

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Immunologie
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig

„Sindbisvirus aktivierte ISRE-bindende Komplexe in L-929-Zellen“

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
Matthias Behr
aus Hofheim in UFr.

Würzburg, Juli 2002

Referent: Professor Dr. C. Jungwirth

Koreferent: Professor Dr. E. Serfling

Dekan: Professor Dr. Th. Berchem

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2002

Der Promovend ist Arzt.

Für meine Eltern

Gliederung für die Dissertation:

„Sindbisvirus aktivierte ISRE-bindende Komplexe
in L-929-Zellen“

I.	Einleitung	S.1
II.	Fragestellung	S.5
III.	Materialien und Methoden	S.7
	a Materialien	S.7
	b Methoden	S.13
IV.	Ergebnisse	S.21
	a Induktion von SABP1 und SABP2 durch Sindbisvirus in L-929 Zellen	S.21
	b Zeitliches Auftreten von SABP1	S.23
	c Induktion von SABP1 durch poly rI:rC (dsRNA)	S.24
	d Induktion von SABP1 durch Newcastle disease virus	S.26
	e Induktion von SABP1 durch IFN- α	S.28
	f SABP1 bindet spezifisch an ISG-15-, ISG-54-, PRDI-ISRE	S.28
	g Supershiftversuche	S.30
	h Induktion von SABP4 durch Sindbisvirus in L-929 Zellen bei hoher Multiplizität der Infektion	S.38
	i Induktion eines ISRE-bindenden Proteins in primären Mäusefibroblasten	S.40
V.	Diskussion	S.43
VI.	Zusammenfassung	S.51
VII.	Literaturverzeichnis	S.53

I. Einleitung

Über Jahrtausende entwickelte die Natur mehrere wirkungsvolle Wege die Zelle und somit den Organismus vor einer bakteriellen oder viralen Infektion zu schützen. Einen sehr potenten, weil sehr schnellen Weg, stellt das Interferonsystem dar.

Bei dem Versuch hitzeinaktiviertes Influenza Virus in Hühner-Chorioallantoismembranen zu inkubieren, entdeckten Isaacs und Lindemann Ende der 50'er Jahre einen Stoff, der von den Zellen in das Medium sezerniert wird und die Fähigkeit besitzt anderen Membrankulturen gegenüber einer Infektion mit dem Influenza-Virus Resistenz zu verleihen. Sie nannten diesen Stoff Interferon (IFN) (Isaacs und Lindeman, 1957).

Heute wissen wir, daß es sich damals lediglich um ein Protein aus der großen Klasse der Interferone handelte (Isaacs und Lindeman, 1957). Interferone gehören zu den Cytokinen. Cytokine sind eine ubiquitär vorkommende Gruppe von Zell-Zell interkommunikations Signalen. Die IFNe besitzen neben ihrer antiviralen Wirkung auch immunmodulatorische und zellregulatorische Effekte wie z.B. Beeinflussung der Proliferation und Differenzierung (pleiotrope Wirkung) (Pestka et al., 1987).

Diese Interferone werden in zwei Hauptklassen unterteilt, Typ I IFNe die nach viraler Infektion oder Transfektion mit doppelsträngiger RNA (dsRNA) gebildet werden. Zu ihnen zählen IFN- α , synthetisiert in Leukocyten, und IFN- β , synthetisiert in Fibroblasten. Typ II IFN beinhaltet nur eine Klasse, das IFN- γ ; auch immuno-IFN genannt, das von aktivierten Lymphocyten oder NK- Zellen nach Kontakt mit spezifischen Antigenen oder Mitogenen produziert wird.

Die Einteilung der Interferone geschieht nicht nur nach den Zellen in denen sie synthetisiert werden, sondern auch nach ihrer genetischen Definition und nach ihrer Struktur. IFN- α und IFN- β , jedoch nicht IFN- γ , sind außerordentlich resistent gegenüber einem niedrigen pH-Wert (pH 2-4) (Stewart et al., 1974). Alle drei Interferone stammen von einem intrazellulären Protein mit 166 AS ab, jedoch die Länge des letztendlich funktionellen Proteins variiert um einige AS. IFN- α 143 AS; IFN- β 145 AS, IFN- γ 146 AS (Sehgal, 1982). Die Zahl der Gene ist für die einzelnen IFN-Klassen unterschiedlich. So gibt es für IFN- β und IFN- γ nur ein Gen, für IFN- α aber 15 verschiedene Gene und 9 Pseudogene, die alle auf Chromosom 9 zu finden sind

(Weissmann und Weber, 1986). Das IFN- β Gen findet sich ebenso auf Chromosom 9 und stimmt mit dem α -Gen zu 30% in der Nucleinsäuresequenz überein (Henco et al., 1985). Dahingegen befindet sich das IFN- γ Gen auf Chromosom 12 und zeigt kaum Homologien zu den α -Genen (De Grado et al., 1982). Allen Interferongenen sind jedoch gemeinsam die flankierenden Regionen, die die Transkription und somit die Genexpression positiv wie negativ steuern können (Ryals et al., 1985).

Ein Nucleotidabschnitt im Promotor der IFN-Gene ist ein Enhancerelement das interferon gene regulatory element, IRE, genannt wird (Fujita et al., 1985). Diese Sequenz besteht aus drei funktionellen Untereinheiten: eine „negativ regulatory domain“ (NRD I), und zwei „positiv regulatory domains“ (PRD I; PRD II).

Im normalen Zellzyklus bindet ein labiles Repressor-Protein an NRD I und verhindert so die Bindung der positiven Transkriptionsfaktoren PRD I-BF und PRD II-BF (Keller und Maniatis, 1988). Wird jedoch die zelluläre Proteinsynthese gehemmt, entweder direkt über Virusinfektion (Issacs und Lindeman, 1957), dsRNA (Field et al., 1970) oder indirekt durch den cytopathischen Effekt von verschiedenen bakteriellen Endotoxinen (Merigan, 1973), wird auch die Synthese des Repressor-Proteins unterdrückt und PRD I-BF, PRD II-BF können nach Phosphorylierung an die Enhancer der Interferongene binden und somit die Genexpression erheblich steigern, bzw. induzieren.

Interferon wird nach Transkription und Translation sezerniert und vermittelt seine Wirkung sowohl parakrin als auch autokrin über die Bindung an einen speziellen Rezeptor (Friedman, 1979). Diese Interferon-Rezeptor-Bindung stellt sich als essentiell für alle pleiotropen Wirkungen heraus. Denn es konnte gezeigt werden, daß IFN nur als Rezeptor-Ligand-Komplex wirksam ist (Vengris et al, 1975).

Zwei unterschiedliche Rezeptoren sind nachgewiesen. Einer für Typ I IFN und einer für Typ II IFN. Bei beiden handelt es sich um Glycoproteine (Typ I IFN Rez. wird kodiert auf Chromosom 21; Typ II IFN Rez. wird kodiert auf Chromosom 6;) (Rashidbaigi et al., 1986).

Der Signaltransductionsweg des IFN beginnt mit der Aktivierung der Januskinasen (JAK), die ihrerseits über Tyrosin-Phosphorylierung die „Interferon-regulierenden-Faktoren“ (IRF) aktivieren (Schindler et al., 1992; Stark und Kerr, 1992). Interferon regulatorische Faktoren kommen zum Teil konstitutiv in der Eukariontenzelle vor z.B. IRF 3 (Au et al., 1995). Andererseits gibt es aber auch IRFs, die erst nach Kontakt der

Zelle mit einem Induktor, d.h. IFN, Virus oder dsRNA, in der Zelle nachweisbar sind z.B. ISGF3 (Levy et al., 1989; Fu et al., 1990), VIBP (Bovolenta et al., 1995), DRAF1 (Daly und Reich, 1993).

Die Charakterisierung von DRAF1 zeigte, daß dieser IRF aus mehreren Untereinheiten, nämlich IRF3, CBP und p300 besteht (Weaver et al., 1997).

Der „IFN stimulated gene factor-3“ (ISGF3-Komplex) wurde gereinigt, kloniert und sequenziert von Levy und Darnell (Levy et al., 1989). Sowohl durch IFN-Vorbehandlung, als auch durch Virusinfektion, die somit zu parakriner IFN Ausschüttung der Zelle führt, werden über die JAK-STAT Kette, die im Cytoplasma latent vorhandenen ISGF3 α -Untereinheiten, „signal and activators of transcription 1“ (STAT1) (p91, p84) und STAT2 (p113) (Fu et al., 1990; Schindler et al., 1992) phosphoryliert. Diese verbinden sich darauf mit der DNA-bindenden Untereinheit ISGF3 γ (p48) und wandern in den Kern (Veals et al., 1992). Durch Bindung an eine Konsensussequenz (IFN stimulated regulatory element, ISRE) im Promotor eines IFN sensitivem Genes (ISG) wird die Transkriptionsrate dieses Genes erheblich erhöht. Von diesen ISGs sind mittlerweile mehr als 300 nachgewiesen worden (Levy et al., 1989; Pelligrini und Schindler, 1993; Darnell et al., 1994; Johnson et al., 1994).

Die Translationsprodukte solcher ISG's werden als IFN regulierte Proteine (IRP) bezeichnet. Es handelt sich dabei um unterschiedliche zelluläre Proteine mit den verschiedensten biologischen Wirkungen (Staehele, 1990).

Der antivirale Zustand der Zelle wird induziert durch IFN und durch die funktionellen Eigenschaften einzelner IRPs vermittelt. Dies zeigt sich auch deutlich daran, daß die Virus Vermehrung in IFN vorbehandelten Zellen unterdrückt ist, während sie in Zellen vorbehandelt mit IFN und Actinomycin D, ein Hemmstoff der Transkription, normal vonstatten geht (Joklik, 1990).

Zwei der best untersuchtesten IRPs sind die 2',5' Oligoadenylat-Synthetase (OASE) und die Proteinkinase K (PKR). Die Wirkung der OASE besteht in einer Spaltung von viraler und zellulärer RNA (Samuel, 1991), die Wirkung der PKR führt zu einem Sistieren der Proteinsynthese. Somit führen diese beiden Enzyme zu einer Unterbrechung des viralen Replikationszyklus und verhindern so auf der einen Seite die lytische Wirkung des Virus als auch auf der anderen Seite die Infektion weiterer Zellen.

Diese Vorstellung, Interferon sei eine der ersten Verteidigungslinien der Zelle gegenüber einer Virusinfektion, wird auch gestützt von Experimenten die zeigen, daß virale Krankheiten bei Tieren die mit IFN-Antikörpern behandelt wurden, wesentlich drastischer als bei nicht IFN-Antikörper vorbehandelten Kontrolltieren verlaufen (Joklik, 1990).

Die neben den antiviralen Eigenschaften noch zahlreichen Immun- und zellmodulatorischen Wirkungen des IFN macht sich die moderne Medizin in der Therapie einiger Erkrankungen wie z.B.: chronische Hepatitis B und C (IFN- α), Karposi Sarkom und Haarzell-Leukämie (IFN- α), schubweise wiederkehrende Form der Multiplen Sklerose (IFN- β), septische Granulomatose (IFN- γ), zunutze (Johnson et al, 1994).

II. Fragestellung

Forschungsarbeiten mit unterschiedlichen Induktoren und Zelllinien können Aussagen über zugehörige Signalproteine, IRF, treffen.

Bovolenta und Ozato beschrieben die Induktion eines Transkriptionsfaktors durch vesicular stomatitis virus (VSV) in murinen L-929 Zellen. Dieser intranukleär gefundene ISRE-bindende Faktor wurde „VSV-induced binding protein“ (VIBP) genannt. Weitere Studien zeigten, daß es auch durch dsRNA induzierbar ist und in der Gelretentionsanalyse schneller als ISGF3 wandert (Bovolenta et al., 1995). Yoneyama und Fujita verwendeten zwar auch L-929 Zellen, nutzten als Virusmodell nun aber das Newcastle disease virus (NDV). Der von ihnen entdeckte IRF wurde als „virus-activated binding protein“ (VA-IRF) bezeichnet. In der Gelretentionsanalyse zeigt er im Vergleich zu ISGF3 ein langsames Laufverhalten (Yoneyama et al., 1997).

Mittels des Adenovirus Typ 5 konnten Daly und Reich in humanen Zellen, wie HeLa S3-Zellen und HEC-1B-Zellen, zwei DNA bindende Faktoren in den Kernextrakten identifizieren. Da diese auch durch dsRNA induzierbar sind, wurden sie als DRAF1 (double stranded RNA-activated factor 1), der in der Gelretentionsanalyse langsamer als ISGF3 läuft, und DRAF2, der schneller als ISGF3 läuft, bezeichnet (Daly und Reich, 1993).

Die Untersuchung weiterer Virus- und Zellmodelle kann in den Bemühungen um ein besseres Verständnis der Wirkungsweise des Interferonsystems sicherlich nur von Vorteil sein und hoffentlich auch Antworten auf solch offensichtliche Fragen geben wie z.B. nach der Virusspezifität dieses Anteils der Immunantwort.

Deshalb soll in dieser Arbeit die Frage beleuchtet werden, welche IRF durch Alphaviren induziert werden können und an welche ISRE diese binden. Als Vertreter der Alphaviren wurde das Sindbisvirus ausgewählt (Peters und Dalrymple, 1990). SIN besitzt eine einsträngige plus RNA (Schlesinger und Schlesinger, 1990).

Als Zellsystem dient hauptsächlich die L-929 Zelle. Auch sollen die Effekte in primären Mäuseembryofibroblasten betrachtet werden. Weiterhin ist ein Ziel die gefundenen IRF bezüglich Bindungseigenschaften und Untereinheiten zu charakterisieren und in Verbindung mit den bisherigen Forschungsergebnissen zu diskutieren.

III. Materialien und Methoden

a Materialien

Zellen und Zellkultur

MEM: 0,6 mM Arginin, 0,1 mM Cystin, 2,0 mM Histidin,
0,4 mM Isoleucin, 0,4 mM Leucin, 0,4 mM Lysin,
0,1 mM Methionin, 0,2 mM Phenylalanin,
0,4 mM Threonin, 0,05 mM Tryptophan,
0,2 mM Tyrosin, 0,4 mM Valin, 5,5 mM Glukose,
116 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂
1,0 mM MgCl₂ * 2 H₂O, 23,8 mM NaHCO₈
1 mg/l Cholin, 1 mg/l Folsäure
2 mg/l Inositol, 1 mg/l Nicotinamin
1 mg/l Pantothensäure, 1 mg/l Pyridoxal,
0,1 mg/l Riboflavin, 1mg/ Thiamin

komplettiert wird dieses Medium mit 5%igem fötalem Kälber Serum (FKS); als Prophylaxe gegen bakterielle Kontaminationen werden außerdem $2 \cdot 10^5$ U Penicillin und Streptomycin zugegeben. Der pH-Wert wird mit NaHCO₃, und Phenolrot als Indikator auf 7,2-7,4 eingestellt. (Eagle, 1959)

Trypsin: 0,5%ig

PBS: 8,0g NaCl
0,2g KCl
1,44g Na₂HPO₄
0,24g KH₂PO₄
für einen Liter PBS

FKS: fötales Kälber Serum

Zellen: L-929 Zellen

Viren

Sindbisvirus (heat-resistant), Dr. Gert Wengler, Institut für Virulogie,
Universität Heidelberg;

Newcastle disease virus (La Sota), Dr. Wolfgang Garten, Institut für Virulogie,
Universität Marburg;

Plaquetest

PBS

2% low melting Sea-Plaque Agarose

Neutralrotlsg 0,1g/60ml H₂O, steril filtriert

MEM mit 10% FKS

doppeltkonz. MEM mit 20% FKS

Transfektion

Transfektionskit der Fa. Promega: Profection Mammalian Transfection Systems,
Prod. Nr. E1200, Promega GmbH, Mannheim

DEAE-Dextran

10X PBS

IFN-Behandlung

Typ I-Interferon, Maus, rekombinant, Calbiochem

Kernextrakte für Bandshift-Assay

Puffer A: (für 10ml) 100µl 1M HEPES, 100µl 1M KCl, 2µl 0,5M EDTA,
10µl 100mM EGTA, 10µl 1M DTT, 50µl 0,1M PMSF, ad 10ml Aqua
dest. (Schreiber et al., 1989)

Puffer C: (für 10ml) 200µl 1M HEPES, 800µl 5M NaCl, 20µl 0,5M EDTA, 100µl 100mM EGTA, 10µl 1M DTT, 100µl 0,1M PMSF, ad 10ml mit Aqua dest. (Schreiber et al.,1989)

PBS: (für 1l) 8,0g NaCl, 0,2g KCl ,1,44g Na_2HPO_4 , 0,24g KH_2PO_4 ;
PBS(- Ca^{++} , - Mg^+)

10% Nonidetlsg: Nonidet P-40 (Nonylphenylpolyaethylenglykol), Fluka Chemie AG, Bucka, Schweiz.

Proteinbestimmung

Puffer C: s.o.

Aqua dest.

Roti-Quant: Carl Roth GmbH Karlsruhe

DNA-Oligonucleotid-Herstellung

Oligos:

A ISG 15-ISRE	+	ISG 15-ISRE	Reg.Nr.6077D+6076D
A GBP-ISRE	+	GBP-ISRE	6079D+6078D
A ISG 54-ISRE	+	ISG 54-ISRE	6071D+6070D
A PRDI	+	PRDI	6072D+6073D
A ICSBP	+	ICSBP	6074D+6075D

Alle hergestellt und vertrieben von Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe

Annealing-Puffer für DNA-Oligonucleotide:

4µl 5M NaCl

20µl 1M MgCl_2

20µl 1M TrisHCl ph=7,5

Konzentrierung:

18µl 3M Na-Acetat

500µl 100% Ethanol

70% Ethanol

5µl TE pH=8,0

TE (Tris-EDTA) pH=8,0: 10mM Tris CL pH=8,0

1mM EDTA pH=8,0

radioaktive Markierung der DNA-Oligonucleotide

2,7µl Oligo

1µl T₄ PNK Puffer MBI Fermentas3,8µl DEPC-H₂O2µl γ-ATP^{32P} Amersham Pharmacia
Biotech U.K.Limited0,5µl T₄ PNK MBI Fermentas10mM NaHPO₄

NaAC pH6

Glycogen(hergestellt aus Muscheln)

Fa.Merck,Darmstadt

100% Ethanol

TE

DEPC-H₂O: 100ml Aqua steril + 100µl DEPC**Gelretentionsanalyse (elektrophoresis mobility shift assay (EMSA))**Gele: 5%iges Polyacrylamid Gel (ca.60 ml)

10ml Acryl Rotiphoresegel 30% Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3ml 5 X TBE

47ml H₂O

450µl APS 10% Fa. Serva Feinbiochemika, Heidelberg

45µl TEMED (Tetramethylendiamin)Fa. Merck Kg, Darmstadt

5 X TBE (1l): 54g Trisbase
27,5g Borsäure
20ml 0,5 M EDTA pH8,0
auf 1l mit Aqua dest. auffüllen

Bindungspuffer:

3 X Chiarapuffer: 60mM Hepes
150mM KCl
1,5mM DTT
0,3mM EDTA
30 % Glycerin
H₂O

3 X Bindungspuffer: 60mM Hepes
3mM DTT
3mM EDTA
150mM KCl
12 % Ficoll

Laufpuffer: 0,25 X TBE

Probenansatz: 5µl Chiara oder 3 X Bindungspuffer
2,5µl Poly dI:dC
xµl radioaktiver Proteinextrakt
xµl DEPC-H₂O
8,5µl

6 X Gelladepuffer (1ml):

250µl 1 % Bromphenolblau
250µl 1 % Xylenecyanol
300µl Glycerin
200µl DEPC

Gel-Fixierer (11):

850ml Aqua dest.

100ml Essigsäure

50 ml Methanol

Trockenpapier

Gel-Blotting-Paper, Schleicher & Schuell, Dassel;

Röntgenfilm

Fuji RX 100 NIF, Fuji Photo Film (Europe) GmbH, Düsseldorf;

Scanner

Mustek 600 II N

SupershiftversucheAntikörper:

IRF-2(C19),rabbit polyklonal IgG, 200µg/ml,	Santa Cruz Bio.
CBP(A-22)X,rabbit polyklonal IgG, 200µg/0,1ml,	Santa Cruz Bio.
ISGF3γ p48(C-20)X,rab. poly. IgG, 200µg/0,1ml,	Santa Cruz Bio.
STAT1 p84/p91(E-23),rab. poly, IgG 200µg/ml	Santa Cruz Bio.
STAT1α(C-39),rab.poly. IgG, dilution1:75,	Hr. Th. Decker, Inst.f.Mikrobiologie & Genetik Uni. Wien
IRF-3 anti mouse rabbit serum	Takashi Fujita

Competitor-Versuche

ISRE-DNA-Oligonucleotide s.o.

b Methoden

Zellen und Zellkultur

Die Kultivierung der L-929 Zellen erfolgte als Oberflächenkultur in Roux-Flaschen aus Glas und für Zellkulturen geeigneten Kunststoff Roux-Flaschen bzw. Petrischalen bei 37°C. Hierfür wurde als Medium MEM mit dem Zusatz von 50ml FKS/1 MEM verwendet. Die für das Umsetzen erforderliche Ablösung der Zellen vom Petrischalenboden erfolgte mit 0,5% Trypsin, Einwirkzeit 3min bei 37°C.

Zellkultur primärer Mäuseembryofibroblasten

Für die Herstellung primärer Fibroblasten aus Mäuseembryonen wurden Mäuse der Stämme C57/black und Balb C verwendet. Nach Entnahme der Embryonen wurden diese in eiskaltem PBS präpariert. Extremitäten und innere Organe wurden entfernt, das verbleibende Gewebe in eine 50ml-Spritze gefüllt und in einen Rundkolben mit Rührfisch gepresst.

Zum homogenisierten Gewebe wurden 150ml PBS gegeben, das Gewebe aufgeschüttelt und 10min zum Absitzen stehen gelassen. Das überstehende PBS wird abgeschüttet und dieser Vorgang zweimal wiederholt.

Pro Embryo wurden 5ml 37°C warme Trypsinlösung zugegeben und 30min bei 37 °C gerührt. Unter Zugabe von 20ml Kulturmedium wurde die Zellsuspension durch Gazefilter filtriert und bei 4°C 15min mit 1200 rpm zentrifugiert.

Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit 10ml Medium suspendiert, auf 25ml aufgefüllt und durch einen zweiten Gazefilter filtriert.

Nach Anlegen einer 1:100 Verdünnung wurden die Zellen in der Fuchs-Rosenthal Zählkammer ausgezählt und entsprechend ausgesät.

Viren

Die Aufbewahrung der Viren erfolgte in Stocklösungen die bei -80°C tiefgefroren wurden.

Verwendete Stämme: Sindbisvirus (HR)

Newcastle disease virus (La Sota)

Die Konzentration unserer SIN-Stocklsg. betrug $4 \cdot 10^9$ SIN/ml

Berechnung der Multiplizität der Infektion (= multiplicity of infektion (m.o.i.)):

$$\text{Multiplizität der Infektion} = \frac{\text{Virustiter} * V(\text{Viruslsg.})}{\text{Zellzahl(L-929 Zellen)}}$$

$$\text{z.B.: } \frac{4 \cdot 10^9 / \text{ml} * 50 \mu\text{l}}{6,6 * 10^6} = 30 \text{ PFU/ Zelle}$$

PFU= plaque forming units (dt. plaquebildende Einheiten)

Bestimmung des Virustiters durch den Plaquetest

Der erste Schritt ist die Anfertigung einer Verdünnungsreihe der Viruslösung in Zehnerschritten in PBS. Anschließend wurde das Medium von den vorbereiteten Ø 3cm Petrischalen, konfluent bewachsen mit Hühnerembryofibroblasten; mit Hilfe einer Pipette entfernt. Es folgte ein Waschschriff mit PBS, 37°C, welches dann wieder von den Zellen entfernt wurde. Danach wurden 50µl Virusverdünnung in der Mitte der Schale aufgetragen und die Petrischalen für 1h, 37°C, im Brutschrank inkubiert.

Währendessen wurde niedrig schmelzende, 2% Sea-Plaque-Agarose mit doppeltkonzentriertem MEM, +20% FKS, 1:1 versetzt. Diese Mischung wurde bei 39-40°C im Wasserbad gehalten. Nach Ablauf der Stunde Virusadsorption lies man je 2ml des Agarose-Mediumgemisches vom Rand her in die Platten fliesen. Nun wurden die Platten bei Raumtemperatur verfestigt und dann wiederum in den Brutschrank, 37°C, für 24h gestellt.

Am nächsten Tag bereitete man den Farbagar. Dazu wurde 0,1g Neutralrot in 60ml H₂O gelöst und steril filtriert. Nun mischte man 2ml Neutralrotlsg. auf 30ml Agarose-Mediumgemisch, s.o.. Hiervon wurde 1ml auf die Platten gegeben und bei

Raumtemperatur verfestigt. Erneut folgte eine Inkubation von 24h im Brutschrank, 37°C. Dann konnten die Plaques der einzelnen Verdünnungsschritte ausgezählt werden.

Berechnung des Virustiters: $\text{Plaquezahl} * 20 * \text{Vedünnung} = \text{PFU/ml}$

Zellaussaat

Nach der Zellernte, s.o., wurde die Konzentration der Zellsuspension mit Hilfe der Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Aussaat für einen SIN-beimpfungs Versuch nach einer weiteren Generationszeit von 24h betrug, berechnet für eine Ø 10cm Petrischale, $4-5 * 10^6$ Zellen. Anschließend erfolgte die Zugabe von ca. 12ml Medium.

Virusinfektion

Der erste Schritt für die Infektion ist das Abpipettieren des Mediums von der Petrischale mit den L-929 Zellen. Hieran schloß sich ein Waschvorgang mit PBS, 37°C, an. Die Zellzahl pro konfluenter Ø10cm Petrischale mit L-929 Zellen betrug im Durchschnitt $6 * 10^6$ Zellen.

Eine Adsorbtiions Lsg., 1ml PBS/ Petrischale + berechnete Virusmenge, abhängig von der gewünschten Multiplizität der Infektion, wurde als nächstes gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt. Diese Petrischale wurde nun für 1h in einen Brutschrank, 37°C, gestellt. Anschließend wurde wiederum das PBS abgezogen und die Zellen in der Petrischale mit MEM bedeckt. Diese Petrischalen standen dann bis zu dem Zeitpunkt der Ernte im Brutschrank, 37°C.

Transfektion mit doppelsträngiger RNA

Für die Transfektion wurden ebenfalls L-929 Kulturen in Ø10cm Petrischalen verwendet (Zellzahl ca. $6 \cdot 10^6$).

Nach dem Abpipettieren des Mediums waren die ersten Arbeitsschritte das zweimalige Waschen der Zellen mit je 10ml PBS/Petris., 37°C. Dann wurde die dsRNA in 1X PBS auf ein Volumen von 540µl/Ø10cm Petris. verdünnt und zusätzlich mit 28µl DEAE-Dextran (10mg/ml), 37°C, vermengt. Die dsRNA/DEAE-Dextran-Mischung verteilte man gleichmäßig auf einer Ø10cm Petris., um diese dann für 30min bei 37°C zu inkubieren. Darauf folgte die Zugabe von 6ml MEM und eine weitere Inkubation für bis zu 2.5h oder bis zu dem Zeitpunkt, ab dem ein deutlicher cytopathologischer Effekt (CPE) sichtbar war. Dann ersetzte man die Transfektionslösung komplett durch 12 ml MEM und inkubierte die Zellen wiederum bei 37°C bis zum Erntezeitpunkt. Dieser lag bei 18h nach Infektion.

Gewinnung der Kernextrakte

Die Ernte wurde mit dem Abpipettieren des Mediums begonnen. Anschließend wurde der Zellrasen mit 10ml PBS-Ca⁺⁺-Mg⁺ gewaschen. Wiederrum wurden 5ml PBS aufgetragen und die Zellen nun mit einem Gummischaber vom Boden abgelöst. Nach Abziehen dieses Gemisches erfolgte abermals eine Spülung mit 5 ml PBS. Diese 10ml Zelllösung wurden anschließend für 5min, 15000 rpm bei 4°C in einem Spitzröhrchen zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes und erneuter Resuspension mit 5ml PBS schloss sich eine zweite Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen an. Nach Trockenlegung des Pellet wurde dieses mit 1400µl Puffer A gelöst und für 15min auf Eis gestellt. An die Zugabe von 100µl 10%ige Nonidetlsg. schloss sich 10 sekündiges Vortexen und eine Zentrifugation von 30s, 12000 rpm bei 4°C an. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet wiederum in 80µl Puffer C gelöst. Dieser Lösung wurde nun für 15min bei 4°C auf den Schütteltisch gegeben. Nach der letzten Zentrifugation, 5min, 14000 rpm, 4°C, wurde der Überstand, der den Kernextrakt darstellt, aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren.

Proteinbestimmung nach Bradford

Hierfür wurden 2µ der Kernextrakte zu 800µl Aqua dest. in eine Mikroküvette gegeben. Dazu wurde als Indikator Roti-Quant beigegeben. Durch mehrmaliges Invertieren mit der Pipette wurde gemischt. Für die Null-Wert- Probe wurde anstelle des Proteins 2µl Puffer C beigemischt. Nach einer Wartezeit von ca 20min bei Raumtemperatur (RT), wurde nun die optische Dichte bei 595nm gemessen. Anhand dieser Ergebnisse und einer Eichkurve konnte dann der Proteingehalt berechnet werden.

Radioaktive Markierung der DNA

ISG15- bzw. PRDI-Oligonucleotide wurden mit ^{32}P -gamma-ATP wie folgt markiert:

2,7µl Oligonucleotide, 1µl T4 PNK Puffer A, 4,8µl DEPC-H₂O und 1µl ^{32}P -gamma-ATP wurden zusammenpipettiert und bei 70°C 5min erhitzt.

Dann folgt 3min Abkühlen bei 4°C. Nun wurden 0,5µl T4 PNK hinzugegeben und der Ansatz bei 37°C 1h lang inkubiert.

Währenddessen wurde die NAP-Säule mit Na₂HPO₄ gespült. Nach der 1h Inkubation wurde der Ansatz 5min bei 65°C erhitzt, somit die Markierung gestoppt, und 90µl 10mM Na₂HPO₄ hinzugegeben.

Der Ansatz wurde auf die NAP-Säule gegeben. Nun wurde mit 400µl Na₂HPO₄ achtmal eluiert und auf 4°C das jeweilige Eluat getrennt gesammelt. Pro Fraktion Eluat wurden 1µl entnommen, um deren Aktivität im Szintigraphen zu bestimmen.

Die einzelnen Fraktionen wurden mit 40 µl NaAC (pH 6), 1 µl Glycogen und 880µl 100% Ethanol bei 4°C gefällt.

Die Fraktionen blieben 15 min bei RT stehen und wurden schließlich 15 min bei 4°C mit 12000 rpm zentrifugiert. Nach Abpipettieren der Überstände wurden die Fraktionen mit 400µl 70% Ethanol gewaschen und nochmals bei 4°C 10min mit 12000 rpm zentrifugiert.

Nach dem Abnehmen der Überstände wurden die Fraktionen 5min bei 37°C getrocknet, mit 20µl 1xTE gelöst und 10min bei 4°C stehen gelassen.

Jeweils 0,5µl pro Fraktion wurden für die Aktivitätsbestimmung im Szintigraphen abgenommen und die radioaktiv markierten Proben bei -20°C aufbewahrt.

Gelretentionsanalyse (elektrophoresis mobility shift assay)

Erster Schritt für die Gelretentionsanalyse war die Bereitung eines sog. Mix, der pro Geltasche aus 5µl Bindungspuffer, 2,5µl poly dI:dC, ca.10000 counts per minute (cpm) radioaktiver Probe und 1µl DEPC-H₂O - V (radio. Probe) bestand. Endvolumen 8,5µl. Dieser wurde für 10min auf Eis gestellt.

Pro Geltasche stand ein maximales Ansatzvolumen von 15µl zu Verfügung. Nun wurde der Mix mit dem Protein, ca.10µg, vereinigt. Das Volumen dieses Gemisches wurde mit Puffer C auf 15µl ergänzt. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 30min bei 4°C wurden zu diesen Lösungen 3µl 6 X Gelladepuffer zugefügt. Nun erfolgte die Auftragung auf ein 5 % Polyacrylamid-Gel. Als Laufpuffer fand 0,25 X TBE Verwendung. Die Auftrennung erfolgte mit 200V über einen Zeitraum von ca. 3h.

Gelfixation

Nach Ablauf der 3h Laufzeit wurden die Glasplatten, zwischen denen sich das Elektrophoresegel befindet, aus der Elektrophoreseapparatur genommen. Nach Abnehmen der oberen Glasplatte wurde das Gel für ca. 10min mit dem Gel-Fixierer überdeckt.

Danach erfolgte die Überführung auf Whatman-Papier und die Vakuum-Trocknung bei 80°C für ca.2h.

Filmbelichtung

Die Filmbelichtung der Fuji RX Röntgenfilme erfolgte bei -80°C für 2-20d, je nach Intensität der radioaktiven Strahlung.

Scannen der Filme

Das Scannen der Filme erfolgte mit einem Gerät der Marke: Mustek 600 II N. Die graphische Bearbeitung der Scans wurde mit Microsoft Paint Shop Pro durchgeführt.

Supershift-Assay

Der Unterschied in der Durchführung eines Supershift-Assays zur Gelretentionsanalyse bestand darin, daß der Kernextrakt, bevor er mit dem radioaktiven Mix vereinigt wurde, 1h bei 4°C mit einem Antikörper der Wahl inkubiert wurde. Das Volumen des Antikörpers betrug 0,5µl, die Masse ca.10µg.

Competitor-Versuche

Weitgehend entspricht der Ablauf eines Competitorversuchs dem Ablauf der Gelretentionsanalyse. Im Unterschied dazu wurde jedoch der Kernextrakt bevor er mit dem radioaktiven Mix vereinigt wurde für 20min bei 4°C mit jeweils einem anderen ISRE, welches nicht radioaktiv markiert war, inkubiert. Dieses wirkte als Competitor mit dem radioaktiven ISRE, da beide mit den IRF aus den Kernextrakten Bindungen eingehen können. Außerdem wurde der Competitor in ca. 30fachen Überschuß, verglichen mit der radioaktiven Probe, zugesetzt.

Verschmelzung der kommerziellen Sense und Antisense ISRE

Als Endkonzentration wurde 359pm dsISRE/ 200µl angestrebt.

So mußte, sowohl für Sense und Antisense, die benötigte Menge laut den Konzentrationsangaben des Herstellers berechnet werden. Sense und Antisense wurden vereinigt und mit dem Annealing Puffer versetzt. Dieser Ansatz wurde mit DEPC-H₂O

auf 180µl aufgefüllt. Nach dem Erhitzen auf 75°C für 10min wurde für ca. 3h auf Raumtemperatur abgekühlt. Um eine Konzentrierung zu erreichen wurden die Oligos nun mit dem NaAc und dem 100% Ethanol versetzt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10min, mit 14000rpm. Das Pellet wurde mit ca. 400µl 70% Ethanol gewaschen und nochmals für 10min mit 14000rpm zentrifugiert. Nach Trocknung schloß sich das Lösen des Pellets in 5µl TE an. Somit erfolgte eine ca. 30-35fache Konzentrierung gegenüber den unkonzentrierten ISG-15 Oligonukleotiden. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

IV. Ergebnisse

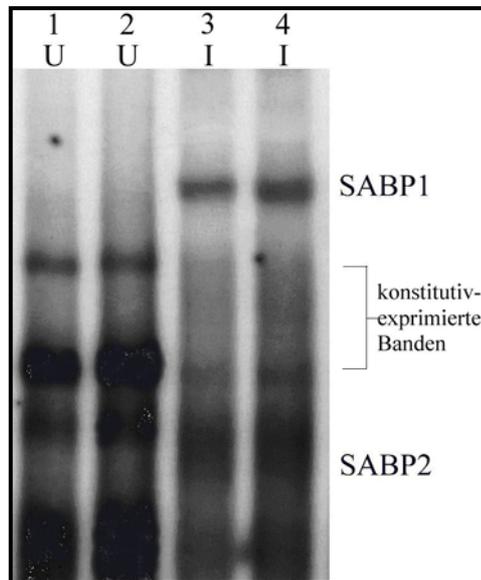
IV.a Induktion von SABP1 und SABP2 durch Sindbisvirus in L-929 Zellen

Um die Frage zu klären, ob Alphaviren imstande sind IRF, und wenn ja welche, in murinen L-929 Zellen zu induzieren, wurden diese Zellen mit Sindbisvirus (SIN) infiziert. 18 h Stunden nach Infektion von L-929 Zellen mit SIN bei 30 PFU/Zelle wurden die Kernextrakte von sowohl uninfizierten als auch infizierten Zellen hergestellt. Diese wurden darauffolgend mit einer ³²-Phosphor radioaktiv markierten ISG 15 Probe in der Gelretentionsanalyse getestet. SIN dient in diesen Versuchen als Virusmodell für Alphaviren Peters und Dalrymple, 1990).

Die Auswertung des Gelelektrophoreseplans, nach der Auftrennung der Extrakte SIN-infizierter und uninfizierter Zellen, zeigt neben einer Anzahl konstitutiv exprimierter Banden im unteren Teil des Gels auch eine sehr deutliche, relativ langsam migrierende Bande im oberen Drittel des Gels, die nur in den Extrakten der virusinfizierten L-929 auftaucht. (Abb.1) Dieses Protein wurde als Sindbis activated binding protein1 (SABP1) bezeichnet.

Eine weitere schneller wandernde, SIN-induzierte Bande ist im unteren Anteil des Filmes zwischen den beiden konstitutiv exprimierten IRF2 Banden zu finden. Dieser IRF wurde als SABP2 bezeichnet. (Abb.1) Ebenso ist reproduzierbar zu beobachten, daß konstitutiv exprimierte Banden, die in den Extrakten uninfizierter Zellen nachweisbar sind, nach SIN-Infektion schwächer werden oder sogar ganz verschwinden. (Abb.1)

Abb1:



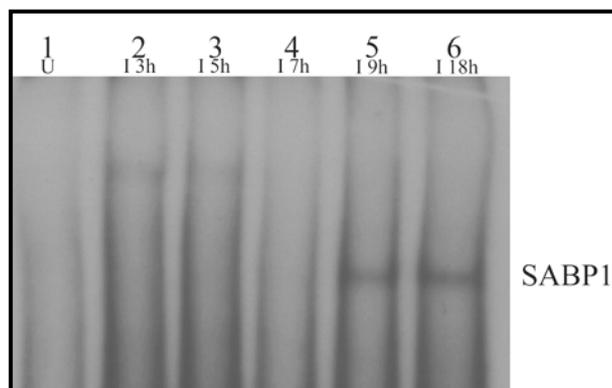
Aktivierung von ISRE-bindenden Faktoren in Kernextrakten von L-929 Zellen durch Sindbisvirus (HR). L-929 Zellen waren entweder uninfiziert (U), Spur 1 und 2, oder mit 60 PFU/Zelle Sindbisvirus infiziert (I), Spuren 3 und 4. Die Kernextrakte wurden nach 18h angefertigt und in der Gelretentionsanalyse getestet. Hierfür wurden 10 μ g Protein der Kernextrakte verwendet. Als ISRE diente eine radioaktiv markierte humane ISG-15 Probe. Die Spuren 3 und 4 zeigen deutliche Bindungsreaktionen von ISRE-bindenden Faktoren, SABP1 und SABP2. Diese sind nicht in den Extrakten der uninfizierten Zellen zu erkennen. In den Extrakten der uninfizierten L-929 Zellen, Spur 1 und 2, sind konstitutiv exprimierte Banden zu sehen. Diese sind nicht, oder sehr viel schwächer, in den Kernextrakten der SIN-infizierten Zellen, Spur 3 und 4, sichtbar.

IV.b Zeitliches Auftreten von SABP1

Um die Zeitspanne zu ermitteln welche nach der Virusinfektion benötigt wird, um SABP1 in der Zelle zu aktivieren, wurden wiederum L-929 Zellen mit SIN infiziert. Hierzu wurden von uninfizierten und SIN-infizierten Zellen die Extrakte zu unterschiedlichen Zeiten hergestellt, 1,3,5,7,9,12,15,18 Stunden nach der Infektion. Die gewonnenen Kernextrakte wurden jeweils in anschließend mit einer radioaktiven ISG 15 Probe inkubiert und im EMSA getestet.(Abb.2)

Hierbei konnte SABP1 frühestens 9h nach Infektion sicher nachgewiesen werden.

Abb. 2:



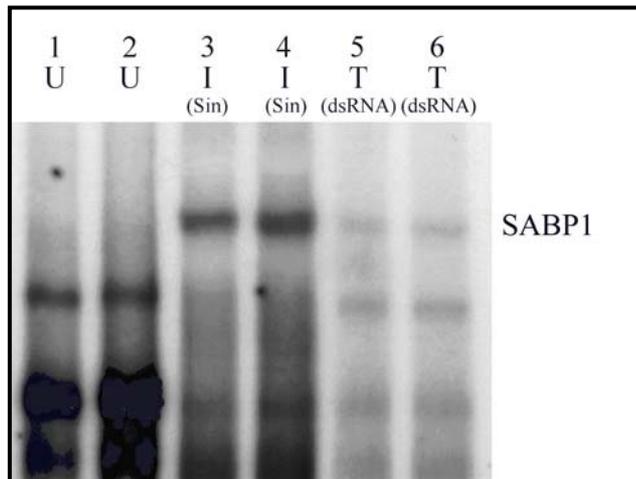
Nachweis von SABP1 durch die Gelretentionsanalyse frühestens nach 9h

Nach Infektion von L-929 Zellen mit 30 PFU/Zelle SIN wurden je $6 \cdot 10^6$ Zellen nach 3h, (Spur 2), 5h, (Spur 3), 7h, (Spur 4), 9h, (Spur 5), oder 18h, (Spur 6), geerntet und anschließend die Kernextrakte durch Gelretentionsanalyse getestet. Radioaktiv markierte ISG-15 Oligonukleotide dienten als ISRE. Die eingesetzte Proteinmenge betrug 10 μ g. Kernextrakte von uninfizierten L-929 Zellen finden sich auf Spur 1. Während in den Spuren 1, 2, 3 und 4 keine spezifischen ISRE-Bindungsreaktionen zu erkennen sind, zeigen die Spuren 5, 9h nach Infektion, und 6, 18h nach Infektion, das Auftreten von SABP1.

IV.c Induktion von SABP1 durch poly rI:rC (dsRNA)

Um zu überprüfen, ob die L-929 Zelle auch nach Behandlung mit anderen Induktoren als SIN SABP1 produziert, wurden auch Versuche mit dsRNA transfizierten L-929 Zellen durchgeführt. Die Mäusefibroblasten wurde mit poly rI:rC nach der Promega-Methode transfiziert (siehe Material und Methoden) und mit den Kontrollzellen nach 18h geerntet. Wieder diente die Gelretentionsanalyse als Untersuchungsmethode für die Extrakte. Es zeigte sich, daß auch in den dsRNA transfizierten L-929 Zellen ein ISRE-bindendes Protein auftaucht. Bei Vergleich mit SIN-induzierten ISRE-bindenden Proteinen zeigte dieses ein gleiches Laufverhalten wie SABP1. (Abb. 3) Somit ist es auch möglich durch die Transfektion mit dsRNA die L-929 Zelle anzuregen und ein Signalprotein zu synthetisieren. Dieses entspricht in seinem Untersuchungsverhalten in der Gelretentionsanalyse dem von uns beschriebenen SABP1.

Abb. 3:



Die Induktion von SABP1 durch dsRNA.

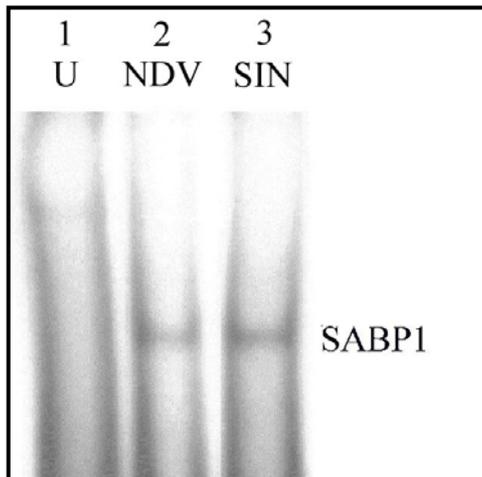
L929 Zellen wurden entweder scheininfiziert (U), Spuren 1 und 2, mit 30 PFU/Zelle SIN infiziert (I), Spuren 3 und 4, oder mit dsRNA transfiziert (T), Spuren 5 und 6. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 18h. Anschließend wurden die Kernextrakte in der Gelretentionsanalyse getestet, wobei radioaktiv markierte ISG-15 Oligonukleotide als ISRE dienten. Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurden 10µg Extrakt pro Tasche eingesetzt. In den Kernextrakten der transfizierten Zellen, Spuren 5 und 6, ist deutlich ein ISRE-bindendes Protein zu erkennen, welches nicht in den Extrakten der scheininfizierten Zellen, Spuren 1 und 2, zu finden ist. Auch ist zu sehen, daß der durch Transfektion mit dsRNA induzierte Faktor in seinem gelelektrophoretischen Laufverhalten SABP1 entspricht.

IV.d Induktion von SABP1 durch Newcastle disease virus

Da oben genannte Versuche zeigten, daß SABP1 nicht nur SIN- induziert ist, sondern auch durch nichtvirale Induktoren induziert werden kann, wurde nach weiteren Induktoren gesucht.

Versuche, die Newcastle Disease Virus (NDV) als möglichen Induktor benutzen, kamen so in Betracht. Das Versuchsprotokoll für den NDV-Versuch ist in Anlehnung an die SIN-Versuche entwickelt worden. L-929 Mäusefibroblasten wurden ebenfalls mit 30 PFU/Zelle des NDV-Virus infiziert. Die Kernextrakt-Bereitung erfolgte 18h Stunden nach der Infektion. Die Testung der Extrakte infizierter Zellen mit der Gelretentionsanalyse zeigte eine Bande und somit eine ISRE-bindendes Protein das mit SABP1 comigriert. (Abb. 4) In Annahme, daß diese beiden ISRE-bindenden Faktoren identisch sind, ist somit zu schlußfolgern, daß SABP1 neben SIN und dsRNA auch durch NDV induzierbar ist.

Abb. 4:



Die Induktion von SABP1 durch Newcastle disease virus.

Die Infektion der L-929 Zellen erfolgte mit 30 PFU/Zelle NDV. Nach 18h wurden die Kernextrakte zubereitet. Parallel wurden auch Kernextrakte von nicht infizierten (U), Spur 1, und mit 30 PFU/Zelle SIN-infizierten Zellen (SIN), Spur 3, hergestellt. Bei der anschließenden Gelretentionsanalyse mit radioaktiv markiertem ISG-15-ISRE ist in den NDV-infizierten Extrakten (NDV), Spur 2, ein deutlicher ISRE-bindender Komplex zu erkennen. Verglichen mit den anderen Spuren ist festzustellen, daß dieser Faktor nicht in uninfizierten Zellen zu finden ist, und in seinem Laufverhalten in der Gelelektrophorese mit dem von SABP1 übereinstimmt.

IV.e Induktion von SABP1 durch IFN- α

Bei der weiteren Testung auf SABP1-Induktoren kam auch IFN- α in Frage.

L-929 Kulturen wurden mit IFN-Typ I behandelt. Die Kernextrakte von IFN-behandelten, als auch unbehandelten Zellen, wurden mittels Gelretentionsanalyse untersucht. Hierbei zeigte sich, daß die L-929 Zellen, die mit IFN- α vorbehandelt waren, eine Bande auf der selben Höhe wie SABP1 in der Gelretentionsanalyse abbildeten. (Daten nicht gezeigt),(Behr et al., 2001). Es zeigt sich, das SABP1 auch IFN- α induzierbar ist.

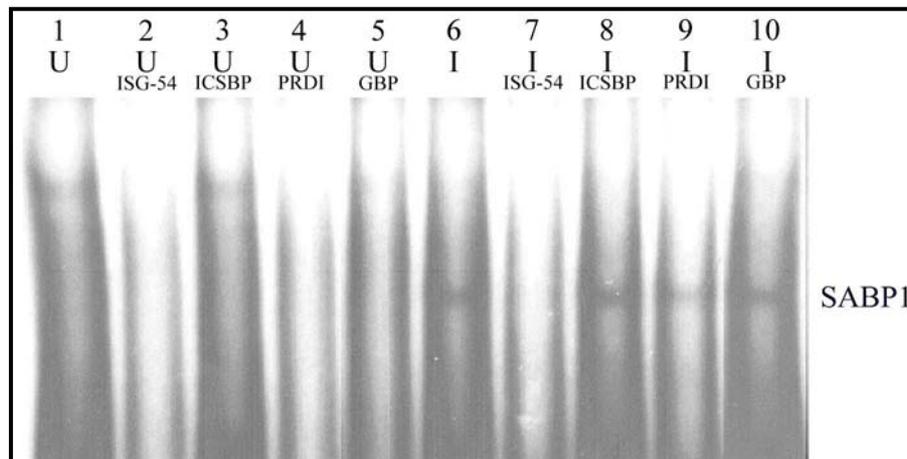
IV.f SABP1 bindet spezifisch an ISG-15-, ISG-54-, PRDI-ISRE

IRF sind Signalproteine, die an ISRE von ISG binden, und somit die Expression dieser Gene steigern. Bedingt durch die jeweils unterschiedliche DNA-Bindungsstelle der IRF besitzt jeder dieser Faktoren eine Bindungsspezifität.

Mittels sog. Competitor Versuche ist es möglich die Bindungsspezifität des zu untersuchenden ISRE-bindenden Proteins zu bestimmen. Hierbei werden Oligonukleotide verwendet, die verschiedene ISRE aus Promotorregionen von unterschiedlichen humanen IFN sensitiven Genen enthalten. Diese werden in ca. 30fachem Überschuß zu der radioaktiven ISG-15 Probe mit den gewonnenen Kernextrakten aus SIN-infizierten und uninfizierten L-929 Zellen inkubiert. Dieser Ansatz wurde in der Gelretentionsanalyse untersucht. Durch die Bindung an nichtradioaktive ISRE wird gegebenenfalls die ISRE-Bande in den Spuren mit Competitor im Vergleich zu der Spur ohne Competitor in ihrer Intensität abgeschwächt. Mehrere dieser Versuche zeigen ganz deutlich, daß SABP1 mit großer Affinität an ISG-15 ISRE bindet. Außerdem besteht auch eine Bindungsaffinität zu dem humanen ISRE vom ISG-54 und PRDI Typ.

Deutlich ist zu erkennen, daß keine Bindung an ICSBP ISRE und GBP ISRE erfolgt. (Abb. 5)

Abb. 5:



SABP1 bindet spezifisch nur an ISG-15, ISG-54, PRDI und nicht an ICSBP und GBP.

Die für den Competitorversuch benötigten Kernextrakte wurden aus uninfizierten L-929 Zellen (U), und mit 30 PFU/Zelle SIN-Virus beimpften L-929 Zellen (I) hergestellt. Auf Spur 1-5 wurden die Extrakte der uninfizierten Zellen aufgetragen. Diesen wurde je nach Versuchsansatz noch der entsprechende Competitor zugegeben. Spur 1, uninfiziert (U) ohne Competitor, Spur 2, U+ISG-54, Spur 3, U+ICSBP, Spur 4, U+PRDI, Spur 5, U+GBP. Die Extrakte der SIN-infizierten Zellen mit dem im 30fachen Überschuß zu ISG-15 zugegebenen Competitor wurden auf den Spuren 6-10 aufgetragen. Spur 6, infiziert (I) ohne Competitor, Spur 7, I+ISG-54, Spur 8, I+ICSBP, Spur 9, I+PRDI und Spur 10, I+GBP. Anschließend wurden alle Reaktionsansätze in der Gelretentionsanalyse getestet. Hierbei wurde wieder eine radioaktiv markierte ISG-15 Probe verwendet. Während in diesem Bildausschnitt keinerlei ISG-15-bindenden Faktoren in den Spuren 1-5 zu sehen sind, ist SABP1 in Spur 6 deutlich zu erkennen. Eine Abschwächung der SABP1-Bande ist nach Zugabe von ISG-54, Spur 7, und PRDI, Spur 9, zu beobachten. Bei ISG-54 verschwindet SABP1 vollständig und bei PRDI wird die SABP1 Bande stark abgeschwächt. Dies bedeutet, daß SABP1, außer an ISRE vom ISG-15-Typ, auch die Fähigkeit besitzt an ISG-54 ISRE und PRDI ISRE zu binden. Wurde ICSBP-ISRE oder GBP-ISRE als Competitor verwendet, so konnte keine Competitionsreaktion beobachtet werden und somit folgt, daß an diese ISRE keine Bindung von SABP1 erfolgt.

IV.g Supershiftversuche

Der cytopathische Effekt (CPE) des Sindbisvirus in L-929 Zellkulturen ist auch nach relativ langer Zeit nach der Infektion, 18 – 24h, nur bei vereinzelt Zellen zu erkennen. Daraus lässt sich auch schlußfolgern, daß in der infizierten Kultur noch Zellen vorhanden sind, die nicht vom Virus befallen sind. Da es sich bei den L-929 Zellen um eine Zelllinie handelt, die sowohl IFN produzieren kann als auch IFN-Rezeptoren auf der Oberfläche trägt, lag die Vermutung nahe, es könnte sich bei SABP1 um ein bereits bekanntes Mitglied der IRF-Familie handeln oder SABP1 könnte zumindest Bestandteile von bekannten IRF enthalten. Diese Frage sollte geprüft werden.

Deshalb bot sich eine Untersuchung der SIN-infizierten Kernextrakte mit Hilfe von Antikörpern, die sich gegen die bereits bekannten Bestandteile des IFN-Systems richten, an.

SABP1 Induktion erfolgte wiederum durch Infektion mit SIN. Die Kernextrakte wurden nach 18h bereit und anschließend für 1h bei 4° mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert um eine Antigen-Antikörperbindung zu ermöglichen. Dieser Ansatz wurde dann mit Hilfe von der Gelretentionsanalyse untersucht.

Die gewählten Antikörper (AK) waren spezifisch gegen Bestandteile von ISGF3 (Darnell & Stark, 1994), nämlich p48 und STAT1, und gegen Bestandteile von DRAF1 (Weaver & Reich, 1997), nämlich CBP, gerichtet. Auch IRF2-AK kamen zum Einsatz.

In den Supershiftanalysen konnte keine Reaktion der IRF2 Antikörper mit SABP1 beobachtet werden. Dies spricht dafür, daß der SABP1-Komplex keine Untereinheit besitzt, die IRF2 entspricht. (Abb. 6)

Auch die SABP1-Banden in Kernextrakten aus L-929 Zellen, induziert durch NDV, IFN- α oder dsRNA, zeigten keine Reaktion auf IRF2-Antiserum. (Daten nicht gezeigt)

In Supershiftversuchen mit SIN-infizierten L-929 Kernextrakten binden IRF2-AK an das konstitutiv exprimierte IRF2. Durch die Verschiebung der IRF2 Bande wird der SABP2 Komplex wesentlich deutlicher sichtbar. (s. Abb.6) Dieser wird in Gelretentionsanalysen ohne IRF2-AK durch die IRF2-Bande verdeckt. Da dieser SABP2-Komplex jedoch nicht durch eine Bindung des Antikörpers verschoben wird, wird deutlich gemacht, daß SABP2 keine Untereinheit besitzt die mit IRF2 identisch ist (s. Abb. 6).

Die Testung von Anti-CBP-AK zeigt keine Bindung an SABP1 in SIN-infizierten Mäusefibroblasten.(s. Abb.7) Bei der Untersuchung der SABP1-Komplexe, der mit entweder NDV, INF- α oder dsRNA vorbehandelten Zellen, konnte ebenso keine Untereinheit, die CBP entspricht, entdeckt werden. Daraus läßt sich ableiten, daß SABP nicht CBP beinhaltet und daher nicht DRAF1 entspricht. (s.Abb. 7)

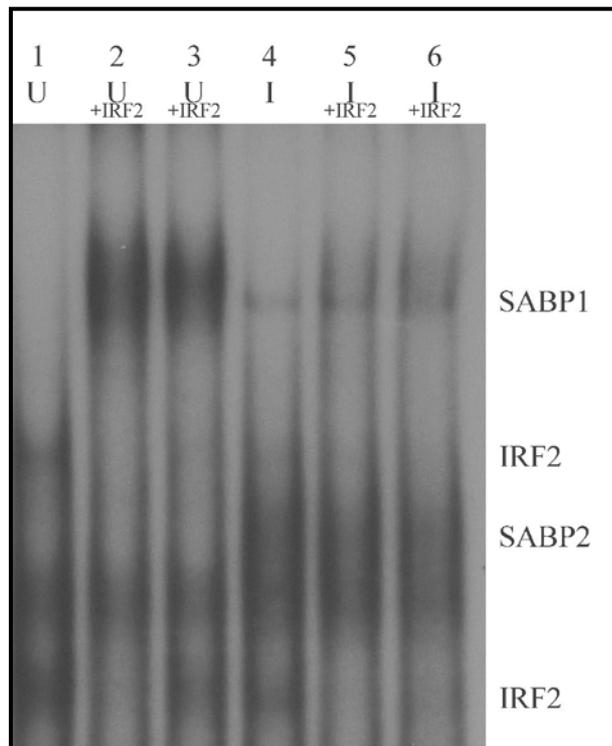
Zur weiteren Charakterisierung von SABP1 wurde dieses ISRE-bindendes Protein auch auf eine Reaktion mit AK die gegen die Untereinheiten von ISGF3 gerichtet sind untersucht. Als ersten zu testenden Bestandteil von ISGF3 wurde ISGF3- γ ausgewählt. So wurden die Kernextrakte aus SIN-infizierten Zellen mit anti murinen p-48 AK (Santa Cruz) inkubiert. (Daten nicht gezeigt) Es erfolgte keine Bindung dieser käuflichen AK an SABP1. Dies würde darauf hinweisen, daß SABP1 nicht Protein p-48 enthält und somit nicht ISGF3 entspricht.

Die Kernextrakte aus SIN-infizierten L-929 Zellen wurden auch mit käuflichen STAT1-AK (Santa Cruz) inkubiert. Da in der nachfolgenden Gelretentionsanalyse keinerlei Unterschied zwischen der kontroll SABP1 und der AK-behandelten SABP1-Bande zu erkennen war ist zu schlußfolgern, daß keine Bindung stattgefunden hat. (Abb. 8) Auch mit den Kernextrakten der IFN- α (s. Abb.9), NDV (Daten nicht gezeigt) oder dsRNA (Daten nicht gezeigt) behandelten Zellen die mit STAT1 AK inkubiert wurden, konnte keine solche Antigen-Antikörper-Reaktion beobachtet werden. Dies führt zu der Überzeugung, daß SABP1 nicht STAT1 enthält und folglich nicht identisch mit ISGF3 ist.

Weitere Antikörperversuche mit einem murinen STAT1-AK, freundlicherweise bereitgestellt von Herrn Decker, zeigten jedoch eine deutliche Bindungstendenz an das SIN-induzierte SABP1 in L-929. Die Auswertung dieses Experiments läßt nur den Schluß zu, daß SABP1 doch STAT1 als Untereinheit enthält und somit ISGF3 entspricht. (Abb. 10)

Dieses Versuchsergebnis erfordert eine eingehende Diskussion der vorhergehenden Supershiftversuche und der Tatsache das, begründet durch den Kontext, die Wahrscheinlichkeit, daß SABP1 mit ISGF3 identisch ist, sehr hoch ist.(s. Diskussion)

Abb. 6:



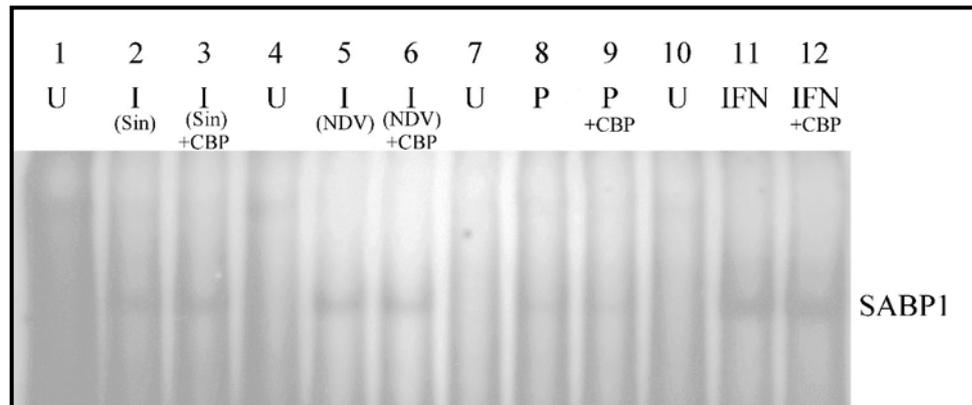
SABP1 enthält keine Untereinheit, die IRF2 entspricht.

L-929 Zellen wurden entweder scheininfiziert (U), Spur 1-3, oder mit 30 PFU/Zelle SIN infiziert (I), Spur 4-6. Die Kernextrakte wurden 18h nach der Infektion angefertigt. Pro Spur wurden 10 µg Extraktprotein verwendet. Diese wurden für 1h mit IRF2 Antiserum bei 4°C inkubiert. Die Menge betrug 0,2µg für Spur 2, 0,04µg für Spur3, 0,2µg für Spur5 und 0,04µg für Spur 6. Anschließend wurden alle Reaktionsansätze in der Gelretentionsanalyse getestet. Als ISRE wurde eine radioaktiv markierte ISG-15 Probe verwendet. Deutlich sichtbar ist, daß in den U-Spuren 1-3, uninfizierte Zellen, keine Bande im oberen Drittel des Filmes auftritt. In Spur 1 sind jedoch die zwei konstitutiv exprimierten IRF2 Banden, ober- und unterhalb von SABP2, gut nachweisbar. Diese werden nach Zugabe des IRF2-AK geschiftet und bilden sich als eine stark verwaschene Bande, kurz oberhalb von der SABP1-Position, s.Spur 4, in den Spuren 2 und 3, ab. In der I-Spur 4, infizierte Zellen, ist SABP1 gut sichtbar. Der Bereich in dem SABP2 in Spur 4 eingebettet liegt ist jedoch gleichmäßig geschwärzt und läßt so nur eingeschränkte Aussagen über diesen Faktor zu. In den Spuren 5 und 6 findet sich die

mit IRF2 AK inkubierten Extrakte der infizierten Zellen und wieder ist die Bande des Antikörper-IRF2-Komplexes oberhalb von der SABP1 Position, wenn auch deutlich schwächer als in Spur 2 und 3, zu sehen. Außerdem ist zu erkennen, daß sich die SABP1 Bande in den Spuren 5 und 6 unverschoben auf der selben Höhe wie in der Spur 4 befindet. Somit hat keine Bindung des IRF2 Antiserums an den SABP1 Komplex stattgefunden. Daraus folgt, daß SABP1 keine Untereinheit besitzt die mit IRF2 identisch ist. Der Bereich in dem SABP2 zu finden ist wird nach AK Zugabe aber deutlich aufgelockert. Durch Binden des Antikörpers an das konstitutiv exprimierte IRF2 und Verschieben dieser Banden wird SABP2 in den Spuren 5 und 6 besser sichtbar.

Ebenfalls wird deutlich, daß der IRF2-AK nicht an SABP2 bindet, da diese Bande nicht verschoben wird. Dies bedeutet, daß auch der SABP2-Komplex nicht IRF2 als Untereinheit besitzt.

Abb. 7:

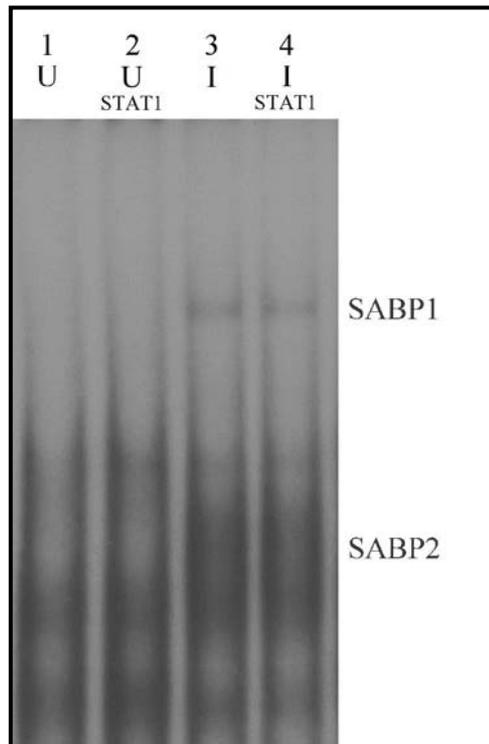


Weder durch SIN, NDV, poly rI:rC noch durch IFN- α induzierte SABP1 Komplexe enthalten CBP als Untereinheit.

Die L-929 Zellen wurden entweder scheininfiziert (U), Spuren 1,4,7,10, oder wahlweise mit 30 PFU/Zelle SIN (I (SIN)), Spuren 2-3, oder 30 PFU/Zelle NDV (I (NDV)), Spuren 5-6, infiziert. Ebenfalls wurden Zellen, die mit dsRNA transfiziert wurden (P), Spuren 8-9, und L-Zellen, die mit IFN- α (500 U/ml) behandelt wurden (IFN), Spuren 11-12, verwendet. Für die Supershiftversuche wurden 10 μ g Extraktprotein mit 1 μ g Antikörper für 1h bei 4°C vor Zusatz der radioaktiven Probe inkubiert.

SABP1 ist durch Behandlung mit allen vier Induktionswege eindeutig nachzuweisen, Spuren 2, 5, 8 und 11. Auch in den Versuchsansätzen, in denen die Kernextrakte mit CBP-AK behandelt wurden, ist der SABP1 Komplex deutlich zu erkennen, Spuren 3, 6, 9, und 12. Er befindet sich in diesen Spuren auf exakt der selben Höhe wie in den Spuren der nicht AK-behandelten Extrakte. Somit hat keine Bindung des CBP-AK an das ISRE-bindende Protein stattgefunden. Hieraus folgt, daß SABP1 kein CBP enthält und somit nicht DRAF1 entspricht.

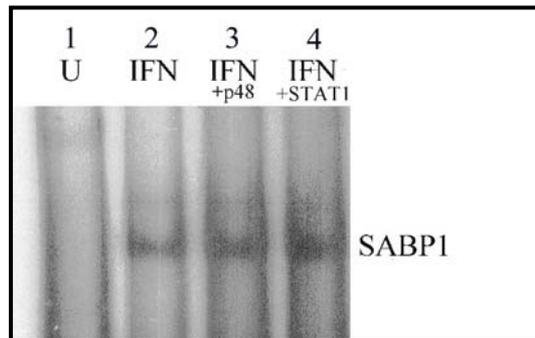
Abb. 8:



SABP1 enthält nicht STAT1 als Untereinheit.

Die L-929 Zellen wurden entweder scheininfiziert (U), Spur 1 und 2, oder mit 30 PFU/Zelle SIN infiziert (I), Spur 3 und 4. Die Kernextrakte wurden 18h nach der Infektion angefertigt. Bevor 10µg der Extrakte mittels einer radioaktiven ISG-15 Probe in der Gelretentionsanalyse getestet wurden, versetzte man Extrakte aus uninfizierten und SIN-infizierten L-929 Zellen für 1h bei 4°C mit 0,5µl STAT1 AK, Spur 2 und 4. Dies entspricht jeweils 1µg Antikörper. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung ist auf Spur 1 und 2 kein ISRE-bindendes Protein zu erkennen. Nach SIN-Infektion ist die SABP1 Bande in Spur 3 und 4 deutlich zu sehen. Die Inkubation der Kernextrakte mit STAT1 AK hat keinen Einfluß auf das Laufverhalten der SABP1-Bande, Spur 4. Dies impliziert, daß STAT1 AK nicht an den SABP1 Komplex binden. Somit folgt, daß SABP1 nicht STAT1 als Untereinheit enthält.

Abb.9:

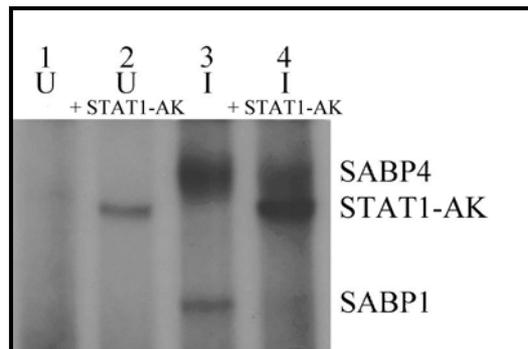


Die IFN- α induzierte Bande enthält weder p48 noch STAT1 als Untereinheit.

Die Kernextrakte von unbehandelten (U), Spur1, und von IFN-behandelten (500U/ml) L-929 Zellen (IFN), Spuren 2-4, wurden für diesen Versuch verwendet. Die Proteine der Kernextrakte von IFN-behandelten Zellen wurden zusätzlich mit entweder kommerziellen p48 AK (Santa Cruz) , Spur 3, oder STAT1 AK (Santa Cruz), Spur 4, für 1h bei 4°C inkubiert. Die absolute Menge der Kernproteine betrug 10 μ g, die der Antikörper 1 μ g. Anschließend erfolgte die Testung mittels einer radioaktiv markierten ISG-15 Probe, eingesetzt in die Gelretentionsanalyse.

In Spur 2 ist die IFN- α induzierte Bande, die in Spur 1 fehlt, zu sehen. Diese Bande ist auch in Spur 3 und 4 deutlich erkennbar. Sie findet sich dort auf exakt der selben Höhe wie die Bande in Spur 2, obwohl in den letzten beiden Spuren AK zu den Kernextrakten gegeben wurden. Dies impliziert, daß keine Bindung der käuflichen AK, gerichtet gegen Untereinheiten von ISGF3, an das von IFN- α induzierte Protein, SABP1, stattgefunden hat.

Abb. 10:



SABP enthält doch STAT1 als Untereinheit.

Die L-929 Zellen wurden entweder scheininfiziert (U), Spuren 1 und 2, oder mit 30 PFU/Zelle SIN infiziert (I), Spuren 3 und 4, und die Kernextrakte 18h nach der Infektion angefertigt. Die Testung von 10µg Extraktprotein erfolgte in der Gelretentionsanalyse unter Verwendung einer radioaktiv markierten ISG-15 Probe. Ein Teil der Extrakte aus sowohl uninfizierten Zellen als auch infizierten Zellen wurde vor Zusatz der radioaktiven Probe für 1h mit spezifischen, polyklonalen STAT1 AK versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in folgender Reihenfolge. Spur 1, U, Extrakte aus uninfizierten L-929 Zellen, Spur 2, U+STAT1, Extrakte aus uninfizierten L-929 Zellen plus STAT1 AK, Spur 3, I, SIN-infizierte L-929 Zellen, Spur 4, I+STAT1, SIN-infizierte L-929 Zellen plus STAT1 AK. In dem gezeigten Bereich des Gelausschnittes sind keine ISRE-bindende Proteine in den Extrakten der uninfizierten Zellen zu erkennen. Auf Spur 2 ist ebenfalls kein ISRE-bindendes Protein zu sehen, jedoch eine Bande die der Präzipitation des STAT1 AK entspricht. Spur 3 zeigt nach der Infektion das Auftreten von SABP1 und SABP4 (zu SABP4 siehe IV.h). In Spur 4 hingegen ist neben der Antikörperbande nur noch SABP4 und die STAT1 AK-Bande zu erkennen, während die SABP1-Bande verschwunden ist. Dies bedeutet dass der STAT1 AK in der Lage ist an Bestandteile von SABP1 zu binden und somit die Bande zu verschieben. Dies ist der Beweis für STAT1 als Bestandteil von SABP1.

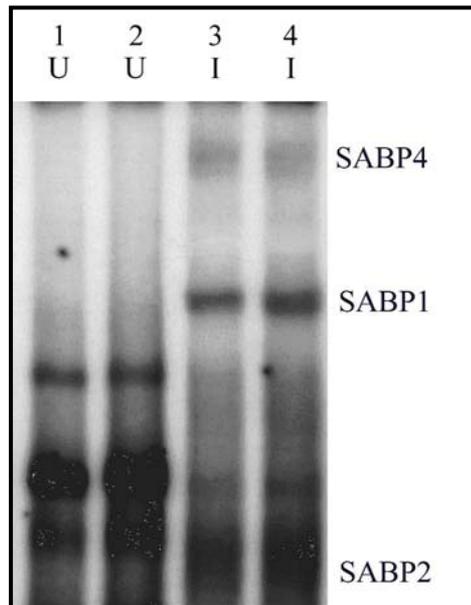
IV.h Induktion von SABP4 durch Sindbisvirus in L-929 Zellen bei hoher Multiplizität der Infektion

Bei einer Vielzahl der Untersuchungen von Extrakten SIN-infizierter L-929 Zellen konnte neben den beschriebenen SABP1- und SABP2 –Komplexen eine weitere Bande beobachtet werden. Diese wurde SABP4 genannt (die Bezeichnung SABP3 wurde schon für ein SIN-induziertes DNA-bindendes Protein in Hühnerfibroblasten verwendet). SABP4 war aber nicht in allen Versuchsansätzen zu finden.

Deshalb wurde in weiteren Versuchen die Multiplizität der Infektion auf 60 PFU/Zelle verdoppelt. Die Ernte der Zellen erfolgte wie in den anderen Versuchen nach 18h. Weiterhin war die Gelretentionsanalyse die Untersuchungsmethode der Wahl für die Testung der Kernextrakte. Die Bedingungen der Gelretentionsanalyse wurden beibehalten. Hierbei zeigte sich nun deutlich neben den schon beschriebenen SABP1- und SABP2-Banden die dritte SIN-induzierte Bande, SABP4, in den infizierten L-929 Zellen, die nicht in uninfizierten L-929 Zellen zu finden. Das hier beschriebene ISRE-bindende Protein ist scheinbar größer als SABP1 oder hat eine wesentlich andere Ladung, da es in der Gelelektrophorese ein deutlich langsames Wanderungsverhalten zeigt.(Abb. 11)

Die Induktion von SABP4 ist streng an SIN-Virus gebunden, da dieser Faktor nie nach Infektion mit NDV oder Transfektion mit poly rI:rC nachgewiesen wurde.

Abb. 11:



Induktion von SABP4 durch SIN in L-929 Zellen bei hoher Multiplizität der Infektion

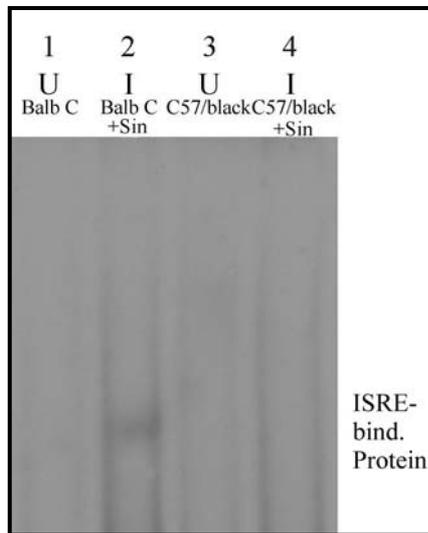
Zur Durchführung dieses Versuches wurden L-929 Zellen nur zum Schein oder mit 60 PFU/Zelle SIN infiziert. Die Kernextrakte wurden 18h nach der Infektion hergestellt und anschließend in der Gelretentionsanalyse getestet wobei ein radioaktiv markiertes ISG-15 Oligonucleotid als ISRE verwendet wurde. Die Extrakte der uninfizierten L-929 Zellen (U) wurden auf den Spuren 1 und 2 aufgetragen, die der Infizierten (I) auf den Spuren 3 und 4. In den infizierten Extrakten sind deutliche ISRE-bindende Komplexe zu erkennen, die nicht in den Extrakten der uninfizierten Zellen zu sehen sind, z.B. SABP1 und SABP2. Neben Diesen ist jedoch in diesem Versuch auch SABP4 zu finden. SABP4 hat eine wesentlich langsamere Wanderungsgeschwindigkeit verglichen mit den anderen induzierten DNA-bindenden Proteinen, was auf eine erhebliche Größe des Komplexes schließen läßt.

IV.i Induktion eines ISRE-bindenden Proteins in primären Mäusefibroblasten

Neben der Induktion von verschiedenen ISRE-bindender Proteine durch Sindbisvirus in L-929 Zellen sollte in einem anderen Experiment auch noch überprüft werden, ob SIN auch in primären Zellen ISRE-bindende Komplexe induzieren kann. Die Verwendung von primären Mäusefibroblasten bietet sich als interessant an, weil diese Zelllinien noch nie passagiert wurden. Dies bedeutet, daß die Zellen in ihrer Funktionsweise den nativen Zellen im Mäuseorganismus entsprechen. Hierzu wurden primäre Mäusefibroblasten vom Stamm C57\black und Balb C gewonnen. Die Infektion der Zellen erfolgte mit SIN, 30 PFU/Zelle. Die Kernextrakte wurden 18h nach der Infektion angefertigt und in der Gelretentionsanalyse getestet. Hierbei zeigte sich in den Extrakten der SIN-infizierten Balb C Zellen ein ISRE-bindendes Protein das sich nicht in den Extrakten der uninfizierten Zellen des gleichen Stammes finden läßt. In den C57\black Zellen läßt sich keine Induktion eines ISRE-bindenden Proteins durch SIN nachweisen. (s.Abb. 12)

Vergleiche mit SIN-infizierten L-929 Zellen zeigen ein unterschiedliches Laufverhalten des in SIN-infizierten Balb C Fibroblasten gefundenen ISRE-bindenden Komplexes zu SABP1.(Daten nicht gezeigt)

Abb. 12:



Induktion eines ISRE-bindenden Proteins in primären Mäusefibroblasten durch SIN-Infektion.

Für die Durchführung dieses Versuches wurden primäre, embryonale Fibroblasten von Mäusen der Stämme Balb C und C57/black gewonnen. Diese wurden mit 30 PFU/Zelle SIN oder nur zum Schein beimpft. 18h nach der Infektion wurden die Kernextrakte hergestellt. Die Testung erfolgte in der Gelretentionsanalyse, bei der eine radioaktive ISG-15 Probe verwendet wurde. Auf Spur 1 wurden die Extrakte der uninfizierten Balb C Zellen (U Balb C) und auf Spur 2 die der SIN infizierten Balb-C Mäusefibroblasten (I Balb C) aufgetragen. Kernextrakte der scheininfizierten C57/black Zellen (U C57/black) findet man auf Spur 3 und der SIN infizierten C57/black Mäusefibroblasten (I C57/black) auf Spur 4. Nur in Spur 2, SIN-infizierte Balb C Zellen, ist eine spezifische Bindungsreaktion an das ISRE zu beobachten. In den Extrakten der SIN infizierten C57/black Mäusefibroblasten, Spur 4, wird kein ISRE-bindendes Protein nachgewiesen.

V. Diskussion

Da es bisher keinerlei Untersuchungen zu dem Thema Sindbis-aktivierter ISRE-binder Proteine in L-929 Zellen gibt, und daher keine vergleichenden Studien mit anderen SIN-Arbeiten möglich sind, müssen unsere Ergebnisse in Zusammenhang mit den derzeit veröffentlichten Arbeiten über z.B. NDV-Virus oder Adenovirus induzierte IRF gesehen werden. Bei dem von uns beschriebenen SABP1 handelt es sich um ISGF3. Nach autokriner und parakriner Wirkung von IFN- α , durch Bindung an den IFN-Typ I-Rezeptor und Aktivierung der ISGF3 Untereinheiten, findet sich ISGF3 im Cyto- und Nukleoplasma (Yoneyama et al., 1996). Dort wirkt ISGF3 als Signalprotein der IFN- α vermittelten Immunantwort und erhöht durch Bindung an verschiedene ISRE die Expression der entsprechenden ISG (Darnell et al., 1994).

Diese Wirkvermittlung von IFN- α über ISGF3 wurde als essentiell für verschieden Zelltypen nachgewiesen. (Yoneyama et al., 1996).

Die Infektion mit NDV, als Reiz für die Zelle ISGF3 zu produzieren, wurde zuerst von Yoneyama et al. beschrieben. Nach Infektion von L-929 Zellen mit NDV gelang ihnen der Nachweis von ISGF3 im Kern (Yoneyama et al., 1997). Von uns ebenfalls durchgeführte Infektionen von L-929 Zellen mit NDV bestätigen die Induktion eines ISRE-bindenden Faktors, der in uninfizierten Zellen nicht zu finden ist. Dieser ISRE-bindende Faktor zeigt das gleiche Verhalten wie SABP1 in der Gelretentionsanalyse, bindet also auch ISG-15 und besitzt dieselbe Größe. Auch die einzige in unseren Zellen durch IFN- α induzierte Faktor zeigt ein absolut gleiches Laufverhalten verglichen mit dem NDV induzierten Komplex.

Dieses Ergebnis beweist ein Übereinstimmen von SABP1 und ISGF3.

Daly und Reich beschreiben neben DRAF1 und DRAF2 auch die Produktion von ISGF3 nach Transfektion der HeLa S3 Zellen mit dsRNA (Daly und Reich, 1993). Wird die L-929 Zelle mit dsRNA transfiziert, so findet sich in der Gelretentionsanalyse ein ISRE-bindender Faktor, der in seinem Laufverhalten dem von SABP1 entspricht. Dies beweist die Übereinstimmung von ISGF3 und SABP1.

Der Mechanismus für die Induktion von ISGF3 durch Sindbisvirus in IFN-sensitiven L-929 Zellen entspricht dem üblichen Erklärungsmodell: Durch die Virusinfektion direkt, oder indirekt durch Bildung von dsRNA im viralen Replikationszyklus kommt es zu einer Aktivierung der Interferongene. Nach Transkription und Translation erfolgt die Sezernierung von IFN. Nach Bindung von IFN- α an den membranständigen Rezeptor aktiviert die JAK-STAT-Kette die Untereinheiten ISGF3 α und ISGF3 γ , so daß sich ISGF3 bilden kann (Joklik et al., 1990). Da die IFN-Sensitivität entscheidend ist für die ISGF3 Aktivierung zeigen z.B. Versuche von Daly und Reich. Denn unter Verwendung von HeC 1b Zellen, die keine IFN-Rezeptoren besitzen, konnte weder durch Transfektion mit dsRNA noch durch Virusinfektion ISGF3 induziert werden. (Daly und Reich, 1993).

Ebensolche Versuche, mit SIN als viralem Induktor und IFN-rezeptorlosen Zellen, wurden mittlerweile in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt und bestätigen oben genannte Ergebnisse.(Abb. 13).

Um eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der unspezifischen Immunantwort auf SIN-Infektion treffen zu können, war es nötig den Zeitpunkt für das früheste Auftreten von SABP1\ISGF3 im Nukleoplasma zu bestimmen. Bei der Erstellung der Zeitkurve konnte SABP1\ISGF3 frühestens nach 9h nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis korreliert mit Forschungsarbeiten anderer Arbeitsgruppen. Daly u. Reich detektierten ISGF3, induziert durch Adenovirus in HeLa Zellen, frühestens nach 7h (Daly und Reich,1993). Bovolenta und Ozato konnten ISGF3 nach VSV-Infektion in L-929 Zellen nach 4-6h nachweisen (Bovolenta et al., 1995). Direkte ISGF3 Aktivierung durch IFN- α Behandlung der Zelle erfolgt wesentlich schneller. Hierbei taucht ISGF3 schon 5min nach IFN- α Induktion im Nukleoplasma auf (Levy et al.,1989). Die virale Induktion von ISGF3 benötigt wesentlich mehr Zeit als die Induktion durch IFN- α , da hier die Schritte Penetration, Uncoating, IFN-Induktion, -Produktion, -Ausschüttung die Antwortzeit der Zellen verlängern.

Die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich der Bindungsspezifität von SABP1 zeigen eine deutliche Übereinstimmung des DNA-Bindungsverhaltens von SABP1 und ISGF3. Arbeiten von Darnell (Darnell et al., 1994) und Yoneyama (Yoneyama et al., 1996) zeigen für ISGF3 eine hohe Bindungsaffinität an ISG 15-

ISRE und ISG 54-ISRE, mit geringerer Affinität auch an PRD I. Keine Bindung an ICSBP. Bei von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Competitorversuchen stellte sich eine deutliche Bindung von SABP1\ISGF3 an ISG 15, ISG54 dar. Verglichen zu diesen ist die Bindungsaffinität an PRD I wesentlich geringer. Eine Bindung an ICSBP-ISRE oder GBP-ISRE ist nicht nachweisbar. Diese Übereinstimmung mit oben genannten Ergebnissen beweist das ISGF3 und SABP1 identisch sind.

SABP1\ISGF3 bindet also sowohl an die Promotorregionen von interferonsensitiven Genen (z.B.: ISG 15), als auch an Promotoren von Interferongen (z.B.: PRD I) und besitzt dadurch eine zentrale Stellung in der IFN-Immunantwort. Denn durch SABP1\ISGF3 Wirkung werden also nicht nur die IFN-induzierten Wirkungen vermittelt, sondern auch, durch Stimulation der IFN-Produktion, die Immunantwort regelrecht unterstützt. Somit kann die Virusresistenz in vitro auf größere Zellsysteme übertragen werden. Wahrscheinlich ist diese positive Rückkopplung auch in vivo mit zuständig, um den antiviralen Status auf den ganzen Organismus auszudehnen.

Außerdem ist die Bindung dieses murinen IRF an ein humanes ISRE ein deutlicher Hinweis auf die evolutionäre Stabilität und den Erfolg des Interferonsystems.

Eine Bindung der CBP-AK und der IRF2-AK an SABP1\ISGF3 ist in den Supershiftversuchen nicht nachweisbar. Daraus läßt sich ableiten, daß SABP1 weder DRAF1 (Weaver et al.,1997), bestehend aus IRF3, CBP, p300, ist, noch eine Komponente, die IRF2 entspricht, enthält.

Die Bindung des IRF2-AK und damit Verschiebung der konstitutiv exprimierten IRF2-Komplex Bande hat jedoch den Effekt, daß SABP2 besser darzustellen ist. Diese Methode könnte eventuell so in späteren Versuchen helfen SABP2 genauer zu detektieren.

Die Supershiftversuche, die mit kommerziellen AK, gerichtet gegen die Untereinheiten von ISGF3 (Darnell et al., 1994) durchgeführt wurden, zeigen keine Bindung an SABP1. Die positiv getesteten STAT1-AK, die freundlicherweise von Herrn Decker et al., Wien, zu Verfügung gestellt wurden, bewirkten jedoch einen Shift. Die Erklärung für diese Diskrepanz liegt in der

räumlichen Konfiguration von SABP1\ISGF3, die die Antigenstruktur so verdecken könnte, daß es den kommerziellen AKn nicht möglich ist an diese zu binden. Diese Theorie wird auch durch Versuche unterstützt, in denen p48 und STAT1 Antiseren mit Kernextrakten von IFN- α behandelten Zellen inkubiert wurden. Da bekannt ist (Joklik et al., 1990; Darnell et al., 1994), daß IFN- α ein ISGF3 Induktor ist, wäre zu erwarten, daß die Antikörper in der Lage sind die ISGF3-Bande zu verschieben. Dies blieb jedoch aus, und war somit ein deutlicher Hinweis, daß die kommerziellen AK, obwohl extra hergestellt für Supershift Versuche, nicht bei unserer Arbeitsmethode zu verwenden sind.(s.Abb. 9) Die Bindung des STAT1- AK von Herrn Decker ist ein weiterer Beweis dafür, daß es sich bei SABP1 und ISGF3 um den selben ISRE-bindenden Faktor handelt.

Daraus folgt der Schluß, daß es also möglich ist mittels SIN, eines Alphavirus, in L-929 Zellen ISGF3 zu induzieren. Dieser Nachweis von ISGF3 nach Infektion durch unterschiedliche Virusspezies, z.B. Adenovirus (Daly und Reich, 1993), NDV (Yoneyama et al., 1997), und nun auch nach Alphavirusinfektion macht deutlich, daß es für diesen Teil der Immunantwort keine Virusspezifität besteht.

Dies ist anders bei der Induktion von SABP4. Wir vermuteten, daß nach SIN-Infektion in der Zelle nur sehr wenig SABP4 produziert wird. Dieses könnte unter der Nachweisgrenze unserer Verfahren liegen und somit erst nach Infektion mit hoher Multiplizität nachweisbar werden. So ist SABP4 in Vorversuchen, im Gegensatz zu SABP1, nicht durch IFN, NDV oder dsRNA zu induzieren, sondern konnte nur nach SIN-Infektion mit hoher Multiplizität nachgewiesen werden.. Spätere Versuche mit einer optimierten Arbeitsmethode können SABP4 jedoch auch schon bei 30 PFU/Zelle nachweisen (Behr et al., 2001). Neben dem unterschiedlichen Laufverhalten in der Gelretentionsanalyse dient also auch der Induktionsmechanismus als Unterscheidungskriterium zwischen SABP1 und SABP4.

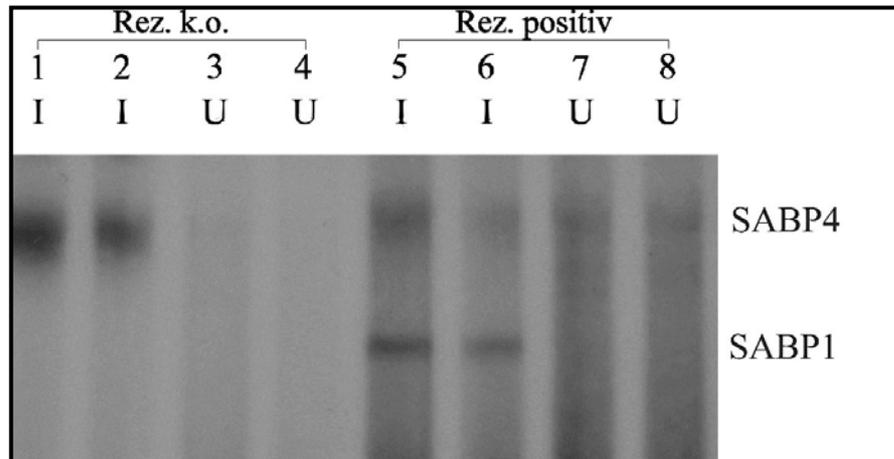
Die Möglichkeit, daß es sich bei SABP4 und DRAF1 um denselben Faktor handelt, wurde mittlerweile von der unserer Arbeitsgruppe durch positive Ergebnisse von anti IRF3 Supershifts bestätigt (Abb. 14)(Behr et al., 2001). Jedoch bleibt weiterhin die Frage offen, warum DRAF1, jedoch nicht SABP4, durch dsRNA induzierbar ist.

Erklärung hierfür wäre die Verwendung von L-929 Zellen im Gegensatz zu HeLa- oder HeC- Zellen, die von Reich verwendet werden (Daly und Reich, 1993). Dieses wäre dann ein Hinweis auf eine gewisse Wirtsspezifität in der Zellantwort mit SABP4 oder DRAF1. Die Frage, warum in Vorversuchen SABP4 nicht durch NDV induzierbar war, wurde nicht weiter verfolgt, da in späteren Versuchen SABP4 nach NDV-Infektion reproduzierbar war (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchungen der IRF-Induktion durch SIN-Infektion in primären Mäusefibroblasten, die einerseits als Vorversuche zu Experimenten mit PKR-knock-out Mäusefibroblasten dienten, und andererseits die Wirtsspezifität der SIN-Induktion beleuchten sollten, zeigten eine deutliche Bande in Balb C Zellen. In C57/black Zellen zeigte sich keine IRF-Bande. Dieses unerwartete Ergebnis, welches auf eine Immunreaktion mit unterschiedlichen IRF in verschiedenen Mäuserassen und L-929 Zellen hinweist, ist bisher nicht geklärt und fordert weitere Untersuchungen, um so eventuell mehr Aussagen über die Wirtsspezifität dieses Wirtszellabwehrsystems machen zu können.

Ein interessanter Befund, der aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden konnte, ist die nach SIN-Infektion auftretende Deaktivierung oder verminderten Produktion, von in den uninfizierten Zellen aktiven, konstitutiven IRF2-haltigen Komplexen (s. Abb. 1). Eventuell besitzen diese nicht-Virus-induzierten IRF eine negativ regulatorische Wirkung auf ISG. Dies hätte zur Folge, daß das ISG-15-ISRE, und somit das zugehörige ISG in der uninfizierten Zelle nicht aktiv werden kann. Wird die Zelle aber mit SIN beimpft, könnten diese negativen Regulatoren abgeschaltet werden und somit stünde dem Wirken der Virusinduzierten, positiven Regulatoren, z.B. ISGF3, nichts mehr im Wege.

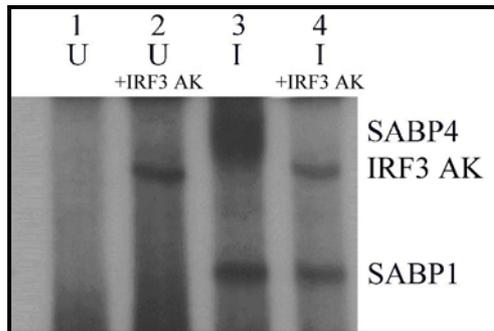
Abb.13:



SABP1 ist IFN-Rezeptor abhängig.(s.Diskussion)

Für diesen Versuch wurden IFN Typ I Rezeptor knockout Mäuse Embryofibroblasten (Rez. k.o.), Spur 1-4, und MEF mit IFN Typ I Rez.(Rez. pos.), Spur 5-8, verwendet. Die Infektion erfolgte mit 30 PFU/Zelle SIN, die Kernextrakte wurden 18h nach der Infektion hergestellt. Die Testung erfolgte durch die Gelretentionsanalyse in der ein radioaktivmarkiertes ISG-15 ISRE eingesetzt wurde. Die Extrakte von uninfizierten Rez. k.o. MEF sind auf Spur 3 und 4 zu sehen. Hier findet sich kein ISRE-bindendes Protein. Auf den Spuren 1 und 2 wurden die Extrakte der SIN-inf. Rez. k.o. MEF aufgetragen. Hier ist nach Infektion nur SABP4, nicht jedoch SABP1 zu finden. Schlußfolgerung hieraus ist, die Abhängigkeit der SABP1 Aktivierung vom IFN Typ I Rez. Werden neben den Extrakten von uninfizierten MEF mit IFN Typ I Rez., Spur 7 und 8, die Extrakte von infizierten MEF mit Rez. betrachtet, Spur 5 und 6, kann man neben SABP4 auch SABP1 erkennen. Dieses Ergebnis ist der positive Beweis für die IFN Typ I Rez. Abhängigkeit von SABP1.

Abb. 14:



SABP4 enthält IRF3 als Untereinheit (s. Disk.).

L-929-Zellen wurden entweder nur scheininfiziert (U), Spuren 1 und 2, oder mit 30 PFU/Zelle SIN infiziert (I), Spuren 3 und 4. Die Zellen wurden nach 18h geerntet und anschließend zu Kernextrakten verarbeitet. Außerdem wurden den sowohl uninfizierten, Spur 2, als auch infizierten Extrakten, Spur 4, IRF3 Antikörper zugegeben. Diese wurden dann in der Gelretentionsanalyse, bei der ein radioaktiv markiertes ISG-15 Oligonukleotid als ISRE diente, untersucht. In Spur 1 ist kein ISRE-bindender Faktor zu sehen. Die Bande in der Kontrollspur 2 entspricht dem IRF-3 Antikörper (IRF3 AK).

Spur 3 zeigt zum Einen die breite SABP4 Bande und den rascher laufenden SABP1 Komplex. Nach Zugabe des IRF-3 AK in Spur 4 sind nur die Banden SABP1 und IRF-3 AK, nicht jedoch SABP4 zu sehen. Dies zeigt, daß es zu einer Bindung zwischen dem IRF-3 AK und SABP4 gekommen ist, und somit IRF-3 eine Untereinheit von SABP4 ist.

VI. Zusammenfassung

Diese Arbeit zeigt, daß es möglich ist mittels des Sindbisvirus, einem Vertreter der Alphaviren, ISRE-bindende Faktoren in murinen L-929-Zellen zu induzieren. Der Nachweis erfolgte durch die Gelretentionsanalyse. Ein humanes ISG-15 DNA-Oligonucleotid diente hier als Interferon stimuliertes regulatorisches Element (ISRE). Es konnten drei unterschiedliche ISRE-bindende Faktoren, SABP1, SABP2 und SABP4 in den Kernextrakten der SIN-infizierten L-929-Zellen nachgewiesen werden.

Zeitkurvenversuche lassen ein Auftreten von SABP1 nach 9h nach der Infektion erkennen. Ebenfalls durch NDV-Virus, dsRNA und IFN- α induzierte ISRE-bindende Komplexe comigrieren mit SABP1. Supershiftversuche mit ISGF3-AK, CBP-AK, IRF-2-AK und Untersuchungen zu der Bindungsspezifität von SABP1, sowie die Induzierbarkeit durch IFN- α zeigen, daß es sich bei SABP1 um den aus anderen Zellen bekannten IRF, ISGF3, handelt. Dieser wird durch die parakrine Interferonausschüttung der infizierten Zellen induziert.

SABP4 ist in der L-929-Zelle nur durch Sindbis Infektion zu Induzieren, nicht jedoch durch IFN- α , dsRNA oder NDV. Außerdem zeigt SABP4 eine deutlich geringere Beweglichkeit in der Gelelektrophorese. Dies zeigt deutlich, daß es zwei unterschiedliche Aktivierungsmechanismen für SABP1/ISGF3 und SABP4 geben muß. Weitere Versuche, in denen primäre Mäusefibroblasten, Balb C und C57/black, als Zellsystem dienten, lassen nach Sindbis Infektion in den Extrakten der Balb C Zellen einen IRF erkennen. Dieser muß noch weiter charakterisiert werden.

VI. Literaturverzeichnis

Au, W.-C., Moore, P.A., Lowther, W., Juang, Y.-T., Pitha, P.M., 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, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; 92: 11657-11661.

Behr, M., Schieferdecker, K., Bühr, P., Büter, M., Petsophonasakul, W., Sirirungsi, W., Redmann-Müller, I., Müller, U., Prempracha, N., Jungwirth, Ch., 2001, Interferon-Stimulated Response Element (ISRE)-Binding Protein Complex DRAF1 Is Activated in Sindbis Virus (HR)-Infected Cells, *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 21:981-990.

Bovolenta, C., Lou, J., Kanno, Y., Park, B.-K., Thornton, A.M., Coligan, J.E., Schubert, M., Ozato, K., 1995, Vesicular Stomatitis Virusinfection induces a nuclear DNA-binding factor specific for the interferon-stimulated response element, *J. Virol.* 72, 9257-9266.

Daly, C., Reich, N.C., 1993, Double-stranded RNA activates novel factors that bind to the interferon-stimulated response element, *Mol. Cell. Biol.*; 13: 3756-3764.

Darnell, Jr. J.E., Kerr, I.M., Stark, G.R., 1994, JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins, *Science*; 264: 1415-1421.

De Grado, W.F., Wassermann, Z.R., Chowdhry, V., 1982, Sequence and structural homologies among type I and type II interferons, *Nature (Lond)*; 300: 379-381.

Eagle, H. 1959, Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures, *Science*; 130: 432-437

Field, A.K., Tytell, A.A., Lampson, G.T., Nemes, M.M., Hilleman M.R., 1970, Doublestranded polynucleotides as interferon inducers, *J. Gen. Physiol.*; 57: 90S.

Friedman, R.M., 1979, Interferons: interactions with cell surfaces, In: Gresser I, ed. *Interferon*, Vol. 1, Orlando: Academic Press; 53-74.

Fu, X.-Y., Kessler, D. S., Veals, S.A., Levy, D.E., Darnell Jr., J.E., 1990, ISGF 3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 87: 8555-8559.

Fujita, T., Ohno, S., Yasumitsu, H., Taniguchi, T., 1985, Delimitation and properties of DNA sequences required for their regulated expression of human interferon- β gene, *Cell*; 41: 489-496.

Harada, H., Fujita, T., Miyamoto, M., Kimura, Y., Maruyama, M., Furia, A., Miyata, T., Taniguchi, T., 1989, Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind the same regulatory element of IFN and IFN-inducible genes, *Cell*; 58: 729-739.

Henco, K., Brosius, J., Fujisawa, A., et al., 1985, Structural Relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes, *J. Mol. Biol.*; 185: 227-260.

Isaacs, A. and Lindeman, I. (1957), Virus interference: I. The Interferon. *Proc. R. Soc. Conolon*; 147: 258-263.

Johnson, H., Bazer, F., Szente, B., Jarpe, M., 1994, Wirkweise von Interferonen, *Spektrum der Wissenschaft*; Juli 1994: 78-84.

Joklik, K., 1990, Interferons, *Virology*, 2.Edition, Ed. Fields, B., Raven Press; 383-410.

Keller, A.D., Maniatis, T., 1988, Identification of an inducible factor that binds to a positive regulatory element of the human interferon- β gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 85: 3309-3313.

Levy, D.E., Kessler, D.S., pine R., Darnell Jr., J.E., 1989, Cytoplasmatic activation of ISGF3, the positive regulator of interferon- α – stimulated transcription reconstituted in vitro, *Genes Dev.*; 3: 1362-1371.

Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E.F., 1989, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Merigan, T.C., 1973, Non-viral substances wich induce interferons, In: Finter N.B. ed. *Interferons and interferon inducers*, New York: American Elsevier; 45-71.

Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T., Taniguchi, T., 1988 Regulated Expression of a Gene Encoding a Nuclear Factor, IRF-I, That Specifically Binds to IFN- β Gene Regulatory Elements, *Cell*; 54: 903-913.

Pellegrini, S., Schindler, C., 1993, Early Events in Signalling by Interferons, *Trends. Biochemistry Sience.*; 18: 338-342.

Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C., Samuel, C.E., 1987, Interferons and Their Actions, *Ann. Rev. Biochem.*; 56: 727-777.

Peters, C., Dalrymple, J.M., 1990, Alphaviruses, *Virology*, sec. edition, ed. by Fields B.N. et al., Raven Press N.Y.; 713-739.

Rashidbaigi, A., Langer, J.A., Jung, V., et al.,1986, The gene for the human immune interferone rezeptor is located in chromosome 6, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 83: 384-388.

Ryals, J., Kierks, P., Ragg, H., Weissmann, C., 1985, A 46-nucleotide promoter segment from an IFN-alpha gene renders an unrelated promoter inducible by virus, *Cell*; 41: 497-507.

Raziuddin, A., Sarkar, F.H., Dutkowski, R., Shulman, L., Rudd, F.H., Gupta, S.L., 1984, Receptors for human alpha and beta interferon but not for gamma interferon are specific by human chromosome 21, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 81: 5504-5508.

Samuel, C.E., 1991, Antiviral Actions of Interferon: Interferon-Regulated Cellular Proteins and Their Surprisingly Selective Antiviral Activities, *Virology*; 183: 1-11.

Schindler, C., Shuai, K., Prezioso, V.R., Darnell, J.E.jr.,1992, Interferon Dependent Tyrosine Phosphorylation of a Latent Cytoplasmatic Transcription Factor, *Science*; 257: 809-813.

Schlesinger, S., Schlesinger, M.J., 1990, Replication of Togaviridae and Flaviviridae, *Virology*, sec. edition, ed. by Fields B.N. et al. Raven Press N.Y.;697-708.

Schreiber, E., Mathias, P., Müller, M.M. , W. Schaffner, 1989, Rapid detection of octamer binding proteins with minimal extracts prepared from a small number of cells, *Nucleic acid Res.*; 17: 6419.

Sehgal, P.B., 1982, The Interferon Genes, *Biochem. Biophys. Acta*; 285: 17-33.

Sims, S.H., Cha, Y., Romine, M.F., Gao, P.-Q., Gottlieb, K., Deisseroth, A.B., 1993, A Novel Interferon-Inducible Domain: Structural and Functional Analysis of the Human Interferon Regulatory Factor I Gene Promotor, *Molecular and Cellular Biology*; 13: 690-702.

Staheli P., 1990, Interferon-induced Proteins and the Antiviral State, *Adv. Virus Research*; 38: 147-200.

Stark, G.R., Kerr, I.M., 1992, Interferon-Dependent Signaling Pathways: DNA Elements, Transcription Factors, Mutations, and Effects of Viral Proteins, *Journal of Interferon Research*; 12:147-151.

- Stewart, W.E. II, De Clerqu, E.D., De Somer, P.,** 1974, Stabilisation of interferons by „defensive“ reversible denaturation, *Nature (Lond)*; 249: 460-461.
- Veals, S.A., Schindler, C., Leonard, D., Fu, X.-Y., Aebersold, R., Darnell, J.E., Jr., and Levy, D.E.,** 1992, Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DANN binding proteins, *Mol. Cell. Biol.*; 12: 3315-3324.
- Vengris, V.E., Stollar, B.D., Pitha P.M.,** 1975, Interferon Externalisation by Producing Cell Before Induction of Antiviral State, *Virology*; 65: 410-417.
- Weaver, B.K., Kumar, P., Reich, N.C.,** 1997, Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1, *Mol. Cell. Biol.*; 1359-1368.
- Weissmann, C., Weber, H.,** 1986, The Interferon Genes, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*; 33: 251-300.
- Weisz, A., Marx, P., Sharf, R., Apella, E., Driggers, P.H., Ozato, K., Levi, B.Z.,** 1992, Human Interferon Consensus Sequence Binding Protein Is a Negative Regulator of Enhancer Elements Common to Interferon-inducible Genes, *Journal of Biological Chemistry*; 267: 25589-25596.
- 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), *J. Biochem*; 120: 160-169.
- Yoneymama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, Fujita, T.,** 1997, Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300, *EMBO J.*; 17: 1087-1095.
- Zinn, K., Maniatis, T.,** 1986, Detection of factors that interact with the human interferon- β regulatory domain in vivo by DNase I footprinting, *Cell*; 45: 611-618.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor C. Jungwirth, für die außerordentlich gute Betreuung und dafür, daß er sich viel Zeit genommen hat.

Kerstin Schieferdecker danke ich sehr herzlich für all die Hilfe im Labor.

Bei Barbara und Dietmar Wintzheimer bedanke ich mich für die Unterstützung bei allen Fragen rund um den PC.

Lebenslauf:

Name: Matthias G. Behr

Anschrift: Karlsbader Str 25
97461 Hofheim

Telefon: 09523/413

Geburtsdatum: 10.04.1975

Familiestand: ledig

Eltern: Felix Behr, Lehrer
Erika Behr, Sekretärin

Geschwister: zwei Brüder, eine Schwester

Schulbildung: 08/81-06/85 Grundschole Hofheim
08/85-06/86 Hauptschole Hofheim
08/86-06/95 Regiomontanus Gymnasium Haßfurt; Abitur: Note 1,7

Studium: 11/95-08/97 Vorklinisches Studium an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg
09/97 Physikum
10/97-03/01 Klinisches Studium an der Julius-Maximilians- Universität
Würzburg
03/99 1. Staatsexamen
03/01 2. Staatsexamen
04/01-04/02 Praktisches Jahr
05/02 Prüfung zum 3. Staatsexamen; Gesamtnote: 1,49

Praktische Erfahrung:
03/98 Famulatur, Chirurgie, Kreiskrankenhaus Haßfurt
10/98 Famulatur, Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Haßfurt
09/99 Famulatur, Allgemein und Sportmedizin, Praxis Kempten
04/99 Famulatur, Institut für Virologie und Immunbiologie,
Universität Würzburg
05/99-10/99 Molekularbiologisches Arbeiten am Institut für Virologie und
Immunbiologie,
Universität Würzburg, Arbeitsgruppe um Prof. Jungwirth
08/00 Famulatur, Plastische Chirurgie, Universität Würzburg
08/00 Praktikum, Rechtsmedizin, Universität Würzburg
04/01-08/01 1. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin,
Universität Würzburg
08/01-12/01 2. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie, Addington
Hospital,
Durban, Südafrika
12/01-4/02 3. Tertial des Praktischen Jahres, Pathologie,
Universität Würzburg

Würzburg, 30. Juli 2002