



**Untersuchung der Rolle von IRF-7
bei der Suppression der Hämatopoese
durch das Hepatitis A-Virus**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie / Chemie
Universität Bremen

vorgelegt von

Sonja Händschke

August 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Angelika Vallbracht

2. Gutachter: PD Dr. Bernd Kazmierczak

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich im Verlauf meiner Dissertation begleitet, unterstützt und gefordert haben. Sie alle haben dazu beigetragen, dass die Zeit der Promotion für mich zu einem Abschnitt voll von unvergesslichen und lehrreichen Erfahrungen geworden ist, welche nicht nur meine berufliche sondern auch meine persönliche Entwicklung nachhaltig geprägt und geformt haben. Mein Dank gilt deshalb allen Mitarbeitern, Diplomanden und Doktoranden, welche in den Jahren meiner Dissertation zusammen mit mir am Institut für Virologie tätig waren. Gemeinsam schufen und gestalteten sie ein stets angenehmes und in seiner Bedeutung nicht zu unterschätzendes Laborklima und Arbeitsumfeld.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Angelika Vallbracht für das Ermöglichen dieser Doktorarbeit und ihr in mich gesetztes Vertrauen mit der Übertragung des Dissertationsthemas. Bedanken möchte ich mich zudem für ihre fortwährende Unterstützung und Betreuung. Mit ihren wertvollen Ratschlägen hat sie entscheidend zu dem Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ein weiterer Dank geht an PD Dr. Bernd Kazmierczak, der so freundlich war, die Rolle des Zweitgutachters zu übernehmen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Dotzauer für seine stets freundliche und kompetente Diskussionsbereitschaft sowie seiner kontinuierlichen und entgegenkommenden Betreuung.

Ein großes Dankeschön geht zudem an alle meine aktiven und ehemaligen Dissertations-Mitstreiter! Für die mir entgegengebrachte super Kameradschaft möchte ich mich hiermit ganz herzlich bei Herrn Dr. Volker Fensterl, Herrn Oliver Janssen-Weets, Frau Anna-Leena Krämer, Herrn Dr. Thomas Magulski, Frau Dr. Dajana Paulmann und Frau Rebecca Schwarz bedanken! Herrn Oliver Janssen-Weets danke ich zudem für seine stete Hilfs- und Gesprächsbereitschaft sowie dem immerwährenden Vorrat an Essbarem. Und Frau Dr. Dajana Paulmann danke ich hiermit auch herzlich für ihren Ansporn und ihre Freundschaft.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Frau Beate Piel für ihre tatkräftige und aufbauende Unterstützung in der zeitlich eng gepackten Endphase meiner Arbeit und ihrer stets herzlichen Gesprächsbereitschaft.

Für das Aufrechterhalten eines allzeit reibungslosen Labor- und Bürobetriebs danke ich Frau Renate Mester, Frau Heike Kettler und Frau Gisela Gunkel. Durch ihre Freundlichkeit haben sie zu dem bereits genannten angenehmen Laborklima beigetragen.

Desweiteren danke ich dem Blutspendedienst Hamburg für die Zurverfügungstellung von Buffy-Coats.

Ein ganz herzlicher Dank gilt hier meinen Eltern, die mich jederzeit in allem unterstützt haben und immer für mich da sind. Auf ihre Hilfe konnte ich immer vertrauen! Damit haben sie einen ganz entscheidenden Beitrag zu meinem beruflichen Werdegang geleistet und vieles erst ermöglicht.

Wie zuvor in meiner Diplomarbeit möchte ich mich auch hier noch einmal gesondert bei meinem Schwesterherz bedanken, die immer und jederzeit in den richtigen Momenten für mich da ist!

Zum Schluss danke ich meinem Freund Julian Blumenstingl für seine tatkräftige und tonerverschlingende Unterstützung im Verlauf meiner Dissertation. Dabei gilt mein Dank auch seinem Verständnis in nicht immer einfachen Zeiten und seinen aufmunternden Neckereien!

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|--|--------------|
| 1. Einleitung | 1-31 |
| 1.1 Das angeborene- und adaptive Immunsystem | 1-5 |
| 1.1.1 Die Hämatopoese | 3-4 |
| 1.1.2 Das hämatopoetische „Microenvironment“ | 5 |
| 1.2 Das Interferonsystem | 5-10 |
| 1.2.1 Aktivierung des Interferonsystems | 6-8 |
| 1.2.2 Wirkung von Interferon | 8-10 |
| 1.3 Der Transkriptionsfaktor IRF-7 | 10-15 |
| 1.3.1 Die Interferon- α Gene und ihre Regulation durch IRFs | 14-15 |
| 1.4 Monozyten und Makrophagen | 15-23 |
| 1.4.1 Aktivierung von Makrophagen | 16-17 |
| 1.4.2 Die mononukleäre Differenzierung (am Beispiel von U937-Zellen) | 17-18 |
| 1.4.3 Die Rolle von IRF-7 in der mononukleären Differenzierung | 18-19 |
| 1.4.3.1 Die Rolle von IFN- α in der mononukleären Differenzierung | 19-20 |
| 1.4.4 Die Rolle der Protein Kinase C in der mononukleären Differenzierung | 20-22 |
| 1.4.4.1 Die Induzierbarkeit von IKK ϵ durch PMA | 22-23 |
| 1.5 Das Hepatitis A-Virus | 24-27 |
| 1.5.1 Pathogenese | 25-26 |
| 1.5.2 Klinik | 26-27 |
| 1.5.3 Aplastische Anämie | 27 |
| 1.6 Einfluss von HAV auf das hämatopetische System und die mononukleäre Differenzierung | 27-30 |
| 1.6.1 Der Einfluss von HAV auf das unspezifische Immunsystem – Expression von IFN- β | 29-30 |
| 1.7 Diskussion der möglichen Beeinflussung des Transkriptionsfaktors IRF-7 durch HAV | 30-31 |
| 1.8 Zielsetzung | 32 |
| | |
| 2. Material | 33-52 |
| 2.1 Virusstämme | 33 |
| 2.2 Zellkultur | 33-35 |
| 2.2.1 Zelllinien | 33-34 |
| 2.2.2 Zellkulturmedien | 34 |
| 2.2.2.1. Mediumzusätze/Antibiotika | 35 |
| 2.3 Bakterienkultur | 35 |
| 2.3.1 Bakterien | 35 |
| 2.3.2 Bakterienmedien | 35 |
| 2.3.2.1 Mediumzusätze/Antibiotika | 35 |
| 2.4 Plasmide | 36-37 |

| | |
|--|-------|
| 2.5 Antikörper | 38 |
| 2.5.1 primäre Antikörper | 38 |
| 2.5.2 sekundäre Antikörper | 38 |
| 2.6 Enzyme | 38 |
| 2.7 Proteine | 39 |
| 2.8 PCR | 39 |
| 2.8.1 Primer für PCR | 39 |
| 2.8.2 RT-PCR | 39-40 |
| 2.8.3 PCR | 40 |
| 2.9 Kits und Standards | 39-40 |
| 2.10 Puffer und Lösungen | 40-41 |
| 2.10.1 Allgemeine Puffer und Lösungen | 41 |
| 2.10.2 Alkalische Dephosphorylierung | 41 |
| 2.10.3 DAPI-Test auf Mycoplasmen (Diamidino-phenylindol) | 41 |
| 2.10.4 Durchflusszytometer | 42 |
| 2.10.5 Freeze & Thaw Lyse | 42 |
| 2.10.6 Immunfluoreszenz | 42 |
| 2.10.7 Extraktion von RNA | 42 |
| 2.10.8 Isolierung von DNA aus Säugetiergewebe | 42 |
| 2.10.9 Ligation eines DNA-Vektors | 43 |
| 2.10.10 PBMC Isolation aus Buffy-Coats | 43 |
| 2.10.11 Phenol-Ether Extraktion von DNA aus LMP-Agarosegel | 43 |
| 2.10.12 Plasmidpräparation | 43-45 |
| 2.10.12.1 Maxiprep | 43-44 |
| 2.10.12.2 Miniprep | 44-45 |
| 2.10.13 Restriktionsansätze | 45 |
| 2.10.14 SDS-Page und Immunoblot | 45-46 |
| 2.10.15 Transfektion | 46-47 |
| 2.10.15.1 Calcium-Phosphat | 46 |
| 2.10.15.2 jetPEI | 47 |
| 2.11 Chemikalien und Reagenzien | 47-49 |
| 2.12 Verbrauchsmaterial | 49-50 |
| 2.13 Geräte | 50-52 |

3. Methoden 53-101

| | |
|--|-------|
| 3.1 Zellkultur | 53-58 |
| 3.1.1 Kultivierung von Zellen | 53-55 |
| 3.1.1.1 FRhK-4-, WISH- und HEK-293-Zellen | 53-54 |
| 3.1.1.2 MRC-5-Zellen | 54 |
| 3.1.1.3 U937-Zellen | 54 |
| 3.1.1.4 primäre humane mononukleäre Zellen | 54-55 |
| 3.1.2 Zellzählung (Bestimmung der Lebendzellzahl/ml) | 55-56 |
| 3.1.3 Cryokonservierung von Zellen | 56-57 |
| 3.1.3.1 FRhK-4- und WISH-Zellen | 56-57 |
| 3.1.3.2 MRC-5-Zellen | 57 |
| 3.1.3.3 U937-Zellen | 57 |
| 3.1.4 Auftauen von Zellen | 57-58 |
| 3.1.4.1 FRhK-4-/FRhK-4-Zellklone sowie WISH-Zellen | 57 |
| 3.1.4.2 MRC-5-Zellen | 58 |
| 3.1.4.3 U937-Zellen | 58 |

| | |
|--|-------|
| 3.2 Bakterienkultur | 58-60 |
| 3.2.1 Glycerol-Cryokultur von Bakterien | 58 |
| 3.2.2 Auftauen von Bakterien | 59 |
| 3.2.3 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation | 59 |
| 3.2.4 Überprüfung der Kompetenz von Bakterien | 60 |
| 3.2.5 Ausplattieren von Bakterien auf Agar-Petrischalen | 60 |
| 3.2.6 Isolierung von Bakterien | 60 |
| 3.3 Herstellung von Viruspools | 61-62 |
| 3.3.1 Ansetzen eines HAV/7- und HAV _{GBM} Viruspools | 61 |
| 3.3.1.1 Gewinnung von Virus- (HAV/7,HAV _{GBM})/Mock-Lysat | 61 |
| 3.3.2 NDV Viruspool | 61 |
| 3.3.2.1 Gewinnung von Virus- (NDV)/Mock-Lysat | 62 |
| 3.4 Bestimmung der Viruspooltiter | 62-64 |
| 3.4.1 TCID ₅₀ von HAV/7 und HAV _{GBM} (Immunfluoreszenz) | 62 |
| 3.4.1.1 Austitration von Virus-/Mock-Lysat (FRhK-4- und MRC-5-Zellen) | 62 |
| 3.4.1.2 Fixierung der FRhK-4- und MRC-5-Zellen | 62-63 |
| 3.4.1.3 Bestimmung der TCID ₅₀ | 63 |
| 3.4.2 TCID ₅₀ von NDV | 64 |
| 3.4.2.1 Austitration von Virus-/Mock-Lysat (FRhK-4-Zellen) | 64 |
| 3.4.2.2 Bestimmung der TCID ₅₀ | 64 |
| 3.5 Infektion von Zellen | 64-66 |
| 3.5.1 Infektion mit dem Hepatitis A-Virus (HAV) | 64-65 |
| 3.5.2 Infektion mit dem Newcastle Disease Virus (NDV) | 65-66 |
| 3.6 Mycoplasmen-Detektions Verfahren | 66-68 |
| 3.5.1 DAPI-Test | 66-67 |
| 3.5.2 Mycoplasmen-PCR | 67-68 |
| 3.7 Induktion von Zellen | 68-69 |
| 3.7.1 Induktion von U937-Zellen mit PMA | 68 |
| 3.7.2 Induktion von U937-Zellen mit Interferon (IFN- α 2a, IFN- β) | 69 |
| 3.7.3 Induktion von FRhK-4-Zellen mit poly-IC | 69 |
| 3.8 Bestimmung der Interferonkonzentration im Zellkulturüberstand | 70-71 |
| 3.8.1 Plaquereduktionsassay | 71 |
| 3.9 Extraktion von Proteinen aus Zellen | 72-74 |
| 3.9.1 Freeze & Thaw Lysis | 72 |
| 3.9.2 Zellysis-Puffer | 72-73 |
| 3.9.3 Proteinkonzentrationsbestimmung | 73-74 |
| 3.10 Luciferase-Assay | 74-75 |
| 3.11 Proteinnachweis (IRF-7, β-Aktin) mittels Immunoblot (WesternBlot) | 75-78 |
| 3.11.1 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) | 75-76 |
| 3.11.2 Immunoblot (Westernblot) | 76-78 |
| 3.12 Transformation von Bakterien | 78-82 |
| 3.12.1 Schnelltest zur Überprüfung von Plasmid-DNA (Miniprep) | 79 |
| 3.12.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien | 79 |
| 3.12.1.2 Restriktionsspaltungstest der isolierten Plasmid-DNA | 80 |
| 3.12.2 Plasmidreinigung (Maxiprep) | 80-82 |
| 3.13 Gel-Elektrophorese | 82-83 |
| 3.14 Photometrische Konzentrationsbestimmungen | 83 |
| 3.14.1 DNA-Konzentrationsbestimmung | 83 |
| 3.14.2 RNA-Konzentrationsbestimmung | 83 |

| | |
|---|---------|
| 3.15 Restriktionsspaltungsanalyse von Plasmid-DNA | 84 |
| 3.15.1 Miniprep | 84 |
| 3.15.2 Maxiprep | 84 |
| 3.16 Transfektion von eukaryotischen Zellen | 85-88 |
| 3.16.1 transiente Transfektion: jetPEI | 85-86 |
| 3.16.2 stabile Transfektion: Calcium-Phosphat | 86-88 |
| 3.17 Immunfluoreszenz | 88-91 |
| 3.17.1 Einlegen/Entfernen von Glasplättchen | 88-89 |
| 3.17.2 Immunfluoreszenz zum Nachweis von IRF-7 und HAV | 89-91 |
| 3.17.2.1 FRhK-4 (pEGFPN1-IRF-7, Klon 6) | 89 |
| 3.17.2.2 U937-Zellen und PBMCs | 90-91 |
| 3.17.3 Paralleldetektion von IRF-7 und HAV in U937-Zellen und PBMCs | 91 |
| 3.17.4 Paralleldetektion von IRF-7 und HAV in FRhK-4-Zellen | 91 |
| 3.18 Herstellung des Reporterkonstruktes „pGL2-IFNα6-Luc“ | 92-96 |
| 3.18.1 Gewinnung des IFN- α 6 Promotors aus Hek-293-Zellen | 92-94 |
| 3.18.1.1 Isolierung von DNA aus Säugetiergewebe | 92-93 |
| 3.18.1.2 Durchführung einer PCR zur Amplifikation des IFN- α 6-Promotors | 93 |
| 3.18.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA | 93-94 |
| 3.18.2 Ligation des pGL2-Control Plasmides mit dem IFN- α 6-Promotor | 94-95 |
| 3.18.2.1 Alkalische Dephosphorylierung von Plasmiden | 94 |
| 3.18.2.2 Ligation des IFN- α 6-Promotors in das geschnittene pGL2-Control Plasmid | 95 |
| 3.18.5 Phenol-Ether-Extraktion von DNA aus LMP-Agarose | 95-96 |
| 3.19 RT-PCR zum Nachweis von mRNA | 96-99 |
| 3.19.1 Extraktion von RNA | 96-97 |
| 3.19.2 DNase-Verdau | 97 |
| 3.19.3 Reverse Transkription von mRNA (IRF-7, β -Aktin, IFN- α 6) in cDNA | 97-98 |
| 3.19.4 Polymerase-Chain Reaction (PCR) (IRF-7, β -Aktin, IFN- α 6) | 98-99 |
| 3.20 Analyse der Größe, Granularität und zellulärer Oberflächenproteine von Zellen | 99-101 |
| 3.20.1 Analyse des Oberflächenrezeptors CD11b auf U937-Zellen | 100 |
| 3.20.2 Analyse von Granularität und Größe von U937-Zellen | 100-101 |

4. Ergebnisse **102-135**

| | |
|---|---------|
| 4.1 IRF-7 und die Differenzierung von mononukleären Zellen | 103-110 |
| 4.1.1 Detektion von IRF-7 in PMA-induzierten U937-Zellen | 103-104 |
| 4.1.2 PMA-induzierte nukleäre Translokation von IRF-7 in U937-Zellen | 104-105 |
| 4.1.3 Induktion der mononukleären Differenzierung durch IRF-7-induziertes Interferon | 105-110 |
| 4.1.3.1 IRF-7-spezifische Aktivierbarkeit des IFN- α 6-Promotors | 106-107 |
| 4.1.3.2 PMA-induzierte U937-Zellen exprimieren biologisch aktives Interferon | 107-108 |
| 4.1.3.3 Interferon bedingt eine Verringerung der Proliferation von U937-Zellen | 108-110 |
| 4.2 Untersuchung der Rolle von IRF-7 in HAV-infizierten mononukleären Zellen | 111-116 |
| 4.2.1 Infektion von primären humanen mononukleären Zellen mit HAV | 111-112 |
| 4.2.2 Infektion von U937-Zellen mit HAV | 112-114 |
| 4.2.3 Transfektion von U937-Zellen mit IRF-7 | 114-116 |
| 4.3 Einfluss des Hepatitis A-Virus auf den Transkriptionsfaktor IRF-7 | 116-135 |
| 4.3.1 Untersuchung der Expression von IRF-7 in FRhK-4-Zellen | 116-118 |
| 4.3.2 Einfluss von HAV auf die transkriptionale Aktivität des Transkriptionsfaktors IRF-7 | 118-120 |
| 4.3.2.1 Untersuchung der Wechselwirkung von NDV-aktivierten IRF-3 mit IRF-7 | 121-123 |
| 4.3.3 HAV hemmt die NDV-induzierte nukleäre Translokation von IRF-7 | 123-125 |
| 4.3.4 HAV hemmt die NDV-induzierte Phosphorylierung von IRF-7 | 126-127 |

| | | |
|------------|--|----------------|
| 4.3.5 | Einfluss von HAV auf die Aktivierbarkeit des IFN- α 6-Promotors | 128-131 |
| 4.3.6 | Einfluss von HAV auf die IRF-7-induzierte Expression von IFN- α | 131-133 |
| 4.3.7 | Einfluss von HAV auf die IRF-7-induzierte Expression von non-IFN- α 1 | 133-134 |
| 5. | Diskussion | 135-144 |
| 6. | Zusammenfassung | 145 |
| 7. | Abkürzungen und Akronyme | 146-148 |
| 8. | Literaturverzeichnis | 149-159 |
| I | Lebenslauf | I |
| II | Veröffentlichungen | II |
| III | Formalien | III |

1. Einleitung

In dieser Dissertation wird der Ursache der Hepatitis A-Virus induzierten Suppression der Hämatopoese nachgegangen. Im Speziellen wird dazu der Einfluss einer Hepatitis A-Virusinfektion auf den, für die mononukleäre Differenzierung essentiellen, Transkriptionsfaktor IRF-7 untersucht. Zudem soll die Rolle von IRF-7 im Verlauf der Hämatopoese durch eigene Befunde unterstrichen und ergänzt werden.

Die folgenden Kapitel der Einleitung sollen es dem Leser ermöglichen, sich ein Bild über den Entstehungsort sowie über Funktion und Interaktion der für diese Arbeit wichtigen mononukleären Zellen zu machen. Da diese Zellen wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems darstellen, folgt zunächst eine Einführung in den Aufbau und die Gliederung des menschlichen Immunsystems. Spätere Abschnitte widmen sich unter anderem der detaillierten Beschreibung des Transkriptionsfaktors IRF-7, der mononukleären Differenzierung, dem Hepatitis A-Virus und dem hemmenden Einfluss, welchen HAV auf die zuvor beschriebene mononukleäre Differenzierung ausübt.

1.1 Das angeborene- und adaptive Immunsystem

Der menschliche Körper muss sich gegen einen permanenten Angriff durch Pathogene (Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten) wehren. Dabei stellen die epithelialen Oberflächen des menschlichen Körpers (Haut, Schleimhaut) einen ersten Schutzwall dar. Wird dieser Schutzwall durchbrochen, so stehen dem Körper zwei weitere Verteidigungslinien – das angeborene- und das adaptive Immunsystem – zur Verfügung. Hierbei wird das angeborene Immunsystem bereits wenige Minuten nach dem Eindringen eines Pathogens aktiv, während das adaptive Immunsystem erst dann aktiviert wird, wenn das angeborene Immunsystem versagt oder zur Eliminierung eines Pathogens alleine nicht ausreicht.

Dabei beruht die Wirkung des angeborenen Immunsystems auf der Erkennung, Phagozytose und Zerstörung von Mikroorganismen durch professionelle Phagozyten (z.B. den für diese Arbeit wichtigen Makrophagen aber auch Neutrophile). Diese exprimieren auf ihren Oberflächen Rezeptoren, welche bestimmte, auf Pathogene vorkommende Strukturen, z.B. bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), erkennen und so deren Eliminierung einleiten können (DALE ET AL. 2008, JANEWAY ET AL. 2002). Als Beispiel sind in der Abbildung 1.1 einige der auf der Oberfläche von Makrophagen exprimierten Rezeptoren, sowie deren Funktion, dargestellt.

Als weiterer Wirkmechanismus kommt es im Verlauf einer Infektion mit Viren oder anderen Pathogenen zur Aktivierung des sogenannten Interferonsystems. Durch die Sezernierung von Interferon- α (IFN- α) und Interferon- β (IFN- β) können bereits infizierte Zellen in sich und in umliegenden Zellen einen sogenannten „antiviralen Status“ auslösen und so der Ausbreitung einer Infektion entgegenwirken. Eine detailliertere Beschreibung des Interferonsystems folgt im Abschnitt 1.2. Bei aller Effektivität ist das angeborene Immunsystem jedoch ein „starres“ System, welches sein Rezeptor- und Effektorpotential nicht weiter ausbauen und neuen Pathogenen anpassen kann, weshalb es auch als „unspezifisches Immunsystem“ bezeichnet wird. Dennoch ist es äusserst effizient und für die Eliminierung der meisten Pathogene ausreichend.

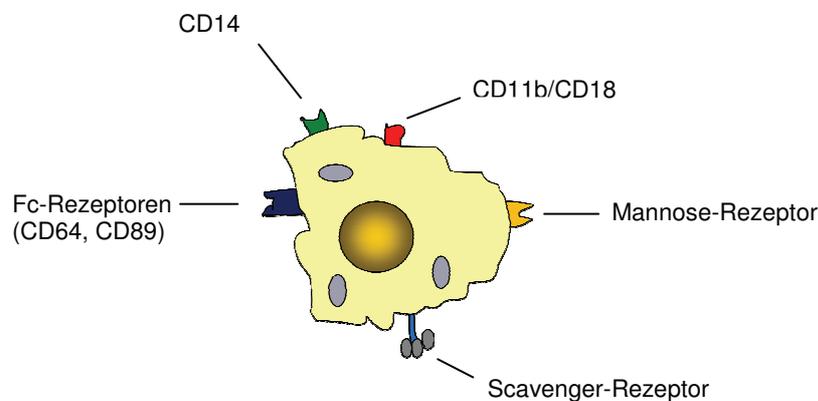


Abbildung 1.1 Makrophagen - Professionelle Phagozyten und ihre Rezeptoren Darstellung eines Makrophagen als Phagozyten und einer Auswahl der auf seiner Oberfläche exprimierten Rezeptoren. CD14: Rezeptor für den Komplex aus bakteriellem LPS und lipopolysaccharidbindendem Protein. CD11b/CD18: CD11b, Bindung der Komplementkomponente iC3b und extrazellulärer Matrixproteine. CD18, Untereinheit der Integrine, bindet an CD11a, b, c und d. Mannose-Rezeptor: zellgebundenes Lektin, Bindung von bestimmten Zuckermolekülen an der Oberfläche von vielen Bakterien und einigen Viren. Scavenger-Rezeptor: Auch als „Fress-Rezeptor“ bezeichnet. Bindung von bestimmten anionischen Polymeren und acetylierte Lipoproteine mit geringer Dichte. Keine Erkennung von, durch Sialinsäureresten verdeckten, körpereigenen Strukturen. Fc-Rezeptoren: Rezeptoren für den Fc-Teil verschiedener Immunglobulinisotypen. Beispielsweise CD64: hochaffiner Rezeptor für IgG, CD89: Rezeptor für IgA.

Die Phagozyten des unspezifischen Immunsystems können im Verlauf einer Infektion das adaptive Immunsystem aktivieren und so eine spezifische Immunantwort (humoral oder zellvermittelt) auslösen. Dabei zeichnet sich beispielsweise die humorale Immunantwort unter anderem durch die Sekretion von spezifischen, gegen Komponenten des jeweiligen Pathogens gerichteten, Antikörpern aus. Diese, von B-Zellen (Plasmazellen) sezernierten Antikörper, ermöglichen eine effektivere Eliminierung des Pathogens durch Phagozyten. Auf den genauen Ablauf der Aktivierung sowie der Funktion des adaptiven Immunsystems soll hier nicht

genauer eingegangen werden. Jedoch ist es das adaptive Immunsystem, welches den Körper ein Leben lang vor einer Infektion mit einem bereits bekannten Pathogen schützt (JANEWAY ET AL. 2002, SOMPAYRAC 2008).

Den Effektorzellen des angeborenen- und adaptiven Immunsystems gemeinsam ist ihr Bildungsort. Als Zellen des Blutes werden sie in einem Vorgang, der als Hämatopoese bezeichnet wird, im Knochenmark gebildet.

1.1.1 Die Hämatopoese

Der Ursprung sämtlicher Zellen des Blutes ist das Knochenmark. Hier befinden sich die sogenannten pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, aus denen alle Blutzelllinien hervorgehen (Abbildung 1.2). Dabei geht der Entstehung der unterschiedlichen Blutzellen eine Kaskade von Zellteilungen und Differenzierungsschritten voraus, welche dem klassischen Modell der Hämatopoese zufolge mit einer anfänglichen Teilung der pluripotenten Stammzelle in zwei weitere Stammzelltypen, lymphoide und myeloide Vorläuferzellen, beginnt (AKASHI ET AL. 2000, KONDO ET AL. 1997). Im Verlauf weiterer Zellteilungen gehen aus den lymphoiden Vorläuferzellen die natürlichen Killer (NK)-Zellen, T- und B- Lymphozyten sowie eine bestimmte Population dendritischer Zellen hervor. Aus den myeloiden Vorläuferzellen hingegen entwickeln sich Leukozyten, Thrombozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten. Die Leukozyten lassen sich weiter in Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile und Basophile Zellen), myeloide Dendritische-Zellen und den für diese Arbeit wichtigen Monozyten unterteilen (REYA ET AL. 2001). Der Hämatopoese zugrunde liegt laut diesem Modell eine feine Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung der Stamm- und Vorläuferzellen. So geht jede einzelne Blutzelllinie und Blutzelle aus einer kleinen Population pluripotenter Stammzellen, welche beispielsweise im murinen System gerade einmal 0,05% aller Knochenmarkszellen ausmacht, (MORRISON UND WEISSMAN 1994) hervor. Diese Zellen exprimieren keine linienspezifische Antigene, dafür aber das Stammzellen-assoziierte Antigen „Sca-1“ sowie niedrige Level des T-Zell Antigens „Thy1“. Dementsprechend werden sie als Lin⁻Sca-1⁺Thy-1^{low} Zellen bezeichnet (GIEBEL UND PUNZEL 2008). Dabei ist die äusserst komplexe Regulation dieses Systems bis heute noch nicht vollständig verstanden und unter den kontinuierlich erbrachten neuen Erkenntnissen einem ständigen Wissensstandswandel unterworfen. So muss das zuvor beschriebene klassische

Modell der Hämatopoese insofern ergänzt werden, als dass es Entwicklungswege gibt, in denen sich beispielsweise auch aus einer lymphoiden Vorläuferzelle zumindest Granulozyten und Makrophagen entwickeln können. Diese lymphoiden Vorläuferzellen werden als lymphoid-geprimte, multipotente Vorläuferzellen „LMPPs“ bezeichnet (CHRISTENSEN UND WEISSMAN 2001). Die Kaskade der Zelldifferenzierung verläuft demnach nicht starr in eine Richtung, sondern flexibel über mehrere alternative Wege.

Dabei ist für den geordneten Ablauf der Hämatopoese eine fein balancierte Zellumgebung (hämatopoetisches „Microenvironment“), bestehend aus spezifischen Zellen und Cytokinen, verantwortlich.

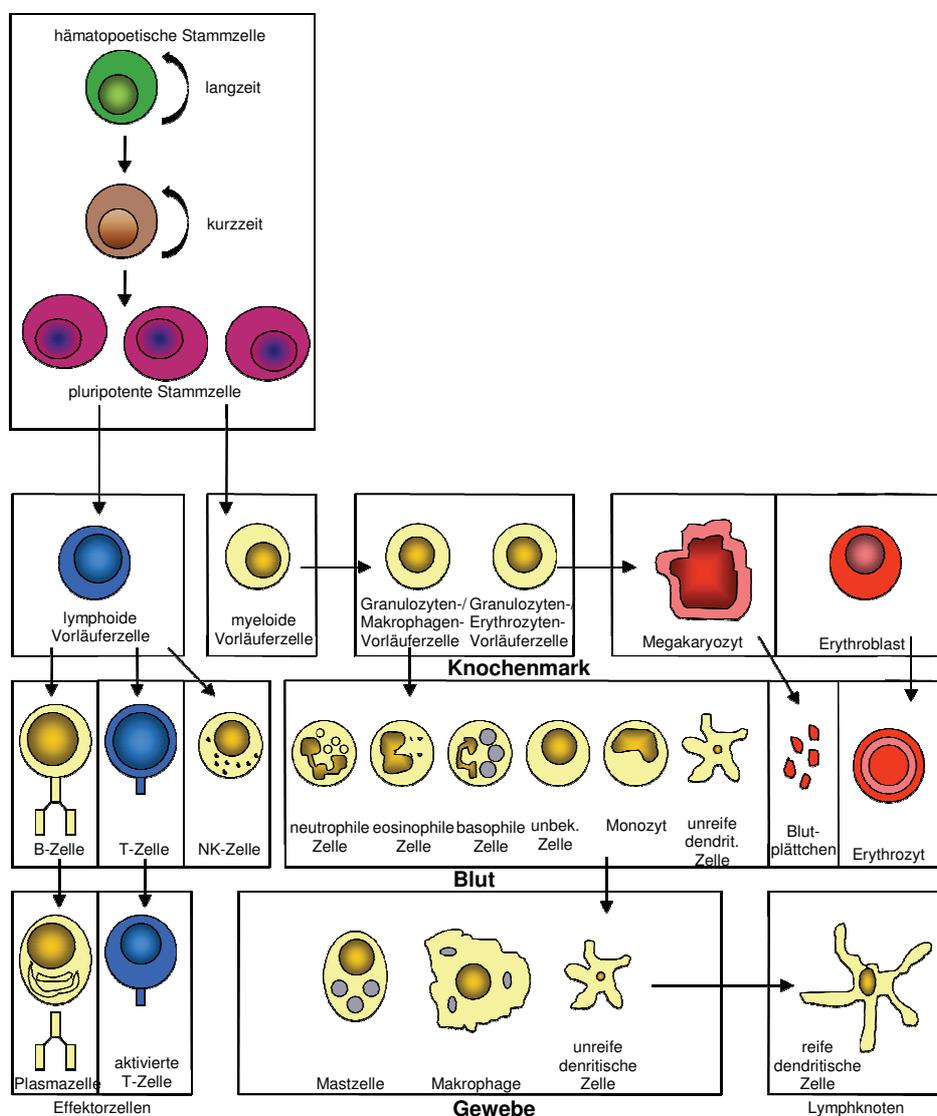


Abbildung nach Reya T. et al. 2001 und Janeway CA 2005

Abbildung 1.2 Die Hämatopoese Darstellung der zellulären Bestandteile des Blutes sowie deren Bildungs-, Reifungs- und Wirkungsorte. Sämtliche Zellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. „Langzeit hämatopoetische Stammzelle“: Andauernde Fähigkeit zur Selbsterneuerung. „Kurzzeit hämatopoetische Stammzelle“: Zeitlich begrenzte Fähigkeit zur Selbsterneuerung.

1.1.2 Das hämatopoetische „Microenvironment“

Im Knochenmark wird durch das Vorhandensein eines spezifischen Umfeldes, welches als das sogenannte hämatopoetische „Microenvironment“ bezeichnet wird, eine Zellumgebung geschaffen, welche Überleben, Differenzierung und Proliferation hämatopoetischer Zellen reguliert. Seit der ersten Entwicklung eines Systems zur Langzeitkultivierung von murinen Knochenmarkszellen in Flüssigmedium (DEXTER ET AL. 1973) und der damit einhergehenden Erleichterung der Untersuchung der Hämatopoese *in vitro*, wurde bekannt, dass sich dieses hämatopoetische „Microenvironment“ aus spezifischen adhärennten Zellen und Cytokinen zusammensetzt. Dabei handelt es sich bei den für die Hämatopoese wichtigen Zellen um phagozytotische Mononukleäre-, Endothel- und Fettzellen (DEXTER ET AL. 1977). Zu den im hämatopoetischen „Microenvironment“ konstitutiv exprimierten Cytokinen gehören die Wachstumsfaktoren CSF-1, GM-CSF, G-CSF, IL-6 und IL-3 (KITTLER ET AL. 1992). Dabei kommen M-CSF, GM-CSF und IL-3 wichtige regulatorische Funktionen in der Produktion und Differenzierung von mononukleären phagozytotischen Zellen zuteil. Von besonderem Interesse ist zudem die Anwesenheit von Interferon- α (IFN- α), welches entscheidend zur Aufrechterhaltung sowie zur Regulation der Hämatopoese beiträgt (MOORE ET AL. 1985, THIELE ET AL. 1998, MAZUR ET AL. 1986, KRUSE ET AL. 1989). Da Makrophagen unter anderem IFN- α in großen Mengen sezernieren und zudem Teil des hämatopoetischen „Microenvironment“ sind (CAVAILLON 1994), werden sie in den folgenden Kapiteln noch von besonderem Interesse sein.

1.2 Das Interferonsystem

Zur Aufgabe des angeborenen Immunsystems gehört die Sezernierung von Interferon (IFN), welches der Familie der Cytokine angehört. Es gibt drei unterschiedliche Interferontypen (Typ I, II und III), welche im Menschen alle auf Chromosom 9 codiert werden. Zu den Typ I Interferonen zählen die humanen IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , und IFN- ω sowie die mehr als 13 Subtypen von IFN- α . IFN- γ ist der einzige Vertreter der Typ II Interferone. Desweiteren gibt es noch IFN- γ 1, IFN- γ 2 und IFN- γ 3, welche alle der Familie der Typ III Interferone angehören. Dabei wird IFN- γ 1 auch als Interleukin-29, IFN- γ 2 als Interleukin-28A und IFN- γ 3 als Interleukin-28B bezeichnet (PESTKA ET AL. 2004). Typ I Interferone werden als direkte Antwort auf virale Infektionen gebildet. Dabei wird IFN- α hauptsächlich von Leukozyten, IFN- β von den meisten Zelltypen, besonders den Fibroblasten, produziert. Interferon- γ

hingegen wird, als einziger Vertreter der Typ II Interferone, ausschließlich von aktivierten T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen, als Antwort auf die Erkennung von virusinfizierten Zellen, sezerniert (VILCEK UND SEN 1996). Über Typ III Interferone ist hingegen noch nicht sehr viel bekannt. Wie Coccia et al. 2004 zeigen konnten, wird es als Antwort auf eine virale Infektion oder Stimulation von Toll-like Rezeptoren (TLR) sowohl von „*monocyte-derived*“ Dendritischen als auch von plasmacytoiden Dendritischen Zellen induziert (COCCIA ET AL. 2004). Die Kontrolle der Produktion von Interferon erfolgt auf Ebene der Gentranskription.

1.2.1 Aktivierung des Interferonsystems

Aktiviert wird das Interferonsystem über die Bindung von Pathogen-assoziierten Strukturen an sich auf der Zelloberfläche befindlichen TLR oder an cytoplasmatische Rezeptoren, wie die beiden Helikasen RIG-I (*retinoic acid-induced gene 1*) und MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene-5*). So wird nach der Bindung viraler doppelsträngiger RNA (dsRNA) oder dem synthetischen dsRNA Analogon Poly-Inosinsäure:poly-Cytidylsäure (poly(IC)) an TLR3, RIG-I oder MDA5 ein Signalweg aktiviert, welcher in einem ersten Schritt in der Sekretion von IFN- β und später in der von IFN- α mündet (YONEYAMA ET AL. 2004, ANDREJEVA ET AL. 2004). Eine IFN- α spezifische Stimulation erfolgt zudem über TLR7/8 und 9 (HEIL ET AL. 2004, DIEBOLD ET AL. 2004, HEMMI ET AL. 2000). In dieser Arbeit ist der Signalweg zur Aktivierung des Interferonsystems, welcher über RIG-I und MDA5 führt, von besonderer Bedeutung. Daher soll im Folgenden genauer auf ihn eingegangen werden.

Am Anfang der Induktion von IFN- β steht die Infektion einer Wirtszelle mit einem Virus. Die sich im Verlauf der viralen Replikation als Replikationsintermediat bildende dsRNA bindet an die bereits erwähnten cytoplasmatischen Rezeptoren RIG-I oder MDA5, welche in der Folge eine Konformationsänderung durchmachen und über ihre CARD-Domänen (*caspase recruitment domain*) an die aminoternale CARD-Domäne des Multiadaptorproteins MAVS (*mitochondrial antiviral signaling*) binden und dieses aktivieren (YONEYAMA ET AL. 2004, ANDREJEVA ET AL. 2004). MAVS interagiert daraufhin mit TRAF-3 (*tumor necrosis factor receptor [TNFR]-associated factor 3*), welches seinerseits über TANK (*TRAF family member-associated NF- κ B activator*) den VAK (*virus-activated kinase*)-Komplex aktiviert (SAHA ET AL. 2006, OGANESYAN ET AL. 2006, LI ET AL. 2002). Dieser VAK-Komplex setzt sich aus den Proteinen TANK (*TRAF-associated NF- κ B activator*) und NAP1 (*NAK-associated protein*)

sowie den Kinasen TBK-1 (*TANK-binding kinase 1*) und IKK ϵ (*I κ B kinase ϵ*) zusammen (CHARIOT ET AL. 2002, FUJITA ET AL. 2003). Die Aktivierung dieses Komplexes führt unter anderem zur vorübergehenden Phosphorylierung, und damit einhergehenden Dimerisierung, der für die IFN- β -Induktion und für diese Arbeit wichtigen Transkriptionsfaktoren IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*) und IRF-7 (*interferon regulatory factor 7*) (TENOEVEER ET AL. 2004, SHARMA ET AL. 2003, PAZ ET AL. 2006, LIN ET AL. 1998, AU ET AL. 1998).

Neben IRF-3 und IRF-7 führt eine RIG-I- beziehungsweise MDA5- vermittelte Detektion von dsRNA zusätzlich zur Aktivierung von NF- κ B (*nuclear factor κ B*) und ATF-2/c-JUN (*activating transcription factor 2/cellular v-jun-homolog*). NF- κ B, welches zur Familie der NF- κ B/Rel-Proteine gehört, liegt normalerweise gebunden an seinen Inhibitor I κ B als inaktives Protein im Cytoplasma vor. Es wird durch die initiale Phosphorylierung und damit einhergehenden Dissoziation sowie der anschließenden Ubiquitinylierung von I κ B durch den RIG-I, beziehungsweise MDA5 aktivierten IKK-Komplex (*I κ B kinase*), aktiviert (SETH ET AL. 2005). Dabei geht die dsRNA-induzierte Aktivierung von NF κ B wie auch von IRF-3 und IRF-7 mit einer Phosphorylierung dieser Transkriptionsfaktoren einher, aus der eine Translokation dieser Faktoren in den Zellkern resultiert (ISRAEL 2000, LIN ET AL. 1998, SATO ET AL. 1998). Im Gegensatz dazu erfolgt die Phosphorylierung und daraus resultierende Heterodimerisierung der Transkriptionsfaktoren ATF-2/c-JUN durch die Kinasen p38 und JNK (*c-JUN N-terminal kinase*) im Zellkern. Aktiviert werden diese beiden Kinasen durch eine dsRNA induzierte Signalkaskade über TAK1 (*TGF- β -activated kinase*) und die MAPK-Kinasen (*mitogen-activated protein kinase*), MKK3/6 sowie MKK4/7 (SAKURAI ET AL 2000, WANG ET AL. 2001, FALVO ET AL. 2000).

Die nun aktiv im Zellkern vorliegenden Transkriptionsfaktoren IRF-3, IRF-7, NF- κ B und ATF-2/c-JUN können an die Enhancerregion des IFN- β Gens, welche sich 102-55bp *upstream* des Transkriptionsstarts befindet, binden. Dabei binden IRF-3 und IRF-7 (Homodimere sowie Heterodimere) an die PRDIII/I (*Positive regulatory domain*), ATF-2/c-JUN an die PRDIV und NF- κ B an die PRDII des Enhancerbereiches und verdrängen so die Repressorproteine von der sogenannten NRDI (*negative regulatory domain I*), welche eine konstitutive Aktivität des IFN- β Promotors unterbindet (MANIATIS ET AL. 1998, NOURBAKHSH UND HAUSER. 1999, YANG ET AL. 2004). Unter Wechselwirkung von IRF-3, IRF-7, NF- κ B und ATF-2/c-JUN mit dem Co-Aktivator CBP (*CREB-binding Protein*) oder seinem Homolog p300 bildet sich in der Folge das sogenannte IFN- β -Enhanceosom aus (MANIATIS ET AL. 1998, MUNSHI ET AL. 1999). Was nun folgt ist eine durch das HMG I(Y) (*high mobility group-protein-I (Y)*)

ausgelöste Konformationsänderung der DNA, wodurch über CBP/p300 eine Assoziation der RNA-Polymerase-II mit dem Enhanceosom ermöglicht und die Transkription des IFN- β -Gens möglich wird (FALVO ET AL. 1995, YIE ET AL. 1999, KEE ET AL. 1996, KIM ET AL. 1998).

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die Induktion von IFN- β genauer erläutert. Dabei wird die maximale Promotoraktivität nur erreicht, wenn sowohl IRF-3 als auch IRF-7 in Form von Heterodimeren an die PRDIII/I binden. Jedoch können auch IRF-3- sowie IRF-7-Homodimere an den IFN- β -Enhancer binden und die IFN- β -Expression auslösen (YANG ET AL. 2004).

Neben IFN- β gibt es jedoch eine Vielzahl weiterer Interferontypen, unter anderem die 13 Subtypen des IFN- α . Dabei sind die Promotorbereiche dieser IFN-Typen anders aufgebaut als der von IFN- β und lassen sich, mit Ausnahme von IFN- α 1, durch IRF-3-Homodimere nicht induzieren. Für ihre Induktion werden entweder IRF-7-Homodimere oder sich aus IRF-3 und IRF-7 zusammengesetzte Heterodimere benötigt (LIN ET AL. 2000A&B, AU WC 1998, BARNES 2004). IFN- α Subtypen für deren Induktion das Vorhandensein von aktiviertem IRF-7 essentiell ist, werden im Folgenden als non-IFN- α 1 bezeichnet.

1.2.2 Wirkung von Interferon

Sowohl IFN- α als auch IFN- β entfalten ihre antivirale Aktivität nach Bindung an den sogenannten IFNAR-Rezeptor, welcher sich aus den homologen Untereinheiten IFNAR-1 und IFNAR-2 zusammensetzt (NOVICK ET AL. 1994). Dabei scheinen IFN- α und IFN- β zunächst primär an den IFNAR-2 zu binden, was in einer Assoziation mit IFNAR-1 resultiert (CUTRONE ET AL. 1997). In Folge der Bindung von IFN- α oder IFN- β an den IFNAR-Rezeptor kommt es zur Aktivierung der mit den Rezeptoren assoziierten Kinasen JAK1 (*janus-kinase*) und TYK2 (*tyrosin-kinase*), welche ihrerseits die Phosphorylierung und somit Aktivierung der STATs (*signal transducers and activators of transcription*) STAT1 und STAT2 induzieren (DARNELL ET AL. 1994, TANIGUCHI ET AL. 2001). Diese wiederum lösen die Bildung des AAF- (*IFN- α activation factor*) und ISGF3- (*IFN-stimulated gene factor 3*) Komplexes aus. Dabei setzt sich AAF aus zwei STAT1, ISGF3 aus je einem STAT1, STAT2 und IRF-9 zusammen (DECKER ET AL. 1991, GAO ET AL. 1998, BLUYSSSEN ET AL. 1996). Da für die hier vorliegende Arbeit vor allem ISGF3 von Bedeutung ist, soll im Folgenden seine Rolle im nun anschließenden Signalweg erläutert werden.

Nach seiner Ausbildung translociert ISGF3 in den Zellkern, wo es aufgrund der DNA-

Bindespezifität von STAT1 und STAT2 mit hoher Spezifität an die ISRE (*IFN-stimulated response element*) -Sequenzen in den Promotorbereichen von ISGs (*IFN-stimulated genes*) bindet und deren Transkription induziert (VEALS ET AL. 1993, KESSLER ET AL. 1988, WILLIAMS 1991). Da ISGF3 zudem über die Fähigkeit verfügt an die PRDI Region des IFN- β -Promotors zu binden, induziert die Bindung von IFN an den IFNAR Rezeptor zudem in einer positiven Rückkoppelung die Expression von weiterem IFN- β (YONEYAMA ET AL. 1996). Die durch IFN- α und IFN- β induzierte Expression der ISGs führt im Folgenden zum Aufbau eines antiviralen Status. Als Beispiele für solche ISGs sollen hier die Proteinkinase R (PKR) und das OAS/RNase L-System genannt werden. Die antivirale Wirkung der PKR beruht, nach Phosphorylierung des eIF2 α (*eukaryotic (translation) initiation factor 2 α*), in einer generellen Inhibition der Proteinsynthese und die des OAS/RNase L-Systems in dem unspezifischen Abbau einzelsträngiger zellulärer wie auch viraler RNA (WRESCHNER ET AL. 1981). Somit hemmen PKR als auch das OAS/RNase L-System auf der einen Seite zwar den eigenen Zellmetabolismus und können zur Auslösung der Apoptose führen, auf der anderen Seite aber wird die Replikation und Freisetzung von Viren gehemmt oder, im Falle der Apoptose, sogar gänzlich unterbunden.

Dabei zeichnet sich das System aus PKR und OAS/RNase L durch die Aktivierung dieser Enzyme aus. So werden diese in Folge einer IFN- β -Induktion zwar exprimiert, oder wie im Falle der PKR stärker exprimiert, liegen aber zunächst inaktiv im Cytoplasma vor. Erst wenn im Zuge einer viralen Replikation dsRNA in der Zelle vorliegt, werden sie durch Bindung an selbige aktiviert (WILLIAMS 1999, RICE 1985, PLAYER 1998). Somit löst die Expression der ISGs zwar einen antiviralen Status aus, in Aktion tritt dieser aber erst, wenn die betroffene Zelle tatsächlich von einem Virus infiziert wurde. Ein Mechanismus, der gewährleistet, dass uninfizierte Zellen durch den antiviralen Status nicht geschädigt werden.

Ein anderes Beispiel eines ISGs stellt IRF-7 dar. So wird die Expression von IRF-7, welches normalerweise nur in Zellen lymphatischen Ursprunges konstitutiv exprimiert wird, durch ISGF3 induziert (AU WC ET AL. 1998, SATO ET AL. 1998). Da IRF-7 für die Induktion der Transkription fast aller IFN- α Subtypen notwendig ist, schließt sich hier der Kreis: Als Antwort auf eine virale Infektion wird demnach zunächst das in allen Zellen konstitutiv exprimierte IRF-3 durch den VAK-Komplex aktiviert, welches im Zusammenspiel mit weiteren Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, ATF-2/c-JUN) die Expression von IFN- β und IFN- α 1 auslöst (AU WC ET AL. 1995). Diese binden im Folgenden an die IFNAR-Rezeptoren derselben sowie umliegende Zellen, wodurch es in diesen zur Auslösung des sogenannten

antiviralen Status sowie zur Expression von IRF-7 kommt (MARIÉ ET AL. 1998). Im Zuge einer viralen Infektion kann in der Folge in diesen Zellen, neben einer Aktivierung von IRF-3, auch eine Aktivierung von IRF-7 erfolgen, wodurch die Expression aller IFN- α Subtypen ermöglicht wird. Somit wird die Expression von non-IFN- α 1 durch eine anfängliche Expression von IFN- β (und IFN- α 1) erst möglich. Im folgenden Abschnitt soll die Induktion der non-IFN- α 1-Gene durch IRF-7 genauer beschrieben werden.

1.3 Der Transkriptionsfaktor IRF-7

Der erste Nachweis von IRF-7 identifizierte diesen Faktor als an den Q ρ Promotor des Epstein Barr-Virus (EBV) bindend. Dabei erfolgt die Bindung von IRF-7 an eine virale ISRE Sequenz (5'-GCGAAAACGAAAGT-3') und inhibiert die Aktivität des Q ρ Promotors und die damit verbundene Transkription der mRNA des Nuklear-Antigen-1 des Epstein Barr-Virus (ZHANG UND PAGANO 1997). In der Folge wurde IRF-7 dann als derjenige Faktor benannt, welcher für die Induktion der bereits erwähnten non-IFN- α 1-Gene und der Auslösung einer systemischen Interferonantwort im Zuge einer angeborenen Immunantwort essentiell ist (AU WC ET AL. 1998, HONDA ET AL. 2005).

Das 503 Aminosäuren umfassende IRF-7 wird auf dem menschlichen Chromosom 11p15.5 in einer CpG-reichen Region codiert (LIN ET AL 2000A, LU ET AL 2000). Die Tatsache, dass sich in einigen Krebszellen eine Methylierung des IRF-7-Promotors detektieren lässt, zusammen mit der Beobachtung, dass eine solche Methylierung die Aktivität des IRF-7-Promotors hemmt, lässt ferner eine potentielle Rolle von IRF-7 in der Tumorgenese einiger Krebszellen vermuten (LU ET AL. 2000). Desweiteren wird IRF-7 eine essentielle Rolle in der Monozyten-zu-Makrophagen Differenzierung zugesprochen (LU UND PITHA 2001).

Im Gegensatz zu IRF-3, welches in allen Zellen konstitutiv exprimiert wird, wird IRF-7 lediglich in peripheren Lymphozyten des Blutes und Dendritischen Zellen konstitutiv exprimiert. In allen anderen Zellen muss die Expression von IRF-7 zunächst durch Stimulation mit einem Typ I Interferon und der damit verbundenen Bindung von ISGF3 an die ISRE Region des Promotors des IRF-7-Gens induziert werden. Dabei scheint die konstitutive Aktivität des IRF-7-Promotors durch dessen Lage im normalerweise für Transkriptionsfaktoren unzugänglichen, kondensierten Bereich des Chromosoms verhindert zu werden (LU ET AL. 2002, LU ET AL. 2000). Ferner konnten Lu et al. in humanen peripheren Blutmonozyten eine über NF- κ B laufende Induktion von IRF-7 durch TNF- α

(Tumornekrosefaktor- α) und PMA (*12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat*) nachweisen. Dabei ist die Bindung von NF- κ B an eine NF- κ B-Bindestelle, welche neben der TATA-Box des IRF-7-Gens lokalisiert ist, für dessen Transkription verantwortlich (LU ET AL. 2002).

Inaktives IRF-7 liegt, wie IRF-3, im Cytoplasma vor. Im Verlauf einer viralen Infektion und der damit einhergehenden Detektion von dsRNA wird IRF-7 über die Kinasen TBK-1 und IKK ϵ aktiviert. So wurde bereits eine NDV-induzierte nukleäre Translokation als auch Phosphorylierung von IRF-7 beschrieben (MARIÉ ET AL. 2000, AU ET AL 1998). Das so aktivierte IRF-7 bewirkt in der Folge die Transkription von IFN- α sowie einer Vielzahl von ISGs (SGARBANTI ET AL. 2007, AU ET AL 1998, BARNES ET AL. 2004). Mit Hilfe von an GFP gekoppelten und in COS-7 Zellen transfiziertem IRF-7 konnte gezeigt werden, dass die soeben beschriebene nukleäre Translokation von IRF-7 im Zuge einer Sendai-Virusinfektion bereits nach 8 Stunden, in ca 50% aller Zellen, zu beobachten ist (LIN ET AL. 1998). Ein weiterer Signalweg, welcher in der Phosphorylierung von IRF-7 und der damit verbundenen Induktion der non-IFN- α 1 Expression mündet, läuft über TLR7/8 und TLR9 (TENOEVEER ET AL. 2004). Dabei formt IRF-7 zum einen mit MyD88 (*Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adaptor*) und zum anderen mit TRAF6 einen Komplex, was die Aktivierung von IRF-7 zur Folge hat. Die aktivierende Wirkung von MyD88 beruht auf dessen Interaktion mit der Inhibitorischen-Domäne von IRF-7 und die von TRAF6 in der TRAF6 vermittelten Ubiquitinylierung (KAWAI ET AL. 2004). Eine bildliche Darstellung der Aktivierungswege für IRF-7 findet sich in der Abbildung 1.3. IRF-7 ist, wie bereits dargestellt, zusammen mit IRF-3 an der Induktion der humanen IFN- β und IFN- α 1 Expression beteiligt. Für alle übrigen IFN- α Subtypen ist jedoch das Vorhandensein von IRF-7 essentiell (AU ET AL. 2001). Zusammenfassend gilt, dass die Expressionsmuster von IFN- α durch die relativen Konzentrationen von IRF-3 und IRF-7 bestimmt werden. Dabei ist die Tatsache, dass die Expression von IRF-7 zunächst durch Stimulation mit einem Typ I Interferon induziert werden muss von besonderer Bedeutung, da so die nur transiente Expression von non-IFN- α 1 gewährleistet als auch reguliert wird (DAI ET AL 2004, SATO ET AL. 2000). Dabei wird die Halbwertszeit von IRF-7 mit Werten von einer bis zu über 24 Stunden angegeben, wobei der Phosphorylierungsstatus keinen Effekt auf die Proteinestabilität auszuüben scheint (SATO ET AL. 2000, ZHANG ET AL. 2001).

IRF-7 ähnelt in seinem Aufbau dem von IRF-3 (CAILLAUD ET AL. 2005, LIN ET AL. 2000B, LIN ET AL. 1999, SCHAFFER ET AL. 1998). So besitzen beide Faktoren eine N-terminale DNA-Bindedomäne, eine IRF-Assoziationsdomäne sowie eine serinreiche Region am C-terminalen Ende, welche für die virusinduzierte Phosphorylierung essentiell ist (LIN ET AL 2000A, MARIÉ ET AL 1998, SATO ET AL. 1998). Im Folgenden wird jedoch nur auf den Aufbau von IRF-7 genauer eingegangen.

Der komplexe Aufbau von IRF-7 wurde 1998 von Lin et al. untersucht. Sie zeigten, dass IRF-7 N-terminal über eine DNA-Binde- (DBD) und C-terminal über eine Signal-Response-Domäne (SRD) verfügt. Desweiteren wiesen sie eine konstitutive Aktivierungs- (CAD) und eine Inhibitions-Domäne (ID) nach und identifizierten zudem eine Region (AS 278-305), welche die basale- sowie virus-induzierte Aktivität verstärkt (VAD) (Abbildung 1.4) (LIN ET AL. 2000A). Da IRF-7 im nicht-induzierten Zustand vor allem im Cytoplasma zu detektieren ist, erscheint es zudem nicht verwunderlich, dass IRF-7 über eine Kern-Export Sequenz verfügt. Daneben besitzt IRF-7 eine N-terminal gelegene Nukleäre-Lokalisationssequenz sowie eine IRF-Assoziationsdomäne, mit der es zur Ausbildung von IRF-7-Homodimeren als auch IRF-3-Heterodimeren kommt. Dabei resultiert die C-terminale Phosphorylierung und die damit induzierte Ausbildung von Homodimeren von IRF-7 in der Aufhebung des Effektes der Inhibitions- auf die Aktivierungs-Domäne (LIN ET AL. 2000A).

Die soeben erwähnte Aktivierung und somit induzierte Transaktivierungsfähigkeit von IRF-7 erfolgt durch Phosphorylierung bestimmter Serinreste im C-terminalen Ende des Transkriptionsfaktors. Sato M et al. waren die ersten, welche in embryonalen Mausfibroblasten die Virus-induzierte Phosphorylierung sowie die damit verbundene nukleäre Translokation von IRF-7 nachweisen konnten (SATO ET AL. 1998). Hier stellen Ser⁴³⁷ und Ser⁴³⁸ die primären Ziele der Phosphorylierung dar, gefolgt von der Phosphorylierung der Serine Ser⁴²⁹⁻⁴³¹ oder Ser⁴⁴¹. Dabei ist die Aktivität von IRF-7 direkt proportional zu der Anzahl der Phosphorylierungen des Proteins. Eine Tatsache, welche der Zelle eine Feinjustierung der IRF-7 Aktivität ermöglicht. Desweiteren scheinen die Serinreste Ser⁴²⁵ und Ser⁴²⁶ eine wichtige Rolle im Verlauf der Phosphorylierung der übrigen Serinreste zu spielen. Ihre Funktion könnte darin bestehen, dass sie eine Erkennungssequenz für TBK-1 und IKKε darstellen oder an der Ausbildung der Konformation der Regulatorischen-Domäne von IRF-7 und der Dimerbildung beteiligt sind (CAILLAUD ET AL. 2005).

Transfiziertes IRF-7 verfügt über eine basale Aktivität, welche unabhängig von einer Virusinfektion auftritt. Dies scheint auf der Tatsache zu beruhen, dass die Transfektion mit IRF-7 zu einer nicht-spezifischen Aktivierung von TBK-1 und IKKε führt. Gestützt wird diese Vermutung durch Experimente mit Wildtyp (WT) IRF-7, welches, nach Cotransfektion mit dominant negativer IKKε in TBK-1 defiziente murine immortalisierte embryonale Fibroblasten, keinerlei Aktivität aufzeigt (CAILLAUD ET AL 2005).

Die soeben beschriebene Phosphorylierung von IRF-7 führt in der Folge zu dessen Homodimerisierung sowie zur nukleären Translokation, DNA-Bindung und der Aktivierung von IRF-7 induzierbaren Zielgenen. Dabei ist die durch die Phosphorylierung induzierte

Dimerisierung, und nicht die Phosphorylierung an sich, für die Aktivierung von IRF-7 essentiell. Scheinbar wird durch die Dimerisierung eine negative Interaktion zwischen der internen Transaktivierungs- und DNA-Bindenden-Region gelöst und die normalerweise von der inhibitorischen-Domäne maskierte Transaktivierungs-Domäne freigegeben, wodurch die nukleäre Ansammlung und Transaktivität von IRF-7 ermöglicht wird (MARIÉ ET AL 2000).

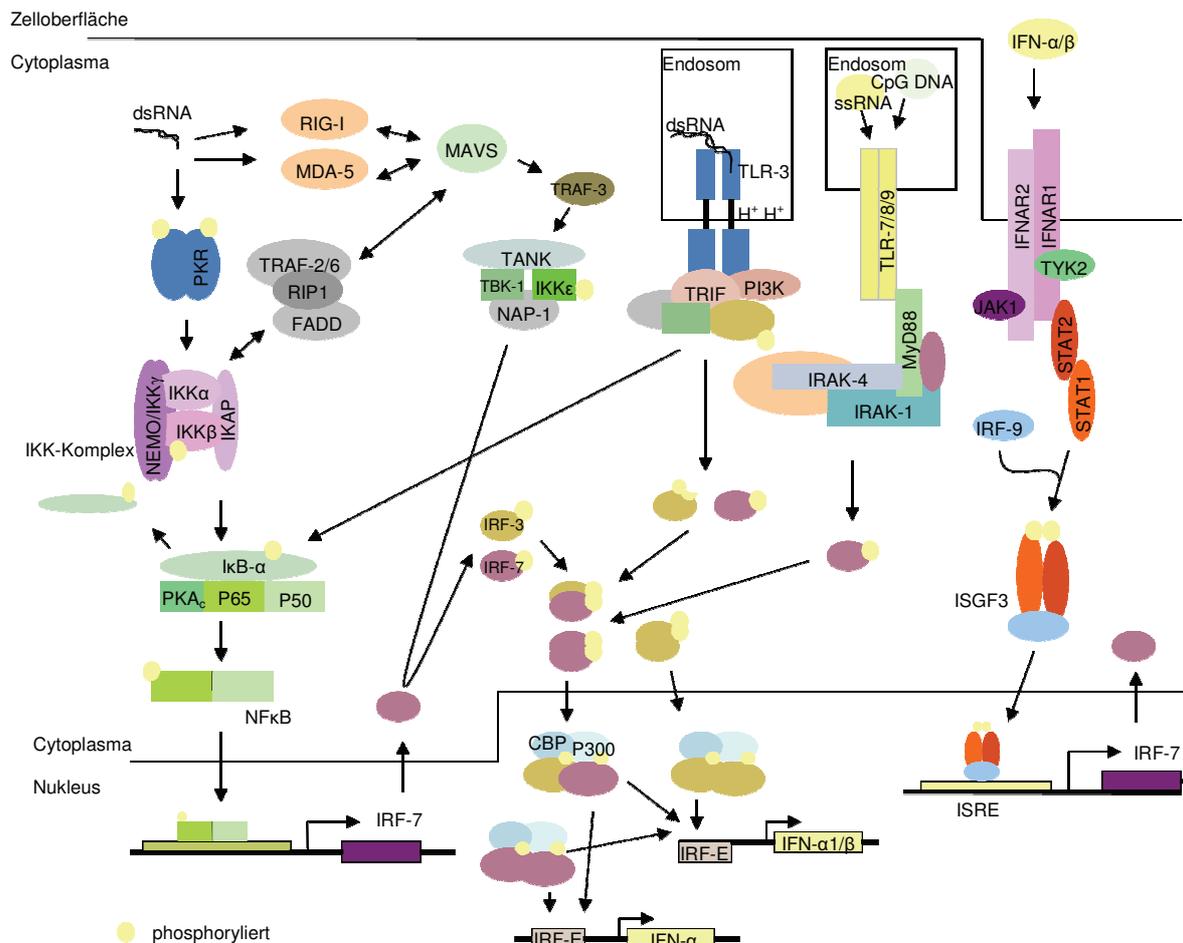


Abbildung 1.3 IRF-7: Expressions- und Aktivierungswege Darstellung von Signalwegen, welche zur Expression beziehungsweise zur Aktivierung (Phosphorylierung) von IRF-7 führen. Spitzer Pfeilkopf: Richtung der weiteren Aktivierung des Signalweges. Gerader Pfeilkopf: Hemmung der weiteren Signalweges. Eine kurze Beschreibung der involvierten Faktoren findet sich im Text und/oder unter „Abkürzungen und Akronyme“.

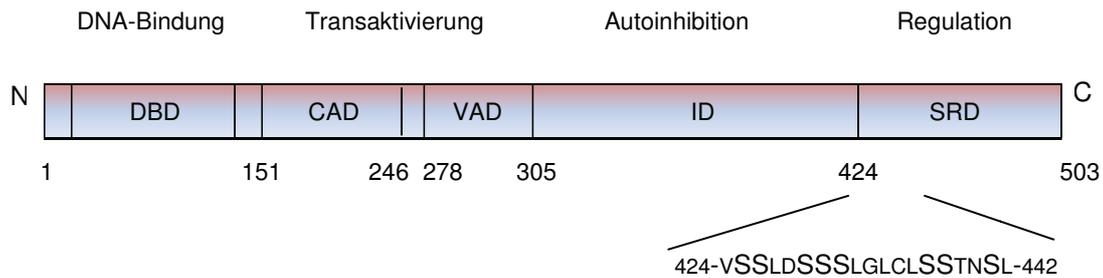


Abbildung 1.4: Aufbau von IRF-7 Schematische Darstellung des Aufbaus von IRF-7. DBD: DNA-bindende Domäne, CAD: Konstitutive Aktivierungsdomäne, VAD: Virus-aktivierte Domäne, ID: Inhibitorische Domäne, SRD: Signal-Response Domäne. Dargestellt ist außerdem die Aminosäuresequenz im C-terminalen Ende von IRF-7 mit den phosphorylierbaren Serinresten.

1.3.1 Die IFN- α -Gene und ihre Regulation durch IRFs

Die IFN- α -Gene befinden sich wie das IFN- β -Gen auf dem menschlichen Chromosom 9, wo sie als eine Multigenfamilie ohne Introns vorliegen (DIAZ 1995).

Die Transkription der IFN- α -Gene wird durch die Bindung von IRFs an sogenannte IRF-Elemente (IRF-E) reguliert. Dabei besteht die Familie der IRFs aus neun Mitgliedern: IRF-1 bis IRF-9 (MAMANE ET AL. 1999, TANIGUCHI ET AL. 2001). Die Interaktion auf Seiten der IRFs erfolgt dabei ausgehend von deren hoch konservierten DNA-Binde-Domäne (DBD). Diese ist am N-terminalen Ende lokalisiert, setzt sich aus einem einzigen Helix-Turn-Helix Motiv zusammen und enthält fünf konservierte Tryptophan-Reste (TANIGUCHI ET AL. 2001, MAMANE ET AL. 1999). Mit drei dieser Helix-Turn-Helix Motiven der DBD binden die IRFs an DNA Sequenzen mit sich ähnelnden Wiederholungen des AANNAAA-Motivs, wobei die 5' flankierenden AA-Sequenzen für die Erkennung durch IRFs essentiell sind (ESCALANTE ET AL. 1998, HONDA ET AL. 2006, FUJII ET AL. 1999). Neben der DBD an ihrem N-Terminus besitzen alle IRFs noch eine IRF-Assoziations-Domäne (IAD) am C-Terminus. Über diese IAD, bestehend aus einem β -Faltblatt sowie flankierenden Helixes und Loops, können die verschiedenen IRFs miteinander Homo- und Heterodimere aber auch Wechselwirkungen mit anderen Transkriptionsfaktoren ausbilden (MAMANE ET AL. 1999, TANIGUCHI ET AL. 2001). Strukturanalysen der IAD konnten zudem einen autoinhibitorischen Mechanismus für IRF-3 und IRF-7 offenlegen. Hierdurch wird die Dimerisierung als auch DNA-Bindefähigkeit der beiden IRFs so lange unterbunden, bis eine Phosphorylierung dieser Faktoren eine Inaktivierung der Autoinhibition auslöst (QIN ET AL. 2003). So können sie dann an die IRF-E der IFN- α -Promotoren binden und deren Transkription auslösen. Dabei können IRFs zusätzlich mit anderen Transkriptionsfaktoren

interagieren. IRF-4 und IRF-8 wechselwirken beispielsweise mit PU.1, einem Mitglied der Ets Familie, und IRF-9 mit STAT1 und STAT2 (ESCALANTE ET AL. 2002, KUWATA ET AL. 2002, GHISLAIN ET AL. 2001). Zumindest für IRF-3 und IRF-7 gilt zudem eine Wechselwirkung mit CBP/p300 als gesichert, wobei für IRF-7 auch eine Interaktion mit c-Jun nachgewiesen werden konnte (KIM ET AL. 1998, YANG ET AL. 2003). Zur Verdeutlichung dient hier ebenfalls die bereits erwähnte Abbildung 1.3.

1998 konnten Erlandsson et al. die bereits erwähnte Abhängigkeit der Induktion von IFN- α von IFN- β zeigen. In ihren Experimenten mit murinen Fibroblasten war eine IFN- β induzierte Aktivierung der IFN-Rezeptoren für die Induktion von IFN- α essentiell (ERLANDSSON ET AL. 1998). Somit zeigte sich, dass der Induktion der IFN- α -Gene eine Expression von IFN- β voraus geht. Allerdings differenzierten Erlandsson et al. in ihren Experimenten noch nicht zwischen IFN- α 1 und non-IFN- α 1. IFN- α wird jedoch nicht nur in Fibroblasten gebildet. Auch in Leukozyten kommt es im Verlauf einer viralen Infektion zur Induktion von IFN- α . Da Leukozyten IRF-7 konstitutiv exprimieren, ist in diesen Zellen eine vorherige Expression von IFN- β jedoch nicht nötig (ERLANDSSON ET AL. 1998, AU WC ET AL. 1998).

1.4 Monozyten und Makrophagen

Im Verlauf der am Anfang der Einleitung beschriebenen Hämatopoese entstehen eine Vielzahl verschiedener Blutzelltypen, unter anderem die Leukozyten, denen die Monozyten angehören und welche für die hier vorliegende Arbeit essentiell sind. Im Folgenden sollen deshalb Rolle und Funktion von Monozyten genauer beschrieben werden.

Monozyten und die sich aus ihnen entwickelnden Makrophagen spielen als die sogenannten „weißen“ Blutzellen eine wichtige Rolle im Verlauf von Immunantworten des angeborenen wie auch des adaptiven Immunsystems. Dabei sind sie im Kampf gegen Infektionen und Tumoren involviert und wirken außerdem immunmodulatorisch. Diese Funktionen üben sie sowohl über die Präsentation von Antigenen, der Phagozytose von Pathogenen als auch der Sezernierung von Entzündungs- und Wachstumszytokinen aus. Zudem bauen sie kaputte und gealterte Erythrozyten ab und beseitigen in der Milz eingelagerte Erythrozyten sowie im Verlauf von Infektionen und Gewebeschädigungen entstandene Zelltrümmer (DALE ET AL. 2008). Nach ihrer Entstehung im Knochenmark zirkulieren Monozyten durch das Blutkreislaufsystem, wo sie, ohne zusätzliche Überlebenssignale, nach 12-72 Stunden durch Apoptose zugrunde gehen (MARGAN ET AL. 1991, FAHY ET AL. 1999). So vollziehen bereits nach 24

Stunden 25-65% aller kultivierten Monozyten, in Abwesenheit von exogenen Stimuli, den programmierten Zelltod. Als solche Überlebenssignale dienen Cytokine wie IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , GM-CSF, IFN- γ , IL-3 oder M-CSF (MANGAN UND WAHL 1991). Dabei stimulieren IL-1 und TNF- α ihrerseits die Produktion von IL-1 und TNF- α in Monozyten, wodurch eine autokrine wie auch parakrine Regulation der Apoptose in diesen Zellen deutlich wird. Die soeben genannten Cytokine werden im Verlauf von Entzündungsreaktionen von Gewebsmakrophagen ausgeschieden und führen dazu, dass Monozyten dem Gradienten der Cytokine folgen, via Extravasation aus dem Blut ins Gewebe einwandern und sich dort zu Makrophagen differenzieren. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung von Grabher et al. 2006, welche in Japankärpflingen zeigen konnten, dass ein kleiner Teil der Population von Makrophagen im Blutkreislaufsystem verbleibt. Im Gegensatz zu Gewebsmakrophagen, welche in das Blutkreislaufsystem nicht wieder zurück wechseln können, verfügen diese Makrophagen jedoch weiterhin über die Fähigkeit, in das umliegende Gewebe einzuwandern (GRABHER ET AL. 2006).

1.4.1 Aktivierung von Makrophagen

Die Aktivierung von Makrophagen erfolgt über eine Stimulation durch Pathogene, mikrobielle Bestandteile oder endogenen Faktoren wie Cytokinen. Nach ihrer Aktivierung sezernieren Makrophagen eine Vielzahl verschiedener Cytokine, zu denen unter anderem IL-1, IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , MCP-1, MCP-3, MIF, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, MIP-1, LIF, OSM, TGF- β , IFN- α , IFN- β und IFN- γ gehören. Die so von Makrophagen freigesetzten Cytokine regulieren die Funktion der Makrophagen und somit auch die Expression von Oberflächenmarkern (NAITO 2008). Dabei können IL-3, GM-CSF und IFN- γ die Produktion von Cytokinen durch Makrophagen zusätzlich stimulieren, während IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- β eine inhibitorische Wirkung ausüben (CAVAILLON 1994). Über die Sezernierung von Cytokinen regulieren Makrophagen jedoch nicht nur ihre eigene Aktivierung und Funktion sondern sind auch an der feinen Regulation der Hämatopoese beteiligt. So sind aktivierte Monozyten und Makrophagen über die Sezernierung von beispielsweise FIM (*factor increasing monozytopoiesis*) in der Regulation der Hämatopoese involviert (SLUITER 1987). Desweiteren üben sie über die Bildung von IFN- α sowohl einen Einfluss auf die Hämatopoese als auch auf die Regulation der mononukleären Differenzierung aus (MOORE ET AL. 1985, THIELE ET AL. 1998, MAZUR ET AL. 1986, KRUSE ET AL. 1989, HATTORI ET AL. 1983).

Der Phagozytose von Pathogenen voraus geht die Bindung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern an einen, der auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen exprimierten, Pathogen-Erkennungsrezeptor. Zu diesen Rezeptoren gehört beispielsweise TLR4, welcher über die Komplementkomponente CD14 an LPS von gram negativen Bakterien bindet (CALVANO 2003). Nach Aufnahme des phagozytierten Pathogens in Form eines Phagosoms kommt es im Inneren des Makrophagen zur Verschmelzung mit einem Lysosom und der damit einhergehenden Bildung eines sogenannten Phagolysosoms. Im Folgenden bewirken die von lysosomalen Enzymen (z.B. NADPH-Oxidasen) freigesetzten toxischen Produkte wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidanion (O_2^-) oder Stickstoffoxid (NO) eine Zerstörung des Pathogens (JANEWAY ET AL. 2002).

1.4.2 Die mononukleäre Differenzierung

Im Folgenden soll die mononukleäre Differenzierung am Beispiel von U937-Zellen genauer beschrieben werden. Diese humane myeloide Leukämie-Zelllinie wurde 1976 von Sundström und Nilsson etabliert und stellt ein gut untersuchtes *in vitro* Tumormodell der mononukleären Differenzierung dar (SUNDSTRÖM UND NILSSON 1976). Dabei wird durch die Gabe von beispielsweise Phorbolestern, Vitamin D, Retinsäure oder Cytokinen eine Differenzierung entlang des Monozyten/Makrophagen Weges ausgelöst, in deren Verlauf die U937-Zellen von einem promonozytischen- zu einem unreifen Entwicklungsstatus eines Makrophagen heran reifen (OLSSON UND BREITMAN N 1982, WIEDERHOLD ET AL. 1988, LOTEM UND SACHS 1979, DODD ET AL. 1983, TESTA ET AL. 1988, HATTORI ET AL. 1983, HASS ET AL. 1989). Im Verlauf dieses Differenzierungsprozesses erfahren die normalerweise stark proliferierenden und in Suspension wachsenden U937-Zellen einen kompletten Proliferationsstop, werden adhärent und weisen eine Vielzahl von morphologischen und funktionalen Veränderungen auf (HATTORI ET AL. 1983, HASS ET AL. 1989).

Hass et al. konnten bereits 1989 den Einfluss von dem Phorbol ester PMA (*12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat*) auf die Differenzierung von U937-Zellen belegen. Sie zeigten, dass PMA-induzierte U937-Zellen, welche normalerweise eine glatte und feine Oberfläche besitzen, neben Proliferationsinhibition und Adhärenz, ausladende Pseudopodien ausbilden (HASS ET AL. 1989).

Die Induktion von U937-Zellen mit PMA ($\geq 5nM$) resultiert bereits 48 Stunden später in einer kompletten Inhibition der Proliferation. Es kommt zur Expression des

Differenzierungsmarkern c-fms (M-CSF Rezeptor) sowie der erhöhten Expression der Monozyten-spezifischen Antigene (Leu-M2, -M3, HLADr) und der Oberflächenrezeptoren (FcR, C3bR, CD11 und CD18). Desweiteren werden spezifische Enzyme (z.B.: die Transglutaminase) verstärkt exprimiert (HASS ET AL. 1989, HASS ET AL. 1997, MINTA UND PAMBRUN 1985). Weitere wichtige differenzierungsspezifische Eigenschaften stellen die Fähigkeit zur Phagozytose, Chemotaxis, der Produktion von Superoxid-Anionen und die antikörpervermittelte Cytotoxizität von mononukleären Zellen dar. Eigenschaften, deren Ausprägung sich im Verlauf einer PMA-Stimulation von U937-Zellen ebenfalls stark erhöht (MINTA UND PAMBRUN 1985). Allerdings sind diese PMA-induzierten Effekte nicht von Dauer. So beschreiten die differenzierten U937-Zellen 2-3 Wochen nach der Induktion mit PMA eine sogenannte Retro-Differenzierung, in deren Verlauf sie sich zu dem ursprünglich undifferenzierten Phänotyp zurück entwickeln (HASS ET AL. 1992, HOSOYA UND MARUNOUCHI 1992).

Auf welchem Weg PMA die mononukleäre Differenzierung von U937-Zellen auslöst, ist bis heute nicht genau verstanden. Klar ist aber, dass die Induktion mit PMA in den U937-Zellen eine Vielzahl von Reaktionen auslöst. So kommt es beispielsweise neben der Hochregulation von IRF-1 und AMAP1, ein GTPase-aktivierendes Protein für Arf GTPasen, zur Herunterregulation von NHP2 (*human homologue of yeast NHP2*) (MANZELLA ET AL. 1999, KANG ET AL. 2002, MIYATA ET AL. 2008). Da die PMA-induzierte Differenzierung von U937-Zellen durch das Caspase-inhibierende Protein p35 verhindert werden kann, scheinen zudem Caspasen an der Differenzierung beteiligt zu sein (CATHELIN ET AL. 2006). Ferner konnten Masumi und Ozato 2001 eine PMA-induzierte Expression von p300 und dem p300/CBP-assoziierten Faktor (PCAF) aufzeigen (MASUMI UND OZATO 2001). Im Jahr 2000 wiesen Cang et al. in PMA-induzierten U937-Zellen dann die Expression von BLIMP-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*) nach und konnten zeigen, dass die alleinige Überexpression von BLIMP-1 zur Differenzierung sowie die Blockierung von endogenem BLIMP-1 zur Inhibition der Differenzierung von U937-Zellen führt (CHANG ET AL. 2000). Dagegen erhielten Lu und Pitha 2001 die selben Ergebnisse für IRF-7, was im folgenden Abschnitt genauer dargelegt werden soll (LU UND PITHA 2001).

1.4.3 Die Rolle von IRF-7 in der mononukleären Differenzierung

Die Tatsache, dass der Transkriptionsfaktor IRF-7 in Zellen lymphatischen Ursprungs

konstitutiv exprimiert wird, lässt bereits die Vermutung zu, dass er in diesen Zellen von besonderer Bedeutung ist (AU ET AL. 1998). So ist es nicht verwunderlich, dass Lu und Pitha 2001 die essentielle Rolle von IRF-7 in der Monozyten-zu-Makrophagen Differenzierung nachweisen konnten. Anhand von U937-Zellen konnten sie zeigen, dass die Expression und nukleäre Translokation von IRF-7 im Verlauf der PMA-induzierten Monozyten-zu-Makrophagen Differenzierung stimuliert wird. Desweiteren war es ihnen möglich, durch eine Überexpression von aktivem IRF-7, eine Differenzierung der U937-Zellen in Richtung Makrophagen zu induzieren. Den Nachweis der Differenzierung erbrachten Lu und Pitha dabei mit Hilfe der Detektion der differenzierungsspezifischen Oberflächenrezeptoren CD11b und CD11c, welche in den IRF-7 überexprimierenden U937-Zellen zu ca. 50% stärker exprimiert wurden. Anhand der Transfektion von U937-Zellen mit einer IRF-7 Mutante, welche über keine DNA-Bindedomäne verfügte sowie der anschließenden Detektion der Expression von CD11b und CD11c, wobei sich hier kein Unterschied zu nicht-transfizierten Zellen zeigte, konnten sie ferner die Bedeutung der DNA-Bindedomäne von IRF-7 für die IRF-7-induzierte mononukleäre Differenzierung aufzeigen. Da sich im Verlauf der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen eine Abnahme der Proliferation ereignet, ist es nicht verwunderlich, dass Lu und Pitha eine solche sowohl in PMA als auch in IRF-7 (aktivem) überexprimierenden U937-Zellen detektieren konnten. Dabei wird die Bedeutung von IRF-7 durch Transfektionsexperimente mit einer dominant-negativen Mutante von IRF-7 unterstrichen. Dieses dominant-negative IRF-7 verfügt zwar über die N-terminale DNA-Binde-Domäne, seine C-terminale Protein-Assoziations-Domäne jedoch fehlt. So wird die nach PMA-Induktion zu beobachtende einsetzende Adhärenz, Zunahme der CD11b- und CD11c- Expression, steigende Phagozytoserate sowie auch die Inhibition der Proliferation, nach der Transfektion mit der dominant-negativen IRF-7 Mutante reduziert (LU UND PITHA 2001).

Somit scheint zumindest die essentielle Bedeutung von IRF-7 an der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen deutlich. Die sich hieraus ableitende Frage lautet: Wie induziert IRF-7 die mononukleäre Differenzierung? Eine Antwort auf diese Frage könnte die genauere Betrachtung der durch IRF-7 induzierten Gene liefern. Diese werden im nächsten Abschnitt dargestellt.

1.4.3.1 Die Rolle von IFN- α in der mononukleären Differenzierung

Neben einer Vielzahl von Genen, welche durch IRF-7 hochreguliert werden, befinden sich die schon erwähnten non-IFN- α 1-Subtypen. Aufgrund der oft fehlenden Differenzierung

zwischen IFN- α 1- und non-IFN- α 1-Subtypen in der Literatur, wird in den folgenden Abschnitten häufig pauschal nur über IFN- α geschrieben. Bereits 1983 konnte von Hattori et al. gezeigt werden, dass IFN- β als auch IFN- α eine Differenzierung von U937-Zellen auslösen können. Nachgewiesen wurde diese Differenzierung anhand eines Vergleiches der PMA-induzierten mononukleären Differenzierung mit der nach einer IFN- α Induktion. Dabei wurden zur Bestimmung der einsetzenden Differenzierung differenzierungsspezifische Merkmale, wie die gesteigerte Expression von Monozyten-assoziiertem Antigen (B43.4.1) und erhöhte cytotoxische Aktivität, untersucht. So führt eine siebentägige Induktion von U937-Zellen mit PMA in 71% und mit IFN- α in 44% der Zellen zu einer Expression von B43.4.1, während in uninduzierten Zellen lediglich 10% der Zellen dieses Antigen exprimieren. Und auch die cytotoxische Aktivität ist sieben Tage nach PMA- als auch nach IFN- α - Induktion, im Gegensatz zu unbehandelten Zellen, erhöht. Desweiteren konnten Hattori et al. eine IFN- α induzierte Wachstumsinhibition detektieren, wobei sich diese, wie auch die PMA-induzierte Zunahme der cytotoxischen Aktivität, durch gleichzeitige Gabe von einem IFN- α -Antiserum verhindern ließ. Daran, dass sie ferner zeigen konnten, dass dieser negative Effekt des IFN- α -Antiserums auf die IFN- α -induzierten Veränderungen mit sinkender Konzentration des Antiserums nachließ, lässt sich die wichtige Rolle von IFN- α in der Differenzierung von U937-Zellen erkennen (HATTORI ET AL. 1983). Unterstrichen wird die hier hervorgehobene Rolle von IFN- α an der mononukleären Differenzierung durch die Ergebnisse von Buessow und Gillespie, welche ebenfalls eine IFN- α induzierte myeloide Reifung in U937-Zellen nachweisen konnten (HATTORI ET AL. 1983, BUSSOW UND GILLESPIE 1984).

1.4.4 Die Rolle der Protein Kinase C in der mononukleären Differenzierung

Schließlich scheint auch der Protein Kinase C (PKC) eine wichtige Funktion im Verlauf der mononukleären Differenzierung zuzukommen. So tritt nach PMA-Stimulation eine Translokation von 80-95% der PKC Aktivität vom Cytosol zur membranhaltigen Fraktion auf (HASS ET AL. 1997). Dabei scheint die PKC eine wichtige Rolle in der Steuerung von PMA-induzierten Signalwegen zu spielen und darin zu bestehen, dass sie zwischen Zelltod oder Differenzierung entscheidet (DE VENTE ET AL. 1995). Schließlich zeigten Matsumoto et al. 2006, dass die Zellzyklus-regulierenden Proteine p21^{Waf1} und Cyclin D1 in HL-60 Zellen (Promyeloblasten) durch PMA vermehrt exprimiert werden und dass diese vermehrte Expression PKC-abhängig verläuft. Dabei scheint der inhibierende Effekt von p21^{Waf1} auf

Cyclin D1 für die PMA- vermittelte Arretierung des Zellzyklus sowie für die Differenzierung verantwortlich zu sein (MATSUMOTO ET AL. 2006). Somit sprechen viele Einzelbefunde für eine wichtige Rolle der PKC im Verlauf der PMA-induzierten mononukleären Differenzierung von U937-Zellen.

Die PKC, welche der Familie der Serin-Threonin Kinasen angehört und sich in calciumabhängige (PKCs α , β 1, β 2, γ) und calciumunabhängige (PKCs ϵ , δ , η , θ) PKCs unterteilen lässt, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von manigfaltigen zellulären Prozessen, wie Proliferation und Differenzierung. So blockieren PKC Inhibitoren beispielsweise die Aktivierung von T-Lymphozyten, während Aktivatoren der PKCs sowohl zu einer Sekretion von IL-2 als auch der Expression von IL-2 Rezeptoren sowie der Phosphorylierung von CD3, CD4 und CD8 führen (ISAKOV UND ALTMAN 1987, CHATILA UND GEHA 1988). Die Mitglieder der PKC-Familie besitzen alle eine N-terminal gelegene Regulatorische-Domäne sowie eine C-terminale Phosphorylierungsstelle. Dabei erfüllt die Regulatorische-Domäne zwei Funktionen. Zum einen binden die PKCs mit dieser an die Plasmamembran oder andere zelluläre Ziele, zum anderen inhibiert sie die aktive Seite des Enzyms. Substratbindung sowie Phosphorylierung hingegen finden am C-terminalen Bereich der PKC statt (BARNETT ET AL. 2007). Die Aktivität der PKC wird durch die Bindung von Cofaktoren, Phosphorylierung und subzellulärer Lokalisation reguliert (COULD UND NEWTON 2008). Solche Cofaktoren, welche an die PKC als zellulären Rezeptor binden, sind beispielsweise: DAG (*diacylglycerol*), *cis* ungesättigte Fettsäuren, Lysophosphatidylcholine oder PS (Phosphatidylserine). Auch dem bereits erwähnten PMA kommt die Rolle eines PKC-Aktivators zu (KEENAN ET AL 1997, CHATILA UND GEHA RS 1988). Allerdings sei an dieser Stelle erwähnt, dass neben dem durch Phorbolster (zu denen auch PMA gehört) induzierten PKC abhängigen Signalweg noch ein PKC-unabhängiger Signalweg zu existieren scheint. Zu diesen alternativen Rezeptoren für Phorbolster gehören Unc-13-verwandte Proteine und Ras-GRP, welche über keine Kinaseaktivität verfügen (RON UND KAZANIETZ 1999). Jedoch spricht vieles dafür, dass PKC-vermittelte und nicht PKC-unabhängige Signalwege an der oben genannten Differenzierung von U937-Zellen beteiligt sind. So gelang Wang et al. der Nachweis, dass die katalytische Domäne der PKC- δ in der PMA induzierten mononukleären Differenzierung von 32D Zellen zu Makrophagen eine Rolle spielt (WANG ET AL. 1997). Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist jedoch die Rolle, welche der PKC θ in der PMA-induzierten Differenzierung von U937-Zellen zuzukommen scheint. Dabei könnte PMA über die Aktivierung eben dieser PKC zur Expression von IFN- α führen und somit die mononukleäre Differenzierung induzieren. Zumindest lassen Ergebnisse von Lucas et al.

diesen Ablauf vermuten. Ihnen gelang 2004 der Nachweis, dass dem scaffolding Protein Bimp3/CARMA1/CARD11 (in der Folge nur als Bimp3 bezeichnet), eine Schlüsselrolle in der Signalweiterleitung ausgehend von der PKC θ zukommt. Demnach führt die aktivierte PKC θ über Bimp3 zur Aktivierung von Bcl10 und MALT1 und somit zur Stimulation von NF- κ B (LUCAS ET AL. 2004, ISAKOV UND ALTMAN 2002). Gestützt wird diese Aussage durch Untersuchungen zum Expressionslevel der PKC θ , welche diese PKC Isoform als eine der Haupttypen in hämatopoetischen Zellen und T-Zellen identifizierten (KEENAN ET AL. 1997, BAIER ET AL. 1994). Zusammen mit den Beobachtungen von Lu et al., welche zum einen neben der TATA-Box des IRF-7-Gens eine NF- κ B-Bindestelle sowie die Notwendigkeit von NF- κ B in der PMA-induzierten Induktion der Expression von IRF-7 nachweisen konnten, sowie den Beobachtungen von Baier et al., welche die Expression von PKC θ in U937-Zellen und dessen Cytosol-zu-Membran-Translokation in PMA-induzierten Jurkat-Zellen nachwiesen, erscheint folgendes Szenario denkbar: PMA führt über die anfängliche Aktivierung der PKC θ zur Stimulation von NF- κ B, welches seinerseits zur Induktion der Expression von IRF-7 führt. Dies könnte in der Folge, z.B. über die Expression von non-IFN- α 1, die mononukleäre Differenzierung auslösen (LUCAS ET AL. 2004, LU ET AL. 2002, LU UND PITHA 2001, HATTORI ET AL. 1983, BARNES ET AL. 2004, AU ET AL 1998, BUSSOW UND GILLESPIE 1984). Da nur aktiviertes IRF-7 die Transkription von non-IFN- α 1-Genen auslöst, bedarf es zur Bestätigung dieser These jedoch noch der Beantwortung der Frage, wie IRF-7 nach seiner Expression aktiviert wird. Wie bereits gezeigt, kann die Aktivierung von IRF-7 sowohl über die aktivierten Kinasen IKK ϵ und TBK-1 als auch über TLR7/8 und TLR9 durch Phosphorylierung erfolgen. Von all diesen, in der Aktivierung von IRF-7 resultierenden, Signalwegen erscheint in diesem speziellen Fall der über IKK ϵ führende am wahrscheinlichsten, weshalb er im Folgenden genauer betrachtet werden soll.

1.4.4.1 Die Induzierbarkeit von IKK ϵ durch PMA

IKK ϵ wird überwiegend in Zellen und Geweben des Immunsystems exprimiert (SHIMADA ET AL. 1999). Dabei zeigt selbst aus unstimulierten Zellen isolierte und in ebenfalls unstimulierten Zellen überexprimierte IKK ϵ eine konzentrationsabhängige, signifikante Kinaseaktivität, was eine konstitutive Aktivität dieser Kinase vermuten lässt (NOMURA ET AL. 2000). Desweiteren gehört IKK ϵ einem PMA-induzierbaren I κ B Kinase Komplex an und ist ferner durch NF- κ B induzierbar (PETERS ET AL 2000, WANG ET AL. 2005). Dabei wird die NF- κ B induzierte Expression von IKK ϵ durch Cytokine wie TNF- α oder IL-1 β ausgelöst (WANG ET AL. 2005). Aufgrund ihres Expressionsmusters, konstitutiven Aktivität, Induzierbarkeit durch PMA und

NF- κ B-abhängigen Expression, erfüllt die IKK ϵ somit alle an sie gestellten Anforderungen. Ihre NF- κ B vermittelte, erhöhte Expression nach PMA-Induktion könnte die Aktivierung von ebenfalls neu exprimierten IRF-7 nach sich ziehen und so die IRF-7-vermittelte Transkription von non-IFN- α 1-Genen ermöglichen. Unter Annahme der Richtigkeit dieses Signalweges, wäre der Bogen zwischen PMA-Induktion und non-IFN- α 1-induzierter mononukleärer Differenzierung von U937-Zellen geschlossen. Eine vereinfachte Darstellung dieses Signalweges findet sich in der Abbildung 1.5.

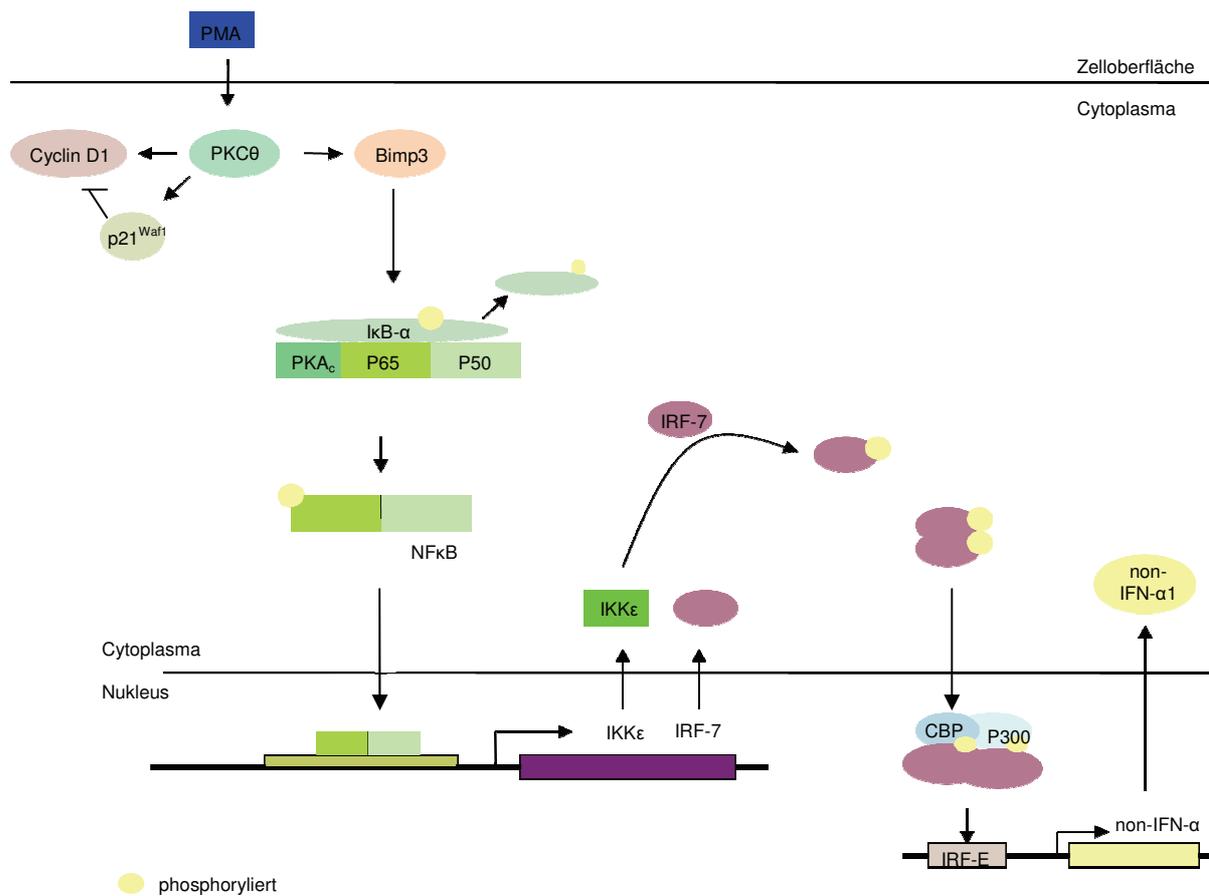


Abbildung 1.5 PMA-induzierte Differenzierung von U937-Zellen Vereinfachte Darstellung der PMA-induzierten Signalwege, welche in U937-Zellen die mononukleäre Differenzierung auslösen „könnten“. Diese induziert PMA zum einen über die Hemmung von Cyclin D1 und zum anderen über die Expression von IFN- α . Spitzer Pfeilkopf: Richtung der weiteren Aktivierung des Signalweges. Gerader Pfeilkopf: Hemmung der weiteren Signalwege. Eine kurze Beschreibung der involvierten Faktoren findet sich im Text und/oder unter „Abkürzungen und Akronyme“.

1.5 Das Hepatitis A-Virus

Das Hepatitis A-Virus, welches zur Familie der *Picornaviridae*, Genus *Hepatovirus*, gehört (COULEPIS ET AL. 1982), konnte 1973 per Elektronenmikroskopie im Stuhl von Patienten nachgewiesen werden (FEINSTONE ET AL. 1973). Es handelt sich um ein nicht umhülltes, ikosaedrisches Capsid (27nm Durchmesser) mit einzelsträngigem RNA-Genom (7,5 kb) in Positivorientierung (TOTSUKA UND MORITSUGU 1999, TICEHURST ET AL. 1983). Dieses RNA-Genom codiert in einem einzigen *Open reading frame* (ORF) für ein Polyprotein (251kDa), unterteilbar in die Bereiche P1, P2 und P3. Während der P1 Bereich die Information zur Bildung der Struktur- und Capsidproteine (VP1, VP2, VP3 und VP4) codiert, befindet sich auf den Bereichen P2 und P3 die Information zur Bildung der Nichtstrukturproteine (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C und 3D) (TOTSUKA UND MORITSUGU 1999). Die Translation der viralen RNA erfolgt CAP-unabhängig unter der Kontrolle einer IRES-Struktur, welche sich im Bereich der 5'-nicht-translatierten Region (NTR) befindet (GLASS ET AL. 1993). Da das 3'-Ende der viralen RNA neben einer weiteren NTR auch einen poly-A-Anhang enthält, erfüllt die virale RNA somit zumindest einige Charakteristika einer eukaryotischen mRNA (TOTSUKA UND MORITSUGU 1999). Durch die proteolytische Aktivität der viralen Protease (3C) wird das entstehende Polyprotein cotranslational in seine einzelnen Proteine gespalten (Abbildung 1.6) (SCHULTHEISS ET AL. 1994).

Das Hepatitis A-Virus kann in konventionellen Säugetier-Zelllinien, wie fetalen Rhesusaffen-Nierenzellen (FRhK-4), kultiviert werden, wo es keine sichtbaren Zellkulturveränderungen induziert, sich nach mehreren Passagen an die Zellkultur adaptiert und in der Folge relativ hohe virale Titer erreicht (LEMON 1997). Daneben existieren jedoch auch hochgradig an Zellkultur adaptierte Virusvarianten, welche in Zellkulturen einen Cytopathischen-Effekt (CPE) induzieren. Hierzu gehört beispielsweise die HAV-Variante HAVcyt/HB1.1 des HAV Stammes HM175, welche in FRhK-4-Zellen zu einem deutlich sichtbaren CPE führt (BRACK ET AL. 1997).

Die normalerweise im Zuge einer viralen Infektion, nach der Detektion von dsRNA, auftretende Sezernierung von Interferon- β tritt im Verlauf einer Hepatitis A-Virus Infektion *in vitro* nicht auf. Somit bauen mit HAV infizierte Zellverbände keinen Interferon-vermittelten antiviralen Status auf. In Kombination mit ihrer sehr langsamen Replikation scheint es nicht-cytopathogenen HAV-Varianten auf diese Weise möglich, in Zellkultur persistente Infektionen zu etablieren (BRACK ET AL. 2002).

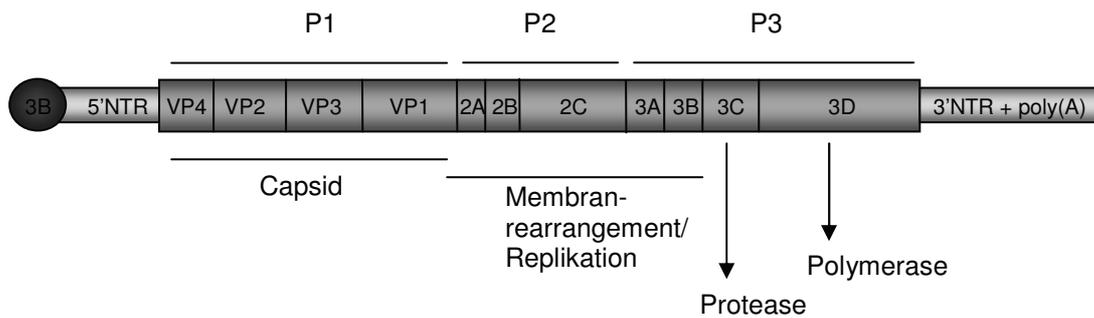


Abbildung 1.6: Aufbau des HAV-Genom und Funktionen einzelner HAV Proteine Schematische Darstellung des HAV-Genoms. Dieses wird von einzelsträngiger RNA (7,5 kb) in Positivorientierung gebildet und codiert in einem *Open reading frame* (ORF) für ein Polyprotein (251kDa). Eine IRES-Struktur zur Cap-unabhängigen Translation ist in der 5' nicht-translatierten Region (NTR) lokalisiert. Desweiteren sind die Funktionen einzelner, der vom Genom codierten, Proteine dargestellt. VP1-VP4: Struktur- und Capsidproteine, 2A-2C + 3A-3D: Nichtstrukturproteine.

1.5.1 Pathogenese

Infektionen mit dem Hepatitis A-Virus erfolgen fäkal-oral. In der Folge werden bereits im Verlauf der 3-4 wöchigen Inkubationszeit große Mengen von Viren ausgeschieden, wobei sich der Höhepunkt der abgegebenen Viruslast kurz vor Ausbruch der ersten Erkrankungsanzeichen detektieren lässt (ASHER ET AL. 1995, NORMANN ET AL. 2004). Dabei entstammen, wie Schulman et al. 1976 in einem Chimpansen-Model zeigen konnten, die neu gebildeten HA-Viren der Leber, von wo aus sie über die Gallengänge in den Darm gelangen und ausgeschieden werden (SCHULMAN ET AL. 1976).

Nach Aufnahme des Virus gelangt selbiges von dem Magen-Darm-Trakt aus in sein Hauptzielorgan, die Leber, wo es die Hepatozyten infiziert. Die mit HAV infizierten Hepatozyten sind vakuolisiert und degenerieren. Dabei sind wahrscheinlich immunologische Reaktionen durch HAV-spezifische CD8⁺ T-Lymphozyten und nicht das Hepatitis A-Virus selbst für die Zerstörung der Zellen verantwortlich (VALLBRACHT ET AL. 1989). Wie genau das HA-Virus vom Magen-Darm Trakt aus in die Leber gelangt, ist noch nicht vollständig verstanden. Allerdings scheint es wahrscheinlich, dass hier HAV-spezifische IgA-Antikörper involviert sind. Wie Dotzauer et al. zeigen konnten, können HAV-IgA-Komplexe in einem ersten Schritt mittels des pIgR (*polymeric immunoglobulin receptor*) von Epithelzellen transcytiert werden und so vom Darmlumen in die Blutbahn übertreten. In einem zweiten Schritt könnten diese HAV-IgA Komplexe über die Blutbahn zur Leber gelangen und über eine IgA-vermittelte Endocytose nach Bindung an den IgA spezifischen ASGPR (*hepatocellular*

asialoglycoprotein receptor) humane Hepatozyten infizieren. Ein Infektionsweg, welcher nicht nur eine Erklärungsmöglichkeit für die Primärinfektion sondern auch für relapsierende HAV-Verläufe liefert (DOTZAUER ET AL. 2005, DOTZAUER ET AL. 2000).

1.5.2 Klinik

Die klinische Manifestation der Hepatitis A-Virus Infektion äussert sich durch plötzlich auftretendes Unwohlsein, Müdigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Beschwerden im rechten oberen Quadranten des Rumpfes und in vielen Fällen Fieber. Später zeigen dunkler Urin, grau gefärbter Stuhl und das Auftreten von Gelbsucht eine Leberentzündung an. Diese wird durch hohe Mengen Bilirubin im Serum ausgelöst und von gesteigerten Leveln und Aktivitäten der Enzyme Alaninen-Aminotransferase (ALT) und alkalischen Phosphatase begleitet. Die akute Phase der Infektion hält für ein bis mehrere Wochen an. In der Regel haben sich die Serumwerte nach 6 Monaten, spätestens nach einem Jahr, wieder normalisiert (LEMON 1997). Die sich im Verlauf der Erkrankung gegen HAV aufgebaute Immunität hält ein Leben lang.

Neben der soeben beschriebenen akuten Leberentzündung, welche nicht chronisch wird und ausheilt, können jedoch auch relapsierende sowie fulminante Hepatitis A-Virus-induzierte Krankheitsverläufe auftreten. Dabei sind die relapsierenden Verläufe mit einer Inzidenz von 3-20% der an Hepatitis A erkrankten Kinder relativ häufig. Charakterisiert sind die relapsierenden HAV Fälle durch ein erneutes Auftreten von Krankheitszeichen und Symptomen 2-3 Monate nach dem ersten Auftreten der HAV-Infektion (CIOCCA 2000). Sehr viel seltener kommt es zum Erscheinungsbild einer, in 90% aller Fälle, tödlich verlaufenden, fulminanten Hepatitis A-Virus Infektion (CAMITTA ET AL. 1974). Diese ist gekennzeichnet durch eine sich innerhalb von acht Wochen nach Auftreten der Gelbsucht ausbildenden schweren Leberschädigung sowie der Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie (CIOCCA 2000). Eine HAV-Komplikation, welche für 3% aller Fälle von akutem Leberversagen verantwortlich ist (LEE ET AL. 2007).

Zusätzlich zu den bis hier beschriebenen Verlaufsformen kann es zudem zu extrahepatischen Manifestationen einer Hepatitis A-Virus Infektion kommen, welche mit deutlichen Blutbildveränderungen einhergehen und in ihrer Symptomatik von einem transienten Abfall der Anzahl von Granulozyten bis zur Ausbildung der sogenannten Aplastischen Anämie reichen (FIRKIN ET AL. 1978, KIVEL 1961). Eine Erklärungsmöglichkeit für diese Symptomatik könnten die Untersuchungen von Vallbracht et al. bieten, welche 1993 einen direkten

inhibitorischen Effekt des Hepatitis A-Virus auf Knochenmarksvorläuferzellen sowie auf die Bildung selbiger aus HAV-infizierten Langzeit-Knochenmarkskulturen zeigen konnten (VALLBRACHT ET AL. 1993, BUSCH ET AL. 1987).

1.5.3 Aplastische Anämie

Die Symptomatik der Aplastischen Anämie (AA) beschreibt eine schwer verlaufende Störung der Knochenmarksfunktion und stellt im Zusammenhang mit einer Hepatitis-Infektion eine bekannte Komplikation dar. So wurden beispielsweise in Frankreich 1990 5% aller AA in Zusammenhang mit Hepatitiden gebracht. Dabei wurde der kausale Zusammenhang zwischen einer Hepatitis A-Virus Infektion und dem Auftreten einer AA bereits im Jahr 1978 von Smith et al. gezeigt (SMITH ET AL. 1978).

Als Aplastische Anämie bezeichnet man eine Panzytopenie, welche durch eine Hypoplasie des Knochenmarks hervorgerufen wird (SPECK 1986). Dabei beschreibt das Bild einer Panzytopenie die Abnahme der Anzahl von Erythrozyten, Granulozyten/Monozyten und Thrombozyten im Blut. So spricht man von einer schweren AA, wenn die Zahl der Granulozyten unter $0,5 \times 10^9/l$, die der Thrombozyten unter $20 \times 10^9/l$ und die der Retikulozyten unter 1% fällt (SPECK ET AL. 1983). Diese Form der AA verläuft meist tödlich. Der Krankheitsverlauf konnte erst durch die Einführung von Knochenmarkstransplantationen und immunsuppressiven Therapien verbessert werden (BROWN ET AL. 1997, BHATTACHARYYA ET AL. 2005, KOJIMA ET AL. 1988). Dabei scheint eine Störung der Knochenmarksstammzellen für diese Form der Erkrankung verantwortlich zu sein

1.6 Einfluss des Hepatitis A-Virus auf das hämatopoetische System und die mononukleäre Differenzierung

Das Hepatitis A-Virus übt, wie Busch et al. 1989 zeigen konnten, einen inhibitorischen Effekt auf humane Knochenmarksvorläuferzellen, zu denen sowohl CFU-GM (*colony-forming units granulocyte-macrophage*), pluripotente CFU-GEMM (*colony-forming units granulocyte-erythroid-Monozyte-megakaryocyte*) als auch BFU-E (*burst forming units erythrocytes*) zählen, aus. So erniedrigt eine HAV-Infektion bei einer MOI=30 nach 22 Stunden die CFU-GM um Ø50%, die BFU-E um Ø41% und die CFU-GEMM um Ø50% (BUSCH ET AL. 1992, BUSCH 1989). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass eine HAV-Infektion von Langzeit-Knochenmarkskulturen zu einer Erniedrigung des Levels von CFU-GM im Überstand der

Kulturen führt. Da Busch et al. 1992 ferner der Nachweis von HAV-spezifischem Antigen in einer Subpopulation von fibroblasten-ähnlichen Stromazellen sowie der Beweis einer produktiven Virusreplikation in primären Knochenmarkskulturen gelang, scheint folgendes Szenario möglich: Eine Infektion von fibroblastoiden Stromazellen des hämatopoetischen „Microenvironments“ durch das Hepatitis A-Virus, könnte zum einen zu einer Erniedrigung der CFU-GM Level und zum anderen zu Störungen im Ablauf der Hämatopoese führen. Allerdings ist die Art des Einflusses einer HAV Infektion auf die Hämatopoese noch nicht verstanden. Der Verdacht, dass HAV-infizierte Langzeitknochenmarkskulturen ein verändertes Cytokinmuster sezernieren, ließ sich, zumindest in Bezug auf die der Hämatopoese entgegenwirkenden Cytokine IFN- γ und TNF- α , nicht bestätigen (BUSCH ET AL. 1992).

In aus Hüftoperationen gewonnenen LTBMK (*long-term bone marrow cultures*), welche nach ihrer Kultivierung ein konfluentes Knochenmarks-Stroma ausbilden und in deren „Cobblestone“-Bereichen die Hämatopoese abläuft, konnte eine HAV-induzierte Reduktion der Ausbildung der Stromaschicht sowie der „Cobblestone“-Bereiche nachgewiesen werden. Auch ließen sich fünf Wochen nach Kultivierung der LTBMK wesentlich mehr phagozytotische Zellen in dem Stroma der nicht-HAV-infizierten Kontrollansätze als in den HAV-infizierten Ansätzen detektieren. Da Wünschmann et al. 2002 im Überstand von zwei Wochen mit HAV-infizieren LTBMK 20% mehr Monozyten als in nicht infizierten Ansätzen nachwies, wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass das Hepatitis A-Virus mit der Adhärenz der Monozyten interferiert und somit zu einer Erniedrigung der Makrophagen im Stroma führt (WÜNSCHMANN ET AL. 2002).

Somit übt das Hepatitis A-Virus, einen in seiner Ursache noch nicht verstandenen, inhibitorischen Effekt auf das humane Knochenmarksstroma und die in ihm ablaufende Hämatopoese aus. Denkbar wäre, dass sich neben der Infektion von fibroblasten-ähnlichen Stromazellen auch eine Infektion von mononukleären Zellen ereignet. Da diese Zellen über die Sezernierung von beispielsweise FIM und IFN- α sowohl einen Einfluss auf die Hämatopoese, als auch auf die Regulation der mononukleären Differenzierung ausüben (HATTORI 1983, SLUITER 1987), könnte eine HAV Infektion dieser Zellen einen negativen Effekt auf die Hämatopoese sowie auf die mononukleäre Differenzierung nach sich ziehen. Auftrieb erhält diese Vermutung durch Untersuchungen von Wünschmann et al., welche 2002 eine Hepatitis A-Virus-induzierte Suppression der Monozyten-zu-Makrophagen Reifung *in vitro* nachweisen konnten. Für ihre Untersuchungen verwendeten sie aus „buffy coats“, mittels Plastik-Adhärenz, isolierte humane Monozyten. Diese differenzierten sich innerhalb von 30

Tagen zu Makrophagen, was anhand von morphologischen Veränderungen sichtbar wurde. Wurden diese Zellen jedoch bereits direkt nach der Isolierung oder zwei Wochen nach ihrer Kultivierung mit dem Hepatitis A-Virus infiziert, so fand keine Reifung zum Makrophagen statt und auch die sich normalerweise ausbildende Plastikadhärenz war, in mit HAV-infizierten Monozyten, um ein dreifaches niedriger als in nicht-HAV-infizierten Kontrollansätzen. Gleiche negative Effekte wurden für die phagozytotische Funktion der Monozyten/Makrophagen nachgewiesen. Hier zeigte sich eine um das 3,5-fach erniedrigte Phagozytoserate von mit HAV-infizierten Monozyten. Da Wünschmann et al. zusätzlich zu ihren Ergebnissen eine tatsächlich stattfindende Replikation des Hepatitis A-Virus in Monozyten/Makrophagen nachwies, konnte die Aussage getroffen werden, dass das Hepatitis A-Virus mit der Reifung von Monozyten interferiert (WÜNSCHMANN ET AL. 2002). Somit verblieben die HAV-infizierten Monozyten als Monozyten und differenzierten sich nicht zu Makrophagen aus. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Wünschmann et al. unter Verwendung der bereits mehrfach erwähnten promonozytischen U937-Zellen. Wie die zuvor genannten primären humanen mononukleären Zellen, lassen sich die U937-Zellen produktiv mit dem Hepatitis A-Virus infizieren. In diesen Zellen inhibiert eine HAV Infektion ab dem fünften Tag p.i. die PMA-induzierte morphologische Differenzierung der U937-Zellen zu Makrophagen und führt zudem zu einer Reduktion der PMA-induzierten Expression des differenzierungsspezifischen Oberflächenmarkers CD11b am siebten Tag p.i.. Desweiteren konnte für HAV-infizierte U937-Zellen, bei gleicher Vitalität, wie bei den nicht infizierten Kontrollansätzen, eine deutliche Suppression in der funktionellen Reifung nach PMA-Induktion beobachtet werden. So nahm die Fähigkeit zur Produktion von Sauerstoffradikalen durchschnittlich um 35% ab (WÜNSCHMANN 1998).

Aus den hier dargestellten Beobachtungen lässt sich zusammenfassend schließen, dass das Hepatitis A-Virus einen deutlich inhibitorischen Effekt auf die Monozyten-zu-Makrophagen Differenzierung ausübt.

1.6.1 Der Einfluss von HAV auf das unspezifische Immunsystem - Expression von IFN- β

Eine HAV-Infektion führt nicht zu der normalerweise auf eine virale Infektion folgenden Bildung und Sezernierung von IFN- β . Wie unsere Arbeitsgruppe bereits 2002 zeigen konnte, erreicht HAV diesen Effekt über eine Beeinflussung des IFN- β -Enhanceosoms (BRACK ET AL.,

2002). Mit Hilfe der Transfektion von Reporterkonstrukten der PRDs des IFN- β -Promotors konnte eine HAV-vermittelte Positivregulation der PRDII sowie eine Inhibition der normalerweise durch poly(IC) induzierten Aktivierbarkeit der PRDIII/I beobachtet werden. Eine HAV-Infektion übt somit einen positiven Effekt auf NF- κ B und einen negativen auf IRF-3 aus (BERK 2003, BRANDT 2002, KAUMANN 2003, MAGULSKI 2001, SCHLEMMINGER 2003). In weiteren Versuchen konnte die Ursache der HAV-vermittelten Blockade der PRDIII/I aufgeklärt werden. Diese liegt in der HAV-vermittelten Inhibition von sowohl Phosphorylierung, nukleärer Translokation als auch transkriptionaler Aktivität des, für die Induktion der IFN- β -Expression essentiellen, Transkriptionsfaktors IRF-3. HAV übt diesen inhibierenden Einfluss auf die Aktivierung von IRF-3 auf mehreren Ebenen aus. So inhibiert es sowohl den über RIG-I und MDA5 als auch den über TLR-3 laufenden, in der Aktivierung von IRF-3 mündenden Signalweg (FENSTERL ET AL. 2005). Dabei scheint der Angriffspunkt im TLR-3 Signalweg auf Höhe von TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β*) und im RIG-I bzw. MDA5 vermittelten Signalweg auf Höhe des Adaptorproteins MAVS zu liegen (FENSTERL ET AL. 2005, PAULMANN ET AL. 2008). Auch konnte ein, wenn auch nicht sehr starker, negativer Einfluss von HAV auf Höhe von TBK-1 und IKK ϵ , welcher ebenfalls in der Inhibition des Signalweges zur Aktivierung von IRF-3 mündet, nachgewiesen werden (Rebecca Schwarz, arbeitsgruppeninternes Ergebnis).

Die soeben dargestellten Ergebnisse zur Identifizierung des Angriffspunktes von HAV auf den Signalweg zur Induktion von IFN- β wurden mit Hilfe von FRhK-4-Zellen erlangt. Diese stellen eine etablierte Zelllinien zur Kultivierung von HAV dar.

1.7 Diskussion der möglichen Beeinflussung des Transkriptionsfaktors IRF-7 durch HAV

Der im vorangegangenen Abschnitt erläuterte über RIG-I und MDA5 führende Signalweg resultiert, nach Detektion von dsRNA, sowohl in einer Aktivierung von IRF-3 als auch in der Aktivierung des zu IRF-3 homologen IRF-7 (YONEYAMA ET AL. 2004, ANDREJEVA ET AL. 2004, FITZGERALD ET AL. 2003, HEMMI ET AL. 2004). Somit liegt die Vermutung nahe, dass eine HAV-Infektion nicht nur die IRF-3- sondern auch die IRF-7-Aktivierung negativ beeinflussen könnte. Sollte sich diese Vermutung im Laufe dieser Arbeit bestätigen lassen, so ließen sich die nach einer HAV-Infektion auftretenden Störungen der mononukleären Differenzierung anhand einer negativen Beeinflussung des, für die mononukleäre Differenzierung essentiellen,

Transkriptionsfaktors 7 durch das Hepatitis A-Virus erklären. Dieser Einfluss könnte sich auf Höhe der IKKe, welche in der PMA-induzierten mononukleären Differenzierung von U937-Zellen eine wichtige Funktion zu spielen scheint, zutragen.

Die aus diesen Überlegungen hervorgehende These ist in der Abbildung 1.7 dargestellt und lautet wie folgt: Das Hepatitis A-Virus hemmt die Aktivität von IRF-7 und somit die IRF-7-induzierte Expression der non-IFN- α 1-Subtypen. Das Fehlen dieses für die mononukleäre Differenzierung wichtigen IFN- α resultiert in HAV-vermittelten Störungen der mononukleären Differenzierung.

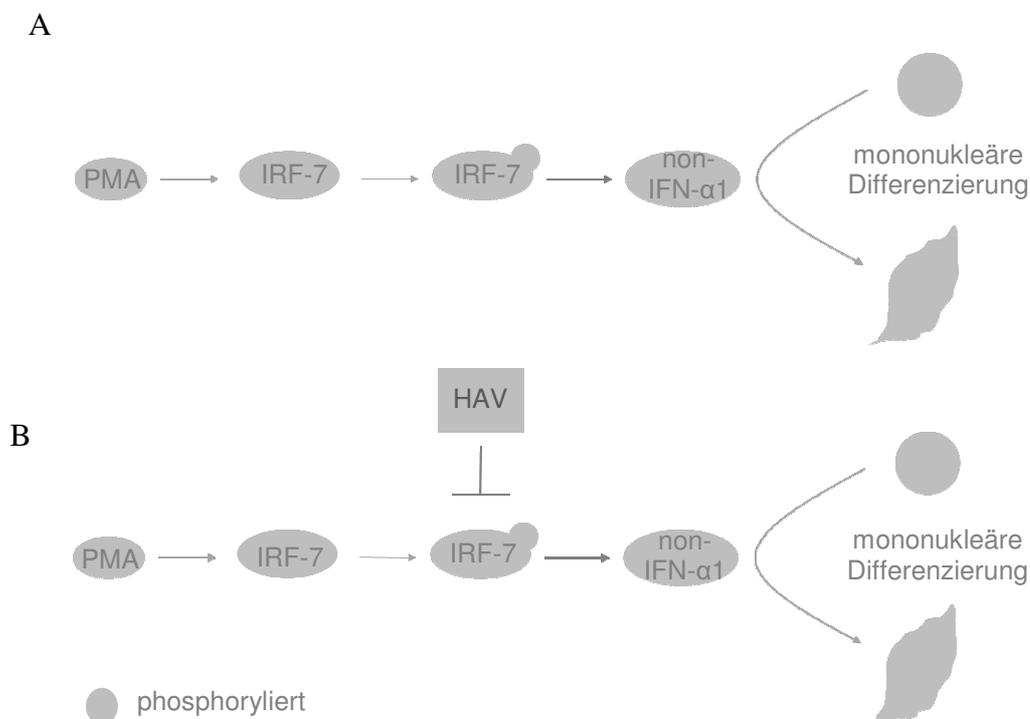


Abbildung 1.7 These: Einfluss des Hepatitis A-Virus auf die mononukleäre Differenzierung

Vereinfachte Darstellung der Signalwege, welche in mononukleären Zellen die Differenzierung induzieren könnten. Laut der in dieser Arbeit formulierten These, resultiert die Hemmung des Transkriptionsfaktors IRF-7 in Störungen der mononukleären Differenzierung. Spitzer Pfeilkopf: Richtung der weiteren Aktivierung des Signalweges. Gerader Pfeilkopf: Hemmung der weiteren Signalwege. A: IRF-7 induzierte mononukleäre Differenzierung. B: Hemmung der IRF-7 induzierten mononukleären Differenzierung durch HAV.

1.8 Zielsetzung

In der Einleitung wurde der inhibierende Effekt einer Hepatitis A-Virus Infektion auf die mononukleäre Differenzierung erläutert. Weiterhin wurde die essentielle Rolle des zu IRF-3 homologen und über die selben Signalwege aktivierbaren Transkriptionsfaktors IRF-7 sowie der von ihm regulierten non-IFN- α 1-Gene an der mononukleären Differenzierung diskutiert. Im Zusammenhang mit der bereits bekannten Aktivierungshemmung des Transkriptionsfaktors IRF-3 durch HAV ergab sich hieraus die These, dass die HAV-vermittelte Störung der mononukleären Differenzierung auf Ebene einer negativen Beeinflussung von IRF-7 durch das Hepatitis A-Virus zu suchen sein könnte. Demnach hemmt eine Hepatitis A-Virus Infektion die Aktivität von IRF-7, wodurch die normalerweise durch IRF-7 induzierte Expression von non-IFN- α 1 unterbunden würde. Aufgrund der essentiellen Rolle, welche IFN- α in der mononukleäre Differenzierung zukommt, könnten sich in der Folge Störungen der mononukleären Differenzierung ausbilden.

Im Verlauf dieser Dissertation soll die essentielle Rolle von IRF-7, und den von ihm regulierten non-IFN- α 1-Genen, an der mononukleären Differenzierung unterstrichen werden. Zudem soll der Effekt einer HAV-Infektion auf Expression sowie Aktivierung von IRF-7 in U937- sowie primären humanen mononukleären Zellen untersucht werden. Dabei liegt das primäre Ziel dieser Dissertation in der Klärung des Einflusses des Hepatitis A-Virus auf IRF-7.

2. Material

2.1 Virusstämme

Hepatitis A-Virus (HAV)

HAV/7: Variante des Stammes HM175, passagiert in FRhK-4-Zellen.

TCID₅₀/ml: $1 \cdot 10^{6,568}$

HAV_{GBM}: An MRC-5-Zellen adaptierte Variante des Stammes HAV_{GBM}.

TCID₅₀/ml: $1 \cdot 10^{6,694}$

TCID₅₀/ml: $1 \cdot 10^6$

Newcastle Disease-Virus (NDV)

Stamm R 05/93, erhalten von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (Insel Riems), passagiert in FRhK-4-Zellen.

TCID₅₀/ml: $1 \cdot 10^{6,79}$.

Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV)

Stamm Indiana, aus MDCK-Zellen stammend.

Pfu/ml: $2 \cdot 10^5$

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

FRhK-4-Zellen / FRhK-4-Zellklone

Fetale Rhesusaffen-Nierenzellen CBER/FDA, Abteilung für Virologie, Bethesda, Maryland (USA).

Wachstumsmedium: 10%FCS/DMEM

Erhaltungsmedium: 1%FCS/DMEM

HEK-293-Zellen

Transformierte humane embryonale Nierenzellen, Robert Koch Institut.

Wachstumsmedium: 10%FCS/DMEM

Erhaltungsmedium: 1%FCS/DMEM

PBMC

Primäre humane mononukleäre Zellen, Blutspendedienst Hamburg.

Wachstumsmedium/ErhaltungsmEDIUM: 5% autologes Serum/RPMI (Verwendung des jeweils zu dem Buffy-Coat gehörenden autologen Serums)

MRC-5-Zellen

Humane embryonale Lungenfibroblasten, American Type Culture Collection, Virginia (USA).

Wachstumsmedium: 10%FCS/DMEM

ErhaltungsmEDIUM: 3%FCS DMEM

WISH-Zellen

Humane Amnionzellen, zur Verfügung gestellt von Frau Prof. A. Vallbracht, Universität Bremen.

Wachstumsmedium: 10%FCS/DMEM

ErhaltungsmEDIUM: 1%FCS/DMEM

U937-Zellen

Transformierte humane Monoblasten eines AML-Patienten, Medizinische Hochschule Hannover

Wachstumsmedium/ErhaltungsmEDIUM: 10%FCS/RPMI-1640

Infektions-ErhaltungsmEDIUM: 1%FCS/RPMI-1640

2.2.2 Zellkulturmedien

DMEM-Medium: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Sigma

RPMI-1640-Medium: developed by Moore et al. Rosewell Park Memorial Institut

Sigma

Einfriermedium Nr.1

10%DMSO

90%FCS

4°C

Einfriermedium Nr.2

7%Wachstumsmedium

2%FCS

1%DMSO

4°C

1% Methylcellulose-Medium

2g Methylcellulose in 30ml kochender HBSS lösen und autoklavieren. Auf 37°C abkühlen und mit warmen DMEM-Medium auf 200ml auffüllen. 30 Minuten, 4°C
(Kurz vor Verwendung: Zugabe von FCS und Penicillin/Streptomycin)

2.2.2.1 Mediumzusätze/Antibiotika

| | |
|-------------------------|-----------|
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck |
| Fetal calf serum (FCS) | Gibco BRL |
| Geneticin (G418) | Sigma |
| Penicillin (10000U/ml) | Sigma |
| Streptomycin (10mg/ml) | Sigma |

2.3 Bakterienkultur

2.3.1 Bakterien

Escherichia coli, Stämme HB101, DH5 α

2.3.2 Bakterienmedien

Bakterieneinfriermedium 30% Glycerin/H₂O, 4°C

LB-Medium 5g Trypton
2,5g Yeast Extract
4g NaCl
autoklavieren

LB⁺⁺ Medium 9,8ml LB-Medium
100 μ l 2-M MgSO₄
100 μ l 1-M KCL

2.3.2.1 Mediumzusätze/Antibiotika

| | |
|------------|------------|
| Ampicillin | Serva |
| Kanamycin | Invitrogen |

2.4 Plasmide

pcDNA3.1/myc-His

Basisvektor von Invitrogen, dessen *multiple cloning site* einen myc- als auch einen His-tag enthält (Abbildung 2.1A). Dieses Plasmid wurde als Leervektor verwendet.

pcDNA3.1/IRF-3 (wt)/myc-His

Expressionsvektor, basierend auf dem Basisvektor pcDNA3.1/myc-His (Abbildung 2.1A) von Invitrogen. Die cDNA von IRF-3(wt) wurde aus dem Plasmid pCMVBL/IRF-3(wt) isoliert und zwischen den Restriktionsschnittstellen EcoRI und XbaI einkloniert.

pCR3.1-IRF-7

Expressionsvektor, basierend auf dem Basisvektor pCR3.1 von Invitrogen (Abbildung 2.1B). In diesen wurde die cDNA von IRF-7 einkloniert. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Yuan, Philadelphia, USA.

pEGFPN1-IRF-7

Expressionsvektor, hervorgegangen aus dem Basisvektor pEGFP-N1 von Clontech (Abbildung 2.1C). In diesen wurde die cDNA von IRF-7 einkloniert. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Yuan, Philadelphia, USA.

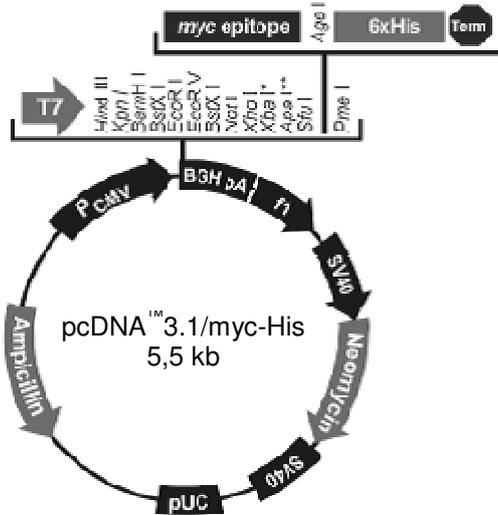
pGL2-Control

Basisvektor von Promega (Abbildung 2.1D). In diesen wurde der IFN- α 6-Promotor so einkloniert, dass das Leuchtkäfer-Luciferase-Gen unter der Kontrolle des IFN- α 6-Promotors steht. Der SV40-Promotor wurde entfernt.

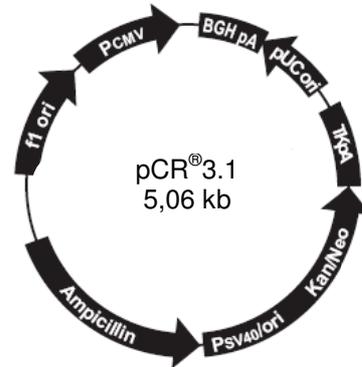
(PRDIII-I)₄-Luc

Reporterplasmid, welches das Leuchtkäfer-Luciferase-Gen unter der Kontrolle von vier *Repeats* der PRDIII-I (IRF-3-Bindestelle) des humanen Interferon- β -Enhancers enthält (Abbildung 2.1F) Basisvektor pGL3 (Promega) inklusive einer TATA-Box. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stephan Ludwig, Institut of Molecular Medicine, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany.

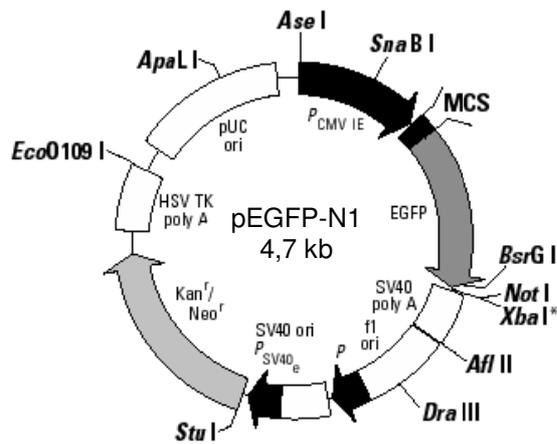
A



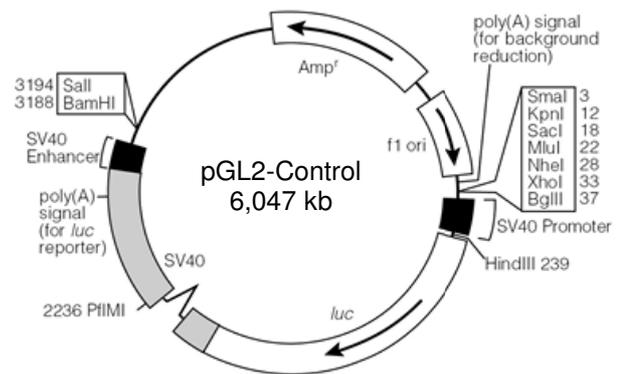
B



C



D



E

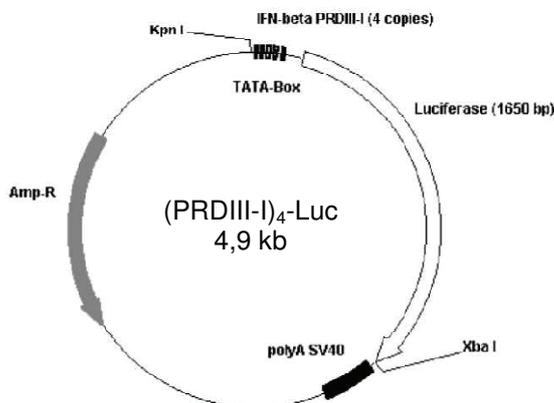


Abbildung 2.1 (A-E): Plasmidkarten Schematische Darstellung einiger der eingesetzten Plasmide. Angabe von Genen, Promotoren, Resistenz-Genen und Restriktionsenzym-Schnittstellen. Erläuterungen siehe Text.

2.5 Antikörper

2.5.1 primäre Antikörper

| | |
|---|------------|
| α - β -Aktin: goat anti-Aktin IgG (polyclonal) | Santa Cruz |
| α -CD11b IgG1 (monoclonal, FITC-konjugiert) | Immunotech |
| α -HAV: mouse anti-HAV IgG2a (Klon 7E7, monoclonal) | Mediagnost |
| α -IRF-7: rabbit polyclonal IgG | Santa Cruz |
| Isotypic Control IgG1 (monoclonal, FITC-konjugiert) | Immunotech |

2.5.2 sekundäre Antikörper

| | |
|---------------------------------|---------------------------|
| Bovine anti-rabbit IgG (HRP) | Santa Cruz |
| Donkey anti-goat IgG (HRP) | Santa Cruz |
| goat anti-mouse (TexasRed) | Kierkegaard & Perry (KPL) |
| goat anti-mouse IgG (FITC) | Kierkegaard & Perry (KPL) |
| Goat anti-rabbit IgG (FITC) | Santa Cruz |
| Goat anti-rabbit IgG (TexasRed) | Santa Cruz |

2.6 Enzyme

| | |
|--|-----------------|
| DNase RQ1 mit 10x Puffer | Promega |
| Klenow-Fragment (von <i>E. coli</i> DNA-Pol. I) mit 10x Puffer | Invitrogen |
| Lysozym (aus Hühnereiklar) | Serva |
| MB-Taq-Polymerase | Minerva Biolabs |
| Restriktionsendonucleasen mit 10x Puffer | Roche |
| Reverse Transkriptase "Expand RT" mit 5x Puffer | Roche |
| RNase A | Roche |
| T4 DNA-Ligase mit 10x Puffer | Roche |
| Taq-Polymerase | Eppendorf |
| Trypsin-EDTA | Sigma |

2.7 Proteine

Bovines Serumalbumin, BSA (Fraktion V)

Roche

2.8 PCR

2.8.1 Primer für PCR

Roth

β-Aktin

antisense: 5' CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC 3'
sense: 5' AGA AGA GCT ACG AGC TGC CTG ACG 3'
(381bp Amplifikat)

IFN-α6 (Promotor)

antisense: 5' CCA AGC TTG GTT CTC TGA AGA CCT TGC TTT 3'
(enthält eine Restriktionsschnittstelle für HindIII)
sense: 5' GCA GAT CTC ACA CAC ACA AAA CTG GTT GAA 3'
(enthält eine Restriktionsschnittstelle für BglII)
(154bp Amplifikat)

IFN-α6

antisense: 5' ATA GCT TCA GCC TTC TGG AA 3'
sense: 5' CTG TGA TCT GCC TCA GAC CCA 3'
(162bp Amplifikat)

IRF-7

antisense: 5' GAA TTC CAC CAG CTC TTG GA 3'
sense: 5' CAG ATC CAG TCC CAA CAA A 3'
(644bp Amplifikat)

2.8.2 RT-PCR

Reverse Transkription (IRF-7, β-Aktin, IFN-α6)

β-Aktin-RT-Primer-Mix 0,3μl β-Aktin antisense (100pm/μl)
6,7μl DEPC-H₂O

IRF-7-RT-Primer-Mix 0,3μl IRF-7 antisense (100pm/μl)
1,7μl DEPC-H₂O

IFN-α6-RT-Primer-Mix 0,3μl IFN-α6 antisense (100pm/μl)
6,7μl DEPC-H₂O

RT-Kontrollmix RT-Puffer (5x) 4µl
 dNTP-Mix [10mM] 2µl
 DTT [100mM] 2µl
 DEPC-H₂O [5U/µl] 1µl

RT-Mix T-Puffer (5x) 4µl
 dNTP-Mix [10mM] 2µl
 DTT [100mM] 2µl
 Expand[®]-RT [5U/µl] 1µl

2.8.3 PCR zur Amplifikation von IRF-7, β-Aktin, IFN-α6 und des IFN-α6-Promotors

PCR-Ansatz:

DEPC-H₂O: 38,2µl
Taq-Puffer (10x) 5µl
dNTP-Mix [10mM] 1µl
Taq-Polymerase [5U/µl] 0,2µl
sense-Primer [100pmol/µl] 0,3µl
antisense-Primer [100pmol/µl] 0,3µl

PCR-Programm β-Aktin

2min 95°C; 30x(1min 95°C; 2min 60°C; 3min 72°C); 10min 72°C; 4°C

PCR-Programm IRF-7

2min 95°C; 30x(1min 95°C; 2min 58°C; 3min 72°C); 10min 72°C; 4°C

PCR-Programm IFN-α6:

2min 95°C; 30x(1min 95°C; 2min 50°C; 3min 72°C); 10min 72°C; 4°C

PCR-Programm IFN-α6 (Promotor):

2min 95°C; 30x(1min 95°C; 2min 55°C; 3min 72°C); 10min 72°C; 4°C

2.9 Kits und Standards

| | |
|--|-------------------|
| IFN-α-ELISA | Bender MedSystems |
| DNA-Längenstandard "1kb ladder" | Invitrogen |
| DNA Molecular weight marker VIII | Roche |
| ECL Detection reagent (für Immunoblot) | SantaCruz |
| Luciferase Assay System | Promega |
| peqGOLD TriFAST [™] | Peqlab |

| | |
|---|-----------------|
| Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 (Für Serin/Threonin Phosphatasen und L-Isozyme der alkalinen Phosphatase) | Sigma |
| Proteaseinhibitor "Complete Mini" (cocktail tablets) | Roche |
| Protein-Marker: Broad Range (sc-2361) | Santa Cruz |
| Protein Assay Dye Reagent (5x Bradford-Reagens) | Bio-Rad |
| Protein-Marker (pre-stained, low-range für SDS-PAGE) | Bio-Rad |
| VenorGeM ^R "Mycoplasma Detection kit" | minerva biolabs |

2.10 Puffer und Lösungen

2.10.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

DEPC-H₂O 0,1% Diethyl-pyrocbonat in H₂O (v/v)
übernacht rühren, autoklavieren (2x)

2xHBS 2,980g HEPES (50mM)
0,134g Na₂HPO₄•12H₂O (1,5mM)
4,090 g NaCl (280mM)
dest. H₂O ad 250ml
pH mit 5M NaOH auf 7,05-7,12
sterilfiltrieren, 4°C

2.10.2 Alkalische Dephosphorylierung (Reaktionsansatz)

5µl 10x Reaktionspuffer
2µl alkalische Phosphatase CiP [1U/µg]
3µl H₂O

2.10.3 DAPI-Test auf Mycoplasmen (Diamidin-phenylindol)

DAPI-Lösung 1:1000 (DAPI Stammlösung 1mg/ml in 1xPBS, 4°C, dunkel)

Carnoy's Fixierer Methanol/Eisessig (3+1 VT, 4°C)

2.10.4 Durchflusszytometer

Fixierungslösung 0,8% Paraformaldehyd/PBS
übernacht rühren, sterilfiltrieren

2.10.5 Freeze & Thaw Lyse

TEN-Puffer 4ml 1M Tris-HCl (pH 7,5, 40mM)
0,2 ml 0,5M EDTA (pH 8,0; 1,0mM)
0,8776g NaCl (150mM)
dest. H₂O ad 100ml
autoklavieren, 4°C

0,25-M Tris-HCl (pH 7,5) 25ml 1M Tris-HCl
dest. H₂O ad 100 ml
autoklavieren, 4°C

1-M Tris-HCl (pH 7,5) 12,112g Tris Base
dest. H₂O ad 100 ml
pH mit HCl auf 7,5

2.10.6 Immunfluoreszenz

Fixierungslösung 4%/0,8% Paraformaldehyd/PBS
übernacht rühren, sterilfiltrieren

Blockierungslösung 10% FCS/PBS

2.10.7 Extraktion von RNA

RSB-Lösung 10mM TRIS, pH 7,5
10mM NaCl
1% NP-40

2.10.8 Isolierung von DNA aus Säugetiergewebe (Current Protocols in molecular biology, 1998)

Aufschluss-Puffer 100mM NaCl
10mM Tris-Cl, pH8
25mM EDTA, pH 8
0,5% SDS
0,1mg/ml Proteinase K (unstabil, jedesmal frisch hinzugeben)
Lagerung bei RT

2.10.9 Ligation eines DNA-Vektors

Ligationsansatz 1pmol Insert (je nach Verhältnis)
 0,5 pmol Vektor
 5µl Ligase-Puffer (19x)
 2,5µl BSA (1mg/ml)
 1U T4 DNA-Ligase (1U/ml)
 mit dest. H₂O auf 50µl auffüllen

2.10.10 PBMC Isolation aus Buffy-Coats

Hyperosmotische Percoll-Lösung

48ml Percoll
41,5ml H₂O dest
10ml 1,6-M NaCl

Isoosmotische Percoll-Lösung

8,3ml Percoll
9,7ml H₂O dest
2ml 1,5-M NaCl

2.10.11 Phenol-Ether Extraktion von DNA aus LMP-Agarosegel

Ether (wassergesättigt)

Diethylether
H₂O dest.
schütteln

3-M Natrium-Acetat (pH 4,8)

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

2.10.12 Plasmidpräparation

2.10.12.1 Plasmidpräparation (Maxiprep)

Lösung 1 50mM Glucose (2,5ml 1M auf 50ml H₂O)
 10mM EDTA
 10mM Tris
 pH 8,0 (mit HCl einstellen)
 kurz vor Gebrauch: 2mg/ml Lysozym hinzu fügen

Lösung 2 0,2M NaOH
 1%SDS
 frisch ansetzen!

Lösung 3 3M Na-Acetat

| | |
|---------------------------------------|--|
| <u>0,5-M Na₂-EDTA</u> | 18,62g pH 8,0 auf 100ml auffüllen |
| <u>2-M Tris</u> | 350ml H ₂ O 121,1g Tris-Base pH 8,0 (mit HCl einstellen), auf 500ml auffüllen |
| <u>TES-Puffer</u> | 12,5ml 2M Tris (pH 8,0) 5ml 5M NaCl (29,22g/100ml) 5ml 0,5M EDTA (pH 8,0) auf 100ml auffüllen |
| <u>50mM Tris/50mM EDTA</u> | 12,5ml 2M Tris (pH 8,0) 50ml 0,5M EDTA (pH 8,0) auf 500ml auffüllen |
| <u>1% Sarcosyl/20mM Tris</u> | 1ml 2M Tris (pH 8,0) 1g Sarcosyl (N-lauroyl-sarcosinat) auf 100ml auffüllen |
| <u>STET-Puffer</u> | 136ml 50mM Tris/50mM EDTA (pH 8,0) 14,4g Saccharose (Endkonzentration 8,0%) 9ml Triton X-100 (Endkonzentration 5,0%) auf 180ml auffüllen, frisch ansetzen |
| <u>5mM Tris</u> | 2,5ml 2M Tris (pH 8,0) auf 1000ml auffüllen |
| <u>Isopropanol (NaCl-gesättigt)</u> | gesättigte NaCl-Lösung in 10mM Tris (pH 8,0)/1mM EDTA Isopropanol etwa 1 VT schütteln, stehen lassen |
| <u>Lysozylösung (frisch ansetzen)</u> | 20mg/ml Lysozym in 20mM Tris (pH 8,0) |

2.10.12.2 Schnellpräparation bakterieller Plasmid-DNA (Miniprep)

| | |
|----------------|---|
| <u>Lösung1</u> | 50mM Glucose (2,5ml 1-M auf 50ml H ₂ O) 10mM EDTA 10mM Tris pH 8,0 (mit HCl einstellen) kurz vor Gebrauch: 2mg/ml Lysozym dazu |
| <u>Lösung2</u> | 0,2M NaOH 1% SDS gesamt ~5ml, frisch ansetzen! |

Lösung 3 3M Na-Acetat
pH 4,8 (mit Eisessig einstellen)

Restriktionsspaltung 20µl der Präparation aus der „Miniprep“
3µl 10x Puffer (je nach Enzym)
2µl RNase (2mg/ml)
3U Restriktionsenzym
mit H₂O auf 30µl auffüllen

2.10.13 Restriktionsansätze

Restriktionsansatz 500ng Plasmid, z.B aus der Plasmidpräparation „Maxiprep“
10x Restriktionsendonukleasen-Puffer
3U Restriktionsenzym
mit H₂O auf 30µl auffüllen

2.10.14 SDS-Page & Immunoblot

Acrylamid-Stammlösung 29% Acrylamid
1% Bis-Acrylamid
Lagerung bei 4°C, lichtgeschützt, drei Monate haltbar

Ammoniumpersulfat (10%) 0,1g Ammoniumpersulfat
1ml dest. H₂O
Lagerung bei 4°C, vier Wochen haltbar

Blotting Puffer 192-mM Glycin
25mM Tris-Base
Lagerung bei 4°C

Bromphenolblau (0,1%) 0,05g Bromphenolblau in 50 ml dest. H₂O
Lagerung bei RT

Elektrophorese-Puffer (1x) 192mM Glycin
25mM Tris
0,1% SDS
Lagerung bei RT

Protein-Probenpuffer (2x) 40% (w/v) Sucrose
12% (w/v) SDS
62,5mM Upper Tris (4x)
0,025% (w/v) Bromphenol-Blau
Lagerung bei -20°C
Kurz vor Gebrauch: Zugabe von 8% 2-Mercaptoethanol

| | |
|--|--|
| <u>Renaturierungspuffer</u> | 50mM NaCl 10 mM Tris-Base (pH 7,0) 4M Harnstoff 0,1mM DTT Lagerung bei RT |
| <u>SDS (10%)</u> | 100g SDS in 1000ml dest. H ₂ O Lagerung bei RT |
| <u>TBS (1x)</u> | 20mM Tris 137mM NaCl Lagerung bei 4°C |
| <u>TBST (1x)</u> | TBS (1x) 0,1% (v/v) Tween-20 Lagerung bei 4°C |
| <u>Upper Tris (4x)</u> | 0,5M Tris 0,4% SDS mit HCl auf pH 6,8 Lagerung bei RT |
| <u>Sammelgel</u> | 1ml Acryl-Bisacrylamid-Stocklösung (30%) 2,6ml 1,5M Upper Tris (4x, pH 6,8) 6,4ml dest. H ₂ O |
| <u>Trenngel</u> | 3,3ml Acryl-Bisacrylamid-Stocklösung (30%) 2,6ml 1,5M Lower Tris (4x, pH 8,8) 4,1ml dest. H ₂ O |
| <u>Lower Tris (4x Stammlösung)</u> | 1,5M Tris 0,4% SDS mit HCl auf pH 8,8 Lagerung bei RT |
| <u>TBST (1x) + Trockenmilch (Blockierungslösung)</u> | TBST (1x) 5% (w/v) Trockenmilch Lagerung bei 4°C |

2.10.15 Transfektion

2.10.15.1 Calcium-Phosphat

| | |
|-----------------------------|---|
| <u>2-M CaCl₂</u> | 11,1g CaCl ₂ (wasserfrei) dest. H ₂ O ad 5ml autoklavieren, 4°C |
|-----------------------------|---|

TE-Puffer (natriumfrei) 0,0606g Tris-Base (10mM)
0,0146g EDTA (1mM)
dest. H₂O ad 50ml, pH mit 1-M HCl auf 7,8
autoklavieren, 4°C

2.10.15.2 (jetPEI)

6-cm²-Schale
10µl jetPEI
5µg Gesamt-DNA (1µg Reporterplasmid, 4µg Expressionsplasmid)

6-Well-Platte (pro well)
5µl jetPEI
2,5µg Gesamt-DNA (2µg Reporterplasmid, 0,5µg Expressionsplasmid)

24-Well-Platte (pro Well)
4µl jetPei
1µg Gesamt-DNA

2.11 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|--|-------------------|
| Aceton | Fluka |
| Acrylamid | Biotech Pharmacia |
| Agar "Bacto Agar" | Becton Dickinson |
| Agarose "LM-MP" low melting point | Roche |
| Agarose "SeaKem LE" | Cambrex |
| Ammoniumpersulfat | Serva |
| Bisacrylamid (Methylenbisacrylamid) | Pharmacia Biotech |
| Bromphenolblau | Sigma |
| Calciumchlorid | Merck |
| Cäsiumchlorid (CsCl) | Serva |
| Chloroform | Fluka |
| Coulter® Clenz® | Beckman Coulter |
| Coulter® Isoton® II Diluent | Beckman Coulter |
| DEAE-Dextran (Diethylaminoethyl-Dextran) | Sigma |
| DEPC (Diethylpyrocarbonat) | Sigma |
| 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) | Sigma |
| Diethylether | Riedel-de Haen |

| | |
|------------------------------------|---------------------|
| Dinatriumhydrogenphosphat | Riedel-de Haen |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Merck |
| dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) | Roche |
| DTT | Roche |
| EDTA (Ethylendiamin-tetra-acetat) | Sigma |
| EGTA | Boehringer Mannheim |
| Entwickler & Fixierer "Adefodur" | Adefo |
| Essigsäure (Eisessig) | Fluka |
| Ethanol | Roth |
| Ethidiumbromid | Sigma |
| Ficoll (Histopaque 1077) | Sigma |
| Glucose | Janssen Chimica |
| Glycerol | Riedel-de Haen |
| Glycerol/PBS (Eindeckmedium) | Euroimmun |
| Glycin | Roth |
| Guanidin-thiocyanat | Serva |
| Harnstoff | Merck |
| HBSS | Sigma |
| Hefe-Extrakt "Bacto yeast extract" | Becton Dickinson |
| HEPES | Acros |
| Immersionsöl "Immersol F" | Zeiss |
| Isoamylalkohol (Isopentylalkohol) | Merck |
| Isopropanol (2-Propanol) | Fluka |
| Isoton-Lösung | Beckman Coulter |
| jetPEI transfection reagent | Qbiogene |
| Kaliumchlorid | Riedel-de Haen |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Riedel-de Haen |
| Kristallviolett | Merck |
| N-Lauroyl-Sarcosinat (Sarcosyl) | Sigma-Aldrich |
| Magnesiumchlorid | Merck |
| Magnesiumsulfat | Riedel-de Haen |
| Methylcellulose | Sigma |
| 2-Mercaptoethanol | Merck |
| Mineral-Öl | Sigma |
| Natriumacetat | Merck |
| Natriumchlorid | Fluka |

| | |
|---|-------------------------|
| Natriumhydroxid | Fluka |
| Nonident P-40 | Sigma |
| Paraformaldehyd | Fluka |
| Percoll | Amersham |
| Phenol (wassergesättigt) "Roti-Aqua-Phenol" | Roth |
| Phenol (TE-Puffer-gesättigt) "Roti-Phenol" | Roth |
| Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) | |
| poly(IC) (Poly-Inosinsäure:poly-Cytidylsäure) | Sigma |
| Saccharose | Acros |
| Salzsäure (HCl) | Merck |
| SDS (Natriumdodecylsulfat) | Pharmacia Biotech, Roth |
| TEMED (Tetramethylethylendiamin) | Sigma |
| Trinatriumcitrat | Roth |
| Tris Base [Tris(hydroxymethyl)-aminomethan] | Sigma, Roth |
| Triton X-100 | Serva |
| Trockenmagermilch | Saliter |
| Trypan Blue | Sigma |
| Trypton "Bacto Tryptone" | Becton Dickinson |
| Tween-20 | Serva |

2.12 Verbrauchsmaterial

| | |
|---------------------------------------|---------------|
| 24-Well-Mikrotiterplatten "Nunclon Δ" | Nunc |
| 96-Well-Mikrotiterplatten "Nunclon Δ" | Nunc |
| 6-Well-Zellkulturplatten "Nunclon Δ" | Nunc |
| Bakterienröhrchen 14ml | Greiner |
| Biomax MR Filme 18x40cm | Kodak |
| Cell Scraper (23cm) | Nunc |
| Chamber slides, 8-Well, Plastik | Labtek/Nunc |
| Combitips | Eppendorf |
| Deckgläschen (24x60mm) | Omnilab |
| Deckgläser (Ø 15mm) | Menzel-Gläser |

| | |
|--|-----------------------|
| Dialyseschläuche (MW cutoff 14 kDa) "ultrapure, Visking" | Gibco, Serva |
| Einmal-Küvetten 1,5ml (Plastik) | Plastibrand |
| Filterpapier "Schwarzband" | Schleicher & Schuell |
| Kanülen (0,9x40mm/0,45x25mm) | B. Braun |
| Kimwipes lite (Wischtücher) | Kimberly-Clark |
| Klonierungszyylinder (abgeschnittene 0,5ml Reaktionsgefäße) | Eppendorf |
| Nitrocellulose-Membran "Protran" | Schleicher & Schuell |
| Quick-Seal-Röhrchen (Polyallomer) | Beckman |
| Parafilm "M" | American National Can |
| Pasteur-Pipetten | Brand |
| PCR-Cups 200µl | Eppendorf |
| Pipettenspitzen 200 & 1000µl "Standartips / epTips" | Eppendorf |
| Reaktionsgefäße 1,5 + 2 ml (Cups) | Eppendorf |
| Sample plates (96-Well-Mikrotiterplatten) 1450-401 (Luminometer) | Wallac |
| Silicone Grease | Beckman |
| Sofortbilder 667 Filmpack | Polaroid |
| Spritzen | B. Braun |
| Sterilfilter für Spritzen "Millex" | Millipore |
| Whatman Chromatographie-Papier | Whatman |
| Zellkulturflaschen (80-cm ² + 185-cm ²) „Nunclon Δ“ | Nunc |
| Zellkulturschalen (6-cm ² + 10-cm ²) „Nunclon Δ“ | Nunc |
| Zentrifugenröhrchen ("Falcon", 15ml + 50 ml) | Greiner |

2.13 Geräte

| | |
|--|-----------------|
| Analysenwaage BP 61 | Sartorius |
| Analysenwaage MC 1 | Sartorius |
| CO ₂ -Brutschränke | Heraeus |
| Durchflußzytometer EPICS® XL (Analyseprogramm: EPIC XL System I Software) | Beckman Coulter |
| Blotting-Kammer (TE Series Transphor Epho Unit) | Hofer |
| Elektrophorese-Kammer (PAGE) "Mighty Small II" SE250 | Hofer |
| Entwicklermaschine SRX-101 | Konica |
| Epifluoreszenzmikroskop "Axioskop 2" (HAL100 & HBO100) | Carl Zeiss |

| | |
|--|------------------------|
| Fluoreszenzfilter-Set: | Carl Zeiss |
| 02 (excitation 365nm, emission 420nm) | |
| 09 (excitation 450-490nm, emission 515nm) | |
| 15 (excitation 546/12nm, emission 590nm) | |
| 24 (excitation 485/20 + 578/14nm, emission 515-540nm; 610nm) | |
| Fuchs-Rosenthal-Zählkammer | Assistent |
| Gelkammern für Agarose-Gelelektrophorese | Bio-Rad |
| Gel-Gießkammer (PAGE) "Mighty Small" SE245 | Hoefer |
| Glaspipetten Hirschmann | EM |
| Glaswaren | Schott, Brand, B.Braun |
| Inkubator Certomat HK | B.Braun Biotech Int. |
| Kolbenhub-Pipetten (Multipipetten, µl-Pipetten) | Eppendorf, Gilson |
| Kühlblock TR-L 288 (für Ligation) | Liebisch |
| Kühlzentrifuge 5403 | Eppendorf |
| Lichtmikroskop Wilovert S | Hund |
| Lumineszenz-Counter "Trilux 1450 MicroBeta" mit Software | Wallac |
| Magnetrühr Tisch RCT basic | Ika Labortechnik |
| Mehrkanalpipetten (8fach) | Eppendorf |
| Messzylinder | VitLab |
| PCR-Cycler "Gene Amp PCR System 2400" | Perkin Elmer |
| pH-Meter pH 537 | WTW |
| Pipettierhilfe "Acuboy" | TecNoMara |
| Pipettierhilfe "Pipetboy acu" | Integra Biosciences |
| Power Supply 200/2.0 | Bio-Rad |
| Quarzküvetten Suprasil | Hellma |
| Refraktometer | Optronic |
| Saugpumpe Vacuboy (Sauger) | Integra Biosciences |
| Schüttler Certomat S | B.Braun Biotech Int. |
| Schweißgerät (Tube Sealer für Quick Seal) | Beckman |
| Sofortbildkamera MP4 ⁺ | Polaroid |
| Sonopuls HD 200 | Bandelin |
| SpeedVac SC 110 Vakuumzentrifuge | Savant |
| Spektralphotometer DU 640 | Beckman |
| Sterilbank Clean Air | Haas |
| Sterilbank LaminAir HB 2448 | Heraeus |
| Taumler "Red Rotor" | Hoefer |
| Thermomixer 5436 (für Reaktionsgefäße) | Eppendorf |

| | |
|---|--------------|
| Tischzentrifuge GS-6R mit Rotor GH 3.7 (für Falcons) | Beckman |
| Tischzentrifuge 5415 C (für Cups) | Eppendorf |
| Tischzentrifuge 5403 (Rotor 16M2 MT, für 24-Well Mikrotiterplatten) | Eppendorf |
| Ultrazentrifuge LE-70 mit Rotor Typ FW 65 | Beckman |
| UV-Handlampe VL-6C | Serva |
| UV-Transluminator "Mighty Bright" | Hoefler |
| Vakuum-Saugpumpe (Membranpumpe, Typ ME 2) | Vacuubrand |
| Vortexer VF2 Ika | Labortechnik |
| Wasserbad (37°C) | Memmert |
| Zentrifuge RC28S mit Rotor F-28/50 und F-16/250 | Sorvall |

3. Methoden

3.1 Zellkultur

Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien und Zellklonen erfolgte in Nährmedien unter Zugabe von fetalem Kälberserum (FCS). Als Nährmedien wurden DMEM-, IMDM- und RPMI-1640-Medium verwendet. Die Kultivierung erfolgte, je nach Verwendungszweck der Zellen, in verschiedenen Zellkulturgefäßen. Diese wurden mit folgenden Mengen Nährmedium beschickt:

96-Well Mikrotiterplatte: 100-200µl/Well
24-Well Zellkulturplatte: 500-1000µl/Well
6-Well Zellkulturplatte: 2ml/Well
6-cm² Zellkulturschalen: 4ml
25-cm² Kulturflaschen: 7ml
75-cm² Kulturflaschen: 20ml
180-cm² Kulturflaschen: 35ml

Kultivierung und Umsetzen der Zellen erfolgte immer mit bereits auf 37°C vorgewärmten Wachstums-/Erhaltungsmedium, dem zusätzlich zum FCS, Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml) zugesetzt wurde. Alternativ zur Umsetzung in Splitverhältnissen wurde die Zellzahl/ml bestimmt und eine bestimmte Zellzahl in ein neues Zellkulturgefäß überführt. Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

3.1.1 Kultivierung von Zellen

3.1.1.1 FRhK-4-, WISH- und HEK-293-Zellen

Nach Umsetzen der Zellen wurden diese zunächst für 5-7 Tage in Wachstumsmedium kultiviert. Zur weiteren Kultivierung erhielten die Zellen Erhaltungsmedium. Zum Umsetzen aus Zellkulturgefäßen (maximal alle 21 Tage, mindestens alle 7 Tage) wurden die adhärennten Zellen nach einem anfänglichen Waschschrift (Trypsin-EDTA) mit Trypsin-EDTA (5-10 Minuten, 37°C) von dem Kulturgefäßboden abgelöst. Es folgte eine gründliche Vereinzelnung der Zellen und die zügige Zugabe von Wachstumsmedium zur Inaktivierung des Trypsin-

EDTA. Danach wurden die Zellen, je nach weiterem Verwendungszweck, in verschiedenen Splitverhältnissen (max. 1:8) in neue Zellkulturgefäße umgesetzt. Ein kompletter Mediumwechsel (Erhaltungsmedium) erfolgte wöchentlich.

3.1.1.2 MRC-5-Zellen

Nach Umsetzen der Zellen wurden diese zunächst für 5-7 Tage in Wachstumsmedium kultiviert, wobei nach einem Tag ein kompletter Mediumwechsel erfolgte. Zur weiteren Kultivierung erhielten die Zellen Erhaltungsmedium. Zum Umsetzen aus Zellkulturgefäßen wurden die adhären Zellen, nach einem anfänglichen Waschschrift (Trypsin-EDTA), mit Trypsin-EDTA (3-5 Minuten, 37°C) von dem Kulturgefäßboden abgelöst. Es folgte eine gründliche Vereinzelung der Zellen und die zügige Zugabe von Wachstumsmedium zur Inaktivierung des Trypsin-EDTA. Zur Entfernung des verbleibenden Trypsin-EDTA erfolgte eine Zentrifugation (1200 rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 5 min, RT), in deren Anschluss der Überstand verworfen und das Zellpellet in neuem Wachstumsmedium aufgenommen wurde. Danach wurden die Zellen, je nach weiterem Verwendungszweck, in verschiedenen Splitverhältnissen (max. 1:5) in neue Zellkulturgefäße umgesetzt. Ein halber Mediumwechsel (Erhaltungsmedium) erfolgte wöchentlich.

3.1.1.3 U937-Zellen

Nach Umsetzen der Zellen, wurden selbige für 5-7 Tage in Wachstumsmedium kultiviert. Zur weiteren Kultivierung wurden wöchentlich einige Milliliter, der in Suspension wachsenden Zellen, in neue Zellkulturgefäße überführt. Dabei betrug das maximale Splitverhältnis 1:10.

3.1.1.4 primäre humane mononukleäre Zellen

Die Isolierung der primären humanen mononukleären Zellen (PBMC) erfolgte aus Buffy-Coats, welche freundlicherweise von dem Blutspendedienst Hamburg zur Verfügung gestellt wurden, modifiziert nach Repnik et al. 2003. Zunächst wurden 20ml des Buffy-Coat mit 20ml RPMI-Medium 1:1 verdünnt. Im Anschluss wurden je 12,5ml Ficoll in zwei 50ml-Falkonröhrchen gegeben und sehr vorsichtig mit je 20ml des verdünnten Buffy-Coats überschichtet. Es folgte ein 15minütiger Zentrifugationsschritt (950g, 20°C, ohne Bremse). Die PBMCs befinden sich nun in der Interphase und wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen. Dabei wurde die Interphase aus den beiden Falkonröhrchen gepoolt. Zusätzlich wurde, das sich in der 1.Phase befindliche autologe Serum abgenommen. Zur weiteren Verwendung wurde dieses autologe Serum zur Hitzedeaktivierung von

Komplementkomponenten bei 56°C für 45 Minuten erwärmt. Im Anschluss wurde dieses auf Eis abgekühlt, zentrifugiert (10000rpm, 15 Minuten, 4°C), steril filtriert und bei 4°C gelagert. Zu den isolierten PBMCs wurde RPMI-Medium hinzugegeben (Endvolumen 45ml). Nun folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (350g, 7 Minuten, ohne Bremse), nachdem der Überstand verworfen und das Zellpellet vorsichtig in 45ml RPMI-Medium resuspendiert wurde. Nach einer nochmaligen Zentrifugation (350g, 7 Minuten, ohne Bremse) wurde der Überstand abermals verworfen und das Zellpellet diesmal in 25ml RPMI-Medium aufgenommen. Nun erfolgte die Bestimmung der Zellzahl/ml mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer und nach einer erneuten Zentrifugation (350g, 7 Minuten, ohne Bremese) die Aufnahme der Zellen in so viel RPMI-Medium, dass sich 50000-700000 Zellen/ml in diesem befanden. Es folgte die Separation der Monozyten von Lymphozyten. Dazu wurden je 3ml der PBMC-RPMI-Suspension auf 1ml der Hyperosmotischen Percoll-Lösung in einem 15ml Falconröhrchen gegeben. Es folgte eine Zentrifugation (580g, 15 Minuten, ohne Bremse), nach der die Interphase mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und die Interphase von drei Falconröhrchen gepoolt wurde. Nun wurde RPMI-Medium zu einem Endvolumen von 45ml hinzugegeben und erneut zentrifugiert (350g, 7 Minuten, ohne Bremse). Nach Verwerfung des Überstandes sollten die Monozyten im folgenden Isolationsschritt von Blutplättchen und toten Zellen getrennt werden. Dazu wurden je 10ml der Isosmotischen Percoll-Lösung vorsichtig mit 3ml der Zellsuspension überschichtet und ein weiterer Zentrifugationsschritt (350g, 15 Minuten, ohne Bremse) angeschlossen. Der Überstand wurde nun abermals verworfen, das Zellpellet in 1ml RPMI-Medium resuspendiert und in ein neues 50ml Falconröhrchen überführt (Hier können nun alle Zellpellets gepoolt werden). Die Zellsuspension wurde in einem Endvolumen von 45ml RPMI-Medium aufgenommen, ein letztes Mal zentrifugiert (350g, 7 Minuten, ohne Bremse) und nach Entfernung des Überstandes in 5ml RPMI-Medium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl/ml wurden die Zellen (2.000.000 Zellen/Well) in 24-Well-Zellkulturplatten umgesetzt (500µl/Well). Dabei erfolgte die Kultivierung der Zellen in RPMI-Medium unter Zugabe von autologem Serum (5%).

3.1.2 Zellzählung (Bestimmung der Lebendzellzahl/ml)

Im Gegensatz zu lebendigen Zellen, deren Zellmenbran für den Farbstoff Trypanblau undurchlässig ist und welche unter dem Lichtmikroskop „durchsichtig“ erscheinen, gelangt

Trypanblau über defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol, wodurch diese Zellen tief blau erscheinen. Aufgrund cytotoxischer Wirkungen von Trypanblau, sollte dieses nicht zu lange auf Zellen einwirken, da sich ansonsten der Anteil toter Zellen erhöht und folglich die ermittelte Zellzahl/ml lebender Zellen erniedrigt wird.

Die in Suspension befindlichen Zellen (U937-Zellen, PBMC), beziehungsweise die mit Trypsin-EDTA abgelösten und in Wachstumsmedium aufgenommenen Zellen (FRhK-4-, MRC-5-, HEK-293-Zellen), wurden mit PBS (1:2 bis 1:10) vorverdünnt. Zur anschließenden Bestimmung der Lebendanzahl Zellen/ml erfolgte eine weitere Verdünnung der vorverdünnten Zellen mit Trypanblau (1:1). Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension (20µl) auf eine Fuchs-Rosenthal Zählkammer aufgebracht, die Zellen unter dem Lichtmikroskop gezählt (5 B-Felder, gemittelt) und die Zellzahl/ml mittels Multiplikation mit dem Kammerfaktor '5000' und Herausrechnen der Vorverdünnungen berechnet. Tote Zellen wurden bei der Zellzählung nicht berücksichtigt.

3.1.3 Cryokonservierung von Zellen

Nach der Resuspension der Zellen in dem jeweiligen Einfriermedium und der Aliquotierung in CryoCups, wurden diese zunächst für 1-2 Tage bei -80°C eingefroren und im Anschluss daran in Stickstoff (-196°C) überführt.

3.1.3.1 Cryokonservierung von FRhK-4- und WISH-Zellen mittels Dimethylsulfoxid (DMSO)

Die einzufrierenden Zellen wurden bis kurz vor Erreichen der Konfluenz in Wachstumsmedium kultiviert. Nach Abnahme und Verwerfung des Wachstumsmediums erfolgte zunächst ein Waschschriff mit Trypsin-EDTA und im Anschluss die Ablösung der Zellen mittels Trypsin-EDTA von dem Boden des Zellkulturgefäßes. Es erfolgte eine Resuspension der abgelösten Zellen in Wachstumsmedium (FRhK-4-Zellklone: keine Zugabe von G418) und ein daran anschließender Zentrifugationsschritt (2500rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 5 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen abermals in Wachstumsmedium (FRhK-4-Zellklone: keine Zugabe von G418) resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2500rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 5 Minuten, RT) und

Verwerfung des Überstandes erfolgte die zügige Resuspension der Zellen (Splitverhältnis 1:8) in Einfriermedium Nr.1 und die Aliquotierung in 1 ml CryoCups (4°C).

3.1.3.2 Cryokonservierung von MRC-5-Zellen mittels Dimethylsulfoxid (DMSO)

Die einzufrierenden Zellen wurden bis kurz vor Erreichen der Konfluenz in Wachstumsmedium kultiviert. Nach Abnahme und Verwerfung des Wachstumsmediums erfolgte zunächst ein Waschschrift mit Trypsin-EDTA und im Anschluss die Ablösung der Zellen mittels Trypsin-EDTA von dem Boden des Zellkulturgefäßes.

Es erfolgte eine Resuspension der abgelösten Zellen in Wachstumsmedium und ein daran anschließender Zentrifugationsschritt (1200rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 5 Minuten, RT). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zügig in Einfriermedium Nr.2 resuspendiert (Splitverhältnis 1:2). Im Anschluss hieran erfolgte eine Aliquotierung in 1 ml CryoCups (4°C).

3.1.3.3 Cryokonservierung von U937-Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden bis zu einer Zelldichte von (4 Millionen Zellen/ml) in Wachstumsmedium kultiviert. Es erfolgte eine Zentrifugation (2500rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 5 Minuten, RT), die Verwerfung des Überstandes und eine Resuspension der Zellen in Wachstumsmedium. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2500rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 5 Minuten, RT) und Verwerfung des Überstandes erfolgte die zügige Resuspension der Zellen in Einfriermedium Nr.1 und die Aliquotierung in 1 ml CryoCups (4°C).

3.1.4 Auftauen von Zellen

Um eine mögliche Kontamination der Zellen mit Mycoplasmen rechtzeitig festzustellen, wurde bald nach Auftauen der Zellen ein Mycoplasmenachweis durchgeführt.

3.1.4.1 Auftauen von FRhK-4-/FRhK-4-Zellklonen sowie WISH-Zellen

Die Zellen in den in Stickstoff lagernden CryoCups wurden zügig aufgetaut, in Wachstumsmedium aufgenommen und in Zellkulturgefäße (Splitverhältnis 1:8) überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein kompletter Mediumwechsel. Nach Ablauf einer Woche wurden die Zellen, wie unter Abschnitt 3.1.1 beschrieben, weiter kultiviert.

3.1.4.2 Auftauen von MRC-5-Zellen

Die in Stickstoff lagernden CryoCups mit den Zellen wurden zügig aufgetaut und in Wachstumsmedium aufgenommen. Zur Entfernung des Einfriermediums erfolgte eine Zentrifugation (1200rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 5 Minuten, RT). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in neuem Wachstumsmedium aufgenommen und in ihrer Menge entsprechende Zellkulturgefäße (Splitverhältnis 1:2) überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein kompletter Mediumwechsel. Nach Ablauf einer Woche wurden die Zellen, wie unter Abschnitt 3.1.1 beschrieben, weiter kultiviert.

3.1.4.3 Auftauen von U937-Zellen

Die in Stickstoff lagernden CryoCups mit den Zellen wurden zügig aufgetaut, in Wachstumsmedium aufgenommen und in ihrer Menge entsprechende Zellkulturgefäße überführt. Am nächsten Tag erfolgte eine Zentrifugation (2500rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 5 Minuten, RT) und die Resuspendierung der Zellen in neuem Wachstumsmedium. Nach Ablauf einer Woche wurden die Zellen, wie unter Abschnitt 3.1.1 beschrieben, weiter kultiviert.

3.2 Bakterienkultur

Die Kultivierung der verwendeten Bakterien (E-coli HB101) erfolgte in LB-Medium/auf LB-Agarplatten unter Zugabe von (dem Resistenzgen der eventuell enthaltenen Plasmide entsprechenden) Antibiotika (Ampicillin: 100µg/ml, Kanamycin: 30µg/ml). Inkubiert wurde entweder im Brutschrank oder auf dem Schüttler bei 37°C.

3.2.1 Glycerol-Cryokultur von Bakterien

Die Bakterien (500µl) wurden in 500µl Bakterieneinfriermedium aufgenommen und in vorgekühlte CryoCups gegeben. Diese wurden bei -80°C eingefroren.

3.2.2 Auftauen von Bakterien

Die sich im Bakterieneinfriermedium befindlichen Bakterien wurden langsam (auf Eis) aufgetaut und im Anschluss ihrem spezifischen Verwendungszweck zugeführt.

3.2.3 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation

Zur Amplifikation und Verfielfachung eines Plasmides in Bakterien muss das Plasmid in kompetente Bakterien eingebracht werden. Dieser Vorgang wird als „Transformation“ bezeichnet. Zur Selektion transformierter von nicht-transformierten Bakterien tragen Plasmide meist ein Selektionsgen (z.B.: Antibiotikaresistenzgen: Ampicillin). Bei späterer Ausplattierung der transformierten Bakterien auf antibiotikahaltigen (z.B.: Ampicillin) LB-Agar-Platten können nur solche Bakterien Kolonien bilden, welche das Plasmid aufgenommen haben und das Antibiotikaresistenzgen exprimieren. Dabei geht eine lokal begrenzte Bakterienkolonie auf jeweils eine ursprünglich transformierte Bakterienzelle (Bakterienklon) zurück. Die Herstellung sogenannter „kompetenter“ Bakterien ist ein notwendiger Schritt zur Erhaltung transformationsfähiger Bakterien.

Es wurden 20µl Glycerolkultur des jeweiligen Bakteriums (E-coli HB101) in 3ml LB⁺⁺ Medium pipettiert (37°C, schüttelnd). Am nächsten Morgen wurden 500µl der Übernachtskultur zu 100ml LB⁺⁺ Medium gegeben und bei 37°C (schüttelnd) weiter inkubiert. Nach Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,4-0,55 folgte eine Überführung des Ansatzes auf Eis (10 Minuten, mehrfach schütteln). Danach wurde der Ansatz in ein Falconröhrchen überführt und die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert (3000rpm, 10 Minuten, 4°C). Im Folgenden wurde der Überstand abgenommen und verworfen sowie das Bakterienpellet in 30 ml kaltem Tfb I resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis (10 Minuten) erfolgte abermals ein Zentrifugationsschritt (3000rpm, 10 Minuten, 4°C) mit einer anschließenden Verwerfung des Überstandes. Das verbleibende Pellet wurde in 4ml Tfb II resuspendiert, der erhaltene Ansatz (kompetente Bakterien) aliquotiert (200µl/Eppendorfcup) und bei -80°C gelagert. Mit den hergestellten kompetenten Bakterien wurde frühestens nach zwei Stunden weitergearbeitet.

3.2.4 Überprüfung der Kompetenz von Bakterien

Zur Überprüfung der Kompetenz der unter Abschnitt 3.2.3: „Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation“ hergestellten Bakterien, wurden diese mit einem Amp^r-Plasmid transformiert. Nach einer Ausplattierung der transformierten Bakterien auf eine LB-Agar (ampicillinhaltig) Petrischale, sollten nur erfolgreich transformierte Bakterien (kompetente Bakterien) auf der Petrischale Kolonien ausbilden.

Die zu testenden kompetenten Bakterien wurden aufgetaut (auf Eis, ca 10 Minuten) und je 30µl der Bakterien mit dem Plasmid pUC19 oder pSP65 (1ng/0,1ng/0,01ng Plasmidmenge) transformiert (Abschnitt 3.11: „Transformation von Bakterien“). Danach erfolgte die Ausplattierung der transformierten Bakterien auf LB-Agar Petrischalen (ampicillinhaltig) und eine Inkubation bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die sich ausgebildeten Kolonien gezählt und die *colony forming units* (cfu) pro µg Plasmid berechnet.

3.2.5 Ausplattieren von Bakterien auf Agar-Petrischalen

Es wurden Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100) der aufzutragenden Bakterienansätze angefertigt und auf die Agar-Petrischalen aufgetropft. Mit Hilfe einer 10ml Glaspipette wurde die aufgetragene Verdünnungsstufe bis zur vollständigen Trocknung auf dem Agar verteilt. Die Agar-Petrischalen wurden daraufhin, zur Vermeidung von Kondenswasser auf dem Agar, mit dem Deckel nach unten in den Brutschrank gestellt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C so lange (meist über Nacht bis zwei Tage), bis Kolonien sichtbar wurden.

3.2.6 Isolierung von Bakterien

Auf LB-Agar Petrischalen aufgebrachte Bakterien bilden auf diesen Kolonien. Dabei bildet in der Theorie eine Bakterienzelle den Ursprung für eine gesamte Kolonie. Demnach besteht eine Kolonie aus einer Vielzahl von Klonen des Ursprungsbakteriums. Zur weiteren Amplifikation eines Bakterienklones in flüssigem LB-Medium, muss dieser von der LB-Agar Petrischale „gepickt“ werden.

Dazu wurde mit einem zuvor autoklaviertem Zahnstocher vorsichtig etwas Zellmaterial aus der Mitte der Kolonie des zu pickenden Bakterienklones entnommen und in 3ml LB-Medium (enthält das dem Antibiotikaresistenzgen entsprechende Antibiotikum) überführt. In der darauf folgenden Inkubation (37°C, schüttelnd) erfolgte die Amplifikation des gepickten Bakterienklones.

3.3 Herstellung von Viruspools

3.3.1 Ansetzen eines HAV/7 und HAV_{GBM} Viruspools

FRhK-4-Zellen (HAV/7) oder MRC-5-Zellen (HAV_{GBM}) wurden in 175-cm²-Zellkulturflaschen umgesetzt. Am folgendem Tag (Konfluenz: 70-80%) wurde der Zellrasen einmal mit PBS (20ml, 37°C) gewaschen. Darauf folgte die Infektion der Zellen mit HAV (MOI=1) bzw. Mock in einem Endvolumen von 5ml Erhaltungsmedium. Während der anschließenden Inokulationsdauer (2 Stunden, 37°C, 5% CO₂) wurde die Zellkulturflasche mehrmals (alle 15 Minuten) vorsichtig geschwenkt. Danach erfolgte die Zugabe von 25ml Erhaltungsmedium und eine Inkubation bei 37°C, 5% CO₂. Nach einer Woche wurden 10ml des Erhaltungsmediums durch neues Medium ersetzt und nach Ablauf einer insgesamt zweiwöchigen Inkubationszeit das Viruslysate aus den Zellen gewonnen.

3.3.1.1 Gewinnung von Virus- (HAV/7, HAV_{GBM}) und Mock-Lysat

Nach Ablauf der insgesamt zweiwöchigen Inkubationszeit erfolgte durch dreimaliges Einfrieren (-80°C)/Auftauen (RT) der gesamten Zellkulturflaschen die Lyse der Zellen. Das so entstandene Zelllysate (HAV + Mock) wurde in 50ml Falconröhrchen überführt und einer Ultraschallbehandlung (3x20 Sekunden: 20kHz/200W, Eis) unterzogen. In einer anschließenden Zentrifugation (3000rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 10 Minuten, RT) erfolgte die Pelletierung von Zelltrümmern. Der Überstand (Viruslysate, Mocklysate) wurde abgenommen, zu je 1ml in 1,5ml Eppendorfcups aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.3.2 NDV Viruspool

FRhK-4-Zellen wurden in 175-cm²-Zellkulturflaschen umgesetzt. Bei Erreichen einer 100% Konfluenz wurde der Zellrasen einmal mit PBS (20ml, 37°C) gewaschen. Darauf folgte die Infektion der Zellen mit NDV (MOI=1) bzw. Mock in einem Endvolumen von 25ml Erhaltungsmedium und eine Inkubation des Ansatzes bei 37°C, 5% CO₂. Sobald der NDV-induzierte CPE ca. 50% des Zellrasens zerstört hatte, wurde das Viruslysate aus den Zellen gewonnen.

3.3.2.1 Gewinnung von Viruslysats (NDV) und Mock-Lysats

Bei Erreichen des 50% CPEs durch NDV wurde der Überstand (NDV + mock) von den Zellkulturflaschen abgenommen und in 50ml Falkonröhrchen überführt. Zur Pelletierung von Zelltrümmern folgte ein Zentrifugationsschritt (1500rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 7 Minuten, RT). Der Überstand (Viruslysats, Mocklysats) wurde abgenommen, zu je 1ml in 1,5ml Eppendorfcups aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.4 Bestimmung der Viruspooltiter

3.4.1 Bestimmung der $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ von HAV/7 und HAV_{GBM} mittels indirekter Immunfluoreszenz

3.4.1.1 Austitration von Viruslysats/ Mocklysats auf FRhK-4- und MRC-5-Zellen

Die Zellen (FRhK-4-Zellen für HAV/7, MRC-5-Zellen für HAV_{GBM}) wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten kultiviert. Bei Erreichen der entsprechenden Konfluenz (80-90%) wurde von dem zu titrierendem Viruslysats eine dekadische Verdünnungsreihe ($10^{-1} - 10^{-9}$) in 1% FCS-DMEM erstellt und im Anschluss an einen Waschgang (PBS, 200 μl /Well) auf die Zellen aufgebracht (100 μl /Well). Vom Mocklysats wurde keine Verdünnungsreihe erstellt. Nur lediglich 5 Wells wurden mit je 100 μl des unverdünnten Mocklysates beschickt. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 37°C , während derer die 96-Well-Mikrotiterplatten mehrfach (alle 15 Minuten) vorsichtig geschwenkt wurden. Danach wurde das Inokulum entfernt, ein Waschschriff mit PBS (100 μl /Well) durchgeführt und anschließend Erhaltungsmedium (100 μl /Well) der entsprechenden Zelllinie zugegeben. Die 96-Well-Mikrotiterplatten wurden bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert. Nach einer Woche erfolgte die Zugabe von weiterem, der Zelllinie entsprechenden, Erhaltungsmedium (100 μl /Well) und eine erneute einwöchige Inkubation bei 37°C , 5% CO_2 .

3.4.1.2 Fixierung der FRhK-4- und MRC-5-Zellen

Nach Ablauf der insgesamt zweiwöchigen Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS (100 μl /Well) gewaschen und unter Zugabe von 90% Aceton/PBS (100 μl /Well) für 20 Minuten bei -20°C fixiert. Zum Abtöten sich noch eventuell auf/in/unter den 96-Well-Mikrotiterplatten befindlichen HAV wurden die Platten für weitere 5 Minuten in ein 90% Aceton/PBS Bad getaucht.

Die indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von HAV erfolgte entweder direkt im Anschluss oder aber nach spätestens 8 Wochen, während derer die 96-Well-Mikrotiterplatten (nach Abnahme und vollständiger Verdampfung des 90% Aceton/PBS) bei 8°C im Kühlschrank gelagert wurden.

3.4.1.3 Bestimmung der TCID₅₀/ml von HAV/7 und HAV_{GBM} mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz

Zur Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz zum Nachweis von HAV wurden die fixierten Zellen zuerst dreimal mit PBS (200µl/Well) gewaschen. Nach gründlicher Entfernung des PBS erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers (Maus anti-HAV 1:800 in PBS, 30µl/Well) sowie eine einstündige Inkubation bei 37°C. Danach wurde der Antikörper entfernt und die Zellen abermals dreimal mit PBS (200µl/Well) gewaschen. Vor der Zugabe des sekundären Antikörpers wurde das, nach dem letzten Waschschrift auf den Zellen verbleibende, PBS gründlich entfernt. Die Zugabe des sekundären Antikörpers (goat anti-mouse [FITC], 1:80 in PBS, 30µl/Well) erfolgte, zur Gegenfärbung der Zellen, zusammen mit Trypanblau (1:1000). Nach einer Stunde wurden die Zellen ein letztes Mal dreimal mit PBS (200µl/Well) gewaschen. Nach gründlicher Entfernung des PBS und Abwischen der 96-Well-Mikrotiterplatten mit 3% Incidin und 70% Ethanol/H₂O, erfolgte die Auswertung unter dem Immunfluoreszenzmikroskop. (Vergrößerung 200x, Öl-Immersion, Filter 09, Anregungswellenlänge: 450-490 nm)

Die HAV-spezifische Immunfluoreszenz erscheint ausschließlich im Cytoplasma und ist anhand von punktförmigen granulären grünem Leuchten erkennbar. Die Berechnung der TCID₅₀/ml erfolgte mit Hilfe der Spearman-Kärber Gleichung.

Spearman-Kärber-Gleichung

$-\log TCID_{50} = \log \text{größte Viruskonz.} - [(\text{Summe infizierter Wells pro Verdünnungsstufe (in \%)} / 100 - 0,5) * \log \text{Verdünnungsfaktor}]$

3.4.2 Bestimmung der TCID₅₀/ml von NDV

3.4.2.1 Austitration von Viruslysat und Mock-Lysat auf FRhK-4-Zellen

Die FRhK-4-Zellen wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten kultiviert. Bei Erreichen einer vollständigen Konfluenz wurde von dem zu titrierendem Viruslysat eine dekadische Verdünnungsreihe ($10^{-1} - 10^{-9}$) in 1% FCS-DMEM erstellt und im Anschluss an einen Waschgang (PBS, 200µl/Well) auf die Zellen aufgebracht (100µl/Well). Vom Mocklysat wurde keine Verdünnungsreihe erstellt. Nur lediglich 5 Wells wurden mit je 100µl des unverdünnten Mocklysates beschickt. Die 96-Well Mikrotiterplatten wurden bei 37°C und 5% CO₂ für eine Woche inkubiert.

3.4.2.2 Bestimmung der TCID₅₀/ml von NDV mittels Cytophatischen Effektes

Nach einer Woche erfolgte die Auswertung des Cytophatischen Effektes (CPE) unter dem Lichtmikroskop. Der CPE lässt sich anhand von sich ablösenden Zellen und bereits etablierten Löchern im Zellrasen deutlich erkennen. Die Berechnung der TCID₅₀/ml erfolgte, wie bei der HAV-Titration, mit Hilfe der Spearman-Kärber Gleichung (Abschnitt 3.4.1.3).

3.5 Infektion von Zellen

Die Infektion der Zellen erfolgte, wenn im Ergebnisteil nicht anders angegeben, nach dem folgenden Schema.

3.5.1 Infektion mit dem Hepatitis A-Virus (HAV)

Zum Erhalt von seit 10 Tagen mit dem Hepatitis A-Virus infizierten FRhK- und FRhK-4-Zellklonen wurden die Zellen zunächst in 80-cm²-Zellkulturflaschen umgesetzt (Split 1:5). Nach Erreichen einer 60-80%igen Konfluenz wurden die Zellen am nächsten Tag einmal mit PBS (10ml/80-cm²-Zellkulturflasche) gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Infektion der Zellen unter Zugabe von 1ml HAV/7-Lysat (MOI ~1) beziehungsweise 1ml Mock-Lysat zu 2ml 1% FCS-DMEM für zwei Stunden bei 37°C. Während der Infektion wurden die Zellkulturflaschen alle 30 Minuten vorsichtig geschwenkt, im Anschluss noch einmal mit PBS (10ml/80-cm²-Zellkulturflasche) gewaschen und nach Zugabe von 17ml 1% FCS-

DMEM für 10 Tage bei 37°C inkubiert. Dabei erfolgte nach 5 Tagen ein halber Mediumwechsel.

Für die Anfertigung der Kinetik zur Expression von IRF-7 in HAV-infizierten FRhK-4-Zellen wurden letztere, wie oben beschrieben, mit HAV/7-Lysat oder Mock-Lysat infiziert. 1, 2, 3, 6, 7, 10 und 14 Tage nach der Infektion erfolgte die RNA-Extraktion aus den Zellen.

Die Infektion der PBMCs erfolgte entweder direkt im Anschluss an die Isolierung der Zellen aus Buffy-Coats oder nach einer Woche Kultur mit HAV_{GBM}. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS (1ml/Well einer 24-Well-Zellkulturplatte) gewaschen und dann mit der entsprechenden Menge HAV-Lysat (MOI 0.625, 1, 1,25, 2, 2,5, 5, 12) oder Mock-Lysat in einem Endvolumen von 270µl oder 500µl Erhaltungsmedium pro Well einer 24-Well-Zellkulturplatte infiziert.

Die Infektion der U937-Zellen wurde sowohl mit HAV/7 als auch mit HAV_{GBM} durchgeführt. Nach einem anfänglichen Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten oder 96-Well-Mikrotiterplatten umgesetzt. Die Infektion erfolgte in einem Endvolumen von 100µl/1ml 1% beziehungsweise 10% FCS-RPMI bei unterschiedlichen MOIs (1, 2,5, 3, 10, 20, 50, 1000, 2000) und Zellzahlen (~1, 10, 100, 1000, 10000, 100000, 160000, 2000000). Im Anschluss an die Infektionszeiten (2, 4, 12, 24 Stunden) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und unter Zugabe von 10% FCS-RPMI weiterkultiviert. Die Induktion mit PMA fand einen oder drei Tage vor der Infektion oder 0, 1, 2, 5, 13, 19, 21 beziehungsweise 79 Tage nach der Infektion mit HAV statt. Aufgrund von Schwierigkeiten bezüglich der Infektion von U937-Zellen mit HAV wurden die Zellen zum Teil 1, 8, 14, 40 oder 62 Tage im Anschluss an eine bereits durchgeführte Infektion abermals mit HAV infiziert.

3.5.2 Infektion mit dem Newcastle Disease Virus (NDV)

Die zu infizierenden Zellen wurden einmal mit PBS (6-cm²-Zellkulturschale: 5ml, 6-Well-Zellkulturplatte: 3ml/Well, 24-Well-Zellkulturplatte: 1ml/Well) gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe der entsprechenden Menge Virus-/Mock-Lysat zum Erhalt einer MOI von 1, beziehungsweise 10 zu 1% FCS-DMEM. Dabei betrug das Endvolumen bei 6-cm²-Zellkulturschalen 2ml, 6-Well-Zellkulturplatten 1ml/Well und bei 24-Well-Zellkulturplatten

396ml/Well. Die Zellkulturgefäße wurden weiterhin bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte entweder 8 oder 18 Stunden später.

3.6 Mycoplasmen-Detektionsverfahren

Mycoplasmen sind Einzeller, welche die Stoffwechseleigenschaften von mit ihnen kontaminierten Zelllinien beeinflussen können. Zur Überprüfung einer eventuellen Mycoplasmenkontamination der Zelllinien und Viruspools wurden in regelmäßigen Abständen Tests zum Nachweis von Mycoplasmen durchgeführt.

3.6.1 DAPI-Test

Zum Nachweis einer Mycoplasmenkontamination von Zelllinien wurde eine unspezifische DNA-Färbung mittels 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gewählt. DAPI leuchtet unter dem Fluoreszenzmikroskop (Filter 02: Anregungswellenlänge: 365nm) bläulich. Bei kontaminierten Zellen lässt sich extrachromosomale DNA in Form von kleinen y-förmigen bis runden, filigranen Strukturen erkennen. Diese treten meist neben dem ebenfalls unter UV-Licht leuchtenden lokal begrenzten Zellkern (chromosomale DNA) auf.

Zur Durchführung eines DAPI-Test zum Nachweis von Mycoplasmen in FRhK-4-, FRhk-4-Zellklone, WISH-, MRC-5-, Hek-293- und U937-Zellen wurden runde Glasplättchen in die Wells einer 24-Well-Zellkulturplatte eingesetzt und Zellen, der zu testenden Zellkultur, in folgenden Splitverhältnissen und der Zelllinie entsprechenden Wachstumsmedien eingesät.

FRhK-4-, FRhK-4-Zellklone und WISH-Zellen: Splitverhältnis 1:8

MRC-5- und HEK-293-Zellen: Splitverhältnis 1:5

U937-Zellen: 2×10^5 Zellen/Well

Die 24-Well-Zellkulturplatten wurden für ein und drei Tage im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen (1ml/Well). Danach erfolgte ein Waschschrift mit einem Gemisch aus PBS/Carnoy's (1:1, PBS/Carnoy's, kalt, 1ml/Well) und zum Schluss ein Waschschrift mit Carnoy's (kalt, 1ml/Well) allein. Abweichend dazu erfolgten bei den U937-Zellen keine Waschschriffe. Da sie in Suspension wachsen, wurden die 24-Well-Zellkulturplatten mit den

U937-Zellen zunächst zentrifugiert, um die Zellen auf den Boden der Wells zu drücken (1200rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 5 Minuten, RT). Nach Abnahme des Wachstumsmediums von den zentrifugierten U937-Zellen und des PBS/Carnoy's (1:1) von den übrigen Zelllinien, wurden im Folgenden alle Ansätze gleich behandelt. Die Fixierung der Zellen auf den Glasplättchen erfolgte mittels Carnoy's (kalt, 200µl/Well) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Abnahme der Fixierungslösung erfolgte ein Waschschriff (H₂O, 1ml/Well) und die anschließende Zugabe von 50µl/Well DAPI (1:1000 in H₂O) für 10 Minuten bei RT im Dunkeln. Im Anschluss wurden die Zellen ein weiteres Mal gewaschen (1ml H₂O/Well) und die Glasplättchen vorsichtig aus den Wells genommen und auf Glasobjekträger aufgebracht (Abschnitt 3.16.1: „Einlegen/Entfernen von Glasplättchen“). Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. (63x/100x Objektiv, Öl-Immersion, Filter 02: Anregungswellenlänge: 365nm)

3.6.2 Mycoplasmen-PCR

Mit Hilfe des VenorGeM^R Mycoplasma Detection Kit von minerva biolabs wurden Zellkulturüberstände, Virus- und Mocklysate mittels PCR auf Mycoplasmen getestet. Bei dieser Methode richten sich die verwendeten Primer gegen einen Abschnitt der 16S-rRNA-Genomsequenz, sodass verschiedenste *Mycoplasmaspecies* (inklusive *Acholeplasma*- und *Ureaplasmaspecies*) detektiert werden können. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Von der zu untersuchenden Zelllinie wurde 100µl Zellkulturüberstand in ein steriles Eppendorfcup überführt (Analog hierzu konnten 100µl eines zu überprüfenden Viruslysates/Mocklysates eingesetzt werden). Dies erfolgte, sobald eine 90% Konfluenz (FRhK-4-, FRhK-4 Zellklone, Hek293-, WISH- und MRC-5-Zellen) oder einer Zelldichte von 2Mill. Zellen/ml (U937-Zellen) erreicht wurde. Die Proben wurden 5 Minuten bei 95°C erhitzt und im Anschluss zentrifugiert (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 5 Sekunden). Aus dem Überstand der so vorbehandelten Proben wurden 2µl in die PCR eingesetzt. Dazu wurden zuvor 48µl des Mastermix in das PCR-Cup vorgelegt, die 2µl der jeweiligen Probe hinzupipettiert und die PCR-Cups in den Thermocycler überführt. Zusätzlich wurden 2µl einer Negativ- und 2µl einer zum VenorGeM^R Mycoplasma Detection Kit gehörenden Positivkontrolle mitgeführt. Nach Ablauf der PCR-Reaktion wurden die PCR Produkte (15µl PCR-Ansatz + 5µl PCR-Probenpuffer) auf ein 1,5% Agarose-Gel aufgetragen und für eine

Stunde bei 80V elektrolytisch aufgetrennt. Als Marker diene der Marker VIII von Roche. Die Auswertung erfolgte auf dem UV-Tisch und bestand aus einem Abgleich der Banden der zu testenden Proben mit den Banden, der in dem verwendeten Kit mitgelieferten Kontrollen (Mycoplasmen negativ/-positiv).

3.7 Induktion von Zellen

U937-Zellen werden als eine Modellzelllinie der Monozyten-zu-Makrophagen Differenzierung verwendet (Einleitung, Abschnitt 1.4.2: „Die mononukleäre Differenzierung“). Dabei handelt es sich um nicht adhärente, in Suspension wachsende Zellen. Durch Zugabe des Phorbolesters „Phorbol 12-myristate 13-acetate“ (PMA) differenzieren sie sich zu makrophagen-ähnlichen Zellen. Phänotypische Veränderungen dieser Differenzierung sind Adhärenz, Größenzunahme und die Ausbildung von Pseudopodien. Auf molekularer Ebene treten makrophagen-typische Veränderungen der Oberflächenantigene auf (z.B.: Verstärkte Expression des Oberflächenrezeptors CD11b) (Lu und Pitha 2001). Desweiteren werden differenzierungsspezifische Veränderungen der U937-Zellen nach Interferon-Stimulation beschrieben.

3.7.1 Induktion von U937-Zellen mit PMA

Zur Induktion der U937-Zellen mit PMA wurden die Zellen in folgenden Zellzahlen pro Zellkulturgefäß umgesetzt und mit 10ng PMA/ml Wachstumsmedium induziert.

96-Well-Mikrotiterplatte: 35.000 Zellen/Well, 100µl Wachstumsmedium

24-Well-Zellkulturplatte: 200.000 Zellen/Well, 1ml Wachstumsmedium

6-cm²-Zellkulturschale: 2.300.000 Zellen, 4ml Wachstumsmedium

25-cm²-Zellkulturflasche: 2.600.000 Zellen, 7 ml Wachstumsmedium

75-cm²-Zellkulturflasche: 7.800.000 Zellen, 20 Wachstumsmedium

3.7.2 Induktion von U937-Zellen mit Interferon (IFN- α 2a, IFN- β)

Zur Induktion der U937-Zellen mit Interferon (IFN) wurden 2×10^5 Zellen/Well in eine 24-Well Zellkulturplatte umgesetzt und verschiedene Konzentrationen (IFN- α 2a, IFN- β) dem Wachstumsmedium zugesetzt. Dabei betrug das Gesamtvolumen pro Well nach Zugabe des Interferons 1ml. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

3.7.3 Induktion von FRhK-4-Zellen mit poly-IC (Transfektion, DEAE-Dextran Methode)

Zur Auslösung eines antiviralen Status (Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, Expression von Interferon) und der letztlich damit verbundenen Induktion von Interferon-spezifischen Genen, können Zellen mit dem künstlichen, doppelsträngigen RNA Analogon „Poly-Inosinsäure:poly-Cytidylsäure,, [poly(IC)] transfiziert und somit induziert werden.

Zur Transfektion der Zellen mit poly(IC) wird „Diethylaminoethyl-Dextran“ (DEAE-Dextran) verwendet. Die sich bildenden poly(IC)/DEAE-Dextran Komplexe besitzen, aufgrund der Diethylaminoethyl-Reste des DEAE-Dextrans, eine positive Nettoladung und können von der Zelle aufgenommen werden. Als Kontrollen der poly(IC) spezifischen Wirkung dienen Zellen, welche nur mit DEAE-Dextran (ohne poly(IC)) oder 0%FCS-DMEM Medium behandelt werden.

Die mit poly(IC) zu transfizierenden FRhK-4-Zellen wurden entweder in 6-Well-Zellkulturplatten oder in 6-cm²-Zellkulturschalen eingesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen (6-Well-Zellkulturplatte: 2ml/Well, 6-cm²-Zellkulturschale: 4ml). Im Anschluss erfolgte die Zugabe der jeweiligen Induktionsmische (6-Well-Zellkulturplatte: 2ml/Well, 6-cm²-Zellkulturschale: 4ml/Well). Die Induktionsmische verblieben für zwei Stunden (37°C, 5% CO₂) auf den Zellen. Danach wurde das Inokulum von den Zellen entfernt und ein weiterer Waschschrift mit PBS durchgeführt (6-Well-Zellkulturplatte: 2ml/Well, 6-cm²-Zellkulturschale: 4ml). Zum Schluss erfolgte die Zugabe von Erhaltungsmedium (1%FCS-DMEM, 6-Well-Zellkulturplatte: 2ml/Well, 6-cm²-Zellkulturschale: 4ml) und eine 16-18 stündige Inkubation (37°C, 5% CO₂) mit anschließender Auswertung.

3.8 Bestimmung der Interferonkonzentration in Zellkulturüberständen

Die Bestimmung der Konzentration von Interferon in Zellkulturüberständen erfolgte zum einen mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen IFN- α -ELISA-Kits (Bender MedSystems) und zum anderen mit einem Plaquereduktionsassay. Dabei wurde der IFN- α -ELISA entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die einzige Abänderung bestand darin, dass bereits der höchste Standard 1:10 vorverdünnt wurde. Demensprechend wurden in den IFN- α -ELISA folgende Standardkonzentrationen eingesetzt: 50pg/ml, 25pg/ml, 12,5pg/ml, 6,25pg/ml, 3,125pg/ml, 1,5625pg/ml, 0,78125pg/ml und 0,390625pg/ml.

Im Falle des Plaquereduktionsassays löst auf WISH-Zellen aufgebracht interfeonhaltiger Zellkulturüberstand in den Zellen einen antiviralen Status aus. Damit sind die Zellen gegen eine spätere Infektion mit dem Vesicular-Stomatitis Virus (VSV) geschützt. Das VSV hat in den WISH-Zellen einen Cytophatischen Effekt zur Folge, welcher sich, nach Überschichtung der Zellen mit methylcellulosehaltigem Zellkulturmedium anhand von kleinen Plaques im Zellrasen gut erkennen lässt. Dabei wird davon ausgegangen, dass jeder Plaque seinen Ursprung in nur einem Viruspartikel hat. Durch Rücktitration der im Versuch eingesetzten VSV-Konzentration auf nicht mit interfeonhaltigem Zellkulturmedium vorbehandelten Zellen und die hierdurch mögliche Ermittlung der um 50% reduzierten Plaquezahl, lässt sich die Konzentration von Interferon in den eingesetzten Zellkulturüberständen anhand folgender Formel berechnen:

$$E = VN + [(P50-PN)(VH-VN)/(PH-PN)]$$

E Interferonaktivität des getesteten Zellkulturüberstandes.

VN reziproke Wert der niedrigsten Verdünnung, die an den Wert für die 50%ige Plaquereduktion angrenzt.

P50 Die um 50% reduzierte Plaquezahl, zu berechnen aus der Rücktitration.

PN Anzahl der Plaques in der Verdünnung VN.

VH reziproke Wert der höchsten Verdünnung, die an den Wert für die 50%ige Plaquereduktion angrenzt.

VN reziproke Wert der niedrigsten Verdünnung, die an den Wert für 50%ige Plaquereduktion angrenzt.

PH Anzahl der Plaques in der Verdünnung VH.

PN Anzahl der Plaques in der Verdünnung VN.

Zudem wurde ein laborinterner IFN- α -Standard (LIS huIFN- α), welcher am Internationalen NIH-Standard kalibriert wurde, mit aufgetragen. Mit Hilfe dieses Standards erfolgte die Berechnung der Internationalen Interferoneinheiten (IU/ml). Dazu wurde die im jeweiligen Test ermittelte Interferonaktivität (Istwert) des mitgeführten LIS huIFN- α mit dem Sollwert des Laborstandards verglichen und der Multiplikationsfaktor aus dem Verhältnis Sollwert :

Istwert errechnet. In der Folge konnte durch Multiplikation der ermittelten Interferonaktivität mit dem für den jeweiligen Versuch ermittelten Multiplikationsfaktor die IU/ml bestimmt werden.

3.8.1 Plaquereduktionsassay

Zunächst wurden WISH-Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten (Splitverhältnis 1:4) eingesetzt. Bei Erreichen einer 100% Konfluenz nach 4-5 Tagen erfolgte das Aufbringen verschiedener Verdünnungsstufen (1:2 bis 1:4096) des, auf seinen Interferongehalt zu testenden, Zellkulturüberstandes. Dazu wurde zunächst das Wachstumsmedium aus sämtlichen Wells (auch aus denen für die spätere Rücktitration zu verwendenden) entfernt und durch 100µl/Well neues 1% FCS/DMEM-Zellkulturmedium ersetzt. Die Anfertigung der Verdünnungsreihen erfolgte direkt in den Wells, in denen sich, nach Abschluss der Verdünnungen, pro Well 100µl Zellkulturmedium/Zellkulturüberstand befanden. Dabei wurde ein Well pro Verdünnungsstufe verwendet. Es folgte eine 20-stündige Inkubation (37°C, 5% CO₂), der sich ein zweimaliger Waschschriff (200µl HBSS/Well) anschloss. Nun erfolgte die Infektion der Zellen mit dem Vesicular-Stomatitisvirus. Dazu wurden, nach Abnahme der HBSS, pro zuvor mit Zellkulturüberstand inokulierten Wells 50µl einer in 0% FCS/DMEM-Medium auf 80pfu/50µl vorverdünnten VSV-Suspension pipettiert. Für die Rücktitration wurden von der eingesetzten VSV-Suspension 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 Verdünnungen in 0% FCS/DMEM-Medium angesetzt und in nicht vorbehandelte Wells aufgebracht.

Die Inokulation erfolgte für eine Stunde (37°C, 5% CO₂). Im Anschluss wurde das VSV-Inokulum abgesaugt und jedes Well mit 1% Methylcellulosemedium überschichtet. Nach einer weiteren Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die Auswertung zwei Tage später. Hierzu wurde zunächst das Methylcellulosemedium abgesaugt und die Zellen mit 4% Formaldehydlösung (200µl/Well) für 15 Minuten bei RT fixiert. Nach einem anschließenden Waschschriff mit dest. H₂O (300µl/Well) erfolgte die Anfärbung der Zellen mit 4% Kristallviolettlösung (10 Minuten, RT). Ungebundenes Kristallviolett wurde durch mehrmaliges Waschen der Platte mit Wasser entfernt, die Platten restlos getrocknet (Dauer: ca 2 Tage) und zum Schluss die Plaquezahl/Well bestimmt (Abschnitt 3.8: „Bestimmung der Interferonkonzentration in Zellkulturüberständen“).

3.9 Extraktion von Proteinen aus Zellen

Die Zellyse dient der Isolierung von Proteinen aus Zellen (FRhK-4-, MRC-5-, U937-Zellen). Das resultierende Proteinlysate kann in weiteren Experimenten (Luciferase-Assay, Immunoblot) auf das Vorhandensein spezifischer Proteine (z.B. aktiven/inaktiven Transkriptionsfaktoren) untersucht werden.

3.9.1 Freeze & Thaw Lysis

Die Zellen wurden zweimal mit PBS (6-cm²-Zellkulturschale: 2ml, 6-Well-Zellkulturplatte: 1ml) gewaschen. Anschliessend erfolgte die Zugabe von TEN-Puffer (6-cm²-Zellkulturschale: 1,5ml, 6-Well-Zellkulturplatte: 1ml/Well) und eine 15-minütige Inkubation auf Eis, während derer die Zellkulturgefäße mehrfach vorsichtig geschwenkt wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellkulturgefäße von dem Eis genommen und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer 1000µl Pipette vollständig vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst. Die so erhaltene Zellsuspension wurde in ein 1,5ml Eppendorfcup überführt und die Zellen durch Zentrifugation (9000 rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 2 Minuten) vom TEN-Puffer getrennt. Nach vorsichtiger Abnahme des TEN-Puffers wurde das Zellpellet in 50-100µl (abhängig von der Pelletgröße) Tris-HCl resuspendiert. Zur Lyse der Zellen folgte danach ein dreimaliges Einfrieren (Ethanol [-80°C], 7 Minuten) mit anschließendem Auftauen (37°C, 2 Minuten. Nach Ablauf der 2 Minuten wurden die Eppendorfcups ca. 20 Sekunden geschüttelt). Nach dem dritten Auftauschritt (ab jetzt wurde nur noch auf Eis gearbeitet) wurde das Zellysate ein weiteres Mal zentrifugiert (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 5 Minuten). Im Überstand befinden sich nun die Proteine der lysierten Zellen. Nach Abnahme und Alliquottierung (z.B. für die spätere Bestimmung der Proteinkonzentration) des Überstandes wurde dieser bei -80°C eingefroren.

3.9.2 Zellysis-Puffer

Die Zellen wurden einmal mit Trypsin-EDTA (6-cm²-Zellkulturschale: 2ml, 6-Well-Zellkulturplatte: 1ml/Well) gewaschen. Anschliessend erfolgte die Zugabe von Trypsin-EDTA (6-cm² Zellkulturschale: 2ml, ,6-Well-Zellkulturplatte: 1ml/Well) und eine 2-10 minütige

Inkubation (Die Dauer ist von dem verwendeten Zelltyp abhängig) bei 37°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden noch auf dem Boden des Zellkulturgefäßes verbleibende Zellen mit Hilfe einer 1000µl Eppendorfpipette (Auf- und Abpipettieren) vom Boden gelöst. Die so erhaltende Zellsuspension wurde sogleich in ein 15ml Falconröhrchen überführt, durch Zugabe von 10ml 10%FCS-DMEM-Medium, das Trypsin-EDTA deaktiviert und die Zellen durch Zentrifugation (1200 rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 5 Minuten) vom Trypsin/10%FCS-DMEM-Medium getrennt. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 1000µl PBS resuspendiert und in ein 1,5ml Eppendorfcup überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (9000 rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 5 Minuten), in dessen Anschluss der Überstand ein weiteres mal vorsichtig abgenommen und verworfen wurde. Zur Lyse der Zellen wurde das verbleibende Zellpellet in Lysis-Puffer resuspendiert. Die Menge des eingesetzten Lysis-Puffers hing hier von der Größe des Pellets ab und entsprach etwa dem 2,5fachen des Volumens (ca 20-35µl) des Pellets. Zur Inaktivierung von Proteasen und Phosphatasen konnte dem verwendeten Lysis-Puffer noch ein Proteaseinhibitor-Cocktail (150µl/ml) und/oder ein Phosphataseinhibitor (10µl/ml) zugesetzt werden. Es folgte eine 45 minütige Inkubation auf Eis und eine anschließende Zentrifugation (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 10 Minuten, 4°C), in deren Anschluss alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt wurden. Im Überstand befanden sich nun die Proteine der lysierten Zellen. Nach Abnahme und Aliquotierung (z.B. für die spätere Bestimmung der Proteinkonzentration) des Überstandes wurde dieser bei -80°C eingefroren.

3.9.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration von Zelllysaten wird mit Hilfe des Bradfordreagenzes durchgeführt. Bradford alleine hat ein Absorptionsmaximum von 470nm. Nach Zugabe von Proteinen (Bradford bindet an die Proteine) erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in Richtung 595nm. Mit Hilfe einer Eichgraden, welche die Absorptionsmaxima des Bradfordreagenzes bei definierten Proteinkonzentrationen angibt, kann die Proteinkonzentration von jedem beliebigen Zelllysate bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen von Zelllysaten wurde das Bradfordreagenz zunächst 1:5 mit H₂O verdünnt, im Anschluss filtriert (Filterpapier) und dunkel gelagert. Nun wurden jeweils 1000µl des angefertigten Bradfordreagenz zu 5µl des zu messenden Zelllysates (Vorgelegt in Plastikküvetten. Bei dem durch Zelllysepuffer gewonnenen

Zelllysaten musste das Zelllysate 1:5 mit H₂O vorverdünnt werden) pipettiert und gut vermischt. Nach Ablauf von 15 Minuten erfolgte die Messung des Absorptionsmaximums bei 595nm. Mit Hilfe der Eichgeraden konnte die Proteinkonzentration des Zelllysates ermittelt werden. Als Blankwert galt bei Zelllysaten, gewonnen mit Hilfe der „Freeze & Thaw Lysis“ 5 µl Tris-HCl und bei solchen, gewonnen mit Hilfe eines Lysispuffer, 5 µl des jeweiligen Lysis-Puffers. Die Proteinkonzentration vom Blank wurde von allen übrigen Proben subtrahiert.

Eichgerade zur Proteinbestimmung nach Bradford:

Erstellt mit einer BSA Stammlösung (10mg/ml), welche mit 0,25-M Tris-HCl auf verschiedenen Endkonzentrationen verdünnt wurde (Endkonzentration [mg/ml]: 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0). Messung der jeweiligen Absorption bei 595nm.

3.10 Luciferase-Assay

Zur Ermittlung der Aktivität der Promotoren des Interferon- α 6- und des IFN- β -Gens, wurden diese Promotorsequenzen so in Plasmide einkloniert, dass deren Aktivierung die Transkription eines Luciferasegens auslöst. Über die Detektion der Luciferaseaktivität im Zelllysate können Aussagen bezüglich der Promotoraktivität-/Aktivierung, der mit dem jeweiligen Plasmid transfizierten Zellen, getroffen werden. Dabei wird die Aktivität der Luciferase anhand der Lumineszenz gemessen, welche bei dem Umsatz des Luciferase Substrats (Beetle Luciferin) zu Oxyluciferin durch die Luciferase freigesetzt wird. Mit Hilfe des Luciferase-Assays lässt sich die Luciferaseaktivität in jedem beliebigen Zelllysate bestimmen.

Zunächst wurden 25µg Zelllysate (im Schnitt etwa 5-15µl) der zu untersuchenden Probe mit 1xCLL auf 25µl aufgefüllt und auf Eis gelagert. Von den so erhaltenen Proben wurden 20µl pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Durch Zugabe des bereits aufgetauten, handwarmen Luciferasesubstrats (100µl/Well, gut durchmischen) wurde sodann die Reaktion zum Nachweis der Luciferaseaktivität gestartet. Die Zugabe des Luciferasesubstrates und die anschließende Messung der Lumineszenz mit Hilfe des Luminometers erfolgte jeweils im Abstand von 10 Sekunden. Zudem wurden, aufgrund der kurzen Halbwertszeit der Lumineszenz ($t_{0,5}$ ~ 10 Minuten, starke Aktivität: ~ eine Minute), nur je 10 Proben gleichzeitig ausgewertet. Als Blank wurde ein Ansatz verwendet, in dem anstatt Zelllysate lediglich 1xCLL Puffer eingesetzt wurde. Die im Blank gemessene Lumineszenz wurde von

allen übrigen Proben subtrahiert.

3.11 Proteinnachweis (IRF-7, β -Actin) mittels Immunoblot (WesternBlot)

Mit Hilfe dieser Methode lassen sich zuvor denaturierte Proteine in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch ihrer Größe nach auftrennen. Dabei verleiht die negative Ladung des SDS diesen eine negative Nettoladung durch Assoziation mit hydrophoben Aminosäureresten der Proteine, wodurch sie die Fähigkeit erlangen, in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode zu wandern. Nach anschließender Renaturierung, einem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran und der Inkubation mit spezifischen Antikörpern, lassen sich bestimmte Proteine in einem durch Lysepuffer gewonnenen Zellysat nachweisen. Der Schritt der Renaturierung ist für die Rückfaltung der Proteine in ihre native Konformation und der damit einhergehenden Wiederherstellung spezifischer Epitope für die Erkennung durch Antikörper essentiell.

Zum Nachweis von Phosphorylierungsstadien der Proteine können dem Zellysepuffern Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zugesetzt werden.

3.11.1 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Im Vorfeld des Aufbaus der Gelgießkammer erfolgte eine gründliche Reinigung der Keramik-/Glasplatten. Dazu wurden selbige einmal mit Isopropanol, einmal mit einem Gemisch aus Isopropanol und Ethanol sowie zweimal mit Ethanol abgerieben.

Nach Aufbau der Gelgießkammer wurde zunächst ein 10% SDS-Polyacrylamid-Gel (Trenngel) angesetzt und mit der Saugpumpe für 10 min entgast. Zum Auslösen der Polymeration erfolgte die Zugabe von 5 μ l TEMED und 50 μ l 10% Ammoniumpersulfat. Nach gründlicher Durchmischung wurde die Gelgießkammer zu ca 2/3 zügig mit dem Trenngel befüllt und zugleich mit 0,1% SDS überschichtet. Hiernach wurde Frischhaltefolie über die Gelgießkammer gedeckt. Die vollständige Polymerisation des Trenngels erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Am nächsten Tag wurde ein 3% SDS-Polyacrylamid-Gel (Sammelgel) angesetzt und mit der Saugpumpe für 10 min. entgast. Während der Entgasung wurde restliches, sich auf dem Trenngel befindliches SDS, vorsichtig, aber gründlich abgenommen

(Wathmannpapierstreifen). Die Polymerisation des Sammelgels wurde durch die Zugabe von 10µl TEMED und 50µl 10% Ammoniumpersulfat ausgelöst. Nach gründlicher Durchmischung wurde das Sammelgel dann zügig über das Trenngel gegossen und die benötigten Kämme in das Trenngel gesteckt. Die Gelgießkammer wurde danach abermals mit Folie abgedeckt und das Gel eine Stunde bei Raumtemperatur polymerisieren gelassen.

Während der Auspolymerisation des Sammelgels erfolgte die Vorbereitung der Proben. Dazu wurden 50-80µg des mit Lysepuffer gewonnenen Zellysates mit Proteinprobenpuffer versetzt (Endvolumen: 30µl, Verhältnis Zellysat:Proteinprobenpuffer 1:1 bis max 1:6). Im Anschluss wurden die Proben zunächst einer Ultraschallbehandlung (2x20 Sekunden: 20kHz/200W, Eis) unterzogen und hiernach 5 min bei 95°C denaturiert. Bis zum Auftragen der so vorbereiteten Proben wurden diese auf Eis gelagert.

Nach Auspolymerisierung des Sammelgels wurde dieses in die Elektrophoresekammer „Mighty Small“ überführt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Kämme wurden vorsichtig gezogen und die Gelkammern zuerst mit 0,1% Bromphenolblau und im Anschluss mit Elektrophoresepuffer ausgespült. Die Proben wurden kurz in der Hand aufgewärmt und dann, nach einem nochmaligem Ausspülen der betreffenden Gelkammer mit Elektrophoresepuffer, vollständig in die Kammern pipettiert. Desweiteren wurden 5µl des Proteinmarkers „Broad Range“ oder „pre-stained, low-range“ mit 10µl Proteinprobenpuffer versehen und ebenfalls in eine Gelkammer aufgetragen.

Der Gellauf erfolgte bei 75Volt für 1-3 Stunden (Abhängig von der Größe der zu erwartenden Proteine und der Laufeigenschaft des jeweiligen Trenngels).

3.11.2 Immunoblot (Westernblot)

Nach dem Gellauf wurde das Gel vorsichtig aus der Elektrophoresekammer genommen und das Sammelgel verworfen. Das Trenngel wurde in seiner Ausrichtung markiert, seine Maße ermittelt und für eine halbe Stunde in Renaturierungspuffer auf dem Taumler (Stufe 3) bei Raumtemperatur inkubiert. Von dem Trenngel wurden vier Stück Wathmannpapier und eine Nitrocellulosemembran in der entsprechenden Größe gefertigt. Im Anschluss an die Inkubation im Renaturierungspuffer erfolgte eine halbstündige Inkubation (Taumler (Stufe 3, RT) des Trenngels und der Nitrocellulosemembran in 1x Blottingpuffer. Hiernach erfolgte der Zusammenbau der Blotapparatur, wobei sich das Trenngel und die Nitrocellulosemembran zwischen je zwei Lagen Wathmannpapier befand (durchtränkt mit 1x Blottingpuffer). Der

Blot erfolgte in 1x Blottingpuffer für zwei Stunden bei 1,6-1,8 A (Nachjustierung der Amperezahl nötig), wobei die Spannung so an die Blotapparatur angeschlossen wurde, dass sich das Trenngel auf der zur Anode zeigenden Seite befand und die Proteine in Richtung Kathode auf die Nitrocellulosemembran geblottet wurden.

Ein erfolgreiches „Blotten“ der Proteine und des Markers vom Trenngel auf die Nitrocellulosemembran ließ sich an den Banden des Markers (jetzt auf der Nitrocellulosemembran) deutlich erkennen. Die Nitrocellulosemembran wurde sodann aus der Blotapparatur entfernt und zwecks Abdeckung unspezifischer Bindungen (Blockierung) für 4 Stunden in 5% Trockenmilch/TBST bei Raumtemperatur auf dem Taumler (Stufe 3) in kleinen Schalen inkubiert (Mit Frischhaltefolie abdecken).

Nach Ablauf der Blockierungszeit wurde die Blockierungslösung abgenommen und es erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers: (α -IRF-7, α - β -Actin, α -IRF-3, verdünnt in 5% Trockenmilch/TBST). Sollten zwei verschiedene Proteine auf einer Nitrocellulosemembran nachgewiesen werden, wurde die Nitrocellulosemembran im Anschluss an die Blockierung zerschnitten und die resultierenden Hälften mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. Die Bindung der primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Taumler (Stufe 3). Um einer Verdunstung der Antikörperverdünnungen vorzubeugen, wurden die Schalen abermals mit Frischhaltefolie abgedeckt.

Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper abgenommen (bei -20°C gelagert sind die Antikörperverdünnungen in 5% Trockenmilch/TBST bis zu viermal wiederverwendbar) und die Nitrocellulosemembran, zum Abwaschen nicht gebundener Antikörper, dreimal je 5 Minuten mit TBST gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die Zugabe des jeweiligen sekundären Antikörpers (IRF-7, IRF-3: goat-anti-rabbit (HRP); β -Actin: donkey anti-goat (HRP), 1:400 in 5% Trockenmilch/TBST) und eine weitere Inkubation für fünf Stunden bei Raumtemperatur auf dem Taumler ([Stufe 3], [gegen Verdunstung: Abdeckung mit Frischhaltefolie]).

Am Ende der letzten Inkubationszeit wurde der sekundäre Antikörper von der Nitrocellulosemembran entfernt (bei -20°C gelagert sind die Antikörperverdünnungen in 5% Trockenmilch/TBST bis zu viermal wiederverwendbar) und die Nitrocellulosemembran abermals dreimal je 5 Minuten mit TBST gewaschen.

Zum Schluss wurde das ECL-Reagenz (enhanced chemiluminescence) nach Herstellerangaben angesetzt und die Nitrocellulosemembran vollständig für eine Minute bei Raumtemperatur damit bedeckt. Das ECL-Reagenz ermöglicht hier eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) vermittelte Lichtreaktion. Zum Nachweis selbiger wurde das ECL-Reagenz

nach Ablauf der Inkubationszeit vorsichtig von der Nitrocellulosemembran entfernt, die Nitrocellulosemembran in Folie gelegt und für 20-120 Sekunden im Dunkeln ein Film (Kodak, Biomax-Film) aufgelegt. Die Entwicklung und Fixierung des Filmes erfolgte direkt im Anschluss mit Hilfe der Entwicklermaschine. Auf den so erhaltenen Bildern ließen sich spezifische Banden (Schwärzungen durch die Lichtreaktion) an den Stellen nachweisen, an denen zuerst der primäre und dann der sekundäre Antikörper gebunden hatten. Dabei waren anhand von Intensitätsvergleichen der Banden Aussagen über die relativen Proteinmengen möglich. Des Weiteren lieferten Markerbanden einen Aufschluss über das Molekulargewicht (kDa) der so nachgewiesenen Proteine.

3.12 Transformation von Bakterien

Plasmide können entweder gelöst in H₂O oder getrocknet auf Filterpapier aufbewahrt werden. Letztere müssen, vor Durchführung der Transformation, zunächst vom Filterpapier gelöst werden (Überführung des Filterpapiers oder eines kleinen Stückes davon in 50µl H₂O, 45 Minuten, 35°C, schüttelnd).

Kompetente Bakterien (*E.coli* HB 101) wurden langsam auf Eis aufgetaut. Nun folgte die Zugabe von 1µl Plasmid-DNA zu 30µl Bakterien und eine 20minütige Inkubation auf Eis. Die Transformation erfolgte im anschließendem Hitzeschock (42°C, 2 Minuten) und der darauf folgenden zweiminütigen Inkubation auf Eis. Ab diesem Schritt liegen gentechnisch veränderte Organismen (GVO's) vor (Aufzeichnungspflicht! spezifische Lagerung!). Nun wurden 320µl LB⁺⁺ Medium zum Ansatz hinzugegeben und die Ansätze für eine Stunde bei 37°C inkubiert (Schüttler). Während dieser Stunde erfolgt die Transkription sowie Translation der auf dem Plasmid kodierten Gene. Transformierte Bakterien bauen in diesem Schritt ihre Antibiotikaresistenz (z.B.: Ampicillin) auf. Im Anschluss erfolgte die Ausplattierung der Ansätze auf LB-Agarplatten, welche das dem Antibiotikaresistenzgen des transformierten Plasmides entsprechende Antibiotikum enthalten, und eine Inkubation (über Nacht) im Brutschrank (37°C).

Am nächsten Tag wurden gewachsene (transformierte) Bakterienklone isoliert und in 3ml LB-Medium (enthält das dem Antibiotikaresistenzgen entsprechende Antibiotikum) überführt. Die weitere Amplifikation des Bakterienklones erfolgte abermals über Nacht bei 37°C (schüttelnd).

Zur Ermittlung der Rate von spontan auftretenden Antibiotikaresistenzen sowie Kontaminationen mit Plasmid-DNA, wurde ein sogenannter H₂O Ansatz (H₂O anstelle der Plasmid-DNA) mitgeführt.

3.12.1 Schnelltest zur Überprüfung von Plasmid-DNA „Miniprep“

Dieser Test dient der Überprüfung der erfolgreichen Transformation von Bakterien. Dabei wird derjenige Bakterienklon ermittelt, welcher neben dem Antibiotikaresistenzgen des transformierten Plasmides auch alle weiteren auf dem Plasmid codierten Gensequenzen enthält.

3.12.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Transformation werden ca. 5µg Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien isoliert und ihre Qualität mittels Restriktionstest überprüft.

Dazu wurde 1ml (Lagerung der verbleibenden 2ml Bakterienkultur bei 4°C) der Bakterienkultur von den, wie unter Abschnitt 3.2.6 isolierten, in LB-Medium überführten und über Nacht inkubierten (37°C) Bakterienklonen in Eppendorfcups überführt und zentrifugiert (9000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 30 Sekunden). Nach Verwerfung des Überstandes erfolgte die Aufnahme des Bakterienpellets in Lösung1 (100µl, vortexen bis zur vollständigen Resuspendierung) und eine anschließende fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur zur Lyse der Bakterienzellen. Im Anschluss erfolgte durch Zugabe von 100µl der Lösung2 (5 Minuten bei 60°C, vortexen) eine weitere Lyse sowie eine Fällung der Proteine und durch Zugabe von 150µl der Lösung3 (15 Minuten auf Eis, kurz vortexen) eine wiederholte Fällung der Proteine. Nun wurden die Ansätze für 10 Minuten zentrifugiert (14000 rpm [Tischzentrifuge 5415 C]) und der, die Plasmid-DNA enthaltene, Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt. Durch Zugabe von 100% Ethanol (-20°C) wurde die DNA-Fällung eingeleitet (30 Minuten, -80°C), an die eine weitere Zentrifugation (14000rpm, 30 Minuten, 4°C) anschloss. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zur Waschung in 1ml 70% Ethanol (-20°C) resuspendiert und eine Zentrifugation (15000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 15 Minuten, 4°C) durchgeführt. Nach zweimaliger Durchführung des letzten Waschschrtes wurde das Pellet (Plasmid-DNA) in der SpeedVac getrocknet und in 50µl H₂O dest. aufgenommen (eventuell bei 37°C, 5 Minuten).

3.12.1.2 Restriktionsspaltungstest der isolierten Plasmid-DNA

Nach der Isolierung der Plasmid-DNA aus der transformierten Bakterienkultur, erfolgte eine Restriktionsspaltung zum Nachweis der Qualität der Plasmid-DNA (Abschnitt 3.15). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von DNA-Probenpuffer (6µl/Restriktionsansatz) gestoppt und die Ansätze auf ein 0,6% Agarosegel aufgetragen. Zur Identifizierung der DNA Größe wurde zusätzlich ein DNA-Marker (1kb-Marker, 6µl) und als Restriktionskontrolle ungeschnittene Plasmid-DNA mit aufgetragen. Nach Durchführung einer Gel-Elektrophorese (70V, 1 Stunde) erfolgte die Auswertung unter dem UV-Tisch. Durch Abgleich der Bandengrößen des Restriktionsansatzes mit denen des Markers, ließen sich die, aus dem Restriktionsschnitt resultierenden, Bandengrößen ermitteln. Bei Übereinstimmung der erhaltenen Bandengrößen mit den zu erwartenden, konnte davon ausgegangen werden, dass die Bakterien tatsächlich mit dem gewünschtem Plasmid transformiert wurden. Die getestete Bakterienkultur konnte weiter verwendet und kultiviert werden.

3.12.2 Plasmidreinigung (Maxiprep)

Mit Hilfe dieser Methode wird Plasmid-DNA in hohen Konzentrationen und Reinheit aus zuvor transformierten und kultivierten Bakterien extrahiert. Mit der so gewonnenen Plasmid-DNA können weitere Versuche (z.B Transfektion von Zellen) durchgeführt werden.

Nach Durchführung des Schnelltests zum Nachweis von Plasmid-DNA (Abschnitt: 3.12.1: „Schnelltest zur Überprüfung von Plasmid-DNA“) wurde der Bakterienklon, welcher das gewünschte Plasmid aufgenommen hat und im hohen Maße exprimiert, bestimmt und über Nacht in 5 ml LB-Medium (unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums) bei 37°C (Schüttler) inkubiert. Von dieser sogenannten ersten Übernachtskultur (ÜNK1) wurde durch Überführung von 20µl in frisches LB-Medium (5 ml, Antibiotikumzusatz) eine zweite Übernachtskultur (ÜNK2) angeimpft (37°C, Schüttler). Von dieser ÜNK2 wurden sodann 500µl in ein mit 500 ml LB-Medium (Antibiotikazusatz) befüllten Erlenmeyerkolben überführt und wiederum über Nacht bei 37°C (Schüttler) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension, nach Überführung in Zentrifugenröhrchen, zentrifugiert (4000rpm [Zentrifuge RC28S, Rotor: F-16/250], 20 Minuten, 4°C). Nachdem der Überstand verworfen wurde erfolgte die Resuspendierung des Bakterienpellets in 20ml TES-Puffer und eine anschließende Zentrifugation (5000 rpm [Zentrifuge RC28S, Rotor: F-28/50], 10 Minuten,

4°C). Der Überstand wurde abermals verworfen, das Pellet in 22 ml frischem STET-Puffer resuspendiert und in 100ml Erlenmeyerkolben überführt. Nach Zugabe von Lysozymlösung (1ml/Erlenmeyerkolben) wurde das Gemisch 40 Sekunden lang über der Bunsenbrennerflamme aufgeköcht und im Anschluss kurz auf Eis abgekühlt. Das, aus der so bewirkten Lyse der Bakterien, resultierende zähflüssige Gemisch wurde vorsichtig in Zentrifugenröhrchen überführt und 45 Minuten bei 16000 rpm (Zentrifuge RC28S, Rotor: F-28/50) zentrifugiert (4°C). Der gewonnene Überstand (das Pellet enthält hier: Zellwand- und Membranbestandteile sowie unlösliche Proteine) wurde in neue Zentrifugenröhrchen überführt und die DNA-Fällung durch Zugabe von 1 Volumenteil Isopropanol (gesamt max. 40ml, 15 Minuten, -80°C) ausgelöst. Hieran schloss ein weiterer Zentrifugationsschritt (12000 rpm [Zentrifuge RC28S, Rotor: F-28/50], 60 Minuten, 4°C) an. Nun wurde der Überstand verworfen und das Pellet in der SpeedVac vakuumgetrocknet (ca. 10 Minuten, Abdeckung: punktierter Parafilm). Nach Antrocknung des Pellets wurde dieses in 8,7 ml 1% Sarcosyl resuspendiert (37°C, Schüttler, ~1 Stunde). Die so erhaltene Plasmidlösung wurde sodann zu 9,4g CsCl gegeben. Nachdem sich das CsCl gelöst hatte, erfolgte die Zugabe von 900µl Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml in H₂O) und die Überführung in Quick-Seal Röhrchen. Ethidiumbromid interkaliert in DNA und kann unter UV-Licht sichtbar (gelb-rote Fluoreszenz) gemacht werden. Nach Überschichtung mit Mineralöl, sorgfältiger Austarierung der Röhrchen und deren Zuschweißung, wurde eine isopyknische Ultra-Zentrifugation bei 4°C durchgeführt (24 Stunden: 50000 rpm, 20 Stunden: 55000 rpm, 36 Stunden: 41000 rpm, drei Tage: 33000 rpm, [Ultrazentrifuge LE-70]). Im Verlauf der Ultrazentrifugation bildet sich ein CsCl-Gradient im Röhrchen. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte von genomischer DNA und Plasmid-DNA sammeln sich diese in verschiedenen Dichtebereichen und werden unter UV-Licht sichtbar.

Nach der Ultrazentrifugation wurde die Plasmid-DNA-spezifische Bande (höhere Dichte als genomische DNA!) unter UV-Licht mit Hilfe einer Kanüle abgezogen und in ein Falconröhrchen überführt. Es erfolgte die Zugabe einer CsCl-Lösung (Refr.-Index 1,3865) auf ein Gesamtvolumen von 12 ml und die erneute Überführung in Quick-Seal Röhrchen. Diese wurden abermals sehr sorgfältig austariert, zugeschweißt und in die Ultrazentrifuge überführt (50000 rpm, 24 Stunden, [Ultrazentrifuge LE-70]). Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA-haltige Bande abermals abgezogen und das Ethidiumbromid, unter Zugabe von jeweils einem Volumenteil H₂O-gesättigtem Isopropanol, aus der Plasmidlösung entfernt (5-7x: Zugabe von Isopropanol, schütteln und obere, ethidiumbromidhaltige Phase, entsorgen). Nach der letzten Zugabe von Isopropanol wurden die Ansätze kurz zentrifugiert (2000 rpm

[Tischzentrifuge GS-6R], 2 Minuten), die nun sehr deutliche obere Phase vorsichtig entsorgt und die untere Phase auf Ethidiumbromidrückstände hin überprüft. Dazu wurde ein Tropfen entnommen und unter UV-Licht auf Ethidiumbromid spezifische Fluoreszenz untersucht. Die untere Phase enthielt nun die reine Plasmidlösung. Zur Entfernung des CsCl aus der Plasmidlösung wurde eine Dialyse durchgeführt. Dazu wurde die Plasmidlösung in Dialyseschläuche überführt und in 4 Litern (5mM Tris, pH 8,0, 4°C, Rührfisch) über Nacht inkubiert (Auswechslung der 5mM Tris mindestens dreimal).

An die Dialyse an schloss die photometrische Bestimmung von Konzentration/Reinheit der Plasmid-DNA sowie ein Restriktionsspaltungstest (Abschnitt 3.14) zum Nachweis der korrekten Identität der erhaltenen Plasmid-DNA. Die Lagerung erfolgte bei -20°C

3.13 Gel-Elektrophorese

Zur Bestimmung der Größe verschiedener DNA-Fragmente in einer DNA-Probe (Plasmid, Restriktionsfragmente) wird sich die Eigenschaft der DNA (negative Nettoladung), in einem elektrischen Feld in Richtung Anode zu wandern, zu Nutze gemacht. Durch Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid (interkaliert in die DNA) lässt sich die DNA unter einem UV-Tisch sichtbar machen.

Durch Aufkochen (lösen) von Agarose (alternativ: LMP-Agarose) in 1xTAE (1% oder 1,8% Agarosegel, je nach Größe der zu detektierenden DNA) und Zugabe von 0,5µg/ml Ethidiumbromid wurde ein Agarosegel hergestellt. Das noch flüssige Gel wurde in eine Agarosegel-Gießvorrichtung gegossen und Gelkammeinsätze eingesteckt. Nach vollständiger Aushärtung erfolgte die Überführung des Gels in eine Gelkammer, die Übersichtung des Gels mit 1xTAE und die Entfernung der Gelkammeinsätze. Die aufzutragende DNA-Probe wurde sodann mit DNA Probenpuffer versehen (Verhältnis DNA:DNA-Probenpuffer: max 6:1) und in die Geltaschen überführt. Die Auftrennung der DNA-Proben in verschiedene DNA-Fragmentgrößen erfolgte in einem elektrischen Feld (60V, 1-2 Stunden) und ließ sich im Anschluss unter dem UV-Tisch sichtbar machen und per Fotografie dokumentieren. Durch das Auftragen eines DNA-Größenstandards („1kb ladder“ oder DNA Molecular weight marker VIII, 5µl) ließen sich die Größen der DNA-Fragmente bestimmen und zuordnen.

Zur späteren Isolierung einer spezifischen Bande DNA oder RNA, wurde als Gel-Matrize LMP-Agarose (low melting point) verwendet. Aus dieser kann eine spezielle Bande

ausgeschnitten und das enthaltene Fragment (DNA/RNA) durch Schmelzen der LMP-Agarose wieder isoliert werden (Abschnitt 3.18.5: „Phenol-Ether-Extraktion von DNA aus LMP-Agarose“).

3.14 Photometrische Konzentrationsbestimmungen

Die Methode der photometrischen Bestimmung der DNA Konzentration einer Probe beruht auf der spezifischen Absorption von DNA bei einer OD von 260 nm ($OD_{260nm}=1$, entspricht 50 μ g DNA/ml). Dagegen liegt die spezifische Absorption aromatischer Aminosäuren bei einer OD von 280nm. Damit spiegelt der Quotient OD_{260}/OD_{280} den Reinheitswert der DNA wieder und sollte bei 1,8 bis 2,0 liegen.

3.14.1 DNA Konzentrationsbestimmung

Die zu untersuchende DNA-Probe wurde 1:20 mit H₂O vorverdünnt. Die Messung der jeweiligen Absorption erfolgte im Photometer (UV-Lampe) bei einer OD von 260 und 280 nm. Als Blank wurde normales Wasser verwendet und von den Absorptionswerten der Proben subtrahiert.

3.14.2 RNA Konzentrationsbestimmung

Hierzu wurden 2 μ l der aufgereinigten RNA (Abschnitt 3.17.5) mit 98 μ l DEPC-H₂O gründlich vorverdünnt (1:50 Verdünnung), in Quarzküvetten überführt und bei 260nm gegen DEPC-H₂O gemessen. Dabei gilt: $OD_{260}=1$, entspricht 40 μ g RNA/ml.

3.15 Restriktionsspaltungsanalyse von Plasmid-DNA

Diese Methode dient der Sicherung der Identität präparierter Plasmide sowohl aus der Mini- als auch der Maxiprep. Das Prinzip beruht darin, dass Restriktionsendonukleasen an, für sie spezifischen Nukleotidsequenzen der DNA (hier Plasmid-DNA), schneiden. Bei bekannter Nukleotidsequenz eines DNA-Stückes können Endonukleasen gewählt werden, welche die DNA so schneiden, dass DNA-Fragmente bekannter Größe entstehen. Im Anschluss können diese Fragmente, mittels Gelelektrophorese, ihrer Größe nach aufgetrennt, zugeordnet und identifiziert werden. Soll DNA parallel mit mehreren verschiedenen Endonukleasen geschnitten werden, so ist bei dieser Methode darauf zu achten, dass ein Restriktionsendonukleasen-Puffer gewählt wird, bei dem sämtliche der verwendeten Endonukleasen eine möglichst hohe Effektivität aufweisen.

Um die Zuordnung der erhaltenen DNA-Fragmentgrößen zu erleichtern, wurde in allen Ansätzen, neben den Ansätzen mit Restriktionsenzymen, ungeschnittenes sowie nur mit einem Restriktionsenzym geschnittenes (linearisiertes) Plasmid mitgeführt.

3.15.1 Miniprep

Hier wurden zu 20µl der isolierten DNA der jeweilige Restriktionsansatzes pipettiert und mit dest. H₂O auf ein Gesamtvolumen von 30µl aufgefüllt. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 37°C. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von DNA-Probenpuffer (Verhältnis DNA:Probenpuffer: 1:6) beendet, die Probe auf ein Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe der Gelelektrophorese die DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt.

3.15.2 Maxiprep

Hier wurden pro Probe je 500ng Plasmid mit dest. H₂O auf ein Gesamtvolumen von 5µl aufgefüllt, der Restriktionsansatzes hinzupipettiert und das Gesamtvolumen mit dest. H₂O auf 30µl eingestellt. Wie unter Abschnitt 3.14 beschrieben, folgte eine zweistündige Inkubation (37°C) und die anschließende Auftrennung und Identifikation der resultierenden DNA-Fragmente in einem Agarosegel.

3.16 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Plasmide können unter bestimmten Bedingungen von eukaryotischen Zellen aufgenommen werden. Dieser Vorgang wird als „Transfektion“ bezeichnet. Die Transkription der auf dem Plasmid befindlichen Gene ist nur möglich, wenn sich eukaryotisch initierbare Promotoren auf dem Plasmid befinden. Mit Hilfe der Transfektion von „eukaryotisch“ transkribierbaren Plasmiden ist es so beispielsweise möglich, die Gensequenz eines spezifischen Proteins in eine Zelle einzubringen und eine Überexpression dieses Proteins zu erlangen. Auswirkungen dieser Überexpression lassen sich dann in weiteren Experimenten untersuchen.

3.16.1 Transiente Transfektion: jetPEI (Reporter-/Expressionsplasmid)

Als transiente Transfektion wird das nicht stabile Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Im Verlauf der Kultivierung der transfizierten Zellen geht das transfizierte Plasmid „verloren“, da es nicht in die genomische DNA integriert wird.

Die Transfektion von FRhK-4- und Hek-293-Zellen erfolgte mit Hilfe des kationischen Polymers JetPEI (Polyethylenimin). Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die zu transfizierende DNA mit jetPEI Komplexe ausbildet, welche in ihrer Gesamtheit eine positive Nettoladung aufweisen und so in die zu transfizierenden Zellen gelangt.

Die zu transfizierenden Zellen wurden in die jeweiligen Zellkulturgefäße umgesetzt (FRhK-4-Zellen: 6-cm²-Zellkulturschale: 600.000 Zellen, 6-Well-Zellkulturplatte: 300.000/Well Zellen, 24-Well-Zellkulturplatte: 53.000 Zellen, U937-Zellen: 24-Well-Zellkulturplatte: 200.000 Zellen/Well) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Hatten die Zellen am nächsten Tag eine Konfluenz von 50-70% erreicht, konnte mit der Transfektion begonnen werden. Dazu wurden pro Zellkulturgefäß zwei Eppendorfcups benötigt (Mastermixe für mehrere Zellkulturgefäße sind möglich!). In beide Eppendorfcups wurde 150mM NaCl vorgelegt (250µl/6-cm²-Zellkulturschale, 125µl/6-Well Zellkulturplatte, 50µl/24-Well-Zellkulturplatte, U937-Zellen: 20µl/24-Well-Zellkulturplatte). Nun erfolgte die Zugabe der entsprechenden Menge JetPEI in das eine und der entsprechenden Menge DNA in das andere Eppendorfcup (Material, Abschnitt 2.10: „Puffer und Lösungen“. Die beiden Cups wurden sogleich für je 10 Sekunden gevortext und im Anschluss hieran bei 10000rpm (Tischzentrifuge 5415 C) für ca. 5 Sekunden zentrifugiert. Hiernach erfolgte die Zugabe des JetPEI-Mixes zu dem DNA-Mix, wodurch der sogenannte Transfektionsmix entstand. Daran an schloss ein weiterer 10

sekündiger Vortex- und anschließender Zentrifugationsschritt (10000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 5 Sekunden) sowie eine 15-25 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Während der Inkubationszeit wurde das Wachstumsmedium von den zu transfizierenden Zellen entfernt und durch frisches Wachstumsmedium ersetzt (FRhK-4- Zellen: 6-cm²-Zellkulturschale: 3ml, 6-Well-Zellkulturplatte: 2ml, 24-Well-Zellkulturplatte: 0,5ml, U937-Zellen: 24-Well-Zellkulturplatte: 0,4ml). Nach Ablauf der Inkubationszeit des Transfektionsmixes wurde dieser tröpfchenweise über die Gesamtfläche der zu transfizierenden Zellen des Zellkulturgefäßes verteilt und durch vorsichtiges Schwenken des Zellkulturgefäßes mit dem auf den Zellen befindlichen Wachstumsmedium vermischt.

Der Transfektionsmix verblieb mindestens für 4 Stunden, maximal für 24 Stunden (U937-Zellen: maximal 44 Stunden) auf den Zellen (37°C, 5% CO₂). Danach erfolgte ein kompletter Mediumwechsel und die Zugabe der entsprechenden Menge frischen Wachstumsmediums.

Transfektionsexperimente wurden frühestens nach 24 Stunden, spätestens nach drei Tagen abgebrochen.

3.16.2 stabile Transfektion: Calciumphosphat

Eine weitere Möglichkeit der Transfektion von eukaryotischen Zellen stellt die Calciumphosphat-Methode dar. Diese beruht auf der Eigenschaft der Bildung feiner Kristallzusammenschlüsse, bestehend aus Calciumphosphat und DNA, welche entstehen, wenn eine Ca²⁺-Ionen haltige DNA-Lösung mit einer Hydrogenphosphat-haltigen Lösung zusammengebracht wird. Die sich ausbildenden DNA-haltigen Kristalle können in folgenden Schritten, unter anderem ein Glycerol-Schock, von den zu transfizierenden Zellen aufgenommen werden. Zur Gewinnung eines Zellklones, welcher das transfizierte Plasmid stabil aufgenommen (ins Genom integriert) hat und in der Folge die auf ihm codierten Gene stabil exprimiert, werden zuvor transfizierte Zellen mit Hilfe des Aminoglycosid-Antibiotikums (G418, Geneticindisulfat) zuerst selektiert, später isoliert und kultiviert. Dabei befindet sich die Neomycin-Resistenz im Idealfall auf dem zu transfizierenden Plamid oder aber auf einem cotransfiziertem Resistenz-Plasmid.

FRhK-4-Zellen sollen mit den Plasmiden pCR3.1-IRF-7 und pEGFPN1-IRF-7 stabil transfiziert werden. Dazu wurde, 48 Stunden nach erfolgter Calciumphosphat-Transfektion, mit der Kultivierung der transfizierten Zellen in G418 (600µg/ml) haltigem DMEM-Medium begonnen. Nach drei bis vier Wochen waren alle nur transient transfizierten Zellen

abgestorben und es wurde ein 1:5 Split (G418-haltiges DMEM-Medium) in neue 6-cm²-Zellkulturschalen durchgeführt. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte ein weiterer Split (1:500 bis 1:10000) in 10-cm²-Zellkulturschalen. Durch das hohe Splitverhältnis wuchsen, vor allem in den ersten Tagen nach Umsetzen, von einander abgrenzbare Kolonien. Diese gehen, der Theorie nach, aus jeweils nur einem Ausgangszellklon hervor. Durch das Aufsetzen von, mit Silicone Grease abgedichteten, Klonierungszyklindern über einen zu pickenden Zellklon (Zellkolonie) und der Zugabe von 100µl Trypsin-EDTA (8 Minuten, 37°C) erfolgte die selektive Ablösung eines Zellklones. Dieser wurde in das Well einer 24-Well-Mikrotiterplatte überführt und bis zu seiner Konfluenz in G418 haltigem DMEM-Medium (1ml/Well) kultiviert. Mit Erreichen der Konfluenz konnte mit der Überprüfung der Expression des gewünschten Gens in dem Klon begonnen werden. Im Falle von pEGFPN1-IRF-7 erfolgte die Analyse direkt unter dem Immunfluoreszenzmikroskop (Abschnitt 3.16) und mittels Immunoblot (Abschnitt 3.10.2). Der Nachweis von pCR3.1-IRF-7 wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz zur Detektion von IRF-7 (Abschnitt 3.16.2) und im Immunoblot (Abschnitt 3.10.2) erbracht. Die Zellklone wurden, bis zur Durchführung von Experimenten, weiterhin in G418-haltigem DMEM-Medium kultiviert. In Experimenten wurden sie ohne G418- haltigem DMEM-Medium eingesetzt.

Die zu transfizierenden Zellen (FRhK-4-Zellen) wurden in 6-cm²-Zellkulturschalen umgesetzt (Abschnitt 2.1: „Zellkultur“) und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium von den Zellen entfernt und durch neues Medium (10%FCS-DMEM, 4ml) ersetzt. Eine weitere Inkubation (37°C, 5% CO₂, 2,5 Stunden) folgte. Eine halbe Stunde vor Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zusammenstellung der Transfektionsmixe in Eppendorfcups (Maximal zwei Ansätze pro Eppendorfcup).

Dabei wurden die Transfektionsmixe auf Eis und nach folgendem Pipettierschema angesetzt: Zuerst wurde in einem Cup das 2xHBS (ca 250µl, so viel, dass der resultierende Transfektionsmix-Ansatz, nach Zugabe der TE-DNA-CaCl₂ Lösung, 500µl Gesamtvolumen hat) und in einem anderen der TE-Puffer (119µl, kalt) vorgelegt. Es folgte die Zugabe der Plasmid-DNA (20µg) zum TE-Puffer (gut schwenken) und die tröpfchenweise Zugabe der 2-M-CaCl₂ Lösung (31µl, anschnipsen) in die TE-DNA Lösung. Nun wurde die TE-DNA-CaCl₂ Lösung, abermals tröpfchenweise, zu dem bereits vorbereiteten 2xHBS pipettiert (anschnipsen) und der Transfektionsmix auf Eis inkubiert (15-25 Minuten, Bildung der Kristallzusammenschlüsse). Zur Überprüfung der Rate von Zellen, welche alleine durch die Transfektion absterben, wurde ein Transfektionsmix-Ansatz mitgeführt, welcher, anstelle von

zu transfizierender Plasmid-DNA, TE-Puffer enthält.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Transfektionsmische schneckenförmig auf das Medium der zu transfizierenden Zellen getropft (500µl/6-cm² Zellkulturschale). Zu diesem Zeitpunkt erfolgte auch die Überprüfung der Kristallbildung unter dem Lichtmikroskop. Nun folgte eine 3,5 stündige Inkubation bei 37°C (5% CO₂). In der Zwischenzeit wurde die 15% Glycerol-Schocklösung (1ml pro 6-cm²-Zellkulturschale) angesetzt. Dazu wurde die 30% Glycerol-Lösung 1:2 mit 2xHBS verdünnt und bis zu ihrer Verwendung bei Raumtemperatur belassen. Nach Ablauf der 3,5 stündigen Inkubationszeit wurde das Medium (inklusive der Transfektionsmische) von den 6-cm² Zellkulturschalen verworfen und pro 6-cm²-Zellkulturschale 1 ml der Glycerol-Schocklösung hinzugegeben. Diese wurde unter ständigem Schwenken für 90 Sekunden auf den Zellen belassen. Im Anschluss folgte ein zweimaliger Waschschrift mit 1% FCS-DMEM-Medium (3ml/6-cm² Zellkulturschale) und zum Schluss die Zugabe von 10% FCS-DMEM-Medium (4ml/6-cm²-Zellkulturschale) sowie eine Überführung der Zellkulturschalen in den Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Am nächsten Tag erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel (10% FCS-DMEM-Medium, 4ml/6-cm²-Zellkulturschale). Die Auswertung bezüglich der Effizienz der Transfektion fand zwischen dem ersten und dritten Tag nach der Transfektion statt.

3.17 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz lassen sich Anwesenheit sowie zelluläre Lokalisation von Proteinen, in zuvor auf dem Boden des Zellkulturgefäßes fixierten und permeabilisierten Zellen, nachweisen. Verwendet wird hierfür zunächst ein, das Protein oder spezielle Phosphorylierungsformen des gesuchten Proteins bindender, „primärer Antikörper“ und im Anschluss ein Fluorochrom-markierter „sekundärer Antikörper“. Die Auswertung erfolgt unter dem Immunfluoreszenzmikroskop.

3.17.1 Einlegen/Entfernen von Glasplättchen

Da, mit sich direkt auf dem Zellkulturboden von 24-Well-Zellkulturplatten befindenen Zellen keine Immunfluoreszenz durchgeführt werden kann (die 24-Well-Zellkulturplatte ist zu hoch, um sie unter das Objektiv zu bekommen), wurden, vor Zugabe von Zellen, runde

Glasplättchen in die Wells von 24-Well-Zellkulturplatten gelegt (In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass diese Glasplättchen keinen negativen Effekt auf das Wachstum von FRhK-4 Zellen ausüben). Um eine „Unterschwemmung“ der Glasplättchen mit Zellen zu vermeiden und eventuelle Luftblasen zu entfernen, wurden die Glasplättchen, nach Zugabe der Zellen, mit Hilfe einer 200µl Pipettenspitze noch einmal kurz (sorgfältig) auf den Boden gedrückt.

Die Entfernung der Glasplättchen erfolgte unter zur Hilfenahme einer Kanüle (0,9x40 mm), welche an ihrer Spitze leicht gebogen wurde und einer Pinzette. Dabei ist zu beachten, dass sich während des Prozesses der Entfernung immer 1ml PBS auf den Glasplättchen befinden sollte. Nach Entfernung der Glasplättchen erfolgte deren Trocknung (RT, lichtgeschützt!). Währenddessen wurden je 9µl Eindeckmedium (ohne Luftblasen) auf ein Objektträger pipettiert und die Objektträger beschriftet. Nach vollständiger Trocknung der Glasplättchen wurden diese, mit der Oberseite nach unten, auf das Eindeckmedium des jeweiligen Objektträgers gelegt. Sobald das Eindeckmedium die gesamte Fläche zwischen Objektträger und Glasplättchen benetzte, wurde das Glasplättchen mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert. Die Auswertung erfolgte, nach Trocknung des Nagellackes, unter Zugabe von Immersionsöl, unter dem Immunfluoreszenzmikroskop.

3.17.2 Immunfluoreszenz zum Nachweis von IRF-7 und HAV

3.17.2.1 FRhK-4 (pEGFPN1-IRF-7, Klon 6)

Diese Zellen exprimieren ein GFP-gekoppeltes IRF-7 Protein. Zur Detektion von IRF-7 ist die Anfärbung mit Antikörper nicht nötig.

Es wurden je 53.000 Zellen/Well, nach Einlage von Glasplättchen, in 24-Well-Zellkulturplatten umgesetzt. 18 Stunden nach Induktion der Zellen mit poly(IC) oder NDV wurde das Medium von den Zellen entfernt und ein Waschschrift mit 1ml/Well PBS durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd (200 µl/Well, 20 Minuten, RT). Nach einem dreimaligen Waschschrift (1ml PBS/Well) wurden die Glasplättchen vorsichtig aus den Wells entfernt und trockengelassen (lichtgeschützt!). Die Auswertung erfolgte, unter Zugabe von Immersionsöl, unter dem Immunfluoreszenzmikroskop (Vergrößerung 200x, Öl-Immersion, Filter 09, Anregungswellenlänge: 450-490 nm).

3.17.2.2 U937-Zellen und PBMCs

Zum Nachweis von IRF-7 wurden U937-Zellen, nach Einlage von Glasplättchen, in 24-Well-Platten umgesetzt (2×10^5 Zellen/Well) und mit PMA induziert (10ng/ml). Nach spätestens sechs Tagen wurde das Medium von den Zellen entfernt und ein Waschschriff mit 1ml/Well PBS durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd (200 μ l/Well, 20 Minuten, RT) und nach Abnahme der Fixierungslösung die Permeabilisierung der Zellen mit eiskaltem Methanol (200 μ l/Well, 7 Minuten, -20°C). Nach einem dreimaligen Waschgang (je 1ml PBS/Well) erfolgte die Zugabe einer Blockierungslösung (10% FCS/PBS, 100 μ l/Well, 1 Stunde, 37°C , 5% CO_2). Es folgten drei weitere Waschschriffe (1ml PBS/Well) und die anschließende Zugabe und Inkubation mit dem primären Antikörper (α -IRF-7, 1:50 in 1% FCS/PBS, 50 μ l/Well, 1 Stunde, 37°C , 5% CO_2). Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen (1ml PBS/Well) von den Zellen entfernt und der sekundäre Antikörper (goat anti-rabbit [FITC] 1:100, 1% FCS/PBS, 50 μ l/Well, 1 Stunde, 37°C , 5% CO_2) hinzupipettiert. Die Auswertung erfolgte nach drei weiteren Waschschriffen (1ml PBS/Well) und Überführung der Glasplättchen auf Glasobjekträger unter dem Immunfluoreszenzmikroskop (Vergrößerung 200x, Öl-Immersion, Filter 09, Anregungswellenlänge: 450-490 nm). Zum Nachweis von HAV-spezifischem Antigen in U937-Zellen wurden, anstelle des IRF-7-spezifischen Antikörpers, der HAV-spezifische primäre Antikörper α -HAV (1:400 in 1% FCS/PBS) und der FITC-markierte sekundäre Antikörper goat anti-rabbit [FITC] (1:40 in 1% FCS/PBS) eingesetzt.

Analog zu den U937-Zellen wurde der Nachweis von IRF-7 in PBMC durchgeführt. Die einzigen Abänderungen betreffen Fixierung/Permeabilisierung, die bei diesen Zellen mit 0,1% Paraformaldehyd (30min, RT) durchgeführt wurde, sowie die Verdünnung des primären α -IRF-7 Antikörpers, welcher 1:50 in 1% FCS/PBS verdünnt eingesetzt wurde. Der Nachweis von HAV-spezifischen Antigen erfolgte in diesen Zellen unter Verwendung des primären Antikörpers α -HAV 1:20 in 1% FCS/PBS und des Texas-Rot markierten sekundären Antikörpers goat anti-mouse [Texas Red] 1:400 (1%FCS/PBS). Der Nachweis von IRF-7 mit dem sekundären goat anti-rabbit [FITC], welcher 1:100 in 1% FCS/PBS verdünnt wurde.

Zum Nachweis von IRF-7 in nicht mit PMA induzierten U937-Zellen, wurden je 2×10^5 U937-Zellen pro Well einer 24-Well-Platte (enthält Glasplättchen) eingesetzt (Gesamtvolumen/Well: 1 ml Zellen/Medium) und zentrifugiert (1200 rpm [Tischzentrifuge

5403], 7 Minuten). Nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes erfolgte die zuvor beschriebene Fixierung/Permeabilisierung sowie Inokulation mit Antikörpern.

3.17.3 Paralleldetektion von IRF-7 und HAV in U937- Zellen und PBMCs

Die parallele Detektion von IRF-7 und HAV erfolgte unter Verwendung der jeweiligen primären Antikörper (IRF-7 und HAV) und des Texas-Rot markierten sekundären Antikörpers goat anti-mouse [Texas Red] 1:400 zum Nachweis von HAV-Antigenen.

3.17.4 Paralleldetektion von IRF-7 und HAV in FRhK-4-Zellen

Zum parallelen Nachweis von IRF-7 und HAV wurden die Zellen zunächst in, mit Glasplättchen bestückten, 24-Well-Platten kultiviert. Zur Durchführung der Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd (200 µl/Well, 20 Minuten, RT) fixiert und im Anschluss, nach Abnahme der Fixierungslösung, mit 0,2% Triton X-100/PBS für 20 Minuten (200µl/Well, RT) permeabilisiert. Da die primären/sekundären Antikörper zum Nachweis von HAV und IRF-7 aus jeweils unterschiedlichen Tieren stammen, konnten die Zellen im ersten Schritt zeitgleich mit den primären und im zweiten Schritt zeitgleich mit den sekundären Antikörpern inokuliert werden. Nach einem dreimaligem Waschgang (je 1ml PBS/Well) erfolgte die Zugabe einer Blockierungslösung (10% FCS/PBS, 100µl/Well, 1 Stunde, 37°C, 5% CO₂). Es folgten drei weitere Waschschritte (1ml PBS/Well) und die anschließende Zugabe und Inkubation mit dem primären Antikörper (α-IRF-7, 1:50 sowie α-HAV, 1:80 in 1% FCS/PBS, 50µl/Well, 1 Stunde, 37°C, 5% CO₂). Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen (1ml PBS/Well) von den Zellen entfernt und die sekundären Antikörper (goat anti-rabbit [FITC] 1:100, beziehungsweise goat anti-mouse [TexasRed] 1:400, 1% FCS/PBS, 50µl/Well, 1 Stunde, 37°C, 5% CO₂) hinzupipettiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Immunfluoreszenzmikroskopes. Dabei war es möglich, beide Fluoreszenzen zusammen unter einem sogenannten Kombifilter (Filter 24, excitation 485/20 + 578/14nm, emission 515-540nm; 610nm) oder einzeln unter den jeweiligen FITC / TR entsprechenden Filtern (Filter: 09, excitation 450-490nm, emission 515nm oder Filter 15, excitation 546/12nm, emission 590nm) zu detektieren.

3.18 Herstellung des Reporterkonstruktes: „IFN- α 6-Luc“

IFN- α 6 ist ein IFN- α Subtyp, dessen Transkription von IRF-7 reguliert wird. Zum selektiven Nachweis von transkriptionell aktiven IRF-7 sollte ein IFN- α 6 Promotor-Luc Reporterplasmid hergestellt werden. Hierfür wurde zunächst DNA aus Hek-293 Zellen isoliert, mittels PCR der IFN- α 6 Promotor amplifiziert und letztlich so in das pGL2-Control Plasmid inkloniert, dass das Luc-Gen unter der Kontrolle des IFN- α 6-Promotors stand. Dazu wurde der SV40 Promotor zuvor aus dem pGL2-Control Plasmid entfernt. Durch Restriktionsspaltung von Insert (IFN- α 6-Promotor) und Vektor (pGL2-Control) mit den gleichen Restriktionsenzymen entstanden sticky-ends, welche mit Hilfe der Ligase ligiert werden konnten. Das resultierende Reporterplasmid wurde als: „IFN- α 6-Luc“ bezeichnet.

3.18.1 Gewinnung des IFN- α 6 Promotors aus Hek-293-Zellen

3.18.1.1 Isolierung von DNA aus Säugetiergewebe (Current Protocols in molecular biology, 1998)

Hek-293-Zellen wurden in 10-cm²-Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert, mittels Trypsin-EDTA von dem Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst und die resultierende Zellsuspension zentrifugiert (2000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 5 Minuten, 4°C). Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Dazu wurde es in 10ml eiskalter PBS resuspendiert und eine erneute Zentrifugation (2000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 5 Minuten, 4°C) durchgeführt. Nach nochmaliger Durchführung des Waschschrittes wurde das Zellpellet in 1ml des Aufschlusspuffers resuspendiert und für 18 Stunden bei 50°C (schüttelnd) inkubiert. Im Anschluss wurde ein Volumenteil Phenol (TE-gesättigt)/Chloroform/Isoamylalkohol) zu den nun viskosen Proben hinzupipettiert und die Proben ein weiteres Mal zentrifugiert (9000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 10 Minuten, RT). Die obere, wässrige Phase enthielt nun die DNA und wurde in ein neues Eppendorfcup überführt. Zur Präzipitation der DNA erfolgte die Zugabe von ½ Volumenteil 7,5M Ammoniumacetat und 2 Volumenteilen Ethanol (100%). Das, nach einem sich anschließenden Zentrifugationsschritt (9000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 2 Minuten, RT), sichtbare DNA-Pellet wurde, nach Abnahme des Überstandes, zweimal mit Ethanol (70% in H₂O) gewaschen (9000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 2 Minuten, RT) und zum Schluss in

20µl TE-Puffer aufgenommen (65°C, 4 Stunden). Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde photometrisch bestimmt (Abschnitt 3.14.1). Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

3.18.1.2 Durchführung einer PCR zur Amplifikation des IFN-α6-Promotors

Zur Amplifikation des IFN-α6-Promotors mittels der PCR wurden 1,2ng der zuvor aus Hek-293-Zellen gewonnenen DNA in Eppendorfcups vorgelegt. Nun folgte die Zugabe von je 45µl des IFN-α6-Promotor PCR-Mixes. Die Proben wurden in den PCR-Cycler überführt und die PCR mit den in Material, Abschnitt 2.8 stehenden Einstellungen gestartet.

Die Überprüfung der Größe des Amplifikates erfolgte nach Beendigung des PCR-Programmes. Dazu wurden 10µl des Amplifikats mit 2µl DNA-Probenpuffer versehen und mit Hilfe der Gelelektrophorese dessen Größe bestimmt.

3.18.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Zur Entfernung von Primern und Polymerase wird, die sich in wässriger Lösung befindliche DNA, abermals extrahiert. Dazu wurde die sich in wässriger Lösung befindliche DNA mit dest. H₂O auf ein Gesamtvolumen von 500µl gebracht. Es erfolgte die Zugabe von Phenol (TE-gesättigt, 500µl). Die Probe wurde für zwei Minuten geschüttelt und im Anschluss zentrifugiert (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 2 Minuten, RT). Die DNA befindet sich nun in der oberen, wässrigen Phase und wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfcup überführt. Der Rest wurde verworfen. Zu der DNA wurden Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, 250µl) und 250µl Phenol (TE-gesättigt) gegeben und die Probe abermals für zwei Minuten geschüttelt und im Anschluss zentrifugiert (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 2 Minuten, RT). Die resultierende obere Phase wurde wiederum abgenommen und in ein neues Eppendorfcup überführt, während der Rest verworfen wurde. Es folgte die Zugabe von Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, 500µl) und ein zweiminütiger Schüttelschritt. Nun wurde die Probe wieder zentrifugiert (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 2 Minuten, RT) und der Überstand zum letzten Mal in ein neues Eppendorfcup überführt. Der Rest wurde auch in diesem Schritt verworfen. Weiter erfolgte die Zugabe von zunächst 1/10 Volumenteil 3-M Natriumacetat, welches mit der Probe gut vermischt wurde. Die sich anschließende Präzipitation der DNA wurde durch die Zugabe von 2,5 Volumenteilen eiskaltem Ethanol (über Nacht, -80°C) ausgelöst. Nach einer sich anschließenden Zentrifugation (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 30 Minuten, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das nun vorliegende DNA-Pellet zweimal mit je 1 ml eiskaltem Ethanol (70% in dest. H₂O, 14000rpm, 15 Minuten, 4°C) gewaschen. Danach wurde das DNA-Pellet in der SpeedVac

getrocknet (ca 4 Minuten), in dest. H₂O (30µl) aufgenommen und gelöst. Die DNA wurde bei -20°C eingefroren und gelagert sowie deren Konzentration mit Hilfe des Photometers (Abschnitt 3.13.1) bestimmt. Nach Durchführung eines Restriktionsschnittes des PCR-Produktes (IFN-α6-Promotor) mit HindIII und BglII (Abschnitt 3.14) wurden die Restriktionsprodukte auf ein 1% LMP-Agarosegel aufgetragen. Das Herausschneiden der IFN-α6-Promotor-spezifischen Bande (189bp) erfolgte unter UV-Licht mit Hilfe der "UV-Handlampe VL-6C". Bis zur weiteren Verwendung wurde das Produkt bei 4°C gelagert.

3.18.2 Ligation des pGL2-Control Plasmides mit dem IFN-α6-Promotor

Hierzu musste zunächst der SV40 Promotor aus dem Basisvektor (pGL2-Control) herausgeschnitten werden. Dazu wurde ein Restriktionsschnitt mit 5µg des pGL2-Control Plasmides mit HindIII und BglII (Abschnitt 3.15) durchgeführt und der Ansatz im Anschluss bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Zur Vermeidung/Reduzierung der Religation des pGL2-Control Plasmides im Verlauf der später folgenden Ligation, wurde eine alkalische Dephosphorylierung des Vektors durchgeführt.

3.18.2.1 Alkalische Dephosphorylierung von Plasmiden

Es wurden 10µg des mit HindIII und BglII geschnittenen pGL2-Control Plasmides mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 40µl aufgefüllt und der Reaktionsansatz (Abschnitt 2.10 Puffer und Lösungen) hinzupipettiert. Es erfolgte eine einstündige Inkubation (37°C), ein Stop der Reaktion durch Zugabe von 10µl 100mM EGTA (10 Minuten, 65°C) und eine anschließende Lagerung bei -20°C. Das nun dephosphorylierte Restriktionsprodukt wurde auf ein 0,6% LMP-Agarosegel aufgetragen. Im Verlauf der folgenden elektrophoretischen Auftrennung der Restriktionsprodukte wurde die SV40 spezifische Bande (202bp) von dem übrigen pGL2-Control Plasmid getrennt. Das pGL2-Control Plasmid (ohne SV40-Promotor: 5845bp) konnte unter UV-Licht (UV-Handlampe VL-6C) aus dem LMP-Agarosegel heraus geschnitten werden. Die weitere Lagerung erfolgte bei 4°C.

3.18.2.2 Ligation des IFN- α 6-Promotors in das geschnittene pGL2-Control Plasmid

Die LMP-Agarosestücke, in denen sich die zu ligierenden Fragmente (IFN- α 6-Promotor, pGL2-Control Plasmid) befanden, wurden bei 70°C für ca. 10 Minuten eingeschmolzen. Im Anschluss erfolgte durch Zugabe von dest. H₂O eine Verdünnung der 1% LMP-Agarose (IFN- α 6-Promotors) auf 0,6%. Die sich anschließende Ligation wurde im Verhältnis 3:1 (Insert:Vektor) durch Zugabe des bereits auf 37°C vorgewärmten Ligationsansatzes (Abschnitt 2.10.9) gestartet. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei 37°C, der eine weitere Inkubation (60 Minuten) bei Raumtemperatur folgte. Im Anschluss wurden die Ansätze über Nacht bei 12-14°C inkubiert und am nächsten Tag, nach einer nochmaligen Zugabe von 1U T4 DNA-Ligase (2 Stunden, 14°C), mit Hilfe der Gelelektrophorese (LMP-Agarose) auf die erfolgte Ligation überprüft.

3.18.5 Phenol-Ether Extraktion von DNA aus LMP-Agarose

Um das erhaltende IFN- α 6-Luc Reporterplasmid aus dem LMP-Agarosegel zu isolieren, wurde die entsprechende Bande (Abschnitt 3.18.2.2) aus dem LMP-Agarosegel unter UV-Licht (UV-Transluminator "Mighty Bright") ausgeschnitten und auf 68°C erwärmt. Sobald sich die LMP-Agarose verflüssigt hatte, erfolgte die Zugabe von 1 Volumenteil dest. H₂O (auf 68°C vorgewärmt). Zu dem resultierenden LMP-Wasser-Gemisch wurde ein weiterer Volumenteil Phenol (TE-gesättigt, 56°C) pipettiert, der Ansatz für zwei Minuten gevortext und im Anschluss zentrifugiert (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 2 Minuten). Die obere wässrige Phase enthielt nun die DNA und wurde in ein neues Eppendorfcup überführt, der Rest wurde verworfen. Nun erfolgte die Zugabe von einem Volumenteil eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) zu der DNA. Die Probe wurde für zwei Minuten geschüttelt und zentrifugiert (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 2 Minuten). Die obere, DNA-haltige Phase wurde abermals in ein neues Eppendorfcup überführt und mit einem Volumenteil Phenol (TE-gesättigt) versetzt (2 Minuten schütteln). Nach einer weiteren Zentrifugation (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 2 Minuten) wurde die obere, wässrige DNA-haltige Phase ein letztes Mal abgenommen, in ein neues Eppendorfcup pipettiert, mit 2,5 Volumenteilen Ether (H₂O-gesättigt) versehen und zwei Minuten geschüttelt. Nach der anschließenden Zentrifugation (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 2 Minuten) befindet sich die DNA in der unteren, wässrigen Phase. Die obere Phase (Etherphase) wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die untere Phase wurde durch die erneute Zugabe von Ether

(H₂O-gesättigt) noch zweimal gewaschen (zwei Minuten schütteln, Zentrifugation 14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 2 Minuten), bevor die Fällung der DNA durch Zugabe von 1/10 Volumenteil 3-M Natrium-Acetat (pH 4,8) sowie 2,5 Volumenteilen 100% Ethanol ausgelöst wurde (Fällung für 60 Minuten, -80°C). Nach der Fällung erfolgte eine weitere Zentrifugation (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 25 Minuten), in deren Anschluss der Überstand verworfen und das DNA-Pellet noch zweimal mit 70% Ethanol gewaschen wurde (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 20 Minuten, 4°C). Nach Trocknung des DNA-Pellets in der SpeedVac wurde es in 20µl dest. H₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mit Hilfe des Photometers (Abschnitt 3.14). Mit Hilfe der Methode der Mini- und Maxiprep wurde das Plasmid „pGL2-IFNα6-Luc“ im Folgenden in großen Mengen amplifiziert (Abschnitt 3.12).

3.19 RT-PCR zum Nachweis von mRNA

Die Methode der RT-PCR dient dem Nachweis zellulärer mRNAs. Dabei geht der Methode der RT-PCR die Extraktion zellulärer RNA und der sich anschließende DNase-Verdau voraus. In der folgenden RT-PCR wird die zelluläre mRNA in einem ersten Schritt, der Reversen Transkription, zunächst mit Hilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“ in copy DNA (cDNA) umgeschrieben. In den folgenden Schritten wird diese cDNA mittels PCR amplifiziert, das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen und sichtbar gemacht. Als Kontrolle der erfolgten Reversen Transkription wird, neben der Amplifikation der untersuchten mRNA, auch β-Aktin mRNA amplifiziert und nachgewiesen. Desweiteren wird eine Wasserkontrolle (keine RNA) und eine RT-Kontrolle (keine Reverse Transkriptase) mitgeführt. Die Wasserkontrolle soll eine Verunreinigung des im Versuch benutzten Wassers mit RNA, die RT-Kontrolle, eine Kontamination der Probe mit DNA ausschließen.

3.19.1 Extraktion von RNA

Zur Extraktion cytoplasmatischer RNA wurden die zu verwendenden Zellen zunächst mittels Trypsin-EDTA vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst, vereinzelt und in 10ml Wachstumsmedium aufgenommen. Es folgte ein Waschschrift (1500rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 5 Minuten, RT) und die anschließende Aufnahme des Zellpellets in 10ml PBS. Nach

einem erneuten Waschschrift (1500rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 5 Minuten, RT) wurde das Zellpellet in 1ml PBS aufgenommen und in ein Eppendorfcup überführt. Nun folgte ein einminütiger Zentrifugationsschritt (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C]). Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Zellpellet in 200µl RSB-Lösung auf Eis resuspendiert (20-30x pipettieren, wird schaumig). Im Anschluss wurden die Kerne bei 14000rpm ([Tischzentrifuge 5415 C], 30 Sekunden) pelletiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und die sich im Überstand befindliche RNA unter Zugabe des gleichen Volumens eines H₂O-gesättigtem Phenol/Chloroform (1:1) Gemisches extrahiert (schütteln). Nach einer weiteren Zentrifugation (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 5 Minuten, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und erneut mit dem gleichen Volumen eines H₂O-gesättigtem Phenol/Chloroform (1:1) Gemisches extrahiert (schütteln). Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis die Interphase klar oder gar nicht mehr vorhanden war. Die Fällung der RNA erfolgte im Anschluss unter Zugabe von 500µl Ethanol (100%) und 20µl 3M Na-Acetat (pH 4,8) zu dem Überstand (ca. 200µl) bei -80°C. Nach einer Stunde wurden die Proben abermals zentrifugiert (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 30 Minuten, 4°C) und das Pellet zweimal mit Ethanol (70% in DEPC-H₂O) gewaschen (14000rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 5 Minuten, 4°C). Schließlich erfolgte die Resuspendierung des RNA-Pellets in 25µl DEPC-H₂O.

3.19.2 DNase-Verdau

Nach der RNA-Extraktion soll mit Hilfe der DNase RQ1 noch in der Probe verbliebene Rest-DNA abgebaut werden. Hierzu wurden je 43µl aus der RNA-Extraktion mit 5µl DNase-Puffer (10x) sowie 2µl DNase RQ1 (=2U) versehen. Es folgte eine Inkubation bei 37°C (30 Minuten) und im Anschluss eine Phenol-Chloroform-Extraktion wie bereits unter Abschnitt 3.18.1.3 beschrieben.

3.19.3 Reverse Transkription von mRNA (IRF-7, β-Aktin, IFN-α6) in cDNA

Nach der Extraktion zellulärer RNA und anschließendem DNase-Verdau, erfolgte die RNA-Konzentrationsbestimmung der Probe und eine Vorverdünnung selbiger auf 200ng/µl. Die Reverse Transkription von IRF-7 und IFN-α6 erfolgte, indem zu 10µl der RNA-Vorverdünnung 2µl des jeweiligen RT-Primer-Mixes pipettiert wurden. Für die Reverse

Transkription von β -Aktin wurden zu 5 μ l der RNA-Vorverdünnung 7 μ l des β -Aktin -RT-Primer-Mix zugegeben. Für beide Ansätze wurde jeweils eine Wasserkontrolle mitgeführt. Für diese wurde, anstelle der RNA-Vorverdünnungen, DEPC-H₂O zu den jeweiligen RT-Primer-Mixen pipettiert. Es folgte eine zehnminütige Inkubation bei 65°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte der Start der Reversen Transkription. Hierzu wurden die Proben auf Eis gestellt und je 9 μ l des RT-Mixes beziehungsweise des RT-Kontroll-Mixes zu den Proben gegeben. In einem Gesamtvolumen von nun 21 μ l erfolgte die Reverse Transkription für 45 Minuten bei 42°C. Nach Ablauf der Reversen Transkription konnte die nun erhaltene cDNA bei -20°C weggefroren und eine PCR zum Nachweis der jeweiligen cDNA durchgeführt werden

3.19.4 Polymerase-Chain Reaction (PCR) zum Nachweis von IRF-7, IFN- α 6 und β -Aktin

Mit Hilfe der Polymerase-Chain Reaction (PCR) lässt sich ein beliebiger Ausschnitt der Nukleotidsequenz von z.B. cDNA amplifizieren, vervielfältigen, im Anschluss auf ein Agarosegel auftragen und nachweisen. Dazu werden kurze DNA Fragmente, Primer genannt, die zu dem zu amplifizierenden DNA Bereich komplementär sind, erstellt und zusammen mit der Taq-Polymerase zu der Probe pipettiert. Unter Durchlaufung spezifischer Temperaturen zur Trennung der DNA-Doppelstränge, Anlagerung der Primer an ihre komplementäre Nukleotidsequenz und DNA-Amplifikation (Taq-Polymerase), ausgehend von den Primern, erfolgt die Vervielfältigung des entsprechenden DNA Bereichs. Dabei ist in der Phase der Anlagerung der Primer die Temperatur (Annealingstemperatur) von der Anzahl der Adenosine und Thyminidine bzw. der Guanosine abhängig und erfordert des öfteren eine nachträgliche Feinjustierung der gewählten Temperatur.

Zur Amplifikation von DNA/cDNA mittels der PCR wurden entweder 120ng DNA oder 5 μ l cDNA in Eppendorfcups vorgelegt. Nun folgte die Zugabe von je 45 μ l des jeweiligen PCR-Mixes (IRF-7-/ β -Aktin/IFN α 6-PCR-Mix). Die Proben wurden in den PCR-Cycler überführt und die PCR mit den unter Material, Abschnitt 2.8.3: „PCR“ aufgelisteten Cyclen durchgeführt.

Nach Beendigung der spezifischen PCR-Programme wurden je 10µl des jeweiligen Amplifikats mit 2µl DNA-Probenpuffer versehen und mit Hilfe der Gelelektrophorese die Amplifikate ihrer Größe nach aufgetrennt und identifiziert.

3.20 Analyse von Größe, Granularität und zellulärer Oberflächenproteine von Zellen

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie lässt sich, neben Größe und Granularität der untersuchten Zellen, auch die Expression spezifischer Proteine analysieren. In dieser Methode werden Zellen in einem feinen Kanülensystem zunächst vereinzelt und im Anschluss durch ein Laser-Detektionsbereich gepresst. Dabei wird mittels Detektion von Durchgangslicht die Größe, und mittels Detektion von Streuungslicht die Granularität jeder einzelnen Zelle ermittelt. Durch vorheriges Anfärben spezifischer Proteine mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern (möglich ist hier die Verwendung von sowohl direkt als auch indirekt markierten Antikörpern) können Expression und Expressionsstärke der so markierten Proteine untersucht werden. So ist es beispielsweise möglich, verschiedene Zelltypen in einem Zellmix voneinander zu unterscheiden.

Deweiteren können die verschiedenen Differenzierungsgrade von beispielsweise mononukleären Zellen anhand der Expression des differenzierungsassozierten Oberflächenrezeptors CD11b bestimmt werden.

Dabei muss, bei Anfärbung der Zellen mit spezifischen Fluorochrom-markierten Antikörpern, immer eine sogenannte Isotypkontrolle mitgeführt werden. Diese dient zur Ermittlung des Anteils unspezifischer Bindung und muss immer dem gleichen Ig-Subtyp und Konjugat wie der verwendete antigenspezifische Antikörper entsprechen. In der Endauswertung muss die gemessene Fluoreszenzintensität (unspezifische Fluoreszenz) der Isotypkontrolle von der Gesamtfluoreszenzintensität subtrahiert werden. Dazu wurden, zur Bestimmung des prozentualen Anteils von Zellen, welche eine spezifische Fluoreszenzintensität aufweisen, mit Hilfe des Analyseprogrammes „EPIC XL System I Software“ sogenannte „Gates“ gesetzt und miteinander verglichen.

3.20.1 Analyse des Oberflächenrezeptors CD11b auf U937-Zellen

Es wurden 2.3000.000 U937-Zellen pro 6-cm²-Zellkulturschale eingesetzt und mit PMA (10ng/ml) induziert. Die Ablösung der Zellen erfolgte sechs Tage später mit Hilfe eines „Cell Scrapers“. Nach Aufnahme der Zellen in 5ml PBS wurde ein 7minütiger Zentrifugationsschritt (1200rpm [Tischzentrifuge GS-6R], RT) durchgeführt. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1ml PBS resuspendiert sowie in 1,5ml Eppendorfcups überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation (1200rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 7 Minuten, RT) wurde der Überstand abermals verworfen und die Zellen in 7µl des α-CD11b Antikörpers resuspendiert (30 Minuten, Eis, dunkel). Die Fixierung erfolgte im Anschluss durch Zugabe von 0,8% Paraformaldehyd/PBS (200µl, 15 Minuten, Eis, dunkel). Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 5ml PBS und ein weiterer Zentrifugationsschritt (1200rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 7 Minuten, RT). Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in 1ml PBS aufgenommen und in 1,5ml Eppendorf-Cups überführt. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (1200rpm [Tischzentrifuge 5415 C], 5 Minuten, RT) und Abnahme des Überstandes, erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in 1ml Isoton-Lösung. Die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe des Durchflußzytometers. Als differenzierungsspezifische Negativkontrolle dienten nicht PMA-induzierte U937-Zellen, welche, abgesehen von der Abschabung mit dem Zellscraper, wie die PMA-induzierten Zellen behandelt wurden.

Die Bindung des CD11b Antikörpers wurde anhand der spezifischen FITC Fluoreszenz detektiert. Als Isotypkontrolle dienten sowohl PMA-induzierte als auch nicht-PMA-induzierte U937-Zellen, welche mit „Isotypic Control IgG1 (monoclonal)“ angefärbt wurden.

3.20.2 Analyse der Granularität und Größe von Zellen

Es wurden 2.300.000 U937-Zellen pro 6-cm² Zellkulturschale eingesetzt und mit PMA (10ng/ml) induziert. Die Ablösung der Zellen erfolgte sechs Tage später wie unter Abschnitt 3.20.1 beschrieben. Nach Aufnahme der Zellen in 5ml PBS folgte zunächst ein Zentrifugationsschritt (1200rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 7 Minuten, RT), im Anschluss die Abnahme des Überstandes und die Resuspendierung der Zellen in 200µl Fixierungslösung (0,8% Paraformaldehyd/PBS). Nach 15 minütiger Inkubation der Zellen auf Eis erfolgte die Zugabe von 5 ml PBS und eine weitere Zentrifugation (1200rpm [Tischzentrifuge GS-6R], 7

Minuten, RT). Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in 1ml Isoton-Lösung resuspendiert und in 1,5ml Eppendorfcups überführt. Die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe des Durchflußzytometers. Als differenzierungsspezifische Negativkontrolle dienten nicht-PMA-induzierte U937-Zellen, welche, abgesehen von der Abschabung mit dem Zellscraper, wie die PMA-induzierten Zellen behandelt wurden.

4. Ergebnisse

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das Hepatitis A-Virus die Differenzierung von mononukleären Zellen hemmt. Dies konnte sowohl in U937-Zellen (WÜNSCHMANN 1998), welche eine Modellzelllinie für die mononukleäre Differenzierung darstellen, als auch in primären humanen mononukleären Zellen (WÜNSCHMANN ET AL. 2002) beobachtet werden. Desweiteren wurde von uns gezeigt, dass eine Hepatitis A-Virus Infektion *in vitro* die Produktion von Interferon- β verhindert. Dabei konnten wir, zumindest in Hinblick auf den Einfluss von HAV auf das Interferonsystem, den molekularen Mechanismus dieser Suppression aufklären. So verhindert das Hepatitis A-Virus die Phosphorylierung und daraus resultierende Dimerisierung sowie nukleäre Translokation des Interferon Regulierenden Faktors-3 (IRF-3). Eine Begründung der Inhibition der Differenzierung von mononukleären Zellen durch eine HAV-Infektion steht hingegen noch aus. Neuere Studien rücken den Interferon Regulierenden Faktor-7 (IRF-7) in den Blickpunkt. Dieser ist an der Differenzierung von U937-Zellen beteiligt (LU UND PITHA 2001). Aufgrund der strukturellen wie auch funktionellen Ähnlichkeit der Transkriptionsfaktoren IRF-3 und IRF-7 liegt die Vermutung nahe, dass das Hepatitis A-Virus nicht nur einen negativen Effekt auf die Aktivität von IRF-3 sondern auch auf IRF-7 ausübt.

In den folgenden Versuchen sollte die bereits in der Einleitung dargestellte These, wonach sich die HAV-vermittelte Störung der mononukleären Differenzierung auf Ebene einer negativen Beeinflussung von IRF-7 durch das Hepatitis A-Virus gründet, untersucht werden. Laut dieser These hemmt eine Hepatitis A-Virusinfektion die Aktivität von IRF-7, wodurch die normalerweise durch IRF-7-induzierte Expression von non-IFN- α 1 unterbunden wird und sich in der Folge Störungen der mononukleären Differenzierung ausbilden.

Zur Überprüfung der hier formulierten These sollte zunächst die Bedeutung von IRF-7, sowie der von IRF-7-regulierten non-IFN- α 1 Expression, an der mononukleären Differenzierung von U937-Zellen überprüft werden. Desweiteren sollte ein Reporterkonstrukt zum Nachweis der IRF-7-abhängigen non-IFN- α 1-Expression konstruiert werden.

4.1 IRF-7 und die Differenzierung mononukleärer Zellen

Bereits im Jahr 2001 konnten Lu und Pitha die essentiellen Rolle von IRF-7 an der mononukleären Differenzierung von U937-Zellen aufzeigen (LU UND PITHA 2001). Jedoch ist ihre Arbeit bis heute die einzige, welche sich mit der Rolle von IRF-7 an der mononukleären Differenzierung beschäftigt. Zur Überprüfung der dieser Arbeit zugrunde liegenden These sollte deshalb zunächst die von Lu und Pitha aufgezeigte Bedeutung von IRF-7 an der mononukleären Differenzierung überprüft werden. Hierzu wurden U937-Zellen, welche eine Modelzelllinie der mononukleären Differenzierung darstellen, verwendet. In diesen Zellen bedingt die Gabe von PMA eine Differenzierung entlang des Monozyten/Makrophagen Weges (OLSSON UND BREITMAN N 1982, WIEDERHOLD ET AL 1988, LOTEM UND SACHS 1979, DODD ET AL 1983, TESTA ET AL. 1988, HATTORI ET AL. 1983, HASS ET AL. 1989). Die folgenden zwei Versuche sollten sowohl Aufschluss über das Expressionslevel als auch die zelluläre Lokalisation von IRF-7 im Verlauf der PMA-Induktion von U937-Zellen liefern.

4.1.1 Detektion von IRF-7 in PMA-induzierten U937-Zellen

Zum Nachweis von IRF-7 in U937-Zellen wurden selbige zunächst mit PMA induziert. Nach sechs Tagen erfolgte die Lyse der Zellen. Um den Phosphorylierungsstatus von IRF-7 zu erhalten, erfolgte die Zellyse unter Zugabe eines Phosphatase-Inhibitors und Protease-Inhibitor-Cocktails. Von dem so gewonnenen Zellysat wurden 30µg in einen Immunoblot eingesetzt. Als Kontrolle dienten nicht PMA-induzierte U937-Zellen. Der Nachweis von IRF-7 erfolgte mit Hilfe des α -IRF-7 Antikörpers. Als Kontrolle dafür, dass in allen Proben die gleiche Proteinmenge eingesetzt wurde, erfolgte zudem der Nachweis von β -Aktin (Mengenstandard) mit Hilfe des α - β -Aktin Antikörpers. Das Ergebnis ist in der Abbildung 4.1 dargestellt.

In U937-Zellen lässt sich eine, wenn auch sehr schwache, IRF-7-spezifische Bande (konstitutiv exprimiertes, endogenes IRF-7) detektieren. In PMA-induzierten Zellen ist diese IRF-7 spezifische Bande stärker ausgeprägt. Hier lassen sich, da die Bandenstärke für β -Aktin in allen Proben gleich ist, mit Hilfe des Vergleichs der Bandenstärken, Rückschlüsse über die Expressionsraten ziehen. Demnach führt eine sechstägige PMA-Induktion von U937-Zellen zu der, bereits von Lu und Pitha beschriebenen, verstärkten Expression von IRF-7 (LU UND PITHA 2001). Allerdings war es in diesem Versuch nicht möglich, mögliche

Phosphorylierungsbanden, von dem durch PMA-hochregulierten IRF-7, zu erhalten. Dies könnte mit der nur geringen Expressionsrate von IRF-7 zu begründen sein.

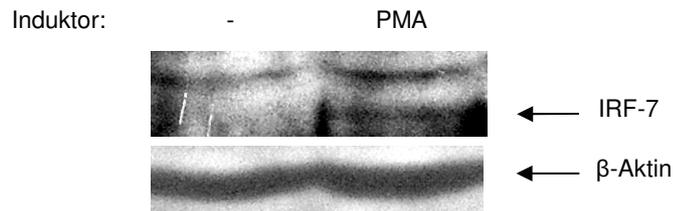


Abbildung 4.1 Nachweis von IRF-7 in U937-Zellen (+/- PMA). Detektion von IRF-7 mittels des primären mouse α -IRF-7 Antikörpers und des sekundären goat α -mouse HRP Antikörpers in U937-Zellen (+/- PMA) im Immunoblot. Die Zellen wurden mit PMA (10ng/ml) induziert. Die Lyse der Zellen erfolgte sechs Tage später. Die IRF-7-spezifische Bande liegt auf Höhe von ~67 kDa. Als Kontrolle dienen nicht-PMA-induzierte U937-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen.

4.1.2 PMA-induzierte nukleäre Translokation von IRF-7 in U937-Zellen

Um zu untersuchen, ob die im vorherigen Versuch beobachtete, PMA-induzierte, Hochregulation von IRF-7 in U937-Zellen auch zu einer Translokation von selbigen in den Zellkern führt, wurden U937-Zellen für sechs Tage mit PMA induziert und im Anschluss eine Immunfluoreszenz zum Nachweis von IRF-7 durchgeführt. Wie in der Abbildung 4.2 zu erkennen, führt eine Induktion von U937-Zellen mit PMA zur Translokation von IRF-7 in den Zellkern, wodurch die PMA-induzierte Aktivierung von IRF-7 gezeigt und die Bedeutung von IRF-7 bei der mononukleären Differenzierung weiter unterstrichen wird. Somit bestätigen die hier dargestellten Ergebnisse die zuvor von Lu und Pitha diskutierte Bedeutung von IRF-7 an der PMA-induzierten mononukleären Differenzierung von U937-Zellen (LU UND PITHA 2001).

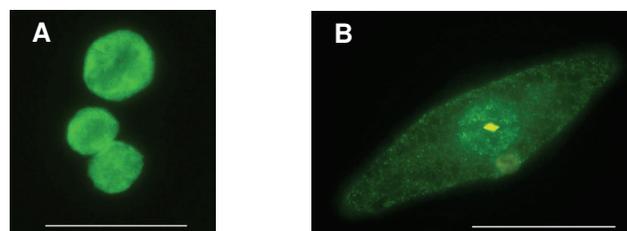


Abbildung 4.2 Induktion von U937-Zellen mit PMA. U937-Zellen wurden mit 10 ng/ml PMA für 0 oder 6 Tage induziert. Danach wurden die Zellen fixiert und es erfolgte eine Immunfluoreszenz zum Nachweis von IRF-7 mittels des primären mouse α -IRF-7 Antikörpers und des sekundären goat α -mouse FITC Antikörpers. Die Auswertung erfolgte unter dem Immunfluoreszenzmikroskop. Der durch eine Linie signalisierte Maßstab beträgt 50 μ m. Die IRF-7 spezifische Fluoreszenz erscheint grün-granulär. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen aus drei Wiederholungen. A:U937-Zellen -PMA, B: U937-Zellen +PMA

Ferner ließen sich in PMA-induzierten U937-Zellen die bereits in der Literatur beschriebenen, PMA-induzierten morphologischen Veränderungen wie Größenzunahme, Adhärenz und Ausbildung von Zellfortsätzen deutlich erkennen. Desweiteren konnte 6 Tage nach PMA-Induktion ein deutlicher Anstieg der Granularität als auch der Expression des differenzierungsspezifischen Oberflächenrezeptors CD11b detektiert werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.1.3 Induktion der mononukleären Differenzierung durch IRF-7-induziertes Interferon

Laut den in dieser Arbeit sowie von Lu und Pitha erbrachten Ergebnissen, bedingt eine PMA-Induktion von U937-Zellen sowohl eine verstärkte Expression als auch eine nukleäre Translokation von IRF-7 (LU UND PITHA 2001). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Transkriptionsfaktor IRF-7 an der PMA-induzierten, mononukleären Differenzierung beteiligt sein könnte. Die folgenden Versuche dienen der Klärung der Frage, über welchen Mechanismus IRF-7 zu den beobachteten Veränderungen in den U937-Zellen führen könnte. Dabei ist das Augenmerk auf die von IRF-7-regulierten Gene zu richten. So spielt IRF-7 eine essentielle Rolle in der Induktion von non-IFN- α 1-Genen. So äusserten Lu und Pitha bereits 2001 die Vermutung, dass IRF-7-induziertes Type I Interferon an der PMA-induzierten Differenzierung von U937-Zellen beteiligt sein könnte. Der Nachweis der IFN-induzierten Differenzierung von U937-Zellen gelang ihnen durch exogene Gabe von IFN- α jedoch nicht (LU UND PITHA 2001). Dagegen sprechen Ergebnisse von Buessow und Gillespie sowie Hattori et al. für eine Rolle von IFN- α an der mononukleären Differenzierung. Wie Hattori et al. demonstrieren konnten, führt die alleinige Gabe von IFN- α zu einer myeloiden Reifung von U937-Zellen (HATTORI ET AL. 1983, BUSSOW UND GILLESPIE 1984). Dabei wurde in diesen Experimenten IFN- α aus lymphoblastoiden und peripheren Blutleukozyten sowie rekombinantes humanes Leukozyten IFN- α verwendet. Eine Unterscheidung zwischen IFN- α 1 und non-IFN- α 1 erfolgte jedoch nicht.

Die nun folgenden Versuche wurden zur Bestätigung der Rolle des Transkriptionsfaktors IRF-7 an der non-IFN- α 1-Expression durchgeführt. Zudem sollten eigene Untersuchungen bezüglich der Rolle von non-IFN- α 1 an der mononukleären Differenzierung die widersprüchlichen Literaturangaben ergänzen.

4.1.3.1 IRF-7-spezifische Aktivierbarkeit des IFN- α 6-Promotors

Die Expression von IFN- α 1 (als auch IFN- β) kann sowohl von IRF-7 als auch von IRF-3 induziert werden. Dagegen ist für die Expression von non-IFN- α 1 das Vorhandensein von aktiviertem IRF-7 essentiell (AU WC ET AL. 1998, HONDA ET AL. 2005). Um diese generelle Abhängigkeit der non-IFN- α 1-Expression von IRF-7 zu bestätigen und um ein Nachweissystem für transkriptional aktives IRF-7 zu erhalten, sollte zunächst ein IFN- α 6-Luc-Reporterkonstrukt konstruiert werden. Hierzu wurde der Promotorbereich des IFN- α Subtypes 6 (IFN- α 6) aus dem Genom von Hek-293-Zellen amplifiziert, isoliert und in die MCS des Plasmides pGL2-Control (Promega) inkloniert. Nach erfolgreicher Sequenzierung des inklonierten Fragments konnten mit Hilfe des nun vorliegenden IFN- α 6-Luc-Reporterplasmides Versuche bezüglich der Abhängigkeit der IFN- α 6-Expression von IRF-7 durchgeführt werden. Dabei beruht das Prinzip des IFN- α 6-Luc-Reporterplasmides darin, dass eine Bindung des Transkriptionsfaktors IRF-7 (Homodimer, Heterodimer mit IRF-3) an den IFN- α 6-Promotor erfolgt, wodurch die Expression des angeschlossenen Luciferasegens ermöglicht wird. Die Detektion der Luciferaseaktivität im späteren Zelllysate gibt dann direkten Aufschluss über die transkriptionale Aktivität von IRF-7 sowie der damit verbundenen Expression von IFN- α 6.

In dem folgenden Experiment sollte zunächst die selektive Induktion der Expression des IFN- α 6 durch IRF-7 gezeigt werden. Anstelle von den bisher verwendeten U937-Zellen wurden für diesen Versuch FRhK-4-Zellen verwendet. Diese, in unserem Labor etablierte und von uns für ähnliche Transfektionsexperimente bereits mehrfach verwendete Zelllinie, zeichnet sich durch gute Transfektionsraten sowie anschließenden hohen Proteinausbeuten aus. Die FRhK-4-Zellen wurden mit dem IFN- α 6-Luc-Reporterplasmid „pGL2-IFN- α 6-Luc“ als auch einem IRF-7 Expressionsplasmid „pCR3.1-IRF-7“ cotransfiziert. 42 Stunden später erfolgte die Lyse der Zellen und die Detektion der Luciferaseaktivität. Als Kontrolle der Nicht-Beteiligung von IRF-3 (Homodimere) an der Aktivierbarkeit des IFN- α 6-Luc Promotors diente die Cotransfektion des pGL2-IFN- α 6-Luc zusammen mit dem IRF-3-Expressionsplasmid „pcDNA3.1/IRF-3 (wt)/myc/His“. Wie der Abbildung 4.3 zu entnehmen ist, führt die alleinige Transfektion von FRhK-4-Zellen mit dem IFN- α 6-Luc-Reporterkonstrukt zu keiner messbaren Luciferaseaktivität. Erwartungsgemäß vermag auch die transiente Überexpression von IRF-3 den IFN- α 6-Luc-Promotor, für dessen Induzierbarkeit IRF-7 essentiell ist, nicht zu aktivieren. Erreicht wird dies erst durch die transiente Überexpression von IRF-7. Damit kann die essentielle Rolle von IRF-7 bei der

Aktivierung der Expression von IFN- α 6 (als Vertreter der non-IFN- α 1-Subtypen) bestätigt und die Verwendbarkeit des hergestellten IFN- α 6-Luc-Reporterplasmides, als Indikator für ein IRF-7-spezifisches Genprodukt, klar belegt werden. Zudem wird in diesem Versuch deutlich, dass bereits die alleinige Überexpression von IRF-7 zu dessen Aktivierung führt. Ein Befund, der sich mit den bereits in der Einleitung dargestellten Literaturangaben deckt (CAILLAUD A ET AL 2005).

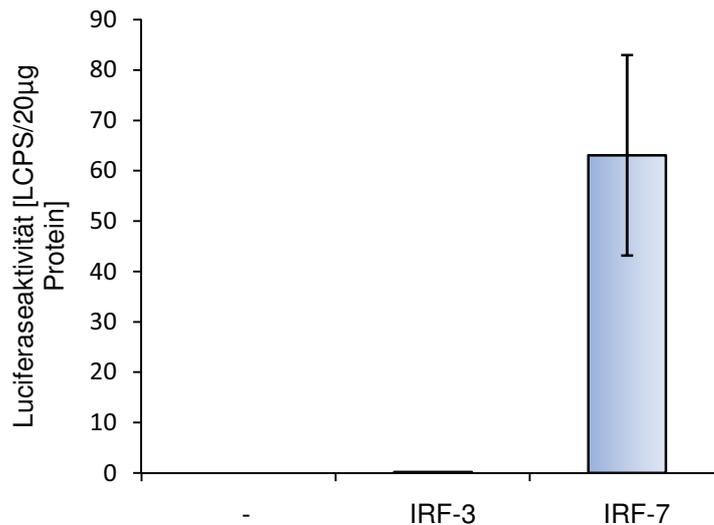


Abbildung 4.3 Induktion von IFN- α 6-Luc durch IRF-7. FRhK-4-Zellen wurden in 6-Well-Zellkulturplatten umgesetzt und mit dem Reporterplasmid „pGL2-IFN- α 6-Luc“ und dem Expressionsplasmid „pCR3.1-IRF-7“ oder „pcDNA3.1/IRF-3 (wt)/myc/His“ cotransfiziert. 42 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen sowie die Ermittlung der Luciferaseaktivität. Die ermittelten Mittelwerte mit Standardabweichungen ergeben sich aus Doppelbestimmungen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen.

4.1.3.2 Mit PMA-induzierte U937-Zellen exprimieren biologisch aktives Interferon

Nachdem am Beispiel von IFN- α 6 die essentielle Rolle von IRF-7 an der non-IFN- α 1-Expression bestätigt werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob mit PMA-induzierte U937-Zellen Interferon exprimieren. Hierzu wurden U937-Zellen in 6-cm²-Zellkulturschalen umgesetzt und mit PMA induziert. Sechs Tage später erfolgte die Abnahme des Überstandes der so behandelten Zellen und das Einsetzen selbigen in einem Plaquereduktionsassay zur Bestimmung des Gesamt-Interferongehaltes. Als Negativkontrolle diente der sechstage alte Überstand von nicht PMA-induzierten U937-Zellen.

Wie der Abbildung 4.4 zu entnehmen ist, beträgt die Interferonkonzentration in nicht PMA-induzierten Zellen 34,0 IU/ml. In PMA-induzierten U937-Zellen hingegen wird eine

Interferonkonzentration von 53,9 IU/ml detektiert. Demnach führt die Induktion von U937-Zellen mit PMA zu der verstärkten Expression von biologisch aktiven Interferon.

Jedoch lässt der hier durchgeführte Test zur Bestimmung der Interferonkonzentration keine Aussage bezüglich des Interferontyps zu. Sollte es sich bei dem detektierten Interferon jedoch unter anderem um non-IFN- α 1 handeln, und sollte dies an der PMA-induzierten Induktion der mononukleären Differenzierung von U937 beteiligt sein, so sollte die Behandlung von U937-Zellen mit non-IFN- α 1 zur Induktion der Differenzierung führen. Im Folgenden sollte deshalb die Wirkung eines non-IFN- α 1 Subtyp auf die Differenzierung von U937-Zellen untersucht werden.

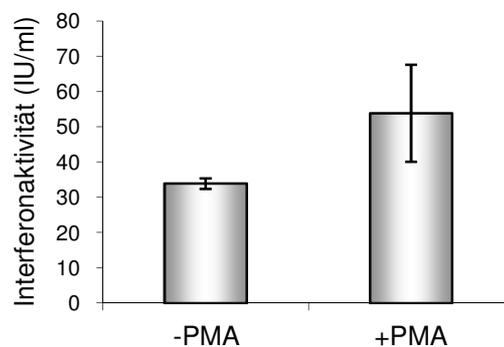


Abbildung 4.4 Bestimmung von biologisch aktiven Interferon in U937-Zellen. U937-Zellen wurden mit 10 ng/ml PMA induziert. Sechs Tage später erfolgte die Bestimmung der Interferonaktivität im Überstand der Zellen mit Hilfe des Plaquereduktionsassays und die Berechnung der IU/ml. Als Negativkontrolle diente der Zellkulturüberstand von nicht mit PMA induzierten U937-Zellen. Die ermittelten Mittelwerte mit Standardabweichungen ergeben sich aus Doppelbestimmungen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen.

4.1.3.3 Interferon bedingt eine Verringerung der Proliferation von U937-Zellen

Nachdem die essentielle Rolle von IRF-7 an der Induktion der non-IFN- α 1-Expression verdeutlicht und eine PMA-induzierte Expression von Interferon detektiert werden konnte, sollte untersucht werden, in wie weit non-IFN- α 1 an der PMA-induzierten Differenzierung von U937-Zellen beteiligt ist. Dabei sollten die folgenden Untersuchungen die in der Literatur widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Rolle von IFN- α an der Differenzierung von U937-Zellen ergänzen. U937-Zellen wurden in 24-Well-Zellkulturplatten umgesetzt und mit verschiedenen Konzentrationen von Interferon- α 2a (IFN- α 2a), Interferon- β (IFN- β) oder beiden zusammen behandelt. Nach sechs Tagen erfolgte eine mikroskopische Betrachtung und eine erneute Bestimmung, der sich im Überstand jedes einzelnen Wells befindlichen Zellzahl. Als Negativkontrolle dienten nicht mit PMA-induzierte, als Positivkontrolle PMA-

induzierte U937-Zellen. Sollte Interferon (und unter ihm auch das IRF-7-spezifische non-IFN- α 1) an der mononukleären Differenzierung der U937-Zellen beteiligt sein, so sollte sich dieses anhand der Morphologie und Adhärenz der Zellen erkennen lassen. Zudem sollte, da der Beginn der Differenzierung mit einem Proliferationsstopp einhergeht, die Zellzahl von mit Interferon-behandelten Zellen deutlich unter der von nicht-PMA-induzierten Zellen liegen.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in der Abbildung 4.5 dargestellt. Dabei ließ sich bereits rein optisch eine Hemmung der Proliferation in mit Interferon-behandelten U937-Zellen beobachten. Diese fiel zwar nicht in dem Maße wie unter PMA-Induktion aus, nahm jedoch mit steigender Interferonkonzentration zu. Differenzierungsspezifische, morphologische Veränderungen der U937-Zellen oder Adhärenz traten jedoch nur in PMA-induzierten, nicht aber in Interferon-behandelten U937 Zellen auf (Ergebnisse nicht dargestellt). Anhand der Abbildung 4.5 lässt sich erkennen, dass in PMA-induzierten Zellen praktisch keine nicht-adhären Zellen im Überstand vorkommen. Alle Zellen sind adhären. Im Gegensatz dazu ist die Anzahl der nicht-adhären Zellen in den unbehandelten Wells stark angestiegen. Hier hat eine ungehemmte Proliferation stattgefunden. Wird die hier bestimmte Zellzahl auf 100% gesetzt, so lässt sich in den Interferon-induzierten Ansätzen eine Inhibition der Proliferation von bis zu 95,6% (IFN- α 2a + IFN- β , 500U/ml) detektieren (Tabelle 4.1).

Eine Behandlung von U937-Zellen mit Interferon führt demnach zu einem starken Rückgang der Proliferation. Allerdings lassen sich in mit Interferon behandelten U937-Zellen keine differenzierungsspezifische, morphologische Veränderungen oder Adhärenz beobachten.

Somit scheint dem Interferon zwar eine wichtige Rolle im Verlauf der mononukleären Differenzierung von U937-Zellen zuzukommen, alleiniger Induktor ist es jedoch nicht. Dennoch scheint auch die PMA-induzierte Expression von non-IFN- α 1 an der PMA-induzierten mononukleären Differenzierung von U937-Zellen beteiligt zu sein. Um die Notwendigkeit von non-IFN- α 1 an der mononukleären Differenzierung weiter zu untersuchen, würden sich hier ergänzende Versuche zu den bereits von Hattori et al. durchgeführten anbieten (HATTORI ET AL. 1983). In der Diskussion wird dieser Punkt abermals aufgegriffen werden.

In diesem Versuchsabschnitt konnte die Bestätigung der wichtigen Rolle von IRF-7 an der PMA-induzierten Differenzierung von U937-Zellen erbracht werden. Es wurde die Abhängigkeit der non-IFN- α 1-Expression von IRF-7 am Beispiel von IFN- α 6 klar belegt und ein Reporterkonstrukt zur Detektion von transkriptional aktiven IRF-7 konstruiert. Zudem

konnte ein PMA-induzierter Anstieg der Expression von Interferon in PMA-induzierten U937-Zellen nachgewiesen sowie die Bedeutung einiger der verschiedenen Interferon-Subtypen (unter anderem non-IFN α 1) an der PMA-induzierten Differenzierung von U937-Zellen bestätigt werden.

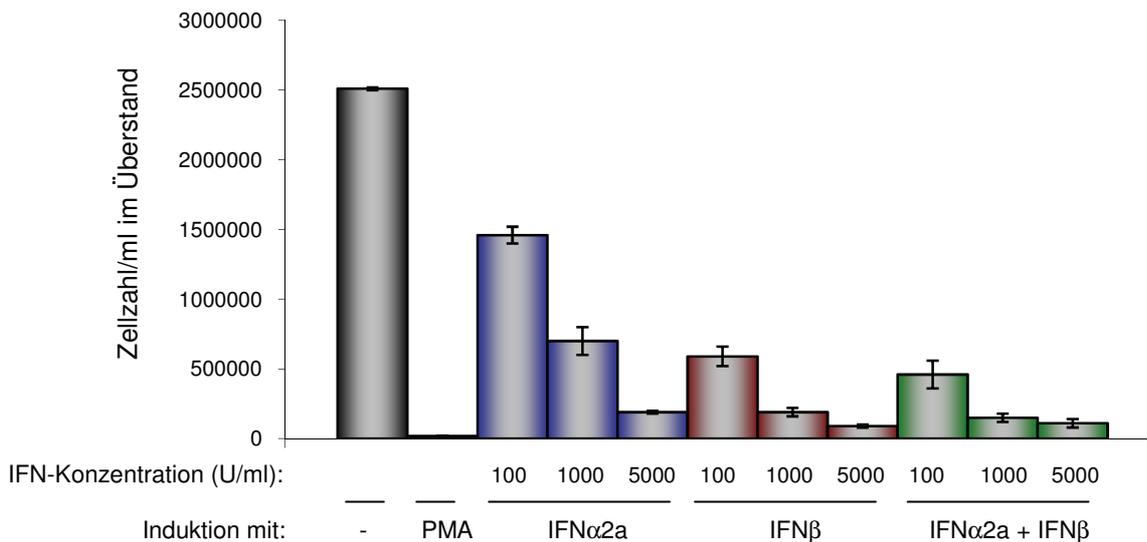


Abbildung 4.5 Bestimmung der Zellzahl/ml von mit Interferon behandelten U937-Zellen. U937-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von IFN- α 2a, IFN- β oder beiden zusammen behandelt. Sechs Tage später erfolgte die Bestimmung der Zellzahl/ml der nicht adhärenen Zellen eines jeden Wells. Als Positivkontrolle diente der Überstand von U937-Zellen, welche mit PMA induziert wurden. Überstand aus nicht PMA-induzierten Zellen diente als Negativkontrolle. Die ermittelten Mittelwerte mit Standardabweichungen ergeben sich aus Doppelbestimmungen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen.

Tabelle 4.1 Bestimmung der Zellzahl/ml von mit Interferon behandelten U937-Zellen. U937-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von IFN- α 2a, IFN- β oder beiden zusammen behandelt. Sechs Tage später erfolgte die Bestimmung der Zellzahl/ml der nicht adhärenen Zellen eines jeden Wells. Als Positivkontrolle diente der Überstand von U937-Zellen, welche mit PMA-induziert wurden. Überstand aus nicht PMA-induzierten Zellen diente als Negativkontrolle. Die Angabe der Reduktion der Proliferation erfolgt in Prozent. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen.

| Induktor | Inhibition der Proliferation in % |
|----------------------------|-----------------------------------|
| --- | 0 |
| PMA | 99,3 |
| IFN α 2 (100 U/ml) | 41,8 |
| IFN α 2 (1000 U/ml) | 72,1 |
| IFN α 2 (5000 U/ml) | 92,4 |
| IFN β (100 U/ml) | 76,5 |
| IFN β (1000 U/ml) | 92,4 |
| IFN β (5000 U/ml) | 96,4 |

| Induktor | Inhibition der Proliferation in % |
|--|-----------------------------------|
| IFN α 2 + IFN β (100 U/ml) | 81,8 |
| IFN α 2 + IFN β (1000 U/ml) | 94,0 |
| IFN α 2 + IFN β (5000 U/ml) | 95,6 |

4.2 Untersuchung der Rolle von IRF-7 in HAV-infizierten mononukleären Zellen

Ziel der bis hierher durchgeführten Versuche war es, die Rolle von IRF-7 sowie der von ihm regulierten non-IFN- α 1-Expression an der mononukleären Differenzierung zu bestätigen. Das nun folgende Kapitel sollte sich dem Einfluss widmen, welchen eine HAV-Infektion auf die mononukleäre Differenzierung und den hierbei involvierten Transkriptionsfaktor IRF-7 ausübt. So sollte in PMA-induzierten U937-Zellen der Effekt einer HAV-Infektion auf IRF-7 untersucht werden. Auch sollten Experimente bezüglich des Einflusses von HAV auf IRF-7 in primären humanen mononukleären Zellen durchgeführt werden.

Hierzu war es zunächst nötig, die verwendeten Zellen mit dem Hepatitis A-Virus zu infizieren und diese Infektion, mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz, zum Nachweis von HAV-Antigen zu bestätigen.

4.2.1 Infektion von primären humanen mononukleären Zellen mit HAV

Die primären humanen mononukleären Zellen wurden aus Buffy-Coats isoliert und im Anschluss kultiviert. Die Zellen erschienen nach einer Woche Kultur unter dem Lichtmikroskop sehr plastisch, mit einem erhabenen „Hügel“ im Bereich des Zellkernes. Auch ließen sich typische makrophagenähnliche Zellfortsätze bereits nach zwei Tagen Kultur erkennen. Allerdings gestaltete sich die Kultivierung dieser Zellen als sehr fehleranfällig und für äußere Einflüsse sensibel. So zeigten sich von jeweils zwei parallel aufgearbeiteten und aus verschiedenen Spendern stammenden Buffy-Coats in der Regel nur die Zellen aus einem Ansatz, auch eine Woche nach der Isolierung, noch vital. Dabei konnte die Isolation der Zellen, im Vergleich zu der in unserer Arbeitsgruppe in früheren Arbeiten verwendeten Isolationsmethode über Plastikadhärenz, durch das Einfügen von zwei zusätzlichen Isolationsschritten (1. Trennung der Monozyten von Lymphozyten, 2. Trennung der Monozyten von Blutplättchen und toten Zellen) erheblich verbessert werden. Zudem wurde unter Verwendung von autologem Serum die Kultivierung erleichtert (Im Vorfeld wurde hier FCS-Gold dem Medium zugesetzt).

Die Infektion der PBMCs erfolgte mit HAV_{GBM} oder HAV/7 entweder direkt im Anschluss an die Isolation oder nach einer Woche Kultivierung. Dabei wurden unterschiedliche MOIs eingesetzt. Der Nachweis von HAV-spezifischen Differenzierungsstörungen erfolgte anhand von morphologischen Veränderungen und der Nachweis von HAV-Antigen mit Hilfe der

indirekten Immunfluoreszenz zur Detektion von HAV. Obwohl eine Infektion von PBMCs mit HAV in der Literatur bereits beschrieben wurde (WÜNSCHMANN ET AL. 2002), gelang in dieser Arbeit weder die Detektion von Differenzierungsstörungen noch die Detektion von HAV-Antigen in den HAV-infizierten PBMCs. Deshalb sollte zunächst mit U937-Zellen als Modellzellen für die mononukleäre Differenzierung weitergearbeitet werden.

4.2.2 Infektion von U937-Zellen mit HAV

Die Infektion der U937-Zellen gestaltete sich ebenfalls als sehr schwierig. Es wurden verschiedene Infektionsversuche unternommen. Dabei erfolgte die HAV-Infektion sowohl vor als auch nach PMA-Induktion. Zudem wurden verschiedene MOIs und Infektionszeiten verwendet. Jedoch führte keine der Infektionsformen zu einer reproduzierbaren HAV-Infektion der U937-Zellen. Auch ließen sich keine Unterschiede in der Größe/Granularität oder wie in der Abbildung 4.6 dargestellten Expression von CD11b in HAV- oder Mock-infizierten Zellen erkennen. Zwar traten hin und wieder morphologische Unterschiede (Abbildung 4.7) zwischen HAV- und Mock-infizierten, PMA-induzierten U937-Zellen auf, diese waren aber sehr selten und ließen sich nicht reproduzieren. Der spezifische Nachweis von HAV-Antigen war nur in einem einzigen Ansatz (Abbildung 4.8) möglich.

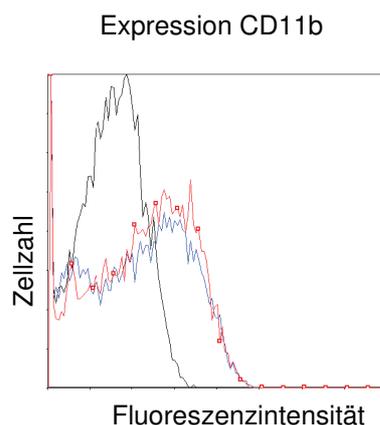


Abbildung 4.6 Analyse des zellulären Oberflächenrezeptors CD11b. U937-Zellen wurden mit HAV-infiziert. 21 Tage später erfolgte die Induktion mit PMA. Nach sechs Tagen wurden die Zellen mittels „Cell Scraper“ vom Boden des Zellkulturgefäßes abgeschabt und mit dem direkt FITC konjugierten α -CD11b Antikörper angefärbt. Die Analyse des Oberflächenrezeptors CD11b erfolgte mit Hilfe des Durchflußzytometers. Dargestellt ist die Expression des Oberflächenrezeptors CD11b von HAV- (rot) und Mock-(blau) infizierten Zellen. Als Kontrolle wurde eine Isotypkontrolle (schwarz) mitgeführt. Die durchflußzytometrische Analyse stellt die Fluoreszenzintensität (Abzisse) in Abhängigkeit zur Anzahl der Zellen (Ordinate) dar. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Wiederholungen.

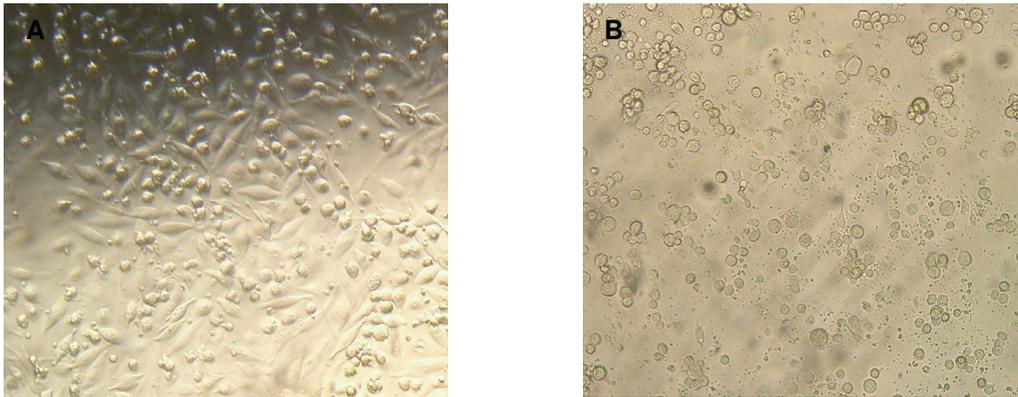


Abbildung 4.7 Infektion von U937-Zellen mit HAV_{GBM}. U937-Zellen wurden für insgesamt 25 Tage mit HAV_{GBM} infiziert. (Infektion mit HAV_{GBM} am Tag 1, 8 und 14) Die Induktion mit PMA wurde am Tag 19 durchgeführt. Sechs Tage später erfolgte die lichtmikroskopische Auswertung. A: U937-Zellen + Mock, B: U937-Zellen + HAV

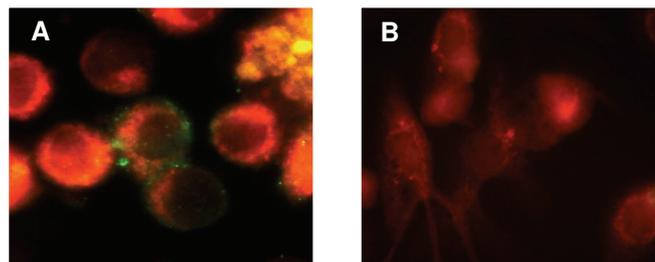


Abbildung 4.8 Infektion von U937-Zellen mit HAV_{GBM}. U937-Zellen wurden für insgesamt 85 Tage mit HAV_{GBM} infiziert. (Infektion mit HAV_{GBM} am Tag 1, 40 und 62) Die Induktion mit PMA erfolgte am Tag 79. Sechs Tage später wurde HAV-Antigen mittels des primären mouse α -HAV (7E7) Antikörpers und des sekundären goat α -mouse FITC Antikörpers nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte unter dem Immunfluoreszenzmikroskop. Die HAV spezifische Fluoreszenz erscheint grün-granulär. A: U937-Zellen +HAV, b.) U937-Zellen +Mock

Eine Erklärungsmöglichkeit, warum sich U937-Zellen so schlecht mit dem Hepatitis A-Virus infizieren lassen, könnte sein, dass sich die Zellen nicht produktiv mit dem Hepatitis A-Virus infizieren lassen. Aufgrund dieser Überlegung erfolgte eine Überprüfung der Entwicklung des HAV-Titers in U937-Zellen. Hierzu wurden U937-Zellen mit PMA-induziert und mit HAV- (MOI: 15) beziehungsweise Mock-Lysat infiziert. Hierzu wurden 625.000 Zellen in einem Infektionsvolumen von 0,2ml (Infektions-Erhaltungsmedium) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach einem sich anschließenden Waschschrift wurden je 10.417 Zellen in ein Well einer 24-Well-Zellkulturplatte umgesetzt (Gesamtvolumen 0,2ml, Infektions-Erhaltungsmedium). 24 Stunden später erfolgte die Zufütterung von 420 μ l Erhaltungsmedium/Well und die Induktion mit PMA. Wöchentlich erfolgte eine

Nachfütterung mit Erhaltungsmedium. 0, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 13 und 21 Tage nach der Infektion wurden die Zellen für eine spätere Austitration des Zelllysates auf MRC-5-Zellen lysiert. Der Nachweis von HAV-Antigen erfolgte mittels der indirekten Immunfluoreszenz. Das Ergebnis dieses Versuches ist in der Abbildung 4.9 dargestellt und lässt klar erkennen, dass sich das ursprünglich eingesetzte HAV-Inokulum im Verlauf der Kultivierung der Zellen heraus verdünnt hat und es folglich zu keiner produktiven Infektion der Zellen gekommen ist.

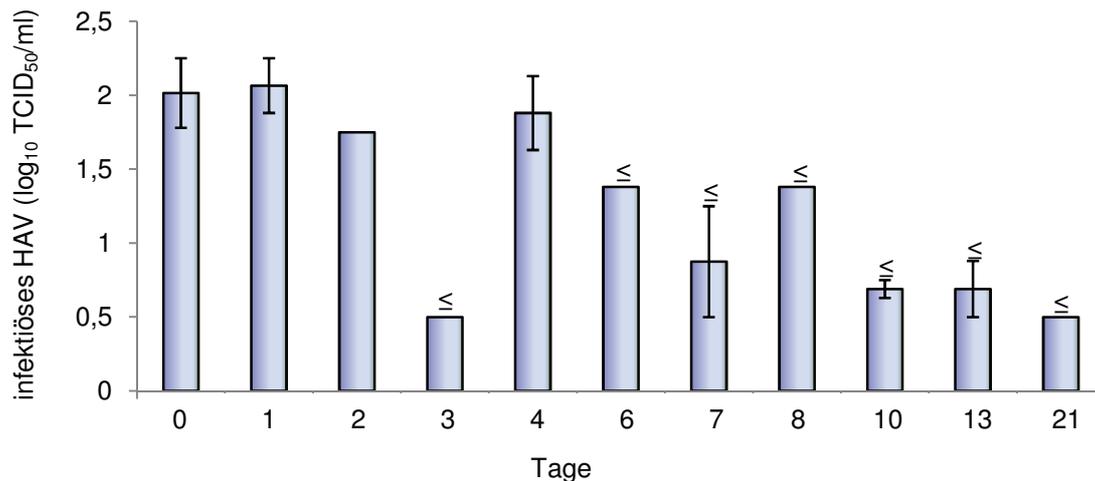


Abbildung 4.9 Kinetik einer HAV-Infektion in PMA-induzierten U937-Zellen. U937-Zellen wurden mit HAV_{GBM} (MOI: 15) infiziert. Nach 0, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 13 und 21 Tagen wurde Zelllysate gewonnen und auf MRC-5-Zellen austitriert. Die Bestimmung der TCID₅₀ erfolgte nach Bestimmung von HAV-Antigen mittels indirekter Immunfluoreszenz und der Berechnung mit der „Spearman-Kärber-Gleichung“. In Zelllysate aus Mock-infizierten Zellen konnte kein HAV-Antigen nachgewiesen werden. Die ermittelten Mittelwerte mit Standardabweichungen ergeben sich aus Doppelbestimmungen.

Somit war die reproduktive Infektion der U937-Zellen in dieser Dissertation nicht möglich. Demzufolge ist die herkömmliche Art der Infektion der U937-Zellen mit dem Hepatitis A-Virus nicht erfolgversprechend. In zukünftigen Arbeiten sollte die Infektion, wie in der Diskussion dargestellt werden wird, auf anderen Wegen erfolgen. Das primäre Ziel sollte hier in der Etablierung einer persistent mit HAV infizierten Population von U937-Zellen liegen.

4.2.3 Transfektion von U937-Zellen mit IRF-7

Da die reproduktive Infektion der U937-Zellen in dieser Dissertation nicht möglich war, sollten in einem abschließenden Experiment U937-Zellen mit dem IRF-7-Expressionsplasmid

„pCR3.1-IRF-7“ transfiziert werden. Dabei sollte untersucht werden, ob die Überexpression von IRF-7 eine Differenzierung auslöst. So würden zwar keine Aussagen bezüglich des Effekts von HAV auf IRF-7 in mononukleären Zellen zu treffen sein, zumindest die essentielle Rolle von IRF-7 an der mononukleären Differenzierung indes würde sich jedoch abermals bestätigen.

Es wurden U937-Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten umgesetzt und mit verschiedenen Verhältnissen von DNA zu jetPEI transfiziert. Lichtmikroskopische und durchflusszytometrische (Nachweis von CD11b) Auswertungen lieferten jedoch keinen Hinweis auf, durch die Überexpression von IRF-7 ausgelöste, differenzierungsspezifische Veränderungen (Ergebnisse nicht dargestellt). Desweiteren ließen Transfektionsversuche mit dem GFP-IRF-7 Expressionsplasmid „pEGFPN1-IRF-7“ eine nur sehr schlechte Transfektionsrate erkennen. Damit sind, mit dem in unserem Labor etablierten Transfektionsmethoden, Transfektionsexperimente mit U937-Zellen zurzeit nicht möglich. Hierzu wäre zunächst die Etablierung einer für U937-Zellen geeigneten Transfektionsmethode, wie der Elektroporation, nötig (LU UND PITHA 2001).

In diesem Versuchsabschnitt gelang weder die HAV-Infektion der U937-Zellen noch die der primären humanen mononukleären Zellen. Der Einfluss, welchen eine HAV-Infektion auf die mononukleäre Differenzierung und den hierbei involvierten Transkriptionsfaktor IRF-7 ausübt, konnte nicht untersucht werden. Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses von überexprimierten IRF-7 auf die Differenzierung von U937-Zellen konnten ebenfalls nicht durchgeführt werden. Die mit diesem Versuchsabschnitt verbundenen Erwartungen wurden nicht erfüllt. Jedoch konnte in vorherigen Versuchsabschnitten unter anderem die wichtige Rolle von IRF-7 an der PMA-induzierten Differenzierung von U937-Zellen bestätigt werden. Um trotz der Kultivierungs-, Transfektions- und Infektions –Schwierigkeiten mit sowohl den U937- als auch den primären humanen mononukleären Zellen dennoch den Effekt einer HAV-Infektion auf den Transkriptionsfaktor IRF-7 untersuchen zu können, wurden, für die sich nun anschließenden Versuche, FRhK-4-Zellen verwendet. Diese, in unserem Labor etablierte und von uns für ähnliche Fragestellungen bereits mehrfach verwendete Zelllinie, stellt ein etabliertes Zellkultursystem zur Kultivierung von HAV dar. Zudem zeichnen sich FRhK-4-Zellen durch ihre einfache Transfizierbarkeit mit guten Transfektionsraten sowie anschließenden hohen Proteinausbeuten aus. Im Folgenden wurden deshalb FRhK-4-Zellen als Zellkultursystem zur Überprüfung des Einflusses einer HAV-Infektion auf IRF-7

verwendet.

Zur Untersuchung eines möglichen Effekts des HAV auf die transkriptionale Aktivität von IRF-7 sollten im Folgenden Transfektionsexperimente mit Reporterkonstrukten, welche die transkriptionale Aktivität von IRF-7 („pGL2-IFN- α 6-Luc“) beziehungsweise IRF-3 („PRDIII-D)₄-Luc widerspiegeln, durchgeführt werden. Desweiteren sollte der Effekt, einer HAV-Infektion auf Phosphorylierung als auch nukleäre Translokation von IRF-7 sowie auf die Expression von non-IFN- α 1 in FRhK-4-Zellen, untersucht werden.

4.3 Einfluss des Hepatitis A-Virus auf den Transkriptionsfaktor IRF-7

Der für die Differenzierung mononukleärer Zellen essentielle Transkriptionsfaktor IRF-7 muss, um transkriptional aktiv werden zu können, phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung führt zur Translokation von IRF-7 in den Zellkern, wo es an Promotorbereiche von, durch IRF-7, regulierbare Gene binden und deren Transkription auslösen kann. In den folgenden Versuchen sollte der Einfluss des Hepatitis A-Virus sowohl auf die transkriptionale Aktivität als auch auf die NDV-induzierte Phosphorylierung und die sich anschließende nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors IRF-7 genauer untersucht werden. Hierzu wurde die in unserem Labor etablierte Zellkulturlinie FRhK-4 verwendet. Da sich diese Zellen reproduzierbar und leicht nachweisbar mit HAV infizieren sowie mit hohen Transfektionsraten transfizieren lassen, stellen FRhK-4-Zellen ein geeignetes Zellkultursystem zur Überprüfung der Fragestellung dar. Aufgrund fehlender Daten bezüglich der Expression von IRF-7 in FRhK-4-Zellen, musste jedoch zunächst die Expressionsrate von IRF-7 in diesen Zellen auf Protein- sowie auf mRNA-Ebene untersucht werden.

4.3.1 Untersuchung der Expression von IRF-7 in FRhK-4-Zellen

Zur Bestimmung der Expression von IRF-7 in FRhK-4-Zellen, wurden selbige für 10 Tage in 6-cm²-Zellkulturschalen kultiviert. Es folgte die Lyse der Zellen mit Hilfe des Zellysis-Puffers. Zur Ermittlung des Phosphorylierungsstatus von IRF-7 erfolgte die Zellyse unter Zugabe eines Phosphatase-Inhibitors und Protease-Inhibitor-Cocktails. 30 μ g des so gewonnenen Zellysats wurden in einen Immunoblot eingesetzt. In diesem erfolgte der Nachweis von IRF-7 mit IRF-7-spezifischen Antikörpern. Als Positivkontrolle wurden FRhK-

4-Zellen, welche transient mit dem Expressionsplasmid „pCR3.1-IRF-7“ transfiziert wurden, mitgeführt. Wie der Abbildung 4.10 zu entnehmen ist, exprimieren FRhK-4-Zellen kein endogenes IRF-7.

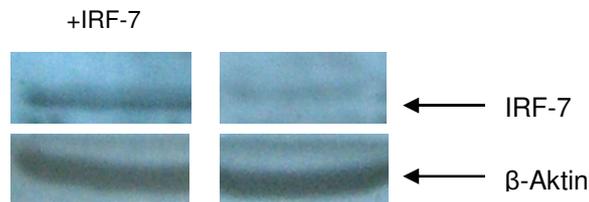


Abbildung 4.10 Nachweis von IRF-7 in FRhK-4-Zellen im Immunoblot. Detektion von IRF-7 mittels des primären mouse α -IRF-7 Antikörpers und des sekundären goat α -mouse HRP Antikörpers in FRhK-4-Zellen. Die IRF-7-spezifische Bande liegt auf Höhe von ~ 67 kDa. Als Kontrolle dienen FRhK-4-Zellen, welche das Expressionsplasmid „pCR3.1-IRF-7“ transient überexprimieren. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Wiederholungen.

In früheren Arbeiten konnte von unserer Arbeitsgruppe jedoch gezeigt werden, dass es im Verlauf einer Hepatitis A-Virus Infektion zu einer Aktivierung von NF- κ B kommt (BERK 2003). Da dieses die Expression von IRF-7 induziert (LU R ET AL. 2002), sollte im Folgenden untersucht werden, ob nicht zumindest HAV-infizierte FRhK-4-Zellen IRF-7 exprimieren.

Um eine HAV-induzierte Expression von IRF-7 in FRhK-4-Zellen zu untersuchen, wurde das Expressionslevel von IRF-7 sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene untersucht. Dazu wurden bereits seit 10 Tagen mit HAV- oder Mock-Lysat infizierte Zellen mit Hilfe des Zelllysis-Puffers lysiert. 30 μ g des so gewonnenen Zelllysats wurden in einen Immunoblot eingesetzt und IRF-7 mit IRF-7-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Ferner wurde eine RT-PCR zum Nachweis von IRF-7 mRNA mit dem Überstand aus, seit 7 Tagen mit dem Hepatitis A-Virus infizierten, FRhK-4-Zellen durchgeführt. Das Ergebnis aus diesen beiden Versuchen (nicht dargestellt) lieferte jedoch kein klares Resultat, weshalb zur Abklärung einer eventuell vorliegenden, zeitlich begrenzten, Hochregulation von IRF-7 durch HAV eine Kinetik zum Nachweis von IRF-7 mRNA in HAV-infizierten FRhK-4-Zellen angefertigt wurde. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist der Abbildung 4.11 zu entnehmen. Neben unspezifischen Banden in den HAV-Ansätzen, lassen sich weder in den mit Mock- noch in den mit HAV-Lysat infizierten Ansätzen IRF-7-spezifische Banden erkennen. Im Verlauf einer HAV-Infektion kommt es somit zu keinem Zeitpunkt zu einer Hochregulation von IRF-7. Demnach wird IRF-7 weder in Mock- noch in HAV-Lysat infizierten FRhK-4-Zellen exprimiert.

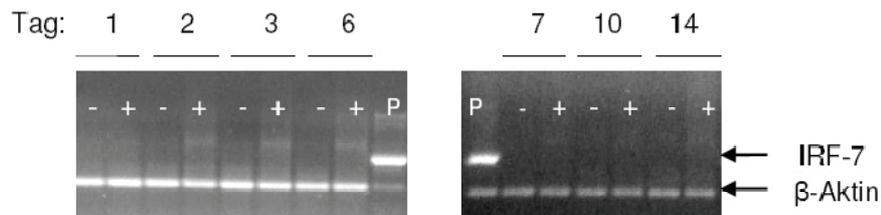


Abbildung 4.11 Kinetik des Nachweises von IRF-7 mRNA FRhK-4 Zellen wurden mit HAV- oder Mock-Lysat infiziert. 1, 2, 3, 6, 7, 10 und 14 Tage später erfolgte die Lyse der Zellen mit anschließender RNA-Extraktion. Als Kontrolle dient aus IRF-7 transient überexprimierenden FRhK-4-Zellen extrahierte mRNA. + = HAV-Lysat, - = Mock-Lysat, P=Positivkontrolle

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, führt die Bindung von IFN- α/β an den sogenannten IFNAR-Rezeptor zur Expression von IRF-7. Da in unserer Arbeitsgruppe jedoch bereits gezeigt werden konnte, dass FRhK-4-Zellen auf exogenes Interferon nicht reagieren (BRACK 1999), musste auch die Möglichkeit der Interferon-induzierten Expression von IRF-7 verworfen werden.

Im Verlauf der hier dargestellten Versuche bezüglich der Expression von IRF-7 in FRhK-4-Zellen wurde die Erkenntnis erlangt, dass sich der Einfluss von HAV auf IRF-7 anhand von endogenem IRF-7 in diesem Zellkultursystem nicht untersuchen lässt. Folglich musste IRF-7 in den folgenden Versuchen in den FRhK-4-Zellen überexprimiert werden. Dies erfolgte mit Hilfe der Transfektion des IRF-7-Expressionsplasmides „pCR3.1-IRF-7“ sowie des GFP-gekoppelten IRF-7-Expressionsplasmides „pEGFPN1-IRF-7“.

4.3.2 Einfluss des Hepatitis A-Virus auf die transkriptionale Aktivität des Transkriptionsfaktors IRF-7

Um den Einfluss einer HAV-Infektion auf die transkriptionale Aktivität des IRF-7 zu untersuchen, sollte die, durch IRF-7-induzierbare, Aktivität des PRDIII/I Promotorbereiches des IFN- β -Enhancers untersucht werden. Dazu wurden bereits seit 10 Tagen mit HAV-infizierte FRhK-4-Zellen, in 6-Well-Zellkulturplatten umgesetzt und mit dem Reporterplasmid „(PRDIII-I)₄-Luc“ sowie dem Expressionsplasmid „pCR3.1-IRF-7“ beziehungsweise mit einem Leervektor („pcDNA3.1/myc-His“) cotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte, zur Aktivierung von überexprimierten IRF-7 sowie endogenem IRF-3, die Infektion mit NDV (MARIÉ ET AL. 2000, AU ET AL 1998) und 18 Stunden später Zellyse sowie Bestimmung der Luciferaseaktivität.

Da im Reporterplasmid „(PRDIII-I)₄-Luc“ eine Bindung der Transkriptionsfaktoren IRF-3 und IRF-7 (Homodimere sowie Heterodimere) an die PRDIII/I die Expression des angeschlossenen Luciferasegens bewirkt, gibt die Detektion der Luciferaseaktivität im späteren Zelllysate direkten Aufschluss über die transkriptionale Aktivität von IRF-3 und IRF-7. Aufgrund der in Vorversuchen bestätigten Tatsache, dass FRhK-4-Zellen unter normalen Bedingungen kein IRF-7 exprimieren, muss dieser Transkriptionsfaktor zuvor durch Transfektion der FRhK-4 Zellen mit dem Expressionsplasmid „pCR3.1-IRF-7“ in diesen Zellen überexprimiert werden. Dabei ist eine IRF-3-induzierte, Interferon-vermittelte endogene Expression von IRF-7 in HAV infizierten Zellen nicht möglich, da HAV bereits die Aktivierung von IRF-3 hemmt (FENSTERL ET AL. 2005) und FRhK-4-Zellen zudem für exogenes Interferon nicht sensibel sind (BRACK 1999). Ferner konnte gezeigt werden, dass auch eine HAV-Infektion keine Hochregulation von IRF-7 bewirkt (Abb 4.11).

Der Abbildung 4.12 ist zu entnehmen, dass die alleinige Transfektion von FRhK-4-Zellen mit dem Reporterplasmid „(PRDIII-I)₄-Luc“, sowohl in Mock- als auch in HAV-infizierten Zellen, zu keiner Induktion des Luciferasegens führt. In der Abbildung lässt sich zudem der von unserer Arbeitsgruppe bereits mehrfach aufgezeigte Effekt einer HAV-Infektion auf endogenes IRF-3 erkennen. Hier wird klar ersichtlich, dass eine HAV-Infektion die durch NDV-induzierte transkriptionale Aktivität von endogenem IRF-3 vollständig blockiert. Desweiteren lässt sich der Abbildung 4.12 entnehmen, dass die alleinige Überexpression von IRF-7 zu einer schwachen Aktivierung der PRDIII/I-Luc führt. Diese, im Folgenden als konstitutive Aktivität bezeichnete, Eigenschaft könnte auf eine durch die Überexpression von IRF-7 bedingte Aktivierung der IKK ϵ und TBK-1 beruhen (CAILLAUD ET AL. 2005). Da diese beiden Kinasen sowohl IRF-7 als auch IRF-3 aktivieren können, ist die hier gemessene PRDIII/I-Luc-Promotoraktivität auf beide Transkriptionsfaktoren zurückzuführen. Wie der Abbildung 4.12 weiter zu entnehmen ist, führt eine zusätzliche Induktion mit NDV zu einer verstärkten PRDIII/I-Luc-Promotoraktivität. Dies liegt in der NDV-bedingten Aktivierung des Signalweges, welcher zur Aktivierung des Interferonsystems führt, begründet. Da in diesem Signalweg IRF-7 als auch IRF-3 aktiviert werden, kann hier keine Aussage bezüglich der selektiven Aktivität der beiden Transkriptionsfaktoren getroffen werden. Ferner lässt sich der Abbildung jedoch entnehmen, dass eine HAV-Infektion sowohl die konstitutive als auch die durch NDV-induzierte verstärkte Aktivität von überexprimierten IRF-7 als auch endogenem IRF-3 zu reduzieren vermag. Da eine HAV-Infektion den Transkriptionsfaktor IRF-3 sicher hemmt, können mit Hilfe dieser Ergebnisse zudem Aussagen bezüglich des Effektes von HAV auf den Transkriptionsfaktor IRF-7 getroffen werden. Demnach spielt IRF-3 in den

HAV-infizierten Ansätzen bei der Induktion des PRDIII/I Promotors keine Rolle. Diese wird stattdessen ausschließlich von dem überexprimierten IRF-7 hervorgerufen. Die Tatsache, dass die PRDIII/I-Luc-Promotoraktivität in HAV-infizierten Zellen nach einer NDV-Infektion unterhalb derer ohne NDV liegt, lässt demnach den folgenden Schluss zu: Überexprimiertes IRF-7 erfährt in HAV-infizierten FRhK-4-Zellen keine NDV-induzierte Aktivierung, sondern eine leichte Reduktion seiner Eigenschaft zur Aktivierung des PRDIII/I-Luc-Promotorkonstruktes. Somit übt das Hepatitis A-Virus einen negativen Effekt auf die transkriptionale Aktivität von IRF-7 aus.

Die in diesem Versuchsabschnitt beobachtete Tatsache, dass NDV-induziertes endogenes IRF-3 zu einer scheinbar stärkeren Aktivierung des PRDIII/I-Luc-Reporterkonstruktes führt als NDV-induziertes endogenes IRF-3 mit überexprimierten IRF-7 zusammen, wird in dem folgendem Abschnitt genauer untersucht werden.

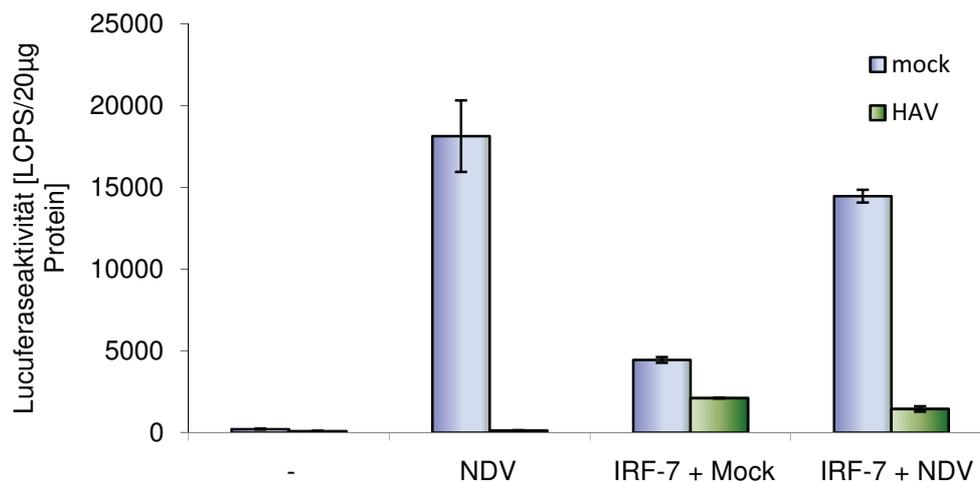


Abbildung 4.12 Induktion der PRDIII/I-Luc Aktivität durch IRF-7. FRhK-4-Zellen wurden für 10 Tage mit HAV/7 infiziert und im Anschluss in 6-Well-Zellkulturplatten umgesetzt und mit dem Reporterplasmid „(PRDIII-I)₄-Luc“ und dem Expressionsplasmid „pCR3.1-IRF-7“ cotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Infektion mit NDV und weitere 18 Stunden später die Lyse der Zellen sowie die Ermittlung der Luciferaseaktivität. Als Kontrolle dienen Zellen, welche anstelle mit dem Expressionsplasmid „pCR3.1-IRF-7“ mit einem Leervektor („pcDNA3.1/myc-His“) transfiziert wurden. Zum Nachweis einer tatsächlichen HAV-Infektion wurde eine indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von HAV durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelbestimmungen. Zudem stellt die Abbildung ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Wiederholungen dar.

4.3.2.1 Untersuchung der Wechselwirkung von NDV-aktivierten IRF-3 mit IRF-7

Wie in der Einleitung dargestellt gibt es, neben nur einem IFN- β - eine Vielzahl von IFN- α - Genen. Während IRF-7 für die Expression von IFN- β und IFN- $\alpha 1$ nicht notwendig ist, ist es für die Transkription der übrigen IFN- α -Gene (non-IFN- $\alpha 1$ -Gene) essentiell. Nun besitzt der Promotorbereich des hier verwendeten PRDIII/I-Luc Reporterplasmides jedoch nicht nur Bindestellen für IRF-3 Homodimere sondern verfügt zudem über Bindestellen für IRF-3/IRF-7 Heterodimere. Ähnliches gilt für den Promotorbereich des IFN- $\alpha 6$ -Luc Reporterkonstruktes, welches neben Bindestellen für IRF-7 Homodimere auch über solche für IRF-3/IRF-7 Heterodimere verfügt. Somit besteht die Möglichkeit der Wechselwirkung der Transkriptionsfaktoren IRF-7 und IRF-3 miteinander. Ob dies tatsächlich der Fall ist, sollte mit den nun folgenden Versuchen geklärt werden.

Zunächst sollte der Effekt einer IRF-7-Überexpression auf die NDV-induzierte Aktivierbarkeit der PRDIII/I des Interferon- β Enhancers in FRhK-4-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden FRhK-4-Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten umgesetzt und mit dem Reporterplasmid „(PRDIII-I)₄-Luc“ alleine oder zusammen mit dem Expressionsplasmid „pCR3.1-IRF-7“ cotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte, zur Aktivierung von IRF-7, die Infektion mit NDV (MOI: 1) und 18 Stunden später Zelllyse sowie Bestimmung der Luciferaseaktivität. Der Abbildung 4.13 ist zu entnehmen, dass eine NDV-Infektion zu der erwarteten Verstärkung der PRDIII/I Promotoraktivität führt. Ausgelöst wird dies durch die NDV-induzierte Aktivierung von endogenem IRF-3. Auch die alleinige Überexpression von IRF-7 bedingt in diesem System die bereits in der Abbildung 4.12 beobachtete geringe Aktivität des PRDIII/I Promotors. Interessanterweise resultiert die Überexpression von IRF-7 in NDV-induzierten Ansätzen jedoch in einer Verringerung der normalerweise durch NDV-induzierten PRDIII/I Promotoraktivität. Anscheinend vermag überexprimiertes IRF-7 die durch endogenes IRF-3 (aktiviert durch NDV) vermittelte, starke Aktivierbarkeit dieses Promotors zu reduzieren. Ein Effekt, welcher sich bereits in der Abbildung 4.12 zeigte.

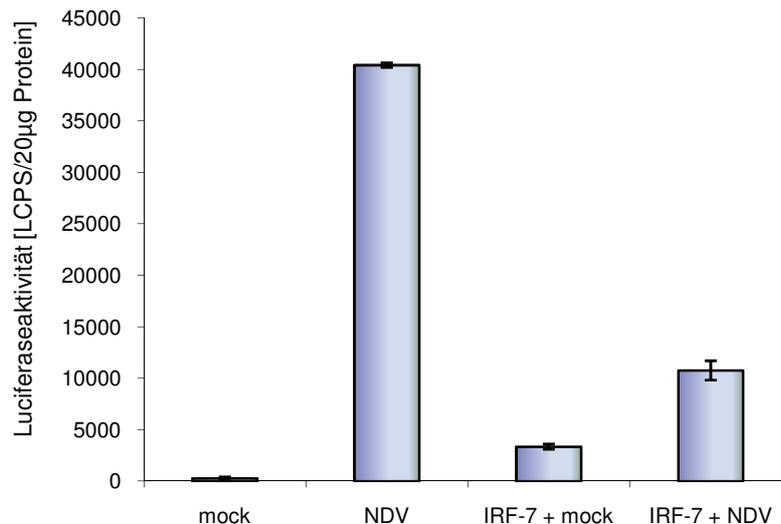


Abbildung 4.13 Induktion der PRDIII/I-Luc Aktivität durch endogenes IRF-3 und überexprimiertes IRF-7 in FRhK-4-Zellen. FRhK-4-Zellen wurden in 6-Well-Zellkulturplatten umgesetzt und mit dem Reporterplasmid „(PRDIII-I)₄-Luc“ alleine oder zusammen mit dem Expressionsplasmid „pCR3.1-IRF-7“ cotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Infektion mit NDV und weitere 18 Stunden später die Lyse der Zellen sowie die Ermittlung der Luciferaseaktivität. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Wiederholungen.

In einem weiteren Experiment sollte nun der Einfluss von überexprimierten IRF-3 auf die normalerweise durch überexprimiertes IRF-7 induzierte IFN- α 6-Luc-Promotoraktivität untersucht werden. Hierzu wurden FRhK-4-Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten umgesetzt und mit dem Reporterplasmid „IFN- α 6-Luc“ alleine oder zusammen mit den Expressionsplasmiden „pCR3.1-IRF-7“ und/oder „pcDNA3.1/IRF-3 (wt)/myc/His“ cotransfiziert. Dabei konnte die aus der alleinigen Überexpression von IRF-3 resultierende konstitutive Aktivität von IRF-3, bereits in einer Dissertation unserer Arbeitsgruppe unter Verwendung eines „PRDIII/I-CAT“ Reporterplasmides eindeutig gezeigt werden (PAULMANN 2008). 42 Stunden nach der Transfektion erfolgten Zelllyse sowie Bestimmung der Luciferaseaktivität. Wie in der Abbildung 4.14 zu erkennen, führt die Überexpression von IRF-3 zu keiner Aktivierung des IFN- α 6-Luc Reporterkonstruktes. Eine deutliche Aktivierung des IFN- α 6- Promotors lässt sich erst durch Überexpression von IRF-7 beobachten. Dagegen führt die gleichzeitige Überexpression von IRF-3 und IRF-7 zu einer deutlichen Reduktion der, durch alleinige Überexpression von IRF-7 hervorgerufenen, IFN- α 6-Promotoraktivität.

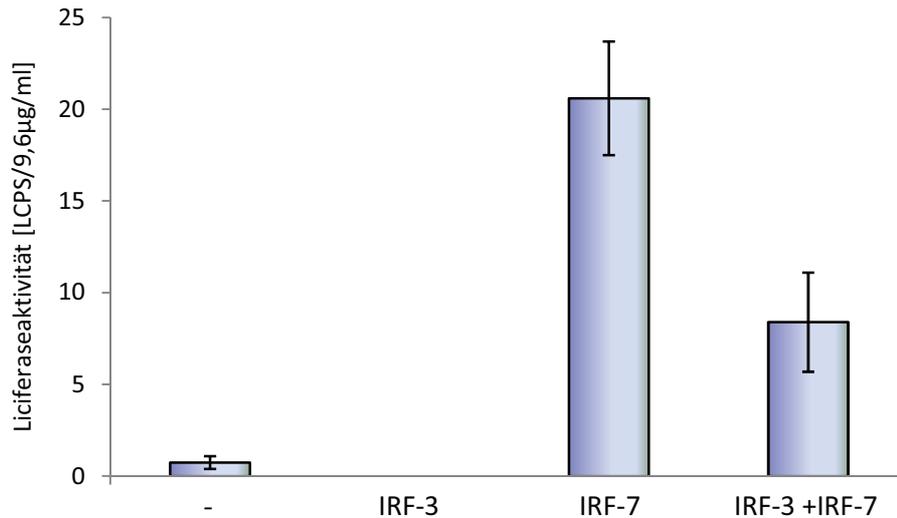


Abbildung 4.14 IRF-3- beziehungsweise IRF-7-induzierte Induktion von IFN- α 6-Luc in FRhK-4-Zellen. FRhK-4-Zellen wurden in 6-Well-Zellkulturplatten umgesetzt und mit dem Reporterplasmid „pGL2-IFN- α 6-Luc“ alleine oder zusammen mit dem Expressionsplasmid „pCR3.1-IRF-7“ und/oder „pcDNA3.1/IRF-3 (wt)/myc/His“ cotransfiziert. 42 Stunden später erfolgte die Lyse der Zellen sowie die Ermittlung der Luciferaseaktivität. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen.

Unabhängig von der Fragestellung dieser Dissertation konnte im Verlauf der Durchführung der hier dargestellten Experimente somit die unerwartete Erkenntnis gewonnen werden, dass sowohl IRF-3 als auch IRF-7 die transkriptionale Aktivität des jeweiligen anderen supprimiert.

4.3.3 HAV hemmt die NDV-induzierte nukleäre Translokation von IRF-7

Im Abschnitt 4.3.2 konnte eine geringe Hemmung der transkriptionalen Aktivität des Transkriptionsfaktors IRF-7 gezeigt werden. Um an die Promotorregionen von regulierten Genen binden zu können und deren Transkription zu induzieren, muss IRF-7 zunächst in den Zellkern translocieren. Ermöglicht wird diese nukleäre Translokation durch mehrere C-terminale Phosphorylierungen, wodurch die Kernlokalisationssequenz des Transkriptionsfaktors zugänglich wird. Der folgende Versuch sollte der Klärung der Frage dienen, ob eine HAV-Infektion die nukleäre Translokation von IRF-7 beeinflusst.

Zur erleichterten Detektion von IRF-7 in FRhK-4-Zellen, wurde zunächst ein stabil GFP-IRF-7 exprimierender FRhK-4-Zellklon hergestellt. Hierzu wurde das Plasmid „pEGFPN1-IRF-7“

in FRhK-4-Zellen mit Hilfe der Calcium-Phosphat Transfektion eingebracht, transfizierte Zellen mittels G418 selektiert und so ein FRhK-4-Zellklon isoliert, welcher GFP-gekoppeltes IRF-7 stabil überexprimiert. Die Lokalisation von GFP-IRF-7 lässt sich in diesem Zellklon durch einfache Betrachtung der Zellen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop feststellen. Die Fluoreszenz des GFP-IRF-7 erscheint grün. In dem für die Experimente ausgewählten Zellklon lässt sich IRF-7, unter normalen Zellkulturbedingungen, ausschließlich im Cytoplasma detektieren.

Um den Einfluss einer Hepatitis A-Virus-Infektion auf die Lokalisation von IRF-7 in den FRhK-4-GFP-IRF-7 (Klon 6)-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst mit HAV/7 (MOI 1) oder Mock-Lysat infiziert, nach 10 Tagen in 6-cm²-Zellkulturschalen überführt und am nächsten Tag, zwecks Auslösung des zur Phosphorylierung von IRF-7 führenden Signalweges, mit NDV (MOI 10) induziert. Im Anschluss an die NDV-Infektion erfolgte 8 Stunden später die Fixierung der Zellen und das Abtöten noch vorhandener Viruspartikel mit 4% Paraformaldehyd/PBS (20 Minuten, RT). Die abschließende Bestimmung der Lokalisation von GFP-IRF-7 wurde mit Hilfe des Immunfluoreszenzmikroskopes (Filter 09, Anregungswellenlänge: 450-490 nm) durchgeführt.

Wie der Abbildung 4.15 zu entnehmen ist, liegt GFP-IRF-7 in nicht-HAV und nicht-NDV infizierten Zellen im Cytoplasma vor (4.15a). Eine alleinige NDV Infektion führt nach 8 Stunden in vielen Zellen zu einer Translokation von IRF-7 in den Zellkern (4.15b). Dagegen weisen nur mit HAV infizierte Zellen keine nukleäre Translokation von IRF-7 auf (4.15c). Desweiteren zeigen, zuvor für 10 Tage mit HAV-infizierte, Zellen nach einer NDV Infektion ebenfalls keine Translokation von IRF-7 in den Zellkern (4.15d).

Eine alleinige HAV Infektion führt somit zu keiner nukleären Translokation von IRF-7. Sie verhindert vielmehr sogar die NDV-induzierte Translokation von IRF-7 in den Zellkern.

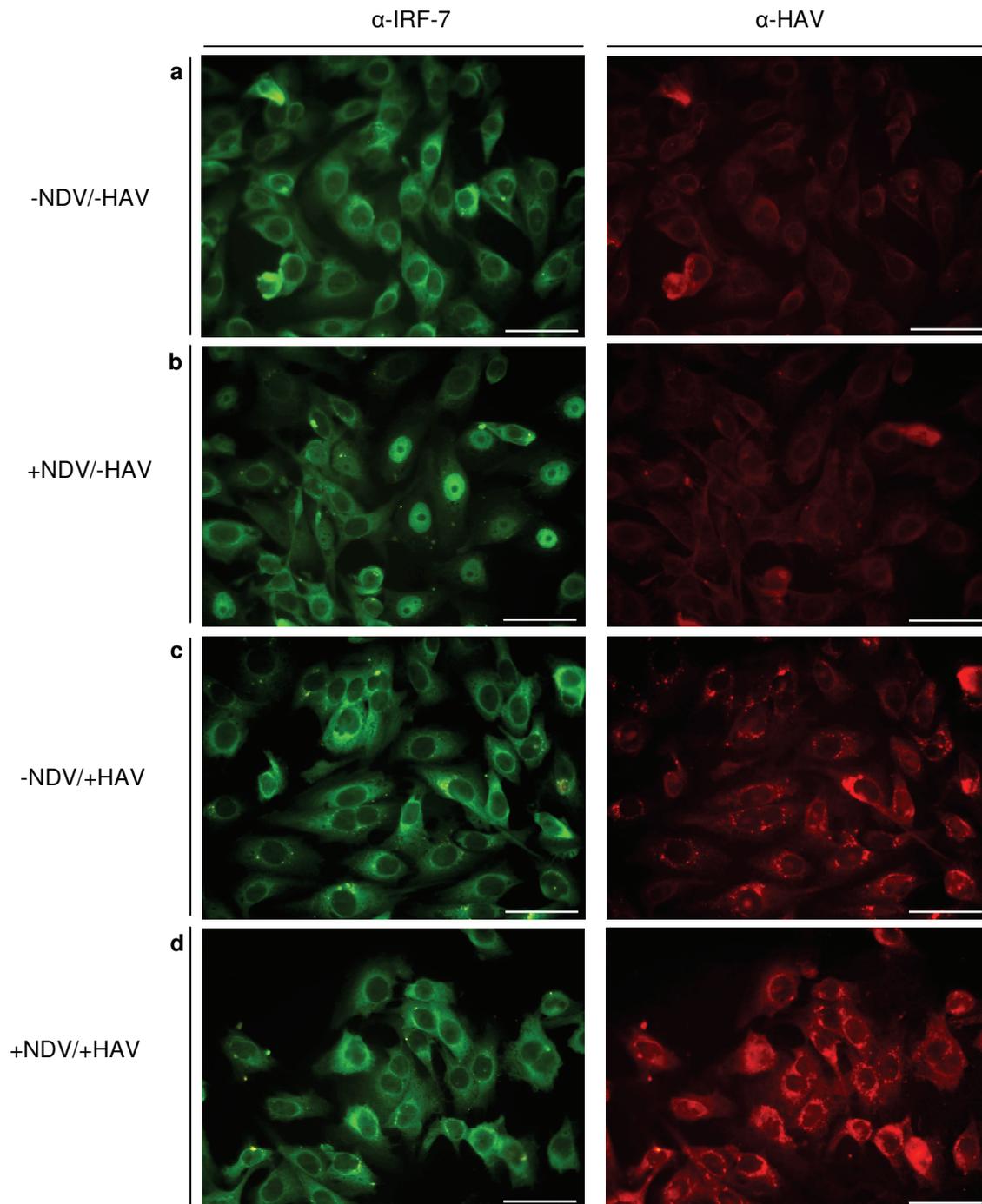


Abbildung 4.15 Nachweis von GFP-IRF-7 in HAV-infizierten, NDV-induzierten FRhK-4 –GFP-IRF-7 (Klon 6)-Zellen. Detektion von IRF-7 mittels des an IRF-7 gekoppelten GFP. Die Zellen wurden für 10 Tage mit HAV/7 oder Mock infiziert, in 6-cm² Zellkulturschalen umgesetzt und mit NDV (MOI: 1) infiziert. Die Auswertung erfolgte 8 Stunden nach der NDV Infektion unter dem Immunfluoreszenzmikroskop. Eine indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von HAV-Antigen galt dem Nachweis einer tatsächlichen HAV-Infektion. Der durch eine Linie signalisierte Maßstab beträgt 50µm. (a.) FRhK-4-IRF-7-GFP (Klon 6)-Zellen (-HAV/-NDV), b.) FRhK-4-GFP-IRF-7 (Klon 6)-Zellen (-HAV/+NDV), c.), FRhK-4-GFP-IRF-7 (Klon 6)-Zellen (+HAV/-NDV) und d.) FRhK-4-GFP-IRF-7 (Klon 6)-Zellen (+HAV/+NDV). Die spezifische IRF-7 Fluoreszenz erscheint grün, die von HAV rot. Die dargestellten Abbildungen stellen ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen dar.

4.3.4 HAV hemmt die NDV-induzierte Phosphorylierung von IRF-7

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine HAV-Infektion die NDV-induzierte transkriptionale Aktivität wie auch die nukleäre Translokation von IRF-7 negativ beeinflusst, sollte nun die für die nukleäre Translokation essentielle Phosphorylierung von IRF-7 untersucht werden. Hierzu wurde ein IRF-7 stabil überexprimierender FRhK-4-Zellklon hergestellt. Dazu wurde das Plasmid „pCR3.1-IRF-7“ mit Hilfe der Calcium-Phosphat Transfektion in FRhK-4-Zellen transfiziert und erfolgreich transfizierte Zellen mit G418 selektiert. In dem für weitere Experimente ausgewählten Zellklon (FRhK-4-IRF-7“, Klon 7) ist IRF-7, unter normalen Zellkulturbedingungen, ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert. Die stabile IRF-7-Überexpression konnte sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im Immunoblot detektiert werden.

Um den Einfluss einer Hepatitis A-Virus Infektion auf die Phosphorylierung von IRF-7 in den FRhK-4-IRF-7 (Klon7)-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst mit HAV/7 (MOI: 1) oder Mock-Lysat infiziert, nach 10 Tagen in 6-cm²-Zellkulturschalen überführt und am nächsten Tag mit NDV (MOI: 10) infiziert. Dabei dient die NDV-Infektion der Induktion des Signalweges zur Phosphorylierung von IRF-7. Null und acht Stunden nach erfolgter NDV-Infektion erfolgte die Lyse der Zellen mit Hilfe des Zelllysis-Puffers. Um den Phosphorylierungsstatus von IRF-7 zu erhalten, erfolgte die Zelllyse unter Zugabe eines Phosphatase-Inhibitors und Protease-Inhibitor-Cocktails. Von dem so gewonnenen Zelllysat wurden 30µg in einen Immunoblot eingesetzt. In diesem erfolgte der Nachweis von IRF-7 mit IRF-7-spezifischen Antikörpern. Wie in der Abbildung 4.16 zu erkennen, lässt sich in allen Ansätzen eine IRF-7-spezifische Einzelbande detektieren. Im Anschluss an eine NDV-Infektion kommt es nach 8 Stunden zu einem Auftreten von zusätzlichen IRF-7 spezifischen Banden. Diese, für verschiedene Phosphorylierungsstadien des IRF-7 stehende Banden, treten in Zellen, welche zuvor für 10 Tage mit HAV infiziert wurden, nicht auf.

Somit verhindert eine HAV-Infektion die NDV-induzierte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF-7. Die zuvor beobachtete Hemmung der NDV-induzierten transkriptionalen Aktivität von IRF-7 durch HAV, lässt sich demnach damit erklären, dass eine HAV-Infektion die für die nukleäre Translokation von IRF-7 erforderliche Phosphorylierung hemmt.

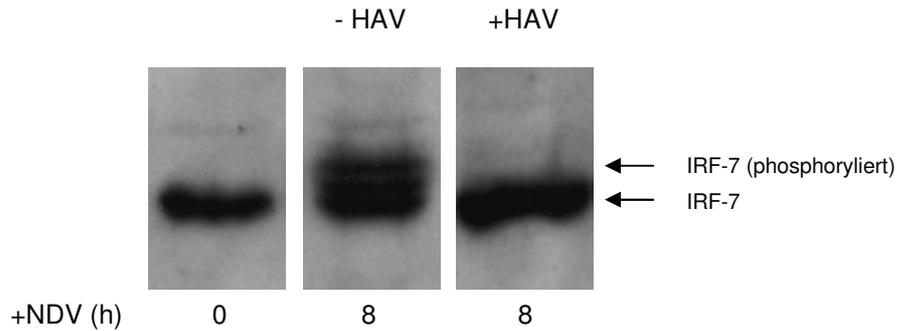


Abbildung 4.16 Nachweis von IRF-7 spezifischen Phosphorylierungsbanden in FRhK-4-IRF-7 (Klon 7)-Zellen im Immunoblot. Detektion von IRF-7 mittels des primären mouse α -IRF-7 Antikörpers und des sekundären goat α -mouse HRP Antikörpers in FRhK-4-IRF-7 (Klon 7)-Zellen. Die Zellen wurden für 10 Tage mit HAV/7 oder Mock infiziert, in 6-cm²-Zellkulturschalen umgesetzt und mit NDV (MOI: 10) infiziert. Die Lyse der Zellen erfolgte 0, 4 und 8 Stunden nach der NDV Infektion. Die bestehende HAV-Infektion wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz bestätigt. Zum Nachweis einer tatsächlichen HAV-Infektion wurde eine indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von HAV-Antigen durchgeführt. Die IRF-7-spezifische Bande liegt auf Höhe von ~67 kDa. Phosphorylierungsspezifische IRF-7 Banden befinden sich oberhalb der IRF-7 Bande. Als Kontrolle dienen mit Mock-Lysat infizierte und NDV-induzierte FRhK-4-IRF-7 (Klon 7)-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen. Gellauf: 3,5 Stunden.

Zusammenfassend zeigen die bis zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Ergebnisse, dass HAV eine Hemmung der NDV-induzierten Phosphorylierung und damit einhergehenden nukleären Translokation als auch der transkriptionalen Aktivität von IRF-7 bedingt. Da in früheren Abschnitten bereits die in der Literatur diskutierte essentielle Rolle von IRF-7 in der Differenzierung von mononukleären Zellen bestätigt werden konnte, könnte diese HAV-vermittelte Hemmung von IRF-7 eine Erklärungsmöglichkeit für die HAV-induzierte Inhibition selbiger liefern. Der sich anschließende Abschnitt sollte die beobachtete Hemmung des Transkriptionsfaktors IRF-7 durch HAV mit den HAV-induzierten Differenzierungsstörungen von mononukleären Zellen in Zusammenhang bringen. Da bereits gezeigt werden konnte, dass non-IFN- α 1 in dem Differenzierungsverlauf von U937-Zellen eine wichtige Rolle spielt, sollte im Folgenden der Effekt einer Hepatitis A-Virus-Infektion auf die Induktion von non-IFN- α 1 untersucht werden. Mit Hilfe des IRF-7-spezifischen IFN- α 6-Luc-Reporterkonstruktes sollte deshalb die HAV-induzierte Hemmung des IRF-7-induzierbaren IFN- α 6 untersucht werden. Aufgrund der bereits beschriebenen Transfektions- als auch Infektionsschwierigkeiten mit U937-Zellen wurden für die folgenden Versuche abermals FRhK-4-Zellen verwendet.

4.3.5 Untersuchung des Einflusses von HAV auf die Aktivierbarkeit des IFN- α 6-Promotors

Die bereits zu Beginn dieses Ergebnisteils beschriebene HAV-induzierte Hemmung der transkriptionalen Aktivität von IRF-7 sollte nun mit Hilfe des IRF-7-spezifischen IFN- α 6-Luc-Reporterkonstruktes bestätigt und verdeutlicht werden. Da in vorherigen Abschnitten bereits eine NDV-induzierte deutliche Phosphorylierung als auch nukleäre Translokation von IRF-7 beobachtet werden konnte, sollte nun zuerst eine NDV-induzierte Aktivierung des IFN- α 6-Luc-Reporterplasmides nachgewiesen werden. Sollte sich die bereits nach einer transienten Überexpression von IRF-7 zu beobachtende, verstärkte Aktivität des IFN- α 6-Luc Reporterkonstruktes durch eine NDV-Infektion weiter verstärken lassen, so sollte in der Folge untersucht werden, ob eine HAV-Infektion diese NDV-induzierte Aktivität des IFN- α 6-Luc Reporterkonstruktes zu hemmen vermag.

Zur Untersuchung der NDV-induzierten Aktivierbarkeit des IFN- α 6-Luc Promotors wurden FRhK-4-Zellen mit dem IFN α 6-Luc-Reporterplasmid „pGL2-IFN- α 6-Luc“ als auch dem IRF-7-Expressionsplamid „pCR3.1-IRF-7“ cotransfiziert. 24 Stunden später erfolgte die Infektion der Zellen mit NDV (MOI:10) und weitere 8 Stunden später die Lyse der Zellen sowie die Detektion der Luciferaseaktivität. Das Ergebnis ist in der Abbildung 4.17 dargestellt.

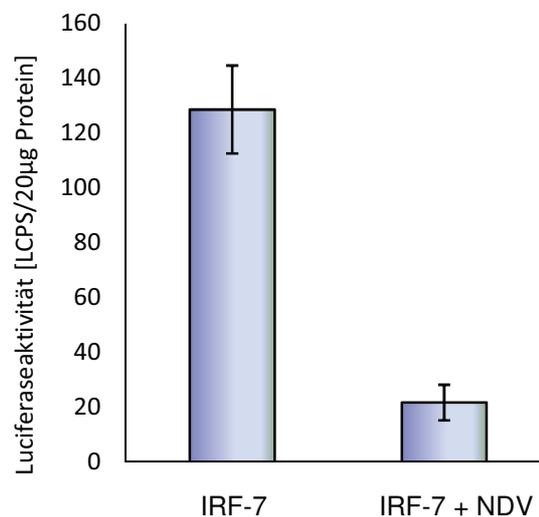


Abbildung 4.17 Induktion von IFN- α 6-Luc durch IRF-7 und NDV. FRhK-4-Zellen wurden in 6-Well-Zellkulturplatten umgesetzt und mit dem Reporterplasmid „pGL2-IFN- α 6-Luc“ und dem Expressionsplasmid „pCR3.1-IRF-7“ cotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte die NDV-Infektion (MOI: 10) und 8 Stunden später die Lyse der Zellen sowie die Ermittlung der Luciferaseaktivität. Die ermittelten Mittelwerte mit Standardabweichungen ergeben sich aus Doppelbestimmungen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen.

Hier ist zu erkennen, dass die alleinige Überexpression von IRF-7 zu einer deutlichen Aktivierung des IFN- α 6-Luc Reporterplasmides führt. Ein Ergebnis, was sich mit dem in der Abbildung 4.3 erbrachten deckt. Allerdings resultiert die zusätzliche Aktivierung von IRF-7 durch eine NDV-Infektion jedoch nicht, wie erwartet, in einer verstärkten, sondern einer deutlich reduzierten Aktivität des IFN- α 6-Promotors. Das selbe Ergebnis wurde unter Verwendung von „Poly-Inosinsäure:poly-Cytidylsäure,, [poly(IC)] anstelle von NDV erbracht. Poly(IC) wurde hier als doppelsträngiges RNA-Analogon, zur Induktion des Signalweges zur Aktivierung von IRF-7 eingesetzt. In der Abbildung 4.18 ist das Ergebnis dargestellt. Neben einer geringen Reduktion der IFN- α 6-Luc-Promotoraktivität in den Kontrollansätzen mit 0%FCS und DEAE, ist eine deutliche Reduktion der IRF-7-induzierten Aktivität des IFN- α 6-Luc-Reporters nach poly(IC)-Induktion zu erkennen.

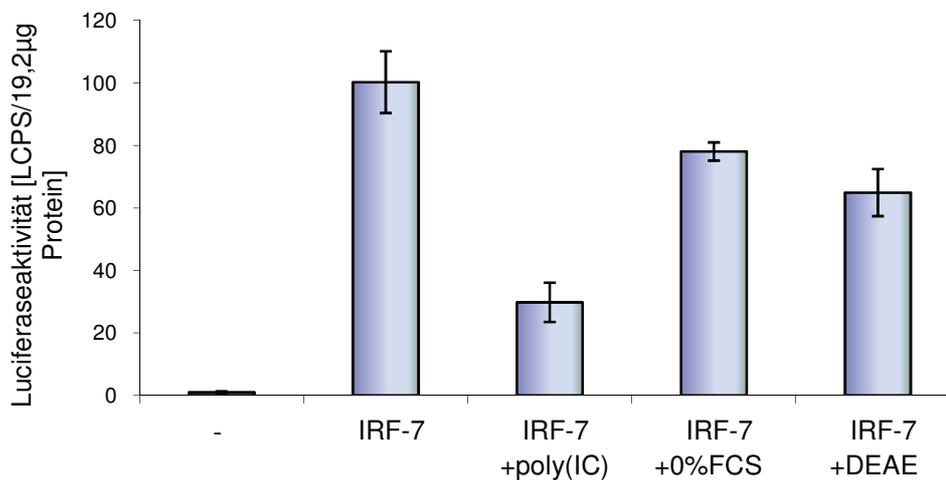


Abbildung 4.18 Induktion von IFN- α 6-Luc durch IRF-7 und pIC. FRhK-4-Zellen wurden in 6-Well-Zellkulturplatten umgesetzt und mit dem Reporterplasmid „pGL2-IFN- α 6-Luc“ und dem Expressionsplasmid „pCR3.1-IRF-7“ cotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Induktion mit „Poly-Inosinsäure:poly-Cytidylsäure,, [poly(IC)] und 8 Stunden später die Lyse der Zellen sowie die Ermittlung der Luciferaseaktivität. Als Kontrollen wurden Ansätze mit 0%FCS und DEAE anstelle von poly(IC) mitgeführt. Die ermittelten Mittelwerte mit Standardabweichungen ergeben sich aus Doppelbestimmungen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen.

Um auszuschließen, dass diese unerwartete Reduktion der IFN- α 6-Luc-Promotoraktivität nach Aktivierung von IRF-7 durch die konstitutive Aktivität des überexprimierten IRF-7 hervorgerufen wird, wurde dieses Experiment im Anschluss unter Verwendung der IRF-7, beziehungsweise GFP-IRF-7 stabil überexprimierenden FRhK-4-Zellklone (FRhK-4-GFP-IRF-7 (Klon 6)-Zellen, FRhK-4-IRF-7 (Klon 7)-Zellen) wiederholt. In diesen Zellklonen konnte im Verlauf dieser Dissertation bereits eine NDV-induzierte Aktivierung des

überexprimierten IRF-7 nachgewiesen werden. Nach Transfektion der Zellen mit dem IFN α 6-Luc-Reporterplasmid „pGL2-IFN- α 6-Luc“ erfolgte 24 Stunden später die Infektion der Zellen mit NDV (MOI: 1) und weitere 18 Stunden später die Lyse der Zellen sowie die Detektion der Luciferaseaktivität. Das Ergebnis dieses Versuches ist in der Abbildung 4.19 dargestellt.

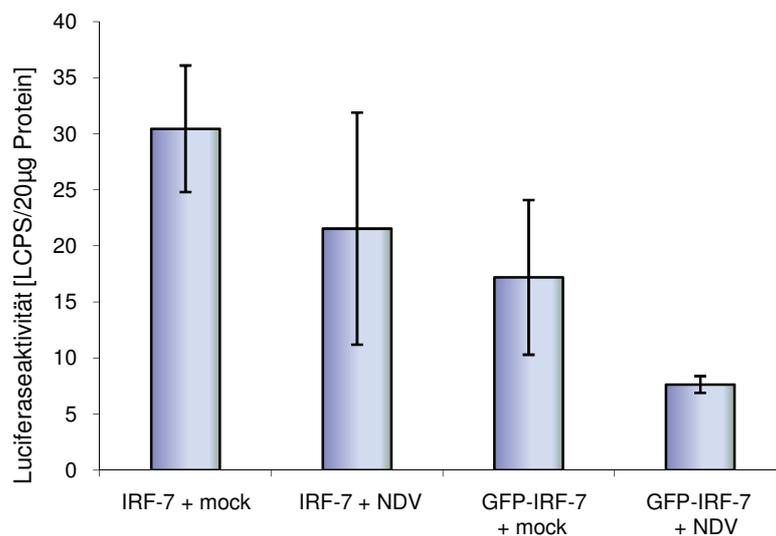


Abbildung 4.19 NDV-induzierte Induktion von IFN- α 6-Luc in FRhK-4-GFP-IRF-7 (Klon 6)- und FRhK-4-IRF-7 (Klon 7)-Zellen. FRhK-4-Zellen (FRhK-4-GFP-IRF-7, Klon 6 und FRhK-4-IRF-7, Klon 7) wurden in 6-Well-Zellkulturplatten umgesetzt und mit dem Reporterplasmid „pGL2-IFN- α 6-Luc“ transfiziert. 24 Stunden später erfolgte die NDV-Infektion (MOI: 1) und weitere 18 Stunden später die Lyse der Zellen sowie die Ermittlung der Luciferaseaktivität. Die ermittelten Mittelwerte mit Standardabweichungen ergeben sich aus Doppelbestimmungen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen.

Wie zuvor in den Abbildungen 4.17 und 4.18, lässt sich auch hier in keinem der verwendeten FRhK-4-Zellklone eine NDV-induzierte verstärkte IFN- α 6-Luc-Promotoraktivität detektieren. Im Gegenteil: Eine NDV-Infektion führt zu einer Reduktion selbiger. Die Tatsache, dass die gemessenen Luciferasewerte in dem FRhK-4-GFP-IRF-7 Zellklon niedriger liegen als bei dem FRhK-4-IRF-7 Zellklon, lässt sich mit einer verminderten DNA-Bindefähigkeit dieses GFP-IRF-7 erklären. Hingegen lässt der Umstand, dass sich in beiden nicht-induzierten Zellklonen überhaupt eine Luciferaseaktivität detektieren lässt, darauf schließen, dass auch in ihnen eine gewisse Menge des stabil überexprimierten IRF-7 konstitutiv aktiv sein muss. Dies bedeutet ausserdem, dass die nach transients Überexpression von IRF-7 zu beobachtende konstitutive Aktivität von IRF-7 weder mit dem Vorgang der Transfektion an sich, noch mit dem Vorliegen von dsDNA zu erklären ist. Die in der Literatur diskutierte dsRNA-ähnliche,

den Signalweg zur Aktivierung von IRF-3 und IRF-7 induzierende, Wirkung von Plasmid-DNA kann für diesen Versuchsaufbau somit nicht bestätigt werden.

Da in beiden Zellklonen IRF-7 in uninduzierten Zellen nur im Cytoplasma detektiert werden konnte und sich in den FRhK-4-IRF-7-Zellklonen in uninduzierten Zellen ferner keine IRF-7 spezifischen Phosphorylierungsbanden detektieren ließen, ist dieses Ergebnis unerwartet. Scheinbar verfügt auch das IRF-7 in den stabil IRF-7-überexprimierenden FRhK-4-Zellklonen über eine geringe basale Aktivität. Zum Nachweis dieser geringen konstitutiven Aktivität scheinen jedoch Immunoblot als auch Immunfluoreszenz nicht empfindlich genug zu sein.

Zusammenfassend lässt sich hier festhalten, dass die bis zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Ergebnisse, bezüglich einer NDV-induzierten Aktivierung von IRF-7, miteinander zunächst nicht in Einklang zu bringen waren. So konnte zwar eine NDV-induzierte Phosphorylierung als auch nukleäre Translokation von IRF-7 gezeigt werden, eine NDV-induzierte verstärkte Aktivierung des für IRF-7 spezifischen IFN- α 6-Promotors trat jedoch nicht auf. Somit wurde im Falle von Phosphorylierung und Lokalisation eine NDV-induzierte Aktivierung, im Falle der transkriptionalen Aktivität des IRF-7 jedoch eine scheinbare NDV-induzierte Hemmung aufgezeigt.

Die Klärung dieses „Dilemmas“, welches zum Zeitpunkt der Dissertation bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde, erfolgte jedoch bereits im Abschnitt 4.3.2.1. Hier konnte eine Wechselwirkung von NDV-aktivierten endogenem IRF-3 mit IRF-7, unter Verwendung des PRDIII/I-Luc-Reporterplasmides, aufgezeigt werden. Somit kann das in dieser Dissertation hergestellte IFN- α 6-Luc-Reporterplasmid zum Nachweis einer HAV-vermittelten Suppression der NDV-induzierten non-IFN- α 1-Expression nicht verwendet werden.

Um auch ohne das IFN- α 6-Luc Reporterplasmid eine Aussage bezüglich des Effektes einer HAV-Infektion auf die Expression von IFN- α treffen zu können, sollte in dem nun folgenden Abschnitt ein ELISA zur spezifischen Detektion von IFN- α , in dem Überstand von mit Mock-beziehungsweise HAV-Lysat infizierten und NDV-induzierten FRhK-4-Zellen, durchgeführt werden.

4.3.6 Untersuchung des Einflusses von HAV auf die IRF-7-induzierte Expression von IFN- α

Um den Einfluss von HAV auf die IRF-7-vermittelte Expression von IFN- α zu untersuchen, wurde ein kommerziell erhältlicher IFN- α -ELISA angewendet. Mit Hilfe dieses Kits sollte die NDV-induzierte Aktivierung von IRF-7, und die damit einhergehende IFN- α -Expression, gemessen und eine eventuelle Hemmung selbiger durch eine gleichzeitige HAV-Infektion festgehalten werden. Dabei ist zu beachten, dass das verwendete IFN- α -ELISA-Kit sämtliche IFN- α -Subtypen, einschließlich IFN- α 1, erkennt. Als Zellkultursystem bieten sich für diese Untersuchung die FRhK-4-IRF-7 (Klon 7)-Zellklone an. Für diese konnte bereits gezeigt werden, dass eine NDV-Infektion zu einer nukleären Translokation und somit Aktivierung des überexprimierten IRF-7 führt, welche durch HAV gehemmt wird.

Um den Einfluss einer Hepatitis A-Virus Infektion auf die NDV-induzierte Expression von IFN- α zu untersuchen, wurden FRhK-4-IRF-7 (Klon 7)-Zellen zunächst mit HAV/7 (MOI: 1) oder Mock-Lysat infiziert. Nach 10 Tagen erfolgte die Überführung in 24-Well-Zellkulturplatten und am nächsten Tag die Infektion mit NDV- (MOI: 10) oder Mock-Lysat. Dabei dient die NDV-Infektion der Aktivierung von IRF-7. Null und 8 Stunden nach erfolgter NDV-Infektion wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, aliquotiert und weggefroren. Das Ergebnis dieses Versuches ist in der Tabelle 4.2 dargestellt. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, exprimieren weder Mock- noch HAV-infizierte FRhK-4-IRF-7 (Klon 7)-Zellen am Zeitpunkt Null nach NDV-/Mock-Infektion IFN- α . Erst acht Stunden nach der Induktion mit NDV lässt sich IFN- α (11,06575pg/ml) detektieren. Da in vorherigen Versuchen bereits die NDV-induzierte Phosphorylierung als auch nukleäre Translokation von IRF-7 beschrieben wurde, entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen. In HAV-infizierten Ansätzen hingegen kann nach einer achtstündigen NDV-Induktion kein IFN- α nachgewiesen werden. Somit lässt sich eine deutliche Hemmung der NDV-induzierten Expression von IFN- α durch eine HAV-Infektion erkennen.

Tabelle 4.2 Einfluss von HAV auf die NDV-induzierte Expression von IFN- α in FRhK-4-IRF-7 (Klon 7)-Zellen. FRhK-4-IRF-7 (Klon 7)-Zellen wurden mit HAV (MOI 1) infiziert und 10 Tage später in 24-Well-Zellkulturplatten (80000 Zellen/Well) umgesetzt. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit NDV (MOI: 10), Abnahme des Zellkulturüberstandes und Lagerung bei -80 °C. Der IFN- α -ELISA wurde nach Bestätigung aller Kontrollen (HAV- /Mock-Infektion, NDV-Infektion, NDV-induzierte nukleäre Translokation von IRF-7) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der positive IFN- α -Wert (-HAV/+NDV, 8h) ist der Mittelwert der Mittelwerte (8,596pg/ml, 13,5355pg/ml) aus zwei Doppelbestimmungen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Wiederholungen. Die Standardabweichung beträgt: 2,46975pg/ml. u.N= unterhalb der Nachweisgrenze.

| HAV-Infektion | NDV-Infektion | IFN- α (pg/ml) | |
|---------------|---------------|-----------------------|----------|
| | | 0h | 8h |
| - | - | u.N | u.N |
| - | + | u.N | 11,06575 |
| + | - | u.N | u.N |
| + | + | u.N | u.N |

Da sich mit Hilfe des IFN- α -ELISA nicht zwischen den verschiedenen IFN- α -Subtypen unterscheiden lässt, sollte in einem weiteren Versuch die selektive Induktion der IRF-7-induzierbaren non-IFN- α 1-Subtypen durch NDV gezeigt werden. Ferner sollte der Einfluss von HAV auf die non-IFN- α 1-Subtypen untersucht werden.

4.3.7 Untersuchung des Einflusses von HAV auf die IRF-7-induzierte Expression von non-IFN- α 1

Um den Einfluss einer HAV-Infektion auf die IRF-7-induzierte Expression von non-IFN- α 1 Subtypen zu untersuchen wurde eine RT-PCR zum Nachweis von IFN- α 6 durchgeführt. Hierzu wurden FRhK-4-IRF-7 (Klon 7)-Zellen zunächst für 10 Tage mit HAV/7 (MOI: 1) oder Mock-Lysat infiziert. Nach 10 Tagen erfolgte die Überführung in 6-Well-Zellkulturplatten. Am nächsten Tag folgte zur Aktivierung von IRF-7 die Infektion mit NDV- (MOI: 10) oder Mock-Lysat. Null und 8 Stunden nach erfolgter NDV-Infektion erfolgten die RNA-Extraktion mit dem sich anschließendem DNase-Verdau. Das Ergebnis der späteren RT-PCR zum Nachweis von IFN- α 6 ist in der Abbildung 4.20 dargestellt.

Der Abbildung 4.20 lässt sich entnehmen, dass FRhK-4-IRF-7 (Klon 7)-Zellen unter normalen Bedingungen kein IFN- α 6 exprimieren. Erst eine NDV-Infektion führt nach acht Stunden zu einer deutlichen Expression von IFN- α 6. Desweiteren lässt sich der Abbildung entnehmen, dass eine HAV-Infektion die NDV-induzierte Expression von IFN- α 6 hemmt.

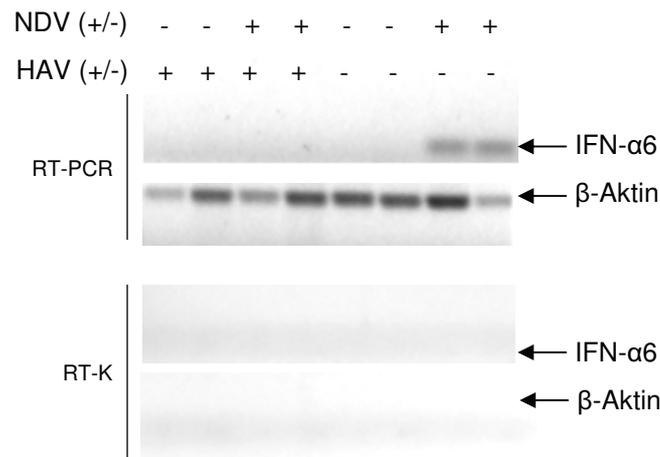


Abbildung 4.20 Einfluss von HAV auf die NDV-induzierte Expression von IFN- α 6. FRhK-4-IRF-7 (Klon 7)-Zellklone wurden mit HAV (MOI: 1) infiziert und 10 Tage später in 6-Well-Zellkulturplatten (200000 Zellen/Well) umgesetzt. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit NDV (MOI: 10). Null und 8 Stunden später erfolgten RNA-Extraktion und DNase-Verdau sowie eine RT-PCR zum Nachweis von IFN- α 6. Dabei wurde die RT-PCR erst nach Bestätigung aller Kontrollen (HAV- /Mock-Infektion, NDV-Infektion) durchgeführt. Alle RT-Kontrollen sowie die H₂O-Kontrolle waren negativ. + = HAV-Lysat bzw. NDV-Lysat, - = Mock-Lysat, RT-K = RT-Kontrolle

Zusammenfassend lässt sich in dem hier vorliegenden Ergebnisteil ein eindeutig hemmender Effekt des Hepatitis A-Virus auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-7 festhalten. Zudem konnte die Rolle von IRF-7 an der mononukleären Differenzierung von U937-Zellen unterstrichen und an der Expression von non-IFN- α 1 bestätigt werden. Letztlich konnte, unter Verwendung eines IFN- α -spezifischen ELISA, die HAV-induzierte Hemmung der NDV-induzierten Expression von IFN- α klar detektiert werden. Eine RT-PCR zur Detektion von IFN- α 6 lieferte zudem den Beweis, dass eine HAV-Infektion die NDV-induzierte Expression eines non-IFN- α 1-Subtypes deutlich hemmt.

Laut der zu Beginn dieser Arbeit aufgestellten These, hemmt eine Hepatitis A-Virusinfektion die Aktivität von IRF-7, wodurch die normalerweise durch IRF-7 induzierte Expression von non-IFN- α 1 unterbunden wird und sich in der Folge Störungen der mononukleären Differenzierung ausbilden. Obwohl eine Übertragung des HAV-vermittelten negativen Effektes auf IRF-7 in mononukleären Zellen nicht erbracht werden konnte, kann diese These somit dennoch in vielen Punkten bestätigt werden.

5. Diskussion

Vor mittlerweile 36 Jahren wurde das Hepatitis A-Virus zum ersten Mal unter dem Elektronenmikroskop detektiert (FEINSTONE ET AL. 1973). Seitdem hat das Wissen über dieses im Durchmesser nur 27nm messende, nicht-umhüllte, einzelsträngige RNA-Virus stetig zugenommen. So auch unsere Erkenntnisse über die im Verlauf einer Hepatitis A-Virus Infektion auftretenden extrahepatischen Manifestationen, welche mit deutlichen Blutbildveränderungen einhergehen und in ihrer Symptomatik von einem transienten Abfall der Anzahl von Granulozyten bis zur Ausbildung der sogenannten Aplastischen Anämie reichen (FIRKIN ET AL. 1978, KIVEL 1961). Eine Erklärungsmöglichkeit für diese Symptomatik liefern Untersuchungen, welche eine zumindest zeitweilige Generalisierung der Hepatitis A-Virus Infektion vermuten lassen (BOURNE ET AL. 1965, CONRAD ET AL. 1964). So konnte beispielsweise ein direkter inhibitorischer Effekt des Hepatitis A-Virus auf Knochenmarksvorläuferzellen sowie auf die Bildung selbiger aus HAV-infizierten Langzeit-Knochenmarkskulturen gezeigt werden (VALLBRACHT ET AL. 1993, BUSCH ET AL. 1987). Dieser Effekt könnte auf einer Interferenz des Hepatitis A-Virus mit der Reifung von Monozyten beruhen. Tatsächlich konnte eine Replikation des Hepatitis A-Virus in primären humanen Monozyten/Makrophagen nachgewiesen und Differenzierungsstörungen in PMA-induzierten und mit dem Hepatitis A-Virus infizierten, promonozytischen U937-Zellen detektiert werden (WÜNSCHMANN ET AL. 2002). Dabei könnten sich die nach einer HAV-Infektion auftretenden Störungen der mononukleären Differenzierung anhand einer möglichen negativen Beeinflussung des, für die mononukleäre Differenzierung essentiellen, Transkriptionsfaktors IRF-7 durch HAV erklären lassen. Für diese Theorie sprechen zum einen die Untersuchungsergebnisse von Lu und Pitha, welche eine essentielle Rolle von IRF-7 in der mononukleären Differenzierung erkennen lassen sowie die Tatsache, dass das durch IRF-7 regulierbare IFN- α an der Differenzierung beteiligt ist (LU UND PITHA 2001, LIN ET AL 2000B, MARIÉ ET AL 1998, BUSSOW UND GILLESPIE 1984, HATTORI ET AL. 1983). Zum anderen konnte bereits eine Inhibition der Aktivität (Phosphorylierung, Dimerisierung, nukleäre Translokation) des zu IRF-7 homologen Transkriptionsfaktor IRF-3 durch das Hepatitis A-Virus nachgewiesen werden (FENSTERL ET AL. 2005, PAULMANN ET AL. 2008).

Aufgrund dieser Überlegungen sollte in der hier vorliegenden Dissertation die bereits in der Einleitung dargestellte These, wonach sich die HAV-vermittelte Störung der mononukleären Differenzierung auf Ebene einer negativen Beeinflussung von IRF-7 durch das Hepatitis A-

Virus gründet, untersucht werden. Laut dieser These (Abbildung 1.7B, Seite 31) hemmt eine Hepatitis A-Virus Infektion die Aktivität von IRF-7, wodurch die normalerweise durch IRF-7 induzierte Expression von non-IFN- α 1 unterbunden wird und sich in der Folge Störungen der mononukleären Differenzierung ausbilden. Folglich lag das primäre Ziel dieser Arbeit in der Klärung des Einflusses des Hepatitis A-Virus auf IRF-7.

In einem ersten Experiment sollte der mögliche Einfluss des HAV auf die transkriptionale Aktivität von IRF-7 untersucht werden. Aufgrund von Kultivierungs-, Transfektions- und Infektions- Schwierigkeiten mit sowohl den U937- als auch den primären humanen mononukleären Zellen, wurden zur Klärung der Fragestellung FRhK-4-Zellen verwendet. Diese, in unserem Labor etablierte und von uns für ähnliche Fragestellungen bereits mehrfach verwendete Zelllinie, stellt ein etabliertes Zellkultursystem zur Kultivierung von HAV dar. Im Folgenden wurde die IRF-7-induzierte Induktion des PRDIII/I Promotorbereiches des IFN- β -Enhancers genauer untersucht. An diesen Promotor binden sowohl IRF-3 als auch IRF-7 als Homodimere und/oder Heterodimere und bewirken in der Folge eine Expression des angeschlossenen Luciferasegens. Da eine HAV-Infektion die Aktivierung von zumindest IRF-3 sicher hemmt (Abb 4.12) kann in diesem Experiment, mit Hilfe der Bestimmung der Luciferaseaktivität, die transkriptionale Aktivität von IRF-7 bestimmt werden. Aufgrund von Vorversuchen, welche eine Nicht-Expression von endogenem IRF-7 in FRhK-Zellen erkennen ließen (Abb 4.10, 4.11), musste IRF-7 in diesen Zellen durch die transiente Transfektion des Plasmides „pCR3.1-IRF-7“ überexprimiert werden. Die Aktivierung von IRF-3 und IRF-7 erfolgte mit Hilfe einer NDV-Infektion (MARIÉ ET AL. 2000, AU ET AL 1998). Dabei ließ sich in HAV-infizierten und NDV-induzierten Ansätzen keine erhöhte, sondern eine leicht erniedrigte IRF-7-spezifische Aktivierung des PRDIII/I-Luc Promotors als ohne NDV-Induktion erkennen. Somit bestätigte sich im Verlauf dieses Versuches die Vermutung, dass das Hepatitis A-Virus einen inhibitorischen Effekt auf die NDV-induzierte transkriptionale Aktivität von IRF-7 ausübt (Abbildung 4.12).

Nach Bestätigung des negativen Einflusses des HAV auf die transkriptionale Aktivität von IRF-7, folgten Versuche zur Klärung der Ursache dieses Effektes. Dazu wurden eigens für diese Versuche hergestellte FRhK-4-Zellklone, welche entweder IRF-7 oder GFP-gekoppeltes IRF-7 stabil überexprimieren, verwendet. In diesen Zellklonen wurde die Lokalisation als auch der Phosphorylierungsgrad von IRF-7 in HAV-infizierten und nicht-HAV-infizierten Ansätzen mit- und ohne NDV-Induktion untersucht. Dabei konnte, unter Verwendung des GFP-IRF-7 Zellklones (FRhK-4-GFP-IRF-7, Klon 6), eine deutliche nukleäre Translokation

von IRF-7 nach einer NDV-Induktion beobachtet werden. Diese wurde durch eine gleichzeitige HAV-Infektion gehemmt (Abbildung 4.15). Mit Hilfe des IRF-7 Zellklones (FRhK-4-IRF-7, Klon 7) gelang der ergänzende Nachweis einer NDV-induzierten Aktivierung von IRF-7, welche sich durch das Auftreten von phosphorylierungsspezifischen Banden im Westernblot zeigte. Eine HAV-Infektion führte zur Hemmung dieser NDV-induzierten Phosphorylierung von IRF-7 (Abbildung 4.16). Da für die transkriptionale Aktivität von IRF-7 dessen Phosphorylierung und die damit einhergehende Translokation vom Cytoplasma in den Zellkern notwendig ist, lässt sich somit der HAV-vermittelte negative Einfluss auf die transkriptionale Aktivität von IRF-7 erklären (SGARBANTI ET AL. 2007, AU ET AL 1998, BARNES ET AL. 2004).

Somit hatte sich die These, zumindest im Hinblick des Einflusses von HAV auf IRF-7, bestätigt. Weiterführende Versuche sollten zunächst mit U937-Zellen als mononukleäre Modellzelllinie durchgeführt werden. In diesen Zellen sollte gezeigt werden, dass IRF-7 sowie die IRF-7-vermittelte Induktion der non-IFN- α 1-Expression für die mononukleäre Differenzierung von Bedeutung sind.

Die essentielle Rolle von IRF-7 an der mononukleären Differenzierung ist bis dato erst einmal in der Literatur belegt worden. So sprechen die Untersuchungen von Lu und Pitha für eine essentielle Rolle von IRF-7 an der mononukleären Differenzierung von U937-Zellen (LU UND PITHA 2001). Jedoch sollten diese Ergebnisse durch die im Folgenden beschriebenen eigenen Untersuchungen zunächst bestätigt werden. Wie der Abbildung 4.1 zu entnehmen ist, führt eine Induktion der U937-Zellen mit PMA zu einer deutlich verstärkten Expression von IRF-7, was sich anhand einer starken Bande im Westernblot zeigt. Zudem führt die Behandlung der U937-Zellen mit PMA zu einem Shift der Lokalisation von IRF-7 vom Cytoplasma in den Zellkern (Abbildung 4.2), was mit Hilfe der Immunfluoreszenz deutlich zu erkennen war. Dies bedeutet, dass IRF-7 im Verlauf der mononukleären Differenzierung nicht nur hochreguliert sondern auch aktiviert wird. Die Folgerung aus diesen Ergebnissen ist, dass PMA zum einen die Expression von IRF-7 als auch die Aktivierung (nukleäre Translokation) von selbigen bewirkt. Somit kann, auch durch die hier vorliegenden Ergebnisse, die Involvierung von IRF-7 an der PMA-induzierten mononukleären Differenzierung von U937-Zellen belegt werden. Dabei könnte PMA die Expression von IRF-7 über die, bereits in der Einleitung erwähnte, PKC θ -vermittelte Aktivierung von NF- κ B induzieren (LUCAS ET AL. 2004, LU ET AL. 2002, LU ET AL. 2001, HATTORI ET AL. 1983, BARNES ET AL. 2004, AU ET AL 1998, BUSSOW UND GILLESPIE 1984). Die Phosphorylierung von IRF-7 könnte im Anschluss über die ebenfalls durch

PMA und NF- κ B hochregulierte und konstitutiv aktive IKK ϵ -Kinase erfolgen (NOMURA ET AL. 2000, PETERS ET AL 2000, WANG ET AL. 2005).

Da Hattori et al. sowie Buessow et al. bereits in den 80iger Jahren die wichtige Rolle von IFN- α (eine Differenzierung zwischen IFN- α 1 und non-IFN- α 1 wurde in diesen Arbeiten nicht erbracht) an der Differenzierung von U937-Zellen erkannten (HATTORI ET AL. 1983, BUOSSOW ET AL 1984), bestand die Vermutung, dass PMA über die Expression und Aktivierung von IRF-7 zur Induktion der Expression von non-IFN- α 1 und somit zur Differenzierung beitragen könnte. In weiterführenden Experimenten sollte deshalb zunächst die Abhängigkeit der non-IFN- α 1-Expression von IRF-7 mit Hilfe eines eigens dafür konstruierten IFN- α 6-Luc Reporterkonstruktes bestätigt werden (AU ET AL. 1998, HONDA AL. 2005). Dazu wurde das selektiv durch IRF-7 aktivierbare IFN- α 6-Luc-Reporterplasmid hergestellt. Mit Hilfe der Bestimmung der Luciferaseaktivität kann mit diesem Reporterkonstrukt direkt auf die transkriptionale Aktivität von IRF-7 geschlossen werden. Wie der Abbildung 4.3 zu entnehmen ist, führt die alleinige Transfektion dieses Reporterkonstruktes in FRhK-4-Zellen zu keiner nennenswerten Luciferaseaktivität. Erst nach Cotransfektion dieser Zellen mit IRF-7 lässt sich eine deutliche Luciferaseaktivität detektieren, womit sich die Abhängigkeit der IFN- α 6-Expression von IRF-7 deutlich zeigt. Ferner lässt sich an diesem Ergebnis die konstitutive Aktivität von IRF-7 nach Überexpression erkennen. Ein Effekt, der sich nach der transienten Überexpression von IRF-7 in der Immunfluoreszenz durch eine Lokalisation des überexprimierten IRF-7 in den Zellkern zeigte und auch in der Literatur bereits beschrieben wurde. Hier wird eine durch die Überexpression von IRF-7 induzierte Aktivierung der Kinasen IKK ϵ und TBK-1 diskutiert (CAILLAUD ET AL. 2005). Da sich auf Grund dieser transfektionsbedingten, konstitutiven Aktivität von IRF-7 keine Versuche, welche auf eine gezielte Aktivierung von IRF-7 beruhen, durchführen ließen, erfolgte die weiter oben dargestellte Etablierung von IRF-7-überexprimierenden Zellklonen, in denen IRF-7 ausschließlich im Cytoplasma vorliegt. In diesen Zellklonen transloziert IRF-7 erst nach Induktion mit NDV in den Nukleus.

Nachdem nun die essentielle Rolle von IRF-7 an der Induktion der non-IFN- α 1-Expression aufgezeigt wurde, sollte in einem weiteren Experiment zunächst die Bedeutung von Interferon an der mononukleären Differenzierung von U937-Zellen untersucht werden. Mit Hilfe des Plaquereduktionsassays zum Nachweis von biologisch aktiven Interferon zeigte sich, dass PMA-induzierte U937-Zellen vermehrt Interferon in ihren Überstand sezernieren (Abbildung 4.4). Ein Ergebnis, welches konform mit den Ergebnissen von Lu und Pitha ist, welche einen Anstieg der mRNA Expression von IFN- α und IFN- β nach PMA-Induktion in U937-Zellen messen konnten (LU UND PITHA 2001). Dabei könnte die PMA-induzierte Expression von

Interferon zum einen jedoch sowohl Folge als auch Ursache für die PMA-induzierte mononukleäre Differenzierung von U937-Zellen sein. Zum anderen lieferte dieser Versuchsaufbau keine Aussage über den Typ des sezernierten Interferons. Zur Klärung dieser Fragestellung erfolgte der Versuch der Induktion der mononukleären Differenzierung durch die alleinige Gabe von non-IFN- α 1 und/oder non-IFN- α 1/IFN- β . Da ein Stop der Proliferation der Differenzierung vorausgeht, erfolgte zur Bestimmung der Differenzierungs-Induktion die Ermittlung der Zellzahlreduktion sowohl in nicht-PMA-, PMA- und Interferon-induzierten Ansätzen. Dabei ließ sich eine konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation von U937-Zellen nach non-IFN- α 1- Behandlung erkennen (Abbildung 4.5, Tabelle 4.1). Die durch Interferon-induzierte Inhibition der Proliferation (bis zu 95,6%) von U937-Zellen war zwar nicht so deutlich wie nach PMA-Induktion (100% Inhibition), ein Zusammenhang von non-IFN- α 1 und der Differenzierung wird jedoch dennoch deutlich. Auch werden hier die Ergebnisse von Hattori et al. belegt (HATTORI ET AL. 1983). Diese zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen IFN- α und der Expression des differenzierungsspezifischen Antigens B43.4.1, der Erhöhung der cytotoxischen Aktivität sowie der Inhibition der Proliferation in U937-Zellen. Auch war es ihnen möglich, die PMA-induzierte Zunahme der cytotoxischen Aktivität sowie die Proliferationsinhibition durch IFN- α -Antiserum zu verhindern. Somit scheint IFN- α eine wichtige Rolle im Verlauf der mononukleären Differenzierung zu spielen. Allerdings ist hier zu beachten, dass eine Behandlung von U937-Zellen mit Interferon zwar zu einem starken Rückgang der Proliferation führt (Tabelle 4.1), die Induktion mit PMA aber mit einem ungleich stärkerem Proliferationsstop sowie differenzierungsspezifischen, morphologischen Veränderungen und Adhärenz einhergeht. Dem Interferon kommt somit zwar eine wichtige Rolle im Verlauf der mononukleären Differenzierung von U937-Zellen zu, alleiniger Induktor ist es jedoch nicht. Auch darf hier nicht außer Acht gelassen werden, dass Interferon generell einen Proliferationsstop bewirkt. Damit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die PMA-induzierte Expression von IFN- α nicht alleine für den PMA-induzierten Proliferationsstop verantwortlich ist. Um die Rolle von non-IFN- α 1 an der mononukleären Differenzierung von PMA-induzierten U937-Zellen weiter zu untersuchen, würden sich hier Versuche mit α -non-IFN- α 1 Antikörpern anbieten. Würden diese Antikörper eine negative Beeinflussung auf die PMA-induzierte Differenzierung der Zellen ausüben, so würde sich die essentielle Rolle von PMA-induziertem non-IFN- α 1 an der Differenzierung bestätigen.

Im Anschluss an diese Ergebnisse der Beteiligung von Interferon (und non-IFN- α 1) an der mononukleären Differenzierung, sollte der Einfluss einer Hepatitis A-Virus Infektion auf die Induktion der non-IFN- α 1-Expression untersucht werden. Dies sollte unter Verwendung des in dieser Arbeit konstruierten IFN- α 6-Luc-Reporterplasmides geschehen. Zunächst musste hierfür jedoch zunächst die Induzierbarkeit des IFN- α 6-Luc-Reporterplasmides durch NDV bestätigt werden. Hierzu wurden IRF-7 als auch das IFN- α 6-Luc-Reporterkonstrukt in FRhK-4-Zellen transient überexprimiert. Die Detektion der Luciferaseaktivität erfolgte sowohl ohne als auch mit gleichzeitiger NDV-Infektion. Wie der Abbildung 4.17 zu entnehmen ist, führt eine NDV-Infektion nicht zu einer verstärkten, sondern zu einer reduzierten IFN- α 6-Luc Promotoraktivität. Das selbe Ergebnis wurde unter Verwendung von stabil IRF-7 oder GFP-IRF-7 überexprimierenden FRhK-4-Zellklonen (Abbildung 4.19) sowie der Verwendung von poly(IC) als IRF-7 Aktivator erhalten (Abbildung 4.18). Somit war die Untersuchung des Einflusses von HAV auf die NDV-induzierte Aktivierung des IFN- α 6-Luc Reporterkonstruktes zwar nicht möglich, im Folgenden konnte so jedoch eine interessante Wechselwirkung von IRF-3 und IRF-7 auf die transkriptionale Aktivität des jeweils anderen gezeigt werden. Hierzu wurde zum einen die Wirkung von überexprimierten IRF-3 und IRF-7 auf das PRDIII/I-Luc- als auch auf das IFN- α 6-Luc-Reporterkonstrukt untersucht. Aktiviertes IRF-7 vermag nach den hier vorliegenden Ergebnissen die transkriptionale Aktivität von IRF-3 (Abbildung 4.13) und aktiviertes IRF-3 die transkriptionale Aktivität von IRF-7 (Abbildung 4.14) zu reduzieren. Ein Ergebnis, welches zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Versuche, in der Literatur so noch nicht beschrieben war und zum ersten Mal Anfang dieses Jahres von Génin et al. gezeigt wurde (GÉNIN ET AL., 2009). Scheinbar liegt der Grund für diese negative Wechselwirkung in dem Aufbau der Promotorbereiche der Interferongene begründet. So vermag beispielsweise IRF-7 als Homodimer eine starke Expression von IFN- α 6 aber nur eine schwache Expression von IFN- β zu induzieren. Dagegen können IRF-3 Homodimere zwar den IFN- β -Promotor, nicht aber den IFN- α 6 Promotor aktivieren, während Heterodimere aus IRF-3/IRF-7 an beide der genannten Promotoren binden können (PANNE ET AL 2007, YANG ET AL. 2004). Somit könnte aktiviertes IRF-7 mit ebenfalls aktivierten IRF-3 Heterodimere bilden und an den IFN- α 6-Promotor binden. Damit würden sich weniger IRF-3 Homodimere bilden und an den IFN- β -Promotor binden können. Auf der anderen Seite könnte das Vorliegen von aktiviertem IRF-3 die Bildung von IRF-7 Homodimeren zu Gunsten von IRF-3/IRF-7 Heterodimeren erschweren und so weniger IRF-7 Homodimere an den IFN- α 6-Promotor binden können. Die transkriptionale Wirkung von aktivierten IRF-3 und IRF-7 würde sich in Folge auf mehrere regulierte Gene aufteilen. Eine weitere

„Feinjustierung“ könnte dieses System durch die unterschiedlich starke Aktivierung der Promotoraktivitäten durch Homo- und Heterodimere erfahren. So konnten beispielsweise Yang et al. unter Verwendung eines IFN- β -Reporterplasmides eine durch IRF-3-induzierte 9fach verstärkte, durch IRF-7-induzierte 29fach verstärkte und durch IRF-3- und IRF-7-induzierte 90fach verstärkte Virus-induzierte (Sendai Virus) IFN- β -Promotoraktivität detektieren (YANG ET AL. 2004).

Um dennoch einen möglichen Effekt einer Hepatitis A-Virus Infektion auf die Induktion der Expression von IFN- α zu untersuchen, sollte mit Hilfe eines IFN- α -ELISA untersucht werden, ob eine HAV-Infektion die Expression von IFN- α hemmt. Hierzu wurde der Überstand von HAV-infizierten stabil IRF-7 überexprimierenden FRhK-4-IRF-7 (Klon 7)-Zellen nach einer NDV-Infektion auf seinen Gehalt an IFN- α hin untersucht. Als Kontrolle dienten sowohl nicht-HAV, als auch nicht-NDV-infizierte Ansätze. Da in diesem FRhK-4-Zellklon eine NDV-Infektion, wie bereits gezeigt, in einer Phosphorylierung und somit Aktivierung von IRF-7 mündet (Abbildung 4.16), ist es nicht verwunderlich, dass eine NDV-Infektion in diesem System auch zu einer Expression (11,06575pg/ml) von IFN- α führt. Eine HAV-Infektion hingegen führt zu keiner detektierbaren NDV-induzierten IFN- α -Expression (Tabelle 4.2). Somit konnte im Verlauf dieser Dissertation nicht nur ein hemmender Einfluss von HAV auf den Transkriptionsfaktor IRF-7 sondern auch auf die IRF-7-induzierte Expression von IFN- α deutlich und erstmals gezeigt werden. Da IFN- α , wie bereits beschrieben, in der mononukleären Differenzierung eine wichtige Rolle spielt, scheint es somit sehr wahrscheinlich, dass eine HAV-Infektion, wie in der anfänglichen These vermutet, über eine Hemmung der IRF-7-induzierten non-IFN- α 1-Expression der mononukleären Differenzierung entgegenwirkt. Allerdings muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass der in dieser Arbeit verwendete ELISA zur spezifischen Detektion von IFN- α alle IFN- α -Subtypen erkennt. Damit wird mit ihm neben den IRF-7-spezifischen non-IFN- α 1 Subtypen auch IFN- α 1 nachgewiesen. Um auszuschließen, dass es sich bei dem nach einer NDV-Infektion detektiertem IFN- α , lediglich um, durch aktiviertes endogenes IRF-3 induziertes, IFN- α 1 handelt, wurde in einem weiteren Versuch die NDV-induzierte Expression von IFN- α 6 als Vertreter eines non-IFN- α 1 Subtypes untersucht. Mit Hilfe der RT-PCR konnte der deutliche Nachweis erbracht werden, dass eine HAV-Infektion die NDV-induzierte Expression des IRF-7 spezifischen IFN- α 6 hemmt (Abb 4.20).

In meiner Arbeit konnte ich den HAV-vermittelten hemmenden Effekt auf die IRF-7 Aktivität lediglich in FRhK-4-Zellen zeigen. Versuche zum Nachweis der HAV-vermittelten Inhibition von IRF-7 in mononukleären Zellen wurden mit aus Buffy-Coats isolierten primären humanen mononukleären Zellen und U937-Zellen zwar durchgeführt, lieferten aber aufgrund verschiedenster Probleme, keine Ergebnisse. Obwohl für diese Zellen bereits die Infizierbarkeit mit HAV sowie die Inhibition der PMA-induzierten Differenzierung nach einer HAV-Infektion gezeigt werden konnte (WÜNSCHMANN 1998, WÜNSCHMANN ET AL. 2002), war in dieser Arbeit eine reproduktive und produktive Infektion dieser Zellen mit HAV nicht möglich (Abbildung 4.9). Zwar gelang der Nachweis, dass HAV-infizierte und PMA-induzierte U937-Zellen sich hin und wieder morphologisch deutlich von nicht HAV-infizierten Zellen unterscheiden (Abb 4.7), der Nachweis von HAV gelang in diesen Zellen jedoch nicht. Eine Erklärung hierfür könnte in der äusserst geringen Inzidenz (0,22%) von schweren hämatopoetischen Manifestationen (Aplastische Anämie) während einer Hepatitis-Infektion *in vivo* liegen (BÖTTINGER UND WESTERHOLM 1972). Dies spricht dafür, dass eine Infektion von mononukleären Zellen nur sehr selten erfolgt. Um dennoch den Einfluss einer HAV-Infektion auf die mononukleäre Differenzierung genauer untersuchen zu können, erfolgen zur Zeit Versuche der Etablierung von an U937-Zellen adaptiertes HAV. Sollte mit diesem Virus die Etablierung einer persistent HAV-infizierten U937-Zellpopulation gelingen, so könnten ferner Experimente zur Überexpression von, nicht durch Stimulation aktiviertem, IRF-7 in diesen Zellen durchgeführt werden. Auf Grund des Wissens über die konstitutive Aktivität von überexprimiertem IRF-7 könnte so untersucht werden, ob eine Überexpression von IRF-7 die mononukleäre Differenzierung auslöst und der HAV-induzierten Inhibition der PMA-induzierten mononukleären Differenzierung entgegen wirkt. Da U937-Zellen auf ihrer Oberfläche den Fc-Rezeptor für IgA (CD89) besitzen, bieten sich zudem Versuche zur Infektion der U937-Zellen mit IgA-gekoppeltem HAV an (VAN ZANDBERGEN ET AL. 1999). Zumindest, wenn die erschwerte Infektion der Zellen auf einen Block der Aufnahme des Virus gründet, könnte unter Verwendung von IgA-HAV-Komplexen dieser Block eventuell umgangen werden. Sollte sich die Infektion von U937-Zellen jedoch weiterhin als schwierig präsentieren, so würden Transfektionsexperimente mit dem Expressionsplasmid „pI.18/2B“ eine echte Alternative zur Infektion darstellen. Dabei ist von großer Bedeutung zu erwähnen, dass bereits gezeigt werden konnte, dass das HAV-Protein 2B für die HAV-induzierte Hemmung des zu IRF-7 homologen Transkriptionsfaktors IRF-3 verantwortlich ist (PAULMANN ET AL. 2008). Sollte sich herausstellen, dass das HAV-Protein 2B neben IRF-3 auch IRF-7 zu hemmen vermag, so könnte mit Hilfe der oben genannten Transfektionsversuche untersucht

werden, ob das HAV-Protein 2B die PMA-induzierte Differenzierung zu verhindern/behindern vermag. Zur Zeit hat eine Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe die Etablierung einer, für U937-Zellen geeigneten, Transfektionsmethode zum Thema.

Im Verlauf meiner Dissertation konnte ich einen hemmenden Einfluss des Hepatitis A-Virus auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-7 nachweisen. Dieser Nachweis erfolgte in FRhK-4-Zellen, in denen HAV die transkriptionale Aktivität, sowie die NDV-induzierbare Phosphorylierung als auch nukleäre Translokation, von IRF-7 hemmt. Desweiteren konnte ich die Arbeit von Lu und Pitha bestätigen, wonach IRF-7, im Verlauf der PMA-induzierten Differenzierung von U937-Zellen, zum einen hochreguliert wird und zum anderen in den Zellkern translociert (LU UND PITHA 2001), was eine Aktivierung dieses Faktors durch PMA bedeutet. Ferner konnte ich die essentielle Rolle von IRF-7 an der Induktion der Expression von non-IFN- α 1 und die Bedeutung von non-IFN- α 1 an der Differenzierung von U937-Zellen bestätigen. Schließlich konnte ich eine HAV-vermittelte Inhibition der NDV-induzierten non-IFN- α 1-Expression deutlich zeigen. Diese Ergebnisse (Abbildung 5.1) unterstreichen die zuvor aufgestellte These, wonach eine HAV-Infektion die mononukleäre Differenzierung von PMA-induzierten U937-Zellen mittels Inhibition des Transkriptionsfaktors IRF-7 und der damit verbundenen Inhibition der non-IFN- α 1-Expression negativ beeinflusst. Zur endgültigen Bestätigung eines über IRF-7 laufenden, negativen Effektes einer HAV-Infektion auf die mononukleäre Differenzierung muss die Übertragbarkeit der hier dargestellten Befunde auf mononukleäre Zellen jedoch noch bestätigt werden.

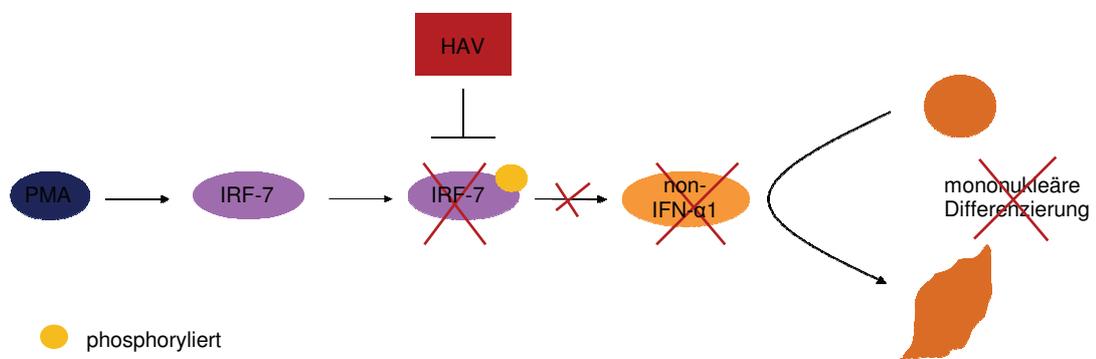


Abbildung 5.1 Möglicher Angriffspunkt von HAV auf die mononukleäre Differenzierung. Schematische Darstellung des über IRF-7 und IFN- α laufenden, PMA-induzierten, möglichen Signalweges zur Auslösung der mononukleären Differenzierung. Die in dieser Arbeit erlangten Teilergebnisse sind farblich dargestellt. Spitzer Pfeilkopf: Richtung der weiteren Aktivierung des Signalweges. Gerader Pfeilkopf: Hemmung der weiteren Signalwege. Rotes Kreuz: Hemmung

In der Abbildung 5.2 ist der mögliche Angriffspunkt einer HAV-Infektion im Verlauf der PMA-induzierten Differenzierung von U937-Zellen dargestellt. Übertragen auf die anfänglich genannten, im Verlauf einer Hepatitis A-Virus Infektion, im Menschen auftretenden extrahepatischen Manifestationen sind meine Ergebnisse folgendermaßen zu deuten: Da die aus Monozyten heranreifenden Makrophagen über die Sekretion von Cytokinen für die Aufrechterhaltung der in der Einleitung erwähnten Hämatopoese von großer Bedeutung sind, bieten meine Ergebnisse somit eine Erklärungsmöglichkeit für die negativen Effekte des Hepatitis A-Virus auf die Hämatopoese *in vivo*.

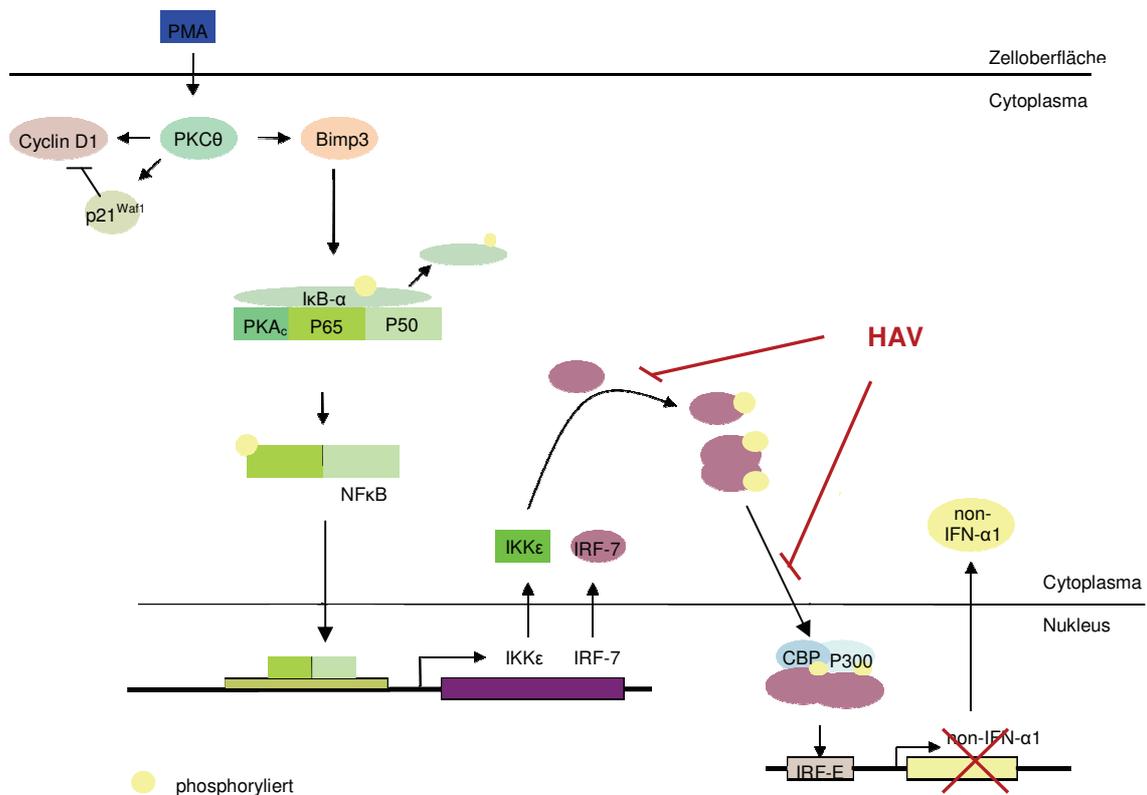


Abbildung 5.2 Vermuteter Angriffspunkt von HAV auf die PMA-induzierte Aktivierung von IRF-7 und Induktion der Expression von IFN-α. Dargestellt ist der im Text erläuterte mögliche Angriffspunkt des Hepatitis A-Virus auf die PMA-induzierten Signalwege, welche zur mononukleäre Differenzierung von U937-Zellen führen. HAV hemmt hier sowohl die Phosphorylierung als auch die nukleäre Translokation von IRF-7. Somit greift HAV in den Signalweg ein, welcher in der Expression für die mononukleäre Differenzierung wichtigen IFN-α mündet. Spitzer Pfeilkopf: Richtung der weiteren Aktivierung des Signalweges. Gerader Pfeilkopf: Hemmung der weiteren Signalwege. Rotes Kreuz: Hemmung. Eine kurze Beschreibung der involvierten Faktoren findet sich im Text und/oder unter „Abkürzungen“.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen meiner Dissertation konnte ich einen deutlich inhibierenden Effekt einer Hepatitis A-Virus-Infektion auf den Transkriptionsfaktor IRF-7 nachweisen. Dieser ist sowohl auf Ebene der Aktivierung (Phosphorylierung), nukleären Translokation als auch transkriptionalen Aktivität des IRF-7 zu detektieren. Desweiteren konnte ich die Bedeutung von IRF-7 und non-IFN- α 1 an der mononukleären Differenzierung unterstreichen und eine HAV-vermittelte Inhibition der NDV-induzierten non-IFN- α 1-Expression aufzeigen (Abbildung 6.1). Weitergehende Fragestellungen, welche auf eine Zusammenführung dieser Ergebnisse mit den Differenzierungsstörungen von mit HAV-infizierten mononukleären Zellen abzielten, konnte ich jedoch nicht beantworten. Die zu Beginn dieser Dissertation aufgestellt These, laut derer eine Hepatitis A-Virus Infektion die Aktivität von IRF-7 hemmt, somit die normalerweise durch IRF-7 induzierte Expression von non-IFN- α 1 unterbunden wird und sich in der Folge Störungen der mononukleären Differenzierung ausbilden, konnte dennoch in großen Teilen bestätigt werden. Der Klärung der Frage nach der molekularen Basis für die Störung der Hämatopoese im Verlauf einer Hepatitis A-Virus Infektion konnte somit ein wichtiger Baustein zugefügt werden.

Desweiteren konnte ich den interessanten Nachweis erbringen, dass aktiviertes IRF-7 als auch IRF-3 die transkriptionale Aktivität des anderen reduziert.

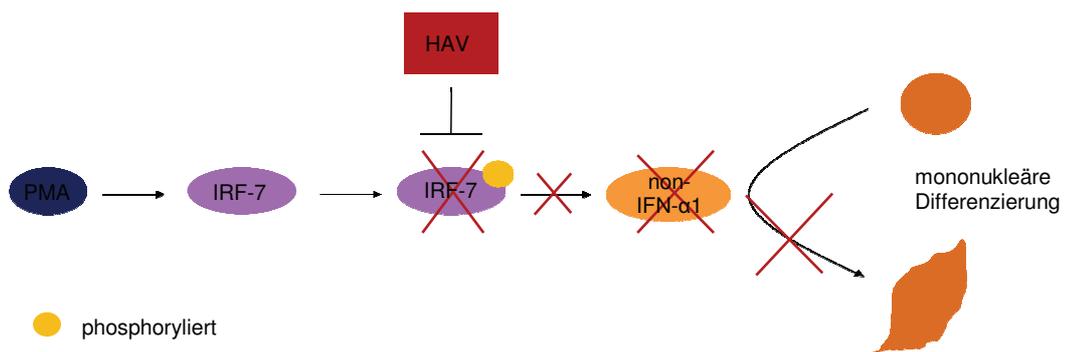


Abbildung 6.1 Möglicher Angriffspunkt von HAV auf die mononukleäre Differenzierung. Schematische Darstellung des über IRF-7 und IFN- α laufenden, PMA-induzierten, möglichen Signalweges zur Auslösung der mononukleären Differenzierung. Die in dieser Arbeit erlangten Teilergebnisse sind farblich dargestellt. Spitzer Pfeilkopf: Richtung der weiteren Aktivierung des Signalweges. Gerader Pfeilkopf: Hemmung der weiteren Signalwege. Rotes Kreuz: Hemmung

7. Abkürzungen, Begriffserklärungen

| Abkürzung / Begriff | Erklärung |
|-----------------------|--|
| 32D Zellen | murine Myelozyten-Zelllinie |
| AA | Aplastische Anämie |
| AAF | IFN- α activation factor |
| AMAP1 | GTPase-aktivierendes Protein für Arf GTPasen |
| ASGPR | hepatocellular asialoglycoprotein receptor |
| ATF-2 | activating transcription factor 2 |
| B43.4.1 | Monozyten-assoziiertes Antigen |
| BFU-E | burst forming units erythrocytes |
| Bimp3 | scaffolding Protein Bimp3/CARMA1/CARD11 |
| BLIMP-1 | B lymphocyte-induced maturation protein-1 |
| buffy-coat | Nach Zentrifugation einer Vollblutspende: Leukozyten/Thrombozyten Fraktion |
| CARD-Domäne | caspase recruitment domain |
| CBP | CREB-bindendes Protein, homolog zu p300 |
| CD | cluster of differentiation |
| CDK | cyclin-dependent kinase |
| cfu | colony forming units |
| CFU-GEMM | colony-forming units granulocyte-erythroid-monoocyte-megakaryocyte |
| CFU-GM | colony-forming units granulocyte-macrophage |
| c-JUN | cellular v-jun-homolog |
| cobblestone | Pflasterstein |
| COS-7 Zellen | african green monkey kidney fibroblast-like cell line |
| CPE | Cytopathischer-Effekt |
| CREB | cAMP response element binding protein |
| Cyclin D1 | Mitglied der Cyclin-Familie. Kontrolle des Zellzyklus |
| DAG | Diacylglycerol |
| DBD | DNA-Bindedomäne |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's Medium |
| dNTP | Desoxyribonucleosidtriphosphat |
| dsRNA | doppelsträngige Ribonucleinsäure (RNA) |
| EBV | Epstein Barr-Virus |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| eIF2 α | eukaryotic (translation) initiation factor 2 α |
| FADD | Fas-associated protein with Death Domain |
| Fc | fragment, crystallizable |
| FcR, C3bR, CD11, CD18 | Oberflächenrezeptoren |
| FCS | fetal calf serum |
| FIM | factor increasing monozytopoiesis |
| FITC | Fluorescein-isothiocyanat |
| FRhK-4 | Fetal rhesus monkey kidney cell-line 4 |
| GAS | IFN- γ activation site |
| GFP | green fluorescent protein |
| GM-CSF | granulocyte macrophage colony-stimulating factor |
| h | Stunde |
| HEK293 | human embryonic kidney 293 cell-line (=293; Adenovirus 5-transformiert) |
| HMG I(Y) | high mobility group-protein-I (Y) |
| IAD | IRF-Assoziations-Domäne |
| iC3b | Komplementkomponente iC3b |
| I κ B | Inhibitor von NF- κ B |
| IFN | Interferon (α , β , γ) |
| IFNAR1, IFNAR2 | Rezeptoren für IFN- α / β |
| IgA | Immunglobulin A |

| | |
|---------------------|--|
| IgG | Immunglobulin G |
| IKAP | <i>IKK complex associated protein</i> |
| IKK | I κ B Kinase (IKK α = IKK1, IKK β = IKK2; IKK γ = NEMO; IKK ϵ = IKK-i) |
| <i>in vitro</i> | lateinisch: <i>im Glas</i> |
| IL | Interleukin (-1, -1 α , -1 β , -2, -3, -4, -6) |
| IRAK | <i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i> (-1, -2) |
| IRES | Internal ribosome entry site |
| IRF | <i>interferon regulatory factor</i> (-3, -7, -9) |
| IRF-E | sogenannte IRF-Elemente |
| ISGs | <i>IFN-stimulated genes</i> |
| ISGF3 | <i>IFN-stimulated gene factor 3</i> (STAT1 + STAT2 + IRF-9) |
| ISRE | <i>IFN-stimulated response element</i> |
| IU | Internationale Einheiten |
| JAK | Janus-Kinase |
| JNK | <i>c-Jun N-terminal kinase</i> |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| LCPS | <i>luminescence counts per second</i> |
| Leu-M2, -M3, HLADr | Monozyten-spezifischen Antigene |
| LMPPs | <i>lymphoid primed multipotent progenitor cells</i> |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LTBMC | <i>long-term bone marrow cultures</i> |
| Luc | Luciferase |
| M-CSF Rezeptor | <i>Macrophage colony stimulating factor receptor</i> |
| MALT1 | <i>mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1</i> |
| MAPK-Kinasen | <i>mitogen-activated protein kinase</i> MKK3/6, MKK4/7 |
| MAVS | <i>mitochondrial antiviral signaling</i> |
| MCS | <i>multiple cloning-site</i> |
| MDA5 | <i>melanoma differentiation-associated gene-5</i> |
| MDCK | Hunde-Nierenzellen |
| MOI | <i>multiplicity of infection</i> (Infektionsverhältnis Viren/Zelle) |
| mock | Zellysat, kein Virus enthaltend |
| MNC | primäre humane mononukleäre Zellen |
| MyD88 | <i>Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adaptor</i> |
| Myelozyt | Vorläuferform der Granulozyten |
| NADPH-Oxidasen | <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i> |
| NAP1 | NAK-associated protein 1 |
| NDV | <i>Newcastle disease virus</i> (Paramoxyviridae) |
| NEMO | NF- κ B essential modulator (= IKK γ) |
| NF- κ B | <i>nuclear factor κB</i> (family: Rel A/p65, Rel B, c-Rel, p50, p52) |
| NHP2 | <i>human homologue of yeast NHP2</i> |
| NIH | <i>National Institute of Health</i> |
| NK | natürliche Killer-Zellen |
| Non-IFN- α 1 | Alle IFN- α Subtypen mit Ausnahme von IFN- α 1 |
| NRDI | <i>negative regulatory domain I</i> |
| NTR | nicht translatierten Region |
| OAS | 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase |
| OD | Optische Dichte (OD ₂₆₀ : Optische Dichte bei 260nm Wellenlänge) |
| ORF | <i>open reading frame</i> |
| p21 | CDK-Inhibitor 1 |
| p35 | Caspase-inhibierendes Protein |
| p38 | <i>mitogen-activated protein kinase</i> 38 kDa |
| P300 | 300 Kilodalton-Protein, E1A-bindend (homolog zu CBP) |
| PBMC | primäre humane mononukleäre Zellen |
| PBS | <i>phosphat buffered saline</i> |
| PCAF | p300/CBP-assoziierter Faktor |
| Pfu | <i>plaque-forming unit</i> |
| p.i. | post infection |

| | |
|------------------------|--|
| PKC, PKC θ | Phosphatidyl-inositol-3-kinase |
| pIgR | <i>Polymeric immunoglobulin receptor</i> |
| PKA | Protein-Kinase A |
| PKA _c | <i>catalytic subunit of PKA</i> |
| PKC, PKC θ | Protein Kinase C |
| PKR | Proteinkinase R |
| PMA | <i>12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat</i> |
| PN | Anzahl der Plaques in der Verdünnung VN |
| poly(IC) | dsRNA Analogen Poly-Inosinsäure:poly-Cytidylsäure |
| PRDIII/I | <i>positive regulatory domain III/I des IFN-β Enhancers</i> |
| PS | Phosphatidylserine |
| RAS-GRP | <i>Ras-guanine nucleotide-releasing protein</i> |
| RIG-I | <i>retinoic acid-induced gene I</i> |
| RIP1 | <i>receptor interacting protein-1</i> |
| RNase L | Latente Ribonuklease |
| RT | Raumtemperatur |
| Sca-1 | <i>stem cell associated antigen</i> |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| Splitverhältniss | Fläche altes Zellkulturgefäß/Fläche neues Zellkulturgefäß |
| STATs | <i>signal transducers and activators of transcription</i> |
| T | Zeit |
| TAB1, TAB2 | <i>TAK1-binding protein 1, -2</i> |
| TAK1 | <i>transforming growth factor-beta-activated kinase 1</i> |
| TCID ₅₀ | <i>tissue culture infectious dose 50%</i> (mittlere Zellkulturinfektionsdosis) |
| TAK1 | <i>TGF-β-activated kinase</i> |
| TANK | <i>TRAF-associated NF-κB activator</i> |
| TBK-1 | <i>TANK-binding kinase 1</i> |
| Thy1 | T-Zell Antigen |
| TLR | Toll-like Rezeptoren |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| TRAF-2, TRAF-3, TRAF-6 | <i>tumor necrosis factor receptor [TNFR]-associated factor 2, -3, -6</i> |
| TRIF | <i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β</i> |
| TYK2 | Tyrosin-Kinase |
| VAK | <i>virus-activated kinase-complex</i> |
| v/v | Volume/volume (Volumen pro Volumen) |
| v/w | Weight/volume (Masse pro Volumen) |
| WT | Wildtyp |

8. Literaturverzeichnis

- Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, Randall RE** (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(49):17264-17269.
- Au WC, Moore PA, Lowther W, Juang YT, Pitha PM** (1995) Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(25):11657-11661.
- Au WC, Moore PA, LaFleur DW, Tombal B, Pitha PM** (1998) Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes. *The Journal of biological chemistry* **273**(44):29210-29217.
- Au WC, Yeow WS, Pitha PM** (2001) Analysis of functional domains of interferon regulatory factor 7 and its association with IRF-3. *Virology* **280**(2):273-282.
- Asher LV, Binn LN, Mensing TL, Marchwicki RH, Vassell RA, Young GD** (1995) Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *Journal of Medical Virology* **47**(3): 260-268.
- Baier G, Baier-Bitterlich G, Meller N, Coggeshall KM, Giampa L, Telford D, Isakov N, Altman A** (1994) Expression and biochemical characterization of human protein kinase C-theta. *European journal of biochemistry/FEBS* **225**(1):195-203.
- Barnes BJ, Richards J, Mancl M, Hanash S, Beretta L, Pitha PM** (2004) Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. *The journal of biological chemistry* **279**(43):45194-45207
- Barnett ME, Madgwick DK, Takemoto DJ** (2007) Protein kinase C as stress sensor. *Cellular signalling* **19**(9):1820-1829.
- Berk I** (2003) Dissertation: Untersuchungen zur Blockade zellulärer antiviraler Mechanismen durch das Hepatitis A-Virus unter besonderer Berücksichtigung der Proteinkinase R und das Transkriptionsfaktors NF-κB. Universität Bremen.
- Bhattacharyya M, Oakervee H, Dalley C, Glynn M, Cavenagh J** (2005) Hepatitis-associated aplastic anemia treated successfully with antilymphocyte globulin. *Clinical and laboratory haematology* **27**(5):331-333.
- Bluyssen AR, Durbin JE, Levy DE** (1996) ISGF3 gamma p48, a specificity switch for interferon activated transcription factors. *Cytokine & growth factor reviews* **7**(1):11-17.
- Böttinger LE, Westerholm B** (1972) Aplastic anaemia. 3. Aplastic anaemia and infectious hepatitis. *Acta medicaScandinavica* **192**(4):323-326.
- Bourne MS, Elves MW, Israuels MC** (1965) Infectious hepatitis as a generalized disease. *British Medical Journal* **1**(5437):740-741.
- Brack K** (1999) Dissertation: Mechanismus und genetische Basis der Cytopathogenität einer Hepatitis A-Virusvariante in Zellkultur. Universität Bremen.
- Brack K, Frings W, Dotzauer A, Vallbracht A** (1997) A cytopathogenic, apoptosis-inducing variant of hepatitis A virus. *Journal of Virology* **72**(4):3370-3376.
- 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. *Journal of Virology* **76**(23):11920-11930.

- Brandt S** (2002) Diplomarbeit: Die Auswirkung einer Hepatitis A-Virusinfektion auf die regulatorische Domäne PRDIV des humanen Interferon- β -Enhanceosomes. Universität Bremen.
- Brown KE, Tisdale J, Barrett AJ, Dunbar CE, Young NS** (1997) Hepatitis-associated aplastic anemia. *The New England journal of medicine* **336**(15):1059-1064.
- Buessow SC, Gillespie GY** (1984) Interferon-alpha and -gamma promote myeloid differentiation of HL-60, a human acute promyelocytic leukemia cell line. *Journal of biological response modifiers* **3**(6):653-662.
- Busch FW** (1989). Beeinflussung der hämatopoetischen Regulation durch Viren: Untersuchungen an einem Hepatitis A Modell. *Habilitationsschrift der hohen Medizinischen Fakultät Klinische Medizin der Eberhard-Karls-Universität Tübingen*.
- Busch FW, de Vos S, Flehmig B, Herrmann F, Sandler C, Vallbracht A** (1987) Inhibition of in vitro hematopoiesis by hepatitis A virus. *Experimental hematology* **15**(9):978-982.
- Busch FW, Kunst A, Flehmig B, Mergenthaler HG, Pawelec G, Vallbracht A** (1992) Myelopoiesis in vitro is suppressed by hepatitis A virus. *Annals of hematology* **64**:A132-136.
- Caillaud A, Hovanessian AG, Levy DE, Marié IJ** (2005) Regulatory serine residues mediate phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent activation of interferon regulatory factor 7. *The journal of biological chemistry* **280**(18):17671-17677.
- Calvano JE, Agnese DM, Um JY, Goshima M, Singhal R, Coyle SM, Reddell MT, Kumar A, Calvano SE, Lowry SF** (2003) Modulation of the lipopolysaccharide receptor complex (CD14, TLR4, MD-2) and toll-like receptor 2 in systemic inflammatory response syndrome-positive patients with and without infection: relationship to tolerance. *Shock* **20**(5):415-419.
- Camitta BM, Nathan DG, Forman EN, Parkman R, Rapoport JM, Orellana TD** (1974) Posthepatic severe aplastic anemia – An indication for early bone marrow transplantation. *Blood* **43**(4):473-483.
- Cathelin S, Rébé C, Haddaoui L, Simioni N, Verdier F, Fontenay M, launay S, Mayeux P, Solary E** (2006) Identification of proteins cleaved downstream of caspase activation in Monozytes undergoing macrophage differentiation. *The journal of biological chemistry* **281**(26):17779-17788.
- Cavaillon JM** (1994) Cytokines and macrophages. *Biomedicine & pharmacotherapy* **48**(10):445-453.
- Chang DH, Angelin-Duclos C, Calame K** (2000) BLIMP-1: trigger for differentiation of myeloid lineage. *Nature immunology* **1**(2):169-176.
- Chariot A, Leonardi A, Muller J, Bonif M, Brown K, Siebenlist U** (2002) Association of the adaptor TANK with the I kappa B kinase (IKK) regulator NEMO connects IKK complexes with IKK epsilon and TBK1 kinases. *The Journal of biological chemistry* **277**(40):37029-37036.
- Chatila TA, Geha RS** (1988) Phosphorylation of T cell membrane proteins by activators of protein kinase C. *Journal of immunology* **140**(12):4308-4314.
- Christensen JL, Irving IL** (2001) Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: A simple method to isolate long-term stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(25):14541-14546.
- Ciocca M** (2000) Clinical course and consequences of hepatitis A infection. *Vaccine* **18**:71-74.
- Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I, Cella M, Lande R, Uzé G** (2004) Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and γ interferons in human plasmacytoid and Monozyte-derived dendritic cells. *European journal of immunology* **34**(3):796-805.
- Conrad ME, Schwartz FD, Young AA** (1964) Infectious hepatitis; a generalized disease. A study of renal, gastrointestinal and hematologic abnormalities. *The american journal of medicine* **37**:789-801.
- Could CM, Newton AC** (2008) The life and death of protein kinase C. *Current drug targets* **9**(8):614-625.

- Coulepis AG, Locarnini SA, Westaway EG, Tannock GA, Gust ID** (1982) Biophysical and biochemical characterization of Hepatitis A virus. *Intervirology* **18**(3):107-127.
- Cutrone EC, Langer JA** (1997) Contributions of cloned type I interferon receptor subunits to differential ligand binding. *FEBS letters* **404**(2-3):197-202.
- Dale DC, Boxer L, Liles WC** (2008) The phagocytes: neutrophils and Monozytes. *Blood* **112**(4):935-945.
- Dai J, Megjugorac NJ, Amrute SB, Fitzgerald-Bocarsly P** (2004) Regulation of IFN regulatory factor-7 and IFN-alpha production by enveloped virus and lipopolysaccharide in human plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology* **173**(3):1535-1548.
- Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR** (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signalling proteins. *Science* **264**(5164):1415-1421.
- David C. Dale, Laurence Boxer, W.Conrad Liles** (2008) The phagocytes: neutrophils and Monozytes. *Blood* **112**(4):935-945.
- De Vente J, Kiley S, Garris T, Bryant W, Hooker J, Posekany K, Parker P, Cook P, Fletcher D, Ways DK** (1995) Phorbol ester treatment of U937 cells with altered protein kinase C content and distribution induces cell death rather than differentiation. *Cell growth & differentiation* **6**(4):371-382.
- Decker T, Lew DJ, Darnell JE Jr** (1991) Two distinct alpha-interferon-dependent signal transduction pathways may contribute to the activation of transcription of the guanylate-binding protein gene. *Molecular and cellular biology* **11**(10):5147-5153.
- Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG, Schofield R, Lord BI** (1973) Stimulation of differentiation and proliferation of haemopoietic cells in vitro. *Journal of cellular physiology* **82**(3):461-473.
- Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG** (1977) Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *Journal of cellular physiology* **91**(3):335-344.
- Diaz MO** (1995) The human type I interferon gene cluster. *Seminars in Virology* **6**(3):143-149.
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C** (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**(5663):1529-1531.
- Dodd RC, Cohen MS, Newman SL, Gray TK** (1983) Vitamin D metabolites change the phenotype of monoblastic U937 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**(24):7538-7541.
- Dotzauer A, Gebhardt U, Bieback K, Göttke U, Kracke A, Mages J, Lemon SM, Vallbracht A** (2000) Hepatitis a virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis a virus via the asialoglycoprotein receptor. *Journal of Virology* **74**(23):10950-10957.
- Dotzauer A, Brenner M, Gebhardt U, Vallbracht A** (2005) IgA-coated particles of Hepatitis A virus translocated antivectionally from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor. *Journal of General Virology* **86**:2747-2751.
- Erlandsson L, Blumenthal R, Eloranta ML, Engel H, Alm G, Weiss S, leanderson T** (1998) Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Current biology* **8**(4):223-226.
- Escalante CR, Yie J, Thanos D, Aggarwal AK** (1998) Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulatory. *Nature* **391**(6662):103-106.
- Escalante CR, Brass AL, Pongubala JM, Shatova E, Shen L, Singh H, Aggarwal AK** (2002) Crystal structure of PU.1/IRF-4 ternary complex. *Molecular Cell* **10**(5):1097-1105.
- Fahy RJ, Doseff AI, Wewers MD** (1999) Spontaneous human Monozyte apoptosis utilizes a caspase-3-dependent pathway that is blocked by endotoxin and is independent of caspase-1. *Journal of immunology* **163**(4):1755-1762.

- Falvo JV, Thanos D, Maniatis T** (1995) Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN beta gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y). *Cell* **83**(7):1101-1111.
- Falvo JV, Parekh BS, Lin CH, Fraenkel E, Maniatis T** (2000) Assembly of a functional beta interferon enhanceosome is dependent on ATF-2-c-jun heterodimer orientation. *Molecular and cellular biology* **20**(13):4814-4825.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH** (1973) Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* **182**(116):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. *Journal of Virology* **79**(17):10968-10977.
- Firkin FC, Nicholls K, Whelan G** (1978) Transient myeloid and erythroid aplasia associated with infectious hepatitis. *British Medical Journal* **2**(6151):1534.
- Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T** (2003) IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature immunology* **4**(5):491-496.
- Fujii Y, Shimizu T, Kusumoto M, Kyogoku Y, Taniguchi T, Hakoshima T** (1999) Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *The EMBO journal* **18**(18):5028-5041.
- Fujita F, Taniguchi Y, Kato T, Narita Y, Furuya A, Ogawa T, Sakurai H, Joh T, Itoh M, Delhase M, Karin M, Nakanishi M** (2003) Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling. *Molecular and cellular Biology* **23**(21):7780-7793.
- Gao JJ, Filla MB, Fultz MJ, Vogel SN, Russell SW, Murphy WJ** (1998) Autocrine/paracrine IFN- α mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat1 α in mouse macrophages: pivotal role of Stat1 α in induction of the inducible nitric oxide synthase gene. *Journal of immunology* **161**(9):4830-4810.
- Génin P, Lin R, Hiscott J, Civas A** (2009) Differential regulation of human interferon-A genes expression by interferon regulatory factor 3 and 7. *Molecular and cellular Biology* [MCB accepts, published ahead of print on 6 April].
- Ghislain JJ, Wong T, Nguyen M, Fish EN** (2001) The interferon-inducible Stat2:Stat1 heterodimer preferentially binds in vitro to a consensus element found in the promoters of a subset of interferon-stimulated genes. *Journal of interferon & cytokine research* **21**(6):379-388.
- Giebel B, Punzel M** (2008) Lineage development of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biological chemistry* **389**(7):813-824.
- Grabher C, Cliffe A, Miura K, Hayflick J, Pepperkok R, Rorth P, Wittbrodt J** (2006) Birth and life of tissue macrophages and their migration in embryogenesis and inflammation in medaka. *Journal of leukocyte biology* **81**(1):263-271.
- Glass MJ, Jia X-Y, Summers DF** (1993) Identification of the Hepatitis A virus Internal ribosome entry site: In vivo and in vitro analysis of bicistronic RNAs containing the HAV 5' noncoding region. *Virology* **193**(2):842-852.
- Hass R, Bartels H, Topley N, Hadam M, Köhler L, Goppelt-Strübe M, Resch K** (1989) TPA-induced differentiation and adhesion of U937 cells: changes in ultrastructure, cytoskeletal organization and expression of cell surface antigens. *European journal of cell biology* **48**(2):282-293.
- Hass R, Gunji H, Datta R, Kharbanda S, Hartmann A, Weichselbaum R, Kufe D** (1992) Differentiation and retrodifferentiation of human myeloid leukemia cells is associated with reversible induction of cell cycle-regulatory genes. *Cancer research* **52**(6):1445-1450.

- Hass R, Bartels Prudovsky I, Kruhøffer M** (1997) Differential effects of phorbol ester on signaling and gene expression in human leukemia cells. *Leukemia research* **21**(7):589-594.
- Hattori T, Pack M, Bougnoux P, Chang ZL, Hoffman T** (1983) Interferon-induced differentiation of U937 cells. *The Journal of clinical investigation* **72**(1):237-244.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S** (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**(5663):1526-1529.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S** (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**(6813):659-660.
- Hemmi H, Takeuchi O, Sato S, Yamamoto M, Kaisho T, Sanjo H, Kawai T, Hoshino K, Takeda K, Akira S** (2004). The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *The Journal of experimental medicine* **199**(12):1641-1650.
- Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutan T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, Taniguchi T** (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**(7034):772-777.
- Honda K, Takaoka A, Taniguchi T** (2006) Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* **25**(3):349-360.
- Hosoya H, Marunouchi T** (1992) Differentiation and dedifferentiation of the human Monozytic cell line, U937. *Cell structure and function* **17**(5):263-269.
- Isakov N, Altman A** (1987) Human T lymphocyte activation by tumor promoters: role of protein kinase C. *Journal of immunology* **138**(10):3100-3107.
- Isakov N, Altman A** (2002) Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annual review of immunology* **20**:761-794.
- Israel** (2000) The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB?. *Trends in cell biology* **10**(4):129-133.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ** (2002) Immunobiology – the immune system in health and disease, 6th edition. *Churchill Livingstone*.
- Kang HS, Jung HM, Jun DY, Huh TL, Kim YH** (2002) Expression of the human homologue of the small nucleolar RNA-binding protein NHP2 gene during Monozytic differentiation of U937 cells. *Biochimica et biophysica acta* **1575**(1-3):31-39.
- Kaumanns P** (2003) Diplomarbeit: Untersuchungen zum Einfluss einer Hepatitis A-Virusinfektion auf die Expression eines unter der Kontrolle definierter Interferon-β Enhancerdomänen stehenden CAT Reportergens. Universität Bremen.
- Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, Terai K, Matsuda M, Inoue J, Uematsu S, Takeuchi O, Akira S** (2004) Interferon-α induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF-7 with MyD88 and TRAF6. *Nature Immunology* **5**(10):1061-1068.
- Kee BL, Arias J, Montminy MR** (1996) Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *The Journal of biological chemistry* **271**(5):2373-32375.
- Keenan C, Long A, Volkoc Y, Kelleher D** (1997) Protein kinase C isotypes θ, δ and η in human lymphocytes: differential responses to signalling through the T-cell receptor and phorbol esters. *Immunology* **90**(4):557-563.
- Kessler DS, Levy DE, Darnell JE Jr** (1988) Two interferon-induced nuclear factors bind a single promoter element in interferon-stimulated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**(22):8521-8525.

- Kim TK, Kim TH, Maniatis T** (1998) Efficient recruitment of TFIIB and CBP-RNA polymerase II holoenzyme by an interferon-beta enhancerosome in vitro. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **95**(21):12191-12196.
- Kivel RM** (1961) Hematologic aspects of acute viral hepatitis. *The American journal of digestive diseases* **6**:1017-1031.
- Kittler EL, McGrath H, Temeles D, Crittenden RB, Kister VK, Quesenberry PJ** (1992) Biologic significance of constitutive and subliminal growth factor production by bone marrow stroma. *Blood* **79**:3168-3178.
- Koichi Akashi, David Traver, Toshihiro Miyamoto, Irving L. Weissman** (2000) A clonogenic commonmyeloid progenitor that gives rise to allmyeloid lineages. *Nature* **404**:193-197.
- Kojima S, Matsuyama K, Koder Y** (1988) Bone marrow transplantation for hepatitis-associated aplastic anemia. *Acta Haematol.* **79**(1):7-11.
- Kruse A, Kirchner H, Zawatzky R, Domke-Opitz I** (1989) In vitro development of bone-marrow-derived macrophages. Influence of mouse genotype on response to colony-stimulating factors and autocrine interferon induction. *Scandinavian journal of immunology* **30**(6):731-740.
- Kuwata T, Gongora C, Kanno Y, Sakaguchi K, Tamura T, Kanno T, basrur V, Martinez R, Appella E, Golub T, Ozato K** (2002) Gamma interferon triggers interaction between ICSBP (IRF-8) and TEL, recruiting the histone deacetylase HDAC3 to the interferon-responsive element. *Molecular and cellular biology* **22**(21):7439-7448.
- Li C, Ni CZ, Havert ML, Cabezas E, He J, Kaiser D, Reed JC, Satterthwait AC, Cheng G, Ely KR** (2002) Downstream regulator TANK binds to the CD40 recognition site on TRAF3. *Structure* **10**(3):403-411.
- Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM, Hiscott J** (1998) Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Molecular and cellular biology* **18**(5):2986-2996.
- Lin R, Mamane Y, Hiscott J** (1999) Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: Localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Molecular and cellular biology* **19**(4):2465-2474.
- Lin R, Mamane Y, Hiscott J** (2000a) Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection. *The journal of biological chemistry* **275**(44):34320-34327.
- Lin R, Génin P, Mamane Y, Hiscott J** (2000b) Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7. *Molecular and cellular biology* **20**(17):6342-6353.
- Lee WM, Squires RH Jr, Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH** (2007) Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology* **47**:1401-1415.
- Lemon SM** (1997) Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. *Clinical Chemistry* **43**(8):1494-1499.
- Lotem J, Sachs L** (1979) Regulation of normal differentiation in mouse and human myeloid leukemic cells by phorbol esters and the mechanism of tumor promotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**(10):5158-5162.
- Lu R, Au WC, Yeow WS, Hageman N, Pitha PM** (2000) Regulation of the promoter activity of interferon regulatory factor-7 gene. *The journal of biological chemistry* **275**(41):31805-31812.
- Lu R, Pitha PM** (2001) Monocyte differentiation to macrophage requires interferon regulatory factor 7. *The journal of biological chemistry* **276**(48):45491-45496.

- Lu R, Moore PA, Pitha PM** (2002) Stimulation of IRF-7 gene expression by tumor necrosis factor alpha: requirement for NfκappaB transcription factor and gene accessibility. *Journal of biological chemistry* **277**(19):16592-16598.
- Lucas PC, McAllister-Lucas LM, Nunez G** (2004) NF-κB signaling in lymphocytes: a new cast of characters. *Journal of cell science* **117**:31-39.
- Magulski T** (2001) Diplomarbeit: Etablierung eines CAT-Reporter-Gen-Assays zur Untersuchung des Einflusses einer Hepatitis A-Virusinfektion auf die Interferon-β-Genexpression. Universität Bremen
- Mamane Y, Heylbroeck C, Génin P, Algarté M, servant MJ, LePage C, DeLuca C, Kwon H, Lin R, Hiscott J** (1999) Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* **237**(1):1-14.
- Mangan DF, Welch CR, Wahl SM** (1991) Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-α, and IL-1β prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood Monozytes. *The journal of immunology* **146**(5):1465-1541.
- Mangan DF, Wahl SM** (1991) Differential regulation of human Monozyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *Journal of immunology* **147**(10):3408-3412.
- Maniatis T, Falvo JV, Kim TK, Lin CH, Parekh BS, Wathélet MG** (1998) Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **63**:609-620.
- Manzella L, Conte E, Cocchiario G, Guarniera E, Sciacca B, Bonaiuto C, Stagno F, Messina A** (1999) Role of interferon regulatory factor 1 in Monozyte/macrophage differentiation. *European journal of immunology* **29**(9):3009-3016.
- Marié I, Durbin JE, Levy DE** (1998) Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *The EMBO journal* **17**(22):6660-6669.
- Marié I, Smith E, Prakash A, Levy DE** (2000) Phosphorylation-induced dimerization of interferon regulatory factor 7 unmasks DNA binding and a bipartite transactivation domain. *Molecular and cellular biology* **20**(23):8803-8814.
- Matsumoto E, Hatanaka M, Bohgaki M, Maeda S** (2006) PKC pathway and ERK/MAPK pathway are required for induction of cyclin D1 and p21 Waf1 during 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced differentiation of myeloleukemia cells. *The Kobe journal of medical sciences* **52**(6):181-194.
- Masumi A, Ozato K** (2001) Coactivator p300 acetylates the interferon regulatory factor-2 in U937 cells following phorbol ester treatment. *The journal of biological chemistry* **276**(24):20973-20980.
- Mazur EM, Richtsmeier WJ, South K** (1986) Alpha-interferon: differential suppression of colony growth from human erythroid, myeloid, and megakaryocytic hematopoietic progenitor cells. *Journal of interferon research* **6**(3):199-206.
- Minta JO, Pambrun L** (1985) In vitro induction of cytologic and functional differentiation of the immature human Monozytelike cell line U-937 with phorbol myristate acetate. *American journal of pathology* **119**(1):111-126.
- Miyata M, Raven JF, Baltzis D, koromilas AE, Sabe H** (2008) IRES-mediated translational control of AMAP1 expression during differentiation of Monozyte U937 cells. *Cell cycle* **7**(20):3273-3281.
- Moore RN, Pitruzzello FJ, Deana DG, Rouse BT** (1985) Endogenous regulation of macrophage proliferation and differentiation by E prostaglandins and interferon alpha/beta. *The Lymphokine Research* **4**(1):43-50.
- Morrison SJ, Weissman IL** (1994) The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* **1**:661-673.
- Motonari Kondo, Irving L. Weissman, Koichi Akashi** (1997) Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell* **91**:661-672.

- Munshi N, Yie Y, Merika M, Senger K, Lomvardes S, Agalioti T, Thanos D** (1999) The IFN-beta enhancer: a paradigm for understanding activation and repression of inducible gene expression. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **64**:149-59.
- Naito M** (2008) Macrophage differentiation and function in health and disease. *Pathology International* **58**:143-155.
- Nomura F, Kawai T, Nakanishi K, Akira S** (2000) NF-kappaB activation through IKK-i-dependent I-TRAF/TANK phosphorylation. *Genes to cells* **5**(3):191-202.
- Normann A, Jung C, Vallbracht A, Flehmig B** (2004) Time course of Hepatitis A viremia and viral load in the blood of human Hepatitis A patients. *J Med Virol* **72**:10-16.
- Nourbakhsh M, Hauser H** (1999) Constitutive silencing of IFN-beta promoter is mediated by NRF (NF-kappaB-repressing factor), a nuclear inhibitor of NF-kappaB. *The EMBO Journal* **18** (22):6415-6425.
- Novick D, Cohen B, Rubinstein M** (1994) The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* **77**(3):391-400.
- Oganesyan G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, Perry A, Cheng G** (2006) Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* **439**(7073):208-211.
- Olsson IL, Breitman TR** (1982) Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by retinoic acid and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-inducing agents. *Cancer research* **42**(10):3924-3927.
- Panne D, Maniatis T, Harrison SC** (2007) An atomic model of enhanceosome structure in the vicinity of DNA. *Cell* **129**(6):1111-1123.
- 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. *The Journal of general virology* **89**(7):1593-1604.
- Paulmann D** (2008) Dissertation: Untersuchung und Identifizierung von Faktoren, die an der Hemmung der IFN- β -Induktion bei einer Hepatitis A-Virusinfektion beteiligt sind. Universität Bremen
- Paz S, Sun Q, Nakhaei P, Romieu-Mourez R, Goubau D, Julkunen I, Lin R, Hiscott J** (2006) Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway. *Cellular and molecular Biology* **15**(52):17-28.
- Pestka S, Krause CD, Walter MR** (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*. **202**:8-32.
- Peters RT, Liao SM, Maniatis T** (2000) IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex. *Molecular cell* **5**(3):513-522.
- Player MR, Torrence PF** (1998) The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacology and Therapeutics*. **78**(2):55-113.
- Qin BY, Liu C, Lam SS, Srinath H, Delston R, Correia JJ, Derynck** (2003) Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphorylation. *Nature structural biology* **10**(11):913-921.
- Repnik U, Knezevic M, Jeras M** (2003) Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. *Journal of immunological methods* **278**(1-2):283-292.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL** (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**:105-111.

- Rice AP, Duncan R, Hershey JW, Kerr IM** (1985) Double-stranded RNA-dependent protein kinase and 2-5A system are both activated in interferon-treated, encephalomyocarditis virus-infected HeLa cells. *Journal of Virology*. **54**(3):894-898.
- Ron D, Kazanietz MG** (1999) New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**(13):1658-1676.
- Saha SK, Pietras EM, He JQ, Kang JR, Liu SY, Oganessian G, Shahangian A, Zarnegar B, Shiba TL, Wang Y, Cheng G** (2006) Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *The EMBO Journal* **25**(14):3257-3263.
- Sakurai H, Miyoshi H, Mizukami J, Sugita T** (2000) Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase by TAB1. *FEBS Letters* **474**(2-3):141-145.
- Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, Tanaka N** (1998) Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS letters* **441**:106-110.
- Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T** (2000) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* **13**(4):539-548.
- Schafer SL, Lin R, Moore PA, Hiscott J, Pitha PM** (1998) Regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor-3. *The journal of biological chemistry* **273**(5):2714-2720.
- Schlemminger S** (2004) Diplomarbeit: Einfluss einer Hepatitis A-Virus-Infektion auf die stressinduzierte Aktivierung von NF- κ B und p53 in FRhK-4-Zellen. Universität Bremen
- Schulman AN, Dienstag JK, Kackson DR, Hoofnagle JH, Gerety RJ, Purcell RH, Barker LF** (1976) Hepatitis A antigen particles in liver, bile, and stool of chimpanzees. *Journal of Infectious Diseases* **134**(1): 80-84.
- Schultheiss T, Kusov YY, Gauss-Müller V** (1994) Proteinase 3C of Hepatitis A virus (HAV) cleaves the HAV polyprotein P2-P3 at all sites including VP1/2A and 2A/2B. *Virology* **198**:275-281.
- Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ** (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF 3. *Cell* **122**(5):669-682.
- Sgarbanti M, Marsili G, Remoli AL, Orsatti R, Battistini A** (2007) IRF-7: New role in the regulation of genes involved in adaptive immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1095**:325-333.
- Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J** (2003) Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**(5622):1148-1151.
- Shimada T, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Inoue J, Tatsumi Y, Kanamaru A, Akira S** (1999) IKK-I, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *International immunology* **11**(8):1357-1362.
- Sluiter W, Hulsing-Hesselink E, Elzenga-Claasen I, van Hemsbergen-Oomens LW, van der Voort der Kleij-van Andel A, van Furth R** (1987) Macrophages as origin of factor increasing Monocytopoiesis 1987. *The Journal of experimental medicine* **166**:909-22.
- Smith G, Gible TJ, Yeager AS, Greenberg HB, Purcell RH, Robinson W, Schwartz HC** (1978) Spontaneous resolution of severe aplastic anemia associated with viral hepatitis A in a 6-year-old child. *American journal of hematology* **5**(3):247-252
- Sompayrac L** (2008) How the immune system works. *Blackwell Publishing*.
- Speck B** (1986) Aplastische Anämie. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* **116**(43):1467-1474.

- Speck B, Gratwohl A, Nissen C, Osterwalder B, Signer E, Jeannot M** (1983) Knochenmarktransplantation bei Leukämie und aplastischer Anämie. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* **113**:622-629.
- Sundström C, Nilsson K** (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *International journal of cancer* **17**(5):565-577.
- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N** (2001) IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual reviews of immunology* **19**:623-655.
- tenOever BR, Sharma S, Zou W, Sun Q, Grandvaux N, Julkunen I, Hemmi H, Yamamoto M, Akira S, Yeh WC, Lin R, Hiscott J** (2004) Activation of TBK1 and IKKvarepsilon kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity. *Journal of virology* **78**(19):10636–10649.
- Testa U, Ferbus D, Gabbianelli M, Pascucci B, Boccoli G, Louache F, Thang MN** (1988) Effect of endogenous and exogenous interferons on the differentiation of human Monozyte cell line U937. *Cancer research* **48**(1):82-88.
- Thiele J, Wickenhauser C, Neuwirth C, Schulze HJ, Flucke U, Kvasnicka HM, Borchmann P, Krech R, Fischer R** (1998) Effect of IFN-alpha on normal human hematopoiesis: an immunohistochemical and morphometric study on trephine biopsy specimens. *Journal of interferon & cytokine research* **18**(4):247-253.
- Ticehurst JR, Racaniello VR, Baroudy BM, Baltimore D, Purcell RH, Feinstone SM** (1983) Molecular cloning and characterization of Hepatitis A virus cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**:5885-5889.
- Totsuka A, Moritsugu Y** (1999). Hepatitis A virus proteins. *Intervirology* **42**(2-3): 63-68.
- Vallbracht A, Maier K, Stierhof YD, Wiedmann KH, Flehmig B, Fleischer B** (1989) Liver-derived cytotoxic T cells in hepatitis A virus infections. *The journal Infectious diseases* **160**(2):209-217.
- Vallbracht A, Fleischer B, Busch FW** (1993) Hepatitis A: hepatotropism and influence on myelopoiesis. *Intervirology* **35**(1-4):133-139.
- van Zandbergen G, Westerhuis R, Mohamad NK, van De Winkel JG, Daha MR, van Kooten C** (1999) Crosslinking of the human Fc receptor for IgA (FcalphaRI/CD89) triggers FcR gamma-chain-dependent shedding of soluble CD89. *Journal of Immunology* **163**(11):5806-5812.
- Veals SA, Santa Maria T, Levy DE** (1993) Two domains of ISGF3 gamma that mediate protein-protein interactions during transcription factor assembly contribute to DNA-binding specificity. *Molecular and cellular biology* **13**(1):196-206.
- Vilcek J, Sen G** (1996) Interferons and other cytokines. In *Fields Virology*. **3**:375-399.
- Wang QJ, Acs P, Goodnight J, Giese T, Blumberg PM, Mischak H, Mushinski JF** (1997) The catalytic domain of protein kinase C.δ in reciprocal δ and ε chimeras mediates phorbol ester-induced macrophage differentiation of mouse promyelocytes. *The Journal of biological chemistry* **272**(1):76-82.
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, chen ZJ** (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**(6844):346-351.
- Wang N, Ahmed S, Haggi TM** (2005) Genomic structure and functional characterization of the human IkappaB kinase-related kinase IKKi/IKKvarepsilon gene. *Gene* **353**(1):118-133.
- Wiederhold MD, Anderson KM, Harris JE** (1988) Labelling of lipids and phospholipids with [3H]arachidonic and the biosynthesis of eicosanoids in U937 cells differentiated by phorbol ester. *Biochimica et biophysica acta* **959**(3):296-304.
- Williams BR** (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene*. **18**(45):6112-6120

- Williams BR** (1991) Transcriptional regulation of interferon-stimulated genes. *European journal of biochemistry* **200**(1):1-11.
- Wreschner DH, James TC, Silverman RH, Kerr IM** (1981) Ribosomal RNA cleavage, nuclease activation and 2-5A (ppp(A2'p)_nA) in interferon-treated cells. *Nucleic Acids Research* **9**(7):1571-1581.
- Wünschmann S** (1998) Suppression der Myelopoese durch das Hepatitis A-Virus. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen.
- Wünschmann S, Becker B, Vallbracht A** (2002) Hepatitis A virus suppresses Monozyte-to-macrophage maturation in vitro. *Journal of Virology*. **76**(9):4350-4356.
- Yang H, Lin CH, Ma G, Baffi MO, Wathelet MG** (2003) Interferon regulatory factor-7 synergizes with other transcription factors through multiple interactions with p300/CBP coactivators. *The Journal of biological chemistry* **278**(18):15495-15504.
- Yang H, Ma G, Lin CH, Orr M, Wathelet MG** (2004) Mechanism for transcriptional synergy between interferon regulatory factor (IRF)-3 and IRF-7 in activation of the interferon-beta gene promoter. *European journal of biochemistry/FEBS* **271**(18):3693-3703.
- Yie J, Merika M, Munshi N, Chen G, Thanos D** (1999) The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN-beta enhanceosome. *The EMBO Journal* **18**(11):3074-3089.
- Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Sato M, Ozato K, Fujita T** (1996) Autocrine amplification of type I interferon gene expression mediated by interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3). *Journal of biochemistry* **120**(1):160-169.
- 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. *Nature Immunology* **5**(7):730-737.
- Zhang L, Pagano JS** (1997) IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency. *Molecular and cellular biology* **17**(10):5748-5757.
- Zhang L, Wu L, Hong K, Pagano JS** (2001) Intracellular signaling molecules activated by Epstein-Barr virus for induction of interferon regulatory factor 7. *Journal of virology* **75**(24):12393-12401.

I Lebenslauf (Ausbildung)

| | | |
|--|-------------|---|
| 04/08 – 04/09 | | wissenschaftliche Mitarbeiterin der Universität Bremen |
| 04/06 – 04/08 | | Promotionsstipendium der Universität Bremen |
| Seit 04/03 | | Dissertation Universität Bremen |
| | Thema: | Untersuchung der Rolle von IRF-7 bei der Suppression der Hämatopoese durch das Hepatitis A-Virus |
| 04/03 | | GDCh-Fortbildungskurs Gentechnik |
| | Zertifikat: | Erlangung des Sachkundenachweises für Projektleiter und BBS nach §15,17 Gentechniksicherheitsverordnung |
| 11/2002 - 6/2006 parallel zur Promotion | Firma: | Mikrolab GmbH |
| | Aufgabe: | Labormitarbeiterin im Bereich chemische Desinfektionsmitteltestungen |
| 12/2002 | | Examen Diplombiologin Universität Bremen |
| | Thema: | Praxisnahe Viruzidieprüfungen mit der cytopathogenen Variante des Hepatitis A Virus |
| 06/97 | | Abitur Gymnasium Stuhr-Brinkum |

II Veröffentlichungen

Vorträge

Händschke S, Grotheer D, Becker B, Gehrke S, Gries S, Steinmann J: In vitro inactivation of hepatitis A virus and feline calicivirus by aldehydes and peroxgen compounds.

7. Internationaler Kongress der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene, Berlin 2004

Steinmann J, Grotheer D, **Händschke S**, Becker B: Überprüfung der Virus-Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsmitteln in vitro und in in vivo.

29. Jahrestagung der ÖGHMP, Bad Ischl 2004

III Formalien

Erklärung gemäß §6 Abs. 5 der Promotionsordnung

Ich erkläre, dass ich

1. die Arbeit ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe,
2. keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und
3. die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Bremen, den 24. August 2009

Sonja Händschke