

Aus der Abteilung Virologie
(Prof. Dr. med. F.T. Hufert)
im Zentrum Hygiene und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Charakterisierung der durch Tribec-Virus induzierten
Hemmung der Interferon- β -Induktion**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Matthias Besse
aus
Warburg

Göttingen 2014

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
I. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. F. T. Hufert
II. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Oppermann
III. Berichterstatterin:	Prof. Dr. hum. biol. M. Schön
Tag der mündlichen Prüfung:	04.02.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Viren.....</i>	<i>1</i>
1.1.1	Einführung und Virusaufbau	1
1.1.2	Einteilung der Viren.....	2
1.1.3	Das Tribec-Virus.....	3
1.1.3.1	Aufbau und Replikation der Orbiviren	3
1.1.3.2	Epidemiologie, Pathogenität und Genetik des Tribec-Virus	5
1.2	<i>Das Interferonsystem</i>	<i>8</i>
1.2.1	Rolle des Interferons im Immunsystem des Menschen	8
1.2.2	Einteilung und Bedeutung des Interferonsystems	8
1.2.3	Induktion von IFN- β	9
1.2.4	Wirkung von IFN- β	11
1.2.5	ISG-56 und IRF-3	13
1.2.6	Virale Strategien gegen das Interferonsystem	14
1.3	<i>Zielsetzung</i>	<i>16</i>
2	Material und Methoden.....	17
2.1	<i>Standardmaterialien</i>	<i>17</i>
2.2	<i>Methoden</i>	<i>18</i>
2.2.1	Zellkultivierung	18
2.2.2	Zellzahlbestimmung.....	19
2.2.3	Zellaussaat in Kavitätenplatten und Zellkulturflaschen.....	20
2.2.4	Virusanzucht und Infektion der Zellen in Kavitätenplatten.....	21
2.2.5	Virustiterbestimmung (TCID ₅₀).....	22
2.2.6	RNA-Isolierung bei infizierten und nicht infizierten Zellen	24
2.2.7	DNase-Behandlung, Reinigung von Gesamt-RNA und spektrometrische Konzentrationsbestimmung der RNA.....	26
2.2.8	cDNA-Synthese	28
2.2.9	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	30
2.2.10	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	32
2.2.11	Indirekte Immunfluoreszenz mit TSA Signalverstärkung	33
2.2.12	Bestimmung der Zellviabilität mittels Impedanzmessung.....	37
2.2.13	Dual-Luciferase Reporter Assay.....	38
2.2.14	Bestimmung der IFN- β -Konzentration in Zellkulturüberständen mittels Sandwich-ELISA	41
3	Ergebnisse.....	43
3.1	<i>Interferon-β-Induktion in TRBV-infizierten Zellen.....</i>	<i>43</i>

3.1.1	RT-PCR zur Untersuchung der IFN- β -Induktion	43
3.1.1.1	Nachweis der IFN- β -Induktion.....	43
3.1.1.2	Infektionsnachweise	44
3.1.1.3	Kontroll-PCRs	45
3.1.2	TCID ₅₀ zum Nachweis der TRBV-Replikation in Doppelinfektionen	46
3.1.3	Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von IFN- β	48
3.2	<i>Wachstumsverhalten TRBV-infizierter Zellen</i>	50
3.2.1	Bestimmung der Zellviabilität nach Infektion mit hoher TRBV-MOI.....	50
3.2.2	Bestimmung der Zellviabilität nach Infektion mit niedriger TRBV-MOI	52
3.2.3	TCID ₅₀ zur Virustiterbestimmung der infektiösen Überstände	52
3.2.4	Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von IFN- β	54
3.3	<i>IRF-3-Translokation in TRBV-infizierten Zellen</i>	56
3.3.1	Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis der IRF-3-Translokation ...	56
3.3.2	RT-PCR zur Untersuchung der ISG56-Aktivierung.....	58
3.3.2.1	Nachweis der ISG-56-Aktivierung.....	59
3.3.2.2	Infektionsnachweise	61
3.3.2.3	Kontroll-PCRs	61
3.4	<i>Einfluss der Genprodukte von TRBV-Segment 6 und 8 auf die IFN-β-Promotoraktivität</i>	62
3.4.1	IFN- β -Promotoraktivität nach VSV-Stimulation.....	64
3.4.2	Vergleich IFN- β -Promotoraktivität nach VSV- und Vero-Stimulation ...	65
4	Diskussion	67
4.1	<i>Das Tribec-Virus hemmt aktiv die Interferon-β-Induktion</i>	67
4.1.1	TRBV führt zu einer verminderten Produktion von Interferon- β	69
4.2	<i>TRBV induziert einen starken zytopathischen Effekt in interferonkompetenten Zellen</i>	70
4.3	<i>In TRBV-infizierten Zellen fehlt die IRF-3-Translokation</i>	72
4.3.1	In TRBV-infizierten Zellen unterbleibt die ISG-56-Aktivierung.....	74
4.4	<i>Die kodierten Proteine auf TRBV-Segment 6 und 8 haben keinen hemmenden Einfluss auf den Interferonpromotor</i>	75
5	Zusammenfassung	76
6	Abbildungsverzeichnis	77
7	Literaturverzeichnis	79

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
CARD	Caspase-Rekrutierung-Domäne
CBP	CREB-bindendes Protein
cDNA	<i>complementary DNA</i> (Komplementäre DNA)
CMV	Cytomegalievirus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	<i>Desoxyribonukleotidtriphosphat</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
eIF	<i>Eukaryotic initiation factor</i> (Eukaryotischer Initiationsfaktor)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FKS	fetales Kälberserum
FL	<i>firefly-luciferase</i> (Glühwürmchen-Luciferase)
FP	<i>forward primer</i> (Vorwärtsprimer)
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	<i>human embryonic kidney</i> (Menschliche embryonale Nierenzellen)
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFNAR	Interferon- α/β -Rezeptor
IKK	I κ B α -Kinase-Komplex
IRF3	Interferon-regulierender Faktor 3
ISG	<i>interferon stimulated gene</i> (Interferon-stimulierendes Gen)
ISGF3	Interferon-stimulierter-Genfaktor 3
JAK1	Janus-Kinase 1
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signalling protein</i>
MDA 5	<i>melanoma differentiation associated gene 5</i>

MEM	<i>minimum essential medium</i>
PKR	Proteinkinase R
PLB	<i>passiv lysis buffer</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> (Muster-erkennender-Rezeptor)
RHP	<i>random hexamer primer</i>
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
RL	Renilla Luciferase
RP	<i>reverse primer</i> (Rückwärtsprimer)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-time-polymerase-chain-reaction</i>
RVFV	Rift Valley Fever Virus
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i> (Einzelstrang-RNA)
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA (-Puffer)
TBK1	<i>TANK-binding kinase</i> (TANK-bindende Kinase)
TCID ₅₀	<i>tissue culture infective dose</i> (Kulturinfektiöse Dosis 50)
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i> (TNF-Rezeptor assoziierter Faktor)
TRBV	Tribec-Virus
TSA	<i>tyramide signal amplification</i> (Tyramid-Signalverstärkung)
TYK2	JAK-Tyrosine-Kinase 2
VIB	<i>viral inclusion body</i>
VP	<i>virion protein</i>
VSV	Vesikuläres Stomatitis-Virus

1 Einleitung

1.1 Viren

1.1.1 Einführung und Virusaufbau

Unter dem Terminus *Viren* werden verschiedene Familien infektiöser Erreger zusammengefasst, welche aufgrund eines nicht vorhandenen eigenen Stoffwechsels nur intrazellulär vermehrungsfähig sind, da sie sich hier einzelner Stoffwechselbestandteile der infizierten Wirtszelle bedienen können. In diesem Punkt unterscheiden sich die Viren deutlich von anderen Mikroorganismen wie Bakterien oder Pilzen. Erst im Jahre 1901 beschrieben Walter Reed und andere mit dem Gelbfiebertvirus das erste humanpathogene Virus, was vorher aufgrund der geringen Größe im Nanometerbereich und der daraus resultierenden Ultrafiltrierbarkeit nicht möglich war (Knipe,Howley 2006).

Viren besitzen, anders als Eukaryonten, DNA oder RNA als Träger ihrer Erbinformation, jedoch nie beide Nukleinsäurearten gleichzeitig. Die lineare, ringförmige oder segmentierte Erbsubstanz kann sowohl als Einzel- oder auch als Doppelstrang vorliegen. Allerdings besitzt die Mehrheit der DNA-Viren einen Doppelstrang, während bei den meisten RNA-Viren nur ein einzelner Strang der Nukleinsäure vorhanden ist. Bei Einzelstrang-RNA-Viren muss zusätzlich die Polarität der RNA beachtet werden, da ein Negativstrang in der Wirtszelle zunächst durch die viruseigene RNA-abhängige RNA-Polymerase in komplementäre mRNA umgeschrieben werden muss (Kayser et al. 2010).

Die Erbsubstanz wird von einer als Kapsid bezeichneten Proteinschicht umhüllt, beide zusammen werden als Virion bezeichnet. Neben der DNA bzw. RNA enthält das Virion unter Umständen auch virale Strukturproteine wie RNA-Polymerasen (Negativstrang-RNA-Viren) oder reverse Transkriptasen (Retroviren). Das Kapsid selbst besteht aus mehreren Protein-Untereinheiten, den Kapsomeren und Protomeren, die unterschiedlich eng mit den Nukleinsäuren verbunden sind (Kayser et al. 2010).

Diese Proteinschicht schützt das Virus einerseits vor Umwelteinflüssen, andererseits spielt sie eine Rolle in der Virusinfektion. Ist das Virus nicht weiter umhüllt, stellt das Kapsid die entscheidende Struktur bei der Erkennung der Oberflächenproteine potenti-

eller Wirtszellen dar und leitet dadurch das Eindringen des Virus in die Zelle ein. Aus der Anordnung des Kapsids ergeben sich verschiedene strukturelle Symmetrien. Dadurch ist eine Unterteilung in Viren mit Ikosaeder- und Viren mit Helixstruktur möglich (Doerr, Gerlich 2010).

Bei vielen Viren bildet das Kapsid nicht die äußerste Struktur des Virus. Diese Viren sind von einer weiteren Virushülle umgeben, die beim Durchtritt des Kapsids durch eine zelluläre Membran entstanden ist und werden entsprechend als behüllte Viren bezeichnet. Die Hülle besteht aus den zum Kapsid hin gelegenen Matrix-Proteinen, welche die Hülle am Kapsid anheften, einer Lipiddoppelmembran und Glykoproteinen. Während bei den unbehüllten Viren das Kapsid selbst den Kontakt zur Wirtszelle herstellt, verschmilzt bei behüllten Viren die Hülle mit der Zielzellmembran und entlässt das Kapsid in die Zelle. Durch ihre erhöhte Anfälligkeit gegenüber organischen Lösungsmitteln und Austrocknung sind die behüllten Viren meist weniger resistent (Doerr, Gerlich 2010).

1.1.2 Einteilung der Viren

Zur Einteilung der Viren existieren verschiedene Klassifikationssysteme. Zu den bekanntesten zählen das Baltimore-Schema, benannt nach dem amerikanischen Virologen David Baltimore, und die Klassifizierung der ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Das Baltimore-Schema unterteilt die Viren nach ihrem Genom (Art, Anzahl, Polarität, reverse Transkription) in sieben Gruppen (Doerr, Gerlich 2010).

Die ICTV wurde 1966 gegründet und beschäftigt sich bis heute mit der Klassifizierung von Viren, wobei hierzu deutlich mehr Kriterien zur Einteilung verwendet werden, als dies beim Baltimore-Schema der Fall ist. So fließen hier unter anderem auch die Form des Kapsids, das Vorhandensein einer Hülle, die Größe des Virions und der gemeinsame genetische Ursprung in die Klassifizierung mit ein. Gemäß dieser Eigenschaften werden die Viren absteigend in Familien (Endung: -viridae), Subfamilien (Endung: -virinae), Gattungen (Endung: -virus) und Spezies (keine spezifische Endung) unterteilt (Knipe, Howley 2006).

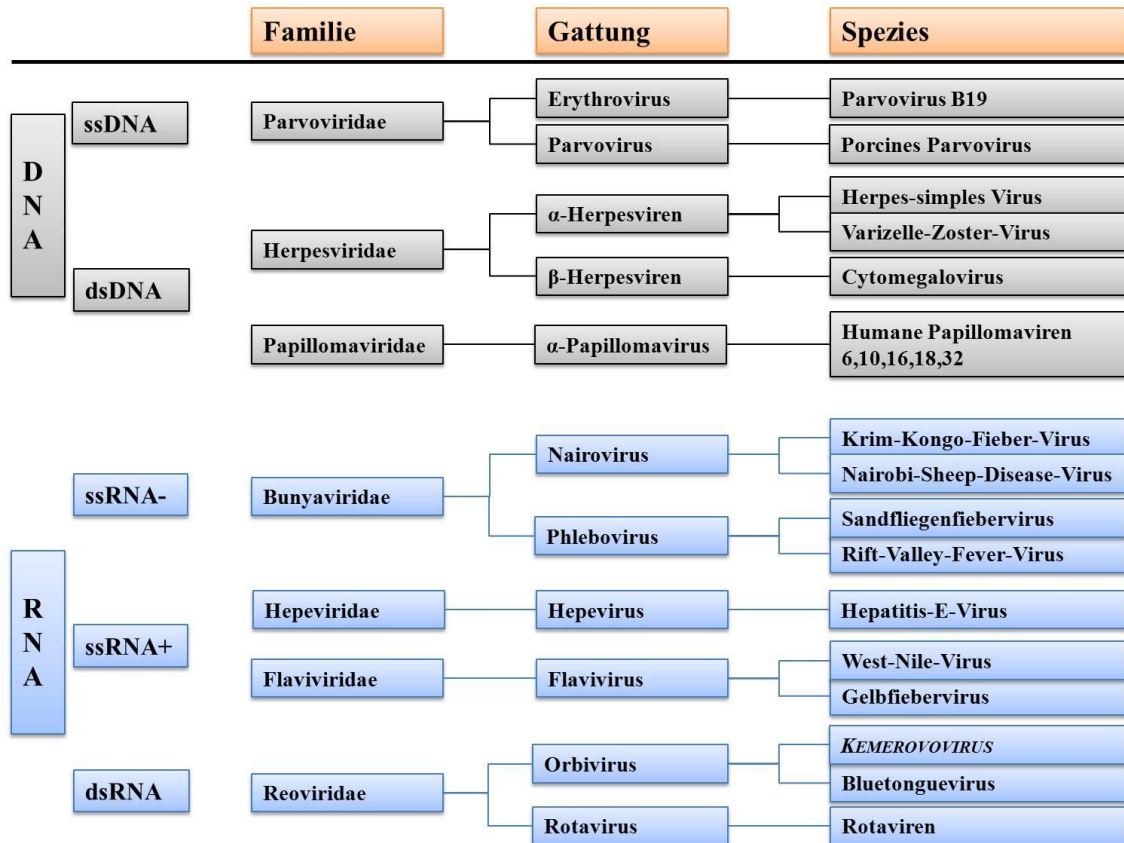


Abbildung 1: Taxonomie ausgewählter Viren nach dem Schema der ICTV. Das in dieser Arbeit behandelte Tribec-Virus gehört zur Serogruppe der Kemerovoviren und damit zur Gattung der Orbiviren. Modifiziert nach Modrow et al. 2010.

1.1.3 Das Tribec-Virus

1.1.3.1 Aufbau und Replikation der Orbiviren

Das Tribec-Virus (TRBV) gehört der Serogruppe der Kemerovoviren und damit der Gattung der Orbiviren an (Gresikova et al. 1965).

Bei den 21 verschiedene Spezies und 160 unterschiedliche Serotypen beinhaltenden Orbiviren (Fauquet et al. 2005) handelt es sich um Viren mit einer doppelsträngigen RNA (dsRNA), welche von einem ikosaedersymmetrischen Kapsid umgeben ist. Die Virusgröße liegt im Bereich zwischen 60-80 nm Durchmesser (Kapikian,Shope 1996). Eine weiter das Kapsid einschließende Virushülle ist bei den Orbiviren nicht vorhanden (Knipe,Howley 2006).

Die 10 als Doppelstrang vorliegenden RNA-Segmente der Orbiviren kodieren für insgesamt sieben Struktur- (VP1-7) und vier Nichtstrukturproteine (NS1-3/3a) (Roy 1995) und haben eine Gesamtmasse von $13 \cdot 10^6$ Da (Verwoerd et al. 1970).

Auf Grund seiner großen ökonomischen Bedeutung ist das Bluetonguevirus das am besten in Struktur und Vermehrungszyklus untersuchte Orbivirus. Deshalb soll der Aufbau und die Replikation anhand des Bluetonguevirus beispielhaft für die Gruppe der Orbiviren erklärt werden.

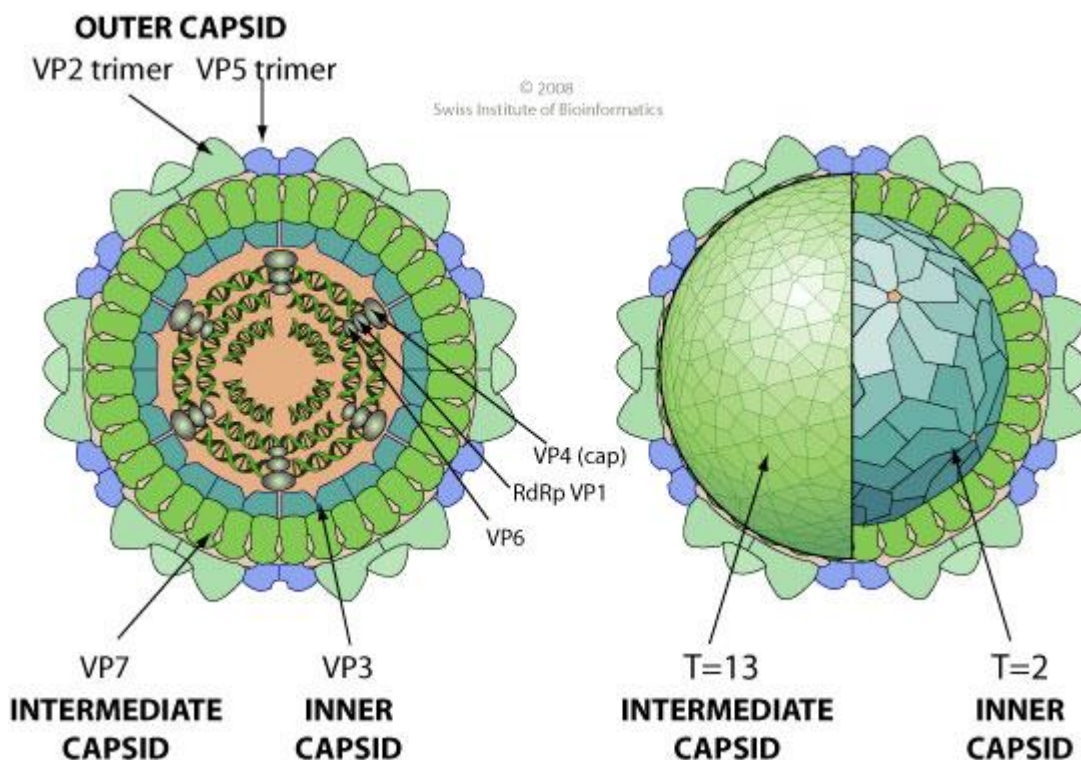


Abbildung 2: Schematischer Aufbau und Struktur des Bluetonguevirus als Vertreter der Orbiviren. Die innere Kapsidschicht wird von VP1, VP3, VP4, VP6 und VP7 gebildet, während das äußere Kapsid aus VP2 und 5 aufgebaut ist. (Swiss-Institute-of-Bioinformatics 2008)

In Abbildung 2 ist die Grundstruktur des Bluetonguevirus dargestellt. Die Strukturproteine VP3 und VP7 bilden die innere von zwei Kapsidschichten, während die äußere Schicht von den Proteinen VP2 und VP5 gebildet werden (Mertens et al. 1984).

VP2 weist die größte Variabilität der sieben Strukturproteine auf und ist damit am spezifischsten für die jeweiligen Virusserotypen. Außerdem induziert es in infizierten Säugern die Produktion spezifischer Antikörper. Hierdurch kommt es zu einem erheblichen Selektionsdruck, was letzten Endes zur großen Variabilität des VP2-Proteins führt

(Mertens et al. 2004). VP2 ist durch seine Funktion als Adsorptionsprotein, mit Glykophorin A als Rezeptor, der entscheidende Faktor für Fähigkeit des Virus, in Säugetierzellen einzudringen (Hassan,Roy 1999).

Dieses Eindringen des Virus in seine Wirtszelle (Penetration) steht am Anfang des viralen Replikationszyklus, in dem das Virus nach der rezeptorvermittelten Anlagerung (Adsorption), bei den Orbiviren vermittelt durch VP2 und VP5, in die Zielzelle eindringt (Knipe,Howley 2006).

Nach dem Eindringen des Virus in die Wirtszelle kommt es zum Verlust der äußeren Kapsidschicht und infolgedessen zur Freisetzung und Aktivierung des Transkriptionskomplexes, bestehend aus VP1(RNA-Polymerase), VP4 (Capping-Enzym) und VP6 (Helikase), in das Zytoplasma der Zelle. Im Zytoplasma erfolgen Replikation und Transkription des Virusgenoms durch die viruseigene RNA-Polymerase (Mertens et al. 2004).

Bereits 2-4 Stunden nach Infektion kommt es zur Translation und damit zur Synthese der viralen Proteine (Knipe,Howley 2006). Die synthetisierten Proteine werden anschließend in sogenannten VIBs (*viral inclusion bodies*) zusammengesetzt, wobei die äußere Kapsidschicht erst kurz vor Freisetzung des Virus ins Zytoplasma entsteht (Brookes et al. 1993). Wie neu synthetisierte Orbiviren ihre Wirtszelle verlassen, ist im Detail nicht vollständig geklärt. Allerdings scheint das NS3/NS3a eine wichtige Rolle bei der Permeabilisierung der Zellmembran zu spielen. Daher ist es von enormer Bedeutung für die Pathogenität des Virus (Han,Harty 2004).

1.1.3.2 Epidemiologie, Pathogenität und Genetik des Tribec-Virus

Bereits 1963 konnte im Rahmen einer Expedition, bei der die Verbreitung des FSME-Virus in Waldgebieten der westlichen Slowakei untersucht werden sollte, ein Virus aus Zecken (*Ixodes ricinus*) und dem Blut kleiner Nagetiere isoliert werden, das nicht dem FSME-Virus oder anderen bekannten Viren entsprach (Libikova et al. 1964).

Dieses Virus reagierte nicht mit FSME-Antikörpern, zeigte in den Neutralisationstests allerdings eine Verwandtschaft zum Kemorovovirus aus der Gruppe der Orbiviren und wurde nach seinem Entdeckungsort, dem Tribec-Gebirge in der Slowakei, Tribec-Virus genannt. Bei Infektion von Hühnerembryozellen konnte nach zwei Tagen ein zytopathischer Effekt beobachtet werden (Gresikova et al. 1965). Später wurde festgestellt, dass

sich das Virus nicht nur in Hühnerembryozellen, sondern ebenfalls in L-Zellen (Maus-Fibroblastenzellen) vermehren kann. Die Virusvermehrung erreichte hier wie bei den Hühnerembryozellen ungefähr 20 Stunden nach Infektion ihren maximalen Virustiter (Rajcani, Gresikova 1970). Neben Zecken und Kleintieren konnte das Virus auch aus dem Blut in der Tribec-Region weidender Ziegen isoliert werden. Dies legte die Vermutung nahe, dass sich das Tribec-Virus sowohl in kleineren als auch größeren Säugern vermehren und über den Vektor Zecke auf weitere Wirtstiere übertragen werden kann (Ernek et al. 1966).



Abbildung 3: Verbreitung des Tribec-Virus innerhalb Europas, Stand 2006. Modifiziert nach Süss et al. 2004 sowie Dobler et al. 2006 (Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlag).

Bei Untersuchungen von Hirnschnitten mit Tribec-Virus infizierter Rhesusaffen konnten Zeichen einer Meningitis bzw. Enzephalitis diagnostiziert und das Virus erfolgreich aus dem Liquor der infizierten Affen isoliert werden (Gresikova et al. 1966). Dieser Befund und der Nachweis des Tribec-Virus im Blut einiger Patienten in der Slowakei mit FSME-Symptomatik (Málková et al. 1980), weist auf eine mögliche Humanpathogenität des Tribec-Virus hin. Entsprechend wurde es durch die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) im Juli 2009 in die Risikogruppe 2 für gentechnische Arbeiten eingestuft.

Wie in Abbildung 3 (S.6) gezeigt, wurde das Tribec-Virus mittlerweile auch außerhalb der Slowakei in mehreren europäischen Ländern entdeckt (Dobler 1996), (Dobler et al. 2006). Unter anderem konnte das Virus aus einer von 140 Blutproben von Feldhasen (*Lepus europaeus*) in Schleswig-Holstein isoliert werden, was einer regionalen Durchseuchungsrate von 4,5% entsprach (Dobler et al. 2006).

In der Genomsequenzierung des Tribec-Virus zeigten sich einige Unterschiede zum unter 1.1.3.1 (S.3) beschriebenen Bluetonguevirus. Diese sind in Tabelle 1 dargestellt.

Segment	Bluetonguevirus	Tribec-Virus
1	VP1 (RNA-Polymerase)	VP1 (RNA-Polymerase)
2	VP2 (äußere Kapsidschicht)	VP3 (innere Kapsidschicht)
3	VP3 (innere Kapsidschicht)	VP4 (<i>capping enzym</i>)
4	VP4 (<i>capping enzym</i>)	NS1 (tubuläre Strukturen)
5	NS1 (tubuläre Strukturen)	VP2 (äußere Kapsidschicht)
6	VP 5 (äußere Kapsidschicht)	VP 5 (äußere Kapsidschicht)
7	VP7 (innere Kapsidschicht)	NS2 (VIB-Matrixprotein)
8	NS2 (VIB-Matrixprotein)	VP7 (innere Kapsidschicht)
9	VP6 (Helikase)	VP6 (Helikase)
10	NS3 (Glykoprotein)	NS3 (Glykoprotein)

Tabelle 1: Unterschiede in der Segmentkodierung zwischen Tribec-Virus und dem Bluetonguevirus als typischem Vertreter der Orbiviren. (Modifiziert nach Dilcher et al. 2012)

Zusätzlich zu VP6 konnten auf Segment 9 der Tribec-RNA drei *open reading frames*, ORF-Xa, ORF-Xb und ORF-Xc, detektiert werden (siehe Abbildung 4, S.8). Diese *open reading frames* sind auch für andere Orbiviren bereits bekannt und wurden kürzlich für das Tribec-Virus dokumentiert. Bislang konnte den durch die *open reading frames* kodierten Proteinen jedoch keine Funktion zugeordnet werden (Dilcher et al. 2012).

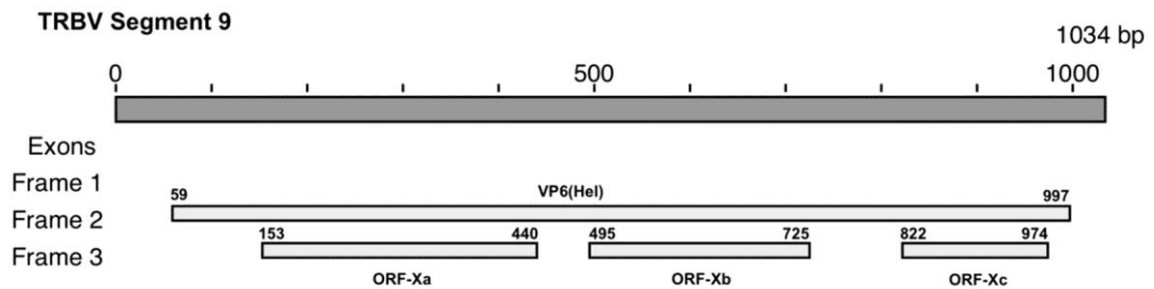


Abbildung 4: Segment 9 des Tribec-Virus, welches neben VP6 auch für drei *open reading frames* (ORF-Xa-c) kodiert. Unverändert entnommen aus Dilcher et al. 2012.

1.2 Das Interferonsystem

1.2.1 Rolle des Interferons im Immunsystem des Menschen

Das Immunsystem des Menschen lässt sich in eine angeborene und eine erworbene Immunantwort unterteilen. Seine Aufgabe besteht darin, den menschlichen Organismus vor eindringenden Krankheitserregern wie Bakterien, Viren oder Parasiten zu schützen (Burmester, Pezzutto 2008). Während das erworbene Immunsystem mittels B- und T-Lymphozyten, unter anderem durch die Produktion von Antikörpern, sehr spezifisch auf pathogene Erreger reagieren kann, sind die Abwehrmechanismen der angeborenen Immunantwort eher unspezifisch. Die erste Barriere für potentiell pathogene Mikroorganismen stellt die Haut dar. Makrophagen und Granulozyten bekämpfen eingedrungene Erreger, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) leiten bei virusinfizierten Zellen den programmierten Zelltod ein. Neben diesen erwähnten Mechanismen wird auch das bereits 1957 durch Lindenmann und Isaacs entdeckte Interferon zur angeborenen Immunantwort gerechnet und spielt eine entscheidende Rolle in der Reaktion der Zellen auf eine Virusinfektion (Koolman, Röhm 2009).

1.2.2 Einteilung und Bedeutung des Interferonsystems

Das menschliche Interferonsystem wird in drei Gruppen eingeteilt. Zu den Typ- I Interferonen gehören sechs verschiedene Klassen, IFN- α , - β , - ϵ , - κ , - ω und - ν , wohingegen der Interferon-Typ II nur von IFN- γ gebildet wird (Pestka 2007). Diese Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Virusabwehr durch den Wirtsorganismus (Pitha, Kunzi 2007).

Eingeteilt werden die Interferone anhand ihrer unterschiedlichen Aminosäuresequenzen, was zu einer weiteren Unterteilung von IFN- α in mehrere Subgruppen führt. Besonders IFN- α und - β werden als direkte Antwort auf eine Virusinfektion produziert und versetzen ihre Zielzellen in einen antiviralen Zustand. Typ I-Interferone aktivieren eine Signalkaskade, die zur Induktion von über 300 Genen führt, welche als Interferon-stimulated genes (ISG) bezeichnet werden (Randall, Goodbourn 2008) und unter anderem für Proteine mit antiviralen Eigenschaften kodieren.

Die besondere Bedeutung der Interferonantwort für die Überwindung einer Virusinfektion wurde erstmals im Mausmodell nachgewiesen. Knockout-Mäuse mit inaktiviertem IFN-I-Rezeptor konnten auf eine Infektion mit VSV nicht adäquat reagieren und starben an den Folgen der Infektion (Muller et al. 1994). Ähnliches wurde auch für infizierte Menschen mit fehlendem oder defektem IFN-I-Rezeptor berichtet. (Dupuis et al. 2003). Neben den bereits beschriebenen Typ I- und Typ II-Interferonen existiert auch die Gruppe der Typ III-Interferone. Diese besteht aus IFN- λ 1, - λ 2 und - λ 3 (Sheppard et al. 2003), deren Rolle im Immunsystem aber noch relativ wenig untersucht ist. Es gibt jedoch Hinweise, die eine ähnliche antivirale Funktion wie bei IFN-Typ I vermuten lassen. (Kelly et al. 2011).

1.2.3 Induktion von IFN- β

Alle Zelltypen, mit Ausnahme der plasmazytoiden dendritischen Zellen, reagieren primär mit der Ausschüttung von IFN- β auf eine Virusinfektion. Deshalb soll im Folgenden näher auf die Induktion von IFN- β durch dsRNA-Viren, wie dem Tribec-Virus, eingegangen werden.

In Zellen sind zwei verschiedene Signalwege bekannt, die zur Induktion von IFN- β führen. Neben dem klassischen zytoplasmatischen Signalweg existiert ein weiterer sogenannter endosomaler Signalweg, der besonders in dendritischen Zellen zu finden ist (Haller et al. 2006). Dieser ist für die vorliegende Arbeit jedoch von untergeordneter Relevanz und soll hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

Nach dem Eindringen eines dsRNA-Virus in eine Zelle kommt es, wie bereits unter 1.1.3.1 (S.3) erläutert, zur Freisetzung und Vermehrung der Virus-RNA. Diese Virus-RNA stellt einen hochpotenten Stimulus für die Induktion des IFN- β -Signalwegs dar (Basler, Garcia-Sastre 2002).

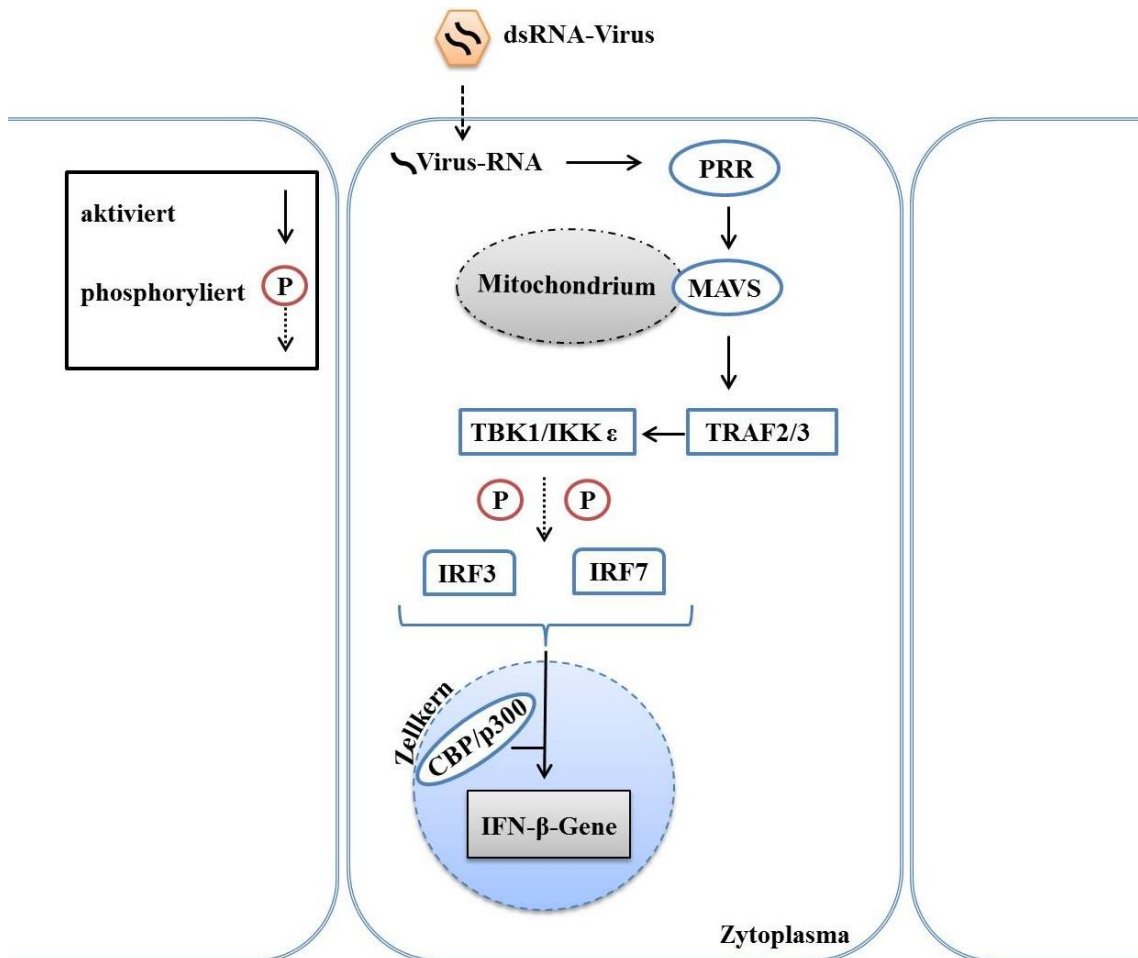


Abbildung 5: Schematische Darstellung der IFN- β -Induktion durch ein dsRNA-Virus. Abbildung modifiziert nach Sun et al. 2010 und West et al. 2011.

Die Virus-RNA wird durch einen im Zytoplasma der Zelle vorhandenen Rezeptor aus der Gruppe der PRRs, MDA5 oder RIG-I erkannt. Lange Zeit war nicht bekannt, auf welche Weise diese Rezeptoren zwischen viraler und zelleigener RNA unterscheiden können (Luthra et al. 2011). Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die fehlende 2-O-Methylierung am ersten oder zweiten Nukleotid der viralen RNA das wesentliche Unterscheidungsmerkmal ist, welches MDA5 erkennt (Zust et al. 2011), während RIG-I-Triphosphatreste am 5'Ende der RNA erkennt (Kato et al. 2008). Beide PRRs aktivieren im ersten Schritt des Signalwegs das über seine Transmembrandomäne in der äußeren Mitochondrienmembran verankerte MAVS. Bei der Aktivierung kommt es zur Dimerisierung der Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD) des MAVS (Tang, Wang 2009). MAVS bindet in einem weiteren Schritt die Ligasen TRAF2 und TRAF3, was in der Aktivierung von IKK ϵ und TBK1 mündet, welche anschließend

IRF-3 und IRF-7 durch Phosphorylierung aktivieren (West et al. 2011). Im Anschluss an die Phosphorylierung homodimerisiert IRF-3, und es kommt zur Translokation der aktivierten Transkriptionsfaktoren in den Zellkern (Sun et al. 2010). Mit den Cofaktoren CBP und p300 bildet es dort das sogenannte *enhanceosome*. Eine entscheidende Rolle spielt die Acetyltransferaseaktivität der Cofaktoren (Ogryzko et al. 1996). Erst durch die Acetylierung der Nukleinsäure-Histone kann das *enhanceosome* an die Promotoreregion der IFN- β -Gene binden und deren Transkription induzieren (Hiscott et al. 1999).

1.2.4 Wirkung von IFN- β

Die Wirkung von Typ I-Interferonen (IFN- α/β) wird über die Bindung an einen in der Zellmembran verankerten Rezeptor, IFNAR, vermittelt. Dieser Rezeptor besteht aus zwei die Zellmembran durchziehenden Proteinketten, IFNAR1 und IFNAR2 (Mogensen et al. 1999). Die zytoplasmatischen Anteile dieser Ketten sind mit den Tyrosinkinase TYK2 und JAK1 aus der Janus-Kinasen-Familie (JAK) assoziiert (Basler, Garcia-Sastre 2002). Binden Typ I-Interferone an IFNAR, kommt es zur gegenseitigen Phosphorylierung der zytoplasmatischen Janus-Kinasen, welche dann wiederum Tyrosin-Anteile der IFNAR1/2-Kette phosphorylieren können (Uze et al. 2007). Neben IFNAR werden auch die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 durch die Janus-Kinasen phosphoryliert. Dies führt zur Heterodimerisierung von STAT1 und STAT2, wodurch ihre Translokation in den Zellkern ermöglicht wird (Boo, Yang 2010). Die STAT-Familie umfasst insgesamt sieben verschiedene Transkriptionsfaktoren. Ihre enorme Bedeutung für den IFN- β -Signalweg wird besonders in Knockout-Mäusen deutlich, bei denen STAT1 oder 2 ausgeschaltet wurden. Die zelluläre Antwort auf die Bindung des IFN an seinen Rezeptor und damit die Fähigkeit, auf virale Infektionen zu reagieren, ist bei diesen Tieren deutlich eingeschränkt (Schindler, Plumlee 2008).

Das STAT-Heterodimer bildet zusammen mit IRF-9 noch im Zellzytoplasma den sogenannten ISGF3-Komplex. Der ISGF3-Komplex leitet das Ablesen der Interferon-stimulierten Gene (ISG) im Zellkern ein, indem er an die ISG-Promotorregion bindet (Fu et al. 1990).

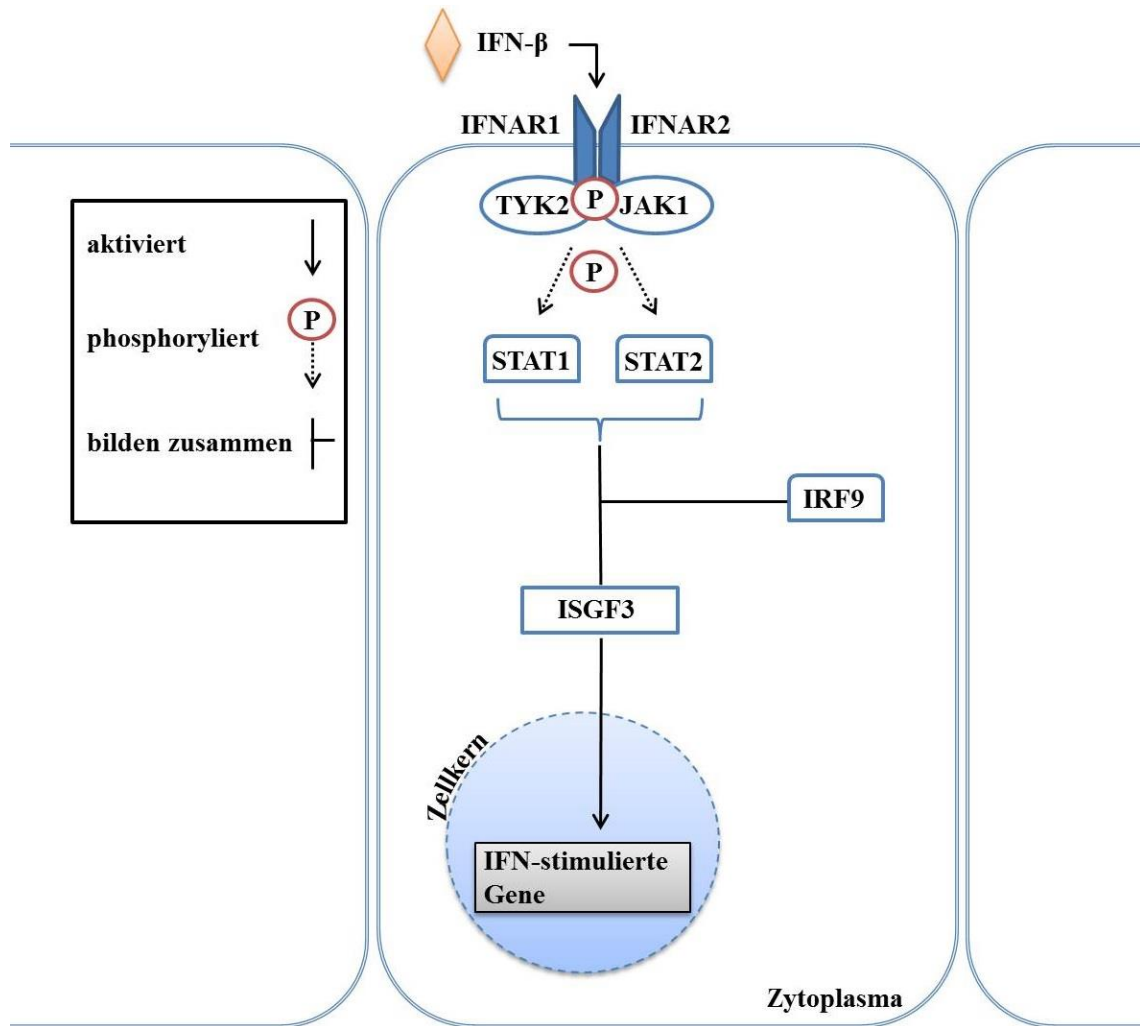


Abbildung 6: Schematische Darstellung der ISG-Induktion durch IFN-β. Abbildung modifiziert nach Sun et al. 2010

Insgesamt induziert IFN die Expression von mehr als 380 ISGs (Schoggins et al. 2011), wobei nicht alle Genprodukte eine Rolle in der Virusabwehr spielen. Die am besten untersuchten Proteine mit antiviralen Eigenschaften sind die Proteinkinase R (PKR), die GTPase MxA und die Oligoadenylat-Synthetase (OAS) (Basler, Garcia-Sastre 2002). PKR liegt in seiner inaktiven Form als Monomer im Zellzytoplasma vor. Die PKR-Expression wird durch IFN gesteigert, die Aktivierung erfolgt unter anderem durch virale RNA. Im Zuge der Aktivierung dimerisiert PKR (Nanduri et al. 2000) in seine aktive Form und phosphoryliert den Translationsfaktor eIF α . Dadurch wird die Regeneration von GDP zu GTP an eIF α durch eIF β unterbunden. Es kommt zum Stopp der zellulären und viralen Translation, da eIF α nicht erneut in seine aktive Form überführt werden

kann. Zudem gibt es Hinweise, dass PKR Apoptose bei infizierten Zellen einleiten kann (Sadler,Williams 2008).

Das Protein MxA liegt im Zellzytoplasma vor und zeigt bei verschiedenen Virusinfektionen antivirale Effekte. Nur für wenige Infektionen ist der genaue antivirale Mechanismus in allen Einzelheiten geklärt. Es ist jedoch zu vermuten, dass die GTPase-Aktivität des MxA-Proteins die entscheidende Rolle spielt (Wisskirchen et al. 2011). Kommt es zu einer Infektion mit dem Influenzavirus, akkumuliert MxA im Zellkern und unterbindet die Transkription der viralen Nukleinsäuren, eventuell durch Interaktion mit einem viralen Nichtstrukturprotein (Turan et al. 2004).

Ein weiteres wichtiges, durch IFN induziertes, antivirales Protein ist OAS. Es liegt beim Menschen in vier Genen vor, OAS 1-3 und OASL, die jeweils unterschiedlich expriert werden. OAS, das auch in nicht infizierten Zellen auf niedrigem Niveau vorhanden ist, aktiviert wiederum die RNase L. Diese homodimerisiert nach Aktivierung durch OAS. In seiner dimerisierten Form besitzt RNase L die Fähigkeit, virale ssRNA zu spalten und somit die Virusvermehrung zu unterbinden. Ein weiterer positiver Effekt ist, dass die RNA-Spaltprodukte über zytoplasmatische Rezeptoren wie MDA5 (siehe 1.2.3, S.9) erkannt werden und somit eine weitere IFN-Induktion hervorrufen können (Sadler,Williams 2008).

1.2.5 ISG-56 und IRF-3

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit soll es sein zu untersuchen, ob es bei einer TRBV-Infektion zur IRF-3 abhängigen Aktivierung von ISG-56 kommt (siehe 3.3.2, S.58). Daher soll im folgenden Abschnitt nochmals auf die Rolle von IRF-3 im IFN- β -Signalweg sowie auf die Funktion von ISG-56 und dessen IFN unabhängiger Aktivierung eingegangen werden.

Wie bereits unter 1.2.3 (S.9) beschrieben, kommt es am Ende der Interferon-Induktionskette zur Aktivierung von IRF3 und zu dessen Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern, wo es als Teil des *enhanceosome* die Transkription des IFN- β -Gens induziert. IFN- β wiederum führt zur Aktivierung Interferon-stimulierter Gene (Hiscott et al. 1999). Unter der großen Anzahl der Interferon-stimulierten Gene befindet sich das ISG56, zu dessen Familie auch ISG54, -60 und -58 gezählt werden. ISG56 kodiert für ein antivirales Protein, P56 genannt (Sen,Sarkar 2007). Seinen antiviralen Effekt, bis-

lang nur für Hepatitis-C-Virus und wenige andere Viren nachgewiesen, entfaltet P56 über die Bindung an den Translationsfaktor eIF3. So unterbindet es dessen stabilisierenden Effekt auf den sogenannten *ternary complex*, bestehend aus eIF2, Met-tRNA_i und GTP. Der *ternary complex* bindet normalerweise an die kleine ribosomale Untereinheit und ermöglicht den Start der Translation und damit die Synthese viraler Proteine (Hui et al. 2003).

Eine weitere Funktion von ISG56 scheint darin zu liegen, über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die durch Interferon initiierte Immunantwort zu begrenzen und damit eine überschießende Immunreaktion zu verhindern. Hierzu bindet P56 an das mitochondriale Transmembranprotein MITA und verhindert auf diesem Weg die Aktivierung von TKB1, was letztlich zu einer Unterbrechung der Interferon- β -Induktion führt (Li et al. 2009).

Neben der oben beschriebenen Induktion durch Interferon existiert auch ein von Interferon-unabhängiger Weg der ISG56-Aktivierung. Ohne vorherige Interferonfreisetzung kommt es zur ISG56-Induktion als direkte Antwort auf eine Virusinfektion. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass auch für diesen Interferon-unabhängigen Weg die Aktivierung von IRF-3 zwingend notwendig ist. So kommt es in transgenen Fibroblasten, denen im Gegensatz zur Wildtyp-Variante IRF-3 fehlt, unter Stimulation mit Virus-RNA nicht zur ISG56-Induktion (Collins et al. 2004).

Neben der IFN-Induktion, spielt IRF-3 auch eine wichtige Rolle in der Aktivierung des programmierten Zelltods im Rahmen einer Virusinfektion, die virale Vermehrung durch Absterben der Wirtszelle zu verlangsamen. Hierbei kommt es zur Translokation von IRF-3 aus dem Zytoplasma in Mitochondrien, was zur Aktivierung der Apoptose führt (Chattopadhyay et al. 2010).

1.2.6 Virale Strategien gegen das Interferonsystem

Im Laufe der Evolution hat sich nicht nur das menschliche Immunsystem den fortwährenden Infektionen durch Viren und anderen Mikroorganismen angepasst. Auch auf viraler Seite entstanden durch den wechselseitigen Selektionsdruck vielfältige Mechanismen zur Umgehung oder Unterbindung der Immunantwort. An dieser Stelle soll nur beispielhaft eine kleine Auswahl viraler Strategien zur Unterwanderung des angebore-

nen Immunsystems aufgezeigt werden, wobei grundsätzlich jeder Schritt der Interferon-Induktionskette einen potentiellen Angriffspunkt bietet.

Wichtige virale Strategien bestehen in der Produktion von Proteasen, der Aktivierung des Proteosoms der Wirtszelle und der Blockierung von Bestandteilen des Interferonsystems, wie zum Beispiel den zytoplasmatischen RIG-like-Rezeptoren (RLRs). Virale Proteasen sind in der Lage, für die Interferoninduktion wichtige zelluläre Proteine direkt zu zerstören. So kodiert das Poliovirus eine Protease 3C, welche NF- κ B durch die Spaltung seiner p65-Untereinheit inaktiviert und den Interferon-Signalweg dadurch unterbricht (McInerney, Karlsson Hedestam 2009).

Beim Proteosom handelt es sich um einen Komplex von zelleigenen Proteasen, die in der Apoptose und im Zellzyklus eine wichtige Rolle spielen. Einige Viren sind in der Lage, Proteine wie STAT1 und -2 vermehrt durch das Proteosom abbauen zu lassen (McInerney, Karlsson Hedestam 2009). Das Rotavirus, welches wie die Orbiviren zur Familie der Reoviridae gerechnet wird, kann mit Hilfe seines NS1 den proteosomalen Abbau von IRF-3 einleiten und so dessen Translokation in den Zellkern verhindern (Barro, Patton 2005). Auf demselben Weg werden auch IRF-5 und IRF-7 dem Abbau zugeführt (Barro, Patton 2007).

Dass die Virus-RNA einen starken Induktor des Interferonsystems darstellen kann und z.B. durch fehlende 2-O-Methylierung von zelleigener RNA durch die RLRs unterschieden werden kann, wurde unter 1.2.3 (S.9) bereits erläutert. Um diese Erkennung durch die zytoplasmatischen PRRs zu umgehen, kodiert z.B. das SARS-Coronavirus NS14-Gen für eine viruseigene Methyltransferase, welche die fehlende Methylierung ergänzen und die Replikationsfähigkeit des Virus deutlich erhöhen kann (Chen et al. 2009).

Auch gegen die vom Immunsystem produzierten antiviralen Proteine haben die Viren effektive Abwehrmechanismen entwickelt. So existieren verschiedene Wege, die Wirkung der PKR zu unterbinden, indem etwa ihre Dimerisierung verhindert, ihre Aktivität von viralen Proteinen direkt gehemmt oder Pseudosubstrate als kompetitive Inhibitoren durch das Virus produziert werden können (Randall, Goodbourn 2008). Das HI-Virus wiederum kodiert in seinem Genom für einen RNase L-Inhibitor, wodurch die RNase L-Aktivität in HIV-infizierten Zellen im Laufe der Zeit abnimmt (Martinand et al. 1999).

1.3 Zielsetzung

Die Ausgangsfrage für die vorliegende Arbeit ist, ob das Tribec-Virus einen hemmenden Einfluss auf die Aktivierung des Typ-I Interferonsystems hat. Dazu soll untersucht werden, ob es in der Einzelinfektion mit TRBV und in einer Doppelinfektion mit dem die IFN-Produktion induzierenden RVFV-Clone-13 zu einer Induktion von IFN- β kommt. Des Weiteren soll der Einfluss einer TRBV-Infektion auf das Wachstumsverhalten Interferon-kompetenter Zellen untersucht werden.

Zusätzlich sollen verschiedene Segmente des Virusgenoms darauf hin untersucht werden, ob ihre Expression für die mögliche Hemmung der IFN-Induktion verantwortlich ist.

Ein besonderes Augenmerk im Rahmen der möglichen Hemmung der IFN-Induktion wird auf der Fragestellung liegen, inwieweit es unter einer TRBV-Infektion zur Translokation von IRF3 aus dem Zellzytoplasma in den Zellkern kommt, da IRF3 ein häufiger Angriffspunkt viraler Proteine zur Unterdrückung der Aktivierung der IFN-Induktion ist (siehe 1.2.6, S.14).

2 Material und Methoden

2.1 Standardmaterialien

Im Folgenden werden Materialien aufgelistet, die bei der Mehrzahl der Versuche verwendet wurden. Alle weiteren Materialien sind jeweils direkt vor den Methodenbeschreibungen aufgelistet.

Geräte:	
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Wärmebad	Köttermann GmbH&Co KG, Uetze/Hänigsen
Mikroskop	Nikon Instruments Europe B.V., Amstelveen, Niederlande
Sterilbank	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Inkubator	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Waltham, USA
Gefriertruhe (max. -140°C)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Vortex	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Gefrierschrank (max. -80°C)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Verbrauchsartikel:	
Pipettus mit Pipetten (2,5,10,25ml)	Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co KG, Eberstadt, Deutschland
Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter (0,1-10µl, 1,0-100µl, 1,0-200µl, 101-1000µl)	Starlab GmbH, Ahrensberg, Deutschland
Safe-Lock-Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reagenzröhren (15ml, 50ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland

Medien, Puffer und Enzyme:	
DMEM (500ml) in gebrauchsfertigem Zustand	100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 50ml FKS, 526,6 mg/l Glutamin
MEM (500ml) in gebrauchsfertigem Zustand)	100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 50ml FKS, 526,6 mg/l Glutamin

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

Verbrauchsartikel:	
Zellkulturflaschen zu 75cm²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Medien, Puffer und Enzyme:	
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Zelllinien:	
HEK 293 (Nierenzellen aus menschlichen Embryonen)	Microbix Biosystems Inc., Toronto, Kanada
Vero B4	DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland
Vero E6	ATCC, Manassas, USA

Methoden:

Zur Kultivierung der verschiedenen Zelllinien werden die Medien DMEM und MEM in gebrauchsfertigem Zustand verwendet.

Die Zellen vom Typ HEK-293 und Vero E6 werden mit gebrauchsfertigen DMEM, die Zellen vom Typ Vero B4 mit gebrauchsfertigem MEM kultiviert. Vor ihrem Gebrauch müssen sowohl die Medien als auch das PBS für ungefähr 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad erwärmt werden.

Zunächst wird die Konfluenz des Zellrasens der in 75cm² Zellkulturflaschen wachsenden Zellen mit Hilfe des Mikroskops überprüft. Bei einem ausreichend dichten Zellra-

sen am Boden der Zellkulturflaschen kann das alte Medium abgesaugt und verworfen, der Zellrasen hiernach mit 5 ml PBS von Medienresten gesäubert werden. Zum Ablösen der Zellen vom Kulturboden wird 1 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und diese 5 Minuten bei 37°C im Inkubator, die HEK-293-Zellen bei Raumtemperatur, stehen gelassen. Anschließend werden die Zellen durch lockeres Anschlagen der Kulturflasche vom Boden gelöst und dem Trypsin-Zellgemisch, im Folgenden als Trypsinat bezeichnet, 4 ml des entsprechenden Mediums zugesetzt. Im Anschluss an mehrmaliges Mischen durch Auf- und Abziehen mit Hilfe der Pipette wird ca. 0,5 ml des Trypsinats in die Zellkulturflasche zurückgegeben, der Rest verworfen oder zur Aussaat für die entsprechenden Versuchsreihen verwendet. Nach Auffüllen der Kulturflasche mit 11,5 ml Medium wachsen die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator bis zum erneuten Erreichen eines konfluenten Zellrasens. Diese Konfluenz wird meist nach 3-4 Tagen Zellwachstum erreicht. Danach müssen die Zellen wie beschrieben ausgedünnt werden, um weiteres Zellwachstum zu ermöglichen und für die Versuche optimale Zellen zu erhalten.

2.2.2 Zellzahlbestimmung

Verbrauchsartikel:	
Neubauer-Zählkammer	Hycor Biomedical Inc., USA
Chemikalien und Enzyme:	
Trypanblau	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Methode:

Um eine bestimmte Anzahl an Zellen aussähen zu können, muss die Anzahl der Zellen pro Milliliter Trypsinat bestimmt werden. Hierzu werden 10 µl Trypsinat mit 90 µl Trypanblau in einem Safe-Lock-Reaktionsgefäß vermischt und anschließend 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben.

Mit Hilfe des Mikroskops wird in drei von neun Quadraten der Neubauer-Zählkammer die Zellanzahl bestimmt und ein Mittelwert gebildet. Gezählt werden allerdings nur einzelne Zellen, Zellhaufen werden als eine Zelle gewertet.

Aus dem berechneten Mittelwert kann durch Multiplikation mit 10^5 die Zellzahl pro Mililiter Trypsinat errechnet werden.

2.2.3 Zellaussaat in Kavitätenplatten und Zellkulturflaschen

<i>Verbrauchsartikel:</i>	
Kavitätenplatten (6, 12, 24, 96 Kavitäten)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<i>Zelllinien:</i>	
HEK-293 (Nierenzellen aus menschlichen Embryonen)	Microbix Biosystems Inc., Toronto, Kanada
Vero B4	DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland
Vero E6	ATCC, Manassas, USA

Methode:

Für die meisten Experimente müssen Zellen in verschieden große Kavitätenplatten ausgesät werden. Hierzu wird zu Anfang des Experimentes die benötigte Zellzahl pro Kavität festgelegt und auf die Gesamtzahl der Kavitäten hochgerechnet. Mit Hilfe der bereits beschriebenen Zellzahlbestimmung kann errechnet werden, wie viel Milliliter Trypsinat pro Kavität nötig sind, um die gewünschte Menge an Zellen aussäen zu können.

Je nach Größe der Kavität wird eine bestimmte Menge des benötigten Wachstumsmediums für die Zellen in die Kavitätenplatten vorgelegt, das Trypsinat mit Hilfe der Pipette in das vorgelegte Medium gegeben und durch leichtes Schwenken der Platte vermischt. Die 96-Kavitätenplatten fassen 200 μ l, die 12-Kavitätenplatten 1 ml und die 6-Kavitätenplatten 2 ml pro Kavität.

Schließlich können die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator am Kavitätenboden anwachsen. Da nach 24 Stunden Inkubation ungefähr mit einer Verdoppelung der Zellzahl zu rechnen ist, wird die auszusäende Zellzahl so gewählt, dass am nächsten Tag die für das jeweilige Experiment benötigte Zellzahl pro Kavität vorhanden ist.

Die Aussaat von Zellen in Zellkulturflaschen erfolgt nach demselben Prinzip.

2.2.4 Virusanzucht und Infektion der Zellen in Kavitätenplatten

Verbrauchsartikel:	
Zellkulturflaschen zu 75cm²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mikro-Schraubröhrchen (2 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zelllinien:	
HEK-293 (Nierenzellen aus menschlichen Embryonen)	Microbix Biosystems Inc., Toronto, Kanada
Vero B4	DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland
Vero E6	ATCC, Manassas, USA
Viren:	
Tribec-Virus	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
RVFV-Clone-13	RVFV-Isolat, apathogene Variante (Lopez et al. 1995)

Methode:

Da die uns zur Verfügung gestellte Menge an Tribec-Virus begrenzt ist, muss mehrmals neues Virus angezchtet werden.

Zu diesem Zweck werden zunächst $1,5 \cdot 10^6$ Zellen in eine 75cm²-Zellkulturflasche ausgesät, wobei das Tribec-Virus in Vero B4-Zellen angezchtet wird.

Nach 24 Stunden Zellwachstum im Inkubator wird das Medium entfernt und 75 µl Virusüberstand sowie 925 µl Wachstumsmedium auf den Zellrasen gegeben. Bei einem TCID₅₀ von $2 \cdot 10^6$ entspricht dies einer MOI von 0,1, also einem Verhältnis Viruspartikel zu Zellen von 1:10. Nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C wird die Zellkulturflasche mit 11 ml Medium aufgefüllt und die Zellen im Inkubator belassen.

Etwa drei Tage später ist unter dem Mikroskop ein zytopathischer Effekt sichtbar und der Virusüberstand kann abgenommen und in Miko-Schraubröhrchen umgefüllt werden.

Diese werden fünf Minuten bei 3000xg zentrifugiert, um den Virusüberstand von eventuell vorhandenen Zellresten zu säubern.

Die Virusüberstände werden nach der Zentrifugation in neue Schraubröhrchen gefüllt und bei -140°C aufbewahrt.

Für alle folgenden Experimente werden Zellen in Kavitätenplatten unterschiedlicher Größe nach der in 2.2.3 (S.20) beschriebenen Methode in gewünschter Zahl ausgesät und anschließend mit dem gewonnenen Tribec-Virus oder Rift-Valley-Fever-Virus-Clone-13 infiziert. Da diese Infektion von der Technik her der Virusanzucht ähnelt, soll sie bereits hier beschrieben werden.

Für die Infektion der Zellen wird das Medium aus den Kavitäten entfernt und verworfen. Die Menge des Virusüberstands pro Kavität ist abhängig von der gewünschten MOI sowie von dem TCID₅₀ des Virusüberstands. Ist die benötigte Menge an Virusüberstand so gering, dass nicht der gesamte Zellrasen von ihr bedeckt wird, kann eine entsprechende Menge an Medium hinzugefügt werden, um ein Austrocknen des Zellrasens zu verhindern. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C im Inkubator wird der Virusüberstand wieder entfernt und die Kavitäten mit Medium neu befüllt. Abschließend werden die Kavitätenplatten je nach Experiment unterschiedlich lange inkubiert und danach weiter bearbeitet.

2.2.5 Virustiterbestimmung (TCID₅₀)

Verbrauchsartikel:	
Mehrkanalpipette 50-200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kavitätenplatte, 96 Kavitäten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zelllinien:	
Vero B4	DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland
Vero E6	ATCC, Manassas, USA
Viren:	
Tribec-Virus	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München

Method:

Die TCID₅₀ (*tissue culture infective dose*) gibt die Virusverdünnung an, bei der in 50% der infizierten Zellen noch ein zytopathischer Effekt, also sichtbare Veränderungen der infizierten Zellen, beobachtet werden kann.

Zur Ermittlung des TCID₅₀ bei den neu gewonnenen Tribec Überständen wird eine 96-Kavitätenplatte mit $1 \cdot 10^4$ Vero B4-Zellen in 150 µl MEM je Kavität ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Für andere Viren werden entsprechend andere Zellen und Medien verwendet.

Der zu bestimmende Virusüberstand wird mit dem jeweiligen Medium auf Verdünnungsstufen von 10^1 bis 10^{11} verdünnt. Für jede Virusprobe werden vier Reihen auf der tags zuvor ausgesäten 96-Kavitätenplatte mit den unterschiedlichen Virusverdünnungsstufen infiziert, die Platte anschließend bei 37°C inkubiert.

Nach sechs Tagen erfolgt die Kontrolle der infizierten Zellen mit Hilfe des Lichtmikroskops -im Vergleich zu nicht infizierten Zellen- im Folgenden als Mock bezeichnet. Wenn in 50% der Kavitäten einer Verdünnungsstufe ein zytopathischer Effekt sichtbar ist, wird der TCID₅₀ erreicht und der Mittelwert für alle vier Reihen kann errechnet werden. Ein zytopathischer Effekt bis zur Verdünnungsstufe 10^5 bedeutete einen TCID₅₀ von 10^5 in 50 µl. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass die 50 µl Virusverdünnung bei Zugabe in die Kavitäten nochmals in 150 µl Medium verdünnt werden. Somit muss der errechnete Wert nochmals mit dem Faktor vier multipliziert werden. Da der TCID₅₀ nach dieser Methode für 200 µl Virusüberstand bestimmt wird, ist eine weitere Multiplikation mit dem Faktor 5 notwendig. So erhält man den gesuchten TCID₅₀/ml Virusüberstand.

Durch die Bestimmung des TCID₅₀ kann bei den Experimenten die nötige Menge an Virus eingesetzt werden, um eine vorgegebene MOI zu erreichen. Sollen $1 \cdot 10^6$ Zellen mit einer MOI=1 infiziert werden, so muss entsprechend 1 ml Virus mit einem TCID₅₀ von $1 \cdot 10^6$ eingesetzt werden.

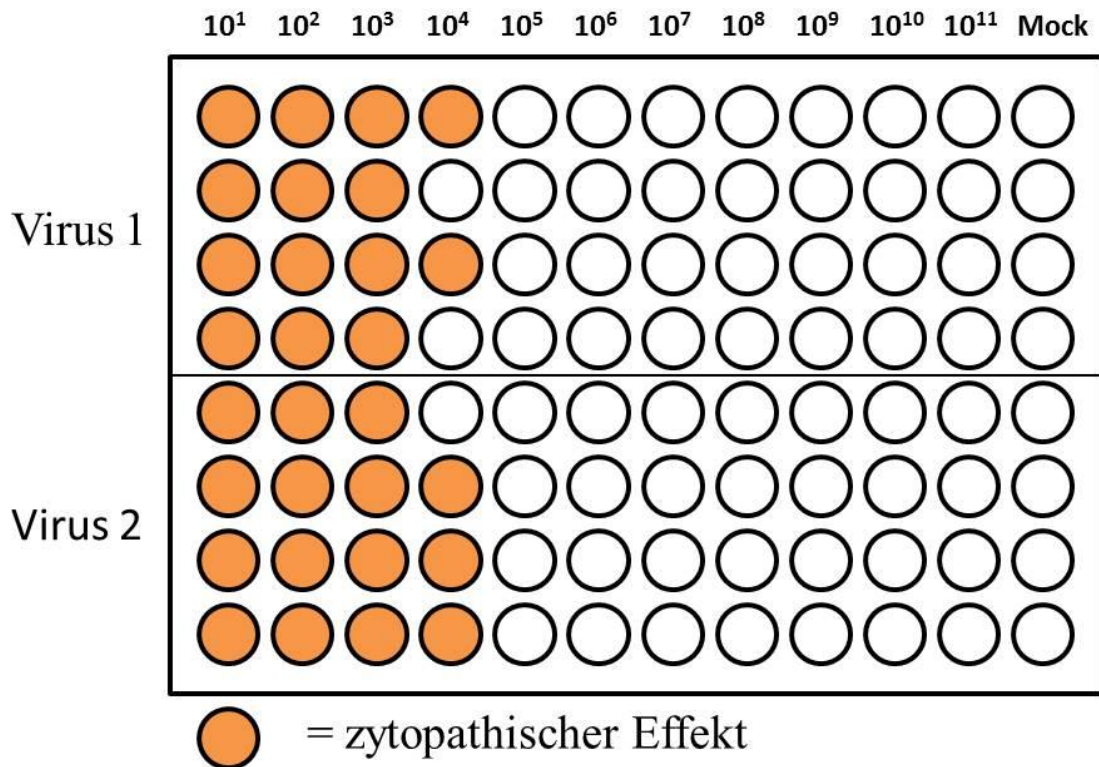


Abbildung 7: Ablesen des zytopathischen Effekts für zwei verschiedene Virusüberstände. Mock bezeichnet nicht infizierte Zellen.

2.2.6 RNA-Isolierung bei infizierten und nicht infizierten Zellen

Verbrauchsartikel:	
Kavitätenplatten, 6 Kavitäten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zelllinien:	
HEK-293 (Nierenzellen aus menschlichen Embryonen)	Microbix Biosystems Inc., Toronto, Kanada
Vero B4	DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland
Viren:	
Tribec-Virus	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München

RVFV-Clone-13	RVFV-Isolat, apathogen Variante (Lopez et al. 1995)
Chemikalien:	
peqGOLD TriFast	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
2-Propanol	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 75%	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
DEPC-Wasser	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

Methoden:

Zunächst werden wie unter 2.2.3 (S.20) und 2.2.4 (S.21) beschrieben Zellen in Kavitätentplatten ausgesät und je nach Versuchsanordnung mit Tribec oder RVFV-Clone-13 infiziert, wobei auch Coinfektionen mit beiden Viren möglich sind.

Ungefähr 24 Stunden nach Infektion der Zellen erfolgt die Isolierung der Zell-RNA unter Anwendung von PeqGOLD TriFast nach Anleitung des Herstellers. PeqGOLD TriFast enthält Phenol sowie Guanidinisothiocyanat und isoliert gleichzeitig RNA und DNA auf Grundlage einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation, bei der sich die Nukleinsäuren in unterschiedlichen Flüssigkeitsphasen je nach ihrer Löslichkeit anreichern.

Nach Lyse der Zellen durch Zugabe von TriFast auf den Zellrasen und anschließender kurzer Inkubation bei Raumtemperatur zwecks Dissoziation der Nukleotidkomplexe, erfolgt die Phasentrennung unter Zugabe von Chloroform und Zentrifugation. Hierzu werden die Proben in Safe-Lock-Reaktionsgefäße überführt. In den zentrifugierten Röhrchen bilden sich drei Phasen, wobei die RNA nur in der obersten wässrigen Phase vorhanden ist. Die beiden unteren, DNA und Proteine enthaltenden Phasen können verworfen werden.

Die Ausfällung der RNA kann danach durch Zugabe von Isopropanol, Lagerung der Proben für 15 Minuten auf Eis und abschließender Zentrifugation erreicht werden. Am Boden der Safe-Lock-Reaktionsgefäße ist die isolierte RNA als weißes Sediment sichtbar, welches nach Abnahme des Isopropanolüberstands zwei Mal mit 75% Ethanol zu reinigen ist.

Im letzten Schritt wird das gewonnene RNA-Sediment nach Abnahme des Ethanols für 10 Minuten getrocknet und abschließend mit DEPC Wasser resuspendiert. Diethylpyrocarbonat (DEPC) führt über eine Modifikation von Histidinresten zur Enzymhemmung. Dies kann einer möglichen Kontamination der resuspendierten RNA durch RNasen entgegenwirken.

Für weitere Arbeitsschritte wird die RNA bei -80°C aufbewahrt.

2.2.7 DNase-Behandlung, Reinigung von Gesamt-RNA und spektrometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

<i>Geräte:</i>	
NanoDrop 1000 Spectrophotometer mit Software ND-1000 V 3.8.0 one channel	Thermo Scientific, Waltham, USA Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland,
<i>Verbrauchsartikel:</i>	
RNeasy MinElute spin column	Qiagen GmbH, Hilden, Germany
<i>Chemikalien, Enzyme und Puffer:</i>	
10x TURBO DNase Buffer	Ambion Applied Biosystems, Austin, USA
TURBO DNase (2 Units/μl)	Ambion Applied Biosystems, Austin, USA
DNase Inactivation reagent	Ambion Applied Biosystems, Austin, USA
RNase-freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden, Germany
Buffer RLT	Qiagen GmbH, Hilden, Germany
Buffer RPE	Qiagen GmbH, Hilden, Germany
Ethanol 80-96%	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
DEPC-Wasser	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

Method:

Obwohl sich bei der RNA-Isolierung mit Hilfe der Einschnitt-Flüssigphasen-Separation RNA und DNA in unterschiedlichen Phasen lösen, kann bei Überführung der RNA-Phase eine Kontamination der Probe mit DNA nicht ausgeschlossen werden. Daher ist ein DNA-Verdau mit Hilfe des Ambion TURBO DNase Kits und anschließender Aufreinigung der Probe durch ein RNA Cleanup notwendig, da in anschließenden Versuchen die Anwesenheit von DNA zur Verfälschung der Ergebnisse führen kann. Desoxyribonukleasen (DNasen) spalten als Endonukleasen DNA-Phosphodiesterbindungen hinter Pyrimidinnukleotiden und zerteilen auf diese Weise den DNA-Doppelstrang in Polynukleotide.

Vorteil der verwendeten TURBO DNase ist, dass diese eine um 350% höhere katalytische Aktivität und eine höhere Affinität zur DNA als die Wildtyp-DNase I aufweist.

Nach Anleitung des Herstellers wird der DNA-Verdau gestartet, indem TURBO DNase und TURBO DNase Buffer, welcher die Aktivität der DNase nochmals verstärkt, zu den Proben gegeben. Nach Inkubation bei 37°C wird die Reaktion unter Verwendung von DNase Inactivation reagent gestoppt und die Proben zentrifugiert. Die Überstände können nun in neue Safe-Lock-Reaktionsgefäße überführt werden.

Mit Hilfe des RNeasy MinElute Cleanup Kits erfolgte die Entfernung von Enzymrückständen und Abbauprodukten des vorherigen DNA-Verdaus nach Anleitung des Herstellers Qiagen.

Das Grundprinzip dieser Aufreinigung besteht darin, dass RNA selektiv an eine Silika-Membran in den im Kit enthaltenen RNeasy MinElute spin columns bindet. Diese werden in Safe-Lock-Reaktionsgefäße eingesetzt und mit den aufzuarbeitenden Proben befüllt. Durch Zentrifugation der Röhrchen kann die an der Silika-Membran gebundene RNA von Enzymrückständen und Nukleotiden befreit werden. Zum Schluss werden die Proben mit RNase freiem Wasser resuspendiert und können bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

Für weitere Versuche ist es notwendig, die RNA-Konzentration zu bestimmen, um in Experimenten festgelegte Mengen an RNA einsetzen zu können. Hierzu wird der NanoDrop 1000 der Firma Thermo Scientific verwendet. Dieses Spektralphotometer emittiert Licht verschiedener Wellenlängen, welches von den einzelnen Bestandteilen der zu messenden Probe absorbiert wird. Aus dem Grad der Lichttransmission kann auf die

Menge an lichtabsorbierenden Bestandteile der Probe geschlossen werden. Im Gegensatz zu konventionellen UV/VIS-Spektrometern entfällt beim Nanodrop die Verwendung einer Küvette und damit die Probenverdünnung. Stattdessen überbrückt ein sehr kleines Probenvolumen direkt die Enden zweier Lichtleiter. Das durch den ersten Lichtleiter geleitete Licht wird durch die Probe teilweise absorbiert und das Ausmaß der Absorption durch ein CCD-Array am Ende des zweiten Lichtleiters erfasst. Nukleinsäuren, also sowohl DNA als auch RNA, absorbieren Licht einer Wellenlänge von 260nm, während Proteine oder Phenol ihr Absorptionsmaximum bei 280nm Wellenlängen haben. Aus dem Absorptionsquotienten 260nm/280nm kann daher auf die Probenreinheit geschlossen werden.

Da die zu messenden Proben wie oben beschrieben einem DNase-Verdau und einer anschließenden Reinigung unterzogen wird, kann davon ausgegangen werden, dass die Absorption bei 260nm nur durch RNA, nicht aber durch DNA oder einzelne Nukleotide erfolgt.

Zur Messung des RNA-Gehalts der Proben wird das Spektralphotometer zunächst mit DEPC-Wasser geeicht. Anschließend werden 1,5 µl der Probe in den NanoDrop gegeben und die Messung erfolgt nach Angaben des Herstellers.

2.2.8 cDNA-Synthese

Geräte:	
PCR-Arbeitsplatz	G&P Kunststofftechnik, Kassel, Deutschland
Thermocycler TPersonal	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Verbrauchsartikel:	
PCR Softtubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Chemikalien, Enzyme und Puffer:	
Random Hexamer Primer (RHP)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
dNTP Mix 100mM	Fermentas GmbH, Leon-Roth, Deutschland
DEPC-Wasser	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland

5xFirst Strand Buffer	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA
SuperScript III Reserve Transkriptase	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA

Methode:

Für PCRs wird cDNA als Matrize benötigt. Deshalb muss zunächst die isolierte und bearbeitete RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Reverse Transkriptasen sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen, sie können also ausgehend von einem RNA-Strang komplementäre cDNA synthetisieren und kommen in der Natur in Retroviren wie dem HI-Virus vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die SuperScript III Reverse Transkriptase der Firma Invitrogen, eine veränderte Version der M-MLV Reversen Transkriptase, nach Anleitung des Herstellers verwendet. Diese besitzt eine verminderte RNase-Aktivität bei gleichzeitig höherer Temperaturstabilität und synthetisiert Einzelstrang-cDNA mit einer Länge von 100 bis mehr als 12000 Basen.

Im ersten Arbeitsschritt wird die RNA zwecks Denaturierung erhitzt und Random Hexamer Primer und dNTPs hinzugefügt. RHP bestehen aus sechs Nukleotiden in zufälliger Abfolge und dienen nach Anlagerung an die RNA als Bindungsstelle für die Reverse Transkriptase und sind damit Ausgangspunkt für die cDNA-Synthese. Nach Zugabe der SuperScript III, DTT, First Strand Buffer und Einstellung des Temperaturoptimums für das Enzym, erfolgt die Verlängerung des Primers unter Verwendung der RNA als Matrize, katalysiert durch die Reverse Transkriptase. Die katalytische Aktivität des Enzyms wird nach 60 Minuten durch Erhitzen auf 70°C beendet und die neu gewonnene cDNA kann bei -80°C aufbewahrt werden.

2.2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Geräte:	
PCR-Arbeitsplatz	G&P Kunststofftechnik, Kassel, Deutschland
Thermocycler TProfessional	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Verbrauchsartikel:	
PCR Softtubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Chemikalien, Enzyme und Puffer:	
dNTP Mix 100mM	Fermentas GmbH, Leon- Roth, Deutschland
10x Taq Buffer advanced	5 Prime GmbH, Hamburg, Deutschland
Destilliertes PCR Wasser	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA
Taq DNA Polymerase	5 Prime GmbH, Hamburg, Deutschland
Primer:	
hu-IFN_beta_for *	GACGCCGCATTGACCATCTA
hu-IFN-beta_rev *	CCTTAGGATTTCCACTCTGACT
hu_gamma-actin_for *	GCCGGTCGCAATGGAAGAAGA
hu_gamma-actin_rev *	CATGGCCGGGGTGTGAAGGTC
TRBV ORFX_for *	ATGCATCCGTATCTGAAGCAAG
TRBV ORFX_rev *	TCATAGCCTTGCGATCGTCTCC
RVF-for #	TGCCACGAGTYAGAGCCA
RVF-rev #	GTGGGTCCGAGAGTYTGC
5'huISG56 #	AAGTGGACCCTGAAAACCTGAAT
3'huISG56 #	TGCCCTTTTGTAGCCTCCTTGAT
*	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
#	Biomers.net, Ulm/Donau, Deutschland

Method:

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1983 von Kary Mullis etabliert und dient der Vervielfältigung einzelner festgelegter DNA-Abschnitte. Im speziellen Fall der RT-PCR geht der PCR noch eine cDNA-Synthese aus RNA voraus (siehe 2.2.8, S.28).

Eine PCR besteht aus mehreren hintereinandergeschalteten Zyklen, in denen eine DNA abhängige DNA-Polymerase komplementäre Nukleotide an einen DNA-Einzelstrang synthetisiert. Somit entsteht ein DNA-Doppelstrang, die Menge an DNA wird innerhalb eines Zyklus verdoppelt und steigt exponentiell an. Auf diese Weise können auch geringe Mengen an DNA schnell vervielfältigt werden.

Zu Anfang eines Zyklus wird der PCR-Ansatz, bestehend aus der zu amplifizierenden Nukleinsäure, den Primern, Desoxyribonukleosidtriphosphaten und der DNA-Polymerase mit passendem Puffergemisch, auf 95°C erhitzt. Bei dieser Temperatur brechen die den Doppelstrang stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen auf und die DNA teilt sich in zwei Einzelstränge. Diese Phase der Denaturierung ist zu Beginn des ersten Zyklus verlängert, um sicherzustellen, dass auch alle Doppelstränge vollständig aufgetrennt werden. Hieran schließt sich ein Abkühlen des Ansatzes auf Werte zwischen 50-65°C je nach verwendetem Primer an. Unter diesen Bedingungen kommt es zur Anlagerung der Primer an die Einzelstrang-DNA. In der sogenannten Elongationsphase bindet die Polymerase an die Primer und beginnt mit der Synthese des komplementären DNA-Strangs durch Bindung freier Nukleotide an die Einzelstrangabschnitte. Die Temperatur wird auf den optimalen Arbeitsbereich der Polymerase, meist um 70°C, eingestellt. Der nächste Zyklus beginnt dann wieder mit der Trennung der neu entstandenen Doppelstränge durch Erhitzen auf 95°C.

In der vorliegenden Arbeit wird die Taq-DNA-Polymerase der Firma 5 Prime samt zugehörigem Puffer nach Protokoll des Herstellers verwendet. Diese Polymerase synthetisiert 30 bis 60 Basenpaare pro Sekunde, während der Puffer für die optimale Konzentration an Magnesiumionen sorgt.

Die Temperaturabfolge wird automatisch durch einen Thermocycler geregelt, der auf den folgenden Programmablauf eingestellt ist:

Initiale Denaturierung:	95°C	2 min	
Denaturierung:	95°C	30 sec	} 35x
Anlagern der Primer:	56°C	30 sec	
Elongation:	72°C	1 min	
Abschließende Elongation:	72°C	5 min	

Anschließend wird die DNA für die Gelelektrophorese verwendet.

2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Geräte:	
Waage	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Mikrowelle	AFK Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Chemidoc XRS mit Software Quantity One	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA
Verbrauchsartikel:	
Kavitätenplatte, 96 Kavitäten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Chemikalien, Nukleotide und Puffer:	
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
TAE Puffer (1x)	40 ml TAE [50x] + 1969 ml H ₂ O
TAE Puffer (50x)	242g Tris: 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5M EDTA (pH=8,0)
6xOrange Loading Dye	Fermentas GmbH, Leon-Roth, Deutschland
DNA-Längenstandard (1kb, 100bp)	Fermentas GmbH, Leon-Roth, Deutschland

Method:

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, DNA-Fragmente ihrer Länge nach zu trennen. Hierzu wird die DNA in ein Agarose-Gel gegeben, an welches ein Gleichstromfeld angelegt wird. Die negativ geladene DNA wandert nun in diesem Feld von der negativ geladenen Kathode zur positiv geladenen Anode. Da Gele in Abhängigkeit vom Agarosegehalt Maschen ausbilden, kommen die DNA-Fragmente unterschiedlich schnell voran. Je kleiner die Fragmente sind, desto weniger wird ihr Fortkommen durch die Gelmaschen behindert, die DNA trennt sich so der Größe nach auf.

Für die in der RT-PCR amplifizierte DNA (siehe 2.2.9, S.30) werden Gele mit 1% oder 2% Agarosegehalt gegossen. Hierzu werden 0,3 g bzw. 0,6 g Agarose (1%) mit 30 ml des Puffers TAE vermischt und in der Mikrowelle bis zur Auflösung der Agarose erhitzt, danach 1,5 µl Ethidiumbromid zugefügt. Zur Aushärtung wird das flüssige Gel in eine Form gegossen, wobei mit Hilfe eines kammartigen Einsatzes Taschen zum Befüllen des Gels ausgespart werden können. Das ausgehärtete Gel wird in die Elektrophoresekammer eingesetzt und komplett mit TAE bedeckt. In einer 96-Kavitätenplatte werden 5 µl jeder DNA-Probe mit 1 µl 6xOrange Loading Dye vermischt und anschließend mit Hilfe einer Pipette in die Geltaschen eingeführt. Zur Abschätzung der Größe der gewanderten DNA, werden zwei Längenstandards mit maximal 100 oder 1000 Basenpaarabständen in das Gel gegeben. Nach Befüllung des Gels wird für ca. 45 min eine Spannung von 100-120 Volt angelegt, wobei es durch den 6xOrange Loading Dye möglich ist zu beobachten, wie weit die DNA-Fragmente im Gel bereits gewandert sind.

Um die DNA-Banden sichtbar zu machen wird der Chemidoc XRS eingesetzt. Das zugesetzte Ethidiumbromid interkaliert mit den Nukleinsäuren und verstärkt unter dem vom Chemidoc abgegebenen UV-Licht seine Fluoreszenz, wobei diese proportional zur Menge an DNA ist. Das Gel kann daraufhin fotografiert und ausgewertet werden.

2.2.11 Indirekte Immunfluoreszenz mit TSA Signalverstärkung**Geräte:**

Konfokales Lasermikroskop	Leica	Leica Mikrosystems GmbH, Wetzlar,
TCS SP2, Leica Confocal Software		Deutschland

Verbrauchsartikel:

Kavitätenplatte, 6, 12, 24 Kavitäten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser (12 mm)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zelllinien:	
Vero B4	DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland
Viren:	
Tribec-Virus	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
RVFV-Clone-13	RVFV-Isolat, apathogene Variante (Lopez et al. 1995)
Chemikalien und Puffer:	
Formaldehyd 3,7% in PBS	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
1xPBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Permeabilisierungslösung (250 µl Triton-X100 + 50 ml 1xPBS)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
TSA Cyanin 5 Kit:	Perkin Elmer Inc., Waltham, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Streptavidin HRP • Cyanine & Tyramide Reagent • Amplification-Diluent • Blocking-Reagent 	
FluorSafe Reagent	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Primäre Antikörper:	
Anti-TRBV-Serum aus Maus	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
Anti-RVFV No. 122 Senegal Serum aus Ziege	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Modou Mustapha Lo, LNERV/ISRA, Dakar, Senegal

Anti-IRF-3 (FL-425) AK aus Kaninchen, 1:200 mit PBS verdünnt	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
<i>Sekundäre Antikörper:</i>	
Cy3 konjugierter anti-Maus AK aus Esel, 1:200 mit PBS verdünnt	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
NL 493 konjugierter anti-Schaf, anti-Ziege AK aus Esel, 1:100 mit PBS verdünnt	R&D Systems, Minneapolis, USA
Biotin konjugierter anti-Kaninchen AK aus Esel, 1:200 mit PBS verdünnt	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

Methode:

Die indirekte Immunfluoreszenz ermöglicht die Detektion unterschiedlichster Zellmoleküle und -strukturen. Das Prinzip beruht auf dem Einsatz zweier Antikörper. Der primäre Antikörper muss so gewählt werden, dass er an die zu detektierende Zielstruktur in der Zelle binden kann. Um den primären Antikörper sichtbar zu machen und damit das Vorhandensein der fraglichen Struktur nachzuweisen, wird ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist. An den sekundären Antikörper ist wiederum ein Fluorochrom gekoppelt, das unter Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge fluoresziert. Unter Verwendung eines Fluoreszenz- oder konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops kann die Fluoreszenz sichtbar gemacht werden, der Nachweis der Zielstruktur ist damit erbracht.

In der vorliegenden Arbeit wird die indirekte Immunfluoreszenz mit den oben angegebenen Antikörpern für den Nachweis der erfolgten Zellinfektion durch TRBV oder RVFV-Clone-13 sowie der Lokalisation des Interferon-regulierenden-Faktors-3 (IRF3) eingesetzt.

Zunächst werden wie unter 2.2.3 (S.20) beschrieben $1 \cdot 10^5$ Zellen Vero B4 je Kavität in einer 6-Kavitätenplatte ausgesät. Jedoch werden vor Aussaat der Zellen drei Deckgläser pro Kavität ausgelegt, die so von Zellrasen überwachsen werden. Nach 24 Stunden erfolgt wie unter 2.2.4 (S.21) erläutert die Zellinfektion mit TRBV und RVFV-Clone-13 als Einzel- und Doppelinfektion. Außerdem werden nicht infizierte, als Mock bezeichnete Zellen ausgesät.

Acht Stunden nach Infektion der Zellen werden die Deckgläschen in eine 24-Kavitätenplatte überführt und die Zellen durch Zugabe von 500 µl 3,7% Formaldehyd auf den Deckgläschen fixiert, sodass es zu keinen Veränderungen der Zellen mehr kommen kann. Nach ca. 10 Minuten Inkubation bei RT wird das Fixiermedium abgenommen und die Zellen drei Mal mit 500 µl PBS gewaschen. Von jedem Ansatz wird danach ein Deckgläschen in eine 12-Kavitätenplatte überführt, mit 500 µl 0,5% Triton X-100 in PBS pro Kavität bedeckt und für 5 Minuten inkubiert. Durch Zugabe des Detergenz Triton-X100 wird die Zellmembran für die später zugefügten Antikörper permeabilisiert. Im nächsten Arbeitsschritt werden mögliche unspezifische Bindungsstellen der Antikörper mit TNB-Puffer gesättigt, um unerwünschte Hintergrundfluoreszenz zu vermindern. Dieser Puffer wird aus dem im TSA Cyanin 5 Kit mitgelieferten Blocking-Reagent nach Anleitung von PerkinElmer hergestellt und verwendet. Die Proben werden 30 Minuten in einer feuchten Kammer gelagert, anschließend der TNB-Puffer entfernt und 40 µl der mit PBS verdünnten primären Antikörper auf die Deckgläschen gegeben. Hiernach schließt sich eine Inkuabtionszeit von einer Stunde an, bevor die primären Antikörper entfernt und die sekundären Antikörper für die gleiche Inkubationsdauer auf den Zellrasen gegeben werden.

Um ein stärkeres Signal des biotinylierten sekundären Antikörpers zu erhalten, wird das bereits erwähnte TSA Cyanin 5 Kit protokollgemäß benutzt. Über Streptavidin kann die eingesetzte Meerrettich-Peroxidase an den zur IRF3-Detektion verwendeten biotinierten sekundären Antikörper binden. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Ablagerung von Fluorochrom gekoppelten freien Tyramiden. Auf diese Weise formieren sich die unlöslichen Fluorochromkomplexe um sekundären Antikörper, wodurch das Fluoreszenzsignal signifikant verstärkt wird, ohne Einbußen in der Auflösungsqualität hinnehmen zu müssen.

Die so behandelten Deckgläschen können abschließend auf Objektträgern unter Verwendung von FluorSafe Reagent eingebettet werden. Unter dem konfokalen Lasermikroskop, welches die Fluorochrome durch einen Argon-Krypton-Laser zur Fluoreszenz anregt, können die Bilder betrachtet und mit Hilfe der Software aufgenommen und bearbeitet werden.

2.2.12 Bestimmung der Zellviabilität mittels Impedanzmessung

Geräte:	
xCELLigence mit Software	Roche Diagnostics AG, Risch, Schweiz
Verbrauchsartikel:	
Mehrkanalpipette 50-200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
96-Kavitäten-E-Platte	Roche Diagnostics AG, Risch, Schweiz
Zelllinien:	
HEK-293 (Nierenzellen aus menschlichen Embryonen)	Microbix Biosystems Inc., Toronto, Kanada
Viren:	
Tribec-Virus	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
RVFV-Clone-13	RVFV-Isolat, apathogene Mutante (Muller, 1995)

Methode:

Das xCELLigence-Zellanalysegerät von Roche ermöglicht eine *in vivo* Bestimmung von Zellzuständen über die Messung eines sich ändernden elektrischen Widerstands. Hieraus kann in Echtzeit auf das Wachstumsverhalten der Zellen bzw. Änderungen des Zellzustands nach Infektion mit Viren, rückgeschlossen werden. Für die Messungen werden Zellen in speziellen 96-Kavitätenplatten ausgesät, in der sie wie in konventionellen Kavitätenplatten am Boden anwachsen. Der Boden dieser sogenannten E-Platte ist mit einem dünnen Goldfilm beschichtet, in den in jeder Kavität eine Elektrode integriert ist. Es wird eine schwache Spannung von ca. 22 mV angelegt und alle 15 Sekunden die Impedanz an den Elektroden gemessen. Werden die Elektroden von Zellen überwachsen, führt dies zu einer Änderung der gemessenen Impedanz. Je mehr Zellen am Kavitätenboden anwachsen und je stärker die Zelladhäsion ist, desto größer wird der elektrische Widerstand. Umgekehrt sinkt der Widerstand, wenn Zellen mit Viren infiziert werden und ein zytopathischer Effekt auftritt. Der RTCA-Analyzer rechnet dann

den über die Zeit gemessenen Widerstand in einen Zellindex für jede Kavität um und stellt ihn graphisch dar.

Für diese Arbeit wird das xCELLigence-System eingesetzt, um den Wachstumsverlauf von TRBV und RVFV-Clone-13 infizierten HEK-293-Zellen im Vergleich zu nichtinfizierten Zellen aufzuzeichnen. Es handelt sich dabei sowohl um Einzel- als auch um Koinfektionen mit unterschiedlicher MOI.

Vor der eigentlichen Zellaussaat muss das xCELLigence-Gerät geeicht werden. Durch Vorlegen von 100 µl Wachstumsmedium in jede Kavität kann der Widerstand, wie er ohne Zelleinfluss herrscht, ermittelt werden. Anschließend werden 2500 HEK-293-Zellen in 150 µl Wachstumsmedium je Kavität ausgesät und die E-Plate im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ gelagert. In der Regel werden die Zellen nach 3 Tagen mit 50 µl Virusüberstand infiziert. Nach weiteren 3 Tagen werden die Überstände abgenommen und wie unter 2.2.5 (S.22) beschrieben auf Vero B4 und Vero E6-Zellen zur Bestimmung der Virusmenge titriert. Damit der weitere Verlauf des Zellwachstums beobachtet werden kann, wurden die Kavitäten der E-Platte mit jeweils 200 µl Wachstumsmedium wieder aufgefüllt.

2.2.13 Dual-Luciferase Reporter Assay

Geräte:	
FLUOstar Optima Software	BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Deutschland
Verbrauchsartikel:	
Kavitätenplatte, 12, 96 Kavitäten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Multipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Chemikalien und Puffer:	
Lipofectamine 2000	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dual-Luciferase Reporter Assay System:	Promega Corporation, Madison, USA

<ul style="list-style-type: none"> • Luciferase Assay Substrate und Buffer II • Stop&Glo Substrate und Buffer • 5x-PLB 	
Kontroll-Plasmide und RNA:	
VSV-RNA	Laboreigene isolierte RNA VSV infizierter Vero E6-Zellen
Vero-RNA	Laboreigene isolierte RNA aus Vero-E6 Zellen
p125-Luc (humaner induzierbarer Interferon- β Promotor, gekoppelt an das Firefly-Luciferase-Reporter-Gen)	Takashi Fujita, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan
pI.18-RL (konstitutiv aktiver CMV Promotor, gekoppelt an das Renilla-Luciferase-Reporter-Gen)	Promega, Mannheim, Deutschland
Medien:	
OptiMEM	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA
Zelllinien:	
HEK-293 (Nierenzellen aus menschlichen Embryonen)	Microbix Biosystems Inc., Toronto, Kanada

Methode:

Ein Dual-Luciferase Reporter Assay ermöglicht die Messung einer Promotoraktivität über ein an den Promotor gekoppeltes Luciferase-Reporter-Gen. Diese Enzyme, die in der belebten Natur unter anderem in Glühwürmchen vorkommen, können durch den Umsatz ihrer Substrate, den Luciferinen, eine Biolumineszenz hervorrufen. Sind die Luciferasen dem zu messenden Genpromotor nachgeschaltet, kann über die Intensität der Lumineszenz auf den Grad der Aktivierung des Promotors rückgeschlossen werden, da die Luciferasegene in Abhängigkeit von der Promotoraktivierung exprimiert werden.

In einem Dual Reporter System werden zwei Luciferasen gleichzeitig verwendet, die jedoch aus verschiedenen Organismen stammen und unterschiedliche Substrate umsetzen müssen. Im Fall des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems der Firma Promega sind dies die Firefly-Luciferase (FL) aus *Photinus pyralis* und die Renilla Luciferase (RL) aus *Renilla reniformis*. Während die FL durch sauerstoffabhängige Oxidation von Käfer-Luciferin zu Oxyluciferin eine Lumineszenz erreicht, kommt es bei der RL über die Umwandlung von Luciferin aus Rippenquallen zu einer Lichtemission.

In einer 12-Kavitätenplatte werden in diesem Experiment $1 \cdot 10^5$ HEK-293-Zellen je Kavität in 1 ml Medium ausgesät (siehe 2.2.1, S.18). Nach 24 h Inkubation werden die Reporterkonstrukte mit Hilfe einer Lipofektion transfiziert, bei welcher die von Liposomen umschlossenen Plasmide nach Verschmelzung der Liposomen mit der Zielzellmembran in den Zellen freigesetzt werden. Für die Lipofektion wird ein sogenannter Lipomix aus je 2 μ l Lipofektamin mit 50 μ l OptiMEM pro Kavität erstellt, vorsichtig in einem Reaktionsgefäß vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Für jede Kavität werden 0,0125 μ g pI.18-RL und 0,25 μ g p125Luc in einem Mastermix mit 50 μ l OptiMEM vermischt. Anschließend wird ein Plasmid-Konstrukt zur Expression z.B. eines Virus-segments, zugefügt, von dem ein Einfluss auf die Expression des Interferon- β -Promotors vermutet wird oder das als Kontrolle dient. Nach Zugabe von 50 μ l Lipomix je Ansatz und 20 min Inkubation bei RT wird 100 μ l der Transfektionslösung in jede Kavität gegeben und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die IFN- β -Promotor kontrollierte FL-Expression (p125Luc) wird durch Zugabe von 2 μ g VSV-RNA je Kavität stimuliert. Als Negativkontrolle wird in einem zweiten Ansatz die gleiche Menge an Vero-RNA transfiziert. Auch hier dient die Lipofektion dazu, die RNA mit Hilfe von Liposomen in die Zellen zu bringen. Nach Transfektion der RNA werden die Zellen für weitere 24 h im Inkubator belassen.

Die Arbeitsschritte der eigentlichen Lumineszenzmessung werden nach Anleitung des Herstellers Promega durchgeführt. Zunächst müssen die Zellen unter Zugabe von 100 μ l 1xPLB lysiert werden, bevor je 20 μ l Zelllysat in eine 96-Kavitätenplatte überführt wird. Nach Zusatz ihres Substrates LAR II kann die Messung der FL-Aktivität im FLUOstar Optima gestartet werden. Die nach der Messung zugefügte Stop&Glo-Reagenz stoppt die FL-Aktivität und enthält gleichzeitig das Substrat für die RL. Da die RL im pI.18-Plasmid an den konstitutiv aktiven CMV-Promotor gekoppelt ist und

somit unabhängig von der Stimulation durch Virus-RNA exprimiert wird, spiegelt die Aktivität der RL die Transfektionseffizienz wieder, welche mit der FL-Aktivität zu verrechnen ist.

2.2.14 Bestimmung der IFN- β -Konzentration in Zellkulturüberständen mittels Sandwich-ELISA

Geräte:	
FLUOstar Optima mit Software	BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Deutschland
Verbrauchsartikel:	
Mehrkanalpipette 50-200 μl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Chemikalien:	
DEPC-Wasser	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Human IFN-β ELISA Kit	PBL Interferon Source, New York, USA

Method:

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist eine Nachweismethode, die in dieser Arbeit zur Quantifizierung von Interferon- β eingesetzt wird. Hierzu wird das Human IFN- β ELISA Kit der Firma PLB Interferon Source gemäß des Protokolls des Herstellers verwendet.

Die zu messenden Proben werden in die im Kit enthaltene 96-Kavitätenplatte gegeben, an deren Boden immobilisierte, gegen IFN- β gerichtete Antikörper gebunden sind. Nach einer Stunde Inkubation können, durch Abpipettieren der Proben und Waschen der Kavitäten, alle Substanzen bis auf das an die Antikörper gebundene IFN- β entfernt werden. Ähnlich wie bei der Signalverstärkung der indirekten Immunfluoreszenz (siehe 2.2.11, S.33) wird hiernach ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter sekundärer Antikörper eingesetzt. Der Antikörper ist ebenfalls gegen IFN- β gerichtet, bindet allerdings an ein anderes Epitop, als der erste immobilisierte Antikörper. Als Substrat wird 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zur an den sekundären Antikörper gebundenen Meerrettich-Peroxidase gegeben, welche das Substrat in ein blaues Reaktionsprodukt

umsetzt. Nach 15 Minuten wird die Reaktion mittels schwefelsäurehaltiger Stopp-Lösung angehalten, wodurch es zu einem Farbumschlag nach Gelb kommt. Die Absorption wird mit Hilfe des FLUOstar Optima bei einer Wellenlänge von 450nm Absorption gemessen. Je mehr Meerrettich-Peroxidase markierter Antikörper an das immobilisierte IFN- β gebunden hat, desto stärker ist die Farbstoffentwicklung und damit die Absorption. Um die ermittelte Absorption in eine Interferonkonzentration umrechnen zu können, wird eine Standardkurve über die schrittweise Verdünnung des im Kit enthaltenen IFN- β -Standards erstellt, sodass sieben Vergleichsproben mit einer definierten Menge von 25-2000 pg/ml IFN vorhanden sind. Über die Absorption der Standards kann die Software mit Hilfe einer Eichgerade den Interferongehalt der gemessenen Proben errechnen.

3 Ergebnisse

3.1 Interferon- β -Induktion in TRBV-infizierten Zellen

Fragestellung für den ersten Teil der vorliegenden Arbeit war, inwieweit TRBV die Induktion von IFN- β hemmen kann. Zu diesem Zweck wurden RT-PCRs, TCID₅₀ sowie ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Im Folgenden sollen die erhaltenen Ergebnisse dargestellt werden.

3.1.1 RT-PCR zur Untersuchung der IFN- β -Induktion

Um nachzuweisen, dass das Tribec-Virus die Produktion von Interferon- β aktiv hemmt, wurde mittels RT-PCR untersucht, ob es in entsprechend infizierten Zellen zu einer Induktion von IFN- β kam. Es wurden in einer 6-Kavitätenplatte, wie unter 2.2.1 (S.18) beschrieben, HEK-293-Zellen mit einer Zelldichte von $3 \cdot 10^5$ Zellen pro Kavität ausgesät. Die menschlichen embryonalen Nierenzellen besitzen ein intaktes Interferonsystem. Bei Infektion mit einem Virus kommt es daher zu einer verstärkten Transkription des IFN- β kodierenden Gens, es sei denn, ein Virus ist in der Lage, diese Induktion zu hemmen.

Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit TRBV (MOI=0,1) und RVFV-Clone-13 (MOI=0,3) sowohl in Einzel- als auch in Doppelinfektionen infiziert (siehe 2.2.4, S.21). In der zweiten Doppelinfektion wurden die Zellen zunächst mit TRBV und 6 h später mit RVFV-Clone-13 infiziert. Die Virusüberstände wurden nach einer Stunde wieder abgenommen, die Infektionsdauer betrug insgesamt ungefähr 24 h Als Kontrolle wurden mit Mock bezeichnete Zellen im nicht infizierten Zustand belassen. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert (siehe 2.2.6, S.24), mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.8, S.28) und diese unter Verwendung der jeweiligen Primer in der RT-PCR amplifiziert (siehe 2.2.9, S.30).

3.1.1.1 Nachweis der IFN- β -Induktion

Zum Nachweis der IFN- β -Transkripte wurden die Primer hu_IFN_beta_for und _rev in der RT-PCR eingesetzt.

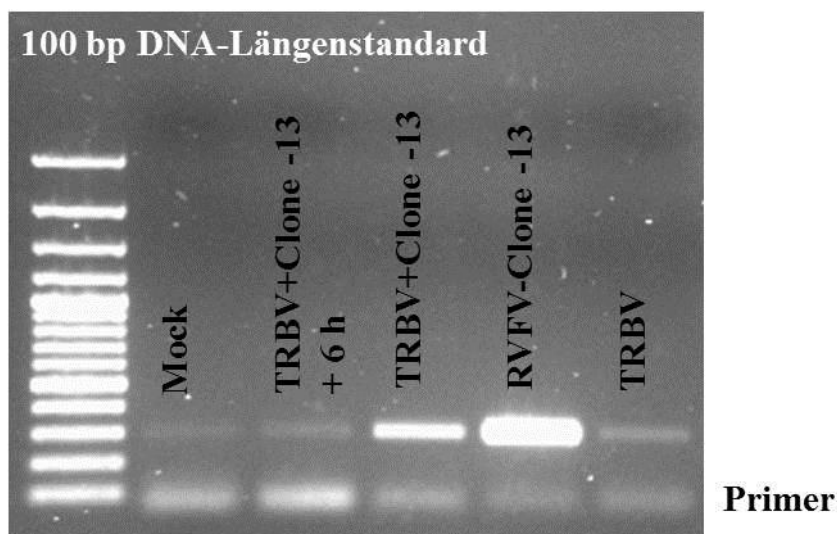


Abbildung 8: Gelelektrophorese zum Nachweis der IFN- β -Induktion in einzel- und doppeltinfizierten HEK-293-Zellen.

In der Gelelektrophorese zeigte sich bei den mit RVFV-Clone-13 infizierten HEK-293-Zellen erwartungsgemäß ein starkes Signal, da dieses Virus die IFN- β -Produktion stimuliert und somit in der RT-PCR eine Aktivierung der IFN- β -Transkription nachgewiesen werden konnte.

In mit Tribec-Virus infizierten Zellen kam es dagegen kaum zu einer Interferon- β -Induktion. Das Signal in der Gelelektrophorese zeigte sich ähnlich schwach wie bei den Mock-infizierten Zellen. Auch in den doppelt infizierten Zellen zeigte sich im Vergleich zur RVFV-Clone-13-Einzelfektion eine deutlich schwächere Bande. Ließ man dem Tribec-Virus in der Doppelfektion zusätzliche 6 h Vorlauf vor der Zweitinfektion, fiel die IFN- β -Induktion noch schwächer aus und bewegte sich ungefähr auf dem Niveau der TRBV-Einzelfektion bzw. der Mock-infizierten Zellen, obgleich die eingesetzte MOI für TRBV niedriger war als für RVFV-Clone-13.

3.1.1.2 Infektionsnachweise

Zum Nachweis der Infektion mit dem Tribec und RVFV-Virus wurden die Primer TRBV ORFX_for und _rev sowie RVF-for und -rev eingesetzt. So konnten in den infizierten Zellen enthaltene virale RNA nachgewiesen werden.

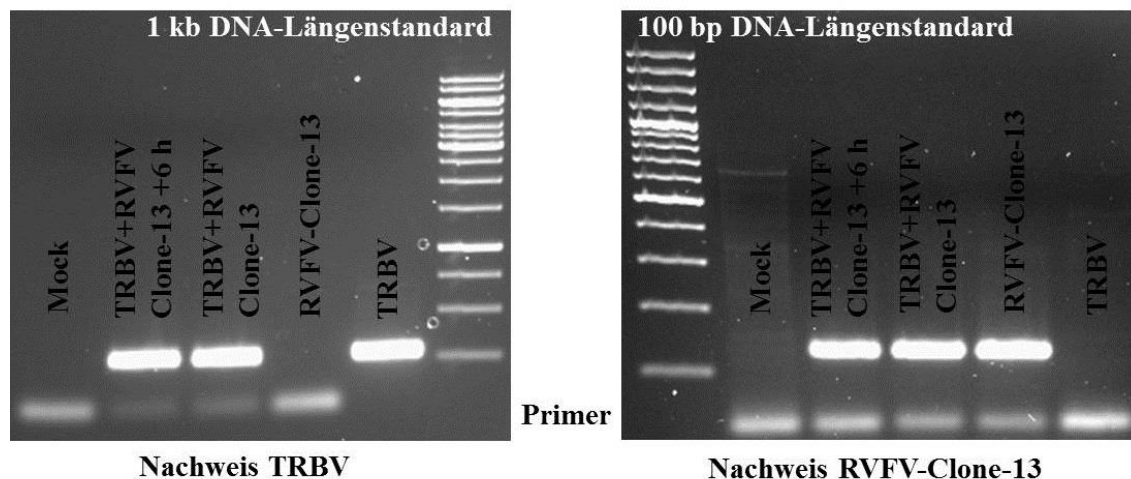


Abbildung 9: Gelelektrophoresen zum Nachweis der erfolgten Virusinfektionen in HEK-293-Zellen.

Es zeigte sich den doppelt infizierten Zellen sowohl ein Signal für den Nachweis von TRBV als auch für RVFV-Clone-13. In den mit einem Virus infizierten Zellen wurde nur das jeweils eingesetzte Virus nachgewiesen, eine versehentliche Coinfektion, eine Verwechslung der Proben oder eine unspezifische Bindung der verwendeten Primer konnte somit ausgeschlossen werden. Für die Mock-infizierten Zellen trat in der Gelelektrophorese weder eine Bande für TRBV noch eine Band für RVFV-Clone-13 auf.

3.1.1.3 Kontroll-PCRs

Neben den PCRs zum Nachweis der Infektion wurde eine PCR zum Nachweis von γ -Aktin mit den Primern hu_γ-actin_for und _rev durchgeführt. So kann sichergestellt werden, dass die beobachteten Unterschiede bezüglich der IFN- β -Transkription nicht auf unterschiedliche Mengen an eingesetzter RNA bzw. cDNA zurückzuführen sind. γ -Aktin ist in den meisten Wirbeltier-Zellen Bestandteil des Zytoskeletts. Bei korrekter RNA-Isolierung sollte also bei allen Proben, inklusive Mock-infizierter Zellen, ein Signal für γ -Aktin vorhanden sein. Um zu zeigen, dass bei der Aufreinigung der RNA keinerlei Rückstände genomischer DNA in den Proben vorhanden waren, die in den PCRs unbeabsichtigt vervielfältigt werden konnten, wurde eine weitere Kontroll-PCR mit den Primern hu_IFN_beta_for und _rev angesetzt. In der PCR wurde die aus den Zellen isolierte RNA ohne vorherige cDNA-Synthese zum PCR-Ansatz gegeben. Falls diese frei von DNA war, sollten in der Gelelektrophorese keine Banden zu sehen sein.

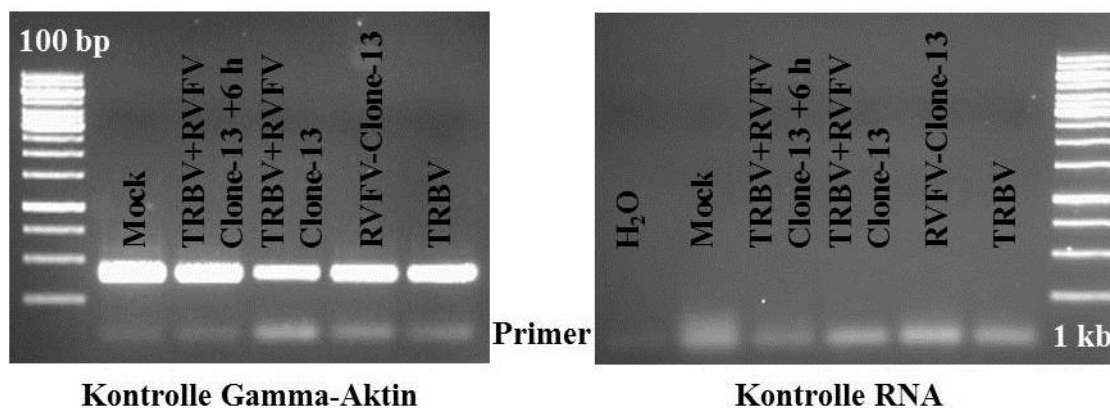


Abbildung 10: Gelelektrophorese zum γ -Aktin-Nachweis in HEK-293-Zellen und zur Reinheitskontrolle der isolierten RNA.

In der γ -Aktin-PCR zeigte sich für jede Infektionsart eine Bande in der Gelelektrophorese, womit das Vorhandensein des Strukturproteins Gamma-Aktin in jeder Probe nachgewiesen werden konnte.

Wurde nur RNA als Matrize für die Taq-DNA-Polymerase in den PCR-Ansatz gegeben, waren in der Gelelektrophorese keine Banden zu sehen. Die RNA war also frei von genomischer DNA, da diese in der PCR vervielfältigt worden wäre und ein Signal erzeugt hätte. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Unterschiede bezüglich der IFN- β -Transkription auf Kontaminationen durch genomische DNA zurückzuführen waren.

3.1.2 TCID₅₀ zum Nachweis der TRBV-Replikation in Doppelinfektionen

Mit Hilfe der virusspezifischen PCRs (siehe 3.1.1.2, S.44) konnten nur virales Transkript bzw. virale genomische Segmente detektiert werden. Die PCRs lieferten jedoch keinen Aufschluss darüber, ob infektiöse Viruspartikel gebildet wurden.

Aus diesem Grund war nicht eindeutig auszuschließen, dass in den Doppelinfektionen die Vermehrung des RVFV-Clone-13 durch TRBV gehemmt wurde und es auf diesem Weg zu einer Abnahme der INF- β -Induktion kam und nicht durch eine aktive Hemmung des Interferonsystems. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden die Virusüberstände aus 3.1.1 aufbewahrt und anschließend auf Vero E6-Zellen titriert, um den Virustiter bestimmen zu können (siehe 2.2.5, S.22). Konnte das RVFV auch in den

Doppelinfectionen replizieren, sollten im $TCID_{50}$ ähnlich hohe Virustiter erreicht werden, wie für die RVFV-Einzelinfection.

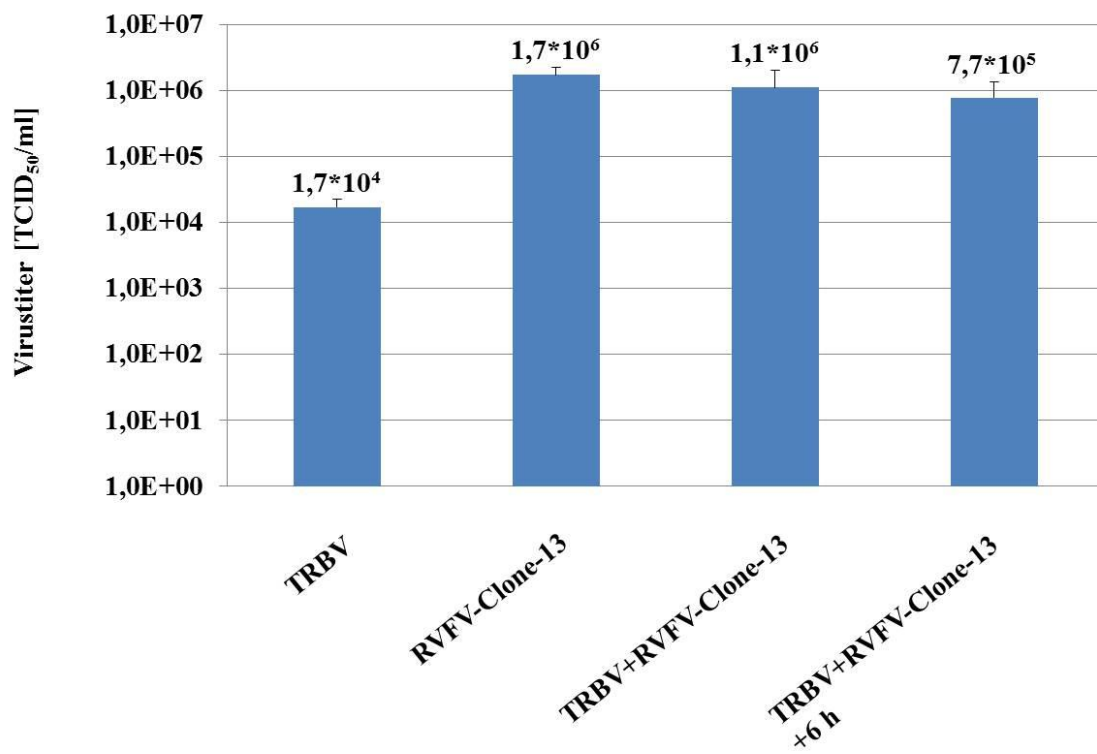


Abbildung 11: Virustiterbestimmung der Virusüberstände TRBV und RVFV-Clone-13 in Einzel- und Doppelinfectionen auf Vero E6-Zellen mittels $TCID_{50}$. Mittelwerte aus 3 verschiedenen Messungen.

Abbildung 11 (S.47) zeigt, dass für die RVFV-Clone-13-Einzelinfection mit einem $TCID_{50}$ von $1,7 \cdot 10^6$ /ml ein Virustiter erreicht wurde, der 2 log-Stufen über dem Titer der TRBV-Einzelinfection ($1,7 \cdot 10^4$ /ml) lag und somit 100fach höher war. Das RVFV-Clone-13 konnte auf den HEK-293-Zellen somit effektiver replizieren, als das TRBV. In vorangegangenen $TCID_{50}$ konnte gezeigt werden, dass TRBV auf Vero B4-Zellen deutlich besser repliziert als auf Vero E6. So wurden hier Titer von bis zu $2 \cdot 10^6$ $TCID_{50}$ /ml erreicht, die damit fast 2 log-Stufen über dem Titer des auf Vero E6 titrierten Virus lagen.

In beiden Doppelinfectionen wurden mit $1,1 \cdot 10^6$ $TCID_{50}$ /ml und $6,7 \cdot 10^5$ $TCID_{50}$ /ml Virustiter erreicht, die nahe an den Titer der RVFV-Clone-13-Einzelinfection heranreichten.

Verglichen mit der TRBV-Einzelfektion lagen die Werte 39- (TRBV+RVFV-Clone-13 +6 h) bzw. 65-mal (TRBV+RVFV-Clone-13) höher. Da in der TRBV-Einzelfektion solch hohe Werte bei der Titration auf Vero E6-Zellen nicht erreicht werden konnten, musste es in den Doppelfektionen zur Vermehrung von RVFV-Clone-13 gekommen sein. Die verminderte β -Induktion in den Doppelfektionen konnte daher nicht auf einer Hemmung der Replikation des RVFV-Clone-13 durch das Tribec-Virus beruhen.

3.1.3 Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von IFN- β

Mittels RT-PCR konnte die Aktivierung der Interferon- β -Transkription in HEK-293-Zellen bei verschiedenen Infektionsarten dargestellt werden. Es war mit dieser Methode allerdings nicht möglich, eine Aussage über die Menge an freigesetztem IFN- β zu treffen.

Da die Menge der gebildeten Transkripte nicht zwangsläufig mit der Menge an freigesetztem IFN- β korrelieren muss (so könnte es beispielsweise zu einer posttranskriptionellen Stabilisierung der Transkripte kommen), wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt, um die Menge an IFN- β in den Proben quantifizieren zu können (siehe 2.2.14, S.41).

Wie in 3.1.1 (S.43) beschrieben, wurden in einer 6-Kavitätenplatte je $3 \cdot 10^5$ HEK-293-Zellen pro Kavität ausgesät und 24 h später mit TRBV (MOI=0,1) und RVFV-Clone-13 (MOI=0,3) einzeln und doppelt infiziert. Auch hier wurde TRBV in einer zweiten Doppelfektion 6 h Vorsprung vor der Zweitinfektion mit RVFV-Clone-13 gegeben und eine Kavität zur Kontrolle unbehandelt belassen (Mock). Nach weiteren 24 h wurden 50 μ l Überstand aus jeder Kavität für den Sandwich-ELISA entnommen.

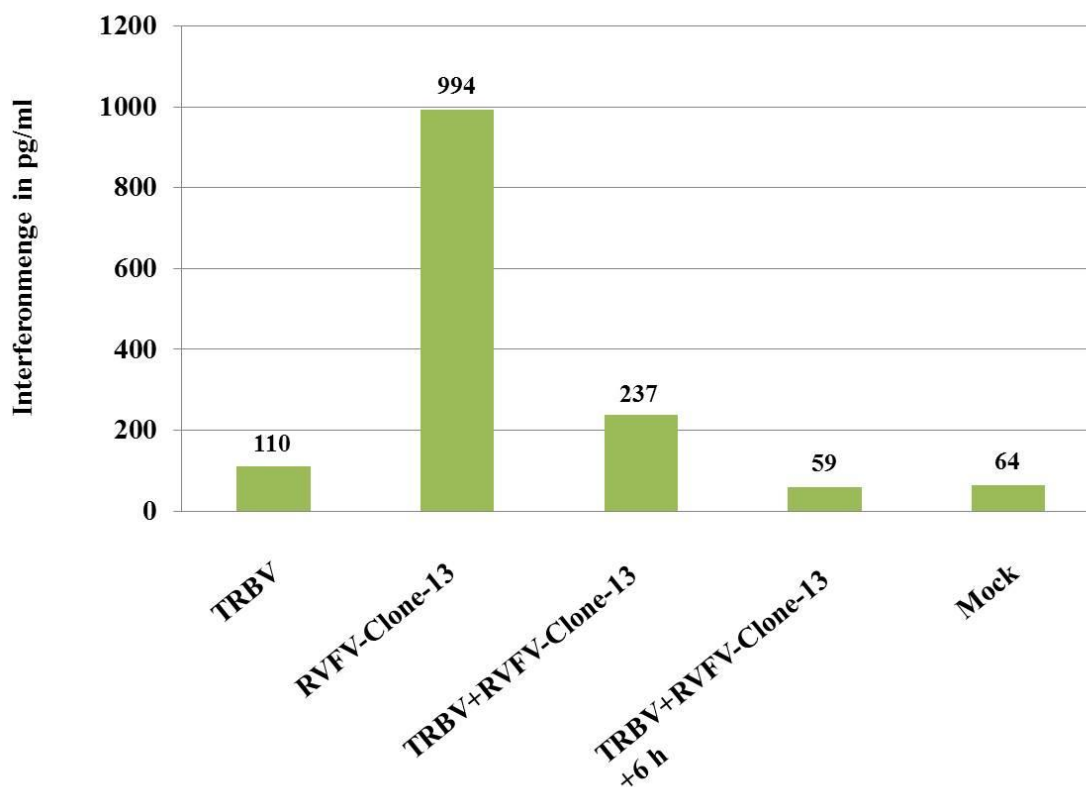


Abbildung 12: Messung der freigesetzten Interferon- β -Menge bei Einzel- und Doppelinfectionen mit TRBV (MOI=0,1) und RVFV-Clone-13 (MOI=0,3) auf HEK-293-Zellen mittels Sandwich-ELISA.

Die Menge der Interferonfreisetzung stimmte mit den in den PCRs gewonnenen Daten zur IFN- β -Induktion überein (siehe 3.1.1.1, S.43).

Kam es bei TRBV-Infektion mit 110 pg/ml nur zu einer geringfügig höheren IFN- β -Freisetzung als in den nicht infizierten Mock-Zellen (64 pg/ml), lag die Menge an IFN- β in den mit RVFV-Clone-13 behandelten Proben bei 994 pg/ml und war im Vergleich zu den Mock-Proben ungefähr um den Faktor 15 erhöht. Wurden die Zellen zusätzlich zu RVFV-Clone-13 noch mit TRBV infiziert, sank die gemessene Menge an IFN- β deutlich ab und war mit 237 pg/ml nur noch vier Mal so hoch wie in den Mock-Proben. Mit einem Infektionsvorsprung von 6 h für TRBV in der zweiten Doppelinfection nahm der gemessene Wert weiter ab und bewegte sich mit 59 pg/ml sogar auf dem Niveau der Mock-Proben.

3.2 Wachstumsverhalten TRBV-infizierter Zellen

Ziel war es zu untersuchen, wie interferonkompetente HEK-293-Zellen eine Infektion mit Tribec-Virus verarbeiteten, bzw. wie sich ihr Wachstumsverlauf nach der Infektion darstellte. Bei einer Hemmung der IFN- β -Induktion durch TRBV sollten die Zellen die Infektion schlechter überstehen als eine Infektion mit RVFV-Clone-13. Bei dieser apathogenen Mutante des RVFV kommt es nicht zur Hemmung der Aktivierung des IFN- β -Systems. Die interferonkompetenten HEK-293-Zellen sollten demnach in ihrer Immunantwort auf das Virus nicht gehemmt werden und eine Infektion mit RVFV-Clone-13 besser hemmen können, als eine TRBV-Infektion. Zur Viabilitätsbestimmung der infizierten Zellen wurde das xCELLigence-SP von Roche eingesetzt, das Prinzip der Methode wurde bereits unter 2.2.12 (S.37) beschrieben. Für den Versuch wurden 2500 HEK-293-Zellen je Kavität in einer E-Platte ausgesät und nach 3-5 Tagen mit TRBV und RVFV-Clone-13 in Einzel- und Doppelinfektionen infiziert. Über die RTCA Software wurde der Wachstumsverlauf der Zellen in Echtzeit graphisch dargestellt und aufgezeichnet.

3.2.1 Bestimmung der Zellviabilität nach Infektion mit hoher TRBV-MOI

Die Zellen wurden mit TRBV (MOI=2) und RVFV-Clone-13 (MOI=10) in Einzel- sowie in einer Doppelinfektion (MOI=2+10) infiziert. Zur Kontrolle wurden als Mock bezeichnete Zellen im nicht infizierten Zustand belassen.

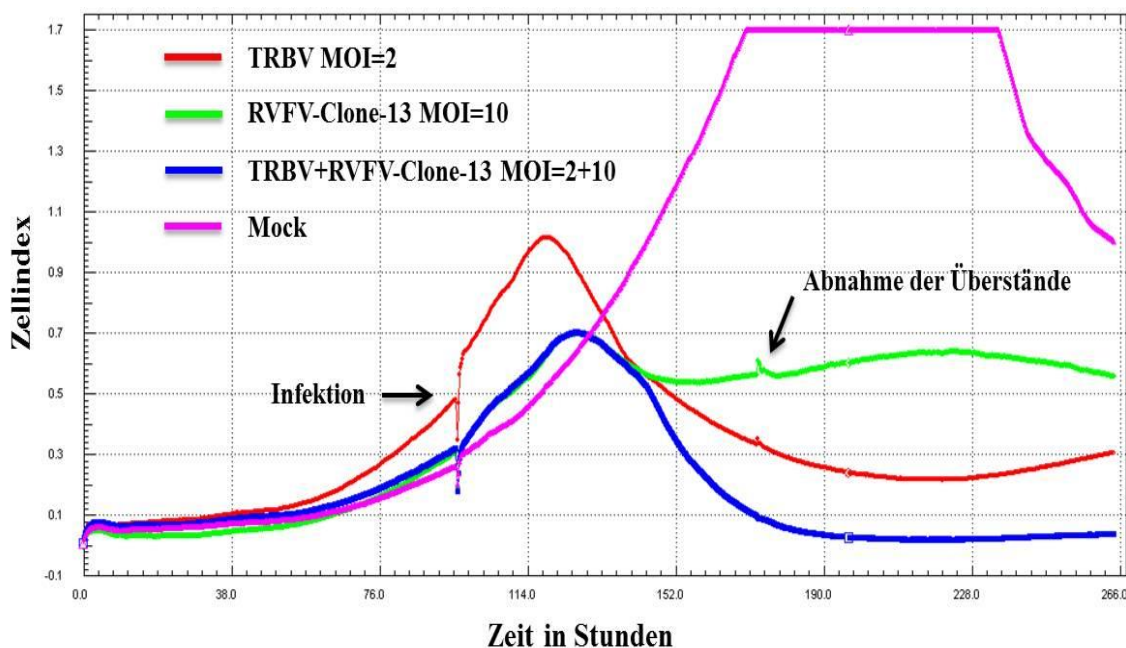


Abbildung 13: Wachstumsverhalten der mit TRBV und RVFV-Clone-13 infizierten Zellen über die Zeit. Es handelt sich um errechnete Mittelwerte aus je 8 Kavitäten. Bei Infektion der Zellen und Abnahme der infektiösen Überstände zur Austiration kam es zu Artefakten im Kurvenverlauf. Die mit Mock bezeichneten Zellen erreichten ca. bei Stunde 200 ihren maximalen Zellindex von 2,4.

Wie aus Abbildung 13 (S.51) ersichtlich wird, erreichten die infizierten Zellen nie den Zellindex der Mock-infizierten Zellen, unabhängig davon welches Virus zur Infektion eingesetzt wurde. So kam es bei allen drei Infektionsarten ungefähr 34 h nach der Infektion zu einem Abfall des Zellindex.

Während sich die Zellen von der RVFV-Clone-13-Infektion jedoch relativ schnell erholen konnten, der Zellindex stieg nach ca. 12 h wieder leicht an und stabilisierte sich, kam es bei den mit TRBV behandelten Zellen zu einem steilen Abfall des Zellindex auf Werte um 0,2. Erst 133 h nach Infektion kam es zu einem leichten Wiederanstieg im Wachstumsverlauf. Zudem ist anzumerken, dass der unterschiedliche Kurvenverlauf trotz der deutlich niedrigeren MOI von 2 für TRBV zustande kam, während RVFV-Clone-13 mit einer 5fach höheren MOI zu den Zellen gegeben wurde.

Die Wachstumskurve der doppelt infizierten Zellen entsprach fast der Kurve der TRBV-Einzelfektion. Allerdings fiel hier der Zellindex sogar auf Werte um 0 ab, was auf ein vollständiges Absterben der Zellen hindeutet.

3.2.2 Bestimmung der Zellviabilität nach Infektion mit niedriger TRBV-MOI

Mittels einer weiteren Impedanzmessung sollte untersucht werden, ob auch mit einer noch niedrigeren TRBV-MOI zu einem ähnlich steilen Abfall des Zellindex kam. Hierzu wurde die MOI für TRBV in der Einzel- und Doppelinfektion um 2 log-Stufen gesenkt, für RVFV-Clone-13 wurde erneut eine MOI=10 gewählt.

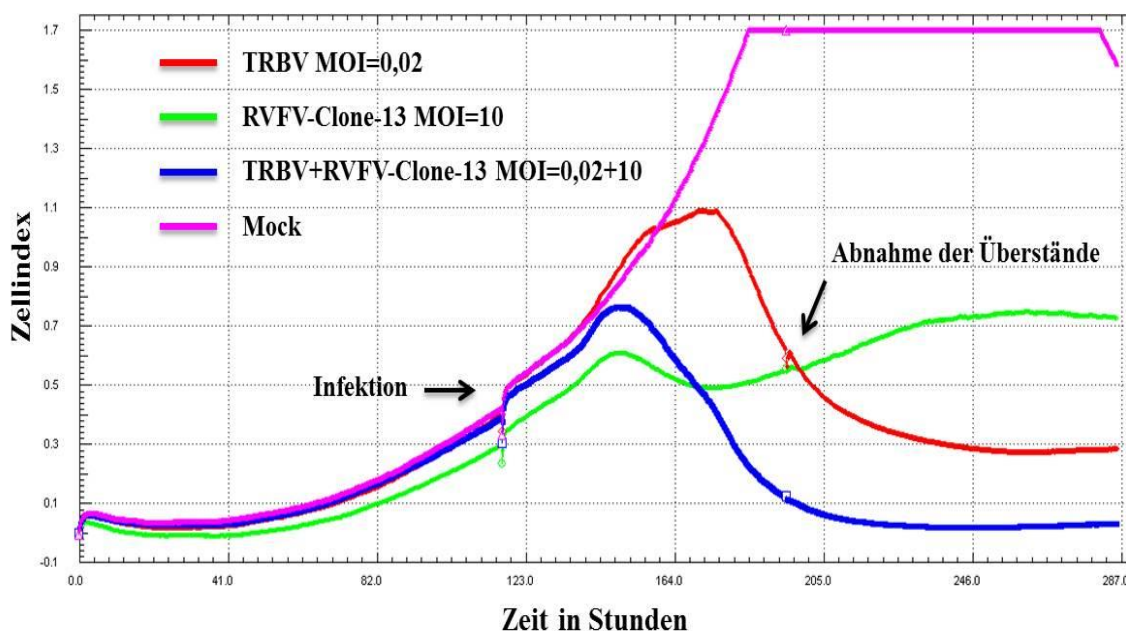


Abbildung 14: Wachstumsverhalten der mit TRBV und RVFV-Clone-13 infizierten Zellen über die Zeit. Es handelt sich um errechnete Mittelwerte aus je 8 Kavitäten. Bei Infektion der Zellen und Abnahme der infektiösen Überstände zur Austitration kam es zu Artefakten im Kurvenverlauf. Die mit Mock bezeichneten Zellen erreichten ca. bei Stunde 225 ihren maximalen Zellindex von 2,4.

Bei Absenkung der MOI für TRBV um 2 log-Stufen, konnte im Vergleich mit der TRBV-Infektion aus 3.2.1 (S.50), ein längeres Überleben der infizierten Zellen gemessen werden (60 h im Vergleich zu 30 h bei hoher TRBV-MOI). Nach wie vor kam es aber im Gegensatz zur RVFV-Clone-13-Infektion zu keiner Erholung der Zellpopulation. Ein ähnliches Bild ergab sich für die Doppelinfektion, bei welcher der Zellindex auf 0 abfiel.

3.2.3 $TCID_{50}$ zur Virustiterbestimmung der infektiösen Überstände

Um einen Zusammenhang zwischen Zellindexabfall und der Menge an neugebildeten Viruspartikeln herstellen zu können, wurden, wie bereits für die PCR Proben beschrie-

ben (siehe 3.1.2, S.46), auch in den infektiösen Überständen der Impedanzmessungen die Virustiter bestimmt. Zu diesem Zweck wurde jede Infektionsart auf der 96-Kavitätenplatte doppelt angelegt. Somit konnten Überstände aus der E-Platte entnommen werden, ohne die Messung des Zellindex über die Zeit beenden zu müssen.

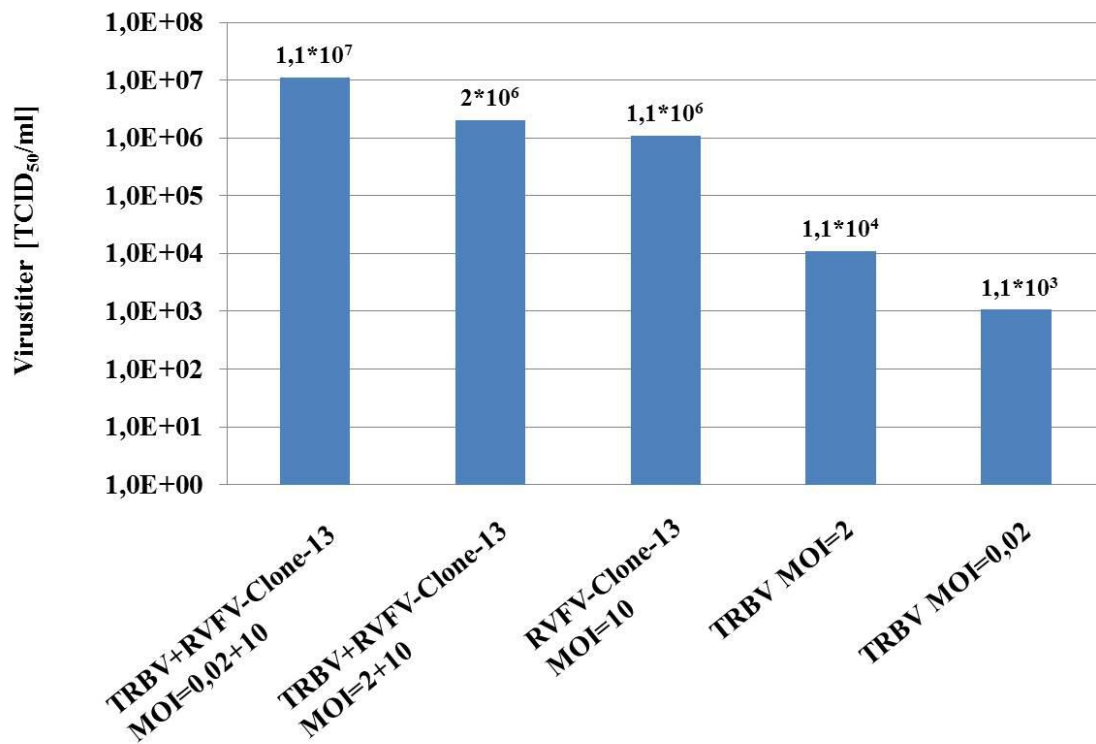


Abbildung 15: Virustiterbestimmung der Virusüberstände TRBV und RVFV-Clone-13 in Einzel- und Doppelinfektionen auf Vero E6-Zellen mittels TCID₅₀. Bei der Probenentnahme kam es zu den in Abbildung 12 (S.49) und Abbildung 13 (S.51) beschriebenen Artefakten im Kurvenverlauf.

Abbildung 15 (S.53) lässt vermuten, dass kein direkter Zusammenhang zwischen Zellindex und Virustiter bestand. Allerdings ist die Aussagekraft durch die generell schlechtere Replikation von TRBV in Vero E6-Zellen in dieser Hinsicht eingeschränkt. So kam es in den mit TRBV-infizierten Zellen, bei hoher oder niedriger MOI, zu einem starken Abfall des Zellindex. Die ermittelten Virustiter fielen mit $1,1 \cdot 10^4$ und $1,1 \cdot 10^3$ TCID₅₀/ml relativ gering aus. Bei Titration der Überstände auf Vero B4-Zellen wurden höhere Titer von $1,01 \cdot 10^6$ und $2 \cdot 10^4$ TCID₅₀/ml gemessen, was bei der bereits beschriebenen schlechteren Replikation von TRBV auf Vero E6-Zellen jedoch zu erwarten war (siehe 3.1.2, S.46). Für die Titration auf Vero E6 lagen die Virustiter 2, bzw. 3 log-Stufen unter dem Titer für die RVFV-Clone-13-Infektion und waren damit 100,

bzw. 1000fach niedriger. Geringe Mengen TRBV reichten somit aus, um die HEK-293-Zellpopulation effektiv zu dezimieren.

Abweichend davon erholte sich die Zellpopulation von der RVFV-Clone-13-Infektion sehr schnell. Es kam kaum zu einem Absinken des Zellindex über die Zeit, obwohl hier im Vergleich zur TRBV-Einzelfektion deutlich größere Mengen an Virus vorhanden waren ($1,1 \cdot 10^6$ TCID₅₀/ml).

In den doppelt infizierten Proben ging der starke Abfall des Zellindex mit hohen Virustitern einher. In der Doppelinfektion bei niedriger TRBV-MOI fiel der Virustiter mit $1,1 \cdot 10^7$ TCID₅₀/ml insgesamt am höchsten aus und lag eine log-Stufe über dem Titer der RVFV-Clone13-Einzelfektion.

3.2.4 Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von IFN- β

Um, neben der tatsächlichen Viruslast, in den infektiösen Überständen der Impedanzmessung auch Aussagen über die freigesetzte Menge an IFN- β treffen zu können, wurden 50 μ l der aus den Impedanzmessungen abgenommenen Überstände (siehe 3.2.3, S.52) in einem Sandwich-ELISA untersucht (siehe 2.2.14, S.41). Ziel war es, mögliche Korrelationen zwischen Wachstumsverhalten und INF- β Freisetzung der Zellen sowie den ermittelten Virustitern zu finden.

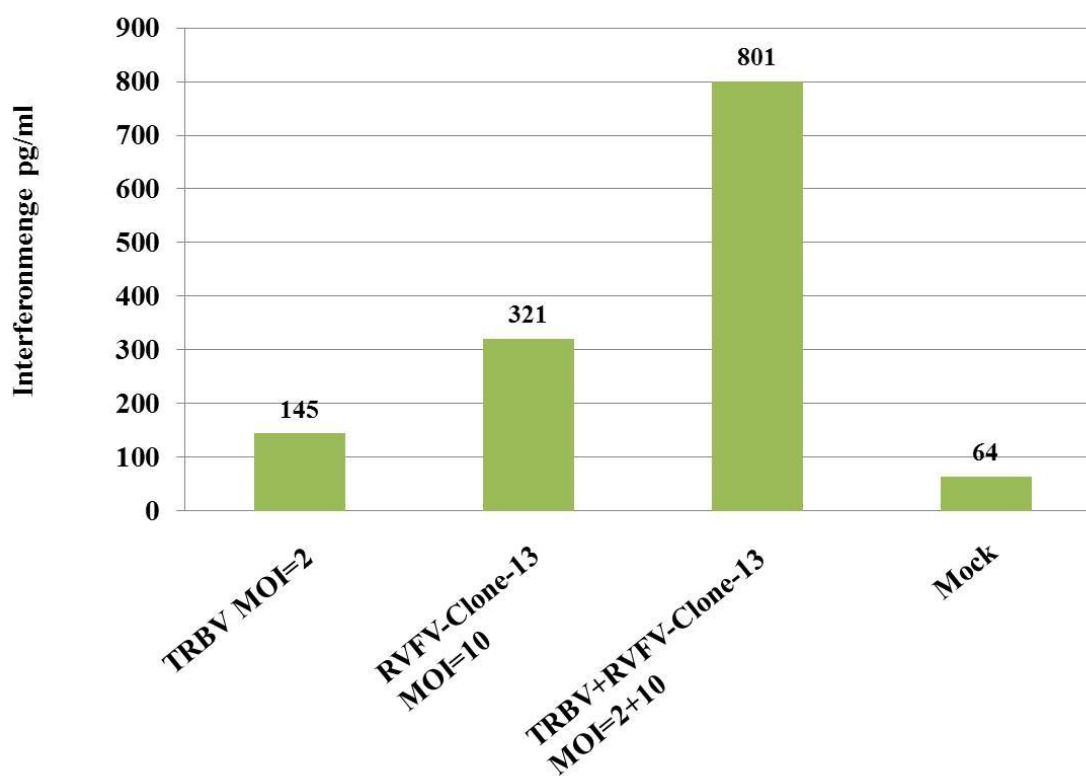


Abbildung 16: Messung der freigesetzten Interferon- β -Menge in xCELLigence-Überständen aus 3.2.3 (S.52) mittels Sandwich-ELISA. Die verwendeten HEK-293-Zellen wurden mit TRBV (MOI=2) und RVFV-Clone-13 (MOI=10) einzeln und doppelt infiziert.

Für die mit TRBV (MOI=2) infizierten Zellen konnte im Sandwich-EILSA 145 pg/ml Interferon- β nachgewiesen werden. Dies entsprach ungefähr der zweifachen Menge an IFN- β , wie sie in der nicht infizierten Mock-Probe ermittelt werden konnte. Wurden die Zellen im xCELLigence mit RVFV-Clone-13 bei einer MOI=10 infiziert, betrug die Interferonmenge 321 pg/ml und lag damit um mehr als das Doppelte über dem Wert der TRBV-Einzelninfektion.

Im Gegensatz zu den unter 3.1.3 (S.48) untersuchten Proben wurde die größte Menge an IFN- β jedoch nicht in der RVFV-Clone-13-Einzelninfektion, sondern für die mit beiden Viren infizierten Zellen gemessen. Sie lag mit 801 pg/ml noch deutlich über den Mengen der jeweiligen Einzelninfektionen.

3.3 IRF-3-Translokation in TRBV-infizierten Zellen

Bei den meisten Infektionen mit RNA-Viren kommt es durch Erkennung der viralen RNA als PAMP zur Aktivierung einer Signalkaskade, wie bereits im Einleitungsteil dieser Arbeit erläutert (siehe 1.2.3, S.9), an deren Ende die Phosphorylierung von Interferon-regulierendem-Faktor-3 durch TBK1 steht. IRF-3 induziert, nach Dimerisierung und Translokation in den Zellkern, die Transkription des IFN- β -Gens. Ausgehend von diesen Überlegungen sollte im dritten Abschnitt der Arbeit untersucht werden, ob es bei einer Infektion mit dem die IFN- β -Induktion hemmenden Tribec-Virus zu einer Aktivierung und Translokation von IRF-3 kam. Hierzu wurden PCRs und die indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt.

3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis der IRF-3-Translokation

Zum Nachweis der IRF-3-Translokation wurde die indirekte Immunfluoreszenz mit TSA-Signalverstärkung eingesetzt (siehe 2.2.11, S.33). Hierzu wurden Vero B4-Zellen wie unter 2.11 beschrieben ausgesät, infiziert und schließlich mit den primären und sekundären Antikörpern gegen TRBV, RVFV-Clone-13 und IRF-3 behandelt. Während die AK zur TRBV und IRF-3-Detektion in einer Verdünnung von 1:200 auf die Zellen gegeben wurden, wurden die AK zur RVFV-Clone-13 Detektion 1:100 verdünnt.

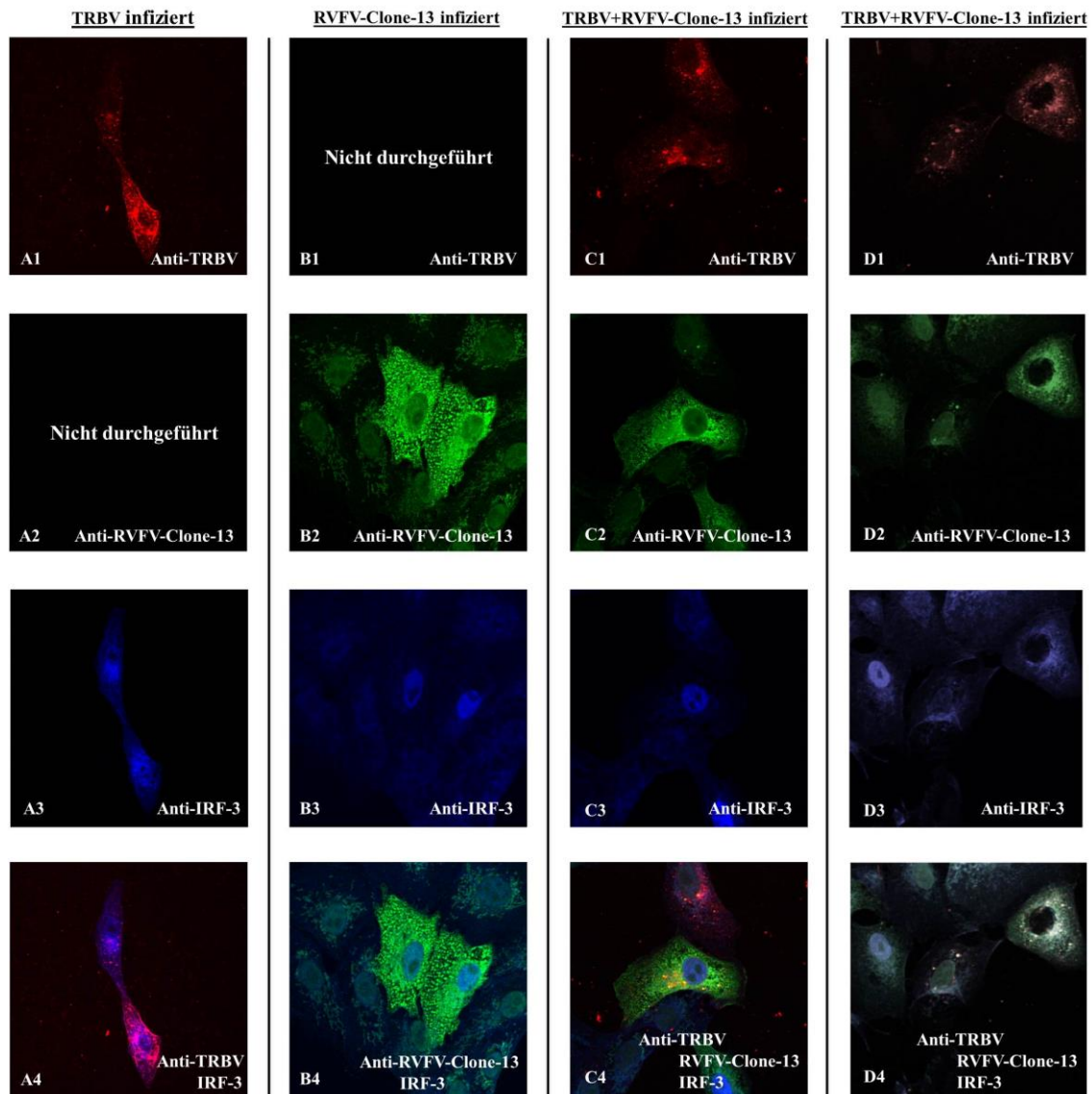


Abbildung 17: Indirekte Immunfluoreszenz mit TSA-Signalverstärkung zum Nachweis der IRF-3-Translokation (blau) auf Vero B4-Zellen, aufgenommen mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops. Die Zellen in A1-A4 wurden mit TRBV (rot), in B1-B4 mit RVFV-Clone-13 (grün) und in C1-C4 und D1-D4 mit beiden Viren infiziert. Am rechten unteren Bildrand sind die jeweils verwendeten primären Antikörper vermerkt. Für A4-D4 wurden die Bilder 1-3 über die Software miteinander kombiniert, um Infektion und IRF-3-Translokation gleichzeitig darstellen zu können. In C1-C4 ist eine IRF-3-Translokation einer doppelt infizierten Zelle zu sehen, wohingegen es in D1-D4 bei der doppelt infizierten Zelle nicht zur IRF-3-Translokation kommt.

Die folgenden Bildangaben in den Klammern beziehen sich auf die Abbildung 17. Unter dem konfokalen Lasermikroskop wurden die auf Deckgläschen fixierten Zellen betrachtet und die Bilder mit der Leica-Software aufgenommen und bearbeitet. Die Zellen wurden sowohl auf die Infektionen, als auch auf die IRF-3-Translokationen untersucht, indem die verwendeten sekundären AK durch einen Argon-Laser (458, 476, 488 und

514 nm Wellenlänge) und zwei Helium-Neon-Laser (543 bzw. 633 nm Wellenlänge) zur Fluoreszenz angeregt wurden. Über die Software konnte außerdem den Fluoreszenzsignalen Farben zugeordnet werden. TRBV-Infektionen wurden rot, die RVFV-Clone-13 infizierten Zellen grün dargestellt, für die IRF-3-Nachweise wurde blau gewählt. Mit Hilfe der Software war es außerdem möglich, Bilder miteinander zu kombinieren. So konnten Infektions- und IRF-3-Nachweis überlappend in einem Bild dargestellt werden (A4, B4, C4), um den Zusammenhang zwischen Infektion und Translokation hervorzuheben.

In nicht infizierten Zellen (nicht abgebildet) zeigte sich für IRF-3 kein nukleäres Signal, sondern stattdessen eine unspezifische leichte Blaufärbung der gesamten Zelle. Wurden die Zellen jedoch mit dem das IFN-System induzierenden RVFV-Clone-13 infiziert (B1-B4), kam es zu einer deutlichen Konzentration des Fluoreszenzsignals im Zellkern (B3), d.h. es musste eine Translokation des Antikörper-markierten IRF-3 in den Zellkern stattgefunden haben. In RVFV-Clone-13 infizierten Zellen kam es demnach zu einer Aktivierung von IRF-3.

Diese Translokation in den Zellkern war hingegen in mit TRBV behandelten Zellen (A1-A4) nicht zu beobachten. Zwar kam es auch hier zu einem deutlicheren Signal für IRF-3, dieses zeigte sich jedoch eher perinukleär als im Zellkern selbst (A3). Es konnte somit gezeigt werden, dass eine IRF-3-Translokation in den TRBV-infizierten Zellen, anders als bei RVFV-Clone-13-Infektion, nicht stattgefunden hatte. IRF-3 war wie bei nicht infizierten Zellen im Zytosol lokalisiert.

Für die doppelt infizierten Zellen (C1-C4) war kein eindeutiges Ergebnis zu erzielen. Bei einigen doppelt infizierten Zellen kam es zu einer IRF-3-Translokation in den Zellkern (C4). In einigen Fällen blieb diese Translokation jedoch aus und es zeigte sich ein ähnliches Bild wie für die TRBV-Einzelfektion.

3.3.2 RT-PCR zur Untersuchung der ISG56-Aktivierung

Um die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz zu bestätigen, wurde eine PCR auf ISG-56-Induktion durchgeführt.

Wie schon im Einleitungsteil dieser Arbeit beschrieben (siehe 1.2.5, S.13), kommt es in virusinfizierten Zellen über die Freisetzung von IFN zur Aktivierung von Interferon-

stimuliertem-Gen 56 (ISG-56), dessen Genprodukt antiviral wirkt. Die Induktion von ISG-56 kann jedoch auch unabhängig vom IFN-Signalweg direkt durch die Virusinfektion erfolgen, hierzu muss es jedoch zur Aktivierung und Translokation von IRF-3 in den infizierten Zellen kommen (Collins et al. 2004). Kommt es bei TRBV-Infektion, wie die Ergebnisse aus 3.3.1 (S.56) vermuten lassen, zur Unterbindung der IRF-3-Aktivierung, sollten daher in der Gelelektrophorese auch keine in der PCR vervielfältigten ISG-56-Transkripte nachweisebar sein.

Es wurden in einer 6-Kavitätenplatte, wie unter 2.2.1 (S.18) beschrieben, Vero B4-Zellen mit einer Zelldichte von $3 \cdot 10^5$ Zellen pro Kavität ausgesät.

Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit TRBV (MOI=0,1) und RVFV-Clone-13 (MOI=0,3) sowohl in Einzel- als auch in Doppelinfektionen infiziert (siehe 2.2.4, S.21). In der zweiten Doppelinfektion wurden die Zellen zunächst mit TRBV und 6 h später mit RVFV-Clone-13 infiziert. Die Virusüberstände wurden nach einer Stunde wieder abgenommen, die Infektionsdauer betrug insgesamt ungefähr 24 h. Als Kontrolle wurden mit Mock bezeichnete Zellen im nicht infizierten Zustand belassen. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert (siehe 2.2.6, S.24), mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.8, S.28) und diese unter Verwendung der jeweiligen Primer in der RT-PCR amplifiziert (siehe 2.2.9, S.30).

3.3.2.1 Nachweis der ISG-56-Aktivierung

Zur Amplifikation der ISG-56-Transkripte wurden die Primer 5'huISG56 und 3'huISG56 in der RT-PCR eingesetzt.

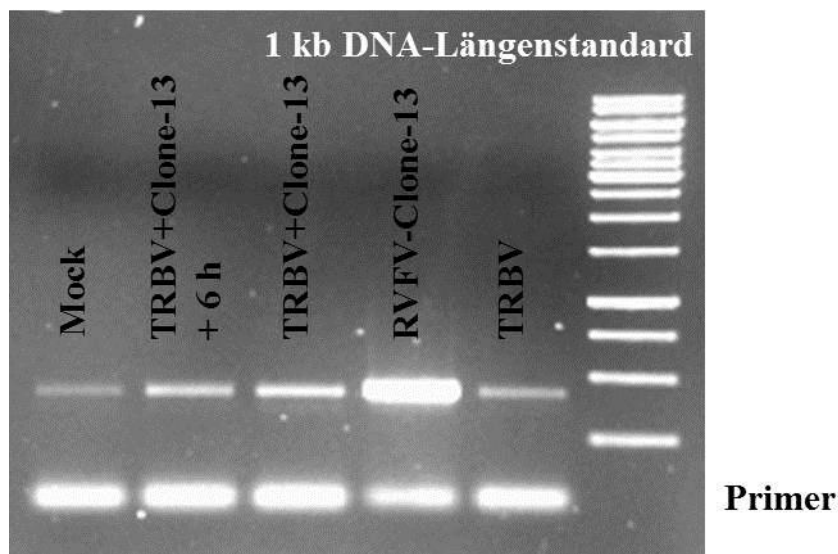


Abbildung 18: Gelelektrophorese zum Nachweis der ISG-56-Aktivierung in einzel- und doppeltinfizierten Vero B4-Zellen.

In der RT-PCR konnte für RVFV-Clone-13 infizierte Zellen eine große Menge an ISG-56-Transkripten nachgewiesen werden. Es kam in diesen Zellen zur Aktivierung der ISG-56-Transkription. Da die zelluläre RNA bereits 24 h nach Infektion analysiert wurde, ist davon auszugehen, dass die beobachtete Aktivierung der Transkription im Wesentlichen auf die Aktivierung von IRF-3 und nicht die Typ I IFN-Signalkaskade zurückzuführen ist, da diese mehr Zeit benötigt. Die IRF-3 abhängige Aktivierung von ISG-56 wurde hingegen bei einigen Virusinfektionen bereits nach 6 h beobachtet (Chattopadhyay et al. 2010). Wurden die Vero B4-Zellen mit TRBV infiziert, fiel das Signal in der Gelelektrophorese deutlich schwächer aus und entsprach dem Signal der Mock-infizierten Zellen. Eine ISG-56-Induktion fand bei TRBV-Infektion, verglichen mit Mock-infizierten Zellen, nicht statt. Auch für die beiden Doppelinfektionsarten zeigte sich lediglich eine sehr schwache Aktivierung der ISG-56-Transkription. Zwar fielen hier die Banden in der Gelelektrophorese geringfügig stärker aus als in der TRBV-Einzelninfektion, verglichen mit der RVFV-Clone-13-Infektion konnten jedoch nur sehr geringe Mengen an ISG-56-Transkripten in der PCR nachgewiesen werden.

3.3.2.2 Infektionsnachweise

Zum Nachweis der Infektion mit dem Tribec- und RVFV-Virus wurden die Primer TRBV ORFX_for und _rev sowie RVF-for und -rev eingesetzt. So konnten in den infizierten Zellen enthaltene virale RNA amplifizieren werden.

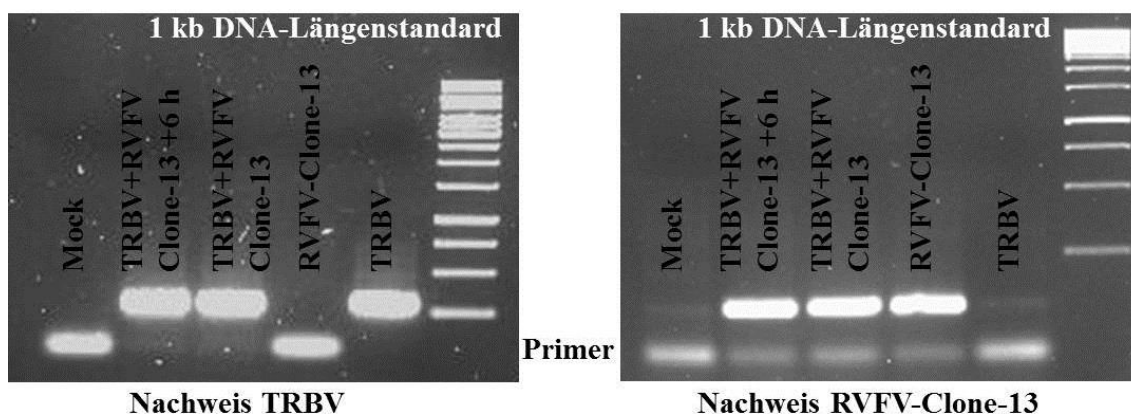


Abbildung 19: Gelelektrophoresen zum Nachweis der erfolgten Virusinfektionen in Vero B4-Zellen.

Es zeigte sich für beide Doppelinfectionsarten sowohl ein Signal für den Nachweis von TRBV als auch für RVFV-Clone-13. In den Einzelinfektionen konnte nur das jeweils eingesetzte Virus nachgewiesen werden, eine versehentliche Coinfektion, eine Verwechslung der Proben oder eine unspezifische Bindung der verwendeten Primer konnte somit ausgeschlossen werden. Für die unbehandelten Mock-Zellen trat in der Gelelektrophorese weder eine Bande für TRBV noch eine Band für RVFV-Clone-13 auf.

3.3.2.3 Kontroll-PCRs

Neben den PCRs zum Nachweis der Infektion wurden PCRs zum γ -Aktin-Nachweis durchgeführt. Die Grundidee dieser Nachweise wurde bereits unter 3.1.1.3 (S.45) erläutert.

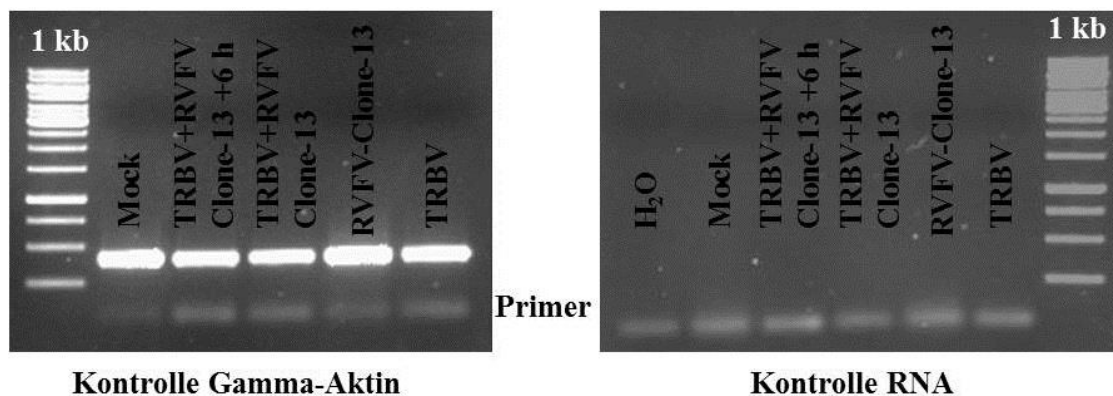


Abbildung 20: Gelelektrophore zum γ -Aktin-Nachweis in Vero B4-Zellen und zur Reinheitskontrolle der isolierten RNA

Zum γ -Aktin-Nachweis wurden die Primer hu_gamma-actin_for und _rev verwendet, um die Reinheit der isolierten RNA zu überprüfen wurden als Primer hu_IFN_beta_for und _rev in der PCR eingesetzt.

Während in der γ -Aktin-PCR für jede Probe eine Bande ähnlicher Intensität in der Gelelektrophore sichtbar war und der Nachweis des Strukturproteins somit erbracht wurde, war die zweite Gelelektrophore zur Reinheitskontrolle der RNA frei von Banden. Die in die PCR gegebene RNA war somit nicht mit genomischer DNA kontaminiert. Diese wäre in der PCR vervielfältigt worden und hätte in der anschließenden Gelelektrophore ein Signal erzeugt. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Unterschiede bezüglich der ISG-56-Transkription auf Kontaminationen durch genomische DNA zurückzuführen waren.

3.4 Einfluss der Genprodukte von TRBV-Segment 6 und 8 auf die IFN- β -Promotoraktivität

In einer früheren Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die auf TRBV-Segment 9 kodierten Proteine, also die virale Helikase und die durch die drei *open reading frames* kodierten Proteine, einen hemmenden Einfluss auf die Induktion des Interferon- β -Promotors hatten (Brandt 2012). Da die Möglichkeit besteht, dass auch auf anderen

Segmenten Proteine kodiert sind, die einen Einfluss auf die Interferoninduktion haben, sollten die auf TRBV-Segment 6 und 8 codierten viralen Proteine VP5 und VP7 im Hinblick auf ihre Wirkung auf die Interferon-Induktion untersucht werden. In diesem Fall würde die Virus-RNA vermittelte Aktivierung des IFN- β -Promotors im Dual-Luciferase Reporter Assay (siehe 2.2.13, S.38) signifikant niedriger ausfallen als bei den Negativkontrollen. Neben den Expressionsplasmiden für die auf den TRBV-Segmenten 6 und 8 codierten viralen Proteinen wurden verschiedene Kontrollkonstrukte eingesetzt. Als Positivkontrolle für die Hemmung der Interferon- β -Promotoraktivierung diente das Expressionskonstrukt pI.18-RNSs-ZF5 (im Folgenden ZF5 abgekürzt). Es dient der Expression des Rift-Valley-Fever-Virus NSs-Proteins, das zum einen durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor TFIID zu einer allgemeinen Hemmung der RNA-Polymerase II- vermittelten Transkription führt (Le May et al. 2004), zum anderen aber auch spezifisch die Aktivierung des Interferon- β -Promotors unterbinden kann (Le May et al. 2008). Als Negativkontrolle wurde zum einen pI.18, also der analoge „leere“ eukaryontische Expressionsvektor mit konstitutiv aktivem CMV-Promotor ohne weitere cDNA, eingesetzt. Zum anderen wurde pI.18-RNSs-CF3 (im Folgenden CF3 abgekürzt) verwendet. Dieses Expressionsplasmid enthält die cDNA des NSs-Gens aus RVFV-Clone-13, welches auf Grund einer großen Deletion in seiner Erbinformation für ein funktionsloses Nichtstrukturprotein kodiert. Sowohl pI.18 als auch CF3 sollten keinerlei hemmenden Einfluss auf die Induktion des IFN- β -Promotors haben. Der IFN- β -Promotor wurde durch die Transfektion von VSV-RNA stimuliert, als Vergleich diente eine Stimulation mit reiner Vero-RNA (siehe 2.2.13, S.38)

Die im Folgenden aufgeführten Werte sind Mittelwerte aus insgesamt sechs verschiedenen Messungen. Es wurden zur Signifikanzbestimmung Zweistichproben-t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianz durchgeführt. Ab einem p-Wert von $\leq 0,05$ gelten Ergebnisse als statistisch signifikant, ab einem p-Wert von $\leq 0,01$ als sehr signifikant und ab einem p-Wert von $\leq 0,001$ als hoch signifikant.

3.4.1 IFN- β -Promotoraktivität nach VSV-Stimulation

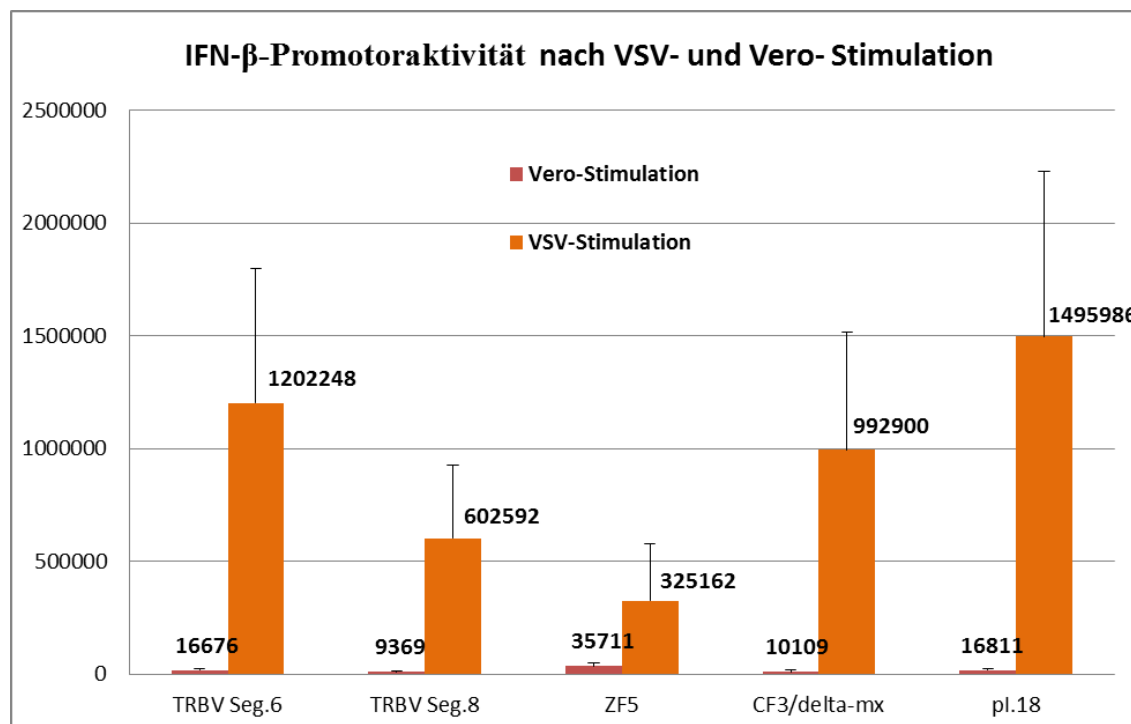


Abbildung 21: Verhältnis der IFN- β -Promotoraktivität nach Stimulation mit VSV-RNA und Vero-RNA. Es handelt sich bei den abgebildeten Werten um den relativen Anstieg der IFN- β -Promotoraktivität nach Stimulation mit VSV-RNA im Vergleich zur Stimulation mit Vero-RNA

Die Abbildung 21 (S. 64) zeigt die Aktivität des Interferon- β -Promotors nach Transfektion verschiedener Konstrukte und Stimulation des Promotors mit VSV-RNA sowie mit Vero-RNA. Wie erwartet war nach VSV-Stimulation die Aktivität des IFN- β -Promotors nach Expression des Transkriptionsinhibitors RVFV-NSs am niedrigsten. Die Aktivität des Promotors war hier im Vergleich zur Negativkontrolle, bei Transfektion des Konstrukts CF3, signifikant niedriger ($p=0,025$). Sowohl für TRBV-Segment 6 ($p=0,53$) als auch für TRBV-Segment 8 ($p=0,16$) ergaben sich in der VSV-Stimulation allerdings keine signifikant niedrigeren Werte der Promotoraktivität im Vergleich zur Positivkontrolle CF3. Somit hatten die TRBV-Segmente 6 und 8 keinen signifikanten inhibierenden Einfluss auf die Induktion des INF- β -Promotors.

3.4.2 Vergleich IFN- β -Promotoraktivität nach VSV- und Vero-Stimulation

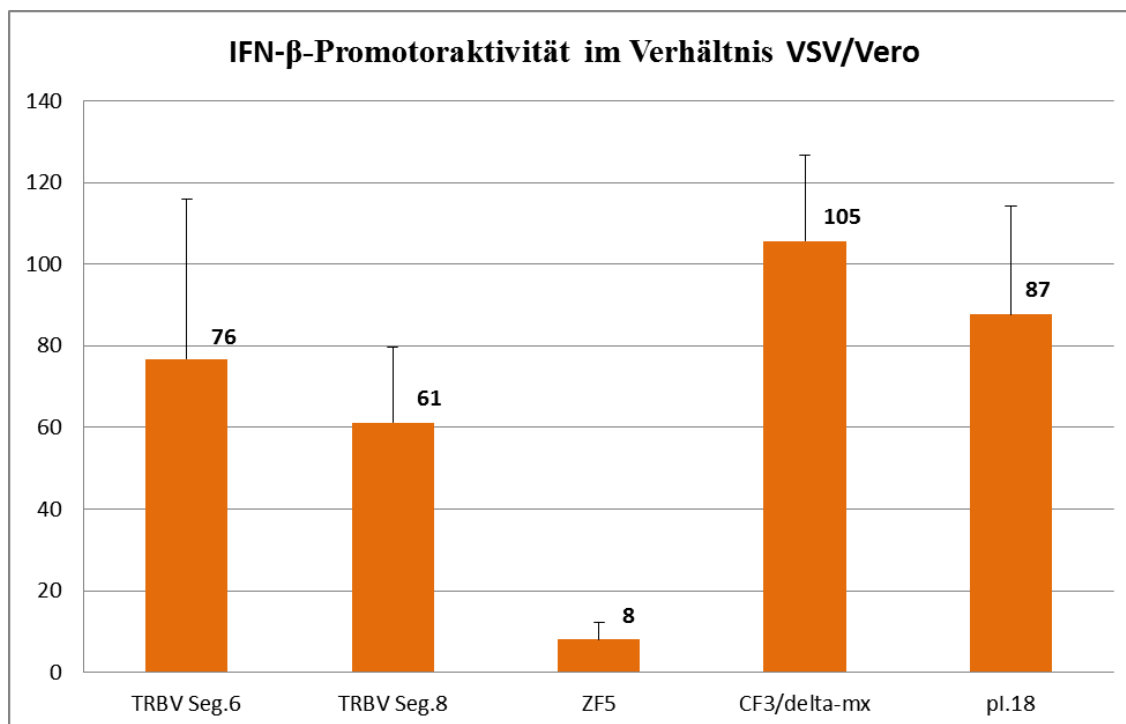


Abbildung 22: Dual-Luciferase Reporter Assay mit den TRBV-Segmenten 6 und 8. Es handelt sich um die Mittelwerte aus sechs Messungen der Lumineszenz, und damit der IFN- β -Promotoraktivität, nach Stimulation mit VSV-RNA.

Neben der absoluten Aktivität des IFN- β -Promotors nach Stimulation mittels VSV-RNA, wurde auch der relative Anstieg der IFN- β -Promotoraktivität nach Stimulation mit VSV-RNA im Vergleich zur Stimulation mit reiner Vero-RNA ermittelt (siehe Abbildung 22, S. 65).

Mit Hilfe des pI.18-Konstrukts konnte zunächst die Effektivität der VSV-Stimulation überprüft werden, da pI.18 selbst -wie auch CF3- keinen Einfluss auf die Aktivität des IFN- β -Promotors haben sollte. Die Aktivität des Promotors war hier im Vergleich zur Stimulation mit Vero-RNA um den Faktor 87 erhöht. Dieser Anstieg war signifikant ($p=0,026$), womit VSV-RNA als potenter Stimulator des IFN- β -Promotors angesehen werden konnte, wenn keine hemmenden Einflüsse vorhanden waren.

Wiederum kam es nach Expression von RVFV-NSs zum geringsten Anstieg der Promotoraktivität, nämlich um den Faktor 8, der hoch signifikant niedriger als bei der Negativkontrolle CF3 ausfiel ($p=0,0001$).

Sowohl für TRBV-Segment 6 (Faktor 76) als auch für Segment 8 (Faktor 61) ergaben sich etwas geringere Anstiege in der Promotoraktivität im Vergleich zur den

Positivkontrollen CF3 (Faktor 105) und pI.18 (Faktor 87). Für Segment 6 war dieser Unterschied aber weder im Vergleich zu CF3 ($p=0,15$) noch zum Leervektor pI.18 ($p=0,59$) signifikant. Für das Segment 8 zeigte sich zwar eine sehr signifikant niedrigere Promotoraktivierung verglichen mit CF3 ($p=0,003$). Der Unterschied zum Anstieg bei pI.18 war jedoch wiederum nicht signifikant ($p=0,08$) geringer.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden potentielle Pathogenitätsfaktoren des Tribec-Virus, einem Virus aus der Gattung der Orbiviren untersucht. Im Mittelpunkt des Interesses stand dabei die vermutete Fähigkeit des Virus, die Aktivierung des Interferonsystems zu verhindern. Die Unterbindung der interferonvermittelten Immunantwort ist eine Strategie, die sich bei vielen verschiedenen Viren aus unterschiedlichen Gattungen und Familien beobachten lässt. Auf diese Weise verhindern die Viren ihre Elimination durch das Abwehrsystem des jeweiligen Wirtsorganismus und stellen somit ihre Vermehrung sicher (McInerney, Karlsson Hedestam 2009).

Bislang ist nur wenig über das Tribec-Virus bekannt. Der Großteil der Veröffentlichungen zu TRBV, darunter auch Untersuchungen zur Vermehrung und Pathogenität des Virus, stammen vor allem aus dem Zeitraum zwischen 1963 bis 1970. In diese Zeit datiert auch die Entdeckung des Virus im namensgebenden Tribec-Gebirge in der heutigen Slowakei (siehe 1.1.3.2, S.5). Seit der ersten Isolierung des Virus wurde es vor allem in Osteuropa, aber auch in Deutschland, nachgewiesen (siehe Abbildung 3, S.6). Das Tribec-Virus steht in Verdacht, beim Menschen eine Entzündung der Hirnhäute hervorzurufen zu können (Málková et al. 1980). Erst im Jahr 2010 wurde das Genom des Tribec-Virus vollständig sequenziert (Dilcher et al. 2012).

4.1 Das Tribec-Virus hemmt aktiv die Interferon- β -Induktion

Um die Induktion des Typ-I Interferon-Systems durch das Tribec-Virus zu untersuchen, wurden interferonkompetente HEK-293-Zellen mit dem Tribec-Virus infiziert. Als Kontrollen dienten nicht-infizierte Zellen (Mock) sowie Zellen, die mit dem Interferon induzierenden RVFV-Clone-13 infiziert wurden. In einer Serie von RT-PCRs wurden die Interferon- β -Transkript spezifische cDNA-Fragmente amplifiziert und anschließend in der Gelelektrophorese nachgewiesen (siehe 3.1, S.43).

Hierbei ergab sich, dass es nach TRBV-Infektion nicht zur Aktivierung der Interferon- β -Expression kommt (siehe Abbildung 8 (S.44)). TRBV gelingt es also, an einer bis dato nicht identifizierten Stelle der Signalkette (siehe 1.2.3, S.9) die Interferoninduktion zu unterbinden.

Interessanterweise ist TRBV auch bei gleichzeitiger Infektion mit dem IFN-Induktor RVFV-Clone-13 in der Lage, die Aktivierung der Interferon- β -Expression zumindest teilweise zu hemmen. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine aktive Inhibition der Typ I IFN-Induktion durch TRBV. Das in der Doppelinfektion beobachtete Phänomen ließ sich noch verstärken, indem der TRBV-Infektion sechs Stunden Vorsprung vor der Zweitinfektion mit RVFV-Clone-13 gelassen wurde (siehe Abbildung 8, S.44). Der zeitliche Unterschied der Infektionen erlaubt die Expression von TRBV-Proteinen vor der RVFV-Clone-13-Infektion. Die nach Infektion mit TRBV beobachtete fehlende IFN- β -Expression lässt sich demnach nicht nur auf ein „Verstecken“ des Virus zurückführen, wie es für andere Reoviren beschrieben worden ist (Sherry 2009), sondern ist wohl auf die Wirkung eines viralen Interferonantagonisten zurückzuführen, der auch die RVFV-Clone-13 vermittelte IFN-Induktion unterdrücken kann.

Das Unterbleiben der IFN-Induktion in der TRBV-Einzelfektion würde, für sich allein genommen, noch nicht für eine aktive Hemmung der Immunantwort durch TRBV sprechen. Andere Orbiviren verhindern die Erkennung ihrer RNA (siehe 1.2.3, S.9), durch die RIG-like-Rezeptoren der Wirtszelle, indem sie ihr Genom mit stabilen Kapsiden umgeben und so vor Detektion schützen (Mertens et al. 2004). Auch auf diese Weise würde eine IFN- β -Induktion durch TRBV unterbleiben. Allerdings käme es dann in der Doppelinfektion mit RVFV-Clone-13 nicht zu einer verminderten IFN-Induktion. Diese Beobachtung spricht vielmehr für eine aktive Hemmung der Interferoninduktion durch TRBV.

Eine alternative Erklärung für die geringe Interferoninduktion in den oben genannten Doppelinfektionen wäre, dass RVFV-Clone-13 in Anwesenheit von TRBV schlechter repliziert und daher das IFN- β -System weniger stark induziert. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden die Virusüberstände zur Bestimmung der mittleren infektiösen Dosis (TCID₅₀) auf Vero E6-Zellen titriert (siehe 3.1.2, S.46), in denen RVFV-Clone-13 sehr viel besser repliziert als TRBV. Es zeigten sich in den Doppelinfektionen ähnlich

hohe Virustiter, wie in der RVFV-Clone-13-Einzelfektion, wobei der Virustiter in der TRBV-Einzelfektion deutlich niedriger ausfiel (siehe Abbildung 11, S.47). Zudem gab es in den PCR-Ansätzen nach Doppelfektion auch keinen Hinweis, dass weniger RVFV-Clone-13-Transkripte im Vergleich zur Einzelfektion vorhanden sind. Die geringere IFN- β -Induktion in den Doppelfektionen kann also nicht auf einer verminderten Replikation von RVFV-Clone-13 beruhen, was wiederum die These der aktiven Hemmung durch TRBV unterstützt.

4.1.1 TRBV führt zu einer verminderten Produktion von Interferon- β

Mit Hilfe der RT-PCR konnte gezeigt werden, dass es nach TRBV-Infektion nicht zu einer verstärkten Produktion von Interferon- β -Transkripten kommt. Um eine Aussage über die tatsächlich freigesetzte Menge an IFN- β während einer TRBV-Infektion treffen zu können, wurde ein Sandwich-ELISA zur IFN- β -Quantifizierung durchgeführt. Dazu wurden HEK-293-Zellen mit TRBV und RVFV-Clone-13 einzeln und doppelt infiziert. Zur Kontrolle wurden Zellen im nichtinfizierten Zustand (Mock) belassen. Die infektiösen Überstände wurden im Sandwich ELISA eingesetzt (siehe 3.2.4, S.54).

Ziel des ELISA war es, die Ergebnisse der RT-PCRs zu bestätigen und die These der aktiven Hemmung der IFN-Antwort durch TRBV zu unterstützen. Im Unterschied zu den RT-PCRs, in denen die Menge an Interferon-Transkripten gemessen wurde, konnten im ELISA auch möglicherweise auftretende posttranskriptionale Einflüsse auf die Interferoninduktion erfasst werden.

Nach Infektion mit dem Tribec-Virus kam es im Vergleich zur Infektion mit RVFV-Clone-13 zu einer deutlich verminderten Freisetzung von IFN- β (siehe Abbildung 12, S.49). Die Hemmung der Freisetzung durch TRBV ist so effektiv, dass die Menge an freigesetztem IFN- β nach TRBV-Einzelfektion nur knapp über der basalen IFN- β -Menge der nicht infizierten Zellen liegt. Damit wurden auf RNA-Ebene und Protein-Ebene übereinstimmende Ergebnisse für die IFN- β -Expression erzielt.

Auch in den Doppelfektionen ließen sich die Ergebnisse aus den RT-PCR-Versuchen reproduzieren. Wiederum fiel die Hemmung der IFN- β -Freisetzung in der Doppelfektion mit sechs Stunden Vorsprung für TRBV stärker aus als in der gleichzeitigen Infek-

tion mit RVFV-Clone-13. Sie liegt sogar knapp unterhalb der basalen IFN- β -Menge, die von Mock-infizierten Zellen gebildet wird.

Die Ergebnisse aus den PCR Versuchen und dem IFN- β -ELISA unterstützen somit beide die These der aktiven Hemmung des Interferon- β -Systems durch das Tribec-Virus.

4.2 TRBV induziert einen starken zytopathischen Effekt in interferonkompetenten Zellen

Mittels RT-PCR und ELISA konnten Aussagen über die Inhibition des Interferonsystems durch TRBV getroffen werden (siehe 4.1, S.67). Hieraus ergaben sich jedoch noch keine Aussagemöglichkeiten, ob eine Hemmung der Interferonfreisetzung Einfluss auf das Wachstum von mit TRBV-infizierten Zellen hat. Um dies zu untersuchen, wurden interferonkompetente HEK-293-Zellen ausgesät und mit TRBV und RVFV-Clone-13 einzeln und doppelt infiziert. Das Wachstum wurde mit Hilfe des xCELLigence-Zellanalyse-Gerätes über die Zeit gemessen. Zur Kontrolle wurden Zellen im nicht-infizierten Zustand belassen (siehe 3.2, S.50).

Es zeigte sich, dass das Wachstum von TRBV-infizierten HEK-293-Zellen gehemmt war und es nach Infektion zu einem Absterben der Zellen kam. Dies konnte für die Zellpopulation gezeigt werden, die mit einer im Vergleich zu den RT-PCR-Versuchen (MOI=0,1; siehe 3.1.1, S.43) relativ hohen TRBV-MOI von 2 infiziert wurde (siehe Abbildung 13, S.51). Ein weiterer Versuch mit einer niedrigeren TRBV-MOI von 0,2 (siehe Abbildung 14, S.52) zeigte aber auch identische Ergebnisse. Es genügt demnach bereits eine niedrige TRBV-MOI von 0,2, um das Wachstum der Zellen zu hemmen, vermutlich bedingt durch die Unterdrückung des zellulären Interferonsystems. In beiden Ansätzen erreichten die Zellpopulationen außerdem einen höheren Zellindex als die mit RVFV-Clone-13 infizierten Zellen. Möglicherweise hängt dies mit der höheren MOI der RVFV-Clone-13-Infektion zusammen. Eine andere Erklärung könnte sein, dass es im Rahmen der Unterdrückung der zellulären IFN-Antwort durch TRBV nicht zur Expression antiproliferativer Gene kommt, die bei einer Virusinfektion ebenfalls verstärkt abgelesen werden, um die Virusvermehrung zu begrenzen. In diesem Fall würden die

TRBV-infizierten Zellen zunächst die Wachstumsrate von nichtinfizierten Zellen beibehalten.

Auf Grundlage der Ergebnisse der RT-PCRs (siehe 3.1.1, S.43) und des ELISA (siehe 3.1.3, S.48) konnte die These aufgestellt werden, dass es bei einer Doppelinfektion mit TRBV und RVFV-Clone-13 ebenfalls zu einem starken Abfall des Zellindex kommen muss, da es auch hier zu einer Hemmung der IFN- β Induktion kam. Diese These bestätigte sich in den xCELLigence-Versuchen. Der Zellzahlabfall fiel sogar sowohl in den Testreihen mit hoher als auch niedriger TRBV-MOI noch stärker aus als in der TRBV-Einzelinfektion, bis hin zu einem vollständigen Absterben der Zellpopulation. Wie es scheint, trägt in der Doppelinfektion das eigentlich apathogene RVFV-Clone-13 (in der Einzelinfektion erholt sich die Zellpopulation rasch von der Infektion) zum verstärkten Absterben der Zellen bei, wenn deren Interferonsystem gleichzeitig durch TRBV gehemmt wird.

Beachtet werden muss jedoch, dass in den Versuchen nicht erfasst werden konnte, ob der Abfall des Zellzahlindex einzig auf die Hemmung der Interferonantwort der Zellen durch TRBV zurückzuführen war. Möglich wäre beispielsweise auch eine IFN- β unabhängige Induktion der Apoptose durch TRBV, die zur Reduktion der Zellpopulation beitragen würde. Für zahlreiche andere Viren wurde dies berichtet. So kann das E1A-Protein der Adenoviren direkt die Apoptose induzieren (Roulston et al. 1999). Für TRBV ist eine Apoptoseinduktion bislang nicht bekannt, allerdings konnte diese für das TRBV nahverwandte Bluetongue-Virus nachgewiesen werden (Schwartz-Cornil et al. 2008). Wie bei anderen Reoviren, zu denen auch TRBV zählt, trägt die Apoptose beim Bluetongue-Virus zur Freisetzung der replizierten Viruspartikel bei, da diese Viren die Zellen durch Budding nur ineffektiv verlassen können (Mortola et al. 2004). Weitere Versuche zur Apoptoseinduktion nach TRBV-Infektion sind daher anzustreben.

Auch in den infektiösen Überständen der xCELLigence-Versuche wurden, wie unter 3.1.2 (S.46) beschrieben, die Virustiter auf Vero E6-Zellen bestimmt (siehe Abbildung 15, S.53). Wie aus den Vorversuchen zu vermuten war, fielen die Titer für TRBV niedriger aus als für die RVFV-Clone-13-Einzelinfektion. Der Titer für die TRBV-Infektion mit einer MOI von 2 lag dabei erwartungsgemäß eine Logstufe über dem Titer der In-

fektion mit der niedrigeren MOI von 0,2. Auffällig am Ergebnis ist, dass der höchste Virustiter bei der Doppelinfektion mit niedriger TRBV-MOI erreicht wurde und nicht in der Doppelinfektion mit hoher TRBV-MOI. Grund hierfür könnte sein, dass die Virusvermehrung durch das schnellere Absterben der HEK-293-Zellen limitiert wurde, da die Zellen nach ihrem Absterben nicht mehr als Ort der Virusreplikation zur Verfügung stehen (siehe 1.1.3.13).

Neben den Virustitern wurde in vier Proben der infektiösen Überstände ebenfalls die Menge an freigesetztem Interferon- β mittels Sandwich-ELISA bestimmt (siehe Abbildung 16, S.55). Abweichend von den Ergebnissen des vorherigen ELISA, zeigte sich eine starke IFN- β -Freisetzung in der Doppelinfektion mit TRBV (MOI=2) und RVFV-Clone-13. Möglicherweise kam es anfangs zu einer starken Vermehrung von RVFV-Clone-13 bei gleichzeitigem verzögertem Wachstum von TRBV. Im Gegensatz zu den in 3.1.3 (S.48) beschriebenen Versuchen wurde ein größerer Überschuss an RVFV-Clone-13 und insgesamt sehr viel größere Virusmengen zur Infektion eingesetzt. Unter diesen Bedingungen kann es zunächst zu einer Induktion des IFN-Systems mit anschließender IFN- β -Freisetzung gekommen sein, bevor sich TRBV ausreichend vermehren und die Interferonantwort unterdrücken konnte.

4.3 In TRBV-infizierten Zellen fehlt die IRF-3-Translokation

Die Erkenntnisse der RT-PCRs zur Hemmung der Interferoninduktion durch TRBV lassen noch keine Rückschlüsse auf den genauen Angriffspunkt von TRBV in der Signalkaskade der IFN-Induktion (siehe 1.2.3, S.9) zu. Ein häufiger Angriffspunkt der Viren ist der Transkriptionsfaktor IRF-3. So ist für das Rotavirus, welches wie TRBV zur Familie der Reoviridae gehört (siehe 1.1.2, S.2), bekannt, dass es bei einer Infektion zur Hemmung des Interferonsystems durch proteosomalen Abbau von IRF-3 kommt. Eine Translokation von IRF-3 in den Zellkern unterbleibt damit. Vermittelt wird dieser Abbau durch das NS1-Protein des Rotavirus (Barro,Patton 2005).

Um die IRF-3-Translokation nach TRBV-Infektion zu untersuchen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Die Lokalisierung von IRF-3 wurde anschließend

am konfokalen Lasermikroskop untersucht. Als Kontrollvirus wurde erneut RVFV-Clone-13 eingesetzt (siehe 3.3.1, S.56).

Es konnte in der indirekten Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass es auch bei einer Infektion mit TRBV nicht zu einer Translokation von IRF-3 aus dem Zellzytoplasma in den Zellkern kam, während dies in der RVFV-Clone-13-Kontrolle deutlich der Fall war (siehe Abbildung 17, S.57). Ob die ausbleibende Translokation Folge einer direkten IRF-3-Hemmung durch TRBV war, wie es für das Rotavirus beschrieben wurde, lässt sich aus dem Ergebnis der Immunfluoreszenz allerdings nicht ableiten. Die Interferon-Induktionssignalkette könnte auch bereits durch Hemmung eines Schritts vor der IRF-3-Aktivierung unterbrochen worden sein. In einer vorangegangenen Arbeit konnte allerdings nachgewiesen werden, dass nach Transfektion des TRBV-Segments 9 die Aktivierung des IRF-3-responsiven Promotors durch konstitutiv aktiviertes, nicht phosphoryliertes IRF-3 signifikant unterdrückt werden konnte (Brandt 2012). Hieraus kann in Zusammenschau mit den Ergebnissen der indirekten Immunfluoreszenz abgeleitet werden, dass TRBV frühestens die Phosphorylierung von IRF-3 unterbindet.

In den doppelt infizierten Zellen zeigte sich kein einheitliches Bild. Während es bei einigen mit TRBV und RVFV-Clone-13 doppelt infizierten Zellen zur Translokation von IRF-3 in den Zellkern kam, konnte in einigen Zellen eine perinukleäre Gruppierung von IRF-3- wie in TRBV-infizierten Zellen beobachtet werden.

Das uneinheitliche Bild in der Doppelinfektion könnte darauf zurückzuführen sein, dass die TRBV-MOI mit 0,1 (RVFV-Clone-13: MOI 0,3) sehr niedrig gewählt wurde, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der RT-PCRs zu ermöglichen. Zwar zeigte sich unter dieser MOI in den RT-PCRs eine Hemmung der Interferoninduktion für die TRBV-Einzelninfektion (siehe 3.1.1, S.43). In der Doppelinfektion kam es jedoch zu einem Anstieg von IFN- β -Transkripten. In der indirekten Immunfluoreszenz könnte daher die MOI auch zu niedrig gewesen sein, um in allen Zellen eine IRF-3-Translokation zu verhindern. Eventuell würde auch ein Inkubationsvorsprung von sechs Stunden für TRBV, ähnlich wie in der RT-PCR zur IFN- β -Hemmung, zu einem deutlicheren Ergebnis führen.

4.3.1 In TRBV-infizierten Zellen unterbleibt die ISG-56-Aktivierung

Die indirekte Immunfluoreszenz zeigte ein eindeutiges Ergebnis in Bezug auf die Frage der IRF-3-Translokation bei einer Infektion mit TRBV. Für die Doppelinfektion ergab sich jedoch, aus den unter 4.3 (S.72) bereits erwähnten möglichen Gründen, kein eindeutiges Ergebnis. Zur Verifizierung der These, dass es bei einer TRBV-Infektion nicht zur Aktivierung und Translokation von IRF-3 kommt, wurde deshalb eine RT-PCR zur Detektion von ISG-56-Transkripten durchgeführt (siehe 3.3.2, S.58). Der Zusammenhang zwischen IRF-3-Aktivierung und Induktion der ISG-56-Transkription wurde bereits unter 1.2.5 (S.13) erläutert.

Aus den in Abbildung 18 (S.60) dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass es bei der TRBV-Infektion zu einer ISG-56-Induktion, etwa auf dem Level der nicht infizierten Zellen, kam. Bei der Kontrollinfektion mit RVFV-Clone-13 zeigte sich hingegen ein deutliches Signal in der Gelelektrophorese, es kam zu einer starken Vervielfältigung von ISG-56-Transkript-spezifischen cDNA-Fragmenten. In beiden Doppelinfektionen, sowohl bei simultaner als auch bei sechsstündig verzögerter Infektion mit RVFV-Clone-13 nach TRBV-Infektion fiel das Signal für ISG-56 zwar etwas stärker aus als in der TRBV-Einzelinfektion. Es war jedoch deutlich schwächer als nach RVFV-Clone-13-Infektion. Setzt man die Ergebnisse der RT-PCR mit den Ergebnissen der indirekten Immunfluoreszenz in Zusammenhang, bestätigt sich die Hypothese, dass es auch bei einer gleichzeitigen Infektion von TRBV und RVFV-Clone-13 nur zu einer geringen bzw. nur teilweisen Aktivierung von IRF-3 kommt. Andernfalls wäre die ISG-56-Induktion deutlich stärker ausgefallen. Zwar waren die Resultate in der indirekten Immunfluoreszenz für die Doppelinfektion nicht eindeutig. Die Ergebnisse der RT-PCR weisen jedoch auf eine stark eingeschränkte IRF-3-Aktivierung hin, wie sie auch partiell in der Immunfluoreszenz beobachtet werden konnte. Jedoch lassen sich auch nach den Ergebnissen der ISG-56 RT-PCR keine Aussagen zur Art und Ursache der fehlenden IRF-3-Aktivierung machen.

4.4 Die kodierten Proteine auf TRBV-Segment 6 und 8 haben keinen hemmenden Einfluss auf den Interferonpromotor

Neben den Untersuchungen zur Reaktion des IFN-Systems der Wirtszelle auf eine TRBV-Infektion sollte untersucht werden, ob die auf TRBV-Segment 6 (VP5) und Segment 8 (VP7) kodierten Proteine zur Hemmung der IFN-Induktion beitragen. Wie schon unter 3.4 erwähnt, wurde bereits für TRBV-Segment 9 (VP6) eine Hemmung der IFN-Induktion beschrieben, wohingegen Segment 7 (NS2) keinen Einfluss auf die IFN-Freisetzung hat (Brandt 2012). Dennoch besteht die Möglichkeit, dass sich auch auf anderen Segmenten des TRBV-Erbguts Gene befinden, deren Expressionsprodukte zumindest zur Unterdrückung der Immunantwort beitragen. Beim dem TRBV nahe verwandten Bluetongue-Virus führt VP5 zur Einleitung des programmierten Zelltods der Wirtszelle, während VP7 im Komplex mit VP3 die virale RNA intrazellulär vor der Entdeckung durch das Immunsystem der Wirtszelle schützt und somit die IFN-Antwort der Zelle verhindert (Schwartz-Cornil et al. 2008).

Wie aus Abbildung 21 (S.64) und Abbildung 22 (S.65) abzulesen, kommt es weder bei Expression des TRBV-Segments 6 (VP5) noch bei Segment 8 (VP7) zu einem statistisch signifikant niedrigeren Anstieg der IFN- β -Promotoraktivität bei Stimulation mit VSV-RNA im Vergleich zur Positivkontrolle. Die kodierten Genprodukte dieser Segmente tragen im Fall von TRBV nicht zur Unterdrückung der IFN-Induktion bei. Es lässt sich somit zusammenfassen, dass von den 10 Segmenten des TRBV-Erbguts bislang vier auf die Hemmung des IFN-Promotors untersucht wurden, von denen aber nur die Expression von Segment 9 codierten Genen zu einer verminderten Aktivierung des IFN- β -Promotors führt. Möglicherweise befinden sich jedoch auf den noch nicht untersuchten Segmenten Gene für Proteine, die zur Hemmung beitragen. Auch eine Komplexbildung zweier Proteine, die dann zur IFN-Hemmung führt, wie es bei Bluetongue-Virus mit VP3 und VP7 der Fall ist, wäre auch für TRBV denkbar. Hier wären weiterführende Untersuchungen wünschenswert, zumal das TRBV-Erbgut mittlerweile vollständig sequenziert wurde, was die Klonierung aller TRBV-Segmente möglich macht.

5 Zusammenfassung

Das Tribec-Virus wird zur Gattung der Orbiviren gezählt und wurde erstmals 1963 aus Blutproben aus dem Tribec-Gebirge in der Slowakei isoliert. Mittlerweile ist das Virus auch in vielen anderen Ländern Europas nachgewiesen worden. Wie für die Orbiviren typisch, besteht sein Erbgut aus insgesamt zehn Segmenten Doppelstrang-RNA. 2010 konnte das Genom des Tribec-Virus vollständig sequenziert werden. Das Virus wird meist über Zecken übertragen und steht in Verdacht, bei Säugetieren eine Entzündung des ZNS hervorrufen zu können.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen einer Infektion mit dem Tribec-Virus zu einer verminderten Induktion von Interferon- β in der infizierten Wirtszelle kommt. Dies ist auch dann der Fall, wenn gleichzeitig eine Infektion mit einem Interferon-induzierenden Virus vorliegt, was auf eine aktive Hemmung der angeborenen Immunantwort durch das Tribec-Virus schließen lässt. Neben einer geringeren Aktivierung der Transkription des Interferon- β -Gens konnte in Zellkultur auch gezeigt werden, dass die Menge an freigesetzten Interferon- β nach einer Tribec-Virus-Infektion vergleichsweise gering ist. Als Folge dieser Unterdrückung der angeborenen Immunantwort trägt es bei Typ-I Interferon-kompetenten Zellpopulationen nach Infektion mit Tribec-Virus zur Induktion eines zytopathischen Effekts bei der besonders stark ausfällt, wenn gleichzeitig mit dem Kontrollvirus RVFV-Clone-13 infiziert wird. RVFV-Clone-13 löst selbst nur einen sehr limitierten zytopathischen Effekt aus. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass bei mit Tribec-Virus infizierten Zellen die Translokation von IRF-3 aus dem Zellzytoplasma in den Zellkern unterbleibt, die einen notwendigen Schritt zur Aktivierung des Interferon- β -Promotors darstellt. Die Hemmung der IRF-3-Translokation konnte auch über die verminderte Induktion von ISG56 nachgewiesen werden. Dies war auch für Zellen möglich, die sowohl mit Tribec-Virus als auch mit RVFV-Clone-13 infiziert worden waren, was den Rückschluss zulässt, dass es auch in diesen Zellen nicht zu einer Translokation von IRF-3 kommt. Von den 10 Segmenten des Erbguts des Tribec-Virus wurden in dieser Arbeit die Segmente 6 und 8 daraufhin untersucht, ob ihre Expression Einfluss auf die Interferoninduktion hat. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass keines der beiden Segmente für ein Protein kodiert, welches die Interferonantwort hemmen würde.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomie ausgewählter Viren nach dem Schema der ICTV.....	3
Abbildung 2: Schematischer Aufbau und Struktur des Bluetonguevirus als Vertreter der Orbiviren.....	4
Abbildung 3: Verbreitung des Tribec-Virus innerhalb Europas, Stand 2006.	6
Abbildung 4: Segment 9 des Tribec-Virus, welches neben VP6 auch für drei <i>open reading frames</i> (ORF-Xa-c) kodiert	8
Abbildung 5: Darstellung der IFN- β -Induktion durch ein dsRNA-Virus	10
Abbildung 6: Schematische Darstellung der ISG-Induktion durch IFN- β	12
Abbildung 7: Ablesen des zytopathischen Effekts für zwei verschiedene Virusüberstände.	24
Abbildung 8: Gelelektrophorese zum Nachweis der IFN- β -Induktion in einzel- und doppeltinfizierten HEK-293-Zellen.....	44
Abbildung 9: Gelelektrophoresen zum Nachweis der erfolgten Virusinfektionen in HEK-293-Zellen.	45
Abbildung 10: Gelelektrophorese zum γ -Aktin-Nachweis in HEK-293-Zellen und zur Reinheitskontrolle der isolierten RNA.	46
Abbildung 11: Virustiterbestimmung der Virusüberstände TRBV und RVFV-Clone-13 in Einzel- und Doppelinfektionen auf Vero E6-Zellen mittels TCID ₅₀	47
Abbildung 12: Messung der freigesetzten Interferon- β -Menge bei Einzel- und Doppelinfektionen mit TRBV (MOI=0,1) und RVFV-Clone-13 (MOI=0,3) auf HEK-293-Zellen mittels Sandwich-ELISA.....	49
Abbildung 13: Wachstumsverhalten der mit TRBV und RVFV-Clone-13 infizierten Zellen über die Zeit.....	51
Abbildung 14: Wachstumsverhalten der mit TRBV und RVFV-Clone-13 infizierten Zellen über die Zeit.....	52
Abbildung 15: Virustiterbestimmung der Virusüberstände TRBV und RVFV-Clone-13 in Einzel- und Doppelinfektionen auf Vero E6-Zellen mittels TCID ₅₀	53
Abbildung 16: Messung der freigesetzten Interferon- β -Menge in xCELLigence-Überständen aus 3.2.3 (S.52) mittels Sandwich-ELISA.....	55
Abbildung 17: Indirekte Immunfluoreszenz mit TSA-Signalverstärkung zum Nachweis der IRF-3-Translokation (blau) auf Vero B4-Zellen.	57
Abbildung 18: Gelelektrophorese zum Nachweis der ISG-56-Aktivierung in einzel- und doppeltinfizierten Vero B4-Zellen.....	60
Abbildung 19: Gelelektrophoresen zum Nachweis der erfolgten Virusinfektionen in Vero B4-Zellen.	61
Abbildung 20: Gelelektrophorese zum γ -Aktin-Nachweis in Vero B4-Zellen und zur Reinheitskontrolle der isolierten RNA	62

Abbildung 21: Verhältnis der IFN- β -Promotoraktivität nach Stimulation mit VSV-RNA und Vero-RNA	64
Abbildung 22: Dual-Luciferase Reporter Assay mit den TRBV-Segmenten 6 und 8 ..	65

7 Literaturverzeichnis

- Barro M, Patton JT (2005): Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (11), 4114-9
- Barro M, Patton JT (2007): Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *J Virol* 81 (9), 4473-81
- Basler CF, Garcia-Sastre A (2002): Viruses and the type I interferon antiviral system: induction and evasion. *Int Rev Immunol* 21 (4-5), 305-37
- Boo KH, Yang JS (2010): Intrinsic cellular defenses against virus infection by antiviral type I interferon. *Yonsei Med J* 51 (1), 9-17
- Brandt E (2012): Inhibition des Interferon-Beta-Systems durch Tribec-Virus. Med. Diss.Göttingen 2012.
- Brookes SM, Hyatt AD, Eaton BT (1993): Characterization of virus inclusion bodies in bluetongue virus-infected cells. *J Gen Virol* 74 (Pt 3) 525-30
- Burmester G, Pezzutto A: Taschenatlas der Immunologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2008
- Chattopadhyay S, Marques JT, Yamashita M, Peters KL, Smith K, Desai A, Williams BR, Sen GC (2010): Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax. *EMBO J* 29 (10), 1762-73
- Chen Y, Cai H, Pan J, Xiang N, Tien P, Ahola T, Guo D (2009): Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (9), 3484-9
- Collins SE, Noyce RS, Mossman KL (2004): Innate cellular response to virus particle entry requires IRF3 but not virus replication. *J Virol* 78 (4), 1706-17
- Dilcher M, Hasib L, Lechner M, Wieseke N, Middendorf M, Marz M, Koch A, Spiegel M, Dobler G, Hufert FT, et al. (2012): Genetic characterization of Tribec virus and Kemerovo virus, two tick-transmitted human-pathogenic Orbiviruses. *Virology* 423 (1), 68-76
- Dobler G (1996): Arboviruses causing neurological disorders in the central nervous system. *Arch Virol Suppl* 11 33-40
- Dobler G, Wolfel R, Schmuser H, Essbauer S, Pfeffer M (2006): Seroprevalence of tick-borne and mosquito-borne arboviruses in European brown hares in Northern and Western Germany. *Int J Med Microbiol* 296 Suppl 40 80-3
- Doerr H, Gerlich W: Medizinische Virologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2010
- Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, Fieschi C, Al-Mohsen IZ, Al-Jumaah S, Yang K, Chappier A, Eidenschenk C, Eid P, et al. (2003): Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet* 33 (3), 388-91
- Ernek E, Kozuch O, Gresikova M (1966): Isolation of Tribec virus from the blood of sentinel pastured goats in Tribec region (Slovakia). *Acta Virol* 10 (4), 367-8

- Fauquet C, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, Ball L: *Virus Taxonomy, Eight report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier Academic Press, Amsterdam 2005
- Fu XY, Kessler DS, Veals SA, Levy DE, Darnell JE, Jr. (1990): ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (21), 8555-9
- Gresikova M, Rajcani J, Hruzik J (1966): Pathogenicity of Tribec virus for Macaca rhesus monkeys and white mice. *Acta Virol* 10 (5), 420-4
- Gresikova M, Nosek J, Kozuch O, Ernek E, Lichard M (1965): Study on the Ecology of Tribec Virus. *Acta Virol* 9 83-8
- Haller O, Kochs G, Weber F (2006): The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344 (1), 119-30
- Han Z, Harty RN (2004): The NS3 protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties. *J Biol Chem* 279 (41), 43092-7
- Hassan SS, Roy P (1999): Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry. *J Virol* 73 (12), 9832-42
- Hiscott J, Pitha P, Genin P, Nguyen H, Heylbroeck C, Mamane Y, Algarte M, Lin R (1999): Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. *J Interferon Cytokine Res* 19 (1), 1-13
- Hui DJ, Bhasker CR, Merrick WC, Sen GC (2003): Viral stress-inducible protein p56 inhibits translation by blocking the interaction of eIF3 with the ternary complex eIF2.GTP.Met-tRNAi. *J Biol Chem* 278 (41), 39477-82
- Kapikian AZ, Shope RE (1996): Rotaviruses, Reoviruses, Coltiviruses, and Orbiviruses.
- Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S (2008): Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* 205 (7), 1601-10
- Kayser F, Böttger E, Zinkernagel R, Haller O, Eckert J, Deplazes P: *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2010
- Kelly C, Klenerman P, Barnes E (2011): Interferon lambdas: the next cytokine storm. *Gut* 60 (9), 1284-93
- Knipe D, Howley P: *Fields Virology 5th Edition*. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia 2006
- Koolman J, Röhm K: *Taschenatlas Biochemie des Menschen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009
- Le May N, Dubaele S, Proietti De Santis L, Billecocq A, Bouloy M, Egly JM (2004): TFIIF transcription factor, a target for the Rift Valley hemorrhagic fever virus. *Cell* 116 (4), 541-50
- Le May N, Mansuroglu Z, Leger P, Josse T, Blot G, Billecocq A, Flick R, Jacob Y, Bonnefoy E, Bouloy M (2008): A SAP30 complex inhibits IFN-beta expression in Rift Valley fever virus infected cells. *PLoS Pathog* 4 (1), e13
- Li Y, Li C, Xue P, Zhong B, Mao AP, Ran Y, Chen H, Wang YY, Yang F, Shu HB (2009): ISG56 is a negative-feedback regulator of virus-triggered signaling and cellular antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (19), 7945-50

- Libikova H, Rehacek J, Gresikova M, Kozuch O, Somogyiova J, Ernek E (1964): Cytopathic Viruses Isolated from Ixodes Ricinus Ticks in Czechoslovakia. *Acta Virol* 8 96
- Lopez N, Muller R, Prehaud C, Bouloy M (1995): The L protein of Rift Valley fever virus can rescue viral ribonucleoproteins and transcribe synthetic genome-like RNA molecules. *J Virol* 69 (7), 3972-9
- Luthra P, Sun D, Silverman RH, He B (2011): Activation of IFN- β ; expression by a viral mRNA through RNase L and MDA5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (5), 2118-23
- Málková D, Holubová J, Kolman JM, Marhoul Z HF, Kulková H, Markvart K, L S (1980): Antibodies against some arboviruses in persons with various neuropathies. *Acta Virol* 24 298
- Martinand C, Montavon C, Salehzada T, Silhol M, Lebleu B, Bisbal C (1999): RNase L inhibitor is induced during human immunodeficiency virus type 1 infection and down regulates the 2-5A/RNase L pathway in human T cells. *J Virol* 73 (1), 290-6
- McInerney GM, Karlsson Hedestam GB (2009): Direct cleavage, proteasomal degradation and sequestration: three mechanisms of viral subversion of type I interferon responses. *J Innate Immun* 1 (6), 599-606
- Mertens PP, Brown F, Sangar DV (1984): Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. *Virology* 135 (1), 207-17
- Mertens PP, Diprose J, Maan S, Singh KP, Attoui H, Samuel AR (2004): Bluetongue virus replication, molecular and structural biology. *Vet Ital* 40 (4), 426-37
- Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H: *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010
- Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, Uze G (1999): The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res* 19 (10), 1069-98
- Mortola E, Noad R, Roy P (2004): Bluetongue virus outer capsid proteins are sufficient to trigger apoptosis in mammalian cells. *J Virol* 78 (6), 2875-83
- Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M (1994): Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264 (5167), 1918-21
- Nanduri S, Rahman F, Williams BR, Qin J (2000): A dynamically tuned double-stranded RNA binding mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. *EMBO J* 19 (20), 5567-74
- Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996): The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87 (5), 953-9
- Pestka S (2007): Purification and cloning of interferon alpha. *Curr Top Microbiol Immunol* 316 23-37
- Pitha PM, Kunzi MS (2007): Type I interferon: the ever unfolding story. *Curr Top Microbiol Immunol* 316 41-70
- Rajcani J, Gresikova M (1970): Multiplication of Tribec arbovirus in L cells. *Acta Virol* 14 (2), 175-7

- Randall RE, Goodbourn S (2008): Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 89 (Pt 1), 1-47
- Roulston A, Marcellus RC, Branton PE (1999): Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 53 577-628
- Roy P (1995): Orbivirus structure and assembly. *Virology* 216 1-11
- Sadler AJ, Williams BR (2008): Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8 (7), 559-68
- Schindler C, Plumlee C (2008): Interferons and the JAK-STAT pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19 (4), 311-8
- Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, Rice CM (2011): A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472 (7344), 481-5
- Schwartz-Cornil I, Mertens PP, Contreras V, Hemati B, Pascale F, Breard E, Mellor PS, MacLachlan NJ, Zientara S (2008): Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet Res* 39 (5), 46
- Sen GC, Sarkar SN (2007): The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 316 233-50
- Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, et al. (2003): IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 4 (1), 63-8
- Sherry B (2009): Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response. *J Interferon Cytokine Res* 29 (9), 559-67
- Sun L, Liu S, Chen ZJ (2010): SnapShot: pathways of antiviral innate immunity. *Cell* 140 (3), 436-436 e2
- Süss J, Fingerle V, Hunfeld K-P, Schrader C, Wilske B (2004): Durch Zecken übertragbare humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa. *Bundesgesundheitsblatt* 47 392-404
- Swiss-Institute-of-Bioinformatics (2008). . [ViralZone:www.expasy.org/viralzone](http://www.expasy.org/viralzone).
- Tang ED, Wang CY (2009): MAVS self-association mediates antiviral innate immune signaling. *J Virol* 83 (8), 3420-8
- Turan K, Mibayashi M, Sugiyama K, Saito S, Numajiri A, Nagata K (2004): Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res* 32 (2), 643-52
- Uze G, Schreiber G, Piehler J, Pellegrini S (2007): The receptor of the type I interferon family. *Curr Top Microbiol Immunol* 316 71-95
- Verwoerd DW, Louw H, Oellermann RA (1970): Characterization of bluetongue virus ribonucleic acid. *J Virol* 5 (1), 1-7
- West AP, Shadel GS, Ghosh S (2011): Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 11 (6), 389-402
- Wisskirchen C, Ludersdorfer TH, Mueller DA, Moritz E, Pavlovic J (2011): The interferon induced antiviral protein MxA interacts with the cellular RNA Helicases UAP56 and URH49. *J Biol Chem*

Zust R, Cervantes-Barragan L, Habjan M, Maier R, Neuman BW, Ziebuhr J, Szretter KJ, Baker SC, Barchet W, Diamond MS, et al. (2011): Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat Immunol* 12 (2), 137-43

Danksagung:

Der erste Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr.rer.nat. Martin Spiegel, für die intensive Betreuung, zahlreiche Diskussionen sowie Hilfestellung bei nicht funktionierenden Versuchen, streikender Hard- und Software und bei allen anderen Widrigkeiten des Laboralltags.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Hufert für die Möglichkeit der Promotion in seiner Abteilung und für die Überlassung des Promotionsthemas sowie den anderen wissenschaftlichen Mitarbeitern, Herrn Dr.rer.nat. Maik Dilcher und Herrn PD Manfred Weidmann, die sich auch immer Zeit für meine Fragen genommen haben.

Den technischen Assistentinnen des Instituts gebührt ein besonders großer Dank, da sich mich gerade zu Anfang in die Handhabung der unterschiedlichsten Laborutensilien eingeführt haben und immer geduldig und kompetent auf meine zahlreichen Fragen eingegangen sind.

Nicht ganz losgelöst von allen wissenschaftlich-technischen Aspekten danke ich meinen Mitdoktoranden der Abteilung Virologie, Katharina Schnülle, Julian Dieterle, Milena Euler, Bastian Dörrbecker und Ahmed Abdel Wahed. Durch sie wurde das Arbeiten und Schreiben im Labor zu einer sehr angenehmen, kurzweiligen Angelegenheit.

Lebenslauf:

Ich wurde am 25. September 1985 in der ostwestfälischen Kleinstadt Warburg geboren und verbrachte dort sowohl meine Kindheit als auch meine gesamte Schulzeit. Nach der Grundschulzeit besuchte ich von 1996 bis zum Abitur im Jahre 2005 das Hüffertgymnasium in Warburg.

Anschließend leistete ich ein freiwilliges soziales Jahr (FSJ) auf einer kardiologisch-gastroenterologischen Station im Klinikum Kassel ab.

Im April 2007 erhielt ich die Zusage für einen Studienplatz im Fach Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen und nahm das Studium zum Sommersemester 2007 auf. Im April 2009 absolvierte ich den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Universitätsmedizin Göttingen und unterbrach ein Jahr später für ein Semester mein Studium, um in der Abteilung für Virologie meine Promotionsarbeit zum Thema Tri-
bec-Virus zu beginnen.

Von Oktober 2011 bis März 2012 studierte ich ein Semester an der Medizinischen Universität Wien. Mit dem erfolgreich abgeschlossenen Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im November 2013 beendete ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen.