

**Untersuchungen zu Interaktionen des Hepatitis A-Virus
mit zellulären antiviralen Mechanismen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

im Fachbereich Biologie/Chemie
der Universität Bremen

vorgelegt von
Oliver Janssen-Weets

Bremen, Juni 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Vallbracht
2. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Günther

Erklärung gemäß §6 Abs. 5 der Promotionsordnung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zu Interaktionen des Hepatitis A-Virus mit zellulären antiviralen Mechanismen“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Bremen, den 02.06.2009

Oliver Janssen-Weets

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Angelika Vallbracht für die Möglichkeit und das Vertrauen, die Thematik aus meiner Diplomarbeit weiter bearbeiten zu können, sowie für ihre deutlich über diese Arbeit hinausgehende Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Stephan Günther danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und seine investierte Zeit.

Besonderer Dank gilt Dr. Andreas Dotzauer für seine ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft, seinen fachlichen Rat und seine Aufbauhilfen.

Für das Ermöglichen eines fließenden Laborbetriebes danke ich Renate Mester, Heike Kettler und Beate Piel.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die schöne Zeit, die Begleitung und Gesprächsbereitschaft. Sie alle zu nennen würde den Rahmen sprengen, aber insbesondere danke ich Volker Fensterl (für seine Beständigkeit), Sonja Händschke (für ihre Echtheit), Thomas Magulski (für seinen Humor), Dajana Paulmann (für ihre Gesellschaft), Rebecca Schwarz (für ihre Frische) – ich hätte keinen missen mögen.

Meinen Eltern und Freunden danke ich für ihre Unterstützung und ihr Verständnis.

Ich möchte diese Arbeit meinen Schwestern Nadine, Anika und Bente Janssen-Weets widmen, sowie meiner Gefährtin Melanie Böhm, der ich dafür danke, dass wir beieinander stehen – ohne sie wäre alles nicht möglich gewesen.

Home, home again
I like to be here when I can
When I come home cold and tired
It's good to warm my bones beside the fire
Far away across the field
The tolling of the iron bell
Calls the faithful to their knees
To hear the softly spoken magic spell

(R. WATERS)

Inhalt

| | |
|--|-----------|
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Das Hepatitis A-Virus | 1 |
| 1.2 Das Interferonsystem und die Erkennung viraler Pathogene | 7 |
| 1.3 Effekte des Hepatitis A-Virus auf die Induktion zellulärer Abwehrmechanismen | 11 |
| 1.4 ISG20, eine Nuklease mit antiviralen Eigenschaften | 13 |
| 1.5 Das MxA-Protein, eine große GTPase mit antiviraler Funktion | 15 |
| 1.6 Das 2',5'-Oligoadenylatsynthetase/RNase L-System | 19 |
| 1.7 Zielsetzung | 29 |
| | |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 31 |
| 2.1 Material | 31 |
| 2.1.1 Viren | 31 |
| 2.1.2 Zellen | 31 |
| 2.1.3 Bakterien | 32 |
| 2.1.4 Plasmide | 32 |
| 2.1.5 Oligonukleotide | 36 |
| 2.1.5.1 Primer | 36 |
| 2.1.5.2 sonstige Oligonukleotide | 38 |
| 2.1.6 Nukleotide | 38 |
| 2.1.7 Antikörper, Enzyme und sonstige Proteine | 39 |
| 2.1.7.1 Antikörper | 39 |
| 2.1.7.2 Enzyme | 39 |
| 2.1.7.3 sonstige Proteine | 40 |
| 2.1.8 Antibiotika | 40 |
| 2.1.9 Standards | 40 |
| 2.1.10 Kits | 40 |
| 2.1.11 Puffer, Lösungen und Kulturmedien | 41 |
| 2.1.11.1 Gebrauchslösungen | 41 |
| 2.1.11.2 Zellkulturmedien | 41 |
| 2.1.11.3 DAPI-Färbung | 41 |
| 2.1.11.4 Indirekte Immunfluoreszenz | 42 |
| 2.1.11.5 RNA-Extraktion mit der AGPC-Methode | 42 |
| 2.1.11.6 DNA-Extraktion aus tierischen Zellen | 43 |
| 2.1.11.7 DNA-Reinigung mit LMP-Agarose | 43 |
| 2.1.11.8 Phenol-/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation | 43 |
| 2.1.11.9 native Agarose-Gelelektrophorese | 44 |
| 2.1.11.10 Denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese | 44 |
| 2.1.11.11 denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1.11.12 Bakterienkultur | 46 |
| 2.1.11.13 Herstellung kompetenter E. coli | 46 |
| 2.1.11.14 Schnellpräparation bakterieller Plasmid-DNA (Miniprep) | 47 |
| 2.1.11.15 Präparation bakterieller Plasmid-DNA (Maxiprep) | 47 |
| 2.1.11.16 Plasmid-Transfektion mit der Calciumphosphat-Methode | 48 |
| 2.1.11.17 Plasmid-Transfektion mit jetPEI | 48 |
| 2.1.11.18 poly(IC)-Transfektion zur Aktivierung von Promotorkonstrukten | 48 |
| 2.1.11.19 poly(IC)-Transfektion zur Aktivierung des OAS/RNase L-Weges | 49 |
| 2.1.11.20 Ribonuclease Protection Assay | 49 |
| 2.1.11.21 Bradford-Assay | 50 |
| 2.1.11.22 diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot | 50 |
| 2.1.11.23 Luciferase-Assay | 52 |
| 2.1.11.24 Synthese und Aufreinigung von 2-5A | 52 |
| 2.1.11.25 RNase L-Aktivitäts-Assays | 53 |
| 2.1.11.26 ³² P-Markierung des RNase L-Substrats und Markerherstellung | 53 |
| 2.1.11.27 RNA-Degradation in HeLa-Extrakten | 54 |
| 2.1.12 Chemikalien | 54 |
| 2.1.13 Verbrauchsmaterialien | 56 |
| 2.1.14 Geräte | 58 |
| 2.1.15 spezielle Software | 59 |
| 2.2 Methoden | 60 |
| 2.2.1 Zellkultivierung | 60 |
| 2.2.2 Kryokonservierung von Zellen | 60 |
| 2.2.3 Zellzahlbestimmung | 61 |
| 2.2.4 Mykoplasmen-Nachweise | 61 |
| 2.2.4.1 DAPI-Färbung | 61 |
| 2.2.4.2 VenorGeM PCR-based Mycoplasma Detection Kit | 62 |
| 2.2.5 Viruspool-Herstellung | 62 |
| 2.2.6 Infektion von Zellkulturen mit HAV | 62 |
| 2.2.7 HAV-Endpunkttitration (TCID50-Bestimmung) | 63 |
| 2.2.8 Indirekte Immunfluoreszenz | 63 |
| 2.2.8.1 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von HAV-Antigen | 63 |
| 2.2.8.2 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis der RNase L | 64 |
| 2.2.8.3 Paralleldetektion von RNase L und HAV durch indirekte Immunfluoreszenz | 64 |
| 2.2.9 Extraktion und Reinigung von Nukleinsäuren | 65 |
| 2.2.9.1 RNA-Extraktion mit der AGPC-Methode | 65 |
| 2.2.9.2 Isolierung von poly(A) ⁺ -RNA mit dem Dynabeads® mRNA Purification Kit | 66 |
| 2.2.9.3 RNA-Extraktion mit dem RNeasy® mini Kit | 66 |
| 2.2.9.4 Extraktion viraler RNA mit dem QIAamp® Viral RNA Kit | 67 |
| 2.2.9.5 DNA-Extraktion aus tierischen Zellen | 67 |
| 2.2.9.6 DNA-Reinigung mit LMP-Agarose | 68 |

| | |
|--|----|
| 2.2.9.7 Phenol-/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation | 69 |
| 2.2.10 Physikalische Analyse von Nukleinsäuren | 69 |
| 2.2.10.1 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren | 69 |
| 2.2.10.2 native Agarose-Gelelektrophorese | 70 |
| 2.2.10.3 denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese | 70 |
| 2.2.10.4 denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren | 71 |
| 2.2.11 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren | 71 |
| 2.2.11.1 DNase-Verdau | 71 |
| 2.2.11.2 Auffüllreaktion und blunt end-Generierung mit dem Klenow-Fragment | 72 |
| 2.2.11.3 Restriktions-Analyse von Plasmid-DNA | 72 |
| 2.2.11.4 Restriktionsenzymsspaltung von Plasmiden und PCR-Produkten | 73 |
| 2.2.11.5 Dephosphorylierung von DNA-Molekülen | 73 |
| 2.2.11.6 Ligation von DNA-Molekülen | 73 |
| 2.2.12 Vermehrung und Isolierung von Plasmiden | 74 |
| 2.2.12.1 Herstellung kompetenter E. coli | 74 |
| 2.2.12.2 Transformation kompetenter E. coli | 74 |
| 2.2.12.3 Schnellpräparation bakterieller Plasmid-DNA (Miniprep) | 75 |
| 2.2.12.4 Präparation bakterieller Plasmid-DNA (Maxiprep) | 76 |
| 2.2.13 in vitro-Transkription | 77 |
| 2.2.13.1 Herstellung eines RNA-Standards | 77 |
| 2.2.13.2 Synthese viraler RNA | 77 |
| 2.2.14 Transfektion von Plasmidvektoren | 78 |
| 2.2.14.1 Plasmid-Transfektion mit der Calciumphosphat-Methode | 78 |
| 2.2.14.2 Plasmid-Transfektion mit jetPEI | 79 |
| 2.2.14.3 Stabile Transfektion von Expressionsvektoren | 80 |
| 2.2.15 Transfektion von poly(IC) | 80 |
| 2.2.15.1 poly(IC)-Transfektion zur Aktivierung von Promotorkonstrukten | 80 |
| 2.2.15.2 poly(IC)-Transfektion zur Aktivierung des OAS/RNase L-Weges | 81 |
| 2.2.16 Konstruktion eines siRNA-Expressionssystems | 81 |
| 2.2.17 RT-PCR | 83 |
| 2.2.18 PCR | 83 |
| 2.2.19 real-time RT-PCR | 85 |
| 2.2.20 Ribonuclease Protection Assay | 86 |
| 2.2.20.1 RPA-Sondensynthese | 86 |
| 2.2.20.2 RP-Assay | 87 |
| 2.2.21 Quantifizierung von Protein nach Bradford | 88 |
| 2.2.22 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot | 88 |
| 2.2.23 Luciferase-Assay | 89 |
| 2.2.24 Nachweise der RNase L-Aktivität | 90 |
| 2.2.24.1 Synthese und Aufreinigung von 2',5'-Oligoadenylaten | 90 |
| 2.2.24.2 rRNA-Abbau-Assay zur Bestimmung der RNase L-Aktivität | 91 |

| | |
|--|------------|
| 2.2.24.3 RNase L-Aktivitäts-Assay mit ³² P-markiertem Substrat | 92 |
| 2.2.25 RNA-Degradation in HeLa-Extrakten | 94 |
| 3 ERGEBNISSE | 95 |
| 3.1 Untersuchung der ISG20- und MxA-Promotoraktivität im Kontext einer HAV-Infektion | 95 |
| 3.1.1 HAV-Infektion zeigt keine Auswirkung auf die Aktivität des ISG20-Promotors | 95 |
| 3.1.2 Aktivität des humanen MxA-Promotors in HAV-infizierten FRhK-4-Zellen supprimiert | 96 |
| 3.1.3 Keine Beeinflussung der Aktivität des MxA-Promotors in HFS-10-Zellen durch HAV | 97 |
| 3.1.4 HAV-Infektion hat keinen Effekt auf die MxA-mRNA-Expression in FRhK-4- und MRC-5-Zellen | 98 |
| 3.2 Nachweis der basalen Expression und Funktionalität des 2',5'-Oligoadenylatsynthetasesystems in FRhK-4-Zellen | 99 |
| 3.2.1 OAS in FRhK-4-Zellen auf mRNA-Ebene ohne Induktion nachweisbar | 99 |
| 3.2.2 Poly(IC)-Induktion resultiert in sofortiger Aktivierung der rRNA-Degradation in FRhK-4-Zellen | 100 |
| 3.3 Untersuchungen der Auswirkung einer HAV-Infektion auf das OAS/RNase L-System | 101 |
| 3.3.1 Erhöhtes Aktivierungspotential der RNase L auch in HAV-infizierten MRC-5-Zellen detektierbar | 101 |
| 3.3.2 Nachweis der RNase L-Aktivität mit externem Substrat | 102 |
| 3.3.3 Darstellung der RNase L- und RLI-Transkripte mittels eines Ribonuclease Protection Assays | 103 |
| 3.3.4 RNase L-mRNA-Level werden durch eine HAV-Infektion hochreguliert während die RLI-mRNA unbeeinflusst bleibt | 106 |
| 3.3.5 Erhöhte RNase L-mRNA-Expression in persistent HAV-infizierten FRhK-4-Zellen | 109 |
| 3.3.6 Verläufe von RNase L-mRNA und HAV-RNA in persistent infizierten FRhK-4-Zellen suggerieren einen regulativen Zusammenhang | 111 |
| 3.3.7 In silico-Analyse der Upstream-Sequenz des RNase L-ORFs ergibt zahlreiche potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen | 112 |
| 3.3.8 Endogene FRhK-4-RNase L im Western Blot nicht darstellbar | 116 |
| 3.3.9 HAV-RNA induziert die Degradation ribosomaler RNA in HeLa-Zell-Extrakten | 116 |
| 3.4 Untersuchung der HAV-Replikation im Kontext einer differenziellen RNase L-Expression | 118 |
| 3.4.1 FRhK-4/RLI(+)-Zellen weisen keine erhöhten RLI-mRNA-Level auf | 118 |
| 3.4.2 Konstruktion eines RNase L-überexprimierenden Systems auf pcDNA3.1-Basis | 118 |
| 3.4.3 Konstruktion eines RNase L-überexprimierenden Systems auf Basis des potenten Expressionsvektors pI.18 | 121 |
| 3.4.4 Konstruktion eines siRNA-basierten Knock Down-Systems für die Reduktion der RNase L-Expression | 125 |
| 3.4.5 Variationen der RNase L-Expression zeigen keine Auswirkung auf die Replikation des Hepatitis A-Virus | 127 |
| 3.5 Betrachtung der RNase L-Sensitivität des Hepatitis A-Virus | 129 |
| 3.5.1 Stabilität der HAV-RNA in poly(IC)-aktivierten HeLa-Zell-Extrakten | 129 |
| 3.5.2 Eine RNase L-Überexpression kann die HAV-Infektion einer FRhK-4-Zelle blockieren | 130 |

| | |
|---|------------|
| Inhalt | V |
| 4 DISKUSSION | 133 |
| 4.1 ISG20- und MxA-Promotoraktivität in Gegenwart einer HAV-Infektion | 133 |
| 4.2 Interaktionen zwischen HAV und dem OAS/RNase L-System | 135 |
| 5 ZUSAMMENFASSUNG | 150 |
| 6 LITERATUR | 151 |
| Verzeichnis der Abbildungen | 172 |

Abkürzungen

| | |
|-------------|---|
| 2'-PDE | 2'-Phosphodiesterase |
| 2-5A | 2',5'-Oligoadenylate |
| ABC-Protein | <i>ATP binding cassette protein</i> |
| abs. | absolut |
| ARE | AU-reiche Elemente |
| AS | Aminosäure(reste) |
| ASGPR | Asialoglycoprotein-Rezeptor |
| ATF-2/6 | <i>activating transcription factor 2/6</i> |
| BiP | <i>immunoglobulin heavy chain-binding protein</i> |
| BLAST | <i>basic local alignment search tool</i> |
| bp | Basenpaare |
| CBP | <i>CREB-binding protein</i> |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| Ci | Curie |
| CID | <i>central interaction domain</i> |
| c-JUN | <i>cellular v-jun homolog</i> |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CPE | cytopathischer Effekt |
| DAPI | 4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid |
| DEAE | Diethylaminoethyl |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DRAF1 | <i>dsRNA-activated factor 1</i> |
| dsRNA | doppelsträngige RNA |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EMCV | Encephalomyocarditisvirus |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| eRF3 | <i>eukaryotic release factor 3</i> |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| FITC | Fluorescein-5-isothiocyanat |
| FRET | <i>fluorescence resonance energy transfer</i> |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> |
| HAV | Hepatitis A-Virus |
| HAVcr-1 | <i>HAV cellular receptor-1</i> |
| HBV | Hepatitis B-Virus |
| HCV | Hepatitis C-Virus |
| HEM45 | <i>human estrogen regulated transcript 45</i> |
| HIV | humanes Immundefizienzvirus |
| HMG-I | <i>high mobility group I</i> |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase |
| HSV | Herpes-simplex-Virus |
| HuR | <i>Hu antigen R</i> |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |

| | |
|----------------|--|
| IKK ϵ | <i>inhibitor of NF-κB kinase ϵ</i> |
| IKK-Komplex | <i>IκB kinase complex</i> |
| IRE1 | <i>inositol-requiring enzyme 1</i> |
| IRES | <i>internal ribosomal entry site</i> |
| IRF-3 | <i>interferon regulatory factor 3</i> |
| ISG | IFN-stimulierte Gene |
| ISG20 | IFN-stimuliertes Genprodukt von 20 kDa |
| ISRE | IFN-stimuliertes <i>Response-Element</i> |
| Jak | Janus-Kinase |
| JNK | <i>c-jun NH₂-terminal kinases</i> |
| kb | Kilobasen |
| kbp | Kilobasenpaare |
| KBE | Kolonie bildende Einheiten |
| kDa | Kilodalton |
| LCPS | <i>luminescence counts per second</i> |
| LMP | <i>low melting point</i> |
| LZ | Leucin-Zipper-Region |
| MAPK | mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| MAVS | <i>mitochondrial antiviral signalling protein</i> |
| MCS | <i>multiple cloning site</i> |
| MDA-5 | <i>melanoma differentiation-associated gene 5</i> |
| MEF | <i>mouse embryonic fibroblast</i> |
| MOI | <i>multiplicity of infection</i> |
| mRNA | <i>messenger-RNA</i> |
| Mx | <i>myxovirus resistance</i> |
| NDV | Newcastle-Disease-Virus |
| NEMO | <i>NF-κB essential modifier</i> |
| NF- κ B | <i>nuclear factor κB</i> |
| NLS-Signal | <i>nuclear localisation signal</i> |
| nt | Nukleotide |
| NTR | nicht-translatierte Region |
| OAS | 2',5'-Oligoadenylatsynthetase |
| OASL | <i>OAS like protein</i> |
| OD | optische Dichte |
| ORF | <i>open reading frame</i> |
| p.i. | <i>post infectionem</i> |
| PABP | <i>poly(A)-binding protein</i> |
| PACT | <i>PKR activating protein</i> |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PAMP | Pathogen-assoziierte molekulare Muster |
| PBS | <i>phosphat buffered saline</i> |
| PCBP2 | <i>poly(rC)-binding protein</i> |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| PERK | <i>PKR-like ER kinase</i> |
| pIgR | polymerer Immunglobulin-Rezeptor |
| PKR | Protein Kinase R (dsRNA-aktiviert) |
| poly(IC) | Poly-Inosinsäure:Poly-Cytidylsäure |
| ppi | Pyrophosphat |
| PRDII | <i>positive regulatory domain II</i> |
| PTB | <i>polypyrimidine tract binding protein</i> |
| RE | relative Einheiten |

| | |
|--------------------|---|
| Re-PCR | erneute PCR mit Produkt der Vorhergegangenen |
| Rex4p | <i>RNA exonuclease 4p</i> |
| RIG-I | <i>retinoic acid-inducible gene 1</i> |
| RIP1 | <i>receptor-interacting protein 1</i> |
| RISC | <i>RNA-induced silencing complex</i> |
| RL | RNase L (in Plasmidbezeichnungen) |
| RLI | RNase L-Inhibitor |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| RNase L | Ribonuklease L (latent vorliegend) |
| RPA | <i>ribonuclease protection assay</i> |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i> |
| SAS | <i>self assembly sequence</i> |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| SFV | Semliki-Forest-Virus |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| Sp-1 | <i>specificity protein 1</i> |
| ssRNA | einzelsträngige RNA |
| STAT | <i>signal transducers and activators of transcription</i> |
| T4 PNK | T4 Polynukleotidkinase |
| TAB2/3 | <i>TAK1-binding protein 2/3</i> |
| TAE | Tris Acetat EDTA-Puffer |
| TAK1 | <i>transforming growth factor β-activated kinase 1</i> |
| TANK | <i>TRAF family member-associated NF-κB activator</i> |
| TAR-Sequenz | <i>transactivation responsive sequence</i> |
| TBK1 | <i>TANK-binding kinase 1</i> |
| TBS | <i>Tris buffered saline</i> |
| TCID ₅₀ | <i>tissue culture infectious dose₅₀</i> |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin |
| TIM-1 | <i>T cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-1</i> |
| TLR3 | <i>toll-like receptor 3</i> |
| TRAF6 | <i>tumour necrosis factor receptor-associated factor 6</i> |
| TRIF | <i>toll-interleukin1-resistance domain-containing adaptor inducing IFN-β</i> |
| U | <i>unit</i> |
| Ub | Ubiquitin |
| UPR | <i>unfolded protein response</i> |
| USF-1 | <i>upstream transcription factor 1</i> |
| v/v | <i>volume / volume</i> |
| VAK | virusaktivierter Kinase-Komplex |
| vhs | <i>virus host shutoff</i> |
| VPg | <i>virus protein genome-associated</i> |
| VSV | Vesicular-Stomatitis-Virus |
| VT | Volumenteil |
| w/v | <i>weight / volume</i> |

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis A-Virus

Im Jahre 1973 wurde das Hepatitis A-Virus (HAV) mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie als ätiologisches Agens der akuten infektiösen Hepatitis A in Stuhlproben infizierter Patienten erstmalig nachgewiesen (FEINSTONE ET AL., 1973). Es gelang, das Virus in kultivierten tierischen Zellen zu replizieren (PROVOST UND HILLEMANN, 1979) und biochemisch sowie biophysikalisch zu charakterisieren (COULEPIS ET AL., 1982). Die virale genomische RNA wurde nach einer reversen Transkription in cDNA kloniert und charakterisiert (TICEHURST ET AL., 1983). Es erfolgte eine anfängliche Klassifizierung als Enterovirus in der Familie der *Picornaviridae* (GUST ET AL., 1983). Allerdings traten immer mehr Charakteristika zutage, die das Virus von den anderen Picornaviren unterschied. So fielen unter anderem Sequenzunterschiede (PALMENBERG, 1987) und extreme Säure- und Hitzeresistenz (SIEGL ET AL., 1984; SCHOLZ ET AL., 1989) auf. Zudem repliziert HAV in der Regel sehr langsam und führt nicht zu einem cytopathischen Effekt (CPE). Diese Gründe führten, zusammen mit dem in der Familie unüblichen Hepatotropismus des Virus, zu der Definition des neuen Genus Hepatovirus innerhalb der *Picornaviridae*, dessen einzigen Vertreter HAV darstellt (MINOR, 1991).

Die Infektion mit dem weltweit verbreiteten Hepatitis A-Virus erfolgt normalerweise durch eine fäkal-orale Übertragung und ist mit einer Ausscheidung großer Virusmengen über den Stuhl assoziiert, die vorwiegend während der 3-6 Wochen dauernden Inkubationszeit und in der frühen Phase der Erkrankung stattfindet. Abgesehen von schwachen Hinweisen auf extrahepatische Replikation in Tiermodellen (KARAYIANNIS ET AL., 1986; ASHER ET AL., 1995; HORNEI ET AL., 2001; HEITMANN, 2008), wird von der Leber als exklusivem Replikationsort des Virus ausgegangen.

Der Transport in das Darmlumen erfolgt über die Gallenwege (SCHULMAN ET AL., 1976). Die fäkale Virusausscheidung erreicht kurz vor Beginn der Leberschädigung ihr Maximum und wird von einer schwächer ausgeprägten Virämie begleitet. Die Schädigung der Leberzellen zeigt sich durch einen Anstieg von Serumtransaminasen und Bilirubin im peripheren Blut und ist sehr wahrscheinlich nicht auf einen direkten cytopathischen Effekt des Virus zurückzuführen, sondern stellt vielmehr eine immunpathologische Antwort auf die Infektion der Hepatocyten dar. Virusspezifische cytotoxische T-Lymphocyten wandern im Zuge der Infektion in die Leber ein und sind in der Lage, infizierte Zellen zu zerstören, nekrotische

Gewebeveränderungen hervorzurufen und durch die Sekretion von Interferon- γ zusätzliche, unspezifische inflammatorische Zellen zum Infektionsort zu rekrutieren (VALLBRACHT ET AL., 1986; MAIER ET AL., 1988; VALLBRACHT ET AL., 1989; FLEISCHER ET AL., 1990).

Neutralisierende Antikörper sind in der Regel mit dem Beginn des Anstiegs der Serumtransaminasen nachweisbar. Ein starker initialer Anstieg von anti-HAV-IgM ist dicht gefolgt von anti-HAV-IgG, welches lebenslang persistiert. Begleitend finden sich IgA-Antikörper in Serum und Stuhl (MARTIN UND LEMON, 2006). Alle bislang isolierten HAV-Stämme entsprechen einem Serotyp, wobei 5 bis 7 Genotypen unterschieden werden (ROBERTSON ET AL., 1992; COSTA-MATTIOLI ET AL., 2002).

Das Manifestationsspektrum der Hepatitis A reicht von einer stillen, subklinisch ablaufenden Infektion über die klassische ikterische Hepatitis bis zu einer fulminant verlaufenden Hepatitis mit Leberversagen, wobei die Verlaufsformen mehrheitlich vom Alter der Patienten abhängen. Etwa 3 % der infizierten Kinder unter fünf Jahren entwickeln eine klinisch manifeste Erkrankung, bei Fünf- bis 15-Jährigen beträgt der Anteil 30 % und steigt ab dem 18. Lebensjahr auf 70 %. Fulminante oder tödliche Verläufe finden sich bei unter 1,5 % der hospitalisierten ikterischen Fälle, wobei auch hier eine altersabhängige Häufung zu finden ist und die Rate bei über 50-Jährigen Patienten steigt (DOTZAUER, 2008). Normalerweise nimmt die Hepatitis A einen unkomplizierten, selbstlimitierenden und, verglichen mit anderen viral verursachten Hepatitiden, relativ raschen Verlauf. Es kommt nicht zu chronischen Manifestationen, dennoch werden, trotz vorliegenden neutralisierenden Antikörpern, protrahierte, zum Teil relapsierende Verläufe, mit einem oder mehreren Rückfällen, beschrieben. Diese Verläufe können durchaus bis zu 20 % der Patienten betreffen (VALLBRACHT ET AL., 1985; GLIKSON ET AL., 1992).

Das Hepatitis A-Virion besteht aus einem 27 nm durchmessenden, nicht umhüllten, ikosaedrischen Capsid, aus je 60 Kopien seiner Strukturproteine, welches das 7,5 kb lange, einzelsträngige RNA-Genom in Positivorientierung umschließt (FEINSTONE ET AL., 1973; PROVOST ET AL., 1975; SIEGL UND FRÖSNER, 1978; TICEHURST ET AL., 1983). Das Genom enthält einen einzigen *open reading frame* (ORF), der für ein 2227 Aminosäuren (AS) langes, 251 kDa-Polyprotein codiert (TOTSUKA UND MORITSUGU, 1999; MARTIN UND LEMON, 2006). Dem 6,7 kb umfassenden ORF geht eine 5'-terminale, nicht-translatierte Region (5'NTR) aus etwa 730 nt voraus, die reich an Sekundärstrukturen mit regulatorischen Funktionen ist und eine *internal ribosomal entry site* (IRES) enthält (BROWN ET AL., 1991; GLASS ET AL., 1993). Das 5'-Ende des HAV-Genoms ist kovalent an ein Peptid, das VPg (*virus protein genome-*

associated), gebunden (WEITZ ET AL., 1986). Das 3'-Ende wird von der etwa 60 nt messenden und einfachere Sekundärstrukturen tragenden 3'NTR und einer 40-80 nt langen poly-A-Sequenz gebildet (Abb. 1) (SIEGL ET AL., 1981; KUSOV ET AL., 1996).

Für die Kultivierung von HAV in der Zellkultur wurden eine Reihe von permissiven Zelltypen beschrieben, die neben Primatenzellen auch Meerschweinchen-, Schwein- und Delphinzellen umfassen (PROVOST UND HILLEMANN, 1979; FLEHMIG, 1980; DAEMER ET AL., 1981; FLEHMIG ET AL., 1981; DE CHASTONAY UND SIEGL, 1987; DOTZAUER ET AL., 1994).

Der zelluläre Rezeptor für das Hepatitis A-Virus ist bisher noch nicht eindeutig identifiziert worden. Als möglicher Rezeptor wurde mit HAVcr-1 (*HAV cellular receptor-1*) bzw. TIM-1 (*T cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-1*) ein mucinartiges Glycoprotein unbekannter natürlicher Funktion in Affenzellen beschrieben (KAPLAN ET AL., 1996; ASHIDA UND HAMADA, 1997; FEIGELSTOCK ET AL., 1998a). Für das humane Homolog konnte lediglich HAV-Bindekapazität gezeigt werden (FEIGELSTOCK ET AL., 1998b). Dieses Protein wird allerdings nicht selektiv in der Leber exprimiert und kann somit den Hepatotropismus nicht erklären. DOTZAUER ET AL. (2000) konnten hingegen zeigen, dass HAV-spezifisches IgA die Infektion von Hepatocyten mit HAV über den Asialoglycoprotein-Rezeptor (ASGPR) vermittelt. HAV-IgA-Komplexe, wie sie im Stuhl infizierter Personen vorkommen (LOCARNINI ET AL., 1980), sind in der Lage, die Magenpassage zu überstehen (DOTZAUER ET AL., 2000) und werden von polarisierten Epithelzellen über den polymeren Immunglobulin-Rezeptor (pIgR) von der apikalen zur basolateralen Zellseite transcytiert (DOTZAUER ET AL., 2005). Dieser Ansatz bietet einen Mechanismus für die Überbrückung der Darmbarriere und eine mögliche Erklärung des Organotropismus. Letzteres konnte durch Untersuchungen im Tiermodell untermauert werden (HEITMANN, 2008). Das Modell bietet ebenfalls Erklärungsmöglichkeiten bezüglich der relapsierenden Hepatitis A-Verlaufsformen, die trotz der Gegenwart neutralisierender Antikörper vorkommen.

Nach der Penetration und dem *Uncoating* des Virus im Cytoplasma der Wirtszelle wird die virale RNA als mRNA direkt für die Synthese des Polyproteins verwendet. Diese erfolgt über eine IRES-vermittelte, 5'-Cap-unabhängige Translation. Im Gegensatz zu weiteren picornaviralen IRES-Strukturen, ist die Typ III-IRES von HAV auf die Gegenwart des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF4G angewiesen (BORMAN UND KEAN 1997), der von anderen Picornaviren im Zuge eines *virus host shutoff* (vhs)-Mechanismus gespalten wird, um ihrer eigenen 5'-Cap-unabhängigen Translation einen Vorteil zu verschaffen (BEDARD UND SEMLER, 2004). Das synthetisierte Polyprotein wird co- und posttranslational

hauptsächlich durch die virale Protease $3C^{\text{Pro}}$ prozessiert, wobei zuerst drei kleinere Polyproteine entstehen, die folgend in die einzelnen Proteine gespalten werden (Abb. 1) (SCHULTHEISS ET AL., 1994; TOTSUKA UND MORITSUGU, 1999; MARTIN UND LEMON, 2006).

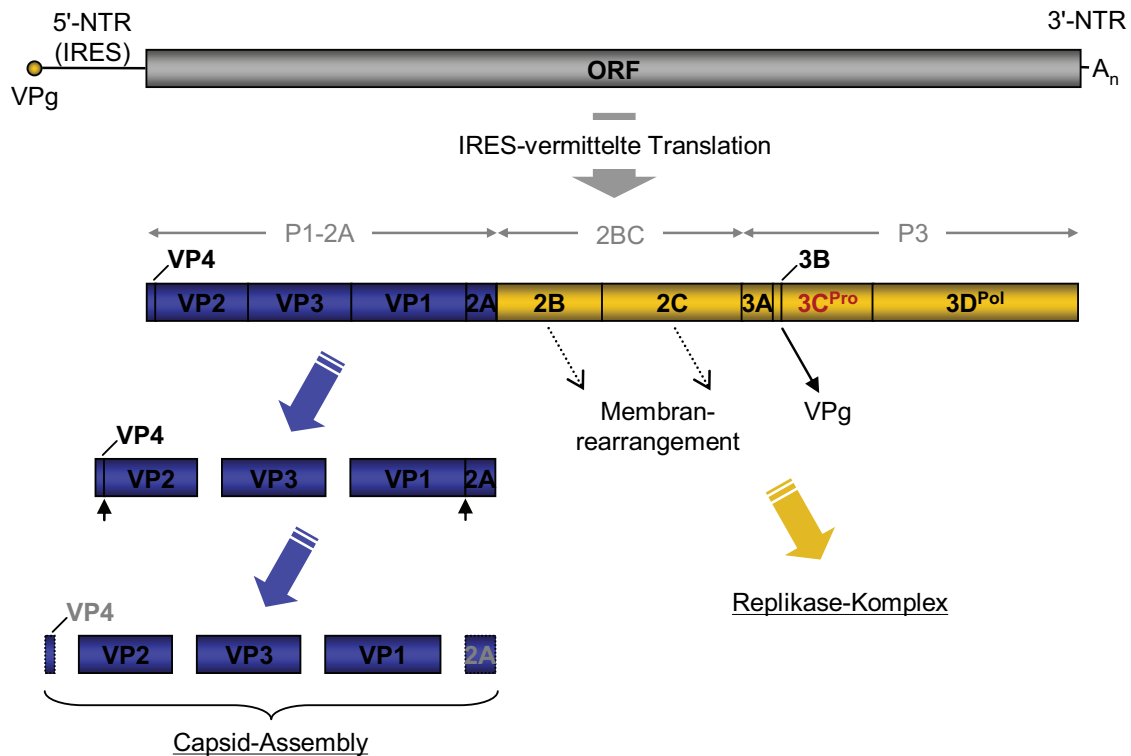


Abb. 1: Genomorganisation und Polyprotein des Hepatitis A-Virus. Das positivsträngige ssRNA-Genom des Hepatitis A-Virus enthält einen einzigen *open reading frame* (ORF), der von einer IRES-enhaltenden 5'- und einer polyadenylierten 3'-NTR flankiert wird. Das 5'-Ende des Genoms ist zudem kovalent an das VPg-Protein gebunden. Durch die IRES-vermittelte Translation entsteht ein Polyprotein, welches durch die virale Protease $3C^{\text{Pro}}$ prozessiert und in die einzelnen HAV-Proteine gespalten wird. Die Spaltungen zwischen VP4 und VP2 sowie VP1 und 2A (*kleine Pfeile*) werden von einer unbekannt proteolytischen Aktivität bzw. einer nicht identifizierten zellulären Protease realisiert (nach MARTIN UND LEMON, 2006).

Die Strukturproteine VP1, VP2, VP3 und VP4 bilden das Capsid, wobei die Spaltung zwischen dem ungewöhnlich kleinen und nicht myristoylierten VP4 und VP2 möglicherweise erst im Virion stattfindet (GAUSS-MÜLLER ET AL., 1986; TESAR ET AL., 1993; PROBST ET AL., 1999). Teilweise wird auch das 2A-Protein in Form des Vorläufers VP1-2A (oder pX) auf der Oberfläche der HAV-Virionen gefunden. Es spielt eine Rolle im *Assembly* der Virionen, verfügt aber im Gegensatz zum 2A-Protein des Poliovirus nicht über eine Proteasefunktion und kann unabhängig von der $3C^{\text{Pro}}$ -Protease von VP1 abgespalten werden (MARTIN ET AL., 1999; PROBST ET AL., 1999; COHEN ET AL., 2002; RACHOW ET AL., 2003). Die Nichtstrukturproteine 2B und 2C spielen eine Rolle in der Replikation und liegen membranassoziiert vor, wobei sie Veränderungen des strukturellen Aufbaus intrazellulärer Membransysteme bewirken (KUSOV ET AL., 1998; GOSERT ET AL., 2000). Das 3AB-Protein vermittelt die

Membranassoziation des viralen Genoms, wobei das 3B-Protein, nach Abspaltung, das VPg darstellt (BENEDUCE ET AL., 1999; TOTSUKA UND MORITSUGU, 1999).

Die RNA-Synthese folgt dem Assembly eines großen, makromolekularen Replikase-Komplexes aus den Nichtstrukturproteinen, der an Membranen lokalisiert ist, die von dem zellulären endoplasmatischen Retikulum stammen. Möglicherweise hat die Spaltung des PABP (*poly(A)-binding protein*) und des PCBP2 (*poly(rC)-binding protein*) durch die virale 3C^{pro}-Protease eine Bedeutung bei dem Wechsel von der Translation der HAV-RNA zu der RNA-Synthese (ZHANG ET AL., 2007a&b). Wahrscheinlich dient das uridylierte VPg der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase 3D^{pol} als Primer für die Synthese der negativ-*sense*, als auch folgender positiv-*sense* RNA (BENEDUCE ET AL., 1999; GOSERT ET AL., 2000; MARTIN UND LEMON, 2006).

Im Zuge der Replikation des Virus akkumuliert virales Antigen im perinukleären Raum (KLINGER ET AL., 2001). Der Mechanismus des *Releases* neuer HAV-Virionen ist unbekannt, benötigt aber nicht die Lyse der Wirtszelle. Er könnte zelluläre, vesikuläre Transportmechanismen involvieren (BLANK ET AL., 2000). Im Zellkultursystem können 90 % der Nachkommen-Viren zellassoziiert vorliegen (ROBERTSON ET AL., 1988).

Die Replikationseffizienz von HAV-Wildtyp-Viren in Zellkultur ist in der Regel minimal und Virusnachkommen können erst nach mehreren Wochen oder Monaten nachgewiesen werden (FRÖSNER ET AL., 1979; PROVOST UND HILLEMANN, 1979; FLEHMIG, 1981; FLEHMIG ET AL., 1981; GAUSS-MÜLLER ET AL., 1981; DAEMER ET AL., 1981). Das Virus muss einen Prozess der Adaptation durchmachen, um die Fähigkeit zur effizienten Replikation zu etablieren. Hierbei kommt es zu der Akkumulation Zellkultur-adaptierender Mutationen (COHEN ET AL., 1987a&b; JANSEN ET AL., 1988; COHEN ET AL., 1989; EMERSON ET AL., 1991; EMERSON ET AL., 1992; FUNKHOUSER ET AL., 1994; GRAFF ET AL., 1994).

Es fielen insbesondere replikationssteigernde Mutationen in der IRES-Sequenz und innerhalb der 2B- und 2C-Bereiche auf. Während die Mutationen in den für 2B und 2C codierenden Sequenzen eine allgemeine Steigerung der viralen RNA-Replikation in Zellkultursystemen zur Folge haben und als essentiell eingestuft wurden (EMERSON ET AL., 1993, YI UND LEMON, 2002), führen die IRES-Mutationen zu einer zelltypabhängigen Steigerung der Cap-unabhängigen viralen Translation (DAY ET AL., 1992; SCHULTZ ET AL., 1996a). Zwei zelluläre Proteine, die je nach Abundanz in kompetitiver Weise einen Einfluss auf die Funktion der HAV-IRES ausüben, sind PTB (*polypyrimidine tract binding protein*), welches eine Steigerung, und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), welches eine

Suppression der IRES-vermittelten Translation verursacht. GAPDH scheint nach Bindung an die IRES die Stabilität ihrer Sekundärstruktur zu vermindern, und so finden sich in zellkulturadaptierten Viren Mutationen, welche die GAPDH-Bindeaffinität der IRES deutlich herabsetzen (SCHULTZ ET AL., 1996b; YI ET AL., 2000). GAPDH bindet als dominantes von mehreren zellulären Proteinen auch spezifisch an andere Bereiche der HAV-RNA, was für die 3D^{pol}-Region und die 3'-NTR gezeigt wurde (NÜESCH ET AL., 1993; KUSOV ET AL., 1996; DOLLENMAIER UND WEITZ, 2003). Hierbei liegen über die Bedeutungen dieser Bindungen bisher keine Erkenntnisse vor, sie stützen aber Beobachtungen von FRINGS UND DOTZAUER (2001) bezüglich adaptiver Mutationen, nach denen die 5'-NTR nicht die einzige Sequenzregion mit wirtszellspezifischen Informationen darstellt. Mit einem Huh7-Hepatomzellklon wurde 2006 erstmalig ein Zell-System beschrieben, in dem Wildtyp-HAV genetisch stabil replizierte (KONDURU UND KAPLAN, 2006).

Einige zellkulturadaptierte HAV-Stämme mit vergleichsweise rasantem Replikationsverhalten und cytopathogenen Eigenschaften wurden beschrieben (VENUTI ET AL., 1985; ANDERSON, 1987; CROMEANS ET AL., 1987; NASSER UND METCALF, 1987; LEMON ET AL., 1991; MORACE ET AL., 1993; BRACK ET AL., 1998). In der Regel repliziert aber auch zellkulturadaptiertes HAV im Vergleich zu anderen Picornaviren ausgesprochen langsam, ohne cytopathische Effekte und führt auf zellulärer Ebene zu der Persistenz des Virus (FLEHMIG, 1981; GAUSS-MÜLLER ET AL., 1981; GAUSS-MÜLLER UND DEINHARDT, 1984; VALLBRACHT ET AL., 1984; DE CHASTONAY UND SIEGL, 1987).

Während andere Picornaviren einen vollen Replikationszyklus innerhalb von 8-12 h nach der Infektion vollziehen und bis zu 1 000 infektiöse Partikel pro Zelle produzieren (RUECKERT, 1990), liegen bei einer HAV-Infektion nach Tagen bis Wochen durchschnittlich nur 20 infektiöse Partikel pro Zelle vor (ANDERSON ET AL., 1988a). Als Erklärungen für den langsamen Replikationsphänotyp des Hepatitis A-Virus wurden eine Reihe von möglichen Ursachen diskutiert: (I.) langsame und asynchrone Freisetzung der viralen RNA (WHEELER ET AL., 1986; CHO UND EHRENFELD, 1991), (II.) ineffiziente Initiation der Cap-unabhängigen Translation durch die HAV-IRES (BROWN ET AL., 1994; WHETTER ET AL., 1994), (III.) im Bezug auf die humane Zelle stark abgewandelte bzw. "optimal deoptimierte" *Codon Usage*, als Anpassung an die Konkurrenz mit der zellulären Translation (PINTÓ ET AL., 2007), (IV.) ineffiziente Prozessierung des Polyproteins (GAUSS-MÜLLER ET AL., 1984), (V.) schnelle Verpackung der Plusstrang-RNA im Zuge des *Assembly*-Prozesses mit daraus folgender Depletion der RNA-Matrizen (ANDERSON ET AL., 1988b), (VI.) Akkumulation von defekten viralen Partikeln mit subgenomischen RNAs (NÜESCH ET AL., 1988). Bisher konnte allerdings

kein Faktor eindeutig für das spezielle Replikationsverhalten des Hepatitis A-Virus verantwortlich gemacht werden.

Einer Phase logarithmischer Virusreplikation folgt in der Regel der Übergang in den Zustand der persistenten Infektion. Hierbei sind alle Zellen der Zellkultur infiziert und die virale Synthese verläuft auf einem niedrigen Level für Monate oder Jahre weiter (VALLBRACHT ET AL., 1984; DE CHASTONAY UND SIEGL, 1987). Die Etablierung der persistenten Infektion korreliert mit einer starken Runterregulation der viralen Replikation und einer Reduktion neu synthetisierter viraler RNA auf minimale Level (DE CHASTONAY UND SIEGL, 1987).

Im Zuge einer HAV-Infektion kommt es in den infizierten Zellen nicht zu der Synthese von Interferon (VALLBRACHT ET AL., 1985). Das Virus ist vielmehr in der Lage, die Induktion der β -Interferonexpression durch doppelsträngige RNA (dsRNA) zu blockieren (BRACK ET AL., 2002). Da HAV sensitiv auf Typ I-Interferone reagiert und die Gabe von exogenem Typ I-Interferon *in vitro* die Eliminierung des Virus bewirkt (VALLBRACHT ET AL., 1984), stellt die Blockade der Interferoninduktion ein wichtiges Mittel zur Sicherung der viralen Replikation dar. Ansonsten könnte es bereits vor Einsetzen der spezifischen Immunantwort zu einer Eliminierung des Virus durch das unspezifische Immunsystem kommen.

1.2 Das Interferonsystem und die Erkennung viraler Pathogene

Die Interferon-*Response* stellt eine primäre Abwehrreaktion des Wirts gegen virale Infektionen dar. ISAACS UND LINDENMANN beschrieben 1957 Interferon (IFN) als ein sezerniertes Makromolekül, welches in der Lage war, mit der Replikation von Influenzaviren zu interferieren. Interferone werden ihrer Aminosäuresequenz nach in die Typen I, II und III unterteilt. Typ II-Interferon ist IFN- γ und wird hauptsächlich von Zellen des Immunsystems wie CD4-positiven T- und fast allen CD8-positiven Zellen sezerniert, nachdem diese Kontakt zu antigenpräsentierenden Zellen hatten oder durch entsprechende Interleukine stimuliert wurden. Die über den IFN- γ -Rezeptor vermittelte Wirkung beschränkt sich hauptsächlich auf immunmodulatorische Funktionen innerhalb des spezifischen Immunsystems und spielt erst in der späten Phase einer Infektion eine Rolle. Zu den Typ I-Interferonen gehören IFN- α und IFN- β , die sich bei *Homo sapiens* aus 13 bzw. einem Subtyp zusammensetzen, sowie einige weitere Vertreter. IFN- α wird insbesondere von Leukocyten produziert, IFN- β von den meisten Zelltypen, aber im besonderen Maße von Fibroblasten.

Die Induktion der Expression von IFN- α/β erfolgt als Reaktion auf eine virale Infektion und stimuliert einen antiviralen Status in Zielzellen. Auch die Typ III-Interferone werden als direkte Reaktion auf eine Virusinfektion produziert, sind aber noch nicht so gut erforscht. Sezerniertes IFN- α/β agiert über den heterodimeren IFN- α/β -Rezeptor, der ubiquitär verbreitet zu sein scheint, und aktiviert, per Signaltransduktion über den JAK-STAT-Weg, die Expression zahlreicher IFN-stimulierter Gene (ISG) (GOODBOURN ET AL., 2000; RANDALL UND GOODBOURN, 2008). Weit über 100 Gene werden durch IFN- α/β signifikant in ihrer Expression beeinflusst (DER ET AL., 1998), von denen zahlreiche für den Aufbau eines antiviralen Status verantwortlich sind.

Die Induktion der IFN- α/β -Expression infolge einer Virusinfektion erfordert die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) durch zelluläre Rezeptoren. Als Interferon-induzierende PAMPs fungieren virale Proteine sowie Nukleinsäuren, die sich von den zellulären differenzieren lassen. Am meisten Beachtung hat in der Vergangenheit dsRNA gefunden, von der angenommen wird, dass sie sowohl von RNA- als auch von DNA-Viren generiert werden kann. Bei Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom entsteht dsRNA bei Transkriptions- und Genom-Replikations-Prozessen und DNA-Viren könnten dsRNA im Zuge konvergenter Transkriptionsvorgänge bilden. Hinzu kommen mögliche doppelsträngige Sekundärstrukturen einzelsträngiger RNA. Auf jeden Fall sind dsRNA und speziell ihr synthetisches, experimentell oft verwendetes Analogon Poly-Inosinsäure:Poly-Cytidylsäure (poly(IC)) sehr starke IFN-Induktoren (RANDALL UND GOODBOURN, 2008).

Die Reaktion auf intrazellulär vorliegende dsRNA, wie sie als Intermediat im Zuge einer Picornavirus-Replikation entsteht, ist in Abb. 2 schematisch dargestellt. Die Erkennung der dsRNA erfolgt über die zwei verbreitet exprimierten RNA-Helikasen RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) und MDA-5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*). Beide sind in der Lage auf transfiziertes poly(IC) zu reagieren (ANDREJEVA ET AL., 2004; YONEYAMA ET AL., 2004, YONEYAMA ET AL., 2005; YAMASHITA ET AL., 2005; CARDENAS ET AL., 2006; TAIMA ET AL., 2006). RIG-I vermittelt auch eine Reaktion auf einzelsträngige RNA (ssRNA), wenn diese am 5'-Ende einen Triphosphatrest trägt (HORNUNG ET AL., 2006; PICHLMAIR ET AL., 2006; KATO ET AL., 2006). Zelluläre ssRNA verfügt über 5'-Cap-Strukturen, 5'-Monophosphate oder andere Modifikationen, die eine Differenzierung zulassen. Die 5'-Enden der RNA von Picornaviren sind an das VPg gebunden, passenderweise erwies sich auch MDA-5 als essentiell für die IFN-Produktion als Reaktion auf eine Picornavirus-Infektion (GITLIN ET AL., 2006; KATO ET AL., 2006). Nach der Aktivierung von RIG-I oder MDA-5 rekrutieren und

aktivieren diese das mitochondrienassoziierte MAVS (*mitochondrial antiviral signalling protein*; analog: CARDIF, VISA oder IPS-1), von dem aus drei Wege zu der Aktivierung IFN-relevanter Transkriptionsfaktoren führen (HISCOTT ET AL., 2006; JOHNSON UND GALE, 2006). MAVS interagiert mit TRAF6 (*tumour necrosis factor receptor-associated factor 6*), worauf dieses Ubiquitin-E3-Ligase-Aktivität entfaltet und sich selbst sowie RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) polyubiquitiniert. Hierdurch kommt es zur Erkennung durch TAB2 und TAB3 (*TAK1-binding protein 2/3*), die eine Komplexbildung mit TAK1 (*transforming growth factor β -activated kinase 1*) vermitteln. Das polyubiquitinierte RIP1 wird von NEMO (*NF- κ B essential modifier*) erkannt, welches die γ -Untereinheit des IKK-Komplexes (*I κ B kinase complex*) darstellt, der in Folge rekrutiert wird. Die folgende Phosphorylierung der IKK β -Untereinheit des IKK-Komplexes durch TAK1 führt zu der Phosphorylierung, der folgenden Ubiquitinierung und proteosomalen Degradation von I κ B, dem Inhibitor von NF- κ B (RANDALL UND GOODBOURN, 2008). Das prototypische NF- κ B stellt ein Heterodimer aus p65 und p50 dar (THANOS UND MANIATIS, 1995; LI UND VERMA, 2002) und liegt, durch Assoziation mit seinem Inhibitor I κ B, im inaktiven Zustand im Cytoplasma vor. Die durch den IKK-Komplex induzierte Ubiquitinierung und proteosomale Degradation des I κ B führt zu der Demaskierung eines NLS-Signals (*nuclear localisation signal*) bei NF- κ B. Zusätzlich zu der Dissoziation von I κ B wird NF κ B an seiner p65-Untereinheit phosphoryliert, was sich stabilisierend auf folgende Interaktionen auswirkt (ZHONG ET AL., 2002). Der Transkriptionsfaktor transloziert in den Nukleus und beteiligt sich dort, über die Bindung an die PRDII (*positive regulatory domain II*) des IFN- β -Enhancers, an der Induktion der IFN- β -Expression (LENARDO ET AL., 1989; ESCALANTE ET AL., 2002). Die Komplexbildung von TAK1 mit TAB1 und TAB2 führt ebenfalls zu der Phosphorylierung und Aktivierung von Kaskaden mitogenaktivierter Proteinkinasen (MAPK), an deren Enden die Phosphorylierung der nukleären Transkriptionsfaktoren ATF-2 (*activating transcription factor 2*) und c-JUN (*cellular v-jun homolog*) stehen. Diese binden als Heterodimer an die PRDIV des IFN- β -Enhancers (MAY ET AL., 1998; MANIATIS ET AL., 1998; SCHAEFFER UND WEBER, 1999). Die stärkste und essentielle transaktivierende Wirkung geht aber von IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*) aus. MAVS interagiert wahrscheinlich direkt mit TRAF3, welches seinerseits mit TANK (*TRAF family member-associated NF- κ B activator*), einer Untereinheit des virusaktivierten Kinase-Komplexes (VAK), interagiert, über dessen weitere Komponenten TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) oder IKK ϵ (*inhibitor of NF- κ B kinase ϵ*) es zur Phosphorylierung von IRF-3 kommt. Eine spezifische Interaktion von TANK mit NEMO weist auf potentielle Co-Regulations-

mechanismen hin (RANDALL UND GOODBOURN, 2008). IRF-3, welches inaktiv als Monomer vorwiegend im Cytoplasma vorliegt, dimerisiert in Folge der Phosphorylierung, transloziert in den Nukleus und bildet dort mit p300/CBP (*CREB-binding protein*) den *dsRNA-activated factor 1* (DRAF1)-Komplex. Nach Acetylierung des IRF-3 durch p300/CBP vermittelt es die Bindung an die PRDIII-I des IFN- β -Enhancers (SUHARA ET AL., 2002). Gemeinsam mit NF- κ B und ATF-2/c-JUN sowie HMG-I-Proteinen (*high mobility group I*) wird die Induktion der IFN- β -Expression in synergistischer Weise vermittelt (MANIATIS ET AL., 1998).

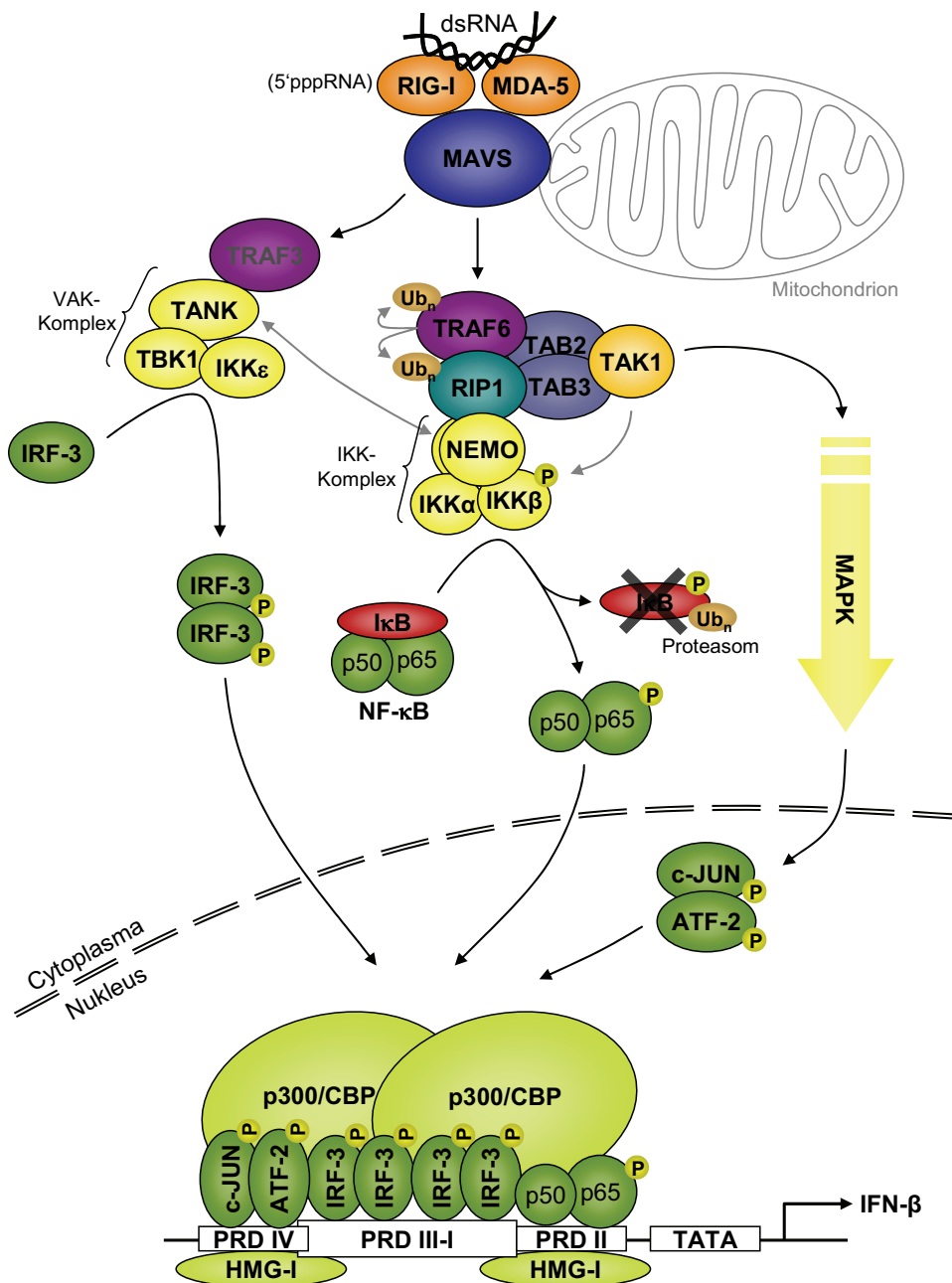


Abb. 2: Erkennung intrazellulärer dsRNA und folgende Induktion der IFN- β -Expression. Die Rezeptoren RIG-I und MDA-5 aktivieren über ihren Adapter MAVS Signalwege, welche zum Aufbau des IFN- β -Enhanceosoms führen und die Transkription des IFN- β -Gens initiieren (nähere Erläuterungen im Text).

Zusätzlich zu der Reaktion auf intrazelluläre dsRNA kann auch extrazelluläre oder endosomal vorliegende dsRNA zu der Induktion der IFN- β -Expression führen, wenn die Zellen über den entsprechenden Rezeptor verfügen. Diesen Rezeptor stellt der TLR3 (*toll-like receptor 3*) dar, der in der Lage ist, über das Adapterprotein TRIF (*toll-interleukin-1-resistance (TIR) domain-containing adaptor inducing IFN- β*), den oben beschriebenen Wegen ähnliche Signaltransduktionspfade zu verwenden, um die Transkriptionsfaktoren des IFN- β -Enhancers zu aktivieren (RANDALL UND GOODBOURN, 2008). Die sekundärstrukturentragende genomische RNA des Hepatitis A-Virus wirkt sich bei extrazellulärer Applikation allerdings nicht aktivierend auf den TLR3 aus (HILLEBRECHT, 2002), eine Rolle bei der Reaktion auf Replikationsintermediate kann aber nicht ausgeschlossen werden.

1.3 Effekte des Hepatitis A-Virus auf die Induktion zellulärer

Abwehrmechanismen

Das Hepatitis A-Virus ist in der Lage, die RIG-I-vermittelte IFN- β -Induktion zu unterbinden, indem es die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 als Schlüsselkomponente des IFN- β -Enhancers, oberhalb der aktivierenden Kinasen TBK1 bzw. IKK ϵ , blockiert. Zusätzlich kommt es zur Reduktion einer TRIF-vermittelten IRF-3-Aktivierung des TLR3-Weges (FENSTERL ET AL., 2005). Die Blockade des RIG-I/MDA-5-Weges erfolgt durch Beeinflussung der MAVS-abhängigen Signalweiterleitung. Diese wird im starken Maße durch eine ektopische Expression des HAV-2B-Proteins supprimiert, welches in der Zelle zum Teil mit MAVS kolokalisiert vorliegt (PAULMANN ET AL., 2008). Aber auch für das 3ABC-Intermediat konnte hier eine hemmende Wirkung gezeigt werden. YANG ET AL. (2007) konnten eine Beeinflussung von MAVS durch die in 3ABC enthaltene virale Protease 3C^{pro} zeigen, durch welche MAVS gespalten wird. Dieser Vorgang gleicht dem Mechanismus, mit dem das zur Familie der *Flaviviridae* gehörende Hepatitis C-Virus (HCV) die IFN- β -Induktion durch proteolytische Spaltung von MAVS über das virale NS3/4A-Protein inhibiert (MEYLAN ET AL., 2005; LI ET AL., 2005). Während HCV neben der Aktivierung von IRF-3 auch die von NF- κ B blockiert, ist letzteres bei HAV nicht der Fall. Im Zuge einer HAV-Infektion kommt es vielmehr zu der Aktivierung von NF- κ B (FENSTERL ET AL., 2005), diese allein ist allerdings nicht ausreichend für eine IFN- β -Induktion.

Zusätzlich zu der Suppression der IFN- β -Induktion ist HAV auch in der Lage, die Induktion von Apoptose durch dsRNA und weitere Stimuli zu inhibieren (BRACK ET AL., 2002;

ALBRECHT, 2004). Möglicherweise reichen diese Maßnahmen zur Inhibition zellulärer Abwehrmechanismen aber im späteren Verlauf der Infektion nicht mehr aus. Wie bereits erwähnt, korreliert die Etablierung der Persistenz mit einer starken Reduktion der viralen Replikation. Sowohl die Synthese viraler mRNA, als auch die Replikation viraler genomischer RNA werden deutlich vermindert (DE CHASTONAY UND SIEGL, 1987). Dieser Vorgang könnte essentiell sein, um zelluläre Reaktionen auf akkumulierende dsRNA zu unterdrücken. Eine Regulation der viralen Replikation auf ein moderates Niveau könnte auf zellulärer Ebene die Ausbildung der persistenten Infektion ermöglichen und *in vivo* zur Etablierung der Infektion beitragen.

Diese Überlegungen werden durch Untersuchungen mit der cytopathogenen Hepatitis A-Virusvariante HAV_{cyt/HB1.1} unterstützt. Diese Variante repliziert schneller und erreicht höhere Titer als nicht-cytopathogene HAV-Varianten und weist auf eine Korrelation apoptotischer Merkmale in der Zellkultur mit der Höhe des viralen Titers hin (BRACK ET AL., 1998; BRACK ET AL., 2002). Dies legt eine Verbindung zwischen Replikationsphänotyp und dem persistenten bzw. cytopathischen Charakter der Infektion auf zellulärer Ebene nahe. Die Mechanismen, mit denen nicht-cytopathogenes HAV/7 seine Replikation bei der Etablierung der Persistenz herunterreguliert, wirken in *trans* auch auf HAV_{cyt/HB1.1} und reduzieren dessen Replikation. Bei einer Überinfektion persistent HAV/7-infizierter FRhK-4-Zellen mit HAV_{cyt/HB1.1} kommt es nicht zur Apoptose, sondern zu einem persistenten Charakter der ansonsten cytopathischen Infektion (BRACK ET AL., 2002).

Die Mechanismen hinter dem Phänomen der gedrosselten Replikation sind allerdings völlig unbekannt. DE CHASTONAY UND SIEGL (1987) schlagen eine Blockade der Translation viraler RNA vor und somit eine Abnahme der Konzentration an viraler Polymerase. Zudem diskutieren sie die Möglichkeit der regulativen Funktion einer subgenomischen RNA, die etwa 2 kb der für die Strukturproteine codierenden Region umfasst. Im Zuge dieser Überlegungen wurde auch ein möglicher Zusammenhang mit defekten, potentiell interferierenden Partikeln betrachtet. Diese treten in HAV-infizierten Zellkultursystemen regelmäßig auf, aber weder Quantität noch Qualität der deletierten Virusgenome wiesen einen Einfluss auf die Etablierung der Persistenz auf (NÜESCH ET AL., 1988). 1993 zeigten NÜESCH ET AL., dass ab Beginn der persistenten Infektion in den Zellen Proteine vorliegen, welche einen Bereich der viralen 3'-NTR binden. Eine Spezifizierung dieser Proteine blieb allerdings aus. Bis heute ist über den Mechanismus der Replikationsdrosselung nichts bekannt.

Komponenten zellulärer antiviraler Systeme, die durch Interferon stimuliert werden, können häufig auch direkt durch die Gegenwart einer viralen Infektion oder dsRNA induziert werden, oder liegen basal exprimiert auf einem niedrigem Level vor. Die Regulation der HAV-Replikation könnte durch solche zelluläre antivirale Mechanismen realisiert werden, die IFN-unabhängig und auf einem schwächeren Wirkungsniveau im Verlauf der HAV-Infektion induziert werden. Im Zuge dieser Arbeit wurden zur weiteren Untersuchung dieses Regulationsvorganges drei solcher antiviraler Systeme, die im Folgenden vorgestellt werden, im Kontext mit einer HAV-Infektion betrachtet.

1.4 ISG20, eine Nuklease mit antiviralen Eigenschaften

ISG20 wurde erst 1997 als IFN-stimuliertes Genprodukt von 20 kDa bei der Suche nach bisher unidentifizierten IFN-regulierten Genen gefunden (GONGORA ET AL., 1997; MATTEI ET AL., 1997), parallel aber auch im Kontext einer östrogenabhängigen Expressionssteigerung als *human estrogen regulated transcript 45* (HEM45) beschrieben (PENTECOST, 1998).

Es handelt sich um eine 3'-5'-Exonuklease mit einer Präferenz für ssRNA und der deutlich schwächeren Fähigkeit zur ssDNA-Degradation (NGUYEN ET AL., 2001). ISG20 wurde der Superfamilie der DEDD-Exonukleasen zugeordnet, welche vier stark konservierte Aspartat- (D) bzw. Glutamat- (E) Aminosäurereste in drei Sequenzmotiven beinhalten und zu denen beispielsweise die RNase T und D sowie die *Proofreading*-Domäne der Pol I-DNA-Polymerasen zählen (MOSER ET AL., 1997; ZUO UND DEUTSCHER, 2001). Das ISG20-Protein weist nur eine katalytische Exonukleasedomäne auf und scheint über keine regulatorische Domäne zu verfügen (Abb. 3), was eine Regulation der Nukleaseaktivität über komplexere Interaktionen mit anderen Faktoren nahe legt (DEGOLS ET AL., 2007).



Abb. 3: Schematische Darstellung des ISG20-Proteins. Die große, grün dargestellte Exonukleasedomäne enthält die drei Exonukleasemotive Exo I-III mit den konservierten Aspartat- (D) und Glutamatresten (E) der DEDD-Superfamilie in rot. Durch den ebenfalls konservierten Histidinrest (h) erfolgt die Einteilung der ISG20-Nuklease in die DEDDh-Untergruppe. (AS: Aminosäureposition) (nach: DEGOLS ET AL., 2007, modifiziert)

Zusätzlich zu einer diffusen cyto- und nukleoplasmatischen Lokalisation findet sich ISG20 im Nukleus in Nukleoli und Cajal-Körpern, nukleären Bereichen der RNA-Prozessierung, und insbesondere in Bereichen der rRNA-Reifung (ESPERT ET AL., 2006). Aminosäure-Sequenzvergleiche wiesen ISG20 als mögliches humanes Homolog des Hefe-Proteins Rex4p

(*RNA exonuclease possibly involved in pre-rRNA processing and ribosome assembly*) aus, für dessen Familie Funktionen im Zusammenhang mit der Prozessierung vieler RNA-Spezies beschrieben wurden (VAN HOOF ET AL., 2000). Somit könnte ISG20 eine Rolle in den Reifungsprozessen von RNAs, insbesondere rRNAs innehaben.

Auf jeden Fall verfügt ISG20 aber über antivirale Eigenschaften und vermittelt bei Überexpression eine Resistenz gegen RNA-Viren wie das Vesicular-Stomatitis- (VSV), Encephalomyocarditis- (EMCV), Sindbis- und Influenzavirus und interferiert mit der Replikation des humanen Immundefizienzvirus (HIV-1) und von Hepatitis C-Virus-Replikons (ESPERT ET AL., 2003; ESPERT ET AL., 2005; ZHANG ET AL., 2007; JIANG ET AL., 2008). Die Replikation eines Reporter-gen-tragenden Adenovirus, mit seinem DNA-Genom, wurde hingegen nicht beeinflusst (ESPERT ET AL., 2003).

Der Mechanismus der antiviralen Aktivität der ISG20-Nuklease ist unklar und die Effekte auf die virale Replikation unterschiedlich stark ausgeprägt. Aber, zumindest auf VSV bezogen, scheint ISG20 für einen wesentlichen Teil der IFN-vermittelten antiviralen Aktivität zuständig zu sein, die durch Expression einer dominant negativen ISG20-Mutante erheblich vermindert wird. Die Inhibition der VSV-Replikation durch ISG20 erfolgt spezifisch und ohne Beeinflussung der Expression zellulärer Kontrollgene (ESPERT ET AL., 2003). Ob dies durch direkte Degradation viraler RNA erfolgt oder ISG20 indirekt über weitere zelluläre Faktoren wirkt, ist ungeklärt. Die intakte Exonukleasedomäne ist allerdings für die antiviralen Eigenschaften notwendig (ESPERT ET AL., 2003; ESPERT ET AL., 2005).

Das auf Chromosom 15 lokalisierte humane ISG20-Gen verfügt über einen TATA-Box-freien Promotor, dessen basale Aktivität von den, für *Housekeeping*-Gene bekannten, Transkriptionsfaktoren Sp-1 (*specificity protein 1*) und USF-1 (*upstream transcription factor 1*) abhängig ist (Abb. 4). Sein ISRE (IFN-stimuliertes *Response*-Element)-Motiv ist in der Lage, eine Expressionssteigerung als Reaktion auf Typ I- und Typ II-Interferone zu vermitteln (GONGORA ET AL., 2000).



Abb. 4: Cis-Elemente des ISG20-Promotors in der Region bis 460 bp vor dem Transkriptionsstart. Die SP1-Bindemotive sind zusammen mit der E-box durch Rekrutierung der Transkriptionsfaktoren Sp-1 bzw. USF-1 für die basale Aktivität des Promotors zuständig. Die Reaktion auf Typ I- und Typ II-IFN wird über das ISRE-Motiv vermittelt, für die *gamma-activated sequence* (GAS) konnte keine Funktionalität nachgewiesen werden. NF-κB spielt durch Bindung an das κB-Element zelltyp-abhängig eine zentrale Rolle in der Induktion der ISG20-Expression durch dsRNA. (nach: GONGORA ET AL., 2000)

Eine Induktion der ISG20-Expression infolge einer Infektion wurde für HIV-1, das Rabies- und das Hepatitis B-Virus (HBV) sowie für Herpesviren (SIMMEN ET AL., 2001; IZMAILOVA ET AL., 2003; WIELAND ET AL., 2004; ESPERT ET AL., 2005; PRÉHAUD ET AL., 2005; YUAN ET AL., 2006) beschrieben aber auch für bakterielle und parasitäre Infektionen mit Listerien, *Mycobacterium tuberculosis* und *Toxoplasma gondii* (STAEGE ET AL., 2001; CHAUSSABEL ET AL., 2003). Die Induktion kann hierbei IFN-vermittelt oder IFN-unabhängig erfolgen. So kann die Aktivierung von Rezeptoren der TLR-Familie durch PAMPs wie CpG-Oligodeoxynukleotide, Lipopolysaccharide und dsRNA direkt zu der Induktion der ISG20-Expression führen (HASHIMOTO ET AL., 2000; KATO ET AL., 2003; ESPERT ET AL., 2004). Die starke ISG20-Induktion durch Behandlung von HeLa-Zellen mit synthetischer dsRNA ist NF- κ B-abhängig, welches in einer ersten Phase die Promotoraktivität über die Bindung des κ B-Elements steigert und später durch die Bindung von IRF-1 an die ISRE unterstützt wird (ESPERT ET AL., 2004). Allerdings scheint NF- κ B bei vaskulären Endothelzellen in diesem Kontext keine Rolle zu spielen (IMAZUMI ET AL., 2008), was auf zelltypabhängig unterschiedliche Induktionswege schließen lässt.

1.5 Das MxA-Protein, eine große GTPase mit antiviraler Funktion

Das nächste zu betrachtende antivirale Protein gehört der Familie der Mx-Proteine an. Die Erstbeschreibung eines Mx-Gens als *myxovirus resistance gen* erfolgte bereits 1964 und beschrieb ein einzelnes Gen als Ursprung der Resistenz eines Mäuse-Inzuchtstammes gegen die, ansonsten bei Labormäusen letal verlaufende, Infektion mit einem Influenza-A-Virus (LINDENMANN, 1964). Das entdeckte Mx1 stellte sich als Interferon stimuliertes Gen heraus und die Familie der Mx-Proteine gehört, zusammen mit der Protein Kinase R (PKR) und dem 2',5'-Oligoadenylatsynthetase-System, zu den am besten untersuchten Mediatoren der IFN-vermittelten antiviralen Mechanismen.

Mx-Proteine finden sich in den meisten Vertebraten inklusive Vögeln und Fischen und wurden auch bei einer Molluskenart beschrieben (HALLER ET AL., 2007; DE ZOYSA ET AL., 2007). *Homo sapiens* verfügt mit MxA und MxB über zwei Mx-Homologe, wobei lediglich für MxA, welches auf Chromosom 21 codiert ist, antivirale Aktivität gezeigt werden konnte (STAEHELI UND HALLER, 1985; HORISBERGER ET AL., 1988; AEBI ET AL., 1989).

Die Mx-Proteine wurden der Familie der großen GTPasen zugeordnet, die sich durch ein hohes Molekulargewicht (um 80 kDa) und die Fähigkeit zur GTP-Hydrolyse bei geringer Affinität zu Guanin-Nukleotiden und hoher Hydrolyserate auszeichnen (STAEHELI ET AL.,

1993). Zu dieser Familie gehören die Dynamine, die grundlegende Funktionen im Zusammenhang mit intrazellulären Transportvorgängen innehaben und eine entscheidende Rolle bei der Abschnürung von Vesikeln spielen. Für große GTPasen wird eine mechanochemische Aktivität postuliert, wobei das Molekül durch die Bindung von GTP in einen aktivierten Zustand versetzt wird und die folgende Hydrolyse Konformationsänderungen bewirkt, die als mechanochemische Energie auf Zielstrukturen wie Membranen übertragen werden kann (WARNOCK UND SCHMID, 1996; DANINO UND HINSHAW, 2001). Für die antivirale Funktion von Mx-Proteinen scheint die Bindung, nicht die Hydrolyse, von GTP entscheidend zu sein (PITOSI ET AL., 1993; SCHWEMMLE ET AL., 1995a; PONTEN ET AL., 1997; KOCHS ET AL., 1998; KOCHS UND HALLER, 1999a), und eine essentielle Konformationsänderung einzuleiten (VARNE ET AL., 2002).

Das 662 AS lange MxA-Protein gliedert sich in eine N-terminale GTPase-Domäne, eine zentrale Interaktionsdomäne (CID) und eine Leucin-Zipper-Region (LZ) (Abb. 5). Die GTPase-Domäne beinhaltet drei hochkonservierte GTP-Bindungs-Konsensusmotive (DEVER ET AL., 1987) und eine *Self-Assembly*-Sequenz (SAS), die für intermolekulare Wechselwirkungen bedeutsam ist (NAKAYAMA ET AL., 1993). Zwei konservierte Leucin-Zipper am C-Terminus interagieren mit der CID-Region, was eine wichtige Voraussetzung für die Funktion der GTPase-Domäne darstellt (SCHWEMMLE ET AL., 1995b). Zudem trägt der C-Terminus zu der antiviralen Spezifität bei (ZÜRCHER ET AL., 1992; FRESE ET AL., 1995).

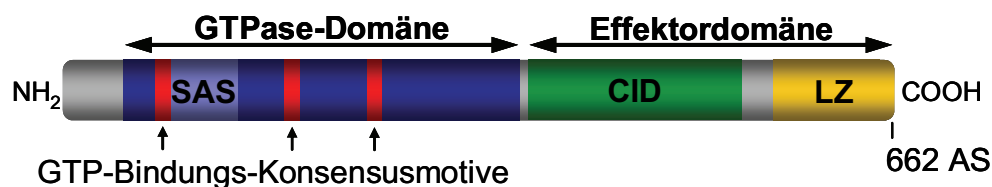


Abb. 5: Schematische Darstellung des MxA-Proteins. Die N-terminale GTPase-Domäne enthält drei hochkonservierte GTP-Bindungsmotive, in ihrem Bereich liegt ebenfalls die *Self-Assembly*-Sequenz (SAS). Die Effektor-domäne umfasst die zentrale Interaktionsdomäne (CID) und die Leucin-Zipper-Region (LZ). (nach: HALLER UND KOCHS, 2002)

Wie andere große GTPasen sind Mx-Proteine in der Lage, ein *Self-Assembly* in geordnete, hochmolekulare Strukturen durchzuführen und zeigen kooperative GTP-Hydrolyse (MELÉN ET AL., 1992; NAKAYAMA ET AL., 1993; KOCHS ET AL., 2002a; ACCOLA ET AL., 2002). Dieser Vorgang spielt eine Rolle für die Stabilität und die GTPase-Aktivität des Proteins sowie für die Erkennung viraler Zielstrukturen und resultiert wahrscheinlich aus intermolekularen Wechselwirkungen zwischen LZ- und CID-Regionen (SCHUMACHER UND STAEHLI, 1998; JANZEN ET AL., 2000).

MxA akkumuliert im Cytoplasma IFN-behandelter Zellen in punktförmigen Granula (STAEHELI UND HALLER, 1985) und ist mit einer Halbwertszeit von 24 h sehr stabil, während monomeres MxA zügig degradiert wird (JANZEN ET AL., 2000). Daher könnten die Aggregate eine Form der Lagerung darstellen. Obwohl MxA-Proteine nicht über Membraninteraktions-Domänen der Dynamine verfügen, sind sie in der Lage, wie diese, Lipid-Vesikel zu binden und in tubuläre Strukturen umzuformen (ACCOLA ET AL., 2002; KOCHS ET AL., 2005). So findet sich ein großer Anteil des zellulären MxA-Proteins membranassoziiert in Bereichen des glatten Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert (STERTZ ET AL., 2006).

Das antivirale Potential der Mx-Proteine wurde in vielfältigen Studien untersucht. Hier zeigte sich für *Mammalia* der Ordnung *Rodentia*, die in der Regel über zwei Formen antiviraler Mx-Proteine verfügen, eine Korrelation der antiviralen Aktivität mit der subzellulären Lokalisation. So vermittelt das nukleäre Mx1 von Ratten und Mäusen Resistenzen gegen unterschiedliche Viren, die im Nukleus replizieren, während das cytoplasmaständige Mx2 antivirale Wirkung gegen Viren mit cytoplasmatischem Replikationsort entfaltet (HALLER ET AL., 2007).

Das im Cytoplasma lokalisierte humane MxA weist hingegen ein weites antivirales Spektrum gegen unterschiedliche Virustypen, unabhängig von dem Ort ihrer Replikation, auf. Unter Vertretern mit ssRNA-Genomen in Negativstrangorientierung wurden MxA-sensitive Viren in den Familien der *Bunya-*, *Orthomyxo-*, *Paramyxo-* und *Rhabdoviridae* beschrieben (PAVLOVIC ET AL., 1990; SCHNEIDER-SCHAULIES ET AL., 1994; FRESE ET AL., 1995; FRESE ET AL., 1996; ZHAO ET AL., 1996; ANDERSSON ET AL., 2004; BRIDGEN ET AL., 2004), für ssRNA-Genome mit Plusstrangorientierung in den Familien der *Picorn-* und *Togaviridae* (LANDIS ET AL., 1998; CHIEUX ET AL., 2001). Ebenso wurden antivirale Aktivitäten gegen dsRNA-Viren der *Birna-* und *Reoviridae* (MUNDT, 2007) sowie gegen das Hepatitis B-Virus, als DNA-Virus mit einem genomischen RNA-Intermediat, (GORDIEN ET AL., 2001) nachgewiesen.

Der Mechanismus der antiviralen Aktivität gegen die viralen Vertreter aus unterschiedlichsten Familien ist noch nicht komplett verstanden. Mx-Proteine sind in der Lage, essentielle virale Komponenten zu binden und ihre Funktion zu hemmen. So bindet MxA die Nukleocapside des Thogotovirus und verhindert deren Transport in den Nukleus, den Standort der Orthomyxovirus-Replikation (KOCHS UND HALLER, 1999a&b). Im Cytoplasma replizierende Bunyaviren werden inhibiert, indem MxA große copolymere Komplexe mit dem viralen Nukleocapsid- (N) Protein bildet, wodurch es zu einer Depletion des N-Proteins am Ort der

viralen Replikation kommt (KOCHS ET AL., 2002b; REICHELT ET AL., 2004). Bei anderen Viren, wie dem Vesikular-Stomatitis- oder dem Masern-Virus, ist der Angriffspunkt noch unklar. Meistens wird bereits die initiale Transkription des viralen Genoms durch die virale Polymerase gehemmt, wobei es aber auch zu zelltypabhängigen Unterschieden kommt und posttranskriptionelle Prozesse betroffen sind (STAEHELI UND PAVLOVIC, 1991; SCHNEIDER-SCHAULIES ET AL., 1994; SCHWEMMLE ET AL., 1995a). Bei Experimenten mit Semliki-Forest-Virus- (SFV-) Replikons wurde eine MxA-abhängige Transkriptionshemmung unabhängig von dem Vorhandensein viraler Strukturproteine gezeigt (LANDIS ET AL., 1998).

HALLER UND KOCHS schlagen ein Modell vor, in dem in IFN-stimulierten Zellen ein Pool von, durch Aggregatbildung stabilisierten, MxA-Homooligomeren entsteht, von dem transient Monomere entlassen werden. Die Erkennung viraler Zielstrukturen induziert dann die Rekrutierung von weiteren MxA-Molekülen, welche die viralen Strukturen sequestrieren und somit immobilisieren und der viralen Replikation entziehen (HALLER UND KOCHS, 2002).

Während das MxA-Protein in uninduzierten Zellen nicht nachweisbar ist, erreicht es nach Induktion mit Typ I-IFN sehr hohe Level und kann nach ca. 16 h bis zu 1 % des cytosolischen Proteinanteils der Zelle ausmachen (GOETSCHY ET AL., 1989; HORISBERGER, 1992). Die MxA-mRNA steigt hierbei innerhalb einer 6stündigen Inkubation von <1 Molekül pro Zelle auf 500 MxA-mRNA-Moleküle pro Zelle an. Die Reaktion auf eine IFN- γ -Behandlung fällt deutlich niedriger aus (AEBI ET AL., 1989). Eine ebenfalls niedrigere, aber immer noch starke direkte Induktion, die unabhängig von der Proteinbiosynthese erfolgt, wurde für eine Infektion mit dem Newcastle-Disease-Virus (NDV) beschrieben, ebenso für Influenza A und VSV, sowie eine Behandlung mit poly(IC) (AEBI ET AL., 1989; GOETSCHY ET AL., 1989). Die direkte virusinduzierte Hochregulation der MxA-Expression scheint allerdings zelltypabhängig zu sein, so wurde in einer anderen Arbeit nur eine marginale Induktion durch NDV und das Influenza A-Virus gefunden (BAZZIGHER ET AL., 1992).

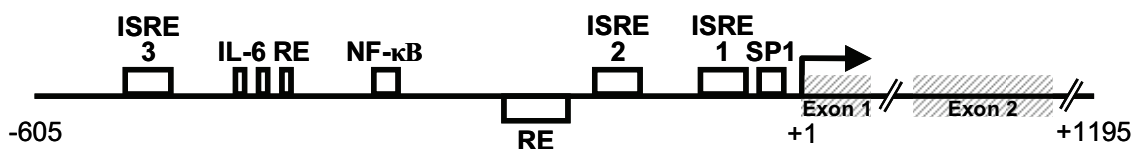


Abb. 6: Cis-Elemente der Promotorregion des MxA-Gens. In der 605 bp-langen Region vor dem Transkriptionsstart des Mx-Gens finden sich drei ISRE-Motive, von denen nur die beiden proximal gelegenen Elemente (ISRE1, ISRE2) die Aktivität des TATA-Box-freien Promotors beeinflussen. Zusätzlich findet sich ein SP1-Bindemotiv, welches funktional in der Lage ist, den Transkriptionsfaktor SP1 zu binden. Eine Assoziation von NF- κ B mit dem vorliegenden Sequenzmotiv des κ B-Elements konnte nicht gezeigt werden. Trotz der drei Interleukin-6 *response elements* (IL-6 RE) zeigt der Promotor keine Beeinflussung durch IL-6-Behandlung der Zellen. Zudem tragen ein IFN-unabhängiges Repressorelement (RE) und wahrscheinlich ein *Enhancer* im Intron 1 zu der Regulation des Mx-Gens bei. (nach: HORISBERGER ET AL., 1990; CHANG ET AL., 1992; RONNI ET AL., 1998)

Nach Identifikation des korrespondierenden Promotors (Abb. 6) konnte die IFN- und poly(IC)-Induzierbarkeit des MxA-Gens mit Reportergenkonstrukten nachvollzogen werden (HORISBERGER ET AL., 1990; CHANG ET AL., 1991; RONNI ET AL., 1998).

1.6 Das 2',5'-Oligoadenylatsynthetase/RNase L-System

Zuletzt soll das 2',5'-Oligoadenylatsynthetase/RNase L-System vorgestellt werden, ein aktivierbares ssRNA-Degradationssystem. Es gehört zu den prominentesten der IFN-induzierten antiviralen Mechanismen. Allerdings liegen die Bestandteile des Systems auch bereits ohne IFN-Induktion in geringeren Mengen basal exprimiert und latent in Vertebratenzellen vor.

Der Initialpunkt für die Entdeckung des Systems war die Feststellung, dass die Proteinsynthese in Zell-Lysaten durch dsRNA inhibiert werden konnte und dieser Effekt nach einer IFN-Behandlung verstärkt auftrat (EHRENFELD UND HUNT, 1971; HUNT UND EHRENFELD, 1971; FRIEDMANN ET AL., 1972; KERR ET AL., 1974; ROBERTS ET AL., 1976a). Die folgenden Untersuchungen zu diesem Phänomen führten zu der Entdeckung der dsRNA-aktivierten Proteinkinase (PKR) und der 2',5'-Oligoadenylatsynthetasen (OAS) (ROBERTS ET AL., 1976b; HOVANESSIAN ET AL., 1977; KERR ET AL., 1977; KERR UND BROWN, 1978; HOVANESSIAN UND KERR, 1979).

Vertreter der Familie der 2',5'-Oligoadenylatsynthetasen katalysieren nach Aktivierung durch dsRNA die Polymerisation von ATP zu Oligomeren mit einer Verknüpfung durch ungewöhnliche 2',5'-Phosphodiesterbindungen. Diese 2',5'-Oligoadenylate (2-5A) stellen den Aktivator der RNase L dar, welche in aktivierter Form virale und zelluläre ssRNA degradiert. Negativ-regulatorische Elemente des Systems sind der RNase L-Inhibitor (RLI) sowie die Aktivitäten von 2'-Phosphodiesterase (2'-PDE) und 5'-Phosphatasen, welche 2-5A abbauen bzw. durch Dephosphorylierung inaktivieren (Abb. 7).

2',5'-Oligoadenylatsynthetasen wurden bei einer großen Anzahl an Säugetierspezies, mehreren Vogel- und Reptilienarten identifiziert (PLAYER UND TORRENCE, 1998) und sogar für marine Schwämme beschrieben (LOPP ET AL., 2002; MÜLLER ET AL., 2004). Dies lässt auf ein phylogenetisch sehr altes Enzymsystem schließen, auch wenn die Rolle der OAS bei den Schwämmen eher in der Abwehr gegen Mikroorganismen vermutet wird.

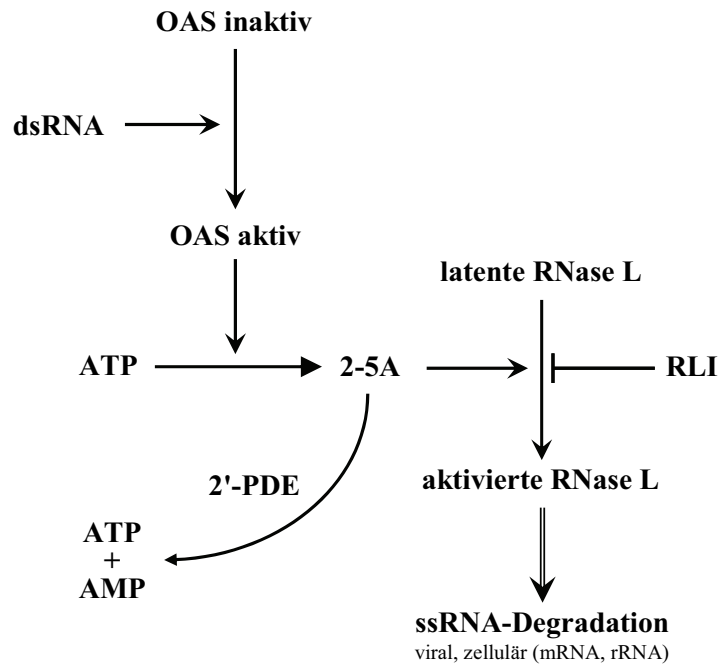


Abb. 7: Übersicht des 2',5'-Oligoadenylatsynthetase/RNase L-Systems. 2',5'-Oligoadenylatsynthetasen (OAS) werden durch dsRNA aktiviert und synthetisieren daraufhin 2',5'-Oligoadenylate (2-5A) aus ATP. Die 2-5A dienen als Aktivator der latenten RNase L, die in ihrer aktiven Form ssRNA degradiert. Eine negative Regulation erfolgt über den Abbau der 2-5A durch die 2'-Phosphodiesterase (2'-PDE), aber auch durch 5'-Phosphatasen, sowie den RNase L-Inhibitor (RLI).

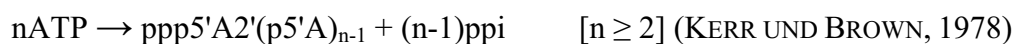
In humanen Zellen finden sich drei Formen der 2',5'-Oligoadenylatsynthetase, die in mehreren Isoformen auftreten (CHEBATH ET AL., 1987a; HOVANESSIAN ET AL., 1987; HOVANESSIAN ET AL., 1988) und in einem gemeinsamen Gencluster auf Chromosom 12 codiert sind (HOVNANIAN ET AL., 1998). Die 2',5'-Oligoadenylatsynthetasen enthalten unterschiedliche Anzahlen einer homologen OAS-Domäne, die den ersten 346 AS der OAS1 entspricht (MARIÉ UND HOVANESSIAN, 1992; REBOUILLAT ET AL., 1999). Die OAS1 beinhaltet eine OAS-Domäne und wird in Isoformen von 40 und 46 kDa gefunden, die von zwei *Splicevarianten* der mRNA codiert werden (BENECH ET AL., 1985; SAUNDERS ET AL., 1985; WATHELET ET AL., 1986). Die OAS2 enthält zwei OAS-Domänen und existiert als 69 und 71 kDa-Isoform, für die mindestens vier Transkripte unterschiedlicher Länge codieren (MARIÉ UND HOVANESSIAN, 1992; HOVNANIAN ET AL., 1998; MARIÉ ET AL., 1999). OAS3 schließlich verfügt über drei OAS-Domänen und liegt lediglich in einer 100 kDa-Form vor (REBOUILLAT ET AL., 1999). Ein weiteres IFN-induziertes Protein von 56-59 kDa, welches über eine OAS-Domäne verfügt, allerdings keine 2',5'-Oligoadenylatsynthetaseaktivität ausübt, wurde OASL (OAS *like protein*) benannt (MARIÉ ET AL., 1989; REBOUILLAT ET AL., 1998; HARTMANN ET AL., 1998a). OASL könnte eventuell antivirale Aktivität über eine ubiquitinartige Domäne ausüben (ESKILDSEN ET AL., 2003), auf dieses Protein soll aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden.

Die 2',5'-Oligoadenylatsynthetasen liegen, je nach Zelltyp, in unterschiedlichen basalen Mengen vor, die von dem Wachstumsstatus der Zellkultur beeinflusst sein können. So wurde ein Abfall der OAS-Konzentration nach der Zellpassage beschrieben, gefolgt von einem Wiederanstieg des Levels bis zum Erreichen der Konfluenz (STARK ET AL., 1979; KRISHNAN UND BAGLIONI, 1981; JACOBSEN ET AL., 1983a). Die Expression aller OAS-Formen kann durch IFN- α , - β oder - γ induziert werden, wobei für die Induktion durch Typ I-Interferone keine Proteinsynthese nötig ist (FALTYNEK ET AL., 1985; GRIBAUDO ET AL., 1989). Zelltyp-abhängig kommt es zu differenzierter Expression und Induktion, was auf die Existenz zellspezifischer Faktoren mit regulativem Einfluss schließen lässt (ROSENBLUM ET AL., 1988; MARIÉ ET AL., 1990; KHANNA ET AL., 1991).

OAS1 und OAS2 werden in Assoziation mit subzellulären Fraktionen, wie der mitochondrialen, nukleären und mikrosomalen Fraktion gefunden, wobei für OAS2 eine Assoziation mit dem rauen ER und der Kernhülle gezeigt wurde. OAS3 ist mit der ribosomalen Fraktion assoziiert, aber auch im Nukleus lokalisiert (CHEBATH ET AL., 1987a; HOVANESSIAN ET AL., 1987; BESSE ET AL., 1998).

Das Enzym wird durch die Bindung von dsRNA aktiviert, aber auch durch ssRNA mit Sekundärstrukturen (MINKS ET AL., 1979a; MAITRA ET AL., 1994; DESAI ET AL., 1995; HARTMANN ET AL., 1998b). Die OAS-Domäne verfügt hierbei über keine klassischen linearen Bindemotive für Polynukleotide, aber Kristallstrukturanalysen zeigten eine, mit basischen Aminosäureresten ausgekleidete, Furche in der Proteinoberfläche, für welche eine dsRNA-Bindfunktion angenommen wird. Das katalytische Zentrum des Enzyms liegt dieser Furche gegenüber und könnte nach der Bindung von dsRNA sterisch zugänglich werden (HARTMANN ET AL., 2003).

Nach der Aktivierung katalysieren die 2',5'-Oligoadenylatsynthetasen mit folgender Reaktion die Synthese von 2',5'-Oligoadenylaten:



Die Reaktionsprodukte weisen unterschiedliche Längen auf, wobei 2-5A-Trimere (Abb. 8) und -Tetramere die am häufigsten vorkommenden Formen darstellen (KERR UND BROWN, 1978; MINKS ET AL., 1979b; KNIGHT ET AL., 1980).

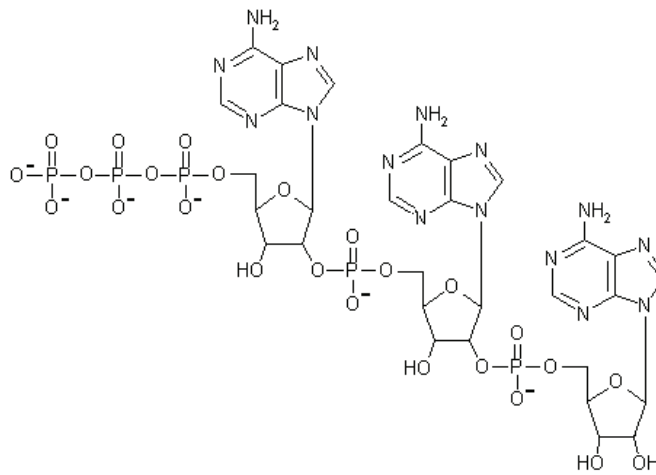


Abb. 8: Struktur eines 2',5'-Oligoadenylat-Trimers.

Während OAS3 mit seinen drei OAS-Domänen als Monomer vorliegt, existieren OAS1 als Tetramer und OAS2 als Dimer und verfügen so jeweils insgesamt über vier OAS-Domänen (MARIÉ ET AL., 1990). Diese Oligomerisierung von OAS1 und OAS2 ist essentiell für ihre enzymatische Aktivität (GHOSH ET AL., 1997). HOVANESSIAN UND JUSTESEN postulieren, dass die volle 2',5'-Olygoadenylatsynthetaseaktivität die Präsenz von vier OAS-Domänen benötigt, die den enzymatischen Prozess auf eine kooperative Weise bewerkstelligen (HOVANESSIAN UND JUSTESEN, 2007). So unterscheiden sich OAS1 und OAS2 in ihren enzymatischen Eigenschaften auch deutlich von OAS3. Während OAS1 und OAS2 unter optimalen Bedingungen in Gegenwart von 100 µg/ml dsRNA volle Aktivität zeigen, ist OAS3 schon bei 1 µg/ml dsRNA vollständig aktiviert. Allerdings synthetisiert OAS3 vorwiegend 2-5A-Dimere, während die anderen OAS-Formen in der Lage sind 2-5A-Oligomere zu synthetisieren (MORY ET AL., 1989; MARIÉ ET AL., 1997; MARIÉ ET AL., 1999; REBOUILLAT ET AL., 1999). 2-5A-Dimere sind kaum in der Lage, das Effektorenzym des Systems, die RNase L, zu aktivieren (DONG ET AL., 1994). Dementsprechend führt die Überexpression der OAS3 im Gegensatz zu Überexpressionen von OAS1 und OAS2 nicht zu einer Resistenz gegen Infektionen mit Vertretern der *Picornaviridae*. Daher liegt es nahe, für die OAS3 eine Rolle außerhalb des OAS/RNase L-Systems zu vermuten. So ist dieses Protein in der Lage, auf eine 2-5A-unabhängige Weise die Sensitivität für dsRNA-induzierte Apoptose zu steigern (HOVANESSIAN UND JUSTESEN, 2007), und wird mit einer Rolle bei pre-mRNA-*Splicing*-Vorgängen in Zusammenhang gebracht (SPERLING ET AL., 1991).

Die Syntheseprodukte der OAS sind im zellulären Milieu sehr kurzlebig. So wird für biologisch aktives 2-5A in HeLa-Zell-Extrakten bei 30 °C eine Halbwertszeit von zwei Minuten beschrieben (MINKS ET AL., 1979c). Für die schnelle Abnahme des 2-5A-Signals

werden zum einen 5'-Phosphatasen verantwortlich gemacht, welche durch 2-5A-Dephosphorylierung das RNase L-aktivierende Potential drastisch vermindern (MINKS ET AL., 1979c; KNIGHT ET AL., 1980; DONG ET AL., 1994), zum anderen wird 2-5A durch eine IFN-induzierbare 2'-Phosphodiesterase zu AMP und ATP degradiert (SCHMIDT ET AL., 1979; JOHNSTON UND HEARL, 1987; KUBOTA ET AL., 2004).

Die einzige bisher bekannte Funktion von 2-5A ist die Aktivierung der, als RNase L bezeichneten, latent vorliegenden Endoribonuklease (BAGLIONI ET AL., 1978; CLEMENS UND WILLIAMS, 1978; HOVANESSIAN ET AL., 1979; WILLIAMS ET AL., 1979; HOVANESSIAN UND WOOD, 1980; ZHOU ET AL., 1993). Die hierfür nötigen strukturellen Eigenschaften sind genauestens untersucht, so sind nur trimere oder längere 2-5A-Oligomere in der Lage, die RNase L zu aktivieren (TORRENCE ET AL., 1984; SILVERMAN 1985). Die Nukleotide müssen über 2',5'-Phosphodiesterbindungen verknüpft sein und für die optimale Aktivität über 3'-Hydroxylgruppen verfügen, wobei diese nur am 2. Nukleotidrest vom 5'-Terminus essentiell für die Bindung ist (EPPSTEIN ET AL., 1982; LESIAK ET AL., 1983; TORRENCE ET AL., 1988). Adeninreste sind für die biologische Aktivität entscheidend und am 5'-Ende für die Bindung sowie am 2'-Ende für die Aktivierung der RNase L notwendig (DROCOURT ET AL., 1982; LESIAK UND TORRENCE, 1983; TORRENCE ET AL., 1984; IMAI ET AL., 1985). Das 5'-Ende des 2-5A-Moleküls muss zellsystemabhängig mindestens ein Monophosphat oder aber ein Polyphosphat tragen (TORRENCE ET AL., 1981; LESIAK UND TORRENCE, 1985; KOVACS ET AL., 1993). DONG ET AL. konnten eine rekombinante humane RNase L mit 5'-monophosphorylierten 2-5A maximal aktivieren (DONG ET AL., 1994).

Das Effektorenzym des Systems, die Ribonuklease L, kommt bei Reptilien, Vögeln und Säugetieren vor (PLAYER UND TORRENCE, 1998). Die Level der RNase L variieren zwischen verschiedenen Zelltypen und sind von dem Differenzierungsstatus der Zellen abhängig (KRAUSE ET AL., 1985a; FLOYD-SMITH UND DENTON, 1988a&b). Zudem wurde für Zellkulturen mit dem Erreichen der Konfluenz, analog zu der OAS, ein Anstieg der RNase L-Konzentration beschrieben (JACOBSEN ET AL., 1983a; KRAUSE ET AL., 1985b). In manchen Systemen konnte keine Expressionsinduktion durch eine IFN-Behandlung gefunden werden, in anderen wurden leichte, bis zu 20fache Erhöhungen der RNase L-Level beschrieben (JACOBSEN ET AL., 1983b; KRAUSE ET AL., 1985a&b; ZHOU ET AL., 1993).

Für das Protein wird eine cytoplasmatische und nukleäre Lokalisation beschrieben (NILSEN ET AL., 1982a; SCHRÖDER ET AL., 1989; BAYARD UND GABRION, 1993). Hierbei ist das Enzym mit

Polysomen assoziiert (SALEHZADA ET AL., 1991), aber auch mit Mitochondrien und dem Cytoskelett (TNANI ET AL., 1998; LE ROY ET AL., 2001).

Das auf Chromosom 1 lokalisierte humane RNase L-Gen codiert für ein 741 AS-Protein mit einem Molekulargewicht von 84 kDa (ZHOU ET AL., 1993; SQUIRE ET AL., 1994). Die Expression einer *Splicevariante* (RENNERT ET AL., 2006) sowie das Vorkommen eines, wahrscheinlich durch proteolytische Spaltung der RNase L entstandenen, 40-46 kDa-Proteins mit RNase L-Eigenschaften wurden beschrieben (FLOYD-SMITH ET AL., 1982; KRAUSE ET AL., 1985a; BISBAL ET AL., 1989; SALEHZADA ET AL., 1991; BAYARD UND ZHOU, 1992).

Die RNase L besteht aus drei Domänen (Abb. 9). Die N-terminale Hälfte des Proteins beinhaltet 9 Ankyrin-Motive, es folgt ein Bereich mit Proteinkinase-Homologien und die C-terminale Ribonukleasedomäne (ZHOU ET AL., 1993; HASSEL ET AL., 1993). Die C-terminale Hälfte der RNase L weist Homologien zu IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*) auf, einer Kinase/Endonuklease, die eine Rolle in der *unfolded protein response* innehat (SIDRAUSKI UND WALTER, 1997; URANO ET AL., 2000; DONG ET AL., 2001). Allerdings konnte für die RNase L, im Gegensatz zu IRE1, bisher keinerlei Kinaseaktivität gezeigt werden.

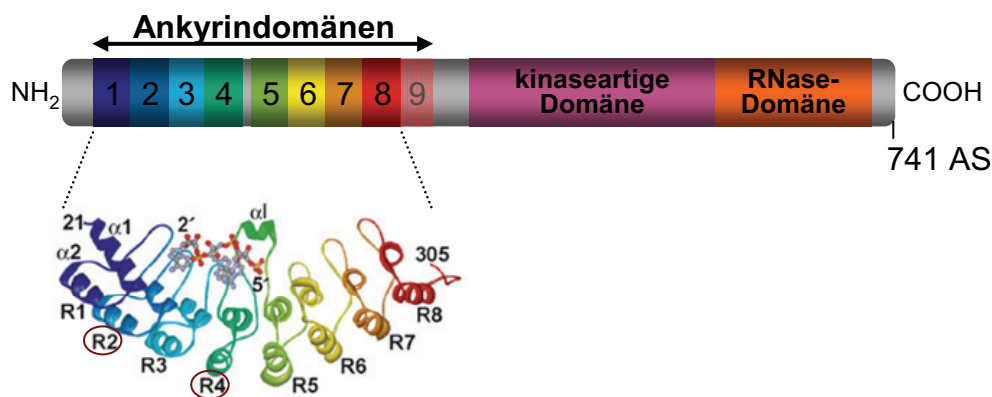


Abb. 9: Schematischer Aufbau der RNase L und Bindung des 2-5A-Aktivators. Die N-terminale Hälfte der RNase L enthält 9 Ankyrin-Motive (1-9), wobei die ersten 8 komplett sind und das 9. nur partiell vorliegt. Das 2. und 4. Motiv interagiert mit 2-5A, dessen Bindung in einem Bändermodell dargestellt ist (aus: TANAKA ET AL., 2004). Die C-terminale Hälfte des Enzyms unterteilt sich in eine Domäne mit Homologien zu Proteinkinasen und die Ribonuklease-Domäne (nach: HASSEL ET AL., 1993; TANAKA ET AL., 2004).

Die Ankyrin-Wiederholungen der N-terminalen Proteinhälfte stellen eine regulatorische Domäne dar. Spielen sie ansonsten eine Rolle bei Protein-Protein-Wechselwirkungen, binden sie im Fall der RNase L den Oligonukleotid-Aktivator des Enzyms. Kristallstrukturanalysen zeigten eine Bindung von 2-5A an das 2. und 4. Ankyrin-Motiv (Abb. 9) (TANAKA ET AL., 2004; NAKANISHI ET AL., 2005a). Allerdings wurde auf funktionaler Ebene gezeigt, dass auch

die Motive 1, 7, 8 und 9 essentiell für die 2-5A-Bindung sind, so dass diese wohl eine Rolle für die strukturelle Integrität des Proteins spielen (ZHOU ET AL., 1993; DONG UND SILVERMAN, 1997; DIAZ-GUERRA ET AL., 1999). Die Bindung von 2-5A an die latent vorliegende RNase L induziert eine Konformationsänderung der Ankyrin-Domänen. In Folge dessen wird wahrscheinlich die C-terminale RNase-Domäne demaskiert und es kommt zu einer Dimerisierung des Proteins, an der offensichtlich Bereiche der kinaseartigen Domäne und der Ankyrin-Motive beteiligt sind (Abb. 10) (DONG UND SILVERMAN, 1995; DONG UND SILVERMAN, 1997; NAIK ET AL., 1998; DONG ET AL., 2001; NAKANISHI ET AL., 2005b). Für die Bildung des aktiven RNase L-Homodimers ist die Bindung äquimolarer Mengen 2-5A erforderlich (DONG UND SILVERMAN, 1995; COLE ET AL., 1996; COLE ET AL., 1997). Die Dimerisierung scheint eine stabilisierende Wirkung auf die enzymatisch aktive Konformation des Proteins zu haben aber nicht strukturell notwendig zu sein. Heterodimere aus Wildtyp-RNase L und Nukleaseinaktiven Mutanten weisen auch mit einer einzelnen aktiven Nukleasedomäne enzymatische Aktivität auf (DONG ET AL., 2001).

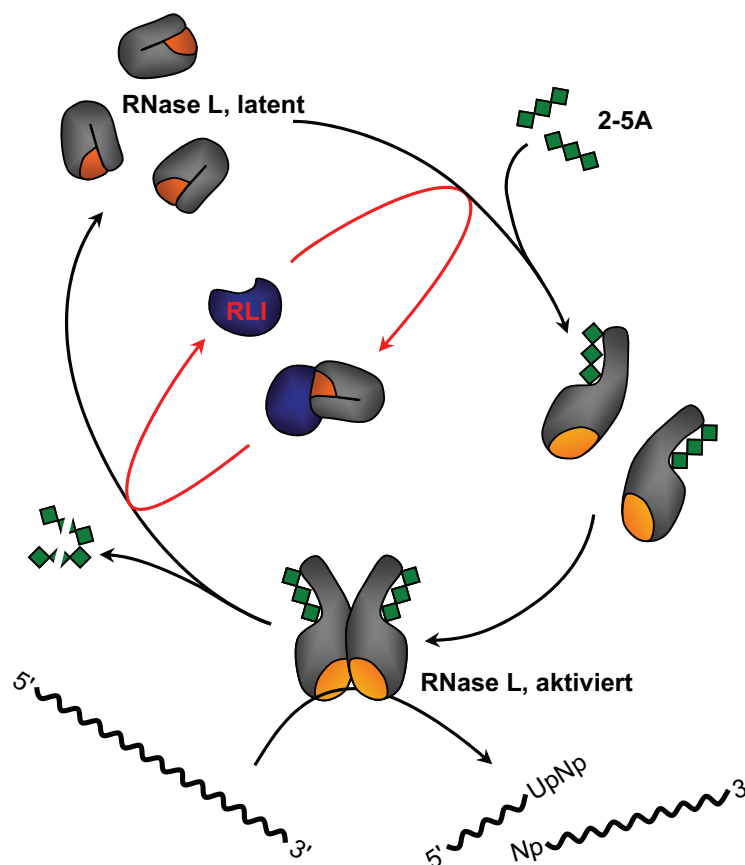


Abb. 10: Schema der RNase L-Aktivierung: Die latente RNase L liegt als Monomer vor. Durch die Bindung von 2-5A kommt es zu Konformationsänderungen und zur Dimerisierung. Die enzymatisch aktiven RNase L-Homodimere degradieren daraufhin ssRNA. Eine Kontrolle der RNase L-Aktivität erfolgt über die Gegenwart des 2-5A, dessen Kurzlebigkeit eine lokale Aktivierung und somit eine gewisse Selektivität erlaubt, und des RLI, der die Aktivierung der RNase L durch Bindung inhibiert.

Die aktivierte RNase L degradiert ssRNA relativ unspezifisch, mit einer Präferenz für Schnitte 3'-terminal von 5'-UpUp-3'- und 5'-UpAp-3'-Motiven (FLOYD-SMITH ET AL., 1981; WRESCHNER ET AL., 1981a; DONG ET AL., 1994). Zu den Substraten gehört, neben viraler und zellulärer mRNA sowie viraler genomischer ssRNA, auch ribosomale RNA (WRESCHNER ET AL., 1981b; SILVERMAN ET AL., 1983; LI ET AL., 1998). So finden sich in RNA-Präparationen aus Zellen oder Zell-Lysaten mit stark aktivierter RNase L distinkte Degradationsprodukte der rRNA mit einem zelltypabhängigen, aber reproduzierbaren Fragmentmuster. Für dessen Entstehung dürfte vornehmlich die Sekundärstruktur der rRNA und deren Interaktion mit anderen Molekülen verantwortlich sein und nicht die Basenabfolge der Sequenz (SILVERMAN ET AL., 1982; SILVERMAN ET AL., 1983; HAUGH ET AL., 1983; PLAYER ET AL., 1998).

Die rRNA-Degradation wird als Resultat einer generalisierten RNase L-Aktivität angesehen und korreliert mit einer hohen 2-5A-Konzentration (≥ 10 nM) (WRESCHNER ET AL., 1981b). Aber auch geringere 2-5A-Konzentrationen führen zu antiviralen Effekten ohne einen begleitenden rRNA-Abbau. Zudem konnte eine bevorzugte Degradation und somit eine Unterscheidung von der Wirts-RNA für ssRNA, die an dsRNA gebunden ist, sowie für entsprechende RNA aus Replikationskomplexen gezeigt werden. Dies führte zu dem Modell einer lokalen Aktivierung der RNase L, bei dem dsRNA, am Ort der viralen Replikation, die OAS aktiviert und die daraufhin synthetisierten 2-5A durch ihre Kurzlebigkeit nur eine lokalisierte RNase L-Aktivität und somit ein gewisses Maß an Selektivität zur Folge haben (NILSEN UND BAGLIONI, 1979; NILSEN ET AL., 1982b; BAGLIONI ET AL., 1984; LI ET AL., 1998).

Neben der 2-5A-abhängigen Aktivierung der RNase L erfolgt eine weitere Regulation über den RNase L-Inhibitor, ein auf Chromosom 4 codiertes und über zwei Transkriptvarianten ubiquitär exprimiertes 68 kDa-Protein (BISBAL ET AL., 1995; AUBRY ET AL., 1996; DIRIONG ET AL., 1996). RLI ist in der Lage, durch reversible Assoziation mit der RNase L, über einen nichtkompetitiven Mechanismus, die Bindung von 2-5A an das Enzym und somit die Entfaltung dessen Ribonuklease-Aktivität zu verhindern (Abb. 10) (BISBAL ET AL., 1995). Der vorhandene Level an RLI ist gewebeabhängig, aber nicht IFN-reguliert (BISBAL ET AL., 1995; AUBRY ET AL., 1996). Allerdings ist eine Induktion der RLI-Expression durch eine Behandlung der Zellen mit synthetischer dsRNA möglich, die dann zu einer transienten, durch die kurze Halbwertszeit (100 min) des RLI-Proteins bedingten, Inhibition der RNase L-Aktivität führt (MARTINAND ET AL., 1998a).

Der Ribonuklease L-Inhibitor wird der Superfamilie der ABC- (*ATP binding cassette*) Proteine zugeordnet und in diesem Kontext als ABCE1-Protein klassifiziert. Hoch homologe

Sequenzen finden sich in den Genomen vieler eukaryotischer Spezies und bei *Archaea*, die nicht über eine RNase L verfügen, so dass sich die Frage nach weiteren Funktionen des Proteins stellt (KERR, 2004). Für ein RLI-Homolog bei Hefen konnten essentielle zelluläre Funktionen im Zusammenhang mit der Ribosomenbiogenese und Komponenten der Translationsinitiation gezeigt werden (DONG ET AL., 2004; KISPAL ET AL., 2005; YARUNIN ET AL., 2005).

Die antiviralen Effekte des OAS/RNase L-Systems basieren nicht ausschließlich auf der Zerstörung viraler Ribonukleinsäuren sondern sind das Resultat eines virus- und zelltyp-abhängigen Zusammenspiels mehrerer Mechanismen. So kann natürlich die RNase L-abhängige Spaltung viraler genomischer RNA zu einem Verlust an genomischer Information führen und die Degradation viraler mRNA die Synthese viraler Proteine inhibieren, aber auch ein Abbau zellulärer rRNA und essentieller mRNA-Spezies können über die resultierende Schädigung der Wirtszellmaschinerie einen negativen Einfluss auf die virale Replikation ausüben (WRESCHNER ET AL., 1981b; FLOYD-SMITH ET AL., 1981; SILVERMAN ET AL., 1983; HAN ET AL., 2004; MALATHI ET AL., 2005). Zudem wurde eine, über den RIG-I/MDA-5-Weg verlaufende, Induktion der IFN- β -Expression im Zuge der RNase L-Aktivierung beschrieben, die wahrscheinlich über die Entstehung kurzer Duplex-RNA-Fragmente aus zellulären RNA-Substraten erfolgt (MALATHI ET AL., 2007). Eine anhaltende oder extrem starke Aktivierung der RNase L schließlich kann zur Apoptose führen (CASTELLI ET AL., 1997; DIAZ-GUERRA ET AL., 1997a; ZHOU ET AL., 1997; CASTELLI ET AL., 1998; MAITRA UND SILVERMAN, 1998; ZHOU ET AL., 1998; RUSCH ET AL., 2000). Diese wird wahrscheinlich über eine ribotoxische Stressreaktion und die Aktivierung der JNK- (*c-jun NH₂-terminal kinases*) MAP-Kinasen eingeleitet (IORDANOV ET AL., 2000; LI ET AL., 2004) und benötigt Caspase 3-Aktivität (RUSCH ET AL., 2000). Zusammengenommen führen die aktivierten Signalwege dazu, dass die Anzahl der induzierten zellulären mRNAs ungefähr das Doppelte der reprimierten mRNAs beträgt, wie *Microarray*-Studien zeigen konnten (MALATHI ET AL., 2005).

Möglicherweise existieren auch direkte antivirale Mechanismen der OAS-Proteine. So vermittelt die OAS1b-Isoform der Maus eine Resistenz gegen Flaviviren, und dies wahrscheinlich auf eine RNase L-unabhängige Weise (PERELYGIN ET AL., 2002; MASHIMO ET AL., 2002; KAJASTE-RUDNITSKI ET AL., 2006).

Eine inhibierende Wirkung der aktivierten RNase L ist für eine ganze Reihe von RNA-Viren gezeigt worden, wobei das OAS/RNase L-System häufig gemeinsam mit der PKR für einen

Großteil der IFN-vermittelten antiviralen Aktivität verantwortlich gemacht wird. Zu den beschriebenen RNase L-sensitiven ssRNA-Viren gehören das Encephalomyocarditis- (HASSEL ET AL., 1993; ZHOU ET AL., 1997; ZHOU ET AL., 1998), das Mengo- (CHEBATH ET AL., 1987b) und das Coxsackievirus B4 (FLODSTRÖM-TULLBERG ET AL., 2005) von den *Picornaviridae*, ebenso Vertreter der *Flavi-* (HAN UND BARTON, 2002; GÓMEZ ET AL., 2005; SAMUEL ET AL., 2006; SCHERBIK ET AL., 2006) sowie *Rhabdo-* (ZHOU ET AL., 1998; ZHOU ET AL., 1999) und *Paramyxoviridae* (ZHOU ET AL., 1998; BEHERA ET AL., 2002). Auch für Retroviren, inklusive HIV-1, ist eine RNase L-Sensitivität beschrieben (MAITRA UND SILVERMAN, 1998; DONG ET AL., 2007). Bei DNA-Viren existieren widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der RNase L-Sensitivität des Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) bei in vivo-Studien (LEIB ET AL., 2000; ZHENG ET AL., 2001; AUSTIN ET AL., 2005), während Untersuchungen in Zellkultur einen Anteil der RNase L an dem anti-HSV-1-Effekt des IFN- β zeigen (AL-KHATIB ET AL., 2003; CARR ET AL., 2003). Das Vacciniavirus ist der stärkste bekannte Induktor der 2-5A-Synthese (RICE ET AL., 1984). Das OAS/RNase L-System hat aber unter normalen Bedingungen keine inhibierende Wirkung auf die Replikation des Vacciniavirus (XIANG ET AL., 2002), diese tritt nur bei artifizieller Überexpression der Komponenten des Systems auf (DÍAZ-GUERRA ET AL., 1997b; ZHOU ET AL., 1998).

Neben der antiviralen Wirkung ist das OAS/RNase L-System auch in weitere Prozesse involviert. So spielt es eine Rolle bei der Regulation der Stabilität mitochondrialer mRNA, zumindest im Zusammenhang mit der antiproliferativen Wirkung von Interferon (LE ROY ET AL., 2001). Wahrscheinlich hat es auch eine Funktion in der transienten Kontrolle und Limitierung der IFN-Antwort, indem die Stabilität von ISG-mRNA-Spezies, inklusive der PKR-mRNA, reguliert wird (LI ET AL., 2000; KHABAR ET AL., 2003). Neben der Regulation der mRNA-Stabilität weist die RNase L auch die Fähigkeit einer Modulation der Translation, über eine Interaktion mit dem Translationsterminationsfaktor eRF3 (*eukaryotic release factor 3*), auf (LE ROY ET AL., 2005). Die Koppelung der Expressionslevel von Komponenten des OAS/RNase L-Systems an den Zellstatus legt eine Bedeutung für Proliferations- und Differenzierungsprozesse nahe (KRISHNAN UND BAGLIONI, 1981; ETIENNE-SMEKENS ET AL., 1983; JACOBSEN ET AL., 1983a; FERBUS ET AL., 1985; RYSIECKI ET AL., 1989; SCHWARTZ UND NILSON, 1989; BICKEL ET AL., 1990; SALZBERG ET AL., 1996; SALZBERG ET AL., 1997; COHEN ET AL., 2005). Zumindest für die Differenzierung von Myoblasten konnte ein regulativer Zusammenhang mit der Aktivität der RNase L gezeigt werden (BISBAL ET AL., 2000).

Die Rolle der RNase L in der Induktion der Apoptose, auch außerhalb des antiviralen Kontextes, ließ eine Funktion in der Tumorsuppression denkbar erscheinen (ZHOU ET AL., 1997; CASTELLI ET AL., 1998). Und so konnte auch eine inhibierende Wirkung des Proteins auf das Wachstum von Fibrosarkomen gezeigt werden (LIU ET AL., 2007). Verschiedene Karzinomarten korrelieren mit Mutationen des RNase L-Gens (SILVERMAN, 2003; BARTSCH ET AL., 2005; KRÜGER ET AL., 2005), wobei aber zumindest in Fällen des hereditären Prostatakarzinoms ein Zusammenhang mit einem RNase L-sensitiven Retrovirus möglich ist (URISMAN ET AL., 2006; DONG ET AL., 2007).

1.7 Zielsetzung

Die Replikation nicht-cytopathogener Hepatitis A-Viren wird im Zuge der Etablierung der Persistenz auf zellulärer Ebene runterreguliert. Der verwendete Regulationsmechanismus wirkt in *trans* auch auf cytopathogene HAV-Varianten und verschiebt deren Replikationscharakter in die Richtung einer persistenten Infektion ohne Apoptose. Möglicherweise ist ein moderates Replikationsniveau essentiell für die Ausbildung der persistenten Infektion sowie die Vermeidung zellulärer Abwehrmechanismen und trägt so *in vivo* zu der Ausbreitung der Infektion bei.

In dieser Arbeit sollten mit ISG20, MxA und OAS/RNase L drei zelluläre, antivirale Systeme auf eine mögliche Rolle in der Regulation der HAV-Replikation untersucht werden. Für alle Systeme liegt die Beschreibung replikationsmindernder Effekte auf Picornaviren vor und sie könnten durch basale oder virusinduzierte Expression interferonunabhängig eine Rolle spielen.

ISG20 und MxA wurden auf Grund rein hypothetischer Zusammenhänge und einer möglichen Expressionsregulationsbeteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in die Untersuchungen einbezogen. In HAV-infizierten Zellen kommt es zu einer Aktivierung des NF- κ B, die durch eine poly(IC)-Transfektion noch weiter steuerbar ist (FENSTERL ET AL., 2005). Indes führt eine poly(IC)-Transfektion auch zu reduzierten Leveln viraler RNA (MÜLLER, 2006), eventuell über NF- κ B-abhängige Mechanismen. Zusätzlich wiesen interne Untersuchungen auf eine gesteigerte HAV-Replikation in Zellen hin, in denen die NF- κ B-Aktivierung durch die Expression einer dominant negativen I κ B α -Variante supprimiert wurde. Dies führte zu der Hypothese, dass die Aktivierung von NF- κ B einen inhibierenden Effekt auf die HAV-Replikation zur Folge hat. Die ISG20-Nuklease und das MxA-Protein könnten Mediatoren eines solchen Effektes darstellen.

Für das OAS/RNase L-System gab es hingegen relevante Vorbefunde. So weist eine Degradation der rRNA in HAV-infizierten Zellen auf eine Aktivierung der RNase L hin, die außerhalb des IFN-Kontextes erfolgt (BRACK, 1999; GOTTER, 1999). In stabil mit einem RLI-Expressionsplasmid transfizierten Zellen konnte eine beschleunigte und höhere Titer erreichende Replikation verschiedener HAV-Varianten gezeigt werden (GOTTER, 1999; KURTH, 2001; HEITMANN, 2002). Dies weist auf einen Einfluss der RNase L-Aktivität auf die virale Replikation hin und legt eine Beteiligung an deren Regulation nahe. Zudem kann in Lysaten persistent HAV-infizierter Zellen eine höhere RNase L-Aktivität durch externe 2-5A-Präparationen induziert werden, als in entsprechenden Kontrollansätzen (JANSSEN-WEETS, 2002). Dieses erhöhte Aktivierungspotential der RNase L spricht für einen Einfluss der HAV-Infektion auf der Ebene des Effektorenzyms. Es könnte entweder zu einer Erhöhung der RNase L-Konzentration selbst kommen oder, durch eine Abnahme der RLI-Konzentration, zu einer verringerten Repression ihrer Aktivierbarkeit.

Eine derartige Modulation des RNase L-Systems, aber auch eine Expressionsinduktion der ISG20-Nuklease oder des MxA-Proteins könnte von entscheidender Bedeutung für das Replikationsverhalten des Hepatitis A-Virus sein und einen Mechanismus zur Etablierung der persistenten Infektion von Zellkulturen, aber auch der Infektionsausbreitung *in vivo* darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Viren

HAV/7: abgeleitet von dem 1976 isolierten HAV-Stamm HM175, wurde durch Transfektion mit dem Transkript des infektiösen HM175-cDNA-Klons pHAV/7 erhalten (COHEN ET AL., 1987A&B); passagiert in FRhK-4-Zellen.

HAV GBM: aus Patientenmaterial isoliert (FLEHMIG ET AL., 1977); Passagierung: GBM/FRhK-4 62/FRhK-4(USA) 3 bzw. GBM/Hek 8/HFS 23/MRC-5 8.

2.1.2 Zellen

FRhK-4-Zellen: Linie fetaler Rhesusaffen-Nierenzellen (CBER/FDA, Abteilung für Virologie, Bethesda, Maryland, USA).

FRhK-4/RLI(+): von GOTTER (1999) stabil mit dem RNase L-Inhibitor-Expressionsplasmid pcDNA3.1/RLI 3' transfizierte FRhK-4-Zellen, "Klon 6".

FRhK-4/pcDNA3.1/RL und FRhK-4/pI.18/RL: stabil mit pcDNA3.1- bzw. pI.18-basierten RNase L-Expressionsvektoren transfizierte FRhK-4-Zellen.

FRhK-4/pcDNA3.1/RL_{Dneg} und FRhK-4/pI.18/RL_Δ: FRhK-4-Zellen, stabil transfiziert mit pcDNA3.1- bzw. pI.18-basierten Expressionsvektoren für eine carboxyterminal um 89 AS verkürzte, dominant-negative RNase L-Variante.

HeLa-Zellen: humane Cervixcarcinom-Zelllinie (CBER/FDA, Abteilung für Virologie, Bethesda, Maryland, USA).

HFS-10-Zellen: humane, embryonale Lungenfibroblasten (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. Vallbracht).

MRC-5-Zellen: humane embryonale Lungenfibroblasten (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA).

2.1.3 Bakterien

Escherichia coli der Stämme HB101, C600 und DH5 α

2.1.4 Plasmide

pCVB3-0: Enthält die vollständige cDNA-Sequenz des CVB3/0 in dem Plasmidvektor pSVN-1 unter der Kontrolle eines T7-Promotors (CHAPMAN ET AL., 1994). Freundlicherweise von S. Tracy (University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA) zur Verfügung gestellt.

pcDNA3.1: CMV-Promotor kontrollierter Expressionsvektor mit Ampicillin- und Neomycin-Resistenz (Invitrogen, Karlsruhe).

pcDNA3.1/RL: RNase L-Expressionsvektor auf pcDNA3.1-Basis. Die für die humane RNase L codierende Sequenz aus dem Plasmid ZC5.1 wurde mit einem *HindIII*-Verdau ausgeschnitten und in den *HindIII*-behandelten Vektor eingebracht (Abb. 11C).

pcDNA3.1/RL Dneg: pcDNA3.1-basierter Expressionsvektor für die murine, carboxy-terminal verkürzte, dominant-negative RNase L-Variante. Deren Sequenz wurde durch *SacI*- und *KpnI*-Behandlung aus dem Plasmid ZB1 gewonnen und nach entsprechender Präparation mit dem *HindIII*- und *KpnI*-verdauten Vektor ligiert.

pEGFP: Expressionsplasmid, codiert für eine angepasste Variante des *green fluorescent protein* (GFP) (Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA).

pGL3: Das pGL3-Basic-Plasmid (Promega, Mannheim) ist ein Luciferase-Reporter-Vektor und enthält eine modifizierte codierende Region für die Feuerfliegen- (*Photinus pyralis*) Luciferase. Nach der Insertion von Promotorelementen kann deren Aktivität über die Detektion der Luciferaseaktivität bestimmt werden.

pGL3-MxA-P: Reporterkonstrukt auf pGL3-Basis mit dem Luciferasegen unter der Kontrolle der humanen MxA-Promotorregion (1,8 kb). Als "pGL3-MxAP-FF-Luc" freundlicherweise von G. Kochs (Abteilung für Virologie, Universität Freiburg, Freiburg) zur Verfügung gestellt (Abb. 11A).

pGL3p460: Reporterkonstrukt auf pGL3-Basis mit dem Luciferasegen unter der Kontrolle des humanen ISG20-Promotors, freundlicherweise von N. Mechti (UMR-CNRS, Montpellier, Frankreich) zur Verfügung gestellt (Abb. 11B).

pGL3-SV40-P: Für Kontrolluntersuchungen wurde der Luciferasegen in dem pGL3-Vektor ein SV40-Promotor vorgeschaltet, um eine konstitutive Expression zu realisieren.

pHAV/7: Enthält die vollständige cDNA-Sequenz von HAV HM175-p35 in dem Plasmidvektor GEM-1 (COHEN ET AL, 1987A&B). Ein SP6-Promotor erlaubt die Transkription der viralen Plusstrang-RNA, während die Minusstrang-RNA über einen T7-Promotor synthetisiert werden kann (CBER/FDA, Abteilung für Virologie, Bethesda, Maryland, USA) (Abb. 11F).

pI.18: CMV-Promotor kontrollierter Expressionsvektor, der zwischen Promotor und MCS eine Intron A-Sequenz enthält, die von zwei Exonsequenzen (Splicer-Donor/Akzeptor) flankiert wird. Die Intron A-Sequenz wird im Zuge ihrer Prozessierung aus der prä-mRNA herausgeschnitten, was scheinbar zu der stark gesteigerten Expression in die MCS inserierter Sequenzen führt. Das Plasmid wurde freundlicherweise von J. Robertson (National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, UK) zur Verfügung gestellt.

pI.18/RL: RNase L-Expressionsvektor auf pI.18-Basis. Die für die humane RNase L codierende Sequenz wurde mittels PCR, mit dem ZC5.1-Plasmid als Template, amplifiziert und über *KpnI* und *SalI*-Schnittstellen in den Vektor eingebracht (Abb. 11D).

pI.18/RLA: pI.18-basierter Expressionsvektor für die humane, carboxyterminal verkürzte RNase L-Variante. Deren Sequenz wurde mittels PCR und dem Plasmid ZC5.1 generiert, wobei die Sequenz der humanen RNase L am 3'-Ende um 267 codierende Nukleotide verkürzt wurde. Die Ligation in den Vektor erfolgte über *KpnI* und *SalI*-Schnittstellen.

pRNA-CMV3.1/Neo: (GenScript, New Jersey, USA) siRNA-Expressionsvektor, der eine CMV-Promotor gesteuerte Expression einer, zwischen eine *Bam*HI- und eine *Hind*III-Schnittstelle inserierten, siRNA-Kassette realisiert und über ein SV40-Promotor-kontrolliertes Neomycin-Resistenzgen verfügt.

pRNAII: von pRNA-CMV3.1/Neo abgeleiteter Vektor, in dem die originale 66 bp-Sequenz zwischen der *Bam*HI- und der *Hind*III-Schnittstelle gegen ein 2,3 kbp-Fragment (*Bam*HI/*Hind*III) aus pSV2neo ausgetauscht wurde. Diese Variation diente lediglich einem vereinfachten Umgang mit dem Plasmid. So konnte die Präparation des Vektors vor der Insertion der siRNA-Kassetten verbessert werden, weil inkomplette Restriktions-Produkte entfernt werden konnten.

pRNA/RL38, pRNA/RL218 und pRNA/RL465: Von pRNAII abgeleitete siRNA-Expressionsvektoren, welche als DNA-Insert je eine 66 bp große siRNA-Kassette beinhalten. Diese codiert für die exprimierten siRNAs, deren 21 nt langen Zielsequenzen an unterschiedlichen Positionen in der RNase L-mRNA von *Homo sapiens* und *Macaca mulatta* liegen (s. Tab. 4; Abb. 11E).

pRNA/K: siRNA-Expressionsvektor, der für eine siRNA mit einer Nonsens-Sequenz codiert und als Kontrollplasmid dient (s. Tab. 4).

pSP64/VP2: Dieses Plasmid wurde abgeleitet von pSP64 (Roche, Mannheim) und enthält unter der Kontrolle eines SP6-Promotors die 665 nt lange cDNA-Sequenz, die für das VP2-Protein von HAV kodiert.

pSV2neo: vermittelt eine Neomycin-Resistenz, wurde zur Etablierung stabiler Transfektionen mit den entsprechenden Plasmiden cotransfiziert (ATCC, Manassas, Virginia, USA).

ZB1: von pBluescript II KS(+) abgeleitetes Plasmid, trägt eine cDNA, welche für die Aminosäurereste 1-656 der murinen RNase L codiert (ZHOU ET AL., 1993). Diese carboxyterminal um 89 AS verkürzte Form der murinen RNase L ist in der Lage 2',5'-Oligoadenylate zu binden, verfügt aber über keine RNase-Funktion und wirkt in murinen Zellen *in trans* dominant-negativ. Durch ein Klonierungsartefakt wurden die letzten fünf Aminosäurereste von NPYQD zu KPLSG verändert (HASSEL ET AL., 1993, ZHOU ET AL., 1993). ZB1 wurde

freundlicherweise von R. H. Silverman (Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio, USA) zur Verfügung gestellt.

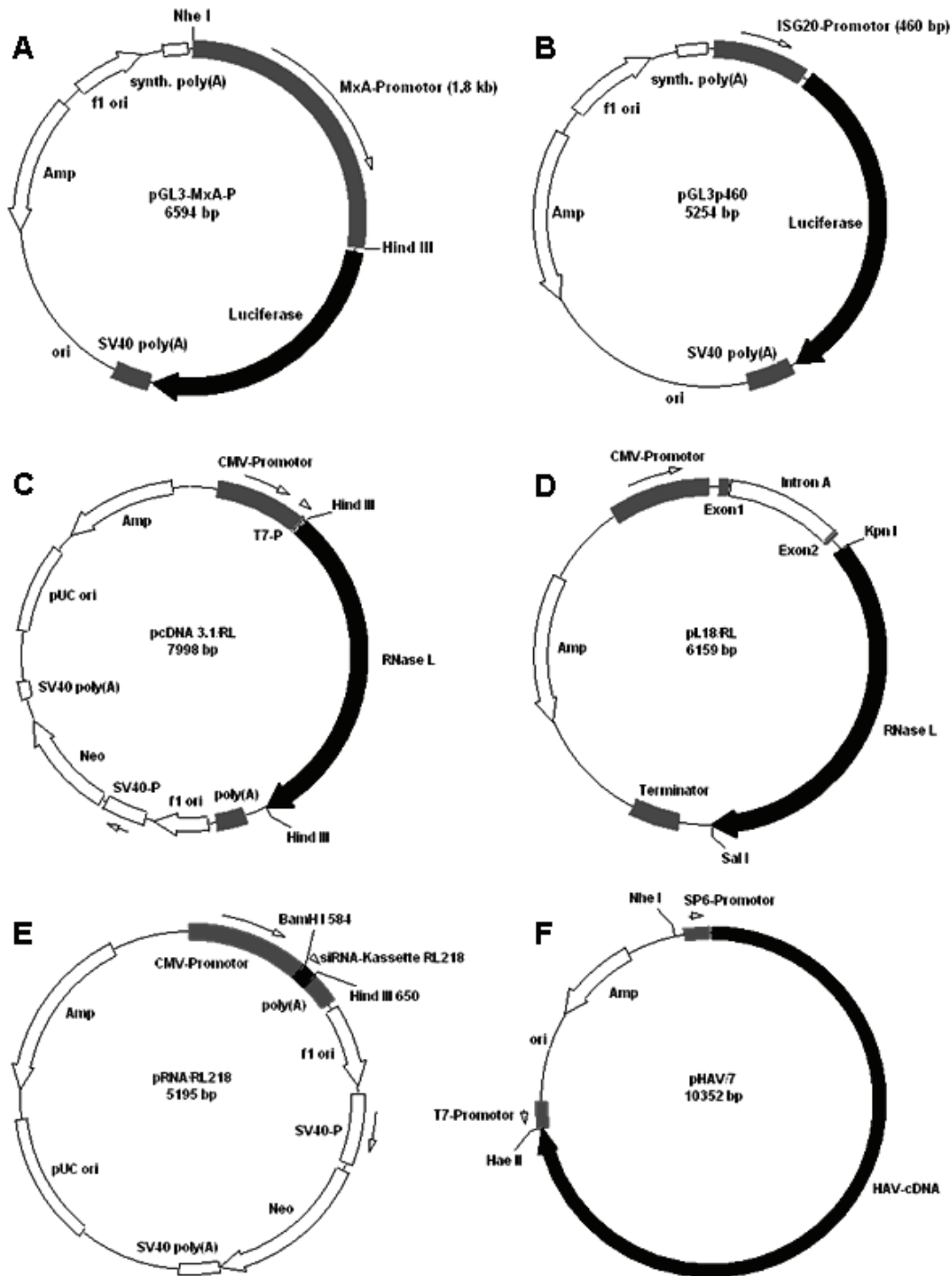


Abb. 11: Plasmidkarten ausgewählter Vektoren. Die Beschreibungen sind im Text (2.1.4) zu finden. (Amp: Ampicillinresistenz; Neo: Neomycinresistenz; ori: origin of replication; P: Promoter)

ZC5.1: von pBluescript II KS(+) abgeleitetes Plasmid, enthält innerhalb eines 2506 bp langem HindIII-Fragments die komplette für Protein kodierende Sequenz des humanen RNase L-

Gens. Diese Komposit-DNA wurde aus cDNA und genomischer DNA hergestellt (ZHOU ET AL., 1993). ZC5.1 wurde freundlicherweise von R. H. Silverman (Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio, USA) zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Oligonukleotide

2.1.5.1 Primer

Tab. 1: PCR- und RT-PCR-Primer. Bis auf die genannten Ausnahmen basieren alle Primer auf humanen Sequenzen, konnten aber erfolgreich für die Amplifikation von *Macaca mulatta*-Sequenzen verwendet werden. (Carl Roth, Karlsruhe oder biomers.net, Ulm)

| Name | Sequenz 5'→3' | Beschreibung |
|----------------------|--|--|
| β-Aktin-s | AGA AGA GCT ACG AGC TGC CTG ACG | β-Aktin-spezifisch; 381 bp-Produkt; (WÜNSCHMANN, 1998) |
| β-Aktin-as | CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC | |
| MxA-s | ACC TGA TGG CCT ATC ACC AG | MxA-spezifisch; 193 bp-Produkt |
| MxA-as | TTC AGG AAC TTC CGC TTG TC | |
| OAS1-420s | AGC TGG AAG CCT GTC AAA GA | OAS1-spezifisch*; 248 bp-Produkt |
| OAS1-667as | GGA GAA CTC GCC CTC TTT CT | |
| OAS2-132s | CTG AGA GCA ATG GGA AAT GG | OAS2-spezifisch; 235 bp-Produkt |
| OAS2-366as | TAC CAT CGG AGT TGC CTC TT | |
| RNase L-RT | TGC ATC CAG TGC CCA GAC TTA | RNase L-spezifische Primer für RT und PCR; 1279 bp- Produkt; (TNANI & BAYARD, 1999) |
| RNase L-s | GCT CAC CTG GCA GAT TTT GAT AA | |
| RNase L-as | AAT GAA TGA GAT TCC TGG AAC C | |
| RNase Lm-s | TGA CAT GAA GGC AGA AGT CG | spezifisch für die murine RNase L; 827 bp-Produkt |
| RNase Lm-as | ATA GGA TGC TGT GGG CAA AC | |
| RNaseL/KpnI-5'-s | GAG GCT AGG TAC CGT CAT GGA GAG CAG GGA TCA TAA CAA | Primer für die Klonierung der RNase L und der trunkierten Variante, mit angefügten Schnittstellen und Kozak- Sequenz |
| RNaseL/Koz/KpnI-5'-s | GAG GCT AGG TAC CAC CAT GGA GAG CAG GGA TCA TAA CAA | |
| RNaseL/Sall-3'-as | ATC GGT CGA CTC AGC ACC CAG GGC TGG CCA | |
| RNaseL/Sall-trunk-as | GGC CGT CGA CTC ACT GGT AGA AAT TGC CTC TTT TTT CA | |
| CMV 467 s | CAC CAA AAT CAA CGG GAC TT | vektorbezogene Primer für Sequenzierungen und Plasmidnachweise |
| pI.18-MCS-as | CGG AAT TCC TCG AGG TCG | |
| "RSP" pRNA-as | TAG AAG GCA CAG TCG AGG | |

*: Eignung für *Macaca mulatta* unklar

Tab. 2: Primer und Sonden für die *real-time* RT-PCR. In den *real-time* RT-PCR-Analysen von Christina Röser verwendete Primer und Sonden (RÖSER, 2007). Die Nukleotidsonden (Sd) sind jeweils endständig *FAM*- und *TAMRA*-gekoppelt. (Metabion, Martinsried)

| Name | Sequenz 5'→3' | Beschreibung |
|---------------------|--|---------------------------------------|
| 18S rRNA <i>for</i> | ACG GCT ACC ACA TCC AAG GA | 18S rRNA-spezifische Primer und Sonde |
| 18S rRNA <i>rev</i> | CCA ATT ACA GGG CCT CGA AA | |
| 18S rRNA Sd | <i>FAM</i> -CAG GCG CGC AAA TTA CCC ACT CC- <i>TAMRA</i> | |
| GAPDH <i>for</i> | CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG | GAPDH-spezifische Primer und Sonde |
| GAPDH <i>rev</i> | CAG TCT TCT GGG TGG CAG TGA | |
| GAPDH Sd | <i>FAM</i> -ACA ACT TTG GTA TCG TGG AAG GAC TCA TGA CC- <i>TAMRA</i> | |
| RLI <i>for</i> | AAG ACT GAT GGC AGC TCG AGT T | RLI-spezifische Primer und Sonde |
| RLI <i>rev</i> | ATG ACG CGA TCC GCT AGA TAG | |
| RLI Sd | <i>FAM</i> -CGT TTC ATA CTC CAT GCA AAA AAG ACA GCC TTT- <i>TAMRA</i> | |
| RNase L <i>for</i> | GAC CTG CTG GGT CAT CCC TT | RNase L-spezifische Primer und Sonde |
| RNase L <i>rev</i> | CAT TTC CCA CAT TCC GAA GC | |
| RNase L Sd | <i>FAM</i> -TTT TGG ACT TGG GAG AGC CGC TAT AGG A- <i>TAMRA</i> | |

Tab. 3: Primer für die PCR-basierte Synthese der RPA-Sondentemplates. Die Oligonukleotide wurden 5'-endständig mit einer HindIII-Schnittstelle und einer Nonsens-Folge von 23 nt (*fw*-Primer) bzw. einer BamHI-Schnittstelle und einem SP6-Promotor (*re*-Primer) versehen. Das Design erfolgte auf der Basis humaner Sequenzen, zumindest die β -Aktin- und RLI-Sonden erwiesen sich als geeignet für *Macaca mulatta*. (Carl Roth, Karlsruhe)

| Name | Sequenz 5'→3' | Sondentemplate |
|---------------------------------|---|------------------------|
| β -Aktin-RPA-SP <i>fw</i> | AAG CTT AGA CTA GAT CAT CTA TCT CAC GGA GAG CTA CGA GCT GCC TGA C | β -Aktin, 242 bp |
| β -Aktin-RPA-SP <i>re</i> | CCT AGG ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG AGA GCA CTG TGT TGG CGT ACA G | |
| RLI-RPA-SP <i>fw</i> | AAG CTT TCT GTA TCT CGA ATA CTC AGT CCA GGG GAC AGT GGG CTC TAT T | RLI, 341 bp |
| RLI-RPA-SP <i>re</i> | CCT AGG ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG AGT CAT GCT CCA CCA CAA TGA T | |
| RNase L-RPA-SP <i>fw</i> | AAG CTT TTG TAT CAA GTC AAG TCC GCT GAC CTC ATT CAT CGT CTC TTC CA | RNase L, 173 bp |
| RNase L-RPA-SP <i>re</i> | CCT AGG ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG AGC ACA TTC CGA AGC GTC CTA T | |

2.1.5.2 sonstige Oligonukleotide

RNase L-Substrat RNA (biomers.net, Ulm):

5'-CCC CCC CCC CCU UCC CCC CC-3'

siRNA-Insert-DNA-Oligonukleotide (GenScript, Piscataway, New Jersey, USA)

Tab. 4: siRNA-Insert-DNA-Oligonukleotide. Das Design der Oligonukleotide erlaubte ein Annealing der jeweiligen sense und antisense Konstrukte, dessen dsDNA-Produkt direkt in einen *Bam*HI/*Hind*III-geschnittenen Vektor ligiert werden konnte. Der sense-Strang folgt jeweils diesem Schema: *Bam*HI-Schnittstelle / 21 nt spezifische Sequenz (antisense) / 10 nt Loop-Region / 21 nt spezifische Sequenz (sense) / CG / *Hind*III-Schnittstelle. Die RL-Sequenzen sind RNase L-spezifisch (*Homo sapiens* und *Macaca mulatta*), K stellt eine Kontrollsequenz mit Nonsens-Reihenfolge dar.

| Name | Sequenz 5'→3' |
|----------|--|
| RL/218s | GAT CCT CTT TGG CTC CAT AAG AGA GAT TGA TAT CCG TCT CTC TTA TGG AGC CAA AGA CGA |
| RL/218as | AGC TTC GTC TTT GGC TCC ATA AGA GAG ACG GAT ATC AAT CTC TCT TAT GGA GCC AAA GAG |
| RL/465s | GAT CCT TGC AGA CAA GAG ACT TCC TGT TGA TAT CCG CAG GAA GTC TCT TGT CTG CAA CGA |
| RL/465as | AGC TTC GTT GCA GAC AAG AGA CTT CCT GCG GAT ATC AAC AGG AAG TCT CTT GTC TGC AAG |
| RL/38s | GAT CCT TAA TCT CTA TGT GCT CTT GCT TGA TAT CCG GCA AGA GCA CAT AGA GAT TAA CGA |
| RL/38as | AGC TTC GTT AAT CTC TAT GTG CTC TTG CCG GAT ATC AAG CAA GAG CAC ATA GAG ATT AAG |
| K_s | GAT CCT CCG TAT GTC ATC CTG AAT TCT TGA TAT CCG GAA TTC AGG ATG ACA TAC GGA CGA |
| K_as | AGC TTC GTC CGT ATG TCA TCC TGA ATT CCG GAT ATC AAG AAT TCA GGA TGA CAT ACG GAG |

2.1.6 Nukleotide

| | |
|--|---------------------------------------|
| [α - ³² P]GTP (3000 Ci/mmol; 10 mCi/ml) | Amersham Biosciences, Piscataway, USA |
| [α - ³² P]GTP (400 Ci/mmol; 10 mCi/ml) | Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig |
| [γ - ³² P]ATP (6000 Ci/mmol; 10 mCi/ml) | Amersham Biosciences, Piscataway, USA |
| ATP | Amersham Biosciences, Piscataway, USA |
| Desoxynukleosid Triphosphat Set | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Nukleosid Triphosphat Set | Roche Diagnostics, Mannheim |
| poly(IC) (Poly-Inosinsäure:poly-Cytidylsäure) | Sigma-Aldrich, München |

2.1.7 Antikörper, Enzyme und sonstige Proteine

2.1.7.1 Antikörper

| | |
|---|--|
| anti-HAV (Maus IgG2a), Klon 7E7 | Mediagnost, Tübingen |
| anti-Kaninchen (Ziege), FITC-markiert | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| anti-Kaninchen (Kuh), HRP-konjugiert | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| anti-Maus-IgG (Ziege), FITC-markiert | Kierkegaard & Perry, Gaithersburg, USA |
| anti-Maus-IgG (Ziege), Texas Red-markiert | Kierkegaard & Perry, Gaithersburg, USA |
| anti-RNase L (Kaninchen) | zur Verfügung gestellt von C. Bisbal (Inst. de Genetique Moleculaire, Montpellier, FR) |

2.1.7.2 Enzyme

| | |
|---|---|
| Alkalische Phosphatase (CIP) mit 10 x Dephosphorylierungspuffer | Roche Diagnostics, Mannheim |
| DNase I (RNase frei) | Roche Diagnostics, Mannheim |
| DNase I aus dem <i>RNase-Free DNase Set</i> mit RDD Puffer | Qiagen, Hilden |
| DNase RQ1 mit 10 x DNase-Puffer | Promega, Mannheim |
| Expand TM Reverse Transkriptase mit 5 x Expand TM Reverse Transkriptase-Puffer | Roche Diagnostics, Mannheim |
| HotMaster TM Taq DNA Polymerase | Eppendorf, Hamburg |
| Klenow-Fragment (von <i>E. coli</i> DNA-Pol. I) mit 10 x Puffer | Invitrogen, Karlsruhe |
| Lysozym (aus Hühnereiklar) | Serva, Heidelberg |
| MB-Taq-Polymerase | Minerva Biolabs |
| Restriktionsendonukleasen mit zugehörigen Puffersystemen | Roche Diagnostics, Mannheim |
| RNase A | Roche Diagnostics, Mannheim |
| SP6 RNA-Polymerase mit 10 x Transkriptionspuffer | Roche Diagnostics, Mannheim bzw. Amersham Biosciences, Piscataway, USA |
| SspI mit 10 x NEB2-Buffer | New England BioLabs, Frankfurt |
| T4 DNA-Ligase mit 10 x Puffer | Roche Diagnostics, Mannheim |
| T4 Polynukleotidkinase mit Verdünnungs- und 10 x Reaktionspuffer | USB Corporation, Staufen |
| T7 RNA-Polymerase mit 10 x Transkriptionspuffer | Roche Diagnostics, Mannheim |

| | |
|--|---|
| Taq DNA-Polymerase mit 10 x Taq-Puffer | Eppendorf, Hamburg bzw. Molzym, Bremen |
| Trypsin mit Na-EDTA (0,2 g/l) | Sigma-Aldrich, München |

2.1.7.3 sonstige Proteine

| | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| BSA (Fraktion V) | Roche Diagnostics, Mannheim |
| FCS | Gibco BRL, Karlsruhe |
| Interferon- β (Betaferon®) | Schering, Berlin |
| Leupeptin | Sigma-Aldrich, München |
| RNasin® Ribonuklease-Inhibitor | Promega, Mannheim |

2.1.8 Antibiotika

| | |
|---|------------------------|
| Ampicillin | Serva, Heidelberg |
| G418 (Geneticin) | Sigma-Aldrich, München |
| Kanamycin | Invitrogen, Karlsruhe |
| Penicillin (10^4 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml) | Sigma-Aldrich, München |

2.1.9 Standards

| | |
|---|-----------------------------|
| DNA Molecular Weight Marker VIII ("124 bp-Ladder") | Roche Diagnostics, Mannheim |
| DNA-Längenstandard ("1 kb-DNA-Ladder") | Invitrogen, Karlsruhe |
| Protein-Marker (pre-stained, low-range für SDS-PAGE) | Bio-Rad, München |
| Protein-Marker (pre-stained, high-range für SDS-PAGE) | Bio-Rad, München |

2.1.10 Kits

| | |
|---|---------------------------------------|
| Bradford-Reagenz (5 x) | Bio-Rad, München |
| Dynabeads® mRNA Purification Kit | Dynal Biotech, Oslo, NOR |
| ECL Detection Reagent (Western Blot) | Amersham Biosciences, Piscataway, USA |
| Luciferase Assay System | Promega, Mannheim |
| OptiPhase Supermix | PerkinElmer, Jügesheim |
| Protease Inhibitor Cocktail (Complete Mini) | Roche Diagnostics, Mannheim |
| VenorGeM | |
| PCR-based Mycoplasma Detection Kit | Minerva Biolabs, Berlin |

2.1.11 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Wenn nicht anders angegeben, wurde Reinstwasser aus dem NANOpure-Reinstwassersystem (Barnstead International, Dubuque, Iowa, USA) verwendet.

Alle Lösungen für Arbeiten mit RNA wurden mit RNase-freiem Wasser angesetzt oder DEPC-behandelt (wie unter 2.1.11.1 für H₂O beschrieben).

2.1.11.1 Gebrauchslösungen

PBS 140 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 6,5 mM Na₂HPO₄
 1,5 mM KH₂PO₄
 pH 7,2

RNase-freies H₂O Behandlung mit DEPC (0,1 % (v/v) DEPC in H₂O, über Nacht gerührt und anschließend zweimal autoklaviert). Alternativ: Verwendung von Molecular Biology Grade Water (Eppendorf, Hamburg).

2.1.11.2 Zellkulturmedien

Grundmedium DMEM (Sigma-Aldrich, München) mit
 2 mM L-Glutamin
 26 mM NaHCO₃
 100 U/ml Penicillin
 100 µg/ml Streptomycin

Wachstumsmedium Grundmedium mit 10 % (v/v) FCS

Erhaltungsmedium Für FRhK-4- und HeLa-Zellen wurde Grundmedium mit 1 % (v/v) FCS, für MRC-5- und HFS-10-Zellen mit 3 % FCS verwendet.

Selektionsmedium Für Selektion und Aufrechterhaltung stabil transfizierter FRhK-4-Zellen mit Neomycinresistenz wurde das Kulturmedium mit 600µg/ml G418 versetzt.

Einfriermedium 10 % DMSO in FCS oder Grundmedium mit 20 % FCS und 10 % DMSO für MRC-5-Zellen

2.1.11.3 DAPI-Färbung

DAPI-Lösung 1 µg/ml DAPI in PBS

Carnoy's Fixierer 25 % (v/v) Eisessig in Methanol (4 °C)

2.1.11.4 Indirekte Immunfluoreszenz

90 % Aceton in PBS (-20 °C)

4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS (sterilfiltriert 14 Tage bei RT haltbar)

0,2 % (v/v) Triton X-100 in PBS

2.1.11.5 RNA-Extraktion mit der AGPC-Methode

GIT-Stocklösung 4 M Guanidiniumthiocyanat
25 mM Natriumcitrat
0,5 % (w/v) Sarcosyl
pH 7,0

Lösung D 0,1 M 2-Mercaptoethanol in GIT-Stocklösung

2 M Natriumacetatlösung (pH 4,0)

Chloroform/Isoamylalkohol (49:1), frisch

75 % (v/v) Ethanol (-20 °C)

Änderungen für die Extraktion nach dem rRNA-Abbau-Assay:

GIT*-Stocklösung 5 M Guanidiniumthiocyanat
31,25 mM Natriumcitrat
0,625 % (w/v) N-Lauroyl-Sarcosin
pH 7,0

Lösung D* 125 mM 2-Mercaptoethanol in 5 M GIT-Stocklösung

2.1.11.6 DNA-Extraktion aus tierischen Zellen

Lysepuffer 100 mM NaCl
 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 25 mM EDTA (pH 8,0)
 0,5 % (w/v) SDS
 0,1 mg/ml Proteinase K (frisch zugesetzt)

Phenol (TE)/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)

7,5 M Ammoniumacetat-Lösung

70%iger Ethanol

TE-Puffer 10 mM Tris
 1 mM EDTA
 pH 7,8 (mit HCl)

2.1.11.7 DNA-Reinigung mit LMP-Agarose

Phenol (TE)/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)

Ether, wassergesättigt (Diethylether 1:1 mit Aqua dest. ausgeschüttelt)

3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8)

70%iger Ethanol (-20 °C)

2.1.11.8 Phenol-/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation

Phenol (TE-gepuffert)/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8)

5 M Ammoniumacetatlösung

70%iger Ethanol (-20 °C)

2.1.11.9 native Agarose-Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer 2 M Tris
 250 mM Natriumacetat
 50 mM EDTA
 pH 7,8
(Gebrauchslösung: mit Aqua dest. auf 1 x TAE verdünnt)

Probenpuffer 40 % (w/v) Sucrose
 1 mM EDTA (pH 8,0)
 0,1 % (w/v) SDS
 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

DNA-Längenstandard [120 ng/µl]

60 µl DNA-Marker "1kb ladder" bzw. 73 µl Marker "VIII"
40 µl 10 x TAE
100 µl Probenpuffer
300 µl Aqua dest.
10 min bei 56 °C, Lagerung in Aliquots bei -20 °C

Ethidiumbromid-Lösung: 10 mg/ml in 20 mM Tris (pH 8,0)

(für RNA-Auftrennung: alle Lösungen mit RNase-freiem H₂O)

2.1.11.10 Denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

10 x MOPS-Puffer 0,2 M MOPS (pH 7,0 mit NaOH)
 50 mM Na-Acetat
 10 mM EDTA

10 x Ladepuffer 50 % Glycerol
 1 mM EDTA (pH: 8,0)
 0,25 % Bromphenolblau

deionisiertes Formaldehyd bzw. Formamid

2 h mit 2,5 g/50 ml Amberlite IRN-150L rührend inkubiert und durch
Whatman 3MM filtriert (Aliquots bei -20 °C gelagert und einmalig
verwendet; auf pH > 4 getestet)

Ansatz eines 1%igen Gels mit 0,6 M Formaldehyd (75 ml):
(Gelkammer, -träger und -kamm für 30 min in 3%iger H₂O₂-Lösung inkubiert und folgend 4fach mit H₂O gespült.)
0,75 g Agarose in 63,75 ml H₂O gelöst
→ auf 60 °C abkühlen lassen
vor dem Gießen Zugabe von temperierten 7,5 ml 10 x MOPS und 3,75 ml Formaldehyd (37%ig; deionisiert)

0,5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung

(alle Lösungen RNase-frei)

2.1.11.11 denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Acrylamid-Stammlösung (30 % T 5 % C_{bis})

28,5 % (w/v) Acrylamid
1,5 % (w/v) Methylenbisacrylamid
filtriert und bei 4 °C dunkel gelagert

Ladepuffer (1-2 x) 95 % Formamid (deionisiert*)
18 mM EDTA
0,025 % SDS
0,025 % Xylencyanol
0,025 % Bromphenolblau
(*: Formamid 1 h mit 10 g / 100 ml Amberlite IRN-150L gerührt, danach filtriert; Lagerung bei -80 °C)

10 x TBE 0,9 M Tris (pH 8,3)
0,9 M Borsäure
20 mM Natrium-EDTA

10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung (bei 4 °C einen Monat haltbar)

0,1%ige (w/v) Bromphenolblaulösung

2 µg/ml Ethidiumbromid in H₂O für eventuelles Färbebad

Ansatz eines 5%igen Gels mit 8 M Harnstoff für zwei kleine Gele (10 x 8 x 0,1 cm):

7,2 g Harnstoff
1,5 ml 10 x TBE
2,5 ml 30%ige Acrylamid-Stammlösung (30 % T 5 % C_{bis})
ad 15 ml mit Aqua dest.

→ entgast mittels Saugpumpe für 15 min

150 µl 10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung
15 µl TEMED

→ vorsichtig gemischt und zügig zwischen, zuvor mit 2-Propanol und Ethanol gereinigte, Platten gegossen, mind. 1 h polymerisieren gelassen

→ Geltaschen vor dem Lauf gründlich mit Bromphenolblau-Lösung und TBE gespült und das Gel 30 min bei 20-40 V/cm (4 °C) vorlaufen gelassen

2.1.11.12 Bakterienkultur

LB-Medium 10 g Trypton
 5 g Hefe-Extrakt
 8 g NaCl
 ad 1 l mit Aqua dest.
 ggf. Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin

LB-Agar 15 g/l Agar in LB-Medium durch autoklavieren gelöst
 ggf. Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin

LB⁺⁺-Medium LB-Medium mit 20 mM MgSO₄ und 10 mM KCl

2.1.11.13 Herstellung kompetenter *E. coli*

TfB I 30 mM Kaliumacetat
 50 mM MnCl₂
 100 mM RbCl
 10 mM CaCl₂
 15 % (v/v) Glycerol
 pH 5,8 mit verd. Essigsäure

TfB II 10 mM MOPS
 75 mM CaCl₂
 10 mM RbCl
 15 % (v/v) Glycerol

2.1.11.14 Schnellpräparation bakterieller Plasmid-DNA (Miniprep)

Lösung 1 50 mM Glucose
 10 mM EDTA
 10 mM Tris
 pH 8,0 (mit HCl)
 2 mg/ml Lysozym vor Gebrauch zugeben

Lösung 2 0,2 M NaOH
 1 % (w/v) SDS
 frisch angesetzt

Lösung 3 3 M Natriumacetat
 pH 4,8 (mit Eisessig)

70%iger Ethanol (-20 °C)

2.1.11.15 Präparation bakterieller Plasmid-DNA (Maxiprep)

2 M Tris (pH 8,0 mit HCl)

0,5 M EDTA (pH 8,0 mit NaOH)

TES-Puffer 50 mM Tris (pH 8,0)
 5 mM EDTA (pH 8,0)
 50 mM NaCl

STET-Puffer 50 mM Tris (pH 8,0)
 50 mM EDTA (pH 8,0)
 8 % (w/v) Saccharose
 5 % (w/v) Triton X-100
 frisch angesetzt

20 mg/ml Lysozymbromid-Lösung in 20 mM Tris (pH 8,0), frisch

1 % (w/v) Sarcosyl in 20 mM Tris (pH 8,0), frisch

10 mg/ml Ethidiumbromid-Lösung

5 mM Tris (pH 8,0)

CsCl-Lösung 50 g CsCl
 65 ml 20 mM Tris (pH 8,0)
 Refraktionsindex mit 20 mM Tris auf 1,3865 eingestellt

NaCl-gesättigter Isopropanol

Isopropanol ausgeschüttelt in NaCl-gesättigter 10 mM Tris (pH 8,0)/
1 mM EDTA-Lösung

2.1.11.16 Plasmid-Transfektion mit der Calciumphosphat-Methode

2 x HBS 50 mM HEPES
 1,5 mM Na₂HPO₄
 280 mM NaCl
 pH 7,1 (mit NaOH)
 sterilfiltriert

2 M CaCl₂-Lösung

TE-Puffer 10 mM Tris
 1 mM EDTA
 pH 7,8 (mit HCl)

30%ige (v/v) Glycerol-Lösung (für Schocklösung 1:2 in 2 x HBS verdünnt)

2.1.11.17 Plasmid-Transfektion mit jetPEI

150 mM NaCl-Lösung

2.1.11.18 poly(IC)-Transfektion zur Aktivierung von Promotorkonstrukten

10 mg/ml DEAE-Dextran (sterilfiltriert)

2 mg/ml poly(IC) in H₂O (Lagerung bei -80 °C)

2.1.11.19 poly(IC)-Transfektion zur Aktivierung des OAS/RNase L-Weges

TD-Lösung 140 mM NaCl
 5 mM KCl
 0,7 mM Na₂HPO₄
 25 mM Tris
 pH 7,4

TS-Lösung 100 ml TD-Lösung
 0,5 ml 0,5 mM MgCl₂
 0,5 ml 0,5 mM CaCl₂
 (sterilfiltriert)

10 mg/ml DEAE-Dextran in TS-Lösung (sterilfiltriert)

2 mg/ml poly(IC) in H₂O (Lagerung bei -80 °C)

2.1.11.20 Ribonuclease Protection Assay

Stopp-Lösung 0,2 M EDTA (pH 8,0)

2,5 M Ammoniumacetat-Lösung

20 mg/ml Glycogen-Lösung in H₂O

70%iger Ethanol (-20 °C)

0,1 mM EDTA-Lösung (pH 8,0) für die Elution

deionisiertes Formamid

Formamid 1 h mit 10 g/100 ml Amberlite IRN-150L rührend inkubiert
und durch Whatman 3MM filtriert (frisch zubereitet)

Hybridisierungslösung

40 mM PIPES (pH 6,4)
400 mM NaCl
5 mM EDTA
80 % (v/v) deionisiertes Formamid (frisch zugegeben oder in Aliquots
bei -80 °C gelagert)

RNase-Verdau-Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
300 mM NaCl
5 mM EDTA

RNase-Stammlösung

0,5 mg/ml RNase A
10 000 U/ml RNase T1
10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
20 mM NaCl
50 % (v/v) Glycerol
→ für den Gebrauch 1:100 in RNase-Verdau-Puffer verdünnt

20 % (w/v) SDS in H₂O

Proteinase K-Lösung

5 mg/ml Proteinase K
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
3 mM CaCl₂
50 % (v/v) Glycerol
→ direkt vor Gebrauch 1:1 mit 20%iger (w/v) SDS-Lösung versetzt

Phenol (H₂O)/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)

2.1.11.21 Bradford-Assay

Bradford-Reagenz (Bio-Rad, München) 1:5 mit H₂O verdünnt und filtriert

BSA-Standard BSA-Lösungen in NP-40-Lysepuffer oder 250 mM Tris-HCl (pH 7,5)
im Bereich 0,25-4 mg/ml

2.1.11.22 diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Lower Tris 1,5 M Tris Base (pH 8,8 mit HCl)
0,4 % (w/v) SDS

Upper Tris 0,5 M Tris Base (pH 6,8 mit HCl)
0,4 % (w/v) SDS

10%ige (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung (bei 4 °C 1 Monat haltbar)

Acrylamid-Stammlösung (30 % T 3,3 % C_{bis})

29 % (w/v) Acrylamid
1 % (w/v) Bisacrylamid
filtriert, bei 4 °C 3 Monate haltbar

Ansatz eines 10%igen Trenngels für zwei kleine Gele (10 x 8 x 0,1 cm):

3,3 ml Acrylamidstammlösung (30 % T 3,3 % C_{bis})
2,6 ml Lower Tris (pH 8,8)
4,1 ml Aqua dest.

→ entgast mittels Saugpumpe für 15 min

50 µl 10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung
5 µl TEMED

→ vorsichtig gemischt und zügig in, zuvor mit 2-Propanol und Ethanol gereinigte, Platten gegossen, mind. 1 h oder über Nacht polymerisieren lassen, dann Sammelgel angefügt

Ansatz eines 3%igen Sammelgels für zwei kleine Gele (10 x 8 x 0,1 cm):

1 ml Acrylamidstammlösung (30 % T 3,3 % C_{bis})
2,6 ml Lower Tris (pH 8,8)
6,4 ml Aqua dest.

→ entgast mittels Saugpumpe für 15 min

50 µl 10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung
10 µl TEMED

→ vorsichtig gemischt und zügig gegossen, mind. 1 h stehen lassen

RIPA-Puffer

150 mM NaCl
10 mM Tris (pH 7,2)
5 mM EDTA
0,1 % SDS
1 % Triton X-100
1 % Desoxycholat
→ vor Gebrauch Zusatz von 200 µl Protease Inhibitor Cocktail zu 1 ml

Protein-Probenpuffer

62,5 mM Upper Tris
40 % (w/v) Saccharose
12 % (w/v) SDS
0,025 % (w/v) Bromphenolblau
8 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
bei -20 °C gelagert

Elektrophoresepuffer 25 mM Tris
192 mM Glycin
1 % (w/v) SDS

Renaturierungspuffer 10 mM Tris (pH 7,0)
50 mM Natriumchlorid
4 M Harnstoff
0,1 mM DTT

Blottingpuffer 25 mM Tris
192 mM Glycin
bei 4 °C gelagert

TBS 2 mM Tris Base
137 mM Natriumchlorid
pH 8,0 (mit HCl)
bei 4 °C gelagert

TBST 0,1 % (v/v) Tween-20 in TBS
bei 4 °C gelagert

TBST/Trockenmagermilch
5 % (w/v) Trockenmagermilch in TBST
bei 4 °C gelagert

0,1%ige (w/v) Bromphenolblau-Lösung

2.1.11.23 Luciferase-Assay

TEN-Puffer 40 mM Tris-HCl (pH 7,5)
1 mM EDTA (pH 8,0)
150 mM NaCl

250 mM Tris-HCl (pH 7,5)

2.1.11.24 Synthese und Aufreinigung von 2-5A

OAS-Lysepuffer 10 mM KCl
1,5 mM Mg(OAc)₂
20 mM HEPES
pH 7,4 (mit KOH)

OA-Synthesepuffer 150 mM KOAc
31,25 mM Mg(OAc)₂
25 mM HEPES
pH 7,4 (mit KOH)
5 mM Fuctose-1,6-Diphosphat
1,25 mM DTT
6,25 mM ATP
12,5 µg/ml Poly(IC)

Waschpuffer 90 mM KCl
20 mM HEPES
pH 7,4 (mit KOH)

Elutionspuffer 350 mM KCl
20 mM HEPES
pH 7,4 (mit KOH)

2.1.11.25 RNase L-Aktivitäts-Assays

NP-40-Lysepuffer 10 mM Hepes (pH 7,5)
90 mM KCl
1 mM Mg(OAc)₂
0,5 % (v/v) Nonidet P-40
2 mM 2-Mercaptoethanol
100 µg/ml Leupeptin (frisch)

10 x Cleavage-Puffer 100 mM Hepes (pH 7,5)
1 M KCl
50 mM Mg(OAc)₂
10 mM ATP (frisch)
140 mM 2-Mercaptoethanol (frisch)

2.1.11.26 ³²P-Markierung des RNase L-Substrats und Markerherstellung

3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2)

80%iger und 95%iger Ethanol (-20 °C)

200 mM Na₂CO₃-Lösung (pH 9,0)

2.1.11.27 RNA-Degradation in HeLa-Extrakten

| | |
|---------------------|--|
| isotonischer Puffer | 35 mM HEPES (pH: 7,4 mit KOH) 146 mM NaCl 11 mM Glucose |
| hypotoner Puffer | 20 mM HEPES (pH: 7,4 mit KOH) 10 mM KCl 1,5 mM Mg(CH ₃ CO ₂) ₂ 1 mM DTT |
| 10 x S10-Puffer | 200 mM HEPES (pH: 7,4 mit KOH) 1,2 M KCH ₃ CO ₂ 40 mM Mg(CH ₃ CO ₂) ₂ 50 mM DTT |
| SDS-Puffer | 0,5 % SDS 10 mM Tris-HCl (pH: 7,5) 1 mM EDTA 100 mM NaCl |
| 10 x Reaktionsmix | 10 mM ATP 600 mM KCH ₃ CO ₂ 155 mM HEPES (pH 7,4 mit KOH) |

0,1 mg/ml poly(IC)

2.1.12 Chemikalien

| | |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| 2-Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt |
| Aceton | Fluka, Buchs, CHE |
| Acrylamid | Pharmacia Biotech, Uppsala, SWE |
| Agar "Bacto Agar" | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Agarose "SeaKem LE" | Cambrex, East Rutherford, USA |
| Agarose | BMA, Augst, CHE / Bio-Rad, München |
| Amberlite IRN-150L | Pharmacia Biotech, Uppsala, SWE |
| Ammoniumpersulfat | Serva, Heidelberg |
| Bisacrylamid (Methylenbisacrylamid) | Pharmacia Biotech, Uppsala, SWE |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich, München |
| Calciumchlorid | Merck, Darmstadt |

| | |
|------------------------------------|------------------------------|
| Cäsiumchlorid | Serva, Heidelberg |
| Chloroform | Fluka, Buchs, CHE |
| DAPI | Sigma-Aldrich, München |
| DEAE 52-Cellulose | Serva, Heidelberg |
| DEAE-Dextran | Sigma-Aldrich, München |
| DEPC | Sigma-Aldrich, München |
| Diethylether | Riedel-de Haën, Seelze |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Riedel-de Haën, Seelze |
| DMEM (mit L-Glutamin) | Sigma-Aldrich, München |
| DMSO | Merck, Darmstadt |
| DTT | Roche Diagnostics, Mannheim |
| EDTA | Sigma-Aldrich, München |
| Eindeckmedium (Glycerol/PBS) | Euroimmun, Lübeck |
| Eindeckmedium CITIFluor | Citifluor Ltd, London, UK |
| Entwickler und Fixierer "Adefodur" | Adefo, Dietzenbach |
| Essigsäure | Fluka, Buchs, CHE |
| Ethanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich, München |
| Fructose-1,6-Diphosphat | Sigma-Aldrich, München |
| Glucose | Janssen Chimica, Geel, BEL |
| Glycerol | Riedel-de Haën, Seelze |
| Glycin | Carl Roth, Karlsruhe |
| Guanidiniumthiocyanat | Serva, Heidelberg |
| Harnstoff | Merck, Darmstadt |
| HBSS | Sigma-Aldrich, München |
| Hefeextrakt "Bacto yeast extract" | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Hepes | Acros, Geel, BEL |
| Immersionsöl "Immersol F" | Zeiss, Jena |
| Isoamylalkohol | Merck, Darmstadt |
| Isopropanol | Fluka, Buchs, CHE |
| jetPEI | Qbiogene, Carlsbad, USA |
| Kaliumacetat | Riedel-de Haën, Seelze |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Riedel-de Haën, Seelze |

| | |
|-----------------------------------|------------------------------|
| Kaliumhydroxid | Riedel-de Hen |
| LM-MP Agarose (low melting point) | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Magnesiumacetat | Riedel-de Hen |
| Magnesiumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Methanol | Fluka, Buchs, CHE |
| Mineral-ol | Sigma-Aldrich, München |
| Molecular Biology Grade Water | Eppendorf, Hamburg |
| Natriumacetat | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid | Fluka, Buchs, CHE |
| Natriumcitrat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydroxid | Fluka, Buchs, CHE |
| N-Lauroyl-Sarcosin (Sarcosyl) | Sigma-Aldrich, München |
| Nonidet P-40 | Sigma-Aldrich, München |
| Paraformaldehyd | Fluka, Buchs, CHE |
| Phenol (TE-gesattigt) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Phenol (wassergesattigt) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Saccharose | Acros, Geel, BEL |
| Salzsäure | Merck, Darmstadt |
| SDS | Carl Roth, Karlsruhe |
| 20 x SSC | Sigma-Aldrich, München |
| TEMED | Sigma-Aldrich, München |
| Tris Base | Sigma-Aldrich, München |
| Triton X-100 | Serva, Heidelberg |
| Trockenmagermilch | Saliter, Obergunzburg |
| Trypan Blau-Lösung (0,4%ig) | Sigma-Aldrich, München |
| Trypton "Bacto Tryptone" | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Tween 20 | Serva, Heidelberg |

2.1.13 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|-----------------|
| 8-Well Chamber Slides | Nunc, Wiesbaden |
| 6-Well Mikrotiterplatten Nunclon Δ | Nunc, Wiesbaden |
| 12-Well Mikrotiterplatten Nunclon Δ | Nunc, Wiesbaden |

| | |
|--|--|
| 24-Well Mikrotiterplatten Nunclon Δ | Nunc, Wiesbaden |
| 96-Well Mikrotiterplatten Nunclon Δ | Nunc, Wiesbaden |
| 96-Well Sample Plates (1450-401) | PerkinElmer, Jügesheim |
| Bakterienröhrchen 14 ml | Greiner, Frickenhausen |
| Biomax MR Filme | Kodak, Stuttgart |
| Combitips | Eppendorf, Hamburg |
| Deckgläschen | Omnilab, Bremen |
| Dialyseschläuche "Ultrapure" und "Visking" | Gibco BRL, Karlsruhe / Serva, Heidelberg |
| Einmalküvetten 1,5 ml Plastik | Plastibrand, Wertheim und Nerbe, Winsen |
| Filterpapier "Schwarzband" | Schleicher&Schuell, Dassel |
| Filterpapier | Whatman, Dassel |
| Glasobjektträger | Omnilab, Bremen |
| Kanülen (0,9 x 40 mm / 0,45 x 25 mm) | B. Braun, Melsungen |
| Kimwipes lite | Kimberly-Clark, Mainz |
| Kryoröhrchen | Nunc, Wiesbaden |
| Nitrocellulosemembran "Protran" | Schleicher&Schuell, Dassel |
| Parafilm M | American National Can, Chicago, USA |
| Pasteurpipetten | Brand, Wertheim |
| PCR-Cups 200 µl | Eppendorf, Hamburg |
| PCR-Stripes | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg |
| Quick Seal-Zentrifugenröhrchen (Polyallomer) | Beckman Coulter, Unterschleißheim |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf, Hamburg |
| Sofortbilder 667 Film-pack | Polaroid, Dreieich-Sprendlingen |
| Spitzröhrchen | Greiner, Frickenhausen |
| Spritzen | B. Braun, Melsungen |
| Sterilfilter "Millex" | Millipore, Schwalbach |
| UVette® | Eppendorf, Hamburg |
| Whatman 3MM-Chromatographie-Papier | Whatman, Dassel |
| Zellkulturgefäße, Nunclon Δ | Nunc, Wiesbaden |
| Zellschaber | Nunc, Wiesbaden |
| Zentrifugenröhrchen | Greiner, Frickenhausen |

2.1.14 Geräte

| | |
|---|---|
| Analysenwaage BP 61 | Sartorius, Göttingen |
| Analysenwaage MC 1 | Sartorius, Göttingen |
| Begasungsbrutschränke | Heraeus, Osterode |
| Blotting-Kammer "TE Series Transphor Eppo Unit" | Hofer, Holliston, USA |
| Dounce Homogenisator | Braun Biotech Int., Melsungen |
| Elektrophoresekammern für Agarosegele | Bio-Rad, München |
| Elektrophoresekammer "Mighty Small II" SE250 | Hofer, Holliston, USA |
| Elektrophorese-Kammer "Protean II xi Cell" | Bio-Rad, München |
| Entwicklermaschine SRX-101 | Konica, Langenhagen |
| Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 (HAL100&HBO100) | Zeiss, Jena |
| Fuchs-Rosenthal-Zählkammer | Assistent, Sondheim |
| Gefäße für radioaktive Abfälle | Amersham Bio., Piscataway, USA |
| Geigerzähler (β - γ Detektor LB122) | Berthold, Bad Wildbach |
| Geltrockner "Gel Dryer Model 543" | Bio-Rad, München |
| Glaspipetten | Hirschmann EM, London, UK |
| Glaswaren | Schott, Mainz; Brand, Wertheim und B.Braun, Melsungen |
| Inkubator Ceromat HK | Braun Biotech Int., Melsungen |
| Kolbenhubpipetten | Eppendorf, Hamburg und Gilson |
| Kühlblock TR-L 288 | Liebisch, Bielefeld |
| Kühlzentrifuge 5403 | Eppendorf, Hamburg |
| Lichtmikroskop Wilovert S | Hund, Wetzlar |
| Lumineszenz-Counter "Trilux 1450 MicroBeta" | PerkinElmer, Jügesheim |
| Magnetrühr Tisch RCT basic | Ika Labortechnik, Staufen |
| Mehrkanalpipetten (8 Kanäle) | Eppendorf, Hamburg |
| Messzylinder | VitLab, Grossostheim |
| pH-Meter pH 537 | WTW, Weilheim |
| Pipettierhilfe "Acuboy" | TecNoMara, Zürich, CHE |
| Pipettierhilfe "Pipetboy acu" | Integra Biosciences, Ruhberg |
| Power Supply 200/2.0 | Bio-Rad, München |
| Quarzküvetten Suprasil | Hellma, Jena |
| Refraktometer | Optronic, Hamburg |
| Reinstwassersystem "NANOpure" | Barnstead Int., Dubuque, USA |
| Saugpumpe "Vacuboy" | Integra Biosciences, Ruhberg |

| | |
|---|----------------------------------|
| ScanJet 2200C | Hewlett Packard, Böblingen |
| Schüttler Ceromat S | Braun Biotech Int., Melsungen |
| Schutzfolie für radioaktive Arbeiten | Amersham Bio., Piscataway, USA |
| Schutzschilder für radioaktive Arbeiten | Amersham Bio., Piscataway, USA |
| Schweißgerät für Quick Seal-Röhrchen | Beckman Coulter, Unterschleißh. |
| Sofortbildkamera MP4+ | Polaroid, Dreieich-Sprendlingen |
| SpeedVac SC 110 Vakuumzentrifuge | Savant, Farmingdale, USA |
| Spektralphotometer DU® 640 | Beckmann Coulter, Unterschleißh. |
| Sterilbank (Typ: CA/REV4) | Clean Air, Haan |
| Sterilbank Lamin Air HB 2448 und HB 2472 S | Heraeus, Osterode |
| Taumler "Red Rotor" | Hofer, Holliston, USA |
| Thermocycler Gene Amp™ PCR System 2400 | PerkinElmer, Jügesheim |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf, Hamburg |
| Tischzentrifuge 5415 C (Rotor F-45-18-11) | Eppendorf, Hamburg |
| Tischzentrifuge GS-6R (Rotor GH 3.7) | Beckmann Coulter, Unterschleißh. |
| Ultraschallgerät UW 200 | Bandelin, Berlin |
| Ultrazentrifuge LE-70 (Rotor FW 65) | Beckmann Coulter, Unterschleißh. |
| UV-Handlampe VL-6C | Serva, Heidelberg |
| UV-Transilluminator "Mighty Bright" | Hofer, Holliston, USA |
| Vortexer VF2 | Ika Labortechnik, Staufen |
| Wasserbad | Memmert, Schwabach |
| Zentrifuge RC28S (Rotor F-28/50 und F-16/250) | Sorvall, Hanau |

2.1.15 spezielle Software

| | |
|----------------------------|--|
| BLAST | http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| DNASTAR SeqBuilder (6. Ed) | DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA |
| EIDorado | Genomatix Software GmbH, München |
| GEMS Launcher | Genomatix Software GmbH, München |
| GraphPad InStat (V 3.01) | GraphPad Software, San Diego California USA |
| Primer3 | (ROZEN AND SKALETSKY, 2000); http://primer3.sourceforge.net/webif.php |
| Sequence Viewer 2.0.β | National Center for Biotechnology Information, Rockville, Maryland, USA; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/sviewer |

| | |
|---------------------------------|--|
| SIMMONICS 2005 Vers. 1,6 | (SIMMONDS UND SMITH, 1999); http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/bio/research/devans/bioinformatics/simmonics/ |
| siRNA Target Finder | GenScript (Piscataway, New Jersey, USA); (WANG UND MU, 2004); https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai# |
| siRNA Construct Builder | GenScript (Piscataway, New Jersey, USA); (WANG UND MU, 2004); https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai# |
| The Sequence Manipulation Suite | (STOTHARD, 2000); http://www.bioinformatics.org/sms2/ |
| Plasmid Processor | Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Kuopio; http://www.uku.fi/~kiviraum/plasmid/plasmid.html |

2.2 Methoden

(Angaben der Beschleunigung bei Zentrifugationen erfolgen in g_{max})

2.2.1 Zellkultivierung

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) unter Zusatz von 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Das Wachstumsmedium enthielt einen 10%igen Anteil von FCS, während das Erhaltungsmedium 1 % für FRhK-4- und HeLa-Zellen bzw. 3 % für MRC-5- und HFS-10-Zellen beinhaltete. Ein Mediumwechsel wurde in der Regel zweimal wöchentlich durchgeführt.

Alle ein bis zwei Wochen erfolgte eine Passagierung, bei der die Zellen durch Trypsin mit 0,2 g/l Na-EDTA abgelöst und dann im maximalen Verhältnis von 1:8 umgesetzt wurden. MRC-5- und HFS-10-Zellen wurden bei der Passage maximal im Verhältnis 1:3 umgesetzt und durch einen Waschschrift mit Wachstumsmedium vom Trypsin befreit.

Stabil transfizierte Zellpopulationen oder -klone wurden kontinuierlich in Gegenwart von 600 µg/ml G418 kultiviert, wobei jeweils vor Beginn der Experimente auf den Einsatz des Selektionsantibiotikums verzichtet wurde.

2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, einmal mit Wachstumsmedium gewaschen, dann in gekühltem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen

überführt. Nach dem Einfrieren der Zellen bei -80 °C (über Nacht) erfolgte die Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C . Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen aufgetaut und mit Wachstumsmedium in die entsprechenden Kulturgefäße gegeben. Nach einigen Stunden erfolgte ein Wechsel des Mediums.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden Zellsuspensionen in geeigneter Verdünnung in eine Fuchs-Rosenthal-Kammer eingesetzt und ausgezählt. Unter Berücksichtigung des Kammer- und des Verdünnungsfaktors wurde die Zellkonzentration in der Ausgangssuspension ermittelt, wobei immer Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

Durch das Versetzen der auszählenden Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an 0,4%iger Trypan Blau-Lösung wurden tote Zellen identifiziert, die im Gegensatz zu vitalen Zellen durch den Farbstoff blau gefärbt werden.

2.2.4 Mykoplasmen-Nachweise

Die verwendeten Zellkulturen wurden regelmäßig mittels einer DAPI-Färbung oder eines PCR-basierten Tests (VenorGeM) auf Mykoplasmen untersucht, wobei niemals eine Mykoplasmen-Kontamination nachgewiesen wurde.

2.2.4.1 DAPI-Färbung

Für die DAPI-Färbung wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 30 % auf runden Deckgläsern in Mikrotiterplatten kultiviert. Die Zellen wurden je einmal mit PBS, mit PBS/Carnoy's Fixierer (1:1) und mit kaltem (4 °C) Carnoy's Fixierer gewaschen und folgend für 10 min bei RT in Carnoy's Fixierer inkubiert. Nach einem Waschschrift mit H_2O erfolgte die Färbung mit $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ DAPI in PBS für 10 min bei RT im Dunkeln. Die Zellen wurden erneut mit H_2O gewaschen und mit ihren Deckgläsern und etwas Eindeckmedium umgekehrt auf Objektträgern platziert. Nach Fixierung der Deckgläser mit Nagellack konnten die Präparate am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

2.2.4.2 VenorGeM PCR-based Mycoplasma Detection Kit

Der PCR-Nachweis wurde nach Herstellerangaben (Minerva Biolabs, Berlin) durchgeführt. Hierfür wurden 2 µl Zellkulturüberstand in den Test eingesetzt, welcher mit seinen, gegen die 16S rRNA-Gensequenz gerichteten Primern, zahlreiche *Mykoplasma*-, *Acholeplasma*- und *Ureaplasma*-Spezies detektieren kann.

2.2.5 Viruspool-Herstellung

Als Inokulum für die Infektion von Zellkulturen mit HAV wurden Viruspools verwendet, welche eine Mischung zelldebrisfreier Zell-Lysate und Kulturüberstände HAV-infizierter Zellkulturen darstellen.

Für einen HAV-Viruspool aus FRhK-4-Zellen wurde eine 80-90 % konfluente Zellkultur in einer 185 cm²-Flasche mit 1 ml Virus-Lysat in Grundmedium infiziert (s. 2.2.6). Parallel wurde für die Herstellung einer Mock-Kontrolle eine Zellkultur nur mit dem entsprechenden Volumen an Erhaltungsmedium inkubiert. Nach der Infektion erfolgte eine Kultivierung der Zellen für 14 Tage, wobei nach 7 Tagen Erhaltungsmedium nachgefüttert wurde.

Die Lyse der Zellen wurde durch dreimaliges Einfrieren (-80 °C) und Auftauen (RT) realisiert. Es schloss sich eine Ultraschallbehandlung für dreimal je 20 s (20 kHz/200 W) an und abschließend wurde der Zelldebris für 10 min bei 1 700 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und als HAV- bzw. Mock-Lysat bei -80 °C gelagert. Es folgte die Titerbestimmung des Viruspools (2.2.7). HAV GBM-Pools aus MRC-5-Zellen wurden analog hergestellt.

2.2.6 Infektion von Zellkulturen mit HAV

Für die Infektion wurden zu 80-90 % konfluent gewachsene Zellkulturen verwendet. Das Kulturmedium wurde abgenommen und das Inokulum, in der Regel mit einer MOI = 1, im Grundmedium auf die Zellen gegeben, wobei das Volumen möglichst klein gehalten wurde. Die Mock-Kontrollen wurden entweder nur mit Grundmedium überschichtet oder mit Mock-Lysat inkubiert (s. 2.2.5). Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit gelegentlichem Schwenken wurde das Inokulum entfernt. Die Zellen wurden einmal mit Medium gespült und dann in dem entsprechenden Erhaltungsmedium kultiviert.

Bei längeren Infektionskinetiken wurde ggf. wöchentlich ein 50%iger Austausch des Mediums vorgenommen.

Um persistent infizierte Zellkulturen zu erhalten, wurden die Kulturen, wie beschrieben, infiziert (MOI = 1) und in der Regel für drei Wochen kultiviert, bevor sie passagiert und in die Experimente eingesetzt wurden.

Der Infektionserfolg wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz überprüft (2.2.8.1).

2.2.7 HAV-Endpunkttitration (TCID₅₀-Bestimmung)

Mit der Endpunkttitration wird die höchste Verdünnung einer Virus-Suspension ermittelt, die noch einen Effekt auf das Testsystem hat. Mittels der Kärber-Gleichung wird aus den Ergebnissen mehrerer Parallelansätze die mittlere infektiöse Dosis in der Zellkultur (TCID₅₀) errechnet.

FRhK-4-Zellen wurden 1:5 in 96-Well-Platten umgesetzt und 1-2 Tage bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Von den zu titrierenden Proben wurden mit Erhaltungsmedium je zwei logarithmische Verdünnungsreihen zu der Basis 10 hergestellt (z.B. 1:10 bis 1:10¹¹). Galt es niedrige Virusmengen zu quantifizieren, wurde mit dem Verdünnungsfaktor 5 gearbeitet (unverdünnt, 1:5 bis 1:5¹⁰). Mit jeder Verdünnung wurden die Zellen in 8 Wells (einer Spalte) einer 96-Well-Platte infiziert, wobei ein Inokulum von 100 µl verwendet wurde. Die 12. Spalte der Platte wurde jeweils für Mock-Lysate oder als Negativ-Kontrolle verwendet. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen mit 200 µl Erhaltungsmedium versehen. Nach einer 14tägigen Kultivierung wurden die Zellen fixiert und HAV-Antigen mit der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen (2.2.8.1).

Die Berechnung der TCID₅₀ erfolgte dann nach der Kärber-Gleichung (HAWKES, 1979 nach KÄRBER, 1931):

$$-\log TCID_{50} = \log \text{ kleinste Verdünnung} - \left[\left(\frac{\sum \text{infizierte Wells pro Verdünnung in \%}}{100} - 0,5 \right) \cdot \log \text{ Verdünnungsfaktor} \right]$$

2.2.8 Indirekte Immunfluoreszenz

2.2.8.1 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von HAV-Antigen

In infizierten Zellen wurde HAV-Antigen über die indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen.

Für den Immunfluoreszenztest wurden Zellen der zu untersuchenden Zellkulturen in 96-Well-Mikrotiterplatten kultiviert. Um die Zellen zu fixieren, wurde erst ein Volumen von eiskaltem (-20 °C), 90%igen Aceton in PBS zu dem Kulturmedium gegeben, dann wurde der Überstand

abgenommen und die Zellen jeder Kavität mit 100 µl eiskaltem, 90%igen Aceton in PBS für 20 min bei -20 °C inkubiert. Nach dem Entfernen des Acetons und zweimaligem Waschen mit je 200 µl PBS wurden die Zellen mit 50 µl einer 1:800 Verdünnung des monoklonalen IgG2A-Mausantikörpers anti-HAV 7E7 in PBS überschichtet und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden viermal gewaschen und mit 50 µl einer 1:80 Verdünnung des FITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörpers in PBS versehen, die zur Hintergrundfärbung 1 µl/ml *Evans blue* enthielt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C wurden die überschüssigen Antikörper durch viermaliges Waschen mit je 200 µl PBS entfernt. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit der Fluoreszenzmikroskopie bei Anregungswellenlängen von 450-490 nm.

2.2.8.2 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis der RNase L

Für den Nachweis einer überexprimierten RNase L in zuvor stabil oder transient transfizierten FRhK-4-Zellen wurden die, auf Chamber-Slides oder runden Deckgläschen (\varnothing : 13 mm) in 12-Well Mikrotiterplatten kultivierten Zellen, dreimal mit PBS gewaschen und dann mit einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung in PBS für 10 min bei RT fixiert. Es folgte eine Inkubation in 0,2 % Triton X-100 in PBS für 15 min bei RT zur weiteren Permeabilisierung der Zellen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Proben 1 h bei 37 °C mit einer 10%igen FCS-Lösung in PBS inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und für 1 h bei 37 °C mit dem primären Antikörper behandelt (Kaninchen-anti-RNase L, 1:80 in PBS mit 1 % FCS). Es erfolgte ein weiterer dreifacher Waschschrift mit PBS, bevor die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen, FITC-konjugiert, 1:100 in PBS mit 1 % FCS) für 45-60 min bei 37 °C durchgeführt wurde. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Eindeckmedium versehen und mit einem Deckgläschen bedeckt bzw. im Falle der Kultivierung auf Deckgläschen auf einem Objektträger platziert. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop (Anregungswellenlänge: 450-490 nm).

2.2.8.3 Paralleldetektion von RNase L und HAV durch indirekte Immunfluoreszenz

Für die Paralleldetektion von RNase L und HAV-Antigen wurden die Proben, wie unter 2.2.8.2 beschrieben, behandelt, allerdings wurde zusätzlich zu den Antikörpern für den RNase L-Nachweis die Kombination aus primärem Maus-anti-HAV- (1:600) und sekundärem *Texas Red*-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:400) eingesetzt. Für die *Texas Red*-

Visualisierung wurde eine Anregungswellenlänge von 546 nm verwendet. Ein Kombifilter mit Anregungswellenlängen von 485 und 578 nm erlaubte die simultane Betrachtung der FITC- und *Texas Red*-Signale.

2.2.9 Extraktion und Reinigung von Nukleinsäuren

2.2.9.1 RNA-Extraktion mit der AGPC-Methode

(*acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*)

(CHOMCZYNSKI UND SACCHI, 1987; modifiziert)

Bei dieser Methode werden RNasen durch die denaturierende Wirkung von Guanidiniumthiocyanat direkt während der Zell-Lyse inhibiert. Die folgende Isolierung der Gesamt-RNA beruht auf der Tatsache, dass diese sich unter sauren Bedingungen in der wässrigen Phase von einer organischen Phase aus Phenol und Chloroform abtrennen lässt. Proteine und DNA verbleiben in der organischen und der Interphase, wobei für die Löslichkeit der DNA in der organischen Phase die Verwendung von wassergesättigtem Phenol wichtig ist. Die Fällung der RNA erfolgt dann in Gegenwart monovalenter Kationen mit Isopropanol.

Maximal 10^7 Zellen wurden pro Ansatz verarbeitet und nach dem Ablösen aus den Kulturgefäßen zweimal mit PBS gewaschen und direkt lysiert oder schockgefroren und bei -80 °C zwischengelagert. Die gekühlten Zellpellets wurden zügig in 500 μl Lösung D resuspendiert und dabei lysiert. Es folgte die Zugabe von 50 μl 2 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,0), 500 μl wassergesättigtem Phenol und 100 μl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1), wobei jeweils durch Schwenken gemischt wurde. Nach 10 s starkem Schütteln wurden die Ansätze für 15 min auf Eis inkubiert und dann für 20 min bei 10 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, mit dem gleichen Volumen an Isopropanol (-20 °C) gemischt und zur Fällung der RNA für 1 h bei -80 °C inkubiert. Die Pelletierung des Präzipitates erfolgte durch eine Zentrifugation für 20 min bei 10 000 x g und 4 °C . Das Pellet wurde in 300 μl Lösung D gelöst und erneut mit dem gleichen Volumen an Isopropanol für 1 h bei -80 °C präzipitiert. Nach einer 20minütigen Zentrifugation bei 10 000 x g und 4 °C wurde das RNA-Pellet zweimal mit 75%igem Ethanol (-20 °C) gewaschen und in der *SpeedVac*-Vakuumentrifuge getrocknet. Abschließend wurde die RNA in RNase-freiem Wasser gelöst, wobei dieser Vorgang durch eine 10minütige, schüttelnde Inkubation bei 65 °C unterstützt wurde. Es folgte eine DNase-Behandlung mit angeschlossener Phenol-/Chloroform-Extraktion und eine Qualitätskontrolle der Präparation mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.11.1, 2.2.9.7, 2.2.10.2).

Für die Proben aus dem rRNA-Abbau-Assay erfolgte die Extraktion nach einem abgewandelten Protokoll. Hier stellten die 20 µl-Ansätze des Assays das Ausgangsmaterial dar, die direkt nach Ablauf ihrer Inkubationszeit mit 500 µl Lösung D* vermischt wurden. Es folgte eine Zugabe von 180 µl H₂O (ggf. mit eingesetztem RNA-Standard), 50 µl 2 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,0) und 500 µl wassergesättigtem Phenols, wobei jeweils durch Schwenken gemischt wurde. Nach der Zugabe von 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) wurden die Proben 10 s kräftig geschüttelt und für 45 min auf Eis gestellt. Durch Zentrifugation für 20 min bei 10 000 x g und 4 °C wurde die Phasentrennung verstärkt. 750 µl der oberen, wässrigen Phase wurden abgenommen und in einem neuem Reaktionsgefäß mit 750 µl eiskaltem abs. Isopropanol versetzt, gemischt und für 1 h bei -80 °C präzipitiert. Die Pelletierung erfolgte durch 20minütiges zentrifugieren bei 14 000 x g und 4 °C. Das Pellet wurde zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen, in der *SpeedVac*-Vakuumzentrifuge getrocknet und schließlich in RNase-freiem H₂O aufgenommen. Um den Lösungsvorgang zu unterstützen, wurden die Proben für 10 min bei 65 °C inkubiert und schließlich bei -80 °C gelagert.

2.2.9.2 Isolierung von poly(A)+-RNA mit dem Dynabeads® mRNA Purification Kit

Das *Dynabeads*® *mRNA Purification Kit* (Dynal Biotech, Oslo, NOR) erlaubt die Isolierung polyadenylierter mRNA über die Bindung an thyminhaltige Oligonukleotide auf der Oberfläche der *Dynabeads*. Durch ihre magnetische Eigenschaft können die *Dynabeads Oligo (dT)₂₅* während der Wasch- und Elutionsschritte mit Hilfe eines Magneten fixiert werden.

Die Prozedur wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.9.3 RNA-Extraktion mit dem RNeasy® mini Kit

RNA-Präparationen für *real-time* RT-PCR-Analysen (2.2.19) wurden mit dem *RNeasy*® *mini Kit* (Qiagen, Hilden) durchgeführt, da diese quantitativen Applikationen sehr empfindlich auf Phenolverunreinigungen reagieren. Die Methode basiert auf selektiven Bindeeigenschaften von Silica-Membranen, die es erlauben unter den gewählten Bedingungen bis zu 100 µg RNA zu binden, welche nach folgenden Waschsritten wieder mit H₂O eluiert wird. Da für die effektive Bindung Kettenlängen von mindestens 200 nt vonnöten sind, werden 5S und 5,8S rRNA- sowie tRNA-Spezies abgereichert.

Die Extraktionsprozedur folgte dem Herstellerprotokoll "Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology" aus dem *RNeasy® mini Handbook* (Qiagen, Hilden), wobei nicht mehr als 10^6 Zellen eingesetzt wurden, um eine komplette Lyse zu erlauben und die Säulen nicht zu überladen. Die RNA-Ausbeute pro Zelle erwies sich für die FRhK-4-Zellen als gleichbleibend zwischen 5×10^4 und 1×10^6 eingesetzten Zellen. In der Regel wurden Zellen in der Größenordnung von 1×10^5 pro Ansatz eingesetzt, da diese Menge eine vereinfachte Homogenisierung der mit einem Guanidiniumthiocyanat-haltigen Puffer lysierten Zellen erlaubte. Die Zellen wurden entweder direkt nach dem Ablösen aus den Kulturgefäßen und zwei Waschschrritten mit PBS verwendet oder zwischenzeitlich schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Gegebenenfalls wurde nach der Extraktion ein DNase-Verdau durchgeführt (2.2.11.1), wobei die anschließende Aufreinigung wieder über das *RNeasy® mini Kit* erfolgte.

2.2.9.4 Extraktion viraler RNA mit dem QIAamp® Viral RNA Kit

Die Extraktion viraler RNA für die *real-time* RT-PCR-Quantifizierung (2.2.19) wurde mit dem *QIAamp® Viral RNA Kit* (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Diese Methode basiert ebenfalls auf den selektiven Bindeeigenschaften von Silica-Membranen und wurde speziell für die Aufreinigung viraler RNA aus zellfreien Körperflüssigkeiten oder Zellkulturüberständen optimiert.

Die Extraktion wurde nach dem Herstellerprotokoll "Purification of viral RNA (Spin Protocol)" aus dem *QIAamp® Viral RNA Mini Handbook* (Qiagen, Hilden) durchgeführt, wobei vor der Elution der RNA eine 10minütige Zentrifugation eingefügt wurde, um eine Verschleppung von Ethanol zu minimieren und somit einen besseren Nachweis der viralen RNA zu gewährleisten.

2.2.9.5 DNA-Extraktion aus tierischen Zellen

Um DNA aus tierischen Zellen zu isolieren, wurden diese mit einem SDS-haltigen Puffer aufgeschlossen und ihre Proteinstrukturen durch Proteinase K abgebaut. Es folgten eine Phenol-/Chloroform-Extraktion und eine Ethanol-Präzipitation.

Die Zellen wurden mittels Trypsinbehandlung abgelöst und mit PBS gewaschen. Maximal 3×10^7 Zellen wurden in $300\ \mu\text{l}$ Lysepuffer resuspendiert und für 12-18 h bei 50 °C schüttelnd inkubiert. Der relativ klare und sehr viskose Zellaufschluss wurde mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und für

10 min bei 1 700 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde mit ½ Volumenteil 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung versetzt und die DNA durch Zugabe von 2 Volumenteilen Ethanol bei RT präzipitiert. Nach einer 2minütigen Zentrifugation bei 1 700 x g wurde das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Dann wurde die DNA in TE-Puffer aufgenommen und bei RT oder 65 °C schüttelnd resuspendiert. Die Kurzzeitlagerung erfolgte bei 4 °C.

2.2.9.6 DNA-Reinigung mit LMP-Agarose

Um die gewünschten Produkte der Restriktionsspaltung einer Plasmidpräparation oder eines PCR-Produktes aufzureinigen, wurden diese mit einem *low melting point*-Agarosegel elektrophoretisch isoliert und nachfolgend mit einer Phenol-Ether-Extraktion extrahiert.

Die DNA wurde auf einem 0,6%igen LMP-Agarosegel aufgetrennt (2.2.10.2) und die gewünschten DNA-Fragmente unter UV-Licht (366 nm) aus dem kurzzeitig bei 4 °C kaltgestelltem Gel ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden bei 56 °C geschmolzen und im Verhältnis 1:1 mit Aqua dest. (56 °C) verdünnt. Die gesamte Lösung wurde mit dem gleichen Volumen an TE-gesättigtem Phenol (56 °C) versetzt und für 2 min mit dem *Vortexer*-Mixer stark gemischt. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 16 000 x g wurde die obere, wässrige DNA-haltige Phase mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und für 2 min geschüttelt. Die Phasen wurden erneut während einer 2minütigen Zentrifugation bei 16 000 x g getrennt und die obere, wässrige Phase mit dem gleichen Volumen an TE-gesättigtem Phenol versehen und 2 min geschüttelt. Es erfolgte eine Zentrifugation zu den genannten Bedingungen und die obere Phase wurde weiterverwendet. Um Phenolreste zu entfernen, wurde die Probe dreimal mit wassergesättigtem Ether ausgeschüttelt. Hierzu wurde sie jeweils mit dem 2,5fachen Volumen an Ether versetzt, 2 min geschüttelt und für 2 min bei 16 000 x g zentrifugiert, wonach die obere Etherphase verworfen wurde. Am Ende wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) gemischt, mit dem 2,5fachen Volumen an Ethanol versehen und zur Fällung der DNA bei -80 °C für 30 min inkubiert. Das Präzipitat wurde durch eine Zentrifugation für 20 min bei 16 000 x g und 4 °C pelletiert, zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, daraufhin in der *SpeedVac*-Vakuumpellette getrocknet und in Aqua dest. resuspendiert.

2.2.9.7 Phenol-/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation

Mit dieser Methode können Nukleinsäuren aus einer Lösung mit störenden Proteinen extrahiert werden. Hierbei werden die Proteine durch Phenol und Chloroform denaturiert und verbleiben dann in der organischen Phase oder der Interphase zur wässrigen Nukleinsäurelösung. In der wässrigen Phase gelöstes Phenol wird dann durch Ausschütteln mit Chloroform beseitigt. Schließlich erfolgt die Fällung der Nukleinsäuren in Gegenwart monovalenter Kationen mit Ethanol.

Die Proben wurde je einmal mit 1 Volumenteil (VT) TE-gesättigtem Phenol, dann mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und schließlich mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Dabei wurde jeweils nach 2minütigem Schütteln die Phasentrennung durch Zentrifugation für 2 min bei 16 000 x g beschleunigt und die wässrige Phase weiterverarbeitet. Am Ende wurden 1/10 VT 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 2,5 VT abs. Ethanol (-20 °C) hinzugegeben und die Nukleinsäuren für 30 min bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 16 000 x g wurde das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol (-20 °C) gewaschen, in der *SpeedVac*-Vakuumentrifuge getrocknet und in RNase-freiem Wasser gelöst.

Teilweise wies derart extrahierte DNA ein verändertes Laufverhalten in der Agarosegelelektrophorese auf und migrierte wie deutlich kleinere Moleküle. Dieser Effekt erwies sich als reversibel und war durch Zugabe eines Puffers zu der DNA-Lösung neutralisierbar. Er trat nur in Folge einer Phenol-/Chloroform-Extraktion auf. SHIEH ET AL. (1998) beschreiben einen derartigen Effekt als Bromphenol Blau- und Xylene Cyanol-abhängige Denaturierung in Wasser gelöster DNA.

2.2.10 Physikalische Analyse von Nukleinsäuren

2.2.10.1 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren besitzen durch die Eigenschaften der in den Basen enthaltenen aromatischen Ringe ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Die OD_{260} der Proben wurde in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke gemessen, wobei eine $OD_{260} = 1$ einer ssRNA-Konzentration von 40 µg/ml bzw. einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml gleichgesetzt wurde.

Der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm liefert eine Aussage über die Reinheit der Präparation, da die Absorption bei 280 nm durch das Vorhandensein aromatischer Aminosäuren in Proteinen erhöht wird. Für eine reine, wässrige RNA-Lösung liegt A_{260}/A_{280} um 2,0 ($\pm 0,15$), für DNA um 1,8 (FARREL, 1998).

2.2.10.2 native Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erlaubt eine Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld ist für alle Nukleinsäuren in freier Lösung identisch, innerhalb einer Gelmatrix ergeben sich aber Mobilitätsunterschiede, die von der Molekülmasse und -form abhängig sind. Die Anfärbung erfolgte durch den in Nukleinsäuren interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid, der nach Anregung mit UV-Licht von 256 nm orange-rotes Licht (590 nm) emittiert.

Die horizontalen Agarosegele wurden in TAE-Puffer angesetzt und enthielten 0,4 µg/ml Ethidiumbromid. Die Agarosekonzentration der Gele richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren und lag zwischen 0,6 und 2 %. Bei präparativen Gelen mit niedrig schmelzender LMP-Agarose wurde diese in 0,6%iger Konzentration eingesetzt (s. 2.2.9.6). Für die Darstellung der rRNA und ihrer Abbauprodukte wurde in der Regel eine 1,6%ige Agarosekonzentration verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben zur Erhöhung ihrer Dichte mit Probenpuffer versetzt, der hierbei maximal 1:6 verdünnt wurde. Als Längenstandard wurden 5 µl eines DNA-Größenmarkers eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer bei einer maximalen Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand. Die Gele wurden auf einem UV-Transiluminator beurteilt und photographisch dokumentiert.

Für RNA-Gele wurden die Puffer mit RNase-freiem Wasser angesetzt und die Elektrophoresekammer, der Gelträger und der Kamm für 30 min mit 3%iger H₂O₂-Lösung inkubiert und mehrfach mit RNase-freiem Wasser gespült. Für die Darstellung des rRNA-Musters aus FRhK-4- und MRC-5-Zellen hatte sich in vorangegangenen Untersuchungen kein Unterschied zwischen nicht-denaturierenden Agarosegelen und denaturierenden Systemen mit Formaldehyd und Glyoxal gezeigt, wobei erstere ein deutlicheres Bild ergaben.

2.2.10.3 denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

Zur denaturierenden Auftrennung von RNA wurden 1%ige Agarosegele mit 0,6 M Formaldehyd nach FARRELL (1998) verwendet. Die Gele wurden mit MOPS-Puffer angesetzt und härteten für mindestens 30 min aus, bevor sie für 30 min in 1 x MOPS-Puffer äquilibriert wurden.

Bei einem Probenauftragsvolumen von 22 µl wurden 5,7 µl RNA-Lösung (in H₂O) mit 1 µl 10 x MOPS-Puffer, 3,3 µl Formaldehyd (37%ig, deionisiert) und 10 µl Formamid (deionisiert) zusammengegeben und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Gegebenenfalls wurden präzipitierte Proben direkt in obiger Mischung resuspendiert und dann 10 min schüttelnd bei

55 °C gelöst, bevor die Inkubation für 10 min bei 65 °C erfolgte. Nach der Denaturierung wurden die Proben auf Eis mit 2 µl 10 x Ladepuffer versehen und sofort aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in MOPS-Puffer bei max. 5 V/cm Elektrodenabstand.

Nach der Auftrennung wurde das Formaldehyd durch 30 min Waschen in mehrfach gewechseltem H₂O entfernt. Es folgte eine Anfärbung der RNA durch 30 min Inkubation in einer 0,5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung und 20 min Inkubation in H₂O. Für die Autoradiographie wurde das Gel auf 3 Lagen Whatman 3MM-Chromatographiepapier im Geltdrockner für 30 min bei RT und für 2 h bei 50 °C unter Vakuum getrocknet. Der Film wurde dem getrockneten Gel bei -80 °C ausgesetzt.

2.2.10.4 denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die elektrophoretische Auftrennung von Proben aus dem RNase L-Aktivitäts-Assay und dem Ribonuklease-Protection-Assay erfolgte über ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel in der Gegenwart von Harnstoff und mit einem formamidhaltigen Ladepuffer, was die Auftrennung nach der Größe der Nukleinsäurefragmente erlaubt.

Für den RNase L-Aktivitäts-Assay wurden Gele mit 25 % Acrylamid verwendet und die Auftrennung der Fragmente erfolgte über eine Strecke von ca. 16 cm, während für den RPA 5-8%ige Gele zum Einsatz kamen, wobei für die Auswertung Trennstrecken von 6 cm ausreichend waren. Das Verhältnis von Acrylamid zu Methylbisacrylamid betrug jeweils 19:1. Die Proben wurden mit dem Ladepuffer versehen, wobei dieser maximal 1:2 verdünnt wurde, und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Dann erfolgte der Auftrag in die frisch gespülten Taschen des 30 min äquilibrierten Gels und die Elektrophorese mit TBE als Laufpuffer bei ca. 20 V/cm und 4 °C.

Eine Färbung der Nukleinsäuren im Gel, oder einer abgetrennten Spur mit einem Längen-Marker, erfolgte durch ein 10-15minütiges Bad in einer 2 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung in H₂O, auf welches eine kurze Entfärbung in H₂O folgte.

2.2.11 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.2.11.1 DNase-Verdau

Vor dem Einsatz von RNA-Extrakten in die RT-PCR wurden diese einer DNA-Degradation mit DNase RQ1 unterzogen, um restliche DNA zu eliminieren. 43 µl wässriger RNA-Lösung aus der RNA-Extraktion (2.2.9.1) wurden mit 5 µl DNase-Puffer (10 x) und 2 µl DNase RQ1

[1 U/ μ l] für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA über eine Phenol-/Chloroform-Extraktion aufgereinigt (2.2.9.7).

Ein DNase-Verdau vor der *real-time* RT-PCR war nur für Proben nötig, welchen zwecks Überexpression mit einem, die entsprechende Zielsequenz tragendem, Plasmid transfiziert worden waren. Hierfür wurden die Eluate der *RNeasy*[®]-Extraktion (2.2.9.3) erneut auf die Säule aufgetragen und dort im Zuge einer zweiten Extraktion mit DNase I behandelt. Die Prozedur folgte dem "Optional On-Column DNase Digestion"-Protokoll des Herstellers aus dem *RNeasy*[®] *mini Handbook* (Qiagen, Hilden), wobei für 1 h mit der DNase inkubiert wurde.

Die Produkte der *in vitro*-Transkription (2.2.13) wurden einem Verdau mit der DNase I unterzogen. Hierfür wurde pro 10 μ l des *in vitro*-Transkriptionsansatzes 1 μ l DNase I [10 U/ μ l] eingesetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert.

Die Vollständigkeit der DNA-Degradation wurde jeweils durch eine Kontrolle bei der reversen Transkription (2.2.17; 2.2.19) bzw. eine elektrophoretische Auftrennung der Probe im Agarosegel überprüft (s. 2.2.10.2).

2.2.11.2 Auffüllreaktion und blunt end-Generierung mit dem Klenow-Fragment

Das Klenow-Fragment wurde verwendet, um unvollständige 3'-Enden von PCR-Produkten, die in einen Vektor inkloniert werden sollten, aufzufüllen oder um *blunt ends* nach einem Restriktionsverdau mit andersartigem Schnittmuster zu erzeugen.

Für die Auffüllreaktion von PCR-Produkten (2.2.18) wurden den 50 μ l der PCR-Reaktion 4 μ l 0,1 M MgCl₂ und 2 U Klenow-Fragment zugesetzt. Nach einer Inkubation für 20 min bei RT wurde das Enzym durch 10minütiges Erhitzen auf 75 °C inaktiviert.

Für die Behandlung geschnittener Plasmid-DNA wurde der Restriktionsansatz (2.2.11.4) mit je 20 μ M dATP, dTTP, dGTP und dCTP sowie 5 U Klenow-Fragment versehen und für 15 min bei 30 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Erhitzung auf 75 °C für 10 min. Der Abbau von 3'-Überhängen vor der *in vitro*-Transkription zur Herstellung viraler RNA erfolgte in Gegenwart von 100 μ M je dNTP und 1,5 U Klenow-Fragment pro μ g Plasmid-DNA für 20 min bei 22 °C.

2.2.11.3 Restriktions-Analyse von Plasmid-DNA

Um die Identität präparierter Plasmide nach der Miniprep und der Maxiprep zu überprüfen, wurden diese mit Restriktionsendonukleasen an geeigneten Positionen geschnitten und die

entstandenen Fragmente mit einer Agarosegelelektrophorese auf ihre Größe überprüft sowie mit dem ungeschnittenen Plasmid verglichen.

Nach der Maxiprep (2.2.12.4) wurden 500 ng Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 30 µl eines geeigneten Puffersystems mit jeweils 3 U jedes Restriktionsenzym für 2 h bei 37 °C inkubiert. Für Proben aus der Miniprep (2.2.12.3) wurden 20 µl der gewonnenen Präparation unter denselben Bedingungen eingesetzt, zudem enthielten diese Ansätze noch 4 µg RNase A. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Auftrennung im Agarosegel.

2.2.11.4 Restriktionsenzymsspaltung von Plasmiden und PCR-Produkten

Zur Restriktionsspaltung von Plasmiden wurden in der Regel 5 µg Plasmid-DNA und 30 U pro Enzym in 20-40 µl des entsprechenden 1 x Puffersystems für 2 h bei der optimalen Reaktionstemperatur (37 °C) inkubiert.

Für die Restriktionsspaltung von PCR-Produkten (2.2.18 bzw. 2.2.17) ohne vorherige Aufreinigung wurde der PCR-Ansatz mindestens 3fach mit 1 x Restriktionspuffer verdünnt und mit 1-2 U je Restriktionsenzym bei der optimalen Temperatur (37 °C) für 2-16 h inkubiert. Bei aufgereinigten PCR-Produkten wurde die DNA-Menge im Agarosegel abgeschätzt und mit ca. 10 U Enzym/µg DNA wie Plasmid-DNA geschnitten.

2.2.11.5 Dephosphorylierung von DNA-Molekülen

Um zu verhindern, dass linearisierte Plasmide in der Ligationsreaktion (2.2.11.6) rezirkularisieren oder miteinander ligiert werden, wurden die Phosphatgruppen an den 5'-Enden der Plasmid-DNA unter Verwendung einer alkalischen Phosphatase hydrolysiert.

Hierzu wurde die linearisierte DNA (5 µg in dem Restriktionsansatz) mit 1 U Alkalischer Phosphatase in 1 x Dephosphorylierungspuffer für 60 min bei 37 °C inkubiert, wobei nach 30 min ein erneuter Zusatz von 1 U Alkalischer Phosphatase erfolgte. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/5tel Volumen an 100 mM EGTA (pH 8,0) und 15minütiger Inkubation bei 65 °C abgestoppt.

2.2.11.6 Ligation von DNA-Molekülen

Die Ligation von Vektor und Insert wurde in der Regel in einem molaren Verhältnis von 1:4 durchgeführt. Bis zu 1 µg DNA wurden mit 1 U T4-DNA-Ligase und 50 ng/µl BSA in 1 x Ligationspuffer in einem Gesamtansatz von 20 µl zusammengegeben. Lagen eine oder

beide DNA-Präparationen in LMP-Agarose vor, wurden die Gelstücke erst für mindestens 10 min bei 70 °C geschmolzen und dann auf 37 °C temperiert, bis die Reagenzien zugesetzt wurden, die mindestens 50 % des Gesamtvolumens ausmachten. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 37 °C, dann wurden die Ansätze für 1 h bei RT und über Nacht bei 14 °C inkubiert. Darauf folgte eine erneute Zugabe von 1 U T4-DNA-Ligase und eine Inkubation bei 14 °C für weitere 2 h. Abschließend konnten die Ligationsprodukte in die Transformation eingesetzt werden. Wenn LMP-Agarose in den Ligationsansätzen vorlag, wurden diese zuerst bei 70 °C geschmolzen und in dem Transformationsansatz mindestens 30fach verdünnt.

2.2.12 Vermehrung und Isolierung von Plasmiden

2.2.12.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

Mit einer *E. coli*-Kolonie oder 20 µl einer Bakteriensuspension wurde eine Vorkultur in 3 ml LB⁺⁺-Medium beimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Mit 1 ml der Übernachtskultur wurde ein 100 ml LB⁺⁺-Ansatz beimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₆₆₀ von 0,40 bis 0,55 inkubiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10 min, wobei der Ansatz mehrmals geschwenkt wurde. Ab hier wurde mit gekühlten Lösungen und Geräten gearbeitet (4 °C-Raum). Mit einer Zentrifugation bei 1 400 x g für 10 min bei 4 °C wurden die Bakterien pelletiert und anschließend in 30 ml kaltem Tfb I resuspendiert. Nach 10 min auf Eis wurde erneut für 10 min zentrifugiert, das Pellet in 4 ml kaltem Tfb II resuspendiert und Aliquots dieser Suspension bei -80 °C eingefroren und gelagert.

Zur Kontrolle der Kompetenz wurden die Bakterien mit 1 pmol, 0,1 pmol und 0,01 pmol Plasmid-DNA transformiert (2.2.12.2), wobei die Präparationen 10⁶ bis 10⁷ KBE/ml enthalten sollten.

2.2.12.2 Transformation kompetenter *E. coli*

Mit dieser Methode werden Plasmide in kompetente Bakterien eingebracht, um amplifiziert und später in großer Menge wieder isoliert zu werden. Eingesetzt wurden kompetente *Escherichia coli* der Stämme HB101, C600 oder DH5α.

Die Suspension kompetenter Bakterien (2.2.12.1) wurde aufgetaut und 10 min auf Eis gestellt. Für die Transformation wurden jeweils 80 µl der Bakterien mit 15 µl der Plasmidlösung zusammengegeben, bei der es sich um Plasmidpräparationen oder Ligationsansätze handeln konnte, von denen in der Regel mehrere Verdünnungsansätze (1:10, 1:100, 1:1 000)

eingesetzt wurden. Nach einer Inkubation für 20 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C um die Plasmidaufnahme zu induzieren. Nach 2 min auf Eis wurden die Bakterien mit 320 µl LB⁺⁺-Medium versehen und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert um die Expression der plasmidkodierten Resistenz zu erlauben. Nachfolgend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert, über Nacht bei 37 °C kultiviert und in die Miniprep (2.2.12.3) eingesetzt.

In einer Abwandlung der Prozedur wurden nur 30 µl der kompetenten Bakterien mit 1 µl Plasmidlösung zusammengegeben und später mit 120 µl LB⁺⁺-Medium versehen.

2.2.12.3 Schnellpräparation bakterieller Plasmid-DNA (Miniprep)

Mit der Miniprep werden mehrere Mikrogramm Plasmid-DNA zügig aus transformierten Bakterien isoliert, um nachfolgend mit einer Restriktionsanalyse überprüft zu werden.

Einzelne, nach der Transformation (2.2.12.2) auf den antibiotikahaltigen LB-Platten gewachsene, Kolonien wurden isoliert und in je 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler, wurde 1 ml der Kultur für die Präparation in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, der Rest wurde bei 4 °C gelagert. Die Bakterien wurden für 30 s bei 6 500 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit dem *Vortexer*-Mixer vollständig in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und 5 min bei RT zur Lyse der Zellen inkubiert. Es wurden 100 µl Lösung 2 zugesetzt und nach erneutem Mischen mit dem *Vortexer*-Mixer erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 60 °C, bei der die Zell-Lyse komplettiert, Zellbestandteile denaturiert und Plasmide freigesetzt wurden. Durch Zugabe von 150 µl Lösung 3 und kurzes Mischen mit dem *Vortexer*-Mixer wurde der Ansatz neutralisiert und während einer 15minütigen Inkubation auf Eis präzipitierten denaturierte Proteine, hochmolekulare RNA und chromosomale DNA, welche dann mit dem Zelldebris in einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 16 000 x g pelletiert werden konnten. Der plasmidhaltige Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1 ml Ethanol (-20 °C) versetzt und zur Fällung der DNA 20 min bei -80 °C inkubiert. Mittels einer Zentrifugation für 20 min bei 16 000 x g wurde die DNA pelletiert, zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen (10 min bei 16 000 x g) und in der *SpeedVac*-Vakuumentrifuge getrocknet. Schließlich wurde die Plasmid-DNA in 50 µl H₂O aufgenommen und in die Restriktions-Analyse (2.2.11.3) eingesetzt.

2.2.12.4 Präparation bakterieller Plasmid-DNA (Maxiprep)

(SAMBROOK ET AL., 1989, modifiziert)

Im Zuge der Maxiprep wurden die in der Miniprep bestätigten, rekombinanten Bakterienklone im größeren Maßstab kultiviert und größere Mengen an Plasmid-DNA für folgende Experimente isoliert.

Mit 20 µl der gelagerten Miniprep-Kultur (2.2.12.3) wurde eine neue 5 ml LB-Kultur mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und rigoros schüttelnd für 8 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. 0,5-1 ml dieser frischen Kultur dienten als Inokulum für eine 500 ml LB-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotikum, die auf dem Schüttler bei 37 °C für 12-16 h kultiviert wurde. Die Bakterien wurden durch eine Zentrifugation für 20 min bei 2 500 x g und 4 °C pelletiert, als Waschschrift in 20 ml TES-Puffer resuspendiert und erneut für 10 min bei 3 200 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde in 22 ml frischem STET-Puffer aufgenommen, in 100 ml-Erlenmeyerkolben überführt und zur Lyse mit 1 ml Lysozym-Lösung versetzt und für 40 s über dem Bunsenbrenner aufgeköcht. Die entstandene Masse wurde wieder in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 45 min bei 33 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde zur Präzipitation der DNA 1:1 mit Isopropanol versetzt und für 15 min bei -80 °C inkubiert. Mit einer Zentrifugation für 60 min bei 18 500 x g und 4 °C wurde die DNA pelletiert, anschließend für 10 min im Vakuum getrocknet und in 8,7 ml 1%iger Sarkosyl-Lösung aufgenommen. In dieser Lösung wurden 9,4 g Cäsiumchlorid gelöst, dann wurde sie mit 900 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt, in Quick Seal-Zentrifugenröhrchen überführt und mit Mineralöl überschichtet. Es folgte eine isopyknische Zentrifugation für 20 h bei 263 000 x g und 20 °C. Die Plasmid-DNA-Bande, die im entstehenden Cäsiumchlorid-Gradienten von RNA und genomischer DNA separiert wurde, konnte unter UV-Licht-Kontrolle mittels einer Spritze und einer 1,2 x 50 mm-Kanüle abgezogen werden. Das gewonnene Material wurde mit Cäsiumchlorid-Lösung auf 12 ml aufgefüllt und erneut für 24 h bei 218 000 x g und 20 °C zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde erneut abgezogen und durch wiederholtes Ausschütteln mit NaCl-gesättigtem Isopropanol vom Ethidiumbromid befreit. Mit einer Dialyse gegen 5 mM Tris-Puffer über Nacht wurde das Cäsiumchlorid entfernt. Hierbei wurde der Puffer dreimal gewechselt. Es folgte eine photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Präparation (2.2.10.1) sowie eine Restriktions-Analyse (2.2.11.3) des Plasmides.

2.2.13 *in vitro*-Transkription

2.2.13.1 Herstellung eines RNA-Standards

Um einen internen Standard für Bewertungen der Abbaumuster nach dem rRNA-Abbau-Assay (s. 2.2.24.2) zu erhalten, wurde mittels *in vitro*-Transkription ein zufügbarer, 260 nt langer RNA-Standard (R260) hergestellt. Dieser ermöglicht es, durch die Extraktionsprozedur entstandene, quantitative Differenzen abzuschätzen.

Als Standard wurde ein 260 nt langes Transkript aus der 5'-NTR des Hepatitis C-Virus verwendet, welche in dem Plasmid pSP64~665nt HCV unter der Kontrolle eines SP6-Promotors steht.

Für die *in vitro*-Transkription wurde das Plasmid linearisiert. Hierzu wurden 5 µg pSP64~665nt HCV mit 20 U der Restriktions-Endonuklease *StuI* in einem Gesamtvolumen von 40 µl des entsprechenden Puffers verdaut. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei 37 °C. Im Anschluss an den Restriktionsschnitt wurden die eingebrachten Proteine mit einer Phenol-/Chloroform-Extraktion (2.2.9.7) entfernt. Es folgte die *in vitro*-Transkription, deren Ansatz im Gesamtvolumen von 50 µl Transkriptionspuffer die komplette linearisierte Plasmid-DNA (ca. 5 µg), 10 mM DTT, 40 µg/ml BSA, je 500 µM ATP, UTP, CTP und GTP, sowie 60 U RNasin und 40 U SP6-Polymerase enthielt. Die Komponenten wurden bei 37 °C zusammengefügt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein DNase-Verdau (2.2.11.1) und eine weitere Phenol-/Chloroform-Extraktion (2.2.9.7). Die Produkte wurden gelelektrophoretisch charakterisiert, photometrisch quantifiziert (2.2.10.2, 2.2.10.1) und ggf. im großen Volumen, vor der Extraktion, zu den Ansätzen des rRNA-Abbau-Assays (2.2.24.2) zugesetzt.

2.2.13.2 Synthese viraler RNA

Für die Synthese viraler Plus- und Minusstrang-RNA wurden die cDNA-tragenden Plasmide durch Restriktion mit den jeweiligen Endonukleasen linearisiert (2.2.11.4). Im Falle des Vorhandenseins von 3'-Überhängen an den Schnittstellen wurden diese durch eine Behandlung mit dem Klenow-Fragment eliminiert (2.2.11.2), um eine fehlgeleitete Transkriptionsinitiation an diesen Positionen zu verhindern (SCHENBORN UND MIERENDORF, 1985). Anschließend erfolgte eine Aufreinigung mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (2.2.9.7).

Die Synthese von HAV-Plusstrang-RNA erfolgte durch *in vitro*-Transkription von *HaeII*-linearisierter pHAV/7-DNA mit der SP6-RNA-Polymerase. HAV-Minusstrang-RNA wurde nach *NheI*-Linearisierung des Plasmides durch die T7-RNA-Polymerase synthetisiert. Die

Produktion von CVB3-Plusstrang-RNA erfolgte über eine *in vitro*-Transkription der *Clal*-linearisierten pCVB3-0-DNA mit der T7-RNA-Polymerase.

Die Ansätze der *in vitro*-Transkription enthielten 2 µg der linearisierten Plasmid-DNA, je 1 mM ATP, GTP, CTP und UTP, 20 U RNasin und 40 U der jeweiligen RNA-Polymerase in 20 µl des entsprechenden Transkriptionspuffers. Zur radioaktiven Markierung des Produktes wurden ggf. 5 µl [α -³²P] GTP (10 mCi/ml; 400 Ci/mmol) zusätzlich zu dem unmarkierten GTP eingesetzt. Nach einer Inkubation von 16 h bei 30 °C wurde die Reaktion bei 65 °C für 10 min gestoppt. Das DNA-Template wurde durch eine DNase-Behandlung (2.2.11.1) entfernt und das Produkt mittels einer kurzen Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Hierzu wurden die Ansätze mit 15 µl 5 M-Ammoniumacetat-Lösung versetzt und mit H₂O auf 150 µl aufgefüllt. Die Extraktion erfolgte durch 2minütiges Ausschütteln mit 150 µl Phenol/Chloroform (1:1) und folgend 1 Volumenteil Chloroform, wobei jeweils nach einer Zentrifugation für 2 min bei 16 000 x g und 4 °C die wässrige Phase weitergeführt wurde. Nach der Zugabe von 1 Volumenteil Isopropanol wurde die RNA für 20 min bei -20 °C präzipitiert und durch Zentrifugation für 30 min bei 16 000 x g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde zweimalig mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in RNase-freiem H₂O aufgenommen und photometrisch quantifiziert (2.2.10.1).

2.2.14 Transfektion von Plasmidvektoren

2.2.14.1 Plasmid-Transfektion mit der Calciumphosphat-Methode

Bei dieser Methode wird die zu transfizierende DNA mit Calciumchlorid versetzt und in eine phosphathaltige Pufferlösung gegeben, wobei sich feine DNA-Calciumphosphat-Kristalle ausbilden. Diese werden nach Applikation auf die Oberfläche von Zellen über Endocytose in diese aufgenommen, wobei dieser Vorgang durch einen Glycerol-Schock verstärkt wird.

Für die Transfektion wurden subkonfluent gewachsene Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen verwendet, die in der Regel einen Tag zuvor im Verhältnis 1:4 passagiert worden waren. Die Zellen wurden mit 10 ml frischem Wachstumsmedium versehen und für 2,5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für jeden Ansatz wurden 20 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA (s. 2.2.12.4) mit kaltem TE-Puffer auf 438 µl aufgefüllt, dann erfolgte die tropfenweise Zugabe von 62 µl kalter 2 M Calciumchlorid-Lösung. Dieses Gemisch wurde tropfenweise zu 500 µl kalter 2 x HBS-Lösung gegeben, wobei das Reaktionsgefäß regelmäßig angeschnipst wurde. Für die Ausbildung der Kristalle wurden die Ansätze für 15-25 min auf Eis inkubiert, bevor sie komplett schneckenförmig auf die Oberfläche des Mediums der Zellkulturen

getropft wurden. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 3,5 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Dann wurde das Medium abgenommen und die Zellen für 90 s mit 3 ml 15 % Glycerol in HBS versehen. Nach zweimaligem Waschen mit je 5 ml Erhaltungsmedium wurden die Zellen mit 10 ml Wachstumsmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.14.2 Plasmid-Transfektion mit jetPEI

Das Transfektionsreagenz jetPEI (Qbiogene, Carlsbad, USA) stellt ein kationisches Polymer (Polyethylenimin) dar, welches über die negativen Ladungen der Plasmid-DNA mit dieser komplexiert. Die positive Nettoladung dieser Komplexe ermöglicht die Interaktion mit negativ geladenen Proteoglykanen auf der Zelloberfläche und eine folgende Endocytose. Polyethylenimin ist in der Lage den endosomalen pH zu puffern und die DNA vor der Degradation durch pH-abhängig aktivierte DNasen zu schützen. Durch den kontinuierlichen Protoneneinstrom induzierte, osmotische Schwellung führt zu der Ruptur der Endosomen und somit zur Freisetzung der Plasmid-DNA in das Cytoplasma.

Um eine optimale Ratio von 5 positiven Stickstoffladungen des Imins pro Phosphatgruppe der DNA zu erreichen, wurden pro 1 µg DNA 2 µl jetPEI-Reagenz eingesetzt. Die zu transfizierenden Zellen wurden in der Regel am Tag vor der Transfektion passagiert um eine Konfluenz von 60-80 % zu erhalten. Für 6-Well-Platten wurden 2×10^5 Zellen pro Well eingesät. Pro Ansatz wurden 5 µl jetPEI in 100 µl einer 150 mM NaCl-Lösung gelöst, in einem Schritt in eine vorbereitete Lösung von 2,5 µg Plasmid-DNA (s. 2.2.12.4) in 100 µl 150 mM NaCl-Lösung gegeben und nach Mischung für 20 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 ml frischem Wachstumsmedium pro Well versehen und die 200 µl des Transfektionsmixes wurden über die Oberfläche verteilt auf das Medium getropft. Nach sorgfältigem Schwenken der Ansätze wurden diese über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und das Medium wurde am nächsten Tag durch Erhaltungsmedium ersetzt. Bei der Transfektion von MRC-5- und HFS-10-Zellen erfolgte ein Austausch des Mediums bereits nach 4 h.

Wurden Zellen in 6 cm-Schalen transfiziert, kamen 5 µg Plasmid-DNA und 10 µl jetPEI zum Einsatz, die jeweils in 250 µl 150 mM NaCl-Lösung gelöst waren. Die 500 µl des Transfektionsmixes wurden dann auf 4,5 ml Wachstumsmedium gegeben.

Bei Experimenten mit Luciferase-Reporterkonstrukten stellten diese nur einen Teil der einzusetzenden Menge an Plasmid-DNA dar, der Rest wurde mit pI.18 aufgefüllt, um das Protokoll nicht zu variieren und eine Basis für mögliche, anzuschließende Experimente mit Expressionsvektoren zu bieten.

2.2.14.3 Stabile Transfektion von Expressionsvektoren

Um stabil mit den RNase L-Expressionsvektoren transfizierte Zellen zu etablieren, wurden diese im Fall der pI.18-Konstrukte zusätzlich mit dem Plasmid pSV2neo cotransfiziert, welches eine Neomycin-Resistenz vermittelt. Für die stabile Transfektion mit den pcDNA3.1-Abkömmlingen oder den siRNA-Expressionsplasmiden war dies nicht nötig, da diese selbst über ein Neomycin-Resistenzgen verfügen. Die transfizierten Zellen wurden einem Selektionsdruck unterworfen, indem das Antibiotikum Geneticin (G418) zugesetzt wurde, welches die Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen hemmt. Das Neomycin-Resistenzgen codiert für eine Aminoglycosid-Phosphotransferase, welche Geneticin durch Phosphorylierung inhibiert. Somit konnten transfizierte Zellen selektiert werden, während nichttransfizierte abstarben.

Die Transfektion der FRhK-4-Zellen erfolgte nach der Calciumphosphat-Methode (2.2.14.1) oder mit jetPEI (2.2.14.2), wobei ggf. 5-10 % der Gesamt-Plasmid-DNA von dem cotransfizierten pSV2neo stammten. 48 h nach der Transfektion wurde mit der Selektion begonnen, indem dem Kulturmedium 600 µg/ml G418 zugesetzt wurden. Diese Konzentration war als letale Dosis für FRhK-4-Zellen ermittelt worden. Nach dem Absterben nicht transfizierter Zellen erfolgten mehrere Passagen und es wurde entweder eine stabil transfizierte Population etabliert oder die Zellen wurden durch Umsetzen mit hohem Split-Verhältnis in 10 cm-Schalen vereinzelt, so dass stabil transfizierte Zell-Klone isoliert werden konnten.

Stabil transfizierte FRhK-4-Zellen wurden kontinuierlich in Gegenwart von 600 µg/ml G418 kultiviert, wobei jeweils vor Beginn der Experimente auf den Einsatz des Selektionsantibiotikums verzichtet wurde.

2.2.15 Transfektion von poly(IC)

2.2.15.1 poly(IC)-Transfektion zur Aktivierung von Promotorkonstrukten

Diese Methode wurde zur Kontrolle der ISG20- und MxA-Reportergenkonstrukte verwendet, aber auch um die Expression der MxA-mRNA zu induzieren.

Um poly(IC) zu transfizieren wurde die DEAE-Dextran-Methode angewandt, hierbei bilden sich poly(IC)/DEAE-Dextran-Komplexe, die wegen der Diethylaminoethyl-Reste über eine positive Nettoladung verfügen und nach Anlagerung an die Zelloberfläche endocytiert werden können.

Für die Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit dem Mix versehen, der aus 20 µg/ml poly(IC) und 100 µg/ml DEAE-Dextran in DMEM ohne FCS bestand. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Erhaltungsmedium weiterkultiviert. Entsprechende Kontrollen ohne poly(IC) und lediglich mit DMEM wurden mitgeführt.

Für 6 cm-Schalen wurden 2 ml Transfektionsmix eingesetzt, 6-Well-Platten erhielten 1 ml pro Well.

2.2.15.2 poly(IC)-Transfektion zur Aktivierung des OAS/RNase L-Weges

(nach BRACK, 1999)

Um die direkte Aktivierung der konstitutiv vorliegenden Komponenten des 2',5'-Oligoadenylatsynthetase/RNase L-Weges darzustellen, wurden FRhK-4-Zellen mit poly(IC) transfiziert und direkt nach der 30minütigen Transfektionsprozedur aufgearbeitet, um die Integrität der rRNA zu überprüfen.

Konfluente, in 6 cm-Schalen kultivierte FRhK-4-Zellen wurden mit TS-Lösung gewaschen und mit 500 µl Inokulum aus 100 µg poly(IC) und 250 µg DEAE-Dextran in TS-Lösung versehen, die auf den Zellrasen getropft wurden. Es folgte eine 30minütige Inkubation bei RT mit gelegentlichem Schwenken der Kulturschalen. Nach dreifachem Waschen der Zellen mit HBSS wurden diese in 1 ml PBS mit einem Zellschaber abgeschabt und in einem Mikroreaktionsgefäß durch Zentrifugation pelletiert. Es folgte eine RNA-Extraktion nach der AGPC-Methode (2.2.9.1) und eine elektrophoretische Auftrennung von 5 µg der RNA in einem 1,6%igen Agarosegel (2.2.10.2) zur Darstellung der rRNA und ihrer Degradationsprodukte.

2.2.16 Konstruktion eines siRNA-Expressionssystems

In eine Zelle eingebrachte, kurze dsRNA-Moleküle können die Expression eines korrespondierenden Gens runterregulieren. Diese RNA-Moleküle werden als siRNA (*small interfering RNA*) bezeichnet. Sie werden in RISC-Komplexe (*RNA-induced silencing complex*) integriert und vermitteln die Erkennung komplementärer RNA-Moleküle, die daraufhin gespalten und abgebaut werden, was in dem Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) resultiert. Alternativ zu der direkten Transfektion von siRNAs können diese auch plasmidcodiert in die Zelle eingebracht werden. Dies hat Vorteile in der Handhabung und ist kosteneffizienter. Außerdem können so stabil transfizierte Zell-Linien etabliert werden.

Das verwendete System basiert auf dem siRNA-Expressionsvektor pRNA-CMV3.1/Neo (GenScript, Piscataway, New Jersey, USA). Zwischen einer *Bam*HI- und einer *Hind*III-Schnittstelle wird ein ca. 66 bp DNA-Insert eingefügt, welches die siRNA-Kassette darstellt. Die Expression derselben steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Nach der Transfektion wird die siRNA-Kassette durch die RNA-Polymerase II transkribiert und eine kurze hairpin-RNA gebildet, wobei der selbstkomplementäre, doppelsträngige Bereich von ca. 21 bp die sequenzspezifische Information beinhaltet und mit einem ca. 10 nt messendem Loop verbunden ist. Es kommt zur Prozessierung der RNA, wobei die typische siRNA-Form entsteht, welche dann im RISC-Komplex die Degradation von mRNA-Spezies mit komplementären Sequenzen vermitteln kann.

Da die Effizienz einer spezifischen siRNA sehr variabel sein kann, wurden drei siRNA-Kassetten erstellt, die eine Downregulation der RNase L-Expression ermöglichen sollten, sowie eine Kontroll-Kassette mit einer Nonsens-Sequenz. Für die Auswahl der Zielsequenzen und die Generierung der Kassetten wurden die von GenScript unter <https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai#.html> zur Verfügung gestellten Software-Lösungen *siRNA Target Finder* und *siRNA Construct Builder* herangezogen (WANG UND MU, 2004). Der hier verwendete Algorithmus für das siRNA-Design bewertet unter anderem die thermodynamischen Eigenschaften, den GC-Gehalt, Sekundärstrukturen und Komplexität der Zielsequenz, außerdem ist ein Abgleich mit anderen Transkripten möglich. Die in antisense und sense orientierten 21 nt langen Zielsequenzen wurden mit einem *Loop*-Bereich verbunden und mit den Schnittstellen-Sequenzen versehen, so dass sich eine 66 bp siRNA-Kassette ergab (s. Tab. 4 unter 2.1.5.2).

PAGE-gereinigte Sense- und Antisense-ssDNA-Oligonukleotide wurden in der Form erworben, dass sie nach dem Annealing das dsDNA-Insert der siRNA-Kassette mit *sticky ends* ergaben. Für die Hybridisierung der Oligonukleotide wurden je 1 µg des Sense- und des Antisense-Stranges in 20 µl 1 x SSC für 10 min auf 95 °C erhitzt und dann im ausgeschalteten Thermoblock passiv auf RT abgekühlt. Es folgte 1 h Inkubation bei RT und die Zugabe von 30 µl TE-Puffer. Die Insertion erfolgte in den Vektor pRNAII, da pRNA-CMV3.1/Neo auf Grund schlechter Präparierbarkeit eine hohe Rate an Re-Liganten lieferte. pRNAII wurde mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten (2.2.11.4), in einem LMP-Agarosegel aufgereinigt und aus diesem extrahiert (2.2.9.6). Eine Dephosphorylierung des Vektors wurde nicht durchgeführt, da synthetisch hergestellte Oligonukleotide nicht über Phosphatgruppen an den 5'-Enden verfügen und eine Ligation somit nicht möglich wäre. Die Ligation des Vektors mit den verschiedenen siRNA-Kassetten erfolgte wie unter 2.2.11.6 angegeben, wobei das molare

Verhältnis von Vektor zu Insert 1:3 betrug. Es folgte die Transformation in kompetente *E. coli*, eine Überprüfung gepickter Klone nach der Miniprep und schließlich die Vervielfältigung der Plasmide in der Maxiprep (2.2.12.2, 2.2.12.3, 2.2.12.4). Durch die plasmidvermittelte Neomycinresistenz konnte nach Transfektion der Plasmide in FRhK-4-Zellen mit G418 selektiert werden.

2.2.17 RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion mit vorgeschalteter reversen Transkription erlaubt den Nachweis von RNA bzw. die Vervielfältigung der enthaltenen Sequenzinformation auf DNA-Ebene. Zuerst wird die Ziel-RNA durch die Reverse Transkriptase in cDNA transkribiert, darauf folgt, mit der PCR-Reaktion, die Amplifikation der cDNA.

Als Template wurde Material einer RNA-Extraktion (2.2.9.1) eingesetzt, welches einem DNase-Verdau mit nachfolgender Phenol-/Chloroform-Extraktion (2.2.11.1, 2.2.9.7) unterzogen worden war. Gegebenenfalls wurde auch eine Isolierung polyadenylierter RNA-Spezies vorgenommen (2.2.9.2). 0,5-2 µg Gesamt-RNA oder 100 ng poly(A)⁺-RNA wurden zusammen mit 30 pmol des entsprechenden Antisense-Primers bzw. des RT-Primers für 10 min bei 65 °C denaturiert und dann sofort auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl ExpandTM Reverse Transkriptase-Puffer mit 10 mM DTT, je 1 mM dATP, dTTP, dGTP und dCTP versehen und nach Zugabe von 5 U ExpandTM Reverse Transkriptase für 45 min bei 42 °C inkubiert. Von dem Produkt der reversen Transkription wurden 5 µl in die PCR (2.2.18) eingesetzt.

Als Kontrolle der Präparation und der eingesetzten RNA-Mengen wurden β-Aktin-RT-PCRs mitgeführt. Mit einer RT-Kontrolle ohne RNA-abhängige DNA-Polymerase wurde der Erfolg des DNase-Verdaus überprüft. Der Hauptansatz und die Kontrollen wurden immer aus derselben Probenverdünnung angesetzt.

2.2.18 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde verwendet, um DNA oder, aus der reversen Transkription stammende, cDNA zu amplifizieren und ggf. mit modifizierten Enden zu versehen.

100-500 ng DNA (s. 2.2.9.5 bzw. 2.2.12.4) oder 5 µl des Produkts einer reversen Transkription (2.2.17) wurden in die PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl *Taq*-Puffer je 30 pmol Sense- und Antisense-Primer, 200 µM

dATP, dTTP, dGTP und dCTP sowie 1 U *Taq*-Polymerase. Die Zeiten und Temperaturen für Denaturierung, Annealing und Extension sind in Tab. 5 aufgeführt. Im Anschluss an die PCR erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Produkte im Agarosegel (2.2.10.2).

Um der Bildung unspezifischer Produkte entgegenzuwirken, wurde für den Nachweis der OAS2-mRNA eine *Touchdown*-PCR mit zyklenabhängiger Erniedrigung der Annealingtemperatur durchgeführt, deren Parameter in Tab. 5 zu finden sind. Zudem wurde für beide OAS-mRNA-Nachweise die *HotMasterTM Taq DNA-Polymerase* (Eppendorf, Hamburg) mit dem zugehörigen Reaktionspuffer verwendet.

Für die, ebenfalls in Tab. 5 aufgeführten, RNase L- und β -Aktin-mRNA-Nachweise mit variiertes Zyklenzahl wurden in den entsprechenden Zyklen, am Ende der Extensionsphase, je 5 μ l entnommen, mit 1 μ l Probenauftragspuffer versehen und bis zur elektrophoretischen Auftrennung auf Eis gelagert.

Die fortlaufende Produktion von Sondentemplates für den RPA (2.2.20.1) wurde über Re-PCR-Ansätze realisiert, bei denen das Produkt vorangegangener PCR-Reaktionen als Template für neue Reaktionen zu den gleichen Bedingungen verwendet wurde.

Tab. 5: Übersicht über verwendete Temperaturprogramme für die PCR. Die eingesetzten Primer sind in Tab. 1 bzw. Tab. 3 unter 2.1.5.1 zu finden.

| Beschreibung | Temperaturprogramm der PCR |
|--|---|
| β -Aktin-mRNA-Nachweis (Einsatz von 0,5-1 μ g RNA in die RT-Reaktion) | 2' 95 °C; 30 x (1' 95 °C; 2' 60 °C; 3' 72 °C); 10' 72 °C |
| MxA-mRNA-Nachweis (Einsatz von 1 μ g RNA in die RT-Reaktion) | 2' 95 °C; 35 x (1' 95 °C; 2' 59 °C; 3' 72 °C); 10' 72 °C |
| OAS1-mRNA-Nachweis (Einsatz von 2 μ g RNA in die RT-Reaktion) | 2' 94 °C; 35 x (20" 94 °C; 10" 60 °C; 30" 65 °C); 5' 65 °C |
| OAS2-mRNA-Nachweis (Einsatz von 2 μ g RNA in die RT-Reaktion; <i>Touchdown</i> -PCR mit zyklenabhängiger Erniedrigung der Annealingtemperatur) | 2' 94 °C; 35 x (20" 94 °C; 10" T _A ; 30" 65 °C); 5' 65 °C T _A = 5 x 65; 5 x 62; 15 x 60; 5 x 57; 5 x 54 °C |
| RNase L-mRNA-Nachweis (Einsatz von 2 μ g RNA in die RT-Reaktion) | 2' 95 °C; 35 x (1' 95 °C; 2' 58 °C; 3' 72 °C); 10' 72 °C |
| murine RNase L-mRNA-Nachweis (Einsatz von 2 μ g RNA in die RT-Reaktion) | 2' 95 °C; 35 x (1' 95 °C; 2' 50 °C; 3' 72 °C); 10' 72 °C |
| β -Aktin-mRNA-Nachweis mit variiertes Zyklenzahl (Einsatz von 500 ng RNA in die RT-Reaktion) | 2' 95 °C; 11-19 x (1' 95 °C; 2' 60 °C; 3' 72 °C); 10' 72 °C |
| RNase L-mRNA-Nachweis mit variiertes Zyklenzahl (Einsatz von 1 μ g RNA in die RT-Reaktion) | 2' 95 °C; 25-33 x (1' 95 °C; 2' 58 °C; 3' 72 °C); 10' 72 °C |
| RNase L-cDNA-Modifikationen für Insertion in pl.18 (Einsatz von 200 ng ZC-5.1 in die PCR) | 2' 95 °C; 20 x (1' 95 °C; 2' 60 °C; 3' 68 °C); 10' 68 °C |
| RPA-Sondentemplate-Synthesen (Einsatz von 2 μ g RNA in die RT-Reaktion oder 5 μ l PCR-Produkt direkt in die Re-PCR) | 2' 95 °C; 30 x (1' 95 °C; 2' 55 °C; 3' 72 °C); 10' 72 °C |

2.2.19 real-time RT-PCR

Während die konventionelle PCR eine Endpunkt-Methode darstellt, wird bei der *real-time* PCR die Zunahme des PCR-Produktes über die gesamte Reaktionsdauer gemessen. Hierzu kann ein in die DNA interkalierender Farbstoff, wie Ethidiumbromid oder SYBR Green, verwendet werden, der durch Fluoreszenzanstieg einen unspezifischen Nachweis der Zunahme von Produkt-DNA führt. Die Möglichkeit einer spezifischen Detektion des Ziel-Produktes liefern Systeme mit sequenzspezifischen, Fluorochrom-markierten Sonden, die den *Fluorescence resonance energy transfer* (FRET)-Prozess ausnutzen. Das für diese Arbeit verwendete System basiert auf Oligonukleotid-Sonden, die am 5'-Ende mit dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff FAM und am 3'-Ende mit dem Quencher-Molekül TAMRA gekoppelt sind. Die Sonden binden innerhalb der, von den Primern definierten, Produktsequenz und werden im Zuge der Elongations-Phase durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase abgebaut. Die hierbei entstehende räumliche Trennung von Reporter-Fluorochrom und Quencher resultiert in einem Anstieg der Reporter-Fluoreszenz. Die Messung des Reaktionsverlaufes in Echtzeit erlaubt es, durch Verwendung von Daten aus der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion, quantitative Aussagen zu treffen. Die relative Quantifizierung erfolgt über den Vergleich mit den Daten einer mitgeführten Verdünnungsreihe eines Standards der jeweiligen Zielsequenz. Zusätzlich erfolgt eine Normalisierung mit den gemessenen Werten eines Referenz-Ziels, z.B. dem Transkript eines *housekeeping*-Gens.

Die *real-time* RT-PCR zum quantitativen Nachweis von RNase L- und RLI-mRNA wurde im Zuge ihrer Dissertation von Christina Röser bei der QIAGEN Hamburg GmbH (ehemals artus GmbH) etabliert (RÖSER, 2007). Christina Röser führte auch die entsprechenden *real-time* PCR-Analysen durch, deren Ergebnisse hier dargestellt werden. Dazu führte sie mit RNA-Extrakten (2.2.9.3) unter der Verwendung von *Random Hexamer* Primern eine Reverse Transkription durch und setzte die so gewonnene cDNA in die *real-time* PCR ein. Die RNase L- und RLI-mRNA-Daten wurden auf die ebenfalls quantifizierte GAPDH-mRNA oder 18S rRNA normalisiert. Da keine absolut quantitativ definierten Standards verwendet wurden, verfügen die Ergebnisdaten über relative Einheiten (RE), die sich zwar innerhalb eines Analyseansatzes vergleichen lassen, aber keine direkten molekularen Bezüge darstellen. Die *real-time* PCR-basierte Quantifizierung der HAV-RNA wurde mit Extraktionen viraler RNA (2.2.9.4) und dem *RealArtTM HAV LC RT PCR Kit* (Qiagen Hamburg) von Alke Heitmann oder Christina Röser bei der QIAGEN Hamburg GmbH durchgeführt.

2.2.20 Ribonuclease Protection Assay

(PREDIGER, 2001, modifiziert)

Der *Ribonuclease Protection Assay* (RPA) eignet sich zum quantitativen Nachweis zellulärer RNA-Spezies. Er basiert auf der Hybridisierung der zellulären Ziel-RNA mit einer radioaktiv markierten RNA-Sonde komplementärer Sequenz und einer folgenden enzymatischen Hydrolyse einzelsträngiger RNA. Die durch Bindung der Zielsequenz vor dem Abbau geschützten Sonden werden schließlich in einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Durch die direkte Hybridisierung in Lösung und das Wegfallen von Transferschritten weist der RPA gegenüber dem Northern Blot eine deutliche Sensitivitätssteigerung auf und eignet sich somit besonders für die Detektion von Transkripten mit niedriger Abundanz.

2.2.20.1 RPA-Sondensynthese

Die Templates für die Sondensynthese wurden mittels einer RT-PCR mit RNA aus FRhK-4-Zellen hergestellt, wobei die Produkte mit einer SP6-Promotor-Sequenz versehen wurden. Es wurden Sonden zum Nachweis von RNase L-, RLI- und β -Aktin-Transkripten hergestellt. Die hierfür verwendeten Primer wiesen eine 20 bzw. 21 nt lange zielkomplementäre Sequenz auf, die am 5'-Ende von dem SP6-Promotor (re-Primer) bzw. einer 23 nt langen Nonsens-Sequenz (fw-Primer) flankiert wurde (s. Tab. 3 unter 2.1.5.1). Die 5'-Enden bildeten jeweils weitere 6 nt mit Schnittstellen-Sequenzen. Somit konnten die Produkte der RT-PCR als *in vitro*-Transkriptions-Template für die Synthese von, zu der jeweiligen Ziel-mRNA komplementären, Antisense-Sonden dienen. Für das Primerdesign wurden humane bzw. murine cDNA-Sequenzen der β -Aktin-, RNase L- und RLI-Gene verwendet (GenBank/EMBL-Accession-Nr.: NM_001101; NM_021133; U90446), da noch keine Sequenzdaten für *Macaca mulatta* vorlagen.

Die Produkte der RT-PCR (2.2.17), bzw. durch eine Re-PCR (2.2.18) gewonnenes Material, wurden als Templates für die Sondensynthese in eine *in vitro*-Transkription eingesetzt, bei der die Transkripte radioaktiv markiert wurden. Der Transkriptionsansatz wurde bei Raumtemperatur mit auf 37 °C vorgewärmten Puffer angesetzt. Er enthielt in 20 μ l Transkriptionspuffer ca. 0,2 μ g Sondentemplate (3-6 μ l PCR-Produkt), je 500 μ M ATP, UTP, CTP, 20 U RNasin, 20 U SP6-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) und 5 μ l [α -³²P]GTP [3 000 Ci/mmol, 10 mCi/ml]. Für die Synthese der β -Aktin-Sonde wurden zusätzlich noch 50 μ M GTP eingesetzt um ihre spezifische Aktivität zu senken. Die Verwendung von

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ erwies sich als deutlicher Vorteil gegenüber dem Einsatz von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$, da die SP6-Polymerase unempfindlicher auf limitiertes GTP reagierte und sich somit die Ausbeute an *full length*-Transkript verbesserte. Diese konnte durch ein Absenken der Reaktionstemperatur auf 30 °C noch weiter optimiert werden. Die Reaktionsansätze wurden für 1 h bei 30 °C inkubiert, dann mit 2 μl Stopp-Lösung versehen und für 5 min auf 65 °C erhitzt. Es folgte die Zugabe von 80 μl 2,5 M Ammoniumacetat- und 5 μl 20 mg/ml Glycogen-Lösung. Nach dem Mischen wurden 250 μl abs. Ethanol (-20°C) zugegeben und die Nukleinsäuren bei -20 °C für 30 min präzipitiert. Nach einer 30minütigen Zentrifugation bei 16 000 x g und 4 °C wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und lufttrocknen gelassen. Für den Abbau des DNA-Templates wurde das Pellet in 20 μl Transkriptionspuffer gelöst und mit 2 U DNase RQ1 für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden mit 22 μl Ladepuffer versetzt und über ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel (16 x 20 x 0,1 cm) elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.10.4). Die Spur des mitgelaufenen Größenmarkers wurde abgetrennt, in einem Ethidiumbromid-Bad für 15 min gefärbt und danach kurz in Wasser diskriminiert. Währenddessen wurde das Gel autoradiographisch dargestellt, wobei eine Belichtungszeit zwischen 20 s und 1 min ausreichte. Mit Hilfe des Films und des Größenmarkers wurden die gewünschten Banden der *full length*-Transkripte im Gel lokalisiert und ausgeschnitten. Die Gelfragmente wurden zerkleinert, in Mikroreaktionsgefäße überführt und mit 350 μl Elutionspuffer versehen über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Durch eine Zentrifugation für 2 min bei 16 000 x g und 4 °C wurden die Gelfragmente abgetrennt und der Überstand mit der markierten RPA-Sonde direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert. Ein Aliquot der Sonden-Präparation wurde zur Aktivitätsbestimmung unter Verwendung der Szintillationsflüssigkeit OptiPhase Supermix im Lumineszenz-Counter vermessen. Je nach Sonde konnten zwischen 10 % und 70 % der eingesetzten Radioaktivität im PAGE-gereinigten *full length*-Produkt wiedergefunden werden.

2.2.20.2 RP-Assay

Für den RPA-Ansatz wurden 10-30 μg DNA-freier RNA aus konfluent gewachsenen FRhK-4-Zellen eingesetzt (2.2.9.1, 2.2.11.1). Die zelluläre RNA wurde zusammen mit je 8×10^4 cpm pro markierter Sonde zusammengegeben und mit H₂O auf 20 μl aufgefüllt. Die verwendeten Sonden für RNase L-, RLI- und β -Aktin-mRNA wurden einzeln überprüft, aber im Versuchsansatz gemeinsam eingesetzt. Sonden- und zelluläre RNA wurden durch Zugabe von 80 μl 2,5 M Ammoniumacetat-Lösung und 250 μl abs. Ethanol (-20 °C) für 30 min bei

-20 °C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 16 000 x g und 4 °C pelletiert und für 5 bis 10 min luftgetrocknet. Es erfolgte eine Resuspendierung in 20 µl Hybridisierungspuffer, ein Erhitzen auf 94 °C für 4 min und eine Inkubation bei 45 °C über Nacht. Die hybridisierten Proben wurden mit 200 µl RNase-Gebrauchslösung mit RNase A und RNase T1 versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert (es zeigte sich allerdings, dass ein Verzicht auf die RNase A zu einem saubereren Ergebnis führen kann). Kontrollansätze ohne RNase-Zusatz wurden nur mit RNase-Verdau-Puffer versehen. Es folgte der Zusatz von 20 µl Proteinase K-Gebrauchslösung und eine 15minütige Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurden die Proben mit 250 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versehen und für 2 min mit dem Vortexer stark gemischt. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 16 000 x g wurde die obere, wässrige Phase in einem neuen Mikroreaktionsgefäß mit 5 µl 20 mg/ml Glycogen-Lösung versehen und mit 625 µl abs. Ethanol bei -20 °C für 30 min präzipitiert. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei 16 000 x g und 4 °C wurde das Pellet luftgetrocknet und dann in Ladepuffer aufgenommen. Es folgte eine PAGE-Auftrennung in einem 5-8%igen, denaturierenden Gel (2.2.10.4). Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf ein Filterpapier transferiert und für 2 h im Gelrockner bei 85 °C getrocknet, worauf eine Visualisierung der markierten Sonden mittels Autoradiographie erfolgte.

2.2.21 Quantifizierung von Protein nach Bradford

Der Bradford-Assay beruht auf Verschiebung des Absorptionsmaximums des Säurefarbstoffs Coomassie-Brillantblau von 465 zu 595 nm in Gegenwart von Proteinen und im sauren Milieu.

Es wurden je 5 µl Probenverdünnung mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt und nach genau 15 min photometrisch vermessen. Zur Bestimmung des Leerwerts diente ein Ansatz mit NP-40-Lysepuffer. Der Proteingehalt wurde über eine mit BSA (bovines Serumalbumin; in NP-40-Lysepuffer) erstellte Eichgerade ermittelt. Die Proben wurden derart verdünnt, dass ihre Konzentrationen im linearen Bereich (unter 2 mg/ml) lagen.

2.2.22 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Für den Nachweis der RNase L wurden die zellulären Proteine zuerst über eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese, in der Gegenwart von SDS, nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend erfolgte das Western Blotting, bei dem die

Proteine über einen Elektrobplot von dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert wurden, auf der mit spezifischen Antikörpern ein Nachweis der RNase L erfolgen sollte.

Die Zell-Lysate wurden unter Verwendung des NP-40-Lysepuffers, wie unter 2.2.24.2 beschrieben, hergestellt, wobei dem Lysepuffer noch ein *Protease Inhibitor Cocktail* (Roche Diagnostics, Mannheim) zugesetzt wurde. Alternativ wurden die Zellen analog mit RIPA-Puffer lysiert. Es wurden jeweils 50 bis 200 µg Protein im Verhältnis 1:6 mit Protein-Probenpuffer versetzt, zweimal für 1 min mit Ultraschall behandelt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Dann erfolgte die Auftrennung mit der SDS-PAGE über ein 3%iges Sammelgel und ein 10%iges Trenngel in Elektrophoresepuffer bei 80 V.

Nach dem Lauf wurde das Gel je 30 min in Renaturierungspuffer und Blottingpuffer geschwenkt. Der Proteintransfer auf eine, ebenfalls 30 min in Blottingpuffer äquilibrierte, Nitrocellulosemembran wurde mittels Elektrobplot für 2 h bei 4 °C und 1,5-2 A durchgeführt.

Es folgte eine Inkubation der Membran in 5%igem Trockenmagermilchpulver in TBST für 4 h zur Blockierung. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C schwenkend mit dem primären Antikörper (Kaninchen-anti-RNase L 1:1 000 in TBST mit 5 % Trockenmagermilchpulver) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit TBST bei RT erfolgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten sekundären Antikörper (Kuh-anti-Kaninchen-HRP 1:400 in TBST mit 5 % Trockenmagermilchpulver) für 5 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit TBST bei RT erfolgte die Detektion mit dem ECL Detection Reagent (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey, USA). Die Membran wurde für 1 min mit dem ECL-Reagenz beschickt und nachfolgend, in einer Klarsichtfolie eingeschlagen, mit einem *Biomax*-Film (Kodak, Stuttgart) versehen. Durch die Peroxidase-vermittelte Chemielumineszenz-Reaktion kommt es zur Schwärzung des Films und zum Nachweis des gebundenen sekundären Antikörpers. Über einen mitgeführten Protein-Marker konnte die Größe detektierter Banden zugeordnet werden.

2.2.23 Luciferase-Assay

Mit dem Luciferase Assay System (Promega, Mannheim) wurde die Reporter-Aktivität in Zellen mit entsprechenden Luciferase-Reportergen-Konstrukten detektiert. Hierzu wurden Lysate der Zellen mit Luciferin versehen, welches der Luciferase als Substrat dient und bei dessen Umsetzung es zur Emission von Licht kommt, welches luminometrisch gemessen wurde.

Die zu untersuchenden Zellen wurden mittels Freeze & Thaw-Lyse aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellkulturen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dann mit TEN-Puffer für

15 min auf Eis inkubiert. Hierbei wurden 0,5 ml pro Well einer 6-Well-Platten bzw. 1 ml für eine 6 cm-Schale verwendet. Nach dem Erwärmen auf RT für ca. 5 min wurden die Zellen abgespült und suspendiert. Mit einer Zentrifugation für 1 min bei 16 000 x g wurden die Zellen pelletiert und in kalter 250 mM Tris-HCl-Lösung resuspendiert. Hier wurden 30-50 µl für 6-Well-Ansätze und 100 µl für 6 cm-Schalen eingesetzt. Es folgte ein dreimaliges Einfrieren und Auftauen bei -80 °C in kaltem Ethanol bzw. 37 °C im Thermoblock. Die Zelltrümmer wurden für 5 min bei 16 000 x g abzentrifugiert und der Überstand bei -80 °C gelagert. Nach einer Proteinquantifizierung (2.2.21) konnte eine definierte Menge in den Luciferase-Assay eingesetzt werden.

Für den Luciferase-Assay wurde Zell-Lysat mit 20 µg Protein eingesetzt und mit 1 x CCLR-Lösung auf 20 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von je 100 µl Luciferase-Substrat im Abstand von 10 s zwischen den Proben wurden die *luminescence counts per second* (LCPS) nach 2 min in 10 s Intervallen mit dem Trilux 1450 MicroBeta Luminometer vermessen. Die Werte wurden um die LCPS einer Blindprobe ohne Zell-Lysat korrigiert.

2.2.24 Nachweise der RNase L-Aktivität

2.2.24.1 Synthese und Aufreinigung von 2',5'-Oligoadenylaten

(MINKS *ET AL.*, 1979b, modifiziert)

Um 2',5'-Oligoadenylate als Aktivator für die RNase L zu erhalten, wurden diese in Extrakten von HeLa-Zellen synthetisiert und anschließend über Säulenchromatographie aufgereinigt. Hierfür wurde in subkonfluent gewachsenen HeLa-Zellkulturen die Expression der 2',5'-Oligoadenylatsynthetase durch Induktion mit Interferon-β erhöht. In Extrakten dieser Zellen wurde die OAS durch synthetische dsRNA aktiviert, um aus ATP 2',5'-verknüpfte Oligoadenylate zu synthetisieren. MINKS *ET AL.* (1979b) beschreiben, dass mit dieser Methode unter den gewählten Bedingungen innerhalb von 2 h millimolare Mengen von 2',5'-Oligoadenylaten entstehen, wobei das Produkt ein Gemisch verschiedener Kettenlängen mit unterschiedlichem Phosphorylierungsstatus darstellt. Das molare Verhältnis von Trimeren, Tetra-, Penta- und Hexameren wird mit 25:13:4:1 beschrieben. Die Halbwertszeit von 2-5A in HeLa-Zellextrakten ist mit 2 min (30 °C) sehr kurz, die Oligoadenylate können allerdings, wie hier geschehen, durch hohe ATP-Konzentrationen und Fructose-1,6-Diphosphat deutlich stabilisiert werden (MINKS *ET AL.*, 1979c). Auf die Synthese folgte eine säulenchromatographische Aufreinigung der 2-5A mit dem schwachen Anionenaustauscher DEAE, bei der ATP und schwächer geladene Nukleotide entfernt wurden.

Subkonfluent gewachsene HeLa-Zellen wurden für 17 h mit 200 IE/ml IFN- β in Erhaltungsmedium inkubiert. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und dreimal mit PBS gewaschen. 1 Volumen Zellen wurde in 2 Volumen OAS-Lysepuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Mit einem Dounce Homogenisator wurden die Zellen auf Eis lysiert und die Zelltrümmer für 10 min bei 14 000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80 °C eingefroren und gelagert.

5 μ l dieses Zellextraktes wurden mit 20 μ l OA-Synthesepuffer versetzt und somit mit 120 mM Kaliumacetat, 25 mM Magnesiumacetat, 20 mM HEPES (pH 7,4), 4 mM Fructose-1,6-Diphosphat, 1 mM DTT, 5 mM ATP und 10 μ g/ml poly(IC) im Gesamtansatz für 2 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, bei dem kein poly(IC) zugesetzt wurde und somit eine zusätzliche Aktivierung der OAS ausblieb. Die Synthese wurde durch 3minütige Inkubation bei 95 °C gestoppt.

Für die Aufreinigung der 2-5A-Syntheseprodukte wurde die DEAE-Cellulose nach Herstellerangaben vorbereitet, äquilibriert und mit 7 mm Schichthöhe in Glassäulen mit 5 mm Durchmesser gepackt. Die Syntheseansätze wurden mit Waschpuffer auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und für 2 min bei 1 000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden je zweimal über eine DEAE-Cellulose-Säule gegeben, die daraufhin mit 25 ml Waschpuffer (90 mM KCl in HEPES; pH 7,4) gespült wurde. Die Elution der 2-5A erfolgte mit 2 ml Elutionspuffer (350 mM KCl in HEPES; pH 7,4). Der Kontrollansatz wurde über eine separate Säule aufgereinigt. Das 2-5A-Eluat und das Kontroll-Eluat wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.24.2 rRNA-Abbau-Assay zur Bestimmung der RNase L-Aktivität

(PLAYER *ET AL.*, 1998, modifiziert)

Mit Hilfe dieses Tests soll die Aktivierbarkeit der RNase L in einem bestimmten Zellextrakt untersucht werden. Die Lysate der zu untersuchenden Zellen dienen als Quelle für die RNase L sowie ihr Substrat. Hemmende und aktivierende Faktoren, wie der RNase L-Inhibitor und 2-5A, werden ebenfalls aus den Zell-Lysaten in den Test mit eingebracht. Es folgt eine Inkubation der Proben, mit oder ohne exogene RNase L-Aktivatoren, und eine Aufbereitung der als Substrat dienenden rRNA bis zu ihrer Visualisierung im Agarosegel. Vergleiche der Abbaumuster induzierter und nicht induzierter Ansätze erlauben Aussagen über die Aktivierbarkeit der RNase L in dem jeweiligen System. Als RNase L-Aktivator wurde das 2-5A-Produkt der unter 2.2.16 beschriebenen Synthese verwendet.

Für den rRNA-Abbau-Assay wurden in der Regel konfluent gewachsene Zellkulturen verwendet. Die zu untersuchenden Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde auf Eis mit dem 1,5fachen Volumen an NP-40-Lysepuffer durch moderates Pipettieren vermischt und für 5 min inkubiert. Es folgten zwei Zentrifugationsschritte, bei denen der Überstand jeweils für 10 min bei 10 000 x g und 4 °C geklärt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Schließlich wurde die Probe aliquotiert, schockgefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Ein Aliquot wurde jeweils für eine Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt.

Pro Ansatz wurden 200 µg Protein eingesetzt, die in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 10 mM HEPES (pH 7,5), 100 mM KCl, 5 mM Magnesiumacetat, 1 mM ATP und 14 mM 2-Mercaptoethanol, sowie einer Verdünnung des RNase L-Aktivators bei 30 °C für 15 bis 120 min inkubiert wurden. Als Aktivator wurde das 2-5A-Eluat in Endverdünnungen von 1:10 bis 1:1 000 verwendet, um die RNase L maximal zu aktivieren. Nach der Zugabe wurde die Inkubationszeit sofort gestartet. Als Kontrollen wurden Ansätze mit dem Kontroll-Eluat (s. 2.2.16) mitgeführt.

Direkt nach Ablauf der Inkubation wurden die Ansätze auf Eis gestellt und die RNA extrahiert. Hierbei wurde das Volumen der Proben nach Guanidiniumthiocyanat-Zugabe mit H₂O um 180 µl erhöht. Bei diesem Schritt wurde ggf. auch der R260-Standard zugegeben (s. 2.2.13.1), um eine konstante Bezugsgröße in der Proben-RNA zu erhalten, deren Komponenten komplett durch den Abbau beeinflusst wurden. Nach der Extraktion wurde die RNA photometrisch quantifiziert und schließlich in einem 1,6%igen Agarosegel aufgetrennt und dokumentiert, wobei nicht über 2,5 µg RNA eingesetzt wurden um Sättigungsphänomenen bei der Darstellung vorzubeugen (2.2.10.1, 2.2.10.2).

2.2.24.3 RNase L-Aktivitäts-Assay mit ³²P-markiertem Substrat

Mit diesem Test sollte, im Gegensatz zu dem rRNA-Abbau-Assay (s. 2.2.24.2), eine Aussage über die RNase L-Aktivität in Zell-Lysaten nicht über ein internes, sondern über ein zugesetztes Substrat ermöglicht werden. Hierfür wurde ein ³²P-markiertes, 20 nt langes RNA-Oligonukleotid der Sequenz C₁₁UUC₇ verwendet. Da die RNase L eine Präferenz für Schnitte auf der 3'-Seite von 5'UpNp3'-Motiven aufweist und nicht in der Lage ist, poly(C) zu degradieren, erzeugt ein Abbau dieses Substrates durch rekombinante, gereinigte RNase L die Produkte C₁₁UU und C₇ sowie deutlich geringere Mengen von C₁₁U und UC₇ (CARROLL ET AL., 1996).

Für die Markierung des RNA-Substrates wurde das γ -Phosphat von [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP mittels der T4 Polynukleotidkinase an das 5'-Hydroxyende des Oligonukleodides transferiert (*forward kinasing reaction*). Hierfür wurden 10 pmol des Oligonukleodides mit 20 pmol [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (6 000 Ci/mmol) und 5 U T4 Polynukleotidkinase in einem Gesamtvolumen von 50 μl 1 x T4 PNK-Reaktionspuffer zusammengegeben. Vor der Zugabe des Enzyms wurde dieses jeweils nach Herstellerangaben mit dem zugehörigen Verdünnungspuffer 1:60 vorverdünnt. Die Kinasereaktion erfolgte während einer 30minütigen Inkubation bei 37 °C, gefolgt von der Termination der Reaktion für 5 min bei 65 °C. Für eine grobe Aufreinigung der Oligonukleotide wurde der Reaktionsansatz mit 5 μl 3 M Natriumacetatlösung versetzt und dann nach Zugabe von 165 μl abs. Ethanol für 30 min bei -20 °C zur Fällung inkubiert. Die Verwendung von Ammoniumacetat als Quelle monovalenter Kationen, welches die Copräzipitation der freien Nukleotide reduzieren sollte, brachte hier keinen Vorteil. Nach Zentrifugation für 20 min bei 12 000 x g wurde das Pellet je einmal mit 80%igem und 95%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in RNase-freiem Wasser gelöst. Für die Aktivitätsbestimmung wurden mehrere Verdünnungen des markierten Substrates 1:1 mit der Szintillationsflüssigkeit OptiPhase Supermix versetzt und im Lumineszenz-Counter vermessen. Bis zu 15 % der in die Kinasereaktion eingesetzten Radioaktivität konnten nach der Fällung wieder gefunden werden.

Um eine Größenordnung von Abbauprodukten des markierten Substrates zu ermöglichen, wurde ein Aliquot desselben durch alkalische Hydrolyse fragmentiert und so ein Längen-Marker generiert. Hierfür wurde ein Teil des Substrates (mit z.B. 4×10^5 cpm) mit H_2O auf 20 μl aufgefüllt und 1:1 mit 200 mM Natriumcarbonat-Lösung (pH 9,0) versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 85 °C für 30 min und ggf. eine Lagerung bei -20 °C.

Die Herstellung der Zell-Lysate erfolgte wie für den rRNA-Abbau-Assay (2.2.24.2) angegeben, auch der Reaktionsansatz erfolgte analog zu diesem. Es wurde jeweils Zell-Lysat mit 200 μg Protein eingesetzt und in einem Endvolumen von 20 μl mit 10 mM Hepes (pH 7,5), 100 mM KCl, 5 mM Magnesiumacetat, 1 mM ATP und 14 mM 2-Mercaptoethanol, dem Zusatz von ^{32}P -markiertem RNase L-Substrat mit 2×10^5 cpm, sowie des RNase L-Aktivators bei 30 °C inkubiert. Als Aktivator kamen die 2-5A-Eluate bzw. die Kontroll-Eluate (2.2.24.1) in 1:10-Endverdünnungen zum Einsatz, wobei die Inkubation sofort nach deren Zugabe gestartet wurde. Diese Menge an Aktivator stellt einen Überschuss dar, der Einsatz in einer 1:20-Endverdünnung hatte keine verminderte Aktivierung zur Folge. Alternativ wurde der Ansatz mit Aktivator, aber ohne Substrat vorher für 30 min auf Eis präinkubiert und nach Substratzugabe gestartet. Zu unterschiedlichen Zeiten (z.B.: 0, 10,

30 min) wurden je 5 µl aus den Ansätzen entnommen, zu 5-10 µl denaturierendem Ladepuffer gegeben und bei -20 °C eingefroren. Die Auftrennung der Proben erfolgte elektrophoretisch über ein 25%iges denaturierendes Polyacrylamid-Gel (2.2.10.4). Nach dem Lauf wurde das Gel auf ein Filterpapier transferiert und für 2 h im Gelrockner bei 85 °C getrocknet. Hiernach erfolgte eine Autoradiographie (15 min bis 2 h) zur Darstellung des markierten RNase L-Substrats und seiner Fragmente. Die Zuordnung der Degradationsprodukte konnte mit dem fragmentierten Substrat als Größenmarker erfolgen.

2.2.25 RNA-Degradation in HeLa-Extrakten

Die Untersuchung der Degradation viraler RNA im Kontext eines aktivierten OAS/RNase L-Systems sowie der Aktivierung dieses Systems durch die Gegenwart von HAV-RNA wurde in Zellextrakten durchgeführt. HeLa S10-Extrakte dienten hierbei als Quelle der Komponenten des OAS/RNase L-Systems, welches in diesen Extrakten durch die Zugabe von poly(IC) aktivierbar ist.

Die Herstellung der HeLa S10-Extrakten erfolgte angelehnt an die von BARTON ET AL. (1996) beschriebene Methodik. HeLa-Zellen wurden 20 h vor der Aufarbeitung 1:2 passagiert und nach 3 h mit 200 IE/ml IFN-β behandelt, um die Hochregulation der Komponenten des OAS/RNase L-Systems zu induzieren. Die Zellen wurden mittels Trypsinbehandlung abgelöst, durch Zentrifugation für 5 min bei 300 x g pelletiert und mit isotonischem Puffer gewaschen. Ab hier erfolgten alle Schritte auf Eis. Das Zellpellet wurde in dem 1,5fachen Volumen an hypotonem Puffer resuspendiert, gemischt und zum Quellen für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Aufschluss der Zellen durch 25 Streiche des Dounce-Homogenisators. Das Homogenat wurde mit 1/10tel Volumen 10 x S10-Puffer versetzt und durch eine Zentrifugation für 10 min mit 800 x g bei 4 °C von den Zellkernen befreit. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min mit 10 000 x g bei 4 °C wurde der Überstand als HeLa S10-Extrakt aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Die Experimente zu Reaktion und Wirkung des OAS/RNase L-Systems in HeLa S10-Extrakten auf virale RNA wurden angelehnt an HAN UND BARTON (2002) und WASHENBERGER ET AL. (2007) durchgeführt. Die verwendeten 30 µl-Reaktionsansätze enthielten 20 µl HeLa S10-Extrakt, 1 mM ATP, 60 mM KCH₃CO₂, 15,5 mM HEPES (pH 7,4) sowie 0-8 µg/ml poly(IC) und 0-125 µg/ml virale RNA (2.2.13.2). Die Ansätze wurden bei 30 °C für 2 h inkubiert und durch die Zugabe von 170 µl SDS-Puffer terminiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (2.2.9.7) und eine elektrophoretische Auftrennung in einem Formaldehyd-Agarosegel (2.2.10.3).

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der ISG20- und MxA-Promotoraktivität im Kontext einer HAV-Infektion

Im Zuge dieser Arbeit wurden mit den antiviralen Proteinen ISG20 und MxA zwei Kandidaten für eine potentielle regulative Beeinflussung der HAV-Replikation betrachtet. Für beide Proteine wurde eine direkte, interferonunabhängige Expressionsinduktion durch virale Infektionen oder dsRNA beschrieben, und sie waren auf Grund ihrer Promotorstrukturen, besonders im Kontext der HAV-induzierten NF- κ B-Aktivierung, von Interesse.

Um eine mögliche HAV-induzierte Expressionssteigerung darzustellen, die eine nivellierende Wirkung auf die HAV-Replikation haben könnte, wurden Luciferase-Reporterkonstrukte mit den entsprechenden Promotoren verwendet. Als Kontrolle der Induzierbarkeit der verwendeten Reporterkonstrukte wurde eine poly(IC)-Transfektion gewählt, da die verwendeten FRhK-4-Zellen nicht normal auf Interferon reagieren (BRACK, 1999), und die synthetische dsRNA dem potentiellen viralen Induktor am nächsten kommt.

3.1.1 HAV-Infektion zeigt keine Auswirkung auf die Aktivität des ISG20-Promotors

Um zu untersuchen, ob eine HAV-Infektion eine Steigerung der ISG20-Promotoraktivität zur Folge hat, wurde das Plasmidkonstrukt pGL3p460 verwendet. Dieses Plasmid trägt ein Luciferase-Gen unter der Kontrolle des humanen ISG20-Promotors und wurde in Mock- und HAV-infizierte FRhK-4-Zellen eingebracht (2.2.6; 2.2.14.2), in denen folgend die Luciferase-Aktivität bestimmt wurde (2.2.23). Als Kontrolle wurde die Induzierbarkeit des Reportergenkonstruktes durch eine poly(IC)-Transfektion (2.2.15.1) überprüft.

Der ISG20-Promotor, dessen Aktivität durch die poly(IC)-Transfektion gesteigert werden konnte, wurde nicht signifikant durch eine HAV-Infektion beeinflusst (Abb. 12). Dieses Ergebnis wird durch die Resultate der Diplomarbeit von FLACH (2005) gestützt.

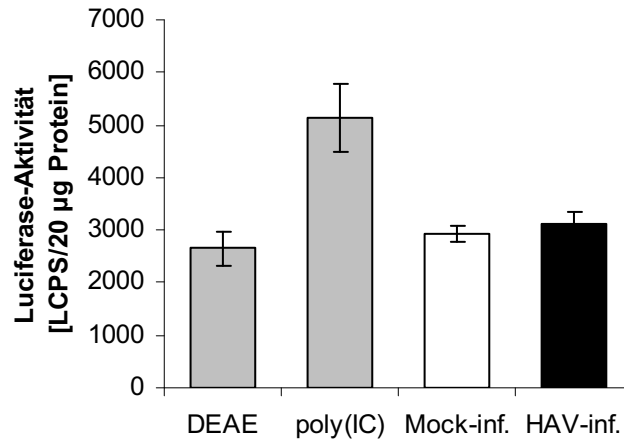


Abb. 12: Aktivität des ISG20-Promotors in HAV-infizierten FRhK-4-Zellen. Mock- bzw. HAV/7-infizierte FRhK-4-Zellen wurden 10 Tage p.i. in 6-Well-Platten umgesetzt und nach einem Tag jetPEI-vermittelt mit 0,6 µg pGL3p460 transfiziert. 24 h später erfolgte ein Mediumwechsel oder eine poly(IC)-Transfektion (20 µg/ml in 100 µg/ml DEAE-Dextran) bzw. eine Kontrolltransfektion ohne poly(IC) (DEAE). Nach weiteren 18 h wurden die Zellen lysiert und die Aktivität des Luciferase-Reporters im Luciferase-Assay analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung. Die poly(IC)-transfizierten Ansätze weisen eine gesteigerte Reporteraktivität auf, während kein Unterschied zwischen Mock- und HAV-infizierten Ansätzen festzustellen ist.

3.1.2 Aktivität des humanen MxA-Promotors in HAV-infizierten FRhK-4-Zellen supprimiert

Eine potentielle Steigerung der Aktivität des MxA-Promotors im Zuge einer HAV-Infektion wurde mit dem Reportergenkonstrukt pGL3-MxA-P untersucht. Bei diesem Plasmid steht das Luciferase-Gen unter der Kontrolle des humanen MxA-Promotors. Das Konstrukt wurde in HAV- und Mock-infizierte FRhK-4-Zellen eingebracht und auf seine Luciferase-Expression untersucht.

Nach einer poly(IC)-Transfektion war eine leichte Steigerung der MxA-Promotoraktivität zu beobachten, während eine HAV-Infektion überraschenderweise zu einer Reduktion führte, die sich regelmäßig im Bereich von 50 % der Werte der Mock-Ansätze bewegte (Abb. 13). Um auszuschließen, dass es sich hierbei um einen generellen Effekt der HAV-Infektion handelt, wurde ein Kontrollvektor hergestellt, dessen Luciferase-Gen der Kontrolle des konstitutiv aktiven SV40-Promotors unterliegt. Die Luciferase-Expression dieses pGL3-SV40-P-Konstruktes erwies sich als nicht durch eine HAV-Infektion beeinflusst (Abb. 13). Hierbei lagen die Werte der Luciferase-Aktivität nicht viel höher als die des pGL3-MxA-P-Konstruktes in den nicht infizierten Zellen und deuten somit auf eine hohe basale Aktivität des MxA-Promotors in FRhK-4-Zellen hin.

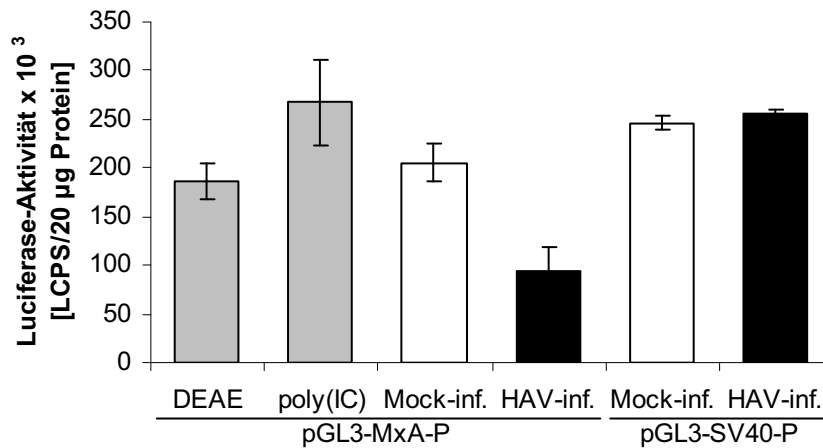


Abb. 13: Aktivität des MxA-Promotors in HAV-infizierten FRhK-4-Zellen. Mock- bzw. HAV/7-infizierte FRhK-4-Zellen wurden 10 Tage p.i. in 6-Well-Platten umgesetzt und einen Tag später jetPEI-vermittelt mit 0,5 µg pGL3-MxA-P oder pGL3-SV40-P transfiziert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel oder eine poly(IC)-Transfektion (20 µg/ml in 100 µg/ml DEAE-Dextran) bzw. eine Kontrolltransfektion ohne poly(IC) (DEAE). Nach weiteren 18 h wurden die Zellen lysiert und die Aktivität des Luciferase-Reporters im Luciferase-Assay analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit Standardabweichung. Die Reporteraktivität des pGL3-MxA-P-Konstruktes ist in poly(IC)-transfizierten Ansätzen leicht gesteigert, während HAV-infizierte Ansätze gegenüber Mock-infizierten Ansätzen eine deutliche Erniedrigung aufweisen. In pGL3-SV40-P-transfizierten Mock- bzw. HAV-infizierten Zellen liegt hingegen kein Unterschied der Reporteraktivität vor.

3.1.3 Keine Beeinflussung der Aktivität des MxA-Promotors in HFS-10-Zellen durch HAV

Für den humanen MxA-Promotor wurde ein Repressorelement beschrieben, über welches das MxA-Gen aktiv reprimiert wird (CHANG ET AL., 1992). Möglicherweise liegen die entsprechenden Faktoren in den FRhK-4-Zellen nicht vor, so dass es durch eine fehlende Negativregulation zu der überraschend hohen basalen Aktivität des humanen Promotors in den Rhesusaffenzellen kam und es sich hier um ein zellspezifisches Phänomen handelt. Daher wurden die Versuche mit humanen MRC-5-Zellen wiederholt. Allerdings erwies sich die Transfektionseffizienz als zu gering, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. So wurden humane HFS-10-Zellen verwendet.

In den HFS-10-Zellen war keine Reduktion der MxA-Promotor-kontrollierten Luciferase-Expression durch eine HAV-Infektion zu detektieren. Zudem bestand ein deutlicher Unterschied zwischen der basalen Aktivität des MxA-Promotors und der konstitutiven Aktivität des SV40-Promotors (Abb. 14).

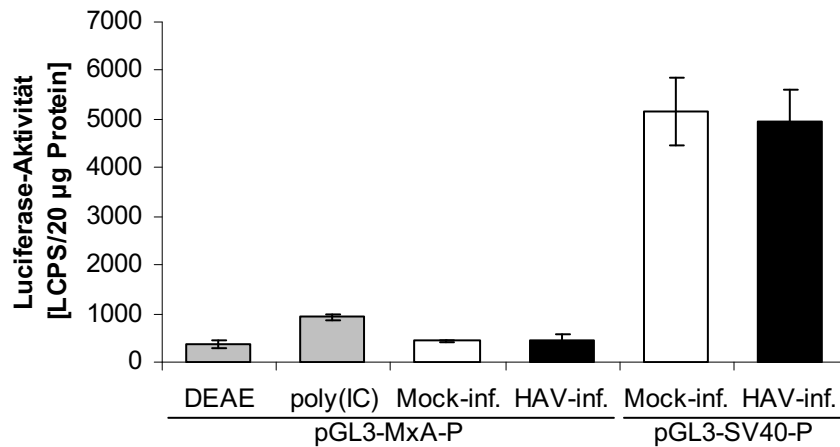


Abb. 14: Aktivität des MxA-Promotors in HAV-infizierten HFS-10-Zellen. Mock- bzw. HAV/7-infizierte HFS-10-Zellen wurden 10 Tage p.i. in 6 cm-Schalen umgesetzt und einen Tag später jetPEI-vermittelt mit 0,5 µg pGL3-MxA-P oder pGL3-SV40-P transfiziert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel oder eine poly(IC)-Transfektion (20 µg/ml in 100 µg/ml DEAE-Dextran) bzw. eine Kontrolltransfektion ohne poly(IC) (DEAE). Nach weiteren 18 h wurden die Zellen lysiert und die Aktivität des Luciferase-Reporters im Luciferase-Assay analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit Standardabweichung. Die Reporterogenaktivität des pGL3-MxA-P-Konstruktes ist in poly(IC)-transfizierten Ansätzen gesteigert. Zwischen Mock- und HAV-infizierten Ansätzen bestehen weder für pGL3-MxA-P- noch pGL3-SV40-P-Konstrukte Unterschiede in der Reporterogenaktivität.

3.1.4 HAV-Infektion hat keinen Effekt auf die MxA-mRNA-Expression in FRhK-4- und MRC-5-Zellen

Ein RT-PCR-basierter Nachweis der MxA-mRNA (2.2.17) in FRhK-4- und MRC-5-Zellen wurde mit Primern durchgeführt, die für die humane MxA-cDNA spezifisch waren (GenBank/EMBL-Accession-Nr.: NM_002462).

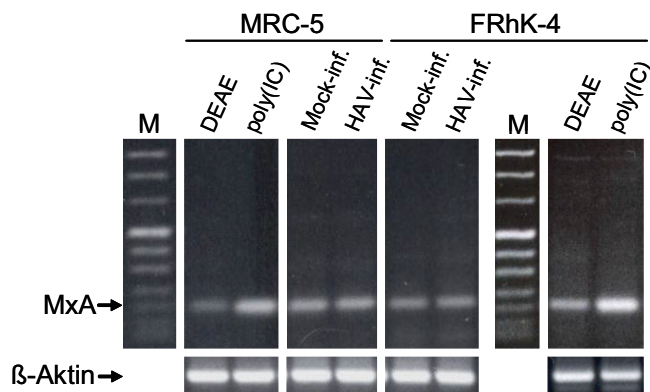


Abb. 15: RT-PCR-basierter Nachweis der MxA-mRNA in HAV-infizierten und poly(IC)-transfizierten Zellen. Mock- bzw. HAV GBM-infizierte MRC-5-Zellen und Mock- bzw. HAV/7-infizierte FRhK-4-Zellen wurden 10 Tage p.i. passagiert und drei Tage später einer RNA-Extraktion unterzogen. Einige der Mock-infizierten Ansätze wurden 6,5 h vor der Extraktion mit einer poly(IC)-Transfektion (20 µg/ml in 100 µg/ml DEAE-Dextran) bzw. einer Kontrolltransfektion ohne poly(IC) (DEAE) behandelt. Von der extrahierten, DNA-freien RNA wurden 1 µg für den MxA-mRNA- und 0,5 µg für den β-Aktin-mRNA-Nachweis in eine RT-PCR eingesetzt. In allen Zellen konnte MxA-mRNA nachgewiesen werden, wobei kein Unterschied zwischen HAV- und Mock-infizierten Ansätzen ersichtlich ist. Eine Steigerung der MxA-mRNA-Expression durch die poly(IC)-Transfektion ist in MRC-5- und FRhK-4-Zellen deutlich sichtbar. Die negativen H₂O- und RT-freien Kontrollen sind nicht abgebildet. (M: "124 bp"-Marker)

Das Zielfragment war in beiden Zelltypen amplifizierbar. Der Test lieferte keinen Hinweis auf eine veränderte Expression bei HAV-infizierten Zellen. Die Expression der MxA-mRNA war in beiden Zelltypen deutlich durch eine poly(IC)-Transfektion hochregulierbar (Abb. 15).

3.2 Nachweis der basalen Expression und Funktionalität des 2',5'-Oligoadenylatsynthetasesystems in FRhK-4-Zellen

3.2.1 OAS in FRhK-4-Zellen auf mRNA-Ebene ohne Induktion nachweisbar

Da die Gegenwart der 2',5'-Oligoadenylatsynthetase für die Funktionalität der RNase L als aktivierbare RNase essentiell ist, sollte die basale Expression der OAS in FRhK-4-Zellen dargestellt werden. Nur die OAS-Formen OAS1 und OAS2 sind in der Lage 2-5A mit Aktivierungspotential für die RNase L zu synthetisieren, deshalb wurde auf einen Nachweis der OAS3 verzichtet.

Bei den experimentell verwendeten FRhK-4-Zellen handelt es sich um Nierenzellen fetaler Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), für die zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch keine 2',5'-Oligoadenylatsynthetase-Sequenzen vorlagen. Um Primer für den Nachweis von OAS-spezifischen Transkripten zu generieren, wurden daher die vorliegenden cDNA-Sequenzen der humanen Transkriptvarianten des OAS1-Gens (GenBank/EMBL-Accession-Nr.: NM_016816, NM_002534, NM_001032409) sowie des OAS2-Gens (NM_016817, NM_002535, NM_001032731) verwendet. Die Nukleotide 1-1144 der OAS1-Transkriptvarianten sind für alle Transkripte identisch, bei der OAS2 gilt dies für die ersten 589 nt. Diese Bereiche wurden mittels einer BLAST-Analyse mit der vorliegenden, noch nicht annotierten Sequenz-Datenbank des Rhesus Monkey Genome Projects (Mmul_051212) verglichen, welches im Human Genome Sequencing Center am Baylor College of Medicine durchgeführt wird (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/rmacaque>). Die BLAST-Suche resultierte in mehreren 200-300 nt langen *Alignments* mit ca. 95%iger Übereinstimmung zwischen den humanen Sequenzen und denen des *Macaca mulatta*-Genoms. Innerhalb dieser Sequenzen wurden Primer positioniert, die es erlauben sollten, die Transkripte des OAS1- bzw. des OAS2-Gens sowohl in humanen als auch in Makaken-Zellen nachzuweisen.

Aus konfluent gewachsenen FRhK-4-Zellen wurde mit der AGPC-Methode die Gesamt-RNA extrahiert (2.2.9.1) und nach einem DNase-Verdau (2.2.11.1) in die RT-PCR eingesetzt. OAS1-spezifische mRNA konnte nicht nachgewiesen werden, wobei die Reaktion bei diversen *Annealing*-Temperaturen einen Schmier unspezifischer Produkte lieferte (Abb. 16). Auch der Nachweis der OAS2-Transkripte lieferte unspezifische Banden, die allerdings durch

die Verwendung eines *Touchdown*-Protokolls für die PCR (2.2.18) minimiert werden konnten. Hier zeigte sich deutlich ein PCR-Produkt der erwarteten Länge. Um die Spezifität dieses Produktes vor dem Hintergrund der unspezifischen Banden zu überprüfen, wurde ein Restriktionsverdau mit *Pst*I durchgeführt (2.2.11.4), welcher das korrekte, 235 bp lange Produkt in zwei Fragmente (144 und 91 bp) spalten sollte. Die Restriktion mit *Pst*I war erfolgreich und somit konnte die basale Expression von OAS2-mRNA in FRhK-4-Zellen dargestellt werden (Abb. 16).

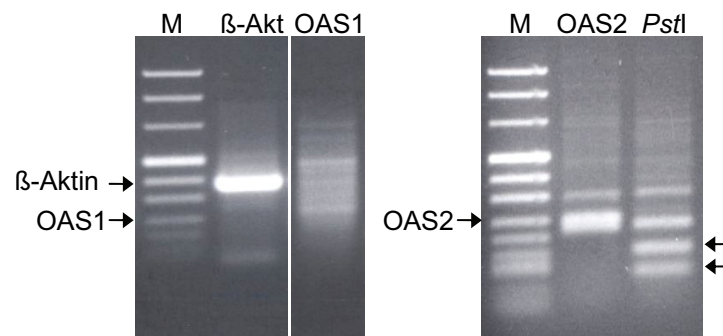


Abb. 16: RT-PCR zum Nachweis von basal vorliegender OAS-mRNA in FRhK-4-Zellen. Je 2 µg DNA-freier RNA aus konfluent gewachsenen FRhK-4-Zellen wurden zum Nachweis von OAS1- und OAS2-Transkripten in eine RT-PCR eingesetzt. Für die β-Aktin-Kontrolle wurde 1 µg RNA verwendet. Die OAS1-Primern erzeugten keine spezifische Produktbande (OAS1), während der Nachweis der OAS2-mRNA positiv war. Es wurde eine Doppelbande auf der Höhe des spezifischen Produkts (235 bp) und eine weitere unspezifische Bande bei 320 bp nachgewiesen (OAS2). Durch einen positiven Restriktionsverdau mit *Pst*I, bei dem das spezifische Produkt in ein 144 bp- und ein 91 bp-Fragment geschnitten wurde (*Pfeile*), konnte seine Authentizität gesichert werden (*Pst*I). Ein Verdau des OAS1-Produktes mit den in der Zielsequenz schneidenden Restriktionsenzymen *Hinc*II und *Pst*I ergab keine Veränderung des Musters. Die negativen H₂O-Kontrollen sowie die negativen Ansätze ohne Reverse Transkriptase sind nicht dargestellt. (*M*: "124 bp"-Marker, *β-Akt*: β-Aktin-Nachweis)

3.2.2 Poly(IC)-Induktion resultiert in sofortiger Aktivierung der rRNA-Degradation in FRhK-4-Zellen

Es sollte dargestellt werden, dass die basale, nicht induzierte Expression der Komponenten des 2',5'-Oligoadenylsynthetase/RNase L-Systems in FRhK-4-Zellen ausreicht, um eine Reaktion auf dsRNA zu erlauben. Hierfür wurde die Degradation der ribosomalen RNA, wie sie im Zuge einer generalisierten RNase L-Aktivierung vorkommt, als Aktivitätsmarker herangezogen. FRhK-4-Zellen wurden mit poly(IC) transfiziert und sofort aufgearbeitet (2.2.15.2). Die Gesamt-RNA wurde mit der AGPC-Methode extrahiert und elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt. Direkt im Anschluss an die 30minütige Transfektionsprozedur war ein neu auftretendes RNA-Fragment unterhalb der 18S rRNA-Bande im Agarosegel zu erkennen (Abb. 17). Dieses Degradationsprodukt der ribosomalen RNA kann als indirekter Nachweis einer RNase L-Aktivierung herangezogen werden und somit zeigen,

dass die RNase L sowie die 2',5'-Oligoadenylatsynthetase in ausreichenden Mengen in FRhK-4-Zellen vorliegen, um unabhängig von einer Interferoninduktion zu einer Reaktion auf dsRNA in der Lage zu sein. Das durch die Transfektion synthetischer dsRNA-Analoga induzierte Bandenmuster gleicht zudem jenem aus HAV-infizierten Zellen (Abb. 17), in denen der Weg über dsRNA-Replikationsintermediate aktiviert werden dürfte.

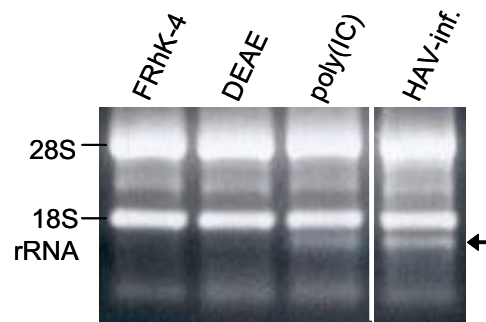


Abb. 17: Aktivierung des basal vorliegenden OAS/RNase L-Systems durch poly(IC)-Transfektion. Konfluente FRhK-4-Zellen wurden mit 100 µg poly(IC) pro 6 cm-Schale für 30 min transfiziert. Direkt danach erfolgte die RNA-Extraktion und 5 µg RNA wurden in einem 1,6%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Gegensatz zu den Extrakten aus unbehandelten FRhK-4-Zellen (*FRhK-4*) und Zellen mit einer Kontrolltransfektion ohne poly(IC) (*DEAE*) findet sich bei dem poly(IC)-transfizierten Ansatz (*poly(IC)*) eine neue Bande als Resultat beginnender rRNA-Degradation (*Pfeil*). Auf derselben Höhe findet sich auch bei nicht transfizierten, HAV-infizierten Zellen eine Bande (*HAV-inf.*: HAV GBM-infizierte FRhK-4-Zellen, 17 d p.i.).

3.3 Untersuchungen der Auswirkung einer HAV-Infektion auf das OAS/RNase L-System

3.3.1 Erhöhtes Aktivierungspotential der RNase L auch in HAV-infizierten MRC-5-Zellen detektierbar

In vorangegangenen Arbeiten war ein rRNA-Abbau-Assay etabliert worden, mit dem gezeigt wurde, dass das Potential der RNase L-Aktivierung durch 2-5A in Lysaten HAV-infizierter FRhK-4-Zellen erhöht ist (JANSSEN-WEETS, 2002). Im Zuge einer Diplomarbeit wurde nun mit der Verwendung von MRC-5-Zellen die Übertragbarkeit dieses Ergebnisses auf einen anderen Zelltyp betrachtet (MÜTHER, 2003). Lysate Mock- und persistent HAV GBM-infizierter MRC-5-Zellen wurden in den rRNA-Abbau-Assay (2.2.24.2) eingesetzt und auch hier zeigte sich eine erhöhte Aktivierbarkeit der RNase L in den HAV-infizierten Ansätzen (Abb. 18). Die Ausprägung des Effektes fiel allerdings schwächer aus, als bei infizierten FRhK-4-Zellen. Die Veränderung des Musters direkt extrahierter rRNA durch eine HAV-

Infektion ist bei MRC-5-Zellen ebenfalls deutlich schwächer ausgeprägt als bei FRhK-4-Zellen (vgl. Abb. 17).

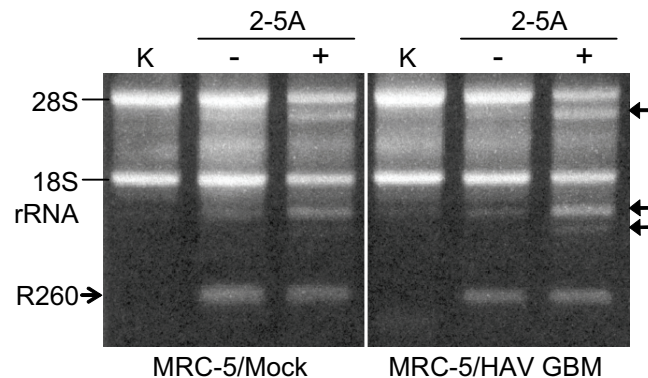


Abb. 18: Aktivierung der RNase L in Lysaten persistent HAV-infizierter MRC-5-Zellen. Mock- bzw. HAV GBM-infizierte MRC-5-Zellen wurden für 4 Wochen kultiviert, in denen sie zweimal passagiert wurden. Dann erfolgte die Lyse und die Durchführung des rRNA-Abbau-Assays. Hierbei wurden die Proben für 45 min bei 30 °C mit einer 2-5A-Präparation als RNase L-Aktivator (+) oder einer entsprechenden Kontrollpräparation ohne 2-5A-Anreicherung (-) inkubiert (s. 2.2.24.1). Zusätzlich wurden unbehandelte Lysate mitgeführt (K). Nach der Zugabe des 260 nt RNA-Standards (R260) zu den inkubierten Proben wurde die RNA extrahiert und in einem 1,6%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die induzierte rRNA-Degradation durch Aktivierung der RNase L ist deutlich anhand entstehender Abbau-Banden ersichtlich (Pfeile). Visuelle und densitometrische Vergleiche der Abbaumuster zeigten ein erhöhtes Aktivierungspotential in den infizierten MRC-5-Zellen (Abb. aus MÜTHER, 2003, modifiziert).

3.3.2 Nachweis der RNase L-Aktivität mit externem Substrat

Die Ergebnisse des rRNA-Abbau-Assays zur Bestimmung der RNase L-Aktivität basieren auf dem Abbau eines internen Substrates, welches auch schon in der integren, HAV-infizierten Zelle degradiert wird. Um diesen Grundunterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen auszugleichen, wurden für die Auswertung jeweils die Differenzen zwischen Ansätzen mit 2-5A-Präparation und entsprechender Kontroll-Präparation herangezogen und diese dann verglichen (s. 2.2.24.1). Dennoch sollten die Ergebnisse mit einem erweiterten Test unter Verwendung eines externen Substrates verifiziert werden. Hierzu wurde mit einem C₁₁UUC₇-RNA-Oligomer ein Substrat verwendet, für welches distinkte Degradationsprodukte durch einen RNase L-abhängigen Abbau beschrieben sind (CARROLL *ET AL.*, 1996). Das RNA-Oligonukleotid wurde am 5'-Ende mit ³²P markiert, aufgereinigt und HAV- bzw. Mock-infizierten Zell-Lysaten für den RNase L-Aktivitäts-Assay zugesetzt (2.2.24.3).

Insgesamt wurde das eingesetzte RNA-Substrat in Gegenwart der Zell-Lysate unspezifisch degradiert und ergab eine ganze Reihe von Produktbanden, wobei diese in den HAV-infizierten Ansätzen schwächer ausgeprägt waren. Die Bande des markierten Hauptprodukts der RNase L, C₁₁UU war allerdings durch die Aktivierung des Enzyms mit 2-5A deutlich

induzierbar und, im Gegensatz zu den Mock-infizierten, auch bei HAV-infizierten Ansätzen ohne 2-5A-Zusatz schwach erkennbar (Abb. 19: HAV-). Die Aktivierbarkeit der RNase L schien in den HAV-infizierten FRhK-4-Zellen leicht erhöht zu sein (Abb. 19: HAV+), wobei die Aussagekraft durch den dynamischen Prozess unspezifischer Degradation fraglich ist.

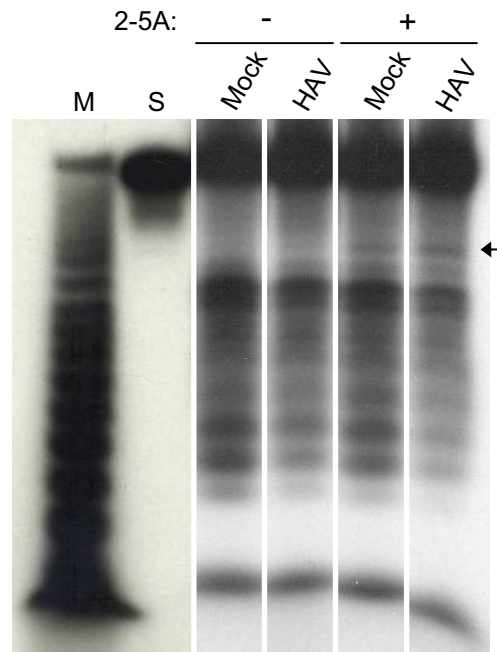


Abb. 19: Degradation von ³²P-C₁₁UUC₇ in Lysaten Mock- bzw. HAV-infizierter Zellen nach RNase L-Aktivierung. Lysate Mock- (*Mock*) bzw. persistent HAV GBM-infizierter (*HAV*) FRhK-4-Zellen wurden in den RNase L-Aktivitäts-Assay eingesetzt, hierzu mit dem ³²P-markierten RNA-Substrat versetzt und in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (-) zugesetzter 2-5A für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Proben wurden auf einem 25%igen, denaturierenden Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und das ³²P-markierte Substrat sowie seine Degradationsprodukte autoradiographisch dargestellt. Das eingesetzte Substrat (*S*: *Substratpräparation*) wird in Gegenwart der Zell-Lysate stark und unspezifisch fragmentiert. Mit Hilfe des hydrolysierten Substrates als Marker (*M*) lässt sich die Laufhöhe des typischen Produkts eines Abbaus durch die RNase L bestimmen (*Pfeil*). Diese Zielbande ist durch die Gegenwart von 2-5A induzierbar und in dem HAV-infizierten Ansatz stärker ausgeprägt. Auch im HAV-infizierten Ansatz ohne 2-5A-Zusatz ist diese Bande erkennbar. Unspezifische Degradationsprodukte sind in den Mock-infizierten Ansätzen jeweils stärker ausgeprägt.

3.3.3 Darstellung der RNase L- und RLI-Transkripte mittels eines Ribonuclease Protection Assays

Da mit dem ursprünglichen rRNA-Abbau-Assay gezeigt worden war, dass die RNase L-Aktivierbarkeit durch die Zugabe von externen 2',5'-Oligoadenylaten in HAV-infizierten Zellen erhöht ist (JANSSEN-WEETS, 2002; MÜTHER, 2003; s. 3.3.1), war die Beeinflussung des OAS/RNase L-Systems unterhalb der OAS zu suchen. Dem Effekt könnte eine Erhöhung des RNase L- oder aber einer Erniedrigung des RLI-Levels zugrunde liegen.

Um quantitative Unterschiede der RLI- bzw. RNase L-Expression zwischen HAV-infizierten und uninfizierten Zellen auf Transkript-Ebene zu betrachten, wurde ein *Ribonuclease Protection Assay* (2.2.20) herangezogen. Mittels einer RT-PCR wurden für die mRNA aus FRhK-4-Zellen spezifische Sondentemplates hergestellt, mit denen RNA-Sonden für die Detektion der RLI- und RNase L- sowie der β -Aktin-Transkripte synthetisiert werden konnten (Übersicht s. Abb. 20A). Da noch keine *Macaca mulatta*-Sequenzen vorlagen, wurden die Primer für die RT-PCR anhand humaner und muriner Sequenzen generiert und waren derartig aufgebaut, dass die PCR-Produkte die spezifische Sequenz flankiert von einem Nonsens-Bereich und einem SP6-Promotor enthielten (Abb. 20B). Mittels einer *in vitro*-Transkription wurden dann RNA-Sonden synthetisiert, die mit einem Teil ihrer Sequenz komplementär zu der jeweiligen Ziel-mRNA und zudem radioaktiv markiert waren. Die Produktgrößen waren gut differenzierbar gewählt, um eine simultane Detektion der drei Ziel-Transkripte in einem Reaktionsansatz zu erlauben (Abb. 20C). Vor dem Einsatz wurden die Sonden über eine PAGE von unvollständigen Transkripten separiert und aufgereinigt.

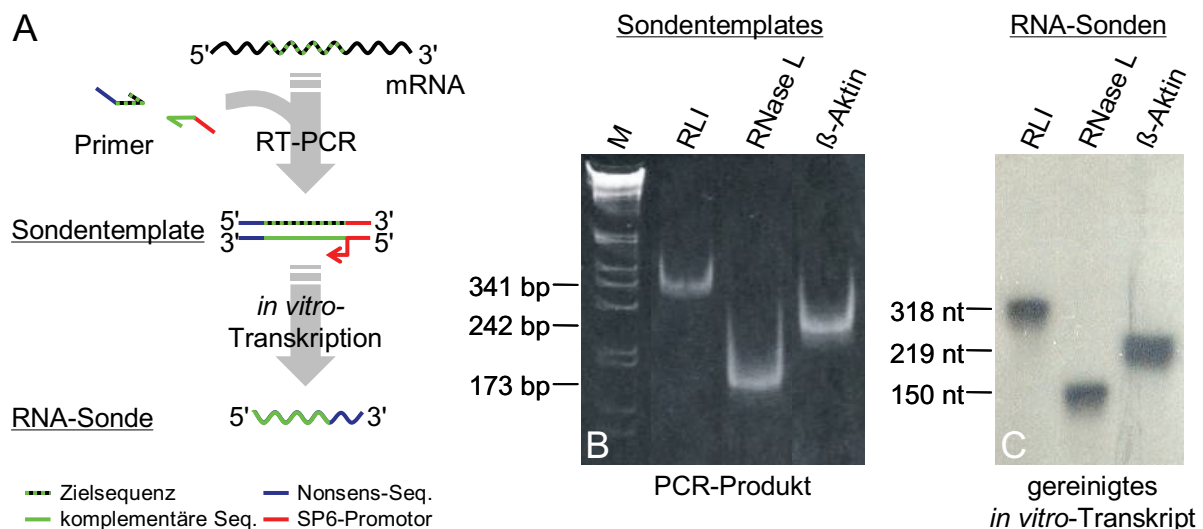


Abb. 20: Sondentemplates und deren Transkripte als Hybridisierungssonden für den RPA. Über eine RT-PCR mit RNA aus FRhK-4-Zellen wurden Templates für die Sondensynthese hergestellt (A: schematische Übersicht; B: PCR-Produkte mit 5%iger PAGE aufgetrennt). Diese Sondentemplates enthielten die spezifische, zielkomplementäre Sequenz sowie einen nichtspezifischen Nonsens-Bereich unter der Kontrolle eines SP6-Promotors und erlaubten somit, über *in vitro*-Transkription, die Herstellung von RNA-Sonden mit komplementären Sequenzen zu den RLI-, RNase L- und β -Aktin-mRNAs aus FRhK-4-Zellen. Die durch den Einsatz von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ radioaktiv markierten Sonden enthielten neben der zielkomplementären Sequenz noch weitere 35 nt des Nonsens-Bereichs und der teilweise inkorporierten SP6-Promotor-Sequenz (C: PAGE-gereinigte Produkte der *in vitro*-Transkription nach Auftrennung mit 5%iger PAGE und Autoradiographie).

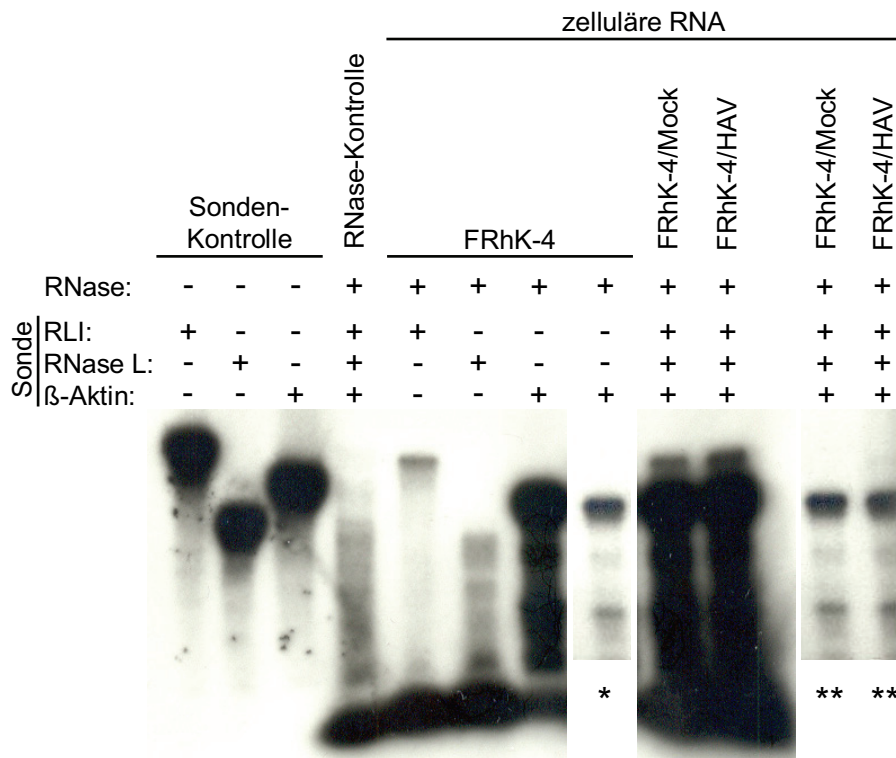


Abb. 21: RPA zum Nachweis zellulärer RLI-, RNase L- und β-Aktin-mRNAs. 30 µg DNA-freier RNA aus konfluenten FRhK-4-Zellen, die Mock- oder persistent HAV GBM-infiziert waren, wurden zusammen mit 8×10^4 cpm je markierter Sonde in den Ribonuclease Protection Assay eingesetzt. Nach Hybridisierung und Abbau ungeschützter, einzelsträngiger RNA durch Behandlung mit RNase A und RNase T1 wurden die Proben in einem 5%igen, denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch visualisiert. Die *Sonden-Kontrolle* stellt die Läufe der drei unbehandelten RNA-Sonden dar, welche 35 nt länger sind als die durch Hybridisierung mit der Zielsequenz geschützten Bereiche. Die *RNase-Kontrolle* zeigt, dass die drei Sonden durch die RNase-Behandlung abgebaut werden. In den *FRhK-4*-Ansätzen wurden die Sonden einzeln mit FRhK-4-RNA-Extrakten hybridisiert und mit RNase behandelt. Die RLI-Sonde zeigt hier eine saubere, wenn auch schwache Bande, während der Ansatz mit der RNase L-Sonde nur in einem Schmier resultiert und keine distinkte Bande liefert. Der Einsatz der β-Aktin-Sonde liefert ein starkes Signal auf der Zielhöhe und weitere kleinere Banden, die bei längerer Autoradiographiezeit einen Schmier bilden, aber bei der daneben abgebildeten, kürzer gewählten Zeit klar abgrenzbar sind (*). Die Ansätze *FRhK-4/Mock* und *FRhK-4/HAV* stellen den Einsatz aller drei Sonden mit der RNA Mock- bzw. HAV/7-infizierter Zellen dar. Die Banden der RLI-Sonde sind deutlich zu erkennen, die Darstellung der β-Aktin-Banden bei kürzerer Autoradiographiezeit ist neben den Spuren abgebildet(**).

Die RNA-Sonden, die durch eine Behandlung mit einem RNase A/RNase T1-Gemisch komplett degradierbar waren, wurden mit DNA-freier RNA aus FRhK-4-Zellen hybridisiert und einem RNase-Verdau unterzogen. Nach einer denaturierenden PAGE-Auftrennung konnten für die RLI- und die β-Aktin-Sonde Fragmente in der Größe der jeweiligen spezifischen Sequenz detektiert werden. Diese Fragmente stellen die Sondenbereiche dar, welche durch Bindung an ihre komplementäre Ziel-Sequenz vor dem Abbau geschützt wurden. Die Menge der geschützten Sondenfragmente verhält sich proportional zu der zellulären Ziel-RNA. Die sehr viel höhere Abundanz der β-Aktin-mRNA wurde hier deutlich, so dass ein simultaner Nachweis aller Transkripte, trotz niedrigerer ^{32}P -Markierungsdichte der

β -Aktin-Sonde, nur mit unterschiedlichen Belichtungszeiten der Autoradiographie möglich war. Zudem erzeugte die β -Aktin-Sonde noch schwächere unspezifische Banden, die durch Verzicht auf die RNase A in dem RNase-Gemisch minimiert werden konnten, da die RNase T1 eine geringere Fehlpaartoleranz aufweist. Der Nachweis von RNase L-mRNA war mit der verwendeten Sonde nicht möglich und resultierte nur in einem durchgehendem Schmier ab der Höhe des Ziel-Fragments (Abb. 21).

Der RPA wurde mit DNA-freien Extrakten Mock- bzw. persistent HAV GBM-infizierter FRhK-4-Zellen durchgeführt, wobei kein Anzeichen für eine Runterregulation der RLI-mRNA in den HAV-infizierten Zellen festgestellt werden konnte (Abb. 21).

Auf eine weitergehende Optimierung des RPA und die Etablierung einer funktionellen RNase L-Sonde wurde verzichtet, da sich die Möglichkeit ergab, die Methode der *real-time* RT-PCR für diese Fragestellung zu verwenden.

3.3.4 RNase L-mRNA-Level werden durch eine HAV-Infektion hochreguliert während die RLI-mRNA unbeeinflusst bleibt

Die Möglichkeit der *real-time* RT-PCR basierten Quantifizierung von RNase L- und RLI-Transkripten löste die Versuche mit dem *Ribonuclease Protection Assay* ab. Die *real-time* RT-PCR wurde herangezogen, um festzustellen, ob die erhöhte Aktivierbarkeit der RNase L in HAV-infizierten FRhK-4-Zellen durch einen Anstieg der RNase L-Expression oder eine Verminderung der RLI-Expression bedingt ist.

Der *real-time* RT-PCR-Nachweis für die RNase L- und RLI-mRNA (2.2.19) wurde von Christina Röser im Zuge ihrer Dissertation etabliert (RÖSER, 2007), und die entsprechenden Messungen der hier dargestellten Ansätze wurden von ihr bei der QIAGEN Hamburg GmbH (ehemals artus GmbH) durchgeführt.

Um die Level der RLI- und RNase L-mRNA auf eine HAV-induzierte Runter- bzw. Hochregulation zu untersuchen, wurden FRhK-4-Zellen mit HAV GBM oder HAV/7 infiziert, zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. aufgearbeitet und die Transkripte der Zielgene mit der *real-time* RT-PCR quantifiziert. Für die Normalisierung wurde hier die 18S rRNA herangezogen. Da diese selber – wie potentiell auch jede mRNA – ein Substrat der RNase L darstellt, wurde überprüft, ob sich die Tendenzen bei der Verwendung anderer Bezugsgrößen verändern. Normalisierungen auf die eingesetzte RNA-Menge oder auf die Zellzahl führten zu denselben Resultaten.

Die Infektionskinetiken zeigten für die mRNA des RLI und der RNase L die erwarteten Verläufe, die durch eine Passagierung der Zellen induziert werden (JACOBSEN ET AL., 1983a; KRAUSE ET AL., 1985b). Während für die RLI-mRNA keine signifikanten Unterschiede zwischen den HAV-infizierten Ansätzen und den Mock-Kontrollen zu verzeichnen waren, etablierten sich in den HAV-infizierten Zellen mit zunehmender Zeit nach der Infektion höhere Level der RNase L-mRNA als in den Mock-infizierten Zellen. In Abb. 22 ist eine Infektionskinetik mit typischen RLI- und RNase L-mRNA-Verläufen beispielhaft dargestellt. Eine Übersicht über vier voneinander unabhängige Infektionskinetiken liefert die Abb. 23, in der die Verläufe auf die jeweilige Mock-Kontrolle bezogenen dargestellt sind. Auch hier zeigte sich deutlich die Tendenz einer verstärkten Expression der RNase L-mRNA nach der Infektion. Die Werte der HAV-infizierten Ansätze erreichten 21 Tage p.i. im Schnitt das Dreifache der entsprechenden Mock-Kontrollen.

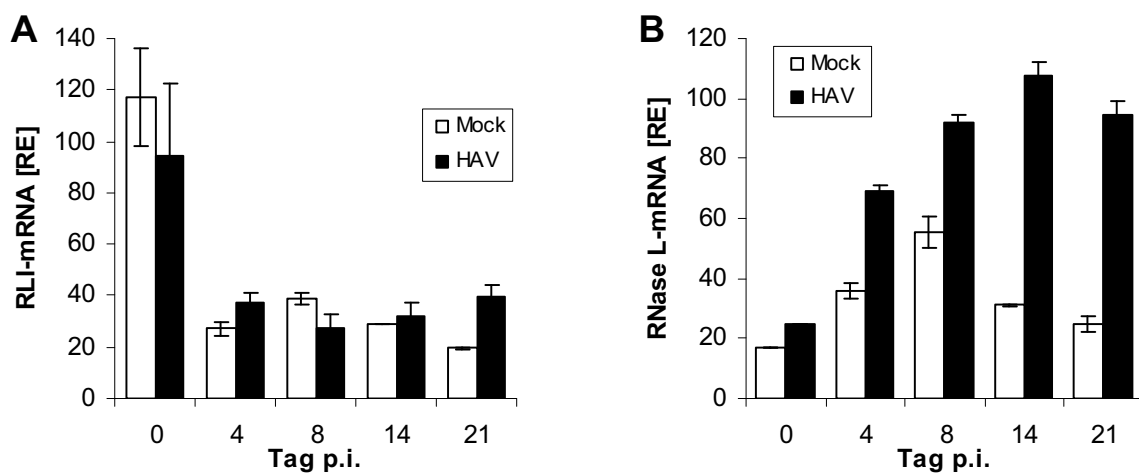


Abb. 22: Verläufe der RLI- und RNase L-mRNA-Level nach einer HAV-Infektion. FRhK-4-Zellen wurden zwei Tage nach dem Umsetzen mit HAV GBM (MOI = 10) infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer RNA-Extraktion unterzogen. Mit den Präparationen wurde dann per *real-time* RT-PCR eine Quantifizierung der RLI- und RNase L-mRNA durchgeführt. Die auf den jeweiligen Standard bezogenen relativen Werte der mRNA-Quantifizierung wurden auf die 18S rRNA normalisiert und sind hier unter der Bezeichnung relative Einheiten [RE] als Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit Standardabweichung dargestellt. Die RLI-mRNA (A) fällt nach dem, durch die Passage bedingten, erhöhten Level am 0. Tag auf ein niedrigeres Niveau. Ein signifikanter Unterschied zwischen HAV- und Mock-infizierten Ansätzen ist nicht ersichtlich. Der RNase L-mRNA-Level (B) steigt nach der Passage an und pendelt sich wieder auf ein höheres Niveau ein. Hierbei erreichen die HAV-infizierten Ansätze deutlich höhere RNase L-mRNA-Level als die Mock-Ansätze.

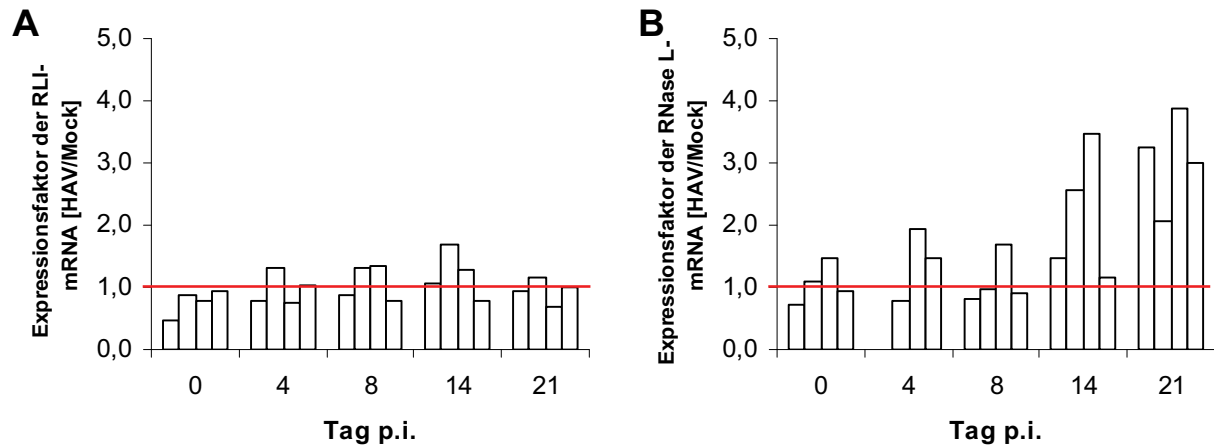


Abb. 23: Einfluss der HAV-Infektion auf die Expression der RLI- bzw. RNase L-mRNA in Infektionskinetiken. Abgebildet ist eine Zusammenfassung von vier HAV GBM-Infektionskinetiken, die analog zu der Beschreibung unter Abb. 22 durchgeführt wurden. Die normalisierten Werte der infizierten Ansätze wurden durch die der Mock-Ansätze dividiert und somit relativ zu diesen als Expressionsfaktor dargestellt. Der mit einer roten Linie gekennzeichnete Wert von 1 steht somit für eine unveränderte Expression, bei der die mRNA-Level in HAV-infizierten und Mock-Ansätzen identisch sind. Die Werte der vier, voneinander unabhängigen Infektionskinetiken sind zu den jeweiligen Zeitpunkten nebeneinander als Balken abgebildet. Auch wenn deutliche Schwankungen zwischen den Kinetiken zu finden sind, zeigt sich die klare Tendenz zur Erhöhung des RNase L-mRNA-Levels in Folge der HAV-Infektion (B) während die RLI-mRNA-Werte der HAV-Ansätze auf dem Niveau der Mock-Ansätze bleiben (A). (Für die RNase L-mRNA sind auf Grund eines Messfehlers am 4. Tag p.i. nur Daten von drei Kinetiken aufgezeigt.)

Zusätzlich zu den RLI- und RNase L-Transkripten wurde auch die HAV-RNA in den RNA-Extrakten der Infektionskinetiken bestimmt. Hier zeigte sich ein Anstieg der zellgebundenen HAV-RNA bis zum 14. Tag p.i., im Folgenden blieb der Wert auf einem Level oder fiel leicht ab. Die HAV-RNA-Daten, der in Abb. 22 gezeigten Kinetik, sind in Abb. 24 dargestellt.

Versuche mit HAV/7 zeigten dieselben Tendenzen wie die HAV GBM-Ansätze.

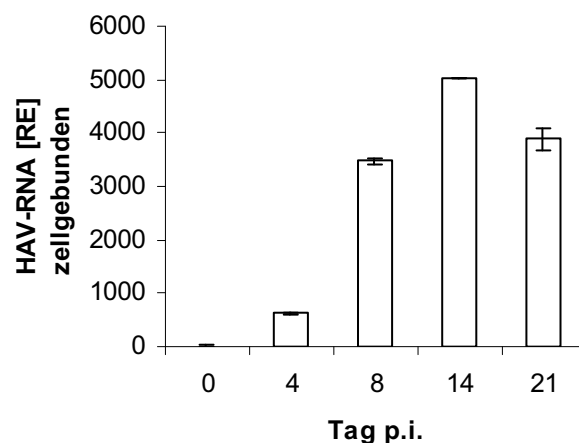


Abb. 24: Zellgebundene HAV-RNA im Verlauf einer Infektionskinetik (auf 18S bezogen). Mit den RNA-Extrakten der Infektionskinetiken wurde eine real-time RT-PCR-basierte Bestimmung der HAV-RNA durchgeführt. Die auf ihren Standard bezogenen HAV-RNA-Werte wurden, wie die mRNAs, auf die 18S rRNA normalisiert. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von Daten der zu Abb. 22 gehörenden Proben, die den typischen Verlauf in den Experimenten mit einem Anstieg der HAV-RNA bis zum 14 Tag p.i. und einem folgenden leichten Abfall oder einer Stagnation zeigen.

3.3.5 Erhöhte RNase L-mRNA-Expression in persistent HAV-infizierten FRhK-4-Zellen

Wenn eine Hochregulation der RNase L für die Etablierung und Erhaltung der Persistenz eine Rolle spielt, sollte sie auch in persistent HAV-infizierten Zellen nachweisbar sein. Daher wurden persistent infizierte FRhK-4-Zellen passagiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgearbeitet. Die RNase L- sowie die RLI-mRNA wurden mittels *real-time* RT-PCR quantifiziert. Die Passage der Zellen induzierte einen initialen Anstieg der RLI-mRNA, deren Level sich im Laufe der Tage wieder auf ein niedrigeres Niveau absenkten. Der RNase L-mRNA-Level wurde durch das Umsetzen der Zellen erniedrigt und stieg dann wieder an. Diese Verläufe sind im Konsens mit dem beschriebenen Expressionsverhalten in Abhängigkeit der Zell-Passagierung (JACOBSEN ET AL., 1983a; KRAUSE ET AL., 1985b). Insgesamt lagen die RNase L-mRNA-Level in den persistent HAV-infizierten FRhK-4-Zellen regelmäßig über denen der Kontroll-Zellen, wobei der Unterschied nicht besonders groß ausfiel und selten den Faktor 2 überstieg. Vereinzelt wiesen Probenpaare auch eine gegenläufige Tendenz auf. Die Quantifizierung der RLI-mRNA ergab ein unregelmäßigeres Bild. Es konnten zwar ähnlich große Differenzen zwischen infizierten und nicht-infizierten Probenpaaren gemessen werden, wie bei der Analyse der RNase L-mRNA, allerdings ohne ersichtliche Richtung. Es gab keine deutliche Tendenz für eine regelmäßige Erhöhung oder Erniedrigung des RLI-mRNA-Levels in HAV-infizierten Ansätzen. Die Daten zweier unabhängiger Kinetiken sind in Abb. 25 exemplarisch dargestellt.

Um die schwach ausgeprägte, aber regelmäßige Tendenz der RNase L-mRNA-Daten auf ihre statistische Signifikanz zu überprüfen, wurden die Werte von fünf unabhängigen Kinetik-Experimenten mit insgesamt 55 Probenpaaren einer Analyse unterzogen. Die Daten der HAV-infizierten Ansätze wurden relativ zu denen der Kontroll-Ansätze ausgedrückt und somit als Expressionsfaktor dargestellt, der bei identischen Expressionsleveln dem Wert "1" entspricht (vgl. Abb. 23). Die Werte fanden sich zwischen 0,61 und 3,85 mit einem Mittelwert von 1,51 (95%-Konfidenzintervall: 1,31 – 1,70), wobei die Hälfte der Werte über 1,33 (Median) lagen. Ein t-Test beurteilte den Unterschied zu einem unveränderten Expressionslevel von 1,00 als extrem signifikant ($p < 0,0001$). Im Gegensatz hierzu wiesen die RLI-mRNA-Daten keine statistisch signifikante Abweichung von einem unveränderten Expressionslevel auf.

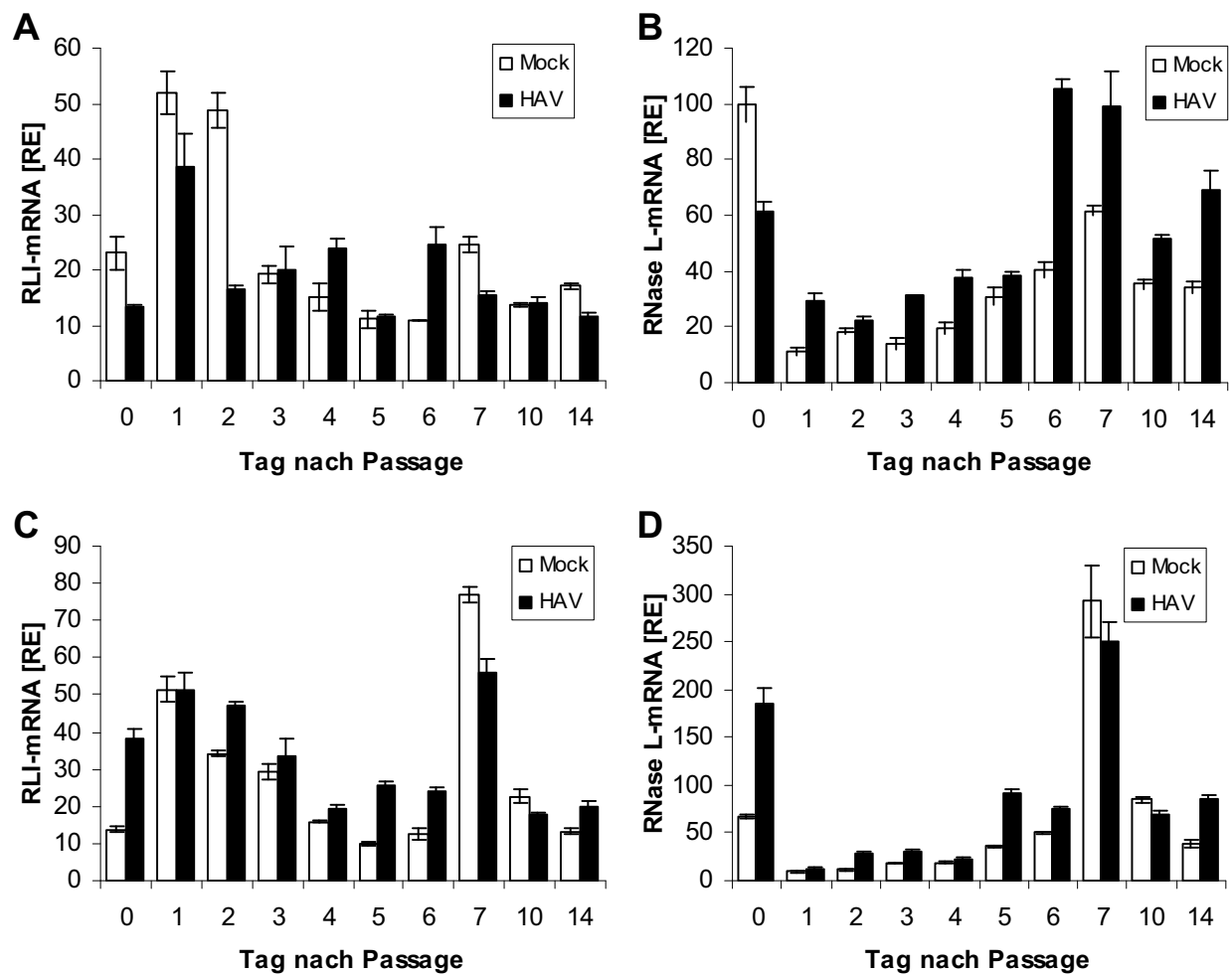


Abb. 25: RLI- und RNase L-mRNA-Level in persistent infizierten FRHK-4-Zellen. Persistent mit HAV GBM infizierte FRhK-4-Zellen und entsprechende Mock-Kontrollen wurden passagiert (Split: 1:8) und dann bis zu unterschiedlichen Zeitpunkten kultiviert. Nach einer Extraktion der RNA erfolgte die Quantifizierung der RLI- und RNase L-mRNA mittels *real-time* RT-PCR. Die auf den jeweiligen Standard bezogenen relativen Werte der mRNA-Quantifizierung wurden auf die 18S rRNA normalisiert und sind als Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit Standardabweichung dargestellt. Exemplarisch abgebildet sind hier die RLI- bzw. RNase L-mRNA-Daten zweier Experimente (A&B; C&D). Die Kinetiken wiesen passagebedingte Effekte auf, einen initialen Anstieg der RLI-mRNA-Konzentration, die sich typischerweise um den 5. Tag nach dem Umsetzen wieder auf einem tieferen Niveau einpendelt und einen Abfall des RNase L-mRNA-Levels, der um den 6. oder 7. Tag wieder ein höheres Niveau erreichte. Die Level der RNase L-mRNA lagen in den HAV-infizierten Zellen regelmäßig höher als in den Mock-Zellen, ein Effekt, der für die RLI-mRNA nicht so ausgeprägt war.

3.3.6 Verläufe von RNase L-mRNA und HAV-RNA in persistent infizierten FRhK-4-Zellen suggerieren einen regulativen Zusammenhang

Betrachtet man den Level der HAV-RNA in den persistent infizierten Zellen nach der Passagierung, pendelt dieser sich nach einem leichten Anstieg um den 6. oder 7. Tag auf ein konstantes Niveau ein. In diesem Zeitraum erreicht auch die RNase L-mRNA wieder ihren höchsten Level. Abb. 26 zeigt exemplarisch den Verlauf in einem der Experimente. Ebenfalls abgebildet sind gelelektrophoretische Auftrennungen der RNA-Proben, die an den Tagen mit den höchsten HAV-RNA-Konzentrationen eine Verstärkung der potentiellen rRNA-Degradationsbande zeigen (Abb. 26B). Die stärkere RNase L-Aktivität scheint hier mit den höheren HAV-RNA-Werten zu korrelieren, während die HAV-RNA nach der Zunahme der enzymatischen Aktivität und mit dem Anstieg der RNase L-mRNA leicht abfällt und sich auf einem konstanten Niveau einpendelt.

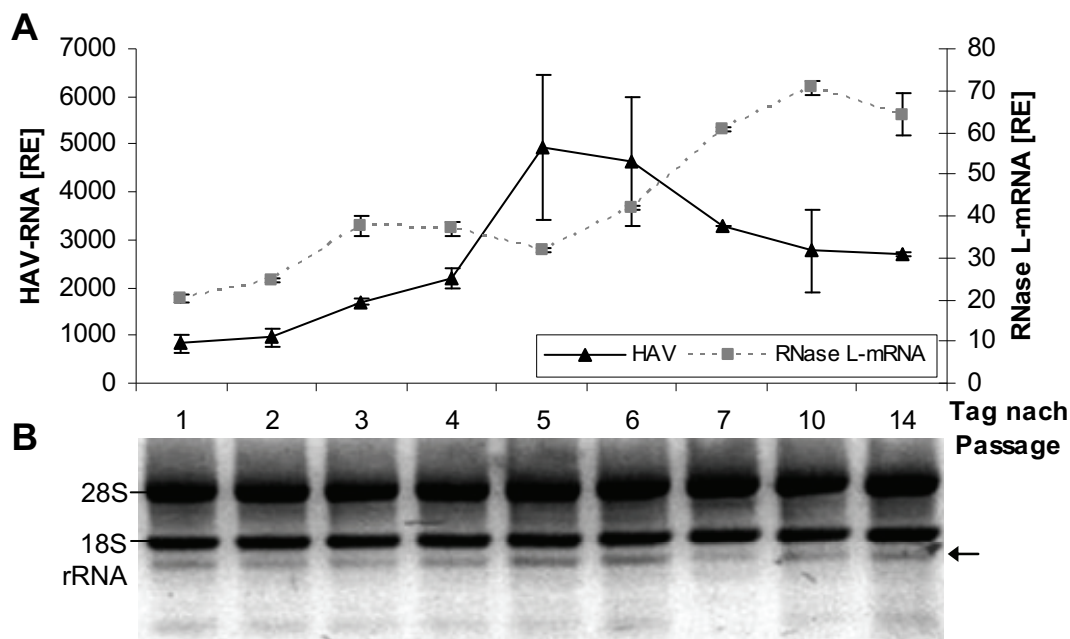


Abb. 26: Verlauf der HAV-RNA und der RNase L-mRNA nach der Zellpassage. A: Mit den RNA-Extrakten persistent HAV GBM-infizierter FRhK-4-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Passage der Zellen wurde eine real-time RT-PCR-basierte Bestimmung der HAV-RNA sowie der RNase L-mRNA durchgeführt. Die auf ihren Standard bezogenen Werte wurden jeweils auf die 18S rRNA normalisiert. Abgebildet sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit ihrer Standardabweichung. Die Menge zellgebundener HAV-RNA steigt nach dem Umsetzen langsam an und erreicht ihr Maximum am 5. und 6. Tag, ab dem 7. Tag pendelt sie sich auf einem niedrigeren Level ein. Parallel dazu erreicht die RNase L-mRNA um den 7. Tag nach der Passage ihr oberes Niveau. Der hier abgebildete Verlauf spiegelt die in weiteren Experimenten gefundenen Tendenzen. B: Von den zu den jeweiligen Datenpunkten gehörenden RNA-Extrakten wurden 5 µg in einem 1,6%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. An den Tagen mit den höchsten Konzentrationen an Virus-RNA findet man die deutlichsten Banden unterhalb der 18S rRNA (Pfeil).

3.3.7 In silico-Analyse der Upstream-Sequenz des RNase L-ORFs ergibt zahlreiche potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen

Um nach Erklärungen für die Hochregulation der RNase L-Expression im Zuge einer HAV-Infektion zu suchen, sollte die Promotorregion des RNase L-Gens auf Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht werden. Mit der Annotationssoftware EIDorado (Genomatix Software GmbH, München) wurde das auf Chromosom 1 (GenBank/EMBL-Accession-Nr.: NC_007858) lokalisierte RNase L-Gen des Rhesusaffen auf potentielle Promotorbereiche hin untersucht. Von den zwei prognostizierten Promotorregionen wies eine, mit 92%iger Sequenzübereinstimmung und vergleichbarer Lokalisation, eine hohe Ähnlichkeit zu dem von ZHOU ET AL. (2005) beschriebenen Promotor des humanen RNase L-Gens auf (Abb. 27).

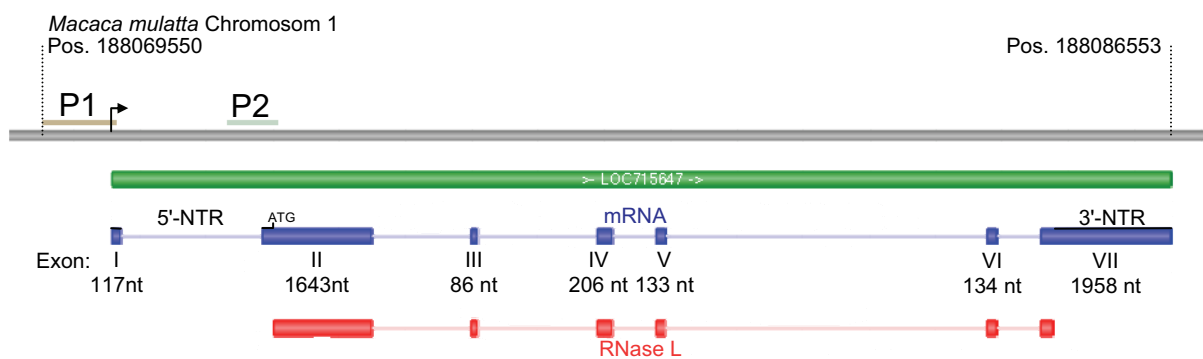


Abb. 27: Organisation des RNase L-Gens bei *Macaca mulatta*. Das auf Chromosom 1 gelegene RNase L-Gen des Rhesusaffen (GenBank/EMBL-Accession-Nr.: NC_007858; *Macaca mulatta* chromosome 1 reference assembly) ist hier mit seiner zugehörigen *full length*-mRNA und dem für das Protein codierenden Bereich dargestellt. Mittels der Annotationssoftware EIDorado (Genomatix Software GmbH, München) wurden zwei Promotorregionen prognostiziert (*P1*, *P2*). Die Region *P1* entspricht der von ZHOU ET AL. (2005) beschriebenen Promotorregion des humanen RNase L-Gens. Die Abbildung wurde mit Hilfe des NCBI-Sequence Viewers 2.0.β erstellt und nachfolgend modifiziert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/sviewer.html>).

Die Sequenz dieser Promotorregion (*P1* aus Abb. 27) wurde mit der GEMS Launcher-Softwaresammlung (Genomatix Software GmbH, München) auf potentielle Transkriptionsfaktorbindemotive untersucht, wobei die Präsenz in dem humanen RNase L-Promotor sowie das Auftreten in konservierten Bezugssystemen berücksichtigt wurden. Die Ergebnisse der *in silico*-Analyse sind in Tab. 6 und Abb. 28 dargestellt. Von besonderem Interesse ist hier das Vorhandensein potentieller Bindepotionen für den Transkriptionsfaktor NF-κB, der im Zuge einer HAV-Infektion aktiviert wird (FENSTERL ET AL., 2005).

Tab. 6: Potentielle Transkriptionsfaktorbindemotive in der RNase L-Promotorregion bei *Macaca mulatta*. Die Sequenzanalyse erfolgte mittels der Softwaresammlung GEMS Launcher (Genomatix Software GmbH, München). Ausgewählt wurden Motive, die eine komplette Übereinstimmung mit dem hochkonservierten Kern der Matrix-Sequenz aus der Genomatix-Datenbank aufwiesen und deren Gesamtübereinstimmung über dem, für die jeweilige Sequenz, optimierten Schwellenwert lag. Zusätzlich wurden die Motive nach ihrer Präsenz sowohl in der makaken, als auch in der humanen Promoterregion gefiltert. Motive, die mit definierten Distanzen zu mindestens drei anderen vorhandenen, regulatorischen Elementen auftraten und damit bekannten Modellen konservierter Bezugssysteme entsprachen, sind in der Tabelle durch Fettdruck hervorgehoben. Das potentielle GAS-Motiv wurde nach visueller Sequenz-Inspektion manuell eingefügt. Die aufgeführten Bindemotive sind mit ihrer jeweiligen Abkürzung (*Abk.*) in Abb. 28 im Bezug zu der Promotorregion dargestellt. (*Matrix:* Benennung und Beschreibung der Matrix in der Genomatix-Datenbank; *Position:* Nukleotidposition in der Promotorsequenz; *Str.:* Strangorientierung; *Matrix-Übereinstimmung:* Ähnlichkeit zu gesamer Matrix-Sequenz; *Matrix-Sequenz:* Sequenz des jeweiligen Motivs, bei der hochkonservierte Positionen rot dargestellt und die Kern-Nukleotide großgeschrieben sind).

| Abk. | Matrix | Beschreibung | Position | Str. | Matrix-Übereinstimmung | Matrix-Sequenz |
|----------------|------------------|---|-----------|------|------------------------|-------------------------------------|
| MEL1 | V\$MEL1.02 | (MEL1 (MDS1/EV11-like gene 1) DNA-binding domain 2) | -986/-970 | (+) | 0.994 | gtgttg GATG aggatg |
| MEL1 | V\$MEL1.02 | (MEL1 (MDS1/EV11-like gene 1) DNA-binding domain 2) | -980/-964 | (+) | 0.994 | ggatgag GATG agggat |
| GCMa | V\$GCM1.01 | Glial cells missing homolog 1, chorion-specific transcription factor GCMa | -974/-964 | (-) | 0.934 | at CCCT catcc |
| YY1 | V\$YY1.02 | (Yin and Yang 1 repressor sites) | -950/-932 | (+) | 0.944 | gggtg CCAT ttgtagat |
| NGN1/3 | V\$NEUROG.01 | (Neurogenin 1 and 3 (ngn1/3) binding sites) | -948/-936 | (+) | 0.927 | gtg CCAT ttgtag |
| SMARCA3 | V\$SMARCA3.01 | (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 3) | -947/-937 | (+) | 0.986 | tg CCAT ttgta |
| MAZ | V\$MAZ.01 | (Myc associated zinc finger protein (MAZ)) | -924/-912 | (+) | 0.920 | atgg GAGG agggg |
| MAZ | V\$MAZ.01 | (Myc associated zinc finger protein (MAZ)) | -921/-909 | (+) | 0.909 | ggag GAGG ggcag |
| MEL1 | V\$MEL1.02 | (MEL1 (MDS1/EV11-like gene 1) DNA-binding domain 2) | -904/-888 | (+) | 0.997 | aggaaaa GATG agtgtt |
| IRF1 | V\$IRF1.01 | (Interferon regulatory factor 1) | -896/-876 | (-) | 0.877 | gtgt caatgGAA acactcat |
| SMARCA3 | V\$SMARCA3.01 | (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 3) | -888/-878 | (+) | 0.992 | tt CCAT ttgac |
| TGIF | V\$TGIF.01 | (TG-interacting factor belonging to TALE class of homeodomain factors) | -884/-874 | (-) | 1.000 | atg GTCA aat |
| PTX1 | V\$PTX1.01 | (Pituitary Homeobox 1 (Ptx1, Pitx-1)) | -841/-825 | (-) | 0.951 | tct CTAA cccagcctc |
| NFKB | V\$NFKAPPAB50.01 | (NF-kappaB (p50)) | -818/-806 | (+) | 0.855 | cc GGGAg tcct |
| NFKB | V\$NFKAPPAB50.01 | (NF-kappaB (p50)) | -816/-804 | (-) | 0.846 | cta GGGAct ccca |
| AP2 | V\$AP2.01 | (Activator protein 2) | -787/-773 | (-) | 0.917 | cag GCCT ggggcctc |
| NKX25 | V\$NKX25.01 | (Homeo domain factor Nkx-2.5/Csx, tinman homolog, high affinity sites) | -756/-742 | (+) | 1.000 | gtcgtc AAGT gacca |
| FREAC2 | V\$FREAC2.01 | Fork head related activator-2 (FOXF2) | -734/-718 | (-) | 0.947 | gactg TAAAc gcgag |
| MRF2 | V\$MRF2.01 | (Modulator recognition factor 2 (MRF2, ARID5B)) | -692/-684 | (-) | 0.985 | AATA cccag |
| NFAT1 | V\$NFAT.01 | (Nuclear factor of activated T-cells) | -676/-658 | (+) | 0.955 | gat GGA atacttccact |
| NKX3 | V\$NKX31.01 | (Prostate-specific homeodomain protein NKX3.1) | -655/-641 | (+) | 0.918 | agcag tAAGT acaca |
| SMARCA3 | V\$SMARCA3.02 | (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 3) | -606/-596 | (+) | 0.985 | caga ACTT gta |
| OCT1 | V\$OCT1.05 | Octamer-binding factor 1 | -540/-526 | (-) | 0.931 | gg CATG tgat ^{taac} |

| Abk. | Matrix | Beschreibung | Position | Str. | Matrix-Übereinstimmung | Matrix-Sequenz |
|--------|----------------|---|-----------|------|------------------------|--------------------------------------|
| GFI1 | V\$GFI1.02 | (Growth factor independence 1) | -539/-525 | (+) | 0.905 | tta AATC acatgcct |
| VERBA | V\$VERBA.01 | (vErbA, viral homolog of thyroid hormone receptor alpha1) | -531/-509 | (+) | 0.964 | catgcctga GGTC actcagc taa |
| FXRE | V\$FXRE.01 | Farnesoid X - activated receptor (RXR/FXR dimer), IR1 sites | -523/-511 | (+) | 0.933 | AGGT cactcagct |
| AP1 | V\$AP1.02 | Activator protein 1 | -522/-512 | (-) | 0.906 | gct GAGT gacc |
| ATF6 | V\$ATF6.01 | (Member of b-zip family, induced by ER damage/stress, binds to the ERSE in association with NF-Y) | -507/-495 | (+) | 0.936 | cag CCAC acagag |
| MEIS1 | V\$MEIS1.01 | (Binding site for monomeric Meis1 homeodomain protein) | -402/-392 | (-) | 0.971 | ccc TGTC acct |
| DREAM | V\$DREAM.01 | (Downstream regulatory element-antagonist modulator, Ca ²⁺ -binding protein of the neuronal calcium sensors family that binds DRE (downstream regulatory element) sites as a tetramer) | -336/-326 | (+) | 0.976 | tt GTCA gggggt |
| INSM1 | V\$INSM1.01 | (Zinc finger protein insulinoma-associated 1 (IA-1) functions as a transcriptional repressor) | -335/-323 | (+) | 0.982 | tg tca GGGGttaa |
| TH1E47 | V\$TH1E47.01 | (Thing1/E47 heterodimer, TH1 bHLH member specific expression in a variety of embryonic tissues) | -297/-281 | (-) | 0.965 | ttgtgtg CCAG acacaa |
| NF1 | V\$NF1.03 | (Non-palindromic nuclear factor 1 binding sites) | -294/-274 | (-) | 0.971 | gcacctgtgtg TGCCA gaca |
| SMAD | V\$SMAD.01 | (Sma- and Mad-related proteins) | -294/-286 | (+) | 0.969 | t GTCT ggca |
| MYOG | V\$MYOGENIN.01 | (Myogenic bHLH protein myogenin (myf4)) | -286/-270 | (+) | 0.971 | acaca ACAG gtctcaa |
| AREB6 | V\$AREB6.03 | (AREB6 (Atp1a1 regulatory element binding factor 6)) | -283/-271 | (-) | 0.965 | tgag CACCT gttg |
| ILF1 | V\$FREAC2.01 | (Fork head related activator-2 (FOXF2)) | -271/-255 | (-) | 0.988 | ggaaag TAA caatatt |
| NANOG | V\$NANOG.01 | (Homeobox transcription factor Nanog) | -263/-247 | (-) | 0.941 | aaagg AATG gaaagtaa |
| TEAD | V\$TEAD.01 | (TEA domain-containing factors, transcriptional enhancer factors 1,3,4,5) | -258/-246 | (+) | 0.927 | ttc CATT ccttg |
| SOX9 | V\$SOX9.02 | (SRY (sex-determining region Y) box 9) | -256/-240 | (-) | 0.973 | ttgga ACA agggaatgg |
| STAT5 | V\$STAT5.01 | (STAT5: signal transducer and activator of transcription 5) | -251/-233 | (-) | 0.948 | ggcc TTCT tggaacaaagg |
| GAS | | IFN-γ activated site | -245/-237 | (+) | | TTcCaagAA |
| MEL1 | V\$MEL1.02 | (Ecotropic viral integration site 1 encoded factor, amino-terminal zinc finger domain) | -124/-108 | (-) | 0.995 | gtctgct GATG agggat |
| SOX9 | V\$SOX9.01 | (SOX (SRY-related HMG box)) | -103/-87 | (-) | 0.902 | gcaaag CAAT ggccact |
| TEAD | V\$TEAD.01 | (TEA domain-containing factors, transcriptional enhancer factors 1,3,4,5) | -15/-3 | (+) | 0.986 | cca CATT cctcac |

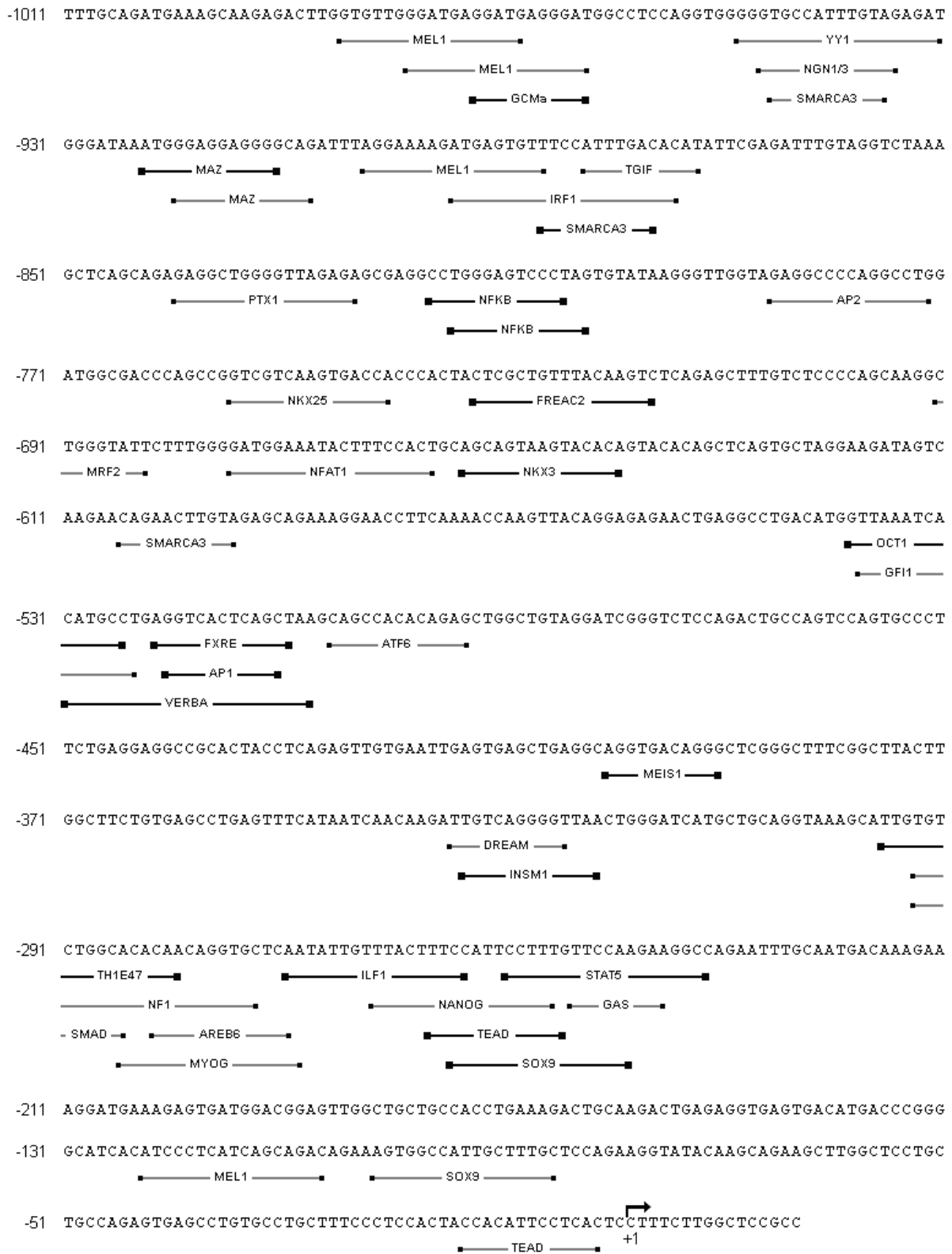


Abb. 28: Sequenz der putativen Promotorregion des *Macaca mulatta* RNase L-Gens. Die in Tab. 6 aufgeführten potentiellen Transkriptionsfaktorbindepositionen sind unterhalb der Sequenz dargestellt. Im Muster bekannter Bezugssysteme gemeinsam auftretende Bindepositionen sind hervorgehoben. (Pfeil: Transkriptionsstart)

3.3.8 Endogene FRhK-4-RNase L im Western Blot nicht darstellbar

Um die auf der mRNA-Ebene gefundenen Differenzen der RNase L-Expression zwischen nicht infizierten und HAV-infizierten FRhK-4-Zellen auf der Proteinebene zu untersuchen, wurde versucht, die RNase L im Western Blot (2.2.22) darzustellen. Hierzu wurden FRhK-4-Zellen 7 Tage nach der Passage entweder mit NP-40-Lysepuffer oder RIPA-Puffer lysiert und die Lysate mit einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach einem Elektrolot erfolgte der antikörperbasierte Nachweis der RNase L.

Es gelang weder die basal exprimierte RNase L in unbehandelten FRhK-4-Zellen noch in HAV-infizierten Zellen sauber darzustellen. Allerdings konnte das Protein in Zellen nachgewiesen werden, die mit dem RNase L-Expressionsplasmid pcDNA3.1/RL transfiziert worden waren. Im Vergleich findet sich auch in den nicht transfizierten Ansätzen eine Bande auf der entsprechenden Höhe, diese ist aber erst bei einem Auftrag von 200 µg Protein detektierbar und ist von dem Hintergrund unspezifischer Banden nicht zu trennen (Abb. 29). Da der Auftrag von größeren Proteinmengen das Laufverhalten deutlich verschlechterte, konnte keine Aussage über die Verhältnisse der RNase L in infizierten und nicht-infizierten Zellen getroffen werden.

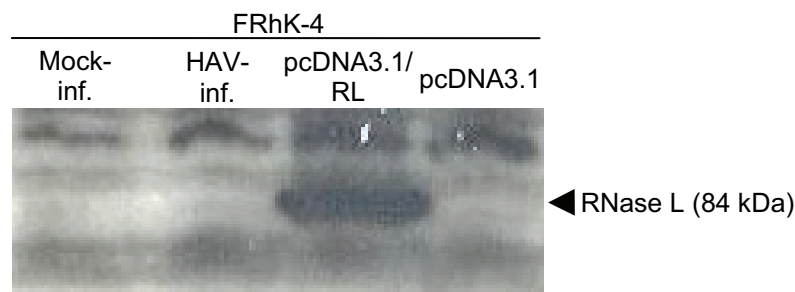


Abb. 29: Nachweis der RNase L im Western Blot. FRhK-4-Zellen, die Mock- oder persistent HAV-infiziert waren wurden am 7. Tag nach der Zellpassage unter Verwendung eines NP-40-Lysepuffers lysiert. Ebenso wurde mit Zellen verfahren, die 2 Tage zuvor mit dem RNase L-Expressionsvektor pcDNA3.1/RL bzw. dem entsprechenden Leervektor pcDNA3.1 transfiziert worden waren. Lysat mit 200 µg Protein wurde in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und folgend einem Western Blot zum Nachweis der RNase L unterzogen. Während eine deutliche Bande für die pcDNA3.1/RL-transfizierten Zellen zu sehen ist, konnte für die anderen Ansätze, vor dem unspezifischen Hintergrund, kein RNase L-Nachweis erfolgen.

3.3.9 HAV-RNA induziert die Degradation ribosomaler RNA in HeLa-Zell-Extrakten

Vorangegangene Befunde wiesen auf eine Aktivierung des OAS/RNase L-Systems in HAV-infizierten Zellen hin, deren rRNA verstärkte Degradationsmuster aufwiesen (vgl. Abb. 17; Abb. 26). Die Aktivierung der OAS könnte durch doppelsträngige Replikationsintermediate, aber auch durch sekundärstruktureiche virale ssRNA erfolgen. Um das OAS-aktivierende

Potential der HAV-RNA zu betrachten, wurden mit dem Plasmid pHAV/7 *in vitro*-Transkripte mit der HAV-Sequenz in Plusstrangorientierung hergestellt (2.2.13.2). In Anlehnung an Experimente von HAN UND BARTON (2002) sowie WASHENBERGER ET AL. (2007) wurden diese HAV-Transkripte in unterschiedlichen Konzentrationen in HeLa S10-Extrakten inkubiert (2.2.25). Die Aktivierung des OAS/RNase L-Systems wurde anhand der Degradation von rRNA beurteilt. Es zeigte sich ab einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ der *in vitro*-Transkripte ein Abbau ribosomaler RNA mit einem Banden-Muster, welches dem von poly(IC)-behandelten Proben gleich (Abb. 30). Unter Berücksichtigung der unvollständigen Produkte der *in vitro*-Transkription kann für 25 $\mu\text{g/ml}$ RNA eine verwendete Stoffmengenkonzentration von etwa 20 nM angenommen werden. HAV-ssRNA in Form des Produktes einer *in vitro*-Transkription ist also in der Lage, die OAS zu aktivieren.

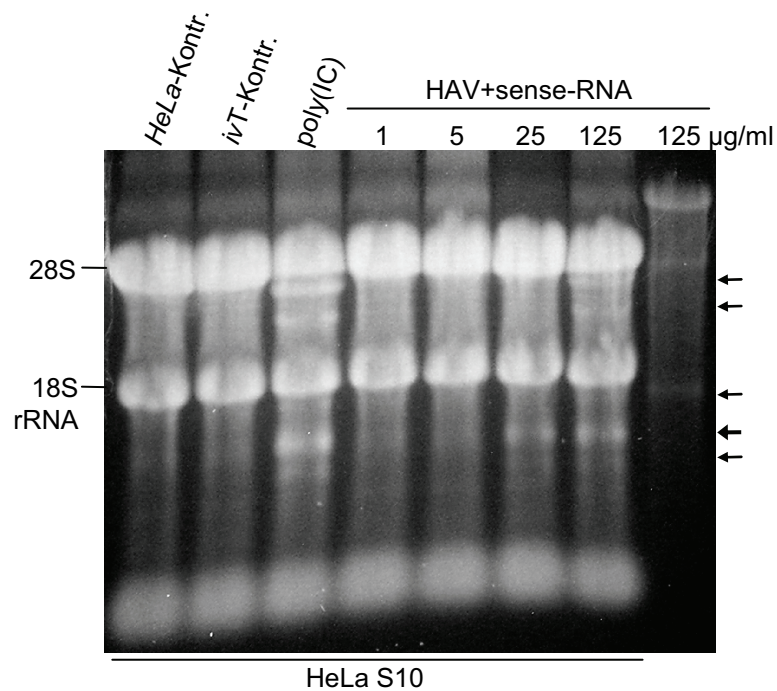


Abb. 30: Inkubation von HeLa S10-Extrakten mit HAV-RNA. *In vitro*-Transkripte mit der Sequenz von HAV-Plusstrang-RNA wurden in unterschiedlichen Konzentrationen zusammen mit HeLa S10-Extrakten für 2 h bei 30 °C inkubiert. Nach der Extraktion wurde die RNA auf einem denaturierendem Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Mit poly(IC) inkubierte HeLa S10-Extrakte (*poly(IC)*) weisen verglichen mit ohne Zusätze inkubierten Ansätzen (*HeLa-Kontr.*) das typische Degradationsmuster der rRNA auf, welches durch die Aktivierung der RNase L entsteht. In schwächer ausgeprägter Form finden sich diese Abbaubanden (Pfeile) auch bei den mit HAV-RNA inkubierten Ansätzen ab einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$, nicht aber bei der Zugabe von Material einer Mock-*in vitro*-Transkription, die ohne RNA-Polymerase durchgeführt wurde (*ivT-Kontr.*).

3.4 Untersuchung der HAV-Replikation im Kontext einer differentiellen RNase L-Expression

3.4.1 FRhK-4/RLI(+)-Zellen weisen keine erhöhten RLI-mRNA-Level auf

Die zur Verfügung stehenden FRhK-4/RLI(+)-Zellen hätten ein geeignetes System darstellen sollen, um die Replikation des Hepatitis A-Virus in Gegenwart einer verminderten RNase L-Aktivität zu betrachten. Bei Experimenten von KURTH (2001) und HEITMANN (2002) hatten die FRhK-4/RLI(+)-Zellen eine gesteigerte Replikationseffizienz für HAV gezeigt, welche der Überexpression des RLI zugeschrieben wurde. Allerdings konnte bei Untersuchungen mittels *real-time* RT-PCR in diesen Zellen keine Erhöhung des RLI-mRNA-Niveaus im Vergleich zu normalen FRhK-4-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 31). Daher wurden andere Systeme für diese Fragestellung verwendet.

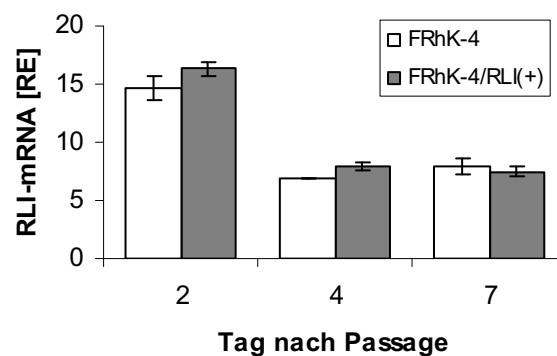


Abb. 31: Level der RLI-mRNA in FRhK-4- und FRhK-4/RLI(+)-Zellen. FRhK-4- und FRhK-4/RLI(+)-Zellen wurden passagiert und 2, 4 bzw. 7 Tage später geerntet. Nach der Extraktion der RNA erfolgte die Quantifizierung der RLI-mRNA mittels *real-time* RT-PCR. Die Daten wurden auf mitgeführte Standardreihen bezogen und auf die GAPDH-mRNA normalisiert. Dargestellt sind die relativen Einheiten [RE] der RLI-mRNA zu den entsprechenden Zeitpunkten als Mittelwert aus Doppelansätzen mit der jeweiligen Standardabweichung.

3.4.2 Konstruktion eines RNase L-überexprimierenden Systems auf pcDNA3.1-Basis

Um die Bedeutung der RNase L-Aktivität für das Hepatitis A-Virus zu untersuchen, sollten Systeme konstruiert werden, in denen diese erhöht bzw. erniedrigt wird. Hierbei war besonders Letzteres von Interesse, sollte doch eine Erniedrigung der RNase L-Aktivität zu einer deutlichen Erhöhung der HAV-Replikation führen, wenn das Virus das RNase L-System zur Kontrolle der eigenen Replikation nutzt.

Die für die humane RNase L codierende Sequenz lag in dem Plasmid ZC-5.1 vor und sollte in den Expressionsvektor pcDNA3.1 umkloniert werden. Die codierende Sequenz wurde mit einem *HindIII*-Verdau aus ZC5.1 ausgeschnitten und nach einer Aufreinigung durch eine

LMP-Agarosegelelektrophorese mit folgender Extraktion (2.2.9.6) in den Vektor pcDNA3.1 ligiert (2.2.11.6), welcher zuvor ebenfalls mit *Hind*III geschnitten, dephosphoryliert (2.2.11.5) und aufgereinigt worden war. Das so gewonnene Plasmid pcDNA3.1/RL sollte nach Transfektion die Überexpression der RNase L in Zellkultur ermöglichen.

In HASSEL ET AL. und ZHOU ET AL. (1993) war eine, carboxyterminal um 89 Aminosäurereste verkürzte, Form der RNase L beschrieben worden, welche in *trans* einen dominant negativen Effekt auf die Aktivität der normalen RNase L ausübt. Die entsprechende Sequenz dieser murinen, trunkierten Form lag mit dem Plasmid ZB1 vor. Dieses wurde mit *Sac*I geschnitten, worauf eine *blunt end*-Generierung mit dem Klenow-Fragment und ein Verdau mit *Kpn*I durchgeführt wurde. Nach einer Aufreinigung über LMP-Agarose erfolgte die Ligation mit dem Vektor pcDNA3.1. Dieser war zuvor mit *Hind*III verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt (2.2.11.2), mit *Kpn*I geschnitten, dephosphoryliert und aufgereinigt worden. Das erhaltene Plasmid pcDNA3.1/RL_Dneg sollte bei Expression in Zellkultur zu einer Suppression der zellulären RNase L-Aktivität führen.

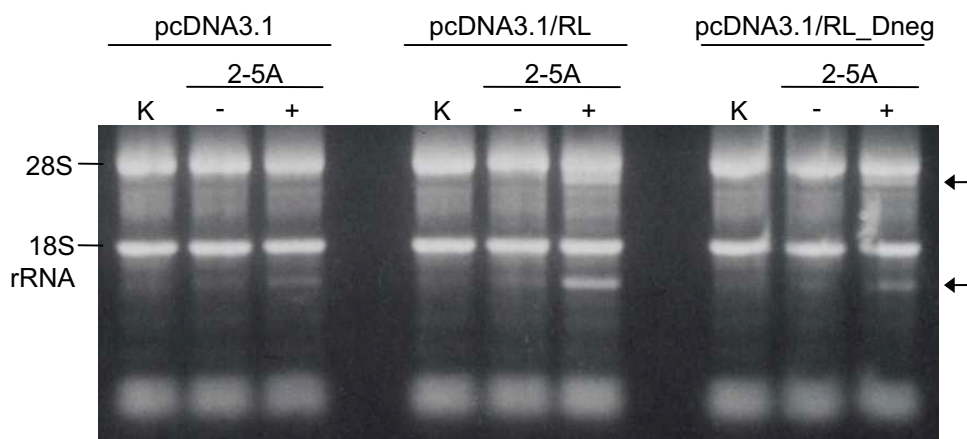


Abb. 32: Aktivierung der RNase L in FRhK-4-Lysaten nach Transfektion von pcDNA3.1-basierten RNase L-Expressionsvektoren. FRhK-4-Zellen wurden über die Calciumphosphat-Methode mit dem Leervektor pcDNA3.1 bzw. den Expressionsvektoren pcDNA3.1/RL oder pcDNA3.1/RL_Dneg transfiziert, wobei je 20 µg Plasmid-DNA pro 10 cm-Schale eingesetzt wurden. 2 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und ein rRNA-Abbau-Assay durchgeführt. Hierbei wurden die Proben für 15 min bei 30 °C mit einer 2-5A-Präparation als RNase L-Aktivator (+) oder einer entsprechenden Kontrollpräparation ohne 2-5A-Anreicherung (-) inkubiert. Unbehandelte Lysate wurden als Kontrolle mitgeführt (K). Nach der Inkubation wurde die RNA extrahiert und in einem 1,6%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Pfeile zeigen die Degradationsprodukte unterhalb der 28S und 18S rRNA, die bei Vorliegen einer pcDNA3.1/RL-Transfektion deutlich stärker induziert werden können. Die pcDNA3.1/RL_Dneg-transfizierten Zellen zeigen, verglichen mit den Leervektor-transfizierten Ansätzen, keine Abschwächung der Reaktion auf den RNase L-Aktivator.

Um die pcDNA3.1-Konstrukte auf ihre Funktionalität zu überprüfen, wurden sie in FRhK-4-Zellen transfiziert (2.2.14.1), deren RNase L-Aktivitätspotential nachfolgend mit dem rRNA-Abbau-Assay betrachtet wurde (Abb. 32). Hierbei wiesen die mit pcDNA3.1/RL transfizierten Zellen eine erhöhte RNase L-Aktivierbarkeit auf und zeigten somit den Phänotyp einer funktionalen RNase L-Überexpression. Die pcDNA3.1/RL_Dneg-Transfektion, deren Ziel eine reduzierte Aktivierbarkeit der endogenen RNase L sein sollte, blieb allerdings ohne derartigen Effekt.

Zur Etablierung einer stabilen Transfektion (2.2.14.3) wurde pcDNA3.1/RL und auch pcDNA3.1/RL_Dneg mit der Calciumphosphat-Methode in FRhK-4-Zellen eingebracht. Nach einer Selektion auf erfolgreich transfizierte, G418-resistente Zellen wurden mehrere Klone gepickt. Die FRhK-4/pcDNA3.1/RL-Klone wurden mit der *real-time* RT-PCR auf eine Erhöhung des RNase L-mRNA-Levels untersucht. Drei der Klone zeigten hierbei höhere Level, die maximal das 4fache von Kontrollzellen betragen (Abb. 33A). Die Überprüfung der FRhK-4/pcDNA3.1/RL_Dneg-Klone erfolgte nicht mit der *real-time* RT-PCR, weil die etablierten Primer nicht für die Sequenz der murinen, trunkierten RNase L-Form geeignet waren. So wurde lediglich die Expression der plasmidcodierten mRNA, mit Primern spezifisch für die murine RNase L, in einer RT-PCR nachgewiesen. Dies gelang für zwei Klone, wobei die exprimierte mRNA in sehr geringen Mengen vorlag (Abb. 33B). Diese beiden Klone waren auch die einzigen, in denen die Plasmid-DNA nachweisbar war. Während ein Nachweis der RNase L im Western Blot für transient transfizierte Zellen erfolgreich war, konnte das Protein in den Zellklonen, wie auch in unbehandelten FRhK-4-Zellen, nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. 29).

Die FRhK-4/pcDNA3.1/RL_Dneg-Klone wiesen, wie auch die transient transfizierten Zellen zuvor, im rRNA-Abbau-Assay nicht die bezweckte reduzierte RNase L-Aktivierbarkeit auf. Allerdings war auch für die stabil RNase L-überexprimierenden FRhK-4/pcDNA3.1/RL-Klone kein Effekt mehr nachweisbar und sie glichen in ihrem Aktivierungspotential normalen FRhK-4-Zellen. In einer durchgeführten Infektionskinetik waren keine signifikanten Replikationsunterschiede von HAV in FRhK-4-Zellen und den Zellklonen zu finden.

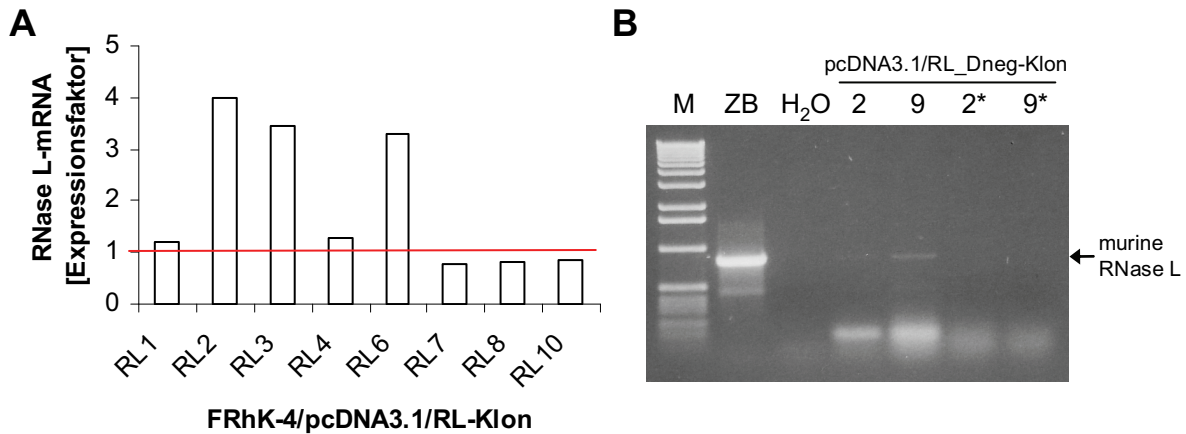


Abb. 33: Überprüfung stabil mit pcDNA3.1/RL und pcDNA3.1/RL_Dneg transfizierter FRhK-4-Klone. A: Die RNase L-mRNA der stabil mit pcDNA3.1/RL transfizierten Zellklone wurde mit der *real-time* RT-PCR quantifiziert. Die normalisierten Werte der Klone wurden durch den Mittelwert zweier stabil mit dem Leervektor transfizierter Zellklone dividiert und somit relativ zu diesen als Expressionsfaktor dargestellt. Die rote Linie kennzeichnet eine unveränderte Expression. Die Zellklone RL2, RL3 und RL6 weisen eine bis zu 4fache Erhöhung der RNase L-mRNA-Expression auf. B: Die mRNA der murinen, trunkierten RNase L-Variante konnte über eine RT-PCR, mit für die murine RNase L spezifischen Primern, in zwei Zellklonen nachgewiesen werden. Je 2 µg DNA-freier RNA der stabil mit pcDNA3.1/RL_Dneg transfizierten Zellklone wurden in die RT-PCR eingesetzt. Das Plasmid ZB1 diente als Positivkontrolle (ZB), die mit * gekennzeichneten Ansätze wurden ohne Zugabe der Reversen Transkriptase behandelt. Bei den Klonen Nr. 2 und 9 konnte ein schwaches positives Signal nachgewiesen werden, alle anderen waren negativ (nicht gezeigt) (M: "1kbp"-Marker; H₂O: Wasserkontrolle).

3.4.3 Konstruktion eines RNase L-überexprimierenden Systems auf Basis des potenten Expressionsvektors pI.18

Ein Grund für das funktionale Versagen der pcDNA3.1-basierten Expressionssysteme, im Bezug auf stabil transfizierte Zellklone, könnte in einer nicht genügend ausgeprägten Expressionsstärke liegen. Möglicherweise reichte die erzielte Überexpression, die schwächer ausfiel als erwartet, nicht für einen nachweisbaren Effekt im rRNA-Abbau-Assay. In vorangegangenen Untersuchungen waren bereits positive Erfahrungen mit dem Expressionsvektor pI.18 gemacht worden, der zwischen CMV-Promotor und MCS eine, von zwei Exon-Sequenzen (Splice-Donor/Akzeptor) flankierte, Intron A-Sequenz enthält, die im Zuge ihrer Prozessierung aus der prä-mRNA herausgeschnitten wird, was zu einer erheblichen Steigerung der Expressionsraten führt (MAGULSKI, 2007). Daher sollte versucht werden, ein Expressionssystem auf pI.18-Basis zu etablieren.

Um möglichst die RNase L der FRhK-4-Zellen überexprimieren zu können, wurde versucht, die cDNA des entsprechenden Transkriptes per RT-PCR zu gewinnen. Da noch keine Sequenzdaten über die *Macaca mulatta*-RNase L vorlagen, wurde die bekannte Sequenz für die humane RNase L verwendet (ZHOU ET AL., 1993; GenBank/EMBL-Accession-Nr.: L10381), um Primer für das 5'- und das 3'-Ende der codierenden Region zu generieren.

Zusätzlich wurde ein Primer für ein trunkiertes 3'-Ende erstellt, der es erlauben sollte, eine Sequenz zu gewinnen, die für eine, der murinen dominant negativen Form äquivalente, carboxyterminal um 89 AS verkürzte RNase L codiert. Die Primer wurden für die geplanten Klonierungsarbeiten mit 5'-endständigen *KpnI*- bzw. *SalI*-Schnittstellen versehen. Allerdings war es weder mit Gesamt-RNA-Präparationen noch mit isolierter poly(A)⁺-RNA (2.2.9.2) möglich, aus FRhK-4-Zellmaterial, mit diesen Primern ein RT-PCR-Produkt zu erhalten. Daher wurde die in ZC5.1 vorliegende, für die humane RNase L codierende, Sequenz als Template herangezogen.

Nach Abschluss der praktischen Arbeiten wurde die *Macaca mulatta*-RNase L-cDNA von GOSWAMI UND KULKA aus FRhK-4-Zellen gewonnen und sequenziert (nur GenBank/EMBL-Veröffentlichung, Accession-Nr.: DQ644021). Ein Vergleich mit dieser Sequenz zeigte, dass der in dieser Arbeit erfolglos verwendete Sense-Primer am 3'-Ende zwei Fehlpaarungen zu der Makakensequenz aufwies. Daher war die Amplifikation eines Produktes der reversen Transkription mit den gewählten Primern nicht möglich.

Die PCR-basierte Strategie wurde für die Umklonierung der RNase L aus ZC5.1 beibehalten, weil somit zum einen die neue trunkierte Variante unabhängig von der murinen Sequenz erzeugt werden konnte und zum anderen in einem Parallelansatz, über den Sense-Primer, eine Kozak-Sequenz eingefügt werden sollte. Da die Konstrukte mit der neuen Kozak-Konsensussequenz keine Vorteile brachten, wird hier nicht weiter auf diese eingegangen. Der für die humane RNase L codierende Bereich aus ZC5.1 wurde in normaler Länge und als trunkierte Variante mittels PCR amplifiziert und über die angefügten *KpnI*- und *SalI*-Schnittstellen in den pI.18-Vektor inseriert. Die resultierenden Konstrukte waren pI.18/RL und pI.18/RLΔ.

Um die Konstrukte auf ihre Funktionalität zu überprüfen, wurden FRhK-4-Zellen mit ihnen transfiziert und nachfolgend auf die Expression der RNase L, sowie das Verhalten im Aktivitätsnachweis mit dem rRNA-Abbau-Assay untersucht. Die erfolgreiche Expression der plasmidcodierten humanen RNase L konnte mit der indirekten Immunfluoreszenz (2.2.8.2) dargestellt werden. Das trunkierte RLΔ-Protein konnte ebenso nachgewiesen werden (Abb. 34). Im rRNA-Abbau-Assay wiesen die pI.18/RL-transfizierten Zellen eine stark erhöhte RNase L-Aktivierbarkeit auf (Abb. 35). pI.18/RL stellte einen deutlich potenteren Expressionsvektor dar als pcDNA3.1/RL. Während ein funktionales System für die Überexpression der RNase L hergestellt war, konnte für das pI.18/RLΔ-codierte Protein, wie schon für sein murines Vorbild, keinerlei dominant negativer Effekt gezeigt werden. Es wurde

beschlossen, zu versuchen, die Erniedrigung der RNase L-Aktivität über eine siRNA-vermittelte Runterregulation der RNase L zu realisieren.

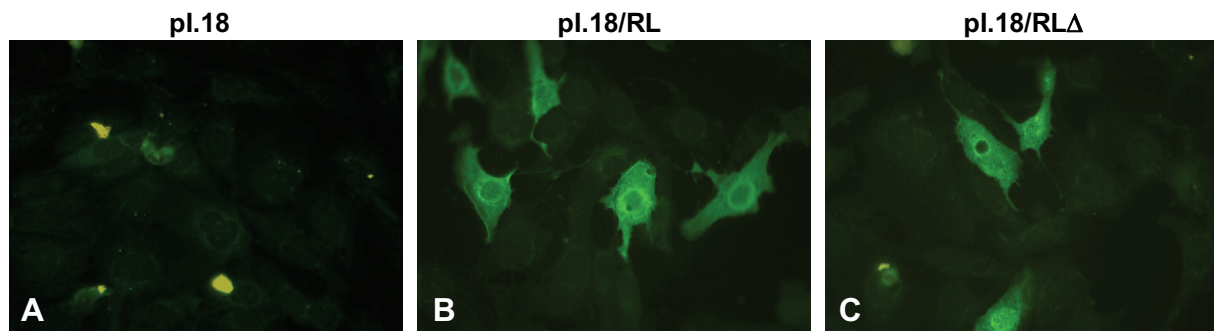


Abb. 34: Nachweis einer Expression der vektorcodierten RNase L-Varianten nach Transfektion in FRhK-4-Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz. Auf Deckgläschen in 12-Well Mikrotiterplatten kultivierte FRhK-4-Zellen wurden unter Verwendung von jetPEI mit 1,2 μ g pl.18, pl18/RL oder pl.18/RL Δ transfiziert. 24 h später wurden die Zellen fixiert und die RNase L mittels indirekter Immunfluoreszenz dargestellt. Die Bilder wurden bei 400facher Vergrößerung aufgenommen. Während die mit dem Leervektor pl.18 transfizierten Zellen lediglich eine Grundfluoreszenz zeigen (A), finden sich in dem pl.18/RL-transfizierten Ansatz deutlich grün fluoreszierende Zellen, welche die RNase L überexprimieren (B). Die Transfektion des pl.18/RL Δ führte ebenfalls zu einer nachweisbaren Expression der trunkierten RNase L-Variante (C).

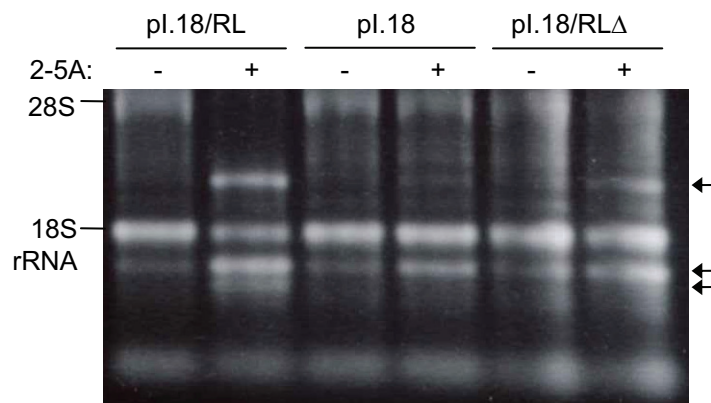


Abb. 35: Aktivierung der RNase L in FRhK-4-Lysaten nach Transfektion von pl.18-basierten RNase L-Expressionsvektoren. FRhK-4-Zellen wurden über die Calciumphosphat-Methode mit dem Leervektor pl.18 bzw. den Expressionsvektoren pl.18/RL oder pl.18/RL Δ transfiziert, wobei je 20 μ g Plasmid-DNA pro 10 cm-Schale eingesetzt wurden. 2 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und ein rRNA-Abbau-Assay durchgeführt. Hierbei wurden die Proben für 15 min bei 30 °C mit einer 2-5A-Präparation als RNase L-Aktivator (+) oder einer entsprechenden Kontrollpräparation (-) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die RNA extrahiert und in einem 1,6%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Pfeile zeigen die Degradationsprodukte unterhalb der 28S und 18S rRNA. Die Transfektion von pl.18/RL führte zu einer extremen Verstärkung der induzierbaren Degradationsaktivität, während durch pl.18/RL Δ kein dominant negativer Effekt vermittelt wurde.

Um stabil RNase L überexprimierende Zellen zu etablieren, wurden FRhK-4-Zellen jetPEI-vermittelt mit pl.18/RL transfiziert, wobei eine Cotransfektion mit pSV2neo durchgeführt wurde, um Transfektanten mit G418 selektieren zu können. Aus der G418-resistenten Zellpopulation wurden mehrere Klone gepickt und nach Anzucht mit der *real-time* RT-PCR auf einen erhöhten RNase L-mRNA-Level untersucht. Mit FRhK-4/pl.18/RL-Klon 6 konnte

ein Zellklon mit fast 20fach erhöhtem Level identifiziert werden (Abb. 36). Dieser wurde weiter kultiviert und schließlich einige Passagen später weiteren Untersuchungen unterzogen.

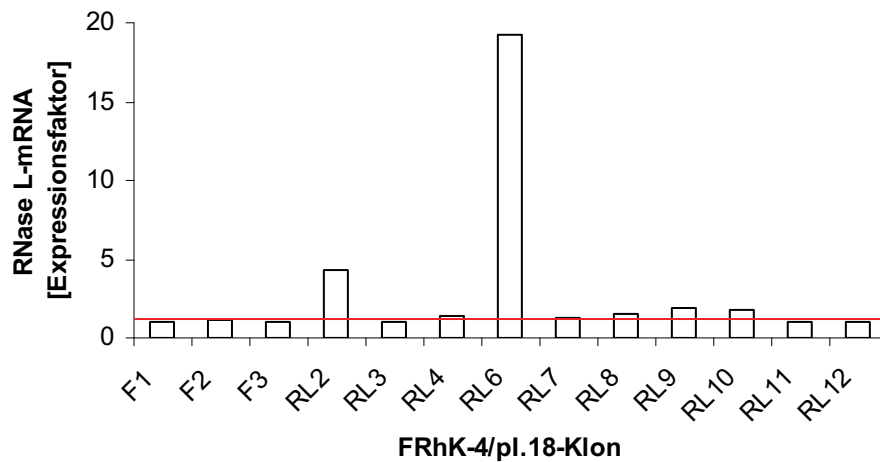


Abb. 36: Überprüfung stabil mit pl.18/RL transfizierter FRhK-4-Klone mittels *real-time* RT-PCR. Die RNase L-mRNA der stabil mit pl.18/RL transfizierten Zellklone wurde mit der *real-time* RT-PCR quantifiziert. Die normalisierten Werte der Klone wurden durch den Mittelwert zweier stabil mit dem Leervektor pl.18 transfizierter Zellklone dividiert und somit relativ zu diesen als Expressionsfaktor dargestellt. Die rote Linie kennzeichnet eine unveränderte Expression. Die Proben F1-3 stellen Kontroll-FRhK-4-Zellen dar. Mit FRhK-4/pl.18/RL-Klon 6 konnte ein Zellklon mit einem um ca. 20fach erhöhten RNase L-mRNA-Level identifiziert werden.

Ein Nachweis der RNase L-Überexpression im Western Blot war nicht erfolgreich, daher wurde versucht, sie in der indirekten Immunfluoreszenz darzustellen. Da die Beurteilung etwaiger leichter Signalunterschiede zwischen verschiedenen Präparaten schwerfiel, wurden stabil transfizierte Zellen zusammen mit untransfizierten FRhK-4-Zellen auf gemeinsamen Deckgläschen kultiviert und analysiert, wobei die Populationen durch eine Deckgläschen-Wand getrennt wurden. Ein nun besser möglicher Vergleich mit der indirekten Immunfluoreszenz zeigte keine nachweisbare Steigerung der RNase L-Menge in den stabil mit pl.18/RL transfizierten Zellen (Abb. 37A). Die Kontrolle der RNase L-Aktivierbarkeit in den Zellklonen, über den rRNA-Abbau-Assay, wies ebenfalls keine signifikante Veränderung zu den Kontrollzellen auf (Abb. 37B). Dieses Phänomen, dass sich stabil transfizierte Zellklone mit einem initial erhöhten RNase L-mRNA-Level schaffen ließen, die dann aber zu einem späteren Zeitpunkt, wenn die kultivierte Zellmenge weitere Analysen zuließ, keine Anzeichen einer RNase L-Überexpression mehr aufwiesen, zog sich durch alle Versuche ein stabil RNase L-überexprimierendes System zu schaffen.

Das Kulturwachstum der mit den RNase L-Expressionsvektoren transfizierten Zellen verlief langsamer als bei Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert worden waren. Diese Beobachtung, zusammen mit einer erhöhten Apoptoseneigung in der Kultur, findet sich auch in der Literatur (CASTELLI ET AL., 1997; ZHOU ET AL., 1998). CASTELLI ET AL. (1997)

vermuten, dass das verlangsamte Kulturwachstum auf einer erhöhten Todesrate der Zellen beruht und nicht auf einer verlangsamten Proliferation. Ein verstärktes Absterben von Zellen war während der Kultivierung allerdings nicht aufgefallen.

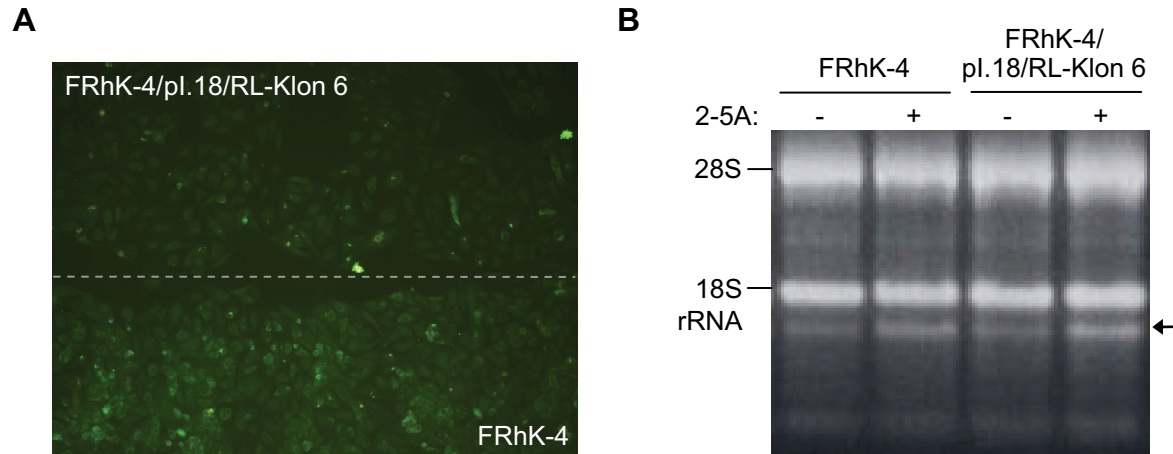


Abb. 37: Stabil pl.18/RL-transfizierte FRhK-4-Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz und dem rRNA-Abbau-Assay. (A) FRhK-4-Zellen (*unten*) und FRhK-4/pl.18/RL-Klon 6-Zellen (*oben*) wurden, von einem senkrechten Deckgläschen getrennt (*Linie*), auf einem gemeinsamen Deckgläschen kultiviert, fixiert und mit der indirekten Immunfluoreszenz auf eine nachweisbare RNase L-Überexpression untersucht. In den Klon-6-Zellen kann keine, gegenüber den FRhK-4-Zellen gesteigerte, Signalstärke der grünen FITC-Fluoreszenz des sekundären Antikörpers ausgemacht werden. (B) Mit FRhK-4-Zellen und FRhK-4/pl.18/RL-Klon 6-Zellen wurde ein rRNA-Abbau-Assay durchgeführt. Hierbei wurden die Proben für 15 min bei 30 °C mit einer 2-5A-Präparation als RNase L-Aktivator (+) oder einer entsprechenden Kontrollpräparation (-) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die RNA extrahiert und in einem 1,6%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Der *Pfeil* zeigt die Degradationsprodukte unterhalb der 18S rRNA. Eine, auf eine Erhöhung des RNase L-Levelns hinweisende, deutlich erhöhte Aktivierbarkeit ist nicht zu erkennen. Auch verlängerte Inkubationszeiten zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen auf.

3.4.4 Konstruktion eines siRNA-basierten Knock Down-Systems für die Reduktion der RNase L-Expression

Da eine negative Beeinflussung der RNase L-Aktivität mit der Expression potentiell dominant negativer Varianten des Enzyms nicht erreicht worden war, wurde versucht, ein System mit herabgesetztem RNase L-Aktivierungspotential durch eine siRNA-vermittelte Reduktion der RNase L-Expression zu realisieren. Hierzu wurde ein vektorbasiertes siRNA-Expressionssystem auf der Basis des pRNA-CMV3.1/Neo-Plasmids verwendet. Insetierte siRNA-Kassetten werden hier unter der Kontrolle eines CMV-Promotors zu hairpin-RNAs transkribiert, die in der Zelle zu siRNAs prozessiert werden.

Für die Auswahl der Zielsequenzen wurde der Algorithmus der *siRNA Target Finder*-Software (WANG UND MU, 2004) herangezogen. Da die *Macaca mulatta*-RNase L noch nicht sequenziert war, wurde eine 780 bp cDNA-Sequenz (GenBank/EMBL-Accession-Nr.: CO582600) als Basis genommen, welche im Zuge einer Analyse des Rhesusaffen-

Transkriptom gewonnen worden war und mit 95%iger Sequenzübereinstimmung eine hohe Ähnlichkeit zu der humanen RNase L aufwies (MAGNESS ET AL., 2005). Die vorgeschlagenen 21 nt-langen Sequenzen wurden zur Beurteilung ihrer Spezifität über eine BLAST-Analyse mit vorhandenen makaken und humanen Sequenzen verglichen, bevor eine Auswahl getroffen wurde. Wie sich nach Sequenzierung der *Macaca mulatta*-RNase L herausstellte, weisen die verwendeten Ziel-Sequenzen eine 100%ige Übereinstimmung zu dieser auf. Da die Effizienz von siRNA-Sequenzen sehr unterschiedlich ausfallen kann, wurden drei RNase L-spezifische siRNA-Kassetten synthetisiert und in den Expressionsvektor inseriert (2.2.16). Zusätzlich wurde ein Vektor mit einer Nonsens-Kassette als Kontrollplasmid verwendet.



Abb. 38: Überprüfung der siRNA-Konstrukte auf eine Runterregulation der RNase L-mRNA mittels RT-PCR. FRhK-4-Zellen wurden in 6 cm-Schalen mit 5 µg Plasmid-DNA der siRNA-Vektoren pRNA/RL38 (3), pRNA/RL218 (4) bzw. pRNA/RL465 (5), mit RNase L-spezifischer Sequenz, mittels jetPEI transfiziert. Als Kontrollen wurden pRNA/K (2), mit einer gegen eine Nonsens-Sequenz gerichteten siRNA-Kassette, sowie nicht transfizierte Zellen (1) eingesetzt. Zwei Tage nach der Transfektion wurde die Gesamt-RNA extrahiert und eine RT-PCR durchgeführt. Für den Nachweis der RNase L-mRNA wurden 1 µg, für den Nachweis der β-Aktin-mRNA 0,5 µg DNA-freie RNA aus einer gemeinsamen Verdünnung eingesetzt. Um eine semiquantitative Abschätzung zu ermöglichen, wurde die Reaktion nach unterschiedlichen Zyklenzahlen abgebrochen, um den ersten Zyklus mit einem im Agarosegel nachweisbaren Produkt zu ermitteln. Das erste unter UV-Licht erkennbare Produkt trat bei der β-Aktin-RT-PCR für alle Ansätze nach dem 14. Zyklus auf (*unten, s. Kreis*). Die RNase L-RT-PCR für die untransfizierten und die pRNA/K-transfizierten FRhK-4-Zellen lieferten nach dem 28. Zyklus erkennbare Produkte, während die der drei Ansätze mit den siRNA-Expressionsvektoren erst ab dem 29. Zyklus erkennbar waren (*oben, s. Kreise*). Die negativ ausgefallenen Ansätze ohne Reverse Transkriptase sowie die H₂O-Kontrollen sind nicht abgebildet.

Nachdem die siRNA-Kassetten mittels Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft worden waren, wurden sie zur Kontrolle ihrer Funktionalität in FRhK-4-Zellen transfiziert, bei denen dann die Expression der RNase L-mRNA per RT-PCR untersucht wurde. Die PCR-Reaktion wurde nach unterschiedlichen Zyklenzahlen abgebrochen, um über die Ermittlung des ersten Zyklus mit einem in der Agarosegel-Elektrophorese nachweisbarem Produkt eine semiquantitative Aussage zu ermöglichen. Die Ansätze, die mit den drei siRNA-Expressions-

vektoren mit RNase L-spezifischen Sequenzen transfiziert worden waren, lieferten einen Zyklus später ein sichtbares Produkt, als die Ansätze ohne Plasmid oder mit dem Kontrollplasmid. Der Nachweis der β -Aktin-mRNA lieferte für alle Ansätze im selben Zyklus ein visualisierbares Produkt (Abb. 38). Da alle drei konstruierten siRNA-Expressionsvektoren tendenziell vielversprechend aussahen, wurden alle für die nachfolgenden HAV-Infektionskinetiken in transient oder stabil transfizierten Zellen verwendet (s. 3.4.5).

3.4.5 Variationen der RNase L-Expression zeigen keine Auswirkung auf die Replikation des Hepatitis A-Virus

Um den Einfluss eines veränderten RNase L-Levels auf die Replikation des Hepatitis A-Virus und den Erhalt einer persistenten Infektion zu betrachten, wurden Infektionsversuche vor dem Hintergrund einer mit den konstruierten Vektorsystemen beeinflussten RNase L-Expression durchgeführt.

Persistent infizierte FRhK-4-Zellen wurden mit den siRNA-Expressionsvektoren oder dem RNase L-Expressionsvektor pI.18/RL transfiziert, um eine mögliche Beeinflussung des etablierten HAV-Levels zu untersuchen. Die im Zuge des Experiments quantifizierte RNase L-mRNA sollte einen Rückschluss auf die Effizienz der Plasmidkonstrukte ermöglichen. Bei einem Vergleich mit dem RNase L-Level der pRNA/K-transfizierten Zellen wiesen die pRNA/RL38- und pRNA/RL465-transfizierten Ansätze leicht niedrigere Level auf (ca. 80 %), allerdings lagen sie dabei nur etwas unter den nicht transfizierten FRhK-4-Zellen. Das pRNA/RL218-Konstrukt hatte keinerlei Effekt (Abb. 39B). In keinem der Ansätze zeigte sich eine Auswirkung auf den Level der HAV-RNA (Abb. 39A) oder den Titer infektiöser Virionen (2.2.7; nicht gezeigt).

Da die Effizienz der transienten Transfektion für diese Experimente ein Problem darstellen könnte, wurden stabil transfizierte Zellpopulationen etabliert. Um die vorangegangenen Probleme bei dem Versuch der Gewinnung stabil RNase L-überexprimierender Zellen zu umgehen, wurde auf die Selektion von Zellklonen verzichtet und lediglich auf G418-resistente Zellpopulationen selektiert. So standen die Zellen schon in der 3. Passage nach der Transfektion für den Einsatz in die Experimente zur Verfügung. Die mit den siRNA-Expressionsvektoren transfizierten Populationen spiegelten die RNase L-mRNA-Level des vorangegangenen transienten Versuchs wider, wobei die pRNA/RL38- und pRNA/RL465-Populationen nun bei ca. 70 % des Levels der Kontrollpopulation lagen und sich auch etwas deutlicher von den normalen FRhK-4-Zellen absetzten. Die pI.18/RL-Population wies bei dem Ansatz des Experiments eine über mehr als 200fach gesteigerte RNase L-mRNA-

Expression auf (Abb. 40B). Auf die Virusreplikation hatten die unterschiedlichen Zellpopulationen keinen Einfluss, wie die HAV-Titration (Abb. 40A) oder die Quantifizierung per *real-time* RT-PCR (keine Abb.) zeigten. Ein wiederholter Ansatz konnte das Ergebnis bestätigen.

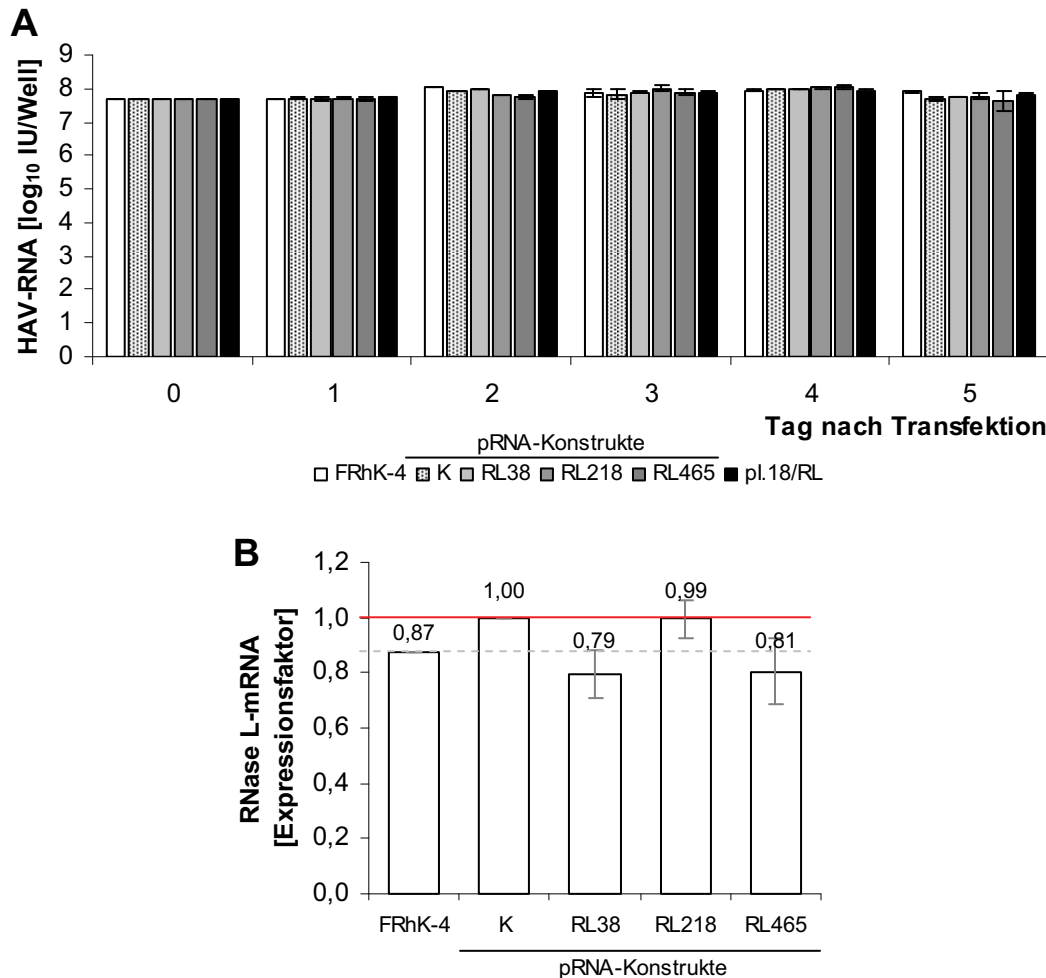


Abb. 39: Transfektion persistent HAV-infizierter FRhK-4-Zellen mit RNase L-Level-modulierenden Vektoren. Persistent HAV-infizierte FRhK-4-Zellen wurden in 6-Well-Platten umgesetzt und einen Tag nach der Passage jetPEI-vermittelt transfiziert, wobei 2,5 µg Plasmid-DNA pro Well verwendet wurden. Es wurden die siRNA-Expressionsvektoren pRNA/RL38, RL218 und RL465 sowie der zugehörige Kontrollvektor pRNA/K verwendet, zusätzlich kam der RNase L-Expressionsvektor pl.18/RL zum Einsatz. Ab der Transfektion erfolgte täglich eine Probenahme um nach einer Freeze & Thaw-Lyse eine HAV-Quantifizierung durchführen zu können. A zeigt die per *real-time* RT-PCR ermittelte Menge von HAV-RNA pro Well als Mittelwerte einer Doppelbestimmung mit Standardabweichung. Der HAV-RNA-Level der persistent infizierten Zellen bleibt konstant auf einem Niveau und weist keine Variationen zwischen den, mit unterschiedlichen Konstrukten transfizierten, Ansätzen auf. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurde die RNase L mittels *real-time* RT-PCR quantifiziert (B). Die normalisierten Daten sind als Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit Standardabweichung dargestellt und auf den Level der pRNA/K-transfizierten Zellen bezogen (*rote Linie*). Im Vergleich zu diesem sind die RNase L-mRNA-Level in den pRNA/RL38- und pRNA/RL465-transfizierten Zellen leicht, auf ca. 80 % reduziert. Allerdings fällt der Unterschied zu den nicht transfizierten FRhK-4-Zellen deutlich kleiner aus (*gestrichelte Linie*). Eine Aussage über die pl.18/RL-transfizierten Ansätze konnte nicht getroffen werden, da trotz DNA-Verdau noch ein RT-unabhängiges Signal (Plasmid-DNA) vorlag.

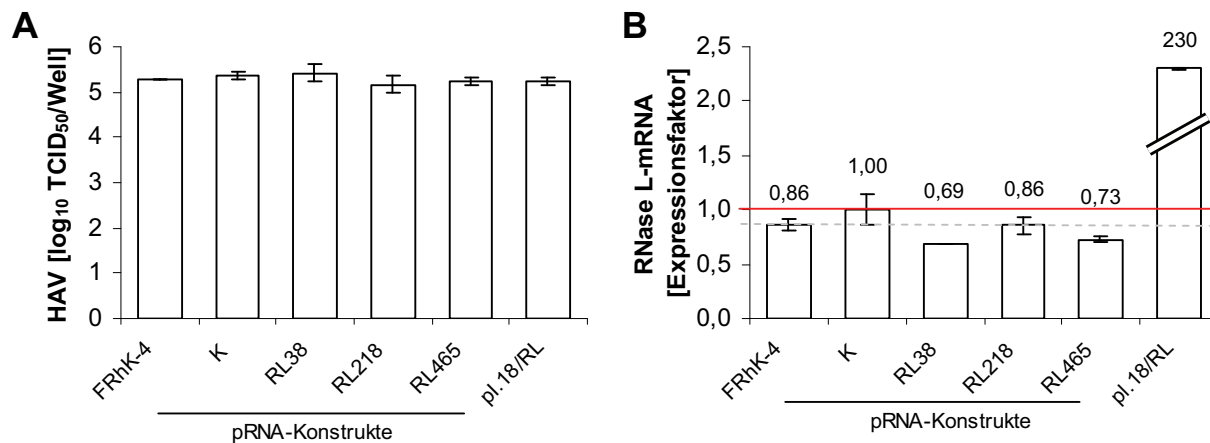


Abb. 40: HAV-Infektion stabil mit RNase L-Level-modulierenden Vektoren transfizierter Zellpopulationen. FRhK-4-Zellen wurden mit den siRNA-Expressionsvektoren pRNA/RL38, RL218 bzw. RL465 oder dem zugehörigen Kontrollplasmid pRNA/K jetPEI-vermittelt transfiziert und mit G418 selektiert. Analog wurde eine mit dem RNase L-Expressionsvektor pl.18/RL und dem resistenzvermittelnden Plasmid pSV2neo transfizierte Zellpopulation etabliert. Die Zellen wurden mit HAV infiziert (MOI = 1) und folgend mittels HAV-Endpunkt titration und indirekter Immunfluoreszenz auf ihren HAV-Titer untersucht. Dargestellt ist der HAV-Titer am 8. Tag p.i. als Mittelwert aus Doppelbestimmungen mit Standardabweichung (A). Ein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Ansätzen ist nicht erkennbar. B zeigt die mittels *real-time* RT-PCR quantifizierte RNase L-mRNA, deren normalisierte Daten als Mittelwerte einer Doppelbestimmung mit Standardabweichung dargestellt und auf den Level der stabil pRNA/K-transfizierten Zellpopulation bezogen sind (*rote Linie*). Für die pRNA/RL38- und pRNA/RL465-transfizierten Populationen zeigen sich RNase L-mRNA-Level von ca. 70 % der pRNA/K-Population. Damit liegen sie ca. 20 % unter den normalen FRhK-4-Zellen (*gestrichelte Linie*). Die pl.18/RL-Population weist mit einem Expressionsfaktor von 230 eine extrem erhöhte RNase L-mRNA-Expression auf, ohne dass sich ein Einfluss auf die HAV-Replikation zeigt.

3.5 Betrachtung der RNase L-Sensitivität des Hepatitis A-Virus

3.5.1 Stabilität der HAV-RNA in poly(IC)-aktivierten HeLa-Zell-Extrakten

Bei Untersuchungen mit dem Poliovirus fanden HAN ET AL. (2007), dass dessen RNA eine Resistenz gegen den Abbau durch die RNase L aufweist. Dies wäre eine Erklärung für die Ergebnisse der HAV-Replikationskinetiken in Gegenwart einer RNase L-Überexpression (3.4.5).

Der für die Resistenz des Poliovirus verantwortliche Sequenzbereich weist keine Homologien zu HAV-Sequenzen auf, dennoch sollte überprüft werden, ob die HAV-RNA generell als RNase L-sensitiv eingestuft werden kann. Zu diesem Zweck wurde mittels *in vitro*-Transkription der in dem Plasmid pHAV/7 codierten HAV-cDNA virale Plusstrang- bzw. Minusstrang-RNA hergestellt (2.2.13.2). Als Kontrolle diente Plusstrang-RNA des CVB3, welche sich RNase L-sensitiv verhält (HAN ET AL., 2007). Als Untersuchungssystem wurden in Anlehnung an Experimente von WASHENBERGER ET AL. (2007) Extrakte von HeLa-Zellen verwendet, deren endogenes OAS/RNase L-System durch die Zugabe von poly(IC) aktiviert

wurde (2.2.25). [α - 32 P] GTP-markierte Produkte der *in vitro*-Transkription wurden in diesem System inkubiert um die Stabilität der viralen RNA in Gegenwart einer aktiven RNase L zu überprüfen. Hierbei wurde, wegen enormer Verlusten, auf eine explizite Aufreinigung der *full length*-Transkripte verzichtet. Es zeigte sich bereits ohne poly(IC)-Aktivierung ein starker Abbau aller eingesetzten viralen RNA-Spezies, was auf eine direkte Aktivierung der OAS durch die *in vitro*-Transkripte zurückführbar sein kann (s. 3.3.9) oder in RNase L-unabhängigen enzymatischen Aktivitäten begründet liegen könnte. Die Zugabe von poly(IC) hatte eine Steigerung der RNA-Degradation zur Folge und stellt den Effekt der aktivierten RNase L dar. Hierbei wies die HAV-RNA keine höhere Stabilität auf als die CVB3-RNA und ist somit als RNase L-sensitiv zu erachten (Abb. 41).

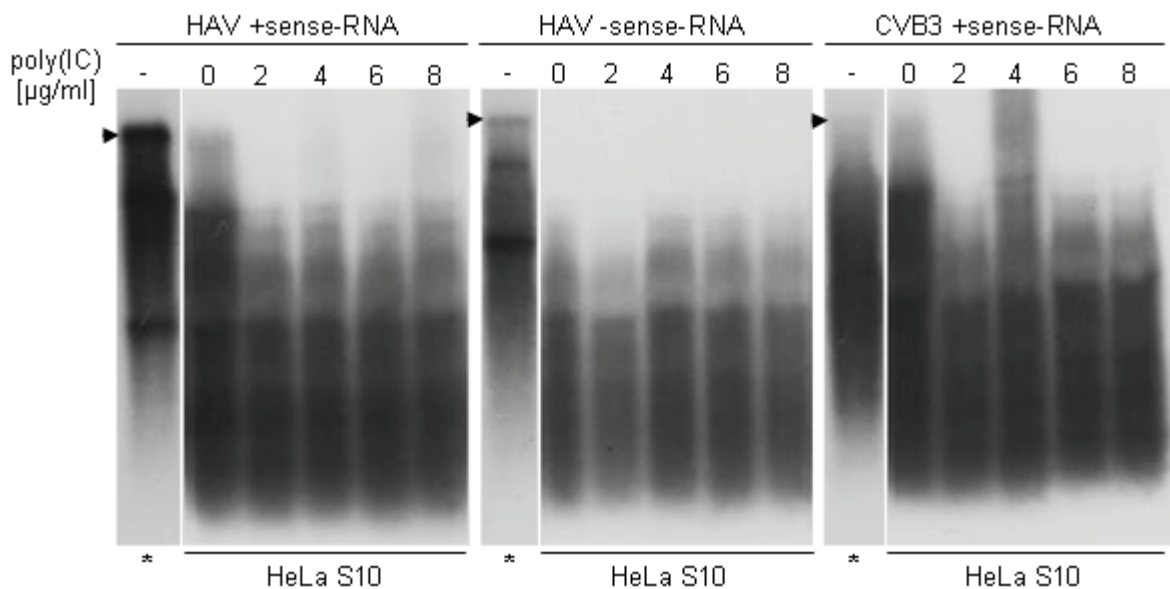


Abb. 41: Darstellung viraler RNA nach Inkubation in poly(IC)-aktivierten HeLa S10-Extrakten. [α - 32 P] GTP-markierte *in vitro*-Transkripte mit der HAV-Sequenz in Plusstrang- bzw. Minusstrangorientierung und der CVB3-Sequenz in Plusstrangorientierung wurden mit einer Konzentration von rund 25 μ g/ml in HeLa S10-Extrakten für 2 h bei 30 °C inkubiert. Eine Aktivierung des OAS/RNase L-Systems erfolgte durch den Zusatz unterschiedlicher Mengen poly(IC). Nach der Extraktion wurde die RNA auf einem denaturierendem Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch visualisiert. Zur besseren Darstellung wurden nicht inkubierte *in vitro*-Transkripte (*) mit einer kürzeren Belichtungszeit abgebildet. Ersichtlich ist eine fast komplette Degradation der viralen *full length*-RNA (▶) infolge der Inkubation in HeLa S10-Extrakten. Durch die Zugabe von poly(IC) wird der Abbau noch weiter verstärkt, erreicht sein Maximum aber bereits bei einer Konzentration von 2 μ g/ml.

3.5.2 Eine RNase L-Überexpression kann die HAV-Infektion einer FRhK-4-Zelle blockieren

Da eine RNase L-Überexpression in den vorangegangenen Infektionsexperimenten (3.4.5) keinerlei Einfluss auf die Replikation des Hepatitis A-Virus gezeigt hatte, sollte die HAV-

bezogene antivirale Wirkung der RNase L mittels indirekter Immunfluoreszenz auf der Ebene einzelner Zellen betrachtet werden. Hierzu wurden FRhK-4-Zellen mit dem pI.18/RL-Plasmid transfiziert und einen Tag später infiziert. 5 Tage p.i. wurden in den Zellen HAV-Antigen und RNase L-Überexpression mit der indirekten Immunfluoreszenz (2.2.8.3) nachgewiesen.

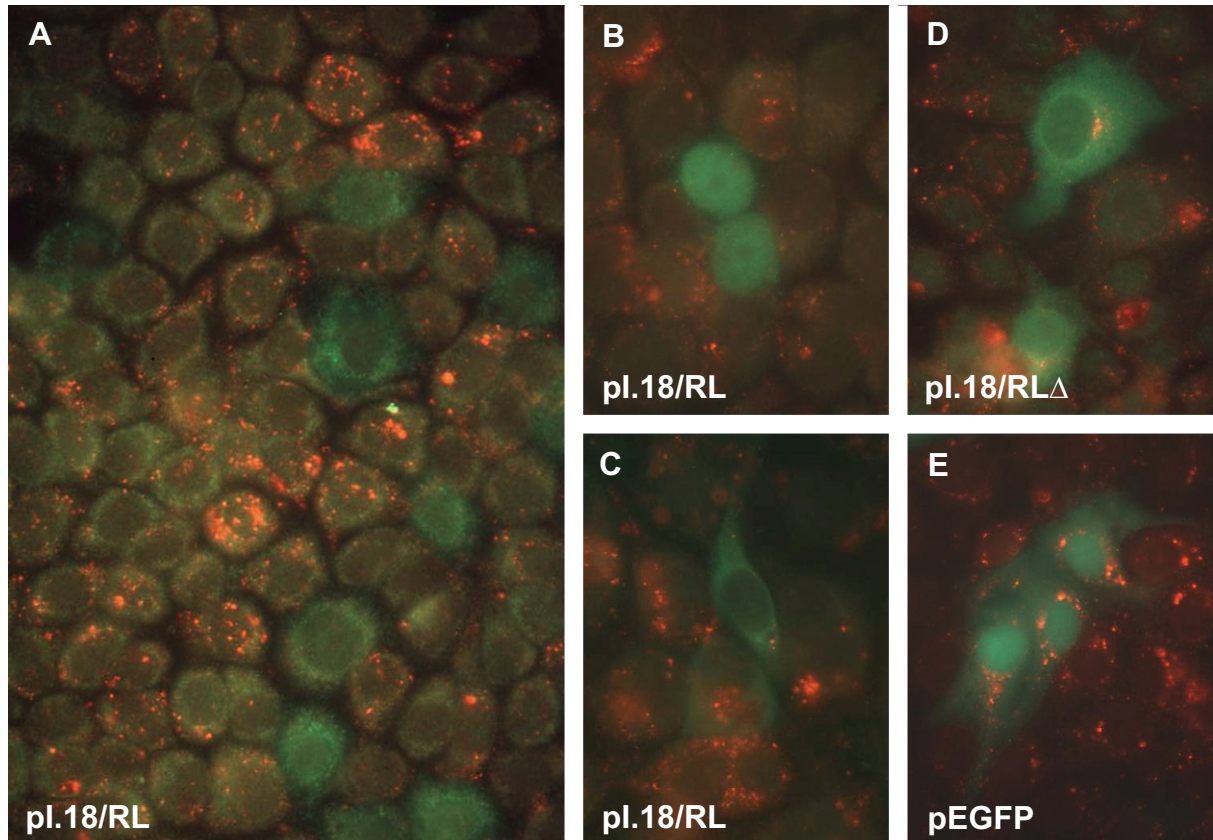


Abb. 42: HAV-Infektion RNase L-überexprimierender FRhK-4-Zellen. FRhK-4-Zellen wurden in Chamber-Slides jetPEI-vermittelt mit 250 ng Plasmid-DNA der Expressionsvektoren pI.18/RL, pI.18/RLΔ oder pEGFP transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion erfolgte eine HAV-Infektion mit einer MOI = 1 und eine weitere Kultivierung für 5 Tage. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die RNase L sowie HAV-Antigen mittels indirekter Immunfluoreszenz dargestellt. Hierbei wurde ein grün fluoreszierender, FITC-markierter sekundärer Antikörper für den Nachweis der RNase L verwendet, während ein rot fluoreszierender, TexasRed-markierter sekundärer Antikörper für den HAV-Nachweis zum Einsatz kam. Die Zellen mit nachweisbarer RNase L-Überexpression wurden auf eine bestehende HAV-Infektion untersucht, wobei für die Bewertung nur Zellen herangezogen wurden, die von infizierten Zellen umgeben waren. Über die Hälfte der erfolgreich pI.18/RL-transfizierten Zellen waren, im Gegensatz zu den umgebenden Zellen, HAV-negativ (A, B). In den anderen konnte HAV-Antigen nachgewiesen werden (C). Mit dem, für die trunkierte, inaktive RNase L-Variante codierenden, pI.18/RLΔ-Plasmid transfizierte Zellen waren durchgehend HAV-positiv (D). Ebenso zeigten mit dem GFP-Expressionsplasmid pEGFP transfizierte Zellen keinerlei Interferenz der, per Transfektion vermittelten, Expression mit der Infektion (E). Die Bilder wurden bei 200 bzw. 400facher Vergrößerung unter Verwendung eines Kombifilters aufgenommen (Anregung: 485 und 578 nm; Emission 515-540 nm und > 610 nm).

Eine Beurteilung von komplett mit infizierten Zellen umgebenen, RNase L-überexprimierenden Zellen zeigte, dass über 50 % von ihnen HAV-negativ waren. Als Kontrolle waren weitere Ansätze mit dem GFP-Expressionsplasmid pEGFP oder mit pI.18/RLΔ

transfiziert worden. FRhK-4-Zellen, die GFP oder die inaktive RNase L-Variante exprimierten, waren durchgehend HAV-positiv. Dies schloss einen negativen Einfluss der Transfektionsprozedur oder der Belastung der Zellmaschinerie durch die Überexpression aus (Abb. 42). Somit konnte über die Betrachtung einzelner Zellen gezeigt werden, dass eine HAV-Infektion durch eine Überexpression der RNase L blockiert werden kann.

4 Diskussion

Die ohnehin langsame Replikation von Hepatitis A-Viren in Zellkultur erfährt im späteren Verlauf der Infektion eine Runterregulation. Möglicherweise ist ein moderates Replikationsniveau essentiell für die Etablierung der, auf zellulärer Ebene, persistenten Infektion und die Vermeidung zellulärer Abwehrreaktionen. Dieses Prinzip könnte *in vivo* zu der Ausbreitung der Infektion beitragen. Der für die Replikationssuppression verantwortliche Mechanismus wirkt in *trans* auch auf cytopathogene HAV-Varianten und verschiebt deren Replikationscharakter in die Richtung einer nicht-cytopathogenen, persistenten Infektion (BRACK ET AL., 2002).

In dieser Arbeit wurden drei potentielle zelluläre Kandidaten für eine regulierte HAV-Replikationsreduktion untersucht. Klassischerweise gehören das MxA-Protein, die ISG20-Nuklease und das 2',5'-Oligoadenylatsynthetase/RNase L-System zu den interferonstimulierten antiviralen Systemen. Da es im Zuge einer HAV-Infektion aber nicht zu einer IFN-Induktion kommt, könnten sie in diesem Kontext eine abgewandelte Rolle spielen und der viralen Replikationsregulation dienen.

4.1 ISG20- und MxA-Promotoraktivität in Gegenwart einer HAV-Infektion

Sowohl die ISG20-Nuklease als auch das MxA-Protein können inhibierend auf virale Replikationsvorgänge wirken. Für beide Proteine ist die Möglichkeit einer IFN-unabhängigen, direkten Expressionsinduktion durch eine Virusinfektion beschrieben, daher war für sie eine potentielle Rolle in der Replikationsregulation des Hepatitis A-Virus denkbar. Zudem weisen die Promotoren beider Gene Sequenzen für die Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B auf, und zumindest bestimmte Induktionswege für ISG20 sind NF- κ B-abhängig. Das ist im Kontext mit HAV interessant, da es im Zuge der Infektion zu einer NF- κ B-Aktivierung kommt (FENSTERL ET AL., 2005) und Hinweise für eine supprimierende Wirkung des aktivierten NF- κ B auf die HAV-Replikation vorliegen.

Um festzustellen, ob es im Zuge einer HAV-Infektion über eine Steigerung der Promotoraktivität zu einer Expressionsinduktion des ISG20- oder MxA-Gens kommt, wurden Experimente mit Reportergenkonstrukten in FRhK-4-Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich keine erhöhte ISG20-Promotoraktivität nach einer HAV-Infektion (Abb. 12). Dieses Ergebnis wird zusätzlich von den Daten einer Diplomarbeit gestützt (FLACH, 2005).

Auch die Aktivität des MxA-Promotors wurde nicht erhöht, sondern fiel überraschenderweise deutlich niedriger aus als in den Mock-infizierten Kontrollansätzen (Abb. 13). Zudem schien die Promotoraktivität ohne induzierenden Stimulus bereits am Maximum zu liegen. Dieses Ergebnis war konträr zu der Literatur, nach welcher ohne Induktion auch keine MxA-Expression nachweisbar sein sollte (AEBI ET AL., 1989; GOETSCHY ET AL., 1989; HORISBERGER, 1992; RONNI ET AL., 1998).

Auch wenn der HAV-Effekt auf den humanen MxA-Promotor in FRhK-4-Zellen in keinem Zusammenhang zu der Frage einer möglichen Replikationsdrosselung steht, wurde das Phänomen näher betrachtet. Durch die Verwendung eines Kontrollvektors mit einer konstitutiven Expression des Reportergens über einen SV40-Promotor konnte ausgeschlossen werden, dass ein genereller Effekt der HAV-Infektion für die beobachtete Absenkung der MxA-Promotoraktivität verantwortlich war (Abb. 13). Um zu überprüfen, ob es sich um ein Zellsystem-abhängiges Phänomen handelt und der humane MxA-Promotor in FRhK-4-Zellen von *Macaca mulatta* ein anderes Verhalten zeigt als in humanen Zellen, wurden die Experimente in HFS-10-Zellen wiederholt. In den humanen Zellen zeigte sich der erwartete große Unterschied zwischen der basalen Aktivität des MxA-Promotors und der konstitutiven Aktivität des SV40-Promotors. Zudem war keine Veränderung der Aktivität des MxA-Promotors in HAV-infizierten Ansätzen zu detektieren (Abb. 14).

Ein RT-PCR-basierter Nachweis der MxA-mRNA in FRhK-4-Zellen und humanen MRC-5-Zellen zeigte in beiden Systemen, nach einer poly(IC)-Transfektion, eine deutliche Induktion der Expression zelleigener MxA-mRNA. Einflüsse einer HAV-Infektion waren nicht ersichtlich (Abb. 15).

Die Literatur bietet keine Hinweise auf eine basale Expression des zelleigenen MxA-Proteins. Die zugehörige mRNA wird ohne Expressionsinduktion als praktisch nicht nachweisbar beschrieben (AEBI ET AL., 1989; RONNI ET AL., 1998). In dieser Arbeit konnte die MxA-mRNA mittels RT-PCR aber auch in nicht-induzierten Zellen detektiert werden, was mit der Sensitivität der verwendeten Methodik zu erklären ist.

Die unerwartet hohe basale Aktivität des humanen MxA-Promotors in den FRhK-4-Zellen ist zellkontextabhängig. CHANG ET AL. (1991) beschrieben eine solche konstitutive und kaum noch steigerbare Aktivität des humanen MxA-Promotors auch für murine LM-Zellen. In folgenden Untersuchungen wurde ein Repressorelement in der Promotorsequenz identifiziert und postuliert, dass das MxA-Gen im Ruhezustand aktiv reprimiert wird (CHANG ET AL., 1992). In FRhK-4-Zellen dürfte ein anderes Verhalten der Faktoren, welche die Repression

vermitteln, für die konstitutive Aktivität des humanen MxA-Promotors verantwortlich sein. Die gemessene, hohe Promotoraktivität ist also als Artefakt anzusehen, während die RT-PCR-Ergebnisse auf eine erwartungsgemäße Expressionsregulation des entsprechenden zelleigenen Mx-Gens mit deutlichem Induktionspotential hinweisen. Interessanterweise wird die Aktivität des humanen Promotors in diesem System durch eine HAV-Infektion spezifisch vermindert. Dies könnte über eine Beeinflussung des Repressorsystems erfolgen.

GOETSCHY ET AL. (1989) diskutieren im Zusammenhang mit der direkten, virusinduzierten Induktion der MxA-Expression die Hemmung einer Negativregulation des MxA-Gens in Gegenwart von NDV, wodurch es zu einer fortlaufenden Akkumulation des MxA-Proteins kommt. Es ist nicht auszuschließen, dass die möglicherweise beobachtete positive Beeinflussung des MxA-Repressorsystems bei einer HAV-Infektion eine Rolle spielt und neben der Blockade der IFN-vermittelten MxA-Induktion für das Virus von Bedeutung ist. Die meisten bekannten viralen Gegenmaßnahmen scheinen sich nicht direkt auf MxA, sondern vielmehr auf das Signalmolekül Interferon zu beziehen. Lediglich für das Hepatitis B-Virus wurde gezeigt, dass es in der Lage ist, durch direkte Interaktion der *core*-Proteine mit Bereichen des MxA-Promotors dessen IFN-induzierte Aktivität zu inhibieren (FERNÁNDEZ ET AL., 2003).

Die mögliche Regulation der HAV-Replikation über eine Induktion der Genexpression des MxA-Proteins oder der ISG20-Nuklease konnte ausgeschlossen werden. Es kommt in HAV-infizierten FRhK-4-Zellen nicht zu einer Steigerung der Promotoraktivität dieser Gene.

4.2 Interaktionen zwischen HAV und dem OAS/RNase L-System

Eine erhöhte Replikation des Hepatitis A-Virus in Zellen, die stabil mit einem RNase L-Inhibitor-Expressionsvektor transfiziert waren, legte einen Einfluss des OAS/RNase L-Systems auf die HAV-Replikation nahe (GOTTER, 1999; KURTH, 2001; HEITMANN, 2002). Hinweise auf eine Regulation des OAS/RNase L-Systems durch HAV boten Untersuchungen, die ein erhöhtes Aktivierungspotential der RNase L in persistent HAV-infizierten Zellen aufzeigten. In Lysaten persistent infizierter FRhK-4-Zellen konnte, durch die Zugabe externer 2-5A-Präparationen, eine höhere RNase L-Aktivität induziert werden als in Mock-infizierten Zellen (JANSSEN-WEETS, 2002). Dieses erhöhte Aktivierungspotential spricht für einen Einfluss der HAV-Infektion auf der Ebene des Effektorenzyms. Eine Hochregulation der RNase L- oder eine Erniedrigung der RLI-Expression könnte die Aktivierbarkeit dieses

Systems modulieren und somit einen regulierenden Einfluss auf die Replikation des Hepatitis A-Virus ermöglichen.

Im Zuge einer Diplomarbeit konnten die vorangegangenen Ergebnisse bezüglich einer Beeinflussung der RNase L-Aktivierbarkeit durch eine HAV-Infektion von FRhK-4-Zellen auf humane MRC-5-Zellen übertragen werden (MÜTHER, 2003). Auch in MRC-5-Zellen wurde das Potential, die RNase L durch extern zugesetztes 2-5A zu aktivieren, durch eine persistente HAV-Infektion erhöht (Abb. 18). Durch den Nachweis dieses Effektes in einem weiteren, humanen Zelltyp konnte die mögliche Relevanz für das Hepatitis A-Virus unterstrichen werden.

Es wurde versucht, die verwendete Methode zur Bestimmung der RNase L-Aktivität, welche zelluläre rRNA als Substrat verwendet, zu verbessern und ein externes, markiertes Substrat einzusetzen. Somit wäre ein besserer Vergleich größerer Probenanzahlen möglich gewesen, was mit dem herkömmlichen rRNA-Abbau-Assay schwer realisierbar ist.

Die Versuche zeigten zwar die Tendenz der vorangegangenen Ergebnisse und deuteten auch auf eine bestehende Aktivität der RNase L in HAV-infizierten Zellen hin, waren aber aufgrund unspezifischer Degradation des Substrates kaum auswertbar und brachten keine Verbesserung der Methodik (Abb. 19).

Damit ein erhöhtes Aktivierungspotential der RNase L eine Auswirkung auf die potentielle Enzymaktivität in den Zellen haben kann, muss die 2',5'-Oligoadenylatsynthetase vorliegen, um den Aktivator 2-5A synthetisieren zu können. Um darzustellen, dass eine der für die Aktivierung der RNase L relevanten OAS-Formen in FRhK-4-Zellen auch unabhängig von einer IFN-Induktion exprimiert wird, wurde mittels RT-PCR ein Nachweis von OAS1- und OAS2-Transkripten durchgeführt. Es gelang, die basale Expression der OAS2-mRNA in unbehandelten FRhK-4-Zellen nachzuweisen, der OAS1-mRNA-Nachweis verlief hingegen negativ (Abb. 16).

In einer vorangegangenen Arbeit war die Darstellung von OAS-Transkripten mittels Northern Blot nicht erfolgreich gewesen, aber es konnten mit einem polyklonalen anti-OAS-Antikörper mehrere Proteine im Western Blot detektiert werden (WEIß, 2001). Die nachgewiesenen Proteine wichen in ihrer Größe etwas von den beschriebenen humanen Varianten ab, wiesen aber vergleichbare Größenverhältnisse auf. Mit dem, in der vorliegenden Arbeit, erfolgreichen Transkriptnachweis ist davon auszugehen, dass in FRhK-4-Zellen mindestens eine OAS-

Variante basal exprimiert wird, die nach Aktivierung durch dsRNA in der Lage ist, über die Synthese von 2-5A eine Aktivierung der RNase L herbeizuführen.

Dass die basal vorliegenden Komponenten des OAS/RNase L-Systems ausreichen, um auf die Gegenwart von dsRNA mit einer Aktivierung der RNase L zu reagieren, konnte mittels einer poly(IC)-Transfektion gezeigt werden. Sofort im Anschluss an die Transfektionsprozedur trat eine beginnende rRNA-Degradation als Zeichen der RNase L-Aktivität auf (Abb. 17).

Folgend galt es festzustellen, ob das erhöhte RNase L-Aktivierungspotential in HAV-infizierten Zellen durch eine Steigerung der RNase L-Expression oder eine Absenkung der RLI-Expression zu erklären ist.

Es wurde begonnen, einen *Ribonuclease Protection Assay* zum Nachweis der RLI- bzw. RNase L-mRNA zu etablieren, um quantitative Unterschiede der Transkripte zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen festzustellen. Eine Runterregulation der RLI-mRNA deutete sich nicht an, während ein Nachweis der RNase L-Transkripte mit der gewählten Sonde nicht gelang (Abb. 21). Der RPA wurde nicht weiter optimiert, da sich die Möglichkeit ergab, für diese Fragestellung eine quantitative *real-time* RT-PCR zu verwenden, die von RÖSER (2007) etabliert worden war.

Die Wahl einer Bezugsgröße für die Normalisierung der Daten stellte hier ein theoretisches Problem dar. Ursprünglich war eine Normalisierung auf die mRNA des *housekeeping*-Gens GAPDH vorgesehen. Da es aber zu Interaktionen zwischen dem Enzym GAPDH und HAV kommt (SCHULTZ ET AL., 1996b; YI ET AL., 2000; DOLLENMAIER UND WEITZ, 2003), erschien die GAPDH-mRNA als Bezugspunkt ungeeignet. Die ebenfalls etablierte Normalisierung auf die 18S rRNA bot eine Bezugs-RNA, die aber ein Substrat der RNase L darstellt. Allerdings sind ssRNA-Moleküle generell als potentielle RNase L-Substrate anzusehen und in Gegenwart einer aktivierten RNase L sind deutliche Veränderungen des mRNA-Profiles einer Zelle zu beobachten (MALATHI ET AL., 2005), so dass jedes Transkript als potentiell problematisch anzusehen war. Wegen der hohen Abundanz der Bezugs-RNA könnte eine Normalisierung auf die 18S rRNA sogar als stabiler und unempfindlicher für Verfälschungen angesehen werden. Im Laufe der Experimente wurden Normalisierungen auf die 18S rRNA, die eingesetzte Gesamt-RNA-Menge sowie die Zellzahl durchgeführt und verglichen. Hierbei ergaben sich keine abweichenden Resultate.

Quantifizierungen der RLI- und RNase L-mRNA zeigten den für die RNase L beschriebenen Verlauf mit einer Zunahme des Levels während der Konfluenzentwicklung nach einer

Passage (JACOBSEN ET AL., 1983a; KRAUSE ET AL., 1985b) und einer gegenläufigen Tendenz der RLI-mRNA. Eine HAV-Infektion hatte keine Auswirkung auf den Level der RLI-mRNA, wohingegen die RNase L-mRNA mit zunehmender Zeit p.i. in den HAV-infizierten FRhK-4-Zellen höhere Level erreichte als in den Mock-infizierten Zellen (Abb. 22, Abb. 23). Die erhöhten Level der RNase L-mRNA etablierten sich in den infizierten Zellen um den 14. Tag p.i. und korrelierten mit der Stagnation der HAV-RNA-Zunahme (Abb. 24). 21 Tage p.i. erreichte die RNase L-mRNA in HAV-infizierten FRhK-4-Zellen durchschnittlich den 3fachen Level der Mock-infizierten Zellen. Die Infektion wurde hierbei mit einer hohen MOI durchgeführt, um eine simultane Infektion der gesamten Zellkultur zu gewährleisten (MOI = 10). Der Effekt auf den RNase L-mRNA-Level war sowohl in HAV/7- als auch in HAV GBM-infizierten Zellen zu finden.

Um festzustellen, ob ein Einfluss des Hepatitis A-Virus auf die RNase L-mRNA auch nach Etablierung der Persistenz zu finden ist, wurden persistent infizierte FRhK-4-Zellen passagiert und an den nachfolgenden Tagen auf ihre Transkript-Gehalte untersucht. Hier zeigten sich für die HAV-infizierten Zellen regelmäßig leicht höhere RNase L-mRNA-Level als für die Mock-infizierten Zellen (Abb. 25). Die gefundenen Unterschiede überstiegen selten den Faktor 2 und bewegten sich somit in einem Bereich, in dem durchaus noch die Fehlerbreite der Methodik anzusetzen ist. Zur Vermeidung systematischer Fehler wurde die Bearbeitungsreihenfolge der Proben während der Aufreinigung und der Messung variiert. So wurden potentielle Effekte durch zeitlich bevorzugtes Verarbeiten bestimmter Proben verhindert. Zudem wurde ausgeschlossen, dass es zu Sättigungseffekten der RNeasy[®]-Säulen während der RNA-Extraktion kam, die eventuell zu einem Bias in der Repräsentation von RNA-Spezies mit geringer Abundanz führen könnten. Die Unterschiede der mRNA-Level konnten durch eine statistische Analyse verifiziert werden. Ein zweiseitiger t-Test mit den Daten aus 5 unabhängigen Kinetiken beurteilte die Abweichungen der RNase L-mRNA-Expressionslevel zwischen HAV- und Mock-infizierten FRhK-4-Zellen als extrem signifikant ($p < 0,0001$). Auch die RLI-mRNA betreffend traten Differenzen auf, nur lag hier keine Tendenz für eine regelmäßige Erhöhung oder Erniedrigung vor (Abb. 25).

Betrachtet man den quantitativen Verlauf der HAV-RNA in persistent infizierten FRhK-4-Zellen nach einer Passage, so steigt diese leicht an und pendelt sich nach 6 bis 7 Tagen auf einem konstanten Niveau ein. In diesem Zeitraum erreicht auch die RNase L-mRNA ihre höchsten Level (Abb. 26). Die rRNA HAV-infizierter FRhK-4-Zellen weist Degradationspuren auf, die denen gleichen, welche durch RNase L-Aktivierung in Folge einer poly(IC)-

Transfektion auftreten (Abb. 17, BRACK, 1999). Eine derartige rRNA-Degradation konnte auch durch die Inkubation von Zell-Lysaten mit HAV-RNA erzeugt werden (Abb. 30). Zu den Zeitpunkten mit den höchsten HAV-RNA-Leveln nach einer Passage finden sich auch Hinweise auf eine verstärkte Aktivität der RNase L (Abb. 26).

Um Hinweise auf mögliche Mechanismen für die Hochregulation der RNase L-Expression durch eine HAV-Infektion zu erhalten, wurde eine *in silico*-Analyse der Promotorregion des RNase L-Gens von *Macaca mulatta* durchgeführt (Tab. 6, Abb. 28). Die Region wies 92%ige Sequenzübereinstimmung mit dem beschriebenen Promotor des humanen RNase L-Gens auf und enthielt, wie die humane Sequenz, eine Reihe potentieller Transkriptionsfaktor-bindemotive für gewebespezifische Faktoren, wie NGN1/3 (Nervensystem), vErbA (Schilddrüse), PTX1 (Hypophyse), MYOG (Muskel) oder NKX3 (Prostata), sowie für Cytokin- oder Wachstumsfaktor-stimulierte Faktoren wie STAT5, IRF1, SMAD oder STAT1-Homodimere (GAS-Element), und mit SP1 auch eine für *housekeeping*-Gene bekannte Bindesequenz (Zhou et al., 2005). Von besonderem Interesse waren aber Motive für die Bindung des, im Zuge einer HAV-Infektion aktivierten, NF- κ B und des ER-Stress-reaktiven Transkriptionsfaktors ATF6 (*activating transcription factor 6*), auf die später noch eingegangen werden soll.

Der Einfluss des Hepatitis A-Virus auf die RNase L-Expression sollte mittels Western Blot auch auf der Proteinebene untersucht werden. Es gelang aber nicht, die endogene RNase L in FRhK-4-Zellen darzustellen. Lediglich eine transient überexprimierte humane RNase L konnte deutlich nachgewiesen werden.

Eventuell sind die in FRhK-4-Zellen vorliegenden RNase L-Proteinmengen extrem gering, was aber schwer mit der induzierbaren enzymatischen Aktivität zu vereinbaren ist. Der Versuch einer Aufkonzentrierung über eine Immunpräzipitation wäre hier möglich gewesen, allerdings ließen die zahlreichen unspezifischen Banden im Western Blot diesen Ansatz nicht sinnvoll erscheinen. Da der verwendete Antikörper gegen die humane RNase L gerichtet ist, ist er möglicherweise auch nicht in der Lage, die *Macaca mulatta*-RNase L nachzuweisen. Die beiden Proteine unterscheiden sich in 10 % ihrer Sequenz und ein antikörperbasierter Nachweis der humanen Form gelang im Western Blot sowie in der indirekten Immunfluoreszenz.

Wenn das OAS/RNase L-System eine über die RNase L-Expression gesteuerte, regulative Bedeutung für die HAV-Replikation hat, sollte eine Variation des RNase L-Levels und somit der potentiellen RNase L-Aktivität eine Veränderung des HAV-Titers zur Folge haben. Daher sollten Systeme mit erhöhtem oder erniedrigtem RNase L-Aktivierungspotential etabliert werden. Insbesondere ein erniedrigtes Potential würde die Hypothese einer Replikationsregulation unterstützen, wenn es zu einem erhöhten Virustiter führen würde. Von einem erhöhten Potential wäre hingegen eine Titerreduktion zu erwarten.

Die stabil mit einem RNase L-Inhibitor-Expressionsvektor transfizierten FRhK-4/RLI(+)-Zellen sollten ein System mit einem erniedrigten RNase L-Aktivierungspotential darstellen (GOTTER, 1999). Tatsächlich erreicht HAV in den FRhK-4/RLI(+)-Zellen auch höhere Titer als in normalen FRhK-4-Zellen (KURTH, 2001; HEITMANN, 2002). Allerdings konnten GOTTER (1999) und KURTH (2001) die Überexpression des RLI in den stabil transfizierten Zellen nicht nachweisen. Quantitative Analysen der RLI-mRNA in dieser Arbeit zeigten keine erhöhte RLI-Expression in FRhK-4/RLI(+)-Zellen (Abb. 31), in denen die verbesserte HAV-Replikation aber zu beobachten war.

Die FRhK-4/RLI(+)-Zellen fallen den normalen FRhK-4-Zellen gegenüber durch ein beschleunigtes Proliferationsverhalten auf. Die höheren HAV-Titer sind aber nicht auf eine größere Zellzahl in der Kultur zurückzuführen, auch die infektiösen Einheiten pro Zelle sind bei den FRhK-4/RLI(+)-Zellen erhöht (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise profitiert die HAV-Replikation von dem veränderten Wachstumsverhalten der FRhK-4/RLI(+)-Kultur und resultiert so in höheren Titern.

Da die FRhK-4/RLI(+)-Zellen sich als ungeeignet erwiesen hatten, sollte die Erniedrigung des RNase L-Aktivierungspotentials durch die Expression einer carboxyterminal verkürzten RNase L realisiert werden. Für diese RNase L-Form war in *trans*-Wirkung ein dominant negativer Effekt auf die Aktivität der normalen RNase L beschrieben worden (HASSEL ET AL., 1993). Ein System mit erhöhtem RNase L-Aktivierungspotential sollte durch eine Überexpression des Enzyms selbst realisiert werden.

Expressionsplasmide mit den Sequenzen für die humane RNase L, bzw. eine murine oder humane carboxyterminal verkürzte RNase L-Variante wurden auf der Basis von pcDNA3.1- und pI.18-Vektoren konstruiert. Der Versuch, die cDNA der *Macaca mulatta*-RNase L zu gewinnen, verlief erfolglos, da die verwendeten Primer für deren Amplifikation ungeeignet waren und zu der Zeit noch keine Sequenzinformationen vorlagen.

Die Expression der vektorcodierten RNase L-Formen konnte nach Transfektion in FRhK-4-Zellen auf Proteinebene durch Western Blot oder indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen

werden (Abb. 29, Abb. 34). Eine Untersuchung der enzymatischen Aktivität erfolgte mit dem rRNA-Abbau-Assay durch die Aktivierung der RNase L über 2-5A-Präparationen. In Lysaten von FRhK-4-Zellen, die mit den RNase L-exprimierenden Plasmiden transfiziert worden waren, konnte jeweils eine gesteigerte RNase L-Aktivität nachgewiesen werden. Für den pI.18-basierten Vektor pI.18/RL war diese, aufgrund seiner potenten Expressionsleistung, deutlich stärker ausgeprägt (Abb. 32, Abb. 35). Für die verkürzten RNase L-Formen konnte hingegen kein dominant negativer Effekt gezeigt werden.

HASSEL ET AL. (1993) schreiben, dass relativ hohe Level der trunkierten RNase L-Form nötig sind, um einen dominant negativen Effekt auf die Aktivität der endogenen RNase L auszuüben. Möglicherweise wurden die nötigen Expressionslevel nicht erreicht oder die Transfektionsraten waren zu gering, um einen Effekt vor dem Hintergrund nicht transfizierter Zellen nachzuweisen. Zudem wäre es möglich, dass der dominant negative Effekt auf der Bildung enzymatisch inaktiver Heterodimere beruht und diese mit der *Macaca mulatta*-RNase L nicht gebildet werden.

Als alternative Möglichkeit einer negativen Beeinflussung des RNase L-Aktivierungspotentials wurde eine siRNA-vermittelte Runterregulation der RNase L-Expression gewählt. Hierzu wurde ein vektorbasiertes siRNA-Expressionssystem verwendet, in welches die siRNA-codierenden Sequenzen eingebracht wurden.

Diese Konstrukte wurden in FRhK-4-Zellen transfiziert und auf ihre Funktionalität untersucht. Mit einer semiquantitativen RT-PCR konnte für drei Konstrukte mit sequenzspezifischen siRNA-Kassetten ein reduzierender Effekt auf die RNase L-mRNA-Level beobachtet werden, der bei einem Konstrukt mit einer Nonsens-Sequenz nicht auftrat (Abb. 38). Daher wurden diese Konstrukte zur Etablierung eines Zellsystems mit verminderter RNase L-Aktivierbarkeit in HAV-Infektionskinetiken eingesetzt. Ein erhöhtes Potential der RNase L-Aktivierbarkeit sollte durch die Überexpression des Enzyms mit dem pI.18/RL-Konstrukt realisiert werden.

Unter den RNase L-Level-modulierenden Bedingungen wurde in FRhK-4-Zellen die HAV-Replikation untersucht. Hierzu wurden entweder persistent HAV-infizierte FRhK-4-Zellen mit den Expressionsvektoren für die siRNAs bzw. die RNase L transfiziert, oder stabil transfizierte Zellpopulationen mit HAV infiziert. Durch die siRNA-basierte Runterregulation der RNase L-mRNA wurde hier bestenfalls eine Reduktion auf 70 % des Levels von Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert waren, erreicht. Eine stabil mit dem RNase L-

Expressionsvektor pI.18/RL transfizierte Population erreichte einen um über das 200fache gesteigerten RNase L-mRNA-Level.

In keinem Ansatz dieser Infektionsexperimente war mittels *real-time* RT-PCR oder Virustitration ein Effekt auf die Replikation des Hepatitis A-Virus nachzuweisen (Abb. 39, Abb. 40).

Da zumindest für die RNase L-überexprimierenden Zellen ein Effekt auf die HAV-Replikation zu erwarten gewesen wäre, stellte sich die grundlegende Frage nach der RNase L-Sensitivität des Hepatitis A-Virus. Für das Poliovirus beschrieben HAN ET AL. (2007) überraschenderweise eine Resistenz der viralen RNA gegen den Abbau durch die RNase L. Bei HAV finden sich zwar keine Homologien zu dem hierfür verantwortlichen Sequenzbereich, aber ein vergleichbares Prinzip würde die Ergebnisse der Replikationskinetiken erklären.

Um die HAV-RNA auf eine mögliche Resistenz gegen die Degradation durch die RNase L zu überprüfen, wurden *in vitro*-Transkripte mit der Sequenz der viralen RNA in HeLa-Zellextrakten inkubiert, deren OAS/RNase L-System durch poly(IC) aktiviert wurde. Der gefundene drastische Abbau der *in vitro*-Transkripte zeigte, dass die HAV-RNA über keine Resistenz gegen die RNase L-vermittelte Degradation verfügt (Abb. 41).

Die Betrachtung der Ereignisse in einzelnen Zellen sollte zeigen, ob ein Effekt einer RNase L-Überexpression auf dieser Ebene nachweisbar ist. Hierzu wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert, inwieweit sich eine HAV-Infektion in transient RNase L-überexprimierenden FRhK-4-Zellen etablieren kann. Etwa 50 % der bewerteten RNase L-überexprimierenden Zellen blieben nach Infektion der Zellkultur HAV-negativ, während Zellen, welche die trunkierte RNase L-Form oder GFP (*green fluorescent protein*) exprimierten, durchweg HAV-positiv ausfielen (Abb. 42).

Somit war durchaus ein inhibierender Effekt einer RNase L-Überexpression auf die HAV-Infektion zu finden, der sich in den vorangegangenen Replikations-Experimenten nicht gezeigt hatte oder nicht darstellbar war.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Komponenten des OAS/RNase L-Systems in FRhK-4-Zellen unabhängig von einer IFN-Induktion auf einem Level exprimiert werden, der eine Reaktion auf die Gegenwart doppelsträngiger RNA erlaubt. Zudem führt auch einzelsträngige HAV-RNA zu der Aktivierung des Systems. Somit sind funktionale

Konsequenzen des zuvor gefundenen erhöhten Aktivierungspotentials der RNase L in persistent HAV-infizierten FRhK-4-Zellen zu erwarten, da die RNase L über die OAS aktiviert werden kann. Der Nachweis der erhöhten RNase L-Aktivierbarkeit in persistent infizierten MRC-5-Zellen weist hier auf einen generellen Effekt der HAV-Infektion hin.

Die Erhöhung des Aktivierungspotentials der RNase L ist mit einer Hochregulation der RNase L-Expression zu erklären. Diese tritt erst im späteren Verlauf der Infektion, wenn auch die HAV-Replikation runterreguliert wird, sowie in der Persistenz auf und könnte somit für die Etablierung der Persistenz von Bedeutung sein. Die erhöhte RNase L-Expression konnte zwar nicht auf der Proteinebene gezeigt werden, aber die Nachweise der Enzymaktivität stützen die Befunde der *real-time* RT-PCR.

In persistent infizierten Zellen suggerieren die Verläufe von HAV-RNA, RNase L-mRNA und rRNA-Degradation, als Marker der RNase L-Aktivität, einen regulativen Zusammenhang zwischen der RNase L und der HAV-Replikation. Zu Zeiten mit der höchsten HAV-RNA-Last findet man eine verstärkte enzymatische Aktivität der RNase L, deren folgender Expressionsanstieg mit einer Erniedrigung des Levels der HAV-RNA einhergeht, die sich dann auf einem konstanten Niveau einpendelt. Ein solcher Zusammenhang mit Wirkung auf die HAV-Replikation konnte allerdings durch Infektions-Kinetiken in Zellkulturen mit differenzieller RNase L-Expression nicht nachgewiesen werden. Diese Systeme zeigten keinen Effekt auf die Replikation des Hepatitis A-Virus.

Die siRNA-vermittelte Reduktion der RNase L-mRNA-Level fiel hierbei nicht besonders stark aus, dennoch könnte man erwarten, einen Effekt auf die HAV-Replikation zu detektieren, falls hier ein reprimierender Mechanismus durch die RNase L vorliegt. Interessanter ist aber die Feststellung, dass eine Überexpression der RNase L unter diesen Bedingungen keine Reduktion des Virustiters zur Folge hatte. Eine Replikationsinhibition durch die reine Überexpression der RNase L wurde für EMCV, VSV, HIV, Vaccinia- und das humane Parainfluenzavirus beschrieben (DIAZ-GUERRA ET AL., 1997b; MAITRA UND SILVERMAN, 1998; ZHOU ET AL., 1998), allerdings wurden in diesen Untersuchungen keine Daten bezüglich einer Interferoninduktion erfasst.

Ein falsch negatives Ergebnis bezüglich der RNase L-Wirkung auf die HAV-Replikation könnte potentiell durch eine zu niedrige Rate an erfolgreich transfizierten Zellen entstanden sein, so dass diese sowohl bei den transient transfizierten Ansätzen, als auch bei den stabilen Populationen derartig unterrepräsentiert waren, dass ein Effekt nicht nachzuweisen war. Der fehlende Einfluss der RNase L-Überexpression auf die HAV-Replikation könnte, neben einem möglichen Resistenzmechanismus, indes auch in einem zu niedrigen Level der basal

exprimierten 2',5'-Oligoadenylsynthetase begründet sein. Wenn nur eine minimale 2-5A-Synthese in den FRhK-4-Zellen realisierbar war, ist es eventuell nicht möglich gewesen, das erhöhte Aktivierungspotential auszunutzen. So hätte die Anzahl aktivierter RNase L-Moleküle in normalen und RNase L-überexprimierenden Zellen gleichbleiben können und es wäre nicht möglich, antivirale Aktivität nachzuweisen. In diesem Fall wäre die HAV-induzierte Expressionssteigerung der RNase L und die damit einhergehende Erhöhung ihres Aktivierungspotentials aber auch in diesem Kontext zu betrachten. Folglich wäre die Hochregulation der RNase L-Expression ohne jede Bedeutung für eine Regulation der Virusreplikation.

Bei Betrachtung der Infektionsetablierung in einzelnen Zellen konnte allerdings ein Effekt beobachtet werden. Hier blockierte die Überexpression der RNase L zu ca. 50 % die Etablierung einer HAV-Infektion. In transient transfizierten Zellen liegen deutlich größere RNase L-Mengen vor als in den stabil transfizierten Zellpopulationen. Die Qualität des Effektes könnte in dem Konzentrationsunterschied begründet sein. Andererseits wurden in der mikroskopischen Analyse auch nur die erfolgreich transfizierten Zellen beurteilt, während der Effekt bei den Replikationsuntersuchungen von den nicht-transfizierten Zellen, wie erwähnt, abgeschwächt oder verdeckt werden konnte.

Auf jeden Fall scheint, unter den gewählten Bedingungen und bei einer starken Überexpression, eine 50%ige Blockade der Infektion kein ausgesprochen starker antiviraler Effekt zu sein. Zudem ist nicht auszuschließen, dass es sich hierbei gar nicht um einen gegen HAV gerichteten, sondern vielmehr um einen Nebeneffekt der für die Zellen problematischen RNase L-Überexpression handelt.

Viren haben eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um die Aktivität des OAS/RNase L-Systems zu inhibieren. Häufig basieren diese auf einer Verhinderung der OAS-Aktivierung. So exprimieren Reo- und Influenzaviren mit $\sigma 3$ bzw. NS1 Proteine, welche über die Sequestrierung doppelsträngiger RNA die Aktivierung der OAS verhindern (BEATTIE ET AL., 1995; MIN UND KRUG, 2006). Auch das Vaccinia Virus verfügt mit E3L über ein dsRNA-bindendes Protein (WATSON ET AL., 1991), dennoch kommt es während der Infektion zu einer starken Induktion der 2-5A-Synthese (RICE ET AL., 1985). Das Vaccinia Virus wird aber nur bei einer Überexpression der RNase L inhibiert, ansonsten vermittelt ein Mechanismus, zu dem E3L auf unbekannte Weise beiträgt, eine Resistenz (BEATTIE ET AL., 1995; RIVAS ET AL., 1998; XIANG ET AL., 2002). HIV-1 verhindert die Reaktion der OAS über ein Protein, welches die OAS-aktivierende TAR- (*transactivation responsive*) Sequenz am 5'-Terminus der viralen

RNA bindet (SCHRÖDER ET AL., 1990). Zudem vermag HIV-1, ebenso wie EMCV, eine verstärkte Expression des RNase L-Inhibitors zu induzieren (BISBAL ET AL., 1995; MARTINAND ET AL., 1998b; MARTINAND ET AL., 1999). Im Zuge einer Infektion mit Herpes simplex-Virus Typ 1 und 2 oder Simian Virus 40 kommt es zu der Synthese inaktiver 2-5A-Derivate (CAYLEY ET AL., 1984; HERSH ET AL., 1984). Das Poliovirus hingegen inhibiert die RNase L direkt, wobei eine phylogenetisch konservierte RNA-Struktur im viralen ORF eine Resistenz gegen die Spaltung vermittelt (HAN ET AL., 2007). Ein derartiger Mechanismus konnte in dieser Arbeit für das Hepatitis A-Virus ausgeschlossen werden, dessen RNA sich als RNase L-sensitiv erwies.

Für das Hepatitis C-Virus wurde eine Degradation seiner RNA durch die RNase L in Extrakten aus HeLa-Zellen gezeigt, wobei es vornehmlich zu Schnitten auf der 3'-Seite von UA- und UU-Dinukleotiden kam. UA-Dinukleotide lagen hierbei im Bereich fast aller Spaltstellen vor (HAN UND BARTON, 2002). Die Analyse der Basenabfolge von HCV-RNA-Sequenzen wies eine deutlich geringere Anzahl an UA- und UU-Dinukleotiden auf als statistisch vorhergesagt, was die Autoren als mögliches Anzeichen der evolutionären Anpassung an einen Selektionsdruck der RNase L ansahen (WASHENBERGER ET AL., 2007). Die Reduktion der potentiellen RNase L-Schnittstellen ist in relativ IFN-resistenten HCV-Genotypen noch stärker ausgeprägt, deren RNA im OAS/RNase L-Kontext auch schlechter degradiert wird (HAN UND BARTON, 2002).

Betrachtet man die Dinukleotideile im HAV-Genom, findet man auch hier deutlich weniger UA-Dinukleotide als statistisch zu erwarten wären (Abb. 43). Es finden sich allerdings erhöhte Anteile an UU-Paaren, wobei die erwähnten Untersuchungen mit HCV-RNA vornehmlich die Präsenz von UA-Dinukleotiden in den RNase L-Spaltstellen zeigen. Die Poliovirus-RNA weist interessanterweise höhere Anteile an UA-Dinukleotiden auf als die HCV- oder HAV-RNA. Möglicherweise sind diese Daten als Hinweis auf einen Selektionsdruck des OAS/RNase L-Systems auf HAV zu werten.

Wenn auch kein Effekt der RNase L auf den HAV-Titer detektierbar war, so weist die vorhandene rRNA-Degradation in HAV-infizierten Zellen auf eine stark aktivierte RNase L hin (BRACK, 1999, Abb. 17, Abb. 26). KULKA ET AL. (2003) beschrieben eine vergleichbare rRNA-Degradation in FRhK-4-Zellen, im Zusammenhang mit einem cytopathogenen HAV-Stamm, und postulierten in GOSWAMI ET AL. (2004) einen RNase L-unabhängigen Mechanismus, da sie keine OAS-mRNA nachweisen konnten. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch eine basale Expression der OAS2-mRNA nachgewiesen werden. Zudem

konnte eine rRNA-Degradation direkt durch eine poly(IC)-Transfektion induziert werden, was eine Expression der OAS erfordert, wenn kein bisher unbekannter dsRNA-aktivierter Mechanismus für den Abbau verantwortlich ist.

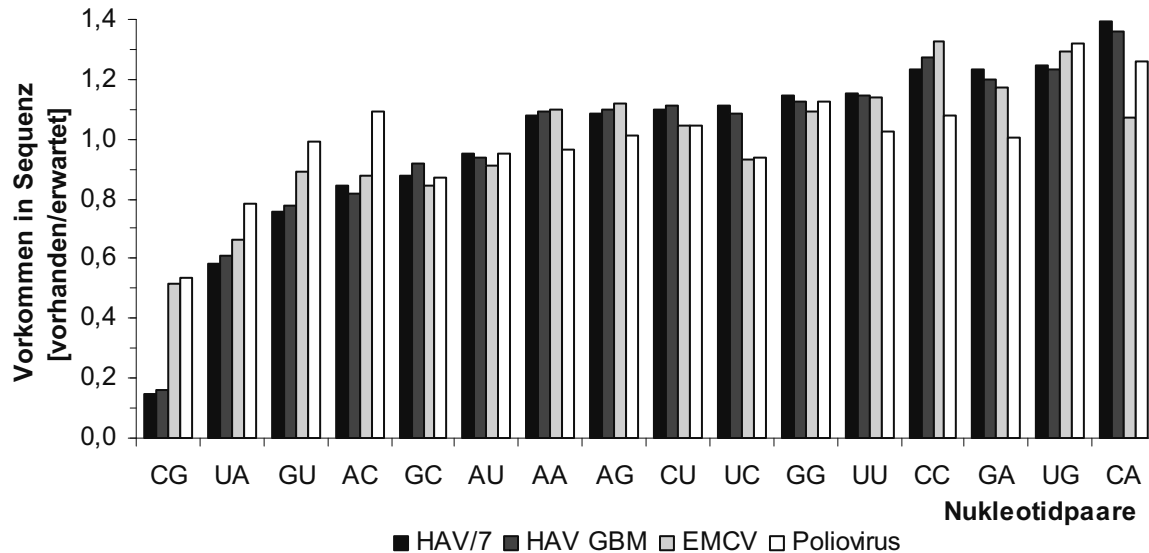


Abb. 43: Verhältnisse vorhandener und erwarteter Nukleotidpaare in HAV-Genomen. Die erwartete Anzahl eines Bestimmten, der 16 möglichen Nukleotidpaare, wurde kalkuliert, indem der Anteil der einzelnen Nukleotide an der Gesamtsequenz miteinander und mit der Länge der Sequenz multipliziert wurden (z.B.: $0,329 \text{ U} \times 0,293 \text{ A} \times 7478 \text{ nt} = 720 \text{ UA Dinukleotide}$). Die Anzahl der wirklich vorhandenen Nukleotidpaare wurde mit der *Simmonic 2005*-Software ermittelt (SIMMONDS UND SMITH, 1999). Pro Nukleotidpaar wurde die Anzahl der Vorhandenen durch die Anzahl der Erwarteten dividiert und als Balken in obigem Diagramm dargestellt. In den Sequenzen von HAV/7 und HAV GBM wurden somit nur 58 bzw. 61 % der erwarteten UA-Paare gefunden, während die RNase L-resistente Polio-RNA 78 % aufweist. EMCV liegt hier bei 66 %. Allerdings enthalten die HAV-Sequenzen einen größeren Anteil an UU-Paaren als kalkuliert. WASHENBERGER ET AL. beschrieben 2007 Anteile von ca. 75 % für UA- und ca. 90 % für UU-Paare in HCV-Sequenzen und werteten dies als Hinweis auf einen evolutionären Selektionsdruck der RNase L (Washenberger et al., 2007). Die extrem erniedrigten Anteile an CG-Nukleotidpaaren sind typisch für ssRNA-Viren (RIMA UND MCFERRAN, 1997).

Zumindest *in vitro* ist die HAV-RNA RNase L-sensitiv und das OAS/RNase L-System wird augenscheinlich im Zuge einer HAV-Infektion aktiviert, dennoch war ein Effekt der RNase L auf den HAV-Titer nicht nachweisbar. Möglicherweise spielen intrazelluläre Veränderungen hierbei eine Rolle. In HAV-infizierten Zellen kommt es zu drastischen strukturellen Veränderungen des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates, ein tubulär-vesikuläres Netzwerk wird ausgebildet und das Membran-*Rearrangement* formt myelinartige Strukturen. Die HAV-Replikation findet in enger Assoziation mit diesen Strukturen statt (TINARI ET AL., 1989; GOSERT ET AL., 2000; BASU ET AL., 2000; KLINGER ET AL., 2001). Es ist denkbar, dass diese Veränderungen einer Inhibition des Hepatitis A-Virus durch das OAS/RNase L-System entgegenwirken. Somit wäre der beobachtete Effekt auf die Infektions-etablierung in einzelnen RNase L-überexprimierenden Zellen erklärbar. HAV könnte bis zu

der Etablierung entsprechender protektiver Strukturen noch sensibel auf das OAS/RNase L-System reagieren.

Die Ergebnisse sprechen gegen einen RNase L-abhängigen Mechanismus der Replikationskontrolle. Ansonsten wären stärkere Effekte zu erwarten, die sich mit der verwendeten Methodik hätten zeigen sollen. Für die Runterregulation der viralen Replikation im späteren Verlauf der Infektion muss ein anderer Mechanismus verantwortlich sein.

ZHANG ET AL. beschrieben 2007(a) die Spaltung des poly(A)-bindenden Proteins (PABP) durch die HAV-Protease 3C^{PRO} und eine Inhibition der IRES-abhängigen Translation durch die abgespaltene RNA-bindende Domäne des PABP. Die Autoren postulierten hier einen Zusammenhang mit dem Mechanismus zum Wechsel von der Translation zu der Replikation viraler RNA. Die Spaltprodukte des PABP waren allerdings in den infizierten Huh-7-Zellen erst 9 Tage p.i. nachweisbar. Daher könnte es sich durchaus um einen Mechanismus handeln, der mit der Drosselung viraler Replikation und dem Übergang in die Persistenz zusammenhängt, auch wenn es sich bei dem verwendeten HAV 18f um eine cytopathogene Variante handelt. Interessanterweise ist auf Proteinebene eine Interaktion der RNase L mit eRF3, einem PABP-bindenden Protein, beschrieben (LE ROY ET AL., 2005).

Auch wenn kein direkter Zusammenhang mit einer Replikationskontrolle ersichtlich ist, wird die Expression der RNase L im Zuge einer HAV-Infektion hochreguliert. Stellt man die Frage nach dem Mechanismus dieser Hochregulation, bieten sich die Ergebnisse der *in silico*-Analyse des RNase L-Promotors als Basis an. Besonders interessant sind hier Motive für die Bindung von NF- κ B und ATF6. Da NF- κ B in HAV-infizierten Zellen aktiviert wird, könnte es für die Erhöhung der RNase L-Expression verantwortlich sein. Auch ATF6, ein Faktor der *unfolded protein response* (UPR), könnte hier eine Rolle spielen. Zusammen mit der Kinase PERK (*PKR-like ER kinase*) und der RNase L-ähnlichen Kinase und Endoribonuklease IRE1 fungiert ATF6 als Sensor für ER-Stress. Die drei Transmembranproteine sind auf der Seite des ER-Lumens mit dem Chaperon BiP (*immunoglobulin heavy chain-binding protein*) assoziiert. ER-Stress führt zu der Dissoziation von BiP und dem 90 kDa-Protein ATF6, worauf letzteres in den Golgi-Komplex transportiert und dort proteolytisch gespalten wird. Die abgespaltene cytoplasmatische 50 kDa-Domäne transloziert daraufhin in den Nukleus und agiert dort als Transkriptionsfaktor (RUTKOWSKI UND KAUFMAN, 2004).

Viren können ER-Stress induzieren und Teile der UPR aktivieren, wie für Vertreter der Hepadna-, Herpes- und Flaviviridae gezeigt wurde (SU ET AL., 2002; JORDAN ET AL., 2002;

ISLER ET AL., 2005; LI ET AL., 2007). Es wird angenommen, dass hierbei die exzessive Produktion viraler Glykoproteine eine Rolle spielt. Allerdings kommt es auch durch subgenomische HCV-Replikons, welche nicht für Struktur- und Glykoproteine codieren, zu einer ER-Stress-Antwort und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF6 (TARDIF ET AL., 2002). Der ER-Stress dürfte hier durch die Assoziation des viralen Replikationskomplexes mit der ER-Membran induziert werden. Die membranassoziierte Replikation des Hepatitis A-Virus und die drastischen morphologischen Veränderungen des endoplasmatischen Retikulums in HAV-infizierten Zellen (TINARI ET AL., 1989; GOSERT ET AL., 2000; BASU ET AL., 2000; KLINGER ET AL., 2001) legen einen ähnlichen Effekt nahe. So könnte eine ATF6-Aktivierung über ER-Stress zu der beobachteten Expressionsverstärkung der RNase L führen.

ER-Stress könnte indes auch die Ursache der NF- κ B-Aktivierung darstellen (PAHL UND BAEUERLE, 1995), zu der es im Zuge einer HAV-Infektion kommt, da die Reaktion auf intrazelluläre dsRNA über den RIG-I/MDA-5-Weg durch HAV blockiert wird (FENSTERL ET AL., 2005) und ein möglicher Weg über die PKR in HAV-infizierten Zellen supprimiert zu sein scheint (BERK, 2003). PANDEY ET AL. (2004) konnten eine Induktion der RNase L-Expression durch unterschiedliche Stress-induzierende Agenzien zeigen, wobei NF- κ B allerdings keine essentielle Rolle zukam.

Die Basis der HAV-induzierten Erhöhung der RNase L-mRNA-Level könnte allerdings auch auf posttranskriptionaler Ebene zu finden sein. LI ET AL. (2007) beschrieben für die RNase L einen Mechanismus der Kontrolle ihrer mRNA-Stabilität. Die Autoren zeigten eine regulatorische Rolle des nicht-translatierten 3'-Endes der RNase L-mRNA. Die 3'-NTR enthält eine Reihe von AU-reichen Elementen (ARE), *cis*-aktiven Regionen, welche über die Bindung von ARE-bindenden Proteinen die mRNA-Stabilität modulieren. AREs sind in etwa 5-8 % der mRNAs des humanen Transkriptoms zu finden (BAKHEET ET AL., 2006). Das ARE-bindende Protein HuR (*Hu antigen R*), selbst durch Zellstress und im Zuge von Differenzierungsvorgängen aktiviert (WANG ET AL., 2000; FIGUEROA ET AL., 2003; VAN DER GIESSEN ET AL., 2003), ist in der Lage die Stabilität der RNase L-mRNA über die Bindung an ARE-Motive zu erhöhen (LI ET AL., 2007).

Die Modulation der RNase L-Expression könnte Vorteile für HAV mit sich bringen, die keinen direkten Replikationsbezug besitzen. Auch andere Viren nutzen Effekte, die durch die Aktivität des OAS/RNase L-Systems entstehen. So führt die Apoptoseinduktion der im späten Verlauf einer Poliovirus-Infektion aktivierten RNase L zu einer verbesserten Virusausbreitung

(HAN ET AL., 2007). Bei Reoviren trägt die RNase L entscheidend zum *host shutoff* bei und erlaubt bestimmten Stämmen eine verbesserte Replikation (SMITH ET AL., 2005). Das Sindbis Virus ist in RNase L-*knockout* MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) nicht in der Lage seine Minusstrang-Synthese zu beenden und ein normales Replikationsverhalten zu etablieren (SAWICKI ET AL., 2003). Möglicherweise benutzt HCV das OAS/RNase L-System in einer Weise, wie es in dieser Arbeit für HAV diskutiert wurde, denn im Lebergewebe chronisch HCV-infizierter Patienten wurde eine erniedrigte RLI-Expression gefunden (YU ET AL., 2000). Dass sich aus den komplexen Regulationsmechanismen, in welche die RNase L involviert ist, ein Vorteil für HAV ergibt, ist durchaus denkbar. Eine hochregulierte und gegebenenfalls aktivierte RNase L hat signifikante Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel. RNase L-überexprimierende Zellen weisen, ebenso wie HAV-infizierte Zellen, eine verlangsamte Proliferationsrate auf. Eine generelle Reduktion des zellulären Stoffwechsels könnte für die Etablierung der persistenten Infektion vorteilhaft sein. Zudem könnte für HAV die beschriebene Negativregulation der PKR-Expression über die RNase L-abhängige Destabilisierung der PKR-mRNA von Bedeutung sein (KHABAR ET AL., 2003).

Abschließend kann folgendes Modell aufgestellt werden: Im Zuge einer Hepatitis A-Virus-Infektion kommt es zur Hochregulation der RNase L-Expression. Die 2',5'-Oligoadenylat-synthetase wird durch die Gegenwart des Virus aktiviert und führt somit zu einer Aktivierung der RNase L. Während das Virus an seinem Replikationsort vor der RNase L geschützt vorliegt und in seiner Replikation nicht durch deren Aktivität beeinflusst wird, kommt es zur Degradation zellulärer RNA-Spezies. Dabei werden zahlreiche Gene in ihrer Expression beeinflusst. Darunter findet sich auch die PKR, deren Expressionsinhibition mögliche zelluläre Gegenmaßnahmen verhindert, die in Folge höherer dsRNA-Level oder über ein stressaktiviertes PACT (*PKR activating protein*) erfolgen könnten. Der über das OAS/RNase L-System realisierte Eingriff in den zellulären Stoffwechsel, der sich in Zellkultur in einer verlangsamten Proliferationsrate spiegelt, könnte einen wichtigen Beitrag zu der Etablierung der Persistenz des Virus leisten und *in vivo* zu der Ausbreitung der Infektion beitragen.

5 Zusammenfassung

Die Replikation des nicht-cytopathogenen Hepatitis A-Virus wird im späteren Verlauf der Infektion auf zellulärer Ebene stark gedrosselt und auf ein niedriges Niveau abgesenkt, während die Infektion einen persistenten Charakter annimmt. HAV ist in der Lage essentielle zelluläre Abwehrmechanismen, wie die IFN- β -Induktion und die Apoptose, zu inhibieren. Möglicherweise reichen diese Maßnahmen aber im späteren Verlauf der Infektion nicht mehr aus, um die Reaktion auf das replizierende Virus und dessen akkumulierende Bestandteile zu reprimieren. Die Reduktion der Replikation auf ein moderates Niveau könnte der Vermeidung zellulärer Abwehrmechanismen dienen, essentiell für die Etablierung der persistenten Infektion auf zellulärer Ebene sein, und so *in vivo* zur Ausbreitung der Infektion beitragen.

Über den Mechanismus, der die Drosselung der viralen Replikation vermittelt, ist nichts bekannt. In dieser Arbeit wurden mit ISG20, MxA und OAS/RNase L drei zelluläre antivirale Systeme, für die hypothetische und experimentelle Anhaltspunkte vorlagen, auf eine potentielle Rolle bezüglich der regulierten Replikationsreduktion des Hepatitis A-Virus untersucht.

Unter Verwendung von Reportergenkonstrukten konnte eine mögliche Replikationsregulation über eine HAV-abhängige Induktion der Genexpression des MxA-Proteins oder der ISG20-Nuklease ausgeschlossen werden.

Im Hauptteil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Komponenten des OAS/RNase L-Systems in FRhK-4-Zellen unabhängig von einer Interferoninduktion auf einem basalen Level exprimiert werden und eine Reaktion auf die Gegenwart doppelsträngiger RNA erlauben. Die gefundene Erhöhung des RNase L-Aktivierungspotentials in persistent HAV-infizierten Zellen ist mit einer Hochregulation der RNase L-Expression erklärbar, deren mRNA im späteren Verlauf und in der Persistenz einer HAV-Infektion erhöht ist. Eine Sequenzanalyse der RNase L-Promotorregion zeigte mit NF- κ B und ATF6 zwei Transkriptionsfaktoren als Kandidaten für eine HAV-induzierte Expressionsregulation auf. Eine biologische Relevanz der hochregulierten RNase L konnte experimentell nicht nachgewiesen werden. Replikationskinetiken im Kontext einer differenziellen RNase L-Expression deuteten keinen Einfluss der RNase L auf den HAV-Titer an, allerdings war eine RNase L-Überexpression teilweise in der Lage, die Etablierung der Infektion einzelner Zellen zu blockieren. Ein Zusammenhang mit einer viralen Replikationskontrolle ist unwahrscheinlich, allerdings könnte die Einflussnahme auf das OAS/RNase L-System auf anderen Wegen einen Beitrag zu der Etablierung der persistenten Infektion leisten.

6 Literatur

- Accola, M.A.; Huang, B.; Masri, A.A. & McNiven, M.A.** (2002) The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **277**(24): 21829-21835
- Aebi, M.; Fäh, J.; Hurt, N.; Samuel, C.E.; Thomis, D.; Bazzigher, L.; Pavlovic, J.; Haller, O. & Staeheli, P.** (1989) cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol Cell Biol*, **9**(11): 5062-5072
- Al-khatib, K.; Williams, B.R.G.; Silverman, R.H.; Halford, W. & Carr, D.J.J.** (2003) The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR and the murine 2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent RNase L are required for IFN-beta-mediated resistance against herpes simplex virus type 1 in primary trigeminal ganglion culture. *Virology*, **313**(1): 126-135
- Albrecht, M.** (2004) Einfluß einer HAV-Infektion in FRhK-4 und HepG2 Zellen auf die streßinduzierte Apoptoserate. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Anderson, D.A.** (1987) Cytopathology, plaque assay, and heat inactivation of hepatitis A virus strain HM175. *J Med Virol*, **22**(1): 35-44
- Anderson, D.A.; Locarnini, S.A. & Gust, I.D.** (1988a) Replication of hepatitis A virus. *in: Zuckerman, A. (Hrsg.) Viral hepatitis and liver disease*. New York: Alan R. Liss: 8-11
- Anderson, D.A.; Ross, B.C. & Locarnini, S.A.** (1988b) Restricted replication of hepatitis A virus in cell culture: encapsidation of viral RNA depletes the pool of RNA available for replication. *J Virol*, **62**(11): 4201-4206
- Andersson, I.; Bladh, L.; Mousavi-Jazi, M.; Magnusson, K.; Lundkvist, A.; Haller, O. & Mirazimi, A.** (2004) Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol*, **78**(8): 4323-4329
- Andrejeva, J.; Childs, K.S.; Young, D.F.; Carlos, T.S.; Stock, N.; Goodbourn, S. & Randall, R.E.** (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(49): 17264-17269
- Asher, L.V.; Binn, L.N.; Mensing, T.L.; Marchwicki, R.H.; Vassell, R.A. & Young, G.D.** (1995) Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J Med Virol*, **47**(3): 260-268
- Ashida, M. & Hamada, C.** (1997) Molecular cloning of the hepatitis A virus receptor from a simian cell line. *J Gen Virol*, **78**(7): 1565-1569
- Aubry, F.; Mattéi, M.G.; Barque, J.P. & Galibert, F.** (1996) Chromosomal localization and expression pattern of the RNase L inhibitor gene. *FEBS Lett*, **381**: 135-139
- Austin, B.A.; James, C.; Silverman, R.H. & Carr, D.J.J.** (2005) Critical role for the oligoadenylate synthetase/RNase L pathway in response to IFN-beta during acute ocular herpes simplex virus type 1 infection. *J Immunol*, **175**(2): 1100-1106
- Baglioni, C.; Minks, M.A. & Maroney, P.A.** (1978) Interferon action may be mediated by activation of a nuclease by pppA₂'p5'A₂'p5'A. *Nature*, **273**: 684-687
- Baglioni, C.; Benedetti, A.D. & Williams, G.J.** (1984) Cleavage of nascent reovirus mRNA by localized activation of the 2'-5'-oligoadenylate-dependent endoribonuclease. *J Virol*, **52**(3): 865-871
- Bakheet, T.; Williams, B.R.G. & Khabar, K.S.A.** (2006) ARED 3.0: The large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic Acids Res*, **34**(Database issue): D111-D114
- Barton, D.J.; Morasco, B.J. & Flanagan, J.B.** (1996) Assays for poliovirus polymerase, 3D(Pol), and authentic RNA replication in HeLa S10 extracts. *Methods Enzymol*, **275**: 35-57
- Bartsch, D.K.; Fendrich, V.; Slater, E.P.; Sina-Frey, M.; Rieder, H.; Greenhalf, W.; Chaloupka, B.; Hahn, S.A.; Neoptolemos, J.P. & Kress, R.** (2005) RNASEL germline variants are associated with pancreatic cancer. *Int J Cancer*, **117**(5): 718-722
- Basu, A.; Gangodkar, S.V.; Joshi, M.S. & Chitambar, S.D.** (2000) Electron microscopy of buffalo green monkey kidney cells persistently infected with hepatitis A virus and immunolocalization of HAV antigens. *Indian J Pathol Microbiol*, **43**(4): 409-415
- Bayard, B. & Zhou, A.** (1992) Affinity blotting assay for 2-5A-dependent RNase. *Anal Biochem*, **200**(1): 108-114

- Bayard, B.A. & Gabrion, J.B.** (1993) 2',5'-Oligoadenylate-dependent RNase located in nuclei: biochemical characterization and subcellular distribution of the nuclease in human and murine cells. *Biochem J*, **296** (1): 155-160
- Bazzigher, L.; Pavlovic, J.; Haller, O. & Staeheli, P.** (1992) Mx genes show weaker primary response to virus than other interferon-regulated genes. *Virology*, **186**(1): 154-160
- Beattie, E.; Denzler, K.L.; Tartaglia, J.; Perkus, M.E.; Paoletti, E. & Jacobs, B.L.** (1995) Reversal of the interferon-sensitive phenotype of a vaccinia virus lacking E3L by expression of the reovirus S4 gene. *J Virol*, **69**(1): 499-505
- Bedard, K.M. & Semler, B.L.** (2004) Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes Infect*, **6**(7): 702-713
- Behera, A.K.; Kumar, M.; Lockey, R.F. & Mohapatra, S.S.** (2002) 2'-5' Oligoadenylate synthetase plays a critical role in interferon-gamma inhibition of respiratory syncytial virus infection of human epithelial cells. *J Biol Chem*, **277**(28): 25601-25608
- Benech, P.; Mory, Y.; Revel, M. & Chebath, J.** (1985) Structure of two forms of the interferon-induced (2'-5') oligo A synthetase of human cells based on cDNAs and gene sequences. *EMBO J*, **4**(9): 2249-2256
- Beneduce, F.; Ciervo, A.; Kusov, Y.; 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**(2): 410-421
- Berk, I.** (2003) Untersuchungen zur Blockade zellulärer antiviraler Mechanismen durch das Hepatitis A-Virus unter besonderer Berücksichtigung der Proteinkinase R und des Transkriptionsfaktors NF-kappaB. Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Besse, S.; Rebouillat, D.; Marie, I.; Puvion-Dutilleul, F. & Hovanessian, A.G.** (1998) Ultrastructural localization of interferon-inducible double-stranded RNA-activated enzymes in human cells. *Exp Cell Res*, **239**(2): 379-392
- Bickel, M.; Dveksler, G.; Dieffenbach, C.W.; Ruhl, S.; Midura, S.B. & Pluznik, D.H.** (1990) Induction of interferon-beta and 2',5'-oligoadenylate synthetase mRNAs by interleukin 6 during differentiation of murine myeloid cells. *Cytokine*, **2**(4): 238-246
- Bisbal, C.; Salehzada, T.; Lebleu, B. & Bayard, B.** (1989) Characterization of two murine (2'-5')(A)n-dependent endonucleases of different molecular mass. *Eur J Biochem*, **179**(3): 595-602
- Bisbal, C.; Martinand, C.; Silhol, M.; Lebleu, B. & Salehzada, T.** (1995) Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. *J Biol Chem*, **270**(22): 13308-13317
- Bisbal, C.; Silhol, M.; Laubenthal, H.; Kaluza, T.; Carnac, G.; Milligan, L.; Roy, F.L. & Salehzada, T.** (2000) The 2'-5' oligoadenylate/RNase L/RNase L inhibitor pathway regulates both MyoD mRNA stability and muscle cell differentiation. *Mol Cell Biol*, **20**(14): 4959-4969
- Blank, C.A.; Anderson, D.A.; Beard, M. & Lemon, S.M.** (2000) Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. *J Virol*, **74**(14): 6476-6484
- Borman, A.M. & Kean, K.M.** (1997) Intact eukaryotic initiation factor 4G is required for hepatitis A virus internal initiation of translation. *Virology*, **237**(1): 129-136
- Brack, K.; Frings, W.; Dotzauer, A. & Vallbracht, A.** (1998) A cytopathogenic, apoptosis-inducing variant of hepatitis A virus. *J Virol*, **72**(4): 3370-3376
- Brack, K.** (1999) Mechanismus und genetische Basis der Cytopathogenität einer Hepatitis A-Virusvariante in Zellkultur. Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- 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
- Bridgen, A.; Dalrymple, D.A.; Weber, F. & Elliott, R.M.** (2004) Inhibition of Dugbe nairovirus replication by human MxA protein. *Virus Res*, **99**(1): 47-50
- Brown, E.A.; Day, S.P.; Jansen, R.W. & Lemon, S.M.** (1991) The 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: secondary structure and elements required for translation in vitro. *J Virol*, **65**(11): 5828-5838
- Brown, E.A.; Zajac, A.J. & Lemon, S.M.** (1994) In vitro characterization of an internal ribosomal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus. *J Virol*, **68**(2): 1066-1074

- Cárdenas, W.B.; Loo, Y.; Gale, M.; Hartman, A.L.; Kimberlin, C.R.; Martínez-Sobrido, L.; Saphire, E.O. & Basler, C.F.** (2006) Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *J Virol*, **80**(11): 5168-5178
- Carr, D.J.J.; Al-khatib, K.; James, C.M. & Silverman, R.** (2003) Interferon-beta suppresses herpes simplex virus type 1 replication in trigeminal ganglion cells through an RNase L-dependent pathway. *J Neuroimmunol*, **141**: 40-46
- Carroll, S.S.; Chen, E.; Viscount, T.; Geib, J.; Sardana, M.K.; Gehman, J. & Kuo, L.C.** (1996) Cleavage of oligoribonucleotides by the 2',5'-oligoadenylate- dependent ribonuclease L. *J Biol Chem*, **271**(9): 4988-4992
- Castelli, J.C.; Hassel, B.A.; Wood, K.A.; Li, X.L.; Amemiya, K.; Dalakas, M.C.; Torrence, P.F. & Youle, R.J.** (1997) A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2-5A system. *J Exp Med*, **186**(6): 967-972
- Castelli, J.C.; Hassel, B.A.; Maran, A.; Paranjape, J.; Hewitt, J.A.; Li, X.L.; Hsu, Y.T.; Silverman, R.H. & Youle, R.J.** (1998) The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. *Cell Death Differ*, **5**(4): 313-320
- Cayley, P.J.; Davies, J.A.; McCullagh, K.G. & Kerr, I.M.** (1984) Activation of the ppp(A2'p)nA system in interferon-treated, herpes simplex virus-infected cells and evidence for novel inhibitors of the ppp(A2'p)nA-dependent RNase. *Eur J Biochem*, **143**(1): 165-174
- Chang, K.C.; Hansen, E.; Foroni, L.; Lida, J. & Goldspink, G.** (1991) Molecular and functional analysis of the virus- and interferon-inducible human MxA promoter. *Arch Virol*, **117**: 1-15
- Chang, K.C.; Hansen, E.; Jaenicke, T.; Goldspink, G. & Butterworth, P.** (1992) Transformation of a novel direct-repeat repressor element into a promoter and enhancer by multimerisation. *Nucleic Acids Res*, **20**(7): 1669-1674
- Chapman, N.M.; Tu, Z.; Tracy, S. & Gauntt, C.J.** (1994) An infectious cDNA copy of the genome of a non-cardiovirulent coxsackievirus B3 strain: its complete sequence analysis and comparison to the genomes of cardiovirulent coxsackieviruses. *Arch Virol*, **135**: 115-130
- Chastonay, J.D. & Siegl, G.** (1987) Replicative events in hepatitis A virus-infected MRC-5 cells. *Virology*, **157**(2): 268-275
- Chaussabel, D.; Semnani, R.T.; McDowell, M.A.; Sacks, D.; Sher, A. & Nutman, T.B.** (2003) Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood*, **102**(2): 672-681
- Chebath, J.; Benech, P.; Hovanessian, A.; Galabru, J. & Revel, M.** (1987a) Four different forms of interferon-induced 2',5'-oligo(A) synthetase identified by immunoblotting in human cells. *J Biol Chem*, **262**(8): 3852-3857
- Chebath, J.; Benech, P.; Revel, M. & Vigneron, M.** (1987b) Constitutive expression of (2'-5') oligo A synthetase confers resistance to picornavirus infection. *Nature*, **330**: 587-588
- Chieux, V.; Chehadeh, W.; Harvey, J.; Haller, O.; Wattré, P. & Hober, D.** (2001) Inhibition of coxsackievirus B4 replication in stably transfected cells expressing human MxA protein. *Virology*, **283**(1): 84-92
- Cho, M.W. & Ehrenfeld, E.** (1991) Rapid completion of the replication cycle of hepatitis A virus subsequent to reversal of guanidine inhibition. *Virology*, **180**(2): 770-780
- Chomczynski, P. & Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**(1): 156-159
- Clemens, M.J. & Williams, B.R.** (1978) Inhibition of cell-free protein synthesis by pppA2'p5'A2'p5'A: a novel oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell extracts. *Cell*, **13**(3): 565-572
- Cohen, J.I.; Rosenblum, B.; Ticehurst, J.R.; Daemer, R.J.; Feinstone, S.M. & Purcell, R.H.** (1987a) Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**(8): 2497-2501
- Cohen, J.I.; Ticehurst, J.R.; Purcell, R.H.; Buckler-White, A. & Baroudy, B.M.** (1987b) Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *J Virol*, **61**(1): 50-59
- Cohen, J.I.; Rosenblum, B.; Feinstone, S.M.; Ticehurst, J. & Purcell, R.H.** (1989) Attenuation and cell culture adaptation of hepatitis A virus (HAV): a genetic analysis with HAV cDNA. *J Virol*, **63**(12): 5364-5370
- Cohen, L.; Bénichou, D. & Martin, A.** (2002) Analysis of deletion mutants indicates that the 2A polypeptide of hepatitis A virus participates in virion morphogenesis. *J Virol*, **76**(15): 7495-7505

- Cohen, S.; Dovrat, S.; Sarid, R.; Huberman, E. & Salzberg, S.** (2005) JAK-STAT signaling involved in phorbol 12-myristate 13-acetate- and dimethyl sulfoxide-induced 2'-5' oligoadenylate synthetase expression in human HL-60 leukemia cells. *Leuk Res*, **29**(8): 923-931
- Cole, J.L.; Carroll, S.S. & Kuo, L.C.** (1996) Stoichiometry of 2',5'-oligoadenylate-induced dimerization of ribonuclease L. A sedimentation equilibrium study. *J Biol Chem*, **271**(8): 3979-3981
- Cole, J.L.; Carroll, S.S.; Blue, E.S.; Viscount, T. & Kuo, L.C.** (1997) Activation of RNase L by 2',5'-oligoadenylates. Biophysical characterization. *J Biol Chem*, **272**(31): 19187-19192
- Costa-Mattioli, M.; Cristina, J.; Romero, H.; Perez-Bercof, R.; Casane, D.; Colina, R.; Garcia, L.; Vega, I.; Glikman, G.; Romanowsky, V.; Castello, A.; Nicand, E.; Gassin, M.; Billaudel, S. & Ferré, V.** (2002) Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J Virol*, **76**(18): 9516-9525
- Coulepis, A.G.; Locarnini, S.A.; Westaway, E.G.; Tannock, G.A. & Gust, I.D.** (1982) Biophysical and biochemical characterization of hepatitis A virus. *Intervirology*, **18**(3): 107-127
- Cromeans, T.; Sobsey, M.D. & Fields, H.A.** (1987) Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. *J Med Virol*, **22**(1): 45-56
- Daemer, R.J.; Feinstone, S.M.; Gust, I.D. & Purcell, R.H.** (1981) Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect Immun*, **32**(1): 388-393
- Danino, D. & Hinshaw, J.E.** (2001) Dynamins family of mechanoenzymes. *Curr Opin Cell Biol*, **13**(4): 454-460
- Day, S.P.; Murphy, P.; Brown, E.A. & Lemon, S.M.** (1992) Mutations within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA which enhance replication in BS-C-1 cells. *J Virol*, **66**(11): 6533-6540
- Degols, G.; Eldin, P. & Mechti, N.** (2007) ISG20, an actor of the innate immune response. *Biochimie*, **89**: 831-835
- Der, S.D.; Zhou, A.; Williams, B.R. & Silverman, R.H.** (1998) Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(26): 15623-15628
- Desai, S.Y.; Patel, R.C.; Sen, G.C.; Malhotra, P.; Ghadge, G.D. & Thimmapaya, B.** (1995) Activation of interferon-inducible 2'-5' oligoadenylate synthetase by adenoviral VAI RNA. *J Biol Chem*, **270**(7): 3454-3461
- Dever, T.E.; Glynias, M.J. & Merrick, W.C.** (1987) GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**(7): 1814-1818
- Díaz-Guerra, M.; Rivas, C. & Esteban, M.** (1997a) Activation of the IFN-inducible enzyme RNase L causes apoptosis of animal cells. *Virology*, **236**(2): 354-363
- Díaz-Guerra, M.; Rivas, C. & Esteban, M.** (1997b) Inducible expression of the 2-5A synthetase/RNase L system results in inhibition of vaccinia virus replication. *Virology*, **227**(1): 220-228
- Díaz-Guerra, M.; Rivas, C. & Esteban, M.** (1999) Full activation of RNaseL in animal cells requires binding of 2-5A within ankyrin repeats 6 to 9 of this interferon-inducible enzyme. *J Interferon Cytokine Res*, **19**(2): 113-119
- Diriong, S.; Salehzada, T.; Bisbal, C.; Martinand, C. & Taviaux, S.** (1996) Localization of the ribonuclease L inhibitor gene (RNS4I), a new member of the interferon-regulated 2-5A pathway, to 4q31 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, **32**(3): 488-490
- Dollenmaier, G. & Weitz, M.** (2003) Interaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with secondary and tertiary RNA structural elements of the hepatitis A virus 3' translated and non-translated regions. *J Gen Virol*, **84**(2): 403-414
- Dong, B.; Xu, L.; Zhou, A.; Hassel, B.A.; Lee, X.; Torrence, P.F. & Silverman, R.H.** (1994) Intrinsic molecular activities of the interferon-induced 2-5A-dependent RNase. *J Biol Chem*, **269**(19): 14153-14158
- Dong, B. & Silverman, R.H.** (1995) 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A. *J Biol Chem*, **270**(8): 4133-4137
- Dong, B. & Silverman, R.H.** (1997) A bipartite model of 2-5A-dependent RNase L. *J Biol Chem*, **272**(35): 22236-22242
- Dong, B.; Niwa, M.; Walter, P. & Silverman, R.H.** (2001) Basis for regulated RNA cleavage by functional analysis of RNase L and Ire1p. *RNA*, **7**(3): 361-373

- Dong, J.; Lai, R.; Nielsen, K.; Fekete, C.A.; Qiu, H. & Hinnebusch, A.G.** (2004) The essential ATP-binding cassette protein RL11 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. *J Biol Chem*, **279**(40): 42157-42168
- Dong, B.; Kim, S.; Hong, S.; Gupta, J.D.; Malathi, K.; Klein, E.A.; Ganem, D.; Derisi, J.L.; Chow, S.A. & Silverman, R.H.** (2007) An infectious retrovirus susceptible to an IFN antiviral pathway from human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(5): 1655-1660
- Dotzauer, A.; Feinstone, S.M. & Kaplan, G.** (1994) Susceptibility of nonprimate cell lines to hepatitis A virus infection. *J Virol*, **68**(9): 6064-6068
- Dotzauer, A.; Gebhardt, U.; Bieback, K.; Göttke, U.; Kracke, A.; Mages, J.; Lemon, S.M. & 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
- Dotzauer, A.; Brenner, M.; Gebhardt, U. & Vallbracht, A.** (2005) IgA-coated particles of Hepatitis A virus are translocated antivectionally from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor. *J Gen Virol*, **86**(10): 2747-2751
- Dotzauer, A.** (2008) Hepatitis A Virus *in: Mahy, B. W. J. & van Regenmortel, M.* (Hrsg.) *Encyclopedia of Virology* (3. Edition) Elsevier: 343-350
- Drocourt, J.L.; Dieffenbach, C.W.; Ts'o, P.O.; Justesen, J. & Thang, M.N.** (1982) Structural requirements of (2'-5') oligoadenylate for protein synthesis inhibition in human fibroblasts. *Nucleic Acids Res*, **10**(6): 2163-2174
- Ehrenfeld, E. & Hunt, T.** (1971) Double-stranded poliovirus RNA inhibits initiation of protein synthesis by reticulocyte lysates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**(5): 1075-1078
- Emerson, S.U.; McRill, C.; Rosenblum, B.; Feinstone, S. & Purcell, R.H.** (1991) Mutations responsible for adaptation of hepatitis A virus to efficient growth in cell culture. *J Virol*, **65**(9): 4882-4886
- Emerson, S.U.; Huang, Y.K.; McRill, C.; Lewis, M. & Purcell, R.H.** (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
- Emerson, S.U.; Huang, Y.K. & Purcell, R.H.** (1993) 2B and 2C mutations are essential but mutations throughout the genome of HAV contribute to adaptation to cell culture. *Virology*, **194**(2): 475-480
- Eppstein, D.A.; March, Y.V.; Schryver, B.B.; Larsen, M.A.; Barnett, J.W.; Verheyden, J.P. & Prisbe, E.J.** (1982) Analogs of (A2'p)nA. Correlation of structure of analogs of ppp(A2'p)2A and (A2'p)2A with stability and biological activity. *J Biol Chem*, **257**(22): 13390-13397
- Escalante, C.R.; Shen, L.; Thanos, D. & Aggarwal, A.K.** (2002) Structure of NF-kappaB p50/p65 heterodimer bound to the PRDII DNA element from the interferon-beta promoter. *Structure*, **10**(3): 383-391
- Eskildsen, S.; Justesen, J.; Schierup, M.H. & Hartmann, R.** (2003) Characterization of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase ubiquitin-like family. *Nucleic Acids Res*, **31**(12): 3166-3173
- Espert, L.; Degols, G.; Gongora, C.; Blondel, D.; Williams, B.R.; Silverman, R.H. & 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
- Espert, L.; Rey, C.; Gonzalez, L.; Degols, G.; Chelbi-Alix, M.K.; Mechti, N. & Gongora, C.** (2004) The exonuclease ISG20 is directly induced by synthetic dsRNA via NF-kappaB and IRF1 activation. *Oncogene*, **23**(26): 4636-4640
- Espert, L.; Degols, G.; Lin, Y.; 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**(8): 2221-2229
- Espert, L.; Eldin, P.; Gongora, C.; Bayard, B.; Harper, F.; Chelbi-Alix, M.K.; Bertrand, E.; Degols, G. & Mechti, N.** (2006) The exonuclease ISG20 mainly localizes in the nucleolus and the Cajal (Coiled) bodies and is associated with nuclear SMN protein-containing complexes. *J Cell Biochem*, **98**(5): 1320-1333
- Etienne-Smekens, M.; Vandebussche, P.; Content, J. & Dumont, J.E.** (1983) (2'-5')Oligoadenylate in rat liver: modulation after partial hepatectomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**(15): 4609-4613
- Faltynek, C.R.; McCandless, S.; Chebath, J. & Baglioni, C.** (1985) Different mechanisms for activation of gene transcription by interferons alpha and gamma. *Virology*, **144**(1): 173-180
- Farrell, R.E.** (1998) RNA Methodologies. (2. Ausgabe) Academic Press, USA

- Feigelstock, D.; Thompson, P.; Mattoo, P. & Kaplan, G.G.** (1998a) Polymorphisms of the hepatitis A virus cellular receptor 1 in African green monkey kidney cells result in antigenic variants that do not react with protective monoclonal antibody 190/4. *J Virol*, **72**(7): 6218-6222
- Feigelstock, D.; Thompson, P.; Mattoo, P.; Zhang, Y. & Kaplan, G.G.** (1998b) The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol*, **72**(8): 6621-6628
- Feinstone, S.M.; Kapikian, A.Z. & Purceli, R.H.** (1973) Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*, **182**: 1026-1028
- 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
- Ferbus, D.; Testa, U.; Titeux, M.; Louache, F. & Thang, M.N.** (1985) Induction of (2'-5') oligoadenylate synthetase activity during granulocyte and monocyte differentiation. *Mol Cell Biochem*, **67**(2): 125-133
- Fernández, M.; Quiroga, J.A. & Carreño, V.** (2003) Hepatitis B virus downregulates the human interferon-inducible MxA promoter through direct interaction of precore/core proteins. *J Gen Virol*, **84**(8): 2073-2082
- Figueroa, A.; Cuadrado, A.; Fan, J.; Atasoy, U.; Muscat, G.E.; Muñoz-Canoves, P.; Gorospe, M. & Muñoz, A.** (2003) Role of HuR in skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes. *Mol Cell Biol*, **23**(14): 4991-5004
- Flach, B.** (2005) Charakterisierung von rRNA-Degradationsprodukten in HAV-infizierten FRhK-4-Zellen und Untersuchung des Einflusses der Infektion auf die Promotoraktivität der ISG20-Nuklease. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Flehmg, B.; Frank, H.; Frösner, G.G. & Gerth, H.J.** (1977) Hepatitis A-virus particles in stools of patients from a natural hepatitis outbreak in Germany. *Med Microbiol Immunol*, **163**(3): 209-214
- Flehmg, 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**(4): 239-248
- Flehmg, B.** (1981) Hepatitis A virus in cell culture. II. Growth characteristics of hepatitis A virus in Frhk-4/R cells. *Med Microbiol Immunol*, **170**(2): 73-81
- Flehmg, B.; Vallbracht, A. & Wurster, G.** (1981) Hepatitis A virus in cell culture. III. Propagation of hepatitis A virus in human embryo kidney cells and human embryo fibroblast strains. *Med Microbiol Immunol*, **170**(2): 83-89
- Fleischer, B.; Fleischer, S.; Maier, K.; Wiedmann, K.H.; Sacher, M.; Thaler, H. & Vallbracht, A.** (1990) Clonal analysis of infiltrating T lymphocytes in liver tissue in viral hepatitis A. *Immunology*, **69**(1): 14-19
- Flodström-Tullberg, M.; Hultcrantz, M.; Stotland, A.; Maday, A.; Tsai, D.; Fine, C.; Williams, B.; Silverman, R. & Sarvetnick, N.** (2005) RNase L and double-stranded RNA-dependent protein kinase exert complementary roles in islet cell defense during coxsackievirus infection. *J Immunol*, **174**(3): 1171-1177
- Floyd-Smith, G.; Slattery, E. & Lengyel, P.** (1981) Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5')oligoadenylate--dependent endonuclease. *Science*, **212**: 1030-1032
- Floyd-Smith, G.; Yoshie, O. & Lengyel, P.** (1982) Interferon action. Covalent linkage of (2'-5')pppApApA(32P)pCp to (2'-5')(A)n-dependent ribonucleases in cell extracts by ultraviolet irradiation. *J Biol Chem*, **257**(15): 8584-8587
- Floyd-Smith, G. & Denton, J.S.** (1988a) A (2'-5')An-dependent endonuclease: tissue distribution in BALB/c mice and the effects of IFN-beta treatment and anti-IFN-alpha/beta immunoglobulin on the levels of the enzyme. *J Interferon Res*, **8**(4): 517-525
- Floyd-Smith, G. & Denton, J.S.** (1988b) Age-dependent changes are observed in the levels of an enzyme mediator of interferon action: a (2'-5')A(n)-dependent endoribonuclease. *Proc Soc Exp Biol Med*, **189**(3): 329-337
- Frese, M.; Kochs, G.; Meier-Dieter, U.; Siebler, J. & Haller, O.** (1995) Human MxA protein inhibits tick-borne Thogoto virus but not Dhori virus. *J Virol*, **69**(6): 3904-3909
- Frese, M.; Kochs, G.; Feldmann, H.; Hertkorn, C. & Haller, O.** (1996) Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *J Virol*, **70**(2): 915-923
- Friedman, R.M.; Metz, D.H.; Esteban, R.M.; Tovell, D.R.; Ball, L.A. & Kerr, I.M.** (1972) Mechanism of interferon action: inhibition of viral messenger ribonucleic acid translation in L-cell extracts. *J Virol*, **10**(6): 1184-1198

- Frings, W. & Dotzauer, A.** (2001) Adaptation of primate cell-adapted hepatitis A virus strain HM175 to growth in guinea pig cells is independent of mutations in the 5' nontranslated region. *J Gen Virol*, **82**(3): 597-602
- Frösner, G.G.; Deinhardt, F.; Scheid, R.; Gauss-Müller, V.; Holmes, N.; Messelberger, V.; Siegl, G. & Alexander, J.J.** (1979) Propagation of human hepatitis A virus in a hepatoma cell line. *Infection*, **7**(6): 303-305
- Funkhouser, A.W.; Purcell, R.H.; D'Hondt, E. & Emerson, S.U.** (1994) Attenuated hepatitis A virus: genetic determinants of adaptation to growth in MRC-5 cells. *J Virol*, **68**(1): 148-157
- Gauss-Müller, V.; Frösner, G.G. & Deinhardt, F.** (1981) Propagation of hepatitis A virus in human embryo fibroblasts. *J Med Virol*, **7**(3): 233-239
- Gauss-Müller, V. & Deinhardt, F.** (1984) Effect of hepatitis A virus infection on cell metabolism in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med*, **175**(1): 10-15
- Gauss-Müller, V.; von der Helm, K. & Deinhardt, F.** (1984) Translation in vitro of hepatitis A virus RNA. *Virology*, **137**(1): 182-184
- Gauss-Müller, V.; Lottspeich, F. & Deinhardt, F.** (1986) Characterization of hepatitis A virus structural proteins. *Virology*, **155**(2): 732-736
- Ghosh, A.; Sarkar, S.N.; Guo, W.; Bandyopadhyay, S. & Sen, G.C.** (1997) Enzymatic activity of 2'-5'-oligoadenylate synthetase is impaired by specific mutations that affect oligomerization of the protein. *J Biol Chem*, **272**(52): 33220-33226
- Gitlin, L.; Barchet, W.; Gilfillan, S.; Cella, M.; Beutler, B.; Flavell, R.A.; Diamond, M.S. & Colonna, M.** (2006) Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(22): 8459-8464
- Glass, M.J.; Jia, X.Y. & Summers, D.F.** (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**(2): 842-852
- Glikson, M.; Galun, E.; Oren, R.; Tur-Kaspa, R. & Shouval, D.** (1992) Relapsing hepatitis A. Review of 14 cases and literature survey. *Medicine (Baltimore)*, **71**(1): 14-23
- Goetschy, J.F.; Zeller, H.; Content, J. & Horisberger, M.A.** (1989) Regulation of the interferon-inducible IFI-78K gene, the human equivalent of the murine Mx gene, by interferons, double-stranded RNA, certain cytokines, and viruses. *J Virol*, **63**(6): 2616-2622
- Gómez, C.E.; Vandermeeren, A.M.; García, M.A.; Domingo-Gil, E. & Esteban, M.** (2005) Involvement of PKR and RNase L in translational control and induction of apoptosis after Hepatitis C polyprotein expression from a vaccinia virus recombinant. *Virol J*, **2**: 81
- Gongora, C.; David, G.; Pintard, L.; Tissot, C.; Hua, T.D.; Dejean, A. & Mechti, N.** (1997) Molecular cloning of a new interferon-induced PML nuclear body-associated protein. *J Biol Chem*, **272**(31): 19457-19463
- Gongora, C.; Degols, G.; Espert, L.; Hua, T.D. & Mechti, N.** (2000) A unique ISRE, in the TATA-less human Isg20 promoter, confers IRF-1-mediated responsiveness to both interferon type I and type II. *Nucleic Acids Res*, **28**(12): 2333-2341
- Goodbourn, S.; Didcock, L. & Randall, R.E.** (2000) Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol*, **81**(10): 2341-2364
- Gordien, E.; Rosmorduc, O.; Peltekian, C.; Garreau, F.; Bréchet, C. & Kremsdorf, D.** (2001) Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein. *J Virol*, **75**(6): 2684-2691
- 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**(1): 157-169
- Goswami, B.B.; Kulka, M.; Ngo, D. & Cebula, T.A.** (2004) Apoptosis induced by a cytopathic hepatitis A virus is dependent on caspase activation following ribosomal RNA degradation but occurs in the absence of 2'-5' oligoadenylate synthetase. *Antiviral Res*, **63**(3): 153-166
- Gotter, J.** (1999) Einfluß eines RNase L-Inhibitors auf die Apoptoseinduktion durch die cytopathogene Hepatitis A-Variante HAVcyt/HB1.1. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Graff, J.; Normann, A.; Feinstone, S.M. & 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
- Gribaudo, G.; Fizzotti, M.; Cocciolo, M.G.; Cavallo, G. & Landolfo, S.** (1989) Different mechanisms regulate the IFN-inducible expression of 40 kDa human 2'-5' oligo (A) synthetase in HeLa and Molt 4 cells. *Int J Biol Markers*, **4**(4): 221-225

- Gust, I.D.; Coulepis, A.G.; Feinstone, S.M.; Locarnini, S.A.; Moritsugu, Y.; Najera, R. & Siegl, G.** (1983) Taxonomic classification of hepatitis A virus. *Intervirology*, **20**(1): 1-7
- Haller, O. & Kochs, G.** (2002) Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, **3**(10): 710-717
- Haller, O.; Stertz, S. & Kochs, G.** (2007) The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes Infect*, **9**: 1636-1643
- Han, J. & Barton, D.J.** (2002) Activation and evasion of the antiviral 2'-5' oligoadenylate synthetase/ribonuclease L pathway by hepatitis C virus mRNA. *RNA*, **8**(4): 512-525
- Han, J.; Wroblewski, G.; Xu, Z.; Silverman, R.H. & Barton, D.J.** (2004) Sensitivity of hepatitis C virus RNA to the antiviral enzyme ribonuclease L is determined by a subset of efficient cleavage sites. *J Interferon Cytokine Res*, **24**(11): 664-676
- Han, J.; Townsend, H.L.; Jha, B.K.; Paranjape, J.M.; Silverman, R.H. & Barton, D.J.** (2007) A phylogenetically conserved RNA structure in the poliovirus open reading frame inhibits the antiviral endoribonuclease RNase L. *J Virol/Department of Microbiology, School of Medicine, University of Colorado, Mail Stop 8333, Room P18-9116, 12800 E. 19th Ave., Aurora, CO 80045, USA.*, **81**(11): 5561-5572
- Hartmann, R.; Olsen, H.S.; Widder, S.; Jorgensen, R. & Justesen, J.** (1998a) p59OASL, a 2'-5' oligoadenylate synthetase like protein: a novel human gene related to the 2'-5' oligoadenylate synthetase family. *Nucleic Acids Res*, **26**(18): 4121-4128
- Hartmann, R.; Norby, P.L.; Martensen, P.M.; Jorgensen, P.; James, M.C.; Jacobsen, C.; Moestrup, S.K.; Clemens, M.J. & Justesen, J.** (1998b) Activation of 2'-5' oligoadenylate synthetase by single-stranded and double-stranded RNA aptamers. *J Biol Chem*, **273**(6): 3236-3246
- Hartmann, R.; Justesen, J.; Sarkar, S.N.; Sen, G.C. & Yee, V.C.** (2003) Crystal structure of the 2'-specific and double-stranded RNA-activated interferon-induced antiviral protein 2'-5'-oligoadenylate synthetase. *Mol Cell*, **12**(5): 1173-1185
- Hashimoto, S.I.; Suzuki, T.; Nagai, S.; Yamashita, T.; Toyoda, N. & Matsushima, K.** (2000) Identification of genes specifically expressed in human activated and mature dendritic cells through serial analysis of gene expression. *Blood*, **96**(6): 2206-2214
- Hassel, B.A.; Zhou, A.; Sotomayor, C.; Maran, A. & Silverman, R.H.** (1993) A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon. *EMBO J*, **12**(8): 3297-3304
- Haugh, M.C.; Cayley, P.J.; Serafinowska, H.T.; Norman, D.G.; Reese, C.B. & Kerr, I.M.** (1983) Analogues and analogue inhibitors of ppp(A2'p)nA. Their stability and biological activity. *Eur J Biochem*, **132**(1): 77-84
- Hawkes, R.** (1979) General principles underlying laboratory diagnosis of viral infections. in: Lenette, E. H. & Schmidt, N. J. (Hrsg.) *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. (5. Auflage) American Public Health Association, Inc., Washington: 3-48
- Heitmann, A.** (2002) Untersuchung zur Optimierung der Nachweismöglichkeit von infektiösem Hepatitis A Virus aus Blut, Blutprodukten und Vakzine-Pools. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Heitmann, A.** (2008) Untersuchungen zum Gewebetropismus des Hepatitis A-Virus im Mausmodell durch quantitative Analyse viraler Nukleinsäure. Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Hersh, C.L.; Brown, R.E.; Roberts, W.K.; Swyryd, E.A.; Kerr, I.M. & Stark, G.R.** (1984) Simian virus 40-infected, interferon-treated cells contain 2',5'-oligoadenylates which do not activate cleavage of RNA. *J Biol Chem*, **259**(3): 1731-1737
- Hillebrecht, W.** (2002) Einfluss der viralen genomischen RNA des Hepatitis A-Virus auf die Induktion der Interleukin-6-Expression über eine Aktivierung des Toll-like Rezeptors 3. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Hiscott, J.; Lin, R.; Nakhaei, P. & Paz, S.** (2006) MasterCARD: a priceless link to innate immunity. *Trends Mol Med*, **12**(2): 53-56
- Horisberger, M.A.; Wathelet, M.; Szpirer, J.; Szpirer, C.; Islam, Q.; Levan, G.; Huez, G. & Content, J.** (1988) cDNA cloning and assignment to chromosome 21 of IFI-78K gene, the human equivalent of murine Mx gene. *Somat Cell Mol Genet*, **14**(2): 123-131

- Horisberger, M.A.; McMaster, G.K.; Zeller, H.; Wathelet, M.G.; Dellis, J. & Content, J.** (1990) Cloning and sequence analyses of cDNAs for interferon- and virus-induced human Mx proteins reveal that they contain putative guanine nucleotide-binding sites: functional study of the corresponding gene promoter. *J Virol*, **64**(3): 1171-1181
- Horisberger, M.A.** (1992) Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *J Virol*, **66**(8): 4705-4709
- Hornei, B.; Kämmerer, R.; Moubayed, P.; Frings, W.; Gauss-Müller, V. & Dotzauer, A.** (2001) Experimental hepatitis A virus infection in guinea pigs. *J Med Virol*, **64**(4): 402-409
- Hornung, V.; Ellegast, J.; Kim, S.; Brzózka, K.; Jung, A.; Kato, H.; Poeck, H.; Akira, S.; Conzelmann, K.; Schlee, M.; Endres, S. & Hartmann, G.** (2006) 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*, **314**: 994-997
- Hovanessian, A.G.; Brown, R.E. & Kerr, I.M.** (1977) Synthesis of low molecular weight inhibitor of protein synthesis with enzyme from interferon-treated cells. *Nature*, **268**: 537-540
- Hovanessian, A.G. & Kerr, I.M.** (1979) The (2'-5') oligoadenylate (pppA2'-5'A2'-5'A) synthetase and protein kinase(s) from interferon-treated cells. *Eur J Biochem*, **93**(3): 515-526
- Hovanessian, A.G.; Wood, J.; Meurs, E. & Montagnier, L.** (1979) Increased nuclease activity in cells treated with pppA2'p5'A2'p5' A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**(7): 3261-3265
- Hovanessian, A.G. & Wood, J.N.** (1980) Anticellular and antiviral effects of pppA(2'p5'A)n. *Virology*, **101**(1): 81-90
- Hovanessian, A.G.; Laurent, A.G.; Chebath, J.; Galabru, J.; Robert, N. & Svab, J.** (1987) Identification of 69-kd and 100-kd forms of 2-5A synthetase in interferon-treated human cells by specific monoclonal antibodies. *EMBO J*, **6**(5): 1273-1280
- Hovanessian, A.G.; Svab, J.; Marié, I.; Robert, N.; Chamaret, S. & Laurent, A.G.** (1988) Characterization of 69- and 100-kDa forms of 2-5A-synthetase from interferon-treated human cells. *J Biol Chem*, **263**(10): 4945-4949
- Hovanessian, A.G. & Justesen, J.** (2007) The human 2'-5' oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. *Biochimie*, **89**(6-7): 779-788
- Hovnanian, A.; Rebouillat, D.; Mattei, M.G.; Levy, E.R.; Marié, I.; Monaco, A.P. & Hovanessian, A.G.** (1998) The human 2',5'-oligoadenylate synthetase locus is composed of three distinct genes clustered on chromosome 12q24.2 encoding the 100-, 69-, and 40-kDa forms. *Genomics*, **52**(3): 267-277
- Hunt, T. & Ehrenfeld, E.** (1971) Cytoplasm from poliovirus-infected HeLa cells inhibits cell-free haemoglobin synthesis. *Nat New Biol*, **230**(11): 91-94
- Imai, J.; Lesiak, K. & Torrence, P.F.** (1985) Respective role of each of the purine N-6 amino groups of 5'-O-triphosphoryladenyl(2'→5')adenyl(2'→5')adenosine in binding to and activation of RNase L. *J Biol Chem*, **260**(3): 1390-1393
- Imaizumi, T.; Mechti, N.; Matsumiya, T.; Sakaki, H.; Kubota, K.; Yoshida, H.; Kimura, H. & Satoh, K.** (2008) Expression of interferon-stimulated gene 20 in vascular endothelial cells. *Microbiol Immunol*, **52**(1): 30-35
- Iordanov, M.S.; Paranjape, J.M.; Zhou, A.; Wong, J.; Williams, B.R.; Meurs, E.F.; Silverman, R.H. & Magun, B.E.** (2000) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase by double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus: involvement of RNase L, protein kinase R, and alternative pathways. *Mol Cell Biol*, **20**(2): 617-627
- Isaacs, A. & Lindenmann, J.** (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **147**: 258-267
- Isler, J.A.; Skalet, A.H. & Alwine, J.C.** (2005) Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *J Virol*, **79**(11): 6890-6899
- Izmailova, E.; Bertley, F.M.N.; Huang, Q.; Makori, N.; Miller, C.J.; Young, R.A. & Aldovini, A.** (2003) HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages. *Nat Med*, **9**(2): 191-197
- Jacobsen, H.; Krause, D.; Friedman, R.M. & Silverman, R.H.** (1983a) Induction of ppp(A2'p)nA-dependent RNase in murine JLS-V9R cells during growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**(16): 4954-4958
- Jacobsen, H.; Czarniecki, C.W.; Krause, D.; Friedman, R.M. & Silverman, R.H.** (1983b) Interferon-induced synthesis of 2-5A-dependent RNase in mouse JLS-V9R cells. *Virology*, **125**(2): 496-501

- Jansen, R.W.; Newbold, J.E. & Lemon, S.M.** (1988) Complete nucleotide sequence of a cell culture-adapted variant of hepatitis A virus: comparison with wild-type virus with restricted capacity for in vitro replication. *Virology*, **163**(2): 299-307
- Janssen-Weets, O.** (2002) Effekte persistenter HAV-Infektionen auf die Aktivierbarkeit der Ribonuklease L. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Janzen, C.; Kochs, G. & Haller, O.** (2000) A monomeric GTPase-negative MxA mutant with antiviral activity. *J Virol*, **74**(17): 8202-8206
- Jiang, D.; Guo, H.; Xu, C.; Chang, J.; Gu, B.; Wang, L.; Block, T.M. & Guo, J.** (2008) Identification of three interferon-inducible cellular enzymes that inhibit the replication of hepatitis C virus. *J Virol*, **82**(4): 1665-1678
- Johnson, C.L. & Gale, M.** (2006) CARD games between virus and host get a new player. *Trends Immunol*, **27**(1): 1-4
- Johnston, M.I. & Hearl, W.G.** (1987) Purification and characterization of a 2'-phosphodiesterase from bovine spleen. *J Biol Chem*, **262**(17): 8377-8382
- Jordan, R.; Wang, L.; Graczyk, T.M.; Block, T.M. & Romano, P.R.** (2002) Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells. *J Virol*, **76**(19): 9588-9599
- Kärber, G.** (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche *Arch Exp Pathol Pharmacol*, **162**: 480-483
- Kajaste-Rudnitski, A.; Mashimo, T.; Frenkiel, M.; Guénet, J.; Lucas, M. & Desprès, P.** (2006) The 2',5'-oligoadenylate synthetase 1b is a potent inhibitor of West Nile virus replication inside infected cells. *J Biol Chem*, **281**(8): 4624-4637
- Kaplan, G.; Totsuka, A.; Thompson, P.; Akatsuka, T.; Moritsugu, Y. & Feinstone, S.M.** (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
- Karayannis, P.; Jowett, T.; Enticott, M.; Moore, D.; Pignatelli, M.; Brenes, F.; Scheuer, P.J. & Thomas, H.C.** (1986) Hepatitis A virus replication in tamarins and host immune response in relation to pathogenesis of liver cell damage. *J Med Virol*, **18**(3): 261-276
- Kato, A.; Homma, T.; Batchelor, J.; Hashimoto, N.; Imai, S.; Wakiguchi, H.; Saito, H. & Matsumoto, K.** (2003) Interferon-alpha/beta receptor-mediated selective induction of a gene cluster by CpG oligodeoxynucleotide 2006. *BMC Immunol*, **4**: 8
- Kato, H.; Takeuchi, O.; Sato, S.; Yoneyama, M.; Yamamoto, M.; Matsui, K.; Uematsu, S.; Jung, A.; Kawai, T.; Ishii, K.J.; Yamaguchi, O.; Otsu, K.; Tsujimura, T.; Koh, C.; e Sousa, C.R.; Matsuura, Y.; Fujita, T. & Akira, S.** (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, **441**: 101-105
- Kerr, I.M.; Brown, R.E. & Ball, L.A.** (1974) Increased sensitivity of cell-free protein synthesis to double-stranded RNA after interferon treatment. *Nature*, **250**: 57-59
- Kerr, I.M.; Brown, R.E. & Hovanessian, A.G.** (1977) Nature of inhibitor of cell-free protein synthesis formed in response to interferon and double-stranded RNA. *Nature*, **268**: 540-542
- Kerr, I.M. & Brown, R.E.** (1978) pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**(1): 256-260
- Kerr, I.D.** (2004) Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**(1): 166-173
- Khabar, K.S.A.; Siddiqui, Y.M.; al-Zoghaibi, F.; al-Haj, L.; Dhalla, M.; Zhou, A.; Dong, B.; Whitmore, M.; Paranjape, J.; Al-Ahdal, M.N.; Al-Mohanna, F.; Williams, B.R.G. & Silverman, R.H.** (2003) RNase L mediates transient control of the interferon response through modulation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J Biol Chem*, **278**(22): 20124-20132
- Khanna, K.K.; An, S.J.; Wu, J.M.; Landolfo, S. & Hovanessian, A.G.** (1991) Absence of the 40-kDa form of (2'-5')oligoadenylate synthetase and its corresponding mRNA from skin fibroblasts derived from Alzheimer disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(13): 5852-5856
- Kispal, G.; Sipos, K.; Lange, H.; Fekete, Z.; Bedekovics, T.; Janáky, T.; Bassler, J.; Netz, D.J.A.; Balk, J.; Rotte, C. & Lill, R.** (2005) Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO J*, **24**(3): 589-598

- Klinger, M.H.; 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**(12): 2291-2307
- Knight, M.; Cayley, P.J.; Silverman, R.H.; Wreschner, D.H.; Gilbert, C.S.; Brown, R.E. & Kerr, I.M.** (1980) Radioimmune, radiobinding and HPLC analysis of 2-5A and related oligonucleotides from intact cells. *Nature*, **288**: 189-192
- Kochs, G.; Trost, M.; Janzen, C. & Haller, O.** (1998) MxA GTPase: oligomerization and GTP-dependent interaction with viral RNP target structures. *Methods*, **15**(3): 255-263
- Kochs, G. & Haller, O.** (1999a) GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J Biol Chem*, **274**(7): 4370-4376
- Kochs, G. & Haller, O.** (1999b) Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(5): 2082-2086
- Kochs, G.; Haener, M.; Aebi, U. & Haller, O.** (2002a) Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers. *J Biol Chem*, **277**(16): 14172-14176
- Kochs, G.; Janzen, C.; Hohenberg, H. & Haller, O.** (2002b) Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(5): 3153-3158
- Kochs, G.; Reichelt, M.; Danino, D.; Hinshaw, J.E. & Haller, O.** (2005) Assay and functional analysis of dynamin-like Mx proteins. *Methods Enzymol*, **404**: 632-643
- Konduru, K. & Kaplan, G.G.** (2006) Stable growth of wild-type hepatitis A virus in cell culture. *J Virol*, **80**(3): 1352-1360
- Kovacs, T.; Pabuccuoglu, A.; Lesiak, K. & Torrence, P.** (1993) Fluorodeoxy sugar analogues of 2',5'-oligoadenylate probes of hydrogen bonding in enzymes of the 2-5A system. *Bioorg Chem*, **21**: 192-208
- Krause, D.; Silverman, R.H.; Jacobsen, H.; Leisy, S.A.; Dieffenbach, C.W. & Friedman, R.M.** (1985a) Regulation of ppp(A2'p)nA-dependent RNase levels during interferon treatment and cell differentiation. *Eur J Biochem*, **146**(3): 611-618
- Krause, D.; Panet, A.; Arad, G.; Dieffenbach, C.W. & Silverman, R.H.** (1985b) Independent regulation of ppp(A2'p)nA-dependent RNase in NIH 3T3, clone 1 cells by growth arrest and interferon treatment. *J Biol Chem*, **260**(16): 9501-9507
- Krishnan, I. & Baglioni, C.** (1981) Elevated levels of (2'-5')oligoadenylic acid polymerase activity in growth-arrested human lymphoblastoid Namalva cells. *Mol Cell Biol*, **1**(10): 932-938
- Krüger, S.; Silber, A.; Engel, C.; Görgens, H.; Mangold, E.; Pagenstecher, C.; Holinski-Feder, E.; von Knebel Doeberitz, M.; Moeslein, G.; Dietmaier, W.; Stemmler, S.; Friedl, W.; Rüschoff, J.; Schackert, H.K. & Consortium, G.H.N.C.C.** (2005) Arg462Gln sequence variation in the prostate-cancer-susceptibility gene RNASEL and age of onset of hereditary non-polyposis colorectal cancer: a case-control study. *Lancet Oncol*, **6**(8): 566-572
- Kubota, K.; Nakahara, K.; Ohtsuka, T.; Yoshida, S.; Kawaguchi, J.; Fujita, Y.; Ozeki, Y.; Hara, A.; Yoshimura, C.; Furukawa, H.; Haruyama, H.; Ichikawa, K.; Yamashita, M.; Matsuoka, T. & Iijima, Y.** (2004) Identification of 2'-phosphodiesterase, which plays a role in the 2-5A system regulated by interferon. *J Biol Chem*, **279**(36): 37832-37841
- Kulka, M.; Chen, A.; Ngo, D.; Bhattacharya, S.S.; Cebula, T.A. & Goswami, B.B.** (2003) The cytopathic 18f strain of Hepatitis A virus induces RNA degradation in FrhK4 cells. *Arch Virol*, **148**(7): 1275-1300
- Kurth, U.** (2001) Einfluss des RNase L-Inhibitors (RLI) auf die Replikation des Hepatitis A Virus in Primatenzellen. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Kusov, Y.; Weitz, M.; Dollenmeier, G.; Gauss-Müller, V. & Siegl, G.** (1996) RNA-protein interactions at the 3' end of the hepatitis A virus RNA. *J Virol*, **70**(3): 1890-1897
- Kusov, Y.Y.; Probst, C.; Jecht, M.; Jost, P.D. & Gauss-Müller, V.** (1998) Membrane association and RNA binding of recombinant hepatitis A virus protein 2C. *Arch Virol*, **143**(5): 931-944
- Landis, H.; Simon-Jödicke, A.; Klöti, A.; Paolo, C.D.; Schnorr, J.J.; Schneider-Schaulies, S.; Hefti, H.P. & Pavlovic, J.** (1998) Human MxA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of viral structural proteins. *J Virol*, **72**(2): 1516-1522
- Leib, D.A.; Machalek, M.A.; Williams, B.R.; Silverman, R.H. & Virgin, H.W.** (2000) Specific phenotypic restoration of an attenuated virus by knockout of a host resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(11): 6097-6101

- Lemon, S.M.; Murphy, P.C.; Shields, P.A.; Ping, L.H.; Feinstone, S.M.; Cromeans, T. & Jansen, R.W. (1991) Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *J Virol*, **65**(4): 2056-2065
- Lenardo, M.J.; Fan, C.M.; Maniatis, T. & Baltimore, D. (1989) The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. *Cell*, **57**(2): 287-294
- Le Roy, F.; Bisbal, C.; Silhol, M.; Martinand, C.; Lebleu, B. & Salehzada, T. (2001) The 2-5A/RNase L/RNase L inhibitor (RLI) [correction of (RNI)] pathway regulates mitochondrial mRNAs stability in interferon alpha-treated H9 cells. *J Biol Chem*, **276**(51): 48473-48482
- Le Roy, F.; Salehzada, T.; Bisbal, C.; Dougherty, J.P. & Peltz, S.W. (2005) A newly discovered function for RNase L in regulating translation termination. *Nat Struct Mol Biol*, **12**(6): 505-512
- Lesiak, K.; Imai, J.; Floyd-Smith, G. & Torrence, P.F. (1983) Biological activities of phosphodiester linkage isomers of 2-5A. *J Biol Chem*, **258**(21): 13082-13088
- Lesiak, K. & Torrence, P.F. (1983) Synthesis and biological activity of a fluorescent analogue of 2-5A. *FEBS Lett*, **151**(2): 291-296
- Lesiak, K. & Torrence, P.F. (1985) Phosphorylation of 2-5A core 5'-diphosphate to 2-5A in mouse L cell extracts. *Biochem Biophys Res Commun*, **126**(2): 917-921
- Li, X.L.; Blackford, J.A. & Hassel, B.A. (1998) RNase L mediates the antiviral effect of interferon through a selective reduction in viral RNA during encephalomyocarditis virus infection. *J Virol*, **72**(4): 2752-2759
- Li, X.L.; Blackford, J.A.; Judge, C.S.; Liu, M.; Xiao, W.; Kalvakolanu, D.V. & Hassel, B.A. (2000) RNase-L-dependent destabilization of interferon-induced mRNAs. A role for the 2-5A system in attenuation of the interferon response. *J Biol Chem*, **275**(12): 8880-8888
- Li, Q. & Verma, I.M. (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, **2**(10): 725-734
- Li, G.; Xiang, Y.; Sabapathy, K. & Silverman, R.H. (2004) An apoptotic signaling pathway in the interferon antiviral response mediated by RNase L and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem*, **279**(2): 1123-1131
- Li, X.; Sun, L.; Seth, R.B.; Pineda, G. & Chen, Z.J. (2005) Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(49): 17717-17722
- Li, X.; Andersen, J.B.; Ezelle, H.J.; Wilson, G.M. & Hassel, B.A. (2007) Post-transcriptional regulation of RNase-L expression is mediated by the 3'-untranslated region of its mRNA. *J Biol Chem*, **282**(11): 7950-7960
- Lindenmann, J. (1964) INHERITANCE OF RESISTANCE TO INFLUENZA VIRUS IN MICE. *Proc Soc Exp Biol Med*, **116**: 506-509
- Liu, W.; Liang, S.; Liu, H.; Silverman, R. & Zhou, A. (2007) Tumour suppressor function of RNase L in a mouse model. *Eur J Cancer*, **43**(1): 202-209
- Locarnini, S.A.; Coulepis, A.G.; Kaldor, J. & Gust, I.D. (1980) Coproantibodies in hepatitis A: detection by enzyme-linked immunosorbent assay and immune electron microscopy. *J Clin Microbiol*, **11**(6): 710-716
- Lopp, A.; Kuusksalu, A.; Reintamm, T.; Müller, W.E.G. & Kelve, M. (2002) 2',5'-oligoadenylate synthetase from a lower invertebrate, the marine sponge *Geodia cydonium*, does not need dsRNA for its enzymatic activity. *Biochim Biophys Acta*, **1590**: 140-149
- Magness, C.L.; Fellin, P.C.; Thomas, M.J.; Korth, M.J.; Agy, M.B.; Proll, S.C.; Fitzgibbon, M.; Scherer, C.A.; Miner, D.G.; Katze, M.G. & Iadonato, S.P. (2005) Analysis of the *Macaca mulatta* transcriptome and the sequence divergence between *Macaca* and human. *Genome Biol*, **6**(7): R60
- Magulski, T. (2007) 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 im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Maier, K.; Gabriel, P.; Koscielniak, E.; Stierhof, Y.D.; Wiedmann, K.H.; Flehmig, B. & Vallbracht, A. (1988) Human gamma interferon production by cytotoxic T lymphocytes sensitized during hepatitis A virus infection. *J Virol*, **62**(10): 3756-3763
- Maitra, R.K.; McMillan, N.A.; Desai, S.; McSwiggen, J.; Hovanessian, A.G.; Sen, G.; Williams, B.R. & Silverman, R.H. (1994) HIV-1 TAR RNA has an intrinsic ability to activate interferon-inducible enzymes. *Virology*, **204**(2): 823-827

- Maitra, R.K. & Silverman, R.H.** (1998) Regulation of human immunodeficiency virus replication by 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *J Virol*, **72**(2): 1146-1152
- Malathi, K.; Paranjape, J.M.; Bulanova, E.; Shim, M.; Guenther-Johnson, J.M.; Faber, P.W.; Eling, T.E.; Williams, B.R.G. & Silverman, R.H.** (2005) A transcriptional signaling pathway in the IFN system mediated by 2'-5'-oligoadenylate activation of RNase L. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(41): 14533-14538
- Malathi, K.; Dong, B.; Gale, M. & Silverman, R.H.** (2007) Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature*, **448**: 816-819
- Maniatis, T.; Falvo, J.V.; Kim, T.H.; Kim, T.K.; Lin, C.H.; Parekh, B.S. & Wathlet, M.G.** (1998) Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **63**: 609-620
- Marié, I.; Galabru, J.; Svab, J. & Hovanessian, A.G.** (1989) Preparation and characterization of polyclonal antibodies specific for the 69 and 100 k-dalton forms of human 2-5A synthetase. *Biochem Biophys Res Commun*, **160**(2): 580-587
- Marié, I.; Svab, J.; Robert, N.; Galabru, J. & Hovanessian, A.G.** (1990) Differential expression and distinct structure of 69- and 100-kDa forms of 2-5A synthetase in human cells treated with interferon. *J Biol Chem*, **265**(30): 18601-18607
- Marié, I. & Hovanessian, A.G.** (1992) The 69-kDa 2-5A synthetase is composed of two homologous and adjacent functional domains. *J Biol Chem*, **267**(14): 9933-9939
- Marié, I.; Blanco, J.; Rebouillat, D. & Hovanessian, A.G.** (1997) 69-kDa and 100-kDa isoforms of interferon-induced (2'-5')oligoadenylate synthetase exhibit differential catalytic parameters. *Eur J Biochem*, **248**(2): 558-566
- Marié, I.; Rebouillat, D. & Hovanessian, A.G.** (1999) The expression of both domains of the 69/71 kDa 2',5' oligoadenylate synthetase generates a catalytically active enzyme and mediates an anti-viral response. *Eur J Biochem*, **262**(1): 155-165
- Martin, A.; Bénichou, D.; Chao, S.F.; Cohen, L.M. & Lemon, S.M.** (1999) Maturation of the hepatitis A virus capsid protein VP1 is not dependent on processing by the 3Cpro proteinase. *J Virol*, **73**(8): 6220-6227
- Martin, A. & Lemon, S.M.** (2006) Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology*, **43**(2 Suppl. 1): S164-S172
- Martinand, C.; Salehzada, T.; Silhol, M.; Lebleu, B. & Bisbal, C.** (1998a) The RNase L inhibitor (RLI) is induced by double-stranded RNA. *J Interferon Cytokine Res*, **18**(12): 1031-1038
- Martinand, C.; Salehzada, T.; Silhol, M.; Lebleu, B. & Bisbal, C.** (1998b) RNase L inhibitor (RLI) antisense constructions block partially the down regulation of the 2-5A/RNase L pathway in encephalomyocarditis-virus-(EMCV)-infected cells. *Eur J Biochem*, **254**(2): 248-255
- Martinand, C.; Montavon, C.; Salehzada, T.; Silhol, M.; Lebleu, B. & Bisbal, C.** (1999) RNase L inhibitor is induced during human immunodeficiency virus type 1 infection and down regulates the 2-5A/RNase L pathway in human T cells. *J Virol*, **73**(1): 290-296
- Mashimo, T.; Lucas, M.; Simon-Chazottes, D.; Frenkiel, M.; Montagutelli, X.; Ceccaldi, P.; Deubel, V.; Guenet, J. & Despres, P.** (2002) A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(17): 11311-11316
- Mattei, M.G.; Tissot, C.; Gongora, C. & Mechti, N.** (1997) Assignment of ISG20 encoding a new interferon-induced PML nuclear body-associated protein, to chromosome 15q26 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, **79**: 286-287
- May, G.H.; Allen, K.E.; Clark, W.; Funk, M. & Gillespie, D.A.** (1998) Analysis of the interaction between c-Jun and c-Jun N-terminal kinase in vivo. *J Biol Chem*, **273**(50): 33429-33435
- Melén, K.; Ronni, T.; Broni, B.; Krug, R.M.; von Bonsdorff, C.H. & Julkunen, I.** (1992) Interferon-induced Mx proteins form oligomers and contain a putative leucine zipper. *J Biol Chem*, **267**(36): 25898-25907
- 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
- Min, J. & Krug, R.M.** (2006) The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(18): 7100-7105

- Minks, M.A.; West, D.K.; Benvin, S. & Baglioni, C.** (1979a) Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2',5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. *J Biol Chem*, **254**(20): 10180-10183
- Minks, M.A.; Benvin, S.; Maroney, P.A. & Baglioni, C.** (1979b) Synthesis of 2',5'-oligo(A) in extracts of interferon-treated HeLa cells. *J Biol Chem*, **254**(12): 5058-5064
- Minks, M.A.; Benvin, S.; Maroney, P.A. & Baglioni, C.** (1979c) Metabolic stability of 2' 5'oligo (A) and activity of 2' 5'oligo (A)-dependent endonuclease in extracts of interferon-treated and control HeLa cells. *Nucleic Acids Res*, **6**(2): 767-780
- Minor, P.** (1991) Picornaviridae. in: Francki, R.; Fauquet, C.; Knudson, D. & Brown, F. (Hrsg.) *Classification and nomenclature of viruses*. (2 (Suppl.)) Arch. Virol.: 320-326
- Morace, G.; Pisani, G.; Beneduce, F.; Divizia, M. & Panà, A.** (1993) Mutations in the 3A genomic region of two cytopathic strains of hepatitis A virus isolated in Italy. *Virus Res*, **28**(2): 187-194
- Mory, Y.; Vaks, B. & Chebath, J.** (1989) Production of two human 2',5'-oligoadenylate synthetase enzymes in Escherichia coli. *J Interferon Res*, **9**(3): 295-304
- Moser, M.J.; Holley, W.R.; Chatterjee, A. & Mian, I.S.** (1997) The proofreading domain of Escherichia coli DNA polymerase I and other DNA and/or RNA exonuclease domains. *Nucleic Acids Res*, **25**(24): 5110-5118
- Müller, W.E.G.; Wiens, M.; Müller, I.M. & Schröder, H.C.** (2004) The chemokine networks in sponges: potential roles in morphogenesis, immunity and stem cell formation. *Prog Mol Subcell Biol*, **34**: 103-143
- Müller, S.** (2006) Untersuchung differentieller Genexpression in Arenavirus-infizierten Zellen und Entwicklung einer therapeutischen siRNA gegen Arenaviren. Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Müther, N.** (2003) Untersuchung zum Einfluß einer HAV-Infektion in MRC-5-Zellen auf die Aktivierbarkeit der RNase L. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Mundt, E.** (2007) Human MxA protein confers resistance to double-stranded RNA viruses of two virus families. *J Gen Virol*, **88**(4): 1319-1323
- Naik, S.; Paranjape, J.M. & Silverman, R.H.** (1998) RNase L dimerization in a mammalian two-hybrid system in response to 2',5'-oligoadenylates. *Nucleic Acids Res*, **26**(6): 1522-1527
- Nakanishi, M.; Tanaka, N.; Mizutani, Y.; Mochizuki, M.; Ueno, Y.; Nakamura, K.T. & Kitade, Y.** (2005a) Functional characterization of 2',5'-linked oligoadenylate binding determinant of human RNase L. *J Biol Chem*, **280**(50): 41694-41699
- Nakanishi, M.; Goto, Y. & Kitade, Y.** (2005b) 2-5A induces a conformational change in the ankyrin-repeat domain of RNase L. *Proteins*, **60**(1): 131-138
- Nakayama, M.; Yazaki, K.; Kusano, A.; Nagata, K.; Hanai, N. & Ishihama, A.** (1993) Structure of mouse Mx1 protein. Molecular assembly and GTP-dependent conformational change. *J Biol Chem*, **268**(20): 15033-15038
- Nasser, A.M. & Metcalf, T.G.** (1987) Production of cytopathology in FRhK-4 cells by BS-C-1-passaged hepatitis A virus. *Appl Environ Microbiol*, **53**(12): 2967-2971
- Nguyen, L.H.; Espert, L.; Mechti, N. & Wilson, D.M.** (2001) The human interferon- and estrogen-regulated ISG20/HEM45 gene product degrades single-stranded RNA and DNA in vitro. *Biochemistry*, **40**(24): 7174-7179
- Nilsen, T.W. & Baglioni, C.** (1979) Mechanism for discrimination between viral and host mRNA in interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**(6): 2600-2604
- Nilsen, T.W.; Wood, D.L. & Baglioni, C.** (1982a) Presence of 2',5'-oligo(A) and of enzymes that synthesize, bind, and degrade 2',5'-oligo(A) in HeLa cell nuclei. *J Biol Chem*, **257**(4): 1602-1605
- Nilsen, T.W.; Maroney, P.A. & Baglioni, C.** (1982b) Synthesis of (2'-5')oligoadenylate and activation of an endoribonuclease in interferon-treated HeLa cells infected with reovirus. *J Virol*, **42**(3): 1039-1045
- Nüesch, J.; Krech, S. & Siegl, G.** (1988) Detection and characterization of subgenomic RNAs in hepatitis A virus particles. *Virology*, **165**(2): 419-427
- Nüesch, J.P.; Weitz, M. & Siegl, G.** (1993) Proteins specifically binding to the 3' untranslated region of hepatitis A virus RNA in persistently infected cells. *Arch Virol*, **128**: 65-79
- Pahl, H.L. & Baeuerle, P.A.** (1995) A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J*, **14**(11): 2580-2588

- Palmenberg, A.** (1987) Comparative organization and genome structure in picornaviruses. *in*: Brinton, M. & Rueckert, R. (Hrsg.) *Positive strand RNA viruses*. New York: Alan R. Liss: 25-34
- Pandey, M.; Bajaj, G.D. & Rath, P.C.** (2004) Induction of the interferon-inducible RNA-degrading enzyme, RNase L, by stress-inducing agents in the human cervical carcinoma cells. *RNA Biol*, **1**(1): 21-27
- Paulmann, D.; Magulski, T.; Schwarz, R.; Heitmann, L.; Flehmig, B.; Vallbracht, A. & Dotzauer, A.** (2008) Hepatitis A virus protein 2B suppresses beta interferon (IFN) gene transcription by interfering with IFN regulatory factor 3 activation. *J Gen Virol*, **89**(7): 1593-1604
- Pavlovic, J.; Zürcher, T.; Haller, O. & Staeheli, P.** (1990) Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J Virol*, **64**(7): 3370-3375
- Pentecost, B.T.** (1998) Expression and estrogen regulation of the HEM45 mRNA in human tumor lines and in the rat uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **64**: 25-33
- Perelygin, A.A.; Scherbik, S.V.; Zhulin, I.B.; Stockman, B.M.; Li, Y. & Brinton, M.A.** (2002) Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(14): 9322-9327
- Pichlmair, A.; Schulz, O.; Tan, C.P.; Näslund, T.I.; Liljeström, P.; Weber, F. & e Sousa, C.R.** (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*, **314**: 997-1001
- Pintó, R.M.; Aragonès, L.; Costafreda, M.I.; Ribes, E. & Bosch, A.** (2007) Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Res*, **127**(2): 158-163
- Pitossi, F.; Blank, A.; Schröder, A.; Schwarz, A.; Hüssi, P.; Schwemmler, M.; Pavlovic, J. & Staeheli, P.** (1993) A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins. *J Virol*, **67**(11): 6726-6732
- Player, M.R.; Wondrak, E.M.; Bayly, S.F. & Torrence, P.F.** (1998) Ribonuclease L, a 2-5A-dependent enzyme: purification to homogeneity and assays for 2-5A binding and catalytic activity. *Methods*, **15**(3): 243-253
- Player, M.R. & Torrence, P.F.** (1998) The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol Ther*, **78**(2): 55-113
- Ponten, A.; Sick, C.; Weeber, M.; Haller, O. & Kochs, G.** (1997) Dominant-negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. *J Virol*, **71**(4): 2591-2599
- Prediger, E.A.** (2001) Detection and quantitation of mRNAs using ribonuclease protection assays. *Methods Mol Biol*, **160**: 495-505
- Préhaud, C.; Mégret, F.; Lafage, M. & Lafon, M.** (2005) Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J Virol*, **79**(20): 12893-12904
- 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
- Provost, P.J.; Wolanski, B.S.; Miller, W.J.; Ittensohn, O.L.; McAleer, W.J. & Hilleman, M.R.** (1975) Physical, chemical and morphologic dimensions of human hepatitis A virus strain CR326 (38578). *Proc Soc Exp Biol Med*, **148**(2): 532-539
- Provost, P.J. & Hilleman, M.R.** (1979) Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med*, **160**(2): 213-221
- Rachow, A.; Gauss-Müller, V. & Probst, C.** (2003) Homogeneous hepatitis A virus particles. Proteolytic release of the assembly signal 2A from procapsids by factor Xa. *J Biol Chem*, **278**(32): 29744-29751
- Randall, R.E. & Goodbourn, S.** (2008) Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*, **89**(1): 1-47
- Rebouillat, D.; Marié, I. & Hovanessian, A.G.** (1998) Molecular cloning and characterization of two related and interferon-induced 56-kDa and 30-kDa proteins highly similar to 2'-5' oligoadenylate synthetase. *Eur J Biochem*, **257**(2): 319-330
- Rebouillat, D.; Hovnanian, A.; Marié, I. & Hovanessian, A.G.** (1999) The 100-kDa 2',5'-oligoadenylate synthetase catalyzing preferentially the synthesis of dimeric pppA2'p5'A molecules is composed of three homologous domains. *J Biol Chem*, **274**(3): 1557-1565
- Reichelt, M.; Stertz, S.; Krijnse-Locker, J.; Haller, O. & Kochs, G.** (2004) Missorting of LaCrosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes. *Traffic*, **5**(10): 772-784

- Rennert, H.; Sadowl, C.; Edwards, J.; Bantly, D.; Molinaro, R.J.; Orr-Urtreger, A.; Bagg, A.; Moore, J.S. & Silverman, R.H.** (2006) An alternative spliced RNASEL variant in peripheral blood leukocytes. *J Interferon Cytokine Res*, **26**(11): 820-826
- Rice, A.P.; Roberts, W.K. & Kerr, I.M.** (1984) 2-5A accumulates to high levels in interferon-treated, vaccinia virus-infected cells in the absence of any inhibition of virus replication. *J Virol*, **50**(1): 220-228
- Rice, A.P.; Kerr, S.M.; Roberts, W.K.; Brown, R.E. & Kerr, I.M.** (1985) Novel 2',5'-oligoadenylates synthesized in interferon-treated, vaccinia virus-infected cells. *J Virol*, **56**(3): 1041-1044
- Rima, B.K. & McFerran, N.V.** (1997) Dinucleotide and stop codon frequencies in single-stranded RNA viruses. *J Gen Virol*, **78**(11): 2859-2870
- Rivas, C.; Gil, J.; Mělková, Z.; Esteban, M. & Díaz-Guerra, M.** (1998) Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (i.f.n.)-induced 2-5A synthetase enzyme. *Virology*, **243**(2): 406-414
- Roberts, W.K.; Clemens, M.J. & Kerr, I.M.** (1976a) Interferon-induced inhibition of protein synthesis in L-cell extracts: an ATP-dependent step in the activation of an inhibitor by double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**(9): 3136-3140
- Roberts, W.K.; Hovanessian, A.; Brown, R.E.; Clemens, M.J. & Kerr, I.M.** (1976b) Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis. *Nature*, **264**: 477-480
- Robertson, B.H.; Khanna, B.; Brown, V.K. & Margolis, H.S.** (1988) Large scale production of hepatitis A virus in cell culture: effect of type of infection on virus yield and cell integrity. *J Gen Virol*, **69**(8): 2129-2134
- Robertson, B.H.; Jansen, R.W.; Khanna, B.; Totsuka, A.; Nainan, O.V.; Siegl, G.; Widell, A.; Margolis, H.S.; Isomura, S. & Ito, K.** (1992) Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol*, **73**(6): 1365-1377
- Röser, C.** (2007) Untersuchungen zum Replikationsverhalten des Hepatitis C Virus (HCV) in Zellkultursystemen mit manipuliertem 2'-5'Oligoadenylatsynthetase-System. Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Ronni, T.; Matikainen, S.; Lehtonen, A.; Palvimo, J.; Dellis, J.; Eylen, F.V.; Goetschy, J.F.; Horisberger, M.; Content, J. & Julkunen, I.** (1998) The proximal interferon-stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *J Interferon Cytokine Res*, **18**(9): 773-781
- Rosenblum, M.G.; Cheung, L. & Kessler, D.** (1988) Differential activity of the 30-kD and the 100-kD forms of 2'-5'A synthetase induced by recombinant human interferon-alpha and interferon-gamma. *J Interferon Res*, **8**(3): 275-282
- Rozen, S. & Skaletsky, H.** (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, **132**: 365-386
- Rueckert, R.** (1990) Picornaviridae and their replication. in: Fields, B.; Knipe, D.; Chanock, R.; Melnick, J.; Roizman, B.; Hirsch, M. & Monath, J. (Hrsg.) *Virology*. (2. Auflage) New York: Raven Press: 507-548
- Rusch, L.; Zhou, A. & Silverman, R.H.** (2000) Caspase-dependent apoptosis by 2',5'-oligoadenylate activation of RNase L is enhanced by IFN-beta. *J Interferon Cytokine Res*, **20**(12): 1091-1100
- Rutkowski, D.T. & Kaufman, R.J.** (2004) A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol*, **14**(1): 20-28
- Rysiecki, G.; Gewert, D.R. & Williams, B.R.** (1989) Constitutive expression of a 2',5'-oligoadenylate synthetase cDNA results in increased antiviral activity and growth suppression. *J Interferon Res*, **9**(6): 649-657
- Salehzada, T.; Silhol, M.; Lebleu, B. & Bisbal, C.** (1991) Polyclonal antibodies against RNase L. Subcellular localization of this enzyme in mouse cells. *J Biol Chem*, **266**(9): 5808-5813
- Salzberg, S.; Heller, A.; Zou, J.P.; Collart, F.R. & Huberman, E.** (1996) Interferon-independent activation of (2'-5') oligoadenylate synthetase in Friend erythroleukemia cell variants exposed to HMBA. *J Cell Sci*, **109**(6): 1517-1526
- Salzberg, S.; Hyman, T.; Turm, H.; Kinar, Y.; Schwartz, Y.; Nir, U.; Lejbkowitz, F. & Huberman, E.** (1997) Ectopic expression of 2-5A synthetase in myeloid cells induces growth arrest and facilitates the appearance of a myeloid differentiation marker. *Cancer Res*, **57**(13): 2732-2740
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989) Molecular Cloning - A laboratory manual. (2nd Edition) Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA, Vol 1

- Samuel, M.A.; Whitby, K.; Keller, B.C.; Marri, A.; Barchet, W.; Williams, B.R.G.; Silverman, R.H.; Gale, M. & Diamond, M.S.** (2006) PKR and RNase L contribute to protection against lethal West Nile Virus infection by controlling early viral spread in the periphery and replication in neurons. *J Virol*, **80**(14): 7009-7019
- Saunders, M.E.; Gewert, D.R.; Tugwell, M.E.; McMahon, M. & Williams, B.R.** (1985) Human 2-5A synthetase: characterization of a novel cDNA and corresponding gene structure. *EMBO J*, **4**(7): 1761-1768
- Sawicki, D.L.; Silverman, R.H.; Williams, B.R. & Sawicki, S.G.** (2003) Alphavirus minus-strand synthesis and persistence in mouse embryo fibroblasts derived from mice lacking RNase L and protein kinase R. *J Virol*, **77**(3): 1801-1811
- Schaeffer, H.J. & Weber, M.J.** (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*, **19**(4): 2435-2444
- Schenborn, E.T. & Mierendorf, R.C.** (1985) A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Res*, **13**(17): 6223-6236
- Scherbik, S.V.; Paranjape, J.M.; Stockman, B.M.; Silverman, R.H. & Brinton, M.A.** (2006) RNase L plays a role in the antiviral response to West Nile virus. *J Virol*, **80**(6): 2987-2999
- Schmidt, A.; Chernajovsky, Y.; Shulman, L.; Federman, P.; Berissi, H. & Revel, M.** (1979) An interferon-induced phosphodiesterase degrading (2'-5') oligoadenylate and the C-C-A terminus of tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**(10): 4788-4792
- Schneider-Schaulies, S.; Schneider-Schaulies, J.; Schuster, A.; Bayer, M.; Pavlovic, J. & ter Meulen, V.** (1994) Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J Virol*, **68**(11): 6910-6917
- Scholz, E.; Heinricy, U. & Flehmig, B.** (1989) Acid stability of hepatitis A virus. *J Gen Virol*, **70**(9): 2481-2485
- Schröder, H.C.; Wenger, R.; Kuchino, Y. & Müller, W.E.** (1989) Modulation of nuclear matrix-associated 2',5'-oligoadenylate metabolism and ribonuclease L activity in H9 cells by human immunodeficiency virus. *J Biol Chem*, **264**(10): 5669-5673
- Schröder, H.C.; Ugarković, D.; Wenger, R.; Reuter, P.; Okamoto, T. & Müller, W.E.** (1990) Binding of Tat protein to TAR region of human immunodeficiency virus type 1 blocks TAR-mediated activation of (2'-5')oligoadenylate synthetase. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **6**(5): 659-672
- Schulman, A.N.; Dienstag, J.L.; Jackson, D.R.; Hoofnagle, J.H.; Gerety, R.J.; Purcell, R.H. & Barker, L.F.** (1976) Hepatitis A antigen particles in liver, bile, and stool of chimpanzees. *J Infect Dis*, **134**(1): 80-84
- Schultheiss, T.; Kusov, Y.Y. & 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**(1): 275-281
- Schultz, D.E.; Honda, M.; Whetter, L.E.; McKnight, K.L. & Lemon, S.M.** (1996a) Mutations within the 5' nontranslated RNA of cell culture-adapted hepatitis A virus which enhance cap-independent translation in cultured African green monkey kidney cells. *J Virol*, **70**(2): 1041-1049
- Schultz, D.E.; Hardin, C.C. & Lemon, S.M.** (1996b) Specific interaction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the 5'-nontranslated RNA of hepatitis A virus. *J Biol Chem*, **271**(24): 14134-14142
- Schumacher, B. & Staeheli, P.** (1998) Domains mediating intramolecular folding and oligomerization of MxA GTPase. *J Biol Chem*, **273**(43): 28365-28370
- Schwartz, E.L. & Nilson, L.A.** (1989) Activation of 2',5'-oligoadenylate synthetase activity on induction of HL-60 leukemia cell differentiation. *Mol Cell Biol*, **9**(9): 3897-3903
- Schwemmler, M.; Weining, K.C.; Richter, M.F.; Schumacher, B. & Staeheli, P.** (1995a) Vesicular stomatitis virus transcription inhibited by purified MxA protein. *Virology*, **206**(1): 545-554
- Schwemmler, M.; Richter, M.F.; Herrmann, C.; Nassar, N. & Staeheli, P.** (1995b) Unexpected structural requirements for GTPase activity of the interferon-induced MxA protein. *J Biol Chem*, **270**(22): 13518-13523
- Shieh, B.; Su, I.J.; Chuang, W.J. & Li, C.** (1998) Dye-induced denaturation of DNA dissolved in water. *Biotechniques*, **24**(1): 60-2, 64
- Sidrauski, C. & Walter, P.** (1997) The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, **90**(6): 1031-1039
- Siegl, G. & Frösner, G.G.** (1978) Characterization and classification of virus particles associated with hepatitis A. I. Size, density, and sedimentation. *J Virol*, **26**(1): 40-47

- Siegl, G.; Frösner, G.G.; Gauss-Müller, V.; Tratschin, J.D. & Deinhardt, F.** (1981) The physicochemical properties of infectious hepatitis A virions. *J Gen Virol*, **57**(2): 331-341
- Siegl, G.; Weitz, M. & Kronauer, G.** (1984) Stability of hepatitis A virus. *Intervirology*, **22**(4): 218-226
- Silverman, R.H.; Cayley, P.J.; Knight, M.; Gilbert, C.S. & Kerr, I.M.** (1982) Control of the ppp(a2'p)nA system in HeLa cells. Effects of interferon and virus infection. *Eur J Biochem*, **124**(1): 131-138
- Silverman, R.H.; Skehel, J.J.; James, T.C.; Wreschner, D.H. & Kerr, I.M.** (1983) rRNA cleavage as an index of ppp(A2'p)nA activity in interferon-treated encephalomyocarditis virus-infected cells. *J Virol*, **46**(3): 1051-1055
- Silverman, R.H.** (1985) Functional analysis of 2-5A-dependent RNase and 2-5a using 2',5'-oligoadenylate-cellulose. *Anal Biochem*, **144**(2): 450-460
- Silverman, R.H.** (2003) Implications for RNase L in prostate cancer biology. *Biochemistry*, **42**(7): 1805-1812
- Simmen, K.A.; Singh, J.; Luukkonen, B.G.; Lopper, M.; Bittner, A.; Miller, N.E.; Jackson, M.R.; Compton, T. & Früh, K.** (2001) Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(13): 7140-7145
- Simmonds, P. & Smith, D.B.** (1999) Structural constraints on RNA virus evolution. *J Virol*, **73**(7): 5787-5794
- Smith, J.A.; Schmechel, S.C.; Williams, B.R.G.; Silverman, R.H. & Schiff, L.A.** (2005) Involvement of the interferon-regulated antiviral proteins PKR and RNase L in reovirus-induced shutoff of cellular translation. *J Virol*, **79**(4): 2240-2250
- Sperling, J.; Chebath, J.; Arad-Dann, H.; Offen, D.; Spann, P.; Lehrer, R.; Goldblatt, D.; Jolles, B. & Sperling, R.** (1991) Possible involvement of (2'5')oligoadenylate synthetase activity in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(23): 10377-10381
- Squire, J.; Zhou, A.; Hassel, B.A.; Nie, H. & Silverman, R.H.** (1994) Localization of the interferon-induced, 2-5A-dependent RNase gene (RNS4) to human chromosome 1q25. *Genomics*, **19**(1): 174-175
- Staege, H.; Brauchlin, A.; Schoedon, G. & Schaffner, A.** (2001) Two novel genes FIND and LIND differentially expressed in deactivated and Listeria-infected human macrophages. *Immunogenetics*, **53**(2): 105-113
- Staeli, P. & Haller, O.** (1985) Interferon-induced human protein with homology to protein Mx of influenza virus-resistant mice. *Mol Cell Biol*, **5**(8): 2150-2153
- Staeli, P. & Pavlovic, J.** (1991) Inhibition of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis by human MxA protein. *J Virol*, **65**(8): 4498-4501
- Staeli, P.; Pitossi, F. & Pavlovic, J.** (1993) Mx proteins: GTPases with antiviral activity. *Trends Cell Biol*, **3**(8): 268-272
- Stark, G.R.; Dower, W.J.; Schimke, R.T.; Brown, R.E. & Kerr, I.M.** (1979) 2-5A synthetase: assay, distribution and variation with growth or hormone status. *Nature*, **278**: 471-473
- Stertz, S.; Reichelt, M.; Krijnse-Locker, J.; Mackenzie, J.; Simpson, J.C.; Haller, O. & Kochs, G.** (2006) Interferon-induced, antiviral human MxA protein localizes to a distinct subcompartment of the smooth endoplasmic reticulum. *J Interferon Cytokine Res*, **26**(9): 650-660
- Stothard, P.** (2000) The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, **28**(6): 1102, 1104
- Su, H.; Liao, C. & Lin, Y.** (2002) Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. *J Virol*, **76**(9): 4162-4171
- Suhara, W.; Yoneyama, M.; Kitabayashi, I. & Fujita, T.** (2002) Direct involvement of CREB-binding protein/p300 in sequence-specific DNA binding of virus-activated interferon regulatory factor-3 holocomplex. *J Biol Chem*, **277**(25): 22304-22313
- Taima, K.; Imaizumi, T.; Yamashita, K.; Ishikawa, A.; Fujita, T.; Yoshida, H.; Takanashi, S.; Okumura, K. & Satoh, K.** (2006) Expression of IP-10/CXCL10 is upregulated by double-stranded RNA in BEAS-2B bronchial epithelial cells. *Respiration*, **73**(3): 360-364
- Tanaka, N.; Nakanishi, M.; Kusakabe, Y.; Goto, Y.; Kitade, Y. & Nakamura, K.T.** (2004) Structural basis for recognition of 2',5'-linked oligoadenylates by human ribonuclease L. *EMBO J*, **23**(20): 3929-3938
- Tardif, K.D.; Mori, K. & Siddiqui, A.** (2002) Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J Virol*, **76**(15): 7453-7459

- Tesar, M.; Jia, X.Y.; Summers, D.F. & Ehrenfeld, E.** (1993) Analysis of a potential myristoylation site in hepatitis A virus capsid protein VP4. *Virology*, **194**(2): 616-626
- Thanos, D. & Maniatis, T.** (1995) Identification of the rel family members required for virus induction of the human beta interferon gene. *Mol Cell Biol*, **15**(1): 152-164
- Ticehurst, J.R.; Racaniello, V.R.; Baroudy, B.M.; Baltimore, D.; Purcell, R.H. & Feinstone, S.M.** (1983) Molecular cloning and characterization of hepatitis A virus cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**(19): 5885-5889
- Tinari, A.; Ruggeri, F.M.; Divizia, M.; Panà, A. & Donelli, G.** (1989) Morphological changes in HAV-infected Frp/3 cells and immunolocalization of HAAg. *Arch Virol*, **104**: 209-224
- Tnani, M.; Aliau, S. & Bayard, B.** (1998) Localization of a molecular form of interferon-regulated RNase L in the cytoskeleton. *J Interferon Cytokine Res*, **18**(6): 361-368
- Tnani, M. & Bayard, B.A.** (1999) Evidence for IRF-1-dependent gene expression deficiency in interferon unresponsive HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta*, **1451**(1): 59-72
- Torrence, P.F.; Imai, J. & Johnston, M.I.** (1981) 5'-O-Monophosphoryl(adenylyl(2'-5')adenylyl(2'-5')adenosine is an antagonist of the action of 5'-O-triphosphoryl(adenylyl(2'-5')adenylyl(2'-5')adenosine and double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**(10): 5993-5997
- Torrence, P.F.; Imai, J.; Lesiak, K.; Jamouille, J.C. & Sawai, H.** (1984) Oligonucleotide structural parameters that influence binding of 5'-O-triphosphoadenylyl(2'-5')adenylyl(2'-5')adenosine to the 5'-O-triphosphoadenylyl(2'-5')adenylyl(2'-5')adenosine dependent endoribonuclease: chain length, phosphorylation state, and heterocyclic base. *J Med Chem*, **27**(6): 726-733
- Torrence, P.F.; Brozda, D.; Alster, D.; Charubala, R. & Pfeleiderer, W.** (1988) Only one 3'-hydroxyl group of ppp5' A2'p5'A2'p5' A (2-5A) is required for activation of the 2-5A-dependent endonuclease. *J Biol Chem*, **263**(3): 1131-1139
- Totsuka, A. & Moritsugu, Y.** (1999) Hepatitis A virus proteins. *Intervirology*, **42**: 63-68
- Urano, F.; Bertolotti, A. & Ron, D.** (2000) IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, **113**: 3697-3702
- Urisman, A.; Molinaro, R.J.; Fischer, N.; Plummer, S.J.; Casey, G.; Klein, E.A.; Malathi, K.; Magi-Galluzzi, C.; Tubbs, R.R.; Ganem, D.; Silverman, R.H. & DeRisi, J.L.** (2006) Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog*, **2**(3): e25
- Vallbracht, A.; Hofmann, L.; Wurster, K.G. & Flehmig, B.** (1984) Persistent infection of human fibroblasts by hepatitis A virus. *J Gen Virol*, **65**(3): 609-615
- Vallbracht, A.; Gabriel, P.; Zahn, J. & Flehmig, B.** (1985) Hepatitis A virus infection and the interferon system. *J. Infect. Dis.*, **152**: 211-213
- Vallbracht, A.; Gabriel, P.; Maier, K.; Hartmann, F.; Steinhardt, H.J.; Müller, C.; Wolf, A.; Manncke, K.H. & Flehmig, B.** (1986) Cell-mediated cytotoxicity in hepatitis A virus infection. *Hepatology*, **6**(6): 1308-1314
- Vallbracht, A.; Maier, K.; Stierhof, Y.D.; Wiedmann, K.H.; Flehmig, B. & Fleischer, B.** (1989) Liver-derived cytotoxic T cells in hepatitis A virus infection. *J Infect Dis*, **160**(2): 209-217
- van der Giessen, K.; Di-Marco, S.; Clair, E. & Gallouzi, I.E.** (2003) RNAi-mediated HuR depletion leads to the inhibition of muscle cell differentiation. *J Biol Chem*, **278**(47): 47119-47128
- van Hoof, A.; Lennertz, P. & Parker, R.** (2000) Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J*, **19**(6): 1357-1365
- Varne, A.; Muthukumaraswamy, K.; Jatiani, S.S. & Mittal, R.** (2002) Conformational analysis of the GTP-binding protein MxA using limited proteolysis. *FEBS Lett*, **516**: 129-132
- Venuti, A.; Russo, C.D.; del Grosso, N.; Patti, A.M.; Ruggeri, F.; Stasio, P.R.D.; Martiniello, M.G.; Pagnotti, P.; Degener, A.M. & Midulla, M.** (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
- Wang, W.; Furneaux, H.; Cheng, H.; Caldwell, M.C.; Hutter, D.; Liu, Y.; Holbrook, N. & Gorospe, M.** (2000) HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol*, **20**(3): 760-769
- Wang, L. & Mu, F.Y.** (2004) A Web-based design center for vector-based siRNA and siRNA cassette. *Bioinformatics*, **20**(11): 1818-1820

- Warnock, D.E. & Schmid, S.L.** (1996) Dynamin GTPase, a force-generating molecular switch. *Bioessays*, **18**(11): 885-893
- Washenberger, C.L.; Han, J.; Kechris, K.J.; Jha, B.K.; Silverman, R.H. & Barton, D.J.** (2007) Hepatitis C virus RNA: dinucleotide frequencies and cleavage by RNase L. *Virus Res*, **130**: 85-95
- Wathelet, M.; Moutschen, S.; Cravador, A.; DeWit, L.; Defilippi, P.; Huez, G. & Content, J.** (1986) Full-length sequence and expression of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon. *FEBS Lett*, **196**(1): 113-120
- Watson, J.C.; Chang, H.W. & Jacobs, B.L.** (1991) Characterization of a vaccinia virus-encoded double-stranded RNA-binding protein that may be involved in inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Virology*, **185**(1): 206-216
- Weiß, S.** (2001) Untersuchungen zum Einfluß der Hepatitis-A-Virusinfektion auf die Expression der 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Weitz, M.; Baroudy, B.M.; Maloy, W.L.; Ticehurst, J.R. & Purcell, R.H.** (1986) Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs. *J Virol*, **60**(1): 124-130
- Wells, J.A.; Swryrd, E.A. & Stark, G.R.** (1984) An improved method for purifying 2',5'-oligoadenylate synthetases. *J Biol Chem*, **259**(2): 1363-1370
- Wheeler, C.M.; Fields, H.A.; Schable, C.A.; Meinke, W.J. & Maynard, J.E.** (1986) Adsorption, purification, and growth characteristics of hepatitis A virus strain HAS-15 propagated in fetal rhesus monkey kidney cells. *J Clin Microbiol*, **23**(3): 434-440
- Whetter, L.E.; Day, S.P.; Elroy-Stein, O.; Brown, E.A. & Lemon, S.M.** (1994) Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *J Virol*, **68**(8): 5253-5263
- Wieland, S.; Thimme, R.; Purcell, R.H. & Chisari, F.V.** (2004) Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(17): 6669-6674
- Williams, B.R.; Golgher, R.R. & Kerr, I.M.** (1979) Activation of a nuclease by pppA2'p5'A2'p5'A in intact cells. *FEBS Lett*, **105**(1): 47-52
- Wreschner, D.H.; McCauley, J.W.; Skehel, J.J. & Kerr, I.M.** (1981a) Interferon action--sequence specificity of the ppp(A2'p)nA-dependent ribonuclease. *Nature*, **289**: 414-417
- Wreschner, D.H.; James, T.C.; Silverman, R.H. & Kerr, I.M.** (1981b) Ribosomal RNA cleavage, nuclease activation and 2-5A(ppp(A2'p)nA) in interferon-treated cells. *Nucleic Acids Res*, **9**(7): 1571-1581
- Wünschmann, S.** (1998) Suppression der Myelopoese durch das Hepatitis A-Virus. Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen
- Xiang, Y.; Condit, R.C.; Vijaysri, S.; Jacobs, B.; Williams, B.R.G. & Silverman, R.H.** (2002) Blockade of interferon induction and action by the E3L double-stranded RNA binding proteins of vaccinia virus. *J Virol*, **76**(10): 5251-5259
- Yamashita, K.; Imaizumi, T.; Taima, K.; Fujita, T.; Ishikawa, A.; Yoshida, H.; Oyama, C. & Satoh, K.** (2005) Polyinosinic-polycytidylic acid induces the expression of GRO- α in BEAS-2B cells. *Inflammation*, **29**(1): 17-21
- Yang, Y.; Liang, Y.; Qu, L.; Chen, Z.; Yi, M.; Li, K. & Lemon, S.M.** (2007) Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(17): 7253-7258
- Yarunin, A.; Panse, V.G.; Petfalski, E.; Dez, C.; Tollervey, D. & Hurt, E.C.** (2005) Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *EMBO J*, **24**(3): 580-588
- Yi, M.; Schultz, D.E. & Lemon, S.M.** (2000) Functional significance of the interaction of hepatitis A virus RNA with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): opposing effects of GAPDH and polypyrimidine tract binding protein on internal ribosome entry site function. *J Virol*, **74**(14): 6459-6468
- Yi, M. & Lemon, S.M.** (2002) Replication of subgenomic hepatitis A virus RNAs expressing firefly luciferase is enhanced by mutations associated with adaptation of virus to growth in cultured cells. *J Virol*, **76**(3): 1171-1180
- 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 responses. *Nat Immunol*, **5**(7): 730-737

- Yoneyama, M.; Kikuchi, M.; Matsumoto, K.; Imaizumi, T.; Miyagishi, M.; Taira, K.; Foy, E.; Loo, Y.; Gale, M.; Akira, S.; Yonehara, S.; Kato, A. & Fujita, T.** (2005) Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*, **175**(5): 2851-2858
- Yu, S.H.; Nagayama, K.; Enomoto, N.; Izumi, N.; Marumo, F. & Sato, C.** (2000) Intrahepatic mRNA expression of interferon-inducible antiviral genes in liver diseases: dsRNA-dependent protein kinase overexpression and RNase L inhibitor suppression in chronic hepatitis C. *Hepatology*, **32**(5): 1089-1095
- Yuan, J.; Cahir-McFarland, E.; Zhao, B. & Kieff, E.** (2006) Virus and cell RNAs expressed during Epstein-Barr virus replication. *J Virol*, **80**(5): 2548-2565
- Zhang, B.; Morace, G.; Gauss-Müller, V. & Kusov, Y.** (2007a) Poly(A) binding protein, C-terminally truncated by the hepatitis A virus proteinase 3C, inhibits viral translation. *Nucleic Acids Res*, **35**(17): 5975-5984
- Zhang, B.; Seitz, S.; Kusov, Y.; Zell, R. & Gauss-Müller, V.** (2007b) RNA interaction and cleavage of poly(C)-binding protein 2 by hepatitis A virus protease. *Biochem Biophys Res Commun*, **364**(4): 725-730
- Zhang, Y.; Burke, C.W.; Ryman, K.D. & Klimstra, W.B.** (2007) Identification and characterization of interferon-induced proteins that inhibit alphavirus replication. *J Virol*, **81**(20): 11246-11255
- Zhao, H.; De, B.P.; Das, T. & Banerjee, A.K.** (1996) Inhibition of human parainfluenza virus-3 replication by interferon and human MxA. *Virology*, **220**(2): 330-338
- Zheng, X.; Silverman, R.H.; Zhou, A.; Goto, T.; Kwon, B.S.; Kaufman, H.E. & Hill, J.M.** (2001) Increased severity of HSV-1 keratitis and mortality in mice lacking the 2-5A-dependent RNase L gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **42**(1): 120-126
- Zhong, H.; May, M.J.; Jimi, E. & Ghosh, S.** (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell*, **9**(3): 625-636
- Zhou, A.; Hassel, B.A. & Silverman, R.H.** (1993) Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell*, **72**(5): 753-765
- Zhou, A.; Paranjape, J.; Brown, T.L.; Nie, H.; Naik, S.; Dong, B.; Chang, A.; Trapp, B.; Fairchild, R.; Colmenares, C. & Silverman, R.H.** (1997) Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *EMBO J*, **16**(21): 6355-6363
- Zhou, A.; Paranjape, J.M.; Hassel, B.A.; Nie, H.; Shah, S.; Galinski, B. & Silverman, R.H.** (1998) Impact of RNase L overexpression on viral and cellular growth and death. *J Interferon Cytokine Res*, **18**(11): 953-961
- Zhou, A.; Paranjape, J.M.; Der, S.D.; Williams, B.R. & Silverman, R.H.** (1999) Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways. *Virology*, **258**(2): 435-440
- Zhou, A.; Molinaro, R.J.; Malathi, K. & Silverman, R.H.** (2005) Mapping of the human RNASEL promoter and expression in cancer and normal cells. *J Interferon Cytokine Res*, **25**(10): 595-603
- Zoysa, M.D.; Kang, H.; Song, Y.; Jee, Y.; Lee, Y. & Lee, J.** (2007) First report of invertebrate Mx: cloning, characterization and expression analysis of Mx cDNA in disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Fish Shellfish Immunol*, **23**(1): 86-96
- Zürcher, T.; Pavlovic, J. & Staeheli, P.** (1992) Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *EMBO J*, **11**(4): 1657-1661
- Zuo, Y. & Deutscher, M.P.** (2001) Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res*, **29**(5): 1017-1026

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

| | |
|---|-----|
| Abb. 1: Genomorganisation und Polyprotein des Hepatitis A-Virus..... | 4 |
| Abb. 2: Erkennung intrazellulärer dsRNA und folgende Induktion der IFN- β -Expression | 10 |
| Abb. 3: Schematische Darstellung des ISG20-Proteins..... | 13 |
| Abb. 4: Cis-Elemente des ISG20-Promotors in der Region bis 460 bp vor dem Transkriptionsstart | 14 |
| Abb. 5: Schematische Darstellung des MxA-Proteins..... | 16 |
| Abb. 6: Cis-Elemente der Promotorregion des MxA-Gens. | 18 |
| Abb. 7: Übersicht des 2',5'-Oligoadenylatsynthetase/RNase L-Systems | 20 |
| Abb. 8: Struktur eines 2',5'-Oligoadenylat-Trimers | 22 |
| Abb. 9: Schematischer Aufbau der RNase L und Bindung des 2-5A-Aktivators..... | 24 |
| Abb. 10: Schema der RNase L-Aktivierung..... | 25 |
| Abb. 11: Plasmidkarten ausgewählter Vektoren | 35 |
| Abb. 12: Aktivität des ISG20-Promotors in HAV-infizierten FRhK-4-Zellen | 96 |
| Abb. 13: Aktivität des MxA-Promotors in HAV-infizierten FRhK-4-Zellen | 97 |
| Abb. 14: Aktivität des MxA-Promotors in HAV-infizierten HFS-10-Zellen | 98 |
| Abb. 15: RT-PCR-basierter Nachweis der MxA-mRNA in HAV-infizierten und poly(IC)-transfizierten Zellen | 98 |
| Abb. 16: RT-PCR zum Nachweis von basal vorliegender OAS-mRNA in FRhK-4-Zellen..... | 100 |
| Abb. 17: Aktivierung des basal vorliegenden OAS/RNase L-Systems durch poly(IC)-Transfektion . | 101 |
| Abb. 18: Aktivierung der RNase L in Lysaten persistent HAV-infizierter MRC-5-Zellen | 102 |
| Abb. 19: Degradation von ^{32}P -C ₁₁ UUC ₇ in Lysaten Mock- bzw. HAV-infizierter Zellen nach RNase L-Aktivierung | 103 |
| Abb. 20: Sondentemplates und deren Transkripte als Hybridisierungssonden für den RPA | 104 |
| Abb. 21: RPA zum Nachweis zellulärer RLI-, RNase L- und β -Aktin-mRNAs | 105 |
| Abb. 22: Verläufe der RLI- und RNase L-mRNA-Level nach einer HAV-Infektion..... | 107 |
| Abb. 23: Einfluss der HAV-Infektion auf die Expression der RLI- bzw. RNase L-mRNA in Infektionskinetiken..... | 108 |
| Abb. 24: Zellgebundene HAV-RNA im Verlauf einer Infektionskinetik..... | 108 |
| Abb. 25: RLI- und RNase L-mRNA-Level in persistent infizierten FRhK-4-Zellen | 110 |
| Abb. 26: Verlauf der HAV-RNA und der RNase L-mRNA nach der Zellpassage | 111 |
| Abb. 27: Organisation des RNase L-Gens bei <i>Macaca mulatta</i> | 112 |
| Abb. 28: Sequenz der putativen Promotorregion des <i>Macaca mulatta</i> RNase L-Gens..... | 115 |
| Abb. 29: Nachweis der RNase L im Western Blot..... | 116 |
| Abb. 30: Inkubation von HeLa S10-Extrakten mit HAV-RNA..... | 117 |
| Abb. 31: Level der RLI-mRNA in FRhK-4- und FRhK-4/RLI(+)-Zellen..... | 118 |
| Abb. 32: Aktivierung der RNase L in FRhK-4-Lysaten nach Transfektion von pcDNA3.1-basierten RNase L-Expressionsvektoren | 119 |
| Abb. 33: Überprüfung stabil mit pcDNA3.1/RL und pcDNA3.1/RL_Dneg transfizierter FRhK-4-Klone | 121 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 34: Nachweis einer Expression der vektorcodierten RNase L-Varianten nach Transfektion in FRhK-4-Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz..... | 123 |
| Abb. 35: Aktivierung der RNase L in FRhK-4-Lysaten nach Transfektion von pl.18-basierten RNase L-Expressionsvektoren | 123 |
| Abb. 36: Überprüfung stabil mit pl.18/RL transfizierter FRhK-4-Klone mittels <i>real-time</i> RT-PCR | 124 |
| Abb. 37: Stabil pl.18/RL-transfizierte FRhK-4-Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz und dem rRNA-Abbau-Assay..... | 125 |
| Abb. 38: Überprüfung der siRNA-Konstrukte auf eine Runterregulation der RNase L-mRNA mittels RT-PCR | 126 |
| Abb. 39: Transfektion persistent HAV-infizierter FRhK-4-Zellen mit RNase L-Level-modulierenden Vektoren..... | 128 |
| Abb. 40: HAV-Infektion stabil mit RNase L-Level-modulierenden Vektoren transfizierter Zellpopulationen..... | 129 |
| Abb. 41: Darstellung viraler RNA nach Inkubation in poly(IC)-aktivierten HeLa S10-Extrakten | 130 |
| Abb. 42: HAV-Infektion RNase L-überexprimierender FRhK-4-Zellen..... | 131 |
| Abb. 43: Verhältnisse vorhandener und erwarteter Nukleotidpaare in HAV-Genomen..... | 131 |

Tabellen

| | |
|---|-----|
| Tab. 1: PCR- und RT-PCR-Primer | 36 |
| Tab. 2: Primer und Sonden für die <i>real-time</i> RT-PCR | 37 |
| Tab. 3: Primer für die PCR-basierte Synthese der RPA-Sondentemplates..... | 37 |
| Tab. 4: siRNA-Insert-DNA-Oligonukleotide..... | 38 |
| Tab. 5: Übersicht über verwendete Temperaturprogramme für die PCR | 84 |
| Tab. 6: Potentielle Transkriptionsfaktorbindemotive in der RNase L-Promotorregion bei <i>Macaca mulatta</i> | 113 |