoblot, bei dem die Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt werden, andere Inkubationsbedingungen vor. Die SDS-PAGE ist denaturierend für Proteine, sodass nach der Auftrennung der Proteine eine Renaturierung durchgeführt werden musste, die vorher vorhandene Sekundär und Tertiärstrukturen der aufgetrennten Proteine wiederherstellen sollte. Antikörper, die gegen die Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins gerichtet sind binden nach der Denaturierung

oftmals schlechter, da die Renaturierung der Proteine auf der Membran durch Entfernen des Natriumdodecylsulfats nicht immer gelingt. Normalerweise stellt dieses eher bei monoklonalen Antikörpern ein Problem dar, die alle gegen dasselbe Epitop einer Sekundär- oder Tertiärstruktur gerichtet sind. Die in dieser Arbeit eingesetzten polyklonalen α-2B-Antiseren waren gegen zwei Peptide gerichtet, die jeweils nur etwa 6,5 % (13 % im Antiserum) des nachzuweisenden Proteins ausmachten. Der antigene Bereich lag damit bei zweimal 14 Aminosäuren. Bedenkt man nun, dass ein Antigen eine Mindestgröße von etwa 4-8 Aminosäuren besitzt (etwa 990 Da), so existieren je Peptid nur maximal zehn Antigene. Da sich die Inkubationsbedingungen wie pH-Wert, Salzkonzentration, Temperatur und Inkubationszeit grundlegend von denen der indirekten Immunfluoreszenz unterscheiden, könnten sich Sekundärstrukturen ausbilden, die nicht denen der Immunfluoreszenz entsprechen. So könnten die kurzen antigenen Bereiche für die Antikörperbindung unzugänglich sein. Diese These wird zudem von aktuellen Untersuchungen der Arbeitsgruppe Vallbracht im Rahmen einer Diplomarbeit gestützt, die *in vitro* translatiertes HAV-2B mittels des polyklonalen α-2B-Antiserums im Western-Blot nachweisen sollte und bisher ebenfalls erfolglos blieben (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren zeigen Publikationen, dass HAV-2B mit Membranen assoziiert in der Zelle vorliegt (*58*). Diese Membranassoziation könnte ebenfalls der Grund für die mangelnde Nachweisbarkeit von HAV-2B im Immunoblot sein. Sollte das exprimierte Protein unmittelbar nach der Translation in zelluläre Membranen integrieren, so würde es bei der Proteinextraktion mit der unlöslichen Fraktion abzentrifugiert und könnte dementsprechend in der löslichen Fraktion nicht detektiert werden. Somit wäre eine Antikörper-Antigen-Bindung unmöglich. Dennoch ist anzunehmen, dass HAV-2B vor der Integration frei im Cytoplasma vorliegt und zumindest diese Fraktion im Immunoblot nachweisbar wäre. Um dieser Möglichkeit Rechnung zu tragen, wurden für die Proteinextraktion der transfizierten Zellen unterschiedliche Methoden angewandt. Zusätzlich zur *freeze-thaw-lysis* kamen unterschiedliche Lysepuffer zum Einsatz, mit dem Ergebnis, dass HAV-2B auch bei diesen Immunoblots nicht nachzuweisen war.

Woran letztendlich die mangelnde Nachweisbarkeit von HAV-2B im Immunoblot gelegen hat ist nicht bekannt und bedarf der weiteren Klärung in nachfolgenden Arbeiten. Zudem ist es zwingend notwendig, einen pI.18-basierten Expressionsvektor zu konstruieren, der die Möglichkeit bietet das zu exprimierende Protein mit einem C-terminalen *tag* zu markieren, um ein Standardnachweisverfahren per Immunoblot etablieren zu können.

Betrachtet man den Stand der Forschung zu Beginn dieser Arbeit (Abb. 5), so ist zunächst festzuhalten, dass durch Reportergen-Transfektionsexperimente lediglich die Suppression der

IRF-3-vermittelten Genexpression bekannt war (*8, 75*). Die Interaktion mit den zellulären Signalwegen, die zu dieser Beeinflussung führen, wurde in einer parallelen Doktorarbeit untersucht, die zur Zielsetzung hatte, das potentielle zelluläre *Target* der viralen Interaktion einzugrenzen (*48, 49*). Da bereits die Translokation von IRF-3 in den Zellkern unterbunden wurde, musste der Angriffspunkt für HAV *upstream* im IRF-3-Aktivierungsweg liegen (*48, 49*). Durch Überexpression der beiden Kinasen IKKε und TBK1 (Abb. 2), die direkte Mediatoren der IRF-3-Aktivierung darstellen, konnte nachgewiesen werden, dass diese von einer HAV-Infektion nicht beeinflusst werden (*48, 49*). Die einzelne Überexpression dieser resultierte, auch in bereits HAV-infizierten FRhK-4-Zellen, in einer Induktion sowohl der IFN-β-Enhancer- als auch der PRDIII-I-abhängigen Reportergenexpression. Der Suppressionsmechanismus von HAV ist daher IKKε/TBK1-unabhängig. Die Aktivierung des *Virus-activated-kinase*-Komplexes erfolgte nach damaligem Kenntnisstand durch das Sensormolekül für intrazelluläre dsRNA, die RNA-Helicase RIG-I (zusammen mit dem verwandten MDA-5). Die Überexpression von RIG-I induzierte, wie bei IKKε und TBK1, sowohl die IFN-β-Enhancer- als auch der PRDIII-I-abhängige Reportergenexpression. Im Gegensatz zu den Kinasen des VAK-Komplexes wurde diese Induktion in HAV-infizierten Zellen vollständig supprimiert. Zusammenfassend wiesen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit auf einen viralen Angriffspunkt hin, der zwischen RIG-I/MDA-5 und dem VAK-Komplex liegt (*48*). Erst gegen Ende der beiden Doktorarbeiten wurde ein Protein beschrieben, das genau diese Rolle ausfüllen könnte. Es handelt sich hierbei um das *mitochondrial-antiviral-signaling*-Protein (MAVS), das allerdings im zeitlichen Rahmen beider Arbeiten nicht mehr untersucht werden konnte. Die Ergebnisse hinsichtlich der Reportergen-Transfektionsexperimente mit HAV-2B bestätigen diese Ergebnisse. Es ist funktionell bisher kein Unterschied zwischen HAV-Infektion und der Einzelexpression von HAV-2B zu erkennen. Allerdings bedarf es hierzu weiterführender Untersuchungen, die insbesondere den direkten Expressionsnachweis per Immunoblot zum Ziel haben müssen. Um die vorhandenen und in der indirekten Immunfluoreszenz funktionalen α-2B-Antiseren doch im Immunoblot einsetzen zu können, wäre es nötig, die Inkubationsbedingungen des Western-Blots zu optimieren, um einen direkten Nachweis zu erzielen. Vorrangig sollten aber pI.18-basierte Expressionsplasmide konstruiert werden, die eine Markierung der zu exprimierenden Proteine ermöglichen, um schließlich einen Nachweis im Immunoblot zu erleichtern. Diesbezüglich müsste zunächst nachgewiesen werden, dass durch die Markierung keine funktionale Beeinträchtigung der Suppression der IFN-β-Expression erfolgt, weshalb zunächst auf eine Markierung der Proteine verzichtet wurde, da ein im *Screening* positives Effektorprotein über einen direkten Antikörper nachgewiesen werden sollte.

Seit Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit erschienen mehrere Publikationen, die den oben bereits erwähnten Adapter MAVS, auch im Hinblick auf HAV, genauer untersuchten. Die Beteiligung von MAVS an der IRF-3-Aktivierung konnte sowohl in unserer Arbeitsgruppe als auch in verschiedenen Publikationen gezeigt werden (*145*). MAVS liegt über eine C-terminal gelegene Transmembrandomäne, assoziiert mit der äußeren Mitochondrienmembran, vor (*119*). Diese Bindung ist essentiell für die Fähigkeit von MAVS, die Kinasen IKKε und TBK1 des VAK-Komplexes zu aktivieren. Da MAVS eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Induktion von IFN-β durch dsRNA besitzt, bietet es einen idealen viralen Angriffspunkt, um die IFN-β-Expression zu supprimieren. Erstmalig wurde eine solche Interaktion zwischen viralem Protein und MAVS für das Hepatitis C-Virus (HCV) beschrieben. Das NS3/4A Protein des zur Familie der *Flaviviridae* gehörigen HCV spaltet MAVS proteolytisch und verhindert auf diese Weise die RIG-I-induzierte Aktivierung von IRF-3, was in einer ausbleibenden IFN-β-Expression resultiert (*88, 91, 100*).

Vor kurzem konnte eine Arbeitsgruppe um Stanley Lemon zeigen, dass MAVS bei einer HAV-Infektion ebenfalls gespalten wird (*145*). Allerdings erfolgt diese Spaltung nicht durch HAV-2B, wie es die Ergebnisse der Reportergen-Transfektionsexperimente dieser Arbeit vermuten lassen, sondern durch das HAV-Oligoprotein 3ABC. Bei diesem, die virale Protease 3C enthaltenden Prozessierungsintermediat vermittelt 3A durch seine Transmembrandomäne die Assoziierung des Oligoproteins mit der äußeren Mitochondrienmembran, während 3C hingegen die Spaltung von MAVS vollzieht. Dabei ist es essentiell, dass 3A und 3C über 3B miteinander verbunden bleiben, da eine von 3AB unabhängige Expression von 3C nicht zur Degradation von MAVS führt (*145*). Die räumliche Nähe von 3C und MAVS in der mitochondrialen Membran ist daher die Voraussetzung für eine Suppression der IRF-3-Aktivierung. Diesen Effekt vermittelt auch das HAV-Oligoprotein 3ABCD, welches dem genomischen Teilbereich P3 von HAV entspricht (*145*). Obwohl bei der P3 die virale RNA-abhängige-RNA-Polymerase 3D unmittelbar nach der Expression abgespalten wird (entspricht nach Abspaltung 3ABC), zeigt sie dennoch eine reduzierte Fähigkeit zur proteolytischen Degradierung von MAVS. Die Fähigkeit der P3 zur Suppression der IFN-β-Enhancer-abhängigen Reportergenexpression konnte nur bedingt bestätigt werden. Eine Reduktion der CAT-Expression um etwa 14 Prozent war, bei dem in dieser Arbeit durchgeführten *Screening*, nachweisbar (vgl. Tab. 1). Allerdings wurden die Experimente mit Expressionsplasmiden auf Basis des pcDNA3.1/myc-His durchgeführt, dessen Expressionsraten erwiesenermaßen niedriger waren, als die der pI.18-basierten Konstrukte. Da die Untersuchungen bezüglich HAV-3ABC bzw. HAV-3ABCD (HAV-P3) erst nach Abschluss

dieser Arbeit publiziert wurden, war eine Untersuchung der Suppression durch das bereits vorhandene pI.18-P3 und das neu zu klonierende pI.18-3ABC nicht mehr möglich. Es ist daher zwingend notwendig, durch Transfektion des pI.18-P3 die supprimierenden Eigenschaften auf die PRDIII-I-abhängige Reportergenexpression zu untersuchen. Eine Suppression muss auch in unserem Expressionssystem nachweisbar sein. Zudem sollte ein Expressionsplasmid für HAV-3ABC kloniert werden, um zum einen die proteolytische Spaltung von MAVS durch HAV genauer untersuchen zu können und zum anderen, um die supprimierenden Eigenschaften dieses Oligoproteins in Bezug auf unsere Experimente auszutesten. Anzumerken bleibt jedoch, dass das Prozessierungsintermediat 3ABC bei bisherigen Untersuchungen im Zuge einer Infektion nicht detektiert werden konnte.

Abschließend soll der vermeintliche Widerspruch zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit hinsichtlich HAV-2B und der Spaltung von MAVS durch HAV-3ABC diskutiert werden. Es ist ausgesprochen unwahrscheinlich, dass beide Proteine dieselbe Funktion erfüllen, zumal die Aminosäuresequenz von 2B keinerlei Hinweis auf eine Proteasefunktion liefert. Die proteolytische Spaltung von MAVS durch HAV-3ABC ist hingegen erwiesen. Der Mechanismus durch HAV-2B, der zur Suppression der IFN-β- und der PRDIII-I-abhängigen Reportergenexpression führt, bleibt hingegen unklar. Überhaupt ist über die Funktion von HAV-2B innerhalb des Replikationszyklus von HAV wenig bekannt. Eine Mutation innerhalb von HAV-2B an Position 3889, die in einem Aminosäureaustausch (Position 215) von Alanin zu Valin resultiert, soll verantwortlich für die Zellkulturadaption von HAV sein (*40, 59, 61*). Fast alle in Zellkultur wachsenden HAV-Varianten weisen diese Mutation auf. Zudem existiert, wie zuvor beschrieben, eine Transmembrandomäne (Aminosäuren 176-195), die HAV-2B als peripheres Membranprotein ausweist (*58*). Die Lokalisation innerhalb der Zelle ist dabei nicht genau geklärt; eine parallele Doktorarbeit unserer Arbeitsgruppe liefert jedoch Hinweise auf eine Colokalisation von HAV-2B und MAVS in der indirekten Immunfluoreszenz (Daten nicht gezeigt). Dieses spricht für eine Assoziierung mit mitochondrialen Membranen. Allerdings könnte HAV-2B auch mit MAVS assoziiert vorliegen, worüber eine Copräzipitation Aufschluss geben würde. Zur Aufklärung der Lokalisation könnte zudem die Fraktionierung der zellulären Proteine durch eine differenzielle Zentrifugation beitragen. Die einzelnen Fraktionen könnten dann zunächst mit α-2B-Antiserum inkubiert werden, um ein Vorkommen von HAV-2B in der entsprechenden Fraktion mit einem radioaktiv markierten sekundären Antikörper per Autoradiografie nachzuweisen. Gleiches gilt im Übrigen auch für den Nachweis von MAVS, welches im Fall derselben Membranbindung in der gleichen Fraktion zu finden sein müsste. Wie

die Suppression der PRDIII-I-abhängigen Reportergenexpression letztendlich vermittelt wird, lässt sich im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend klären und bedarf weiterer Analysen. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei sicherlich die Membrangebundenheit von HAV-2B, die zu einer Veränderung der Membranstruktur führt und eventuell die Zugänglichkeit der mitochondrialen Membran für die durch MAVS induzierten Kinasen IKKε und TBK1 reduziert. Obwohl in dieser Arbeit eine von HAV-3ABC unabhängige Suppression der PRDIII-I-abhängigen Reportergenexpression gezeigt wurde, ist ein Zusammenspiel mit membrangebundem HAV-3ABC nicht ausgeschlossen. Dieses wäre in der Lage dennoch gebundenes MAVS zu degradieren, was die IRF-3-Aktivierung und damit die IFN-β-Induktion effektiv unterbinden würde. Die Ergebnisse und der derzeitige Stand der Forschung sind in Abbildung 19 dargestellt. Diese schließt auch die mögliche und noch zu untersuchende Interaktion von HAV-2B und MAVS ein.

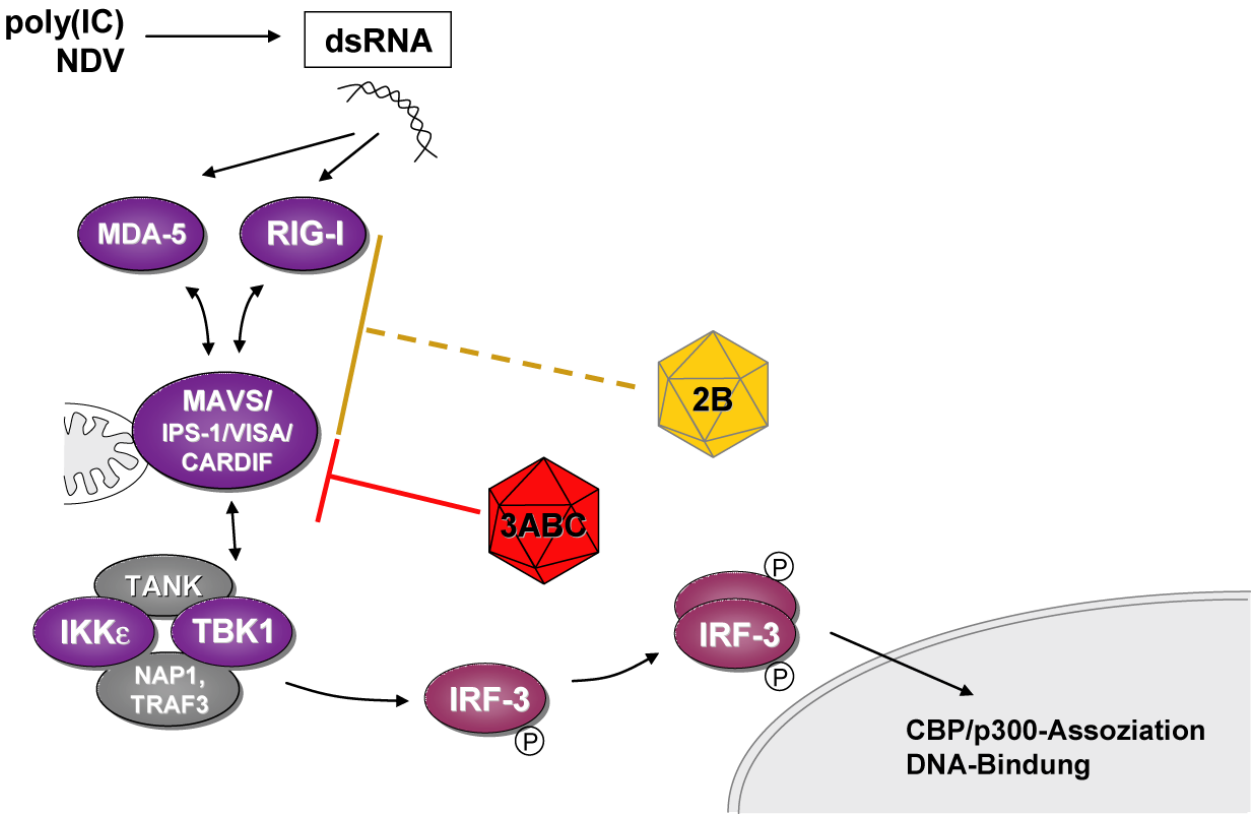


Abb. 19: Virale Angriffspunkte von HAV-Proteinen in den Signalwegen der IRF-3-Aktivierung durch intrazelluläre dsRNA. Die Aktivierung von IRF-3 über intrazelluläre dsRNA wird durch proteolytische Spaltung von MAVS durch HAV-3ABC unterbunden (rot dargestellt). Die möglichen *Targets* von HAV-2B sind gelb gestrichelt dargestellt. (mod. mit Genehmigung V. Fensterl)

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein verlässliches Expressionssystem für Proteine des Hepatitis A-Virus etabliert werden, das ein *Screening* aller viralen Proteine von HAV in Reportergen-Transfektionsexperimenten ermöglicht. Mit diesem sollte ein Effektorprotein von HAV identifiziert werden, das dieselben Suppression wie das Hepatitis A-Virus im intrazellulären dsRNA-induzierten Signalweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 vermittelt, da in HAV-infizierten Zellen die IRF-3-abhängige PRDIII-I des IFN-β-Enhancers supprimiert wird und somit keine IFN-β-Synthese eingeleitet werden kann.

Unter Verwendung von pI.18-basierten Expressionsvektoren gelang funktionell die Identifikation des potentiellen Effektorproteins HAV-2B, das sich bei allen reporterbasierten Untersuchungen identisch zu HAV verhielt. In der indirekten Immunfluoreszenz konnte die Expression von HAV-2B aufgrund der hervorragenden Expressionseigenschaften von pI.18-2B bestätigt werden, was für HAV-VP1 auch im Immunoblot gelang. Hierzu bleibt zu erwähnen, dass diese Nachweise in allen Fällen positiv waren und daher auch eine Expression der nicht nachgewiesenen Proteine im *Screening* anzunehmen ist.

Das Hepatitis A-Virus besitzt demnach wahrscheinlich, vermittelt durch das 2B-Protein, auch 3ABC-unabhängig die Fähigkeit, die IRF-3-Aktivierung und IFN-β-Induktion besonders durch intrazelluläre dsRNA, wie sie auch im Laufe der HAV-Replikation akkumuliert, effizient zu supprimieren. Obwohl diese Eigenschaft lediglich in Zellkultur untersucht wurde, ist diese vermutlich auch *in vivo* von großer Bedeutung. Da das interferonsensitive Hepatitis A-Virus nur sehr langsam repliziert, ist die Unterwanderung des unspezifischen Immunsystems ein probates Mittel zur Sicherung der eigenen Replikation, da ansonsten bereits vor dem Einsetzen der spezifischen Immunantwort eine Vermehrung des Virus unterbunden würde.

6. Literatur

1. **Agalioti T, Chen G, Thanos D** (2002) Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* **111**:381-392

2. **Agalioti T, Lomvardas S, Parekh B, Yie J, Maniatis T, Thanos D** (2000) Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-β promoter. *Cell* **103**:667-678

3. **Albrecht M** (2004) Einfluß einer HAV-Infektion in FRhK-4 und HepG2 Zellen auf die streßinduzierte Apoptoserate. Diplomarbeit FB2 - Biologie/Chemie, Universität Bremen

4. **Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Goodbourn S, Randall RE** (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the *IFN-β* promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(49):17264-17269

5. **Andrejeva, J., Young, D. F., Goodbourn, S. & Randall, R. E. (2002b).** Degradation of STAT1 and STAT2 by the V proteins of simian virus 5 and human parainfluenza virus type 2, respectively: consequences for virus replication in the presence of alpha/beta and gamma interferons. *J Virol* **76**, 2159–2167.

6. **Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB** (1998) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) – a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* **12**:2821-2830

7. **Ashida M & Hamada C** (1997) Molecular cloning of the Hepatitis A virus receptor from a simian cell line. *J Gen Virol* **78**:1565-1569

8. **Astrosini C** (2001) Einfluß des Hepatitis-A-Virus auf die transaktivierenden Eigenschaften verschiedener Komponenten des Interferon-β-Enhancers. Diplomarbeit FB2 - Biologie/Chemie, Universität Bremen

9. **Barchet W, Cella M, Colonna M** (2005) Plasmacytoid dendritic cells - virus experts of innate immunity. *Semin Immunol* **17**:253-261

10. **Barnard P & McMillan NA** (1999) The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virologyl* **259**(2):305-313

11. **Barro M & Patton JT** (2005) Rotavirus nonstrucutural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**(11):4114-4119

12. **Basler CF & García-Sastre A** (2002) Viruses and the type I Interferon antiviral system: induction and evasion. *Intern Rev Immunol* **21**:305-337

13. **Basler CF, Mikulasova A, Martínez-Sobrido, Paragas J, Mühlberger E, Bray M, Klenk H-D, Palese P, García-Sastre A** (2003) The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of Interferon regulatory factor 3. *J Virol* **77**(14):7945-7956

14. **Beneduce F, Ciervo A, Kusov YY, Gauss-Müller V, Morace G** (1999) Mapping of protein domains of Hepatitis A virus 3AB essential for interaction with 3CD and viral RNA. *Virology* **264**:410-421

15. **Berk I** (2003) Untersuchungen zur Blockade zellulärer antiviraler Mechanismen durch das Hepatitis A-Virus unter besonderer Berücksichtigung der Proteinkinase R und des Transkriptionsfaktors NF-κB. Dissertation FB2 - Biologie/Chemie, Universität Bremen

16. **Black, T. L., Barber, G. N. & Katze, M. G. (1993).** Degradation of the interferon-induced 68,000-M_r protein kinase by poliovirus requires RNA.*Journal of Virology***67**, 791-800

17. **Black, T. L., Safer, B., Hovanessian, A. & Katze, M. G. (1989).** The cellular 68,000-M_r protein kinase is highly autophosphorylated and activated yet significantly degraded during poliovirus infection: implications for translational regulation.*Journal of Virology***63**, 2244-2251

18. **Bossert B, Marozin S, Conzelmann K-K** (2003) Nonstrucutral proteins NS1 and NS2 of Bovine respiratory syncytial virus block activation of Interferon regulatory factor 3. *J Virol* **77**(16):8661-8668

19. **Brack K, Berk I, Magulski T, Lederer J, Dotzauer A, Vallbracht A** (2002) Hepatitis A Virus inhibits cellular antiviral defense mechanisms induced by double-stranded RNA. *J Virol* **76**(23):11920-11930

20. **Brack K, Frings W, Dotzauer A, Vallbracht A** (1998) A cytopathogenic, apoptosis-inducing variant of Hepatitis A Virus. *J Virol* **72**(4):3370-3376

21. **Brandt S** (2002) Die Auswirkung einer Hepatitis A-Virusinfektion auf die regulatorische Domäne PRDIV des humanen Interferon-β-Enhanceosomes. Diplomarbeit FB2 - Biologie/Chemie, Universität Bremen

22. **Brzózka K, Finke S, Conzelmann K-K** (2005) Identification of the Rabies virus alpha/beta interferon antagonist: Phosphoprotein P interferes with phosphorylation of Interferon regulatory factor 3. *J Virol* **79**(12):7673-7681

23. **Carroll, K., Elroy-Stein, O., Moss, B. & Jagus, R. (1993).** Recombinant vaccinia virus K3L gene product prevents activation of double-stranded RNA-dependent initiation factor 2 alpha-specific protein kinase.*Journal of Biological Chemistry***268**, 12837-12842

24. **Chan HM & La Thangue NB** (2001) p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* **114**:2363-2373

25. **Chin K-C & Cresswell P** (2001) Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(26):15125-15130

26. **Cohen JI, Rosenblum B, Ticehurst JR, Daemer RJ, Feinstone SM, Purcell RH. (1987).** Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. Proc Natl Acad Sci USA.**84**(8):2497-501

27. **Coulepis AG, Locarnini SA, Westaway EG, Tannock GA, Gust ID** (1982) Biophysical and biochemical characterization of Hepatitis A virus. *Intervirology* **18**(3):107-127

28. **Crance J-M, Lévêque F, Chousterman S, Jouan A, Trépo C, Deloince R** (1995) Antiviral activity of recombinant interferon-α on Hepatitis A virus replication in human liver cells. *Antiviral Res* **28**:69-80

29. **Davies, M. V., Chang, H.-W., Jacobs, B. L. & Kaufman, R. J. (1993).** The E3L and K3L vaccinia virus gene products stimulate translation through inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase by different mechanisms.*Journal of Virology***67**, 1688-1692

30. **Davies, M. V., Elroy-Stein, O., Jagus, R., Moss, B. & Kaufman, R. J. (1992).** The vaccinia virus K3L gene product potentiates translation by inhibiting double-stranded-RNA-activated protein kinase and phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2.*Journal of Virology***66**, 1943-1950

31. **De Chastonay J & Siegl G** (1987) Replicative events in Hepatitis A virus-infected MRC-5 cells. *Virology* **157**:268-275

32. **Dey M, Cao C, Dar AC, Tamura T, Ozato K, Sicheri F, Dever TE** (2005) Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2α substrate recognition. *Cell* **122**:901-913

33. **Didcock, L., Young, D. F., Goodbourn, S. & Randall, R. E. (1999a).** Sendai virus and simian virus 5 block activation of interferon-responsive genes: importance for virus pathogenesis. *J Virol* **73**, 3125–3133

34. **DiPerna G, Stack J, Bowie AG, Boyd A, Kotwal G, Zhang Z, Arvikar S, Latz E, Fitzgerald KA, Marshall WL** (2004) Poxvirus protein N1L targets the I-κB kinase complex, inhibits signaling to NF-κB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-κB and IRF3 signaling by Toll-like receptors. *J Biol Chem* **278**(35):36570-36578

35. **Donelan NR, Dauber B, Wang X, Basler CF, Wolff T, García-Sastre A** (2004) The N- and C-terminal domains of the NS1 protein of Influenza B virus can independently inhibit IRF-3 and beta Interferon promoter activation. *J Virol* **78**(21):11574-11582

36. **Dotzauer A, Brenner M, Gebhardt U, Vallbracht A** (2005) IgA-coated particles of *Hepatitis A virus* are translocalized antivectorially from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor. *J Gen Virol* **86**:2747-2751

37. **Dotzauer A, Feinstone SM, Kaplan G** (1994) Susceptibility of nonprimate cell lines to Hepatitis A virus infection. *J Virol* **68**(9):6064-6068

38. **Dotzauer A, Gebhardt U, Bieback K, Göttke U, Kracke A, Mages J, Lemon SM, Vallbracht A** (2000) Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with Hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. *J Virol* **74**(23):10950-10957

39. **Du W & Maniatis T** (1994) The high mobility group protein HMG I(Y) can stimulate or inhibit DNA binding of distinct transcription factor ATF-2 isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:11318-11322

40. **Emerson SU, Huang YK, McRill C, Lewis M, Purcell RH. (1992).** Mutations in both the 2B and 2C genes of hepatitis A virus are involved in adaptation to growth in cell culture. *J Virol.***66**(2):650-654

41. **Ehrhardt C, Kardinal C, Wurzer WJ, Wolff T, von Eichel-Streiber C, Pleschka S, Planz O, Ludwig S** (2004) Rac1 and PAK1 are upstream of IKK-ε and TBK-1 in the viral activation of interferon regulatory factor-3. *FEBS Lett* **567**:230-238

42. **Espert L, Degols G, Gongora C, Blondel D, Williams BRG, Silverman RH, Mechti N** (2003) ISG20, a new interferon-induced RNase specific for single-stranded RNA, defines an alternative antiviral pathway against RNA genomic viruses. *J Biol Chem* **278**(18):16151-16158

43. **Espert L, Degols L, Lin Y-L, Vincent T, Benkirane M, Mechti N** (2005) Interferon-induced exonuclease ISG20 exhibits an antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* **86**:2221-2229

44. **Falvo JV, Parekh BS, Lin CH, Fraenkel E, Maniatis T** (2000) Assembly of a functional beta interferon enhanceosome is dependent on ATF-2-c-jun heterodimer orientation. *Mol Cell Biol* **20**(13):4814-4825

45. **Falvo JV, Thanos D, Maniatis T** (1995) Reversal of intrinsic DNA bends in the IFNβ gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y). *Cell* **83**:1101-1111

46. **Feigelstock D, Thompson P, Mattoo P, Zhang Y, Kaplan GG** (1998) The human homolog of HAVcr-1 codes for a Hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol* **72**(8):6621-6628

47. **Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH** (1973) Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* **182**:1026-1028

48. **Fensterl V** (2005) Untersuchungen zur Suppression der durch doppelsträngige RNA induzierten IFN-β-Expression durch das Hepatitis A-Virus: Inhibition der RIG-I- und TLR3-vermittelten Signalwege zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3. Dissertation FB2 - Biologie/Chemie, Universität Bremen

49. **Fensterl V, Grotheer D, Berk I, Schlemminger S, Vallbracht A, Dotzauer A** (2005) Hepatitis A virus suppresses RIG-I-mediated IRF-3 activation to block induction of beta interferon. *J Virol* **79**(17):10968-10977

50. **Flehmig B** (1980) Hepatitis A-virus in cell culture: I. Propagation of different Hepatitis A-virus isolates in a fetal rhesus monkey kidney cell line (Frhk-4). *Med Microbiol Immunol* **168**:239-248

51. **Fleischer B, Fleischer S, Maier K, Wiedmann KH, Sacher M, Thaler H, Vallbracht A** (1990) Clonal analysis of infiltrating T lymphocytes in liver tissue in viral hepatitis A. *Immunology* **69**:14–19

52. **Gauss-Müller V, Lottspeich F, Deinhardt F** (1986) Characterization of Hepatitis A virus structural proteins. *Virology* **155**:732-736

53. **Gil J, García MA, Gomez-Puertas P, Guerra S, Rullas J, Nakano H, Alcamí J, Esteban M** (2004) TRAF family proteins link PKR with NF-κB activation. *Mol Cell Biol* **24**(10):4502-4512

54. **Glass MJ, Jia X-Y, Summers DF** (1993) Identification of the Hepatitis A virus Internal ribosome entry site: In vivo and in vitro analysis of bicistronic RNAs containing the HAV 5' noncoding region. *Virology* **193**:842-852

55. **Gotoh B**, **Takeuchi K**, **Komatsu T**, **Yokoo J**. **(2003).** The STAT2 activation process is a crucial target of Sendai virus C protein for the blockade of alpha interferon signaling. *J Virol* **77**(6), 3360–3370.

56. **Goodbourn S, Didcock L, Randall RE** (2000) Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and viral countermeasures. *J Gen Virol* **81**:2341-2364

57. **Goris K** (2005) Die Identifizierung der Rolle von NF-κB bei der Apoptose-Suppression durch HAV/7. Diplomarbeit FB2 - Biologie/Chemie, Universität Bremen

58. **Gosert R, Egger D, Bienz K** (2000) A cytopathic and a cell culture adapted Hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Virology* **266**:157-169

59. **Graff J**, **Kasang C**, **Normann A**, **Pfisterer-Hunt M**, **Feinstone SM**, **Flehmig B. (1994).** Mutational events in consecutive passages of hepatitis A virus strain GBM during cell culture adaptation. *Virology***204**(1):60-68

60. **Graff JW, Mitzel DN, Weisend CM, Flenniken ML, Hardy ME** (2002) Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of Rotavirus NSP1. *J Virol* **76**(18):9545-9550

61. **Graff J**, **Normann A**, **Feinstone SM**, **Flehmig B. (1994).** Nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus GBM in comparison with two cell culture-adapted variants. *J Virol.***68**(1):548-554

62. **Gunnery, S., Rice, A. P., Robertson, H. D. & Mathews, M. B. (1990).** Tat-responsive region RNA of human immunodeficiency virus 1 can prevent activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase.*Proceedings of the National Academy of Sciences, USA***87**, 8687-8691

63. **Guo J, Hui DJ, Merrick WC, Sen GC** (2000b) A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3. *EMBO J* **19**(24):6891-6899

64. **Haig, D. M., McInnes, C. J., Thomson, J., Wood, A., Bunyan, K. & Mercer, A. (1998).** The orf virus OV20.0L gene product is involved in interferon resistance and inhibits an interferon-inducible, double-stranded RNA-dependent kinase.*Immunology***93**, 335-340

65. **Hayakawa J, Mittal S, Wang Y, Korkmaz KS, Adamson E, English C, Omichi M, McClellend M, Mercola D** (2004) Identification of promoters bound by c-Jun/ATF-2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress. *Mol Cell* **16**:521-535

66. **He, B., Gross, M. & Roizman, B. (1997).** The $\gamma_1$34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1a to dephosphorylate the αsubunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase.*Proceedings of the National Academy of Sciences, USA***94**, 843-848

67. **Isaacs A & Lindenmann J** (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond (Biol)* **147**:258-267

68. **Ishak KG** (1976) Light microscopic morphology of viral hepatitis. *Am J Clin Pathol* **65**:787–827

69. **Ito T, Yang M, May WS** (1999) RAX, a cellular activator for double-stranded RNA-dependent protein kinase during stress signaling. *J Biol Chem* **274**(22):15427-15432

70. **Jefferies CA & Fitzgerald KA** (2005) Interferon gene regulation: not all roads lead to Tolls. *Trends Mol Med* **11**(9):403-411

71. **Jennings S, Martínez-Sobrido L, García-Sastre A, Weber F, Kochs G** (2005) Thogoto virus ML protein suppresses IRF3 function. *Virology* **331**:63-72

72. **Juang Y-T, Lowther W, Kellum M, Au W-C, Lin R, Hiscott J, Pitha PM** (1998) Primary activation of Interferon A and Interferon B gene transcription by Interferon regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:9837-9842

73. **Kanda, K., Decker, T., Aman, P., Wahlstrom, M., von Gabain, A. & Kallin, B. (1992).** The EBNA2-related resistance towards interferon (IFN-) in Burkitt's lymphoma cells effects induction of IFN-induced genes but not the activation of transcription factor ISGF-3.*Molecular and Cellular Biology***12**, 4930-4936.

74. **Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, Akatsuka T, Moritsugu Y, Feinstone SM** (1996) Identification of a surface glycoprotein on african green monkey kidney cells as a receptor for Hepatitis A virus. *EMBO J* **15**(16):4282-4296

75. **Kaumanns P** (2003) Untersuchungen zum Einfluss einer Hepatitis A-Virusinfektion auf die Expression eines unter der Kontrolle definierter Interferon-β Enhancerdomänen stehenden CAT Reportergens. Diplomarbeit FB2 - Biologie/Chemie, Universität Bremen

76. **Kee BL, Arias J, Montminy MR** (1996) Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J Biol Chem* **271**(5):2373-2375

77. **Kim TK & Maniatis T** (1997) The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled Interferon-β enhanceosome. *Mol Cell* **1**:119-129

78. **Kim TK, Kim TH, Maniatis T** (1998) Efficient recruitment of TFIIB and CBP-RNA polymerase II holoenzyme by an Interferon-β enhanceosome in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:12191-12196

79. **Klinger MHF, Kämmerer R, Hornei B, Gauss-Müller V** (2001) Perinuclear accumulation of hepatitis A virus proteins, RNA, and particles and ultrastructural alterations in infected cells. *Arch Virol* **146**:2291-2307

80. **Komatsu T, Takeuchi K, Yokoo J, Gotoh B** (2004) C and V proteins of Sendai virus target signaling pathways leading to IRF-3 activation for the negative regulation of interferon-β production. *Virology* **325**:137-148

81. **Kusov YY, Probst C, Jecht M, Jost PD, Gauss-Müller V** (1998) Membrane association and RNA binding of recombinant Hepatitis A virus protein 2C. *Arch Virol* **143**:931-944

82. **Langland, J. O., Pettiford, S., Jiang, B. & Jacobs, B. L. (1994).** Products of the porcine group C rotavirus NSP3 gene bind specifically to double-stranded RNA and inhibit activation of the interferon-induced protein kinase PKR. *Journal of Virology***68**, 3821-3829

83. **Lemon SM & Robertson BH** (1993) Current perspectives in the virology and molecular biology of Hepatitis A virus. *Semin Virol* **4**:285-295

84. **Lemon SM** (1997) Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. *Clin Chem* **43**(8B):1494-1499

85. **Lemon SM, Murphy PC, Shields PA, Ping L-H, Feinstone SM, Cromeans T, Jansen RW** (1991) Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *J Virol* **65**:2056–2065.

86. **Leonard, G. T. & Sen, G. C. (1996).** Effects of adenovirus E1A protein on interferon-signaling.*Virology***224**, 25-33.

87. **Levy DE & Darnell JE Jr.** (2002) STATs: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:651-662

88. **Li, XD, Sun, L, Seth, RB, Pineda, G & Chen, ZJ. (2005).** Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 17717–17722

89. **Lindenmann J** (1960) Interferon und Inverse Interferenz. *Zeitschr f Hygiene* **146**:287-309

90. **Lomvardas S & Thanos D** (2001) Nucleosome sliding via TBP DNA binding in vivo. *Cell* **106**:685-696

91. **Loo, YM, Owen, DM, Li, K, Erickson, AL, Johnson, CL, Fish, P, Carney, DS, Wang, T, Ishida, H & Yoneyama, M, *et al.* (2006).** Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 6001–6006

92. **Lundblad JR, Kwok RPS, Laurance ME, Harter ML, Goodman RH** (1995) Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature* **374**:85-88

93. **Magulski T** (2001) Etablierung eines CAT-Reportergen-Assays zur Untersuchung des Einflusses einer Hepatitis A-Virusinfektion auf die Interferon-β-Genexpression. Diplomarbeit FB2 - Biologie/Chemie, Universität Bremen

94. **Malur AG**, **Chattopadhyay S**, **Maitra RK**, **Banerjee AK**. **(2005).** Inhibition of STAT 1 phosphorylation by human parainfluenza virus type 3 C protein. *J Virol* **79**(12), 7877–7882.

95. **Maniatis T, Falvo JV, Kim TH, Kim TK, Lin CH, Parekh BS, Wathelet MG** (1998) Structure and function of the Interferon-β Enhanceosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**:609-620

96. **Martin A, Bénichou D, Chao S-F, Chen LM, Lemon SM** (1999) Maturation of the Hepatitis A virus capsid protein VP1 is not dependent on processing by the $3C^{pro}$ proteinase. *J Virol* **73**(8):6220-6227

97. **Mathews, M. B. (1993).** Viral evasion of cellular defense mechanisms: regulation of the protein kinase DAI by RNA effectors.*Seminars in Virology***4**, 247-257

98. **Mathews, M. B. (1995).** Structure, function, and evolution of adenovirus virus-associated RNAs.*Current Topics in Microbiology and Immunology***199**, 173-187

99. **Merika M, Williams AJ, Chen G, Collins T, Thanos D** (1998) Recruitment of CBP/p300 by the IFNβ Enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell* **1**:277-287

100. **Meylan, E, Curran, J, Hofmann, K, Moradpour, D, Binder, M, Bartenschlager, R & Tschopp, J. (2005).** Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167–1172

101. **Miller, D. M., Rahill, B. M., Boss, J. M., Lairmore, M. D., Durbin, J. E., Waldman, J. W. & Sedmak, D. D. (1998).** Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/STAT pathway.*Journal of Experimental Medicine***187**, 675-683

102. **Miller, D. M., Zhang, Y., Rahill, B. M., Waldman, W. J. & Sedmak, D. D. (1999).** Human cytomegalovirus inhibits IFN-α-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-α signal transduction.*Journal of Immunology***162**, 6107-6113

103. **Munshi N, Yie J, Merika M, Senger K, Lomvardas S, Agalioti T, Thanos D** (1999) The IFN-β Enhancer: A paradigm for understanding activation and repression of inducible gene expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**:149-159

104. **Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y** (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**:953-959

105. **Pahl HL** (1999) Activators and target genes of Rel/NF-κB transcription factors. *Oncogene* **18**:6853-6866

106. **Panne D, Maniatis T, Harrison SC** (2004) Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF-3 bound to the interferon-β enhancer. *EMBO J* 23(22):4384-4393

107. **Patel CV, Handy I, Goldsmith T, Patel RC** (2000) PACT, a stress-modulated cellular activator of interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem* **275**(48):37993-37998

108. **Patel RC & Sen GC** (1998) Requirement of PKR dimerization mediated by specific hydrophobic residues for its activation by double-stranded RNA and its antigrowth effects in yeast. *Mol Cell Biol* **18**(12):7009-7019

109. **Precious B**, **Young DF**, **Andrejeva L**, **Goodbourn S**, **Randall RE**. **(2005).** In vitro and in vivo specificity of ubiquitination and degradation of STAT1 and STAT2 by the V proteins of the paramyxoviruses simian virus 5 and human parainfluenza virus type 2. *J Gen Virol* **86**(Pt 1), 151–158.

110. **Probst C, Jecht M, Gauss-Müller V** (1999) Intrinsic signals for the assembly of Hepatitis A virus particles - Role of structural proteins VP4 and 2A. *J Biol Chem* **274**(8):4527-4531

111. **Rachow A, Gauss-Müller V, Probst C** (2003) Homogenous Hepatitis A virus particles - Proteolytic release of the assembly signal 2A from procapsids by Factor Xa. *J Biol Chem* **278**(32):29744-29751

112. **Rivas, C., Gil, J., Melkova, Z., Esteban, M. & Diaz-Guerra, M. (1998).** Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (IFN)-induced 2–5A synthetase enzyme.*Virology***243**, 406-414

113. **Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM** (1998) Human Papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to Interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* **12**:2061-2072

114. **Sarkar SN & Sen GC** (2004) Novel functions of proteins encoded by viral stress-inducible genes. *Pharmacol Ther* **103**:245-259

115. **Schaeffer HJ & Weber MJ** (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**(4):2435-2444

116. **Schlemminger S** (2004) Einfluss einer Hepatitis A-Virus-Infektion auf die stressinduzierte Aktivierung von NF-κB und p53 in FRhK-4-Zellen. Diplomarbeit FB2 - Biologie/Chemie, Universität Bremen

117. **Schultheiss T, Kusov YY, Gauss-Müller V** (1994) Proteinase 3C of Hepatitis A virus (HAV) cleaves the HAV polyprotein P2-P3 at all sites including VP1/2A and 2A/2B. *Virology* **198**:275-281

118. **Sen GC** (2001) Viruses and Interferons. *Annu Rev Microbiol* **55**:255-281

119. **Seth RB, Sun L, Ea C-K, Chen ZJ** (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-κB and IRF-3. *Cell* **122**(5):669-682

120. **Sharp, T. V., Raine, D. A., Gewert, D. R., Joshi, B., Jagus, R. & Clemens, M. J. (1999).** Activation of the interferon-inducible (2'–5') oligoadenylate synthetase by the Epstein–Barr virus RNA, EBER-1. *Virology***257**, 303-313

121. **Sharp, T. V., Schwemmle, M., Jeffrey, I., Laing, K., Mellor, H., Proud, C. G., Hilse, K. & Clemens, M. J. (1993).** Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein–Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic Acids Research***21**, 4483-4490

122. **Silva AM, Whitmore M, Xu Z, Jiang Z, Li X, Williams BRG** (2004) Protein kinase R (PKR) interacts with and activates mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) in response to double-stranded RNA stimulation. *J Biol Chem* **279**(36):37670-37676

123. **Spann KM, Tran KC, Collins PL** (2005) Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human Respiratory syncytial virus on Interferon regulatory factor 3, NF-κB, and proinflammatory cytokines. *J Virol* **79**(9):5353-5362

124. **Spiegel M, Pichlmair A, Martínez-Sobrido L, Cros J, García-Sastre A, Haller O, Weber F** (2005) Inhibition of beta Interferon induction by Severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step-model for activation of Interferon regulatory factor 3. *J Virol* **79**(4):2079-2086

125. **Stapleton JT** (1995) Host immune responses to Hepatitis A virus. *J Infect Dis* **171**(Suppl 1):S9-S14

126. **Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, Silverman RH, Schreiber RD** (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**:227-264

127. **Talon J, Horvath CM, Polley R, Basler CF, Muster T, Palese P, García-Sastre A** (2000) Activation of Interferon regulatory factor 3 is inhibited by the Influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **74**(17):7989-7996

128. **Tan SL**, **Katze MG**. **(1998).** Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J Interferon Cytokine Res* **18**(9):757-766

129. **Taylor DR, Puig M, Darnell MER, Mihalik K, Feinstone SM** (2005) New antiviral pathway that mediates Hepatitis C virus replicon interferon sensitivity through ADAR1. *J Virol* **79**(10):6291-6298

130. **Tesar M, Jia X-Y, Summers DF, Ehrenfeld E** (1993) Analysis of a potential myristoylation site in Hepatitis A virus capsid protein VP4. *Virology* **194**:616-626

131. **Thanos D & Maniatis T** (1995a) Virus induction of human IFNβ gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* **83**:1091-1100

132. **Ticehurst JR, Racaniello VR, Baroudy BM, Baltimore D, Purcell RH, Feinstone SM** (1983) Molecular cloning and characterization of Hepatitis A virus cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**:5885-5889

133. **Totsuka A & Moritsugu Y** (1999) Hepatitis A Virus proteins. *Intervirology* **42**:63-68

134. **Unterstab G, Ludwig S, Anton A, Planz O, Dauber B, Krappmann D, Heins G, Ehrhardt C, Wolff T** (2005) Viral targeting of the interferon-β-inducing Traf family member-associated NF-κB activator (TANK)-binding kinase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**(38):13640-13645

135. **Vallbracht A & Flehmig B** (1985) Elimination of a persistent Hepatitis A infection in cell cultures by Interferon. In Kirchner H & Schellekens H: The Biology of the Interferon system, S. 339-345, Elsevier Science Publishers, 1985

136. **Vallbracht A, Gabriel P, Maier K, Hartmann F, Steinhardt HJ, Müller C, Wolf A, Manncke KH, Flehmig B** (1986) Cell-mediated cytotoxicity in Hepatitis A virus infection. *Hepatology* **6**(6):1308-1314

137. **Vallbracht A, Gabriel P, Zahn J, Flehmig B** (1985) Hepatitis A virus infection and the Interferon system. *J Infect Dis* **152**(1):211-213

138. **Vallbracht A, Hoffmann L, Wurster KG, Flehmig B** (1984) Persistent infection of human fibroblasts by Hepatitis A Virus. *J Gen Virol* **65**:609-615

139. **Vallbracht A, Maier K, Stierhof Y-D, Wiedmann KH, Flehmig B, Fleischer B** (1989) Liver-derived cytotoxic T cells in Hepatitis A virus infection. *J Infect Dis* **160**(2):209-217

140. **Venuti A, Di Russo C, del Grosso N, Patti A-M, Ruggeri F, De Stasio PR, Martiniello MG, Pagnotti P, Degener AM, Midulla M, Panà A, Perez-Bercoff R** (1985) Isolation and molecular cloning of a fast-growing strain of human Hepatitis A virus from its double-stranded replicative form. *J Virol* **56**(2):579-588

141. **Vo N & Goodman RH** (2001) CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* **276**(17):13505-13508

142. **Wang X, Li M, Zheng H, Muster T, Palese P, Beg AA, Garcia-Sastre A** (2000) Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-κB and induction of alpha/beta Interferon. *J Virol* **74**(24):11566-11573

143. **Williams BRG** (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* **18**:6112-6120

144. **Xiang Y, Condit RC, Vijaysri S, Jacobs B, Williams BRG, Silverman RH** (2002) Blockade of Interferon induction and action by the E3L double-stranded RNA binding proteins of Vaccinia virus. *J Virol* **76**(10):5251-5259

145. **Yang Y**, **Liang Y**, **Qu L**, **Chen Z**, **Yi M**, **Li K**, **Lemon SM. (2007).** Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor. *Proc Natl Acad Sci USA***104**(17), 7253-7258

146. **Yang H, Ma G, Lin CH, Orr M, Wathelet MG** (2004) Mechanism for transcriptional synergy between interferon regulatory factor (IRF)-3 and IRF-7 in activation of the interferon-β gene promoter. *Eur J Biochem* **271**:3693-3703

147. **Yie J, Liang S, Merika M, Thanos D** (1997) Intra- and intermolecular cooperative binding of high-mobility-group protein I(Y) to the beta-interferon promoter. *Mol Cell Biol* **17**(7): 3649-3662

148. **Yie J, Merika M, Munshi N, Chen G, Thanos D** (1999b) The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN-β enhanceosome. *EMBO J* **18**(11):3074-3089

149. **Yie J, Senger K, Thanos D** (1999a) Mechanism by which the IFN-β enhanceosome activates transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(23):13108-13113

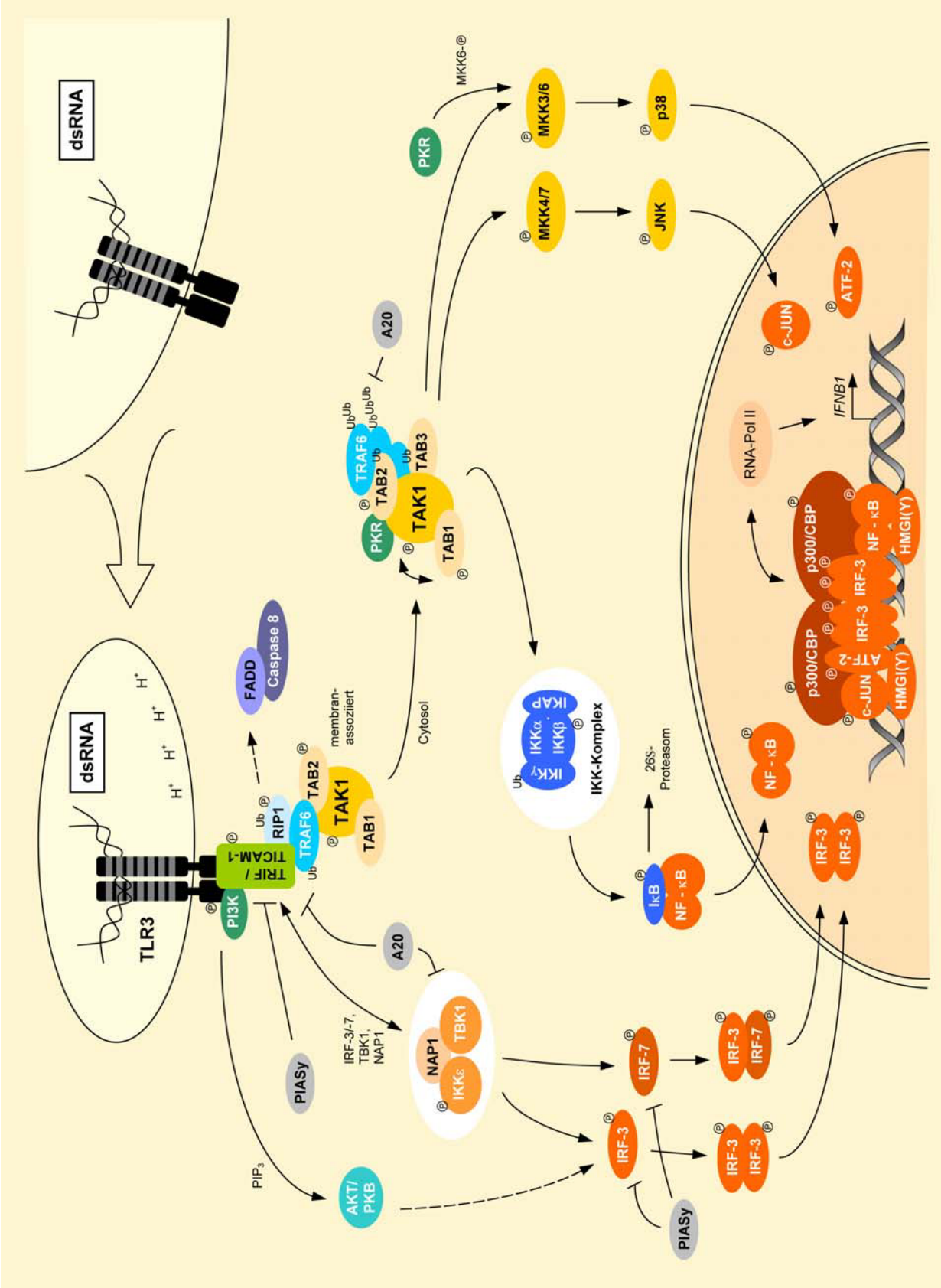
150. **Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T** (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral response. *Nat Immunol* **5**(7):730-737

151. **Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T** (1998) Direct triggering of the type I Interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* **17**(4):1087-1095

152. **Yue Z. & Shatkin, A. J. (1997).** Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is regulated by reovirus structural proteins. *Virology***234**, 364-371

153. **Zhou A, Scoggin S, Gaynor RB, Williams NS** (2003) Identification of NF-κB-regulated genes induced by TNFα utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene* **22**:2054-2064

Anhang



Anhang 1: IFN-β-Induktion durch <u>extrazelluläre</u> dsRNA (TLR3-*Signaling*). Extrazelluläre dsRNA bindet an den TLR3 und vermittelt über dessen Adapter TRIF die Aktivierung der Signalwege zu IRF-3, NF-κB und ATF-2/c-JUN. Über die Ausbildung eines Enhanceosoms wird die Transkription initiiert.

Erklärung gemäß §6 Abs. 5 der Promotionsordnung

Ich versichere, diese Dissertation mit dem Titel
"*Inhibition zellulärer antiviraler Abwehrmechanismen durch das Hepatitis A-Virus – eine Analyse der beteiligten viralen Faktoren: Inhibition des IRF-3 -vermittelten Signalweges durch das Nichtstrukturprotein 2B des Hepatitis A-Virus*"
selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Bremen,

Thomas Magulski