

Aus der Abteilung Virologie

(Prof. Dr. med. F. T. Hufert)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Charakterisierung der TypI-Interferon-
antagonistischen Aktivität
der humanpathogenen Orbiviren
Tribec-Virus und Kemerovo-Virus**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Christian Philipp Berndt

aus

Stadthagen

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. F. T. Hufert

II. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Oppermann

III. Berichterstatterin: Prof. Dr. M. Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Viren.....</i>	<i>1</i>
1.1.1	Arboviren.....	2
1.1.2	Tribec- und Kemerovo-Virus.....	2
1.1.2.1	Struktur und Replikationszyklus der Orbiviren.....	5
1.2	<i>Angeborenes (unspezifisches) Immunsystem.....</i>	<i>9</i>
1.2.1	Überblick.....	9
1.2.1.1	Einteilung der Interferone.....	9
1.2.1.2	Induktion von IFN- β als Reaktion auf Virusinfektionen.....	10
1.2.1.3	Interferonwirkung an der Zielzelle.....	12
1.2.1.4	Virale Interferonantagonisten.....	12
1.3	<i>Zielsetzung.....</i>	<i>13</i>
2	Material und Methoden.....	14
2.1	<i>Grundsätzliche Hinweise, Standardmaterialien.....</i>	<i>14</i>
2.2	<i>Zellbiologische Methoden.....</i>	<i>15</i>
2.2.1	Kultivierung der Zelllinien Vero E6, Vero B4 und HEK293.....	15
2.2.2	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.....	17
2.2.3	Zellaussaat in Kavitätenplatten.....	18
2.3	<i>Virologische Methoden.....</i>	<i>19</i>
2.3.1	Virusanzucht auf Zellkulturen.....	19
2.3.2	Virus-Titerbestimmung mittels TCID ₅₀ -Test (Ausverdünnung).....	21
2.3.3	Virusinfektion adhärenter Zellen.....	23
2.4	<i>Molekularbiologische Methoden.....</i>	<i>24</i>
2.4.1	Gesamt-RNA-Isolierung aus adhärenenten Zellen.....	24
2.4.2	DNase-Behandlung der RNA-Isolate.....	26
2.4.2.1	Spektrophotometrische DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung mit dem Nanodrop 1000:.....	27
2.4.3	cDNA-Synthese.....	27
2.4.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
2.4.5	Agarosegel-Elektrophorese.....	32
2.4.6	DNA-Extraktion aus präparativen, TAE-gepufferten Agarosegelen.....	34
2.4.7	Herstellung rekombinanter pCRII-Plasmidvektoren mittels TA-Klonierung.....	35
2.4.8	Minipräparation von DNA-Plasmiden.....	39

2.4.9	Analytischer Restriktionsverdau der rekombinanten Plasmide durch Restriktionsendonukleasen	40
2.4.9.1	Analytischer Restriktionsverdau.....	41
2.4.9.2	Präparativer Restriktionsverdau	42
2.4.10	DNA-Sequenzierung	43
2.4.11	Midipräparation von DNA-Plasmiden.....	44
2.4.12	Subklonierung der PCR-amplifizierten TRBV-Segment-2- und -3-komplementären kodierenden TRBV-cDNA-Abschnitte aus dem pCRII-Vektor in den eukaryontischen Plasmidvektor pI.18.....	45
2.4.13	Dualer Luziferase Reporter-Assay	48
2.4.13.1	Methode	50
2.4.13.2	Reporter-Assay mit Transfektion von Expressionsplasmiden für virale Proteine	51
2.4.13.3	Reporter-Assays mit virusinfizierten Zellen.....	52
2.4.14	Sandwich-ELISA zur Messung der Interferon- β -Konzentration in Zellkulturüberständen	53
2.4.15	Beobachtung von Echtzeitverläufen virusvermittelter Zytotoxizität mittels Impedanzmessung	54
2.4.15.1	Methode	55
2.4.15.2	Versuchsansatz für Virusinfektionen von HEK293-Zellen.....	55
2.4.15.3	Versuchsansatz für Virusinfektionen mit Interferon- α - und Apoptoseinhibitor-vorbehandelten HEK293-Zellen.....	56
2.4.16	Indirekte Immunfluoreszenz und TUNEL-Färbung	57
3	Ergebnisse.....	61
3.1	<i>Hemmung der IFN-β-Induktion durch TRBV und KEMV.....</i>	<i>61</i>
3.1.1	IFN- β Expression nach TRBV- und KEMV-Infektion	61
3.1.2	IFN- β -Sandwich-ELISA.....	64
3.1.3	Quantitativer Virusnachweis mittels TCID ₅₀ -Test	66
3.2	<i>Zytopathische Wirkung von TRBV und KEMV nach Einzelinfektion sowie nach Koinfektion mit dem interferoninduzierenden RVFV Clone 13</i>	<i>67</i>
3.2.1	Zellwachstumsverläufe von HEK293-Zellen nach TRBV-, KEMV- und RVFV Clone 13-Einzelinfektion	67
3.2.2	Zellwachstumsverläufe von HEK293-Zellen nach RVFV Clone 13-Einzelinfektion mit höherer MOI sowie nach Koinfektion mit TRBV und KEMV	69
3.3	<i>Klonierung von Expressionsplasmiden für die TRBV-Segmente 2 und 3.....</i>	<i>71</i>
3.4	<i>Hemmung der IFN-β-Promotoraktivierung durch TRBV- und KEMV-Proteine</i> <i>73</i>	
3.4.1	Einfluss der Genprodukte der TRBV-Segmente 2, 3 und 9 auf den humanen Interferon- β -Promotor	74

3.4.2	Einfluss der Genprodukte des TRBV-Segments 4 und des KEMV-Segments 9 auf den humanen Interferon- β -Promotor	77
3.4.3	Einfluss einzelner Genprodukte des TRBV-Segments 9 auf den humanen Interferon- β -Promotor	80
3.4.4	Einfluss der Kombination von TRBV-Helikase und TRBV-ORFXa-Protein auf den humanen Interferon- β -Promotor	83
3.4.5	Kombination mehrerer einzelner Genprodukte des TRBV-Segments 9 und deren Einfluss auf den humanen Interferon- β -Promotor	86
3.5	<i>Apoptoseinduktion nach TRBV- und KEMV-Infektion</i>	89
3.5.1	Nachweis von Apoptose in infizierten Vero B4-Zellen mittels TUNEL-Färbung und Immunfluoreszenz	89
3.5.2	Zellwachstumsverlauf KEMV- und TRBV-infizierter HEK293-Zellen unter Behandlung mit IFN- α sowie dem Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK	92
3.5.2.1	Zellwachstumsverlauf nicht-infizierter HEK293- und VeroB4-Zellen unter Behandlung mit IFN- α sowie Z-VAD-FMK	93
3.5.2.2	Zellwachstumsverlauf TRBV-infizierter HEK293- und VeroB4-Zellen unter Behandlung mit IFN- α sowie Z-VAD-FMK	95
3.5.3	Quantitativer Virusnachweis per TCID ₅₀ -Titerbestimmung	99
4	Diskussion	101
4.1	<i>TRBV und KEMV hemmen aktiv die IFN-β-Induktion</i>	102
4.2	<i>TRBV und KEMV lösen einen zytopathischen Effekt in interferonkompetenten Zellen aus</i>	103
4.3	<i>Einfluss einzelner TRBV- und KEMV-Proteine auf die Aktivität des humanen IFN-β-Promotors</i>	105
4.4	<i>Auswirkung der Infektion mit TRBV und KEMV auf das zelluläre Apoptoseverhalten</i>	110
4.4.1	TRBV und KEMV induzieren Apoptose in Vero B4-Zellen	110
4.4.2	Der Apoptoseinhibitor Z-VAD-FMK wirkt nicht zellprotektiv auf TRBV- und KEMV-infizierte HEK293-Zellen und lediglich leicht zellprotektiv auf TRBV- und KEMV-infizierte VeroB4-Zellen	110
4.4.3	IFN- α schützt sowohl HEK293- als auch VeroB4-Zellen vor dem TRBV- bzw. KEMV-vermittelten Zelltod	111
5	Zusammenfassung	113
6	Literaturverzeichnis	115

Abkürzungsverzeichnis

BTV	Bluetongue-Virus
CPE	Zytopathischer Effekt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ff.	und auf den folgenden Seiten
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FSMEV	FSME-Virus (Erreger der Frühsommermeningoenzephalitis)
g	Erdbeschleunigung ($\approx 9,81 \text{ m/s}^2$)
GIV	Great Island-Virus
GTC	Guanidinisothiocyanat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
HEK293	Human Embryonal Kidneycells (Zelllinie 293)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IFN	Interferon
IPS-1	IFN- β Promoter-Stimulator-Protein-1
IRF	<i>interferon regulating factor</i>
ISG	<i>interferon-stimulated genes</i>
ISGF	<i>interferon-stimulated genefactor</i>
ISRE	<i>interferon-stimulated responsive element</i>
KEMV	Kemerovo-Virus
LB	Luria Bertani
LIPV	Lipovnik-Virus
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDA-5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>

“mock”(-infiziert)	nicht-infiziert
MW	Mittelwert
NS	Nichtstrukturprotein
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PRR	<i>pathogen recognition receptor</i>
RHP	<i>random hexamer primer</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene I</i>
Rpm	Rotationen pro Minute (in der Zentrifuge)
RNA	Ribonukleinsäure
RVFV	Rift Valley Fever Virus
s.	siehe
s.o.	siehe oben
Standardverbrauchsmat.	innerhalb der Versuche benutztes Standardmaterial (s. unter 2, S. 14)
TBK-1	<i>TANK-binding kinase</i>
TCID50	<i>tissue culture infectious dose</i> : Verdünnungsstufe, bei der in 50% der Fälle ein CPE eingetreten ist.
TdT	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TLR	<i>toll like receptor</i>
TRBV	Tribec-Virus
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick end labeling</i>
U	unit
Vero-RNA	Gesamt-RNA aus uninfizierten Vero E6-Zellen
vgl.	vergleiche
v.l.n.r.	von links nach rechts
VP	Virusprotein

1 Einleitung

1.1 Viren

Viren bestehen aus Proteinen und einer Nukleinsäureart. Sie vermehren ihre einzelnen Strukturkomponenten in der von ihnen infizierten Wirtszelle und verlassen diese anschließend neu zusammgebaut in vielfacher Kopie. Viren vermehren sich, im Gegensatz zu zellulären Organismen, also nicht durch Zweiteilung. Darüberhinaus besteht aufgrund des Fehlens eines eigenen Proteinsyntheseapparates obligate Abhängigkeit von der Wirtszelle, um sich vervielfältigen zu können (Doerr und Gerlich 2010). Viren können somit als intrazelluläre Parasiten aufgefasst werden (Modrow 2010). Sie stellen eine Grenzzone zwischen belebter und unbelebter Natur dar, denn außerhalb ihres Wirtsorganismus verhalten sie sich wie tote Materie. Schätzungen zufolge existieren Viren bereits seit über zweihundert Millionen Jahren auf der Erde. Der Name „Virus“ (lat.; „Gift“) stammt aus dem frühen zwanzigsten Jahrhundert (Doerr und Gerlich 2010). Im späten neunzehnten Jahrhundert wurden sie noch als „filtrierbares Agens“ bezeichnet. Eine erste Vermutung über die Existenz dieser bislang ungekannten Spezies äußerte 1840 der Göttinger Anatom Jakob Henle (Knipe et al. 2007). Ein Nachweis gelang allerdings erst im späten 19. Jahrhundert anhand des pflanzenpathogenen Tabakmosaikvirus (TMV). Kurz nachdem erste tierpathogene Viren durch Friedrich Loeffler und Paul Frosch nachgewiesen werden konnten, gelang auch der Nachweis humanpathogener Viren durch Walter Reed im Jahr 1900. Elektronenmikroskopisch sichtbar wurden Viren schließlich 1940 und somit einhundert Jahre nach Henles Hypothese. Mit der Einführung der Virusanzucht in Gewebekulturen 1928 und der Entdeckung des zytopathischen Effektes (CPE) 1949 konnten die Grundsteine der heutigen Virusforschung gelegt werden (Modrow 2010). Derzeit werden Viren nicht nur als klassische Infektionserreger, sondern auch als Auslöser von etwa 20 Prozent aller Krebserkrankungen angesehen (Doerr und Gerlich 2010). Hingegen werden mittlerweile aber auch Virusstämme zur gezielten Onkolyse erforscht (Wagener und Müller 2009). Die Entstehung einiger Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose (MS) könnten ebenfalls mit Viren in Zusammenhang stehen (Soldan et al. 1997; Cheng et al. 2012). Ein mitunter gefährliches Potential zeigt daneben auch das Auftreten von Virusmutationen, wie 2002

anhand der SARS-Pandemie und 2009 durch die „Schweinegrippe“ erneut deutlich wurde (Modrow 2010). Dennoch existieren Theorien, dass der Selektionsdruck zwischen Virus und Mensch beiderseits Evolutionsvorteile bieten könnte (Doerr und Gerlich 2010).

1.1.1 Arboviren

Die Bezeichnung Arbovirus leitet sich aus dem englischen „arthropod borne“ ab. Darunter fallen etwa 400 Viren, die – als gemeinsames Merkmal – durch Zecken oder Stechmücken zwischen ihren Wirbeltier-Wirten übertragen werden. Der Begriff Arbovirus bezieht sich also auf den Übertragungsmechanismus und ist somit keine taxonomische Klassifizierung. Etwa einhundert humanpathogene Arboviren sind derzeit bekannt (Doerr und Gerlich 2010). Aufgrund der Datenlage wird jedoch vermutet, dass deutlich mehr Arboviren mit menschlichen Erkrankungen in Zusammenhang stehen (Suss und Schrader 2004). Nahezu alle dieser Viren besitzen ein RNA-Genom (Labuda und Nuttall 2004). Neben Vertretern der Reoviridae - unter ihnen die im Folgenden behandelten Orbiviren - beherbergen die Familien Bunya-, Flavi- und Togaviridae zahlreiche Arboviren (Doerr und Gerlich 2010). Da der globale Klimawandel die Ausbreitung von Arboviren begünstigt, ist der Mensch immer häufiger mit dem Thema arboviraler Erkrankungen konfrontiert (Maclachlan und Guthrie 2010). Neben dem West-Nil-Fieber-Virus, welches sich in den letzten zwei Dekaden interkontinental verbreitete und bereits Todesopfer forderte, werden auch andere Viren in der Lage sein, sich geographisch anzupassen (Suss und Schrader 2004; Stark et al. 2009). Zeckenübertragene Arboviren stellen, mit Ausnahme des FSME-Virus, ein in Deutschland stark vernachlässigtes Forschungsthema dar (Suss und Schrader 2004).

1.1.2 Tribec- und Kemerovo-Virus

Die Arboviren Tribec- (TRBV) und Kemerovo-Virus (KEMV) werden von Schildzecken (*Ixodes ricinus* und *Ixodes persulcatus*) übertragen. Sie sind in Mittel- und Osteuropa weit verbreitet. Innerhalb der Familie *Reoviridae* werden sie den Orbiviren zugeordnet, welche eins von zwölf Genera der Familie *Reoviridae* darstellen (siehe Abb. 1, S. 3) (Libikova et al. 1978; Attoui et al. 2005). Innerhalb der Orbiviren sind sie der Spezies (Serogruppe) Great Island-Virus (GIV) zugeordnet (Knipe et al. 2007). Sie wurde früher in zwei Serokomplexe untergliedert: Great Island-Serokomplex und Kemerovo-Serokomplex (Libikova et al. 1978; Belhouchet et al. 2010). Die Viren beider Serokomplexe stehen in

Verdacht, in Menschen und anderen Säugetieren febrile Meningoenzephalitiden zu erzeugen (s.u.). In der vorliegenden Arbeit werden mit dem Tribec- und Kemerovo-Virus zwei der drei Mitglieder des Kemerovo-Serokomplexes untersucht. Das dritte Mitglied dieser Gruppe ist das zu TRBV nahezu sequenzhomologe Lipovnik-Virus (LIPV) (Dilcher et al. 2012). Diese drei Viren werden im Folgenden auch als „Kemerovo-Viren“ bezeichnet. Der natürliche Vermehrungszyklus dieser Viren ist bezüglich ihrer Wirtsspezifität noch nicht vollständig aufgeklärt (Dobler 1996).

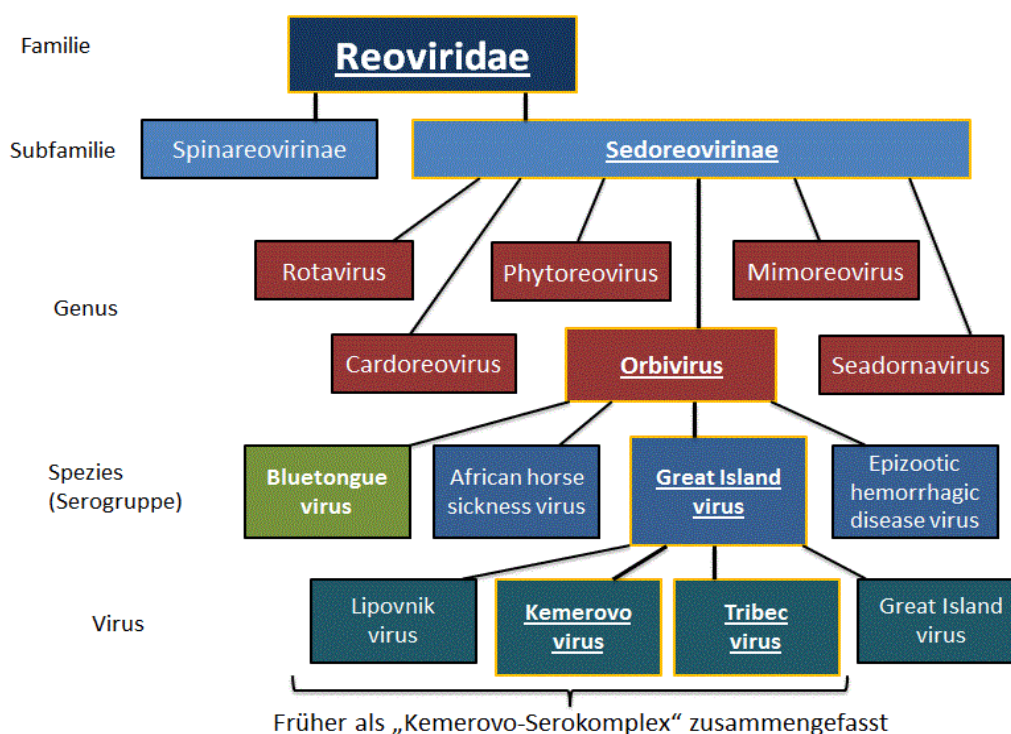


Abb. 1. Stammbaum der Reoviren nach der aktuellen Einteilung des International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Das grün dargestellte Bluetongue-Virus (BTV) ist die orbiviren-genus-definierende „Type Species“. Zum Great Island-Virus-Serokomplex zählen, neben den vier dargestellten Viren, 32 weitere. Modifiziert nach ICTV 2011 (<http://www.ictvonline.org>).

1962 im Mai wurde in der westsibirischen Kemerovo-Region erstmalig das Kemerovo-Virus (KEMV) aus der Schildzecke *Ixodes persulcatus* isoliert (Chumakov et al. 1963). Das Tribec-Virus (TRBV) wurde erstmals im April des Folgejahres in Schildzecken der Gattung *Ixodes ricinus* (gemeiner Holzbock) im slowakischen Tribecgebirge gefunden. Man konnte es kurze Zeit später in Wühlmäusen, Ziegen und anderen Nutztieren nachweisen (Gresikova et al. 1965; Ernek et al. 1966). Daraufhin wurden über 4000 Schildzecken in Westsibirien und der ehemaligen Tschechoslowakei untersucht. Mehr als

eine von hundert Zecken war KEMV-positiv. In manchen Regionen waren sogar mehr Zecken vom KEMV befallen als vom FSMEV. Diese Arboviren stellen somit keine Rarität dar (Libikova et al. 1978). Ebenfalls 1962 konnte das KEMV in Serum und Liquor neurologisch kranker westsibirischer Patienten nachgewiesen werden. Die Patienten, die nach Zeckenbiss an Fieber litten, zeigten in der Mehrzahl der Fälle einen positiven KEMV-Titer, während der FSMEV-Titer negativ ausfiel (Chumakov 1963). In den 1970er Jahren konnte man in Seren- und Liquorproben tschechoslowakischer und österreichischer Patienten, die an Meningoenzephalitis- bzw. Polyradikulitis erkrankt waren, in etwa der Hälfte der Fälle eine Antikörperantwort gegen Kemerovo-Viren nachweisen. Daneben wies die gesunde Bevölkerung westsibirischer und tschechoslowakischer Regionen eine Serokonversionsrate von 8,8 Prozent auf. Somit konnten sowohl stattgehabte Kontakte febriler und neurologisch erkrankter Patienten als auch Gesunder mit diesen Viren belegt werden (Libikova et al. 1978). In Infektionsstudien, bei denen Rhesusaffen, Mäuse, Ratten und Hamster intrazerebral mit TRBV bzw. KEMV infiziert wurden, kam es zu mitunter letal endenden Entzündungen des zentralen Nervensystems (Chumakov 1963; Gresikova et al. 1966; Libikova et al. 1970). In Deutschland ist nur wenig über die Prävalenz der Kemerovo-Viren bekannt, sodass hier eine objektive Risikoberwertung noch nicht möglich ist (Suss und Schrader 2004). Mitte der 1980er-Jahre isolierte man das TRBV im Rahmen von FSME-Studien aus *Ixodes ricinus*-Zecken in Mecklenburg-Vorpommern und Thüringen. Ebenfalls konnte es aus Feldhasen Schleswig-Holsteins isoliert werden (Dobler et al. 2006). Da das KEMV sogar in ägyptischen Zugvögeln zu finden war, muss man mit einer weiten Verbreitung rechnen (Schmidt und Shope 1971). Einen Überblick über bisherige europäische Isolierungsorte des TRBV zeigt die folgende Karte (Abb. 2, S. 5).

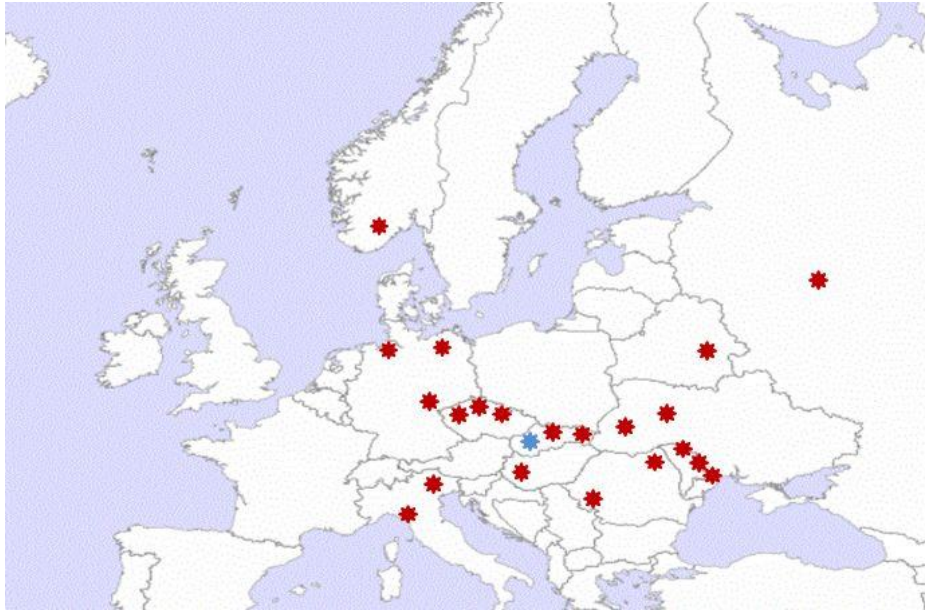


Abb. 2. Verbreitung des Tribec-Virus in Europa – Orte der Virusnachweise bis heute. Blauer Stern = Erstisolierung des TRBV. Modifiziert nach Suss und Schrader 2004; Dobler et al. 2006. Mit freundlicher Genehmigung des Autors.

1.1.2.1 Struktur und Replikationszyklus der Orbiviren

Wie andere Orbiviren besitzen die zeckenübertragenen Tribec- und Kemerovo-Viren ein zehnfach segmentiertes Doppelstrang-RNA-Genom, welches von einem doppel-schichtigen ikosaedrischen Kapsid umgeben ist. Obwohl diese Viren während der Morphogenese kurzzeitig eine Lipidhülle tragen können, sind extrazelluläre Virionen in aller Regel unbehüllt. Das zehnfach segmentierte Genom kodiert für mindestens zehn Proteine (s. Tab. 1, S. 6). Sieben dieser viralen Proteine sind Strukturproteine (VP1-7) und mindestens drei sind Nichtstrukturproteine (NS1-3, s. Tab. 1, S. 6). Zusätzlich gibt es offene, um ein Nucleotid verschobene Leserahmen auf dem Helikase (VP6)-kodierenden Segment 9 (ORFXa, -Xb (und -Xc im Falle des TRBV) (s. Abb. 3, S. 6)). Diese kodieren für potentielle Proteine mit bislang unbekannter Funktion. Für das Bluetongue-Virus (BTV) - den Prototypen der Orbiviren - konnte ein Segment 9-ORFX-vermittelter Replikationsvorteil in IFN-behandelten Zellen festgestellt werden. Das exprimierte Protein, welches sich dabei im Bereich der Nucleoli dieser Zellen anreichert, erhielt den Namen NS4. Aufgrund des Kozak-Kontextes des NS4-Startcodons wird derzeit eine Translation durch *Leaky Scanning* vermutet (Labuda und Nuttall 2004; Attoui et al. 2005; Firth 2008; Ratinier et al. 2011; Dilcher et al. 2012).

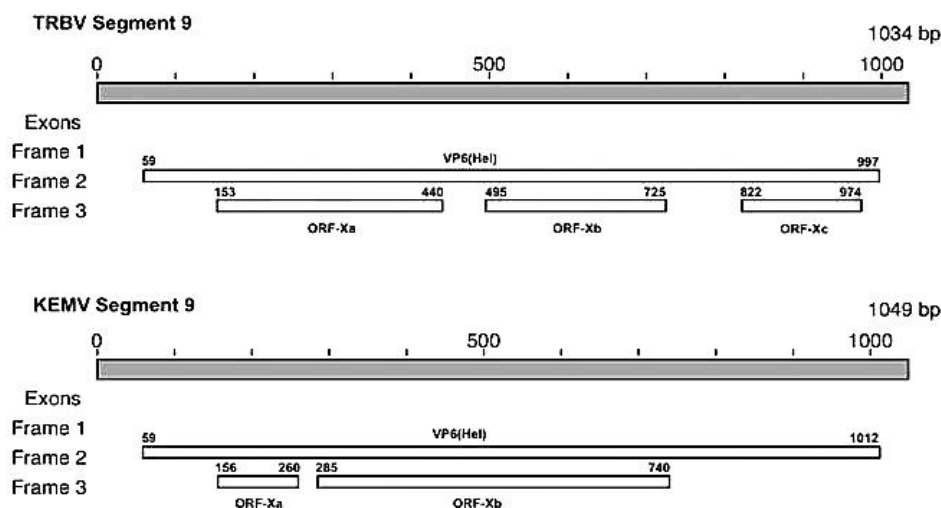


Abb. 3. Genomkarte des Virussegments 9 von TRBV (oben) und KEMV (unten) mit ihren überlappenden offenen Leserahmen ORF-Xa, ORF-Xb (und ORF-Xc im Falle von TRBV).

Genomsegment	Tribec-Virus	Kemerovo-Virus	Bluetongue-Virus
1 (≈4kb)	VP1 (Pol)	VP1 (Pol)	VP1 (Pol)
2	VP3	VP3	VP2
3	VP4 (CaP)	VP4 (CaP)	VP3
4	NS1 (TuP)	VP2	VP4 (CaP)
5	VP2	NS1 (TuP)	NS1 (TuP)
6	VP5	VP5	VP5
7	NS2 (ViP)	NS2 (ViP)	VP7
8	VP7	VP7	NS2 (ViP)
9	VP6 (Hel), ?	VP6 (Hel), ?	VP6 (Hel), NS4
10 (<1kb)	NS3	NS3	NS3

Tab. 1. Vergleich der Virusgenomsegmente von TRBV, KEMV und BTV. Die Bezeichnungen richten sich nach der Segmentlänge bzw. der Gelelektrophorese-Banden. Pol = RNA-abhängige RNA-Polymerase, CaP = Capping-Enzym, TuP = tubuläre Strukturen formendes Protein, ViP = Matrix Protein der viralen Einschlusskörper (VIB = viral inclusion bodies), Hel = ss- und dsRNA-bindende Helikase. Weiteres siehe Text. Abb. 3 und Tab. 1 modifiziert nach Dilcher et al. 2012. Mit freundlicher Genehmigung des Autors.

Die allgemeine Struktur der Orbiviren wird im Folgenden exemplarisch anhand des veterinärmedizinisch relevanten und Genus-definierenden Bluetongue-Virus (BTV) erklärt (siehe Abb. 4; S. 8, vgl. auch Abb. 1; S. 3). Es ist das das derzeit am besten

erforschte Orbivirus, da es in der Vergangenheit nahezu weltweit ein wirtschaftlich relevantes Massensterben von Wiederkäuerherden auslöste (Wilson und Mellor 2008; Modrow 2010). Das Bluetongue-Virus wird von *Culicoides*-Gnizen übertragen und verursacht eine Maul-und-Klauenseuche-ähnliche Erkrankung, welche aufgrund der häufig einhergehenden Zungenzyanose als „Blauzungenkrankheit“ bezeichnet wird (Modrow 2010). Bluetongueviren sind etwa 85 nm große, unbehüllte dsRNA-Viren mit doppelschichtigem, ikosaedrischem Kapsid (Mertens et al. 2004). Die zehn linearen dsRNA-Segmente befinden sich konzentrisch geschichtet innerhalb eines VP3-Mantels (Gouet et al. 1999, siehe Abb. 4; S. 8). Dieser stellt die innere von zwei Schichten des sogenannten *Core*-Partikels dar. Diese Schicht wird auch *Subcore* oder „inneres Kapsid“ genannt. Die äußere Schicht dieses *Core*s bilden trimer organisierte VP7-Ringstrukturen, die das Charakteristikum der Orbiviren darstellen (lat. *orbis* = Ring, Kreis). Man bezeichnet sie literaturabhängig auch als „mittleres Kapsid“. Umschlossen wird der gesamte *Core*-Partikel durch das „äußere Kapsid“, welches aus VP2- und VP5-Einheiten aufgebaut ist. Dabei ist das antigene VP2-Protein äußerst variabel und charakterisiert die einzelnen BTV-Serotypen. Es wird im Falle der Kemerovoviren für die Ausprägung der Neurovirulenz verantwortlich gemacht (Nuttall et al. 1992). Die Serogruppe (GIV; vgl. Abb. 1, S. 3) wird hingegen durch das *Core*-Protein VP7 definiert (Roy 1996; Fauquet 2004). Innerhalb des *Core*-Partikels befinden sich drei Virusproteine entlang des Genoms: Die RNA-abhängige RNA-Polymerase (VP1), ein Capping-Enzym (VP4) und eine ss- und dsRNA-bindende Helikase (VP6). Sie werden unter der Bezeichnung Transkriptionskomplex (TC) zusammengefasst (Fauquet 2004; Knipe et al. 2007).

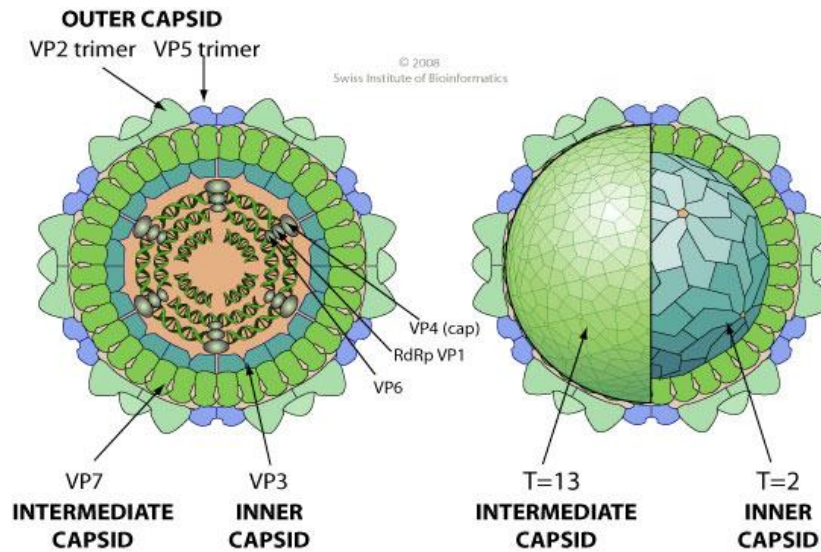


Abb. 4. Struktur der Orbiviren am Beispiel des Bluetongue-Virus (BTV). Vgl. Text. (Swiss Institute of Bioinformatics 2008)

Der noch nicht abschließend erforschte Replikationszyklus beginnt mit der VP2-vermittelten Adhäsion des Virus an Glykoproteine der Vertebraten-Wirtszelle. Infolgedessen erfolgt eine clathrinvermittelte endosomale Aufnahme in die Zelle (Hassan und Roy 1999; Knipe et al. 2007) und anschließend die Freisetzung des Virus-Core aus dem Endosom. Während des Replikationsvorganges verbleibt die doppelsträngige RNA im Core-Partikel, was den Kontakt zu interferoninduzierenden Signalwegen sowie einen Proteinsynthese-Shut-Off der Wirtszelle verhindert. Um dies sicherzustellen, wird durch die Core-Partikel-Proteine sogar fälschlicherweise freigeordnete dsRNA selektiv sequestriert (Diprose et al. 2002; Mertens et al. 2004). Während der Replikation erzeugt der virale Transkriptionskomplex durch ein Zusammenspiel aus entwindender Helikase (VP6), RNA-abhängiger RNA-Polymerase (VP1) und Capping-Enzym (VP4), ausgehend vom Minusstrang des viralen dsRNA-Genoms, viele neue Plusstrang-RNA-Kopien. Diese erhalten am 5'-Ende ein N7-methyliertes GTP („Cap“) und gelangen durch spezielle Poren aus dem *Core* ins Zytoplasma (Knipe et al. 2007). Daraufhin produzieren die zellulären Ribosomen die für die Virusreplikation erforderlichen Proteine. Phosphorylierte NS2-Proteine bilden zellkernnah sogenannte virale Einschlusskörperchen (*viral inclusion bodies* = VIBs), in denen sich im Rahmen der Assemblierung neue Virus-Cores zusammenlagern. Das äußere Capsid wird vermutlich mit Hilfe des zellulären Intermediärfilaments Vimentin angelagert (Brookes et al. 1993; Fauquet 2004). Durch die

Viruspolymerase (VP1) kann das virale dsRNA-Genom während der Replikation komplett erzeugt werden, da sie neben der Plusstrangbildung auch zur Minusstrangsynthese befähigt ist (Boyce et al. 2004). Die Freisetzung fertig assemblierter Virione erfolgt mit Hilfe des NS3-Proteins und des zellulären Vimentins (Hyatt et al. 1993; Bhattacharya et al. 2007). Die dabei genutzten Mechanismen sind Knospung (*Budding*) und lokale Zellmembrandisruptionen (Hyatt et al. 1989; Han und Harty 2004). BTV-infizierte Säugerkzellen zeigen massive Apoptosevorgänge bereits innerhalb der ersten 24 Stunden *post infectionem*. Ursächlich scheinen die Proteine des äußeren Capsids zu sein (Mortola et al. 2004). Doppelstrang-RNA ist zwar auch ein potenter Apoptoseinduktor, gelangt jedoch - wie oben beschrieben – in der Regel nicht frei ins Wirtszellzytoplasma (Stark et al. 1998; Diprose et al. 2002).

1.2 Angeborenes (unspezifisches) Immunsystem

1.2.1 Überblick

Im Vergleich zur adaptiven Immunabwehr ist das angeborene Immunsystem – zu dem auch das TypI-Interferonsystem zählt – ein evolutionär älterer Mechanismus. Es besitzt zwar kein immunologisches Gedächtnis gegenüber stattgehabten Infektionen wie das adaptive (erworbene) Immunsystem. Dafür ist es aber von Geburt an einsatzbereit und vermittelt deutlich schnellere Reaktionen als das adaptive Immunsystem. Als erste und unspezifische Verteidigungslinie begrenzt es die virale Infektion solange, bis eine T- und B-zelluläre Immunantwort (erworbenes Immunsystem) eingeleitet werden kann. Funktioniert dies nicht, können mitunter sogar schwach virulente Erreger zu letalen Infektionen führen. Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer funktionierenden angeborenen Immunabwehr (Kayser 2005; Doerr und Gerlich 2010).

1.2.1.1 Einteilung der Interferone

Interferone sind mit 146 bis 166 Aminosäuren relativ kleine und instabile Proteine. Sie gehören zur Klasse der Zytokine, zu welcher auch Interleukine und Hämatopoese-faktoren gehören. Interferone wirken auf ihre Zielzellen autokrin, parakrin und über einige Distanz, um ihr Gefahrensignal im Körper zu verbreiten. Sie bewirken in der Zielzelle durch die Induktion einer Vielzahl von antiviral aktiven Proteinen die Etablierung eines antiviralen Zellstatus. Interferone wirken somit indirekt antiviral (Kayser 2005).

Desweiteren vermitteln sie eine verstärkte MHCI-Expression (Stark et al. 1998). Es gibt drei Interferonklassen: TypI-Interferone können von nahezu allen Körperzellen gebildet werden. Darunter fällt das IFN- α mit seinen 12 Subtypen, das IFN- β sowie die IFN- κ , - ϵ und - ω . Obwohl alle TypI-Interferone denselben Zielrezeptor haben, besitzen sie jeweils eine eigene Pharmakokinetik. Das vor einigen Jahren entdeckte TypIII-Interferon (IFN- λ) scheint speziell an Schleimhäuten wirksam zu sein. Es hat zwar einen eigenen Zielrezeptor, nutzt jedoch den identischen intrazellulären Signalweg wie die TypI-Interferone (Onoguchi et al. 2007; Doerr und Gerlich 2010). TypII-Interferon wird auch „Immun-Interferon“ oder „Interferon- γ “ genannt und aktiviert andere Signalwege als die übrigen Interferone. Es wird von T- und NK-Zellen produziert und verursacht neben der Stimulation verschiedener Leukozytengruppen eine Verstärkung der MHCII-vermittelten Immunität. Bezogen auf das Immunsystem, spielt dieser IFN-Typ im Gegensatz zu den anderen Interferontypen vor allem im Rahmen der adaptiven Immunantwort eine Rolle.

1.2.1.2 Induktion von IFN- β als Reaktion auf Virusinfektionen

Bestimmte niedermolekulare Verbindungen, Bakterien und vor allem Viren sind in der Lage das TypI-Interferonsystem zu stimulieren. Zu den „Pathogen Recognition Receptors“ (PRRs) zählen verschiedene Rezeptoren, mit denen Zytoplasma, Endosomen und Zelloberflächen ausgestattet sind, um körperfremde Strukturen zu erkennen. Diese Strukturen werden als *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) bezeichnet und sind im Falle der Viren meist virale Nukleinsäuren, häufig dsRNA (Ablasser et al. 2009; Doerr und Gerlich 2010).

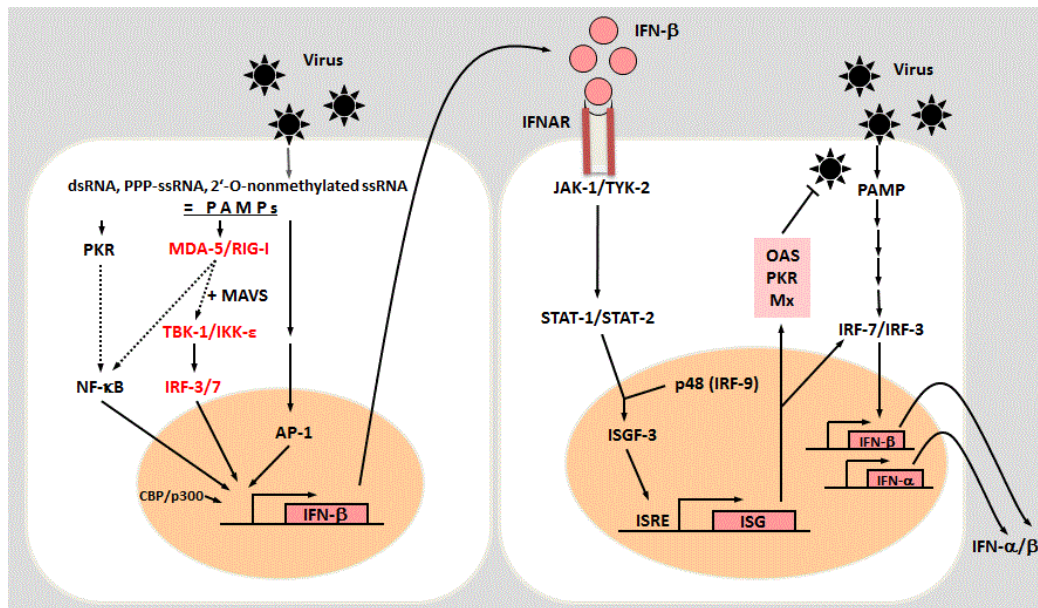


Abb. 5 Signalwege der virusinduzierten Interferon Typ I-Induktion über die zytoplasmatischen RIG-like Rezeptoren MDA-5 und RIG-I (links) sowie IFN-Rezeptor-vermittelte Wirkung des IFN- β (rechts, vgl. Text).

Die Helikasen RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) und MDA-5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) (siehe Abb. 5, S. 11) sind im Zytoplasma der Wirtszelle lokalisiert. Sie zählen zu den „RIG-like Rezeptoren“ und werden im Gegensatz zu den Membran-gebundenen Toll-like Rezeptoren (TLRs) ubiquitär exprimiert. Während intrazelluläre dsRNA von beiden als „fremd“ erkannt wird, erkennt RIG-I spezifisch 5'-triphosphorylierte ssRNA und MDA-5 ssRNA mit fehlender 2'-O-Methylierung der auf die 5'-Ribose folgenden Ribose (Hornung et al. 2006; Zust et al. 2011). Infolgedessen kommt es zur Komplexbildung mit dem mitochondrienassoziierten Protein MAVS, was einen interferoninduzierenden Signalweg einleitet (MAVS: *mitochondrial antiviral signaling protein*; Synonyme: IPS-1, VISA oder auch Cardif) (Yoneyama und Fujita 2008). Stromabwärts von MAVS kommt es zur Aktivierung verschiedener Kinasen. Die TBK-1 (*TANK-binding kinase*) und die Kinase IKK- ϵ aktivieren dann per Phosphorylierung die essentiellen interferonregulierenden Transkriptionsfaktoren IRF-3 und IRF-7 (Sharma et al. 2003; Hiscott 2007). Jene translozieren daraufhin als Homo- oder Heterodimer in den Zellkern und führen zu einer verstärkten IFN-Typ I-Expression. Am genauesten beschrieben ist dieses Prinzip für den IFN- β -Promotor, an dessen VRE-Region (*virus responsive element*) IRF-3 zusammen mit NF κ B, AP-1 und dem Coaktivator CBP/p300 bindet, um als sogenanntes „Enhanceosom“ die IFN- β -

Transkription zu aktivieren. Durch diese erste Interferonwelle kommt es neben der Bildung antiviraler Proteine zu einer vermehrten IRF-7-Expression. Dies führt, im Sinne einer positiven Rückkopplung, gemeinsam mit IRF-3, zu einer stärkeren Synthese von IFN- β und der IFN α -Subtypen (siehe Abb. 5, S. 11, Basler und Garcia-Sastre 2002; Haller et al. 2006; Kawai und Akira 2006; Doerr und Gerlich 2010).

1.2.1.3 Interferonwirkung an der Zielzelle

Wie oben bereits beschrieben verbreiten Interferone ihr spezielles Gefahrensignal sowohl autokrin als auch parakrin. Sezerniertes TypI-Interferon bindet an seine Zielzelle über einen aus zwei Transmembranproteinen dimerisierten Rezeptor (IFNAR; Heterodimer aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2, siehe Abb. 5, S. 11). An dessen zytoplasmatische Domäne sind die Janus-Kinasen JAK-1 und Tyk-2 assoziiert, welche durch die interferonvermittelte Konformationsänderung des Rezeptors aktiviert werden. Die Kinasen, der Rezeptor selbst sowie die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 werden dabei phosphoryliert, woraufhin STAT1/2-Heterodimere entstehen, die in den Zellkern wandern (Basler und Garcia-Sastre 2002). Sie bilden zusammen mit IRF9 (p48) einen als ISGF-3 (*interferon-stimulated gene factor 3*) bezeichneten Transkriptionskomplex, der im Zellkern an das interferonstimulierbare responsive Element (ISRE) des Promotors IFN-stimulierbarer Gene (ISG) bindet (Haller et al. 2006). In der Folge kommt es zur Expression hunderter Gene (s.u.), wodurch die Zelle in einen antiviralen Zustand versetzt wird. IFN-induzierte, antiviral aktive Proteine sind z. B. RNasen wie das 2'5'-OAS/RNase-L System, das virale Nukleoproteine bindende Mx und der Translationsinhibitor PKR. Weitere Beispiele antiviraler Proteine sind die Genprodukte der ISG-15, -20, -56 sowie IFN-induzierbare miRNAs (Knipe et al. 2007; Doerr und Gerlich 2010). Abgesehen von diesen Wirkungen können Interferone zu einer Proliferations- bzw. Wachstumshemmung der Zielzelle sowie Veränderungen im Apoptoseverhalten führen (Stark et al. 1998). Zusätzlich wird der oben besprochene Transkriptionsfaktor IRF-7 vermehrt erzeugt, was eine positive Rückkopplung auf die Interferonbildung zur Folge hat (Basler und Garcia-Sastre 2002; Doerr und Gerlich 2010).

1.2.1.4 Virale Interferonantagonisten

Viele Viren schützen sich durch die Produktion viraler Interferonantagonisten zu einem gewissen Maße vor dem Immunsystem des Wirtes. Interferonantagonisten sind meist

virale Nichtstrukturproteine, welche die IFN-Produktion, IFN-Wirkung und/oder die antivirale Aktivität der IFN-induzierten Proteine hemmen. Manche Viren verfügen sogar über mehrere Interferonantagonisten, die an verschiedenen Punkten angreifen. Interferonantagonisten werden in der frühen Infektionsphase exprimiert (Doerr und Gerlich 2010). Unter den Interferonantagonisten gibt es Typen, die ganz gezielt einzelne Signal- oder Effektorproteine ausschalten. Andere hingegen verursachen globalere Wirkungen bis hin zu einem generellen Proteinsynthese-*shut-off* der Wirtszelle, um ihren Fortbestand zu sichern (Weber et al. 2004). Beispiele für Interferonantagonisten sind das NSs-Protein des Rift Valley Fever Virus (RVFV), das NS1 des Influenza-A-Virus sowie das E6-Protein des humanen Papillomavirus Typ 16 (Doerr und Gerlich 2010). Das NS3-4A-Protein des Hepatitis-C-Virus dient ebenfalls als Interferonantagonist. Es inaktiviert das Signalprotein „Cardif“ (Meylan et al. 2005). Rotaviren und Reoviren der Subfamilie Spinareovirinae konnten mit einer Inhibition der Proteinkinase R (*PKR*) in Verbindung gebracht werden (vgl. Virenstammbaum: Abb. 1, S. 3). Die PKR ist an der Etablierung eines antiviralen Zellstatus beteiligt (siehe Abb. 5, S. 11). Deweiteren konnte gezeigt werden, dass das NSP1-Proteins der Rotaviren durch direkte Bindung an IRF-3, diesen interferonregulierenden Transkriptionsfaktor inaktiviert (Graff et al. 2002; Weber et al. 2004). Weitere Ziele viraler Interferonantagonisten sind etwa die zellulären *pathogen recognition receptors* (PRRs) RIG-I oder MDA-5 sowie weiter stromabwärts liegende Signalübermittler (vgl. 1.2.1.2, S. 10).

1.3 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Pathogenitätsmechanismen der humapathogenen, durch Zecken-übertragenen Orbiviren Tribec- und Kemerovovirus besser zu verstehen. Einerseits soll das Ausmaß der TypI-Interferon-Inhibition charakterisiert und auf Proteinebene gezielt untersucht werden. Auf der anderen Seite soll der durch diese Viren vermittelte zytopathische Effekt beleuchtet werden. Dabei soll auch ermittelt werden, welche Rolle die gezielte Einleitung von Apoptosevorgängen spielt.

2 Material und Methoden

2.1 Grundsätzliche Hinweise, Standardmaterialien

Das Arbeiten mit allen Zellen, Medien, Viren, Plasmiden, Primern, Nukleinsäuren, Enzymen und anderen Chemikalien erfolgt, sofern nicht anders angegeben, unter den dafür vorgesehenen und in den Materialliste angegebenen Sterilbänken, sowie im Hinblick auf PCR-Arbeiten unter dafür vorgesehenen PCR-Arbeitsplätzen. Alle Materialien werden nach Herstellerangaben gelagert. Die verwendeten Virusüberstände werden in Gefrierschränken bei -140°C gelagert, isolierte Nukleinsäuren bei -80°C , oder kurzfristig bei -20°C . Primer, Enzyme und Puffer für die PCR werden bei -20°C gelagert, aufgereinigte Plasmide im Kühlschrank bei 4°C . Folgende Materialien sind als Standardmaterialien anzusehen und werden in den einzelnen Materialtabellen im Methodenabschnitt als diese aufgeführt:

Material	Hersteller
„Standardgeräte“:	
Kühlschrank (4°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Gefriertruhe (-140°C)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sterilbank	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
CO₂-Inkubator	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Vortex	Grant Instruments Ltd., Shepreth, Cambridgeshire, England
Pipetus (elektrische Pipettierhilfe)	Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co KG, Eberstadt, Deutschland
Pipetten „Reference“ (0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

„Standardverbrauchsmaterial“:

Latexhandschuhe	Microflex Corporation, Wien, Österreich
Safe-Lock-Tubes (1,5ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter (0,1-10 µl, 1-100 µl, 1-200 µl, 101-1000 µl)	Starlab GmbH, Ahrensberg, Deutschland
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Vernichtungsbeutel (300mm x 200mm)	Lab Logistic Group GmbH, Meckenheim, Deutschland
Falcon-Röhren (15ml, 50ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

2.2 Zellbiologische Methoden**2.2.1 Kultivierung der Zelllinien Vero E6, Vero B4 und HEK293**

Material	Hersteller
<u>Zelllinien:</u>	
Vero B4 (Subklon der Vero-Nierenzelllinie aus der afrikanischen grünen Meerkatze <i>Cercopithecus aethiops</i> , interferondefiziente Zellen, die durch IFN α / β -Rezeptorbesatz jedoch sensitiv gegenüber exogenem Interferon sind. (Desmyter et al. 1968; Mosca und Pitha 1986))	DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland
Vero E6 (Subklon der Vero-Nierenzelllinie aus der afrikanischen grünen Meerkatze <i>Cercopithecus aethiops</i> , interferondefiziente Zellen, die durch IFN α / β -Rezeptorbesatz jedoch sensitiv	ATCC, Manassas, USA

gegenüber exogenem Interferon sind. (Desmyter et al. 1968; Mosca und Pitha 1986))	
HEK 293 (Menschliche embryonale Nierenzellen mit funktionellem TypI IFN-System, niedrige Passage. (Graham et al. 1977))	Microbix Biosystems Inc., Toronto, Kanada
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon Instruments Europe B.V., Amstelveen, Niederlande
Wärmebad	Köttermann GmbH&Co KG, Uetze/Hänigsen
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
Zellkulturflaschen (75cm²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<u>Kulturmedien:</u>	
DMEM (500ml)	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
DMEM (500ml) in gebrauchsfertigem Zustand, wird nur in dieser Weise verwendet.	Angreichert mit 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 50ml FKS (fötale Kälberserum), 526,6 mg/l Glutamin; Pen/Strep, Glu: Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz, FKS: PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
<u>Weitere Chemikalien:</u>	
PBS	c.c. pro GmbH, Oberdorla, Deutschland
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Um die in 75cm²-Flaschen kultivierten oben genannten Zelllinien über längere Zeit passagieren zu können, werden die adhärent wachsenden Zellen zweimal wöchentlich durch Trypsinierung vom Flaschenboden gelöst und in etwas mehr als einer Zehntel-Verdünnung mit frischem Nährmedium neu ausgesät. Dazu werden zunächst die Medien

und PBS im 37°C temperierten Wasserbad für etwa 10 Minuten vorgewärmt. Nach Feststellung ausreichender Konfluenz der adhären wachsenden Zellen, wird das verbrauchte Medium abgenommen, der Zellrasen mit 5ml PBS gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt. Um die enzymatische Wirkung des Trypsins zu verbessern, werden die Vero-Zelllinien für fünf Minuten bei 37°C/5%CO₂ inkubiert, während die HEK293-Zellen über dieselbe Zeit bei Raumtemperatur belassen werden. Anschließend werden noch anhaftende Zellen durch leichtes Anschlagen der Flaschen an der Tischkante abgelöst. Sodann erfolgt die Zugabe von 4 ml Kulturmedium. Das komplette Volumen wird daraufhin mit der Pipette mehrmals aufgesaugt und abgelassen, um einer etwaigen Verklumpung von Zellen entgegenzuwirken. Währenddessen bewirken die Proteine des im Kulturmedium enthaltenen fötalen Kälberserums (FKS) eine Inaktivierung des Trypsins. Ein Zehntel dieses Trypsinats wird in eine neue Flasche umgefüllt, der Rest wird verworfen oder für Versuche verwendet. Die neue Kulturflasche wird außerdem mit 11,5 ml Kulturmedium aufgefüllt und die somit verdünnte Zellsuspension zum erneuten Anwachsen wieder in den Inkubator bei 37°C/5%CO₂ gestellt. Nach etwa drei bis fünf Tagen ist eine ausreichende Zellvermehrung erreicht, sodass man nach obigem Schema erneut passagieren kann.

2.2.2 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon Instruments Europe B.V., Amstelveen, Niederlande
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
Neubauer-Zählkammer	Hycor Biomedical Inc., Garden Grove, USA
<u>Chemikalien:</u>	
Trypanblau	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Um die Zellzahl des Trypsinats einer Zellpassage pro Milliliter bestimmen zu können, werden in einem Safe-Lock-Gefäß 10µl des aufgeschüttelten Trypsinats aus Abschnitt 2.2.1 (S. 15 ff.) mit 90µl Trypanblau versetzt und mit dem Vortex gemischt. Es werden

dann 10µl dieser Suspension in die Zählkammer pipettiert und nach kurzer Zeit am Mikroskop ausgezählt. Vitale Zellen schließen den Farbstoff aus und erscheinen hell. Stark blau angefärbte Zellen werden als nicht-vital angesehen und deshalb nicht mitgezählt. Stark blau angefärbte Zellen werden nicht mitgezählt. Desweiteren werden Zellklumpen nur als einzelne Zelle gewertet. Der Mittelwert dreier ausgezählter Gruppenquadrate wird mit 10^5 multipliziert, um die Zellkonzentration pro Milliliter zu erhalten.

2.2.3 Zellaussaat in Kavitätenplatten

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
Inkubator	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Wärmebad	Köttermann GmbH&Co KG, Uetze/Hänigsen
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
Kavitätenplatten (6, 12, 24, 96 Kavitäten)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
<u>Kulturmedien und Zelllinien:</u>	
Wie in 2.2.1.	

Für viele Versuche werden zunächst Zellen in Kavitätenplatten angezüchtet, die dann später mit Viren infiziert oder Plasmiden transfiziert werden. Dazu wird die für die jeweilige Kavitätenplatte gewünschte Gesamtzellmenge aus der Trypsinatkonzentration berechnet (vgl. 2.2.2, S. 17 ff.) und auf das Gesamtvolumen, welches die jeweilige Platte insgesamt erhalten soll, mit Medium aufgefüllt. Eine einzelne Kavität einer 96-Kavitätenplatte wird beispielsweise präferentiell mit 200 µl befüllt. Mit 96 multipliziert, ergibt dies 19,2 ml. Dementsprechend füllt man für die Aussaat einer kompletten 96-Kavitätenplatte die errechnete Trypsinatmenge mit Medium auf 19,2 ml auf und verteilt diesen Voransatz anschließend auf die einzelnen Kavitäten zu je 200 µl. Äquivalent verfährt man mit anderen Kavitätenplatten. Für die 6er-Kavitätenplatten werden 2 ml Volumen pro Kavität eingesetzt, für die 12er-Platten jeweils 1 ml. Sinnvollerweise addiert man zu den erforderlichen Trypsinat- und Mediumvolumina fünf bis zehn Prozent, sodass

die Menge des Voransatzes etwas mehr als das erforderliche Gesamtvolumen aufweist. Dies erleichtert das Pipettieren. Anschließend werden die Platten zur Zellanzucht bei 37°C/5%CO₂ in den Inkubator gestellt. In den meisten Versuchen dieser Arbeit wird die Zellkonzentration für die Aussaat so gewählt, dass die Zellen nach 24 Stunden auf dem Kavitätenboden gut angewachsen sind und eine ausreichende Konfluenz erreicht haben.

2.3 Virologische Methoden

2.3.1 Virusanzucht auf Zellkulturen

Material	Hersteller
<u>Zelllinie:</u>	
Vero B4 (s. 2.2.1)	DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland
<u>Geräte:</u>	
	Standardgeräte (s. 2.1)
Mikroskop	Nikon Instruments Europe B.V., Amstelveen, Niederlande
Wärmebad	Köttermann GmbH&Co KG, Uetze/Hänigsen
Zentrifuge	Thermo Scientific, Waltham, USA
<u>Medien und Chemikalien:</u>	
MEM (500ml)	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
MEM gebrauchsfertig	MEM (500 ml) angereichert mit 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000U/ml; Endkonzentration 100U/ml Penicillin und 100U/ml Streptomycin), 10ml FKS (=fötales Kälberserum, 100-prozentig; Endkonz. 2%), 5 ml Glutamin-Lösung (200mM; Endkonz. 2mM), 10 ml Hepes (pH 7,2, 1M; Endkonz. 20mM)
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	
75cm ² Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Mikro-Schraubröhrchen (2ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
<u>Viren:</u>	
Kemerovo-Virus (KEMV)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr
Tribec-Virus (TRBV)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr
Rift Valley Fever Virus (RVFV) Clone 13	Laborbestand der Abt. Virologie der Universitätsmedizin Göttingen, apathogenes RVFV-Isolat mit Deletion im NSs-Gen (Muller et al. 1995)

Zur Vermehrung von TRBV- und KEMV werden $1,2 \cdot 10^6$ Vero B4-Zellen in eine 75 cm² große Zellkulturflasche ausgesät und bei 37°C/5%CO₂ für 24 Stunden im Inkubator angezüchtet. Währenddessen kann das Infektionsmedium angesetzt werden. Dafür werden 500 ml MEM mit FKS, Penicillin/Streptomycin-Lösung, Glutamin-Lösung und Hepes nach den Angaben in obiger Tabelle versetzt. Der ausreichend konfluente Zellrasen wird daraufhin vom Medium befreit, mit 5 ml vorgewärmtem PBS gewaschen und anschließend mit 1ml Virusüberstand bedeckt. Nach einer Stunde bei 37°C/5%CO₂ werden 11 ml des oben beschriebenen Infektionsmediums hinzugefügt und die Flasche etwa drei bis fünf Tage unter selbigen Bedingungen inkubiert, bis etwa 80 Prozent der Zellen einen mikroskopisch erkennbaren zytopathischen Effekt (CPE) zeigen. Sodann wird der komplette virushaltige Medienüberstand abgenommen und in 1,5ml-Schraubdeckelröhrchen fünf Minuten lang mit 3000 x g zum Abtrennen von Zellrückständen zentrifugiert. Der so gewonnene Virusüberstand wird nun in Mikro-Schraubröhrchen umpipettiert und bei -140°C zur Lagerung eingefroren, oder direkt für Infektionsversuche weiterverwendet.

2.3.2 Virus-Titerbestimmung mittels TCID₅₀-Test (Ausverdünnung)

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	
Mikroskop Eclipse TS 100	Standardgeräte (s. 2.1) Nikon Instruments Europe B.V., Amstelveen, Niederlande
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	
Kavitätenplatte, 96 Kavitäten	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1) Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Mehrkanalpipette 50-200µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<u>Zelllinien:</u>	
Vero B4 (s. 2.2.1)	DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland
Vero E6 (s. 2.2.1)	ATCC, Manassas, USA
<u>Viren:</u>	
Kemerovo-Virus (KEMV)	wie in 2.3.1.
Tribec-Virus (TRBV)	wie in 2.3.1.
Rift Valley Fever Virus (RVFV) Clone 13	wie in 2.3.1.

Um eine quantitative Aussage über die Menge infektiöser Viruspartikel in den verwendeten Virusüberständen machen zu können, wird in der vorliegenden Arbeit die Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀) genutzt. Dazu wird von der zu testenden Virussuspension eine Verdünnungsreihe angefertigt, mit der Zellen in einer 96-Kavitätenplatte infiziert werden. Prinzipiell ist die TCID₅₀ die Verdünnungsstufe, bei der die Zellen von 50% der inokulierten Kavitäten durch einen zytopathischen Effekt (CPE) abgetötet wurden, und die anderen 50% der Kavitäten noch vitale Zellen enthalten (s. Abb. 6, S. 22; Beispiel A).

Für die Titerbestimmungen von KEMV und TRBV werden VeroB4- und für die RVFV-Clone13-Titerbestimmung Vero E6-Zellen ausgesät. In jede Kavität werden 10⁴ Zellen in 180µl DMEM ausgesät. Auf diese Weise werden für jede Titerbestimmung vier Zwölferreihen einer 96-Kavitätenplatte belegt, sprich 48 Kavitäten. Nach 24 stündigem Anwachsen bei 37°C/5%CO₂ kann die Infektion erfolgen. Es werden von jedem zu

testenden Virusüberstand Zehnerverdünnungsstufen von 1, sprich unverdünnt, bis 10^{-10} angefertigt. Damit erhält man also insgesamt elf Konzentrationsstufen. 20 μl einer Verdünnungsstufe werden in jede Kavität einer Spalte als Vierfachansatz einpipettiert (siehe Abb. 6, S. 22). Dabei wird die Virussuspension durch leichtes Auf- und Abziehen in der Kavität gemischt, ohne den zellbewachsenen Boden mit der Pipettenspitze zu berühren. Aufgrund der anfangs vorgelegten 180 μl Nährmedium, kommen letztendlich Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-11} zustande. Die am weitesten rechts gelegene Spalte wird lediglich mit 20 DMEM ohne Virus versetzt und stellt die Negativkontrolle („Mock“) dar. Abhängig vom eingesetzten Virus kann nach etwa drei bis sechs Tagen unter dem Mikroskop ein CPE bis in die grenzwertigen Verdünnungsstufen gesehen werden.

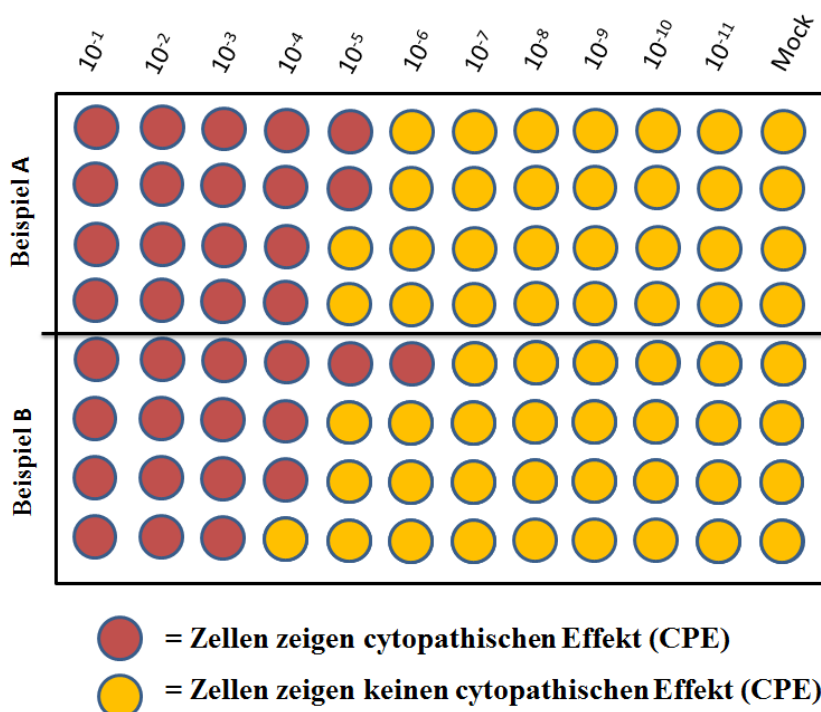


Abb. 6. 96-Kavitätenplatte, Zellen inokuliert mit dekadisch logarithmischer Verdünnungsreihe (Konzentrationen 10^{-1} - 10^{-11}) sowie ohne Virusmaterial (= „Mock“) nach Anzucht unter $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$ und Ausbildung eines CPE (nach etwa 3-6 Tagen).

Auf der oberen Hälfte der Abbildung tritt in der Hälfte der Kavitäten, die mit einer Verdünnung von 10^{-6} inokuliert wurden, ein CPE auf. Somit gilt für das Gesamtvolumen von 200 μl in den Kavitäten: $1 \text{ TCID}_{50}/200\mu\text{l} = 10^{-6}$. Der reziproke Wert davon ($1/10^{-6}$) ergibt den TCID_{50} pro 200 μl (= 1.000.000). Um den TCID_{50} pro ml auszurechnen, wird mit fünf multipliziert. Damit erhält man für das Beispiel der oberen Vierfach-Kavitätenreihe einen TCID_{50} von 5.000.000/ml (= $5 \cdot 10^6/\text{ml}$).

Auf der unteren Hälfte der Abbildung wird der Fall gezeigt, in dem nicht 50% der inokulierten Zellen einer Virusverdünnungsstufe einen CPE zeigen. In diesem Fall liegt der TCID₅₀-Wert zwischen den Zehnerverdünnungsstufen und es erfolgt eine Interpolation nach Reed & Muench (Carter und Saunders 2007).

2.3.3 Virusinfektion adhärenter Zellen

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
Inkubator	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
Kavitätenplatten (6, 12, 24, 96 Kavitäten)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
<u>Medien:</u>	
DMEM, gebrauchsfertig	wie in 2.2.1.
OptiMEM	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
<u>Zelllinien:</u>	
Vero B4 (s. 2.2.1)	DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland
Vero E6 (s. 2.2.1)	ATCC, Manassas, USA
HEK 293 (s. 2.2.1)	Microbix Biosystems Inc., Toronto, Kanada
<u>Viren:</u>	
Kemerovo-Virus (KEMV)	wie in 2.3.1.
Tribec-Virus (TRBV)	wie in 2.3.1.
Rift Valley Fever Virus (RVFV) Clone 13	wie in 2.3.1.

Nach Aussaat und Anwachsen der Zellen in der jeweils benötigten Kavitätenplatte, wird das vorhandene Medium entfernt und der Zellrasen mit Virusüberstand einer gewünschten MOI infiziert (MOI = *multiplicity of infection*; siehe unten). Um die gewünschte MOI zu erhalten, wird der Virusüberstand gegebenenfalls mit OptiMEM verdünnt.

Für die verschiedenen Infektionsexperimente werden unterschiedliche Mengen an Virusüberstand eingesetzt. Dabei gibt die sogenannte MOI (*multiplicity of infection*) das Verhältnis von infizierendem Virus zu infizierbaren Zellen an. Sie richtet sich in den durchgeführten Versuchen nach der TCID₅₀ (vgl. 2.3.2, S. 21), sowie der anfänglich ausgesäten Zellmenge. Eine MOI von 1 beschreibt dabei ein Verhältnis von 1:1. Wurde in einer Kavität zum Beispiel eine Zellmenge von 1×10^5 Zellen ausgesät und der TCID₅₀ des einzusetzenden Virusüberstandes ist 1×10^5 /ml, dann muss der Zellrasen für die oben beschriebene Infektion mit einem Milliliter Virusüberstand infiziert werden. Hat der Überstand hingegen einen TCID₅₀ von 1×10^6 /ml, so werden für die Infektion von 1×10^5 Zellen nur 100 µl benötigt. Die verwendeten Virusüberstände wiesen TCID₅₀-Einheiten zwischen 2×10^6 und $2,3 \times 10^7$ auf. Auf diese Weise wird für jeden Infektionsversuch die benötigte Menge an Virusüberstand berechnet.

Für die Vertiefungen der 6-Kavitätenplatten wird jeweils ein Endvolumen von 500 µl Virussuspension eingesetzt. In 12-Kavitätenplatten wird 250 µl Virussuspension je Vertiefung verwendet. Es folgt eine einstündige Inkubation bei 37°C/5%CO₂. Danach werden die Überstände wieder durch Pipettieren entfernt, ohne jedoch den Zellrasen zu verletzen. Anschließend wird die plattentypische Füllmenge (siehe 2.2.3, S. 18) an vorgewärmtem DMEM vorsichtig auf den Zellrasen pipettiert. Während des gesamten Vorganges dürfen die Zellen möglichst nicht ohne eine Flüssigkeitsbedeckung gehalten werden, um ein Austrocknen zu vermeiden. Anschließend wird die Kavitätenplatte für eine versuchsabhängige Dauer von acht Stunden bis zwei Tagen in den Inkubator unter 37°C/5%CO₂ gestellt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Gesamt-RNA-Isolierung aus adhärenenten Zellen

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
Inkubator	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland

Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge mit Kühlung (5417R)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
Kavitätenplatten (6 Kavitäten)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
<u>Chemikalien:</u>	
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
RNase-freies Wasser	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (75%)	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
peqGOLD TriFast	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
2-Propanol	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
<u>Zellen:</u>	
Infizierte und nichtinfizierte Zellen auf Kavitätenplatten (aus 2.2.3 bzw. 2.3.3).	

Um für Folgeversuche wie cDNA-Synthesen RNA-Material aus infizierter sowie nicht infizierter Zellanzucht zu erhalten, wird das Reagenz peqGOLD TriFast nach Anleitung des Herstellers Peqlab verwendet. Es beruht auf einer Phenol-Chloroform-Extraktion. Dabei wird die Zellkultur zur Homogenisierung mit einem Gemisch aus Guanidinisothiocyanat (GTC) und Phenol versetzt. GTC ist ein chaotropes Salz, welches effektiv Proteine denaturiert, die daraufhin mittels Phenol gelöst werden. Zudem inaktiviert GTC RNA-Abbau katalysierende RNasen. Nach Chloroformzugabe wird durch fünfminütige Zentrifugation bei 12000 x g eine Phasenauftrennung herbeigeführt. Es entsteht eine untere Phenol-Chloroform-Phase, eine mittlere Interphase, sowie eine obere wässrige Phase. In den unteren beiden Phasen reichern sich dabei DNA und Proteine an, während sich in der oberen Phase die RNA sammelt. Die RNA-haltige Phase wird abgenommen und durch Isopropanolzugabe und anschließende zehnminütige Zentrifugation bei 12000 x g präzipitiert. Das so hergestellte RNA-Pellet wird daraufhin mit 75 % Ethanol zweimal gewaschen. Gelöst wird das RNA-Pellet in RNase-freiem Wasser. Auf diese Weise wird verhindert, dass es zu einer RNase-bedingten Degradation

der isolierten RNA kommt. RNAsen kommen ubiquitär vor und sind sehr stabil. Deshalb wird bei der Durchführung des Isolierverfahrens generell an einem speziellen RNA-Arbeitsplatz gearbeitet, an dem durch sorgfältige Hygieneinhaltung, das RNAsen-Vorkommen auf ein Minimum reduziert ist. Die isolierte RNA kann direkt im Anschluss weiter verwendet werden, oder wird bei -80°C eingelagert.

2.4.2 DNase-Behandlung der RNA-Isolate

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
Heizblock (Thermomixer compact)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoDrop 1000 UV/vis-Spektralphotometer, Software ND-1000 V 3.8.1	Thermo Scientific, Waltham, USA Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
<u>Chemikalien:</u>	
RNase-freies Wasser	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
DNase Inactivation reagent	Ambion Applied Biosystems, Austin, USA
Ethanol (80-96%)	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Distilled Water DNase/RNase free	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
10 x TURBO DNase Puffer	Ambion Applied Biosystems, Austin, USA
TURBO DNase (2 U/μl)	Ambion Applied Biosystems, Austin, USA
<u>RNA-Isolat(e) aus 2.4.1</u>	

Zur Entfernung von DNA-Spuren werden die RNA-Isolate einer Behandlung mit dem Desoxyribonuklease (DNase) beinhaltenden Turbo-DNA free-Reagentiensatz von Ambion unterzogen. Die in ihrer Aminosäurestruktur veränderte Turbo DNase besitzt, im Gegensatz zur ursprünglichen Wildtyp-DNase I, eine stark erhöhte DNA-Bindungsaffinität sowie eine dreieinhalb-fach höhere katalytische Aktivität. Desweiteren ist sie verhältnismäßig unempfindlich gegenüber Salzen. Wie auch die DNase I spaltet die Turbo DNase als Endonuklease Phosphodiesterbindungen innerhalb des DNA-Stranges,

wodurch 5'-phosphatierte Oligonukleotide entstehen. Turbo DNase und zugehöriger Puffer werden den RNA-Isolaten nach Herstellerangaben zugefügt, woraufhin eine 30-minütige Inkubation im Heizblock bei 37°C folgt. Anschließend wird das beiliegende Inaktivierungsreagenz zum Stoppen der Reaktion hinzugefügt und kurz bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wird das Inaktivierungsreagenz durch Zentrifugation pelletiert, woraufhin der flüssige Überstand in ein neues Safe-Lock-Gefäß überführt wird. Im Anschluss daran erfolgt eine Kontroll-PCR ohne vorhergehende reverse Transkription (vgl. 2.4.4, S. 29 ff.) auf humanes γ -Aktin, das als Housekeeping-Gene in eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimiert wird. Es dient hier als Indikator für einen gegebenenfalls unvollständigen DNA-Verdau. Sollte also immernoch ein Signal für humanes γ -Aktin erscheinen, erfolgt eine erneute DNase-Behandlung der isolierten RNA. Andernfalls kann mit der cDNA-Synthese (s. 2.4.3, S. 27 ff.) fortgefahren werden. Zunächst wird jedoch noch eine spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung des RNA-Gehaltes der Proben durchgeführt. Diese ermöglicht den Einsatz gleicher RNA-Mengen in der folgenden cDNA-Synthese.

2.4.2.1 Spektrophotometrische DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung mit dem Nanodrop 1000:

Dazu wird das Spektralphotometer Nanodrop 1000 zunächst mit 1,5 μ l RNase-freiem Wasser geeicht, bevor es mit jeweils 1,5 μ l Probenmaterial beladen wird. Nukleinsäuren absorbieren Licht einer Wellenlänge von 260 nm mit maximaler Stärke. Das Absorptionsmaximum aromatischer Reste von Aminosäuren liegt bei 280 nm. Da die oben genannten RNA-Isolate einem DNase-Verdau unterzogen wurden, kann man in diesem Fall bei 260 nm die alleinige RNA-Konzentration bestimmen. Ein 260/280 nm-Quotient von 2,0 spricht für sehr gute Reinheit der Proben. Liegt er deutlich darunter, so kann dies beispielsweise durch Protein- oder Phenolverunreinigung, sowie falschen pH- oder zu hohen Salzkonzentrationen zustande gekommen sein.

2.4.3 cDNA-Synthese

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
PCR-Arbeitsplatz	G&P Kunststofftechnik, Kassel, Deutschland

Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermocycler TProfessional	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
Multiply-Pro PCR-Gefäße 0,2 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
<u>Chemikalien:</u>	
Random Hexamer Primer (RHP)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
RNase-freies Wasser	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
dNTP Mix (100mM)	Fermentas GmbH, Leon-Roth, Deutschland
5x First Strand Buffer	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
SuperScript III	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Reserve Transkriptase	

Reverse Transkriptasen (RT) sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen und synthetisieren ausgehend von ihrer RNA-Matrize die dazu komplementäre DNA. Sie sind das Charakteristikum der Retroviren. Je mehr RNase H-Aktivität eine reverse Transkriptase aufweist, desto limitierter ist die maximal mögliche Länge resultierender cDNA-Produkte. Retroviren nutzen die RNase H-Aktivität im Rahmen der dsDNA-Synthese. Die verwendete Superscript III Reverse Transkriptase hat praktisch keine RNase H-Aktivität und kann cDNA-Produkte bis zu einer Länge von mehr als 12 Kilobasen erzeugen. Sie entstammt ursprünglich aus einem murinen Virus (Moloney Murine Leukemia Virus = M-MLV) und wird in ihrer gentechnisch modifizierten Form mit Hilfe von *E. coli*-Bakterien hergestellt. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 50°C. Durch Verwendung von Sechser-Oligonukleotidprimern, die nach dem Zufallsprinzip zusammengesetzt sind (Random Hexamer Primer = RHP), wird die RNA vollständig in cDNA umgeschrieben, welches auch in Folge-PCRs als Matrize für Amplifikationsreaktionen eingesetzt werden kann. Um RNA-Sekundärstrukturen aufzuschmelzen, wird das Reaktionsgemisch für fünf Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend für eine Minute auf Eis abgekühlt. In einem weiteren Schritt wird die

reverse Transkriptase, Dithiothreitol (DTT) sowie First Strand Buffer hinzugefügt. Für die reverse Transkription wird nach einer fünfminütigen Primer-Annealing-Phase bei 25°C eine Stunde bei 50°C inkubiert. Die sich anschließende fünfzehnminütige Temperaturerhöhung auf 70°C inaktiviert die reverse Transkriptase. Die so entstandenen cDNA-Einzelstränge können für PCRs direkt weiterverwendet werden oder zunächst bei -20°C eingelagert werden. Die Reagentienmengen werden nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
PCR-Arbeitsplatz	G&P Kunststofftechnik, Kassel, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Heizblock (Thermomixer compact)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
Multiply-Pro PCR-Gefäße 0,2 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
<u>Chemikalien:</u>	
Taq DNA Polymerase	5 Prime GmbH, Hamburg, Deutschland
PowerScript Long DNA Polymerase	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
PfuUltraII Fusion HS DNA Polymerase	Agilent Technologies Inc./Stratagene, Santa Clara, Kalifornien, USA
dNTP Mix (100mM)	Fermentas GmbH, Leon- Roth, Deutschland
Distilled Water DNase/RNase free	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
<u>Primer:</u>	
hu_gamma-actin_for *	5'-GCCGGTCGCAATGGAAGAAGA-3'
hu_gamma-actin_rev *	5'-CATGGCCGGGGTGTGTAAGGTC-3'
hu-IFN_beta_for *	5'-GACGCCGCATTGACCATCTA-3'
hu-IFN-beta_rev *	5'-CCTTAGGATTTCCACTCTGACT-3'
KEMV-S9-ORFXa_for	5'-ATGCGGACGACCATGCATC-3'
KEMV-S9-ORFXa_rev	5'-CTACCCCGGGCGATCCAG-3'
RVF-for #	5'-TGCCACGAGTYAGAGCCA-3'

RVF-rev #	5'-GTGGGTCCGAGAGTYTGC-3'
TRBV ORFX_for *	5'-ATGCATCCGTATCTGAAGCAAG-3'
TRBV ORFX_rev *	5'-TCATAGCCTTGCGATCGTCTCC-3'
TRBV S2_for2	5'-GTAAAACCTTCCGGAAGCAATGGC...
TRBV S2_rev	5'-CTACAGCGCGTTCGAGGGTAAAG...
TRBV S3_for	5'-ATGTTCCGGATCGCACACGATAC-3'
TRBV S3_rev	5'-TTACCCGGGCCCGTCATAAC-3'

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung selbst geringster Mengen von DNA-Ausgangsmaterial *in vitro*. Ihr Prinzip beruht auf der Amplifikation einer Matrizen-DNA durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase. Die hier vornehmlich verwendete Taq-Polymerase stammt ursprünglich aus dem grampositiven hitzestabilen Archaeobakterium *Thermus aquaticus*, das in heißen Quellen und Geysiren vorkommt. Zur gentechnischen Herstellung wird das Bakterium *E. coli* benutzt. Mit Ausnahme der Klonierungen (vgl. 2.4.7, S. 35 ff.) wird für die durchgeführten Versuche diese hinreichend genaue Polymerase verwendet. Für die Klonierungen wird mit der Pfu-Polymerase eine andere DNA-abhängige, noch thermostabilere DNA-Polymerase verwendet. Sie wurde ursprünglich aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus* isoliert. Zur Anwendung kommt die PfuUltraII Fusion HS DNA Polymerase von Stratagene samt beiliegendem Reaktionspuffer nach Herstellerangaben. Ihre 3'-5'-Exonukleaseaktivität ermöglicht dieser Polymerase eine Korrekturlesefunktion („Proof Reading“), welche die Menge an Synthesefehlern deutlich reduziert und im Ergebnis zu exakteren DNA-Kopien führt. Desweiteren bindet Sie aufgrund der Fusion mit einem DNA-Bindeprotein sehr effizient an ihre Matrize. Sie produziert im Gegensatz zur Taq-Polymerase jedoch keinen matrizenunabhängigen Desoxyadenosin-Überhang am 3'-Ende, sondern erzeugt glatt endende DNA-Kopien, was etwa für darauffolgende TA-Klonierungen berücksichtigt werden muss (s. 2.4.7, 35 ff.). Außerdem weisen Pfu-Polymerasen meist eine langsamere Synthesegeschwindigkeit auf, weshalb sie längere Elongationszeiten im PCR-Schema erfordern.

Im Thermocycler wird ein für den jeweiligen Versuch geeignetes PCR-Programm erstellt. Dieses besitzt je nach Anforderungen etwa 20-35 Zyklen, in denen es zu einem

exponentiellen Anstieg der Menge der ursprünglichen DNA-Matrize (Template) kommt. Die Aufschmelzung doppelsträngiger DNA erfolgt dabei zunächst in einem Denaturierungsschritt, bei dem es nach Erhitzung auf etwa 95°C zu einem Lösen der vorhandenen Wasserstoffbrückenbindungen kommt. Die darauffolgende Abkühlung auf Temperaturen im Bereich von 45-65°C dient der Anlagerung eines artifiziell erzeugten spezifischen Oligonukleotid-Primerpaars, das den zu amplifizierenden Bereich vorgibt. Man spricht in diesem Zusammenhang von „Annealing“ unter Ausbildung eines Template-Primer-Hybrids (Hybridisierung). Der optimale Temperaturbereich hängt von der Nukleinsäurestruktur der jeweilig eingesetzten Primer ab. Je höher die Temperatur gewählt wird, desto spezifischer ist die Hybridisierung und folglich auch die erzeugten PCR-Produkte. Jedoch erfolgt eine geringere Primerbindung, je höher die Temperatur ist, was die Ausbeute dementsprechend einschränkt. Zur Elongation des entstehenden DNA-Stranges wird die Temperatur auf das enzymatische Temperaturoptimum der Polymerase eingestellt, welches im Falle der Taq-Polymerase bei etwa 72°C liegt. Vom Primer ausgehend erzeugt die Polymerase in 3'-Richtung den zum Matrizenstrang komplementären DNA-Strang. Dabei ist im Hinblick auf die Anzahl zu durchlaufender PCR-Zyklen zu beachten, dass mit jedem weiteren Zyklus die Rate an fehlerhaften DNA-Kopien ansteigt. Eine Variante der klassischen PCR ist die sogenannte „Touchdown-PCR“, eine einfache Möglichkeit größere Mengen sehr spezifischer DNA-Kopien zu erzeugen. Dabei wird mit einer sehr hohen, knapp unter dem Primerschmelzpunkt liegenden Annealingtemperatur begonnen, um zunächst wenige, aber fehlerfreie PCR-Produkte zu erzeugen. Im weiteren Verlauf wird die Annealingtemperatur pro PCR-Zyklus kontinuierlich abgesenkt, um eine starke Vervielfältigung der spezifischen Produkte der ersten Zyklen zu erhalten. Sofern in den einzelnen Kapiteln nicht anders beschrieben, wird in dieser Arbeit standardmäßig die Taq-Polymerase von 5Prime mit zugehörigem magnesiumionenhaltigen Puffergemisch nach Herstellerprotokoll, sowie die folgenden PCR-StandardEinstellungen im Thermocycler benutzt:

initiale Denaturierung:	95°C	2 min	
Denaturierung:	95°C	30 sek	} 35 Zyklen
Hybridisierung der Primer:	56°C	30 sek	
Elongation:	72°C	1 min	
abschließende Elongation:	72°C	5 min	
Kühlhaltephase:	8°C	Lagerung im Gerät bis zur Entnahme der Proben	

Um eine zu starke Verdunstung des Reaktionsgefäßinhalts zu vermeiden, ist während des PCR-Vorganges die Deckelheizung des Thermocyclers auf 95°C eingestellt. Nach Ablauf der PCR werden die Proben direkt weiterverwendet oder vorübergehend bei -20°C gelagert.

2.4.5 Agarosegel-Elektrophorese

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
Präzisionswaage	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Mikrowelle	LG Electronics Inc., Seoul, Südkorea
Chemidoc XRS, Software: Quantity One	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gelelektrophoresekammer Horizon 11'14	Life Technologies Inc., Carlsbad, USA
Elektrophoresegel-Gusssystem Horizon 11'14	Life Technologies Inc., Carlsbad, USA
Elektrophoresis Power Supply EPS 301	GE Healthcare Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
<u>Chemikalien:</u>	
PeqGOLD Universal Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

TAE Elektrophoresepuffer (50 fach konz.)	242g TRIS, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5M EDTA (pH=8,0)
TAE Elektrophoresepuffer (1 fach konz.)	40ml TAE-Puffer (50-fach konz.) + 1960 ml H ₂ O
Tris	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
6xOrange Loading Dye (Probenpuffer)	Fermentas GmbH, Leon-Roth, Deutschland
DNA-Längenstandards (1kbp, 100bp)	Fermentas GmbH, Leon-Roth, Deutschland

Um die in der PCR entstandenen DNA-Fragmente der Länge nach aufzutrennen und ein charakteristisches Abbild, in Form sichtbarer DNA-Banden, zu erhalten, wird die Agarosegel-Elektrophorese genutzt. Dazu wird in Abhängigkeit der erwarteten Fragmentgröße ein 0,8- bis 2,0-prozentiges Agarosegel hergestellt, das mit den DNA-Proben beladen wird. Über die Gelkonzentration variiert man die Porengröße, um mit höherem Agarosegehalt auch relativ kleine DNA-Fragmente voneinander trennen zu können. Die negativ geladenen, polymorphen Nukleinsäuren werden während der Elektrophorese durch das elektrische Gleichstromfeld vom Laufpuffer in Richtung Anode getragen. Entsprechend ihrer Länge und Ladungseigenschaft werden sie dabei sukzessive aufgetrennt. Für den Gelansatz wird die erforderliche Menge Agarosepulver mit einfach konzentriertem Tris-Acetat-EDTA-Puffer (1xTAE) auf 100 Milliliter aufgefüllt, und durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Im Anschluss werden dem flüssigen Gel 5 µl Ethidiumbromidlösung (resultierende Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugesetzt, welches während der Elektrophorese mit den DNA-Molekülen interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Mit Hilfe eines Gelschlittens und eines Kammes zur Ausformung der Probenaschen, wird ein Gel gegossen, welches nach Aushärtung in die Elektrophoresekammer überführt wird. Die Elektrophoresekammer wird bis zur kompletten Überdeckung des Gels mit einfach konzentriertem TAE-Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Im Folgenden werden die aufzutrennenden Proben in die Geltaschen einpipetiert, nachdem sie zu einem Sechstel des Endvolumens mit dem Ladepuffer

6xOrange von Fermentas versetzt worden sind. Dieser sorgt für eine Dichteerhöhung der Lösung und ermöglicht dadurch ein besseres Pipettieren. Desweiteren enthält er zwei Farbstoffe (Xylencyanol und Orange G), welche während der Elektrophorese mit distinkten DNA-Fragmentlängen im Gel komigrieren und somit eine Aussage über den Fortschritt des Gellaufs ermöglichen. Als Referenz dienende 1kbp und 100bp-Längenstandards werden ebenfalls zu je 1,5 µl in jeweils eine Tasche einpipettiert. Unter Anlegen einer Gleichstromspannung von 80-120 Volt für etwa 45 Minuten, trennen sich die in den Proben enthaltenen DNA-Fragmente voneinander. Laufzeit und Spannung werden der Fragmentgröße sowie der agarosekonzentrationsbedingten Porengröße angepasst. Bei zu hohen Spannungen kann es durch Wärmeentwicklung zu Qualitätseinbußen kommen. Daher werden an höher agarosekonzentrierte Gele niedrigere Spannungen angelegt. Für präparative Gele, aus denen später DNA-Fragmente extrahiert werden sollen, werden einprozentige Gele unter einer Spannung von lediglich 80 Volt verwendet. Außerdem werden die Taschen dieser Gele größer modelliert und mit einer DNA-Menge von 50 µl PCR-Produkt befüllt. Nach dem Gellauf wird das Gel im Bioimager (Chemidoc XRS) unter UV-Beleuchtung fotografiert. Aus präparativen Agarosegelen werden die benötigten DNA-Banden dann ausgeschnitten und in Reaktionsgefäße überführt. Für anschließende Klonierungen folgt eine DNA-Gelextraktion (s. 2.4.6, S. 34 ff.).

2.4.6 DNA-Extraktion aus präparativen, TAE-gepufferten

Agarosegelen

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Chemidoc XRS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Präzisionswaage	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Heizblock (Thermomixer compact)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoDrop 1000 UV/vis-Spektralphotometer, Software ND-1000 V 3.8.1	Thermo Scientific, Waltham, USA Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
<u>Chemikalien:</u>	
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research Corporation, Irvine, USA
Distilled Water DNase/RNase free	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA

Mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit von Zymo Research ist eine schnelle Isolation der gewünschten DNA-Fragmente aus Agarosegelen möglich (vgl. 2.4.5, S. 32 ff.). Die gewünschte DNA-Bande wird dafür unter UV-Beleuchtung am Chemidoc XRS mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Agarose-Löse-Puffer des Reagenziensatzes versetzt. Mit Hilfe des darin enthaltenen chaotropen Natriumiodids kann die Agarose bei 55°C aufgelöst werden, und die in der Lösung enthaltene DNA kann in der silicabasierten Zentrifugensäule (Zymo-Spin I) binden. Dies geschieht durch hydrophobe Wechselwirkungen unter einminütiger Zentrifugation bei 12000 xg. Die immobilisierte DNA kann daraufhin durch Wasser von der Zentrifugationssäule eluiert werden. Dies erfolgt nach zwei Waschschritten mit dem Waschpuffer des Reagensatzes, sowie einminütigem Trockenzentrifugieren bei 12000 x g. Eluiert wird mit 50 µl ddH₂O bei 12000 x g. Zuletzt erfolgt die spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration am Nanodrop 1000 (siehe 2.4.2, S. 26 ff.).

2.4.7 Herstellung rekombinanter pCRII-Plasmidvektoren mittels TA-Klonierung

Material	Zusätzliche Bemerkung	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)	
Heizblock (Thermomixer compact)		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Bakterienbrutschrank (37°C)		Heraeus Instruments GmbH, Hannover, Deutschland
Certomat Inkubationsschüttler		Satorius AG, Göttingen, Deutschland
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (siehe 2.1, S. 14)	

Chemikalien:

TA Cloning Kit (with pCRII vector) with One Shot INVaF' Chemically Competent <i>E. coli</i>	(Genotyp One Shot INVaF': F' endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 λ -)	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA
LB-Medium mit Ampicillin (LB-Amp-Medium)	10g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefeextrakt, 10g NaCl, 1ml Ampicillin [100 μ g/ml], mit ddH ₂ O auf 1 l Volumen gebracht; zwanzigminütiges Autoklavieren (120°C), Ampicillinzugabe jedoch erst nach dem Autoklavieren und Abkühlung auf <50°C.	Ampicillin: Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland, sonstige Bestandteile: BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
LB-Agar mit Ampicillin (LB-Amp-Agar)	10g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefeextrakt, 10g NaCl, 1ml Ampicillin [100 μ g/ml], 15g Bacto-Agar, mit ddH ₂ O auf 1 l Volumen gebracht; Zwanzigminütiges Autoklavieren (120°C), Ampicillinzugabe jedoch erst nach dem Autoklavieren und Abkühlung auf <50°C.	Ampicillin: Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland, sonstige Bestandteile: BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
X-Gal (40mg/ml)		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PfuUltraII Fusion HS DNA Polymerase		Agilent Technologies Inc./Stratagene, Santa Clara, Kalifornien, USA
PowerScript Long DNA Polymerase		PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Taq DNA Polymerase		5 Prime GmbH, Hamburg, Deutschland

Unter Verwendung des Dual Promoter TA Cloning Kit von Invitrogen wird eine TA-Klonierung einzelner DNA-Fragmente in den sogenannten pCRII-Plasmidvektor durchgeführt. Die TA-Klonierung ist ein Verfahren, bei dem mittels Taq-Polymerase produzierte PCR-Amplifikate, unter Verwendung ihrer 3'-Desoxyadenosin-Überhänge

(vgl. 2.4.4, S. 29 ff.) in einen linearisierten Plasmidvektor mit komplementären Desoxythymidinüberhängen ligiert werden. In diesem Fall werden pCRII-Vektor (s. Abb. 7, S. 38) und T4-Phagen-DNA-Ligase des oben genannten Reagentiensatzes verwendet. Um eine Degradation der für die TA-Klonierung benötigten Nukleotidüberhänge zu vermeiden, werden die zu klonierenden DNA-Amplifikate direkt nach PCR-Ablauf weiterverarbeitet. Verwendet werden die PCR-amplifizierte Tribec-Virussegment-2- und -3-cDNA. Im Falle von Amplifikaten mit glatten Enden, die durch korrekturlesende Polymerasen wie der PfuUltraII Fusion HS hergestellt wurden (vgl. 2.4.4, S. 29 ff.), ist für eine TA-Klonierung die Ligation erst nach Anfügen von 3'-Desoxyadenosinüberhängen (3'-A-Überhängen) möglich (sogenanntes „A-Tailing“). Dazu werden die PCR-Ansätze nach der eigentlichen Amplifikationsreaktion, unter Zugabe von je einem Unit Taq-Polymerase, fünfzehn Minuten bei 72°C inkubiert. Für die Erzeugung der Inserts wird in dieser Arbeit ausschließlich auf korrekturlesende DNA-Polymerasen zurückgegriffen. Jedoch ist, im Gegensatz zur Pfu-Polymerase, bei der ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten PowerScript Long DNA-Polymerase von PAN kein A-Tailing nötig. Der Grund liegt darin, dass sie ein DNA-Polymerasengemisch darstellt und nicht nur Korrektur lesen, sondern auch 3'-A-Überhänge produzieren kann. Der Ligation folgt das Einbringen der rekombinanten Plasmidvektoren in den kompetenten *E. coli*-Stamm INVaF^c (Transformation), der Bestandteil des verwendeten Reagentiensatzes ist. In diesem erfolgt die Vermehrung des rekombinanten Plasmids. Da auf dem 4 kb großen pCRII-Vektor (s. Abb. 7, S. 38) ein Ampicillin-Resistenzgen vorliegt, ist eine Selektion der Transformanten auf LB-Ampicillin-Agar Nährböden möglich. Desweiteren wird eine Blau-weiß-Selektion durchgeführt, um die korrekt transformierten Bakterienkolonien identifizieren zu können. Dazu müssen die Agarplatten vor Ausstreichen der transformierten Bakterien mit dem chromogenen β -Galaktosidasesubstrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) versetzt werden. Der Plasmidvektor kodiert für das N-terminale Fragment des Enzyms β -Galaktosidase, in welches die Polylinkerregion (Multiple Cloning Site (MCS)) des Vektors eingebettet ist. Der verwendete *E. coli*-Stamm besitzt das komplementäre carboxyterminale Genfragment innerhalb seines Genoms. Durch Transkomplementation beider Genprodukte produzieren die Kolonien, in welche keine inserttragenden Plasmide transformiert wurden, funktionsfähige β -Galaktosidase. Dadurch kommt es zur Umsetzung des X-Gals zu Galaktose und einer Farbstoffvorstufe,

welche sich unter Luftsauerstoffeinwirkung blau färbt. Die betreffenden Bakterienkolonien erscheinen dadurch ebenfalls blau. Im Gegensatz dazu bleiben Kolonien, die mit insertragenden Vektoren transformiert wurden, aufgrund der Unterbrechung der N-terminalen β -Galaktosidasesequenz weiß. Daher werden weiße Kolonien für die folgende Minipräparation von DNA-Plasmiden weiterverwendet.

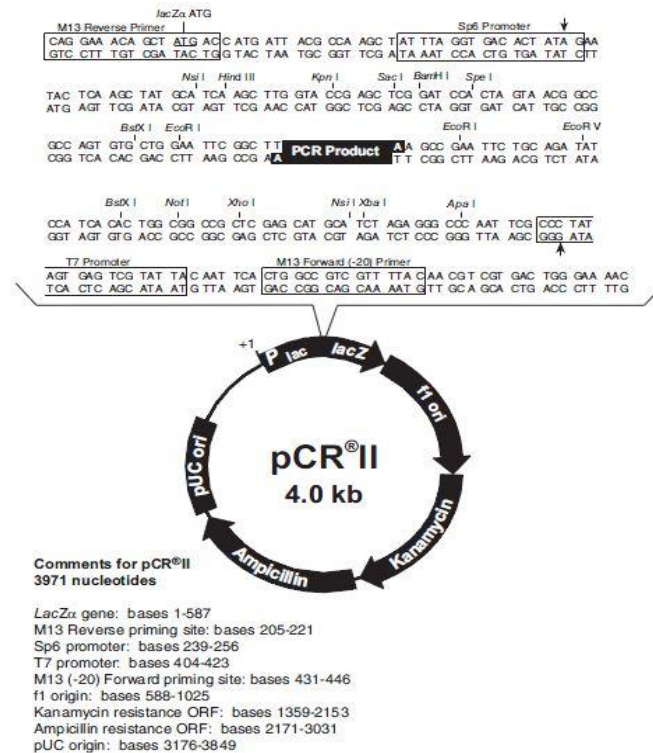


Abb. 7. Karte des pCRII-Klonierungsvektors (aus Manual TA Cloning Kit, Invitrogen).

Schematischer Ablauf:

Nach Extraktion der aus Virus-cDNA PCR-amplifizierten Virussegmente aus dem Agarosegel (s. 2.4.4, S. 29 ff. und 2.4.6, S. 34 ff.) wird der Ligationsansatz nach Herstellerangaben pipettiert. Dazu wird ein Vektor-Insert-Verhältnis von 1:1 benutzt. Außerdem werden Ligationspuffer, T4 DNA-Ligase und steriles Wasser hinzugefügt und über Nacht (bzw. > 4 Stunden) bei 14°C im Heizblock inkubiert. Danach wird das entstandene Konstrukt in den bereits kompetenten *E. coli*-Stamm INVaF^c transformiert. Die bei -80°C lagernden Bakterien werden dazu zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend je Probe mit 2 μ l Ligationsansatz versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis erfolgt ein dreißig-sekündiger Hitzeschock bei 42°C im Heizblock, wodurch vermehrt Plasmide in die kompetenten *E. coli*-Bakterien eindringen können. Den Bakterien werden

250 µl des nährstoffreichen S.O.C.-Mediums hinzugefügt, und sie werden einstündig im 37°C warmen Heizblock unter Schütteln inkubiert. Währenddessen wird für jeden Ansatz eine LB-Ampicillin-Agarplatte steril mit 40 µl X-Gal (40mg/ml) bestrichen. Sodann wird die fertig inkubierte Bakteriensuspensionen mit einem sterilen Spatel auf den Agarplatten verteilt und über Nacht bei 37°C bebrütet. Anschließend werden mehrere weiß gefärbte Einzelkolonien jeweils mit einer Pipettenspitze vorsichtig abgenommen, auf weitere Ampicillin-Agarplatten überimpft (siehe unten), und dann samt Pipettenspitze in ein 15 ml-Schraubdeckelröhrchen überführt, das zuvor mit 5 ml LB-Ampicillin-Medium befüllt worden ist. Daraufhin werden die Röhrchen über Nacht im 37°C warmen Schüttelinkubator bebrütet, um die Bakterien zu vermehren. Auf diese Weise werden etwa zehn verschiedene Bakterienklone angezüchtet. Es folgt die unter 2.4.8 (S. 39 ff.) beschriebene Isolation der ebenfalls vermehrten Plasmide aus den Bakterien, und dann ein restriktionsenzymatischer Kontrollverdau (siehe 2.4.9, S. 40 ff.). Wie oben bereits erwähnt, werden die ausgestochenen Einzelkolonien auf eine neue Ampicillin-Agarplatte überimpft, bevor die bakterienbehafteten Pipettenspitzen in die medienbefüllte Falkonröhre überführt werden. Dazu wird die Pipettenspitze leicht über den Agar gezogen. Wie die Flüssignährmedien werden auch die Platten über Nacht bei 37°C bebrütet und dienen im Anschluss der vorübergehenden Kühlschranklagerung der jeweiligen Klone. Die Flüssigmedien werden zudem während der Inkubation bei 150 Rpm geschüttelt. Ausgehend von den gewünschten Platten werden dann später die Plasmidpräparationen in größerem Maßstab (Midipräparation; siehe 2.4.11, S. 44 ff.) hergestellt.

2.4.8 Minipräparation von DNA-Plasmiden

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
<u>Chemikalien:</u>	
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Um die rekombinante Plasmid-DNA der über Nacht angezüchteten Bakterienklone (siehe 2.4.7, S. 35 ff.) zu isolieren, wird der oben genannte Plasmid Miniprep-Reagensatz von Peqlab nach Herstellerangaben verwendet. Dieser nutzt das Prinzip der alkalischen Lyse mit darauffolgender DNA-Extraktion über eine silikatbasierte Zentrifugationssäule. Dabei erfolgt zunächst eine Zentrifugationspelletierung der in 5 ml LB-Amp-Medium angezüchteten Bakterien (s. 2.4.7, S. 35 ff.), sowie deren Resuspendierung in einem RNase-haltigen Puffer. Die enthaltene RNase führt zu einem Abbau der unerwünschten RNA-Moleküle, nachdem durch eine zweite Lösung die alkalische Bakterienlyse durchgeführt wurde. Unter dem hohen pH denaturiert die im Lysat enthaltene DNA und über das enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) werden bakterielle Proteine und Lipide gebunden. Diese werden nach Zugabe einer essigsäurehaltigen Neutralisationslösung präzipitiert, während kleinere DNA-Moleküle, wie Plasmide, zeitgleich renaturieren. Größere zelluläre DNA-Moleküle renaturieren hingegen erheblich langsamer und werden zusammen mit den SDS-gebundenen Zelltrümmern durch Zentrifugation entfernt. Der auf diese Weise aufgereinigte, plasmidhaltige Flüssigüberstand wird im Anschluss auf eine der mitgelieferten Perfect Bind-Zentrifugationssäulen aufgetragen und eine Minute bei 10000 xg zentrifugiert. In Gegenwart der darin enthaltenen chaotropen Salze wird die enthaltene DNA spezifisch an diese Silika-Säule gebunden. Die anschließende Elution erfolgt mittels 50 µl ddH₂O nach zweimaligem Waschen und Trockenzentrifugation der Säule gemäß Herstellerangabe. Das Eluat wird in einem Safe-Lock-Gefäß aufgefangen und die DNA-Konzentration spektrophotometrisch bestimmt (vgl. 2.4.2.1, S. 27 ff.). Dann wird es für einen analytischen restriktionsenzymatischen Verdau weiterverwendet (siehe 2.4.9, S. 40 ff.), oder es wird zunächst bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.4.9 Analytischer Restriktionsverdau der rekombinanten Plasmide durch Restriktionsendonukleasen

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
Heizblock (Thermomixer compact)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)

Restriktionsenzyme**(samt Reaktionspuffer):**

Fast Digest™ Eco RV (Eco32I)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Fast Digest™ Eco RI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Fast Digest™ Sal I	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Fast Digest™ Sca I	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Fast Digest™ Bgl II	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Fast Digest™ XbaI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Fast Digest™ SpeI (BcuI)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

2.4.9.1 Analytischer Restriktionsverdau

Im Anschluss an die Minipräparation der Plasmide aus den Bakterienklonanzuchten erfolgt ein analytischer Verdau durch spezifisch schneidende Restriktionsendonukleasen des Typs II. Diese Enzyme erkennen kurze palindromische DNA-Sequenzen und schneiden den DNA-Doppelstrang durch Hydrolyse der Phosphordiesterbindungen entweder unter Entstehung glatter Enden (*blunt ends*) oder sogenannter „klebriger Enden“ mit Nukleotidüberhängen (*sticky ends*). Die Enzyme werden so eingesetzt, dass sie innerhalb des Plasmids an mehreren charakteristischen Stellen schneiden, um distinkte DNA-Fragmente zu erzeugen. Die Fragmentlängen-Charakterisierung findet durch Agarosegelelektrophorese statt (siehe 2.4.5, S. 32 ff.). Eine Voraussage über die durch den Verdau entstehenden charakteristischen DNA-Fragmentgrößen ist mit Hilfe der Vektorkarten und geeigneten Computerprogrammen möglich. Durch den analytischen Restriktionsverdau erhält man Auskunft über die Qualität des Plasmids, indem beurteilt wird, ob überhaupt ein Insert in den Vektor kloniert werden konnte und ob dieses Insert auch die korrekte Fragmentgröße aufweist. Desweiteren geben die auf dem Elektrophoresegel ersichtlichen Fragmentgrößen im Falle der TA-Klonierung in pCR-II Aufschluss über die Insertorientierung (Sense- oder Antisense-Orientierung). In dieser Arbeit werden die in der Tabelle genannten Fast Digest™ -Restriktionsendonukleasen samt mitgeliefertem Reaktionspuffer verwendet. Diese Restriktionsenzyme benötigen nur kurze Inkubationszeiten von 5-15 Minuten im Heizblock. Sie besitzen aber selbst bei deutlich längeren Inkubationszeiten als im Protokoll vorgegeben keine Star-Aktivität und sind somit äußerst schnittstellenspezifisch. Folgende Volumina werden verwendet, um einen analytischen Restriktionsverdau der rekombinanten Plasmide durchzuführen:

300ng Plasmid-DNA aus Minipräparation (siehe 2.4.8, S. 39 ff.)

1 μ l Fast Digest-Enzym

1 μ l 10x Fast Digest-Reaktionspuffer

Auf 10 μ l mit ddH₂O auffüllen.

Mischen und 10 Minuten bei 37°C im Heizblock inkubieren.

Danach mit Elektrophorese-Ladepuffer versetzen und auf Gel auftragen (vgl. 2.4.8, S. 39 ff.). Es können auch mehrere Fast Digest-Restriktionsenzyme zeitgleich verwendet werden. Bei beispielsweise zwei Enzymen werden von jedem nur 0,5 μ l eingesetzt. Alles Andere bleibt wie im oben genannten Schema.

2.4.9.2 Präparativer Restriktionsverdau

Für die in dieser Arbeit durchgeführten präparativen Restriktionsverdaue werden ebenfalls Fast Digest Restriktionsendonukleasen des Typs II von Fermentas verwendet. Dabei kommen die folgenden Mengen zum Einsatz:

Restriktion von pCRII-Plasmiden (Isolation der DNA-Inserts):

3 μ g Plasmid-DNA aus Midipräparation (siehe 2.4.11, S. 44 ff.)

3 μ l Fast Digest-Enzym A (siehe 3.3, S. 71 ff.)

3 μ l Fast Digest-Enzym B (siehe 3.3, S. 71 ff.)

6 μ l 10 x Fast Digest-Reaktionspuffer

Auf 60 μ l mit ddH₂O auffüllen.

Restriktion von pI-18-Plasmiden:

3 μ g Plasmid-DNA

3 μ l Fast Digest-Enzym XbaI

(3 μ l Fast Digest-Enzym EcoRV; Nur für Umklonierung von TRBV-Segment 2)

3 μ l 10 x Fast Digest-Reaktionspuffer

Auf 30 μ l mit ddH₂O auffüllen.

2.4.10 DNA-Sequenzierung

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
Multiply-Pro PCR-Gefäße 0,2 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
<u>Auftragslabor:</u>	
Seqlab Sequenzierungslabor	Göttingen, Deutschland
<u>Primer:</u>	
M13-Sequenzierungsprimer for (10 pmol/μl)	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13-Sequenzierungsprimer rev (10 pmol/μl)	5'-CAGGAAACAGCT-3'

Vor der Herstellung einer Plasmidpräparation in größerem Maßstab werden die Plasmidklone aus 2.4.8 (S. 39 ff.), welche ein korrekt erscheinendes Restriktionsmuster aufwiesen, sequenziert. Dadurch kann die Basenabfolge des Inserts auf PCR-Synthesefehler kontrolliert werden. Hierfür werden zwei Ansätze angefertigt, die sich im verwendeten Sequenzierprimer (M13-forward bzw. M13 reverse) unterscheiden. Die Sequenzierung unter Verwendung des M13-Primers ist möglich, da die Polylinker-Region des pCRII-Vektors mit dem enthaltenen Insert von den entsprechenden Primer Bindungsstellen flankiert wird. Sequenziert wurde mit einer auf der sogenannten Kettenabbruch-Synthese nach Sanger (aus dem Jahre 1977) beruhenden Methode, bei der fluorochromgekoppelte Didesoxynukleotide zum Sequenzieren eingesetzt werden. Die Durchführung der Sequenzierungen erfolgte durch die Firma Seqlab, Göttingen.

2.4.11 Midipräparation von DNA-Plasmiden

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
Certomat Inkubationsschüttler	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Detuschland
Zentrifuge Sorvall RC 26 plus mit Zentrifugenröhren	Thermo Scientific, Waltham, USA
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
<u>Chemikalien:</u>	
NucleoBond PC 100 Midiprep Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Distilled Water DNase/RNase free	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA
Ethanol (75%)	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
LB-Medium mit Ampicillin (LB-Amp-Medium)	Wie in 2.4.7.

Um größere Plasmidmengen aus den transformierten *E. coli*-Bakterienklonen zu erhalten, wird mit dem NucleoBond PC 100-Kit von Machery-Nagel eine Plasmidaufreinigung durchgeführt, ausgehend von transformierten Bakterien. Dazu wird eine Einzelkolonie der Klone aus 2.4.7 (S. 35 ff.), die sich nach Minipräparation und Restriktionsverdau (siehe 2.4.8, S. 39 ff. und 2.4.9, S. 40 ff.) als geeignet gezeigt haben, vorsichtig mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte abgenommen und in 50 ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator vermehrt. Danach wird die Bakteriensuspension bei 6000 x g fünfzehn Minuten lang zentrifugiert und das resultierende Bakterienpellet in 4 ml des mitgelieferten Resuspensionspuffers per Vortex aufgeschüttelt. Die enthaltene RNase führt im weiteren Verlauf zu einem Abbau der unerwünschten RNA-Moleküle. Anschließend wird eine alkalische Bakterienlyse durchgeführt, woraufhin die freigesetzte DNA unter dem hohen pH-Wert denaturiert. Durch Natriumdodecylsulfat (SDS) werden bakterielle Proteine und Lipide gebunden. Diese werden nach Zugabe einer essigsäurehaltigen Neutralisationslösung präzipitiert, während kleinere DNA-Moleküle,

wie Plasmide, zeitgleich renaturieren. Größere zelluläre DNA-Moleküle renaturieren hingegen nicht und werden gemeinsam mit den SDS-gebundenen Zelltrümmern über mitgelieferte Faltenfilter entfernt. Im Weiteren binden die renaturierten Plasmide an die im Reagentiensatz enthaltenen, Anionenaustauscher NucleoBond AX-Säulen und werden nach einem Waschschrift über einen kaliumchloridhaltigen Elutionspuffer eluiert. Anschließend wird die im Eluat enthaltene Plasmid-DNA durch Isopropanolzugabe gefällt und bei 4°C/15.500 x g in die Sorvall-Zentrifuge RC 26 plus von Thermo Scientific überführt. Nach abschließendem Waschen des Pellets mit 70 % Ethanol und nochmaligem Zentrifugieren bei 20°C/15.500 x g für 10 Minuten, wird das Plasmid-Pellet in 200 µl sterilem Wasser resuspendiert. Der DNA-Gehalt wird danach spektrophotometrisch am Nanodrop 1000 gemessen (siehe 2.4.2.1, S. 27 ff.). Zur Qualitätskontrolle der extrahierten Plasmide wird ein analytischer Restriktionsverdau (siehe 2.4.9, S. 40 ff.) mit konsekutiver Gelelektrophorese (siehe 2.4.5, S. 32 ff.) und anschließend die DNA-Sequenzierung wie unter 2.4.10 (S. 43 ff.) beschrieben durchgeführt.

2.4.12 Subklonierung der PCR-amplifizierten TRBV-Segment-2- und -3-komplementären kodierenden TRBV-cDNA-Abschnitte aus dem pCRII-Vektor in den eukaryontischen Plasmidvektor pI.18

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
Heizblock (Thermomixer compact)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Bakterienbrutschrank (37°C)	Heraeus Instruments GmbH, Hannover, Deutschland
Certomat Inkubationsschüttler	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
<u>Chemikalien:</u>	
Plasmidvektor pI.18 (4,3 kb)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jim Robertson, National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, UK
LB-Agar mit Ampicillin (LB-Amp-Agar)	wie in 2.4.10
Kompetenter <i>E. coli</i>-Stamm	Herstellung von Kompetenz mittels Z-

XL1blue, OD_{600nm} = 0,5, 50 µl Aliquots, Lagerung bei -80°C	Competent <i>E. coli</i> Transformation Kit & Buffer (Zymo Research Corporation, Irvine, USA), Laborbestand des Instituts für Virologie der Universitätsmedizin Göttingen
rAPid Alkaline Phosphatase	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Rapid DNA Ligation Kit (inkl. Reaktionspuffer)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
LB-Medium mit Ampicillin (LB-Amp-Medium)	wie in 2.4.7.
LB-Agar mit Ampicillin (LB-Amp-Agar)	wie in 2.4.7.

In diesem Abschnitt werden die DNA-Korrelate der Tribec-Segmente 2 und 3 (RNA-Virus) übersichtshalber als S2 und S3 abgekürzt. Diese PCR-Produkte wurden, wie oben beschrieben, aus cDNA amplifiziert und stellen die kodierenden Bereiche dar. Bei der späteren Transkription entsteht also mRNA ohne die ursprünglichen 3'- und 5'-untranslatierten Regionen (3'-, 5'-UTRs).

Nachdem die cDNA der klonierten Virussegmente im pCRII-Klonierungsvektor bakteriell vermehrt wurden (siehe 2.4.7, S. 35 ff. und 2.4.11, S. 44 ff.), erfolgt deren Subklonierung in den eukaryontischen Expressionsvektor pI.18 (siehe Abb. 8, S. 48). Erst in dieser Form werden sie für die in 2.4.13 (S. 48 ff.) beschriebenen Reporter-Assays mit HEK293-Zellen weiterverwendet. Dazu werden die Virussegmente durch einen präparativen restriktionsenzymatischen Verdau nach dem in Abschnitt 2.4.9.2 (S. 42 ff.) angegebenen Schema aus dem pCRII-Vektor ausgeschnitten, und nach Separation über ein präparatives Elektrophoresegel in den ebenfalls enzymgeschnittenen pI.18-Vektor ligiert (siehe 2.4.5, S. 32 ff. und 2.4.9.2, S. 42 ff.). Dafür werden die linearisierten pI.18-Vektoren vor der Ligation mit der oben genannten rekombinanten alkalischen Phosphatase von Roche, dem Herstellerprotokoll entsprechend, einer Dephosphorylierung unterzogen. Die Abspaltung der 5'-Phosphatreste verhindert eine T4-DNA-Ligase katalysierte Religation unvollständig verdauter (d.h. mit nur einem Restriktionsenzym geschnittenen) Plasmide, welche ansonsten die Klonierungseffizienz vermindern. Unter

Verwendung des Rapid DNA Ligation Kits von Fermentas erfolgt die Ligation der cDNA des jeweiligen Virussegments in den linearisierten und dephosphorylierten pI.18-Vektor. Nachdem der in der Tabelle genannten kompetente *E. coli*-XL1blue-Stamm auf Eis aufgetaut ist, wird er für 30 Minuten mit dem jeweiligen Ligationsansatz auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock ist im Falle der verwendeten Bakterien für eine erfolgreiche Transformation nicht nötig (vgl. 2.4.7, S. 35 ff.). Sodann werden die transformierten Bakterien jeweils steril auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Durch ein im pI.18-Plasmid enthaltenes Ampicillin-Resistenzgen wird den Transformanten ein Wachstum auf LB-Ampicillin-Agar ermöglicht, während nicht transformierte *E. coli*-Bakterien absterben. Von den bewachsenen Kulturplatten werden mehrere Einzelkolonien mit Hilfe jeweils einer Pipettenspitze abgenommen und samt dieser in jeweils ein 15ml-Falcon-Röhrchen überführt, in welches 5 ml LB-Ampicillin-Medium vorgelegt wurde. Wie in Abschnitt 2.4.7 (S. 35 ff.), werden die vom Agarboden abgenommenen Einzelkolonien jeweils auf eine neue LB-Ampicillin-Agarplatte überimpft, bevor die bakterienbehafteten Pipettenspitzen in einzelne mediumbefüllte Falconröhrchen überführt werden. Dazu wird die Pipettenspitze leicht über den neuen LB-Ampicillin-Agar gezogen. Sowohl die Flüssignährmedien (bei 150 Upm geschüttelt) als auch die Agarplatten werden bei 37°C über Nacht bebrütet. Die Agarplatten werden daraufhin bei 4°C eingelagert. Ausgehend von den Flüssigkulturen erfolgt eine Minipräparation der pI.18-Plasmide mit darauffolgendem analytischen Restriktionsverdau, sowie die Sequenzierung der Inserts (nach 2.4.8-2.4.9, S. 39 ff.). Dann erfolgt, ausgehend von den eingelagerten LB-Ampicillin-Agarplatten, aus dem korrekt sequenzierten Bakterienklon die Midipräparation der pI.18-Plasmide (siehe 2.4.11, S. 44 ff.) sowie eine abschließende Sequenzierung (siehe 2.4.10, S. 43 ff.).

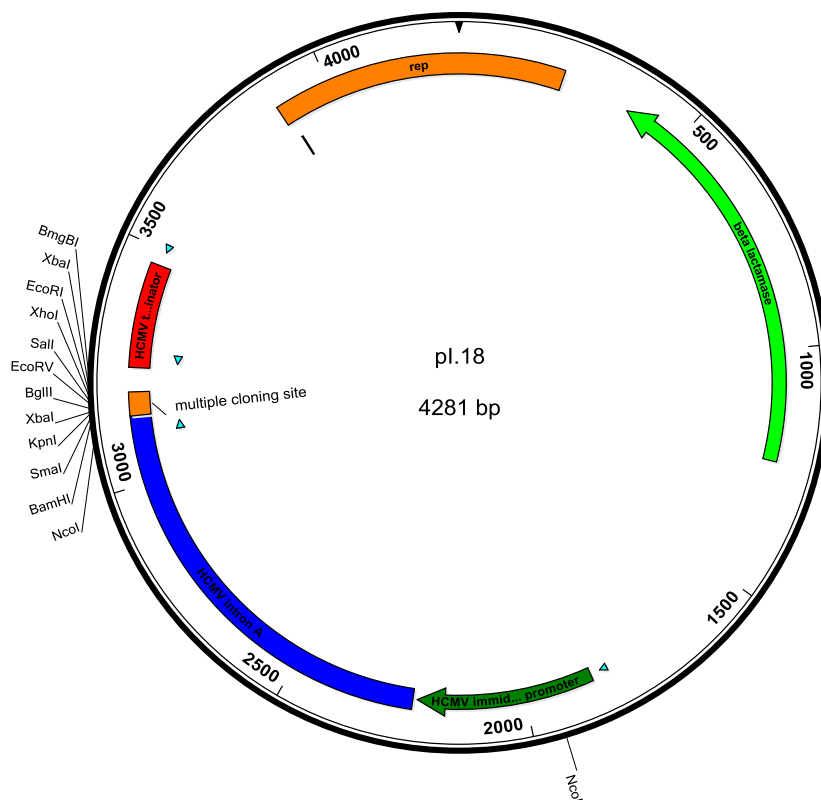


Abb. 8. Schematischer Aufbau des pI.18 Klonierungsvektors. (Erstellt mit Lasergene-Software Seqbuilder von DNASTAR Inc.)

2.4.13 Dualer Luziferase Reporter-Assay

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
Inkubator	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
FLUOstar Optima mit Software	BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Deutschland
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
Lumitrac-96-Kavitätenplatten, weiß	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<u>Zelllinien:</u>	
HEK 293 (s. 2.2.1)	Microbix Biosystems Inc., Toronto, Kanada
<u>Kulturmedien:</u>	
DMEM komplett	wie in 2.2.1

Weitere Chemikalien:

Renilla GLOW-Juice PJK GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland

Beetle LongGlow-Juice PJK GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland

Lipofectamine Reagent Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA

OptiMEM Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA

PBS c.c. pro GmbH, Oberdorla, Deutschland

5xPLB Promega Corporation, Madison, USA

1xPLB (durch 1:5- Promega Corporation, Madison, USA

Verdünnung des 5x PLB mit ddH₂O)

Plasmide:

Plasmidvektor pI.18 (als Leerplasmid verwendet) Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jim Robertson, National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, UK

p125-Luc (Reporterplasmid) Plasmidvektor, in dem das Leuchtkäfer(Firefly)-Luziferasegen an den humanen IFN- β -Promotor gekoppelt ist. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Takashi Fujita, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan

pI.18-RL (Reporterplasmid) Plasmidvektor, in dem das Renilla-Luziferasegen an den dauerhaft aktiven HCMV-Promotor gekoppelt ist.

pI.18-FdMx pI.18-FdMx oder auch pI.18-FLAG-deltaMx ist ein pI.18-Expressionsplasmid, das für ein trunkiertes, humanes, FLAG-Tag-markiertes Mx-Protein kodiert. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Friedemann Weber, Abt. Virologie, Universität Marburg.

pUC19 Bakteriell Plasmid mit Amp-Resistentgen und Galaktosidasegen für Blau-weiß-Selektionen. Wird als Leerplasmid zum Auffüllen benutzt (siehe Text). Laborbestand der Abt. Virologie, Universitätsmedizin Göttingen (UMG), Deutschland.

pI.18-TRBV-S4	Kodiert für TRBV-NS1(TuP).
pI.18-TRBV-S9	Kodiert für TRBV-VP6 (Helikase) und enthält außerdem die alternativen Leserahmen ORF-Xa, -b und -c.
pI.18-TRBV-S9-ORFXa	Kodiert für das vom alternativen Leserahmen ORFXa kodierte Protein.
pI.18-TRBV-S9-ORFXb	Kodiert für das vom alternativen Leserahmen ORFXb kodierte Protein.
pI.18-TRBV-S9-ORFXc	Kodiert für das vom alternativen Leserahmen ORFXc kodierte Protein.
pI.18-TRBV-S9-Helikase (ORFXmut)	Kodiert nur für TRBV-VP6 (Helikase). Das für das Startcodon des ORFXa kodierende Basentriplett wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese zerstört.
pI.18-KEMV-S9	Kodiert für KEMV-VP6 (Helikase) und enthält außerdem die alternativen Leserahmen ORF-Xa, und ORF-Xb.
„VSV-RNA“	Gesamt-RNA aus VeroE6-Zellen, 12 Stunden nach Infektion mit VSV isoliert.
„VeroE6-RNA“	Gesamt-RNA aus nicht-infizierten VeroE6-Zellen.
<u>Viren:</u>	
Kemerovo-Virus (KEMV)	wie in 2.3.1.
Tribec-Virus (TRBV)	wie in 2.3.1.
Rift Valley Fever Virus (RVFV) Clone 13	wie in 2.3.1.

2.4.13.1 Methode

Das Prinzip der Luziferase-Assays beruht auf der quantitativen Messung einer Biolumineszenz, die durch den enzymatischen Umsatz von Luziferinen zustande kommt. Für den dualen Luziferase-Assay werden zwei verschiedene Luziferase-Reportergene eingesetzt. Einerseits kommt die Luziferase des amerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (Firefly-Luziferase) zum Einsatz. Zum anderen wird die Luziferase der Weichkoralle *Renilla reniformis* (Renilla-Luziferase) verwendet. Sie oxidieren das jeweilige Substrat (Luziferin (Firefly) bzw. Coelenterazin (Renilla)) ATP-abhängig zu

Oxyluziferin, welches unter Abgabe von Licht in einen weniger energiereichen Zustand fällt. Die Luziferasegene liegen jeweils auf einem von zwei verwendeten Reporterplasmiden. Durch Lipofektion werden beide zusammen in die verwendeten HEK293-Zellen kotransfiziert. Innerhalb der rekombinanten Plasmide sind die Luziferasegene an einen speziellen Promotor gekoppelt. Der p125-Luc-Reporter exprimiert in Abhängigkeit der Interferon- β -Promotoraktivität die Leuchtkäfer-Luziferase (Firefly-Luziferase). Hingegen unterliegt die Expression der pI.18-RL-Reporterplasmid-kodierten Renilla-Luziferase dem konstitutiv aktiven HCMV-Promotor. Die Lichtemission des angeregten Oxyluziferins (umgesetztes Substrat der Luziferasen) kann am Ende des Versuchs luminometrisch sehr sensitiv gemessen werden. Durch die Promotorkopplung der Luziferasegene kann auf die jeweilige Promotoraktivierung rückgeschlossen werden. Da die Renilla-Luziferase durch Kopplung an den HCMV-Promotor konstitutiv aktiv ist, spiegelt sie die allgemeine Zellviabilität bzw. Transkriptionsaktivität sowie die Transfektionseffektivität wider. Sie wird dazu genutzt, eine standardisierte Aussage über den Aktivierungsgrad des Interferon-beta-Promotors in jeder Kavität machen zu können.

2.4.13.2 Reporter-Assay mit Transfektion von Expressionsplasmiden für virale

Proteine

Ausgegangen wird in diesem Versuchsansatz von einer 12-Kavitätenplatte. Pro Vertiefung werden 1×10^5 HEK293-Zellen in einem ml DMEM ausgesät und 24 Stunden bei $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ angezchtet (vgl. 2.2.1, S. 15 ff.). Daraufhin erfolgt die Transfektion der Reporterplasmide mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine von Invitrogen nach Herstellerangaben. Dieses bildet aus seinen polykationischen und neutralen Lipidbestandteilen Liposomen, mit deren Hilfe DNA-Plasmide per Zellmembranfusion in die Zellen eingebracht werden. Für jede der zwölf Kavitäten werden $0,0125 \mu\text{g}$ des pI.18-RL-Reporterplasmids und $0,25 \mu\text{g}$ vom p125-Luc-Plasmid eingesetzt. Zusammen mit den Reporterplasmiden erfolgt die Cotransfektion von fünf verschiedenen Virusprotein-Expressionsplasmiden – jeweils als Doppelansatz. Dazu werden je $0,25 \mu\text{g}$ dieser Plasmide eingesetzt. Als Referenzplasmid wird den zwei übrigen Kavitäten, anstelle der Expressionsplasmide für virale Proteine, das pI.18-FLAG-deltaMx-Plasmid kotransfiziert. Dieses kodiert für ein trunkiertes Mx-Protein und dient als neutrale Kontrolle. In Kombinationsversuchen, mit mehreren Expressionsplasmiden pro Zelle, wird eine

Gesamtmenge von 0,25 µg Plasmid-DNA pro Kavität eingesetzt. Teilweise wird in derartigen Kombinationsversuchen mit dem oben genannten pUC19-Plasmid aufgefüllt. Dieses prokaryontische Plasmid kommt als Leerplasmid zum Einsatz, um in Transfektionsexperimenten mit mehreren Plasmiden, in jeder Probe vergleichbare Gesamtplasmidmengen transfizieren zu können. Ein spezielles Protein wird dabei nicht exprimiert. Nach nun weiterer 24-stündiger Anzucht bei 37°C/5%CO₂ haben die Zellen die plasmidkodierte Virus- bzw. Mx-Proteine bereits produziert und werden einer Stimulation mit Virus- bzw. Nicht-Virus-RNA unterzogen. Für einen Teil des Doppelansatzes, entsprechend einer Plattenhälfte, wird Gesamt-RNA aus Vero E6-Zellen verwendet, die zwölf Stunden zuvor mit dem Rhabdovirus Vesicular Stomatitis Virus (VSV) infiziert worden waren. Diese RNA führt in HEK293-Zellen im Normalfall zu einer starken Aktivierung des Interferon-Systems, was allerdings von viralen Interferonantagonisten unterdrückt werden kann (siehe 3.4, S. 73 ff.). Für die zweite Plattenhälfte wird Gesamt-RNA verwendet, die aus nicht-infizierten Vero E6-Zellen isoliert wurde. Sie führt nicht zu einer bedeutsamen Induktion des Interferon-Systems und dient als Kontrolle. Verwendet werden 2 µg RNA pro Kavität, die ebenfalls durch Lipofektion in die Zellen eingebracht wird. Nach weiterer 24-stündiger Anzucht bei 37°C/5%CO₂ folgt das Waschen mit 200 µl PBS/Kavität und die Lyse der Zellen durch Zugabe von 100 µl 1xPLB pro Kavität. Es folgt eine zwanzigminütige Inkubation bei Raumtemperatur, bei der die Kavitätenplatte gelegentlich seitlich leicht angeschlagen wird. Daraufhin werden 20 µl eines jeden Zellysats in den Kavitäten einer weißen 96-Kavitäten-Platte mit Renilla-Luziferase-Substrat und weitere 20 µl mit Leuchtkäfer-Luziferase-Substrat gemäß der Angaben des Herstellers PJK gemischt. Die Messung der resultierenden Biolumineszenz erfolgt mit dem FLUOstar-Optima-Luminometer nach Angaben der Firma PJK.

2.4.13.3 Reporter-Assays mit virusinfizierten Zellen

Für die dualen Luziferase Reporter-Assays, bei denen HEK293-Zellen nach einer Infektion mit kompletten Viren untersucht werden, ist nach 2.2.3-2.3.3 (Infektion von Zellaussaaten; siehe S. 18 ff.) und einem ähnlichen, jedoch leicht veränderten Versuchsaufbau zu dem aus Abschnitt 2.4.13.2 (S. 51 ff.) vorzugehen. Genutzt werden in diesem Fall 6-Kavitätenplatten und es werden 3×10^5 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Die Infektion erfolgt, wie in 2.3.3 (S. 23 ff.) erklärt, 24 Stunden nach Zellanzucht. Sechs

Stunden nach der Infektion (37°C/5%CO₂) werden dann die Reporterplasmide p125-Luc und pI.18-RL kotransfiziert, woraufhin die Zellen weitere 24 bzw. 36 Stunden inkubiert werden, je nach Versuchsaufbau. Die Zellyse und Messung der Interferon- β -Promotoraktivität anhand des Luciferins erfolgt letztlich wie in 2.4.13.2 (S. 51 ff.) beschrieben. Für die Zellyse werden allerdings 200 μ l 1xPLB verwendet.

2.4.14 Sandwich-ELISA zur Messung der Interferon- β -Konzentration in Zellkulturüberständen

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
FLUOstar Optima mit Software	BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Deutschland
Zentrifuge	Thermo Scientific, Waltham, USA
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
Mehrkanalpipette 50-200 μl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<u>Chemikalien:</u>	
DEPC-Wasser	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
VeriKine Human IFN-β ELISA Kit	PBL InterferonSource, New York, USA

Mit der Sandwich-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Methode ist es möglich immunogene Substanzen zu quantifizieren. In diesem Fall wird spezifisch die Interferon- β -Konzentration in den Zellkulturüberständen der Infektionsversuche bestimmt (siehe 3.1.2, S. 64 ff.). Dazu wird der oben genannte Reagentiensatz von PBL gemäß der Herstellerangaben verwendet. In den Zellkulturüberständen vorhandenes Interferon- β wird in diesem Verfahren zunächst von spezifischen Fang-Antikörpern gebunden, die am Boden der mitgelieferten Kavitätenplatte immobilisiert vorliegen. Ab hier folgt auf jeden Pipettierschritt eine Behandlung mit der beiliegenden Waschlösung, um unspezifische Überschüsse von Antikörpern oder Enzymsubstrat aus der Reaktion zu entfernen. Im Weiteren wird dem Versuchsansatz ein biotinylierter Detektionsantikörper hinzugefügt, der das am Boden immobilisierte Interferon- β an einem anderen Epitop als der erste

Antikörper bindet. Markiert wird dieser Zweitantikörper mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat. Während Streptavidin an das Biotin des Antikörpers bindet, sorgt das gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase für die Umsetzung des im Folgeschritt hinzugefügten Substrates TMB (3,3',3'',5'-Tetramethylbenzidindihydrochlorid). In der anschließenden Inkubationszeit entsteht eine Blaufärbung, deren Intensität sich proportional zur Interferon- β -Konzentration verhält. Durch Zugabe einer reaktionsbegrenzenden schwachen Schwefelsäurelösung schlägt die Färbung in ein Gelb um, welches absorptionsspektrometrisch eine sensitivere Messung ermöglicht. Diese erfolgt im FLUOstar bei 450 nm Wellenlänge. Eine im Versuch mitgeführte Testreihe mit bekannten IFN- β -Konzentrationen wird während der Messung zur Erstellung einer Standardkurve genutzt, die zur Quantifizierung der Proben dient.

2.4.15 Beobachtung von Echtzeitverläufen virusvermittelter Zytotoxizität mittels Impedanzmessung

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
Sterilbank	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
xCELLigence SP mit RTCA-Software	Roche Diagnostics AG, Risch, Schweiz
1.2.1	
Inkubator	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
Mehrkanalpipette 50-200 μl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
E-Platte (96-Kavitäten)	Roche Diagnostics AG, Risch, Schweiz
<u>Kulturbedien:</u>	
Wie in 2.2.1.	
<u>Chemikalien:</u>	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Universal Type I Interferon [Human	PBL InterferonSource, Lörrach,

Interferon- Alpha A/D (BglII)]	Deutschland
Z-VAD-FMK gelöst in DMSO (50 µM)	Merck-Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
<u>Zelllinien:</u>	
HEK 293 (s. 2.2.1)	Microbix Biosystems Inc., Toronto, Kanada
<u>Viren:</u>	
Kemerovo-Virus (KEMV)	Wie in 2.3.1.
Tribec-Virus (TRBV)	Wie in 2.3.1.
Rift Valley Fever Virus (RVFV) Clone 13	Wie in 2.3.1.

2.4.15.1 Methode

Mit der xCELLigence-Realtime-Zellanalyseplattform von Roche ist es möglich, über kontinuierliches Messen des elektrischen Scheinwiderstands (Impedanz) am Boden einer speziellen 96-Kavitäten-E-Platte, die Viabilität adhärent wachsender Zellen in Echtzeit zu bestimmen. Hierfür wird an die goldfilmbeschichteten Kavitätenböden dieser E-Platte jeweils eine sehr geringe Spannung angelegt, die es erlaubt alle Änderungen von Zellzahl, Morphologie oder Adhärenzverhalten der Zellen zu registrieren, ohne dabei einen störenden Effekt auszuüben. Die Messungen erfolgen alle 15 min, wodurch über die Zeit charakteristische Zellindexkurven analog den Impedanzveränderungen entstehen. Je geringer die Anzahl vitaler Zellen ist, oder je geringer das Adhärenzverhalten ausgeprägt ist, desto geringer ist auch die gemessene Impedanz.

2.4.15.2 Versuchsansatz für Virusinfektionen von HEK293-Zellen

In den durchgeführten Versuchen wird das Wachstumsverhalten verschiedenartig infizierter HEK293-Zellen über die Zeit beobachtet. Inkubiert wird über mehrere Tage, bis ein zytopathischer Effekt auftritt. Die Messeinheit wird dabei zusammen mit der 96-Kavitätenplatte im Inkubator bei 37°C/5%CO₂ aufbewahrt. Zunächst werden in jede Kavität 100 µl des Zellkulturmediums vorgelegt und eine Impedanzmessung durchgeführt. Das Ergebnis wird als Grundniveau gespeichert. Daraufhin werden zu den 100 µl pro Kavität 2500 HEK293-Zellen in einem Volumen von 150 µl Zellkulturmedium ausgesät (vgl. 2.2, S. 15 ff.). Sodann wird die fertig bestückte E-Platte in die im Inkubator liegende Messeinheit des RTCA-Gerätes platziert. Nach zwei- bis viertägiger Anzucht,

sind die Zellen so weit angewachsen, dass eine Infektion erfolgen kann (vgl. 2.3, S. 19 ff.). Es wird die jeweils erforderliche Virus-MOI in einem Volumen von 50 µl Medium hinzugegeben. In den Koinfektionsversuchen werden mit diesen 50 µl zwei verschiedene Viren hinzugefügt. Zur Viabilitätskontrolle werden einige Kavitäten mock-infiziert. Ihnen wird analog zur Virusinfektion 50 µl virenfrees Kulturmedium zugesetzt. Als Endvolumen beinhaltet jede Kavität somit 300 µl Flüssigkeit. In den folgenden Tagen wird die Impedanz kontinuierlich gemessen, um Aussagen über charakteristische Eigenschaften der Virusinfektionen auf das Zellwachstumsverhalten treffen zu können.

2.4.15.3 Versuchsansatz für Virusinfektionen mit Interferon- α - und Apoptoseinhibitor-vorbehandelten HEK293-Zellen

Um die Frage zu klären, welchen Effekt die verwendeten Orbiviren auf interferon- bzw. Apoptoseinhibitor-vorbehandelte Zellen ausüben, wurden die HEK293-Zellen mit IFN α und/oder Z-VAD-FMK vorbehandelt (s. 3.5.2, S. 92 ff.). Die antivirale Wirkung der TypI-Interferone wird unter 1.2 (S. 9 ff.) beschrieben. Z-VAD-FMK wirkt als Pan-Caspaseinhibitor. Caspasen sind inaktive Enzymvorstufen, die über sogenannte Todesrezeptoren oder durch intrazelluläre, mitochondrienvermittelte Reize aktiviert werden. Sie leiten die Apoptose ein. Dabei kommt es über Zwischenschritte letztlich zur Aktivierung von Effektorcaspasen, die zelluläre Proteine spalten und ihrerseits Endonukleasen aktivieren. Diese Enzyme fragmentieren die zelluläre DNA, was mittels TUNEL-Färbung anhand der 3'OH-Enden der entstandenen DNA-Fragmente (vgl. 2.4.16, S. 57 ff.) nachweisbar ist. (Ganten und Ruckpaul 2003; Karlson und Doenecke 2005). Im durchgeführten Versuch sollen die zellulären Caspasen möglichst breitgefächert mit dem Apoptosehemmstoff Z-VAD-FMK der Firma Merck-Calbiochem inhibiert werden. Dies soll klären, in wie weit der zytopathische Effekt der untersuchten Orbiviren auf einer Apoptoseinduktion beruht. Für den Versuchsansatz werden in einer 96er-Kulturplatte, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben (vgl. 2.4.15.2, S. 55 ff.), pro Kavität 2500 HEK293-Zellen in 150 µl Zellkulturmedium ausgesät und angezchtet. Nach Wachstum der Zellen bis zu einem Zellindex von etwa 0,6 werden denjenigen Vertiefungen, die mit IFN α behandelt werden sollen, jeweils 200 Unit IFN α in 10µl DMEM durch vorsichtiges Einmischen in das Kulturmedium hinzugefügt. Die Zugabe erfolgt ab jetzt alle 24 Stunden bis zur Beendigung des Experiments. Ab der zweiten IFN-Behandlung erfolgt die Gabe von 50 µM Z-VAD-FMK (gelöst in DMSO)

in die jeweils dafür vorgesehenen Vertiefungen. Sie wird ab diesem Zeitpunkt ebenfalls 24-stündlich, parallel zum IFN, wiederholt. Eine Stunde nach der erstmaligen Z-VAD-FMK-Behandlung erfolgt die Infektion (wie in 2.4.15.2, S. 55 ff.). Eine Plattenhälfte wird mit TRBV, die andere mit KEMV einer MOI von 2 in einem Volumen von 50 μ l Kulturmedium/Kavität infiziert. Um etwaige Auswirkungen des Z-VAD-FMK-Lösungsmittels DMSO zu berücksichtigen, wird allen Zellen, die nicht mit Z-VAD-FMK behandelt werden, parallel zu allen Z-VAD-FMK-Zugabezeitpunkten, jeweils 5 μ l DMSO/Kavität hinzugefügt. Dies entspricht der DMSO-Menge, die durch die Z-VAD-FMK-Behandlungen jeweils zugeführt wird.

2.4.16 Indirekte Immunfluoreszenz und TUNEL-Färbung

Material	Hersteller
<u>Geräte:</u>	Standardgeräte (s. 2.1)
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Inverses Immunfluoreszenzmikroskop Eclipse TE2000-S, PC-Software NIS-Elements BR3.2	Nikon Instruments Europe B.V., Amstelveen, Niederlande
<u>Verbrauchsmaterial:</u>	Standardverbrauchsmat. (s. 2.1)
Deckgläser rund, 12 mm \emptyset	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
6-, 12-Kavitätenplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, USA
<u>Kulturbedien:</u>	
DMEM, gebrauchsfertig	wie in 2.2.1.
<u>Zelllinien:</u>	
Vero B4 (s. 2.2.1)	DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland
<u>Viren:</u>	
Kemerovo-Virus (KEMV)	wie in 2.3.1.
Tribec-Virus (TRBV)	wie in 2.3.1.

<u>Chemikalien:</u>	
Formaldehyd 3,7% in 1xPBS	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
1xPBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
0,1% Triton in PBS (50 µl Triton X100 + 49,95 ml 1xPBS)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
1% FKS in 1xPBS	FKS: PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland, PBS: s. 2.2.1
FluorSafe Reagent	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Distilled Water DNase/RNase free	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
10 x TURBO DNase Puffer	Ambion Applied Biosystems, Austin, USA
TURBO DNase (2 U/µl)	Ambion Applied Biosystems, Austin, USA
<u>Primärantikörper:</u>	
Anti-TRBV AK (TRBV- Hyper Immuneserum aus Maus), Verdünnung 1:200 mit 1xPBS	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr
<u>Sekundärantikörper:</u>	
Cy3-konjugierter anti-Maus AK aus Ziege, Verdünnung 1:500 mit 1xPBS	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

Mittels der indirekten Immunfluoreszenz ist es möglich, über ein Zwei-Schritt-Verfahren spezifische Antigene nachzuweisen. Im Falle der vorliegenden Arbeit werden virale Antigenstrukturen von Tribec- bzw. Kemerovo-Virus in infizierten Zellen nachgewiesen. Dabei erfolgt eine Bindung polyklonaler unkonjugierter Primärantikörper, aus dem Serum Tribec-Virus (TRBV) infizierter Mäuse, an antigene TRBV-Strukturen innerhalb der Zellen. Aufgrund einer ausgeprägten Kreuzreaktivität der Antikörper mit Antigenstrukturen des nahe verwandten Kemerovo-Virus binden die eingesetzten Antikörper ebenfalls an diese. Nach einem Waschschrift erfolgt über einen spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper, welcher gegen den F_c-Teil der Maus-Antikörper gerichtet ist, der Nachweis der gebundenen Primärantikörper. Dazu wird nach einem weiteren Waschschrift der an die Sekundärantikörper konjugierte Farbstoff Cy3 im

Fluoreszenzmikroskop durch grünes Licht der Wellenlänge 550 nm angeregt, um rotes Licht zu emittieren. Zum Nachweis einer Apoptoseinduktion in den infizierten Zellen wird vor der Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung mit dem Präparat zusätzlich eine sogenannte TUNEL-Färbung durchgeführt (TdT-mediated dUTP nick end labeling). Die bei der Apoptose entstehenden, endonukleasebedingten DNA-Strangbrüche (sog. „nicks“) werden durch das Enzym TdT (terminale Desoxyribonukleotidyltransferase) nachgewiesen, indem es Fluorescein-konjugiertes dUTP an freie 3'OH-Enden koppelt. Die 3'OH-Enden der DNA-Stränge intakter Zellen werden zwar ebenfalls mit Fluorescein-dUTP markiert, sind jedoch quantitativ zu vernachlässigen. Durch die TUNEL-Färbung werden in den untersuchten Präparaten die Zellkerne apoptotischer Zellen anhand ihrer grünen Fluoreszenzmikroskopisch sichtbar, sobald sie durch blaues Licht der Wellenlänge 492 nm angeregt werden.

Für die Herstellung der nach obigem Schema zu färbenden Präparate werden in zwei 6-Kavitätenplatten pro Kavität 1×10^5 Verob4-Zellen ausgesät (vgl. 2.2.3, S. 18 ff.). Zuvor werden jedoch in jede Kavität drei Deckgläser gelegt, die nach Überschichtung mit dem Aussaatmedium, nach 24 Stunden Inkubationszeit bei $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ von den Zellen bewachsen werden. Danach wird eine Infektion, wie unter 2.3.3 (S. 23 ff.) beschrieben durchgeführt. Es werden jeweils vier Kavitäten mit TRBV und KEMV mit einer MOI von 1 infiziert. Die übrigen vier Kavitäten werden äquivalent behandelt, jedoch ohne eine Virusinfektion durchzuführen. Sie werden im Folgenden als uninfiziert oder „mock-infiziert“ bezeichnet. Jeweils eine Kavität der KEMV-, TRBV- und mock-infizierten Zellen wird 8 Stunden infiziert, je eine 24 Stunden, sowie jeweils eine Kavität 36 und eine 48 Stunden. Danach werden die Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette aus den Kavitäten genommen und bei Raumtemperatur für 20 Minuten in 3,7-prozentigem Formaldehyd chemisch fixiert. Eine Fixierung ist nötig, um nachträgliche Veränderungen der Zellstrukturen zu unterbinden. Dabei kommt es unter Formalineinwirkung zur Kreuzvernetzung von Proteinstrukturen. Anschließend wird das Formalin abgenommen und die Deckgläschen dreimalig mit je 200 μl 1xPBS pro Kavität gewaschen. Die Deckgläschen der ersten drei Infektionszeitpunkte werden, bis zum Ende der 48-stündigen Infektionen, mit 1xPBS überschichtet im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Nachdem alle Infektionen abgeschlossen und alle Zellen fixiert worden sind, werden die

Zellmembranen als Voraussetzung für die folgenden antkörpervermittelten Intrazellulärfärbungen mit 0,1 % Triton zwei Minuten lang auf Eis permeabilisiert. Die TUNEL-Färbung der fixierten und permeabilisierten Zellen wird mit dem In Situ Cell Death Detection-Reagensatz der Firma Roche durchgeführt. Als Positivkontrolle werden mock-infizierte Zellen je Deckgläschen für fünf Minuten mit 1,5 µl TurboDNase der Firma Ambion bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Enzym wird dazu ein Puffervolumen von 98,5 µl des zuvor 1:10-verdünnten, mitgelieferten Puffers zugefügt, sodass pro Deckgläschen ein Gesamtvolumen von 100 µl verwendet wird. Auf diese Weise werden ähnlich zur Apoptose DNA-Strangbrüche erzeugt, die sich durch die TUNEL-Färbung detektieren lassen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren und somit die Hintergrundfluoreszenz zu vermindern, werden die Deckgläschen vor der folgenden Immunfluoreszenzfärbung für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einprozentiges FKS gelegt. Sodann werden pro Deckgläschen 40 µl des 1:200 verdünnten Primärantikörpers gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit 200 µl einprozentigem FKS in PBS pro Deckglas, werden 40 µl des 1:500 verdünnten Sekundärantikörpers auf jedes Deckgläschen pipettiert und ebenfalls einstündig bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit je 200 µl einprozentigem FKS, werden die Deckgläschen kurz in ddH₂O getaucht, um Salzartefakte zu reduzieren. Dann werden die Deckgläschen leicht auf Zellstofftüchern abgetupft und mit der zellbewachsenen Seite nach unten zeigend in einem Tropfen FluorSave-Einbettmedium auf Objektträgern eingebettet. Ein Zusatz dieses Einbettmediums soll das belichtungsbedingte Photobleaching der Fluorochrome reduzieren. Nach Aushärtung werden die Präparate mit dem Immunfluoreszenzmikroskop (Nikon TE2000) untersucht und mit Hilfe einer Digitalkamera (Nikon DS-2MBWc) fotografiert und mit Hilfe der PC-Software Nikon NIS-Elements Br ausgewertet.

3 Ergebnisse

Frühere Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass genomische TRBV-RNA ebenso wie RNA aus TRBV-infizierten Zellen, wenn sie durch Lipofektion in HEK293-Zellen eingebracht wird, zu einer Aktivierung des IFN- β -Promotors in diesen Zellen führt. Bei einer Infektion der Zellen mit Tribec-Virus tritt diese Aktivierung hingegen nicht auf (siehe 3.1, S. 61 ff.). Dementsprechend muss das Virus über Mechanismen verfügen, die das Interferonsystem inhibieren. Vorangegangene Arbeiten legten nahe, dass dieser Effekt zu einem großen Anteil durch das TRBV-Gensegment 9 vermittelt wird (Brandt 2012). Welcher der vier offenen Leserahmen innerhalb des TRBV-Segments 9 für ein Protein kodiert, das diese Funktion vermittelt, wurde bislang nicht geklärt.

Die im Folgenden dargestellten Versuche untersuchten die interferonunterdrückende Potenz der beiden verwandten Orbiviren Tribec- und Kemerovovirus. In Koinfektionsversuchen wurde dabei beobachtet, inwieweit diese Viren eine (durch ein anderes Virus vermittelte) Stimulation des IFN- β -Promotors unterdrücken können. In den im Abschnitt 3.4 (S. 71 ff.) dargestellten Versuchen wurden gezielt einzelne TRBV- bzw. KEMV-virale Proteine mit Hilfe klonierter Expressionsvektoren transient in HEK293-Zellen exprimiert und deren alleinige Wirkung auf den IFN- β -Promotor untersucht. Desweiteren wurde anhand von Zellwachstumskurven und Apoptosenachweisen das wirtszell-schädigende Potential von TRBV und KEMV sichtbar gemacht (siehe 3.5, S. 89 ff.).

3.1 Hemmung der IFN- β -Induktion durch TRBV und KEMV

3.1.1 IFN- β Expression nach TRBV- und KEMV-Infektion

Um die Stärke der Induktion einer Interferon- β -Expression in HEK293-Zellen nach Infektionen mit TRBV, KEMV sowie RVFV Clone13 (Interferon-induzierend) zu beobachten, wurden in diesem Versuch RT-PCRs durchgeführt (siehe 2.4.1-2.4.5, S. 24 ff.). Dafür wurden 3×10^5 HEK293-Zellen pro Kavität in einer 6-Kavitätenplatte ausgesät und nach 24-stündiger Inkubation bei $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ infiziert. Es erfolgten Einfachinfektionen mit TRBV, KEMV und dem Interferon-induzierenden RVFV Clone13 mit einer MOI von jeweils 1,0. Desweiteren wurden Koinfektionen durchgeführt, bei

denen TRBV bzw. KEMV zusammen mit dem RVFV Clone 13 in einer MOI von jeweils 1,0 verwendet wurden. Als Negativkontrolle diente eine nicht-infizierte Kavität, welche im Weiteren als „Mock“ bezeichnet wird. Die Inkubationszeit *post infectionem* betrug 24 Stunden bei 37°C/5%CO₂.

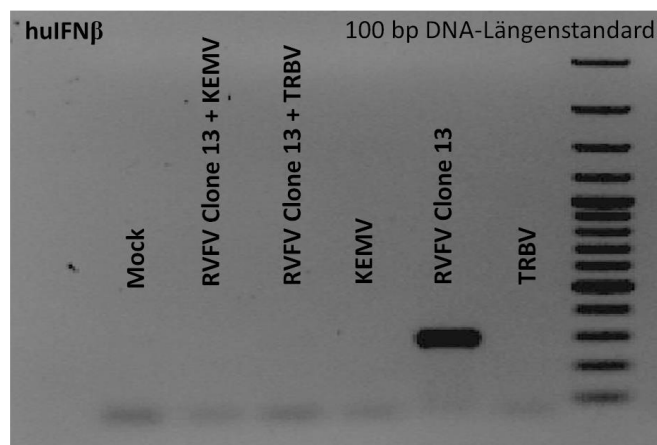


Abb. 9. Gelelektrophoresebild der IFN- β spezifischen Amplifikate nach RT-PCR unter Verwendung von Gesamt-RNA aus infizierten HEK293-Zellen. Beschriftung innerhalb der Abbildung (v.l.n.r): „Mock“: Nichtinfizierte Zellen. „RVFV Clone 13 + KEMV“: Nach Koinfektion mit RVFV Clone 13 und KEMV. „RVFV Clone 13 + TRBV“: Nach Koinfektion mit RVFV Clone 13 und TRBV. „KEMV“: Nach Einzelinfektion mit KEMV. „RVFV Clone 13“: Nach Einzelinfektion mit RVFV Clone 13. „TRBV“: Nach Einzelinfektion mit TRBV.

Nach einer spektrophotometrischen Konzentrationsbestimmung der aus den infizierten Zellen gewonnenen Gesamt-RNA-Isolate (vgl. 2.4.1 und 2.4.2, S. 24 ff.) erfolgte eine RT-PCR mit IFN- β spezifischen Primern. Dazu wurden von allen RNA-Isolaten jeweils gleiche Mengen an RNA eingesetzt und die PCR-Bedingungen waren für alle Ansätze dieselben (siehe 2.4.3, S. 27 ff. und 2.4.4, S. 29 ff.). In der RT-PCR unter Verwendung von RNA aus RVFV Clone 13-infizierten Zellen konnte anhand der anschließend durchgeführten Gelelektrophorese ein IFN- β -spezifisches Amplifikat nachgewiesen werden (siehe Abb. 9, S. 62). Nach Infektion mit RVFV Clone 13 kommt es also zu einer Aktivierung der IFN- β -Expression. Die entsprechenden RT-PCRs unter Verwendung von RNA aus TRBV- und KEMV-infizierten HEK293-Zellen ergaben hingegen kein derartiges Amplifikat, d.h. hier erfolgte keine Aktivierung der IFN- β -Expression. Auch nach Koinfektion mit RVFV Clone 13 und TRBV bzw. KEMV kommt es nicht zur Aktivierung der IFN- β -Expression, da in den entsprechenden RT-PCR-Ansätzen keine IFN- β -spezifischen Amplifikate nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 9, S. 62).

Offenbar unterdrücken TRBV und KEMV aktiv die RVFV Clone 13 vermittelte IFN- β -Induktion.

Um sicherzustellen, dass die RNA-Isolate frei von genomischer DNA der HEK293-Zellen waren, die das RT-PCR-Ergebnis hätten verfälschen können, wurde sowohl vor als auch nach der reversen Transkription der RNA eine Kontroll-PCR mit γ -Aktin-spezifischen Primern durchgeführt. Dabei darf es nur nach reverser Transkription zur Entstehung eines Amplifikationsprodukts kommen, andernfalls liegt eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA der Zelle vor. Wie gewünscht zeigte das Gelelektrophoresebild nach PCR mit RNA als Template keine spezifischen Banden für Transkripte des humanen γ -Aktins. Lediglich die eingesetzten Primer konnten detektiert werden (Abb. 10 links, S. 63). Die Kontrolle der entsprechenden cDNAs zeigte erwartungsgemäß γ -Aktin-Amplifikate (Abb. 10 rechts, S. 63). Somit war die isolierte RNA frei von genomischer DNA, die das Ergebnis hätte verfälschen können.

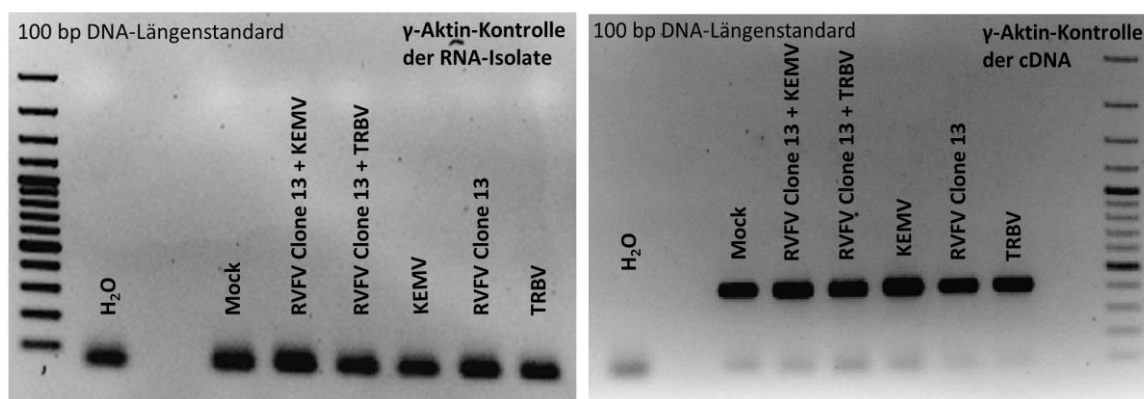


Abb. 10. Gelelektrophoresebilder der γ -Aktin-spezifischen PCR-Amplifikate unter Verwendung von Gesamt-RNA aus infizierten HEK293-Zellen (linke Abbildung) bzw. nach deren Umschreibung in cDNA (rechte Abbildung). Beschriftung innerhalb der Abbildung (v.l.n.r): H₂O: Einsatz von ddH₂O als Negativkontrolle (anstelle des nukleinsäurehaltigen Probematerials). „Mock“: Nichtinfizierte Zellen. „RVFV Clone 13 + KEMV“: Nach Koinfektion mit RVFV Clone 13 und KEMV. „RVFV Clone 13 + TRBV“: Nach Koinfektion mit RVFV Clone 13 und TRBV. „KEMV“: Nach Einzelinfektion mit KEMV. „RVFV Clone 13“: Nach Einzelinfektion mit RVFV Clone 13. „TRBV“: Nach Einzelinfektion mit TRBV.

Desweiteren wurden nach der cDNA-Synthese Virusnachweise mittels PCR durchgeführt, um ausschließen zu können, dass die fehlende Aktivierung der Interferon- β Expression auf mangelnde Virusreplikationen innerhalb der Zellen zurückzuführen ist. Das Elektrophoresebild zeigt, dass es in allen infizierten Zellen zu einer effizienten virusspezifischen RNA-Synthese gekommen ist, sowohl in den Einzel- als auch in den Doppelinfektionen (Abb. 11, S.64). Sowohl das TRBV als auch das KEMV verhindert

also nicht die Synthese von RVFV Clone13-RNA. Dennoch wird das Interferonsystem in den Zellen nicht aktiviert, da man keine IFN- β -spezifischen Amplifikationsprodukte erhält. Dies spricht für eine aktive Unterdrückung der IFN- β -Synthese.

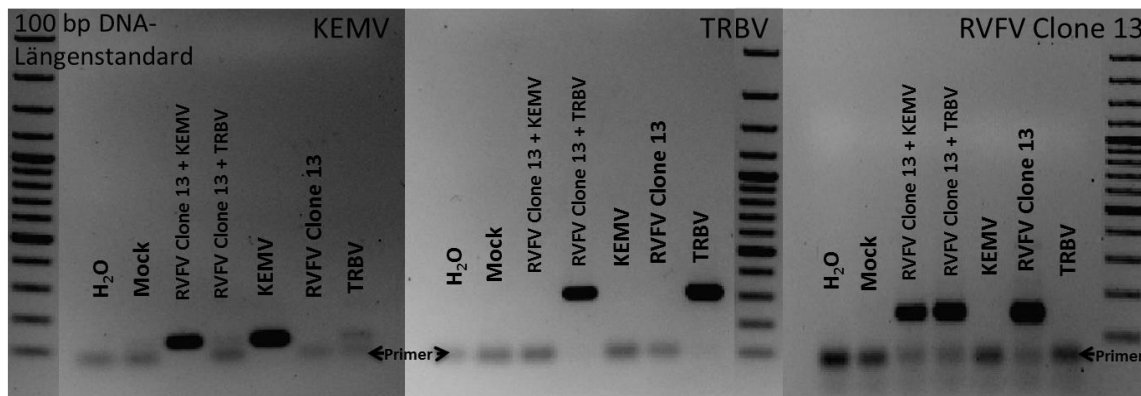


Abb. 11. Gelelektrophoresebilder der virusspezifischen Amplifikate (links KEMV, mittig TRBV, rechts RVFV Clone 13) nach RT-PCR unter Verwendung von Gesamt-RNA der infizierten HEK293-Zellen. Beschriftung innerhalb der Abbildung (v.l.n.r): H₂O: Einsatz von ddH₂O anstelle des nukleinsäurehaltigen Probematerials als Negativkontrolle. „Mock“: Nichtinfizierte Zellen. „RVFV Clone 13 + KEMV“: Nach Koinfektion mit RVFV Clone 13 und KEMV. „RVFV Clone 13 + TRBV“: Nach Koinfektion mit RVFV Clone 13 und TRBV. „KEMV“: Nach Einzelinfektion mit KEMV. „RVFV Clone 13“: Nach Einzelinfektion mit RVFV Clone 13. „TRBV“: Nach Einzelinfektion mit TRBV.

3.1.2 IFN- β -Sandwich-ELISA

In 3.1.1 (S. 61 ff.) erfolgte der Nachweis von IFN- β -Transkripten in RVFV Clone 13-infizierten HEK293-Zellen sowie der Nachweis des Fehlens dieser Transkripte unter Koinfektion mit TRBV bzw. KEMV. Um zu überprüfen, ob diese Hemmung der IFN- β -Expression auf RNA-Ebene auch auf Protein-Ebene nachzuweisen ist, wurde ein IFN- β -ELISA mit den Kulturmedienüberständen infizierter HEK293-Zellen durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist im Methodenteil unter 2.4.14 näher beschrieben.

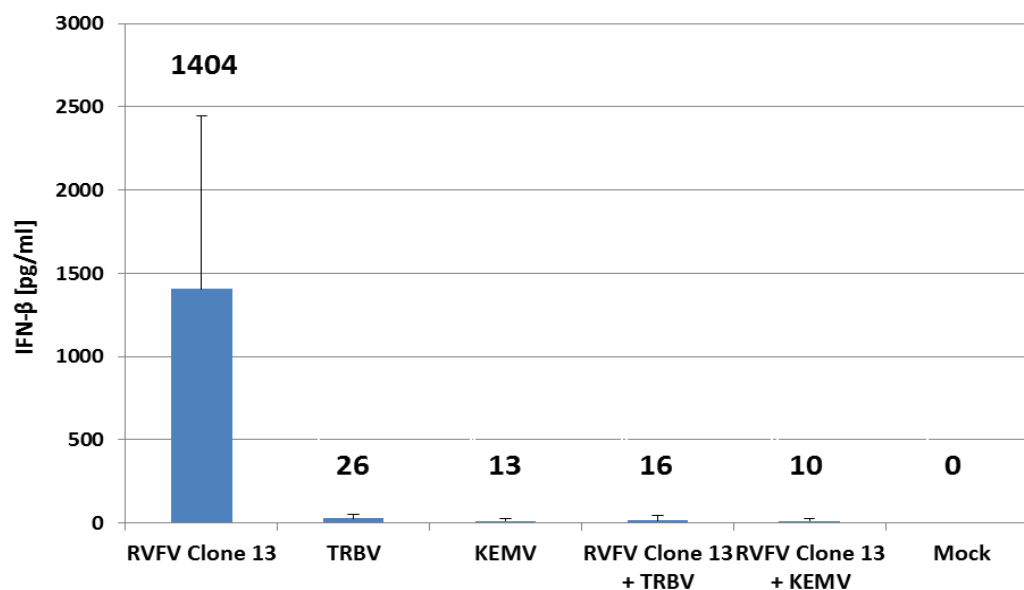


Abb. 12. Menge an freigesetztem IFN- β aus HEK293-Zellen nach Infektion mit RVFV Clone 13, TRBV, KEMV sowie Koinfektionen. Infektionszeit: 24 Stunden. MW aus drei Versuchen. Beschriftung innerhalb der Abbildung (v.l.n.r): „RVFV Clone 13“: Nach Einzelinfektion mit RVFV Clone 13. „TRBV“: Nach Einzelinfektion mit TRBV. „KEMV“: Nach Einzelinfektion mit KEMV. „RVFV Clone 13 + TRBV“: Nach Koinfektion mit RVFV Clone 13 und TRBV. „RVFV Clone 13 + KEMV“: Nach Koinfektion mit RVFV Clone 13 und KEMV. „Mock“: Nichtinfizierte Zellen.

Wie Abb. 12 (S. 65) zeigt, fand - kongruent zu den Ergebnissen aus 3.1.1 (S. 61 ff.) - nach Infektion mit RVFV Clone 13 eine starke Interferonfreisetzung aus den HEK293-Zellen statt. Nach TRBV bzw. KEMV-Infektion wurde in dem dreifach durchgeführten Versuch im Mittel 81-mal weniger IFN- β ausgeschüttet. Aber auch unter TRBV-Koinfektion – zusammen mit dem Interferon-induzierenden RVFV Clone 13 – kam es mit 16 pg/ml ebenfalls nur zu einer sehr geringen IFN- β -Freisetzung. Gleiches gilt für die Koinfektion mit KEMV (10 pg/ml). Dies ist 88- bzw. 140-mal weniger als in der Einzelinfektion mit RVFV Clone 13. Somit war, wie in den RT-PCR-Untersuchungen (vgl. 3.1.1, S. 61 ff.), auch hier die Unterdrückung der Interferon- β -Induktion zu beobachten, sowohl in der Einzel- als auch in der Doppelinfektion zusammen mit RVFV Clone 13.

3.1.3 Quantitativer Virusnachweis mittels TCID₅₀-Test

Da die in 3.1.1 (S. 61 ff.) durchgeführten Virusnachweise mittels RT-PCRs lediglich auf RNA-Ebene stattfanden, wurden zusätzlich die Virustiter der infektiösen Kulturmedienüberstände am Ende der Inkubationszeit mit Hilfe eines TCID₅₀-Tests bestimmt (nach 2.3.2, S. 21 ff.). Nach Einfachinfektion zeigte das RVFV Clone 13 mit $5,9 \times 10^6$ TCID₅₀-Einheiten/ml eine relativ hohe Replikationsrate (siehe Abb. 13, S. 67). Im Vergleich replizierte TRBV mit $1,1 \times 10^6$ Einheiten/ml ähnlich gut, KEMV dagegen mit 6×10^3 TCID₅₀/ml weniger gut in den HEK293-Zellen. Nach Koinfektion der Zellen (mit RVFV Clone 13 und TRBV) lag der Titer der Kulturmedienüberstände mit $1,6 \times 10^6$ TCID₅₀/ml ähnlich hoch wie bei der TRBV-Einzelinfektion. Die Koinfektion mit RVFV Clone 13 und KEMV zeigte mit $1,1 \times 10^6$ TCID₅₀/ml einen deutlich höheren Gesamtvirustiter als die KEMV-Einzelinfektionen. Offenbar kommt es nach Koinfektionen mit KEMV und RVFV-Clone 13 nicht zu einer Replikationshemmung des RVFV Clone 13. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass das Ausbleiben einer IFN- β -Reaktion der HEK293-Zellen unter Doppelinfektion (siehe 3.1, S. 61 ff. und 3.1.2, S. 64 ff.) aus einer aktiven Inhibition der IFN- β -Induktion durch TRBV- bzw. KEMV-Bestandteile oder -Genprodukte resultiert. Einen ammenartigen Effekt seitens TRBV bzw. KEMV auf die RVFV Clone13-Replikation scheint es allerdings nicht zu geben, da sonst der Virustiter in den Kulturmedienüberständen der Koinfektionen höher wäre als bei den ausschließlich RVFV Clone 13-infizierten Zellen.

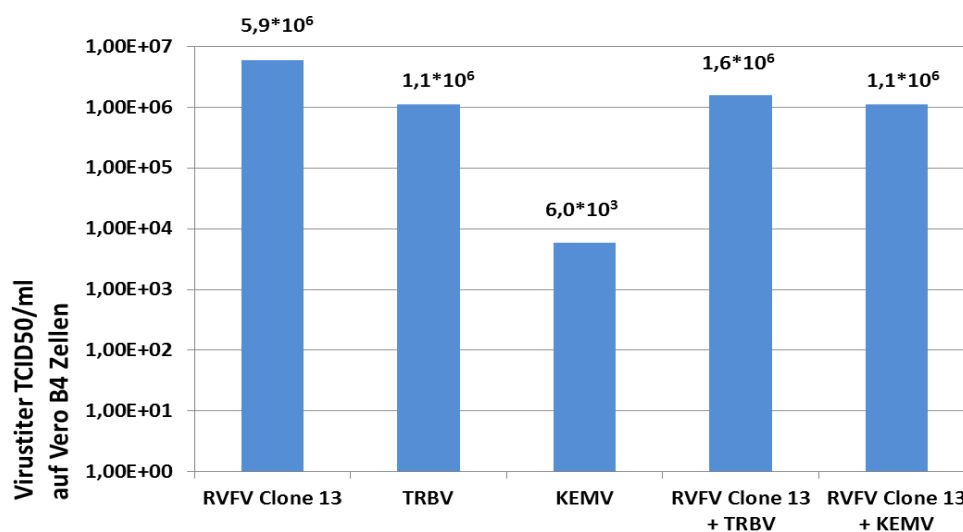


Abb. 13. TCID₅₀-Virustiterbestimmung in den Kulturmedienüberständen RVFV Clone 13-, TRBV- und KEMV-infizierter HEK293-Zellen nach 24-stündiger Infektionszeit. Austitration auf Vero B4-Zellen. Angabe in TCID₅₀-Einheiten pro Milliliter. MW aus drei Versuchen. Dekadisch logarithmische Darstellung. Beschriftung innerhalb der Abbildung (v.l.n.r): „RVFV Clone 13“: Nach Einzelinfektion mit RVFV Clone 13. „TRBV“: Nach Einzelinfektion mit TRBV. „KEMV“: Nach Einzelinfektion mit KEMV. „RVFV Clone 13 + TRBV“: Nach Koinfektion mit RVFV Clone 13 und TRBV. „RVFV Clone 13 + KEMV“: Nach Koinfektion mit RVFV Clone 13 und KEMV.

3.2 Zytopathische Wirkung von TRBV und KEMV nach Einzelinfektion sowie nach Koinfektion mit dem interferoninduzierenden RVFV Clone 13

3.2.1 Zellwachstumsverläufe von HEK293-Zellen nach TRBV-, KEMV- und RVFV Clone 13-Einzelinfektion

Nach dem in 2.4.15, S. 54 ff. beschriebenen Schema wurde mit Hilfe der xCELLigence-Realtime-Zellanalyseplattform der Firma Roche in diesem Versuch das Wachstumsverhalten von HEK293-Zellen nach verschiedenen Virusinfektionen untersucht. Die Kurven stellen, wie in 2.4.15 (S. 54 ff.) beschrieben, die Vitalität der Zellen anhand der Zellindices (y-Achse) im zeitlichen Verlauf (x-Achse) dar. Die verwendeten humanen embryonalen Nierenzellen HEK293 (vgl. 2.2.1, S. 15 ff.) besitzen ein funktionelles TypI-IFN-System, sodass sie beispielsweise auf das interferoninduzierende Rift Valley Fever Virus Clone 13 mit der Etablierung eines antiviralen Zustandes reagieren können.

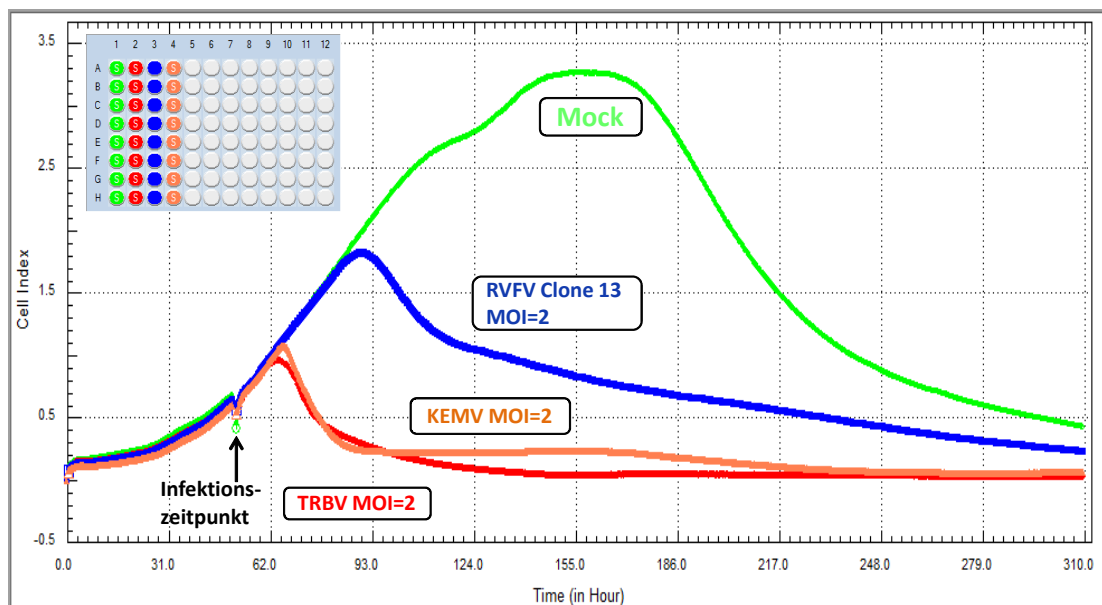


Abb. 14. Infektion von HEK293-Zellen mit TRBV, KEMV und RVFV Clone 13 jeweils mit einer MOI von 2 TCID₅₀-Einheiten (siehe Beschriftungen innerhalb der Abbildung). „Mock“=Nicht-infizierte Zellen. Y-Achse: Zellindex (Maß der Zellviabilität), dargestellt als relative Einheiten (basierend auf der gemessenen Impedanz). X-Achse: Zeit in Stunden. (Vgl. auch 2.4.15, S. 54 ff.)

Die RVFV Clone 13-infizierten Zellen (blaue Kurve in Abb. 14, S. 68) starben im Vergleich zu den TRBV- bzw. KEMV-infizierten Zellen (rote bzw. orangefarbene Kurve) nach der Infektion weniger schnell. Die Zelldichte blieb zwar unter jener der uninfizierten Zellen („Mock“), jedoch war sie deutlich höher als die Zelldichte der TRBV- oder KEMV-infizierten Zellen. Deren Wachstumsverlauf (untere zwei Kurven) war nach dem Infektionszeitpunkt nur kurzzeitig ansteigend. Bereits 16 Stunden nach Infektion setzte ein zytopathischer Effekt ein. Nach weiteren 16 Stunden waren bereits die meisten Zellen abgestorben. Etwa 100 Stunden nach Einsetzen des CPEs erreichte der Zellindex der TRBV-infizierten Zellen (rote Kurve) den Nullpunkt, etwa 90 Stunden danach der Zellindex der KEMV infizierten Zellen (orangefarbene Kurve).

3.2.2 Zellwachstumsverläufe von HEK293-Zellen nach RVFV Clone 13-Einzelninfektion mit höherer MOI sowie nach Koinfektion mit TRBV und KEMV

Anders als im vorherigen Versuch wurde die RVFV Clone 13-Infektion hier mit einer zehnfach höheren MOI (20 TCID₅₀-Einheiten) durchgeführt (Abb. 16, S. 70). Außerdem wurden Doppelninfektionen angefertigt, bei denen der Interferon-induzierende RVFV Clone13 zusammen mit TRBV bzw. KEMV inokuliert wurde (nach 2.4.15.2, S. 55 ff.). Dabei wurde jeweils mit einer MOI von 2 TCID₅₀-Einheiten TRBV bzw. KEMV und RVFV-Clone 13 sowie in einem weiteren Ansatz mit der gleichen MOI TRBV bzw. KEMV, jedoch 20 TCID₅₀-Einheiten RVFV Clone 13 infiziert (siehe Beschriftung innerhalb der Abbildungen; Abb. 15, S. 70 und Abb. 16, S. 70).

Nach RVFV-Einzelninfektion mit einer Konzentration von 20 TCID₅₀-Einheiten zeigte sich eine ähnliche Wachstumskurve wie bei jenen Zellen, die mit einer MOI von 2 infiziert worden waren (vgl. Abb. 15, S. 70 und Abb. 16, S. 70; jeweils blaue Kurven). Trotz Infektion mit einer zehnfach erhöhten RVFV Clone 13-Virusmenge zeigten die Zellen somit auch in diesem Versuch ein deutlich besseres Wachstumsverhalten als es die TRBV- bzw. KEMV-infizierten Zellen taten (rote und orangefarbene Kurven in Abb. 15, S. 70 und Abb. 16, S. 70). Allerdings wuchsen die mit höherer MOI RVFV Clone13-infizierten Zellen, nach anfänglich schneller einsetzendem CPE (28 Stunden statt 40 Stunden *post infectionem*), wieder weiter (etwa ab Stunde 100 auf der X-Achse, 50 Stunden *post infectionem*; Abb. 16, S. 70). Trotz Koinfektion mit dem Interferon-induzierenden RVFV Clone 13 waren TRBV und KEMV in beiden Versuchsansätzen in der Lage, einen raschen CPE zu erzeugen (rot- und orangefarbene Kurven, Abb. 15, S. 70 und Abb. 16, S. 70). Vielmehr setzte der CPE hier sogar früher ein als in den Einzelninfektionen (vgl. Abb. 14, S. 68). Er setzte in den mit höherer RVFV Clone 13-MOI (MOI=20) koinfizierten Zellen bereits nach etwa 13 Stunden ein (Abb. 16, S. 70). In den Zellen, die mit einer MOI von lediglich 2 TCID₅₀-Einheiten RVFV Clone 13 koinfiziert wurden, setzte der CPE erst nach etwa 14,5 Stunden ein (Abb. 15, S. 70). Offenbar erfolgt die Zellschädigung umso schneller, je mehr RVFV Clone 13 für die Koinfektion eingesetzt wird. Der weitere Wachstumskurvenverlauf der koinfizierten Zellen war, unabhängig von der eingesetzten Virusmenge an RVFV Clone 13, in beiden Versuchen sehr ähnlich.

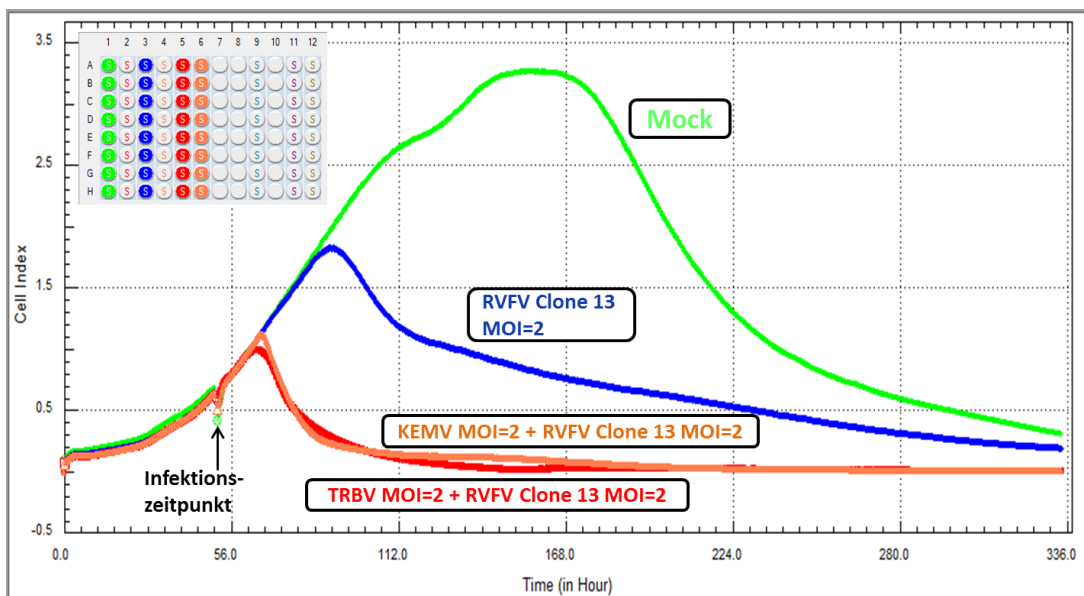


Abb. 15. Infektion von HEK293-Zellen mit RVFV Clone13 einer MOI von 2 $TCID_{50}$ -Einheiten, sowie Koinfektionen zusammen mit TRBV bzw. KEMV einer MOI von 2 $TCID_{50}$ -Einheiten (siehe Beschriftungen innerhalb der Abbildung). „Mock“=Nicht-infizierte Zellen. Y-Achse: Zellindex (Maß der Zellviabilität), dargestellt als relative Einheiten (basierend auf der gemessenen Impedanz). X-Achse: Zeit in Stunden. (Vgl. auch 2.4.15, S. 54 ff.)

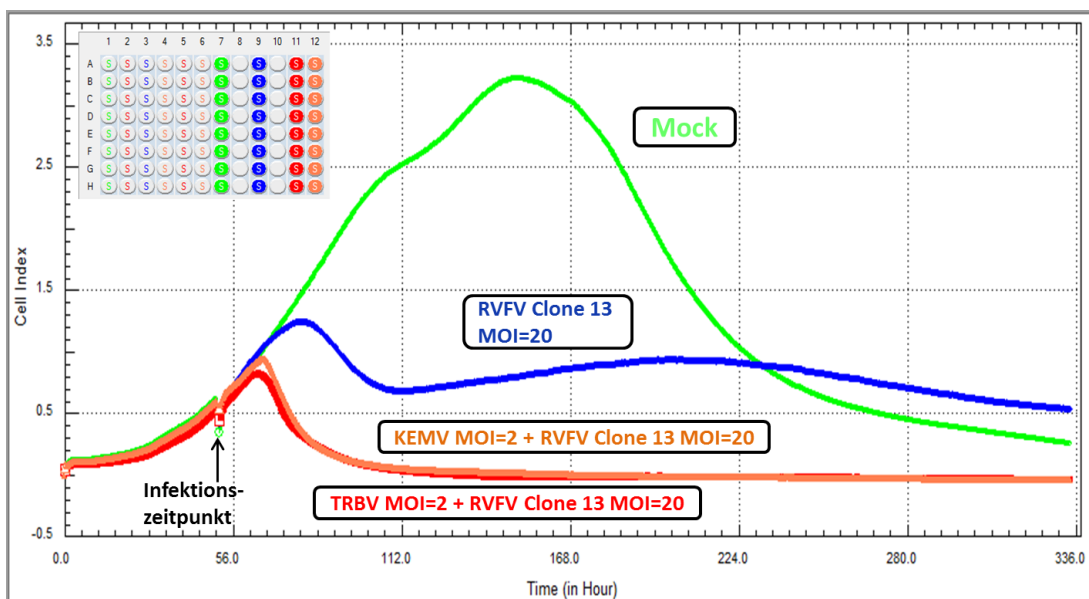


Abb. 16. Infektion von HEK293-Zellen mit RVFV Clone 13 einer MOI von 20 $TCID_{50}$ -Einheiten, sowie Koinfektionen zusammen mit TRBV bzw. KEMV einer MOI von 2 $TCID_{50}$ -Einheiten (siehe Beschriftungen innerhalb der Abbildung). „Mock“=Nicht-infizierte Zellen. Y-Achse: Zellindex (Maß der Zellviabilität), dargestellt als relative Einheiten (basierend auf der gemessenen Impedanz). X-Achse: Zeit in Stunden. (Vgl. auch 2.4.15, S. 54 ff.)

3.3 Klonierung von Expressionsplasmiden für die TRBV-Segmente 2 und 3

Für die erstmals auf diese Weise durchgeführte Klonierung von pI.18-Expressionsplasmiden für die TRBV-Segmente 2 und -3, wurde aus TRBV-infizierten Verozellen isolierte TRBV-RNA (nach 2.4.1, S. 24 ff.), unter Verwendung von Superscript III Reverser Transkriptase und Random Hexamer Primern, in cDNA umgeschrieben (nach 2.4.3, S. 27 ff.). Mittels spezifischer PCR-Primer (siehe 2.4.4, S. 29 ff.) wurde daraufhin die dem TRBV-Segment 2 bzw. -3 (= RNA) entsprechende cDNA-Region ohne ihre untranslatierten Regionen amplifiziert (im Folgenden als „TRBV-Segment 2 bzw. -3“ bezeichnet).

TRBV-Segment 2 wurde mit der PfuUltraII Fusion HS DNA Polymerase von Stratagene amplifiziert. TRBV-Segment 3 konnte mit der PowerScript Long DNA Polymerase von PAN Biotech amplifiziert werden.

PCR-Schema: Amplifikation der TRBV-Segmente 2 und -3.

(Verwendete Polymerasen: PfuUltraII Fusion HS bzw. PowerScript Long.)

initiale Denaturierung:	95°C	2 min	
Denaturierung:	95°C	30 sek	} 35 Zyklen
Hybridisierung der Primer:	61°C	30 sek	
Elongation:	68°C	3 min	
abschließende Elongation:	68°C	10 min	
Kühlhaltephase:	8°C	Lagerung im Gerät bis zur Entnahme der Proben	

Über ein präparatives TAE-gepuffertes Agarosegel wurden die so vermehrten Virussegmente anschließend separiert (siehe 2.4.5, S. 32 ff. und 2.4.6, S. 34 ff.). Anschließend wurde das jeweilige TRBV-Segment durch TA-Klonierung in pCRII-Plasmidvektoren ligiert, wofür TRBV-Segment 2 allerdings zuvor einem A-Tailing unterzogen werden musste. Dabei werden dem Amplifikat mit Hilfe von Taq-Polymerase 3'-Desoxyadenosinüberhänge (3'-A-Überhänge) angehängt, die für die TA-Klonierung benötigt werden (siehe 2.4.7, S. 35 ff.). Im Falle der PowerScript Long DNA Polymerase

kann auf diesen Schritt verzichtet werden, da dieses Polymerasengemisch bereits 3'-Desoxyadenosinüberhänge produziert. Die rekombinanten pCRII-Plasmide wurden anschließend in kompetente *E. coli*-Bakterien (Stamm INVaF^c) transformiert (siehe 2.4.7, S. 35 ff.). Aufgrund der vektorvermittelten Ampicillinresistenz konnte die Anzucht der Transformanten auf LB-Ampicillin-Agarnährböden erfolgen. Unter Vorbehandlung des Agarnährbodens mit dem chromogenen β -Galaktosidasesubstrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid), und aufgrund der Eignung des pCRII-Vektors und des *E. coli*-Stammes (siehe 2.4.7, S. 35 ff.) konnte ein Blau-Weiß-Screening zur Selektion inserttragender Einzelkolonien durchgeführt werden. Darauf folgte die Minipräparation der Plasmide mit Extraktion über eine silikatbasierte Zentrifugationssäule (siehe 2.4.8, S. 39 ff.). Durch einen analytischen Restriktionsverdau der Plasmide mit TypII-Restriktionsendonukleasen, konnte anhand spezifischer DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese eine erste Aussage über die Qualität der Plasmide getroffen werden (siehe 2.4.9, S. 40 ff.). Geeignete Plasmide wurden dann mit Hilfe der Kettenabbruch-Synthese nach Sanger sequenziert (siehe 2.4.10, S. 43 ff.) und die geeigneten Klone mittels Midipräparation in größerem Maßstab vervielfältigt (siehe 2.4.11, S. 44 ff.). Daraufhin erfolgte die Subklonierung des TRBV-Segments 2 bzw. – 3 in den ebenfalls ampicillinresistenzgen-tragenden pI.18-Plasmidvektor (siehe 2.4.12, S. 45). Dafür wurde das TRBV-Segment 2 mit den TypII-Restriktionsendonukleasen Eco RV und SpeI aus dem pCRII-Vektor ausgeschnitten und Segment 3 durch den Einsatz der TypII-Restriktionsendonukleasen XbaI und SpeI. Nach Separation über ein präparatives Elektrophoresegele (siehe 2.4.5, S. 32 ff.) wurden die TRBV-Segmente in den ebenfalls enzymgeschnittenen und mit alkalischer Phosphatase dephosphorylierten pI.18-Plasmidvektor ligiert (siehe 2.4.12, S. 45 ff.). Für TRBV-Segment 2 wurde der pI.18-Vektor mit XbaI und EcoRV, für TRBV-Segment 3 nur mit XbaI linearisiert. Daraufhin wurden die rekombinanten pI.18-Plasmide in *E. coli*-XL1blue-Bakterien transformiert und in LB-Ampicillin-Flüssigkulturen vervielfältigt, sowie auf Ampicillin-Agarnährböden angezüchtet und bei 4°C eingelagert. Dann folgte aus den Flüssigkulturen die Minipräparation der pI.18-Plasmide, ein analytischer Restriktionsverdau, sowie die Sequenzierung der Inserts (siehe 2.4.8-2.4.10, S. 39 ff.). Das korrekte pI.18-Plasmid wurde dann, ausgehend von den eingelagerten Ampicillin-Agarplatten, mittels Midipräparation vervielfältigt (siehe 2.4.11, S. 44 ff.), sowie abschließend abermals

sequenziert (siehe 2.4.10, S. 43 ff.). Die Expressionsplasmide pI.18-TRBV-Segment 2 und -3 (im Weiteren als „pI.18-TRBV-S2 und -S3“ bezeichnet) wurden in dieser Form für die unter 3.4 (S. 73 ff.) dargestellten Reporter-Assays weiterverwendet. pI.18-TRBV-S2 kodiert für TRBV-VP3 (T2) und pI.18-TRBV-S3 für TRBV-VP4 (CaP) (siehe Tab. 1, S. 6).

3.4 Hemmung der IFN- β -Promotoraktivierung durch TRBV- und KEMV-Proteine

Anhand dualer Luziferase Reporter-Assays (siehe 2.4.13, S. 48 ff.) wurde der Einfluss von selektiv exprimierten Virusproteinen auf die Aktivität des humanen IFN- β -Promotors in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 untersucht. Die in Abschnitt 3.1 (S. 61 ff.) dargestellten Versuche konnten bereits das Ausbleiben einer Interferon- β -Induktion in HEK293-Zellen nach TRBV- und KEMV-Infektion, sowie nach Koinfektion mit RVFV Clone 13, zeigen. Im Falle des TRBV konnten Genprodukte des Genomsegments 9 dafür verantwortlich gemacht werden (Brandt 2012). Um herauszufinden, ob darüberhinaus weitere Genprodukte (anderer TRBV- und KEMV-Segmente) an dieser hemmenden Wirkung auf die IFN- β -Promotoraktivierung beteiligt sind, wurden die unter 2.4.13 (S. 48 ff.) beschriebenen dualen Reporter Assays durchgeführt.

Für den Versuch wurden HEK293-Zellen verwendet, die über ein intaktes TypI-Interferonsystem verfügen. In diese Zellen wurden selektiv klonierte pI.18-Expressionsplasmide durch Lipofektion eingebracht, die für die jeweils zu untersuchenden TRBV- bzw. KEMV-Proteine kodieren (nach 3.3, S. 71 ff. und 2.4.13, S. 48 ff.). Als Kontrollplasmid wurde das pI.18-FLAG-deltaMx-Plasmid transfiziert. Dieses kodiert für ein trunkiertes Mx-Protein. Desweiteren wurden Reporterplasmide in die Zellen kotransfiziert, mit denen die IFN- β -Promotoraktivität sowie die allgemeine Transkriptionsaktivität der Zellen gemessen werden konnte:

Der p125-Luc-Reporter exprimiert in Abhängigkeit der Interferon- β -Promotoraktivität die Leuchtkäfer-Luziferase (Firefly-Luziferase). Hingegen unterliegt die Expression der pI.18-RL-Reporterplasmid-kodierten Renilla-Luziferase dem konstitutiv aktiven HCMV-Promotor (vgl. 2.4.13, S. 48 ff.). In Doppelansätzen, jeweils entsprechend einer Kavitätenplattenhälfte, wurde in die Zellen - ebenfalls durch Lipofektion - Gesamt-RNA

aus Vero E6-Zellen eingebracht, die zwölf Stunden zuvor mit dem Rhabdovirus Vesicular Stomatitis Virus (VSV) infiziert worden waren. Diese RNA wird im Weiteren als „VSV-RNA“ bezeichnet. Sie fungierte als Stimulator für den IFN- β -Promotor. In die Zellen der anderen Kavitätenplattenhälfte wurde hingegen Gesamt-RNA nicht-infizierter Vero E6-Zellen eingebracht, die nicht stimulierend auf den IFN- β -Promotor wirkte. Diese RNA wird im Weiteren kurz als „Vero-RNA“ bezeichnet.

Nach Abschluss des Experiments wurden die Zellen gewaschen, lysiert und nach Zugabe der beiden Luziferasesubstrate (in jeweils einem eigenen Ansatz) luminometrisch gemessen (siehe 2.4.13, S. 48 ff.). Anhand dessen konnte die Aktivität des IFN- β -Promotors sowie des HCMV-Promotors bestimmt werden. Die Transfektion der pI.18-Expressionsplasmide und der Reporterplasmide erfolgte immer 24 Stunden vor der Stimulation mit VSV- bzw. Vero-RNA. Die Zellyse erfolgte 24 Stunden nach der Stimulation. Die Einflüsse der durch die pI.18-Vektoren selektiv in den Zellen exprimierten Virusproteine auf die Aktivität des VSV-RNA-stimulierten IFN- β -Promotors, war anhand der Luziferaseaktivitäten direkt quantifizierbar. Die Signifikanzniveaus in den dargestellten Reporter-Assays wurden mit Hilfe des Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen errechnet. Weitere Details zum Versuchsaufbau sind unter 3.1 (S. 61 ff.) und im Methodenteil in Abschnitt 2.4.7 (S. 35 ff.) und 2.4.11 - 2.4.13 (S. 44 ff.) nachlesbar.

3.4.1 Einfluss der Genprodukte der TRBV-Segmente 2, 3 und 9 auf den humanen Interferon- β -Promotor

In diesem Versuch wurden erstmals die Genprodukte der TRBV-Segmente 2 (kodiert für VP3, inneres Core-Protein) und -3 (kodiert für VP4, Capping-Enzyme) durch die im vorangegangenen Abschnitt 3.4 beschriebenen dualen Luziferase Reporter-Assays untersucht (S. 73 ff.). Da das TRBV-Segment 9-vermittelte IFN- β -promotorinhibitorische Potential bereits bekannt war (Brandt 2012), konnte das pI.18-TRBV-S9-Plasmid hier als Positivkontrolle eingesetzt werden. TRBV-Segment 9 kodiert für VP6 (Helikase) und vermutlich für eines oder mehrere weitere Proteine, deren genaue Funktion noch unbekannt ist. Sie werden durch die offenen Leserahmen ORFXa, -b und -c innerhalb des helikasekodierenden Bereichs kodiert (vgl. 1.1.2.1, S. 5 ff.). Die Stimulation mit VSV-RNA bewirkte in den Zellen, die das Kontrollplasmid (pI.18-FdMx) enthielten, im Mittel

einen 31,6-fachen Anstieg der IFN β -Promotoraktivität (siehe Abb. 17 Mitte, S. 77). Dies ist nach dem Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen mit $p=0,04$ als signifikant zu werten. Obwohl die mit Vero-RNA stimulierten Zellen, die das pI.18-TRBV-Segment 9 enthielten, im Durchschnitt eine etwas höhere IFN- β -Promotoraktivität zeigten als die anderen Vero-RNA stimulierten Zellen, ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied darin. Alle Vero-RNA stimulierten Zellen, die in Abb. 17 dargestellt sind (alle grünen Balken), wiesen somit eine ähnliche Grundaktivität des IFN- β -Promotors auf.

Die Aktivität des IFN- β -Promotors war in den Zellen, in denen die Genprodukte des TRBV-Segments 9 exprimiert wurden, nach Stimulation mit VSV-RNA erwartungsgemäß signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrolle pI.18-FdMx (siehe Abb. 17 oben, S. 77 ff.) (mit $p=0,001$ sogar hoch signifikant niedriger). Die Genprodukte des TRBV-Segments 9 vermittelten also einen deutlich inhibitorischen Effekt auf die durch VSV-RNA-Transfektion vermittelte IFN- β -Promotoraktivierung. Der Anstieg der Promotoraktivität durch die Stimulation lag durchschnittlich bei 2,0-fach. Im Vergleich dazu betrug der Anstieg der Kontrolle 31,6-fach (siehe Abb. 17 Mitte, S. 77 ff.). Die Zellen, in denen das durch TRBV-Segment 2 kodierte VP3-Protein (inneres Core-Protein) exprimiert wurde, zeigten nach der Stimulation mit VSV-RNA ebenfalls eine geringere IFN- β -Promotoraktivität als die Kontrolle pI.18-FdMx. Verglichen mit der Kontrolle war dies mit $p=0,02$ sehr signifikant (siehe Abb. 17 oben). Allerdings liegt die allgemeine Proteinsyntheseaktivität bzw. die Aktivität des konstitutiv aktiven HCMV-Promotors (gemessen anhand der Renilla-Luziferaseaktivität) in diesen Zellen deutlich unter den Werten der Kontrolle (siehe Abb. 17 unten). Daher müssen die Firefly-Luziferasewerte (Abb. 17 oben) dementsprechend zurückhaltend bewertet werden. Die Zellen, in denen das durch TRBV-Segment 3 kodierte VP4-Protein (CaP) exprimiert wurde, wiesen nach der Stimulation mit VSV-RNA zwar eine geringere IFN- β -Promotoraktivität als die Kontrolle pI.18-FdMx auf. Allerdings stellte dies mit $p=0,05$ keinen signifikanten Unterschied dar (siehe Abb. 17 oben). Zudem war die Proteinsynthese auch in diesen Zellen deutlich niedriger als in der Kontrolle, was anhand der Renilla-Luziferasewerte deutlich wurde (siehe Abb. 17 unten).

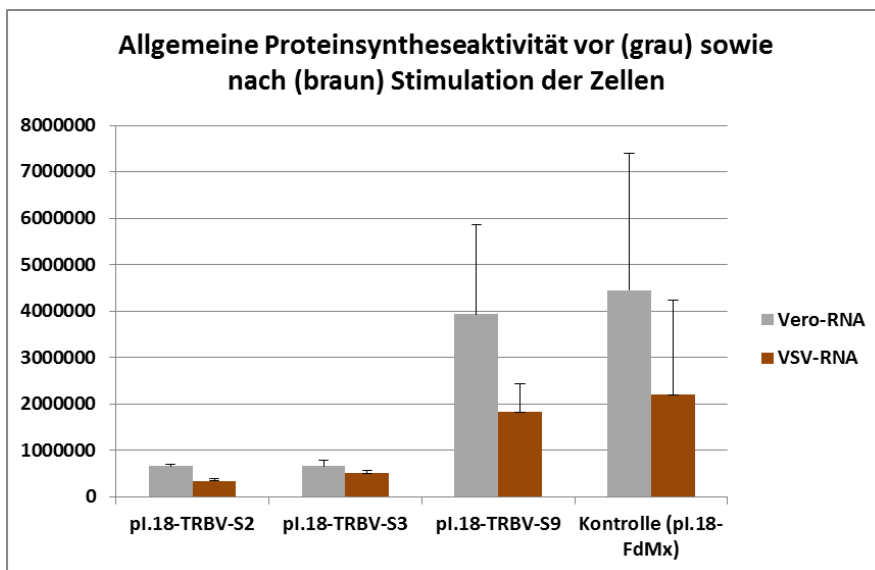
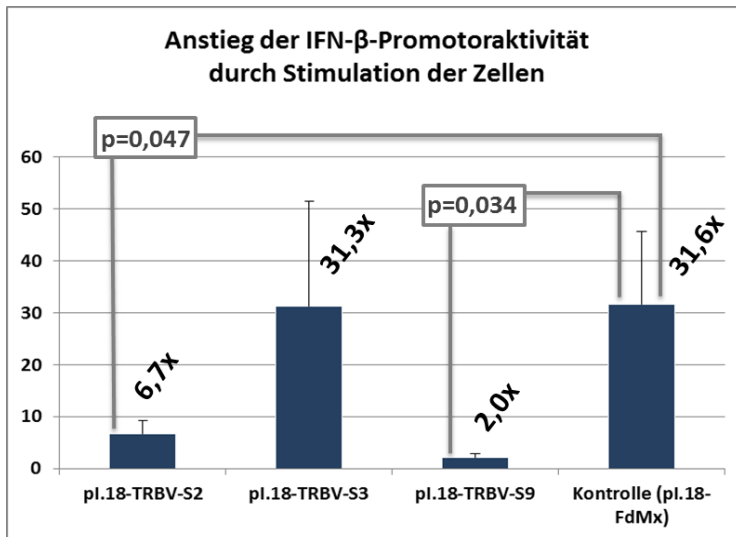
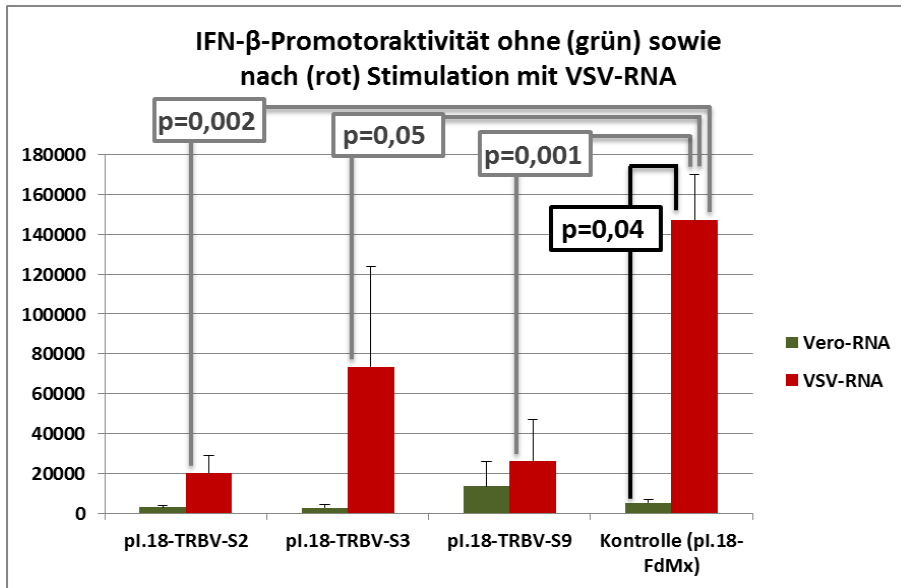


Abb. 17. *Oben: IFN- β -Promotoraktivität (Firefly-Luziferaseaktivität) in unstimulierten Zellen (grün) bzw. nach Stimulation des IFN- β -Promotors durch VSV-RNA (rot). Relative Werte.*

Mitte: Daraus errechnete Aktivierung des IFN- β -Promotors (Verhältnis der IFN- β -Promotoraktivität nach Stimulation mit VSV-RNA zu IFN- β -Promotoraktivität nach Stimulation mit Vero-RNA).

Unten: HCMV-Promotoraktivität (Renilla-Luziferaseaktivität) in unstimulierten Zellen (grau) bzw. nach Stimulation (braun). Relative Werte.

In die Zellen wurden vor der Stimulation verschiedene Vektoren zur Expression von TRBV-Proteinen transfiziert. Untersucht wurden pI.18-TRBV-S2 (kodiert für VP3, inneres Core-Protein), pI.18-TRBV-S3 (kodiert für VP4, CaP), pI.18-TRBV-S9 (kodiert für VP6, Hel und ggf. ORFX-Sequenzen) in HEK293-Zellen (vgl. 1.1.2.1, S. 5 ff.). Als Kontrolle wurde das Plasmid pI.18-FdMx eingesetzt, welches für ein trunkiertes Mx-Protein kodiert (siehe 2.4.13, S. 48 ff.). MW aus drei Versuchen.

3.4.2 Einfluss der Genprodukte des TRBV-Segments 4 und des KEMV-Segments 9 auf den humanen Interferon- β -Promotor

Ebenfalls zum ersten Mal auf diese Weise untersucht wurden das TRBV-Segment 4 (NS1, tubuläre Strukturen formendes Protein) sowie das KEMV-Segment 9, welches ähnlich dem TRBV-Segment 9 für die virale Helikase (VP6) kodiert. Allerdings weist es, im Gegensatz zu den drei kurzen überlappenden offenen Leserahmen des TRBV (ORFXa, -b und -c), im helikasekodierenden Bereich lediglich zwei überlappende offene Leserahmen (ORFXa und -b) auf (vgl. 1.1.2.1, S. 5 ff.).

Die Stimulation mit VSV-RNA bewirkte in den Zellen, die das Kontrollplasmid (pI.18-FdMx) enthielten, im Mittel einen 43,7-fachen Anstieg der IFN- β -Promotoraktivität (siehe Abb. 18 Mitte, S. 80 ff.). Somit ist die Stimulation durch VSV-RNA nach dem Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen mit $p=0,02$ als signifikant zu werten. Alle unstimulierten, also mit Vero-RNA transfizierten Zellen, die in Abb. 18 dargestellt sind (alle grünen Balken), zeigten keinen signifikanten Unterschied ihrer IFN- β -Promotoraktivität. Somit ist die Grundaktivität des IFN- β -Promotors in diesen Zellen ähnlich.

Die Zellen, in denen das durch TRBV-Segment 4 kodierte NS1 (TuP) exprimiert wurde, zeigten nach Stimulation mit VSV-RNA im Vergleich zur Kontrolle keine signifikant geringere IFN- β -Promotoraktivität ($p=0,07$) (siehe Abb. 18 oben, S. 80 ff.). Ebenso wenig wiesen die Zellen, in denen die Genprodukte des KEMV-Segments 9, also Helikase sowie ggf. ORFX-a und -b-Sequenzen (vgl. 1.1.2.1, S. 5 ff.), exprimiert wurden, nach

Stimulation mit VSV-RNA eine geringere IFN- β -Promotoraktivität als die Kontrolle pI.18-FdMx auf. Sie lag in diesem Fall sogar deutlich über der IFN- β -Promotoraktivität der Kontrolle (siehe Abb. 18 oben). Allerdings lag die allgemeine Proteinsyntheseaktivität bzw. die Aktivität des konstitutiv aktiven HCMV-Promotors (gemessen anhand der Renilla-Luziferaseaktivität) in diesen Zellen deutlich über den Werten der Kontrolle (siehe Abb. 18 unten). Daher müssen die Firefly-Luziferasewerte (siehe Abb. 18 oben) dementsprechend zurückhaltend bewertet werden. Das hier erneut als Positivkontrolle genutzte TRBV-Segment 9 wirkte, wie bereits in 3.4.1 (S. 74 ff.), signifikant inhibitorisch auf die VSV-RNA vermittelte Aktivierung des IFN- β -Promotors ($p=0,04$) (siehe Abb. 18 oben).

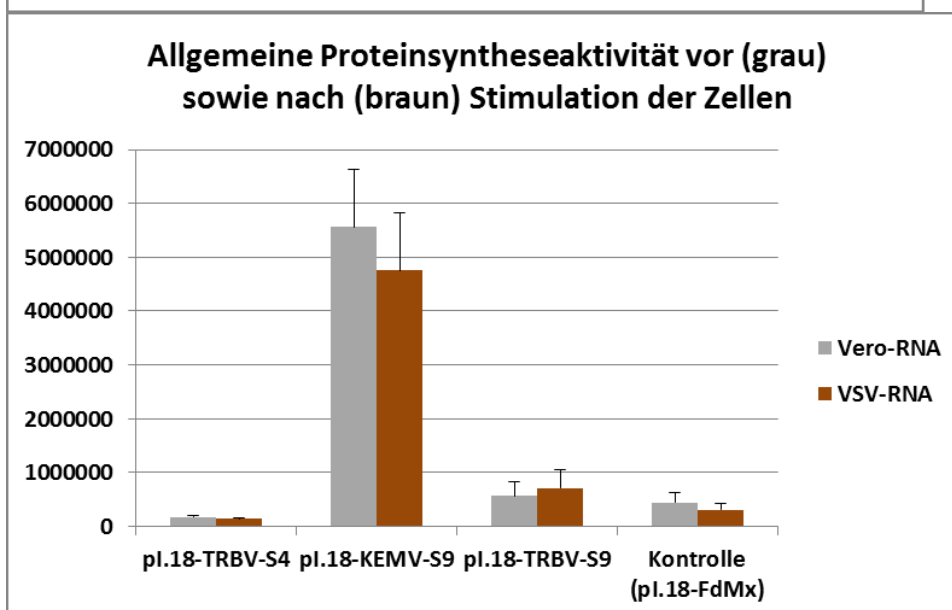
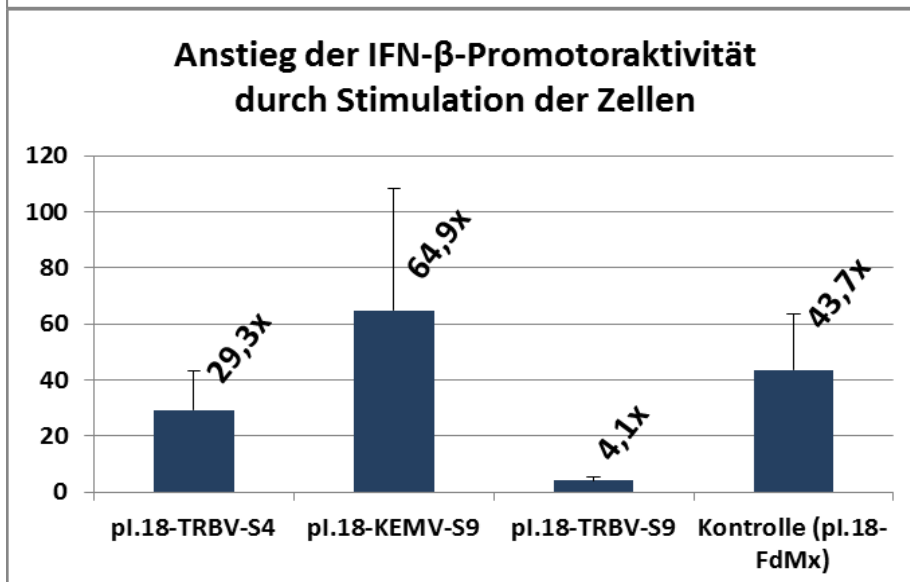
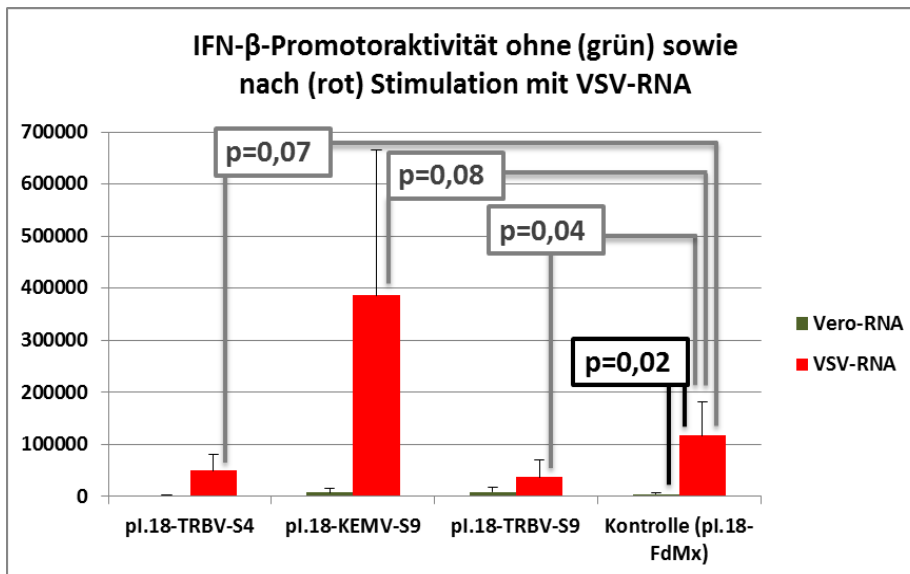


Abb. 18. Oben: IFN- β -Promotoraktivität (Firefly-Luziferaseaktivität) in unstimulierten Zellen (grün) bzw. nach Stimulation des IFN- β -Promotors durch VSV-RNA (rot). Relative Werte. Mitte: Daraus errechnete Aktivierung des IFN- β -Promotors (Verhältnis der IFN- β -Promotoraktivität nach Stimulation mit VSV-RNA zu IFN- β -Promotoraktivität nach Stimulation mit Vero-RNA). Unten: HCMV-Promotoraktivität (Renilla-Luziferaseaktivität) in unstimulierten Zellen (grau) bzw. nach Stimulation (braun). Relative Werte.

In die Zellen wurden vor der Stimulation verschiedene Vektoren zur Expression von TRBV- bzw. KEMV-Proteinen transfiziert. Untersucht wurden pI.18-TRBV-S4 (kodiert für NS1, TuP), pI.18-KEMV-S9 (kodiert für VP6, Hel und ggf. ORFX-Sequenzen), pI.18-TRBV-S9 (kodiert für VP6, Hel und ggf. ORFX-Sequenzen) in HEK293-Zellen (vgl. 1.1.2.1, S. 5 ff.). Als Kontrolle wurde das Plasmid pI.18-FdMx eingesetzt, welches für ein trunkiertes Mx-Protein kodiert (siehe 2.4.13, S. 48 ff.). MW aus vier Versuchen.

3.4.3 Einfluss einzelner Genprodukte des TRBV-Segments 9 auf den humanen Interferon- β -Promotor

Wie bereits mehrfach beschrieben, kodiert das TRBV-Segment 9 neben der viralen Helikase für weitere Proteine, deren Funktion noch weitgehend unbekannt ist. Sie werden durch die drei überlappenden offenen Leserahmen ORFXa, -b und -c innerhalb des helikasekodierenden Bereichs kodiert (vgl. 1.1.2.1, S. 5 ff.). Da die ORFXa-Sequenz innerhalb des Orbiviren-Stammes hoch konserviert ist, spielt sie anscheinend eine entscheidende Rolle für das Virus (Ratinier et al. 2011). Außerdem ist sie vom stärksten AUG-Kontext aller drei ORFX-Sequenzen umgeben (Dilcher et al. 2012). Für das TRBV-verwandte Bluetongue-Virus (BTV) konnte bereits die Relevanz des ORFXa-Proteins (NS4) im Sinne eines Replikationsvorteils in IFN-vorbehandelten Zellen nachgewiesen werden (Ratinier et al. 2011). Um die Rolle des ORFXa-Proteins zu untersuchen, wurden in diesem Versuch die virale Helikase (VP6) und das Genprodukt der ORFXa-Sequenz getrennt voneinander auf ihre IFN β -inhibitorische Potenz untersucht, und mit jener der Genprodukte des kompletten TRBV-Segments 9 verglichen.

Die Stimulation mit VSV-RNA bewirkte in den Zellen, die das Kontrollplasmid (pI.18-FdMx) enthielten, im Mittel einen 26,8-fachen Anstieg der IFN- β -Promotoraktivität (siehe Abb. 19 Mitte, S. 83 ff.). Sie ist nach dem Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen mit $p=0,01$ als signifikant zu werten. Alle mit Vero-RNA stimulierten Zellen, die in Abb. 19 dargestellt sind (alle grünen Balken), zeigten keinen signifikanten Unterschied ihrer IFN- β -Promotoraktivität. Somit ist die Grundaktivität des IFN- β -Promotors in diesen Zellen ähnlich.

Die Zellen, in denen das komplette TRBV-Segment 9 exprimiert wurde, zeigten wie bereits in 3.4.1 und 3.4.2 (S. 74 ff.) nach Stimulation mit VSV-RNA im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant geringere IFN- β -Promotoraktivität ($p=0,02$) (siehe Abb. 19 oben, S. 83 ff.). Jedoch konnte weder durch Transfektion der TRBV-Helikase- noch der TRBV-ORFXa-Expressionsplasmide ein signifikant inhibitorischer Einfluss auf die VSV-RNA vermittelte Aktivierung des IFN- β -Promotors im Vergleich zur Kontrolle (pI.18-FdMx) festgestellt werden (siehe Abb. 19 oben). Die TRBV-Helikase bewirkte vielmehr eine signifikante Steigerung der allgemeinen Proteinsynthese, was anhand der Renilla-Luziferasewerte (entsprechend der HCMV-Promotoraktivität) deutlich wurde (siehe Abb. 19 unten). In diesem Sinne wurde auch mehr Firefly-Luziferase produziert und die Werte der IFN- β -Promotoraktivität fielen dementsprechend hoch aus (siehe Abb. 19 oben). Hingegen kam es durch die alleinige Expression des ORFXa-Proteins in den Zellen zu einer signifikant geringeren Proteinsynthese (siehe Abb. 19 unten). Nur wenn das komplette TRBV-Segment 9 exprimiert wurde, kam es zu einer signifikanten Inhibition des VSV-RNA stimulierten IFN- β -Promotors, bei einer der Kontrolle ähnlichen allgemeinen Proteinsynthese.

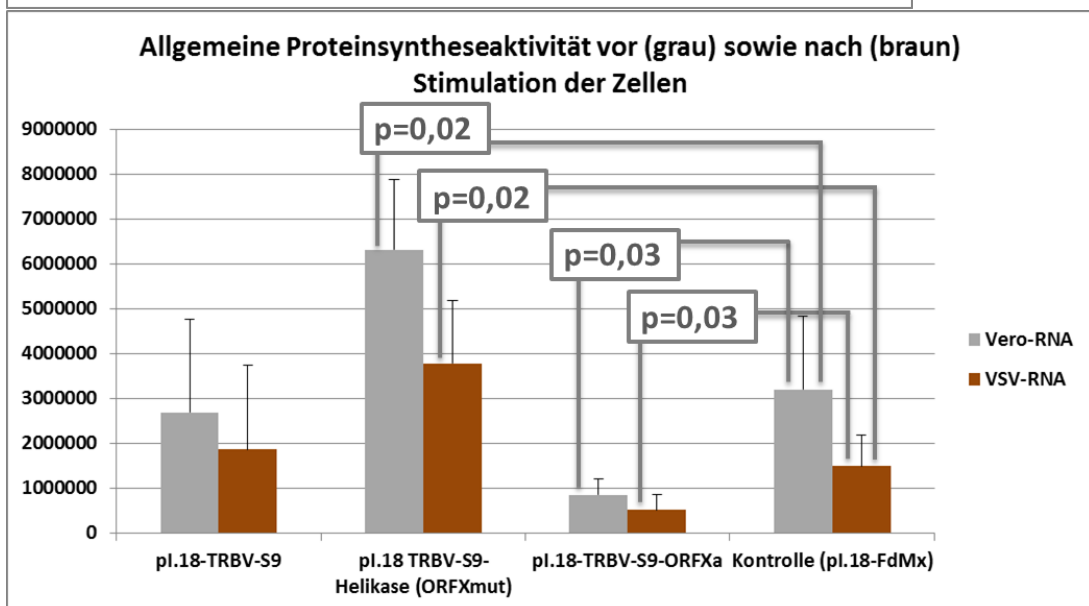
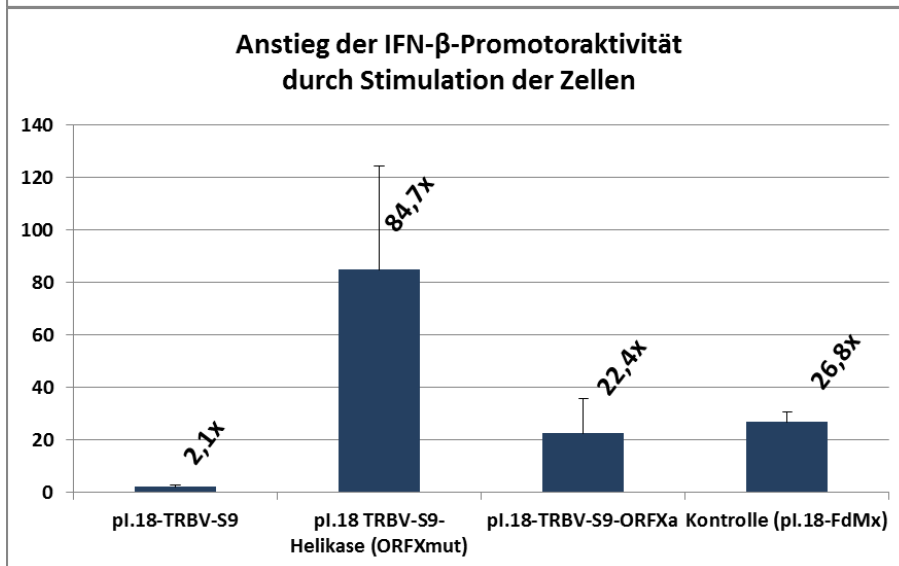
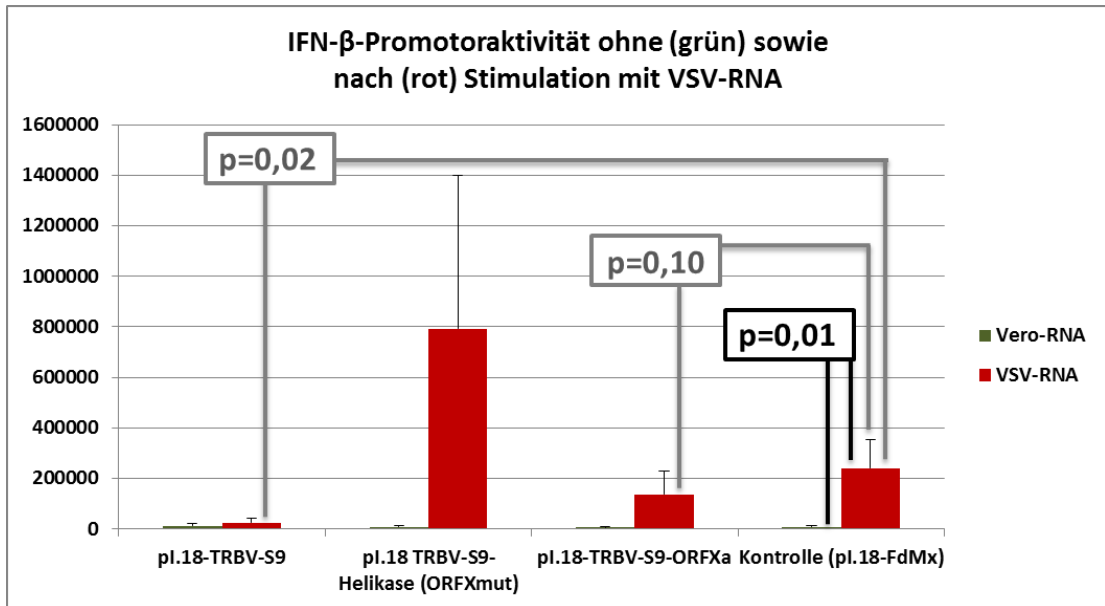


Abb. 19. Oben: IFN- β -Promotoraktivität (Firefly-Luziferaseaktivität) in unstimulierten Zellen (grün) bzw. nach Stimulation des IFN- β -Promotors durch VSV-RNA (rot). Relative Werte. Mitte: Daraus errechnete Aktivierung des IFN- β -Promotors (Verhältnis der IFN- β -Promotoraktivität nach Stimulation mit VSV-RNA zu IFN- β -Promotoraktivität nach Stimulation mit Vero-RNA). Unten: HCMV-Promotoraktivität (Renilla-Luziferaseaktivität) in unstimulierten Zellen (grau) bzw. nach Stimulation (braun). Relative Werte.

In die Zellen wurden vor der Stimulation verschiedene Vektoren zur Expression von TRBV-Proteinen transfiziert. Untersucht wurden pI.18-TRBV-S9 (kodiert für VP6 (Helikase) und ggf. ORFX-Sequenzen), pI.18-TRBV-S9-Helikase (ORFX mut) (kodiert für VP6 (Helikase)) und pI.18-TRBV-S9-ORFXa (kodiert für die ORFXa-Sequenz) in HEK293-Zellen (vgl. 1.1.2.1, S. 5 ff.). Als Kontrolle wurde das Plasmid pI.18-FdMx eingesetzt, welches für ein trunkiertes Mx-Protein kodiert (siehe 2.4.13, S. 48 ff.). MW aus vier Versuchen.

3.4.4 Einfluss der Kombination von TRBV-Helikase und TRBV-ORFXa-Protein auf den humanen Interferon- β -Promotor

Da weder die TRBV-Helikase, noch das ORFXa-Protein alleine eine den kompletten TRBV-Segment 9-Genprodukten entsprechende IFN- β -antagonistische Aktivität erzeugen konnte (siehe 3.4.3, S. 80 ff.), wurden in diesem Versuch das Helikase- und das ORFXa-kodierende Expressionsplasmid gemeinsam in HEK293-Zellen transfiziert. Dies geschah einerseits im Verhältnis 1:1. Wie allerdings in Abschnitt 1.1.2.1 (S. 5 ff.) beschrieben, unterliegt die Translation der TRBV-Segment 9-ORFX-Proteine vermutlich einem Leaky-Scanning-Mechanismus. Dementsprechend wahrscheinlich ist eine unterschiedlich starke Expression der einzelnen Proteine, für die das TRBV-Segment 9 kodiert (Helikase (VP6), ORFX-a, -b und -c). Aus diesem Grund wurden die helikase- und ORFXa-kodierenden Expressionsplasmide auch in unterschiedlichen Mengenverhältnissen zueinander kotransfiziert. Damit sollte geklärt werden, ob eine konzentrationsabhängige Interaktion der beiden Proteine existiert, welche die IFN- β -Promotorinhibition bewirkt. Das ORFXa-Protein kodierende Plasmid wurde dazu in einem Verhältnis von 4:1, 3:2, 2:3 und 1:4 mit dem für die virale Helikase (VP6) kodierenden Plasmid kombiniert.

Die Stimulation mit VSV-RNA bewirkte in den Zellen, die das Kontrollplasmid (pI.18-FdMx) enthielten, im Mittel einen 30,7-fachen Anstieg der IFN- β -Promotoraktivität (siehe Abb. 20 Mitte, S. 86 ff.). Sie ist nach dem Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen mit $p=0,02$ als signifikant zu werten. Alle mit Vero-RNA stimulierten Zellen, die in Abb. 20 dargestellt sind (alle grünen Balken), zeigten keinen signifikanten Unterschied ihrer IFN- β -Promotoraktivität. Somit ist die Grundaktivität des IFN- β -Promotors in diesen Zellen ähnlich.

Die Zellen, in denen das komplette TRBV-Segment 9 exprimiert wurde, zeigten wie bereits in 3.4.1, 3.4.2 und 3.4.3 nach Stimulation mit VSV-RNA im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant geringere IFN- β -Promotoraktivität ($p=0,025$) (siehe Abb. 20 oben). Ebenfalls konnte in diesem Versuch weder durch Transfektion der TRBV-Helikase- noch der TRBV-ORFXa-kodierenden Expressionsplasmide ein signifikant inhibitorischer Einfluss auf die VSV-RNA vermittelte Aktivierung des IFN- β -Promotors im Vergleich zur Kontrolle (pI.18-FdMx) festgestellt werden (siehe Abb. 20 oben). Die TRBV-Helikase bewirkte auch hier wieder eine Steigerung, das ORFXa-Protein auch hier erneut eine signifikante Minderung der allgemeinen Proteinsynthese, was anhand der Renilla-Luziferasewerte (entsprechend der HCMV-Promotoraktivität) deutlich wurde (siehe Abb. 20 unten) (vgl. 3.4.3, S. 80 ff.). Dementsprechend sind die Werte der IFN- β -Promotoraktivität zu bewerten (siehe Abb. 20 oben). Die Kotransfektion von Helikase- und ORFXa-Protein-kodierenden Expressionsplasmiden führte ebenfalls in keinem der untersuchten Mengenverhältnisse zu einer signifikanten Inhibition des VSV-RNA stimulierten IFN- β -Promotors (siehe Abb. 20 oben).

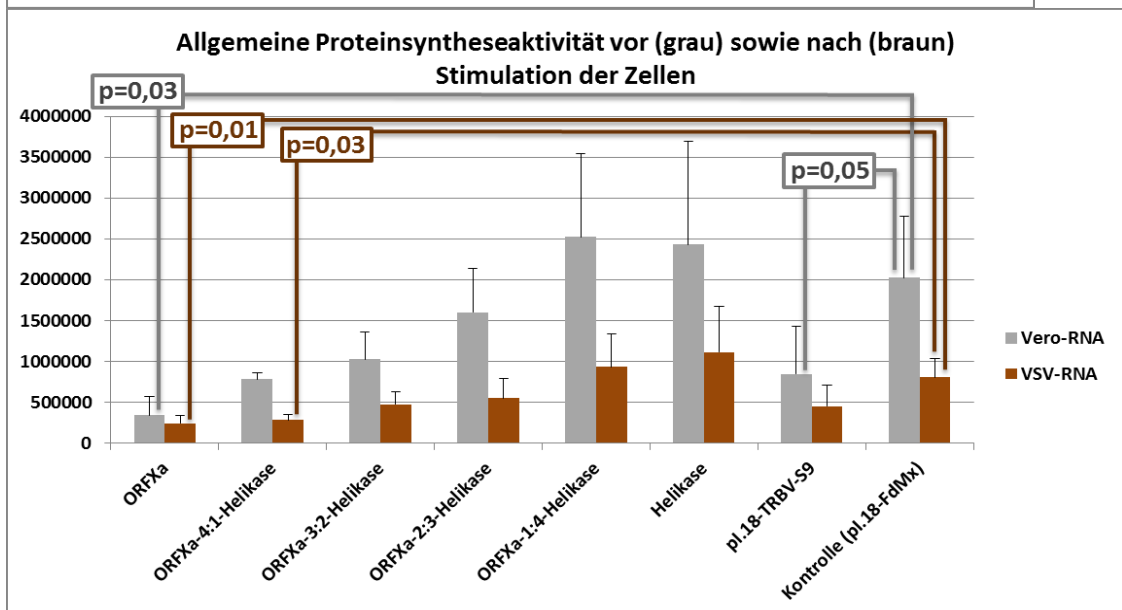
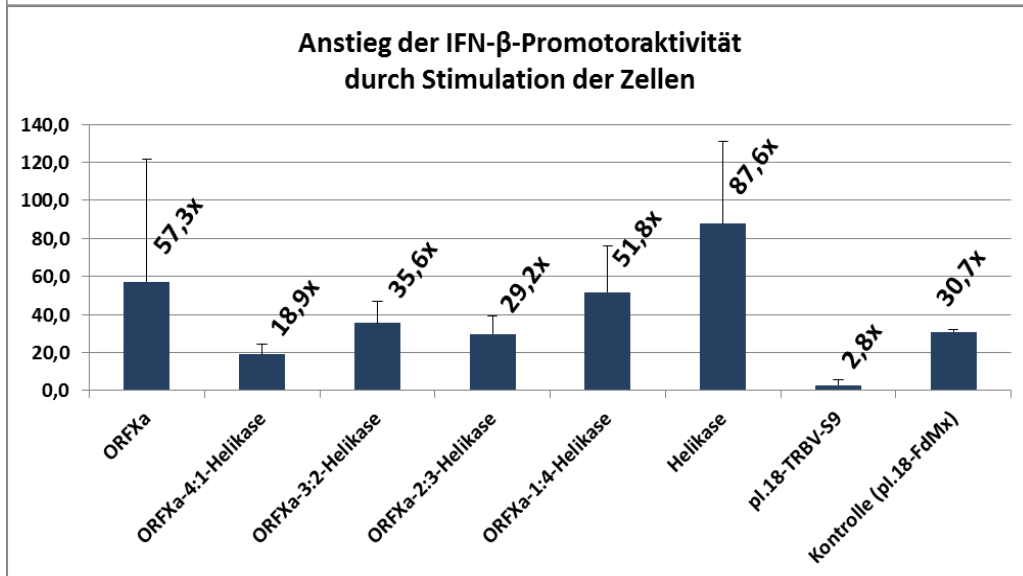
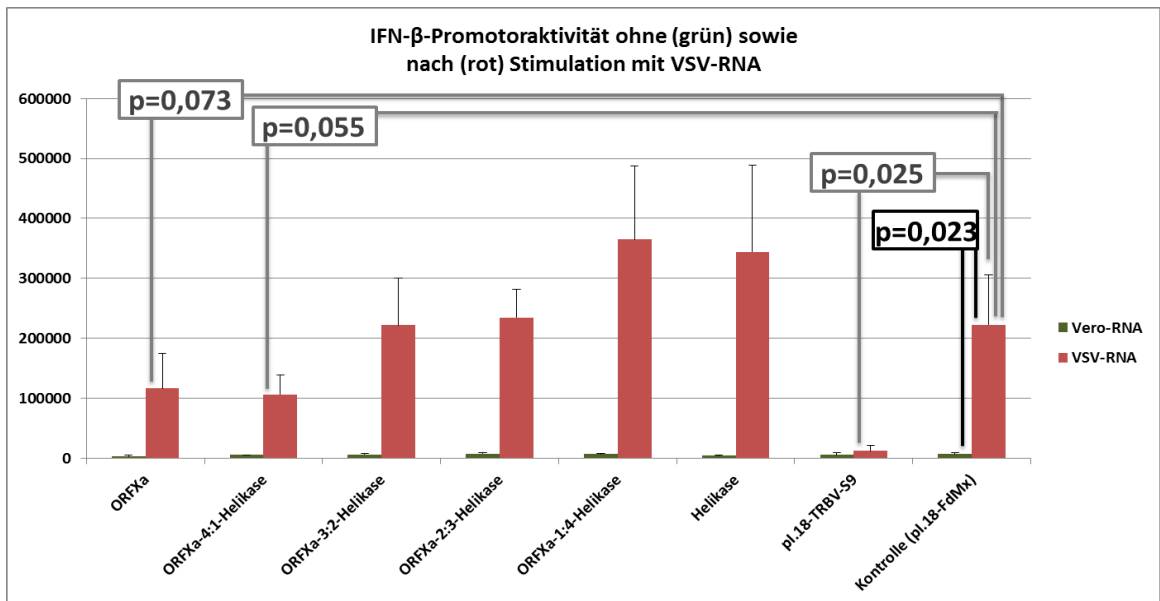


Abb. 20. Oben: IFN- β -Promotoraktivität (Firefly-Luziferaseaktivität) in unstimulierten Zellen (grün) bzw. nach Stimulation des IFN- β -Promotors durch VSV-RNA (rot). Relative Werte. Mitte: Daraus errechnete Aktivierung des IFN- β -Promotors (Verhältnis der IFN- β -Promotoraktivität nach Stimulation mit VSV-RNA zu IFN- β -Promotoraktivität nach Stimulation mit Vero-RNA). Unten: HCMV-Promotoraktivität (Renilla-Luziferaseaktivität) in unstimulierten Zellen (grau) bzw. nach Stimulation (braun). Relative Werte.

In die verwendeten HEK293-Zellen wurden vor der Stimulation verschiedene Vektoren zur Expression von TRBV-Proteinen transfiziert: pI.18-TRBV-S9-Helikase (ORFX mut) (im Diagramm als „Helikase“ bezeichnet; kodiert für VP6 (Helikase)) und pI.18-TRBV-S9-ORFXa (im Diagramm als „ORFXa“ bezeichnet; kodiert für die ORFXa-Sequenz) (vgl. 1.1.2.1, S. 5 ff.). Die Verhältnisse in denen die Expressionsplasmide kotransfiziert wurden sind unter den Diagrammbalken angegeben. Beispielsweise bedeutet „ORFXa-4:1-Hel“, dass 4/5 der kotransfizierten Plasmide ORFXa-kodierend und 1/5 helikasekodierend sind. Als Kontrolle wurde das Plasmid pI.18-FdMx eingesetzt, welches für ein trunkiertes Mx-Protein kodiert (siehe 2.4.13, S. 48 ff.). MW aus drei Versuchen.

3.4.5 Kombination mehrerer einzelner Genprodukte des TRBV-

Segments 9 und deren Einfluss auf den humanen Interferon- β -Promotor

Da die TRBV-Helikase und das ORFXa-Protein weder alleine (siehe 3.4.3, S. 80 ff.), noch in Kombination (siehe 3.4.4, S. 83 ff.) eine den kompletten TRBV-Segment 9-Genprodukten entsprechende IFN- β -antagonistische Aktivität erzeugen konnte, wurden in diesem Versuch alle der vier offenen Leserahmen des TRBV-Segments 9 gemeinsam in VSV-RNA stimulierten HEK293-Zellen exprimiert. Dazu wurden die für die jeweiligen Proteine kodierenden Expressionsvektoren (TRBV-Helikase, -ORFXa, -b und -c) in jeweils gleichen Mengen gemeinsam in die Zellen transfiziert (siehe Abb. 21, S. 90 ff.).

Die Stimulation mit VSV-RNA bewirkte in den Zellen, die das Kontrollplasmid (pI.18-FdMx) enthielten, im Mittel einen 35-fachen Anstieg der IFN- β -Promotoraktivität (siehe Abb. 21, Mitte). Sie ist nach dem Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen mit $p=0,05$ als signifikant zu werten. Alle mit Vero-RNA stimulierten Zellen, die in Abb. 21 dargestellt sind (alle grünen Balken), zeigten keinen signifikanten Unterschied ihrer IFN- β -Promotoraktivität. Somit ist die Grundaktivität des IFN- β -Promotors in diesen Zellen ähnlich. Durch Kotransfektion der TRBV-helikasekodierenden Expressionsplasmide mit den TRBV-ORFXa-, -b- und -c-kodierenden Expressionsplasmiden in einem Verhältnis von jeweils $\frac{1}{4}$ konnte kein inhibitorischer Einfluss auf die VSV-RNA vermittelte Aktivierung des IFN- β -Promotors im Vergleich zur Kontrolle (pI.18-FdMx) festgestellt werden (siehe Abb. 21 oben links). Ebenso wenig wirkte die Kotransfektion von helikasekodierenden Plasmiden mit zwei der drei ORFX-kodierenden Plasmide (Helikase+ORFXa+ORFXb, Helikase+ORFXa+

ORFXc, Helikase +ORFXb+ORFXc; siehe Abb. 21 oben) IFN- β -promotorantagonistisch. Auch die drei ORF-Sequenzen ohne die virale Helikase führten zu keiner signifikanten Inhibition der VSV-RNA-vermittelten IFN- β -Promotoraktivierung.

Offenbar liegt ein anderer Transkriptions- bzw. Translationsmechanismus vor, der es den Genprodukten des kompletten TRBV-Segments 9 ermöglicht, die unter 3.4.1-3.4.3 (S. 74 ff.) dargestellte, deutliche Inhibition der IFN- β -Promotoraktivierung herbeizuführen (siehe Diskussion, Abschnitt 4.3, S. 105 ff.).

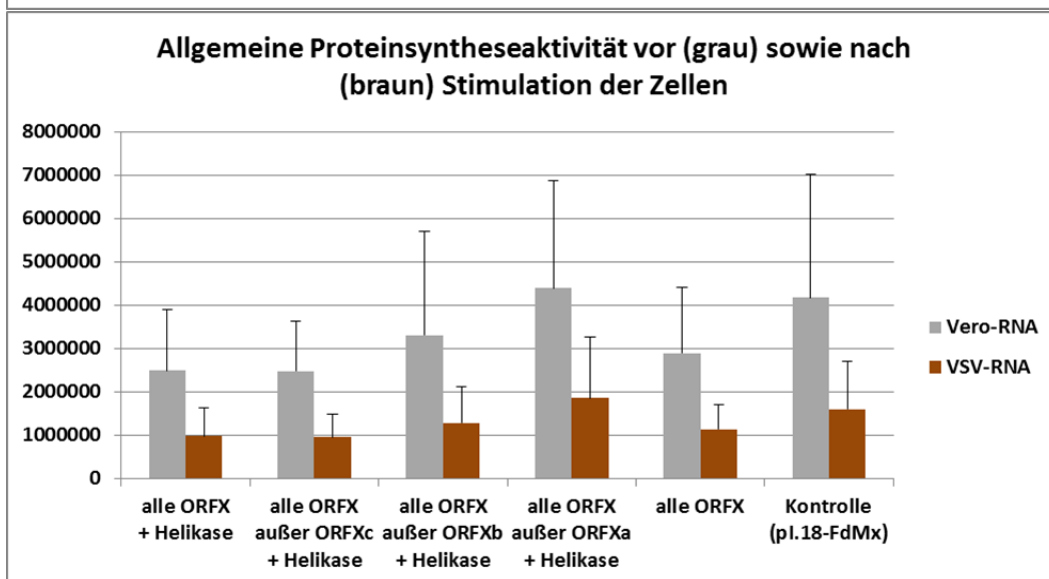
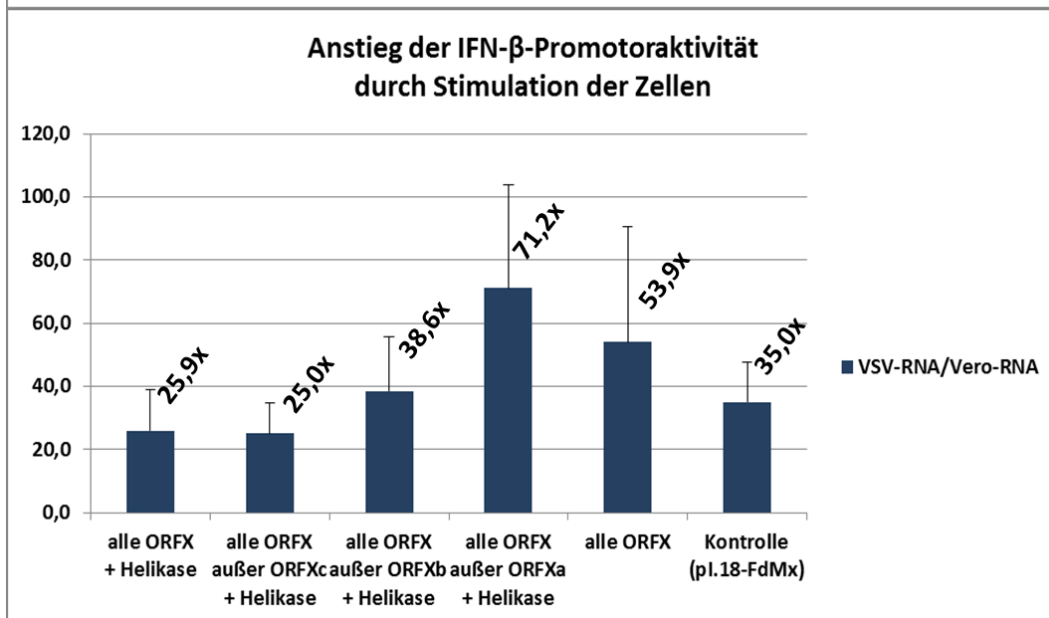
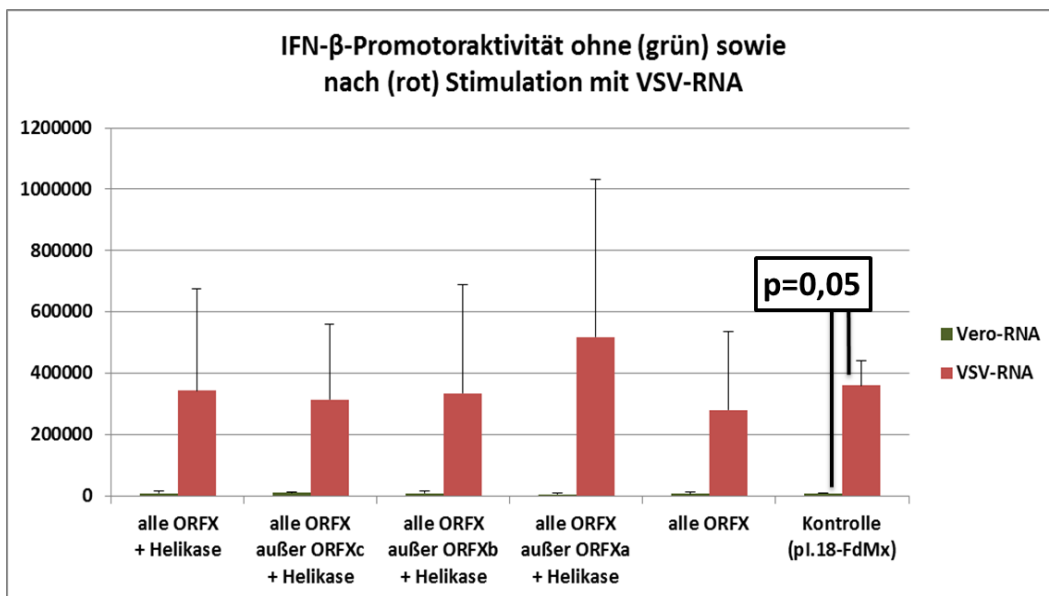


Abb. 21. Oben: IFN- β -Promotoraktivität (Firefly-Luziferaseaktivität) in unstimulierten Zellen (grün) bzw. nach Stimulation des IFN- β -Promotors durch VSV-RNA (rot). Relative Werte. Mitte: Daraus errechnete Aktivierung des IFN- β -Promotors (Verhältnis der IFN- β -Promotoraktivität nach Stimulation mit VSV-RNA zu IFN- β -Promotoraktivität nach Stimulation mit Vero-RNA). Unten: HCMV-Promotoraktivität (Renilla-Luziferaseaktivität) in unstimulierten Zellen (grau) bzw. nach Stimulation (braun). Relative Werte.

In die verwendeten HEK293-Zellen wurden vor der Stimulation verschiedene Vektoren zur Expression von TRBV-Proteinen transfiziert: pI.18-TRBV-S9-Helikase (ORFX mut) (im Diagramm als „Helikase“ bezeichnet; kodiert für VP6 (Helikase)) und pI.18-TRBV-S9-ORFXa, -b bzw. -c (im Diagramm als „ORFXa“, „ORFXb“ oder „ORFXc“ bezeichnet; kodieren für die ORFXa-, -b-, bzw. -c-Sequenzen) (vgl. 1.1.2.1, S. 5 ff.). Die Expressionsplasmide wurden jeweils in gleichen Verhältnissen kotransfiziert. Die Kombinationen sind unter den Diagrammbalken angegeben. Beispielsweise bedeutet „alle ORFX+Helikase“, dass jeweils zu $\frac{1}{4}$ der Gesamtplasmidmenge ORFXa-, ORFXb-, ORFXc- sowie helikasekodierende pI.18-Expressionsplasmide kotransfiziert worden sind. Als Kontrolle wurde das Plasmid pI.18-FdMx eingesetzt, welches für ein trunkiertes Mx-Protein kodiert (siehe 2.4.13, S. 48 ff.). MW aus zwei Versuchen.

3.5 Apoptoseinduktion nach TRBV- und KEMV-Infektion

3.5.1 Nachweis von Apoptose in infizierten Vero B4-Zellen mittels TUNEL-Färbung und Immunfluoreszenz

Verschiedene Viren vermitteln in infizierten Wirtszellen antiapoptotische Effekte, so z.B. verschiedene onkogene Viren wie SV40, HPV, HBV und HCV-Viren (Elmore et al. 1997; Lan et al. 2002; Wagener und Müller 2009; Modrow 2010). Hingegen wirken andere Viren pro-apoptotisch, wie etwa Circoviren oder das dem TRBV und KEMV nah verwandte Bluetongue-Virus (BTV) (siehe 1.1.2, S. 2 ff.). Das BTV vermittelt über seine äußeren Kapsidproteine VP2 und VP5 einen Apoptosereiz (Mortola et al. 2004). Häufig werden Apoptosen aber auch durch virusinduzierte Zellschäden, intrazytoplasmatisch freiliegende dsRNA oder Interferone eingeleitet (Diprose et al. 2002; Hahn et al. 2008; Modrow 2010). Die Freisetzung von Orbiviren aus Säugerzelllinien erfolgt in aller Regel durch eine Zelllyse (Fauquet 2004).

Um zu klären, ob und in wie weit die Orbiviren TRBV und KEMV den in 3.2, S. 67 ff. dargestellten zytopathischen Effekt durch Apoptoseinduktion bewirken, wurden infizierte VeroB4-Zellen mit der unter 2.4.16 beschriebenen TUNEL-Färbung untersucht. Dabei wurden die unter Apoptose entstehenden DNA-Strangbrüche durch Fluoreszenzmarkierung ihrer 3'OH-Enden sichtbar gemacht (grün fluoreszierende Bereiche in Abb. 22, S. 92 ff. und Abb. 23, S. 94 ff.). Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzfärbung der TRBV- und KEMV-Antigene konnten im selben Präparat die TRBV- bzw. KEMV

infizierten Zellen detektiert werden. Dazu wurden KEMV kreuzreaktive TRBV-Antikörper eingesetzt, die mit Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern sichtbar gemacht werden konnten (siehe 2.4.16, S. 57 ff.). Sie kommen in der Abbildung rot zur Darstellung (Abb. 22 und Abb. 23). Die verwendete Vero B4-Zelllinie ist IFN-defizient und somit nicht in der Lage eigenes Interferon zu produzieren, was via p53-Aktivierung ebenfalls zu pro-apoptotischen Effekten führen kann (Hahn et al. 2008). Eine interferoninduzierte Apoptose konnte somit ausgeschlossen werden.

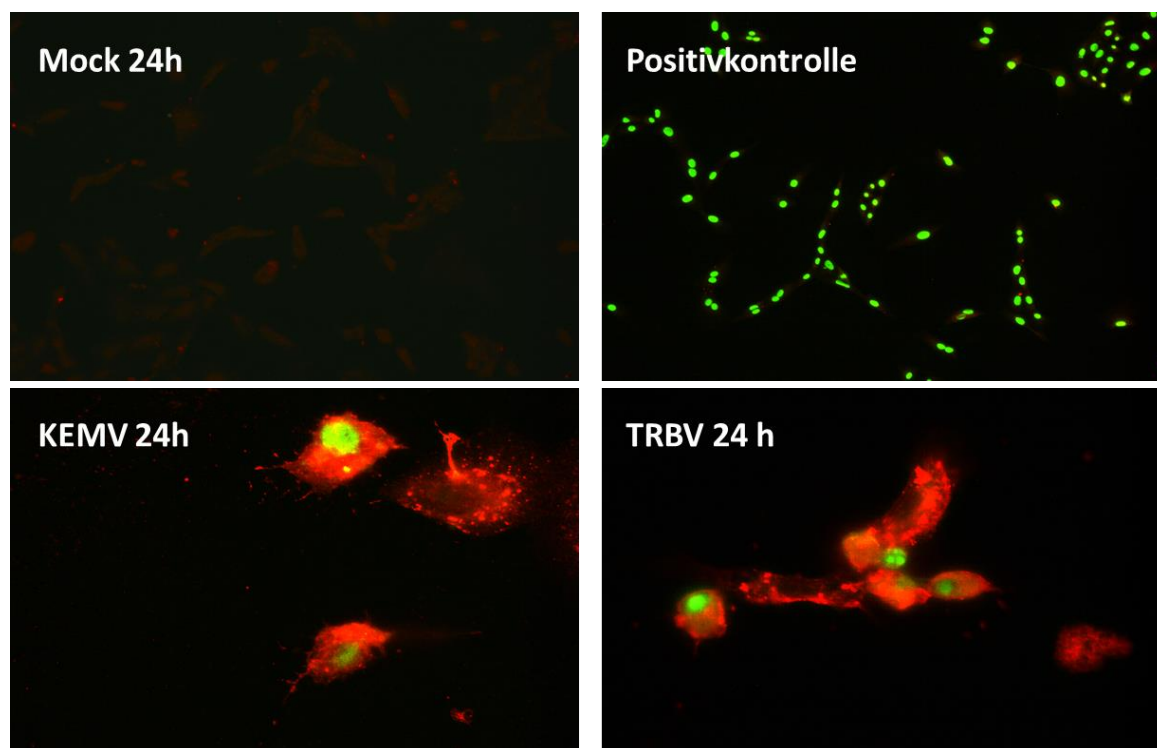
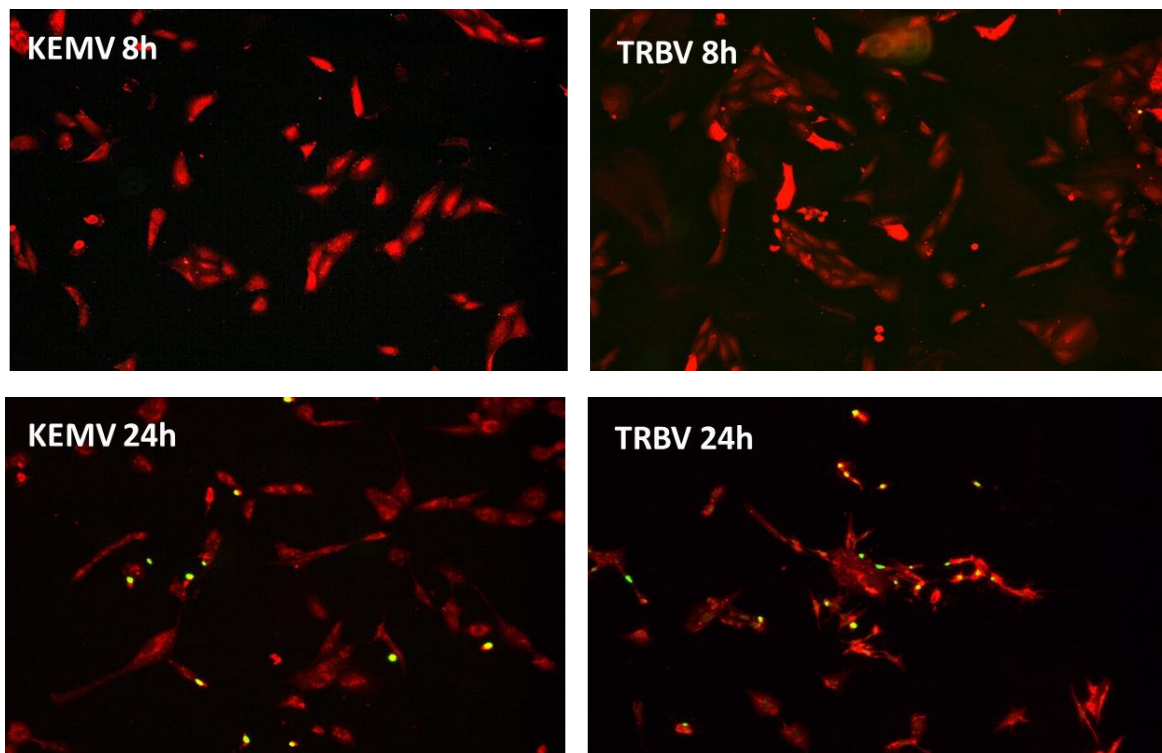


Abb. 22. Nichtinfizierte Vero B4-Zellen nach 24-stündiger Inkubation post infectionem („Mock 24h“) als Negativkontrolle. KEMV- und TRBV-infizierte Zellen nach 24-stündiger Infektionszeit („KEMV 24h“ bzw. „TRBV 24h“). DNase behandelte Zellen dienten als Positivkontrolle für DNA-Strangbrüche. Die Präparate wurden einer TUNEL-Färbung mit anschließender indirekter Immunfluoreszenzfärbung durch TRBV-spezifische Primär- und Cy3-konjugierte Sekundärantikörper unterzogen. Die Apoptoseareale sind grün-fluoreszierend dargestellt (FITC-Kanal des IF-Mikroskops). Der TRBV- bzw. KEMV-Infektion markierende Sekundärantikörper erscheint rot-fluoreszierend (TRITC-Kanal im IF-Mikroskop). Obere Reihe: 100-fache Vergrößerung. Untere Reihe: 600-fache Vergrößerung.

Wie in Abb. 22 zu erkennen, zeigten die KEMV- bzw. TRBV-infizierten VeroB4-Zellen bereits nach 24-stündiger Infektionszeit eine deutliche Anhäufung von DNA-Strangbrüchen im Bereich des Nucleus als Ausdruck der beginnenden Apoptose. Desweiteren trugen die Zellen mehrere zytoplasmatische Ausläufer, die ebenfalls auf frühe Apoptosevorgänge hinweisen (sog. „Boiling-Stadium“) (Krammer 2000). Dies war

in der Mikroskopieaufnahme „KEMV 24h“ besonders gut zu erkennen (s. Abb. 22). Die nicht infizierten Zellen („Mock 24h“) wurden als Negativkontrolle mitgeführt. Sie wurden parallel zu den infizierten Zellen ebenfalls 24 Stunden lang bei 37°C/5%CO₂ inkubiert. Virusproteine konnten in diesem Ansatz erwartungsgemäß nicht detektiert werden. Als Positivkontrolle für DNA-Strangbrüche (s. Abb. 22, oben rechts) dienten Zellen die mit DNase behandelt wurden. Diese waren in der TUNEL-Färbung erwartungsgemäß gut zu detektieren (grüne Fluoreszenz). Der zeitliche Verlauf der Apoptoseinduktion wird in Abb. 23 deutlich: Dafür wurden Zellen nach 8, 24, 36 und auch 48 Stunden Inkubationsdauer *post infectionem* mittels TUNEL und indirekter Immunfluoreszenz gefärbt. Man erkennt eine deutliche Zunahme der Apoptoseareale (grün), je länger die infizierten Zellen inkubiert wurden. Desweiteren nahm die Zelldichte der Präparate mit Fortgang der Inkubationszeit ab. Dies korreliert mit der Beobachtung der Zellindex-Kurven aus 3.2, S. 67 ff. Es wird deutlich, dass sowohl das Tribec- als auch das Kemerovovirus relativ rasch nach der Infektion Apoptosevorgänge in ihren Wirtszellen auslösen.



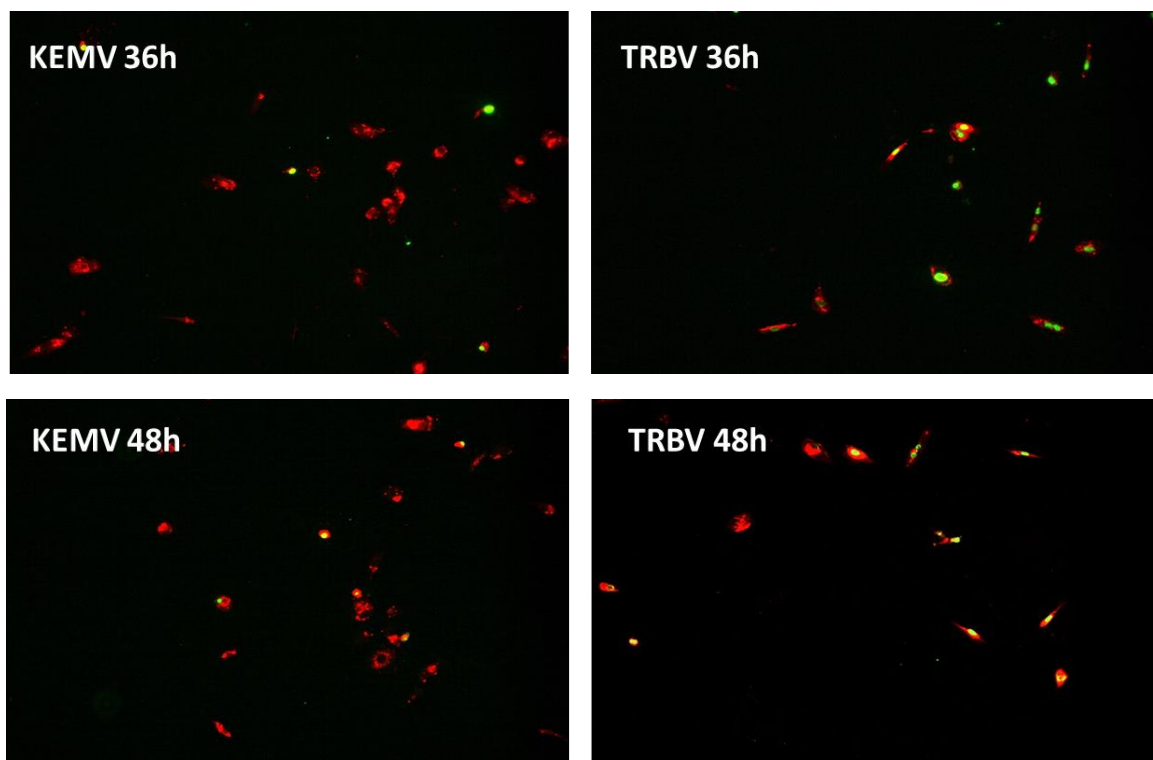


Abb. 23. Präparate von KEMV- und TRBV-infizierten VeroB4-Zellen nach TUNEL- und Immunfluoreszenzfärbung mit TRBV- bzw. KEMV-spezifischen Antikörpern im zeitlichen Verlauf. Die Anfärbung der Präparate erfolgte 8, 24, 36 und 48 Stunden nach Infektion (Beschriftung: „KEMV/TRBV 8h, -24h, -36h und -48h“). Zellen gehen mit voranschreitender Zeit in die Apoptose über. Die Zelldichte nimmt parallel dazu ab. Grün: Apoptoseareale. rot: TRBV- bzw. KEMV-spezifische Antikörper. 100-fache Vergrößerung.

3.5.2 Zellwachstumsverlauf KEMV- und TRBV-infizierter HEK293-Zellen unter Behandlung mit Interferon- α sowie dem Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK

Der im Folgenden dargestellte Versuch (nach 2.4.15.3, S. 56 ff.) wurde durchgeführt, um einerseits der Frage nachzugehen, in wie weit es durch gezielte Inhibition apoptoseinduzierender Signalwege zu einer Verminderung des CPE unter TRBV- und KEMV-Infektion kommt. Andererseits wurde das zellprotektive Potential von TypI-Interferonen auf TRBV- bzw. KEMV-infizierte Zellen anhand von Interferon- α (IFN α) untersucht. Zur Apoptoseinhibition wurde der Pan-Caspasehemmstoff Z-VAD-FMK eingesetzt. Als Z-VAD-FMK-Lösungsmittel diente DMSO. Dieses wurde - aus Gründen der Vergleichbarkeit – parallel zu den Z-VAD-FMK-Zugabezeitpunkten allen Kavitäten zugefügt, die nicht mit Z-VAD-FMK behandelt wurden. Die Kurven in den folgenden

Abbildungen stellen, die Vitalität der untersuchten Zellen im zeitlichen Verlauf dar. Wie im Abschnitt 2.4.15, S. 54 ff. beschrieben, wird dies durch ein kontinuierliches Messen des elektrischen Scheinwiderstands (Impedanz) am Boden einer speziellen 96-Kavitäten-E-Platte erreicht. Die Zellviabilität ist anhand der Zellindices (y-Achse) im zeitlichen Verlauf (x-Achse) dargestellt.

3.5.2.1 Zellwachstumsverlauf nicht-infizierter HEK293- und VeroB4-Zellen unter Behandlung mit IFN- α sowie Z-VAD-FMK

Abb. 24 zeigt die Zellviabilität nicht-infizierter HEK293-Zellen („Mock“) im zeitlichen Verlauf anhand von Zellwachstumskurven. Die Zellen wurden während ihrer Inkubation mit Interferon- α (blaue Kurve), Apoptoseinhibitor Z-VAD-FMK (dunkelgrün), beiden Substanzen (pink), oder lediglich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt (rot) (siehe 2.4.15.3, S. 56 ff. und 3.5.2, S. 92 ff.). Daraus wurde deutlich, dass sich die Behandlung mit dem Apoptoseinhibitor Z-VAD-FMK auf HEK293-Zellen (siehe Abb. 24 oben, S. 94) sowie auf VeroB4-Zellen (siehe Abb. 24 unten) ebensowenig hemmend auf das Zellwachstum auswirkte, wie die Behandlung mit IFN α . Die Zelldichten lagen im Fall der HEK293-Zellen sogar noch etwas höher als die Zelldichte der lediglich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Zellen (siehe Abb. 24 oben). Allerdings zeigten die DMSO-behandelten Zellen (rote Kurve) bereits kurz nach Aussaat (vor allen Zugabezeitpunkten) ein geringeres Wachstum als alle anderen Zellen, sodass es offenbar zu keinem Wachstumsnachteil durch die alleinige DMSO-Behandlung bzw. zu keinem Wachstumsvorteil durch zusätzlich zum DMSO hinzugefügtes IFN α oder Z-VAD-FMK gekommen ist. Auch die Kombination des Apoptoseinhibitors mit IFN α beeinflusste das Zellwachstum der HEK293- und VeroB4-Zellen nicht negativ (siehe Abb. 24 oben und unten).

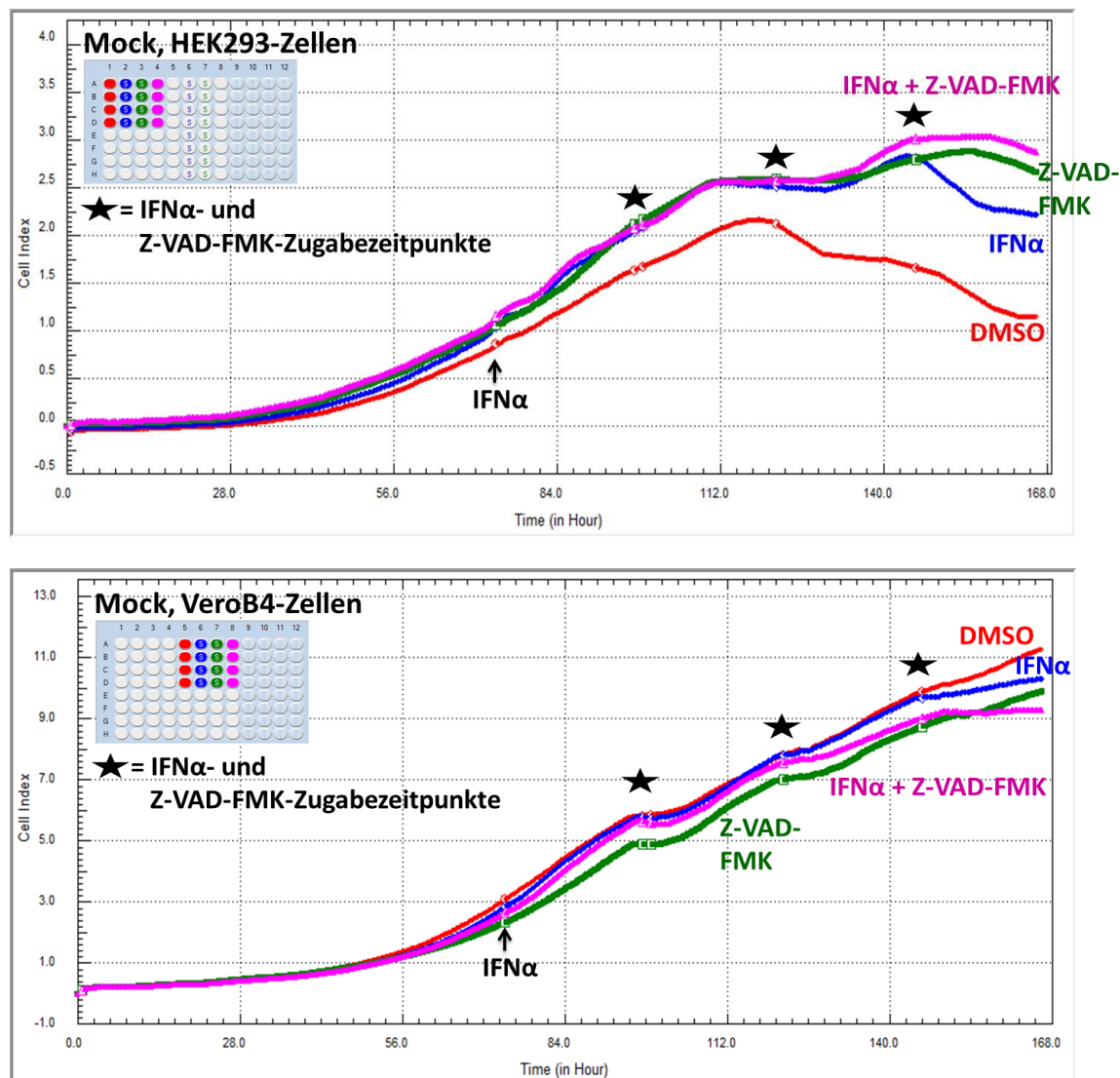


Abb. 24. Viabilitätsverläufe uninfizierter („Mock“) HEK293-Zellen (oben) und VeroB4-Zellen (unten) unter Interferon- α sowie Z-VAD-FMK-Behandlung (vgl. 2.4.15.3). Die gleichfarbig dargestellten Beschriftungen neben den Kurven zeigen, womit die Zellen zu den jeweils sternchenmarkierten Zugabezeitpunkten behandelt wurden: „IFN α “ (=IFN α +DMSO), „Z-VAD-FMK“ (=Z-VAD-FMK +DMSO), IFN α +Z-VAD-FMK“ (=IFN α +Z-VAD-FMK+DMSO), „DMSO“ (=lediglich mit DMSO behandelt). Eine Stunde nach dem ersten sternmarkierten Zugabezeitpunkt erfolgte die Infektion. Die pfeilmarkierte Beschriftung „IFN α “ kennzeichnet eine IFN α -Zugabe zu den Zellen der „IFN α “- und der „IFN α +Z-VAD-FMK“-Kurven. Y-Achse: Zellindex (Maß der Zellviabilität) gemessen anhand der Impedanz am Boden der Zellkulturplatte, relative Einheiten. X-Achse: Zeit in Stunden. Die Kurven stellen Mittelwerte aus jeweils vier Einzelmessungen dar. Sie wurden mit der Line-Fit-Funktion der RTCA-Software 1.2.1 von Roche (jeweils kurz um die Zugabezeitpunkte herum) begründet, da die Manipulationen an der Zellkulturplatte ein für einige Stunden verzerrtes Signal zur Folge hatten.

3.5.2.2 Zellwachstumsverlauf TRBV-infizierter HEK293- und VeroB4-Zellen unter Behandlung mit IFN- α sowie Z-VAD-FMK

Abb. 25 zeigt das Zellwachstum TRBV-infizierter HEK293- und VeroB4-Zellen unter IFN α - sowie Z-VAD-FMK-Behandlung. Im Falle der Z-VAD-FMK-behandelten HEK293-Zellen (siehe Abb. 25 oben, S. 96) zeigte sich bis etwa 20 Stunden *post infectionem* ein gutes Zellwachstum (dunkelgrüne Kurve), vergleichbar zu dem der IFN α -behandelten Zellen (blaue Kurve) oder dem der IFN α - und Z-VAD-FMK-behandelten Zellen (pinke Kurve). Das Wachstum der unbehandelten Zellreihe (DMSO; rote Kurve) verhielt sich allerdings sehr ähnlich. Im Vergleich zur Z-VAD-FMK-behandelten Zellreihe (grüne Kurve) verlief die Wachstumskurve dieser Zellen lediglich auf einem etwas geringeren Zellindex-Niveau, was sich bereits vor dem Zeitpunkt der ersten IFN α -Zugabe („IFN α “ in Abb. 25) abzeichnete. Es konnte also kein zytoprotektiver Effekt auf TRBV-infizierte HEK293-Zellen durch die alleinige Zugabe von Z-VAD-FMK (grüne Kurve) erreicht werden. Die IFN- α -behandelten Zellen (blaue Kurve) und die IFN α +Z-VAD-FMK-behandelten HEK293-Zellen (pinke Kurve) (siehe Abb. 25 oben) wuchsen hingegen deutlich länger weiter, bevor auch sie dem CPE erlagen. Durch die Behandlung mit IFN α kam es somit zu einem schützenden Effekt auf das Zellwachstum TRBV-infizierter HEK293-Zellen.

Das Wachstum der DMSO-behandelten TRBV-infizierten VeroB4-Zellen (rote Kurve in Abb. 25 unten) stellte sich vergleichbar zu dem der HEK293-Zellen dar. Nach etwa 26 Stunden *post infectionem* fiel der Zellindex rapide ab. Allerdings bewirkte der Apoptoseinhibitor Z-VAD-FMK in diesen Zellen eine leichte Verzögerung des Zellindexabfalls (grüne Kurve in Abb. 25 unten). Durch Behandlung mit IFN α waren die TRBV-infizierten VeroB4-Zellen sogar offenbar komplett vor einem TRBV-vermittelten CPE geschützt (blaue Kurve in Abb. 25 unten). Bis zum Abbruch des Versuchs stieg der Zellindex kontinuierlich an. Gleiches gilt für IFN α - und Z-VAD-FMK-behandelten VeroB4-Zellen (pinke Kurve in Abb. 25 unten).

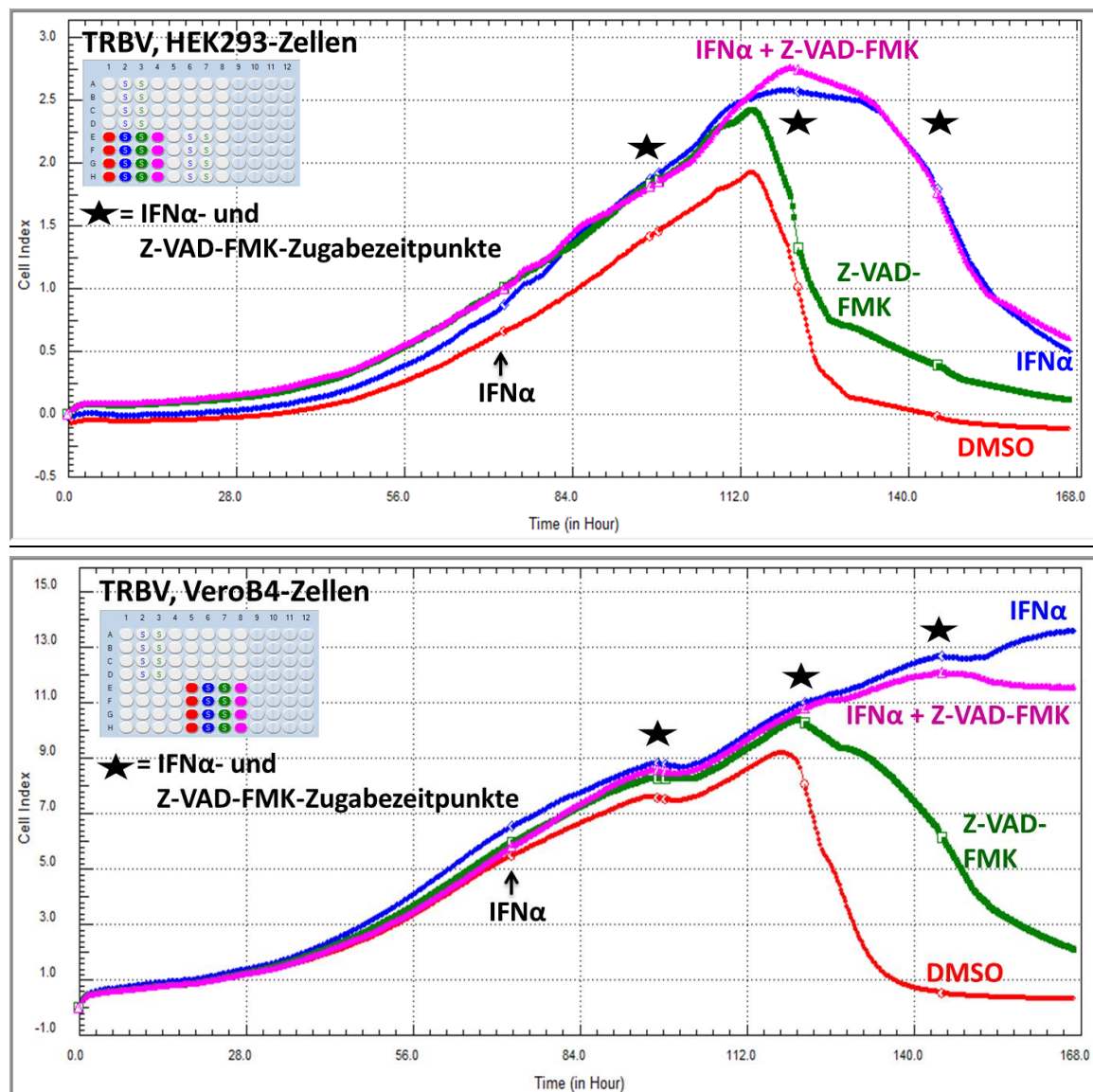


Abb. 25. Viabilitätsverläufe TRBV-infizierter (MOI=2) HEK293-Zellen (oben) und VeroB4-Zellen (unten) unter Interferon- α sowie Z-VAD-FMK-Behandlung (vgl. 2.4.15.3). Die gleichfarbig dargestellten Beschriftungen neben den Kurven zeigen, womit die Zellen zu den jeweils sternchenmarkierten Zugabezeitpunkten behandelt wurden: „IFN α “ (=IFN α +DMSO), „Z-VAD-FMK“ (=Z-VAD-FMK+DMSO), „IFN α +Z-VAD-FMK“ (=IFN α +Z-VAD-FMK+DMSO), „DMSO“ (=lediglich mit DMSO behandelt). Eine Stunde nach dem ersten sternmarkierten Zugabezeitpunkt erfolgte die Infektion. Die pfeilmarkierte Beschriftung „IFN α “ kennzeichnet eine IFN α -Zugabe zu den Zellen der „IFN α “- und der „IFN α +Z-VAD-FMK“-Kurven. Y-Achse: Zellindex (Maß der Zellviabilität) gemessen anhand der Impedanz am Boden der Zellkulturplatte, relative Einheiten. X-Achse: Zeit in Stunden. Die Kurven stellen Mittelwerte aus jeweils vier Einzelmessungen dar. Sie wurden mit der Line-Fit-Funktion der RTCA-Software 1.2.1 von Roche (jeweils kurz um die Zugabezeitpunkte herum) begründet, da die Manipulationen an der Zellkulturplatte ein für einige Stunden verzerrtes Signal zur Folge hatten.

Abb. 26 (S. 98) zeigt das Zellwachstum KEMV-infizierter HEK293- und VeroB4-Zellen unter IFN α - sowie Z-VAD-FMK-Behandlung. Bis nach etwa 20 Stunden *post infectionem* zeigte sich ein gutes Zellwachstum der DMSO- sowie der Z-VAD-FMK-behandelten

HEK293-Zellen (rote und grüne Kurven in Abb. 26 oben). Dann aber fiel der Zellindex als Ausdruck des KEMV-vermittelten CPE rapide ab. Hier konnte somit kein zytoprotektiver Effekt durch den Apoptoseinhibitor Z-VAD-FMK erzielt werden. Hingegen kam es bei den IFN α -behandelten Zellen zu keinem wesentlichen Abfall des Zellindex unter KEMV-Infektion (blaue Kurve in Abb. 26 oben). Gleiches gilt für die IFN α - und Z-VAD-FMK-behandelten Zellen (pinke Kurve in Abb. 26 oben).

Das Wachstum der DMSO-behandelten KEMV-infizierten VeroB4-Zellen (rote Kurve in Abb. 25 unten, S. 96) stellte sich auch hier vergleichbar zu dem der HEK293-Zellen dar. Nach etwa 25 Stunden *post infectionem* fiel der Zellindex rapide ab. Wie bereits im Versuch 3.5.2.2 bewirkte der Apoptoseinhibitor Z-VAD-FMK auch hier eine leichte Verzögerung des Zellindexabfalls (grüne Kurve in Abb. 25 unten). Durch Behandlung mit IFN α waren die KEMV-infizierten VeroB4-Zellen auch hier offenbar komplett vor einem TRBV-vermittelten CPE geschützt (blaue Kurve in Abb. 25 unten). Bis zum Abbruch des Versuchs stieg der Zellindex kontinuierlich an. Gleiches gilt für IFN α - und Z-VAD-FMK-behandelten VeroB4-Zellen (pinke Kurve in Abb. 25 unten).

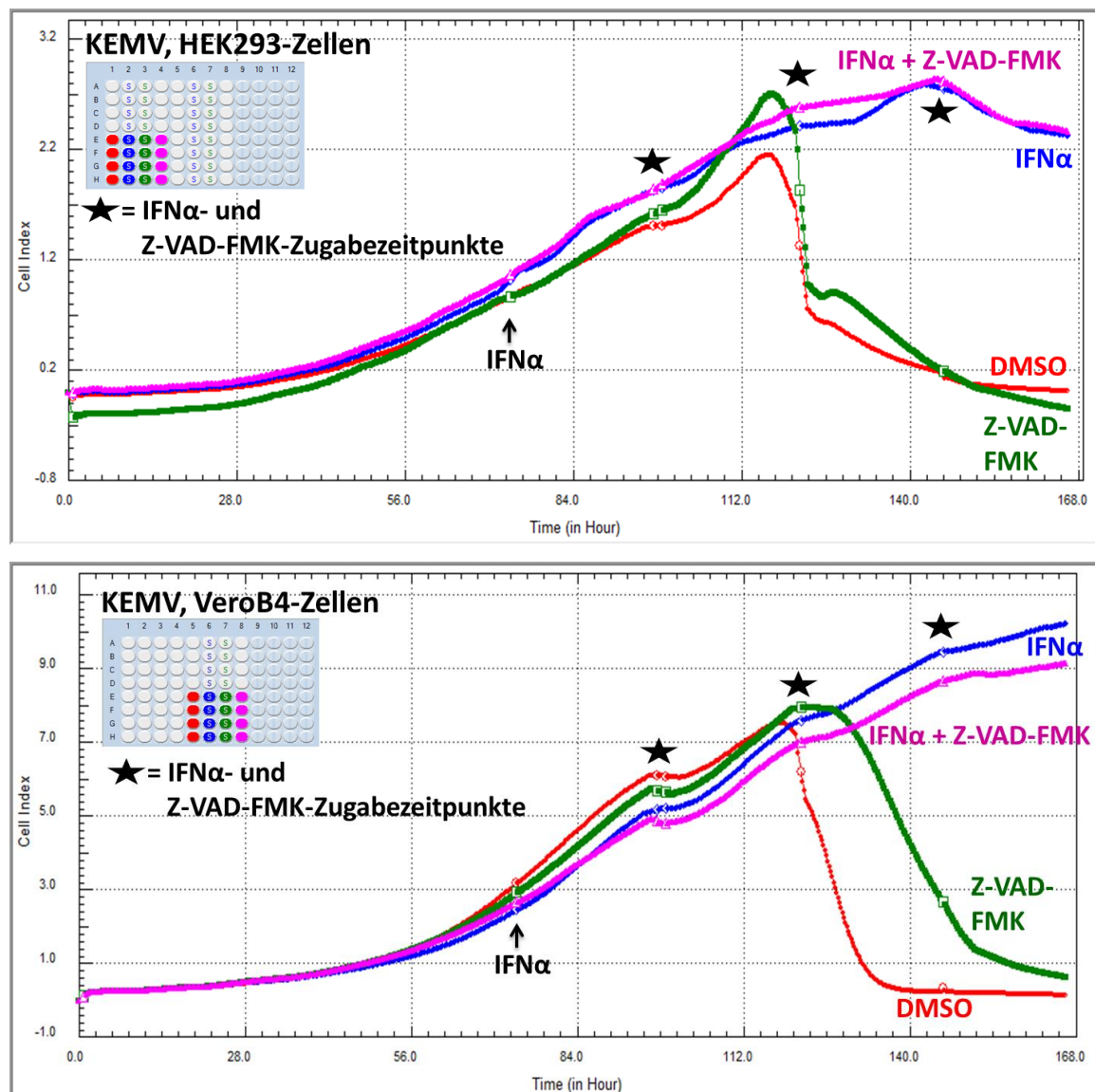


Abb. 26. Viabilitätsverläufe KEMV-infizierter (MOI=2) HEK293-Zellen (oben) und VeroB4-Zellen (unten) unter Interferon- α sowie Z-VAD-FMK-Behandlung (vgl. 2.4.15.3). Die gleichfarbig dargestellten Beschriftungen neben den Kurven zeigen, womit die Zellen zu den jeweils sternchenmarkierten Zugabezeitpunkten behandelt wurden: „IFN α “ (=IFN α +DMSO), „Z-VAD-FMK“ (=Z-VAD-FMK+DMSO), „IFN α +Z-VAD-FMK“ (=IFN α +Z-VAD-FMK+DMSO), „DMSO“ (=lediglich mit DMSO behandelt). Eine Stunde nach dem ersten sternmarkierten Zugabezeitpunkt erfolgte die Infektion. Die pfeilmarkierte Beschriftung „IFN α “ kennzeichnet eine IFN α -Zugabe zu den Zellen der „IFN α “- und der „IFN α +Z-VAD-FMK“-Kurven. Y-Achse: Zellindex (Maß der Zellviabilität) gemessen anhand der Impedanz am Boden der Zellkulturplatte, relative Einheiten. X-Achse: Zeit in Stunden. Die Kurven stellen Mittelwerte aus jeweils vier Einzelmessungen dar. Sie wurden mit der Line-Fit-Funktion der RTCA-Software 1.2.1 von Roche (jeweils kurz um die Zugabezeitpunkte herum) begründet, da die Manipulationen an der Zellkulturplatte ein für einige Stunden verzerrtes Signal zur Folge hatten.

3.5.3 Quantitativer Virusnachweis per TCID₅₀-Titerbestimmung

Um die Effekte der Z-VAD-FMK- und der IFN α -Behandlung nach Abschluss des Versuchs 3.5.2.2 (S. 95 ff.) anhand der in den Kulturmedienüberständen enthaltenen Virusmenge sichtbar zu machen, wurden diese abgenommen und die Virustiter bestimmt (siehe 2.3.2, S. 21 ff.). Das Ergebnis zeigte deutlich den IFN α -vermittelten hemmenden Effekt auf die Virusreplikation bzw. -freisetzung (siehe Abb. 27, S. 100). Dies gilt insbesondere für das KEMV. Sowohl in den Kulturmedienüberständen KEMV-infizierter HEK293-Zellen (siehe Abb. 27 oben) als auch in denen KEMV-infizierter VeroB4-Zellen (siehe Abb. 27 unten) konnten keine infektiösen Viruspartikel nachgewiesen werden. Hingegen konnte für TRBV unter IFN α -Behandlung in HEK293-Zellen sowie in VeroB4-Zellen Virusreplikation nachgewiesen werden. Mit $3,3 \cdot 10^9$ TCID₅₀-Einheiten/ml (HEK293-Zellen) und $1,08 \cdot 10^4$ TCID₅₀-Einheiten/ml (VeroB4-Zellen) war der Virustiter in den Kulturmedienüberständen IFN α -behandelter Zellen im Vergleich zu Überständen un behandelter Zellen 1.000-fach bzw. 10.000.000-fach niedriger.

Die Behandlung mit dem Apoptoseinhibitor Z-VAD-FMK führte hingegen nur in VeroB4-Zellen zu einer Abnahme der freigesetzten KEMV- und TRBV-Mengen (siehe Abb. 27, S. 100 unten). Die in den Kulturmedienüberständen nachgewiesenen Virustiter lagen 5 (TRBV) bzw. 6 (KEMV) Log-Stufen unter den Titern der DMSO-behandelten Zellen. Die VeroB4-Zellen (siehe Abb. 27 unten), die mit IFN α und Z-VAD-FMK gleichzeitig behandelt wurden, setzten dementsprechend (mit $1,58 \cdot 10^3$ TCID₅₀-Einheiten/ml) die geringste Virusmenge frei. Hingegen waren die Titer der Z-VAD-FMK-behandelten HEK293-Zellen (siehe Abb. 27 oben) vergleichbar mit denen der DMSO-behandelten Zellen. Der Apoptoseinhibitor führte in diesen Zellen zu keiner verringerten Virusmenge in den Kulturmedienüberständen. Die gleichzeitige IFN α - und Z-VAD-FMK-Behandlung bewirkte in den TRBV-infizierten HEK293-Zellen offenbar eine (um eine Log-Stufe) weniger hemmende Wirkung auf die Virusreplikation bzw. -freisetzung als die alleinige Behandlung der Zellen mit IFN α (siehe Abb. 27 oben). Im Falle der KEMV-Infektion ergab sich kein Unterschied. Hier war in beiden Fällen kein Virus in den Kulturmedienüberständen nachweisbar (siehe Abb. 27 oben).

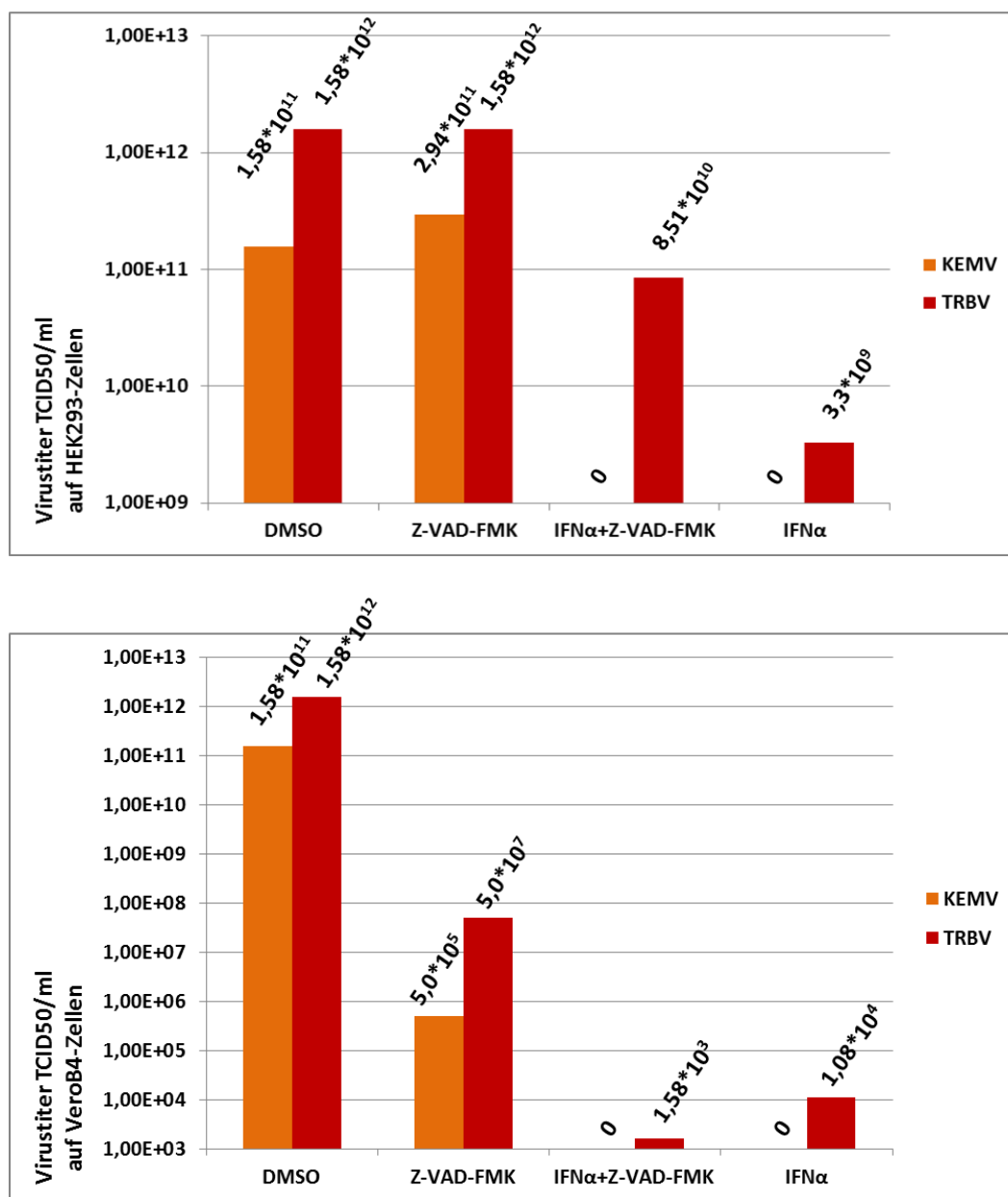


Abb. 27. Virustiterbestimmung mittels TCID₅₀-Test. Untersucht wurden die Kulturmedienüberstände TRBV- und KEMV-infizierter HEK293-Zellen (obere Abb.) bzw. VeroB4-Zellen (untere Abb.) aus Versuch 3.5.2.2 (S. 95 ff.) nach Abschluss der Beobachtung der Zellwachstumskurven. Die Infektionen fanden dabei unter Behandlung mit dem Apoptoseinhibitor Z-VAD-FMK sowie IFN α statt (siehe 3.5.2). Beschriftung (v.l.n.r.): Virustiter der Kulturmedienüberstände der Zellen, die während der Infektion mit dem Lösungsmittel DMSO („DMSO“), mit dem Apoptoseinhibitor Z-VAD-FMK („Z-VAD-FMK“), mit IFN α und Z-VAD-FMK („IFN α +Z-VAD-FMK“) oder mit IFN α („IFN α “) behandelt worden sind. Die Austitration erfolgte auf Vero B4-Zellen. Y-Achse: TCID₅₀-Einheiten pro Milliliter. Dekadisch logarithmische Darstellung.

4 Diskussion

Neben den von Schildzecken übertragenen Erregern *Borrelia burgdorferi* (Lyme-Borreliose) und FSME-Virus (Frühsommer-Meningoenzephalitis), gibt es eine große Anzahl wenig erforschter arboviraler Krankheitserreger. Dazu gehören auch die von Schildzecken der Gattungen *Ixodes ricinus* und *Ixodes persulcatus* übertragenen Viren Tribec- (TRBV) und Kemerovovirus (KEMV). Diese Orbiviren (Familie Reoviridae) stehen in Verdacht, beim Menschen sowie bei anderen Säugetieren febrile Meningoenzephalitiden auszulösen (Chumakov 1963; Libikova et al. 1978). Eine objektive Einschätzung der daran gebundenen gesundheitlichen Risiken für den Menschen ist zum derzeitigen Standpunkt noch nicht möglich. Der genaue Pathomechanismus dieser Viren ist nicht bekannt (Suss und Schrader 2004).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es dementsprechend sein, das zytopathogene Potential von TRBV und KEMV gegenüber menschlichen Zellen zu bestimmen und die zugrundeliegenden Pathomechanismen zu erforschen. Dazu sollte die bereits für das TRBV beschriebene IFN- β -antagonistische Aktivität näher untersucht werden, indem die Wirkung einzeln exprimierter Genprodukte auf die Aktivität des humanen IFN- β -Promotors beobachtet wird. Ebenfalls sollte das KEMV auf IFN- β -antagonistische Funktionen untersucht werden. Durch Koinfektionsexperimente zusammen mit dem Interferon-induzierendem RVFV Clone 13 sollte herausgefunden werden, ob eine aktive IFN- β -promotorinhibitorische Wirkung vorliegt, oder ob sich die viralen PAMPs lediglich durch gezieltes „Verstecken“ den zellulären PRRs entziehen, die IFN-Antwort also deshalb ausbleibt. Schließlich sollte die Auswirkung einer Substitution des inhibierten TypI-Interferons auf das Zellwachstum TRBV- bzw. KEMV-infizierter Zellen beobachtet werden und anhand von Zellwachstumskurven sichtbar gemacht werden. Durch Nachweis apoptotischer Zellen mittels Immunfluoreszenz sollte außerdem untersucht werden, in wie weit der TRBV- und KEMV-vermittelte CPE einer Apoptoseinduktion geschuldet ist.

4.1 TRBV und KEMV hemmen aktiv die IFN- β -Induktion

Um die Auswirkungen einer TRBV- und KEMV-Infektion auf das humane TypI-Interferonsystem zu untersuchen, wurden Infektionsversuche mit der interferon-kompetenten humanen Nierenzelllinie HEK293 durchgeführt. Mit Hilfe von RT-PCRs konnte in TRBV- sowie KEMV-infizierten HEK293-Zellen, anhand fehlender IFN- β -spezifischer Transkripte, das Ausbleiben einer IFN- β -Induktion beobachtet werden (siehe 3.1.1, S. 61 ff.). Die fehlende Bildung von IFN- β -Transkripten unter TRBV- bzw. KEMV-Infektion könnte einerseits eine aktive Hemmung des TypI-Interferonsystems bedeuten (s. Abb. 9, S. 62). Andererseits könnte dies auch durch einen fehlenden Kontakt von viraler RNA zu zellulären Pathogen Recognition Receptors (PRRs) zustande gekommen sein. So verhindert das nahe verwandte Bluetongue-Virus (BTV) während seines Replikationsvorgangs den Kontakt zu zellulären PRRs durch gezieltes Zurückhalten seiner viralen RNA im Virus-Core (Diprose et al. 2002; Mertens et al. 2004). Um dies zu differenzieren wurden Koinfektionsexperimente durchgeführt, in denen HEK293-Zellen mit einem der oben genannten Orbiviren, und simultan mit dem Interferon-Induktor RVFV Clone 13 koinfiziert wurden. Hier zeigte sich ebenfalls ein Fehlen der IFN- β -Induktion (s. Abb. 9, S. 62). Hingegen kam es in Zellen, die nur mit RVFV Clone 13 infiziert worden waren, zu einer starken Bildung von IFN- β -Transkripten. Aus diesem Grund ist, gegebenenfalls parallel zu einem eventuellen Verhindern eines Kontaktes zu zellulären PRRs (s.o.), eine sowohl von TRBV als auch von KEMV ausgehende aktive Inhibition der IFN- β -Induktion anzunehmen. Die in Abb. 11 (S. 64) dargestellten Replikationsnachweise zeigen darüberhinaus, dass alle Viren in den jeweiligen Zellen repliziert hatten. Es kommt also nicht zu einer TRBV- bzw. KEMV-vermittelten Hemmung der RVFV Clone 13-Replikation in den Koinfektionsversuchen, die ein Ausbleiben der RVFV Clone 13-vermittelten IFN-Induktion hätte verantworten können. Dies spricht ebenfalls für eine aktive, durch TRBV bzw. KEMV vermittelte Inhibition der IFN- β -Induktion. Die RVFV Clone 13-Replikation ist im Falle einer Koinfektion mit TRBV oder KEMV allerdings schlechter als bei der Einzelinfektion (Abb. 11, S. 64). Dieses Ergebnis stimmt bezogen auf TRBV mit den Ergebnissen früherer Arbeiten überein. Grund hierfür kann die in dieser Arbeit erstmals beschriebene Apoptoseinduktion durch TRBV bzw. KEMV sein (siehe 3.5, S. 89 ff.). Für das KEMV konnte die offenbar aktive Unterdrückung der IFN- β -Induktion in dieser

Arbeit erstmalig gezeigt werden. Frühere Arbeiten weisen darauf hin, dass TRBV offenbar die Translokation des Transkriptionsfaktors IRF-3 verhindert, und vermutlich auf diese Weise die IFN- β -Induktion hemmt (Besse 2014). Ob Gleiches auch für das KEMV zutrifft, und welchen Anteil dies an der Inhibition der IFN- β -Induktion hat, bleibt zu klären.

Um den IFN- β -inhibitorischen Effekt auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurden IFN- β -ELISAs durchgeführt (s. 3.1.2, S. 64). Auf diese Weise konnte das von den Zellen sezernierte IFN- β quantifiziert werden. Als Untersuchungsmaterial dienten die Kulturmedienüberstände einzeln- und koinfizierter HEK293-Zellen nach Abschluss einer 24-stündigen Infektionszeit. Dabei zeigte sich ein zu den Ergebnissen der RT-PCRs (s.o.) kongruenter Effekt. Während in den Kulturmedienüberständen der RVFV Clone 13 infizierten Zellen durchschnittlich 1404 pg IFN- β /ml nachgewiesen wurde, waren in den Überständen der TRBV- bzw. KEMV-infizierten Zellen, sowie auch der koinfizierten Zellen, lediglich marginale IFN- β -Konzentrationen messbar (10-26 pg IFN- β /ml) (s. Abb. 12, S. 65). Dies bestätigt die Ergebnisse aus den RT-PCRs (s. 3.1.1, S. 61 ff.) und zeigt eine Äquivalenz von Transkripten und letztlich freigesetztem IFN- β . Es wurde somit kein Hinweis auf theoretisch mögliche posttranskriptionelle Modifikationen im Anschluss an die IFN- β -Transkription gefunden, welche die letztlich freigesetzte IFN- β -Menge hätten verändern können.

4.2 TRBV und KEMV lösen einen zytopathischen Effekt in interferonkompetenten Zellen aus

Mit Hilfe der xCELLigence-Realtime-Zellanalyseplattform von Roche wurde mittels Impedanzmessung an den Kavitätenböden einer Zellkulturplatte das Zellwachstum adhärenter Zellen im zeitlichen Verlauf beobachtet. Um die Auswirkung einer TRBV- bzw. KEMV-Infektion bezüglich ihrer Zytopathogenität beurteilen zu können, wurden humane Nierenzellen der Zelllinie HEK293, welche über ein funktionelles TypI-IFN-System verfügen, mit dem jeweiligen Virus (TRBV bzw. KEMV) einer MOI von 2 TCID₅₀-Einheiten infiziert. Als Vergleich diente die Zellwachstumskurve nicht-infizierter HEK293-Zellen. Es zeigte sich im Falle der TRBV- sowie auch der KEMV-Infektion ein rasch einsetzender zytopathischer Effekt (etwa 16 Stunden *post infectionem*; s. Abb. 14, S. 68). Nach weiteren 16 Stunden Infektionszeit waren die meisten Zellen in den

Kavitäten bereits abgestorben. Diese Tatsache belegt das hohe zytopathische Potential von TRBV und KEMV, welches in Abwesenheit einer Interferon-Immunantwort (s. 4.1, S. 102 ff.) zum Tragen kommt (vgl. 4.4.3, S. 111 ff.). Als Vergleich wurde eine Zellreihe mit dem Interferon-induzierenden RVFV Clone 13 (MOI=2) infiziert. Hier zeigte sich zunächst keine Beeinträchtigung des Zellwachstums bis etwa 35 Stunden *post infectionem*. Dann fiel der Zellindex (etwa 40 Stunden *post infectionem*) zunächst ein kurzes Stück steil, und danach langsamer ab. Dabei lag er zwar über die gesamte Zeit unter dem der nicht-infizierten Zellen. Jedoch war er sehr viel höher im Vergleich zu den TRBV- bzw. KEMV- infizierten Zellen. Eine Infektion der HEK293-Zellen mit RVFV Clone 13 weist also einen deutlich weniger schädigenden Effekt auf als die TRBV- bzw. KEMV-Infektion.

In einem weiteren Versuch, in dem die HEK293-Zellen mit einer höheren RVFV Clone 13-Virusmenge (MOI=20) infiziert wurden, zeigte sich ein rascherer erster Abfall des Zellindex (bereits 28 Stunden *post infectionem*) (Abb. 16, S. 70). Allerdings erholten sich die Zellen danach, der Zellindex nahm wieder langsam zu. Dies könnte darauf hinweisen, dass das IFN-System der HEK293-Zellen durch die höhere Virusmenge initial bereits stärker stimuliert wird als durch eine RVFV Clone 13-Infektion mit weniger Virusmaterial (vgl. Abb. 14, S. 68). Dies begrenzt – aufgrund einer stärkeren Interferonantwort – scheinbar die Infektion und führt zu erneutem Zellwachstum. In dem Versuch mit geringerer RVFV Clone 13 MOI reichte die Virusmenge unter Umständen nicht aus, um die PRRs initial so stark zu stimulieren, dass es schnell zu einem suffizienten antiviralen Zellstatus kommt. Da das Kulturmedium in den durchgeführten Versuchen nicht erneuert wurde, war der Beobachtungszeitraum auf etwa 8 Tage begrenzt. Ob sich die Zellen, die anfangs mit der geringeren MOI von 2 infiziert worden waren, unter anderen Nährbedingungen zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls wieder erholt hätten, bleibt Spekulation. Ein anfänglicher Abfall der Zellindices war allerdings in beiden RVFV Clone 13-Einzelfektionen (MOI=2 und MOI=20) zu verzeichnen. Dies kann möglicherweise durch einen IFN-vermittelten Zellwachstumsarrest, oder durch IFN-induzierte Apoptosewege bedingt sein (Randall und Goodbourn 2008).

Die weiteren durchgeführten Koinfektionen mit TRBV bzw. KEMV (MOI=2) und dem Interferon-Induktor RVFV Clone 13 (MOI=2 und MOI=20), stellten sich vom Kurvenverlauf in etwa so dar, wie es die TRBV- bzw. KEMV-Einzelninfektionen taten (s. Abb. 15, S. 70 und Abb. 16, S. 70). Der ebenfalls starke CPE setzte sogar einige Stunden früher ein. Je mehr RVFV Clone 13 für die Koinfektion eingesetzt wurde (verglichen wurden MOI=2 und MOI=20), desto früher setzte der CPE ein (vgl. Abb. 15, S. 70 und Abb. 16, S. 70). Dies scheint durch die erhöhte Viruslast innerhalb der Zellen zustande zu kommen. Eine besondere Stimulation des IFN-Systems durch eine hohe RVFV Clone 13-MOI scheint, anders als in Abwesenheit von TRBV bzw. KEMV, hier nicht stattzufinden. Das Zellwachstum ist in beiden Fällen schlecht. Der CPE setzt früh ein und die Zellen erholen sich nicht. Trotz der normalerweise interferon-induzierenden Funktion durch das RVFV Clone 13, war das Zellwachstum also nicht besser als jenes der lediglich TRBV- oder KEMV-infizierten Zellen. Dies unterstützt die Ergebnisse aus 3.1 (S. 61 ff.) bzw. 4.1 (S. 102 ff.) und spricht für eine TRBV- sowie KEMV-vermittelte aktive Hemmung der IFN-Induktion in Anwesenheit eines sonst interferon-induzierenden Virus. Ein IFN-vermittelter protektiver Effekt auf das Zellwachstum wird dadurch unterbunden.

4.3 Einfluss einzelner TRBV- und KEMV-Proteine auf die Aktivität des humanen IFN- β -Promotors

Um einzelne Genloci innerhalb des Tribec-Virus bzw. Kemerovo-Virus Genoms zu identifizieren, die an der bereits dargestellten interferonantagonistischen Aktivität beteiligt sein könnten, wurden Reporter-Assays nach 2.4.13 (S. 48 ff.) angefertigt. Dabei wurden in HEK293-Zellen selektiv einzelne TRBV- bzw. KEMV-Proteine mit Hilfe von pI.18-Plasmiden exprimiert, und deren Auswirkung auf den humanen IFN- β -Promotor unter Stimulation mit Gesamt-RNA VSV-infizierter Vero E6-Zellen (im Weiteren kurz als VSV-RNA bezeichnet) gemessen (nach 3.4, S. 73 ff.). Wie in vorherigen Arbeiten (Brandt 2012), konnte auch hier eine von den Genprodukten des TRBV-Segments 9 ausgehende starke IFN- β -promotorinhibitorische Aktivität belegt werden (s. Abb. 17, S. 77, Abb. 18, S. 80, Abb. 19, S. 83 sowie 3.4.2, S. 77 ff.).

Desweiteren wurden erstmals die TRBV-Segmente 2, 3 und 4 sowie das KEMV-Segment 9 in dieser Form untersucht (Abb. 17, S. 77 und Abb. 18, S. 80). Dabei wirkte das vom

TRBV-Segment 2 kodierte VP3 ebenfalls signifikant ($p=0,002$) interferonantagonistisch. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass diese Zellen eine deutlich niedrigere allgemeine Proteinsynthese aufwiesen als die Kontrolle oder die Zellen, die das TRBV-Segment 9-kodierende Plasmid enthielten (Abb. 17, S. 77). Diese geringere Proteinsynthese war dementsprechend auch ein Faktor, der zur verminderten IFN- β -Expression führte. Jedoch lag der rechnerische Anstieg der IFN- β -Promotoraktivität durch Stimulation des IFN- β -Promotors mit VSV-RNA bei lediglich 6,7-fach (im Vergleich zur Kontrolle mit 31,6-fach). Eine IFN- β -inhibitorische Aktivität durch TRBV-VP3 ist daher durchaus denkbar, wahrscheinlich aber ist die Expressionshemmung nicht spezifisch für IFN- β . Im Allgemeinen bilden die VP3-Proteine der Orbiviren die innere Capsidschicht des Virions (vgl. Abschnitt 1.1.2, S. 2). Im Falle des Orbivirus-Prototypen Bluetongue-Virus (BTV) verhindert das Protein zusammen mit dem VP7-Protein den Kontakt viraler RNA zu den zellulären PRRs, um eine Aktivierung des TypI-Interferon-Systems zu verhindern (Schwartz-Cornil et al. 2008). Ob es durch diese Wechselwirkung des TRBV-VP3 und der hier als IFN- β -Stimulator verwendeten VSV-RNA zu einer geringeren Aktivierung von zellulären PRRs und somit zu einer geringeren IFN- β -Promotoraktivierung gekommen ist, oder ob das VP3-Protein als aktiver und selektiver IFN- β -Promotorinhibitor wirkt, bleibt zu klären. Insgesamt betrachtet ist der IFN- β -antagonistische Effekt dieses Proteins allerdings deutlich schwächer als jener, der durch die Genprodukte des TRBV-Segments 9 vermittelt wird (s. Abb. 17, S. 77).

Bei dem vom TRBV-Segment 3 kodierten VP4 handelt es sich wahrscheinlich analog zu Bluetongue VP4 um ein Capping-Enzym (vgl. 1.1.2.1, S. 5), das einen Teil des viralen Transkriptionskomplexes (TC) darstellt und dieselben RNA-Modifikationen vermittelt wie zelluläre Capping-Enzyme. Da die Abwesenheit solcher RNA-Modifikationen PAMPs darstellen, könnte VP4 durch das Capping viraler RNAs die Induktion des TypI Interferon-Systems verändern. TRBV-VP4 wirkte aber nicht inhibierend auf die IFN- β -Promotoraktivierung ($p=0,05$; Anstieg der IFN- β -Promotoraktivität durch Stimulation des IFN- β -Promotors mit VSV-RNA 31,3-fach im Vergleich zur Kontrolle mit 31,6-fach) (s. Abb. 17, S. 77). TRBV-VP4 spielt offenbar keine direkte interferonantagonistische Rolle.

Das durch TRBV-Segment 4 kodierte TRBV-NS1 (tubuläre Strukturen formendes Protein, TuP) (vgl. 1.1.2, S. 2 ff.) wirkte ebenfalls nicht signifikant inhibitorisch auf die Aktivität des humanen IFN- β -Promotors ($p=0,07$) (s. Abb. 18, S. 80). Der rechnerische Anstieg der IFN- β -Promotoraktivität durch die Stimulation mit VSV-RNA lag bei 29,3-fach (im Vergleich zur Kontrolle mit 43,7-fach). Eine alleinige Funktion von TRBV-NS1 innerhalb des TRBV-vermittelten Interferonantagonismus ist daher nicht anzunehmen.

KEMV wirkt wie auch TRBV aktiv antagonistisch auf den humanen IFN- β -Promotor (vgl. 4.1, S. 102 ff.). Offenbar erzielt es diese Wirkung jedoch nicht durch das Gensegment 9. Die Zellen, in denen die Genprodukte des KEMV-Segments 9 exprimiert wurden, wiesen nämlich nach Stimulation mit VSV-RNA sogar eine höhere IFN- β -Promotoraktivität auf als die Kontrolle ($p=0,08$) (s. Abb. 18, S. 80). Der rechnerische Anstieg der IFN- β -Promotoraktivität durch die Stimulation mit VSV-RNA lag bei 64,9-fach (im Vergleich zur Kontrolle mit 43,7-fach). Durch die Genprodukte des KEMV-Segments 9 konnte also keine Inhibition des IFN- β -Promotors erzielt werden. Allerdings lag die allgemeine Proteinsyntheseaktivität in diesen Zellen, zu sehen an der HCMV-Promotor getriebenen Renilla-Luziferase-Expression, um ein Vielfaches höher als in der Kontrolle (s. Abb. 18, S. 80). Die Ursache dafür bleibt zu klären. Wahrscheinlich ist hierfür die auf Segment 9 kodierte Helikase verantwortlich, die durch Entwindung von DNA bzw. RNA eine expressionsverstärkende Wirkung ausüben könnte. Wird diese allgemein expressionsverstärkende Wirkung der Helikase bei Auswertung der Reporter-Assay-Daten berücksichtigt, so ergibt sich eine inhibierende Wirkung von KEMV-S9 auf die Aktivierung des IFN- β -Promotors. Es müssen diesbezüglich jedoch weitere Versuche durchgeführt werden, um diese IFN- β -antagonistische Aktivität zu bestätigen. Hierzu könnte ein KEMV-S9-Expressionsplasmid hergestellt werden, in dem das Startcodon des Helikase-Leserahmens mutiert ist, so dass in Reporter-Assays die expressionsverstärkende Wirkung der Helikase nicht mehr zur Wirkung kommt. Im Vergleich zum TRBV-Segment ist KEMV-Segment 9 um 15 Basenpaare länger und weist statt drei lediglich zwei überlappende offene Leserahmen (ORFX-Sequenzen) innerhalb des helikasekodierenden Bereichs auf. Sie kodieren ebenfalls für Proteine, denen bisher noch keine Funktion zugeordnet werden konnte. Die Länge dieser ORFX-Sequenzen unterscheidet sich beim KEMV jedoch stark von der Länge der ORFX-Sequenzen des

TRBV. Während die ORFXa-Sequenz kürzer ist als beim TRBV, ist die ORFXb-Sequenz deutlich länger (s. Abb. 3, S. 6).

Um die IFN- β -inhibitorische Funktion (s.o.) des TRBV-Segments 9 einem einzelnen offenen Leserahmen (helikasekodierender Bereich sowie ORFXa-, -b- und c-Sequenzen) zuordnen zu können, wurden in einem weiteren Versuch in einer Zellpopulation die TRBV-Helikase (VP6) exprimiert, und in einer weiteren die ORFXa-Sequenz (s. 3.4.3, S. 80). Die TRBV-Helikase (VP6) ist vergleichbar mit anderen viralen Helikasen. Sie bindet ssRNA und dsRNA und wirkt in Anwesenheit von ATP und Mg^{2+} entspiralisierend (Kar und Roy 2003). Das ORFXa-Protein (NS4) des TRBV-verwandten BTV-8-Stammes ist ein hochkonserviertes Nicht-Strukturprotein, welches vornehmlich im Bereich der Nucleoli lokalisiert ist und dem Virus einen Replikationsvorteil in interferonvorbehandelten Zellen verschafft. Es wird parallel zu anderen Proteinen bereits früh nach der Infektion exprimiert (Ratinier et al. 2011). Innerhalb des durchgeführten Reporter-Assays (s. Abb. 19, S. 83) zeigte keines der beiden TRBV-Proteine alleine (weder die TRBV-Helikase noch das Genprodukt der TRBV-ORFXa-Sequenz) eine hemmende Wirkung auf den IFN- β -Promotor. Es zeigte sich allerdings eine allgemeine Hemmung der Proteinsynthese in den Zellen, die das ORFXa-kodierende Plasmid enthielten und eine Steigerung der Proteinsynthese in den Zellen, in die das helikasekodierende Plasmid eingebracht wurde. Aufgrund der fehlenden interferonantagonistischen Aktivität der einzelnen Proteine wurden weitere Reporter-Assays angefertigt, in denen beide Expressionsplasmide gemeinsam in HEK293-Zellen kotransfiziert wurden (s. 3.4.4, S. 83). Dabei wurden auch unterschiedliche Mengenverhältnisse der beiden Plasmide zueinander untersucht, um die unter Umständen für eine IFN- β -promotorinhibitorische Wirkung wichtige quantitative Wechselbeziehungen zueinander nachzuziehen zu können. Das Vorliegen unterschiedlicher Mengenverhältnisse von Helikase und ORFX-Proteinen in TRBV-infizierten Zellen erscheint durchaus denkbar, da es bereits für das am besten untersuchte Orbivirus BTV Hinweise gibt, dass die Expression der ORFX-Proteine einem Leaky-Scanning unterliegt (Firth 2008). In dem unter 3.4.5 (S. 86) dargestellten Versuch konnte allerdings auch durch die Kotransfektion der Expressionsplasmide in unterschiedlichen Mengenverhältnissen kein hemmender Einfluss auf die IFN- β -Promotoraktivität festgestellt werden (s. Abb. 20, S. 86). Vielmehr wurde der IFN- β -

Promotor umso stärker aktiviert, je mehr Helikasekodierende Expressionsplasmide in die Zellen transfiziert worden waren. Auch hier zeigte sich, dass die allgemeine Proteinsyntheseaktivität umso geringer war, je mehr ORFXa-kodierende Plasmide transfiziert wurden und umso stärker, je mehr Helikasekodierende Plasmide transfiziert wurden (s. Abb. 20, S. 86). Da die Kombination von Helikase und ORFXa-Protein keine IFN- β -promotorinhibitorische Wirkung erzeugte, wurden in weiteren Versuchen die Expressionsplasmide für die Helikase gemeinsam mit den Expressionsplasmiden aller drei ORFX-Sequenzen kotransfiziert sowie in weiteren Kombinationen mit jeweils zwei der drei ORFX-Sequenzen (s. 3.4.5, S. 86). Jedoch zeigte auch hier keine der Kombinationen eine IFN-antagonistische Wirkung (siehe Abb. 21, S. 89). Ebenso wenig wirksam zeigte sich die Kotransfektion aller drei ORFX-Sequenz-kodierender Expressionsplasmide (ohne das Helikasekodierende Plasmid) (s. Abb. 21, S. 89). Somit bleibt offen, welcher Bereich bzw. welche Bereiche des TRBV-Segments 9 für ein Interferonantagonistisches Protein kodiert/kodieren. Da bisher lediglich für den BTV-8-Stamm ein ORFXa-vermittelter Replikationsvorteil in IFN-vorbehandelten Zellen festgestellt wurde (Ratinier et al. 2011), ist auch denkbar, dass der IFN- β -inhibitorische Effekt des TRBV nicht durch die ORFXa-Sequenz des TRBV-Segments 9 vermittelt wird. Gegebenenfalls kommt es auch durch einen translationalen *Read-Through* zur Bildung von Fusionsproteinen, wie es zum Beispiel beim Colorado Tick Fever-Virus (ebenfalls Familie Reoviridae, aber Genus Coltivirus) der Fall ist (Mohd Jaafar et al. 2004). Die Basensequenz des TRBV-Segments 9 zeigt zwischen dem ORFXa- und ORFXb-kodierenden Bereich nur ein Stoppcodon, was den Mechanismus der *Leaky Termination* und die dementsprechende Bildung von Fusionsproteinen wahrscheinlich machen könnte. Gleiches gilt für das KEMV-Segment 9 (nur ein Stoppcodon zwischen ORFXa- und -b-kodierendem Bereich). Da die Virusmorphogenese der Orbiviren in der Wirtszelle, wie in 1.1.2.1 (S. 5 ff.) beschrieben, innerhalb sog. viraler Einschlusskörperchen stattfindet, spielen die viralen Helikasen in diesem Fall offenbar keine Rolle in Bezug auf eine unspezifische Transkriptionssteigerung, wie es in den beschriebenen Versuchen *in vitro* der Fall war.

4.4 Auswirkung der Infektion mit TRBV und KEMV auf das zelluläre Apoptoseverhalten

4.4.1 TRBV und KEMV induzieren Apoptose in Vero B4-Zellen

Mittels der Fluoreszenzmarkierung von DNA-Strangbrüchen (TUNEL-Färbung nach 2.4.16, S. 57) wurde das Maß der unter TRBV- bzw. KEMV-Infektion stattfindenden Apoptose in Vero B4-Zellen dargestellt (siehe 3.5.1, S. 89). Durch die Interferondefizienz dieser Zelllinie konnte eine Beeinflussung des Apoptoseverhaltens durch endogen gebildetes Interferon ausgeschlossen werden, obgleich eine relevante Interferoninduktion unter TRBV- bzw. KEMV-Infektion sowieso nicht zu erwarten war (vgl. 4.1, S. 102). Mit voranschreitender Infektionszeit nahm die Anzahl der apoptotischen Zellen deutlich zu. Parallel dazu nahm die optische Zelldichte dementsprechend ab (siehe Abb. 22, S. 90 und Abb. 23, S. 92). Eine TRBV- und KEMV-vermittelte Apoptoseinduktion konnte somit nachgewiesen werden. Die dazu führenden viralen Strukturen sowie zelluläre Signalwege, konnten anhand des Versuches allerdings nicht weiter differenziert werden. Im Falle des Orbivirus-Prototypen Bluetongue-Virus (BTV) kommt es durch die äußeren Capsidproteine VP2 und VP5 zur Einleitung einer Apoptose in Säugerzellen. Hier konnte die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF κ B sowie der Caspase 3 gezeigt werden. (Mortola et al. 2004). Da jedoch gerade diese Proteine sehr variabel sind (Mertens et al. 2004), könnten im Falle von TRBV und KEMV auch andere Mechanismen vorliegen, welche die Apoptose induzieren.

4.4.2 Der Apoptoseinhibitor Z-VAD-FMK wirkt nicht zellprotektiv auf TRBV- und KEMV-infizierte HEK293-Zellen und lediglich leicht zellprotektiv auf TRBV- und KEMV-infizierte VeroB4-Zellen

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit ein Pan-Caspase-Inhibitor (verwendet wurde Z-VAD-FMK) TRBV- bzw. KEMV-infizierte VeroB4- und HEK293-Zellen vor Apoptose schützt (s. 3.5.2, S. 92). Die Z-VAD-FMK Behandlung von infizierten HEK293-Zellen hatte nur wenig Auswirkung auf die Überlebenszeit der Zellen. Die HEK293-Zellen überlebten allenfalls nach TRBV-Infektion marginal länger durch die Z-VAD-FMK-Behandlung (s. Abb. 25, S. 96). In HEK293-Zellen kommt es unter Z-VAD-FMK-Behandlung zu einer ebenso hohen Produktion von Virionen, wie in nicht-behandelten

HEK293-Zellen, mitunter waren die Titer sogar höher als die der unbehandelten Zellen (s. 3.5.3, S. 99). Daher war in TRBV- und KEMV-infizierten HEK293-Zellen insgesamt kein Wachstumsvorteil und auch keine virale Replikationshemmung durch Hemmung der Apoptose zu beobachten. Dagegen zeigten Z-VAD-FMK-behandelte VeroB4-Zellen ein längeres Überleben im Vergleich zur nicht-behandelten Kontrolle (DMSO) (s. Abb. 25, S. 96 und Abb. 26, S. 98). Dies spiegelt sich auch deutlich in der im Anschluss an den Versuch (aus den Kulturmedienüberständen) durchgeführten Bestimmung der Virustiter wider (s. 3.5.3, S. 99). In VeroB4-Zellen bewirkt der Apoptoseinhibitor Z-VAD-FMK eine deutlich verminderte Anzahl von Virionen in den Kulturmedienüberständen. Da Orbiviren wie das BTV die Apoptose als Freisetzungsmechanismus aus den Zellen verwenden (Mortola et al. 2004), ist dies durchaus logisch. Warum die Wirkung in HEK293-Zellen allerdings weniger ausgeprägt ist, bleibt unklar. Unter Umständen kommt es in diesen Zellen durch die TRBV- und KEMV-Infektion auf Caspase-unabhängigen Wegen zur Apoptose, oder der Pan-Caspase-Inhibitor war unter den durchgeführten Versuchsbedingungen (s. 2.4.15.3, S. 56) nicht in der Lage, suffizient zu wirken. Da zelluläre Caspasen zu weiten Teilen redundant sind (Krammer 2000), ist es auch denkbar, dass die Funktion einiger Caspasen von anderen, gegebenenfalls nicht-suffizient gehemmten Caspasen ersetzt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher noch ein weiterer Apoptose-Inhibitor, der Caspase 3-Hemmstoff „M50054“ der Firma Merck-Calbiochem getestet (nicht abgebildet). Dieser wirkte allerdings zytotoxisch auf die Zelllinien, sodass er für die Fragestellung nicht weiter verwendet werden konnte. Für Bluetongue-Virus (BTV)-infizierte Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass Inhibitoren der endosomalen Ansäuerung (z.B. Chloroquin) die Apoptoseinduktion weitgehend verhindern können (Mortola et al. 2004). Ob dies auch für TRBV und KEMV gilt, wäre zukünftig zu klären.

4.4.3 IFN- α schützt sowohl HEK293- als auch VeroB4-Zellen vor dem TRBV- bzw. KEMV-vermittelten Zelltod

Viele Viren schützen sich durch die Produktion viraler Interferonantagonisten zu einem gewissen Maß vor dem Immunsystem des Wirtes (vgl. 1.2.1.4, S. 12). In TRBV- bzw. KEMV-infizierten HEK293-Zellen kommt es unter Inhibition des TypI-Interferonsystems zu einem starken CPE (vgl. 4.1, S. 102 und 4.2, S. 103). Daher wurde untersucht, ob die

Viren auch in HEK293- bzw. VeroB4-Zellen, die durch 24-stündliche Zugabe von IFN- α in einen antiviralen Zellstatus versetzt werden, einen CPE auslösen. IFN- α zählt zu den TypI-Interferonen und wirkt am selben Rezeptor wie IFN- β – lediglich mit einer unterschiedlichen Kinetik (Doerr und Gerlich 2010). Das Zellwachstum wurde auch in diesem Versuch mit Hilfe der xCELLigence-Realtime-Zellanalyseplattform von Roche beobachtet (s. 2.4.15.3, S. 56). Dabei zeigte sich ein vollständiger Schutz sowohl der TRBV- als auch der KEMV-infizierten VeroB4-Zellen vor der virusinduzierten Zellschädigung. Sie wuchsen mit einer den nicht-infizierten Zellen vergleichbaren Zelldichte weiter (vgl. Abb. 24, S. 94 und Abb. 25, S. 96). Etwas geringer stellte sich das Wachstum der HEK293-Zellen dar. Während sie durch das IFN- α vor einem KEMV-vermittelten Zellsterben nahezu komplett geschützt waren, war der Schutz hinsichtlich der TRBV-Infektion etwas weniger effektiv. Dennoch kann auch hier ein deutlicher Überlebensvorteil gegenüber den nicht-interferonbehandelten Zellen gesehen werden. Dies spiegelt sich auch deutlich in der im Anschluss an den Versuch (aus den Kulturmedienüberständen) durchgeführten Bestimmung der Virustiter wider (s. 3.5.3, S. 99). Sie sind um ein Vielfaches niedriger als die der nicht-interferonbehandelten Zellen. Im Falle der KEMV-Infektion sind die Titer sogar in beiden Zelllinien bei null, d.h. es ist kein Virus in den Kulturmedienüberständen nachweisbar. Daran wird deutlich, dass die aktive Inhibition des IFN-TypI-Systems eine entscheidende Rolle für die Qualität der TRBV- bzw. KEMV-Infektion spielt.

5 Zusammenfassung

Das Tribec- (TRBV) sowie das Kemerovovirus (KEMV) sind durch Schildzecken der Gattungen *Ixodes persulcatus* und *Ixodes ricinus* übertragene Orbiviren (Familie Reoviridae). Sie stehen im Verdacht, in Menschen und anderen Säugetieren Entzündungen des zentralen Nervensystems hervorzurufen. Seit ihrer Entdeckung im westsibirischen Kemerovo und dem slowakischen Tribetzgebirge in den 1960er Jahren, konnten die Viren mittlerweile in weiten Teilen Europas nachgewiesen werden. Über deren genauen Pathomechanismus ist nur wenig bekannt. Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem zytopathogenen Potential beider Viren gegenüber menschlichen Zellen und den zugrundeliegenden Pathomechanismen.

Innerhalb der Arbeit konnte eine nahezu komplette Inhibition der IFN- β -Induktion in TRBV- sowie KEMV-infizierten menschlichen Nierenzellen (HEK293-Zelllinie) nachgewiesen werden. Anhand von Zellwachstumskurven wurde ein starker TRBV- sowie KEMV-vermittelter zytopathischer Effekt beobachtet. Da unter Koinfektion mit dem Interferoninduktor RVFV Clone 13 ebenfalls eine Hemmung der IFN- β -Induktion resultierte, ist eine aktive Inhibition des TypI-IFN-Systems durch TRBV und KEMV anzunehmen. Zudem konnte in den Koinfektionsexperimenten ebenfalls ein starker zytopathischer Effekt beobachtet werden, der unter alleiniger RVFV Clone 13-Infektion nicht in dieser Stärke auftrat. Es konnte desweiteren belegt werden, dass es durch IFN- α -vermittelte Etablierung eines antiviralen Status zur Normalisierung des Zellwachstums unter TRBV- und KEMV-Infektion kommt. Daher ist anzunehmen, dass die aktive Inhibition des IFN-TypI-Systems eine entscheidende Rolle für die Qualität der TRBV- bzw. KEMV-Infektion spielt. Durch Immunfluoreszenzmarkierung konnte eine mit der Zeit zunehmende Apoptoseinduktion in TRBV- sowie KEMV-infizierten Zellen gezeigt werden. Die Behandlung mit dem Pan-Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK konnte dies allerdings nicht verhindern. Daher könnten Caspase-unabhängige Wege für die Apoptoseinduktion verantwortlich sein. Anhand von Promotorstudien konnte erneut gezeigt werden, dass das TRBV-Segment 9 des zehnfach segmentierten dsRNA-Genoms für einen relevanten Anteil der IFN- β -Promotorinhibition verantwortlich ist. Erstmals

konnte außerdem gezeigt werden, dass keiner der einzelnen offenen Leserahmen (helikase- ebensowenig wie ORFXa-, -b- und -c-kodierende Bereiche) für einen viralen Interferonantagonisten kodieren. Desweiteren wurden zum ersten Mal die TRBV-Segmente 2, 3 und 4 untersucht. Während das von Segment 2 kodierte VP2 unter Umständen ebenfalls eine Interferon-antagonistische Wirkung haben könnte, weisen die Genprodukte der TRBV-Segmente 3 und 4 keine IFN- β -promotorinhibierende Funktion auf. Für das KEMV konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass es durch Genprodukte des Segments 9 vermutlich ebenfalls zu einer IFN- β -Promotorinhibition kommt.

6 Literaturverzeichnis

1. Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V (2009): RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* 10 (10), 1065-72
2. Attoui H, Mohd Jaafar F, Belhouchet M, Aldrovandi N, Tao S, Chen B, Liang G, Tesh RB, de Micco P, de Lamballerie X (2005): Yunnan orbivirus, a new orbivirus species isolated from *Culex tritaeniorhynchus* mosquitoes in China. *J Gen Virol* 86 (Pt 12), 3409-17
3. 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
4. Belhouchet M, Mohd Jaafar F, Tesh R, Grimes J, Maan S, Mertens PP, Attoui H (2010): Complete sequence of Great Island virus and comparison with the T2 and outer-capsid proteins of Kemerovo, Lipovnik and Tribec viruses (genus *Orbivirus*, family *Reoviridae*). *J Gen Virol* 91 (Pt 12), 2985-93
5. Besse M: Charakterisierung der durch Tribec-Virus induzierten Hemmung der Interferon- β Induktion. Med. Diss. Göttingen (in Vorbereitung*) 2014
6. Bhattacharya B, Noad RJ, Roy P (2007): Interaction between Bluetongue virus outer capsid protein VP2 and vimentin is necessary for virus egress. *Virol J* 4 7
7. Boyce M, Wehrfritz J, Noad R, Roy P (2004): Purified recombinant bluetongue virus VP1 exhibits RNA replicase activity. *J Virol* 78 (8), 3994-4002
8. Brandt E: Inhibition des Interferon- β -Systems durch Tribec-Virus. Med. Diss. Göttingen 2012
9. 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
10. Carter J, Saunders V: *Virology: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, 2007
11. Cheng W, Ma Y, Gong F, Hu C, Qian L, Huang Q, Yu Q, Zhang J, Chen S, Liu Z, et al. (2012): Cross-reactivity of autoreactive T cells with MBP and viral antigens in patients with MS. *Front Biosci* 17 1648-58
12. Chumakov MP (1963): Report on the isolation from *Ixodes persulcatus* ticks and from patients in western Siberia of a virus differing from the agent of tick-borne encephalitis. *Acta Virol* 7 82-3
13. Chumakov MP, Karpovich LG, Sarmanova ES, Sergeeva GI, Bychkova MV, Tapupere VO, Libikova EO, Maier V, Rzhigachek R, Kozhukh O, et al. (1963): [Isolation of a virus from the tick *Ixodes persulcatus* in western Siberia and from patients which differs from the pathogen of tick encephalitis]. *Vopr Virusol* 8 98-9

* Mit freundlicher Genehmigung des Verfassers

14. Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE (1968): Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J Virol* 2 (10), 955-61
15. 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
16. Diprose JM, Grimes JM, Sutton GC, Burroughs JN, Meyer A, Maan S, Mertens PP, Stuart DI (2002): The core of bluetongue virus binds double-stranded RNA. *J Virol* 76 (18), 9533-6
17. Dobler G (1996): Arboviruses causing neurological disorders in the central nervous system. *Arch Virol Suppl* 11 33-40
18. 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
19. Doerr HW, Gerlich WH: *Medizinische Virologie : Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen ; 115 Tabellen, 2., komplett überarb. und erw. Aufl.*; Thieme, Stuttgart. New York, 2010
20. Elmore LW, Hancock AR, Chang SF, Wang XW, Chang S, Callahan CP, Geller DA, Will H, Harris CC (1997): Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (26), 14707-12
21. 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
22. Fauquet CM: *Virus taxonomy : 8th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2nd edition*. Academic, Oxford 2004
23. Firth AE (2008): Bioinformatic analysis suggests that the Orbivirus VP6 cistron encodes an overlapping gene. *Virol J* 5 48
24. Ganten D, Ruckpaul K: *Grundlagen der Molekularen Medizin*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 2003
25. Gouet P, Diprose JM, Grimes JM, Malby R, Burroughs JN, Zientara S, Stuart DI, Mertens PP (1999): The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography. *Cell* 97 (4), 481-90
26. Graff JW, Mitzel DN, Weisend CM, Flenniken ML, Hardy ME (2002): Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. *J Virol* 76 (18), 9545-50
27. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36 (1), 59-74
28. Gresikova M, Nosek J, Kozuch O, Ernek E, Lichard M (1965): Study on the Ecology of Tribe C Virus. *Acta Virol* 9, 83-8
29. Gresikova M, Rajcani J, Hruzik J (1966): Pathogenicity of Tribec virus for *Macaca rhesus* monkeys and white mice. *Acta Virol* 10 (5), 420-4
30. Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer, Berlin, Heidelberg 2008

31. Haller O, Kochs G, Weber F (2006): The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344 (1), 119-30
32. Han Z, Harty RN (2004): The NS3 protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties. *J Biol Chem* 279 (41), 43092-7
33. Hassan SS, Roy P (1999): Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry. *J Virol* 73 (12), 9832-42
34. Hiscott J (2007): Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation. *J Biol Chem* 282 (21), 15325-9
35. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, et al. (2006): 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314 (5801), 994-7
36. Hyatt AD, Eaton BT, Brookes SM (1989): The release of bluetongue virus from infected cells and their superinfection by progeny virus. *Virology* 173 (1), 21-34
37. Hyatt AD, Zhao Y, Roy P (1993): Release of bluetongue virus-like particles from insect cells is mediated by BTV nonstructural protein NS3/NS3A. *Virology* 193 (2), 592-603
38. ICTV (2011): "Virus Taxonomy: 2011 Release." von <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011&bhcp=1>.
39. Kar AK, Roy P (2003): Defining the structure-function relationships of bluetongue virus helicase protein VP6. *J Virol* 77 (21), 11347-56
40. Karlson P, Doenecke D: Karlsons Biochemie und Pathobiochemie, Thieme, Stuttgart, 2005
41. Kawai T, Akira S (2006): TLR signaling. *Cell Death Differ* 13 (5), 816-25
42. Kayser FH: Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie. 10. Aufl.,; Thieme, Stuttgart, New York, 2005
43. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Fields BN: Fields virology, 5th; Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2007
44. Krammer PH (2000): Apoptose. *Deutsches Ärzteblatt* 97 ((25)), A-1752-59
45. Labuda M, Nuttall PA (2004): Tick-borne viruses. *Parasitology* 129 Suppl S221-245
46. Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC, Wang YJ, Kato N, Omata M, Chang FY, et al. (2002): HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 21 (31), 4801-11
47. Libikova H, Tesarova J, Rajcani J (1970): Experimental infection of monkeys with Kemerovo virus. *Acta Virol* 14 (1), 64-9
48. Libikova H, Heinz F, Ujhazyova D, Stunzner D (1978): Orbiviruses of the Kemerovo complex and neurological diseases. *Med Microbiol Immunol* 166 (1-4), 255-63
49. Maclachlan NJ, Guthrie AJ (2010): Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other orbivirus diseases. *Vet Res* 41 (6), 35
50. 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

51. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J (2005): Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437 (7062), 1167-72
52. Modrow S: *Molekulare Virologie*, 3. Aufl.; Spektrum, Heidelberg 2010
53. Mohd Jaafar F, Attoui H, De Micco P, De Lamballerie X (2004): Termination and read-through proteins encoded by genome segment 9 of Colorado tick fever virus. *J Gen Virol* 85 (Pt 8), 2237-44
54. 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
55. Mosca JD, Pitha PM (1986): Transcriptional and posttranscriptional regulation of exogenous human beta interferon gene in simian cells defective in interferon synthesis. *Mol Cell Biol* 6 (6), 2279-83
56. Muller R, Saluzzo JF, Lopez N, Dreier T, Turell M, Smith J, Bouloy M (1995): Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment. *Am J Trop Med Hyg* 53 (4), 405-11
57. Nuttall PA, Jacobs SC, Jones LD, Carey D, Moss SR (1992): Enhanced neurovirulence of tick-borne orbiviruses resulting from genetic modulation. *Virology* 187 (2), 407-12
58. Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, Akira S, Taniguchi T, Namiki H, Fujita T (2007): Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J Biol Chem* 282 (10), 7576-81
59. 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
60. Ratnien M, Caporale M, Golder M, Franzoni G, Allan K, Nunes SF, Armezzani A, Bayoumy A, Rixon F, Shaw A, et al. (2011): Identification and characterization of a novel non-structural protein of bluetongue virus. *PLoS Pathog* 7 (12), e1002477
61. Roy P (1996): Orbivirus structure and assembly. *Virology* 216 (1), 1-11
62. Schmidt JR, Shope RE (1971): Kemerovo virus from a migrating common redstart of Eurasia. *Acta Virol* 15 (1), 112
63. 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
64. Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J (2003): Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300 (5622), 1148-51
65. Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, Calabresi PA, Brennan MB, Maloni HW, McFarland HF, Lin HC, et al. (1997): Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* 3 (12), 1394-7
66. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998): How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67 227-64

67. Stark K, Niedrig M, Biederbick W, Merkert H, Hacker J (2009): [Climate changes and emerging diseases. What new infectious diseases and health problem can be expected?]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 52 (7), 699-714
68. Suss J, Schrader C (2004): [Tick-borne human pathogenic microorganisms found in Europe and those considered nonpathogenic. Part I: Ticks and Viruses]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 47 (4), 392-404
69. Swiss Institute of Bioinformatics V (2008): "Orbivirus, Molecular Biology, Virion." von http://viralzone.expasy.org/complete_by_species/106.html.
70. Wagener C, Müller O: *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. Thieme, Stuttgart 2009
71. Weber F, Kochs G, Haller O (2004): Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol* 17 (4), 498-515
72. Wilson A, Mellor P (2008): Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change. *Parasitol Res* 103 Suppl 1 S69-77
73. Yoneyama M, Fujita T (2008): Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors. *Immunity* 29 (2), 178-81
74. 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:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Martin Spiegel und Herrn Dr. rer. nat. Meik Dilcher. Eure Erfahrungen und Professionalität waren unverzichtbar wertvoll für mich. Vielen Dank für das allzeit offene Ohr und die freundschaftliche Zusammenarbeit!

Desweiteren danke ich sehr herzlich Herrn Prof. Dr. med. Frank T. Hufert. Vielen Dank für die Promotionsmöglichkeit und den unkomplizierten Einstieg in Ihre Abteilung.

Ein weiterer Dank geht an das technische Personal der Abteilung. Durch euch war die Einführung in die Instrumentarien und Methodik stets angenehm und mit viel Spaß verbunden.

Zuletzt möchte ich mich bei Frau Erika Pitz für alle organisatorischen Dinge bedanken.

Die Zeit mit euch allen hat riesigen Spaß gemacht und bleibt unvergesslich für mich!