

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

ISRE-bindende Komplexe nach Sindbisinfektion in Mäuse- und Hühnerzellen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Patrick M. Bühr
aus Kempten

Würzburg, Juli 2002

Referent: Professor Dr. C. Jungwirth

Koreferent: Professor Dr. E. Serfling

Dekan: Professor Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2002

Der Promovend ist Arzt.

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
I.1	Interferonsystem allgemein.....	1
I.2	Übertragung des IFN-Signals.....	2
I.3	Die IRF-Familie	3
II.	Fragestellung.....	5
III.	Materialien und Methoden	7
III. 1	Materialien.....	7
III.1.1	Zellen.....	7
III.1.2	Zellkultur	7
III. 1.3	Virus	8
III.1.4	Kernextrakte	8
III.1.5	Nucleotid-Oligomere	9
III.1.6	Radioaktive Markierung.....	9
III.1.7	Gelretardationsverfahren	10
III.1.8	Inhibitoren	11
III.1.9	NEM-Inaktivierung	11
III. 1.10	IFN-Behandlung	11
III.1.11	Antiseren.....	12
III.2	Methoden.....	13
III.2.1	Zellen und Zellkultur	13
III.2.1.1	Zellkultur sekundärer Fibroblasten	13
III.2.1.2	Zellkultur primärer Fibroblasten	13
III.2.2	Virus und Infektion.....	14
III.2.3	Inhibitorversuche	15
III.2.3.1	Aminopurinversuch	15
III.2.3.2	Actinomycinbehandlung.....	15
III.2.3.4	Cycloheximidbehandlung.....	15

III.2.4	IFN-Behandlung	16
III.2.5	Gewinnung der Kernextrakte	16
III.2.6	Proteinbestimmung nach Bradford	17
III.2.7	Herstellung der Doppelstrang-ISRE	17
III.2.8	Radioaktive Markierung der DNA	17
III.2.9	Gelretardationsverfahren	18
III.2.10	NEM-Inaktivierung	19
III.2.11	Supershift-Assay	19
IV.	Ergebnisse	21
IV. 1	Der Bindungskomplex SABP1	21
IV. 1.1	NEM-Alkylierung von SABP 1	21
IV. 1.2	Ist PKR-Aktivität notwendig für die Induktion von SABP 1 ?	22
IV. 1.3	SABP 1 enthält STAT1	23
IV. 2	Der Bindungskomplex SABP4	25
IV. 2.1	Der Bindungskomplex SABP4 in L990772-Zellen	25
IV. 2.2	Multiplizitätsabhängigkeit der Induktion von SABP 4	26
IV. 2.3	Zeitlicher Verlauf der Induktion von SABP 4	27
IV. 2.4	SABP 4 bindet nicht an PRD-I	28
IV. 2.5	Ist PKR-Aktivität notwendig für die Induktion von SABP 4 ?	29
IV. 2.6	Transkription zellulärer Gene und Induktion von SABP 4	30
IV. 2.7	Wird SABP 4 in Abwesenheit von Proteinsynthese induziert?	31
IV. 2.8	Stimulation von SABP 4 durch α -INF	32
IV. 2.9	Wird SABP 4 über IFN Typ-I induziert?	33
IV. 2.10	Enthält SABP 4 IRF-2, STAT1, IRF-3 bzw. CBP/p300 ?	34
IV. 3	Sindbisinduzierte ISRE-bindende Komplexe in C57 black bzw. Balb C	38
IV. 4	Sindbisinduzierte ISRE-bindende Komplexe in aviären Zellen	40
IV. 4.1	ISG-15- bzw. PRD- I-bindende Komplexe	40
IV. 4.2	IRF-1-Antiserum bindet an die Komplexe	42
V.	Diskussion	45

VI.	Zusammenfassung	49
VII.	Quellenverzeichnis.....	51

I. EINLEITUNG

I.1 Das Interferonsystem allgemein

Isaacs und Lindemann inkubierten im Jahr 1957 Membranen von Hühnerzellen mit hitzeinaktiviertem Influenzavirus. Zu ihrer Überraschung bemerkten sie, daß das Medium nun die Fähigkeit erwarb, einer Virusvermehrung entgegen zu wirken. Im Zusammenhang mit diesem Vorgang tauchte eine Substanz auf, welche von den Viruspartikeln zu unterscheiden war. Sie nannten diese Substanz „Interferon“ (Isaacs und Lindenmann 1957).

Heute zählt das Interferon (IFN) zu den Zytokinen mit auto- und parakrinem Wirkmechanismus. Seine Wirkungen sind pleiotrop (Goodbourn et al. 2000). Dazu zählen nicht nur die antivirale Eigenschaft, sondern auch die Regulation des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Immunantwort (Pestka et al. 1987, Samuel 1988).

Die IFNe werden in zwei Gruppen unterteilt, dem Typ-I- und dem Typ-II-IFN.

Das Typ-I-IFN wiederum hat zwei Klassen. Das α -IFN wird von Leukozyten gebildet, während das β -IFN von Fibroblasten sezerniert wird (Vilcek und Sen 1996). Das Typ-II-IFN wird auch γ -IFN genannt. Es wird von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen synthetisiert und wird deshalb auch als Immuno-IFN bezeichnet (Samuel 1991). Die Größe der α , β , und γ -IFNe beträgt jeweils 143, 145 und 146 Aminosäuren. Säurestabilität kennzeichnet die α - und β -IFNe (Vilcek und Sen 1996), während das γ -IFN säurelabil ist (Gray et al. 1982).

Die Anzahl der IFNgene und deren Lokalisation sind bekannt. Das α -IFN besitzt mindestens 15 funktionelle Gene und neun Pseudogene auf Chromosom Nummer neun (Weismann und Weber 1986), identisch mit dem Chromosomenlokus des β -IFNs, für welches nur ein Gen kodiert (Henco et al. 1985). Die Erbinformation für das γ -IFN befindet sich hingegen auf Chromosom Nummer zwölf (De Grado et al. 1982).

Die zellmembrangebundenen Rezeptoren für das Zytokin IFN unterscheiden sich entsprechend dem Typ-I- und Typ-II-IFN in einen Typ-I- und Typ-II-Rezeptor. Der Typ-I-Rezeptor ist auf Chromosom 21 (Raziuddin et al. 1984) und der

Rezeptor vom Typ-II auf Chromosom 6 gelegen (Rashidbaigi et al. 1986). In der Interaktion zwischen IFN und Rezeptor liegt auch die Wirtsspezifität begründet (Joklik 1990). Eine Zelle ohne Induktor produziert kein IFN. Also muß die Synthese zuerst aktiviert werden.

IFN gilt bei der Therapie der sekundär progressiven Multiplen Sklerose als wirksam (Kappos 1998). Bei kornealer Herpesinfektion wird IFN als gesicherte Indikation, bei Therapie der Hepatitis B als Standard und bei der Haarzellenleukämie als Therapie der Wahl gegeben (Classen et al. 1998). Um die etwa 30 durch IFN vermittelten Wirkungen aber therapeutisch besser einsetzen zu können, sind noch genauere Erkenntnisse über die komplexe Wirkweise dieses Zytokines erforderlich.

I.2 Übertragung des IFN-Signals

Es ist mittlerweile bekannt, daß das IFN selbst keine antivirale Eigenschaften hat (Vengris et al. 1975). Es wird zwar nach Virusinfektion gebildet und sezerniert, bindet dann aber auto- und parakrin an den membranständigen Rezeptor (Friedmann 1979). Dies führt nun zur Expression von zellulären Genen. Diese werden „IFN Stimulated Gens“ (ISGs) genannt, welche unter anderem für Proteine kodieren, die direkt antivirale Wirkungen haben. So spaltet z.B. die 2',5' Oligoadenylat-Synthetase (OASE) virale und zelluläre RNA (Samuel 1991). Das Mx Protein hemmt die Virusvermehrung, indem es Viruspolymerasen blockiert (Staehele et al. 1993).

Wie führt nun die Bindung von INF an einen Rezeptor, der in der Zellmembran lokalisiert ist, zur Aktivierung der Transkription von Promotoren? Diese Signalvermittlung wird z.B. über die sogenannte Jak-STAT-Kette weitergeleitet (Darnell et al. 1994). Die Januskinase (Jak) wird nach Ligandenbindung an den Rezeptor aktiviert. Diese phosphoryliert nun die im Zytoplasma konstitutiv vorhandenen STAT-Proteine (Signal Transducer and Activator of Transcription). Diese verbinden sich mit einem weiteren Protein, dem ISGF3 γ , welches letztendlich an die Promotoren von ISGs bindet und zur Genexpression führt. In den Promotoren von ISGs existiert eine Verstärkerregion, welche ISRE (IFN

Stimulated Regulatory Element) genannt wird (Levy et al. 1991). Auch der Promoter des ISG-15 enthält ein ISRE, welches in vorliegender Arbeit oft verwendet wird (s.u.). Die Aktivierung der ISGs kann verhindert werden indem die PKR, eine dsRNA abhängige Proteinkinase blockiert wird. Dies macht sich z.B. das Adenovirus zu nutze (Mathews und Shenk 1991) oder kann im Versuch mittels Aminopurin (Tiwari et al. 1988) erreicht werden.

Ähnlich wie für die ISGs das ISRE als Enhancer dient, existieren für die IFN-Gene Verstärkerregionen, die als IFNregulatorische Element (IRE) bezeichnet werden (Fujita et al. 1985). Das IRE liegt stromaufwärts in den Promotoren der IFNgene und steuert die Expression. Es hat drei Komponenten, nämlich zwei positiv regulatorische Domänen (PRD), die PRD-I und PRD-II genannt werden. Die dritte Domäne ist negativ regulatorisch und wird deshalb als NRD-I bezeichnet (Goodbourn und Maniatis 1988). Das ISRE ähnelt dem IRE und erklärt so, warum viele Faktoren an beide Elemente binden können.

I.3 Die IRF- Familie

IRF-1

Das „IFN Regulatory Factor1“ (IRF-1) wird durch IFN Typ-I und Typ-II, Virusinfektion und dsRNA induziert (Miyamoto et al. 1988, Fujita et al. 1989). Das Protein ist 329 Aminosäuren lang und besitzt ein Molekulargewicht von 37,3 kDa (Miyamoto et al. 1988). IRF-1 selbst aktiviert die Transkription von IFNgenen und von IFN stimulierten Genen (ISGs) (Pine et al. 1990, Henderson et al. 1997).

IRF-2

Das „IFN Regulated Factor 2“ (IRF-2) wird konstitutiv exprimiert. Typ-I-IFN und Virusinfektion bewirken Geninduktion. IRF-2 verdrängt IRF-1 von der DNA-bindenden Domäne und wirkt somit also Repressor von IRF-1 (Harada et al. 1989).

IRF-3

IRF-3 ist 491 Aminosäuren lang. Seine Transkription wird durch dsRNA induziert. Es bindet wie alle IRF an das ISRE (Grant et al. 1995) und ist Bestandteil des weiter unten besprochenen Faktors DRAF-1 (Weaver et al. 1997).

ISGF3

Das „IFN Stimulated Gene Factor 3“ setzt sich aus den zwei Komponenten ISGF-3 α und ISGF-3 γ zusammen und ist latent im Zytoplasma vorhanden (Levy et al. 1989). ISGF-3 α besteht aus dem STAT1, welches jeweils ein 91 und ein 84 kDa Protein enthält, und aus STAT2, das 113 kDa schwer ist. ISGF3- γ ist die 48 kDa schwere Untereinheit, welche im Zellkern an das ISRE bindet. ISGF-3 wird durch IFN Typ-I aktiviert. Um die Wirtszelle auf diesem Weg bei Virusbefall zu schützen, muß also zuerst β -IFN synthetisiert werden.

DRAF1

Das „Double Stranded Activated Factor 1“ (DRAF1) wird direkt über dsRNA aktiviert und bindet an das ISRE (Daly und Reich 1993). Es besteht aus der Untereinheit IRF-3, welche latent im Zytoplasma vorhanden ist und nach Induktion zum Nukleus transloziert. Als Koaktivatoren dienen CBP und p300, welche mit IRF-3 interagieren (Weaver et al. 1997). DRAF1 ist unabhängig von IFN und für seine Aktivierung ist keine de-novo Proteinsynthese notwendig. DRAF1 könnte deshalb die Wirtszelle auf raschem Wege vor einem Virusbefall warnen.

II. FRAGESTELLUNG

ISRE-bindende Komplexe wurden bisher in Zellen identifiziert, die mit Adenovirus (Daly und Reich 1993), Vesicular Stomatitis Virus (Bovolenta et al. 1995), Cytomegalievirus (Navarro et al. 1998), Respiratory Syncytial Virus (Takeuchi et al. 1998) oder New Castle Disease Virus (NDV) (Yoneyama et al. 1996, Weaver et al. 1998) infiziert wurden. Da nicht bekannt ist, inwiefern ISRE-bindende Komplexe virusspezifisch sind, ist es von Bedeutung, mit weiteren, alternativen Virusarten zu arbeiten. In vorliegender Arbeit soll geklärt werden, ob und welche ISRE-bindenden Komplexe durch eine Infektion mit Sindbisvirus, aus dem Genus der α -Viren, induziert werden.

In Vorversuchen wurde ein ISRE-bindender Komplex entdeckt und als SABP 1 bezeichnet. SABP 1 ist durch Sindbisvirus- bzw. NDV-Infektion, poly rI:rC und α -INF induzierbar (Behr et al. 2001). Nähere Charakterisierung soll nun erfolgen, insbesondere ob SABP 1 und ISGF3 identisch sind.

Ein weiteres ISRE-bindende Protein konnte nach Sindbisinfektion identifiziert werden und wurde SABP 4 genannt. Es war wahrscheinlich, dass SABP 4 dem DRAF1 entspricht.

Zusätzlich ist es von Interesse, ob eine Sindbisinfektion nicht nur in sekundären Mäusefibroblasten wie L929-Zellen zu einer Induktion ISRE-bindender Komplexe führt, sondern auch in primären Mäusefibroblasten der Stämme C57 black bzw. Balb C oder in primären Hühnerfibroblasten möglich ist.

III. MATERIALIEN UND METHODEN

III.1. Materialien

III.1.1 Zellen

1.1 L929

1.2 L990722, fehlender IFN Typ-II-Rezeptor (Huang et al. 1993)

1.3 MEF SV 40 6.1.4, fehlender IFN Typ-I-Rezeptor (Müller et al. 1994)

1.4 MEF α Rec. 22, wiederhergestellter IFN Typ-I-Rezeptor

III.2 Zellkultur

2.1 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 NaHCO₃

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

Das MEM wurde mit 5% fetalem Kälber Serum (FKS) komplementiert

und prophylaktisch gegen bakterielle Kontaminationen mit $2 \cdot 10^5$ U

Penicillin und Streptomycin behandelt. Der ph-Wert wurde mit NaHCO₃

und Phenolrot als Indikator auf 7,2-7,4 eingestellt (Eagle 1959).

2.2 0,25% Trypsin

2.3 PBS (pro 1l):

8,0g NaCl
0,2g KCl
1,44g Na₂HPO₄
0,24g KH₂PO₄

III.1.3 Virus

3.1 Sindbisvirus HR (Dr. Gert Wengler, Heidelberg)

3.2 Plaquetest:

PBS
2% low melting Sea-Plaque Agarose
Neutralrotlsg. 0,1g/60ml H₂O, steril filtriert
MEM mit 10% FKS
doppeltkonz. MEM mit 20% FKS

III.1.4 Kernextrakte

4.1.1 Puffer A:

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

4.1.2 Puffer C:

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

4.2 PBS: siehe Zellkultur

4.3 PBS (-Ca⁺⁺, -Mg⁺)

4.4 10% Nonidetlsg.

4.5 Proteinbestimmung:

Puffer C: s.o.

Aqua dest.

Roti®-Quant: Carl Roth GmbH Karlsruhe

III.1.5 Nucleotid-Oligomere

5.1.1 human A ISG 15-ISRE + ISG 15-ISRE Reg.Nr.6077D+6076D

5.1.2 human A PRDI + PRDI Reg.Nr.6072D+6073D,

Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe

5.2 Annealing-Puffer:

4µl 5M NaCl

20µl 1M MgCl₂

20µl 1M TrisHCl ph=7,5

Konzentrierung:

20µl 3M Na-acetat

500µl C₂HOH

70% Ethanol

20µl TE

III.1.6 Radioaktive Markierung

2,7µl Nucleotidoligos

1µl T₄ PNK Puffer

MBI Fermentas

3,8µl DEPC-H₂O2µl γ-ATP^{32P}

Amersham Pharmacia Biotech U.K.Limited

0,5µl T₄ PNK

MBI Fermentas

10mM NaHPO₄

NaAC pH6

Glycogen Merck, Darmstadt

100% Ethanol

TE

DEPC-H₂O: 100ml Aqua steril + 100µl DEPC

III.1.7 Gelretardationsverfahren

7.1 5% Polyacrylamidgel:

(ca.60 ml)

10ml Acryl Rotiphoresegel 30% Carl Roth GmbH,
Karlsruhe

3ml 5 X TBE

5 X TBE (1l):

54g Trisbase

27,5g Borsäure

20ml 0,5 M EDTA pH8,0

auf 1l mit Aqua dest. auffüllen

47ml H₂O

450µl APS 10% Fa. Serva Feinbiochemika,
Heidelberg

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

7.2 3 X Bindungspuffer:

60mM Hepes

3mM DTT

3mM EDTA

150mM KCl

12 % Ficoll
7.3 Laufpuffer: 0,25 X TBE

7.4 6X Gelladepuffer (1ml):

250µl 1 % Bromphenolblau

250µl 1 % Xylenecyanol

300µl Glycerin

200µl DEPC

7.5 Gel-Fixierer (1l):

850ml Aqua dest.

100ml Essigsäure

50 ml Methanol

7.6 Röntgenfilme Fuji RX

III.1.8. Inhibitoren:

8.1 2-Aminopurin Trockenlg. : SIGMA

8.2 Actinomycin D

8.3 Cycloheximid

III.1.9 NEM-Inaktivierung

NEM Sigma

DTT Sigma

III.1.10 IFN-Behandlung

Typ-I-Interferon, Maus, rekombinant, Calbiochem

III.1.11 Antiseren

- 11.1 IRF-2(C19),rabbit polyklonal IgG, 200µg/ml, Santa Cruz Biotechnology
- 11.2 STAT1α(C-39),rab.poly. IgG, Dilution 1:75, Hr. Th. Decker, Institut f.
Mikrobiologie und Genetik, Uni. Wien
- 11.3 IRF-3 anti-mouse rabbit serum, Takashi Fujita, Tokyo
- 11.4 IRF-1 anti-chicken rat serum (Zöller et al. 1999)

III.2. METHODEN

III.2.1 Zellen und Zellkultur

III.2.1.1 Zellkultur sekundärer Fibroblasten

Die Kultivierung der L-929 Zellen erfolgte als Oberflächenkultur in Roux-Flaschen aus Glas und für Zellkulturen in Kunststoff-Roux-Flaschen und Petrischalen (Durchmesser 10 cm).

Die Zellen erhielten Minimal Essential Medium (MEM) und zusätzlich 5%iges fetales Kälberserum.

Beim Umsetzen wurden die Zellen nach einer Einwirkzeit von 3min bei 37°C vom Boden der Petrischalen mit 0,5% Trypsin abgelöst.

III.2.1.2 Zellkultur primärer Fibroblasten

Primäre Fibroblasten wurden aus Hühnerzellen bzw. Mauszellen der Stämme C57- und Balb C angefertigt. Für die Gewinnung der Hühnerzellen wurden elf Tage alte, bebrütete Eier verwendet. Nach steriler Entnahme der Embryonen wurden diese in eiskaltem PBS präpariert. Extremitäten und innere Organe wurden entfernt, das verbleibende Gewebe in eine 50 ml-Spritze gefüllt und in einen Rundkolben mit Rührfisch gepresst.

Zum homogenisierten Gewebe kamen 150 ml PBS hinzu, das Gewebe wurde aufgeschüttelt und 10 min absitzen gelassen. Das überstehende PBS wurde abgeschüttelt und dieser Vorgang zweimal wiederholt.

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

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

Nach Anlegen einer 1:100 Verdünnung wurden die Zellen in der Fuchs-Rosenthal Zählkammer ausgezählt und so ausgesät, daß zum Zeitpunkt der Extraktgewinnung der Zellrasen konfluent war.

III.2.2 Virus und Infektion

Die Aufbewahrung der Sindbisviren erfolgte in Stocklösungen bei -80°C in einer Konzentration von $4 \cdot 10^9$ Virus pro ml. Die m.o.i. (multiplicity of infection) wurde aus dem Produkt von Virustiter und Volumen der Viruslösung, geteilt durch die Zellzahl, berechnet.

Zur Bestimmung des Virustiters wurde eine Verdünnungsreihe der Viruslösung in Zehnerschritten in PBS angefertigt. Nach Absaugen des Mediums von den Petrischalen, folgte ein Waschschriff mit PBS, 37°C , welches dann von den Zellen entfernt wurde. Anschließend wurden $50\mu\text{l}$ Virusverdünnung gleichmäßig in der Schale aufgetragen und die Petrischalen für 1h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Währenddessen wurde niedrig schmelzende 2% Sea-Plaque-Agarose mit doppelkonzentriertem MEM (20% FKS) 1:1 versetzt. Diese Mischung wurde bei $39-40^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad gehalten. Nach 1h Virusadsorption ließ man je 2ml des Agarose-Mediumgemisches vom Rand her in die Platten fließen. Nun wurden die Platten bei Raumtemperatur verfestigt und dann 24h bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

Nach 24 h wurde der Farbagar bereitet, indem 0,1g Neutralrot in 60ml Aqua dest. gelöst und steril filtriert wurde. Nun wurden 2ml Neutralrotlsg. auf 30ml Agarose-Medium gemischt, s.o. Hiervon wurde 1ml auf die Platten gegeben und bei Raumtemperatur verfestigt. Erneut folgte eine Inkubation von 24h im Brutschrank bei 37°C . Dann wurden die Plaques der einzelnen Verdünnungsschritte ausgezählt.

Der Virustiter in PFU (plaque forming units) pro ml ließ sich aus dem Produkt aus Plaquezahl, Virusverdünnung und dem Faktor 20 berechnen.

Zur Virusinfektion wurde das Medium von den konfluenten Zellen der Petrischale abgezogen und diese mit PBS bei 37°C gewaschen.

Die Adsorptionslösung, bestehend aus 1 ml PBS pro Petrischale und berechneter Virusmenge, wurde gleichmäßig auf den Zellrasen verteilt. Die uninfizierten Kontrollen wurden mit einer Scheininfektionslösung behandelt, welche nur PBS ohne Viruslösung enthielt. Die Petrischalen wurden nun für 1h in

den Brutschrank bei 37°C gestellt und alle 15 min geschwenkt. Anschließend wurde das PBS entfernt und die Zellen in der Petrischale mit MEM bedeckt. Die Petrischalen wurden nun bis zum Zeitpunkt der Gewinnung der Extrakte im Brutschrank aufbewahrt.

III.2.3. Inhibitorversuche

III.2.3.1 Aminopurinversuch

Als Inhibitor der PKR wurde 100 mM Aminopurin verwendet. Die Petrischalen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Einem Teil der Schalen wurden dabei jeweils zusätzlich 20 µl Aminopurin zugegeben.

Nun fand eine Vorinkubation für 30 min mit 10 ml MEM und 20 µl Aminopurin statt.

Das MEM wurde abpipettiert und der Infektions- bzw. Scheininfektionslösung wurden 2 µl Aminopurin hinzugefügt. Nach 60 min wurden die Lösung abgezogen und mit 10 ml MEM und zusätzlich 20 µl Aminopurin für 18 h inkubiert.

Zur Kontrolle wurde ein Teil der infizierten bzw. uninfizierten Petrischalen nicht mit Aminopurin behandelt.

Die Gewinnung der Kernextrakte erfolgte wie üblich (s.u.).

III.2.3.2 Actinomycinbehandlung

Das Versuchsprotokoll entsprach dem Aminopurinprotokoll. Als Inhibitor wurden 5 µg Actinomycin D pro ml MEM bzw. PBS verwendet.

III.2.3.3 Cycloheximidbehandlung

Das Protokoll entsprach dem Aminopurinprotokoll. Als Inhibitor wurden 50 µg Cycloheximid pro ml MEM bzw. PBS verwendet.

III.2.4 IFN-Behandlung

Das Protokoll entsprach der Virusinfektion, nur daß anstatt des Virus pro ml MEM 10^3 U IFN hinzugefügt wurden.

III.2.5 Gewinnung der Kernextrakte

Ca. 18h post infectionem wurde das Medium von den in die Petrischalen eingesäten, konfluenten Zellen abgenommen. Zur Herstellung der Zeitkurve wurden die Extrakte zu entsprechend anderen Zeitpunkten gewonnen. Der Zellrasen wurde mit 10 ml PBS (frei von Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Wiederholt wurden 5 ml PBS aufgetragen und die Zellen nun mit einem Gummischaber vom Boden abgelöst. Nach abziehen dieser Suspension wurde nochmals mit 5 ml PBS gespült und die insgesamt 10 ml Zelllösung anschließend für 5 min bei 4°C in einem Spitzröhrchen mit 15000rpm zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes und Resuspension mit 5 ml PBS schloß sich eine zweite Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 12000rpm an. Das Pellet wurde trockengelegt, dann mit $1400\mu\text{l}$ Puffer A gelöst und für 15 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von $100\mu\text{l}$ 10% Nonidetlsg. schloß sich 10 sekundiges Vortexen und ein Zentrifugieren von 30s, 12000 rpm bei 4°C an. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in $80\mu\text{l}$ Puffer C gelöst. Diese Lösung wurde nun für 15min bei 4°C auf den Schütteltisch gestellt. Schließlich wurde für 5min bei 14000 rpm, 4°C , zentrifugiert und der Überstand, der den Kernextrakt darstellt, aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren.

III.2.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Hierfür wurden 2µl der Kernextrakte zu 800µl Aqua dest. in eine Mikroküvette bei Raumtemperatur (RT) gegeben. Als Indikator wurde 20 µl Roti®-Quant beigefügt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Zur Herstellung der Null-Wert-Probe wurde anstelle des Proteins 2µl Puffer C beigemischt. Nach 20min wurden die optische Dichte bei 595nm im Photometer gemessen. Anhand einer Eichkurve wurde der Proteingehalt berechnet.

III.2.7 Herstellung von Doppelstrang-ISRE

Als Endkonzentration wurde 359pm dsISRE pro 200µl angestrebt. Entsprechend den Mengenangaben des Herstellers wurden Sense- und Antisensestrang vereint und mit Annealing Puffer versetzt. Der Ansatz wurde auf 200 µl mit H₂O aufgefüllt, 10min auf 75°C erhitzt und schließlich 3h auf RT abgekühlt.

Um den Ansatz zu konzentrieren wurden die Oligos mit Na-Acetat und 100% Ethanol versetzt. Es erfolgte ein Zentrifugieren mit 14000 rpm für 10 min. Das Pellet wurde mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen und wiederholt 10 min mit 14000 rpm zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurde das Pellet mit 5 µl TE gelöst und somit ein ca. 30-fache Konzentrierung erzielt. Die Aufbewahrung der ds-ISRE erfolgte bei -20°C.

III.2.8 Radioaktive Markierung der DNA

ISG15- bzw. PRDI-Oligonucleotide wurden mit ³²P-γ-ATP wie folgt markiert:

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

Nach 3 min abkühlen bei 4°C wurden 0,5µl T4 PNK hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz bei 37°C 1h lang inkubiert.

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

Der Ansatz wurde auf die NAP-Säule gegeben, mit 400 µl Na_2HPO_4 achtmal eluiert und das jeweilige Eluat in 8 Caps auf Eis gesammelt. Pro Fraktion Eluat wurden 1 µl entnommen, um deren Aktivität im Szintigraphen zu bestimmen.

Die einzelnen Fraktionen wurden mit 40 µl NaAC (pH 6), 1 µl Glycogen und 880 µl 100% Ethanol bei 4°C gefällt und für 15 min bei RT stehen gelassen. Schließlich wurde 15 min bei 4°C mit 12000 rpm zentrifugiert. Nach abpipettieren der Überstände wurden die Fraktionen mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen und nochmals bei 4°C 10 min mit 12000 rpm zentrifugiert.

Die Überstände wurden abgenommen und die Pellets 5 min bei 37°C getrocknet, dann mit 20 µl 1xTE gelöst und für 10 min bei 4°C stehen gelassen.

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

III.2.9 Gelretardationsverfahren (engl. eletrophoresis mobility shift assay)

Die Reaktionsvolumina pro Ansatz betragen 15 µl. Diese bestanden aus 5 µl 3x Bindungspuffer, 2,5 µl poly dI:dC und aus 1 µl radioaktiver Probe, welche eine Aktivität von ca. 20000cpm besaß und in DEPC-Wasser gelöst war. Der Ansatz wurde für 10min auf Eis gestellt und anschließend mit ca. 10 µg Protein vereinigt. Mit entsprechendem Volumen Puffer C wurde das Endvolumen von 15 µl erreicht. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 30min bei 4°C wurden zu der Probenkontrollspur 3 µl 6 X Gelladepuffer zugefügt. Zur Auftragung auf ein 5 % Polyacrylamid-Gel wurden die Reaktionsvolumina halbiert und so in zwei Geltaschen geladen. Als Laufpuffer wurde 0,25 X TBE verwendet. Die Auftrennung erfolgte mit einer Spannung von 200V über einen Zeitraum von ca. 3h. Die Röntgenfilme wurden bei -80°C entsprechend lange belichtet und auf einem Mustek 600 Scanner mit Paint Shop Pro gescannt. Auf den nativen Röntgenfilmen sind die Banden am deutlichsten sichtbar. In den meisten Graphiken sind nur ein oder zwei Bahnen pro Extrakt dargestellt.

III.2.10 NEM-Inaktivierung

Hierfür wurden den Kernextrakte 0,5 μ l NEM (50mM) zugegeben. Nach 20 min bei RT wurden die Ansätze für 5 min in Wassereis gestellt. Die Zugabe von 0,6 μ l DTT (250 mM) sollte die Reaktion stoppen. Nach 10 min wurde mit obigen Gelretardationsverfahren weiter gearbeitet.

III.2.11 Supershift-Assay

Im Supershift-Assay wurden die Kernextrakte, bevor sie mit dem radioaktiven Reaktionsvolumen vereinigt wurden, 1h bei 4°C mit den jeweiligen Antiseren inkubiert. Das Volumen der Antiseren betrug 0,5 μ l.

IV. ERGEBNISSE

IV. Der Bindungskomplex SABP 1

IV.1.1 NEM-Alkylierung von SABP 1

Nach Infektion mit Sindbisvirus konnte in L929-Zellen ein ISRE-bindendes Protein induziert werden (s. Abb. 1). Es wurde als SABP 1 (Sindbis Activated Binding Protein) bezeichnet. SABP 1 erschien außerdem in Versuchen nach Infektion mit NDV, Behandlung mit poly rI:rC und Gabe von α -IFN (Behr et al. 2001). Die vergleichsweise kurze Laufstrecke im Gelretardationsverfahren wies auf ein relativ großes Protein hin, das an das ISRE bindet.

Werden Proteine der IRF-Familie alkyliert, verlieren sie ihre DNA-bindende Fähigkeit. N-Ethylmaleimid (NEM) alkyliert Sulfhydrylgruppen (Levy et al. 1989). Um zu testen, ob auch SABP 1 empfindlich gegenüber NEM ist, wurden Kernextrakte aus Sindbis infizierten Zellen gewonnen. Scheininfizierte und infizierte Zellen wurden vor der Bindungsreaktion mit der markierten DNA-Probe mit NEM behandelt. Zur Kontrolle wurden zusätzlich scheininfizierte und infizierte Extrakte ohne NEM auf das Gel geladen. Es zeigte sich, daß SABP 1 in den infizierten Extrakten ohne NEM nachweisbar ist. In den mit NEM behandelten Extrakten bindet SABP 1 jedoch nicht an die Probe. So wurde bewiesen, daß die DNS-Bindung von SABP 1 empfindlich gegenüber der Alkylierung durch NEM ist und einen Transkriptionsfaktor der IRF-Gruppe enthält.

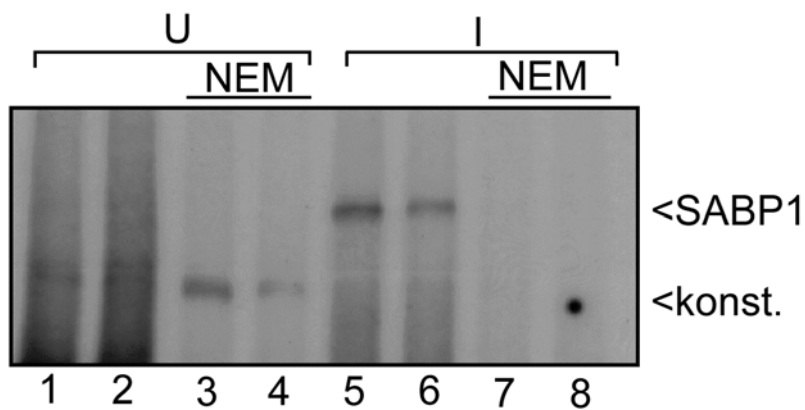


Abb. 1 NEM-Inaktivierung von SABP 1

L929-Zellen wurden scheininfiziert oder mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert. Extraktgewinnung erfolgte 18 Stunden nach Infektion. Die Extrakte mit NEM-Behandlung wurden vor der ISRE-Bindungsreaktion mit 50 mM NEM und 250 mM DTT behandelt (s. Material und Methoden). Die Extrakte wurden anschließend mit einer ISG15-Probe im Gelretardationsverfahren getestet, Laufzeit 3 Stunden, Spannung 200 V, Raumtemperatur (RT), Belichtung 20 Tage. Spuren 1,2: uninfiziert, Spuren 3,4: uninfiziert und NEM-Behandlung, Spuren 5,6: infiziert, Spuren 7,8: infiziert und NEM-Behandlung. Die Position von SABP 1 und einer konstitutiven (konst.) Bande ist eingezeichnet. SABP 1 verschwindet in Spur 7,8.

IV.1.2 Ist PKR-Aktivität notwendig für Induktion von SABP 1?

Das Genom des Sindbisvirus liegt während seines Replikationszyklus partiell als doppelsträngige RNA vor (Strauss 1994). Die PKR, welche Serin- bzw. Threoninreste phosphoryliert, ist in diesem Zusammenhang eine sehr interessante Proteinkinase, da sie von doppelsträngiger RNA abhängig ist. Wird diese blockiert, wird auch die Aktivierung von manchen ISG unterdrückt (Wathelet et al.1989). Demnach könnte die PKR auch eine Rolle in der Aktivierung von SABP 1 besitzen. Um dies zu prüfen, wurde der Einfluss von 2-Aminopurin, ein spezifischer Inhibitor der PKR, untersucht. Ein Teil der Zellen wurde während der Infektion mit Sindbisvirus zusätzlich mit 2-Aminopurin behandelt. Kernextrakte wurden von scheininfizierten und mit Sindbisvirus infizierten L929-Zellen hergestellt. Die Extrakte wurden mit einer ISG -15 Probe im Gelretardationsverfahren getestet. Das Erscheinen von SABP 1 wurde von diesem

Inhibitor nicht beeinflusst (s. Abb. 2, Spur 7 bzw. 8) und zeigte, daß SABP 1 unabhängig von der mit 2-Aminopurin gehemmten PKR aktiviert wird.

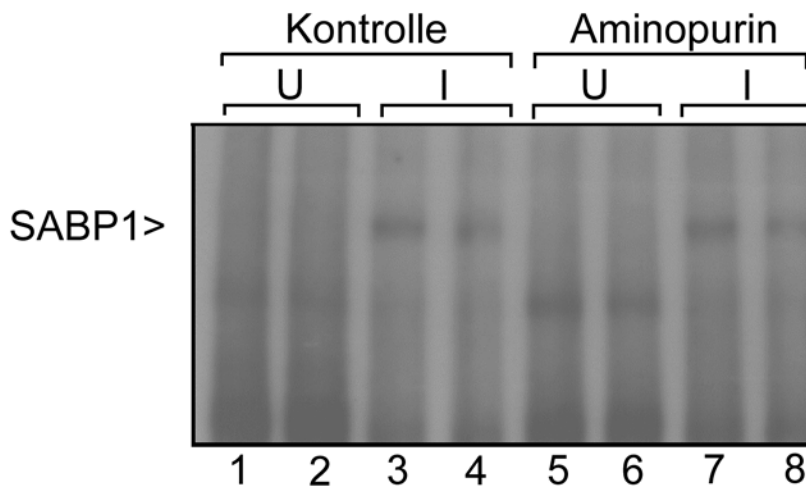


Abb. 2 Ist die PKR-Aktivität notwendig für die Induktion von SABP 1?

L929-Zellen wurden scheininfiziert (Spuren 1,2), mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert (Spuren 3,4), scheininfiziert und mit Aminopurin behandelt oder mit 60 PFU/Zelle infiziert und mit Aminopurin behandelt (Spuren 7,8). Extraktgewinnung erfolgte 18 Stunden nach Infektion. Die Kernextrakte wurden mit einer ISG15-Probe im Gelretardationsverfahren getestet, RT, 5%iges Gel, Laufzeit 3 Stunden, Spannung 200V, Belichtung 9 Tage. Die Position von SABP 1 ist eingezeichnet. SABP 1 erscheint auch unter Aminopurinbehandlung (Spuren 7,8).

IV.1.3 SABP 1 enthält STAT 1

SABP 1 war also durch die Infektion mit Sindbisvirus aktivierbar (s.o.). Auch durch NDV, poly rI:rC, α -IFN war eine Induktion möglich (Behr et al.). SABP 1 war unempfindlich gegenüber 2-Aminopurin, sensitiv gegenüber NEM (s.o.) und es handelt sich um ein relativ großes Protein. All diese Beobachtungen treffen auch für das bekannte ISGF3 zu (Yoneyama et al. 1997, Fu et al. 1990, Bovolenta et al. 1995, Levy et al. 1989). Sind nun SABP 1 und ISGF3 identisch?

Eine der Untereinheiten von ISGF3 ist STAT-1 (Fu 1992). Binden nun STAT-1-Antikörper das SABP 1, würde dies weiter dafür sprechen, daß es identisch mit ISGF3 ist. Hierfür wurden Kernextrakte aus mit Sindbisvirus infizierten L929-Zellen vor der DNA-Bindungsreaktion mit STAT-1-Antiserum inkubiert. Im Gelretardationsverfahren zeigte sich, daß unter der Verwendung von STAT-1-Antiserum SABP 1 gebunden wird. Daher ist zu schließen, daß SABP 1 dem ISGF3 entspricht (s. Abb. 3, Spur 4).

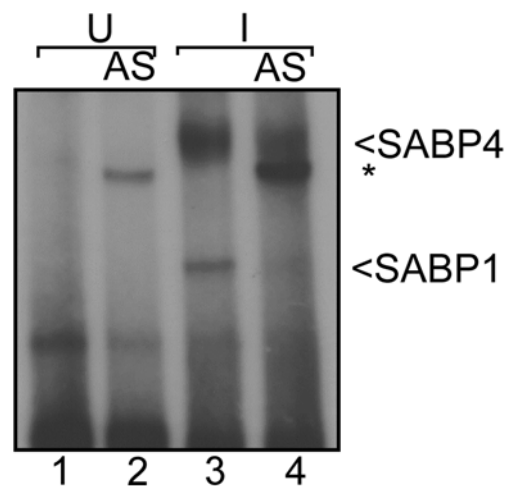


Abb. 3 SABP 1 enthält STAT-1.

L929-Zellen wurden scheininfiziert oder mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert. Extraktgewinnung erfolgte 18 Stunden nach Infektion. Vor Auftragen auf das Gel wurden die Kernextrakte mit Antiserum (AS) gegen STAT-1 für 1h inkubiert und mit einer ISG15-Probe mit Gelretardationsverfahren getestet, Laufzeit 3 Stunden, Spannung 200 V, RT. Spur 1 uninfiziert. Spur 2 uninfiziert mit AS. Spur 3 infiziert. Spur 4 infiziert mit AS. Die Position von SABP 1 ist eingezeichnet. SABP 1 verschwindet in Spur 4. Das Antiserum bindet auch unspezifisch an die radioaktive Probe (*). Beschreibung von SABP 4 s. Kap. IV.2.

IV.2.1 Der Bindungskomplex SABP 4

IV.2. Der Bindungskomplex SABP 4 in Zellen vom Typ L990772 und L929

Neben SABP1 konnte ein zweites ISRE-bindendes Protein durch das Sindbisvirus induziert werden. Es wurde als SABP 4 bezeichnet und besaß eine geringere elektrophoretische Mobilität als SABP1 (s. Abb.4).

Neben der durch INF-induzierten Jak-STAT-Kette war es von Interesse zu untersuchen, ob auch eine direkte Aktivierung von ISGs in Abwesenheit der Proteinsynthese durch DRAF 1 in der mit Sindbisvirus infizierten Zelle ausgelöst werden kann.

SABP 4 wurde erstmals in L929-Zellen entdeckt (s. Abb.4, Spur. 6 bzw. 7). Ruft nun Sindbisinfektion auch in alternativen Zelllinien eine vergleichbare Bande hervor? Deshalb wurden L990772-Zellen, eine sich aus L929-Zellen ableitende Mauszelllinie, mit Sindbisvirus infiziert und davon Kernextrakte hergestellt. Im Gelretardationsverfahren erschien mit einer radioaktiv markierten ISG15-Probe eine Bande, die bezüglich Größe und Laufstrecke dem SABP 4 in L929-Zellen entspricht (s. Abb. 4). Zusätzlich ist zu erkennen, daß eine konstitutive Bande in den uninfizierten Spuren nach Infektion verschwindet. Hier werden also Proteine im Rahmen der Infektion deaktiviert.

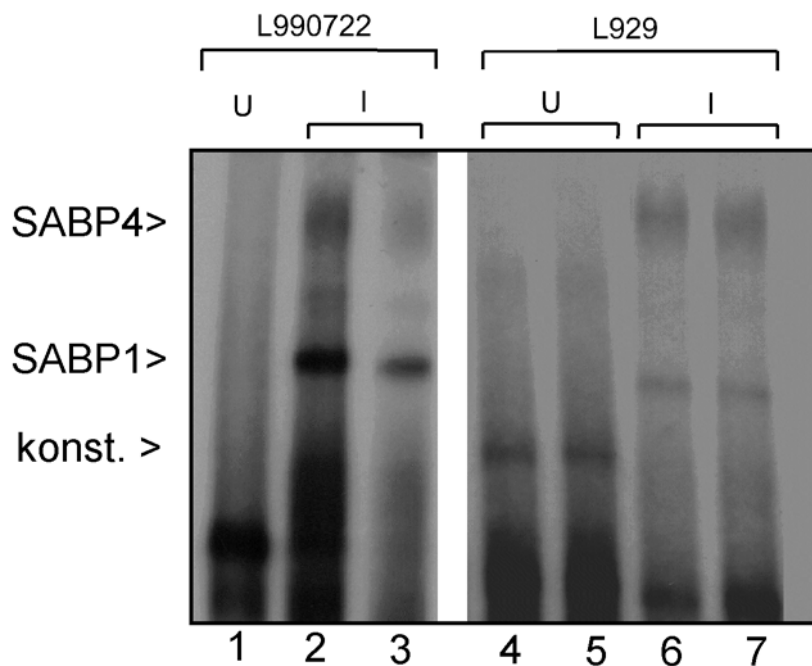


Abb.4 Induktion SABP 4 in L990772- und L929-Zellen.

L990772- bzw. L929-Zellen wurden scheininfiziert (Spur 1,4,5), mit 30 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert (Spur 2,3) oder mit 60 PFU (Spur 6,7) sindbisinfiziert. Nach 18 h wurden Kernextrakte gewonnen und diese mit einer ISG15-Probe im Gelretardationsverfahren getestet. Laufzeit 3 Stunden, RT, 5%iges Gel, Spannung 200V, Belichtungszeit 25 Tage (L990772) bzw. 3Tage (L929). In Spur 2,3 und 6,7 ist SABP 4 zu sehen, welches nicht in Spur 1 und 4,5 zu erkennen ist. Die Position von SABP 4, SABP 1/ISGF3 und dem konstitutiven (konst.) Protein ist eingetragen.

IV.2.2 Multiplizitätsabhängigkeit der Induktion von SABP 4

Um zu untersuchen, inwiefern SABP 4 mit der infizierenden Virusmenge korreliert, sollte mit steigender PFU-Zahl beimpft werden. L929-Zellen wurden mit 15,30,60 bzw. 100 PFU pro Zelle mit Sindbisvirus infiziert. Die gewonnenen Kernextrakte zeigten im Gelretardationsverfahren bei sämtlichen Virusmengen SABP 4 (s. Abb. 5).

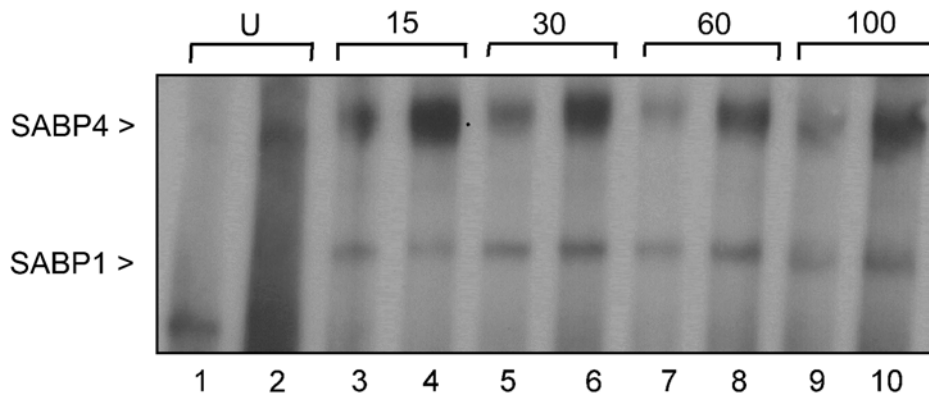


Abb. 5 Multiplizitätsabhängigkeit der Induktion von SABP 4.

L929-Zellen wurden scheininfiziert (Spur 1,2) oder mit 15 (Spur 3,4), 30 (Spur 5,6), 60 (Spur 7,8), oder 100 PFU/Zelle (Spur 9,10) mit Sindbisvirus infiziert. Nach 18 Stunden wurden Kernextrakte gewonnen und diese mit einer ISG15-Probe getestet. Laufzeit 3 Stunden, RT, 5%iges Gel, Spannung 200V, Belichtungszeit 11 Tage. SABP 4 ist in Spur 1,2 nicht, in Spur 3-10 zu erkennen. Die Position von SABP 4 und SABP 1/ISGF3 ist eingezeichnet

IV.2.3 Zeitlicher Verlauf der Induktion von SABP 4

Das Erstellen einer Zeitkurve sollte das Auftreten von SABP 4 in der infizierten Zelle näher bestimmen. L929-Zellen wurden mit Sindbisvirus infiziert. Kernextrakte wurden nach 5,9, 11, bzw. 14,5 Stunden nach Infektion gewonnen und mit einer radioaktiv markierten ISG-15-Probe im Gelretardationsverfahren untersucht. In den infizierten Zellen tauchte SABP 4 deutlich ab 9 Stunden nach Infektion auf (s. Abb. 6).

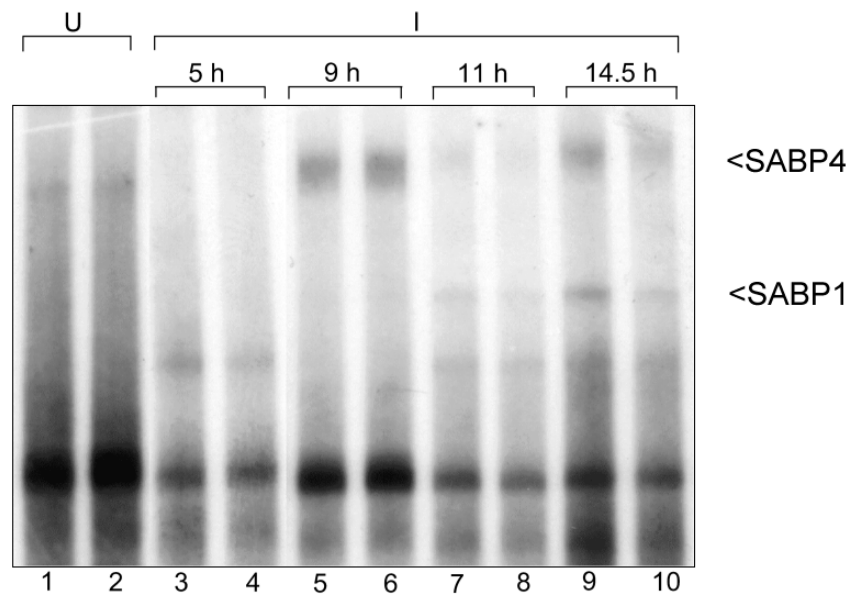


Abb. 6 Zeitlicher Verlauf der Induktion von SABP 4.

L929-Zellen wurden scheininfiziert (Spur 1,2) oder mit Sindbisvirus infiziert (Spur 3-10). Die Kernextrakte wurden nach 5 Stunden (Spur 3,4), 9 Stunden (Spur 5,6), 11 Stunden (Spur 7,8) und 14,5 Stunden (Spur 9,10) nach Infektion gewonnen und im Gelretardationsverfahren mit einer ISG15-Probe getestet. Laufzeit 3 Stunden, 5%iges Gel, Spannung 200V, Belichtungszeit 18 Tage. SABP 4 ist in Spur 1,2 nicht, in Spur 5-10 zu erkennen. SABP 4 und SABP1/ISGF3 sind eingezeichnet.

IV.2.4 SABP 4 bindet nicht an PRDI

Oben wurde gezeigt, daß SABP 4 an das ISRE bindet, welches im ISG-15 enthalten ist. Bindet SABP 4 auch an den PRD-I-Abschnitt in der Promotorregion des IFN-Abschnitts? Dazu wurde anstatt einer ISG15-Probe eine PRDI-Probe radioaktiv markiert. Kernextrakte, die zum SABP 4-Nachweis im Gelretardationsverfahren verwendet worden waren, wurden nun mit der markierten PRDI-Probe getestet. Es zeigte sich, daß das SABP 4 nicht nachweisbar ist, also nicht an PRDI bindet (s. Abb. 7). Zum Vergleich wird das schneller wandernde SABP 1/ISGF 3 aber deutlich gebunden.

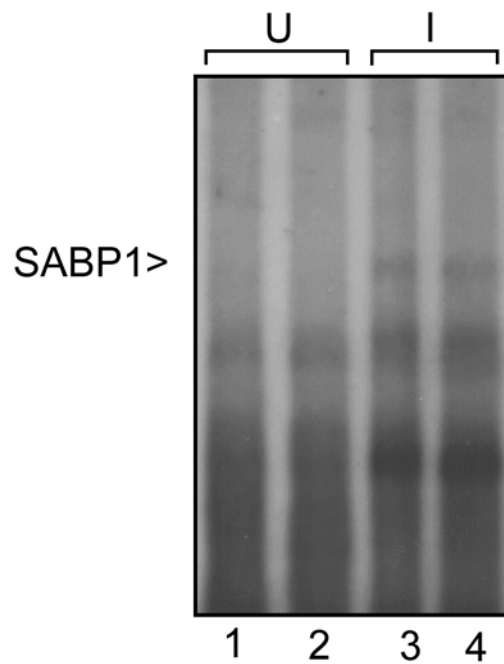


Abb. 7 SABP 4 bindet nicht an PRDI.

L929-zellen wurden scheininfiziert (Spur 1,2) oder mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert (Spur 3,4). Nach 18 Stunden wurden Kernextrakte gewonnen und diese mit einer radioaktiv markierten PRDI-Probe getestet. Laufzeit 3 Stunden, 5%iges Gel, Spannung 200V, Belichtungsdauer 18 Tage. Der langsam migrierende Komplex SABP4 ist in den Spuren 1-4 nicht zu erkennen.

IV.2.5 Ist PKR-Aktivität notwendig für die Induktion von SABP 4?

Die PKR hat eine zentrale Funktion in der Physiologie und Signalübertragung der Zelle. Dieser Versuch wurde vergleichbar zur Untersuchung von SABP 1 (s. Kap. IV.1.2.) durchgeführt:

2-Aminopurin ist ein spezifischer Inhibitor der PKR. Zellen wurden mit und ohne Aminopurin behandelt. Die infizierten Kernextrakte aus aminopurinbehandelten Zellen zeigten im Gelretardationsverfahren keinen Unterschied zu den aus infizierten, aber nicht aminopurinbehandelten Zellen (s. Abb. 8). Daher spielt die PKR bei der Aktivierung von SABP 4 keine Rolle.

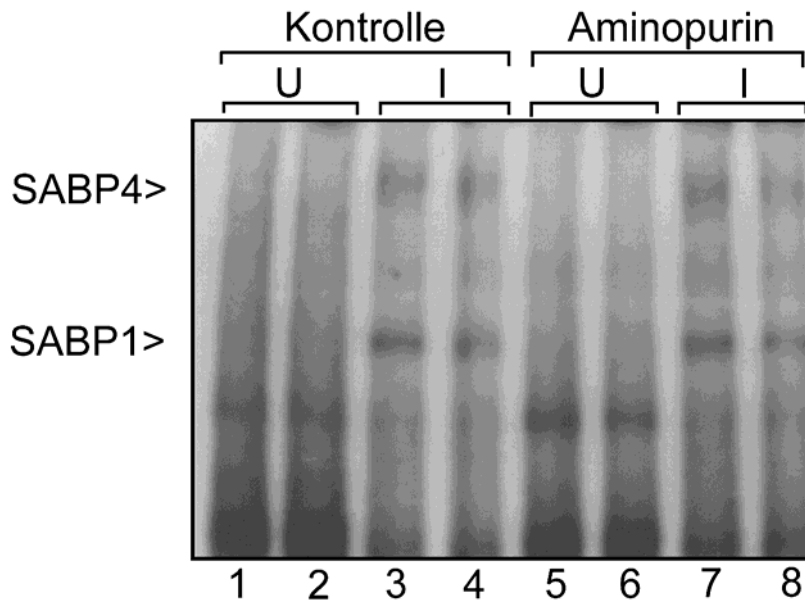


Abb. 8 Ist die PKR-Aktivität notwendig für die Induktion von SABP 4?

L929-Zellen wurden scheininfiziert (Spur 1,2), mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert (Spur 3,4), scheininfiziert und mit Aminopurin behandelt (Spur 5,6) oder mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert und mit Aminopurin behandelt (Spur 7,8). Laufzeit 3 Stunden, 5%iges Gel, Spannung 200V, Belichtungsdauer 18 Tage. SABP 4 ist in Spur 3,4 und Spur 7,8 zu erkennen.

IV.2.6 Transkription zellulärer Gene und Induktion von SABP 4

Von großem Interesse war schließlich, ob für die Induktion von SABP 4 zelluläre RNA-synthese notwendig ist. Zur Klärung dieser Frage wurde der Effekt des Transkriptioninhibitor Actinomycin D untersucht. Hierfür wurden L929-Zellen mit Sindbisvirus infiziert und ein Teil mit Actinomycin behandelt. Die gewonnenen Extrakte wurden mit einer ISG15-Probe im Gelretardationsverfahren getestet. SABP 4 tauchte sowohl in den mit Inhibitor behandelten, als auch in den unbehandelten, infizierten Kontrolleextrakten auf (s. Abb. 9). Behandlung mit Actinomycin ohne Infektion als Kontrolle, führte zu keiner Induktion des Komplexes. SABP 4 ist also von der zellulären Transkription unabhängig und wird durch Sindbisvirus nur aktiviert.

An dieser Stelle muß erinnert werden, daß Actinomycin die IFN-Wirkung hemmt (Taylor 1964). SABP 4 ist in diesem Versuch trotzdem nachweisbar. Deshalb ist davon auszugehen, daß SABP 4 nicht über IFN aktiviert wird.

IV.2.7 Wird SABP 4 in Abwesenheit der Proteinsynthese induziert?

Cycloheximid hemmt die Elongation der Proteinsynthese. Um zu sehen, ob die Induktion von SABP4 abhängig von der Translation ist, wurden L929-Zellen mit Sindbisvirus infiziert und ein Teil der Kulturen zusätzlich mit Cycloheximid behandelt. Zur Kontrolle wurden Zellen nur scheininfiziert bzw. scheininfiziert und mit Cycloheximid behandelt. Die gewonnenen Kernextrakte wurden mit einer ISG15-Probe im Gelretardationsverfahren untersucht. Es zeigte sich, daß SABP 4 durch Cycloheximidbehandlung nicht mehr nachweisbar ist, ebenso taucht SABP1/ISGF3 nicht mehr auf (s. Abb. 9). Dies ist dadurch zu erklären, daß die Hemmung der Proteinsynthese auch die RNA-Synthese des Virus hemmt. Dies weist darauf hin, daß für die Aktivierung von SABP4 virale RNA als Agens dienen könnte.

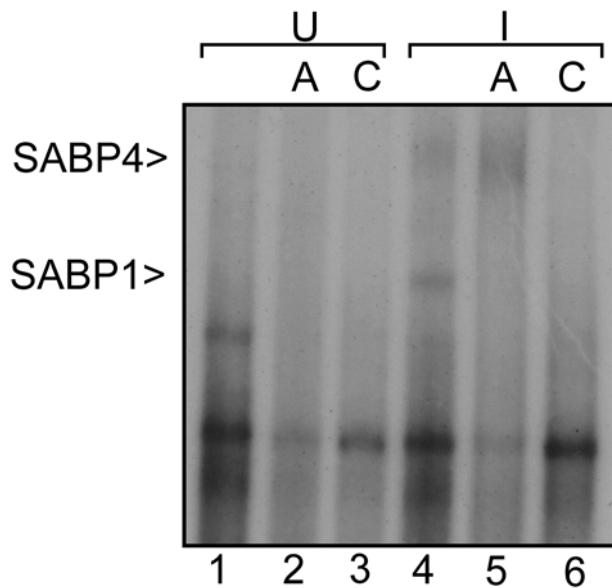


Abb.9 Der Einfluss von Actinomycin und Cycloheximid auf SABP 4.

L929-zellen wurden scheininfiziert (Spur 1), scheininfiziert und mit Actinomycin (A) behandelt (Spur 2), scheininfiziert und mit Cycloheximid (C) behandelt (Spur 3), mit jeweils 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert (Spur 4), infiziert und mit Actinomycin (A) behandelt (Spur 5) oder infiziert und mit Cycloheximid (C) behandelt (Spur 6). Nach 18 Stunden wurden Kernextrakte gewonnen und diese im Gelretardationsverfahren mit einer ISG15-Probe getestet. Laufzeit 3 Stunden, 5%iges Gel, Spannung 200V, Belichtungsdauer 20 Tage. SABP 4 ist in Spur 4,5 zu sehen, die Position von SABP 1/ISGF3 ist eingezeichnet.

IV.2.8 Stimulation von SABP 4 durch α -IFN

Wie in der Diskussion ausführlich besprochen wird, ist der Cycloheximidversuch nicht eindeutig zu interpretieren. Daher wurde untersucht, ob SABP 4 abhängig von α -IFN ist. Für diesen Versuch wurde die Zelllinie L990722 mit Sindbisvirus infiziert oder mit α -IFN behandelt. Zur Kontrolle wurden L990722 Zellen scheininfiziert bzw. nicht mit α -IFN behandelt. Die gewonnenen Kernextrakte wurden im Gelretardationsverfahren verglichen. Dabei zeigte sich, daß SABP 4 in den infizierten Zellen nachweisbar ist, in den α -IFN behandelten Zellen aber nicht zu sehen ist. Das

bekanntermaßen IFN-abhängige SABP 1/ISGF 3 taucht jedoch in den α -IFN-behandelten Zellen auf (s. Abb. 10). Es ist deshalb zu schließen, daß SABP 4 nicht von α -IFN stimuliert wird.

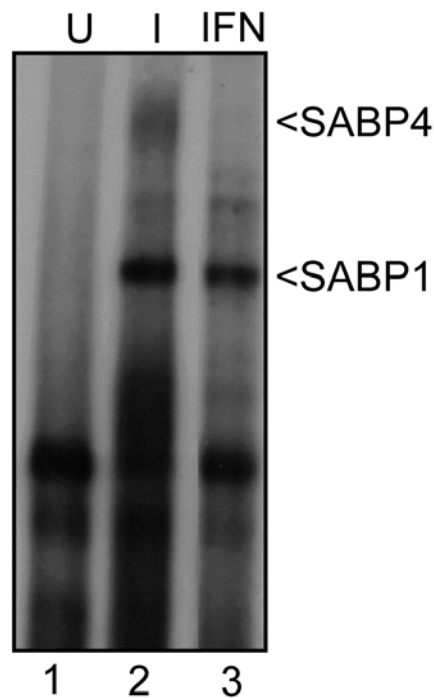


Abb.10 Stimulation von SABP 4 durch α -IFN.

L990722 Zellen wurden scheinbehandelt (Spur 1), mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert (Spur 2) oder mit α -IFN behandelt (Spur 3). Nach 18 Stunden wurden Kernextrakte gewonnen und diese im Gelretardationsverfahren mit einer ISG15-Probe getestet. Laufzeit 3 Stunden, 5%iges Gel, Spannung 200V, Belichtungsdauer 25 Tage. SABP 4 ist in Spur 2 zu sehen. Die Position von SABP 1/ISGF 3 ist eingezeichnet.

IV.2.9 Wird SABP 4 durch IFN-Typ-I induziert ?

Nach obigen Ergebnissen ist die Induktion von SABP 4 sehr wahrscheinlich unabhängig von IFN-Typ I (s. Kap. IV.2.7). Um dies zu überprüfen, wurde die Induktion von SABP 4 in Mäuseembryofibroblasten (MEF), die keinen funktionierenden Typ-I-IFN-Rezeptor besaßen, durchgeführt. Als Kontrolle wurden MEF in den Versuch einbezogen, deren Typ-I-IFN-Rezeptor rekonstituiert worden war. Nach Infektion mit Sindbisvirus zeigte sich im Gelretardationsverfahren, daß sowohl in den Zellen ohne Typ-I-IFN-Rezeptor als auch in den Zellen mit rekonstituiertem Rezeptor, SABP 4

auftauchte (s. Abb. 11). Dagegen erschien in den rezeptorlosen Zellen SABP 1/ISGF3 nicht, von dem erwiesen ist, daß es unabhängig von Typ-I-IFN (s.o.) ist. So wurde bewiesen, daß SABP 4 unabhängig von IFN aktiviert wird.

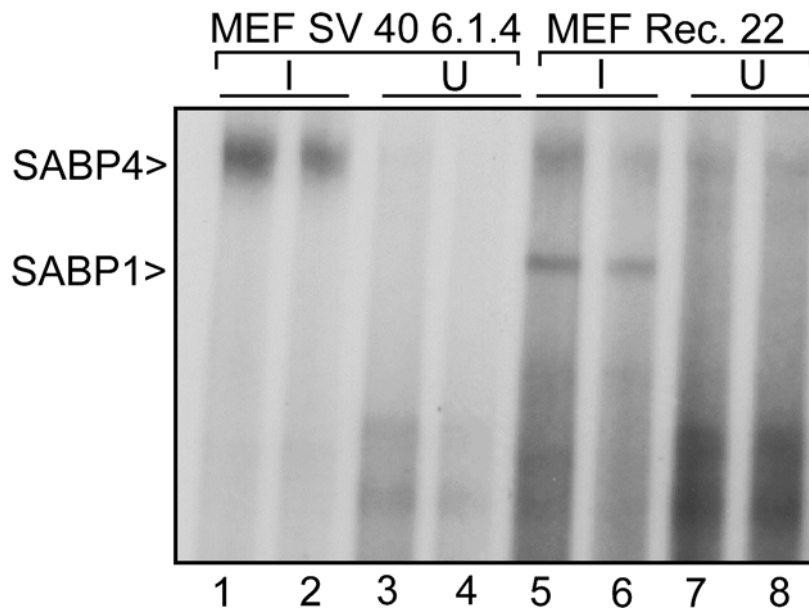


Abb.11 Wird SABP 4 über Typ-I-IFN induziert ?

MEF ohne Typ-I-IFN-Rezeptor wurden scheininfiziert (Spur 3,4), mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert (Spur 1,2), MEF mit rekonstituiertem Rezeptor scheininfiziert (Spur 7,8) oder mit 60 PFU/Zelle infiziert (Spur 5,6). Nach 18 Stunden wurden Kernextrakte gewonnen und im Gelretardationsverfahren mit einer ISG15-Probe getestet. Laufzeit 3 Stunden, 5%iges Gel, Spannung 200V, Belichtungsdauer 14 Tage. SABP 4 ist in Spur 1,2,5,6 zu sehen. Zum Vergleich ist in Spur 5,6 SABP 1/ISGF3 zu erkennen.

IV.2.10 Enthält SABP 4 IRF-2, STAT1, IRF-3 bzw. CBP/p300 ?

Zur weiteren Charakterisierung der Zusammensetzung von SABP 4 wurden Versuche mit Antiseren durchgeführt. Kernextrakte von mit Sindbisvirus infizierten L929-Zellen wurden mit verschiedenen Antiseren inkubiert. Bei der Verwendung von Antiseren gegen IRF-2 bzw. STAT1 zeigte sich, daß diese Antikörper nicht an SABP 4 binden (s. Abb. 12 bzw. Abb. 13). Nach Inkubation mit IRF-3-Antiserum kam es jedoch zum Shift von SABP 4 (s. Abb. 14). Antiserum gegen CBP/p 300 interagiert ebenfalls mit dem

neuen Protein (Behr et al. 2001). Da IRF-3 und CBP/p 300 Bestandteile von DRAF-1 sind (Weaver et al. 1997), kann SABP 4 mit DRAF-1 gleichgesetzt werden.

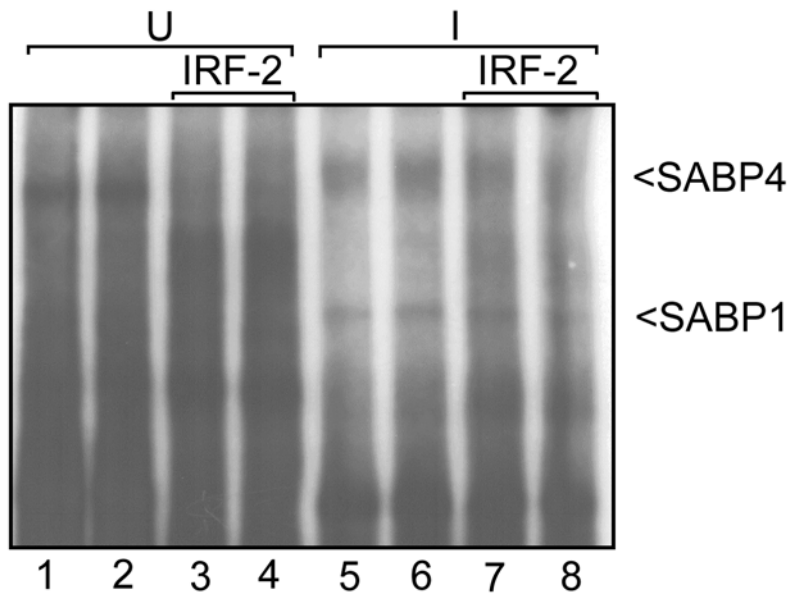


Abb.12 Enthält SABP 4 IRF-2 ?

L929-Zellen wurden scheininfiziert (Spur 1-4) oder mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert (Spur 5-8). Nach 18 Stunden wurden Kernextrakte gewonnen und ein Teil dieser für 1 Stunde mit Antiserum gegen IRF-2 inkubiert (Spur 3,4 und 7,8) und im Anschluß im Gelretardationsverfahren mit einer ISG15-Probe getestet. Laufzeit 3 Stunden, 5%iges Gel, Spannung 200V, Belichtungsdauer 11 Tage. SABP 4 wird nicht von IRF-2 gebunden und ist in Spur 5-8 zu sehen.

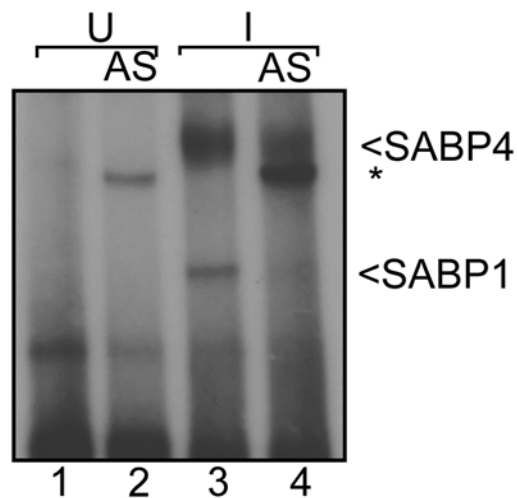


Abb.13 Enthält SABP 4 STAT1 ?

L929-Zellen wurden scheininfiziert (Spur 1,2) oder mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert. (Spur 3,4). Nach 18 Stunden wurden Kernextrakte gewonnen und die der Spur 2 und der Spur 4 mit STAT1-Antiserum vor der DNA-Bindungsreaktion für 1h inkubiert. Das Gelretardationsverfahren wurde mit einer ISG15-Probe durchgeführt. Laufzeit 3 Stunden, 5%iges Gel, Spannung 200 V, Belichtungsdauer 5 Tage. SABP 4 wird nicht durch das STAT1-Antiserum gebunden, i.Ggs. zu SABP1. Das Antiserum bindet auch unspezifisch an die radioaktive Probe (*).

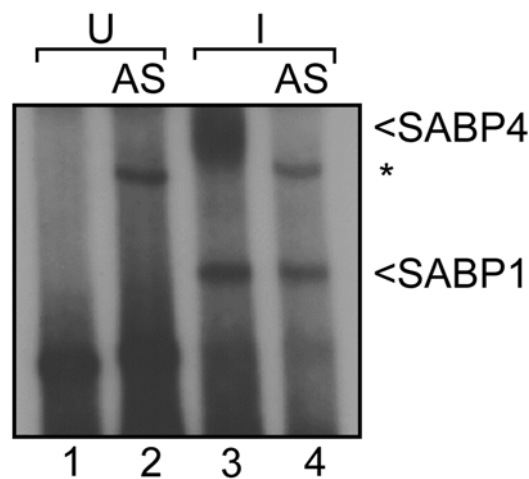


Abb.14 Enthält SABP 4 IRF-3?

L929-Zellen wurden scheininfiziert (Spur 1,2) oder mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert. (Spur 3,4). Nach 18 Stunden wurden Kernextrakte gewonnen und die der Spur 2 und der Spur 4 mit IRF-3-Antiserum vor der DNA-Bindungsreaktion für 1 Stunde inkubiert. Das Gelretardationsverfahren wurde mit einer ISG15-Probe durchgeführt. Laufzeit 3 Stunden, 5%iges Gel, Spannung 200 V, Belichtungsdauer 5 Tage. SABP 4 wird in Spur 4 durch das IRF-

3-Antiserum gebunden und ist somit nicht mehr zu sehen. Das Antiserum bindet auch unspezifisch an die radioaktive Probe (*).

IV.3 Können ISRE-bindende Komplexe in Zellen der Mäusestämme C57 black bzw. Balb C durch Sindbisvirus induziert werden ?

Um die komplexen Abwehrmechanismen der Zelle bei Virusinfektion in ihrer Gesamtheit besser zu verstehen, sind Untersuchungen mit möglichst vielen Zelltypen notwendig. Da es sich bei L929-Zellen um permanente Fibroblasten handelt, sollten zusätzlich primäre Fibroblasten aus Mäusen gewonnen werden, um einen Schritt näher am nativen Modell zu sein.

Es wurden primäre Fibroblasten der Mausstämme C57 black und Balb C verwendet. Die aus mit Sindbisvirus infizierten bzw. scheininfizierten Zellen gewonnenen Kernextrakte wurden mit einer radioaktiven ISG15-Probe im Gelretardationsverfahren analysiert. Dabei trat in den infizierten Extrakten ein ISRE-bindender Komplex auf, welcher in den scheininfizierten nicht induziert wurde (s. Abb. 15 a bzw. Abb. 15 b). Dieser zeigt das Laufverhalten wie SABP 1/ISGF3. Durch Sindbisvirus induzierte Komplexe sind also nicht nur in permanenten L929- und L990722-Zellen möglich. Die Möglichkeit, daß es sich bei diesem ISRE-bindenden Komplex um SABP 1 handelt, muß aber noch in weiteren Versuchen erhärtet werden.

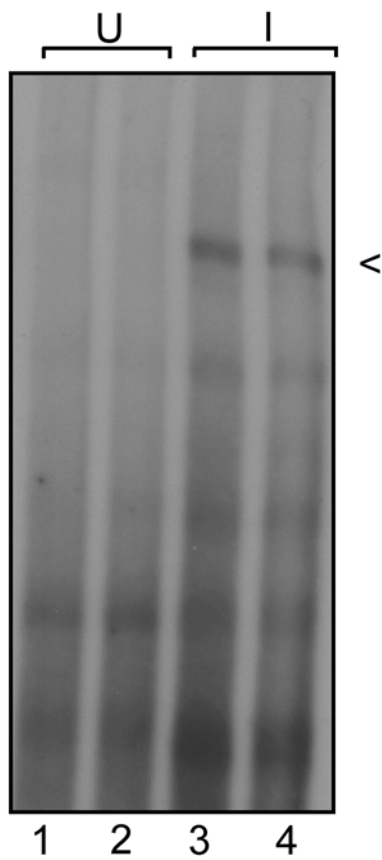


Abb. 15 a

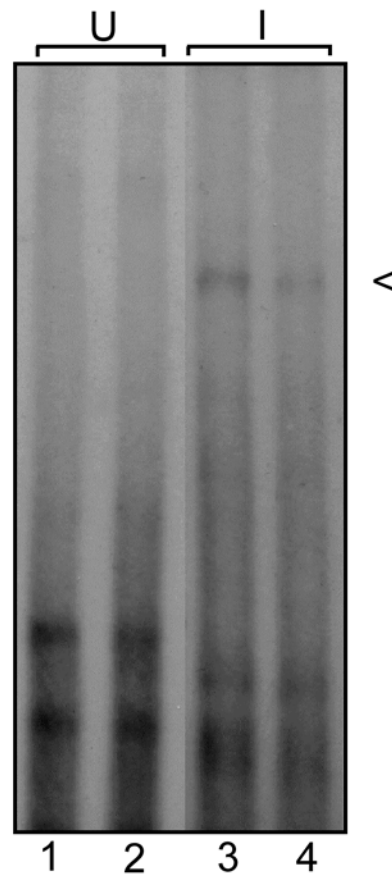


Abb. 15 b

Abb.15 a ISRE-bindende Komplexe in Primären Mäusefibroblasten C57 black.

Zellen wurden scheininfiziert (Spur 1,2) oder mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert (Spur 3,4). Nach 18 Stunden wurden Kernextrakte gewonnen und diese mit einer ISG15-Probe getestet. Laufzeit 3 Stunden, 5%iges Gel, RT, Spannung 200 V, Belichtungsdauer 20 Tage. Ein ISRE-bindender Komplex ist in Spur 3,4 zu sehen.

Abb.15 b ISRE-bindende Komplexe in Primäre Mäusefibroblasten Balb C.

Zellen wurden scheininfiziert (Spur 1,2) oder mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert (Spur 3,4). Nach 18 Stunden wurden Kernextrakte gewonnen und diese mit einer ISG15-Probe getestet. Laufzeit 3 Stunden, 5%iges Gel, RT, Spannung 200 V, Belichtungsdauer 10 Tage. Ein ISRE-bindender Komplex ist in Spur 3,4 sehen.

IV.4 Lassen sich ISRE-bindende Komplexe auch in aviären Zellen durch Sindbisvirus induzieren?

Sindbisinduzierte ISRE-bindende Komplexe sind also in Fibroblasten diverser Mäusezelllinien bzw. Mäusestämmen zu finden. Um die Bedeutung der ISRE-bindenden Komplexe in der zellulären Abwehr weiter zu beurteilen, sollte die Induktion vom ISRE-bindenden Komplexen durch Sindbisvirus nicht nur in Säugetierzellen, sondern auch in aviären Zellen beobachtet werden.

IV.4.1 ISG 15- bzw. PRD-I-bindende Komplexe

Um diese Frage zu untersuchen, wurde mit Hühnerzellen gearbeitet. Aus Hühnerembryonen wurden primäre Fibroblasten angefertigt. Diese wurden mit Sindbisvirus infiziert und nach 18 Stunden Kernextrakte gewonnen. Mit einer radioaktiv markierten ISG15- bzw. - PRD-I-Probe wurden die Extrakte im Gelretardationsverfahren analysiert. Es erschien im Versuch mit der ISG 15-Probe ein relativ langsam wandernder, sehr breiter ISRE-bindender Komplex, der in den scheininfizierten Kontrollextrakten nicht zu sehen war (s. Abb. 16 a). Im Versuch mit der PRD-I-Probe ist ein Komplex zu sehen, der etwas schneller läuft (s. Abb. 16 b)

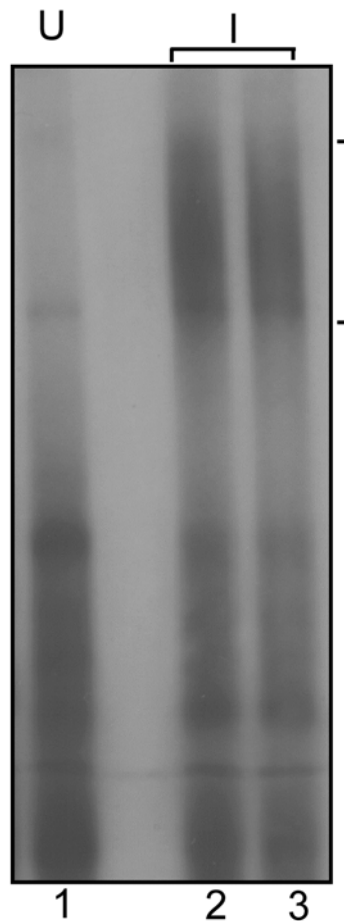


Abb. 16 a

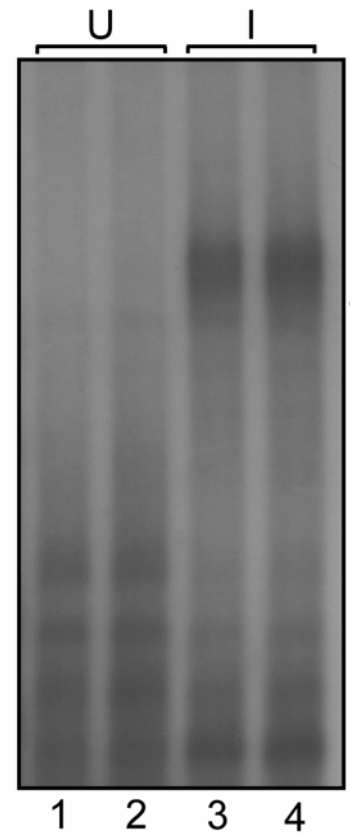


Abb. 16 b

Abb.16 a Primäre Hühnerfibroblasten mit ISG15-Probe.

Primäre Hühnerfibroblasten wurden scheininfiziert (Spur 1) oder mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert (Spur 2,3). Nach 18 Stunden wurden Kernextrakte gewonnen und diese mit einer ISG15-Probe im Gelretardationsverfahren getestet. Laufzeit 3 Stunden, 5%iges Gel, Spannung 200V, Belichtungsdauer 23 Tage. Ein ISRE-bindender Komplex (J) ist in Spur 2,3 zu sehen.

Abb.16 b Primäre Hühnerfibroblasten mit PRDI-Probe.

Primäre Hühnerfibroblasten wurden scheininfiziert (Spur 1,2) oder mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert (3,4). Nach 18 Stunden wurden Kernextrakte hergestellt und mit einer PRDI-Probe getestet. Laufzeit 3 Stunden, 5%iges Gel, RT, Spannung 200V, Belichtungsdauer 18 Tage. In Spur 3,4 ist ein Komplex (J) zu sehen.

IV.4.3 IRF-1-Antiserum bindet an die durch Sindbisvirus induzierten Komplexe

IRF-1, ein Faktor aus der IRF-Familie, lässt sich in primären Hühnerfibroblasten durch Behandlung mit IFN zu induzieren (Jungwirth et al. 1995). Handelt es sich bei den durch Sindbisvirus in Hühnerfibroblasten induzierten Komplexen um welche, die IRF-1 enthalten? Die Kernextrakte wurden jeweils zur Kontrolle ohne IRF-1-Antiserum, mit Präimmenserum und mit IRF-1-Antiserum inkubiert. Im Gelretardationsverfahren konnte gezeigt werden, daß ISG15 bindende Komplexe nach Reaktion mit IRF-1-Antikörpern nicht mehr nachweisbar sind (s. Abb. 17). Ein weiterer Versuch wurde auch unter Verwendung einer PRDI-Probe durchgeführt, wobei demonstriert wurde, daß auch hier PRDI-bindende Faktoren unter Gabe von IRF-1-Antiserum nicht mehr erscheinen (Daten nicht gezeigt).

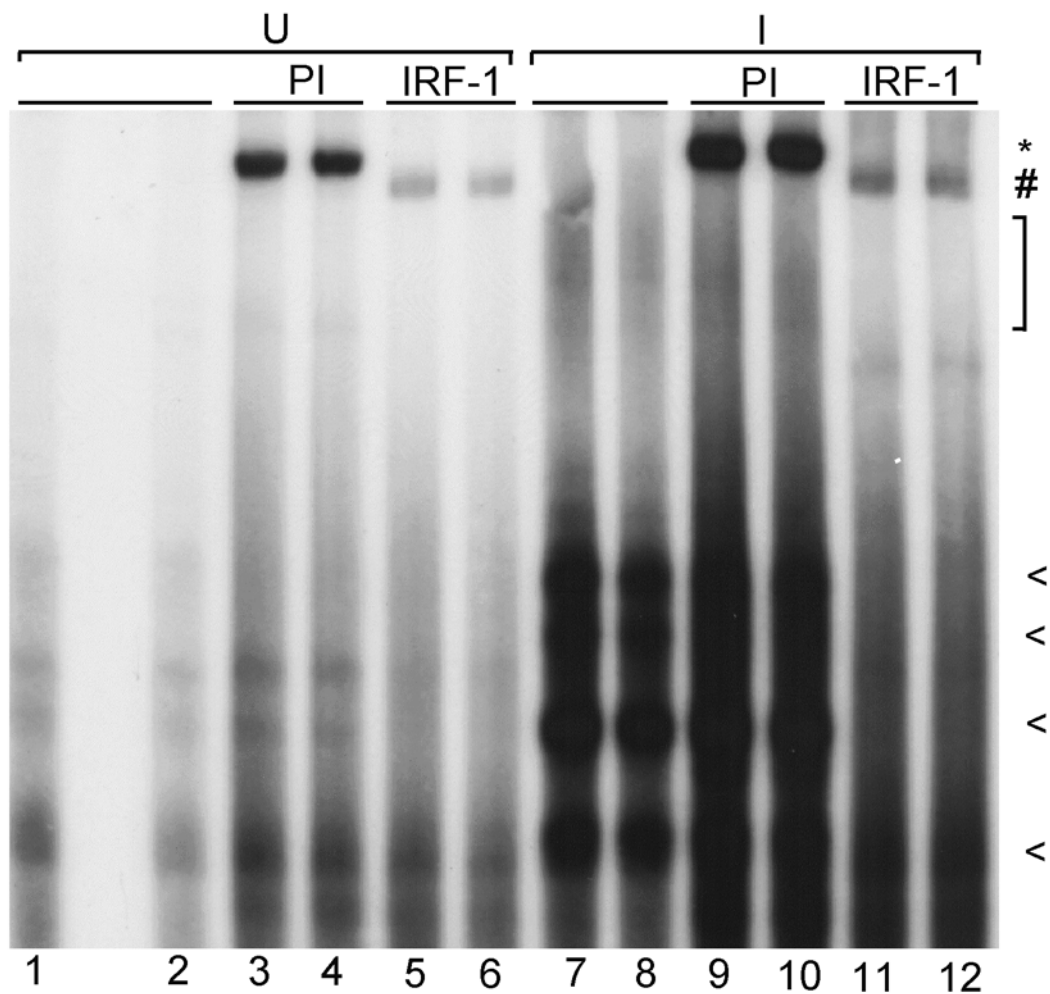


Abb.17 IRF-1-Antiserum bindet an die durch Sindbisvirus induzierten Komplexe.

Primäre Hühnerfibroblasten wurden scheininfiziert (Spur 1-6) oder mit 60 PFU/Zelle mit Sindbisvirus infiziert (Spur 7-12). Nach 18 Stunden wurden Kernextrakte hergestellt und diese mit Präimmunserum (Spur 3,4 und 9,10) oder mit Antiserum gegen IRF-1 (Spur 5,6 und 11,12) für 1 Stunde inkubiert und im Anschluß im Gelretardationsverfahren mit einer ISG15-Probe getestet. Laufzeit ca. 3 Stunden, 5%iges Gel, RT, Spannung 200V, Belichtungsdauer 13 Tage. In Spur 7-10 sind ISRE-bindende Komplexe (<,] zu sehen, welche in Spur 11,12 von Anti-IRF-1 gebunden werden und dadurch nicht auftreten. Aufgrund von unspezifischer Bindung der radioaktiven Probe mit dem Präimmun- bzw. Immunserum treten Banden (*,#) auf.

V. DISKUSSION

Die hier vorgestellten Beobachtungen erweitern die bisher beschriebenen Erkenntnisse bezüglich der Abwehrmechanismen der Wirtszelle gegen virale Infektion.

Anhand zahlreicher übereinstimmender Eigenschaften sind die in dieser Arbeit gefundenen ISRE-bindenden Komplexe, welche sich durch Sindbisinfektion in L929-Zellen induzieren lassen, mit DRAF1 und ISGF 3 (Daly and Reich 1993, Yoneyama et al. 1998, Levy et al. 1989) gleichzusetzen. Die Behandlung mit NEM verhinderte die ISRE-bindende Fähigkeit von SABP 1, was charakteristisch für die Proteine der IRF-Familie ist (Levy et al. 1989). Die beiden durch Sindbisvirus aktivierten Komplexe SABP1 und SABP4 sind hinsichtlich ihrer Laufstrecke im Gelretardationsverfahren und ihrer Proteinzusammensetzung deutlich von dem durch Vesicular Stomatitis Virus aktivierten Bindungsprotein VIBP (Bovolenta et al. 1995) oder von einem IRF, welches durch Adenovirusreplikation induzierbar ist (Feigenblum et al. 1998), zu unterscheiden. Hingegen existiert ein durch Cytomegalievirus induzierte Faktor CIF (Navarro et al. 1998), welcher im Gegensatz zu dem durch Sindbisvirus induziertem Faktor nicht sensitiv gegenüber NEM ist.

SABP 1 ist sowohl durch Sindbisvirus bzw. NDV als auch durch Transfektion mit poly rI:rC (Behr et al. 2001) und durch α -IFN induzierbar. Gabe von Aminopurin, einem spezifischem PKR-Inhibitor, hatte keinen hemmenden Effekt auf die Aktivierung von SABP 1. Demnach spielt die dsRNA-abhängige PKR keine Rolle in der Aktivierung von SABP 1. Hinweise auf andere Wege der Signaltransduktion, an der die PKR nicht beteiligt ist, erhielt man durch Untersuchungen von PKR-knock-out-Zellen (Yang 1995 et al.).

Die Identität von SABP1 mit ISGF 3 ist erwiesen durch Versuche mit NDV, poly rI:rC, α -IFN, 2-Aminopurin, NEM und der Länge der relativer Laufstrecke im Gelretardationsverfahren. Auch in Versuchen mit Antiseren gegen STAT1, einem Bestandteil von ISGF3 (Fu et al. 1992), ließ sich SABP1 binden.

Der zweite durch Sindbisinfektion induzierte ISRE-bindende Komplex SABP4 ist in der Zelle das erstmal neun Stunden nach Infektion nachweisbar. Ist für die Induktion von SABP 4 eine Signalvermittlung durch IFN notwendig? Erstens ist nach α -IFN-Stimulation keine Induktion von SABP 4 zu beobachten. Wenn mit dem

Transkriptionshemmer Actinomycin-D der IFN-vermittelte Weg verhindert wurde, erschien nach Infektion die Bande trotzdem. Auch in Zellen, die keinen funktionierenden IFN-Rezeptor besaßen, war SABP 4 induzierbar. Die Eigenschaft nicht durch IFN induzierbar zu sein, erinnert an DRAF 1 (Daly und Reich 1993).

Auf den ersten Blick widersprachen sich obige Ergebnisse mit Actinomycin bzw. Cycloheximid. Man würde erwarten, daß bei einer Unabhängigkeit von der Proteinsynthese der Komplex auch unter Cycloheximidbehandlung nachweisbar wird. Daß Kernextrakte der cycloheximidbehandelten Zellen kein SABP 4 zeigen, ist folgendermaßen zu erklären: Cycloheximid hemmt selbstverständlich nicht nur die Proteinsynthese, sondern auch virale Vorgänge. Dadurch wird die Virusaktion früh inhibiert und es wird keine Aktivierung von ISRE-bindenden Proteinen durch Infektion ausgelöst. Das negative Ergebnis mit Aminopurin bezüglich SABP 4 weist darauf hin, daß die Induktion von SABP 4 über ein Signaltransduktionskette erfolgt, in der die PKR keine Rolle spielt.

Schließlich wurde gezeigt, daß SABP 4 nicht an PRDI, die Promotorregion der IFN-gene bindet. Das würde bedeuten, daß dieser Faktor nicht die IFN-Synthese aktiviert oder zumindest nicht direkt aktiviert. Versuche mit Antiserum gegen IRF-3 bzw. CBP/p300, welche Bestandteile von DRAF1 sind, zeigten daß SABP4 mit DRAF1 gleich zu setzen ist.

Es sei noch darauf hingewiesen, das DRAF1 als Kandidat für eine Schnellantwort des Organismus gegen Virusbefall betrachtet wird. Da für die Aktivierung von DRAF1 wie oben gezeigt keine Proteinsynthese notwendig ist, würde dies auch plausibel für Sindbisvirusinfektion erscheinen. Dagegen spricht aber das Ergebnis der Zeitkurve, in der DRAF1 erst ab 9 Stunden, d.h. also sehr spät im Replikationszyklus nachweisbar ist. Das späte Erscheinen von SABP 4 könnte allerdings mit der Sensitivität der Nachweismethode zu erklären sein

Die Versuche mit Antiseren zeigen, daß wir es mit einem DRAF 1-Homolog zu tun haben. Unerklärlich ist, daß SABP 4 in der hier verwendeten L929-Zelllinie nicht durch poly rI:rC induzierbar ist. Da L929 keine eindeutig definierte Zelllinie ist, sondern eine ganze Zelllinie unter diesem Namen beschrieben wird, wurde versucht durch Sindbisvirus induzierte ISRE-Bindungskomplexe auch in verschiedenen anderen Zelllinien und in primären Zellen zu finden. ISRE-bindende Komplexe wurden neben

der meist verwendeten L929-Zelllinie auch in HeLa-Zellen (Levy et al. 1989), HEC-1 (Daly and Reich 1993) und in humanen Fibroblasten (Levy et al. 1989, Navarro et al. 1998) beschrieben. Bei Verwendung permanenten Zelllinien besteht der Nachteil, daß die Bedingungen natürlich nicht mit denen im nativen Organismus übereinstimmen. Daher sollte mit primären Mäusefibroblasten der Stämme C57 und Balb C untersucht werden, ob ISRE-bindende Komplexe auch in primären Zellen durch Sindbisvirus induzierbar sind. Es konnte demonstriert werden, daß nach Sindbisinfektion auch in den primären Mäusefibroblasten ISRE-bindende Komplexe nachweisbar sind. Das Laufverhalten der Komplexe der primären Mäusefibroblasten ähnelt dem der in L929-Zellen. Eine weitere Charakterisierung konnte in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Da ähnliche Faktoren nun in Zellen verschiedener Spezies und in primären bzw. permanenten Zellen nachgewiesen werden können, handelt es sich dabei um eine weit verbreiteten Abwehrmechanismus der Wirtszelle.

In der Evolution wurde das IFN-System hochkonserviert (Jungwirth et al. 1995). Der Transkriptionsapparat, welcher durch IFN-Typ-I in aviären Zellen induziert wird, besitzt große Ähnlichkeit zu dem entsprechendem System beim Säuger (Jungwirth et al. 1995, Zöller et al. 1992). Funktionelle Unterschiede der Transkriptionsfaktoren IRF-1 und dem Mx Protein wurden aber beschrieben (Zöller et al. 1999).

Es sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob durch Sindbisvirus induzierte Komplexe nicht nur in Säugern, sondern auch im aviären Zellen nachweisbar sind. In primären Hühnerembryofibroblasten läßt sich durch Sindbisinfektion die Synthese von IFN induzieren (Lockart et al. 1968). Primäre Hühnerembryofibroblasten wurden mit Sindbisvirus infiziert und es zeigte sich, daß ISG15- und PRDI-bindende Komplexe existieren.

IRF-1 kann in primären Hühnerfibroblasten mittels IFN-Behandlung induziert werden (Jungwirth et al. 1995). Im Gegensatz zu Säugern enthalten die in Hühnerfibroblasten induzierten ISRE-Bindungskomplexe den Transkriptionsfaktor IRF-1. Es ist sehr interessant, daß die Antwort der Wirtszelle auf Sindbisinfektion in Hühnerzellen sich so sehr von der in Mäusen unterscheidet, obwohl die cis- und trans-Elemente des IFN-induzierten Transkriptionsapparates sich sehr stark gleichen (Jungwirth et al. 1995). Dies demonstriert die hohe Bedeutung des IFN-Systems in der Evolution bezüglich der Verteidigung der Wirtszelle gegen einen Virus.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Der durch Sindbisvirus in L929-Zellen aktivierte Transkriptionsfaktor SABP 1 gehört zur IRF-Familie. SABP1 stimmt mit seinem Laufverhalten in Versuchen mit NDV, poly rI:rC und α -IFN mit ISGF3 überein. Bei der Verwendung von Antikörpern gegen STAT1, ein Bestandteil von ISGF3 (Fu 1992), wurde SABP1 gebunden. SABP1 ist daher mit ISGF3 gleichzusetzen.

Der zweite entdeckte Faktor SABP4 wurde in L929 und in L990722-Zellen nachgewiesen. SABP4 war bei einer Multiplizität von 15 bis 100 PFU/Zelle und neun Stunden nach Infektion nachweisbar. Die Supershiftanalyse mit Antikörpern gegen IRF-2, STAT1, IRF-3 und CBP/p300 zeigte, daß SABP4 mit DRAF1 (Daly und Reich 1997) zu vergleichen ist. Auch in primären Mäusefibroblasten Balb C und C57 black konnten ISRE-bindende Komplexe durch Sindbisinfektion induziert werden. Eindeutig lassen sich ISRE-bindende Komplexe nur mit einem ISRE aus der ISG-15 Promotor nachweisen. Mit PRDI-I-ISRE konnten keine SABP 4-ähnlichen Komplexe in mit Sindbisvirus infizierten Zellen nachgewiesen werden.

Ebenso wie bei SABP1 wurde auch die Induktion von SABP4 durch die Behandlung mit Aminopurin nicht beeinflusst. Wurde zum Zeitpunkt der Infektion Actinomycin D hinzugegeben, erschien SABP4 dennoch. Die Hemmung von SABP 4 durch Cycloheximid läßt sich dadurch erklären, daß in Abwesenheit von Proteinsynthese keine Replikation von Sindbisvirus stattfindet. SABP 4 wird nicht durch IFN-Typ-I induziert. Deshalb wird SABP 4 auch in Zellen ohne Typ-I-IFN-Rezeptor durch Sindbisvirus aktiviert.

Im Gegensatz zu Säugetierzellen wurden in primären Hühnerfibroblasten mit einer ISG15- bzw. PRD-I-Probe zahlreiche Komplexe gefunden, welche IRF-1 enthielten.

VI. QUELLENVERZEICHNIS

- 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.* 69, 4173-4181.
- Classen, M., Diehl, V., Kochsieck, K.,** *Innere Medizin*, 4. Auflage, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore 1998.
- 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.
- Feigenblum D., Walker R. and Schneider, R.J.,** (1998), Adenovirus Induction of an interferon-regulatory factor during entry into late phase of infection. *J. Virol.* 72, 9257-9266.
- 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.
- Friedman, R., Manly, S. P., McMahon, M., Kerr, I. M., Stark, G. R.,** 1984, Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression human cells, *Cell*, 38, 745-755.
- 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.
- Fu, X.Y., Schindler, C., Improta T., Aebersold R., Darnell Jr., J.E.,** 1992, The proteins of ISGF-3, the interferon α -induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction, *Proc. Natl., Acad. Sci. USA*, 7840-7843.
- 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.
- Goodbourn, S., Didcock, L., Randall, R.E.,** 2000, Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures, *J. Gen. Virol.*, 81, 2341-2364
- Goodbourn, S., Maniatis, T.,** 1988, Overlapping positive and negative regulatory domains of the human β -Interferon gene., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1447-1451.

- Grant, C.E., Vasa, M.Z., Deeley, R.G.,** 1995, cIRF-3. A new member of the interferon regulatory factor (IRF) family that is rapidly and transiently induced by dsRNA, *Nucleic Acids Research*, 23, 2137-2146.
- 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 to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes, *Cell*, 38, 729-739.
- Henco, K., Brosius, J., Fujisawa, A.,** 1985, Structural Relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes, *J. Mol. Biol.*, 185, 227-260.
- Henderson, Y.C., Chou, M., Deisseroth, A.B.,** 1997, Interferon regulatory factor I induces the expression of the inteferon-stimulated genes, *Br., Journal of Haematology*, 96, 566-575.
- Huang ,S., Hendriks ,W., Althage A., Hemmi S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R., Aguet, M.,** 1993 Immune response in mice that lack the inteferon- γ Receptor, *Science*, Vol. 259, 1742-1745.
- Isaacs, A. and Lindenman, 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*, 2nd Edition, Ed. Fields, B., Raven Press, 383-410.
- Jungwirth, C., Rebbert, M., Ozato, K., Degen, H.J., Schultz, U. and Dawid, I.B.** (1995), Chicken interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) and interferon regulatory factor (IRF1) genes reveal evolutionary conservation in the IRF gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 3105-3109.
- Kappos L.,** (1998), Placebo-controlled multicentre randomised trial of interferon β -1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis, *The Lancet*, 352, 1491-1497.
- 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- alpha – stimulated transcription reconstitued in vitro, *Genes Dev.*, 3, 1362-1371.
- Lockart Jr., R.Z., Bayliss N.L., Toy, S.T., Yin, F.H.,** 1968, Viral events necessary for the induction of interferon in chick embryo cells, *Journal of Virology*, 962-965.
- Mathews, M.B. and Shenk., T.,** (1991), Adenovirus virus-associated RNA and translation control. *J. Virol.*, 65, 6557-5662.
- Merigan, T.C.,** 1973, Non-viral substances which induce interferons, In: Finter N.B. ed. *Interferons and interferon inducers*, New York: American Elsevier; 45-71.
- Mertens Th.,** 1998, Antivirale Therapie, *Innere Medizin*, 4.Aufl., Hrsg. Classen, Diehl, Kochsieck, 101.
- 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.
- Müller, U., Steinhoff, U., Reis, L., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R., Aguet, M.,** 1994, Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense, *Science*, 264, 1918-1921.

- Navarro, L., Mowen, K., Rodems, S., Weaver, B., Reich, N., Spector, D., David, M.,** 1998, Cytomegalovirus activates interferon immediate-early response gene expression and an interferon regulatory factor 3-containing interferon-stimulated response element-binding complex, *Mol. Cell. Biol.*, 18, 3796-3802.
- Pellegrini, S., Schindler, C.,** 1993, Early events in signalling by interferons, *Trends Biochemistry Science.*, 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.
- Pine, R., Decker, T., Kessler, D.S., Levy, D.E., Darnell, J.E.,** 1990, Purification and cloning of the interferon-stimulated gene factor 2 (ISGF2): ISGF2 (IRF-1) can bind to the promoters of both beta interferon- and interferon-stimulated genes but is not a primary transcriptional activator of either, *Mol. Cell. Biology*, 10, 2448-2457.
- Rashidbaigi, A., Langer, J.A., Jung, V., et al.,** 1986, The gene for the human immune interferon receptor 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.
- 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.
- Schlesinger, S. and Schlesinger, M.J.,** 1990, Replication of Togaviridae and Flaviviridae, *Virology*, 2nd Edition, Ed. Fields, B., Raven Press, 697-708.
- 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 promoter, *Molecular and Cellular Biology*, 13, 690-702.
- Staheli, P.,** 1990, Interferon-induced proteins and the antiviral State, *Adv. Virus Research*, 38, 147-200.
- Staheli, P., Pitossi, F., Pavlovic, J.,** 1993, Mx proteins: GTPases with antiviral activity, *Trends in Cell Biology*, 3, 268-272.
- 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.
- Strauss, J.H. and Strauss, E.G.,** 1994, The alpha viruses: Gene expression, replication and evolution. *Microbiological Reviews*, 491-562.

- Stewart, W.E. II, De Clerqu, E.D., De Somer, P.,** 1974, Stabilisation of interferons by „defensive“ reversible denaturation, *Nature (Lond)*, 249, 460-461.
- Takeuchi, R., Tsutsumi, H., Osaki, M., Hasayama, K., Mizue, N., Chiba, S.,** 1998, Respiratory syncytial virus infection of human alveolar epithelial cells enhances interferon regulatory factor 1 and interleukin-1 beta converting enzyme gene expression, but does not cause apoptosis, *J. Virol.*, 72, 4498-4502.
- Taylor, I.,** 1964, Inhibition of interferon action by actinomycin . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14, 446-451.
- Tiwari, R., Kusari, J., Kumar, R., and Sen, G.C.,** 1988, Gene induction by interferons and double-stranded RNA: selective inhibition by 2-aminopurin, *Mol. Cell. Biol.* 8, 4289-4294.
- 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 DNA-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.
- Wathelet, M. G., Clauss, I.M., Paillard F.C., and Huez, G.A.,** 1989, 2-aminopurin selectively blocks the transcriptional activation of cellular genes by virus, double-stranded RNA and interferons in human cells. *Eur. J. Biochem.*, 184, 503-509.
- 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.
- Yang, Y.L., Reis L.F.L., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Schäfer, R., Kumar, A., Williams, B.R.G., Aguet, M., Weissmann, C.,** 1995, Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase, *EMBO J.* 14, 6095-6106.
- 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.
- Zöller, B., Ozato, K., Kroemer, G. and Jungwirth, C. (1992).** Interferon induction of chicken MHC class I gene expression : phylogenetic conservation of the interferon responsive element. *Virology* 191, 141-149.
- Zöller, B., Popp, M., Walter, A., Redmann-Müller, I., Lodemann, E. and Jungwirth, C. (1999),** Overexpression of chicken interferon regulatory factor-1 Ch-IRF-1 induces constitutive expression of MHC class I antigens but does not confer virus resistance to a permanent chicken fibroblast cell line. *Gene* 222, 269-278.

Ich möchte mich bei Herrn Professor C. Jungwirth für die exzellente Betreuung bedanken, daß er immer da war, wenn man Fragen hatte.

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

Lebenslauf

Patrick M. Bühr · Am Heggersbach 3 · 87439 Kempten · Tel.: 0831 97628

Geb.: 20.08.1974 in Würzburg

Schulbildung

1981 – 1985	Grundschule Kempten im Allgäu
1985 – 1994	Carl-von-Linde-Gymnasium Kempten mit Abitur als Abschluss

Zivildienst

Juli 1994 – Sept 1995	Individuelle Schwerstbehindertenbetreuung am Verein für Körper- und Mehrfachbehinderte Kempten
-----------------------	---

Medizinische Laufbahn

Nov 1995	Beginn mit Medizinstudium an der Universität Würzburg
März 1998	Famulatur Chirurgie Kempten Prof. Dr. med. M. Neher, Chefarzt
März 1999	Famulatur Orthopädie Universität Innsbruck Dr. med. Krismer, stellv. Chefarzt
Juli 1999	Aufnahme einer experimentellen Dissertation in der Virologie Universität Würzburg, Prof. C. Jungwirth
Aug 2000	Famulatur in Kinderarztpraxis in Kempten Dr. med. R. Kappes
März 2001	2. Staatsexamen
April 2001 – Aug 2001	PJ Innere Medizin Kreuzspital Chur, Schweiz Dr. med. V. Wüscher, Chefarzt
Aug 2001 – Dez 2001	PJ Chirurgie University of Natal, Durban, Südafrika Prof. Dr. med. Thompson, Chefarzt
Jan 2002 - März 2002	PJ Pädiatrie Kinderspital St. Gallen, Schweiz PD Dr. med. C. Kind, Chefarzt
Juni 2002	3. Staatsexamen