

**INAUGURAL - DISSERTATION**  
zur  
**Erlangung der Doktorwürde**  
der  
**Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät**  
der  
**Ruprecht – Karls – Universität**  
**Heidelberg**

vorgelegt von

Apotheker Markus Klehr

aus Karlsruhe

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Mai 2005

**Biochemische Charakterisierung  
und  
physiologische Bedeutung  
eines neuen durch Typ I Interferon induzierten Gens**

Gutachter: Prof. Dr. Rainer Zawatzky

Prof. Dr. Gert Fricker

## Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit wurden Struktur, Expression und Regulation des Interferon-regulierten-Gens-28 (*IFRG28*) untersucht und das Protein anhand von selbst hergestellten monoklonalen Antikörpern und stabil-transfizierten Zelllinien biochemisch und funktionell charakterisiert.

Als IFN-spezifische Kontrollelemente konnten in der proximalen Promotorregion drei Interferon-Stimulierte-Response-Elemente (ISRE) und mehrere GAS- (Gamma-Aktivierte-Sequenz) Motive identifiziert werden, deren Einfluss auf die Induzierbarkeit des IFRG28-Promotors mit Hilfe von Deletionskonstrukten in Reporergenassays untersucht wurde. Die Analyse ergab, dass die Aktivität der untersuchten Promotorregion in den ISRE begründet liegt. Um den individuellen Einfluss jedes der drei Motive auf die Transkription überprüfen zu können, wurden Punktmutationen in die einzelnen Elemente eingeführt. Die sequentielle Inaktivierung aller drei Motive zeigte, dass jedes ISRE allein funktionell ist, obwohl individuelle Unterschiede in ihrer Aktivität festgestellt wurden. Für die biochemische Charakterisierung wurde das Protein heterolog in Bakterien exprimiert und als aufgereinigtes GST-Fusionsprotein einer Sprague Dawley Ratte zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern injiziert. Nach Zellfusion und anschließendem Screening konnten 18 Hybridome identifiziert werden, von denen 17 ein spezifisches Signal im Western-Blot und in der Immunpräzipitation zeigten. Mit Hilfe der gewonnenen Antikörper konnte nachgewiesen werden, dass IFRG28 sehr schnell durch IFN induziert wird, eine lange biologische Halbwertszeit von mehr als 8 h besitzt und sehr wahrscheinlich in vesikulären Strukturen lokalisiert ist. Zur Aufklärung einer möglichen Funktion wurden Zelllinien mit stabiler IFRG28-Expression hergestellt und auf eine veränderte Zellphysiologie nach Transgenexpression untersucht. Es stellte sich heraus, dass IFRG28 die zytopathischen Effekte einer Infektion mit Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) und Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV) hinauszögert. Dieser Nachweis konnte an zwei verschiedenen Zelllinien erbracht werden, womit sichergestellt ist, dass die antivirale Aktivität kein Positionseffekt der integrierten DNA darstellt. Um den Zusammenhang einer antiviralen Wirkung mit der IFRG28-Expression näher zu prüfen, wurde die Replikation des EMCV in den konstitutiv exprimierenden Ba/F3 Zellen verfolgt. In diesen Versuchen konnte klar gezeigt werden, dass IFRG28 einen hemmenden Einfluss auf die virale Replikation ausübt.

## **Abstract:**

The present PhD work concerns the biochemical and functional characterization of the Interferon-regulated-Gene-28 (*IFRG28*) by the use of self established monoclonal antibodies and stably transfected cell lines.

Analysis of the 5'-flanking sequence of the gene revealed the presence of three Interferon-Stimulated-Response-Elements (ISRE) as well as several GAS- (Gamma-Activated-Sequence) elements. Genomic fragments encompassing a portion of the IFRG28 5'-flanking region were inserted into reporter gene vectors and were analysed in reporter gene assays. The study of deletion constructs documented that the activity of the investigated promoter region is mediated by the ISRE. Point mutations in the ISRE sites were inserted in order to analyse their individual influence on the promoter strength. The sequential inactivation of all three ISRE motives revealed that each ISRE is functional although there are individual differences in activity following IFN treatment.

For the generation of monoclonal antibodies the protein was expressed in bacteria and injected as purified GST-fusion protein into a Sprague Dawley rat. After cell fusion and subsequent screening 18 hybridomas were identified from which 17 secreted antibodies specific for IFRG28 in western-blot and immunoprecipitation. The analysis of its expression revealed that IFRG28 is rapidly induced after IFN treatment and has a long biological half life of more than 8 h. Immunofluorescence studies showed that IFRG28 is probably located within vesicular structures.

For the functional characterization stably transfected cell lines were established and subsequently checked for a possible resistance to viral infections, since among the multitude of IFN-mediated effects viral resistance is the most sensitive. It turned out that IFRG28 is able to delay the cytopathic effects of cells infected with encephalomyocarditis-virus (EMCV) and vesicular-stomatitis-virus (VSV). This finding was confirmed by two different cell lines, indicating that the antiviral activity was really due to IFRG28 expression and was not an unspecific property due to DNA integration. The IFRG28-mediated antiviral activity was checked on transcriptional level by infection of transfected Ba/F3 cells with EMCV. These experiments clearly demonstrated that IFRG28 inhibits viral replication of EMCV.

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Interferone	1
1.1.1 Nomenklatur	1
1.1.2 Induktion von Typ-I-Interferon	2
1.1.3 Induktion von Typ-II-Interferon	4
1.1.4 Signaltransduktion der Interferone	5
1.2 Interferon-induzierte Proteine und ihre antiviralen Wirkungen	7
1.3 Die virale Gegenoffensive zur IFN-Antwort	11
1.4 Zielsetzung der Arbeit	13
<b>2. Material</b>	<b>14</b>
2.1 Arbeitsgeräte	14
2.2 Chemikalien	15
2.3 Reagenzien für die Zellkultur	16
2.4 Molekularbiologische Hilfsmittel	16
2.5 Antikörper	17
2.6 DNA- und Protein-Längenstandards	17
2.7 Enzyme	17
2.8 Expressionsvektoren	18
2.9 Kits	18
2.10 Oligodesoxyribonukleotide (Primer)	19
2.11 Lösungen und Puffer	20
2.11.1 Allgemeine Lösungen und Puffer	20
2.11.2 Medien und Lösungen für die Bakterien- und Zellkultur	24
2.12 Biologisches Material	24
2.12.1 Eukaryontische Zelllinien	24
2.12.2 Viren	25
2.12.3 Bakterien	25
<b>3. Methoden</b>	<b>26</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden	26
3.1.1 Restriktionsverdau von DNA	26
3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	26
3.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	27
3.1.4 Erzeugung glatter PCR-Fragmente	27
3.1.5 Phosphorylierung der 5'-Enden eines DNA-Fragmentes	28
3.1.6 5'-Dephosphorylierung von Vektor-DNA	28
3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten	29
3.1.8 Transformation von kompetenten E. coli	29
3.1.9 Minipräparation von Plasmid-DNA (Alkalische Lyse)	30
3.1.10 Midipräparation von Plasmid-DNA	30
3.1.11 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren	31
3.1.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)	31

---

3.1.13 Generierung von Plasmiden mit Punktmutationen	32
3.1.14 Isolierung von RNA	33
3.1.15 Reverse-Transkription von mRNA (RT-Reaktion)	33
3.1.16 Gelelektrophorese und Transfer von RNA (Northern-Blot)	34
3.1.17 Herstellung radioaktiver DNA-Sonden	35
3.1.18 Hybridisierung des Northern-Blots mit radioaktiv markierter DNA	36
3.1.19 5'-RACE (Rapid-Amplification-of-cDNA-Ends)	37
3.2 Proteinchemische Methoden	39
3.2.1 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Bakterien	39
3.2.2 Luciferase-Assay	42
3.2.3 Herstellung von Proteinextrakten aus Säugerzellen	45
3.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	46
3.2.5 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Lämmli	46
3.2.6 Coomassie-Färbung von Proteingelen	47
3.2.7 LDH-Assay	48
3.2.8 MTT-Assay	48
3.3 Immunologische Methoden	49
3.3.1 Immunoblot (Western-Blot)	49
3.3.2 Strippen von Membranen	50
3.3.3 Affinitätsreinigung von Antiseren	50
3.3.4 Immunpräzipitation	52
3.3.5 Immunfluoreszenz	53
3.3.6 Herstellung monoklonaler Antikörper	54
3.3.7 ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay)	59
3.4. Virologische Methoden	60
3.4.1 Retroviraler Gentransfer in NIH-3T3 und Ba/F3	60
3.4.2 Infektion eukaryontischer Zellen mit Virus	63
3.5 Zellbiologische Methoden	64
3.5.1 Kultivierung von Bakterien	64
3.5.2 Herstellung chemokompetenter Bakterien	64
3.5.3 Kultivierung von Säugerzellen	64
3.5.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	65
3.5.5 Calciumphosphat-Transfektion von LMTK <sup>-</sup>	66
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>67</b>
4.1 Bestimmung des 5'-Endes der IFRG28-mRNA	67
4.1.1 Klonierung des 5'-Endes der IFRG28-cDNA durch 5'-RACE	68
4.1.2 Analyse der DNA-sequenzen	69
4.2 Genomische Organisation des IFRG28-Gens	71
4.3 Bioinformatische Promotoranalyse	72
4.4 Reportengenanalyse von proximalen Deletionskonstrukten	75
4.4.1 Herstellung der Deletionskonstrukte	75
4.4.2 Analyse der Deletionskonstrukte	76
4.5 Mutationsanalyse der IFN-spezifischen Kontrollelemente	79
4.5.1 Herstellung der mutierten Promotorfragmente	79
4.5.2 Analyse der mutierten Promotorfragmente	80
4.6 Weiterführende Promotoruntersuchungen	83
4.6.1 Untersuchung auf eine Induzierbarkeit des IFRG28-Promotors durch IFN- $\gamma$	83

---

4.6.2 Untersuchung auf eine Induzierbarkeit des IFRG28-Promotors durch IL-6 und TNF- $\alpha$	84
4.6.3 Vergleichende Promotoruntersuchung (IFRG28 vs. Mx2)	86
4.7 Darstellung und Expression von IFRG28-Fusionsproteinen	87
4.7.1 Klonierung des pGEX-Nco-IFRG28-GST	87
4.7.2 Klonierung des pGEX-Nco-IFRG28-12H	88
4.7.3 Expression der Fusionsproteine	89
4.8 Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen IFRG28	91
4.8.1 Nachweis des IFRG28-Proteins durch das Kaninchenserum in IFN-behandelten Zellen	91
4.8.2 Klonierung einer Splice-Variante des IFRG28	92
4.9 Herstellung von monoklonalen Antikörpern	95
4.10 Untersuchung zur Induktion des IFRG28-Proteins	97
4.10.1 Induktion durch IFN- $\alpha$ und IFN- $\gamma$	97
4.10.2 Keine direkte Induktion durch Virus	99
4.11 Bestimmung der biologischen Halbwertszeit des IFRG28	101
4.12 Lokalisationsstudien mittels indirekter Immunfluoreszenz	103
4.13 Etablierung von transfizierten Zelllinien mit stabiler IFRG28-Expression	107
4.13.1 Klonierung des retroviralen Expressionsvektors	107
4.13.2 Nachweis der IFRG28-Expression in den transfizierten Zellen	107
4.13.3 Nachweis der Lokalisation des IFRG28-Proteins in den transfizierten 3T3-IFRG28-Zellen	109
4.14 Antivirale Eigenschaften des IFRG28	111
4.14.1 Untersuchung auf antivirale Effekte in den 3T3-Zelllinien	112
4.14.2 Untersuchung auf antivirale Effekte in den Ba/F3-Zelllinien	116
4.14.3 Untersuchung zur EMCV-Repikation in 3T3 und Ba/F3	118
<b>5. Diskussion</b>	<b>120</b>
5.1 Kontrollelemente im proximalen Promotorbereich	121
5.2 Mutationsanalyse der IFN-spezifischen Kontrollelemente	122
5.3 Identifizierung einer bisher unbekanntem Splice-Variante des IFRG28	123
5.4 IFN-spezifische Expression des IFRG28-Proteins	124
5.5 Subzelluläre Lokalisation des IFRG28-Proteins	126
5.6 Etablierung von transfizierten Zelllinien mit stabiler IFRG28-Expression	127
5.7 Antivirale Aktivität des IFRG28 gegen EMCV und VSV	129
5.8 Ausblick	135
<b>6. Literatur</b>	<b>137</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>146</b>

## Abkürzungsverzeichnis

2-5A	kurze Oligoadenylate, die in 2´-5´ Richtung polymerisiert sind
4EA1	neutralisierender Antikörper gegen IFN- $\alpha$
7FD3	neutralisierender Antikörper gegen IFN- $\beta$
Abb.	Abbildung
ADAR1	Adenosin-Deaminase
ALU	absolute Luciferase-Einheit
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CDK	Cyclin-abhängige-Kinase
CHX	Cycloheximid
CPE	zytopathischer Effekt
$ddH_2O$	bidestilliertes Wasser
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DRAF1	dsRNA aktivierter Faktor
eGFP	“enhanced-Green-Fluorescent-Protein”
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fa.	Firma
FCS	fötale Kälberserum
GAF	IFN- $\gamma$ aktivierter Faktor
GAS	IFN- $\gamma$ aktivierte Sequenz
GSP	genspezifischer Primer
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
hGBP-1	humanes Guanylat-bindendes-Protein-1
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
iNOS	induzierbare NO-Synthetase
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- $\alpha$ Rezeptor
IFNGR	Interferon- $\gamma$ Rezeptor
IRES	interne ribosomale Bindungsstelle
IRF	“IFN-Regulatory-Factor”
ISG	“IFN-Stimulated-Gene”
ISGF3	“IFN-Stimulated-Gene-Factor 3”
ISRE	“IFN-Stimulated-Response-Element”
kD	kilo-Dalton
K	Negativkontrolle
Luc.	Luciferase
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LTR	“Long-Terminal-Repeat” (repetitive Nukleotidsequenz)
min	Minute
mGBP2	murines Guanylat-bindendes-Protein-2
M $\Phi$	Makrophage
MAB	monoklonaler Antikörper
MCS	multiple Klonierungsstelle



---

MEF	Maus-Embryo-Fibroblasten
MMP	Mager-Milch-Pulver
MOI	“Multiplicity-Of-Infection”
NCBI	National Center for Biology Information
NDV	Newcastle-Disease-Virus
ori	Replikationsstart
OAS	2´-5´ OligoAdenylat-Synthetase
OD	optische Dichte
OPD	ortho-Phenyldiamin
ORF	“Open-Reading-Frame” (offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	“Poly-Chain-Reaction” (Polymerasekettenreaktion)
PFU	“Plaque-Forming-Unit” (Plaque-bildende Einheit)
PKR	Proteinkinase R
PRD	“Positive-Regulatory-Domain” (positive regulatorische Domäne)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RLU	relative Luciferase-Einheit
RNase L	Endoribonuklease L
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
S/MAR	Scaffold/Matrix assoziierte Region
SF	Stimulationsfaktor
STAT	“Signal-Transducers-and-Activators-of-Transcription”
Tab.	Tabelle
TS	Transkriptionsstart
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
VRE	“Virus-Responsive-Element”
VSV	Vesicular-Stomatitis-Virus
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

# 1. Einleitung

## 1.1 Interferone

Die Interferone zählen zu den ersten bekannten Vertretern von sezernierten und zugleich regulatorisch wirkenden Proteinen, den sog. Zytokinen. Sie wurden auf Grund ihrer Eigenschaft entdeckt, zelluläre Resistenz gegen Virusinfektionen zu vermitteln. Diese Beobachtung wurde 1957 von Isaacs und Lindenmann gemacht, als sie befruchtete Hühnereizellen mit Influenzaviren infizierten [Isaacs und Lindenmann, 1957]. Sie stellten fest, dass sich im Kulturüberstand eine Substanz befinden muss, die mit der Virusreplikation interferiert. Diese als Interferenz beschriebene Eigenschaft gab schließlich dieser Proteinfamilie ihren Namen.

Neben der antiviralen Aktivität vermitteln Interferone eine Vielzahl von weiteren biologischen Effekten. Dazu zählen u.a. wachstumshemmende und immunmodulatorische Wirkungen. Untersuchungen zu den biochemischen Mechanismen, über die Interferon (IFN) in den Zellen wirkt, führten in der Folge zur Entdeckung von mehreren hundert IFN-induzierten Genen. Die Frage, wie IFN die Expression dieser Gene aktiviert, stand ebenfalls lange Zeit im Mittelpunkt intensiver Bemühungen. Relevante Studien zu diesem Thema führten schließlich zur Entdeckung des IFN-Rezeptors und des Jak-STAT-Signaltransduktionsweges.

### 1.1.1 Nomenklatur

Die Interferone werden auf Grund ihrer Proteinsequenz und ihrer Rezeptorspezifität in zwei Gruppen eingeteilt: Unter dem Typ-I-IFN werden alle Genprodukte zusammengefasst, die an den Typ-I-IFN-Rezeptor binden. Darunter fallen IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\kappa$  und IFN- $\omega$ . Zum Typ-II-IFN gehört als einziger Vertreter IFN- $\gamma$ , das von T-Lymphozyten gebildet an den Typ-II-IFN-Rezeptor bindet. Ein weiterer Unterschied ergibt sich aus ihrer Induzierbarkeit. Während das Typ-I-IFN vor allem durch Virus oder durch doppelsträngige RNA induziert wird, erfolgt eine Induktion des IFN- $\gamma$  hauptsächlich durch Interleukine (IL-2, IL-7, IL-12, IL-18), Antigen oder Mitogen [Farrar und Schreiber, 1993]. Von einigen Autoren wird deshalb auch eine Einteilung in „viral IFN“ oder „immune IFN“ vorgenommen.

Die verschiedenen Typ-I-Interferone unterscheiden sich auch bezüglich ihrer zellulären Herkunft. So wird IFN- $\alpha$  hauptsächlich von Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten gebildet. Innerhalb der IFN- $\alpha$ -Familie konnten noch weitere Subtypen identifiziert werden, von denen sich bei der Maus das IFN- $\alpha_4$  als ein besonders schnell induzierbares Gen hervorhebt. IFN- $\beta$  kann hingegen von allen Zellen produziert werden und wird bei der Maus zusammen mit IFN- $\alpha$  exprimiert. Von IFN- $\omega$ , das hauptsächlich in Leukozyten zusammen mit IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  gebildet wird, existieren ebenfalls mehrere Kopien. Allerdings wird nur ein Subtyp exprimiert [Adolf et al., 1990]. Für IFN- $\kappa$ , das ausschließlich von Keratinozyten produziert wird, wurde wie für IFN- $\beta$  nur ein Gen beschrieben [LaFleur et al., 2001].

### 1.1.2 Induktion von Typ-I-Interferon

Die durch Virus vermittelte Induktion von IFN- $\beta$  und bestimmten IFN- $\alpha$ -Spezies unterliegt im wesentlichen den gleichen Mechanismen, die auf Ähnlichkeiten im proximalen Promotorbereich zurückzuführen sind [Civas et al., 2002]. Die zugrundeliegenden Promotorelemente werden im Fall des IFN- $\beta$ -Genpromotors als „Positive-Regulatory-Domains“ (PRD) bezeichnet [Thanos, 1996]. Diese Motive stimmen zwar nicht vollständig mit denen der IFN- $\alpha$ -Spezies überein, doch manche IFN- $\alpha$ -Gene enthalten damit verwandte DNA-Abschnitte, die als „Virus-Responsive-Elements“ (VRE) bezeichnet werden [Braganca et al., 1997]. Somit werden nicht alle Subtypen des IFN- $\alpha$  direkt durch Virus induziert. Da der Promotor des IFN- $\beta$  sehr intensiv untersucht wurde, werden stellvertretend für die virusinduzierbaren Typ-I-Interferone an dieser Stelle auf die Induktion des IFN- $\beta$  näher eingegangen.

Im Promotorbereich des Gens für IFN- $\beta$  befinden sich 4 überlappende DNA-Sequenzen, die mit PRD I – IV bezeichnet werden. Als zugehörige Transkriptionsfaktoren wurden ATF-2 Homodimere oder ATF-2/c-Jun Heterodimere [Du et al., 1993], NF $\kappa$ B [Du, Thanos und Maniatis, 1993; Thanos, 1996] und mehrere Mitglieder aus der Interferon-Regulatory-Factor- (IRF) Familie identifiziert. Dabei besetzen die ATF-2 Homodimere oder ATF-2/c-Jun Heterodimere die PRD IV, NF- $\kappa$ B die PRD II und die Transkriptionsfaktoren aus der IRF-Familie die PRD I und III. HMG-I/Y stabilisiert als gerüstbildendes Protein diesen Multiproteinkomplex, der auch als „enhancesome“ bezeichnet wird [Kim und Maniatis, 1997; Thanos, 1996]. Dieser Komplex rekrutiert schließlich den Koaktivator CBP/P300, der mit seiner intrinsischen

Histonacetyltransferaseaktivität maßgeblich zur Ausbildung des Prä- und Re-Initiationskomplexes beiträgt [Yie et al., 1999].

Die IRF-Familie besteht aus mindestens 9 Mitgliedern, die untereinander eine bemerkenswerte Homologie in der DNA-Bindungsdomäne aufweisen [Marecki und Fenton, 2000]. Als wichtige Proteine für eine maximale IFN-Induktion werden IRF3 und IRF7 angesehen. Andere Mitglieder der IRF-Familie wie z.B. IRF1, IRF2 und IRF9 können auch an die PRD-Module I und III binden, allerdings sind diese Transkriptionsfaktoren nicht an der Induktion von IFN beteiligt, sondern stellen selbst IFN induzierte Gene dar [Marie et al., 1998; Sato et al., 1998; Matsuyama et al., 1993]. Während IRF1 und IRF9 aktivierend auf diese Promotorelemente wirken, besitzt IRF2 reprimierende Eigenschaften. Ergänzend wird hier auf die Homologie der PRD-Module I und III mit den nahverwandten ISRE-Motiven hingewiesen (vgl. Kapitel 1.1.4 zur Signaltransduktion der Interferone) [Pine et al., 1990]. Daraus erklärt sich auch, dass einige IFN-stimulierte Gene wie z.B. das ISG56 direkt durch Virus induziert werden können [Brandyopadhyay et al., 1995; Daly und Reich 1995; Weaver et al., 1998].

Während einer Virusinfektion wird das konstitutiv im Zytosol exprimierte IRF3 durch Phosphorylierung aktiviert, das daraufhin in den Zellkern translokiert und sich dort mit CBP/P300 zu dem Transkriptionskomplex DRAF1 (dsRNA-Activated-Factor 1) zusammenschließt [Weaver, Kumar und Reich, 1998]. Dieses Heterodimer bindet an PRD I und III des IFN- $\beta$ -Promotors, wodurch die Transkription des IFN- $\beta$  initiiert wird. Das sezernierte IFN- $\beta$  stimuliert auf autokrinem Wege den Typ-I-IFN-Rezeptor und induziert dadurch auch die Expression von IRF7. Das *de novo* synthetisierte IRF7 wird im Zytoplasma ebenfalls Virus-vermittelt phosphoryliert und aktiviert anschließend die Transkription von solchen IFN- $\alpha$ -Genen, die nicht durch IRF3 induziert werden können.

Mit diesem als „positive feedback induction loop“ bezeichneten Mechanismus wird verdeutlicht, wie wichtig die beiden Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 für die IFN-Induktion sind. Während IRF3 bei der Maus nur die Transkription des IFN- $\beta$  und des IFN- $\alpha_4$  aktiviert, maximiert das anschließend induzierte IRF7 die IFN-Antwort, indem es auch an die Promotoren anderer IFN- $\alpha$ -Spezies bindet und deren Expression initiiert. Auf diese Weise verstärkt IFN seine eigene Produktion. Anhand dieser Kaskade lässt sich auch das lang bekannte Phänomen des „IFN-Priming“ verstehen, wonach kleine IFN-Dosen Zellen in einen „ready to go“ Status versetzen. Dieser

Effekt erklärt sich daraus, dass IRF7 unter diesen Bedingungen bereits im Zytoplasma vorliegt und nur noch durch Virus aktiviert werden muss. Demnach können Zellen, die konstitutiv kleine Mengen an IFN exprimieren, viel schneller und effektiver auf Virusinfektionen reagieren.

NF- $\kappa$ B spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Gen-Induktion von IFN- $\beta$ . In nicht-infizierten Zellen liegt NF- $\kappa$ B in einem inaktiven Komplex mit I $\kappa$ B im Zytosol vor. Die I $\kappa$ B-Kinase kann durch Phosphorylierung des I $\kappa$ B den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aus seiner Bindung befreien. Dazu muss aber die Protein Kinase R (PKR) an den I $\kappa$ B-Kinase-Komplex binden und die I $\kappa$ B-Kinase aktivieren [Bonnet et al., 2000; Zamanian-Daryoush et al., 2000]. Bei der PKR handelt es sich um ein IFN-induzierbares Protein, das in geringen Mengen konstitutiv exprimiert wird. Aktiviert wird die PKR durch doppelsträngige RNA (dsRNA), die sich im Zuge einer Virusreplikation bildet [Chu et al., 1999].

### 1.1.3 Induktion von Typ-II-Interferon

Die Expression von IFN- $\gamma$  ist im Gegensatz zum Typ-I-IFN sehr zellspezifisch, denn nur Zellen des Immunsystems wie NK-Zellen und T-Lymphozyten sind in der Lage IFN- $\gamma$  zu bilden [Vilcek, 1996]. Die dafür verantwortlichen Kontrollmechanismen liegen im proximalen Promotorbereich und in den Introns des IFN- $\gamma$  Gens, wobei ein proximales Element über eine Bindungsstelle für ATF-2/c-Jun Heterodimere und ein distales Element über eine Bindungsstelle für die Transkriptionsfaktoren GATA-3 und ATF-1 verfügt [Penix et al., 1996; Zhang et al., 1998]. Im Ruhezustand der Zellen wird der Promotorbereich sehr wahrscheinlich durch Methylierung von CpG-Motiven inaktiviert.

Prinzipiell wird in T-Zellen die Synthese von IFN- $\gamma$  durch Substanzen verstärkt, die zu einer T-Zell-Aktivierung führen. Dazu zählen Interleukine (IL-2, IL-7, IL-12, IL-18), Antigen oder Mitogen. Inhibitorisch wirken dagegen Glucocorticoide, TGF- $\beta$  und IL-10. Die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sind allerdings erst teilweise aufgeklärt. In diesem Zusammenhang kann aber den Transkriptionsfaktoren STAT4 und NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle zugeschrieben werden [Yoshimoto et al., 1998].

### **1.1.4 Signaltransduktion der Interferone**

Die Interferone vermitteln ihre biologischen Wirkungen, indem sie an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche binden und dadurch die Signaltransduktionskaskade zur Expression IFN-stimulierter Gene (ISG) aktivieren. Der Typ-I- und der Typ-II-IFN-Rezeptor gehören zu der Zytokin-Rezeptor-Klasse II (ZR II). Sie sind aus zwei transmembranen Polypeptidketten aufgebaut, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden und nach Bindung ihres Liganden dimerisieren [Bazan, 1990]. Wichtige Bestandteile des Aktivierungsprozesses sind auf Rezeptorseite die Janus-Tyrosinkinasen (Jaks), die das Signal auf die im Zytoplasma gelegenen STAT-Proteine (Signal-Transducers-and-Activators-of-Transcription) übertragen [Darnell, Jr et al. 1994]. Bei den STAT-Proteinen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die an der Zytokin-abhängigen Genaktivierung beteiligt sind. Da sich die beiden IFN-Rezeptoren in ihrer Signalweiterleitung unterscheiden, werden sie im folgenden getrennt voneinander beschrieben.

#### **Signaltransduktion durch Typ-I-Interferon**

Der Typ-I-IFN-Rezeptor, der auch als IFN- $\alpha$ -Rezeptor (IFNAR) bezeichnet wird, besteht aus den beiden Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 [Mogensen et al., 1999]. An den zytoplasmatischen Domänen befinden sich die Tyrosinkinasen der Janusfamilie, wobei Tyk2 mit IFNAR1 und Jak1 mit IFNAR2 assoziiert ist [Colamonici et al., 1994; Novick et al., 1994]. Durch die Bindung von Typ-I-IFN an die IFNAR2-Untereinheit wird die Dimerisierung beider Rezeptorketten induziert und die Transphosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Kinasen Jak1 und Tyk2 erleichtert [Novick, Cohen, und Rubinstein, 1994]. Anschließend phosphoryliert Tyk2 die IFNAR1-Untereinheit, wodurch eine Bindungstasche für STAT2-Moleküle generiert wird [Yan et al., 1996]. Das gebundene STAT2-Molekül wird dann ebenfalls von Tyk2 phosphoryliert, welches sich daraufhin mit einem STAT1-Molekül assoziiert [Leung et al., 1995; Qureshi et al., 1996]. Nachdem auch dieses STAT1-Molekül phosphoryliert worden ist, dissoziiert das STAT1/STAT2-Heterodimer vom Rezeptor ab, um sich mit p48 (IRF9) zum Transkriptionskomplex ISGF3 (Interferon-Stimulated-Gene-Factor 3) zu verbinden. Die eigentliche DNA-bindende Komponente stellt p48 dar, einem Mitglied der IRF-Familie. Dieses Heterotrimer aus STAT1, STAT2 und p48 bindet im Zellkern an konservierte Sequenzbereiche, die als ISRE- (Interferon-Stimulated-

Response-Element) Motive im Promotorbereich von Typ-I-IFN induzierbaren Genen vorkommen.

### **Signaltransduktion durch Typ-II-Interferon**

Ähnlich zum Typ-I-IFN-Rezeptor besteht auch der Typ-II-IFN-Rezeptor aus zwei transmembranen Polypeptidketten, die als IFNGR1 und IFNGR2 bezeichnet werden [Bach et al., 1996]. An den zytoplasmatischen Domänen befinden sich wiederum Tyrosinkinassen der Janus-Familie, wobei IFNGR1 eine Bindungsstelle für Jak1 und IFNGR2 eine Bindungsstelle für Jak2 besitzt [Kotenko et al., 1995]. Die Signaltransduktion beginnt durch Bindung des dimeren IFN- $\gamma$  an die IFNGR1-Untereinheit, wodurch die Dimerisierung der beiden Rezeptorketten eingeleitet wird. Im Anschluss phosphorylieren sich die Rezeptor-assoziierten Kinasen Jak1 und Jak2 gegenseitig [Briscoe et al., 1996]. Indem nun die aktivierten Jaks mehrere Tyrosine der IFNGR1-Untereinheit phosphorylieren, wird eine paarige Bindungstasche für STAT1-Moleküle geschaffen [Greenlund et al., 1994]. Die STAT1-Moleküle binden nacheinander an IFNGR1, werden phosphoryliert und verlassen schließlich als Homodimer den Rezeptorkomplex. Im Zellkern aktiviert das STAT1-Homodimer, das auch als „Interferon- $\gamma$ -Activated-Factor“ (GAF) bezeichnet wird, die Transkription von IFN- $\gamma$  induzierbaren Genen [Decker et al., 1997]. Diese Gene besitzen im Promotorbereich das sogenannte  $\gamma$ -Activated-Sequence- (GAS) Element, dessen Konsensussequenz sich aus einer palindromartigen Wiederholung der Nukleotide TTA (z.B. TTANNNTAA) ergibt [Darnell, Jr., 1997]. In geringem Umfang werden am Typ-II-IFN-Rezeptor auch STAT1/STAT2-Heterodimere gebildet, die im Komplex mit p48 an die ISRE-Motive von Typ-I-IFN-induzierbaren Genen binden [Matsumoto et al., 1998]. Darüber hinaus können sich am IFNAR auch STAT1-Homodimere ausbilden, die ihrerseits die Expression von GAS-haltigen Genen induzieren [Darnell, Jr., Kerr, und Stark, 1994]. Dies erklärt die z.T. überschneidenden Aktivierungsprofile beider IFN-Typen.

## 1.2 Interferon-induzierte Proteine und ihre antiviralen Wirkungen

Interferon induziert die Synthese von mehr als 300 zellulären Proteinen [Der et al., 1998], von denen einige auch durch Kontakt mit anderen Stimuli wie z.B. dsRNA, LPS, TNF oder Virus von Zellen gebildet werden können. Der Funktion nach werden die ISG in Enzyme, Signalproteine, Chemokine, Antigen-präsentierende Proteine, Transkriptionsfaktoren und apoptotisch wirkende Proteine untergliedert. Allerdings ist die Funktion vieler ISG noch nicht bekannt. Einige sind an der antiviralen Wirkung von IFN beteiligt, von denen die Genprodukte für die 2'-5' OligoAdenylat-Synthetase (OAS), die dsRNA-abhängige Proteinkinase R (PKR), die Mx-Proteine, die dsRNA-abhängige Adenosin-Deaminase (ADAR1), die induzierbare NO-Synthetase (iNOS), die P200 Familie und P56 in den nächsten Abschnitten besprochen werden.

### OAS

Bei den 2'-5' OligoAdenylat-Synthetasen handelt es sich um eine Proteinfamilie, die auf Grund ihres Molekulargewichts in drei Klassen eingeteilt wird, klein - mittel und groß. Innerhalb jeder Klasse existieren noch mehrere Isoenzyme mit unterschiedlichen C-terminalen Enden, die durch unterschiedliche Prozessierung des primären RNA-Transkriptes zu Stande kommen. Zusätzlich können sich die Isoenzyme in den posttranslationalen Modifikationen und den zellulären Lokalisationen unterscheiden.

Diese Enzyme werden zwar durch IFN verstärkt gebildet, benötigen jedoch zur Aktivierung dsRNA und polymerisieren ATP in 2'-5' Richtung zu kurzen Oligoadenylaten (2-5A) [Kerr, 1987]. Für die Aktivierung der OAS reichen in der Regel schon kurze doppelsträngige RNA-Abschnitte mit einer Länge von 15 - 25 bp aus [Sarkar et al., 1999]. Die gebildeten 2-5A binden mit hoher Affinität an die im Zytoplasma vorliegende Endoribonuklease L (RNase L), wodurch deren Dimerisierung induziert wird. Als Dimer zerschneidet die RNase L einzelsträngige mRNA und ribosomale 28S RNA, worauf die Proteinsynthese in Virus-infizierten Zellen zusammenbricht [Jordanov et al., 2000]. Unterstützt wird diese Aussage durch Untersuchungen an RNase<sup>-/-</sup> Mäusen, die verglichen mit dem Wildtyp eine höhere Anfälligkeit gegenüber EMCV-Infektionen besaßen [Zhou et al., 1997].



Das OAS/RNase L-System könnte auch eine wichtige Rolle bei der Apoptose spielen, denn Studien an RNase<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten, dass verschiedene Gewebe Defekte in der Auslösung des programmierten Zelltodes aufwiesen [Zhou et al., 1997]. Für ein weiteres Isoenzym der OAS-Familie, dem 9-2, konnte nachgewiesen werden, dass es mit antiapoptotischen Proteinen wie Bcl2 oder BclxL interagiert und in Folge dessen deren Funktion blockiert [Ghosh et al., 2001].

## **PKR**

Die dsRNA-abhängige Proteinkinase R besitzt zwei gut charakterisierte Proteindomänen, die sich am N-terminalen und am C-terminalen Ende befinden [Meurs et al. 1990]. Die C-terminale Domäne wird auch als katalytische Domäne bezeichnet, da diese eine Serin/Threonin-Kinase-Aktivität besitzt. Dagegen verfügt die N-terminale Domäne über eine Bindungsstelle für dsRNA und wird deshalb auch als regulatorische Domäne bezeichnet. Die PKR ist normalerweise inaktiv, wird aber durch dsRNA oder andere Polyanionen wie Heparin zum funktionellen Dimer aktiviert. Dadurch wird gleichzeitig eine Konformationsänderung eingeleitet, welche die katalytische Domäne freilegt. Als Substrat für die PKR wurde der eukaryontische Transkriptionsinitiationsfaktor eIF-2 $\alpha$  identifiziert, der durch Phosphorylierung inaktiviert wird [Meurs et al., 1992]. Zwangsläufig wird die Proteinsynthese in Virusinfizierten Zellen unterbrochen. Untersuchungen an Zellen, welche die PKR konstitutiv exprimierten, konnten den antiviralen Effekt belegen. Es stellte sich heraus, dass in diesen Zellen die Replikation von EMCV, VSV und Vaccinia-Virus reduziert ist.

Neben ihrer Funktion als Regulator der Proteintranslation ist die PKR bei der Einleitung des programmierten Zelltodes, der ebenfalls zur Beseitigung von Virusinfektionen beiträgt, beteiligt. In diesem Fall wird u.a. die Expression von Fas und Fas-Rezeptoren induziert [Balachandran et al., 1998]. Daneben wurden aber auch direkte Effekte beschrieben, die sich aus der Aktivierung von NF- $\kappa$ B ergeben [Gil et al., 1999]. Abschließend wird noch auf die Induktion von IFN- $\beta$  hingewiesen, die ebenfalls unter Beteiligung der PKR zu einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B führt (vgl. Kapitel 1.1.2 zur Induktion von Typ-I-Interferon).

## **Mx-Proteine**

Bei den Mx-Proteinen handelt es sich um GTPasen, die eine Homologie mit Dynaminen aufweisen [Arnheiter et al., 1996]. Als funktionelle Bestandteile konnten bei den Mx-Proteinen zwei Proteindomänen identifiziert werden. Am N-terminalen Ende befindet sich die oben erwähnte GTP-bindende Domäne, die als essentiell für deren antivirale Aktivität angesehen wird [Pitossi et al., 1993]. Über die zentrale und C-terminale Region bilden die Mx-Proteine hochmolekulare Oligomere mit sich selbst aus. Bisher wurden in der Maus zwei Isoformen identifiziert, von denen eine, Mx1, im Zellkern und die andere, Mx2, im Zytoplasma lokalisiert ist [Dreiding et al., 1985; Jin et al., 1999]. Ihre antivirale Wirkung entfalten die Mx-Proteine, indem sie mit ihrer zentralen und C-terminalen Domäne mit viralen Proteinkomplexen interagieren [Ponten et al., 1997]. Abhängig von ihrer zellulären Lokalisation, inhibieren sie entweder den viralen Nukleokapsid-Transport oder die virale RNA-Synthese [Haller et al., 1998]. Für das Mx1 konnte eine selektive Hemmung der Replikation von mehreren Mitgliedern der Orthomyxoviridae wie den Influenza-Virus A und den Thogoto-Virus nachgewiesen werden [Pavlovic et al., 1992; Frese et al., 1995]. Interessanterweise besitzen mehrere Mausstämme, die im Labor eingesetzt werden, kein funktionelles Mx1-Gen, weshalb sie auch als natürliche Knock-out Mäuse angesehen werden. Dagegen trägt aber das Mx2-Gen von wt-Mäusen zu einer VSV-Resistenz bei [Jin et al., 1999].

## **ADAR1**

Die dsRNA-abhängige Adenosin-Deaminase katalysiert eine Reaktion, in der Adenosinreste (A) einer dsRNA zu Inosinresten (I) hydrolysiert werden [Levanon et al., 2005]. Da die Basenpaarung zwischen Inosin und Uridin (U) eine geringere Bindungsenergie aufweist, als die zwischen A und U, wird dsRNA zu ssRNA destabilisiert [Bass und Weintraub, 1988]. Eine weitere Konsequenz ergibt sich daraus, dass Inosine von Polymerasen und Ribosomen als Guanine erkannt werden. Somit löst die RNA-Modifikation auch gleichzeitig eine Veränderung der Proteinsequenz aus.

Für die ADAR1 konnten zwei verschiedene Mechanismen des „RNA-editing“ festgestellt werden. Bei Viren mit (-) ssRNA als Genom werden häufig mehrere A zu I hydrolysiert, wodurch Hypermutationen eintreten [Bass, 1997]. Von einigen Autoren wird diese Art der Modifikation auch in Zusammenhang mit einer persistierenden

Virusinfektion gebracht [Murphy et al., 1991; Cattaneo, 1994]. Andererseits können Desaminierungen auch sehr selektiv auftreten, wie es z.B. für den Hepatitis-D-Virus nachgewiesen wurde [Casey und Gerin, 1995]. In diesem Fall wird durch Konversion eines Stop-Kodons in ein Tryptophan-Kodon das ORF verlängert, worauf nun das  $\Delta$ -Antigen exprimiert wird.

Aber auch eukaryontische Primärtranskripte können als Substrat in Frage kommen [Maas et al., 1996]. Die Bedeutung dieses Vorgangs ist allerdings in Bezug auf eine Virusinfektion noch unklar.

### **iNOS**

Die induzierbare NO-Synthetase kann in Makrophagen durch IFN- $\gamma$  und LPS induziert werden [Gao et al., 1997]. Sie katalysiert eine NADPH-abhängige Reaktion in der L-Arginin zu Citrullin oxidiert wird [Griffith und Stuehr, 1995]. Dabei fällt NO an, das eine wichtige Rolle in der angeborenen Abwehr von Mikroorganismen und Viren spielt. Reaktive Stickstoff-Intermediate können ebenfalls durch Oxidation und Reduktion von NO entstehen [Michel und Feron, 1997]. Die zytotoxischen Effekte des NO's sind auf dessen Reaktivität mit mitochondrialen Enzymen, die Eisen in ihrem aktiven Zentrum besitzen, zurückzuführen [Kim und Ponka, 2000]. Als Folge davon wird der Elektronentransport der Atmungskette gestört, was schließlich zum Abtöten von infizierten Zellen führt.

### **P200 Familie**

Von den Mitgliedern der P200 Familie sind die murinen P202- und P204-Proteine am besten charakterisiert [Min et al., 1996; Liu et al., 1999]. Beide Proteine besitzen die Fähigkeit die Genexpression in IFN-behandelten Zellen zu verändern, indem sie entweder die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B, c-Fos und c-Jun blockieren (P202) oder den RNA-spezifischen Transkriptionsfaktor UBF1 inaktivieren (P204). Untersuchungen an Zellen, in denen diese Proteine überexprimiert wurden, konnten zeigen, dass die Zellteilungsrate herabgesetzt ist [Min et al., 1996; Liu et al., 1999].

**P56**

P56 zählt zu den Proteinen, die nicht nur durch IFN sondern auch durch Virus bzw. dsRNA induziert werden können [Guo und Sen, 2000]. Als solches besitzt es eine äußerst kurze Halbwertszeit. Dieser Befund steht sicherlich im direkten Zusammenhang mit dessen Funktion. Biochemische Untersuchungen zu diesem Thema konnten zeigen, dass P56 als zytoplasmatisches Protein mit P48, einer Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF-3, interagiert. Als Folge davon wird die Initiation der Proteinsynthese blockiert [Guo et al., 2000a]. In Studien, in denen dessen antivirale Eigenschaften untersucht wurden, konnten allerdings keine inhibitorischen Funktionen auf die Replikation von VSV bzw. EMCV festgestellt werden [Guo et al., 2000].

**1.3 Die virale Gegenoffensive zur IFN-Antwort**

Obwohl das IFN-System einen sehr effektiven Verteidigungsmechanismus zur Abwehr von Virusinfektionen darstellt, werden höher entwickelte Eukaryonten dennoch mit Viren infiziert. Dies ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass auch Viren sich in den Jahrtausenden ihrer Koexistenz den Umständen angepasst haben. Sie entwickelten Mechanismen, mit denen entweder die IFN-Induktion oder die IFN-vermittelten Wirkungen umgangen werden können. Anhand einiger wichtiger Schaltstellen des IFN-Systems sollen die viralen Strategien zur Ausschaltung des IFN-Systems näher erläutert werden.

**Inhibition der IFN-Produktion**

Eine Möglichkeit besteht in der Expression von Proteinen, welche die aktivierenden Sequenzmotive auf dsRNA maskieren. Als dsRNA-bindende Proteine verhindern sie nicht nur die Aktivierung der PKR, sondern auch die von anderen zellulären Proteinen. Als Beispiel ist hier das E3L-Protein des Vaccinia-Virus zu nennen, das neben der PKR auch die OAS und die ADAR1 hemmen kann [Shors et al., 1997].

Für andere virale Proteine konnten inhibitorische Eigenschaften auf Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang produziert das humane Papilloma-Virus 16 gleich zwei Proteine. Während E6 sehr effektiv an IRF3 bindet und dadurch die Induktion von Typ-I-IFN unterdrücken kann, inaktiviert E7 die DNA-bindende Komponente im ISGF3-Transkriptionskomplex [Ronco et al., 1998; Barnard

und McMillan, 1999]. Vom Kaposi Sarkom assoziierten Herpes-Virus 8 ist bekannt, dass es vier homologe IRF-Proteine exprimiert, die domiant-negative Einflüsse auf IRF1, IRF3 und IRF7 ausüben [Li et al., 1998a].

### **Inhibition des Jak/STAT-Signaltransduktionsweges**

Für einige Pox-Viren konnte gezeigt werden, dass von infizierten Zellen lösliche IFN-Rezeptoren sezerniert werden, die dem membranständigen Rezeptor den Liganden entziehen. Damit wird auch gleichzeitig der Aufbau eines antiviralen Status in benachbarten Zellen verhindert. Im Unterschied zu ihren Gegenstücken in der Wirtszelle, besitzen die löslichen Formen häufig eine breite Spezies-Spezifität [Symons et al., 1995].

An anderer Stelle greift das C-Protein des Sendai-Virus ein. Dieses Protein verhindert die Phosphorylierung von STAT1, wodurch kein funktioneller Transkriptionskomplex aufgebaut werden kann [Garcin et al., 1999]. Ein ähnlicher Mechanismus wurde in Zellen beschrieben, die mit dem humanen Zytomegalie-Virus infiziert wurden. In diesem Fall findet allerdings eine Proteasom-vermittelte Degradation von STAT1-Molekülen statt [Miller et al., 1999].

### **Inhibition antiviral wirkender Proteine**

Eine andere Strategie besteht darin, die Funktion von IFN-induzierten Proteinen zu hemmen, wobei die PKR und die OAS häufig Ziele solcher Angriffe sind. Einige Viren produzieren zu diesem Zweck dsRNA-Moleküle, die sehr effektiv an die PKR binden und dadurch als kompetitiver Inhibitor wirken. Solche RNA-Transkripte werden unter anderem von Adenoviren gebildet, aber auch der Epstein-Bar-Virus ist dazu in der Lage [Mathews, 1995; Sharp et al., 1993].

Einen hemmenden Einfluss auf das OAS-System konnte für den Herpes-Simplex-Virus nachgewiesen werden. Dazu werden vom Virus 2-5A - Derivate synthetisiert, die sich als Antagonisten verhalten und die Aktivierung der RNase L inhibieren [Cayley et al., 1984].

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit:**

Während die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade zur Expression IFN-induzierter Gene bereits bekannt ist, sind die molekularen Mechanismen der IFN-Wirkung erst teilweise verstanden. Die beste Chance für die Forschung auf dem Gebiet der IFN-vermittelten Effekte stellt somit die Identifizierung und Charakterisierung weiterer IFN-induzierter Gene dar. Im Rahmen dieser Arbeit galt es, das noch nicht weiter untersuchte IFN-regulierte-Gen-28 (*IFRG28*) der Maus biochemisch zu analysieren, sowie dessen physiologische Bedeutung anhand von selbst etablierten Zellsystemen aufzuklären.

Zunächst sollte die Regulation der Expression mit Hilfe von Reporterstudien untersucht, wichtige Kontrollelemente im Promotorbereich des *IFRG28*-Gens identifiziert und auf eine Induktion durch weitere Zytokine geprüft werden. Für die biochemische Analyse sollte das Protein heterolog in Bakterien exprimiert und aufgereinigt werden, so dass damit monoklonale sowie polyklonale Antikörper hergestellt werden können. Mit Hilfe der gewonnenen Antikörper sollte die Expression des *IFRG28* auf Proteinebene verfolgt und dessen subzelluläre Lokalisation aufgedeckt werden. Zur Aufklärung einer möglichen Funktion sollten Zelllinien mit stabiler *IFRG28*-Expression hergestellt und anhand von physiologischen Tests analysiert werden.

## 2. Material

### 2.1 Arbeitsgeräte

Arbeitsgeräte	Hersteller/Bezugsquelle
Analysenwaage	Mettler, Giessen
Autoradiographie-Kassetten	Kodak , Stuttgart
Begasungsbrutschrank	Labotec, Göttingen
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
ELISA-Reader Multiscan MS	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA, München
FACSort	Becton Dickinson, Heidelberg
Geigerzähler LB 1210 B	Berthold, Wildbad
Geltrockner	Bio-Rad, München
Grobwaage	Sartorius
Heizblock/Schüttler	Eppendorf, Hamburg
Heizwasserbad	Julabo, Seelbach
Kühl-/Heizwasserbad	Julabo, Seelbach
Luminometer Lucy 1	Anthos, Salzburg, Österreich
Luminometer Lumat 9501	Berthold, Bad Wildbach
Mikroskop Leitz Diavert	Leica, Wetzlar
Mikroskop Leitz DMIL+ DFC350 FX	Leica, Wetzlar
Mikroskop Leitz DMRBE	Leica, Wetzlar
Mikrowelle	AEG
Mini-PROTEAN II (Protein-Minigele)	BioRad, München
PCR Thermo Cycler MultiCycler PTC-2000	M.J. Research
pH-Meter Calimatic	Knich
Pipettboy acu	Integra Biosciences
Pipetten	Gilson Abimed, Düsseldorf
Photometer Ultrospec II	LKB Biochrom, Cambridge, UK
Polymax 1040	Heidolph, Rust
Rührer MR 3000	Heidolph, Rust
Spannungsgerät ECPS 3000/150	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Spannungsgerät Phero-stab. 500	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Sterile Werkbank BioGard Hood	Baker Company, Sanford, USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler PTC-200	MJ Research
Über-Kopf-Schüttler	Heidolph, Rust
UV-Crosslinker 1800	Stratagene, Heidelberg
Vortexer	Heidolph, Rust
Western-Blotkammer	Cti, Idstein
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus-Kendro, Hanau
Zentrifuge Minifuge G	Heraeus-Kendro, Hanau
Zentrifuge Minifuge RF	Heraeus-Kendro, Hanau
Zentrifuge Minifuge T	Heraeus-Kendro, Hanau
Zentrifuge Sigma 1 – 15k	Sigma, Taufkirchen
Zentrifuge Sorval RC 5C	Sorvall, Bad Nauheim

## 2.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Bezugsquelle
Aceton	Riedel-de Haën <sup>®</sup> , Seelze
Acrylamid-Bis Lösung, 19:1 (40% m/v)	Serva, Heidelberg
Agar	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Serva, Heidelberg
Aqua-Poly Mount	Polysciences, Eppelheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	Aldrich, Seelze
Borsäure	Fluka, Seelze
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA Fraktion V	Seva, Heidelberg
Chloramphenicol	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Complete <sup>®</sup> Protease-Inhibitor Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
Dextranblau	Sigma, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)	AppliChem, Darmstadt
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Riedel-de Haën <sup>®</sup> , Seelze
Ethanol	Riedel-de Haën <sup>®</sup> , Seelze
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt
Glucose	Fluka, Seelze
Glutathion, reduziert	Merck, Darmstadt
Glutathion-Sepharose, reduziert	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Glycerin 85%	Seva, Heidelberg
Hexanukleotide	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Isopropanol	Fluka, Seelze
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Ladepuffer DNA 6x	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lipofectamin <sup>®</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel-de Haën <sup>®</sup> , Seelze
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Sigma, Deisenhofen
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt



Natriumorthovanadat	AppliChem, Darmstadt
Nonidet-P40 10%	Roche Diagnostics, Mannheim
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
OPDA (1,2-Phenylendiamin)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	AppliChem, Darmstadt
Phenol in TE-Puffer pH 7,5	Roth, Karlsruhe
Phenol, kristallin	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 32%	Merck, Darmstadt
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenendiamin)	Sigma, Taufkirchen
Tris (hydroxymethyl)aminoethan	Sigma, Taufkirchen
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

## 2.3 Reagenzien für die Zellkultur

Zellkulturreagenzien	Hersteller/Bezugsquelle
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Bacto-Agar für die Molekularbiologie	Invitrogen, Karlsruhe
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Dulbecco's modified Eagle's Medium	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid)	AppliChem, Darmstadt
G418	Invitrogen, Karlsruhe
Fötale Kälberserum	Linaris, Karlsruhe
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Interferone $\alpha$ , $\beta$ und $\gamma$	R. Zawatzky, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.4 Molekularbiologische Hilfsmittel

Molekularbiologische Hilfsmittel	Hersteller/Bezugsquelle
Einmalplastikküvetten	Greiner, Nürtingen
Einmalspritzen (steril)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Becton-Dickinson, Heidelberg
Hyperfilm MP Röntgenfilme	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Kryoröhrchen	Greiner, Nürtingen
Nylonmembran Hybond N	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Pipettenspitzen	Rainin, Gießen
Plastikküvetten	Greiner, Nürtingen
PolyPrep Chromatography columns	BioRad, München
Polystyrolröhrchen	Greiner, Nürtingen
PP-Röhrchen 5 ml und 50 ml	Greiner, Nürtingen
PVDF-Membran (Immobilon P)	Millipore, Eschborn

Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Whatmann 3 MM Papiere	Schleicher und Schüll, Dassel
Zellkulturflaschen (75 und 25 cm <sup>2</sup> )	Becton-Dickinson, Heidelberg
Zellkulturplatten (96-, 24- und 6 Loch)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Zellkulturschaber, steril	Becton-Dickinson, Heidelberg

## 2.5 Antikörper

Antikörper	Hersteller/Bezugsquelle
4EA1 (neutralisierender Antikörper gegen IFN- $\alpha$ )	R. Zawatsky, Heidelberg
7FD3 (neutralisierender Antikörper gegen IFN- $\beta$ )	R. Zawatsky, Heidelberg
Alexa 488 (Ziege- $\alpha$ -Ratte, polyklonal)	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa 594 (Ziege- $\alpha$ -Ratte, polyklonal)	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa 594 (Ziege- $\alpha$ -Kaninchen, polyklonal)	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege- $\alpha$ -Ratte polyklonal IgG (H+L) Peroxidase-konjugiert	Dianova, Hamburg
Ziege- $\alpha$ -Kaninchen polyklonal IgG (H+L) Peroxidase-konjugiert	Dianova, Hamburg

## 2.6 DNA- und Protein-Längenstandards

DNA- und Protein-Marker	Hersteller/Bezugsquelle
Gene Ruler <sup>TM</sup> DNA Ladder Mix #SM0333 Precision Plus Protein Standards	Fermentas, St. Leon-Rot BioRad, München

## 2.7 Enzyme

Enzyme	Hersteller/Bezugsquelle
BAP (Bakterielle-Alkalische-Phosphatase)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
HiFidelity-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt/Main
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Frankfurt/Main
TAQ-Polymerase	Sigma, Taufkirchen
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt/Main

## 2.8 Expressionsvektoren

<b>Vektor</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
pGEX2T	Amersham-Pharmacia, Freiburg
pGL3-Basic	Promega, Heidelberg
pMX-PIE	Dr. T. Kitamura, Tokyo, Japan

## 2.9 Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
5'-RACE	Invitrogen, Karlsruhe
ChemiLight	Roche, Mannheim
CytoTox 96 <sup>®</sup> Cytotoxicity-Assay	Promega, Heidelberg
QIAfilter <sup>™</sup> Plasmid Midi Kit	Qiagen, Mannheim
QuickChange-Site-Directed-Mutagenesis-Kit	Stratagene, Heidelberg
ROTI <sup>®</sup> -Transform	Roth, Karlsruhe

## 2.10 Oligodesoxyribonukleotide (Primer)

Primer	Sequenz (5´-3´)	Konstrukt
EMCV-F	CAA GTC TTC CAA CCA GCA TA	EMCV-Sonde
EMCV-R	ACC GAA GGC AGT CCA GTG TA	EMCV-Sonde
K3-Nco-His-F	ACG ACC CAT GGG TCG TAA ACA TCA CCA TCA CCA TCA CCC CGA TGA CTT CAG TAC TTG GGA G	pGex-Nco-IFRG28- His/GST
K3-Nco-His-GST	ACC GAC CAT GGT CGG TTT GTG ATG GTG ATG GTG ATG TTT ACG TTG GGG GGG CTC TCT GCA TCC	pGex-Nco-IFRG28-His- GST
K3-Nco-His-RS	AAT AGC CAT GGC TAT TAA TGG TGA TGG TGA TGG TGT TTA CGT TGG GGG GGC TCT CTG CAT CC	pGeX-Nco-IFRG28-His
MGF1	GCT GGG GCT TAT GAG CTT TG	LK1; LK4; LK5-1;
MGF2	GGT TCG AAT TTG ACC TCT GC	LK5-2
MGF3	ATG TAG GAG AGG GCT ACC ATG	LK6
MGF4	CCC AGA ATG TAG CAG GGC C	LK5-3; LK7; LK8
MGF5	CTC TTA CAG TTC TGA GAT CTC	LK2
MGR1	AGG TGC ACA GAA ACC TTA GGG	LK1
MGR2	GAG GAA ACA AAG AAC TTC AG	LK2; LK3; LK4; LK6; LK7
MGR3	TCC TCA AAT CTG GGA GAG AGG	LK8
MGR4	GCA GCT CAC TTG TCT TCC TCA	LK5-1; LK5-2; LK5-3
ISRE-F	TTA TTT CAA TCC CCA CAC TGG	LK3
M1-F	TCT GTG CAC CTT GGA AAC CAC AAC TTA AAG ACA GAC CGG G	IM1; IM1-3
M1-R	CCC GGT CTG TCT TTA AGT TGT GGT TTC CAA GGT GCA CAG A	IM1; IM1-3
M2-F	AAG ACA GAC CGG GAA ATG GAC CCT GAA AGA ACC GGG AAA CTG	IM2; IM1-2; IM2-3; IM1- 2-3
M2-R	CAG TTT CCC GGT TCT TTC AGG GTC CAT TTC CCG GTC TGT CTT	IM2; IM1-2; IM2-3 IM1-2-3
M3-F	GGA AAC TGA AAG AAC CGG GCA CCT GAA ACT GTT CTT TGT TTC C	IM3
M3-R	GGA AAC AAA GAA CAG TTT CAG GTG CCC GGT TCT TTC AGT TTC C	IM3
pGEX-Mut-F	CAA TTT CAC ACA GGA AAC AGT ATC CAT GGC CCC TAT ACT AGG TTA TTG G	pGex-Nco
pGEX-Mut-R	CCA ATA ACC TAG TAT AGG GGC CAT GGA TAC TGT TTC CTG TGT GAA ATT G	pGex-Nco
K3-Retro-F3	GTG GCG GCC CGC TCG AGC GGG CCG CCA CCA TGC TGT TCC CCG ATG ACT TCA G	pMX-PIE-K3
K3-Rerto-R2	GAT AAT AGC CGC TCG AGC GGC TAT TAT CTA GTG AAA AGA CTA AAA AGG GC	pMX-PIE-K3

**Tab. 2.10-1 Primertabelle**

In der linken Spalte ist der Name der verwendeten Primer aufgeführt, in der mittleren befindet sich die Nukleotidsequenz und in der rechten die Bezeichnung der damit hergestellten Konstrukte.

## 2.11 Lösungen und Puffer

Die aufgeführten Lösungen und Puffer wurden standardmäßig in deionisiertem Wasser angesetzt und nach Bedarf autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte, sofern nichts anderes angegeben, bei Raumtemperatur. Puffer für Enzyme sowie deren Zusammensetzung sind hier nicht aufgeführt, da sie gebrauchsfertig vom Hersteller bezogen wurden.

### 2.11.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
β-Gal-Reaktionspuffer (4°C)	10 mM KCl 1 mM MgSO <sub>4</sub> 50 mM β-Mercaptoethanol 100 mM Na-Phosphat-Puffer; pH 7,5
ATP 10x (-20°C)	50 mM ATP in ddH <sub>2</sub> O
Bakterien-Lysispuffer für Proteinaufreinigung (4°C)	250 mM NaCl 1 mM EDTA 1% Nonidet-P40 (v/v) 1x Complete 50 mM Tris-HCl; pH7,5
Blocklösung für Western-Blot und Immunfluoreszenz	5% Magermilchpulver (m/v) in PBS-T
Coating-Puffer für ELISA	0,05 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; pH 9,6
Elektrophoresepuffer für Agarosegele (TBE-Puffer)	0,9 M H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 20 mM EDTA 0,9 M Tris-HCl; pH 8,0
Elektrophoresepuffer für SDS-Gele 10x	1,9 M Glycin 1% SDS (m/v) 0,25 M Tris
Elutionspuffer für 6His-Fusionsproteine (4°C)	350 mM NaCl 150 mM KCl 5 mM β-Mercaptoethanol 500 mM Imidazol 0,5% NP-40 (v/v) 1x Complete (frisch zuzusetzen) 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,85
Elutions-Puffer für GST-Fusionsproteine	10 mM red. Glutathion 60 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,85 (frisch herzustellen)

---

Ethidiumbromid-Lösung	3 µg/ml Ethidiumbromid
FAE-Puffer 10x	100 mM Na-Acetat 10 mM EDTA 400 mM MOPS; pH 7,0
FA-Mix (-20°C)	6 mM Na-Acetat 0,7 mM EDTA 4,5% Glycerin (v/v) 62% Formamid (v/v) 8% Formaldehyd (v/v) 0,04% Bromphenolblau (w/v) 90 µg/ml Ethidiumbromid 25 mM MOPS; pH 7,0
Färbelösung für Proteingele	50% Methanol (v/v) 10% Eisessig (v/v) 40% $\text{ddH}_2\text{O}$ (v/v) 0,1% Coomassie-Brillant-Blue (m/v)
Fixier/Entfärber für Proteingele	50% Methanol (v/v) 10% Eisessig (v/v) 40% $\text{ddH}_2\text{O}$ (v/v)
Hydrolyse-Puffer für RNA-Gele	0,05 M NaOH 0,01 M NaCl
Luciferin-Lösung 100x (-70°C)	10 mg Luciferin ad 1,4 ml Luciferase-Reaktionspuffer
Luciferase-Reaktionspuffer (4°C)	15 mM $\text{MgSO}_4$ 5 mM ATP (frisch zuzusetzen) 1 mM DTT (frisch zuzusetzen) 25 mM Glycylglycin; pH 7,8
Lysispuffer für Luciferase-Assay (4°C)	15 mM $\text{MgSO}_4$ 4 mM EGTA 1% Triton X-100 (v/v) 1 mM DTT (frisch zuzusetzen) 25 mM Glycylglycin; pH 7,8
Lysispuffer für GST-Fusionsproteine (4°C)	100 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 0,5% NP-40 (v/v) 1x Complete (frisch zuzusetzen) 20 mM Tris-HCl; pH 7,5

---

Lysispuffer für 6His-Fusionsproteine (4°C)	350 mM NaCl 150 mM KCl 12 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 10 mM Imidazol 0,5% NP-40 (v/v) 1x Complete (frisch zuzusetzen) 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 8,0
Lysispuffer für Proteinextrakte (4°C)	150 mM NaCl 10% Glycerol (v/v) 1 mM EDTA 1% NP40 (v/v) 1x Complete (frisch zuzusetzen) 40 mM Tris-HCl; pH 7,4
Minipräp-Lösung 1 (4°C)	50 mM Glucose 10 mM EDTA 4 mg/ml Lysozym 25 mM Tris-HCl; pH 8
Minipräp-Lösung 2	200 mM NaOH 1% Natriumdodecylsulfat (v/v)
Minipräp-Lösung 3 (4°C)	3 M Kaliumacetat; pH 4,8
Na-Phosphat-Puffer (100 mM; pH 7,5)	41 ml 100mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 9 ml 100mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
ONPG 4x (4°C)	4 mg/ml ONPG in 100 mM Na-Phosphat-Puffer
PBS (Phosphate-Buffered-Saline)	37,0 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 20,0 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
PBS-T	0,05% Tween 20 (v/v) in PBS
Phenol/Chloroform für DNA (4°C)	50% Phenol (v/v) 50% Chloroform (v/v)
Phosphatpuffer 40x	300 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 700 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 6,5
Protein-Ladepuffer 5x (4°C)	5% Natriumdodecylsulfat (v/v) 25% Glycerol (v/v) 100 mM Dithiotreitol (DTT) 300 mM Tris-HCl; pH 8,0

---

Puffer A für SDS-Trenngele	0,4% SDS (m/v) 1,5 M Tris-HCl; pH 8,8
Puffer B für SDS-Sammelgele	0,4% SDS (m/v) 0,5 M Tris-HCl; pH 6,8
Reaktionspuffer für ELISA (4°C)	0,03% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (v/v) 1 mg/ml OPDA 0,1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 6,0
Ripa-Puffer (4°C)	100 mM NaCl 1 mM EDTA 15% Glycerin (v/v) 0,1% NP-40 (v/v) 50 mM Tris-HCl; pH 7,4
TE-Puffer (4°C)	1 mM EDTA 10 mM Tris-HCl; pH 8,0
Transferpuffer für Proteingele	192 mM Glycin 25 mM Tris 20% Methanol (v/v) 0,1% Natriumdodecylsulfat (m/v)
Waschpuffer für 6His-Fusionsproteine (4°C)	350 mM NaCl 150 mM KCl 12 mM β-Mercaptoethanol 25 mM Imidazol 0,5% NP-40 (v/v) 1x Complete (frisch zuzusetzen) 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 8,0



### 2.11.2 Medien und Lösungen für die Bakterien- und Zellkultur

Medium/Lösung	Zusammensetzung
Ampicillin (-20°C)	50 mg/ml
D-MEM (4°C)	Fertigprodukt der Fa. Sigma, Taufkirchen
Einfriermedium für Zellen (4°C)	10% DMSO (v/v) 90% FCS (v/v)
LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	50 g Trypton 25 g Hefeextrakt 25 g NaCl 5 g D-Glucose ad 5 L <sub>dd</sub> H <sub>2</sub> O; pH 7-7,5
LB-Agar	2% Bacto-Agar (m/v) in LB-Medium
Penicillin/Streptomycin (4°C)	Fertigprodukt der Fa. Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 (4°C)	Fertigprodukt der Fa. Sigma, Taufkirchen
RF1-Lösung (4°C)	100 mM RbCl <sub>2</sub> 50 mM MnCl <sub>2</sub> 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15% Glycerin (v/v) 30 mM Kaliumactat; pH 5,8
RF2-Lösung (4°C)	10 mM RbCl <sub>2</sub> 75 mM CaCl <sub>2</sub> 15% Glycerin (v/v) 10 mM MOPS; pH 6,8

## 2.12 Biologisches Material

### 2.12.1 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften/Typ
NIH/3T3	Mausembryofibroblasten
LMTK <sup>-</sup>	Mausfibroblasten
Ba/F3	prä-B-Zellen (mit IL-3 transformiert)
Phoenix	transformierte 293T
Ag 8	Ratten-Myelom

### 2.12.2 Viren

<b>Virus</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
EMCV (Encephalomyocarditis-Virus)	R. Zawatzky, Heidelberg
NDV (Newcastle-Disease-Virus)	R. Zawatzky, Heidelberg
VSV (Vesicular-Stomatitis-Virus)	R. Zawatzky, Heidelberg

### 2.12.3 Bakterien

<b>E.coli-Stamm</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
TAM1-F'	Active Motif
BL21	Merck-Novagen, Darmstadt
TOP10F'	Invitrogen, Karlsruhe

## **3. Methoden**

### **3.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.1.1 Restriktionsverdau von DNA**

Die Hydrolyse von doppelsträngiger DNA erfolgt mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen. Hierbei handelt es sich um bakterielle Enzyme, die eine spezifische Abfolge von Nukleotiden auf der DNA erkennen und innerhalb dieser Erkennungssequenz schneiden. Diese spezifische Spaltung der DNA wird sowohl zur Charakterisierung als auch zur Gewinnung von Fragmenten angewendet. Üblicherweise findet die Reaktion in einem Volumen von 30 µl statt, in welchem 1 - 5 µg DNA mit dem entsprechenden Enzym vorliegen. Temperatur und Pufferbedingungen werden nach den Angaben des Herstellers gewählt. Die Inkubationszeit beträgt bei Routineuntersuchungen 1 bis 2 h bei präparativen Ansätzen 4 bis 16 h.

#### **3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA in einem Agarose-Gel dient der Größenbestimmung des untersuchten Materials oder der Isolierung von Fragmenten für Klonierungsarbeiten. Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass DNA im Puffersystem negativ geladen vorliegt und daher bei angelegter Spannung zur Anode wandert. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zur Größe des DNA-Fragmentes. Konzentration der Agarose (0,5% - 2%) und Pufferbedingungen bestimmen den Auftrennungsgrad des Agarose-Gels. Für die Beladung werden die Ansätze mit 1/6 Volumen des DNA-Ladepuffers versetzt und in die Taschen des Gels überführt. Jeder Lauf erfolgt standardmäßig bei 130 V in 1x TBE-Puffer. Anschließend werden die Agarose-Gele für 2 Minuten mit einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und für 20 Minuten in Wasser gewaschen. Dadurch bleibt nur das in die DNA eingebaute Ethiumbromid im Gel zurück. Zur Betrachtung des Gels wird dieses mit UV-Licht bestrahlt und fotografiert.

### 3.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zu präparativen Zwecken werden entweder 5 µg verdaute DNA oder der Ansatz einer PCR in möglichst breite Geltaschen geladen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt elektrophoretisch in einem 0,8%igen Agarose-Gel bei 100 V. Nach erfolgter Ethidiumbromidfärbung wird das Gel unter langwelligem UV-Licht (366 nm) betrachtet und die zu isolierende Bande mit Hilfe eines Skalpell aus geschnitten. Das weitere Vorgehen entspricht den Angaben des zu Grunde liegenden „Jetsorb“ Kits der Fa. Genomed.

### 3.1.4 Erzeugung glatter PCR-Fragmente mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase

PCR-Produkte tragen am 3'-Ende sehr häufig eine zusätzliche Adenosinbase, die durch die Polymerase im Verlauf der DNA-Synthese dem Strang hinzugefügt wird. Da sich dieser Überhang störend auf eine *blunt end* Ligation auswirkt, müssen diese Nukleotide zuvor entfernt werden. Dazu wird die DNA-Polymerase aus dem Phagen T4 eingesetzt. Dieses Enzym besitzt sowohl eine 5'-3'-Polymeraseaktivität als auch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. In Gegenwart von geringen Mengen an dNTPs sorgt die Exonukleaseaktivität dafür, dass die überlappenden Sequenzbereiche am 3'-Ende degradiert werden. Nach Erreichen des komplementären Doppelstranges steht der T4-DNA-Polymerase wieder eine Matrize zur Verfügung, so dass jetzt die Polymeraseaktivität des Enzyms überwiegt und keine weitere Hydrolyse mehr stattfindet.

In der Praxis wird der Versuch wie folgt zusammenpipettiert:

---

20 µl aufgereinigtes PCR-Fragment in  $\text{ddH}_2\text{O}$  (~100 ng)  
+2 µl dNTPs (1 mM),  
+1 µl BSA (1 mg/ml)  
+2,6 µl 10x T4-DNA-Polymerase-Puffer  
+1 µl T4-DNA-Polymerase

---

Die Reaktion wird bei 12°C für 20 min durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgt die Inaktivierung des Enzyms bei 75°C für 15 min. Zur Beseitigung des denaturierten Proteins, wird der Ansatz 2mal mit Phenol/Chloroform extrahiert, in Ethanol umgefällt und das Pellet nachfolgend in 39 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  aufgenommen.

### 3.1.5 Phosphorylierung der 5'-Enden eines DNA-Fragmentes

Die T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) katalysiert eine Reaktion, in der das  $\gamma$ -Phosphat des ATPs auf eine freie 5'-OH-Gruppe übertragen wird. Diese Phosphorylierungsreaktion wird immer dann angewendet, wenn PCR-Fragmente in einer *blunt end* Ligation mit Vektor-DNA verknüpft werden sollen. Denn ein freier 5'-Phosphatrest ist Voraussetzung für die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung. Allerdings besitzen PCR-Produkte synthesebedingt keine Phosphatgruppe am 5'-Ende und würden folglich im unphosphorylierten Zustand nicht als Substrat für die T4-DNA-Ligase in Frage kommen.

Zur Durchführung des Experiments wird folgender Ansatz aufgestellt:

---

39  $\mu$ l geglättetes PCR-Fragment  
5  $\mu$ l ATP (10 nM)  
5  $\mu$ l T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer  
1  $\mu$ l T4-Polynukleotid-Kinase (10 U)

---

Anschließend wird die Reaktion für 30 min bei 37°C durchgeführt. Die T4-PNK lässt sich im Gegensatz zur T4-DNA-Polymerase sehr leicht inaktivieren, so dass eine 2minütige Inkubation bei 65°C ausreicht. Nachfolgend wird der Ansatz 2mal mit Phenol/Chloroform extrahiert, in Ethanol umgefällt und in 16  $\mu$ l  $d_0$ H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.1.6 5'-Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Alkalische Phosphatase wird verwendet, um die endständige 5'-Phosphat-Gruppe in einem linearen doppelsträngigen DNA-Molekül zu entfernen. Dephosphorylierung von DNA-Enden ist notwendig, wenn bei der Ligation eine Religation des Vektors mit sich selbst verhindert werden soll. Dazu wird der geschnittene Ausgangsvektors in einem Gesamtvolumen von 30  $\mu$ l 1x BAP-Puffer in Gegenwart von 1  $\mu$ l alkalischer Phosphatase für 1 h bei 60°C inkubiert.

### 3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase verbindet kompatible DNA-Enden, indem sie die 3'-Hydroxylgruppe des einen Stranges mit dem 5'-Phosphatrest des anderen Stranges verbindet. Da die DNA-Enden nicht miteinander überlappen müssen, können mit Hilfe der T4-DNA-Ligase auch stumpfe Enden legiert werden. Die benötigte Energie bezieht das Enzym für diese Reaktion aus der Hydrolyse von ATP. In dieser Arbeit wird Insert- und Vektor-DNA in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt, wobei insgesamt 100 ng des zu legierenden Fragmentes dafür verwendet werden. Die Reaktion findet in einem Reaktionsvolumen von 20 µl statt und wird in der Regel über Nacht bei 16°C durchgeführt. Die Ligation wird wie folgt zusammenpipettiert:

---

16 µl Insert-DNA
1 µl Vektor-DNA
2 µl T4-DNA-Ligase-Puffer
1 µl T4-DNA-Ligase

---

Am nächsten Tag werden 10 µl von diesem Ansatz für eine Transformation verwendet.

### 3.1.8 Transformation von kompetenten *E. coli*

Ein Aliquot von 50 µl der kompetenten Zellen wird auf Eis aufgetaut und anschließend mit 100 ng der zu transformierenden DNA versetzt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wird die Mischung für 90 Sekunden einem Hitzeimpuls von 42°C im Wasserbad ausgesetzt. Es folgen weitere 2 Minuten auf Eis bevor 1 ml vorgewärmtes LB-Medium (37°C) zugegeben wird. Nach ein bis zwei Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator (500 rpm) werden die Bakterien schonend pelletiert (3000 rpm) und auf LB-Agarplatten, denen Antibiotika zur Selektion zugesetzt wurde, ausplattiert.

### 3.1.9 Minipräparation von Plasmid-DNA (Alkalische Lyse)

Diese Methode wird angewendet, um möglichst schnell und effizient Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren. Das erhaltene Plasmid eignet sich auf Grund der Reinheit insbesondere für Restriktionsanalysen und Retransformationen von Bakterien.

Dazu werden 2 ml einer frisch aufgewachsenen Bakteriensuspension in einem 2 ml Reaktionsgefäß für 20 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wird in 100 µl kalter Minipräplösung 1 resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur alkalischen Lyse wird der Ansatz anschließend mit 200 µl Minipräplösung 2 vorsichtig durch leichtes Schütteln durchmischt und für 5 min auf Eis stehen gelassen. Im Folgenden werden zur Neutralisation des Aufschlusses 150 µl Minipräplösung 3 zugegeben, vorsichtig gemischt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung von chromosomaler DNA und bakteriellen Proteinen wird für 5 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Noch in Lösung befindliche Proteine werden anschließend durch eine Phenol/Chloroform Extraktion entfernt. Aus der wässrigen Phase wird durch Zugabe von 1 ml Ethanol und Zentrifugation die Plasmid-DNA gefällt (15 min; 13000 rpm). Nach dem Waschen des DNA-Pellets mit 70%igem Ethanol wird die DNA für 15 min luftgetrocknet und in 50 µl  $d_0H_2O$  aufgenommen. Zum Abbau vorhandener RNA wird die Lösung für 30 min mit 1 µg RNase A bei 37°C behandelt.

### 3.1.10 Midipräparation von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA höherer Reinheit und Ausbeute zu erhalten, wird das Kit der Fa. Qiagen angewendet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse, bei welcher bakterielle DNA nicht durch Ethanol gefällt, sondern an eine Anionenaustauschersäule adsorbiert wird. Zellbestandteile wie Proteine und RNA werden durch mehrmaliges Waschen der Säule unter Zusatz von RNase A nahezu restlos entfernt. Nach Desorption der DNA erhält man ein sehr reines Endprodukt, welches sich sogar für Sequenzierreaktionen eignet. Die Arbeitsschritte werden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Abweichend davon werden 250 ml einer Übernachtskultur für die Aufarbeitung eingesetzt.

### 3.1.11 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren werden 1 µl DNA in 400 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  verdünnt und die Absorption dieser Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $\text{OD}_{260}$ ), dem Absorptionsmaximum von Purin- und Pyrimidinbasen, gemessen. Bei doppelsträngiger DNA wird bei einer  $\text{OD}_{260} = 1,0$  eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml zugrunde gelegt. Kürzere, einzelsträngige DNA-Moleküle wie Primer weisen bei einer  $\text{OD}_{260} = 1,0$  eine Konzentration von 33 µg/ml auf, während RNA bei gleicher optischer Dichte eine Konzentration von 40 µg/ml zeigt. Daher kann aus den gemessenen Werten unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Konzentration der Probe berechnet werden. Proteine weisen ein um 20 nm in Richtung des langwelligen Bereiches verschobenes Absorptionsmaximum auf. Somit lässt sich aus dem Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm der Reinheitsgrad der DNA bestimmen. Bei reinen DNA-Lösungen liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0. Niedrigere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen.

### 3.1.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode, welche die selektive Amplifikation von DNA-Abschnitten aus einem Nukleinsäuregemisch erlaubt. Das Prinzip besteht darin, dass DNA durch Erhitzen auf 95°C in Einzelstränge denaturiert wird. Durch anschließendes Abkühlen auf ca. 60°C können Oligonukleotide (Primer), die komplementär zum amplifizierenden Bereich sind, einen kurzen doppelsträngigen DNA-Abschnitt durch Hybridisierung bilden, wodurch eine Initiationsstelle für die DNA-Polymerase generiert wird. Im nächsten Schritt wird die Inkubationstemperatur auf 72°C angehoben. Bei dieser Temperatur arbeiten die thermostabilen DNA-Polymerasen optimal und duplizieren durch den Einbau von Nukleotiden (dNTPs) den Bereich zwischen den Primer-Bindungsstellen. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser Einzelschritte entstehen DNA-Abschnitte definierter Länge und Sequenz. Auf Grund der fehlenden 3'-5'-Exonuklease-Aktivität wird die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* im Rahmen dieser Arbeit nur für Routineuntersuchungen eingesetzt. Für Klonierungsarbeiten findet die fehlerkorrigierende High-Fidelity-Polymerase von Roche Verwendung. Für jede Reaktion wird folgender Ansatz benutzt:



---

5x Reaktionspuffer	5 µl
5'-Primer	325 ng
3'-Primer	325 ng
dNTPs (25 mM)	0,45 µl
Polymerase (4 Units/µl)	0,5 µl
DNA	200 ng
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

---

Die Amplifikation erfolgt nach folgendem Temperatur-Zeit-Schema:

---

	Temperatur	Zeit	Cyclenzahl
Denaturierung	95°C	2 min	1x
Denaturierung	95°C	1 min	← 25-35x
Anlagerung	55-62°C	45 s	
Amplifikation	72°C	1-3 min	
Extension	72°C	7 min	1x

---

Die Effektivität und Spezifität einer solchen Reaktion wird durch viele Faktoren beeinflusst. Gute Resultate erhält man, wenn die PCR-Bedingungen für den jeweiligen Ansatz optimiert werden. Dies gilt sowohl für die Primer und deren Anlagerungstemperatur als auch für die Cyclenzahl. Die Dauer des Amplifikationszyklus richtet sich in erster Linie nach der Länge des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes.

### 3.1.13 Generierung von Plasmiden mit Punktmutationen

Um Punktmutationen in einem Plasmid einzuführen, wird der QuickChange-Site-Directed-Mutagenesis-Kit der Fa. Stratagene verwendet. Die Durchführung erfolgt laut den Angaben des Herstellers. Der Kit basiert auf dem Hintergrund, dass Plasmide aus Bakterien die Sequenz 5'-GATC-3' durch Methylierung zu 5'-G<sup>M6</sup>ATC-3' modifiziert haben und neusynthetisierte DNA, aus der PCR stammend, diese Modifikation nicht trägt. Diese methylierte Erkennungssequenz 5'-G<sup>M6</sup>ATC-3' wird von der Endonuklease DpnI erkannt. Die Einführung von Punktmutationen erfolgt demzufolge in einer PCR-ähnlichen Versuchsanordnung. Zwei einander komplementäre Primer, welche die Mutation eingebettet in wt-Sequenz tragen, werden zusammen mit dem Ausgangsplasmid hitzedenaturiert und bewirken bei der

anschließenden Amplifikation so das Einführen von Mutationen. Anschließend wird das Ausgangsplasmid spezifisch mit DpnI verdaut, während das neusynthetisierte mutierte Plasmid übrig bleibt und in Bakterien amplifiziert werden kann.

#### **3.1.14 Isolierung von RNA**

Die Extraktion von RNA aus Säugerzellen erfolgt mit Hilfe des RNA-Isolationskits der Fa. Biomol. Die Methode basiert auf einer Formulierung, der Guanidinium-Salze und Harnstoff als denaturierende Bestandteile zugesetzt sind. Beide Substanzen erzwingen eine Entfaltung der Proteine, wodurch hydrophobe Bereiche exponiert werden. In Gegenwart von Phenol gehen Proteine in die organische Phase über, während RNA in der wässrigen Phase verbleibt. Insgesamt werden also Bedingungen geschaffen, die ein RNase-freies Arbeiten gewährleisten. Die Arbeitsschritte werden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

#### **3.1.15 Reverse-Transkription von mRNA (RT-Reaktion)**

Die Reverse-Transkriptase der Retroviren ermöglicht das Umschreiben von RNA in DNA. Dieses Enzym erkennt anders als die üblichen DNA-Polymerasen nicht nur DNA, sondern auch RNA als Matrize und kann diese ausgehend von einem kurzen doppelsträngigen Bereich in einen komplementären DNA-Strang übersetzen. Am Ende dieser Reaktion liegt also eine RNA/DNA-Hybrid vor. Werden mRNAs als Substrate eingesetzt, erhält man cDNA-Fragmente, in denen die Sequenzen von translatierten Proteinen enthalten sind. Da nahezu alle eukaryontischen mRNAs am 3'-Ende eine Poly-A-Sequenz besitzen, kann durch den Einsatz eines Oligo-dT-Primers das Umschreiben von mRNA initiiert werden. Üblicherweise wird im Anschluss daran eine PCR durchgeführt, in der z.B. die Expression bestimmter Gene analysiert wird (vgl. Kapitel 3.1.12). Um zu vermeiden, dass genomische Sequenzen während des Syntheseschrittes der PCR amplifiziert werden, wird vor der RT-Reaktion ein DNase-Verdau durchgeführt.

**DNase-Verdau von RNA-Extrakten:**

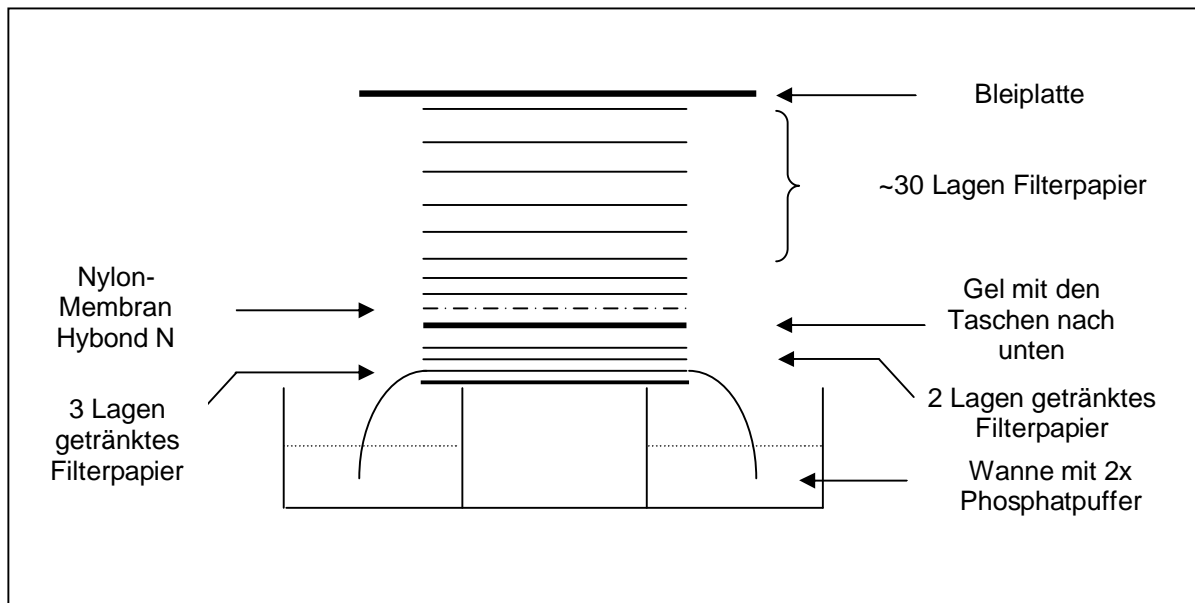
Dazu werden 15 µg RNA mit 1 µl RQ1-DNase (1 U) und 1 µl RNase-Inhibitor (40 U) in einem Volumen von 25 µl 1x DNase-Puffer zur Reaktion gebracht und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Enzymreaktion gestoppt, indem der Ansatz für 10 min bei 70°C gehalten wird.

**Reverse-Transkription (RT-Reaktion):**

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß werden 20 µl DNase-Verdau mit 2 µl Oligo-(dT)<sub>15</sub>-Primer (50 ng/µl) und 2 µl NTPs (25 mM) versetzt. Der Ansatz wird für 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nachfolgend werden die Reaktionsbedingungen durch Zugabe von 1 µl RNase-Inhibitor (2 U/µl), 4 µl DTT (0,1 M), 8 µl 5x RT-Puffer, 1,5 µl ddH<sub>2</sub>O und 1,5 µl Superskript komplettiert. Nach 90 min bei 42°C wird die RT-Reaktion gestoppt, indem der Ansatz für 15 min bei 70°C inkubiert wird.

**3.1.16 Gelelektrophorese und Transfer von RNA (Northern-Blot)**

Das Prinzip der elektrophoretischen Trennung von RNA entspricht dem der DNA. Allerdings müssen während der Auftrennung Bedingungen vorliegen, die eine Ausbildung sekundärer Strukturen verhindern. Vor dem eigentlichen Gellauf wird dazu die Probe mit dem 4x Ladepuffer versetzt, bei 65°C für 10 min denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Standardmäßig wird ein 1,2%iges Agarosegel in 1x FAE-Puffer gegossen und die RNA bei 100 V in 1x FAE-Laufpuffer aufgetrennt. Sobald die Bromphenolbande mehr als ein Drittel der gesamten Laufstrecke zurückgelegt hat, wird die Gelelektrophorese gestoppt und das Gel unter UV-Licht fotografiert. Anschließend wird das Gel für 10 min in alkalischem Hydrolyse-Puffer äquilibriert. Dadurch werden größere RNA-Moleküle in kleiner RNA-Fragmente zerlegt, wodurch der anschließende Transfer auf die Trägermatrix erleichtert wird. Zuvor wird das Gel jedoch 2mal für 10 min in 2x Phosphatpuffer inkubiert. Der Blot wird nach folgendem Schema aufgebaut:



**Abb. 3.1-1 Schematische Darstellung zum Aufbau eines Northern-Blots**

Der Transfer erfolgt durch Konvektion, indem RNA durch Kapillarkräfte aus dem Gel in Richtung nichtgetränktes Filterpapier diffundiert. Nach ~12 h wird der Blot abgebaut und die RNA durch einen UV-Crosslinker auf der Nylonmembran immobilisiert.

### 3.1.17 Herstellung radioaktiver DNA-Sonden

Das Prinzip der radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten besteht darin, dass in ihrer Sequenz unterschiedliche Hexanukleotide an denaturierte einzelsträngige DNA hybridisieren. Die gebildeten Doppelstrangbereiche dienen der Klenow-Polymerase als Ausgangspunkt für die Synthese des komplementären Stranges. Durch den Einbau von  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP wird der neusynthetisierte Strang radioaktiv markiert.

Dazu werden 50 ng eines DNA-Fragment mit  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  auf ein Volumen von 12  $\mu\text{l}$  gebracht, für 10 min im Wasserbad bei 100°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dem Ansatz werden nachfolgend 1  $\mu\text{l}$  BSA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 5  $\mu\text{l}$  5x Oligolabeling-Puffer, 2  $\mu\text{l}$  Klenow-Polymerase (2 U/ $\mu\text{l}$ ) und 5  $\mu\text{l}$   $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) hinzugefügt. Nach 3 - 12 Stunden in einem Bleigefäß bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA gestoppt. Nicht eingebaute Nukleotide werden säulenchromatographisch abgetrennt, indem der Ansatz unter Zusatz von 5  $\mu\text{l}$  Dextranblau durch eine Sephadex-G100-Säule filtriert wird. Die Einbaurate wird bestimmt, indem die Probe im Beta-Counter vermessen wird.

Für die Herstellung einer EMCV-Sonde werden L929-Zellen in einer Dichte von  $5 \times 10^6$ /Kultur auf 90mm-Schalen ausgesät und am nächsten Tag mit EMCV (MOI 1) infiziert (vgl. Kapitel 3.4.2 zur Infektion eukaryontischer Zellen mit Virus). Nach weiteren 8 h werden RNA-Extrakte hergestellt und diese in einer RT-Reaktion mit dem Primer EMCV-R eingesetzt. Anschließend wird die cDNA unter Verwendung des Primer-Pärchens EMCV-F / EMCV-R amplifiziert und über ein Agarose-Gel aufgereinigt. Das weitere Vorgehen entspricht dem oben beschriebenen Verfahren.

### 3.1.18 Hybridisierung des Northern-Blots mit radioaktiv markierter DNA

Dazu wird die Membran in einen Hybridisierungszylinder überführt und für 2 h bei  $42^\circ\text{C}$  in einem Rotationsofen mit 10 ml Hybrimix-Lösung inkubiert. Nachdem unspezifische Bindungsstellen durch die Heringssperma-DNA blockiert worden sind, werden  $1,2 \times 10^7$  cpm der radioaktiv markierten Sonde in  $\text{d}_3\text{H}_2\text{O}$  für 6 min bei  $95^\circ\text{C}$  denaturiert. Anschließend wird der alte Hybrimix verworfen und durch einen frischen Ansatz aus Hybrimix und radioaktiver Probe ersetzt. Die Hybridisierung erfolgt bei  $42^\circ\text{C}$  und wird über Nacht unter Rotation im Inkubator durchgeführt. Am nächsten Morgen wird unspezifisch gebundene DNA durch mehrmaliges Waschen der Membran mit den nachfolgenden Puffern entfernt:

---

2mal 5 min mit 2x SSC / 0,1% SDS bei Raumtemperatur  
10 min mit 2x SSC / 0,1% SDS unter Erwärmen auf  $42^\circ\text{C}$   
5 - 10 min mit 0,2x SSC / 0,1% SDS bei  $42^\circ\text{C}$  -  $68^\circ\text{C}$

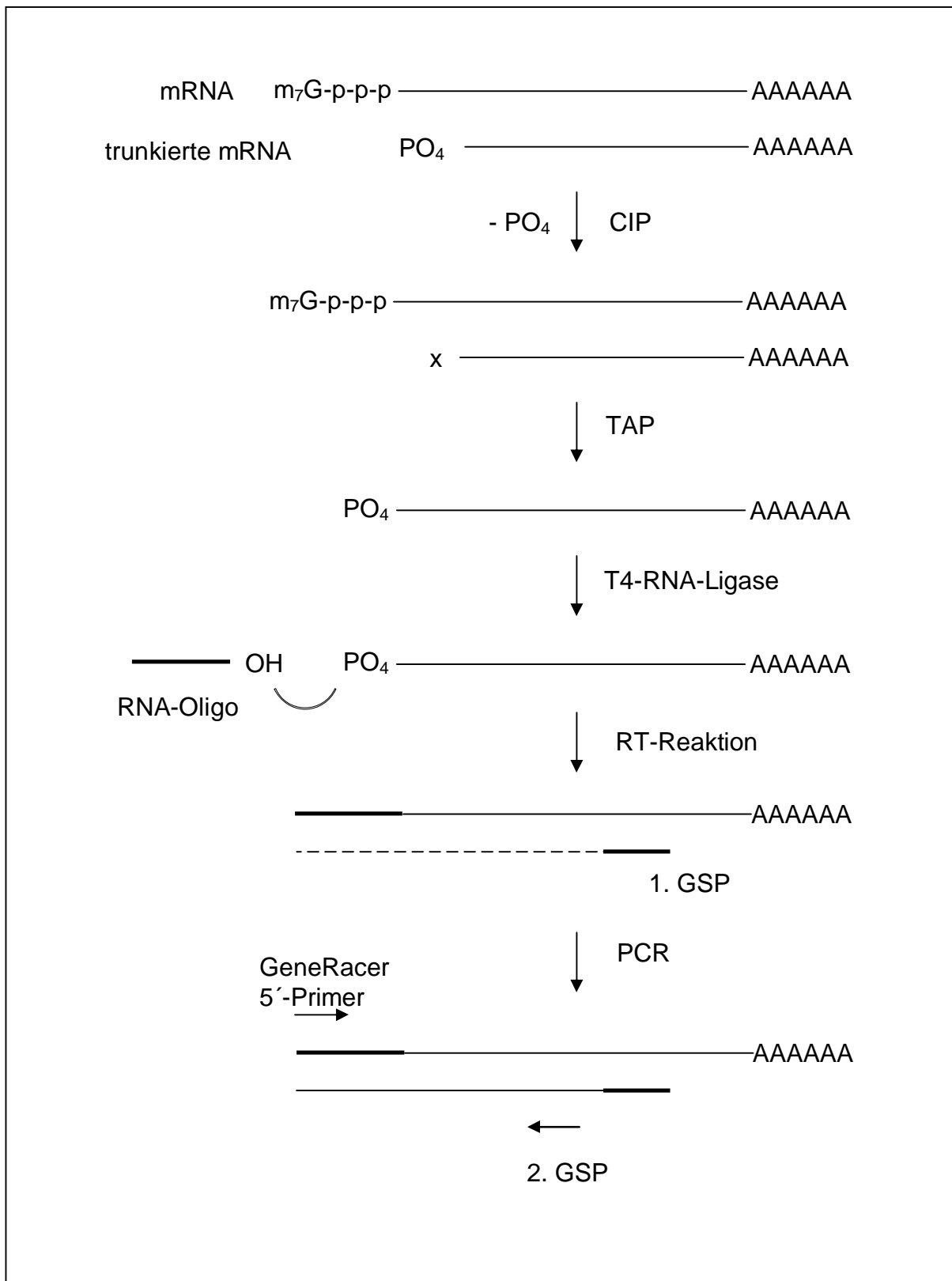
---

Der letzte Waschschrift wird beendet, sobald kein unspezifisches Hintergrundsignal mehr auf dem Blot detektierbar ist. Zur Exposition wird die Membran zwischen zwei Folien einer Filmkassette platziert, mit einem Röntgenfilm bedeckt und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert. Abhängig von der Signalstärke wird der Film nach 1 bis 5 Tagen entwickelt.

### **3.1.19 5'-RACE (Rapid-Amplification-of-cDNA-Ends)**

Zur Bestimmung des unbekanntes 5'-Endes einer cDNA wird der GeneRacer Kit der Fa. Invitrogen eingesetzt. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass in einem ersten Schritt mRNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) behandelt wird. Dadurch wird das 5'-Ende trunkierter mRNAs dephosphoryliert. Intakte „full-length“ mRNA wird durch das Enzym nicht modifiziert, da diese zu ihrem Schutz eine Cap-Struktur am 5'-Ende tragen. Erst durch Behandlung mit TAP (Tobacco-Acid Pyrophosphatase) wird dieses sogenannte Hütchen unter Abspaltung eines Pyrophosphats entfernt. Zurück bleibt eine endständige Phosphatgruppe, die mit einem RNA-Oligo verknüpft werden kann. Mittels genspezifischer Primer (GSP), die innerhalb der bekannten Sequenz an die RNA hybridisieren, wird nun die reverse Transkription durchgeführt. Da die entstandene cDNA an ihrem verlängerten 3'-Ende die bekannte Sequenz des RNA-Oligos trägt, kann durch eine PCR das komplementäre 5'-Ende dazu amplifiziert werden.

Die Durchführung erfolgt gemäß den Herstellerangaben; das Prinzip wird durch das nachfolgende Schaubild nochmals näher erläutert (vgl. Abb. 3.1-2).



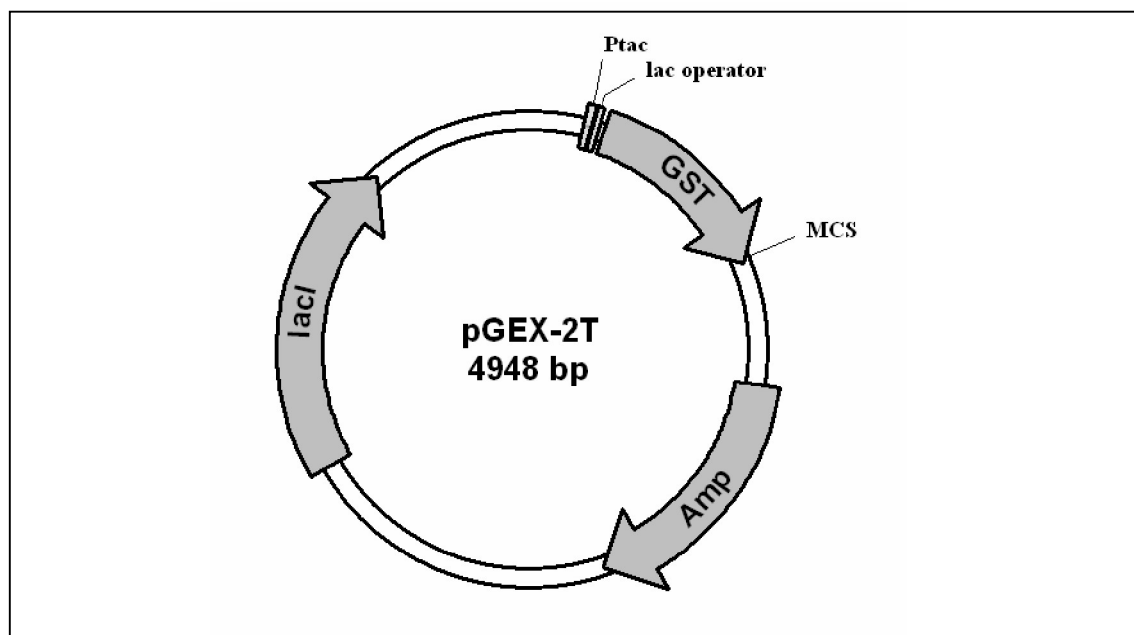
**Abb. 3.1-2 Schematische Darstellung zum Ablauf des 5'-RACE**

CIP, Calf-Intestinal-Phosphatase; TAP, Tobacco-Acid-Pyrophosphatase; GSP, Gene-Specific-Primer.

## 3.2 Proteinchemische Methoden

### 3.2.1 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Bakterien

Die Aufreinigung heterolog exprimierter Proteine wird erleichtert, wenn man das Zielgen um einen Fusionsteil verlängert. Bei dem Fusionsteil handelt es sich um gut charakterisierte Proteine oder kurze Peptidsequenzen für die Antikörper oder bindende Substrate verfügbar sind. Durch Kopplung dieser Substrate an eine Säulenmatrix entstehen Affinitätsäulen, welche den Fusionsteil effektiv binden. Eine Möglichkeit besteht darin, dass man das zu exprimierende Gen mit dem Gen für die Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert. Dieses 26 kD große Enzym ist für seine Eigenschaft bekannt, reversibel und mit hoher Affinität an reduziertes Glutathion zu binden. An eine Glutathionsäule gebunden kann man das Fusionsprotein leicht durch Zugabe von überschüssigem Substrat von der Säule verdrängen. Ein anderer Ansatz beruht auf der Eigenschaft von kurzen Histidinpeptiden, die über ihre Imidazolreste sehr effektiv Chelat-Komplexe mit zweiwertigen Metallionen ausbilden. Durch einen Imidazolgradienten kann das auf der Säule zurückgehaltene Protein im Sinne einer Verdrängungschromatographie eluiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Ansätze mit dem pGEX-Vektorsystem der Fa. Amersham verfolgt (vgl. Abb. 3.2-1).





**Abb. 3.2-1 Plasmidkarte des pGEX-2T-Vektors**

Ptac, Hybrid-Promotor aus Tryptophan-Synthetase- und dem  $\beta$ -Galactosidase-Genpromotor; lac Operator, lac-Operator des  $\beta$ -Galactosidase-Gens; GST, Expressionskassette für die Glutathion-S-Transferase; MCS, multiple Klonierungsstelle für die Insertion eines Gens; Amp, Ampicillin-Resistenz-Gen; lacI, kodierende Region für den lac-Repressor.

Beim tac-Promotor des pGEX-Vektors handelt es sich um einen sogenannten Hybrid-Promotor, der aus dem Tryptophan-Synthetase- und dem  $\beta$ -Galactosidase-Genpromotor zusammengesetzt ist. Kontrolliert wird der tac-Promotor durch einen nachgeschalteten lac-Operator des  $\beta$ -Galactosidase-Gens. An dieses Motiv bindet ein Tetramer des lac-Repressors, der seinerseits als lacI-Gen auf dem Vektor vorliegt und konstitutiv exprimiert wird. In diesem Zustand wird die Transkription anknüpfender Gene (GST) verhindert. Erst durch die Zugabe von IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid) als Induktor kommt es zu einer Konformationsänderung des lac-Repressors, der daraufhin vom lac-Operator abdissoziiert. Nun können RNA-Polymerasen an den vorgeschalteten Promotor binden und die Transkription initiieren.

**Allgemeines Vorgehen zur Gewinnung von Bakterienlysaten:**

Zur Proteinsynthese wird eine 200 ml Vorkultur hergestellt, die über Nacht bei 37°C und 250 rpm hochwachsen kann. Am nächsten Morgen wird damit 1 L LB-Medium auf eine  $OD_{600} = 0,35$  angeimpft. Da sich die Bakterien zu diesem Zeitpunkt noch in der stationären Phase befinden, wird die Kultur erst nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase induziert. Dazu wird die Bakteriensuspension für einen Zeitraum von ungefähr 2 h bei 25°C und 120 rpm gehalten. Anschließend wird durch Zugabe von 1 mM IPTG bei einer  $OD_{600} = 0,45$  die Expression des Proteins induziert. Unter diesen Bedingungen wird die Bakteriensuspension für weitere 6 h kultiviert. Nach Ablauf der Induktionszeit werden die Bakterien bei 4°C für 10 min bei 5.000 rpm sedimentiert. Zum Aufschließen der Zellen wird das Pellet in 30 ml Lysispuffer (eiskalt) resuspendiert und 3mal bei 10.000 - 15.000 psi durch eine French-Press geleitet. Im nächsten Schritt werden unlösliche Bakterienbestandteile durch eine 20minütige Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C beseitigt. Das klare Lysat mit den gelösten Proteinen wird für die Aufreinigung verwendet.

**Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen:**

In einem 50 ml Zentrifugenröhrchen wird 1 ml gepackte Glutathion-Sepharose mit 40 ml PBS resuspendiert und nachfolgend bei 500 rpm pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes werden die gewaschenen Beads mit dem geklärten Lysat vereinigt und für 1 h auf einem Über-Kopf-Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird dieser Ansatz schrittweise in ein Polypräp-röhrchen überführt, so dass sich die Glutathion-Sepharose über der Fritte des Plastikröhrchens sammelt. Auf diese Weise entsteht eine gepackte Säule, die das Waschen und Eluieren des gebundenen Fusionsproteins sehr vereinfacht. Durch Zugabe von 4 x 10 ml PBS werden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Im Idealfall befindet sich jetzt nur noch das fusionierte Protein auf der Säule, das durch Zugabe von reduziertem Glutathion eluiert werden kann. Die Elution erfolgt in 3 Schritten, mit je 1 ml Elutionspuffer (bestehend aus reduziertem Glutathion). Durch vorsichtige Resuspendierung und anschließender Inkubation der Säule auf einer Wippe (5 min) wird das Fusionsprotein von den Beads gelöst und im Anschluss daran in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen.

**Aufreinigung von Histidin-Fusionsproteinen:**

Dazu wird der klare Überstand des Zellaufschlusses in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1 ml gepackter Ni-NTA-Agarose versetzt. Die Suspension wird anschließend für 1 h bei Raumtemperatur auf einem über-Kopf-Schüttler inkubiert; in dieser Zeit können sich die Metall-Chelat-Komplexe ausbilden. Durch das Überführen des Ansatzes in ein Polypräp-Röhrchen, kann das Lysat durch die Fritte ablaufen und sich oberhalb eine Säule aus Ni-NTA-Agarose ausbilden. Im nächsten Schritt wird das Säulenmaterial durch Zugabe von 3 x 5 ml Lysispuffer und 2 x 5 ml Waschpuffer von anhaftenden Verunreinigungen befreit. Dies wird durch niedrige Imidazolkonzentrationen erreicht, wodurch das Fusionsprotein auf der Säule verbleibt, aber unspezifisch gebundene Proteine gewaschen werden. Schließlich wird durch Zugabe von 500 µl Elutionspuffer die Imidazolkonzentration auf 500 mM erhöht, wodurch der Histidinanteil des Proteins kompetitiv aus seiner Chelat-Bindung verdrängt wird. Zur raschen Einstellung der Elutionsbedingungen wird auch hier das Säulenmaterial resuspendiert und die Fraktionen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Elution wird noch 9mal wiederholt.

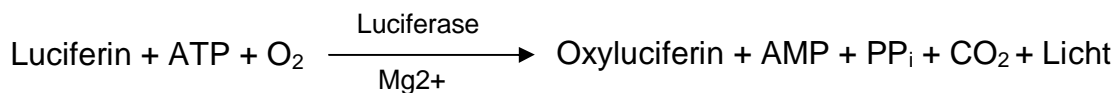
### Lagerung der aufgereinigten Proteine:

Nach Bestimmung des Proteingehalts der einzelnen Fraktionen (vgl. Kapitel 3.2.4 zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford), werden GST-Fusionsproteine zu einer Proteinkonzentration von 0,5 µg/µl mit PBS verdünnt. Die Lagerung erfolgt bei 16°C für höchstens 4 Wochen. Alternativ können die Fraktionen zur Langzeitlagerung auch in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden.

Da die aufgereinigten His-Tag-Proteinen rasch präzipitieren und sich somit einer weiteren Verwendung entziehen, werden diese durch Zugabe von Lysispuffer bei einer Proteinkonzentration von 0,2 µg/µl gelagert (16°C für max. 4 Wochen bzw. -70°C nach Stickstoffbehandlung).

### 3.2.2 Luciferase-Assay

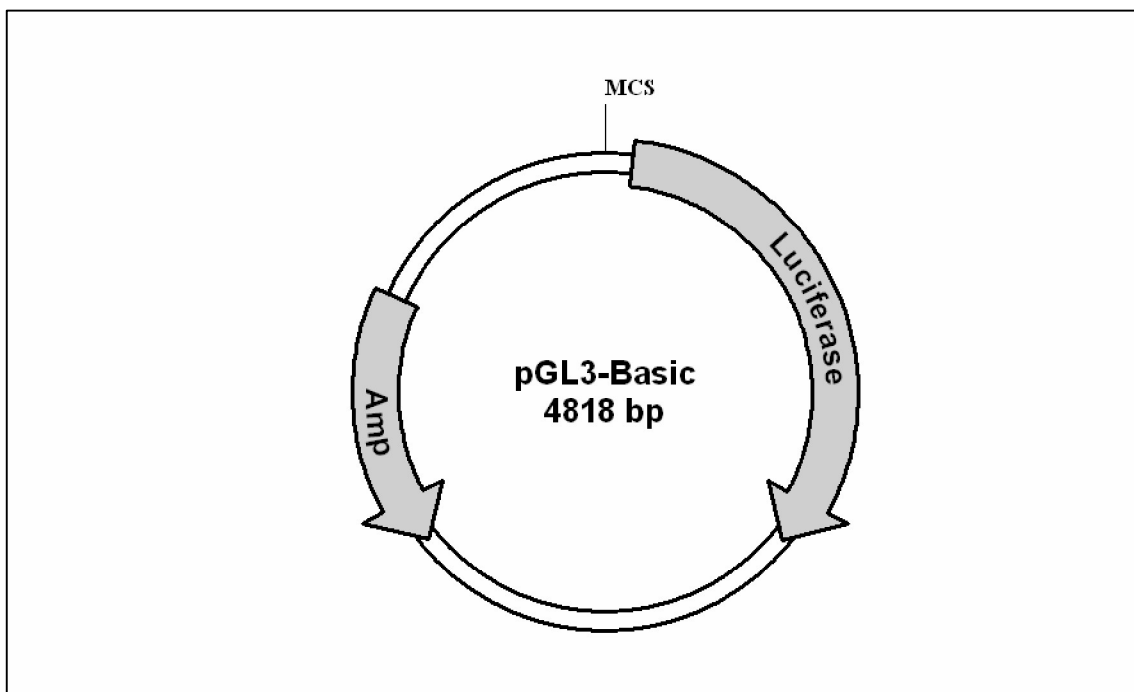
Genregulatorische Bereiche auf genomischer DNA können in Reporterassays auf ihre Funktion untersucht werden. Dazu wird ein Reportergenkonstrukt eingesetzt, das neben der zu analysierenden Promotorsequenz die kodierende Region für ein Reporterprotein enthält. Zu den Reporterproteinen zählen alle Genprodukte, die sich leicht durch eine enzymatische Reaktion quantifizieren lassen. So z.B. auch das Gen für die Luciferase, deren Eigenschaft, Licht zu erzeugen, dem Feuerkäfer *Photinus pyralis* seinen volkstümlichen Namen Glühwürmchen gibt. Die Luciferase katalysiert eine Reaktion, bei der Luciferin in Gegenwart von ATP und Luftsauerstoff oxidiert wird. Dabei entstehen AMP, CO<sub>2</sub> und Licht. Die Lichtemissionen können in einem Luminometer als absolute Luciferase Einheiten (ALU) gemessen werden. Da im Säugetierorganismus weder dieses Gen noch andere Homologe vorkommen, eignet es sich besonders gut als Reportergen.



Wenn Versuchsbedingungen gewählt werden, in denen sowohl das Substrat als auch die übrigen Reagenzien im Überschuss vorliegen, ist die Lichtemission direkt proportional zur Genexpression des Reporterproteins. Die gemessene Enzymaktivität gibt somit indirekt Aufschluss über den Einfluss der Promotorregion auf die

Transkription des Reportergens. Durch schrittweises Deletieren von Promotorbereichen oder durch gezielte Mutation von potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren lassen sich Funktionseinheiten für die kontrollierte Genexpression identifizieren.

Zur Charakterisierung des IFRG28-Genpromotors wurde der pGL3-Basic-Vektor der Fa. Promega verwendet (vgl. Abb. 3.2-2). Dieser Reportervektor zeichnet sich durch das Fehlen von eukaryontischen Promotoren und Enhancern aus. Die Expression der Luciferase ist daher von der alleinigen Insertion eines funktionellen Promotors abhängig.



**Abb. 3.2-2 Plasmidkarte des pGL3-Basic**

MCS, multiple Klonierungsstelle für die Insertion von Promotoren; Luciferase, kodierende Sequenz für die Firefly-Luciferase; Amp, Ampicillin-Resistenz-Gen.

Das in dieser Arbeit untersuchte Protein wurde von P. Nikolaus kloniert und als ein IFN-induziertes Gen identifiziert. Daher müssen auf genomischer DNA Kontrollelemente vorliegen, die für eine IFN-spezifische Expression verantwortlich sind. Nach Transfektion von Promotorkonstrukten und anschließender Stimulation der Zellen mit IFN kann über die Messung der Luciferase-Aktivität die Induzierbarkeit des Promotors im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt werden. Die Genauigkeit einer solchen Untersuchung kann durch verschiedene experimentelle Faktoren beeinträchtigt werden. Erst durch die Co-Transfektion eines weiteren

Reportergens als internen Standard lassen sich verschiedene Reaktionsansätze miteinander vergleichen. Im Rahmen dieser Arbeit wird hierfür ein Plasmid eingesetzt, welches das Gen für die  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors konstitutiv exprimiert.

Die Transfektion erfolgt in Anlehnung an die unter 3.5.5 beschriebene Methode. Abweichend davon werden die Zellen einer 6-Lochplatte mit einer Mischung aus 7  $\mu$ g pGL3-Konstrukt und 1  $\mu$ g  $\beta$ -Gal-Plasmid transfiziert. Nachdem die Zellen am nächsten Tag mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt worden sind, werden die Löcher 1 bis 3 mit 250 IU IFN $\alpha_4$  versetzt. Die restlichen Löcher bleiben unbehandelt und dienen als Kontrollen für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität in der unbehandelten Probe (= Basalaktivität). Nach 15 h werden die Zellen geerntet (vgl. Kapitel 3.2.3 zur Herstellung von Proteinextrakten aus Säugerzellen). Dazu wird das Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und jedes Loch mit 200  $\mu$ l Lysispuffer versetzt. Nach 5 min bei 4°C werden die Zellysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Überstände werden abgenommen und in neue Reaktionsgefäßen überführt.

Zur Messung der Luciferase-Aktivität werden die Proteinextrakte auf eine 96-Lochplatte übertragen, so dass jedes Loch 25  $\mu$ l Lysat / Wert enthält. Anschließend wird die Enzymreaktion im Luminometer Lucy 1 für 20 s gemessen. Die Injektion von 150  $\mu$ l Reaktionspuffer und dem nachfolgenden Substrat (50  $\mu$ l) erfolgt hierbei vollautomatisch.

Zum Abgleich der Transfektionseffizienz wird im Anschluss die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität der einzelnen Proteinextrakte bestimmt. Auch hier werden 25  $\mu$ l Lysat in jede Vertiefung einer 96-Lochplatte vorgelegt. Durch Zugabe von 175  $\mu$ l einer frisch hergestellten Substratlösung (3 Teile  $\beta$ -Gal-Reaktionspuffer + 1 Teil 4x ONPG) wird die Farbreaktion eingeleitet, in welcher ONPG zu einem gelben Azofarbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 405 nm umgesetzt wird. Da sich der gelbe Farbstoff sehr schnell nach Zugabe des Substrats bildet, wird die Reaktion auf Eis angesetzt und erst anschließend bei Raumtemperatur, bis zur eintretenden Verfärbung, inkubiert. Abschließend wird die Absorption der Lösung bei 405 nm gemessen und die unspezifische Absorption der einzelnen Löcher ( $OD_{620}$ ) davon abgezogen.

Zum Abgleich der Transfektionseffizienz werden die absoluten Luciferase-Einheiten (ALU) durch die gemessenen  $\beta$ -Gal-Werte geteilt, wodurch man die sog. relativen Luciferase-Einheiten (RLU) bzw. die normalisierten Luciferase-Werte erhält:

---

$$\text{RLU} = \frac{\text{ALU}}{\beta\text{-Gal}}$$

---

Zur Berechnung des Stimulationsfaktors (SF) wird die RLU der induzierten Probe durch die RLU der unbehandelten Kontrolle dividiert:

---

$$\text{SF} = \frac{\text{RLU (Probe)}}{\text{RLU (Kontrolle)}}$$

---

### 3.2.3 Herstellung von Proteinextrakten aus Säugerzellen

Dazu wird das Medium von adhärent wachsenden Zellen mit einer Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Zugabe des PBS erfolgt am Rand der Gewebekulturschale, so dass sich keine Zellen von der Plastikoberfläche ablösen. Nach Absaugen des Zellüberstands wird dieser Waschschrift für ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend werden die Zellmembranen durch Zugabe des Lysispuffers aufgebrochen und die Gewebekulturschale für 5 min bei 4°C inkubiert. Die Menge des zugesetzten Lysispuffers richtet sich nach der zu lysierenden Fläche. Standardmäßig wird jede Kultur eine 6-Lochplatte mit 200  $\mu$ l, jede 6 cm Schale mit 300  $\mu$ l und jede 90 mm Schale mit 500  $\mu$ l Lysispuffer versetzt. Mit einem Zellschaber werden dann, die noch anhaftenden Zellbestandteile von der Plastikoberfläche gelöst und das Lysat mit den darin enthaltenen Zelltrümmern in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur weiteren Lyse wird der Ansatz für ½ h bei 4°C auf einem Rad inkubiert. Schließlich werden ungelöste Zellbestandteile abzentrifugiert (10 min; 4°C; 13000 rpm) und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß aufbewahrt.

### 3.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf einer Farbreaktion, in der sich das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brillant-Blue durch Proteinbindung von 465 zu 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm im Vergleich zu einem Referenzansatz mit PBS oder Lysispuffer ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Das vorgefertigte Bradford-Reagenz der Fa. BioRad enthält den Farbstoff unter Zusatz von Phosphorsäure und Ethanol in  $\text{ddH}_2\text{O}$  gelöst. Das Reagenz wird zur Konzentrationsbestimmung, gemäß den Herstellerangaben, 1:5 mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  verdünnt. Nachfolgend werden 995  $\mu\text{l}$  von dieser Reaktionslösung in Plastikküvetten vorgelegt und mit 5  $\mu\text{l}$  Proteinlösung versetzt. Standardisiert wird die Messung durch das Erstellen einer Eichgerade, in der die Absorptionen von Proteinlösungen bekannter Konzentration eingetragen werden. Dazu wird mit Hilfe einer BSA-Stammlösung eine Verdünnungsreihe von 10 bis 1 mg/ml erstellt. Die Ansätze werden gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinkonzentration der untersuchten Probe lässt sich anhand der erstellten Eichgeraden ermitteln.

### 3.2.5 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Lämmli

Durch die diskontinuierliche SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) können denaturierte Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei wandern die denaturierten und durch SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld zur Anode, anfangs in einem Sammelgel zur Fokussierung der Banden und anschließend in einem Trenngel. Durch Molekulargewichtsstandards kann die Größe der Proteine bestimmt werden. Standardmäßig wird ein 6%iges Sammelgel und ein 12%iges Trenngel mit dem Elektrophoresesystem für Minigele der Fa. Biorad gegossen. Die Proben werden vor dem Gellauf mit  $\frac{1}{4}$  Volumen 5x Ladepuffer versetzt und für 5 min im Wasserbad aufgeköcht. Die Elektrophorese wird bei 130 V solange durchgeführt, bis die blaue Lauffront gerade aus dem Gel herausgelaufen ist.

Zusammensetzung des Sammelgels:

<b>Sammelgel</b>	<b>6 %</b>
$\text{ddH}_2\text{O}$	2,6 ml
Puffer B	3,75 ml
Acrylamid 40%	1,1 ml
TEMED	20 $\mu\text{l}$
APS 10%	35 $\mu\text{l}$

Zusammensetzung des Trenngels:

<b>Trenngel</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>
$\text{ddH}_2\text{O}$	3,75 ml	3,0 ml
Puffer A	7,5 ml	7,5 ml
Acrylamid 40%	3,75 ml	4,5 ml
TEMED	35 $\mu\text{l}$	35 $\mu\text{l}$
APS 10%	55 $\mu\text{l}$	55 $\mu\text{l}$

### 3.2.6 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Nach elektrophoretischer Trennung der Proteine, wird das SDS-Gel in ein für seine Größe geeignetes Gefäß überführt und mit der Fixierlösung für Proteingele versetzt. In einer sich anschließenden 1stündigen Inkubation auf dem Polymax werden die Proteine im Gel fixiert, so dass das Trennmuster des SDS-PAGE erhalten bleibt. Danach wird der Fixierer abgeschüttet und durch die Färbelösung ersetzt, wodurch Coomassie-Brilliant-Blue 250 in die Poren des Gels diffundieren kann. Dieser Farbstoff bindet unspezifisch und praktisch irreversibel an die im Gel vorhandenen Proteine. Je nach Polymerisationsgrad des Gels kann dieser Färbvorgang bis zu 1 h dauern. Bei einem 12%igen SDS-PAGE wird nach  $\frac{1}{2}$  h die Inkubation mit der Färbelösung abgebrochen und durch Zugabe des Entfärbers der ungebundene Farbstoff aus dem Gel gewaschen. Damit die Proteine als blaue Banden sichtbar werden, muss die Entfärbelösung noch mehrmals gewechselt werden.



### 3.2.7 LDH-Assay

Zur Detektion zellschädigender Einflüsse wird der CytoTox 96-Assay der Fa. Promega eingesetzt. Der Kit basiert auf der Quantifizierung der Laktat-Dehydrogenase (LDH), einem stabilen zytosolischen Enzyms, das nach Ruptur oder Schädigung der Zellmembran freigesetzt wird. Die Aktivität des freigesetzten Enzyms wird im Zellüberstand durch eine zweistufige Reaktion gemessen. Im ersten Schritt katalysiert LDH die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, wobei  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  reduziert wird. Im zweiten Schritt reduziert Diaphorase, unter Verbrauch von  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , ein gelbes Tetrazolium Salz zu einem roten Formazan-Produkt. Die Farbreaktion wird im Elisa-Reader bei 492 nm gemessen.

### 3.2.8 MTT-Assay

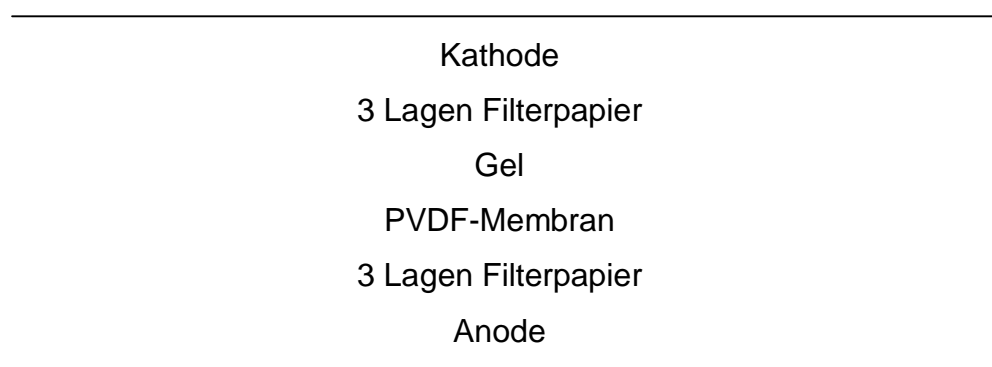
Als Indikator für die Vitalität der Zellen nach Virus-Exposition, dient der MTT-Test. Dieser Test basiert darauf, dass stoffwechselaktive Zellen mit Hilfe ihrer mitochondrialen Dehydrogenasen das schwach gelbe Tetrazolium-Salz MTT zu einem dunkelblauen, wasserunlöslichem Formazanderivat umsetzen. Die optische Dichte des Farbstoffs entspricht dem Anteil der lebenden, stoffwechselaktiven Zellen. Dazu wird jede Vertiefung einer 96-Lochplatte mit 20  $\mu\text{l}$  MTT-Lösung (5 mg/ml) versetzt und die Zellen für 1 h bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Bei Verwendung adhärenter Zellen wird der Zellüberstand abgekippt und der Farbstoff durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Lysepuffer (1 M HCl / Isopropanol) gelöst; bei Suspensionszellen erfolgt die Zugabe direkt zum Kulturmedium. Die Absorption der Lösung wird in einem Elisa-Reader bei 570 nm gemessen.

### 3.3 Immunologische Methoden

#### 3.3.1 Immunoblot (Western-Blot)

Mit dieser Methode werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine nach einer SDS-PAGE auf einen geeigneten Träger, z.B. einer PVDF-Membran übertragen (vgl. Kapitel 3.2.5). Dazu werden Membran und Polyacrylamidgel in den direkten Kontakt zwischen zwei Plattenelektroden gebracht. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die mit SDS beladenen Proteine in Richtung Anode. Von der Membran werden sie allerdings unspezifisch zurückgehalten, so dass eine weitere Migration durch die Membran hindurch verhindert wird. Auf diese Weise entsteht eine exakte Kopie des Gels auf der Membran, wobei das ursprüngliche Trennmuster der Proteine erhalten bleibt.

Der Blot wird wie folgt aufgebaut:



Zuvor wird die PVDF-Membran auf die Gelgröße zurechtgeschnitten, für 15 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend für mindestens 5 min im Transferpuffer äquilibriert. Die Filterpapiere werden ebenfalls vor Aufbau des Blots auf die entsprechende Größe zugeschnitten und kurz in Transferpuffer getränkt. Alle Bestandteile werden nun luftblasenfrei übereinander gelegt und bei 1 mA/cm<sup>2</sup> geblottet. Der Transfer dauert standardmäßig 1½ Stunden.

#### **Nachweis immobilisierter Proteine mit Antikörper:**

Zur Absättigung proteinfreier Bereiche wird die Membran für mindestens 1 h bei Raumtemperatur in Blocklösung geschwenkt. Der Blot wird anschließend mit dem 1. Antikörper (1 µg/ml in Blocklösung) über Nacht auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wird die Membran 3 x 10 min mit 0,05% PBS-T

gewaschen und 1 h mit einer geeigneten Verdünnung des Peroxidase-gekoppelten 2. Antikörpers (in Blocklösung) auf einer Wippe inkubiert. Analog zum 1. Waschschriff wird die Membran 3 x 10 min in 0,05% PBS-T geschwenkt. Nach dem letzten Waschschriff wird die Membran für 1 min mit 2 ml Detektionslösung (1:1 Mischung beider Lösungen des ChemiLight-Kits) behandelt, zwischen 2 Folien einer Filmkassette platziert und mit einem Röntgenfilm bedeckt. Die Expositionszeit des Filmes richtet sich nach der Stärke des zu erwartenden Signals.

### 3.3.2 Strippen von Membranen

Sollen mit einem Blot mehrere Proteine nacheinander nachgewiesen werden, so müssen die spezifisch gebundenen Antikörper nach der ersten Detektion entfernt werden. Dazu wird die Membran in den folgenden Puffern geschwenkt:

---

5 min in PBS  
5 min 0,2 M NaOH  
5 min  $\text{ddH}_2\text{O}$   
5 min PBS

---

Nachdem unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation der Membran in Blocklösung abgesättigt worden sind, kann die Membran zur Detektion anderer Protein eingesetzt werden.

### 3.3.3 Affinitätsreinigung von Antiseren

Durch die kovalente Kopplung eines Antigens an eine Matrix lassen sich Antigensäulen darstellen, die zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von Antiseren eingesetzt werden können. Da in einem Antiserum der Anteil an proteinspezifischen Antikörpern im Vergleich zur Gesamt-Immunglobulin-Fraktion sehr gering ist, bietet sich dieses Verfahren zur Anreicherung antigenreaktiver Antikörper an. Dadurch werden unspezifische Reaktionen, wie z.B. der sogenannte background im Immunoblot, weitgehend reduziert. Als Matrix wird häufig Bromcyanaktivierte Sepharose (CNBr-Sepharose) eingesetzt, an die sich Liganden mit primären Aminogruppen koppeln lassen. Nach Darstellung einer solchen Säule, entstehen durch Inkubation des gebundenen Materials mit dem Antiserum proteinspezifische Wechselwirkungen. Während des Waschvorgangs nutzt man die

hohe Bindungsenergie von Immunkomplexen aus, um den Hintergrund erzeugenden Bestandteil abzutrennen. Erst durch die Wahl geeigneter Elutionsbedingungen wie stark sauren bzw. stark alkalischem pH-Wert oder unter Hochsalz wird der gebunden Antikörper wieder freigesetzt.

#### **Kopplung von Proteinen an CNBr-Sepharose:**

Zu Beginn einer Kopplungsreaktion werden 1 g CNBr-Sepharose 6MB in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen abgewogen und mit 50 ml einer 1 mM HCl-Lösung versetzt. Danach lässt man die Matrix des Säulenmaterials für 15 min auf einem Über-Kopf-Schüttler quellen. Synthesebedingte Verunreinigungen werden anschließend durch 3maliges Waschen des Pellets mit 50 ml 1 mM HCl entfernt und die Sepharose durch Zugabe von 50 ml 0,1 M  $\text{H}_3\text{BO}_3$  pH 8,3 aktiviert. Dem Pellet werden nachfolgend 3 mg aufgereinigtes Protein zur Kopplung hinzugefügt und das Gesamtvolumen mit PBS zu 10 ml aufgestockt. Auf einem Über-Kopf-Schüttler wird der Ansatz nun für 2 h bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt werden zur Absättigung freier Bindungsstellen 40 ml 1 M Ethanolamin-Lösung in das Zentrifugenröhrchen überführt und die Suspension ebenfalls für 2 h bei 4°C auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Schließlich wird das nicht gebundene Antigen durch Waschen mit 50 ml der folgenden Puffer abgetrennt:

---

0,5 M NaCl in 0,1 M Natriumacetat pH 4,0  
0,5 M NaCl in 0,1 M Tris pH 8,0  
0,1 M Glycin pH 2,3

---

Die Beads werden danach in ein Poly-Präp-Röhrchen überführt und zur Einstellung eines neutralen pH-Wertes 5mal mit 10 ml PBS gewaschen. Die Lagerung der Säule erfolgt bei 4°C in Gegenwart von 10 ml PBS / 0,02%  $\text{NaN}_3$ .

#### **Aufreinigung proteinspezifischer Antikörper:**

Zur Entfernung des zugesetzten  $\text{NaN}_3$  wird die Antigensäule mit 20 ml PBS im Durchfluss gewaschen. Anschließend wird der Auslaufstutzen des Poly-Präp-Röhrchens mit einem Stöpsel verschlossen und 2 ml aufgetautes Antiserum dem Ansatz hinzugefügt. Durch Zugabe von 6 ml PBS wird das Gesamtvolumen auf ~8 ml erhöht, wodurch eine gleichmäßige Durchmischung im Poly-Präp-Röhrchen während der Affinitätsbindung sichergestellt wird. Der Ansatz wird nun über Nacht bei 4°C auf

einem Drehrad inkubiert. Am nächsten Morgen lässt man durch Ziehen des Stöpsels das nichtgebundene Antiserum ablaufen. Diese Fraktion wird gesammelt und im ELISA (vgl. Kapitel 3.3.7) auf das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern überprüft. Gegebenenfalls wird der Durchfluss erneut zur Aufreinigung herangezogen. Im nächsten Schritt wird die Antigensäule 4mal mit 10 ml TBS-Puffer gewaschen, so dass unspezifisch gebundene Antikörper entfernt werden. Während des gesamten Waschvorgangs darf die Säule nicht trocken laufen, da sonst die Gefahr besteht, dass spezifische Bindungen geschwächt werden. Schließlich erfolgt die Elution durch einmalige Zugabe von 5 ml 0,1 M Glycin pH 2,3. Der Durchfluss wird dabei gleichmäßig auf 10 Reaktionsgefäße verteilt, in denen 50 µl 1 M Tris pH 9,5 zur Neutralisation vorgelegt sind. Die einzelnen Fraktionen werden danach sofort gemischt und deren Proteinkonzentration (vgl. Kapitel 3.2.4 zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford) bestimmt. Alternativ können auch 15 µl der einzelnen Proben in ein 10%iges SDS-PAGE gefahren werden und die antikörperhaltigen Fraktionen nach Färbung mit Coomassie (vgl. Kapitel 3.2.6 zur Coomassie-Färbung von Proteingelen) bestimmt werden. Die Antigensäule wird zur Lagerung mit 50 ml PBS nachgewaschen und in 10 ml PBS / 0,02% NaN<sub>3</sub> aufbewahrt.

### **3.3.4 Immunpräzipitation**

Für die Immunpräzipitation werden Zellextrakte aus behandelten und unbehandelten Zellen hergestellt und die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben bestimmt. Standardmäßig werden zu 1 mg Zellysat 1 µg Antikörper pipettiert und der Ansatz zur Ausbildung des Antigen-Antikörper-Komplexes für 16 h bei 4°C auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Zur Fällung des Immunkomplexes werden 50 µl Protein-G-Sepharose in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 2mal mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend werden die Beads in 100 µl Lysispuffer resuspendiert und zu den Zellextrakten pipettiert. Die eigentliche Fällung des Immunkomplexes erfolgt bei 4°C für 2 h, ebenfalls durch Inkubation auf einem Über-Kopf-Schüttler. Danach wird der Ansatz bei 500 rpm sedimentiert und unspezifisch gebundenes Protein durch 4maliges Waschen mit 1 ml RIPA-Puffer entfernt. Schließlich werden die Beads mit 20 µl PBS / 10 µl Lämmli-Puffer (5x) versetzt und die Proben für 5 min aufgekocht. Die von den Antikörpern abgetrennten Proteine können nun in einem SDS-PAGE analysiert werden.

### 3.3.5 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie erlaubt Aussagen über den Aufenthalt eines Proteins in der Zelle. Der Nachweis erfolgt durch proteinspezifische Antikörper, die entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind oder sich indirekt durch fluoreszierende 2. Antikörper nachweisen lassen. Da man bei der indirekten Immunfluoreszenz in der Regel ein stärkeres Signal erhält, wird in der vorliegenden Arbeit dieser Ansatz verfolgt.

Pro Färbung werden  $2,5 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von 2 ml resuspendiert und auf Mikroskopie-Deckgläschen, die sich in einer 6-Lochplatte befinden, ausgesät. Zur besseren Haftung der Deckgläschen wird der Boden einer jeden Kultur zuvor mit einem Tropfen FCS benetzt. Dadurch wird das Aufschwimmen der Coverslips nach Zugabe der Zellsuspension verhindert. Nach 24 h wird die Expression des IFRG28 durch Zugabe von 250 IU IFN- $\alpha_4$  induziert. Als Kontrolle dienen Ansätze, die unbehandelt bleiben. Nach weiteren 12 h werden die Deckgläschen 3mal mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml einer 2%igen PFA-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Zur Absättigung freier Valenzen werden die Coverslips 2mal für 5 min in 2 ml 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung inkubiert, wodurch der störende Einfluss einer Autofluoreszenz beim späteren Betrachten der Proben weitgehend unterbunden wird. Nach der Neutralisation des überschüssigen PFA werden die Ansätze für 5 min in 2 ml PBS inkubiert und nachfolgend in 2 ml PBS / 0,1% NP-40 permeabilisiert. Danach werden die Coverslips erneut mit 2 ml PBS gewaschen und für 2 h geblockt (5%ige Magermilchlösung in PBS). Zur Inkubation mit dem ersten Antikörper werden 20  $\mu\text{l}$  Antikörperlösung (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\alpha\text{IFRG28}$  in Blocklösung) auf eine mit Parafilm überzogene Glasplatte pipettiert. Die Deckgläschen werden mit ihrer Zellseite darauf gelegt, in eine mit Wasserdampf gesättigte Photokammer überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Coverslips erneut in die Löcher einer 6-Lochplatten gelegt (Zellseite nach oben) und 3mal mit 2 ml PBS (jeweils 5 min auf einer Wippe) gewaschen. Währenddessen wird der 2. Antikörper 1:250 mit der Blocklösung verdünnt, eine Glasplatte mit Parafilm vorbereitet und die Photokammer mit Wasserdampf gesättigt. Die Deckgläschen werden vorsichtig mit einer Pipette entnommen und wiederum mit ihrer Zellseite auf 20  $\mu\text{l}$  Antikörperlösung gelegt. Die Inkubation mit dem 2. Antikörper erfolgt dieses Mal bei Raumtemperatur für 2 h. Die Coverslips werden analog zu oben in einer 6-Lochplatte gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift werden die Coverslips 5mal in  $\text{ddH}_2\text{O}$  und 3mal in

Ethanol<sub>absolut</sub> getaucht, an der Luft getrocknet und in Aqua-Polymount eingebettet. Für Routinezwecke werden die Proben unter einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop betrachtet; Aussagen zur subzellulären Lokalisation eines Proteinen werden nur mit Hilfe der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie (LSM) getroffen.

### 3.3.6 Herstellung monoklonaler Antikörper

Nach Antigenkontakt bildet das Immunsystem eine große Anzahl an verschiedenen Antikörpern. Die Produktion wird dabei von Plasmazellen übernommen, die aus B-Lymphozyten durch Proliferation und Differenzierung entstehen. Dieser Prozess wird durch die Bindung des entsprechenden Antigens an den Antigenrezeptor des B-Lymphozyten ausgelöst und verläuft unter Beteiligung von Antigen-präsentierenden-Zellen und T-Helfer-Zellen. Da Antigene normalerweise mehrere Epitope tragen, werden gleich mehrere Antikörper gegen dasselbe Antigen produziert, so dass eine Mischung von Immunglobulin-Molekülen verschiedener Struktur und Spezifität entsteht. Monoklonale Antikörper zeichnen sich dagegen dadurch aus, dass sie einem einzelnen Zellklon entspringen und nur gegen ein bestimmtes Epitop gerichtet sind. Die Gewinnung solcher monoklonaler Antikörper geschieht durch Fusion einer B-Zelle mit einer Myelomzelle. Bei diesen Myelomzellen handelt es sich um entartete B-Zellen, die selber keine Antikörper produzieren aber prinzipiell dazu in der Lage sind. Gleichzeitig können diese Zellen die Purin- bzw. Pyrimidinvorstufen Hypoxanthin und Thymidin nicht zur DNA-Synthese verwerten, da die entsprechenden Enzyme, Thymidinkinase bzw. Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT), defekt sind. Sie sind somit auf die *de novo* Synthese der Purine und des Thymidins angewiesen. Zur Selektion von Hybridomzellen verwendet man HAT-Medium, das als besondere Zusätze Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält. Das Aminopterin blockiert die *de novo* Synthese der Purinbasen und des Thymidins. Aus diesem Grund können Myelomzellen nicht im HAT-Medium wachsen. Sie können weder die Nukleotide *de novo* synthetisieren, noch die im HAT-Medium angebotenen Vorstufen Hypoxanthin und Thymidin nutzen. Erst durch Fusion mit einer HGPRT-positiven Milzzelle erlangen sie wieder diese Eigenschaft. Die entstanden Hybridome besitzen also die Unsterblichkeit der Myelomzellen und die Fähigkeit der Milzzelle, die Vorstufen Hypoxanthin und Thymidin nutzen zu können. Nach der Fusion wird der Zellmix durch Ausplattieren auf mehrere Mikrotiterplatten so verteilt, dass in jedem Loch schätzungsweise ein bis

drei Hybridome heranwachsen können. Die Zellen werden dann für ca. 2 Wochen kultiviert und anschließend auf das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern untersucht. Positiv identifizierte Klone werden mehrfach subkloniert, um einerseits das Überwachsen mit weiteren hochgewachsenen Klonen zu verhindern und andererseits genetisch stabile von instabilen Subklonen unterscheiden zu können. Denn durch die Fusion entstehen sehr häufig instabile Zellen mit zwei Kernen. Durch das Verschmelzen der Kerne verlieren die Zellen nach und nach einzelne Chromosome, bis schließlich wieder ein stabiler diploider oder annähernd diploider Zustand erreicht ist. Es besteht daher die Möglichkeit, dass einzelne Zellen ihre Fähigkeit zur Produktion von Antikörpern in diesem Prozess verlieren.

#### **Immunisierung der Ratte:**

Als Antigen wird ein aus Bakterien aufgereinigtes Fusionsprotein, bestehend aus Glutathion-S-Transferase und den ersten 236 Aminosäuren des IFRG28-Proteins, verwendet. Für die erste Immunisierung wird das Antigen mit Freundschem Adjuvans in einer 1:1 Mischung emulgiert und subcutan der Ratte injiziert. Insgesamt finden sieben Immunisierungen statt, die sich dem folgendem Schema entnehmen lassen:

<b>Tag</b>	<b>Menge an Protein [µg]</b>	<b>Injektion</b>
1	350	1:1 Emulsion mit Freundschem Adjuvans s.c.
22	480	i.p.
31	360	i.p.
40	350	i.p.
47	350	i.p.
53	250	i.p.
61	250	i.p.

**Tab. 3.3-1 Immunisierungsschema: Ratte**



**Vorbereitung der Ag8-Myelomzellen:**

Die Ag8 Myelomzellen werden so expandiert, dass sie sich zum Zeitpunkt der Zellfusion in einer logarithmischen Wachstumsphase befinden. Zur Zellfusion werden die Suspensionszellen pelletiert und 2mal mit 50 ml serumfreiem Medium gewaschen. Vor dem letzten Zentrifugationsschritt wird die Zellzahl in einer Zählkammer ermittelt, es ergeben sich  $2,45 \times 10^8$  Zellen. Bis zur Durchführung der Fusion verbleiben die Zellen resuspendiert in 20 ml PBS.

**Isolierung von Peritonealmakrophagen:**

Das Wachstumsverhalten der entstehenden Hybridome wird positiv beeinflusst, indem Peritonealmakrophagen (PM $\Phi$ ) als Feeder-Zellen verwendet werden. Neben der Sekretion von Wachstumsfaktoren übernehmen sie auch die Phagozytose von toten Zellen. Dazu werden 8 Mäuse durch Genickbruch getötet, deren Bauchdecke entfernt und die Bauchhöhle aufgeschnitten. Durch mehrmaliges Ausspülen des Bauchraums mit PBS werden die PM $\Phi$  isoliert. Insgesamt ergeben sich  $3,85 \times 10^7$  Zellen.

**Isolierung der Milz:**

Durch CO<sub>2</sub>-Begasung wird die Ratte getötet und deren Milz steril entnommen. In einer Petrischale wird sie dann in Gegenwart von wenigen Millilitern PBS und unter zu Hilfenahme eines sterilen Einmalkolbens zerkleinert. Durch kreisförmige Bewegungen wird ein sanfter Druck auf die Milz ausgeübt, wodurch die Milzzellen vereinzelt werden. Anschließend wird die Zellsuspension zur Entfernung von unzerkleinerten Gewebsresten durch Mull in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen filtriert und die Zellzahl bestimmt. Es ergeben sich  $2,1 \times 10^8$  Milzzellen. Danach werden die Zellen bei 1800 rpm pelletiert und in 20 ml PBS resuspendiert.

**Vorbereitung der Zellfusion und Ansetzen des HAT-Mediums:**

Alle benötigten Medien und Reagenzien werden zur Durchführung der Fusion rechtzeitig auf 37°C erwärmt und das HAT-Medium zur Selektion angesetzt. Dazu werden 50 ml RPMI-Medium aus einer 500 ml Flasche entnommen und durch 50 ml FCS ersetzt, so dass 500 ml eines 10%igen Zellkulturmediums entstehen. Mit 10 ml dieses Nährmediums wird der HAT-Zusatz in dem separaten Hybri-Max-Gefäß gelöst

und wieder zurück in das Kulturmedium überführt. Anschließend wird zur Vermeidung von Keimwachstum 1% Penicillin / Streptomycin zugesetzt.

### Durchführung der Zellfusion:

Die komplette Anzahl an isolierten Milzzellen ( $2,1 \times 10^8$ ) verbleibt als 20 ml Zellsuspension in ihrem 50 ml Zentrifugenröhrchen und wird mit der Gesamtheit aller vorbereiteten Myelomzellen ( $2,45 \times 10^8$ ) vorsichtig durchmischt. Nachdem die Zellen bei 1800 rpm pelletiert wurden, wird der Überstand vorsichtig entfernt und das Zellpellet durch leichtes Fingerschnippen gelöst. Mit einer 5 ml Pipette werden anschließend 2,5 ml einer 37°C warmen PEG1500-Lösung (50% PEG 1500 in 75 mM Hepes pH 8; Roche) aufgezogen und über einen Zeitraum von 60 Sekunden zugegeben. Bei der Zugabe wird darauf geachtet, dass das Zellpellet mit der Pipettenspitze durch kreisförmige Bewegungen vorsichtig durchmischt wird. Die Zellsuspension wird für weitere 90 Sekunden durchmischt (Pipettenspitze) und daraufhin durch langsame Zugabe (1 - 2 min) von 2,5 ml RPMI-Medium (serumfrei; 37°C) verdünnt. Im nächsten Schritt wird über eine Zeitspanne von 5 min der Zellmix durch tropfenweise Zugabe von 15 ml RPMI-Medium (serumfrei; 37°C) weiter verdünnt. Auch hier erfolgt die Zugabe bei gleichzeitigem Rühren mit der Pipettenspitze. Schließlich werden der Zellsuspension über einen Zeitraum von 1 min weitere 15 ml RPMI-Medium (serumfrei; 37°C), wiederum unter Rühren mit der Pipettenspitze, hinzugefügt. Danach wird die Zellsuspension für 5 min bei 37°C inkubiert und zusammen mit den PM $\Phi$  in das HAT-Medium überführt und durchmischt (vgl. Tab. 3.3-2). Mit einer 8-Kanal-pipette wird nun der Ansatz auf insgesamt 48 Mikrotiterplatten verteilt. Hierbei erhält jedes Loch 150  $\mu$ l Zellsuspension.

Milzzellen	Myelomzellen	PM $\Phi$
$2,1 \times 10^8$	$2,45 \times 10^8$	$3,85 \times 10^7$

Tab. 3.3-2 Übersicht zu den einzelnen Zellzahlen der Zellfusion

**Identifikation von spezifischen Antikörpern gegen IFRG28:**

Nach 12 - 14 Tagen werden die Überstände der Hybridome auf spezifische Antikörper überprüft. Als Nachweisverfahren wird der ELISA gewählt, da sich mit dieser Methode innerhalb relativ kurzer Zeit alle Proben untersuchen lassen. Da zur Immunisierung ein GST-Fusionsprotein Verwendung fand und sich sehr wahrscheinlich auch eine Vielzahl von Antikörpern gegen die Glutathion-S-Transferase gebildet haben, eignet sich dieses Protein nur bedingt zum Coaten der Platten. Denn alle positiv identifizierten Zellklone müssen sonst in einem zweiten Schritt auf ihre potentielle Reaktivität gegen den GST-Teil untersucht werden. Um Zeit und Arbeit zu ersparen, werden daher Mikrotiterplatten mit dem IFRG28-12H-Fusionsprotein vorbereitet, wodurch die Überstände nur einmal zu analysieren sind. So können auch IFRG28-spezifische von GST-spezifischen Hybridomen in der gleichen Kultur der Mikrotiterplatte unterschieden werden.

**Subklonierung:**

Auf Grund der zu Beginn noch bestehenden Instabilität der Hybridome und der Gefahr des Überwachsens mit unspezifischen Zellklonen, müssen alle Hybridome mehrmals subkloniert werden. Dazu wird für jeden Zellklon eine Mikrotiterplatte vorbereitet, welche Milzzellen aus BALB/c Mäusen als Feeder tragen, wobei eine Milz ausreichend Zellen für 15 Platten liefert. Nach Resuspendierung des Hybridoms werden 75 µl Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 1 ml Nährmedium verdünnt. Anschließend werden 100 µl von diesem Ansatz in jedes Loch der ersten Spalte einer Mikrotiterplatte verteilt, so dass sich insgesamt 200 µl darin befinden. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer 8-Kanalpipette wird die Zellsuspension durchmischt und 100 µl in die nächste Spalte der Mikrotiterplatte überführt. Diese Schritte werden für jede Spalte der 96-Lochplatte wiederholt, so dass sich von links nach rechts eine 1:2 Verdünnungsreihe ergibt.

### 3.3.7 ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay)

Der Elisa stellt ein immunologisches Nachweisverfahren dar, bei welchem Proteine an der Plastikoberfläche einer Mikrotiterplatte durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden können (vgl. Tab. 3.3-3). In einem ersten Schritt wird das nachzuweisende Protein in der Coating-Lösung zu einer Endkonzentration von 0,5 - 4 µg/ml verdünnt. Von diesem Ansatz werden anschließend 100 µl in jedes Loch einer 96-Lochplatte pipettiert und die Mikrotiterplatte zur Adsorption des Antigens bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird ungebundenes Protein durch Auskippen verworfen und die freien Valenzen mit 200 µl Blocklösung pro Loch abgesättigt. Nach 1 h bei 37°C wird die Blocklösung durch 100 µl Hybridomüberstand ersetzt und für eine weitere Stunde auf einer Wippe bei Raumtemperatur inkubiert. Die 96-Lochplatte wird nun 4x mit je 100 µl 0,05% PBS-T / Vertiefung gewaschen und mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert (100 µl / Loch; 1 h bei Raumtemperatur auf der Wippe). Nach dem letzten Inkubationsschritt wird die Mikrotiterplatte erneut 4x mit 0,05% PBS-T gewaschen und die OPD-Substratlösung angesetzt. Dazu werden pro Testplatte 11 mg OPD (ortho-Phenyldiamin) abgewogen und in 11 ml Substratpuffer unter Lichtausschluss zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml gelöst. Nachdem sich das OPD vollständig gelöst hat, werden noch 11 µl einer 30%igen Wasserstoffperoxid-Lösung unter ständigem Rühren hinzugefügt. Von diesem Reaktionsansatz werden 100 µl in jedes Loch der Mikrotiterplatte pipettiert. Da das Substrat OPD lichtempfindlich ist, wird die 96-Lochplatte noch mit Aluminiumfolie bedeckt und für ca. 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit findet die Peroxidase-abhängige Umwandlung des OPD zu einem roten Azofarbstoff statt. Da die Menge des gebildeten Reaktionsproduktes im direkten Verhältnis zur Menge des gebundenen 2. Antikörpers steht, lässt sich aus dem Grad der Verfärbung Aussagen über die Menge des spezifisch gebundenen 1. Antikörpers machen. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 µl 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / Loch abgestoppt und die Absorption bei 492 nm im Elisa-Reader gemessen.

nachzuweisendes Protein	1. Antikörper	2. Antikörper
rekombinantes IFRG28	Hybridomüberstand	Ziege-α-Ratte-POX 1:4000

Tab. 3.3-3 Übersicht zum ELISA-Screening

## 3.4. Virologische Methoden

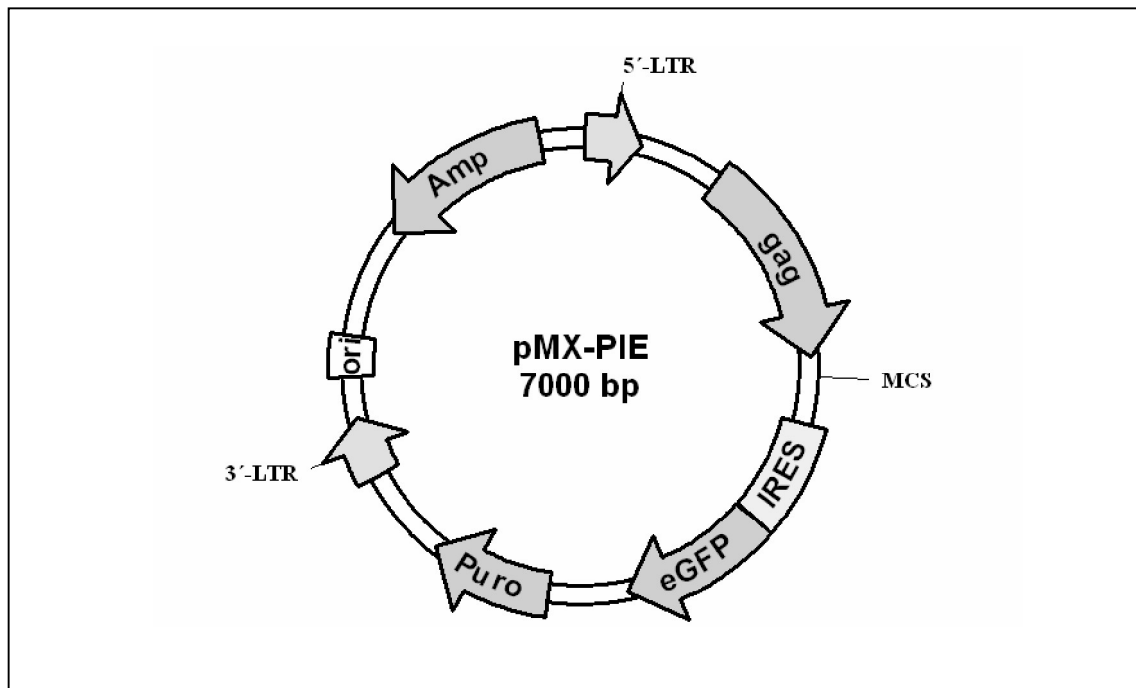
### 3.4.1 Retroviraler Gentransfer in NIH-3T3 und Ba/F3

Bei der herkömmlichen Methode zur Herstellung stabil-exprimierender Zelllinien, der Transfektion mit anschließender Selektion, erfolgt die Integration der Plasmid-DNA zufällig und ungerichtet; häufig in Bereichen, in denen die Expression des Gens schon nach kurzer Zeit abgeschaltet wird. Der Gentransfer mittels retroviraler Vektoren bietet demgegenüber entscheidende Vorteile. Denn die Integration der DNA erfolgt an den sogenannten Scaffold/Matrix assoziierten Regionen (S/MAR). Diese auch als „hot spots of recombination“ bezeichneten Bereiche zeichnen sich dadurch aus, dass die DNA an diesen Stellen nicht zu höher organisierten Funktionseinheiten verpackt wird; sie liegt vielmehr als getrennter Doppelstrang vor. Die integrierte DNA bleibt somit für Transkriptionsfaktoren leicht zugänglich, wodurch eine langanhaltende Expression des Gens gewährleistet wird.

Rekombinante Retroviren für den Gentransfer werden in erster Linie auf der Basis muriner Retroviren, vor allem des Moloney-Murine-Leukemia-Virus (MoMLV), entwickelt. Als Vektorsystem wird ein defektes Virus-Genom verwendet, das zwar noch ein Signal für die Verpackung der RNA in eine virale Hülle besitzt, jedoch fehlen auf dem Virus-Genom essentielle Strukturgene zur Ausbildung einer Virushülle. Damit wird sichergestellt, dass verpackte virale RNA eines defekten Virus zwar Zellen infizieren kann, aber in infizierten Zellen sich keine infektiösen Viren mehr bilden können. Um die geforderte initiale Infektiosität zu erlangen, wird der Vektor zunächst in eine Verpackungszelllinie transfiziert. Eine solche Verpackungszelllinie trägt in ihrem Genom einen ebenfalls defekten Retrovirus, der alle Informationen für die Ausbildung einer viralen Hülle besitzt. Allerdings fehlt der DNA in der Verpackungszelllinie das Verpackungssignal, so dass RNA von diesem Genom nicht in eine Virushülle verpackt wird. Das Prinzip eines derartigen Systems besteht also im Zusammenbringen zweier getrennter und defekter Teilsysteme.

Der in dieser Arbeit verwendete Klonierungsvektor besitzt zwei sogenannte „Long-Terminal-Repeats“ (5´-LTR und 3´-LTR), die für eine effiziente Integration der cDNA-Kopien ins Wirtsgenom verantwortlich sind (vgl. Abb 3.4-1). Die LTRs schließen ihrerseits die multiple Klonierungsstelle (MCS), den Selektionsmarker für Puromycin und eine interne ribosomale Bindungsstelle (IRES) zur Expression des nach-

geschalteten eGFPs (enhanced-Green-Fluorescent-Protein) ein. Zur Klonierung und Vervielfältigung in Bakterien trägt der retrovirale Vektor noch einen bakteriellen Origin und ein Resistenzgen unter bakteriellem Promotor.



**Abb. 3.4-1 Plasmidkarte des pMX-PIE-Vektors**

5'-LTR / 3'-LTR, repetitive Nukleotidsequenz am 5'- bzw. 3'-Ende; gag, gruppenspezifische Antigene; MCS, multiple Klonierungsstelle für die Insertion eines Gens; IRES, interne ribosomale Bindungsstelle; eGFP, Expressionskassette für das enhanced-Green-Fluorescent-Protein; Puro, Puromycin-Resistenzgen; ori, bakterieller Replikationsstart; Amp, Gen für die Ampicillin-Resistenz.

Als Verpackungszellen werden Phoenix-Zellen verwendet, welche sich von 293T-Zellen ableiten und das „gag-pol“-Konstrukt sowie das „env“-Konstrukt unter verschiedenen Promotoren (CMV and RSV) tragen. Zudem sind sie, ähnlich den 293T-Zellen, sehr gut zu transfizieren und ermöglichen dadurch eine hohe Virusproduktion.

### **Herstellung rekombinanter Viren und Gentransfer:**

Dazu werden  $1,5 \times 10^6$  Phoenix-Zellen in 4 ml Medium resuspendiert, in eine beschichtete 25 cm<sup>2</sup> - Flasche überführt und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Am nächsten Tag sollten die Zellen sich abgesetzt haben und den Boden der Zellkulturflasche zu ~75% bedecken, damit mit der Transfektion des retroviralen Vektors fortgefahren werden kann. Hierfür werden zwei Ansätze vorbereitet: In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß werden 25 µl Lipofectamine 2000 mit 475 µl Opti-Mem-

Medium (37°C) verdünnt, während in einem weiteren 1,5 ml Reaktionsgefäß 9 µg Vektor-DNA mit 500 µl Opti-Mem-Medium versetzt werden. Beide Ansätze werden gut gemischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend vereinigt. Nachdem sich der liposomale DNA-Komplex ausgebildet hat (20 min bei Raumtemperatur), wird die Mischung zu den Phoenix-Zellen pipettiert, die daraufhin für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert werden. Nach Ablauf dieser Zeitspanne, wird das Medium vorsichtig abgenommen und durch 4 ml frisches Medium ersetzt. Zur Virus-Produktion werden die Zellen nun für weitere 48 h bei 35°C inkubiert. Anschließend wird der virushaltige Überstand abgenommen und zur Abtrennung von Zellbestandteilen durch einen 0,45 µm Porenfilter filtriert.

Schließlich folgt die Infektion der Zellen:

#### **NIH-3T3:**

Dazu werden  $1,5 \times 10^6$  Zellen in eine 25 cm<sup>2</sup>-Flasche ausgesät, für 24 h kultiviert und am nächsten Tag mit 4 ml Virus-Überstand inkubiert. Zur besseren Adhäsion der Viruspartikel an die Zellmembran wird der Ansatz anschließend mit 4 µl Polybren-Lösung (10 mg/ml) versetzt und für 48 h bei 35°C kultiviert. Zur Selektion stabil transfizierter Zellen werden 1 µg/ml Puromycin zugesetzt.

#### **Ba/F3:**

Hierfür werden  $2,5 \times 10^6$  Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, in 4 ml Virus-Überstand resuspendiert, mit 4 µl Polybren-Lösung versetzt und für 48 h bei 35°C inkubiert. Zur Selektion stabil transfizierter Zellen werden analog zu oben 1 µg/ml Puromycin zugesetzt.

#### **Anreicherung stabil-transfizierter Zellen:**

Nach Integration des retroviralen Expressionsvektors pMX-PIE in das Wirtsgenom werden mRNAs transkribiert, die neben dem Transgen (IFRG28) auch die genetische Information für eGFP tragen. Die Expression des eGFP erfolgt allerdings unter Kontrolle der IRES-Sequenz, über welche die mRNA ein zweites Mal an die Ribosome bindet. Damit steht die GFP-Expression in direkter Korrelation zur IFRG28-Expression. Für den Nachweis einer IFRG28-Expression bietet sich daher eine FACS-Analyse an, in der die GFP-Fluoreszenz quantifiziert wird. Um Zellen mit

einer stabilen IFRG28-Expression zu erhalten, werden unter Verwendung einer angeschlossenen Sortiereinrichtung die besonders stark fluoreszierenden Zellen (die besten 35%) angereichert und zur weiteren Analyse expandiert.

### **3.4.2 Infektion eukaryontischer Zellen mit Virus**

Dazu werden Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^6$ /ml auf 6-, 24- oder 96-Lochplatte ausgesät. Zum Zeitpunkt der Infektion, in der Regel nach 24 h, wird das alte Kulturmedium abgenommen und durch das virushaltige Infektionsmedium (1% FCS; 37°C) ersetzt, wobei mindestens 2 Kulturen als Negativkontrolle uninfiziert bleiben. Der Infektionsfaktor MOI (Multiplicity-Of-Infection) beschreibt die statistische Verteilung von Viruspartikeln pro Zelle und wird durch Verdünnung einer Virusstamm suspension mit Kulturmedium (1% FCS; 37°C) eingestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt anschließend solange bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, bis sich zytopathische Effekte an den infizierten Zellen zeigen. Unter einem zytopathischen Effekt versteht man das Abrunden bzw. Ablösen von Virus-infizierten Zellen. Die Vitalität der Zellen kann dann über die Freisetzung von LDH (vgl. Kapitel 3.2.7) bzw. den Einbau von MTT (vgl. Kapitel 3.2.8) bestimmt werden.



## 3.5 Zellbiologische Methoden

### 3.5.1 Kultivierung von Bakterien

Zur kurzfristigen Lagerung werden Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, bei 37°C über Nacht inkubiert und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Zur Langzeitlagerung wird LB-Medium mit einer Kolonie der Agarplatte angeimpft und auf einem Schüttler (200 rpm) über Nacht kultiviert. Diese frisch aufgewachsene Suspensionskultur wird mit 70%igem Glycerol im Verhältnis 1:1 gemischt und zu 1 ml Aliquots bei -70°C eingefroren.

### 3.5.2 Herstellung chemokompetenter Bakterien

300 ml LB-Medium werden mit 1 ml einer Übernachtskultur E. coli angeimpft und bis zum Erreichen einer  $OD_{600} = 0,6$  auf dem Schüttler inkubiert (37°C; 200 rpm). Danach werden die Bakterien abzentrifugiert (10 min; 3000 rpm; 4°C) und das Pellet in 70 ml eiskalter TFB1-Lösung resuspendiert. Nach 30 min auf Eis erfolgt eine weitere Zentrifugation (10 min; 3000 rpm; 4°C). Der Überstand wird entfernt, das Pellet in 16 ml RF2-Puffer resuspendiert und für weitere 15 min auf Eis aufbewahrt. Von dieser Bakteriensuspension werden 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### 3.5.3 Kultivierung von Säugerzellen

Alle zellbiologischen Arbeiten werden unter einer sterilen Werkbank mit sterilen Materialien durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in Schalen oder Flaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre. Als Kulturmedien werden von der Fa. Sigma RMPI-1640 und D-MEM bezogen, in denen die Zellen unter Zusatz von 5 - 10% FCS kultiviert werden. Je nach Wachstumsverhalten werden die Zellen 2 - 3mal wöchentlich im Verhältnis 1:10 bis 1:20 umgesetzt. Nähere Informationen zu den Kulturbedingungen der einzelnen Zelllinien können der folgenden Tabelle entnommen werden:

Zelllinie	Kulturmedium	Wachstum	Umsetzen
Ag8	RPMI-1640 + 10% FCS	Suspension	2mal wöchentlich 1:20
Ba/F3	RPMI-1640 + 10% FCS	Suspension	2-3mal wöchentlich 1:20
Hybridome	RPMI-1640 + 10% FCS	Suspension	2mal wöchentlich 1:20
LMTK <sup>-</sup>	D-MEM + 5% FCS	Monolayer	2mal wöchentlich 1:10 - 1:15
MEF	D-MEM + 10% FCS	Monolayer	2mal wöchentlich 1:10 - 1:20
NIH3T3	D-MEM + 5% FCS	Monolayer	2mal wöchentlich 1:10 - 1:20
Phönix	D-MEM + 10% FCS	Monolayer	2mal wöchentlich 1:10 - 1:15

**Tab. 3.5-1 Übersicht zu den Kulturbedingungen der einzelnen Zelllinien**

Adhärenz wachsende Zellen werden nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers mit PBS gewaschen und durch Behandlung mit Trypsin (2ml / 75cm<sup>2</sup>-Flasche) von der Unterlage der Zellkulturflasche gelöst. Der enzymatische Verdau wird nach 5 min bei 37°C durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium gestoppt. Anschließend werden die Zellen gut resuspendiert und in der entsprechenden Verdünnung in eine frische Zellkulturflasche überführt. Suspensionszellen werden nach Gelbfärbung des Kulturmediums resuspendiert und in der entsprechenden Verdünnung auf frische Zellkulturflaschen umgesetzt.

### 3.5.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wird das Pellet von  $1,5 \times 10^7$  Zellen in 3 ml Einfriermedium (FCS unter Zusatz von 10% DMSO) resuspendiert und zu 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt. Eine mögliche Kristallbildung während des Einfrierprozesses wird verhindert, indem die Zellen zunächst in einer mit Isopropanol gefüllten Box (Strata-Cooler) bei -70°C gelagert werden. Dadurch wird eine gleichmäßige Abkühlung von  $\sim 1^\circ\text{C} / \text{min}$  erreicht. Nach frühestens 12 h können die Zellen in flüssigem Stickstoff verwahrt werden. Neue Zellkulturen können angelegt werden, indem die eingefrorenen Zellen bei 37°C schnell aufgetaut werden. Die Suspension wird sofort in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, in dem schon 25 ml Zellkulturmedium vorgelegt sind. Durch anschließende Zentrifugation (10 min; 1800

rpm) und Abkippen des Überstands wird das toxische DMSO entfernt. Das Pellet wird in einem Volumen von 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm<sup>2</sup> - Zellkulturflasche überführt.

### **3.5.5 Calciumphosphat-Transfektion von LMTK<sup>+</sup>**

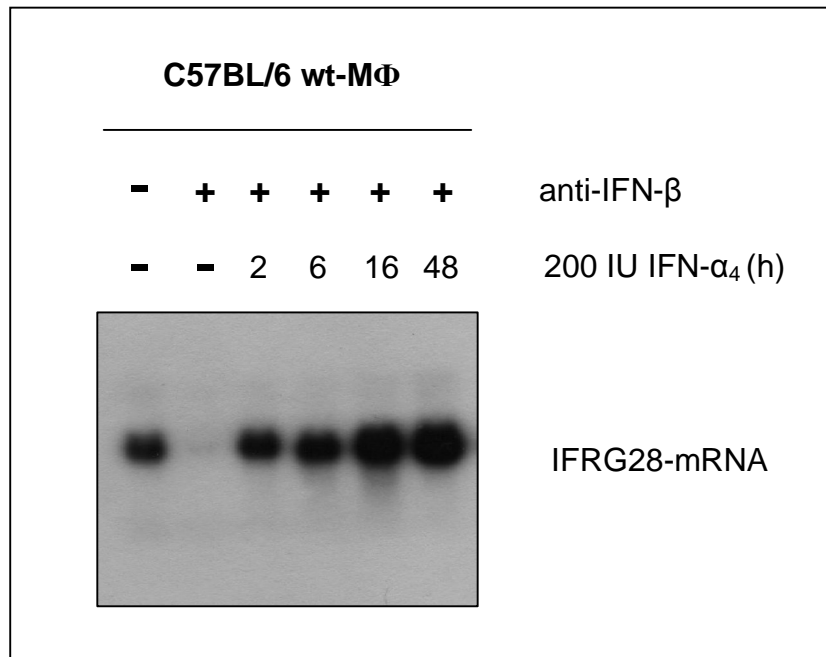
Die Calciumphosphat-Transfektion ermöglicht die transiente Überexpression von Proteinen in adhären Zellen. Bei dieser Transfektionsmethode wird DNA in einem Komplex mit Calciumphosphat auf die Zellmembran präzipitiert und mittels Endocytose von den Zellen aufgenommen. Die Durchführung dieser Methode erfolgt in Anlehnung an das Protokoll von Chen-Okayama. Hierfür werden in jedes Loch einer 6-Lochplatte  $3,5 \times 10^5$  Zellen ausgesät und ca. 24 h lang kultiviert. Sobald eine Zelldichte von 50 - 60% erreicht worden ist, werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 2 ml frischen Mediums inkubiert. Für die Transfektion von 6 Kulturen werden 7 µg Plasmid in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und nacheinander mit 585 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung (0,25 M) und 585 µl 2x BES-Puffer versetzt. Die Lösung wird kurz gemischt und für 15 min stehengelassen. Nach Beendigung der Inkubationszeit werden 185 µl Transfektionsansatz tropfenweise zu jeder Kultur einer 6-Lochplatte pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken im Medium verteilt. Die Zellen werden nun über Nacht bei 35°C und 3% CO<sub>2</sub> kultiviert. Am nächsten Morgen wird das Transfektionsmedium abgezogen, die Zellen zweimal gewaschen und frisches Medium ergänzt. Nach weiteren 24 - 48 h werden die transfizierten Zellen geerntet und Proteinextrakte hergestellt (vgl. Kapteil 3.2.3 zur Herstellung von Proteinextrakten aus Säugerzellen).

## 4. Ergebnisse

Das in dieser Arbeit untersuchte Protein wurde 1996 von P. Nickolaus [P. Nickolaus, 1996] aus einer cDNA-Bank von IFN- $\alpha$  behandelten primären Knochenmark-Makrophagen des Mausstammes B6.C-H28 als cDNA 3/7 isoliert. Durch Northern-Blot-Experimente und RT-PCR-Untersuchungen konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich hierbei um ein IFN-induziertes Gen handelt. Mit der Sequenzinformation der cDNA 3/7 wurde anschließend die „Expressed-Sequence-Tag“ Datenbank am National Center for Biology Information (NCBI) durchsucht. Ein homologer EST-Klon mit der Bezeichnung IFRG28 wurde unter der Acc.No.AJ251364 gefunden, sowie das humane Homolog unter der Acc.No.AJ251832. Zu diesem Zeitpunkt konnte durch Datenbankvergleiche nicht gewährleistet werden, dass das 5'-Ende den richtigen Startpunkt für die Translation des Proteins enthält bzw. ob sich eventuell weitere Exons oberhalb der bekannten cDNA befinden. Um den korrekten Start der mRNA zu definieren, wurde deshalb zuerst ein 5'-RACE durchgeführt.

### 4.1 Bestimmung des 5'-Endes der IFRG28-mRNA

Anhand der bekannten cDNA wurden zunächst genspezifische Primer nach der Arbeitsanweisung des GeneRacer™ Kits (Fa. Invitrogen) angefertigt, deren Spezifität für die IFRG28-cDNA in einer RT-PCR überprüft wurde (Daten nicht gezeigt). Für dieses Experiment wurde auch eine RNA-Präparation aus IFN-behandelten Makrophagen benötigt, die nach Möglichkeit viel IFRG28-mRNA enthielt. Um die Chance zu erhöhen, vollständige IFRG28-Transkripte zu identifizieren, wurde in einem Northern-Blot der Zeitpunkt bestimmt, zu dem die stärkste Expression der IFRG28-mRNA stattfindet (vgl. Kapitel 3.1.18). Den Ergebnissen zufolge enthielten RNA-Extrakte aus Makrophagen, die 48 h mit IFN- $\alpha$  behandelt wurden, die meisten IFRG28-Transkripte (vgl. Abb. 4.1-1). Aus diesem Grund wurde für die Durchführung des 5'-RACE dieser RNA-Extrakt verwendet.

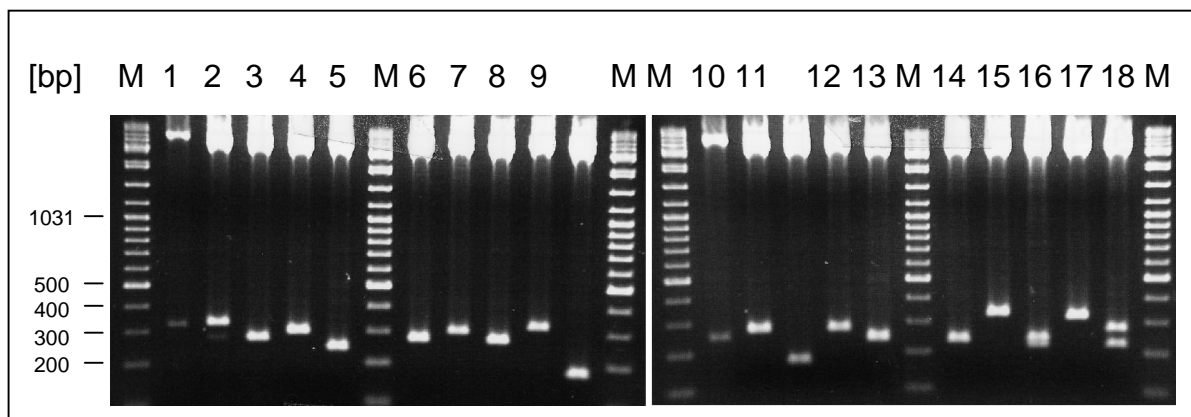


**Abb. 4.1-1 Northern-Blot der eingesetzten RACE-RNA**

15 µg Gesamt-RNA/Spur wurde in einem 1,2% Agarose-Gel unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Der Blot wurde anschließend mit einer <sup>32</sup>P-markierten IFRG28-cDNA hybridisiert und autoradiographiert.

#### 4.1.1 Klonierung des 5'-Endes der IFRG28-cDNA durch 5'-RACE

Nachdem nun sichergestellt war, dass sowohl der RNA-Extrakt als auch die Primer den Vorgaben entsprachen, wurde das 5'-RACE nach den Protokollen des Herstellers durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1.19). Für die reverse Transkription wurde der Primer *K3R* eingesetzt. Anschließend wurde die cDNA in einer 2-Stufen-PCR amplifiziert. Für die erste Reaktion wurden der *GeneRacer 5'-Primer* mit dem reverse Primer *K3R2* kombiniert. Das gewonnene DNA-Fragment wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und diente in einer Nested-PCR dem *GeneRacer 5'-Nested-Primer* und dem *K3R-38 (reverse Primer)* als Template. Nach Abtrennung störender Primer wurde das Amplifikat in den pCR2.1-TOPO-Vektor (Fa. Invitrogen) einkloniert. Nach Transformation in Bakterien wurden 20 Kolonien untersucht und 18 Inserts sequenziert (vgl. Abb. 4.1-2).



**Abb. 4.1-2 Restriktionsanalyse der einklonierten RACE-cDNA**

Nach Klonierung der PCR-Fragmente in den pCR2.1-TOPO-Vektor konnten aus den Plasmiden nach EcoR1-Restriktionsverdau die entsprechenden cDNAs herausgeschnitten werden. Die Auftrennung erfolgte in einem 2% Agarose-Gel. M ist der Molekulargewichtsmarker 100 bp (NEB); Spur 1 bis 18 zeigen die sequenzierten DNA-Inserts.

#### 4.1.2 Analyse der DNA-sequenzen

Die Analyse der 5'-RACE-Produkte ergab, dass alle 18 untersuchten Sequenzen zum 1. Exon homolog sind. Somit konnte kein zusätzliches Exon identifiziert werden. Unterschiede zeigten sich jedoch bezüglich des Transkriptionsstarts. In 6 von 18 Fällen, und damit am häufigsten, begannen die Inserts 22 bp oberhalb der bekannten cDNA. Die übrigen Sequenzen fingen entweder davor oder danach an; ein wiederholtes Auftreten eines bestimmten Nukleotids als Transkriptionsstart konnte in diesen Fällen nicht festgestellt werden. Es deutet alles darauf hin, dass die Position -22 oberhalb der ursprünglichen cDNA, den eigentlichen Transkriptionsstart darstellt. Als längstes RACE-Produkt wurde eine um 50 bp längere cDNA isoliert.

Aus dem Ergebnis des 5'-RACE ergibt sich folgende Basenzusammensetzung für die IFRG28-cDNA:

	<b>+1</b>					
- 28	<u>CTGAAACTGTT</u>	<u>CTTTGTTTCC</u>	<u>TCTCTCCC</u>	<b>AG</b>	<u>ATTTGAAGGA</u>	<u>GACAAGTGAG</u>
+ 23	<u>CTGCTGAGTA</u>	<u>ACCCGGGGCC</u>	<u>TCAGCTTCCA</u>	<u>CACCTCTGAG</u>	<u>AATGCTGTTC</u>	
+ 73	<u>CCCGATGACT</u>	<u>TCAGTACTTG</u>	<u>GGAGCAGACA</u>	<u>TTTCAAGAAC</u>	<u>TGATGCAGGA</u>	
+ 123	<u>GGAGAAGCCC</u>	<u>GGGGCCAAGT</u>	<u>GGAGCCTGCA</u>	<u>TTTGGATAAG</u>	<u>AACATTGTAC</u>	
+ 173	<u>CAGATGGTGC</u>	<u>AGCCCTGGGA</u>	<u>TGGAGGCAGC</u>	<u>ACCAGCAGAC</u>	<u>AGTGCTTGGC</u>	
+ 223	<u>AGGTTCCAGT</u>	<u>GTTCCAGATG</u>	<u>CTGCAGAAGT</u>	<u>TGGACCTCTG</u>	<u>CTCAGGTGAT</u>	
+ 273	<u>GATCTTGTGC</u>	<u>CACATGTACC</u>	<u>CGGACACTTT</u>	<u>GAAATCGCAG</u>	<u>GGCCAGGCAC</u>	
+ 323	<u>GCATGAGGAT</u>	<u>CTTTGGTCAG</u>	<u>AAGTGCCAGA</u>	<u>AGTGTTTTGG</u>	<u>ATGTCAATTT</u>	
+ 373	<u>GAGACTCCCA</u>	<u>AGTTCTCCAC</u>	<u>AGAGATCATC</u>	<u>AAAAGAATTC</u>	<u>TGAATAACCT</u>	
+ 423	<u>AGTTAATTAT</u>	<u>ATTCTGCAGA</u>	<u>GATACTATGG</u>	<u>ACACAGGAAG</u>	<u>ATAGCATTGA</u>	
+ 473	<u>CCTCGAATGC</u>	<u>ATCTTTGGGT</u>	<u>GAGAAGGTGA</u>	<u>CTTTGGATGG</u>	<u>GCCCCACGAC</u>	
+ 523	<u>ACACGCAATT</u>	<u>GTGAGGCATG</u>	<u>CAGTCTAAAC</u>	<u>TCTCATGGAA</u>	<u>GATGTGCCCT</u>	
+ 573	<u>TGCACACAAA</u>	<u>GTA AACCCAC</u>	<u>CCAGATCTCC</u>	<u>ATCTCCATTA</u>	<u>CCAAAGAGTT</u>	
+ 623	<u>CCTCCCCATC</u>	<u>AAAGAGCTGC</u>	<u>CCTCCTCCGC</u>	<u>CTCAGACCCG</u>	<u>GAATACGGAT</u>	
+ 673	<u>TTTGGGAATA</u>	<u>AAACTTTTCA</u>	<u>GGATTTTGGG</u>	<u>AATAGAACTT</u>	<u>TTCAGGGATG</u>	
+ 723	<u>CAGAGAGCCC</u>	<u>CCCCAACGTG</u>	<u>AAATAGAGCC</u>	<u>ACCACTATTT</u>	<u>CTGTTTTTGT</u>	
+ 773	<u>CTATTGCTGC</u>	<u>ATTTGCCCTT</u>	<u>TTTAGTCTTT</u>	<u>TCACTAGATA</u>	<u>ATAGGTTTAT</u>	
+ 823	<u>CGTCTTGTTT</u>	<u>TAATACCTTG</u>	<u>GTGATCAATG</u>	<u>AAATAGATGT</u>	<u>CATTTCAATA</u>	
+ 873	<u>GGACAGTGAA</u>	<u>TTCATATAGA</u>	<u>ATCAAGTAAG</u>	<u>GTCGAGTATA</u>	<u>TAAAATAAAT</u>	
+ 923	<u>CTGCTTTTCT</u>	<u>GGACATGCTC</u>	<u>TGAAAATAGC</u>	<u>CTAAACCATG</u>	<u>GCCCACACAT</u>	
+ 973	<u>AATGGACCCA</u>	<u>ATAACAGATT</u>	<u>TGTATTGAGT</u>	<u>TGCTGAACTG</u>	<u>TCTGCACTAG</u>	
+ 1023	<u>CTTGCTCAGC</u>	<u>TATTGTTCTC</u>	<u>AAGCTATGTT</u>	<u>GATTAATAAA</u>	<u>ATCTTGATTA</u>	
+ 1073	<u>TAAAAAAA</u>					

**Abb. 4.1-3 IFRG28-cDNA**

Neu identifizierter cDNA-Abschnitt (dick unterstrichen); häufigster Transkriptionsstart (groß und fett); kodierende Sequenz (unterstrichen); Start- und Stop-Kodons (groß); Details siehe Text.

In Abbildung 4.1-3 sind die ersten 50 bp des neu identifizierten cDNA-Abschnittes dick unterstrichen dargestellt. Die Nummerierung der einzelnen Basen beginnt mit dem am häufigsten identifizierten Transkriptionsstart. Somit ergibt sich eine Gesamtlänge von insgesamt 1081 Nukleotiden. Dem Start-Kodon an Position +65 (Kozak-Sequenz: 5'-AGAATGC-3') folgt ein offenes Leseraster von 747 Nukleotiden, das für ein Protein mit 249 Aminosäuren kodiert. Die Translation wird durch zwei Stop-Kodons terminiert. Danach schließt sich die 3'-untranslatierte Region mit etwa 270 bp an. Die ursprünglich isolierte cDNA beginnt hier mit Nukleotid 23.

## 4.2 Genomische Organisation des IFRG28-Gens

Durch Screenen einer genomischen Maus DNA-Bank in  $\lambda$ -Bakteriophagen - freundlicherweise von Dr. Krieg, DKFZ Heidelberg, zur Verfügung gestellt - wurden mehrere rekombinante Phagen isoliert, die mit der IFRG28-cDNA hybridisierten, und die Sequenz des betreffenden Gens ermittelt. Die kodierende Sequenz besteht aus 2 Exons von 224 und 805 bp, die durch ein 2736 bp langes Intron voneinander getrennt sind. Anschließend wurde durch Datenbankvergleiche mit der genomischen Sequenz das IFRG28-Gen auf Chromosom 16 lokalisiert (vgl. Abb. 4.2-1).

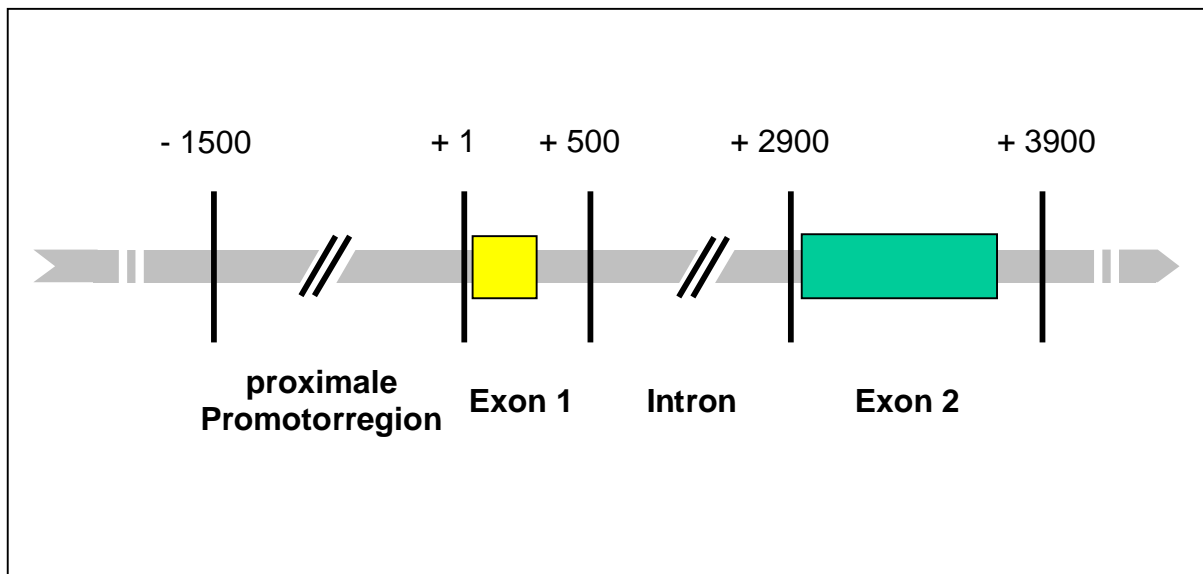


Abb. 4.2-1 Schematische Darstellung zur genomischen Organisation des IFRG28-Gens



### 4.3 Bioinformatische Promotoranalyse

Genpromotoren höherer Zellen können auf Grund ihres modularen Aufbaus mit Hilfe von Bioinformatikprogrammen häufig gut identifiziert werden. Innerhalb der Promotorregion befinden sich oftmals mehrere Sequenzmotive, an die spezifische Transkriptionsfaktoren binden. Jedes dieser Motive besitzt dabei seine eigene spezielle Konsensussequenz, wobei die relative Lage des einzelnen Moduls zum Transkriptionsstart sehr variabel sein kann. Dadurch erhalten eukaryontische Promotoren eine komplexe individuelle Zusammensetzung mit hoher Spezifität. Ein Fingerzeig für die spezifische Regulation eines bestimmten Gens können partielle Kopien dieser Motive sein, die durch Duplikation von Bindungsstellen entstanden sind.

Unmittelbar vor der Initiationsstelle für die Transkription eines Gens befindet sich häufig das TATA-Box-Motiv, an das über entsprechende Faktoren die RNA-Polymerase II bindet. Dieses Modul wird auch als „core-Promotor“ bezeichnet und liegt gewöhnlich 25 - 35 bp oberhalb des Transkriptionsstarts. Eine Reihe von eukaryontischen Promotoren besitzt hingegen kein solches TATA-Box-Motiv. Entweder übernimmt in solchen Fällen ein anderer konservierter Sequenzbereich, ein sogenannter Initiator, diese Aufgabe oder es entstehen Transkripte mit unterschiedlichen 5'-Enden.

Für die mRNA des IFRG28-Gens konnte durch das 5'-RACE ein Haupttranskriptionsstart ermittelt werden, der sich 64 bp oberhalb des ATG-Start-Kodons befindet. Eine weitere Sequenzanalyse ergab, dass relativ zu diesem Transkriptionsstart (TS) keine Konsensussequenz für eine TATA-Box existiert. Stattdessen konnte ein konservierter Sequenzbereich für einen Initiator identifiziert werden.

Eine detaillierte Sequenzanalyse des 1,5 kb langen proximalen Promotorbereichs wurde mit dem Computer-Programm TESS durchgeführt:

Bei der Analyse auf Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren des IFN-Signals-transduktionswegs konnten drei ISRE-Module sowie ein GAS-Element für die Bindung von STAT1-Homodimere identifiziert werden. Mehrere partielle Kopien, die

sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu diesen ISRE-Motiven befinden, konnten ebenfalls ausgemacht werden; diese sind in Abbildung 4.3-1 hellblau dargestellt. Ferner wurden STAT3, STAT5 und NF- $\kappa$ B bindende Elemente identifiziert. Die im proximalen Promotorbereich vorkommenden Konsensussequenzen der einzelnen Motive sowie deren relative Lage zum Transkriptionsstart ist in Tabelle 4.3-1 wiedergegeben.

Motiv	Konsensussequenz	Position
ISRE (STAT1+STAT2+IRF9)	(A/G)NGAAANNGAAACT	-22 bis -35 -41 bis -58 -71 bis -83
Initiator	YYAN(A/T)YY(Y)	-2 bis +6
Bindungsstelle für NF- $\kappa$ B	GGRRNNYYCC	-876 bis -885 -976 bis -985 -1337 bis -1345
GAS (STAT1)	TT(C/A)NNNTAA	-218 bis -226
GAS (STAT3/STAT5)	TT(A/C)NNNGAA	-206 bis -214 -756 bis -764

**Tab. 4.3-1 Konsensussequenzen der einzelnen Motive im proximalen Promotorbereich des IFRG28-Gens**

In der linken Spalte sind die Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren angegeben, in der mittleren die dazugehörigen Konsensussequenzen und in der rechten deren relative Lage zum Transkriptionsstart.

-1564	GGATCTGGTT	TCTTGCTTGC	TTTCAAGAGT	CTATAATTAC	TGCTGGGGCT	
-1514	TATGAGCTTT	GCATTTGCGC	CACAAACAGC	TCCTTGTAGC	AGCTCCTAAC	
-1464	TCGACAATC	TGCAGAACAC	CTGTGACAAT	GGGGTCACTG	TGCCTGTCTC	
-1414	TCTGAAATGT	CTCTCACAGG	AATAATCCTC	TGTTTAGCCT	GGTCTCTTAG	
-1364	ACAGTTCCCC	AGGCAGTAGG	<u>NF-kB</u> <u>GGAATTCC</u> TA	GCGCAGGCTG	CCAGGTCGAG	
-1314	GTTTTACTAC	TGTCTCCCTA	GCTCTGGCAC	CCTGTGCCAC	CCCATAACAA	
-1264	GTGCCTTGG	CTTCTCTCCA	GGCAGTGAGG	TGGATGCAGA	CACAGCAGGT	
-1214	GTTGAAATCA	TAGAGACCCA	GGTTCGAATT	TGACCTCTGC	TTACTTGCCT	
-1164	GTAACCTTGC	TACAAGTTTT	GCCAGCTCTT	GATGTGTGGG	CTCACTTGTA	
-1114	AGATACCAGA	GTTAGAAAGA	ATTTCACTGT	GACAAGAAAA	GAGACTAGGA	
-1064	CTCACATTTT	AGTGTCTGAA	CAAGGCAAAC	TTACTCTCTG	TCAAGAGGGT	
-1014	TTTCTCAGGA	GTGGGAACAC	ACCAGGACAG	<u>NF-kB</u> <u>GAAGCCTCCA</u>	TGTGGTTGGA	
-964	GATGGTGTCT	TTCTTCCTAT	TGGTTGGGGT	CTGACATCAC	AGTTTAAAGA	
-914	TTAGCTAGTG	TAAACCAAAG	AGGCTGGTCG	<u>NF-kB</u> <u>GAGCGCCCC</u>	CCCCACATA	
-864	TGTAGGAGAG	GGCTACCATG	TCTGATTTCA	GTGGGAGAGG	ATATATCTAA	
-814	TCCTGCAGAG	ACTTGATGCA	CCAAGTGGG	TGGGGGAAAC	AGAGGTTCCC	
-764	<u>GAS(STAT3/STAT5)</u> <u>TTCTCAGAA</u> G	GGGAGGGAGA	ATGTGGGAGG	AACTCTGGGA	CGGGAGGAAG	
-714	ACCGGGAGGG	GGCAGAATT	TGGGATGTAA	TAAAATAAAT	AAATTAATTA	
-664	ATTAATAAAAA	AGGAATAGCT	GGTGTAAAA	GAACCTTTGG	GAAGGAAGAA	
-614	AGGAAGTCAG	AATGGGGTCA	GCCACTTAAC	TCTCTTAAGG	GTCCCAGAAT	
-564	GTAGCAGGGC	CTTGCATAA	AAGGTTTTAC	TAGGTGGGAA	GATGTTAATA	
-514	TATTTGCATC	CAAGGTGCAG	GAGATGAAAG	GAGTTGAATT	ATTTGCTGCA	
-464	AACACAAAAA	AAATACAAGT	TTTTCACTGT	CTCAAAGAAA	ATACTCATAT	
-414	TTATTTTGT	GTGCTGTTTT	AACACCAGGA	ACATTTGCAG	TGCGGATTTT	
-364	TTTCAGGGTC	ACTAGGTGAT	TAGGAACACA	ACCTTTACA	GTTCTGAGAT	
-314	CTCCGGGCCA	CCAGCATCTA	CTGGGGCAGG	CGCCTTTTCT	CAGTCACTAA	
-264	GCACTCCTTT	ATTTTCAATC	CCCACACTGG	TGCCTTGT	<u>GAS(STAT1)</u> <u>TT ACAGTAA</u> AAA	
-214	<u>GAS(STAT3/STAT5)</u> <u>TTATAAGAAA</u>	ACAAAATGAA	AAGCTTCCA	CACAGGAGCCG	CTAGAATGC	
-164	AACCAGAACT	CCG <u>CAGTTT</u> C	AGCACGGCCC	TTAACACAG	TGGCAGCGGC	
-114	GATTTGCTGC	CCTAAGG	<u>TTT</u> CTGTGCACCT	<u>TGGAAACCGA</u>	<u>AACT</u> TAAAGA	
-64	CAGACCGGGA	<u>AATGGAACT</u>	<u>AAA</u> GAACCG	<u>GGAAACTGAA</u>	<u>ACT</u> GTTCTTT	
		+1				
-14	<u>TTTT</u> CTCTC	<u>TCC</u> <u>AGATT</u>	GAAGGAGACA	AGTGAGCTGC	TGAGTAACCC	
		Initiator/TS				
+36	GGGGCCTCAG	CTCCACACC	TCTGAGA	<u>ATG</u>	CTGTTCCCCG	ATGACTTCAG

**Abb. 4.3-1 Sequenz und Lage der mit Hilfe der TESS-Software identifizierten Promotorelemente des IFRG28-Gens**

ATG-Start-Kodon (groß und fett); Initiator (grün); ISRE (dunkelblau); partielle Kopien der ISRE (hellblau); Bindungsstellen für STAT1, STAT3 und STAT5 (rot); bindende Elemente für NF-kB (orange); Details siehe Text.

## 4.4 Reportengenanalyse von proximalen Deletionskonstrukten

Um eine IFN-Induzierbarkeit der potentiellen Promotorregion nachweisen zu können, wurden Fragmente mit unterschiedlich langen genomischen Abschnitten in den pGL3-Basic-Vektor kloniert und in einem Luciferase-Assay auf eine gesteigerte Expression des Reportergens nach IFN-Behandlung analysiert. Ergeben sich durch das Verkürzen der untersuchten Promotorregion Unterschiede in der Luciferase-Aktivität, können diese Hinweise auf wichtige Domänen bei der Transkription sein. Für die *in vitro* Analyse der Promotorfragmente wurde die Zelllinie LMTK<sup>c</sup> ausgewählt, da sie einerseits das Gen nach IFN-Stimulation exprimiert und andererseits unter den gewählten experimentellen Bedingungen gut transfiziert werden kann. Die Durchführung der Experimente erfolgte gemäß dem in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Protokoll.

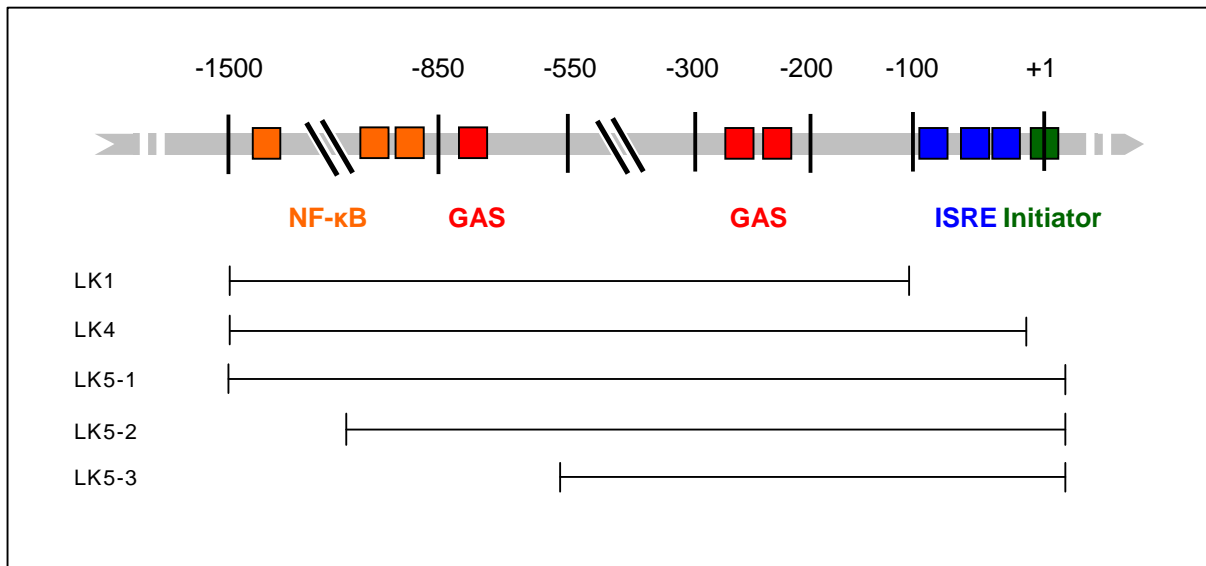
### 4.4.1 Herstellung der Deletionskonstrukte

Proximale Promotorfragmente mit einer Länge von 598 bis 1549 bp wurden mit der PCR-Technik aus vorhandenen Plasmiden amplifiziert und über die Sma1-Schnittstelle in den pGL3-Basic-Vektor einkloniert. Als reverse Primer für die Konstrukte LK5-1, LK5-2 und LK5-3 wurde *MGR4* eingesetzt, da mit diesem noch die Initiator-Sequenz amplifiziert wird. Bei LK4 fehlt diese Sequenz, so dass deren Einfluss auf die Transkription überprüft werden konnte. LK1 unterscheidet sich von LK4 und LK5-1 dadurch, dass in diesem Konstrukt der gesamte ISRE-Bereich deletiert wurde. Einen Überblick über die Herstellung der einzelnen Konstrukte liefern Tab. 4.4-1 und Abb. 4.4-1.

Konstrukt	Primer		Länge des Fragments (bp)
LK1	MGF1 (-1522)	MGR1 (-84)	1439
LK4	MGF1 (-1522)	MGR2 (-6)	1517
LK5-1	MGF1 (-1522)	MGR4 (+26)	1549
LK5-2	MGF2 (-1184)	MGR4 (+26)	1211
LK5-3	MGF4 (-571)	MGR4 (+26)	598

**Tab. 4.4-1 Eingesetzte Primer für die Deletionskonstrukte**

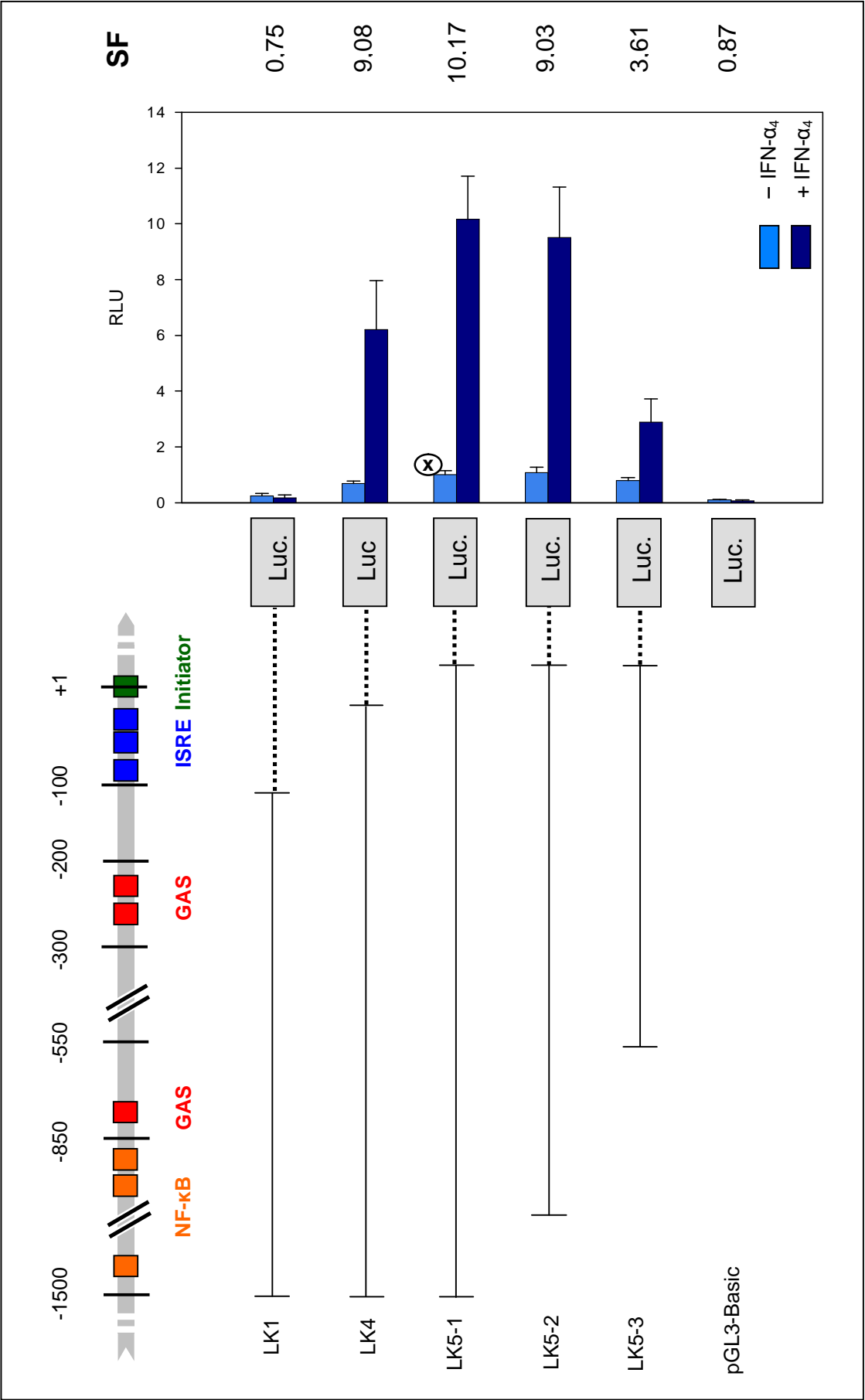
In der linken Spalte ist der Name der einzelnen Konstrukte aufgeführt, in der mittleren die Bezeichnung der eingesetzten Primer und in der rechten die Länge der proximalen Promotorfragmente. Die relative Position der Primer zum Transkriptionsstart ist in Klammer angegeben (mittlere Spalte).



**Abb. 4.4-1 Schematische Darstellung der untersuchten IFRG28-Promotorfragmente**  
Initiator (grün); ISRE (blau); GAS (rot); Bindungsstellen für NF-κB (orange). Proximale Promotorabschnitte der einzelnen Konstrukte sind durch Balken wiedergegeben.

#### 4.4.2 Analyse der Deletionskonstrukte

Mit Hilfe dieser Konstrukte sollte es möglich sein, die Induzierbarkeit des IFRG28-Promotors durch IFN zu untersuchen, die funktionelle Länge des Promotors zu bestimmen und cis-regulatorische Elemente im Promotor zu identifizieren. Um potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren des IFN-Signaltransduktionsweges im pGL3-Basic-Vektor auszuschließen, wurde der Leervektor in dieser Versuchsreihe mitgetestet. Die Resultate sind in Abbildung 4.4-2 in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Die gemessenen relativen Luciferase Einheiten (RLU) beziehen sich auf LK5-1, dessen Basalaktivität willkürlich auf den Wert 1,0 gesetzt wurde. Unter der Basalaktivität versteht man die Luciferase-Aktivität in der unbehandelten Probe (Kontrolle). Das Verhältnis aus induzierter Probe zu nicht-induzierter Kontrolle ist in Form des Stimulationsfaktors (SF) ausgedrückt, der angibt, um welchen Faktor sich die Aktivität der Luciferase nach IFN-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gesteigert bzw. verringert hat.



**Abb. 4.4-2 Reportengenanalyse der Deletionskonstrukte**

LMTK-Zellen wurden in 6-Lochplatten mit 7 µg Reporterengenkonstrukt und 1 µg β-Galaktosidase-Kontrollvektor transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden 3 der 6 Löcher mit 250 IU IFN-α<sub>4</sub> induziert, die anderen blieben unbehandelt. Nach weiteren 16 h wurden Zellextrakte hergestellt und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Unterschiede in der Transfektionseffizienz wurden durch die gemessenen Werte für die β-Galaktosidase-Aktivität abgeglichen. Die errechneten Aktivitätswerte beziehen sich auf LK5-1, dessen Basalaktivität auf den Wert 1 gesetzt wurde (x). Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von insgesamt drei unabhängigen Messungen, die Balken geben die Standardabweichung wieder. Der spezifische Stimulationsfaktor (SF) ist für jedes Konstrukt angegeben.

Für die Konstrukte LK5-1 und LK5-2 konnte eine deutliche Induktion der Luciferase-Expression in IFN-behandelten Zellen nachgewiesen werden. Dabei ergaben sich für den um 399 bp kürzeren LK5-2 keine nennenswerten Unterschiede bezüglich Stimulationsfaktor und Basalaktivität. Erst eine Deletion von weiteren 614 bp führte zu einer eindeutig verringerten Promotoraktivität. Dies drückt sich zum einen in einer Reduktion des Stimulationsfaktors (von ~ 9 auf 3,6) und zum anderen in einer etwas verminderten Basalaktivität des LK5-3 aus. Der Vergleich mit Abbildung 4.4-2 zeigt, dass im fehlenden Promotorbereich ein GAS-Element sowie zwei NF-κB-sites liegen. Vermutlich können diese Motive die Expression des Gens positiv beeinflussen.

Die fehlende Initiator-Sequenz äußerte sich bei LK4 in einer proportional abgeschwächten Luciferase-Aktivität. Dennoch ist der Stimulationsfaktor mit dem des LK5-1 vergleichbar, da die Basalaktivität bei LK4 ebenfalls verringert ist. Demnach wird die Initiation der Transkription durch das Fehlen dieser Sequenz negativ beeinflusst.

Das Konstrukt LK1, das kein ISRE-Motiv beinhaltet, reagierte nicht auf IFN-α<sub>4</sub>, vielmehr wurde nach IFN-Behandlung eine verringerte Luciferase-Expression im Vergleich zum Basalwert festgestellt. Daraus kann gefolgert werden, dass der durch IFN-α induzierbare Promotorbereich in der fehlenden Sequenz liegen muss.

Für den Leervektor waren die Werte vergleichbar niedrig. Somit konnte, ähnlich wie für den LK1, keine Induktion der Luciferase durch IFN festgestellt werden.

## 4.5 Mutationsanalyse der IFN-spezifischen Kontrollelemente

Die vorangegangenen Versuche haben klar gezeigt, dass die Induzierbarkeit der untersuchten Promotorregion durch die ISRE vermittelt wird. Um den individuellen Einfluss jedes der drei Motive (vgl. Tab 4.3-1) auf die Transkription überprüfen zu können, wurden Punktmutationen in die einzelnen Elemente eingeführt. Dazu wurde das QuickChange-Site-Directed-Mutagenesis-Kit der Fa. Stratagene verwendet (vgl. Kapitel 3.1.13 zur Generierung von Plasmiden mit Punktmutationen). Gemäß den Empfehlungen der Fa. Santa Cruz wurden pro Modul zwei Basen ausgetauscht, die in der Konsensussequenz konserviert sind.

### 4.5.1 Herstellung der mutierten Promotorfragmente

Als Ausgangsplasmid für die Mutationsreihe wurde LK5-1 ausgewählt. Die Entscheidung für dieses Konstrukt fiel aus der Überlegung heraus, dass LK5-1 den größten Promotorbereich abdeckt und daher den physiologischen Verhältnissen am nächsten kommt. Zur Einführung der Punktmutationen wurden die Primer-Pärchen *M1-F/R*, *M2-F/R* und *M3-F/R* nach den Anweisungen des QuickChange-Site-Directed-Mutagenesis-Kit (Fa. Stratagene) angefertigt und in einer PCR zur Synthese der mutierten Konstrukte eingesetzt. Anschließend wurden die Konstrukte durch Sequenzanalyse auf ihre Richtigkeit überprüft. In Abbildung 4.5-1 sind die mutierten ISRE-Motive im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz (wt) des LK5-1 dargestellt.

Position	-84			
LK5-1/wt	---	TGGAAACCGAAACT	TAAAGACAGACCGGGAAATGGAAACTGAAAGAACCGGGAAACTGAAACTGT---	
		I SRE-Modul -1	I SRE-Modul -2	I SRE-Modul -3
Reporter-Konstrukte mit ISRE-Mutanten:				
IM 1:	---	TGGAAACCAACT	-----GGGAAATGGAAACTGAAA-----	GGGAAACTGAAACT-----
IM 2:	---	TGGAAACCGAAACT	-----GGGAAATGGACCTGAAA-----	GGGAAACTGAAACT-----
IM 3:	---	TGGAAACCGAAACT	-----GGGAAATGGAAACTGAAA-----	GGCACCTGAAACT-----
IM 1-2:	---	TGGAAACCAACT	-----GGGAAATGGACCTGAAA-----	GGGAAACTGAAACT-----
IM 1-3:	---	TGGAAACCAACT	-----GGGAAATGGAAACTGAAA-----	GGCACCTGAAACT-----
IM 2-3:	---	TGGAAACCGAAACT	-----GGGAAATGGACCTGAAA-----	GGCACCTGAAACT-----
IM 1-2-3:	---	TGGAAACCAACT	-----GGGAAATGGACCTGAAA-----	GGCACCTGAAACT-----

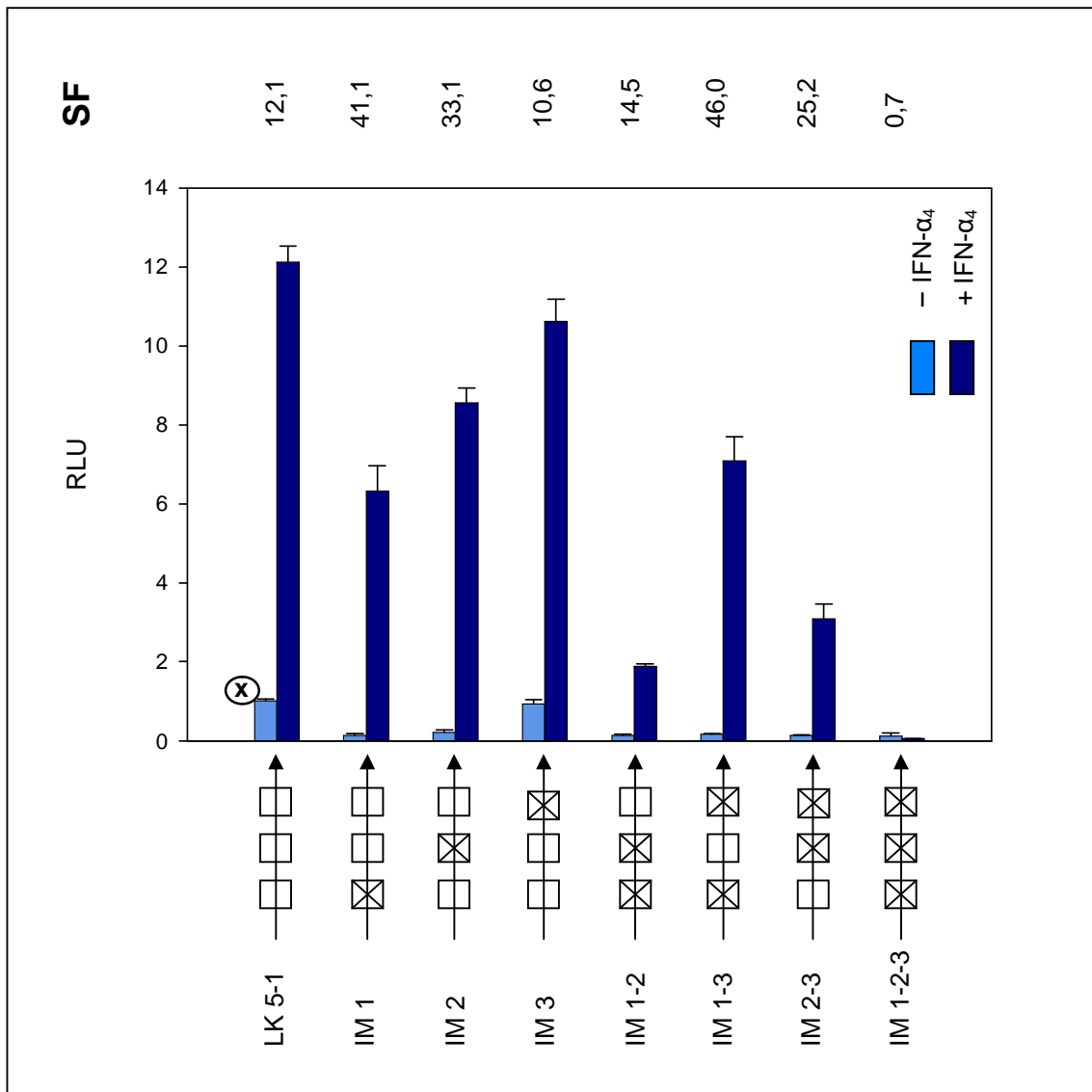
**Abb. 4.5-1 ISRE-Sequenzen der untersuchten Konstrukte**

Blaue Nukleotide symbolisieren die Übereinstimmung mit der Konsensussequenz, mutierte Basen sind rot gekennzeichnet. Details siehe Text.



#### 4.5.2 Analyse der mutierten Promotorfragmente

Die Transfektion der Zellen und die Messung der Reporterogenaktivität erfolgte wie bei den Deletionskonstrukten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5-2 in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Die einzelnen ISRE-Module werden durch drei Quadrate darunter angedeutet, wobei darin befindliche Kreuze inaktivierte Motive symbolisieren. Auch hier bezieht sich die RLU auf die Basalaktivität des LK5-1.



**Abb. 4.5-2 Mutationsanalyse der IFN-spezifischen Kontrollelemente**

LMTK-Zellen wurden in 6-Lochplatten mit 7  $\mu$ g Reportergenkonstrukt und 1  $\mu$ g  $\beta$ -Galaktosidase-Kontrollvektor transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden 3 der 6 Löcher mit 250 IU IFN- $\alpha_4$  induziert, die anderen blieben unbehandelt. Nach weiteren 16 h wurden Zellextrakte hergestellt und die Luciferase-Aktivität gemessen. Unterschiede in der Transfektionseffizienz wurden durch die gemessenen Werte für die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität abgeglichen. Die errechneten Aktivitätswerte beziehen sich auf LK5-1, dessen Basalaktivität auf den Wert 1 gesetzt wurde (x). Jedes Konstrukt wurde in mindestens vier unabhängigen Experimenten analysiert. Standardabweichungen werden durch Fehlerbalken wiedergegeben. Die einzelnen ISRE-Module werden durch drei Quadrate angedeutet, wobei darin befindliche Kreuze inaktivierte Motive symbolisieren. Der spezifische Stimulationsfaktor (SF) ist für jedes Konstrukt angegeben.

Für das Konstrukt IM 1-2-3, in dem alle ISRE-Motive mutiert sind, konnte keine gesteigerte Luciferase-Expression in IFN-behandelten Zellen nachgewiesen werden. Somit wurde der durch IFN- $\alpha$  induzierbare Promotorbereich durch die gesetzten Punktmutationen zweifelsfrei ausgeschaltet. Sogar die Basalaktivität ist im Vergleich zu LK5-1 drastisch reduziert.

Die Inaktivierung von 2 der 3 Module verdeutlichte, dass jedes ISRE funktionell ist, wenngleich die Aktivität des Reportergens in der induzierten Probe im Vergleich zum Wildtyp-Promotor vermindert ist. Aus dem Diagramm ist weiter ersichtlich, dass sich die Basalaktivitäten dieser Gruppe von Konstrukten auf etwa demselben Niveau bewegen und sich Unterschiede daher aus den RLU-Maximalwerten ergeben. IM 1-3 besitzt mit einem Stimulationsfaktor von 46,0 offenbar die stärkste Promotoraktivität. Ein Grund hierfür könnte im Aufbau des intakten ISRE-Modul-2 liegen, denn bei genauerer Betrachtung stellt man fest, dass es sich hierbei um ein aus 3 Basiseinheiten (GAAANN) aufgebautes ISRE-Motiv handelt. Eine Mittelstellung nimmt IM 2-3 ein. Zwar besitzt dieses Konstrukt noch einen hohen Stimulationsindex von ~25, doch der RLU-Maximalwert ist im Vergleich zu IM 1-3 schon merklich reduziert. Über das schwächste intakte Kontrollelement, ISRE-Modul-3, verfügt IM 1-2. Hier ist der RLU-Maximalwert und damit auch der Stimulationsfaktor noch geringer.

In der Gruppe von Konstrukten mit nur einem inaktivierten ISRE-Motiv muss der Abstand der intakten Module voneinander bei der Betrachtung der Ergebnisse mit berücksichtigt werden. Das Aktivitätsprofil des IM 3 stimmt im wesentlichen mit dem des wt-Promotors LK5-1 überein, da sowohl Basalaktivität als auch Stimulationsfaktor ähnlich hohe Werte erzielen. Dies spricht auch für die relative „Schwäche“ des 3. Moduls. Der Abstand beider Motive beträgt in diesem Fall 12 Nukleotide, was ungefähr einer DNA-Windung entspricht. IM 2 weist demgegenüber einen deutlich höheren Stimulationsindex auf, obwohl sich der RLU-Maximalwert reduziert hat. Ursache dafür ist eine verminderte Expression des Reportergens in der unbehandelten Kontrolle. Auch hier ist der Abstand der intakten ISRE-Motive 1 und 3 größer als 10 Nukleotide (35 bp). Im letzten zu analysierenden Konstrukt IM 1 liegen die Elemente 2 und 3 jedoch nur 3 bp voneinander entfernt. Der Theorie nach könnten sich die beiden Initiationskomplexe beim Aufbau gegenseitig stören. Zieht man die Promotorprofile der ersten Gruppe mit zwei inaktivierten Modulen in die Betrachtung mit ein, erkennt man, dass das Aktivitätsprofil des IM 1 sehr ähnlich dem

des IM 1-3 ist. Somit hat die Anwesenheit des intakten 3. Moduls keinen Einfluss auf die Promotoraktivität. Der Maximalwert des IM 1 ist sogar etwas geringer als der des IM 1-3. Es scheint so, als ob die beiden Module 2 und 3 um Transkriptionsfaktoren konkurrieren würden. Offensichtlich wird das Profil des IM 1 sehr stark vom ISRE-Modul-2 geprägt, vor allem auf Grund dessen stärkeren Promotoraktivität. Unterstützt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass im 5'-RACE Nukleotide des ISRE-Modul-3 nachgewiesen werden konnten. Demnach beginnt die Transkription des Gens u.U. schon innerhalb dieser Region, so dass dieses Motiv für die Gen-Induktion des IFRG28 entbehrlich zu sein scheint.

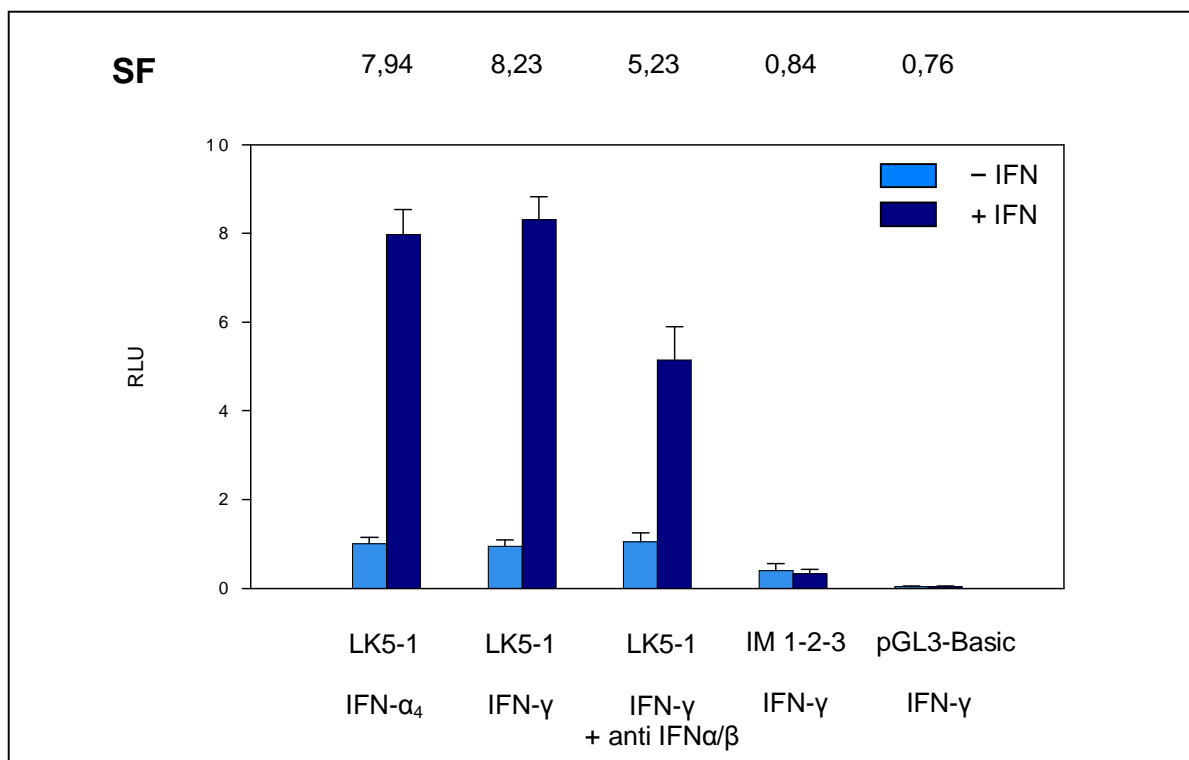
Durch die Mutationsanalyse konnte noch einmal gezeigt werden, dass in den proximalen ISRE-Modulen die Induzierbarkeit durch Typ-I-IFN begründet liegt. Jedes der 3 Module hat seine Funktionsfähigkeit bewiesen, wenngleich individuelle Unterschiede in der Promotoraktivität festgestellt wurden. Was den Stimulationsfaktor angeht, war das Modul-2 allen anderen Motiven überlegen.

Als treibende Kraft für die IFN-Induzierbarkeit des LK5-1 konnte die Kombination aus Modul 1 und 2 bestimmt werden. Denn die Inaktivierung von Modul-3 hatte keinen entscheidenden Einfluss, weder auf die Basalaktivität noch auf den Stimulationsfaktor. Somit spielt das zu letzt genannte Modul eine untergeordnete Rolle im Prozess der Gen-Induktion.

## 4.6 Weiterführende Promotoruntersuchungen

### 4.6.1 Untersuchung auf eine Induzierbarkeit des IFRG28-Promotors durch IFN- $\gamma$

Zum Nachweis einer Induktion durch IFN- $\gamma$  wurde das Konstrukt LK5-1 eingesetzt. Die Experimente wurden sowohl in An- als auch in Abwesenheit neutralisierender Antikörper gegen IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  durchgeführt. Damit sollte der Effekt einer möglichen induzierten Expression von IFN- $\beta$  bzw. IFN- $\alpha$  durch IFN- $\gamma$  überprüft und eine Falschaussage vermieden werden. Der komplett mutierte Promotorbereich des IM 1-2-3 erwies sich ebenfalls als sehr nützlich, denn durch die Inaktivität aller ISRE-Motive ist eine Induktion durch IFN- $\alpha$  in diesem Konstrukt ausgeschlossen. Während der Leervektor pGL3-Basic in dieser Versuchsreihe als Negativkontrolle fungierte, wurde als Positivkontrolle LK5-1 mit IFN- $\alpha$  induziert (vgl. Abb. 4.6-1).



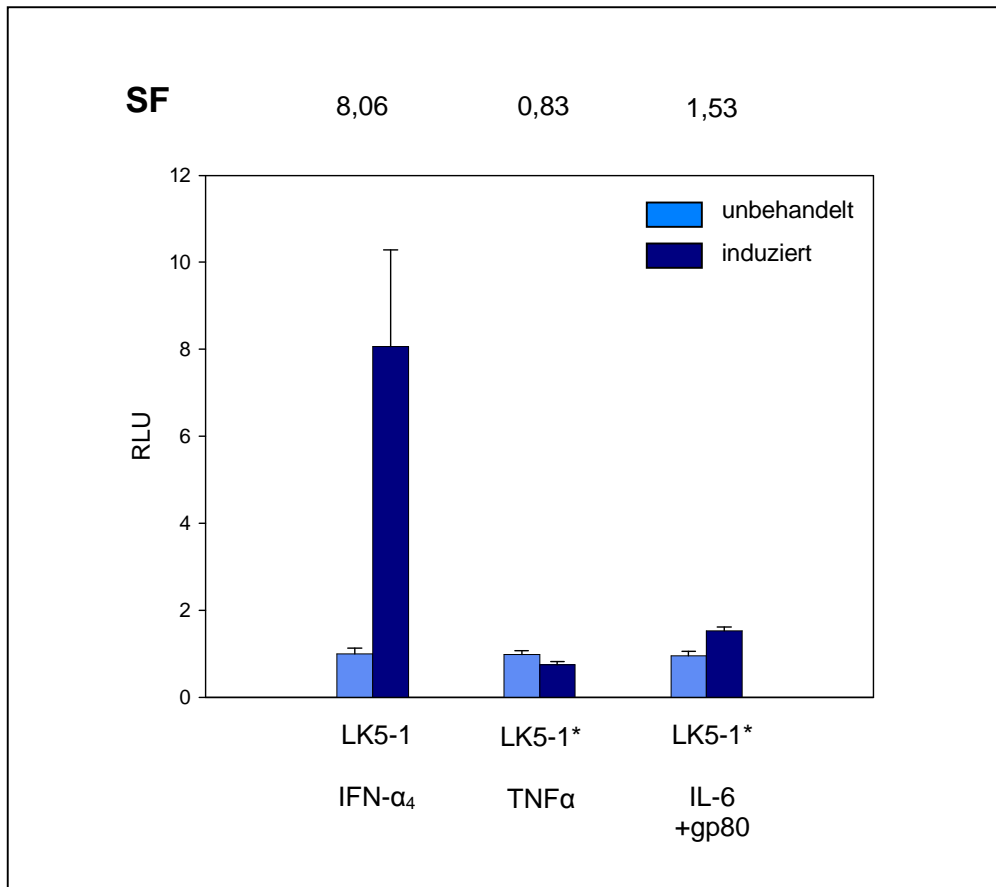
**Abb. 4.6-1 Reporteranalyse nach Induktion mit IFN- $\gamma$**

Luciferase-Reporter-Gen-Assays wurden mit LMTK-Zellextrakten durchgeführt, die in 6-Lochplatten transfiziert worden waren. 24 h nach der Transfektion wurden 3 der 6 Löcher mit 250 IU IFN- $\gamma$  induziert, die anderen blieben unbehandelt. Zur Unterdrückung einer indirekten Induktion durch Typ-I-IFN, wurden den Medien ggf. gleichzeitig mit IFN- $\gamma$  neutralisierende Antikörper gegen IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  zugesetzt. Nach weiteren 16 h wurden Zellextrakte hergestellt und die Luciferase-Aktivität gemessen. Unterschiede in der Transfektionseffizienz wurden durch die gemessenen Werte für die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität abgeglichen. Die errechneten Aktivitätswerte beziehen sich auf LK5-1, dessen Basalaktivität auf den Wert 1 gesetzt wurde. Jede Säule repräsentiert den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten. Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben.

Für LK5-1 konnte in IFN- $\alpha$  und in IFN- $\gamma$  behandelten Zellen ein nahezu identisches Promotorprofil nachgewiesen werden. Dieses Profil änderte sich allerdings in Gegenwart von neutralisierenden Antikörpern. Unter diesen Versuchsbedingungen sank der Stimulationsfaktor in der IFN- $\gamma$  induzierten Probe von 8,23 auf ~5. Noch deutlicher fielen die Unterschiede mit dem Konstrukt IM 1-2-3 aus. Hier sank die Luciferase-Aktivität der Probe sogar unter den Basalwert der Kontrolle. Die Ergebnisse legen nahe, dass der klonierte Promotorbereich keine Bindungsstellen für STAT1-Homodimere besitzt. Eine Aktivierung durch IFN- $\gamma$  erfolgt höchstwahrscheinlich nicht direkt, sondern über den Umweg einer IRF1-Induktion. Dafür spricht der geringere Stimulationsfaktor des Konstrukts LK5-1 durch IFN- $\gamma$  in Gegenwart von neutralisierenden Antikörpern. An dieser Stelle sei auch auf das Western-Blot-Experiment in MEF der IFNAR<sup>-/-</sup>-Linie verwiesen (vgl. Kapitel 4.10.1), in welchem die Expression des IFRG28-Proteins durch IFN- $\gamma$  untersucht wurde.

#### **4.6.2 Untersuchung auf eine Induzierbarkeit des IFRG28-Promotors durch IL-6 und TNF- $\alpha$**

Um Aussagen über eine Induzierbarkeit des IFRG28-Promotors durch IL-6 bzw. TNF- $\alpha$  machen zu können, wurden LMTK<sup>-</sup>-Zellen mit dem Konstrukt LK5-1 transfiziert und mit IL-6 (200 IU) bzw. TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) stimuliert. Da sowohl TNF- $\alpha$  als auch IL-6 eine Expression von IFN- $\alpha$  bzw. IFN- $\beta$  bewirken können, wurden die Experimente wieder in Gegenwart von neutralisierenden Antikörpern gegen IFN- $\beta$  und IFN- $\alpha$  durchgeführt (vgl. Abb. 4.6-2). Dadurch wird eine indirekte Stimulation des Promotors über Typ-I-IFN unterdrückt. Parallel wurde die Funktionsfähigkeit des Konstrukts durch eine Induktion mit IFN- $\alpha$  bestätigt.



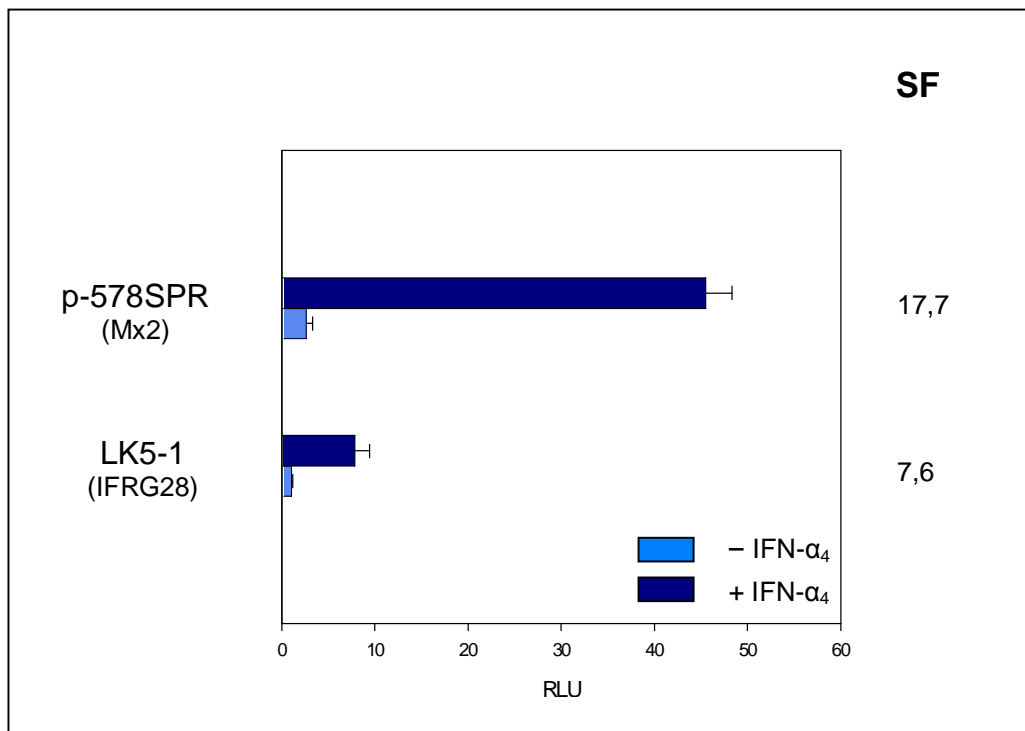
**Abb. 4.6-2 Untersuchung auf eine Induktion durch TNF- $\alpha$  bzw. IL-6**

LMTK-Zellen wurden in 6-Lochplatten mit 7  $\mu$ g Reporter-genkonstrukt und 1  $\mu$ g  $\beta$ -Galaktosidase-Kontrollvektor transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden 3 der 6 Löcher induziert (250 IU IFN- $\alpha$ ; 200 IU IL-6 oder 10 ng/ml TNF- $\alpha$ ), die anderen blieben unbehandelt. Um die Affinität des IL-6 zu seinem Rezeptor zu erhöhen, wurde gp80 zugesetzt (1  $\mu$ g/ml). Nach weiteren 16 h wurden Zellextrakte hergestellt und die Luciferase-Aktivität gemessen. Unterschiede in der Transfektionseffizienz wurden durch die gemessenen Werte für die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten abgeglichen. Die errechneten Aktivitätswerte beziehen sich auf LK5-1, dessen Basalaktivität auf den Wert 1 gesetzt wurde. Jedes Konstrukt wurde in drei unabhängigen Experimenten analysiert. Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben; \* in Gegenwart von neutralisierenden Antikörpern gegen IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ .

Im Proteinextrakt von TNF- $\alpha$  behandelten Zellen trat eine Reduktion der Luciferase-Signale im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf. Ein Stimulationsfaktor von 0.83 lässt darauf schließen, dass sich das Konstrukt LK5-1 nicht durch TNF- $\alpha$  stimulieren lässt. Dem gegenüber konnte in IL-6 induzierten Zellen ein leichter Anstieg der Luciferase-Aktivität verzeichnet werden. Allerdings ist der Effekt nicht so überzeugend wie der von IFN- $\alpha$ . Vermutlich kann die Expression des Gens durch IL-6 moduliert werden; Hauptinduktor bleibt den Ergebnissen zu Folge Typ-I-IFN.

### 4.6.3 Vergleichende Promotoruntersuchung (IFRG28 vs. Mx2)

Um einen Eindruck über die Promotorstärke des LK5-1 zu erhalten, wurde eine vergleichende Promotoruntersuchung mit p-578SPR durchgeführt (vgl. Abb. 4.6-3). Dieses Konstrukt, freundlicherweise von Dr. Atsushi Asano aus Hokkaido, Japan, zur Verfügung gestellt [Asano et al., 2003], enthält die Promotorregion des Mx2-Gens der Maus im pGL3-Basic-Vektor, wobei die Expression der Luciferase ebenfalls durch 3 putative ISRE-Module kontrolliert wird. Auch in diesem Experiment bezieht sich die RLU auf die Basalaktivität des LK5-1.



**Abb. 4.6-3 IFRG28 vs. Mx2**

LMTK-Zellen wurden in 6-Lochplatten mit 7  $\mu\text{g}$  Reporter-genkonstrukt und 1  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Galaktosidase-Kontrollvektor transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden 3 der 6 Löcher mit 250 IU IFN- $\alpha_4$  induziert, die anderen blieben unbehandelt. Nach weiteren 16 h wurden Zellextrakte hergestellt und die Luciferase-Aktivität gemessen. Unterschiede in der Transfektionseffizienz wurden durch die gemessenen Werte für die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten abgeglichen. Die errechneten Aktivitätswerte beziehen sich auf LK5-1, dessen Basalaktivität auf den Wert 1 gesetzt wurde. Jedes Konstrukt wurde in drei unabhängigen Experimenten analysiert. Standardabweichungen werden durch Fehlerbalken wiedergegeben. Der spezifische Stimulationsfaktor (SF) ist für jedes Konstrukt angegeben.

Auffallend ist das deutlich höhere Luciferase-Signal des p-578SPR in induzierten Zellen; mit 45,5 ist der RLU-Maximalwert fast 6mal größer als der des LK5-1. Die Werte von LK5-1 bewegen sich mit einer RLU von ~10 dabei im üblichen Rahmen. Aufgrund des höheren Basalwertes bei Mx2 ergibt sich aber nur ein Stimulationsfaktor von 17,7 gegenüber 7,6 mit LK5-1.

## 4.7 Darstellung und Expression von IFRG28-Fusionsproteinen

Da für die biochemische Untersuchung des IFRG28-Proteins keine Antikörper zur Verfügung standen, wurde das Protein in Bakterien rekombinant exprimiert und zu Immunisierungszwecken aufgereinigt. Als Fusionsteil wurde die Glutathion-S-Transferase bzw. ein His-Tag gewählt. Ziel der Versuche war es, das Protein in möglichst reiner Form zu isolieren, um damit polyklonale und monoklonale Antikörper herstellen zu können.

### 4.7.1 Klonierung des pGEX-Nco-IFRG28-GST

Die Expression der kompletten Aminosäuresequenz des IFRG28-Proteins scheiterte auf Grund einer zu geringen Ausbeute. Eine Analyse mit dem Programm TmHMM aus Husar (Human-Sequence-Analysis-Resource) ergab, dass sich am C-Terminus mit hoher Wahrscheinlichkeit eine hydrophobe Transmembranregion befindet, des weiteren konnte eine Prolin-reiche Sequenz mit dem Programm DomainSweep detektiert werden (vgl. Abb. 4.7-1).

1	MLFPDDFSTW	EQTFQELMQE	EKPGAKWSLH	LDKNI VPDGA	ALGWROHQQT
51	VLGRFOCSRC	CRSWTSAQVM	I LCHMYPDTL	KSQGOARMRI	FGQKCKQKCFG
101	CQFETPKFST	EI I KRI LNNL	VNYI LQRYYG	HRKI ALTSNA	SLGEKVTLDG
151	PHDTRNCEAC	SLNSHGRCAL	AHKVK	PPRSP	SPLPKSSSPS
201	NTDFGNKTFQ	DFGNRTFQGC	REPPQREI	EP	PLFLFLSIAA
					FALFSLFT

**Abb. 4.7-1 Ergebnis der Analse auf Proteindomänen im IFRG28-Protein**

Prolin-reiche Sequenz (blau); putative Transmembranregion (rot).

Durch Deletion dieses Bereiches konnte eine Verbesserung erzielt werden. Jedoch war die Ausbeute des gewonnen Proteins unter Verwendung des kommerziellen pGEX-2T-Vektors nicht zufriedenstellend. Ein hoher Anteil des aufgereinigten Proteins bestand aus dem GST-Fusionsteil, während das vollständige Fusionsprotein schwächer exprimiert wurde. Daher wurde zur Expression in BL21 ein modifizierter pGEX-2T-Vektor konstruiert, mit dem es möglich war, das Protein C-terminal mit der Glutathion-S-Transferase zu fusionieren. Dazu wurde das Start-Kodon des pGEX-2T-Vektors unter Verwendung der Primer *pGEX-Mut-F* und *pGEX-Mut-R* in eine Nco1- Schnittstelle verwandelt (vgl. Kapitel 3.1.13 zur Generierung von Plasmiden mit Punktmutationen).



Damit gleichzeitig die Möglichkeit bestand, das Protein über einen Imidazolgradienten aufzureinigen zu können, wurden entsprechende Primer mit der Nukleotid-Sequenz für 6 Histidin-Reste synthetisiert. Bei der Konstruktion der Primer *K3-Nco-His-F* und *K3-Nco-His-GST* wurde darauf geachtet, dass das Histidinpeptid von hydrophilen bzw. strukturbrechenden Aminosäuren eingebettet wird. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass der His-Tag an der Oberfläche der Proteins als Voraussetzung für eine spätere Chelat-Bindung zu liegen kommt. Mit dem Programm PeptideStructure aus Husar wurde die Sequenz dahingehend überprüft. Die Integration der kodierenden Sequenz für diesen His-Tag erfolgte sowohl am 5´- als auch am 3´-Ende der IFRG28-cDNA. Das Fusionsprotein hatte demnach folgenden Aufbau:

1	<u>MGRKHHHHHH</u>	<u>PDDFSTWEQT</u>	<u>FOELMQEEKP</u>	<u>GAKWSLHLDK</u>	<u>NI VPDGAALG</u>
51	<u>WROHQOTVLG</u>	<u>RFQCSRCCRS</u>	<u>W TSAQVMI LC</u>	<u>HMYPDTLKSO</u>	<u>GOARMRI FGO</u>
101	<u>KCQKCFGCQF</u>	<u>ETPKFSTEI I</u>	<u>KRI LNNLVNY</u>	<u>I LQRYYGHRK</u>	<u>I ALTSNASLG</u>
151	<u>EKVTLDGPHD</u>	<u>TRNCEACSLN</u>	<u>SHGRCALAHK</u>	<u>VKPPRSPSPL</u>	<u>PKSSSPSKSC</u>
201	<u>PPPPQTRNTD</u>	<u>FGNKTFQDFG</u>	<u>NRTFOGCREP</u>	<u>PQRKHHHHHH</u>	<u>KPTMSP I LGY</u>
251	<u>WKI KGLVQPT</u>	<u>RL LLEYLEEK</u>	<u>YEEHLYERDE</u>	<u>GDKWRNKKFE</u>	<u>LGLEFPNLPY</u>
301	<u>YI DGDVKL TQ</u>	<u>SMAI I RYI AD</u>	<u>KHNMLGGCPK</u>	<u>ERAEI SMLEG</u>	<u>AVLDI RYGVS</u>
351	<u>RI AYSKDFET</u>	<u>LKVDFLSKLP</u>	<u>EMLKMFEDRL</u>	<u>CHKTYLNGDH</u>	<u>VTHPDFMLYD</u>
401	<u>ALDVVLYMDP</u>	<u>MCLDAFPKLV</u>	<u>CFKKRI EAI P</u>	<u>QI DKYLKSSK</u>	<u>YI AWPLOGWQ</u>
451	<u>ATFGGGDHPP</u>	<u>KSDLVPRGSP</u>	<u>GI HRD</u>		

**Abb. 4.7-2 Aminosäuresequenz des IFRG28-GST-12H**

Proteinsequenz des IFRG28 (einfach unterstrichen); modifizierte His-Tags (dick unterstrichen); Histidine (rot); hydrophile Aminosäuren (blau); strukturbrechende Aminosäuren (grün).

#### 4.7.2 Klonierung des pGEX-Nco-IFRG28-12H

Um das spätere Screening von monoklonalen Antikörper zu vereinfachen, wurde ein reines Histidin-Fusionsprotein exprimiert (vgl. Kapitel 3.3.6 zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern). Mit dem Primer-Pärchen *K3-Nco-His-F* / *K3-Nco-His-RS* wurde die cDNA aus vorhandenen Plasmiden amplifiziert, mit Nco1 verdaut und über die Nco1-Schnittstelle in den pGEX-Nco-Vektor inkloniert. Die exprimierte Aminosäuresequenz ist in Abbildung 4.7-3 dargestellt.

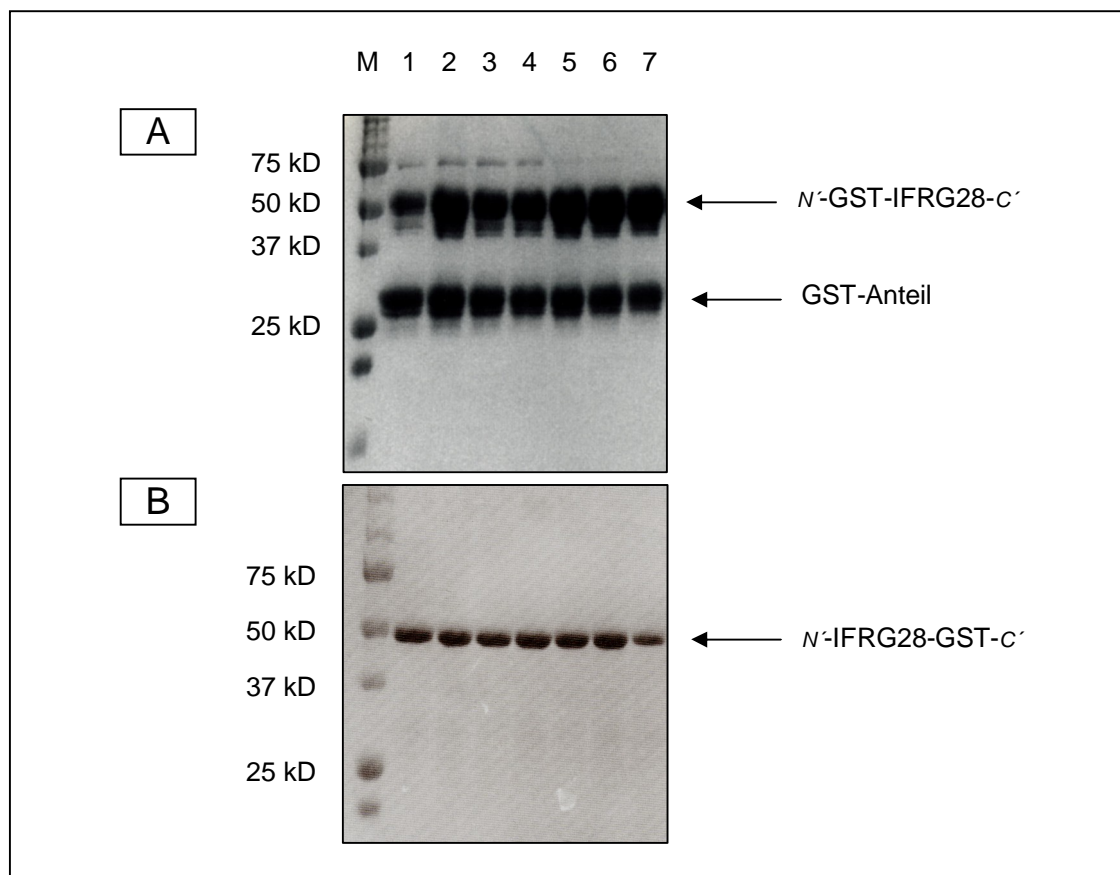
1	<u>MGRK</u> <b>HHHHHH</b>	<u>PDDFSTWEQT</u>	<u>FOELMQEEKP</u>	<u>GAKWSLHLDK</u>	<u>NI VPDGAALG</u>
51	<u>WRQHQOTVLG</u>	<u>RFQCSRCCRS</u>	<u>WTSAQVMI LC</u>	<u>HMYPDTLKSQ</u>	<u>GOARMRI FGO</u>
101	<u>KCQKCFGCQF</u>	<u>ETPKFSTEI I</u>	<u>KRI LNNLVNY</u>	<u>I LQRYYGHRK</u>	<u>I ALTSNASLG</u>
151	<u>EKVTLDGPHD</u>	<u>TRNCEACSLN</u>	<u>SHGRCALAHK</u>	<u>VKPPRSPSPL</u>	<u>PKSSSPSKSC</u>
201	<u>PPPPQTRNTD</u>	<u>FGNKTFQDFG</u>	<u>NRTFQGCREP</u>	<u>PQRK</u> <b>HHHHHH</b>	

**Abb. 4.7-3 Aminosäuresequenz des IFRG28-12H**

Proteinsequenz des IFRG28 (einfach unterstrichen); modifizierte His-Tags (dick unterstrichen); Histidine (rot); hydrophile Aminosäuren (blau); strukturbrechende Aminosäuren (grün).

### 4.7.3 Expression der Fusionsproteine

Die Durchführung der Experimente erfolgte gemäß dem in 3.2.1 beschriebenen Protokoll. In Abbildung 4.7-4 ist zum Vergleich auch eine Aufreinigung mit dem Ausgangsvektor dargestellt (A). Auffallend sind hier die zusätzlichen prominenten Banden bei 26 kD, die den abgespaltenen GST-Fusionsteil repräsentieren. Dies ist zugleich ein Hinweis darauf, dass das Fusionsprotein proteolytisch gespalten wird, wenn sich der GST-Anteil am N-Terminus befindet. In der Aufreinigung mit dem verbesserten pGEX-Nco-Vektor (B) erscheint im Coomassie-Gel fast ausschließlich die gewünschte Hauptbande bei ~50 kD.



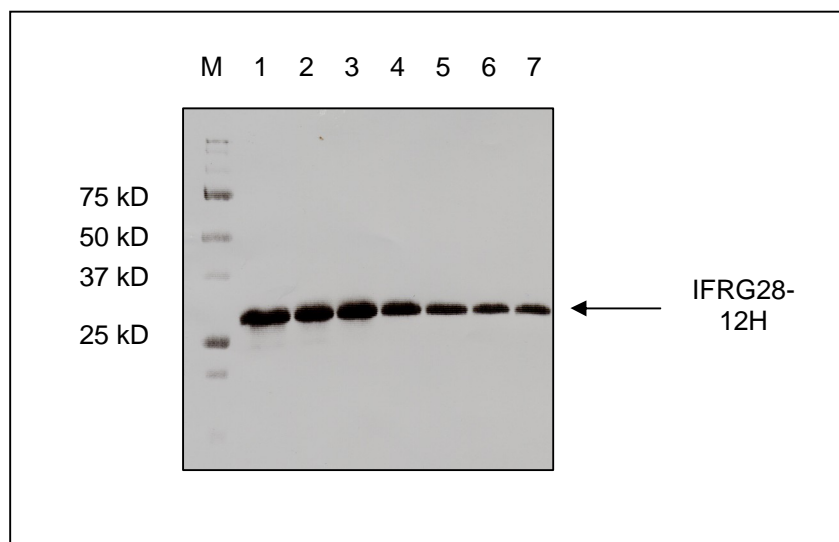
**Abb. 4.7-4 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine**

Zur Proteinsynthese wurde 1 L LB-Medium mit 200 ml einer exponentiell-wachsenden Bakterienkultur angeimpft ( $OD_{600} = 0,35$ ). Nach ungefähr 2 h bei 25°C wurde die Bakteriensuspension ( $OD_{600} = 0,45$ ) mit IPTG (Endkonzentration 1mM) induziert. Nach weiteren 6 h erfolgte der Aufschluss des sedimentierten Zellpellets (French-Press) und die Aufreinigung des Fusionsproteins über eine Glutathion-Sepharose-Säule. M = Molekulargewichtsmarker; 1 bis 7 bezeichnen die einzelnen Fraktionen einer Aufreinigung, von denen jeweils 12,5 µl Eluat in einem 12% SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Anschließend erfolgte die Färbung mit Coomassie.

A) Ausgangsvektor pGEX-2T mit hohem GST-Anteil bei ~ 26 kD.

B) Verbesserter pGEX-Nco-Vektor mit einer Hauptbande bei ~ 50 kD.

Ein ähnlich gutes Ergebnis wurde bei der Imidazol-Aufreinigung des kürzeren IFRG28-12H-Fusionsproteins erzielt (vgl. Abb. 4.7-5). Auch hier konnten nahezu keine Degradationsprodukte bzw. Kontaminationen festgestellt werden.

**Abb. 4.7-5 Aufreinigung des IFRG28-12H**

Zur Proteinsynthese wurde 1 L LB-Medium mit 200 ml einer exponentiell-wachsenden Bakterienkultur angeimpft. Nach ungefähr 2 h bei 25°C wurde die Bakteriensuspension mit IPTG induziert und nach weiteren 6 h geerntet. Nachdem die Zellen aufgeschlossen waren (French-Press), wurde das IFRG28-12H-Fusionsprotein über einen Imidazolgradienten aufgereinigt. M = Molekulargewichtsmarker; 1 bis 7 bezeichnen die einzelnen Fraktionen einer Aufreinigung, von denen jeweils 12,5 µl Eluat in einem 12% SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Anschließend erfolgte die Färbung mit Coomassie.

Bei der Aufreinigung des GST-Fusionsproteins konnten im Schnitt 8 mg aus einer 1 L Kultur isoliert werden. Die Ausbeute des um die Hälfte kleineren His-Tag-Proteins lag im Gegensatz dazu nur bei 4,5 mg. Dieser Unterschied bezieht sich jedoch auf die Gesamtproteinmenge und nicht auf den IFRG28-Anteil. Wenn jedoch das Molekulargewicht des IFRG28 berücksichtigt wird, ergeben sich für beide Proteinlösungen ähnliche hohe molare Konzentrationen.

## 4.8 Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen IFRG28

Für die Gewinnung eines polyklonalen Antiserums wurde ein Kaninchen des Stammes NZW insgesamt 4mal mit 200 µg des aufgereinigten IFRG28-GST-Fusionsproteins (vgl. Tab. 4.8-1) immunisiert (Fa. Charles River). Vor der ersten Injektion (Präimmunserum) sowie an den Tagen 37 und 51 (1. und 2. Serumprobe) wurden Blutproben aus der Ohrvene des Tieres entnommen und die gewonnenen Seren im ELISA auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper untersucht. Für diese Bestimmungen wurden ELISA-Platten mit dem IFRG28-12H-Fusionsprotein vorbereitet, so dass der Titer nicht durch GST-spezifische Antikörper verfälscht werden konnte. Da sowohl in der 1. als auch in der 2. Serumprobe der Antikörpertiter bei 1:16000 bzw. 1:32000 lag, wurde das Kaninchen am Tag 70 entblutet.

Tag	Maßnahme
0	1. Injektion in CFA
28	2. Injektion in IFA
37	1. Serumprobe (5ml)
42	3. Injektion in IFA
51	2. Serumprobe (5ml)
56	4. Injektion in IFA
70	Entblutung

**Tab. 4.8-1 Immunisierungsschema Kaninchen**

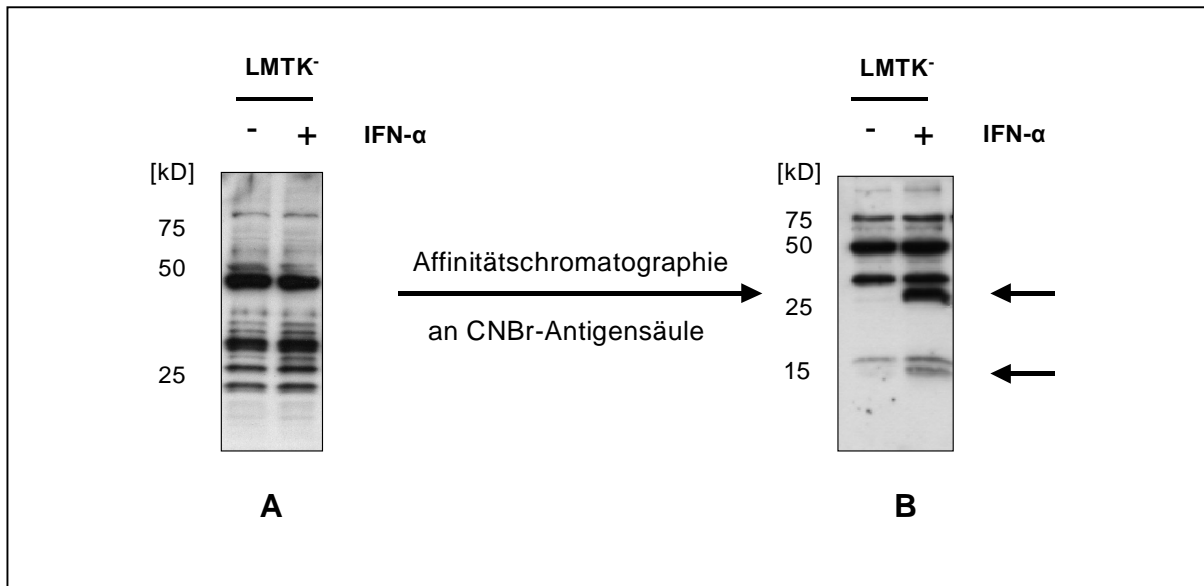
CFA = komplettes Freundesches Adjuvans

IFA = inkomplettes Freundesches Adjuvans

### 4.8.1 Nachweis des IFRG28-Proteins durch das Kaninchenserum in IFN-behandelten Zellen

Zum Nachweis des IFRG28 wurden Zellextrakte aus unbehandelten Kontrollzellen und IFN-induzierten Zellen (Probe) hergestellt und im Western-Blot analysiert. Auf Grund einer hohen Kreuzreaktivität des Kaninchenserums mit zellulären Proteinen konnte das Protein aber nicht eindeutig in der induzierten Probe nachgewiesen werden. Deshalb wurde versucht, die Spezifität des Antiserums mit Hilfe einer Antigensäule zu erhöhen. Als Ligand für die CNBr-Sepharose wurde das IFRG28-12H-Fusionsprotein gewählt, da dieses Protein über keine Antigenbindungsstellen für GST-spezifische Antikörper verfügt (vgl. Kapitel 3.3.3 zur Affinitätsreinigung von Antiseren). Durch den Einsatz des gereinigten polyklonalen Antikörpers konnte nun

in Zellextrakten aus IFN-induzierten LMTK<sup>-</sup>-Zellen eine spezifische Bande bei der erwarteten Größe von 28 kD detektiert werden (vgl. Abb. 4.8-1). Zusätzlich wurde in Extrakten aus IFN-behandelten Zellen eine Bande bei ~15 kD nachgewiesen. Ob es sich hierbei um eine mögliche Splice-Variante des IFRG28 handelt, sollte anhand von RT-PCR-Ansätzen untersucht werden.



**Abb. 4.8-1 Nachweis der Expression von IFRG28 in IFN- $\alpha_4$  induzierten LMTK<sup>-</sup>-Zellen**

LMTK<sup>-</sup>-Zellen wurden mit 250 IU IFN- $\alpha_4$  induziert, nach 20 h geerntet und mit nicht-induzierten Gesamtzellextrakten (30  $\mu$ g/Spur) in einem 12% SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis des IFRG28 erfolgte über Western-Blot mit **A** Kaninchenserum (1:2000) und **B** aufgereinigten polyklonalen Antikörpern (1  $\mu$ g/ml). Die Positionen von IFRG28 und einem weiteren spezifischen Signal bei 15 kD sind durch Pfeile hervorgehoben. Durchführung gemäß dem unter 3.3.1 beschriebenen Verfahren.

#### 4.8.2 Klonierung einer Splice-Variante des IFRG28

Für eine Identifizierung der unbekanntes cDNA über RT-PCR sprechen folgende Überlegungen:

- 1) Die cDNA muss Teilsequenzen des IFRG28 beinhalten, denn sonst wäre kein weiteres spezifisches Signal in der induzierten Probe nachzuweisen gewesen.
- 2) Im 5'-RACE wurde kein zusätzliches Exon oberhalb des Translationsstarts identifiziert, deshalb beschränkt sich die Suche auf Sequenzen, die sich downstream zum ATG-Start-Kodon befinden.
- 3) Mit einem geschätzten Molekulargewicht von ~15 kD, ist dieses Protein eindeutig kleiner als IFRG28; was darauf schließen lässt, dass es sich hierbei um eine kürzere Splice-Variante handeln könnte.



Bereich im 2. Exon bereits nach 22 bp terminiert wird. Somit ergibt sich für das IFRG28-short (IFRG28s) ein offenes Leseraster von insgesamt 183 Nukleotiden, das für ein Protein mit 61 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 7 kD kodiert (vgl. Abb. 4.8-3).

Nukleotid-Sequenz des IFRG28s:				
1	ATGCTGTTCC	CCGATGACTT	CAGTACTTGG	GAGCAGACAT TTCAAGAACT
51	GATGCAGGAG	GAGAAGCCCG	GGGCCAAGTG	GAGCCTGCAT TTGGATAAGA
101	ACATTGTACC	AGATGGTGCA	GCCCTGGGAT	GGAGGCAGCA CCAGCAGACA
151	GTGCTTGGCA	<u>GAGATACTAT</u>	<u>GGACACAGGA</u>	<u>AGATAGCATT</u> GACCTCGAAT
201	GCATCTTTGG	GTGAGAAGGT	GACTTTGGAT	GGGCCCCACG ACACACGCAA
251	TTGTGAGGCA	TGCAGTCTAA	ACTCTCATGG	AAGATGTGCC CTTGCACACA
301	AAGTAAAACC	ACCCAGATCT	CCATCTCCAT	TACCAAAGAG TTCCTCCCCA
351	TCAAAGAGCT	GCCCTCCTCC	GCCTCAGACC	CGGAATACGG ATTTTGGGAA
401	TAAAACTTTT	CAGGATTTTG	GGAATAGAAC	TTTTTCAGGGA TGCAGAGAGC
451	CCCCCAACG	TGAAATAGAG	CCACCACTAT	TTCTGTTTTT GTCTATTGCT
501	GCATTTGCC	TTTTTAGTCT	TTTCACTAGA	
Protein-Sequenz des IFRG28s:				
1	MLFPDDFSTW	EQTFQELMQE	EKPGAKWSLH	LDKNI VPDGA ALGWROHQQT
51	VLGRD <u>TMDTG</u>	<u>R</u>		

**Abb 4.8-3 Nukleotid- und Protein-Sequenz des IFRG28 short (IFRG28s)**

In der Nukleotid-Sequenz sind: Start- und Stop-Kodon groß und fett gedruckt; das verschobene Leseraster aus dem 2. Exon ist dick unterstrichen. In der Protein-Sequenz sind die Aminosäuren, die sich aus dem verschobenen Leseraster des 2. Exons ergeben, ebenfalls dick unterstrichen.

Die im Western-Blot zusätzlich identifizierte kleine Bande (bei 15 kD) stimmt nicht mit dem errechneten Molekulargewicht des IFRG28s von 7 kD überein. Allerdings besitzen kleine Proteine häufig ein atypisches Laufverhalten. Um zu bestätigen, dass es sich hierbei tatsächlich um die klonierte Splice-Variante handelt, müsste die Bande aus dem Western-Blot ausgeschnitten und die Proteinsequenz ermittelt werden.

## 4.9 Herstellung von monoklonalen Antikörpern

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurden zwei Sprague Dawley Ratten mit dem IFRG28-GST-Fusionsprotein immunisiert. Das Immunisierungsschema sowie das weitere Vorgehen sind unter Methoden (vgl. Kapitel 3.3.6) ausführlich beschrieben. Hier soll nur die Strategie besprochen und das Ergebnis der Fusion zusammengefasst werden.

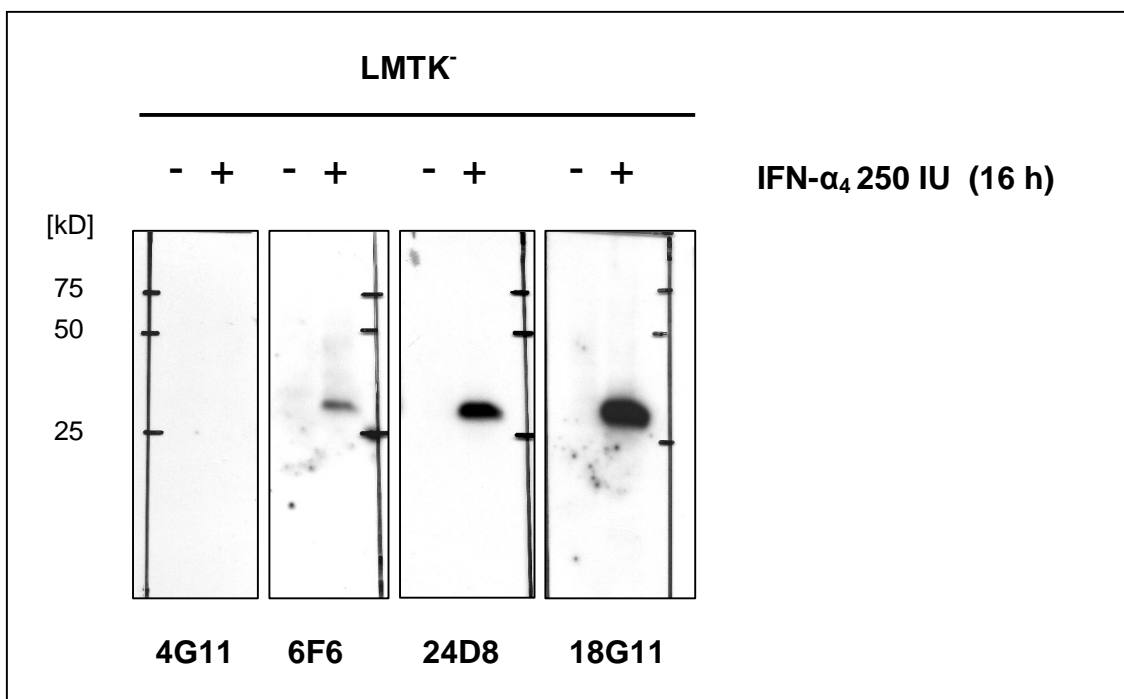
Da das IFRG28 der Maus eine sehr hohe Ähnlichkeit mit dem homologen Protein der Ratte aufweist, ist dessen Antigenität bei einer 86%igen Übereinstimmung im Vergleich zum bakteriellen Trägerprotein sehr gering. Im Vorfeld konnte also schon davon ausgegangen werden, dass sich durch die Fusion eine Mehrzahl an GST-spezifischen Hybridomen bilden wird. Daher eignete sich das IFRG28-GST-Fusionsprotein nur bedingt zum Screenen der Zellklone, denn alle positiv identifizierten Hybridome müssten sonst in einem zweiten Schritt auf ihre potentielle Reaktivität gegen den GST-Teil untersucht werden. Um Zeit und Arbeit zu ersparen, wurden daher Mikrotiterplatten mit dem IFRG28-12H-Fusionsprotein vorbereitet, so dass die Überstände nur einmal analysiert werden mussten. So konnten auch IFRG28-spezifische von GST-spezifischen Hybridomen in der gleichen Kultur der Mikrotiterplatte unterschieden werden.

Von den insgesamt 4608 getesteten Überständen zeigten im ersten Screening mehr als 100 Hybridome ein positives Signal, wovon die 36 stärksten subkloniert wurden. Nach insgesamt 4 Subklonierungen blieben schließlich 18 Hybridome übrig, die zur weiteren Analyse expandiert wurden. Die Überstände dieser Klone wurden sowohl im Western-Blot als auch in der Immunpräzipitation mit Zellextrakten aus Kontrollzellen und IFN-behandelten Zellen getestet. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.9-1 zusammengefasst; exemplarisch sind Western-Blots der monoklonalen Antikörper in Abbildung 4.9-1 gezeigt.



Hybridom	Western-Blot	Immunpräzipitation
2B6	+	-
2C5	+++	-
4G11	-	++
6F6	+	-
11G11	++	++
12D12	++	++
17C4	+	+
18E5	-	-
18G11	+++	+++
23F9	-	++
24D8	++	++
26H5	++	++
27C7	+++	++
32H4	-	++
35B11	+	+
39C1	-	+
39E1	+	-
43B2	-	+

**Tab. 4.9-1 Übersicht über die Reaktivität der charakterisierten monoklonalen Antikörper**  
Die Überstände der aufgeführten Hybridome wurden sowohl im Western-Blot als auch in der Immunpräzipitation mit Zellextrakten aus IFN-induzierten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen getestet. + schwaches; ++ gutes; +++ sehr gutes Signal im Western-Blot bzw. nach Immunpräzipitation.



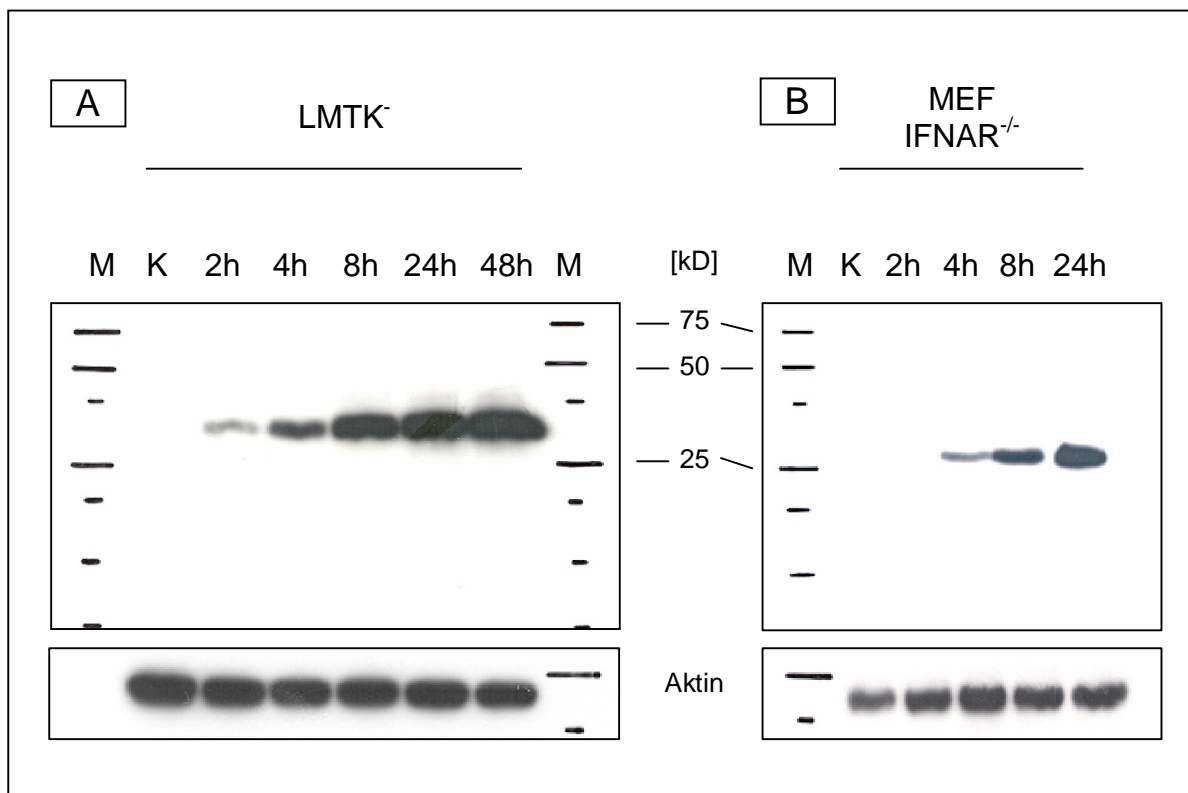
**Abb. 4.9-1 Analyse der Hybridomüberstände im Western-Blot**

LMTK<sup>-</sup>-Zellen wurden mit 250 IU IFN- $\alpha_4$  induziert, nach 16 h geerntet und mit nicht-induzierten Gesamtzellextrakten (30  $\mu$ g/Spur) in einem 12% SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis des IFRG28 erfolgte über Western-Blot mit Hybridomüberständen, die 1:2 mit Blocklösung (5% MMP in 0,05% PBS-T) verdünnt wurden. 2. Antikörper Ziege- $\alpha$ -Ratte 1:4000.

## 4.10 Untersuchung zur Induktion des IFRG28-Proteins

### 4.10.1 Induktion durch IFN- $\alpha$ und IFN- $\gamma$

Zunächst wurde untersucht, wie schnell sich IFRG28 auf Proteinebene nach IFN-Induktion nachweisen lässt. Für eine Induktion durch IFN- $\alpha$  wurde die Zelllinie LMTK $^{-}$  ausgewählt, da mit ihr alle Promotoruntersuchungen durchgeführt wurden. Des Weiteren sollte die Frage geklärt werden, ob sich das Protein auch durch IFN- $\gamma$  induzieren lässt. Für diese Versuche wurden Maus-Embryo-Fibroblasten (MEF) aus Interferon- $\alpha$ -Rezeptor-Knock-out (IFNAR $^{-/-}$ ) Mäusen präpariert, um so eine indirekte Induktion über autokrin gebildetes IFN- $\beta$  ausschließen zu können. In beiden Experimenten blieb das IFN bis zum Zeitpunkt der Ernte auf den Zellen (vgl. Abb. 4.10-1).

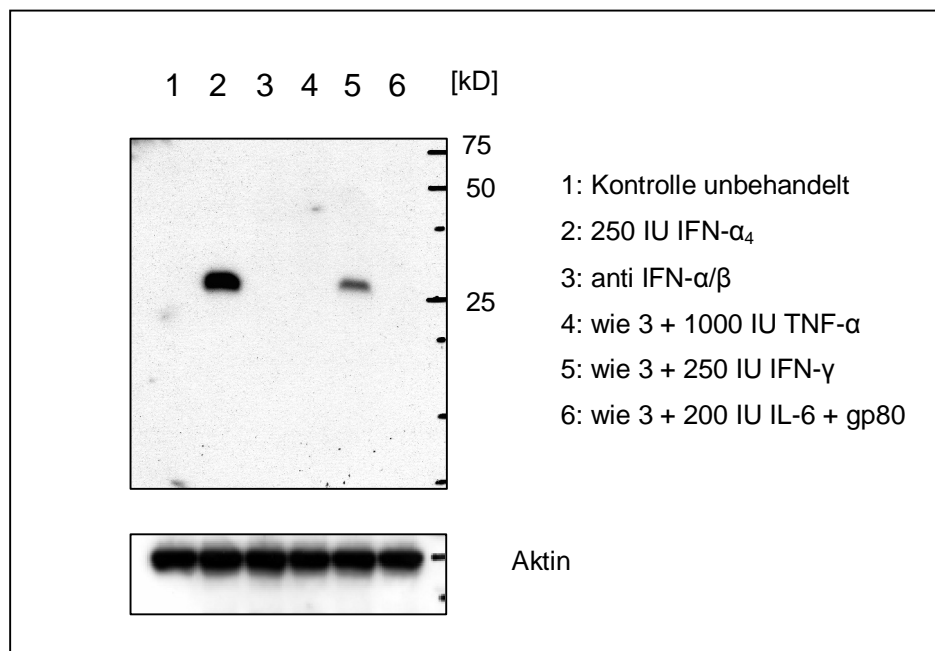


**Abb. 4.10-1 Induktionsprofil des IFRG28 in LMTK $^{-}$  und in MEF des IFNAR $^{-/-}$ -Stammes**

Gesamtzellextrakte (30  $\mu$ g/Spur) wurden in einem 12% SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit einem Pool aus monoklonalen  $\alpha$ -IFRG28-Antikörpern (1  $\mu$ g/ml) inkubiert; 2. Antikörper Ziege- $\alpha$ -Ratte (1:400) A: LMTK $^{-}$ -Zellen wurden mit 250 IU IFN- $\alpha_4$  induziert und nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. B: Kinetik in MEF-IFNAR $^{-/-}$  : 2 h - 24 h = Induktion mit 250 IU IFN- $\gamma$  für 2 bis 24 Stunden. M = Molekulargewichtsmarker (Biorad). Zur Verifizierung der aufgetragenen Proteinmengen wurden die Blots nach Detektion von IFRG28 gestrippt und auf ihren Aktin-Gehalt geprüft. Durchführung gemäß dem unter 3.3.1 beschriebenen Verfahren.

Das Induktionsprofil in den LMTK<sup>-</sup>-Zellen verdeutlichte, dass IFRG28 sehr schnell durch IFN- $\alpha_4$  induziert wird (vgl. Abb. 4.10-1). Bereits nach 2 h lässt sich das Protein im Western-Blot nachweisen. Dieser anfänglich noch schwachen Bande folgen anschließend wesentlich stärkere Signale, die auf eine ansteigende Proteine-expression bis zum 8 h Wert hindeuten. Auch danach nimmt die Signalstärke zu - wenn auch weniger signifikant.

Abweichend von den Ergebnissen der Promotoruntersuchung lässt sich das Protein auch durch IFN- $\gamma$  induzieren, wenngleich der immunologische Nachweis des IFRG28 erst nach einer 4stündigen Induktion gelingt. Die im Vergleich zu IFN- $\alpha$  schwächer ausfallenden Signale legen die Vermutung nahe, dass sich das Protein durch IFN- $\gamma$  weniger stark induzieren lässt. Um dies näher zu überprüfen, wurden LMTK<sup>-</sup>-Zellen sowohl mit IFN- $\alpha_4$  als auch mit IFN- $\gamma$  behandelt, wobei letzteres Experiment in Gegenwart neutralisierender Antikörper durchgeführt wurde. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob eine Induktion durch IL-6 bzw. TNF- $\alpha$  erfolgt.



**Abb. 4.10-2 Untersuchung auf eine Induktion von IFRG28 in LMTK<sup>-</sup> durch IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-6**

LMTK<sup>-</sup>-Zellen wurden für 20 h mit den angegebenen Zytokinen behandelt. Um die Affinität des IL-6 zu seinem Rezeptor zu erhöhen, wurde gp80 (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) zugesetzt. Zur Unterdrückung einer indirekten Induktion durch Typ-I-IFN, wurden den Medien ggf. neutralisierende Antikörper gegen IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  zugesetzt. Anschließend wurden Zellextrakte hergestellt, in einem 12% SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit einem Pool aus monoklonalen  $\alpha$ -IFRG28-Antikörpern (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert; 2. Antikörper: Ziege- $\alpha$ -Ratte 1:4000. Zur Verifizierung der aufgetragenen Proteinmengen wurde der Blot nach Detektion von IFRG28 gestrippt und auf seinen Aktin-Gehalt geprüft. Durchführung gemäß dem unter 3.3.1 beschriebenen Verfahren.

Aus Abbildung 4.10-2 geht eindeutig hervor, dass IFRG28 sehr viel stärker durch IFN- $\alpha$  als durch IFN- $\gamma$  induziert wird. Allerdings konnte keine Induktion nach Behandlung mit TNF- $\alpha$  bzw. IL-6 nachgewiesen werden.

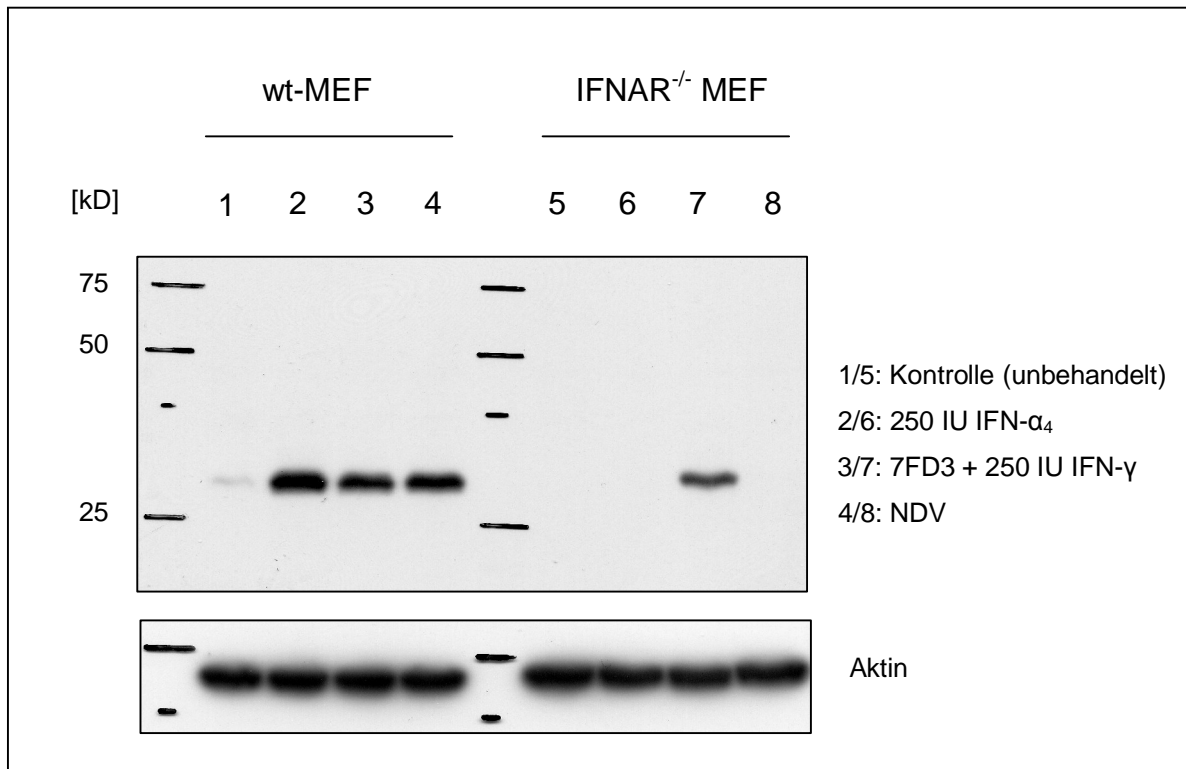
#### 4.10.2 Keine direkte Induktion durch Virus

Eine Gruppe von IFN-kontrollierten Genen kann direkt durch Virus induziert werden, wobei IRF3 im Zuge einer Infektion phosphoryliert wird und dadurch die Transkription dieser Gene initiiert. Dabei bindet IRF3 entweder an ISRE-Module oder an die PRD-Motive (Positive-Regulatory-Domain) der Typ-I-IFN-Gene (vgl. Kapitel 1.1.2 zur Induktion von Typ-I-Interferon). Im Folgenden wurde untersucht, ob IFRG28 auch zu dieser Gruppe von Proteinen gehört. Dazu wurden MEF mit dem Newcastle-Disease-Virus (NDV) infiziert (vgl. Kapitel 3.4.2 zur Infektion von eukaryontischen Zellen mit Virus). Da aber über IRF3 nicht nur die Expression bestimmter IFN-regulierter Proteine aktiviert wird, sondern, wie oben erwähnt, auch die Produktion größerer Mengen IFN ausgelöst wird, musste für einen gesicherten Nachweis die indirekte, autokrine Induktion des IFRG28 ausgeschlossen werden. Um nun unterscheiden zu können, ob IFRG28 durch Virus oder durch IFN induziert wird, wurden die nachfolgenden Experimente in MEF von IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten in diesen Versuchen Zellextrakte aus MEF des Wildtypstammes.

Den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse zu folge, wird IFRG28 nicht direkt durch Virus (Spur 8) induziert, sondern erst im Anschluss einer Virus-vermittelten IFN-Induktion (Spur 4) gebildet (vgl. Abb. 4.10-3). Mit diesem Ergebnis wird auch indirekt die ausbleibende Induktion des Proteins durch TNF- $\alpha$  bestätigt, da NF $\kappa$ B in diesen Zellen ebenfalls infolge einer Virusinfektion aktiviert wird (vgl. Abb. 4.10-2).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich IFRG28 in IFNAR<sup>-/-</sup> Zellen nur durch IFN- $\gamma$  induzieren lässt (Spur 7). Eine Expression nach Behandlung mit IFN- $\alpha$  konnte auf Grund des fehlenden IFNAR nicht nachgewiesen werden (Spur 6). Dieser Befund verdeutlicht noch einmal, dass IFRG28 direkt durch IFN- $\gamma$  induziert werden kann.

Da MEF über ihr endogen gebildetes IFN- $\beta$  eine konstitutive Expression von IFN-spezifischen Genen bewirken, konnte in der unbehandelten Kontrolle der wt-Probe (Spur 1) IFRG28 nachgewiesen werden, dessen Signalstärke nach Behandlung mit IFN- $\alpha_4$  erwartungsgemäß zunahm. Auch in diesem Experiment konnte das Protein durch IFN- $\alpha$  (Spur 2) etwas stärker induziert werden als durch IFN- $\gamma$  (Spur 3).

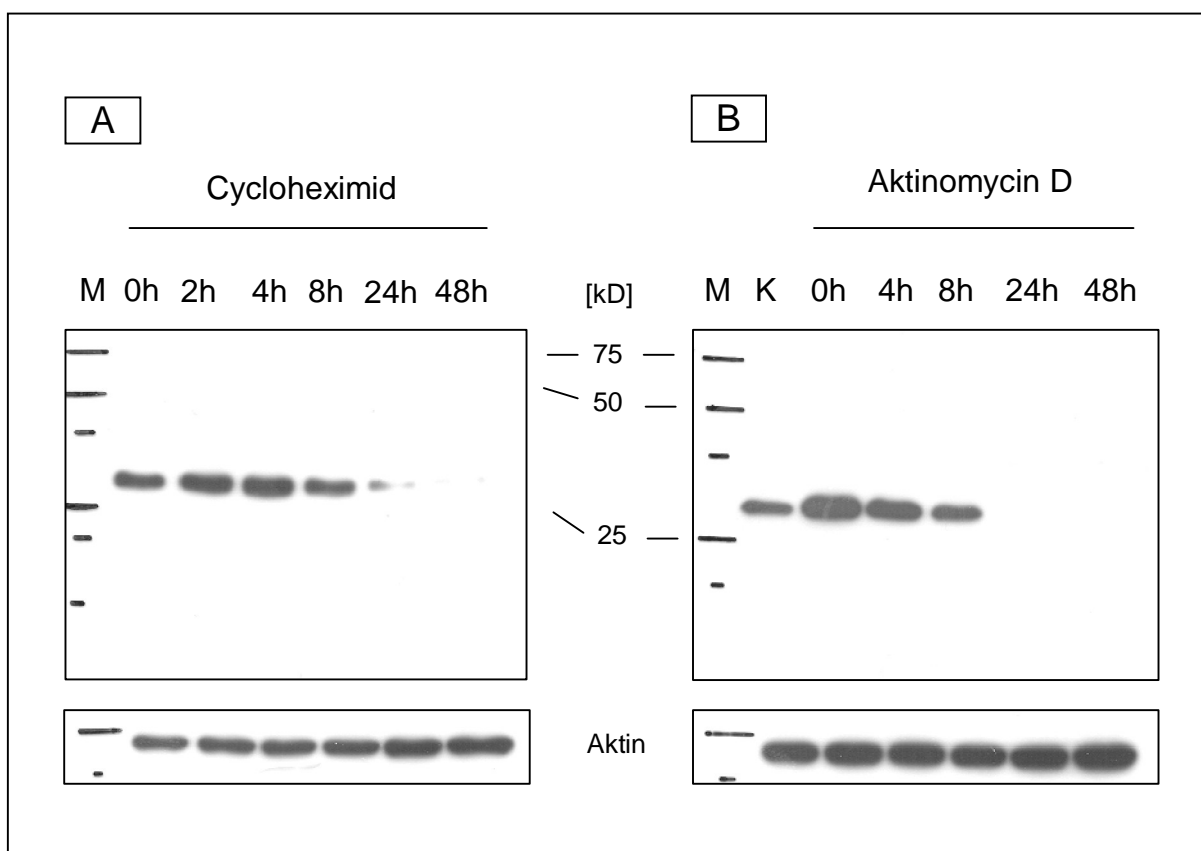


**Abb. 4.10-3 Untersuchung auf eine direkte Induktion durch NDV in MEF**

MEF des Wildtypstammes und der IFNAR<sup>-/-</sup>-Linie wurden für 20 h mit Interferon (250 IU IFN-α<sub>4</sub> bzw. IFN-γ) induziert oder mit NDV (MOI 1) infiziert. Zur Unterdrückung einer indirekten Induktion durch Typ-I-IFN, wurden den Medien ggf. neutralisierende Antikörper gegen IFN-β zugesetzt. Anschließend wurden die Zellextrakte in einem 12% SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit einem Pool aus monoklonalen α-IFRG28-Antikörpern (1 μg/ml) immunodetektiert. 2. Antikörper: Ziege-α-Ratte 1:4000. Zur Verifizierung der aufgetragenen Proteinmengen wurde der Blot nach Detektion des IFRG28 gestrippt und auf seinen Aktin-Gehalt geprüft.

### 4.11 Bestimmung der biologischen Halbwertszeit des IFRG28

Zur Bestimmung der Proteinhalbwertszeit wurden MEF zunächst mit IFN zur Expression des IFRG28 stimuliert und nachfolgend mit Cycloheximid (CHX), einem Inhibitor der Translation, behandelt. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden dann Proteinextrakte hergestellt und diese im Western-Blot mit Aktinomycin D behandelten Proben, die parallel dazu präpariert wurden, verglichen (vgl. Abb. 4.11-1). Während CHX die Translation hemmt, greift Aktinomycin D als Inhibitor der Transkription eine Stufe früher in die Genexpression ein. Durch diese vergleichende Analyse sollten Aussagen über die Stabilität des Proteins in der Zelle gemacht werden.



**Abb. 4.11-1 Bestimmung der biologischen Halbwertszeit**

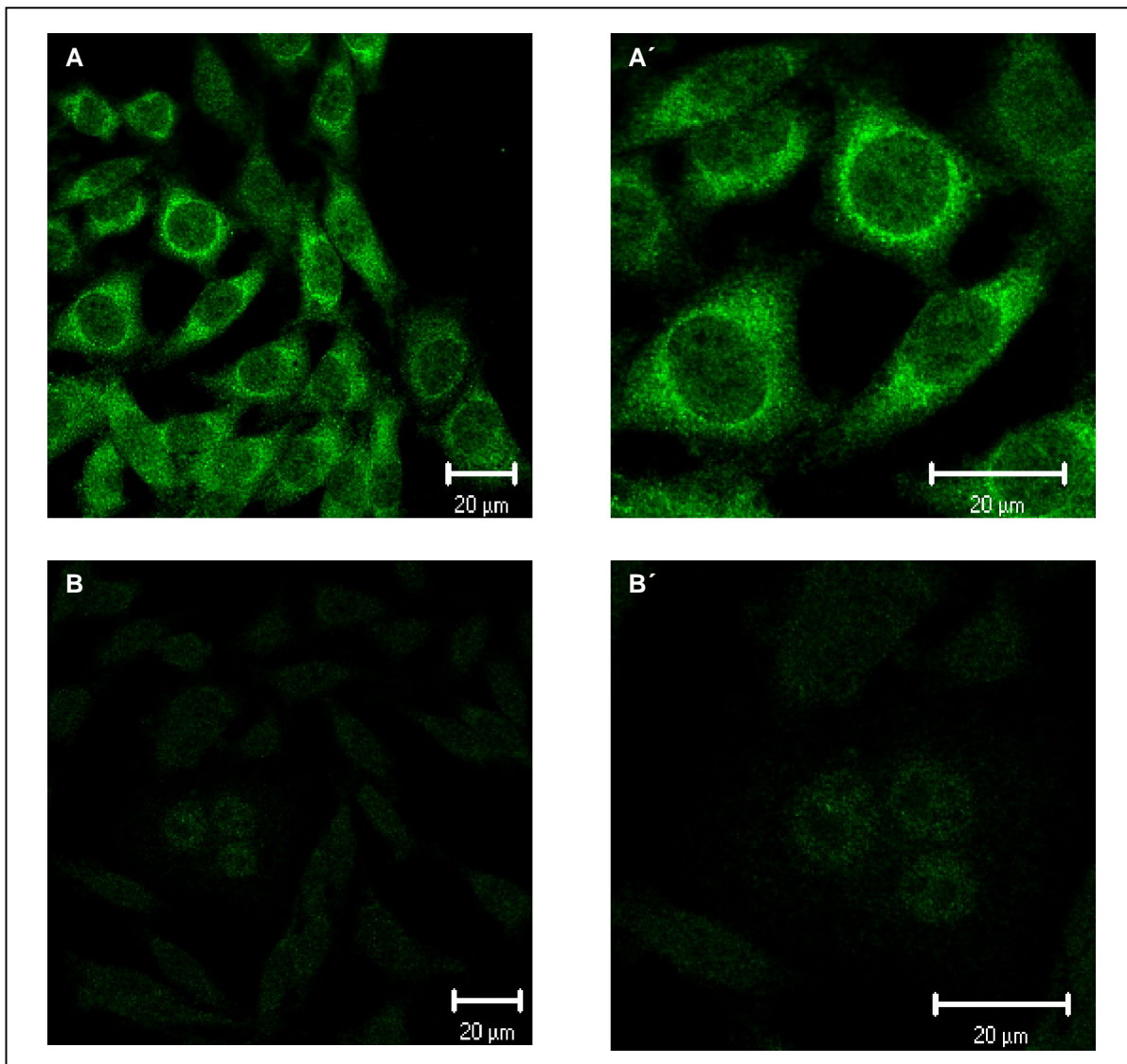
MEF des Wildtypstammes wurden für 16 h mit 250 IU IFN- $\alpha_4$  induziert und anschließend mit CHX (50  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Aktinomycin D (4  $\mu\text{g/ml}$ ) für 0 bis 48 h behandelt. Anschließend wurden die Zellextrakte in einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit einem Pool aus monoklonalen  $\alpha$ -IFRG28-Antikörpern (MAB-Pool) immundetektiert. 2. Antikörper: Ziege- $\alpha$ -Ratte 1:4000. Zur Verifizierung der aufgetragenen Proteinmengen wurden die Blots nach Detektion des IFRG28 gestrippt und auf ihren Aktin-Gehalt geprüft; M=Proteinmarker; K=Kontrolle (nicht-induziert und unbehandelt).

Bei Betrachtung der einzelnen Banden fällt auf, dass zwischen dem 0 h und 4 h Wert (vgl. Abb. 4.11-1 A) ein Anstieg in der Signalstärke stattfindet. Dieser Befund erklärt sich daraus, dass neben der Translation des IFRG28 auch die Protein-*de-novo*-Synthese von proteolytischen Enzymen gehemmt wird. Da aber abbauende Enzyme über eine recht lange Halbwertszeit verfügen, nivelliert sich dieser Effekt spätestens mit dem 8 h Wert, so dass das untersuchte Protein 24 h nach Zugabe des CHX kaum noch in den Zellen nachzuweisen war.

Die Ergebnisse der CHX-Behandlung gehen konform mit denen des Aktinomycin D Experimentes (vgl. Abb. 4.11-1 B). Auch hier endet der Nachweis des IFRG28 mit dem 24 h Wert. Ergänzend wird an dieser Stelle auf die konsitutive Expression des IFN- $\beta$  in den MEF hingewiesen (vgl. Abb. 4.10-3). Dies erklärt, weshalb auch in diesem Experiment IFRG28 in der unbehandelten Kontrolle (K) detektiert werden konnte. Zusammenfassend ergibt sich daraus, dass IFRG28 eine recht lange Halbwertszeit von mehr als 8 Stunden besitzt.

#### 4.12 Lokalisationsstudien mittels indirekter Immunfluoreszenz

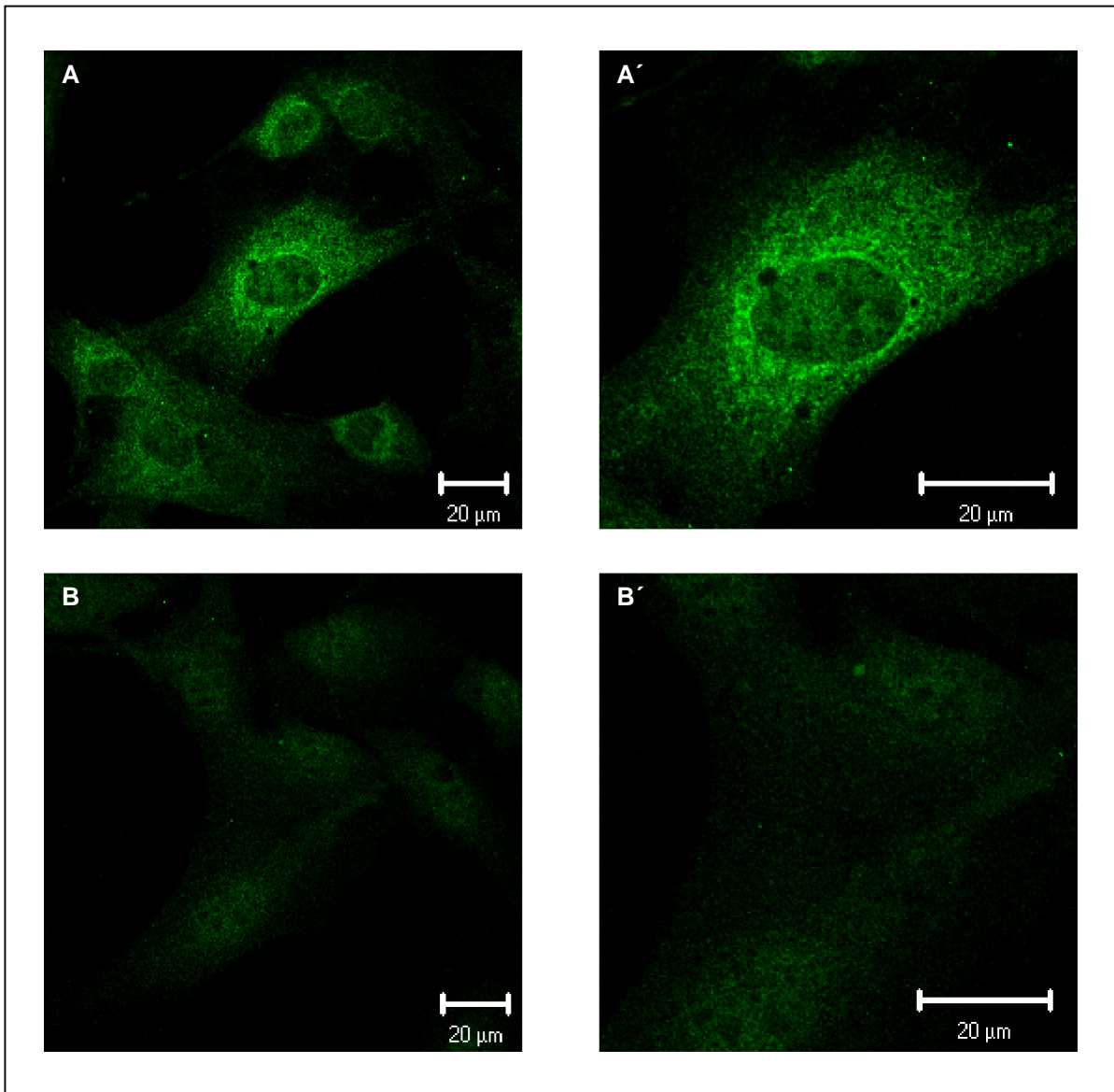
Für die Analyse der Expression von IFRG28 mittels Immunfluoreszenz wurden sowohl LMTK<sup>-</sup>-Zellen als auch MEF mit IFN- $\alpha_4$  induziert (250 IU) und wie unter Methoden beschrieben nach 16 h präpariert (vgl. Kapitel 3.3-5). Als Erstantikörper wurde ein Pool aus gereinigten monoklonalen Antikörpern eingesetzt, der anschließend durch eine grüne Fluoreszenzfärbung mit einem Alexa488-konjugierten Ziege- $\alpha$ -Ratte-Antikörper detektiert wurde. Als Negativkontrolle wurden identisch behandelte, aber nicht induzierte Zellen verwendet (vgl. Abb. 4.12-1 und 4.12-2).



**Abb. 4.12-1 Nachweis des IFRG28 in LMTK<sup>-</sup> Zellen mit Hilfe der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie**

Fluoreszenzmikroskopie von IFN-induzierten Zellen (A) und unbehandelten Kontrollzellen (B) nach indirekter Immunfärbung mit MAB-Pool (0,1 µg/µl) und Alexa488-konjugiertem Sekundärantikörper (1:250); Detailausschnitte aus A und B zeigen A' bzw. B'. Die Aufnahme der Proben erfolgte mit Hilfe der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie. Parameter: Argon-Laser mit 488 nm und LP 505-Filter, 63x Plan-Apochromat-Objektiv.





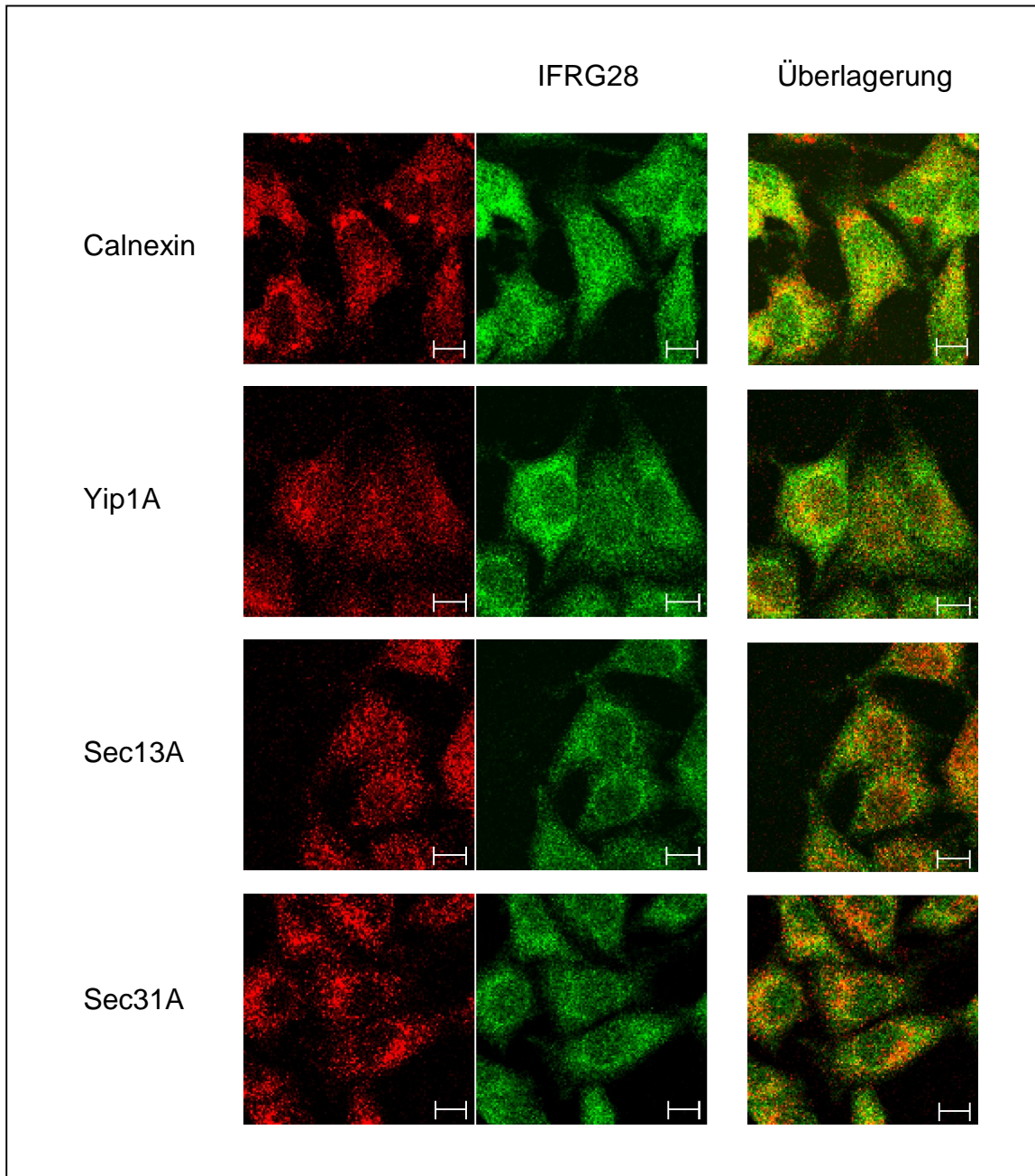
**Abb. 4.12-2 IFRG28-Nachweis in MEF**

Die Proben wurden, wie unter Abb. 4.12-1 beschrieben, behandelt. Detailausschnitte aus A und B zeigen A' bzw. B'.

Auch mit diesem Experiment konnte eindeutig gezeigt werden, dass sich das IFRG28-Protein nur in IFN-behandelten Zellen nachweisen lässt. In nicht-induzierten Zellen trat bestenfalls eine schwache Anfärbung des Zellkerns auf. Aus Abb. 4.12-1 und 4.12-2 geht weiter hervor, dass IFRG28 vermutlich Bestandteil von vesikulären Strukturen ist. Dafür spricht dessen punktförmige Verteilung. Obwohl sich die Punktsignale über das gesamte Zytoplasma ausbreiten, ist ein gehäuftes Auftreten nur in der Nähe des Zellkerns festzustellen. Das perinukleäre Signal macht daher eine Kolo-kalisation mit Strukturen des endoplasmatischen Retikulums (ER) wahrscheinlich. Als mögliche kernnahe Vesikel kommen u.a. COP-II-Vesikel in Frage, die am Proteintransport zum Golgi-Apparat beteiligt sind. Zur Analyse einer

Kolokalisation des IFRG28 mit dem ER wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit Calnexin-Antikörpern (Fa. Santa Cruz) durchgeführt. Eine Beteiligung am frühen sekretorischen Signalweg, vom ER zum Golgi-Apparat, wurde mit Hilfe von Sec13A- und Sec31A-spezifischen Antikörpern (freundlicherweise von Ong Yan Shan aus Proteos, Singapore, zur Verfügung gestellt [Bor Luen Tang et al., 2001]) überprüft. Beide Proteine sind Bestandteile von COP-II-Vesikeln. Die Bildung und Ausschleusung dieser Transportvesikel findet an bestimmten Regionen des ER statt. An diesen sogenannten „exit sites“ befindet sich auch Yip1A, das den COP-II vermittelten ER-Golgi-Transport moduliert. Zur Analyse einer Kolokalisation mit dieser Schnittstelle wurden Yip1A-spezifische Antikörper [Bor Luen Tang et al., 2001] eingesetzt.

Die Studie zur zellulären Lokalisation ergab, dass IFRG28 mit keinem der verwendeten Markerproteine vollständig kolokalisiert (vgl. Abb. 4.12-3) Es konnte lediglich eine partielle Überlappung mit der ER-spezifischen Calnexin-Färbung festgestellt werden. Die Signale des COP-II vermittelten Vesikeltransports wichen sogar gänzlich von denen des IFRG28 ab, so dass eine Beteiligung am Proteinexport ausgeschlossen werden kann.



**Abb. 4.12-3 Keine Kollokalisierung von IFRG28 mit vesikulären Proteinen**

LMTK<sup>-</sup>-Zellen wurden mit 250 IU IFN- $\alpha_4$  induziert, 16 h nach Induktion erfolgte die Fixierung und anschließende Permeabilisierung der Zellen. IFRG28 wurde mit einem Pool aus gereinigten monoklonalen Antikörpern (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) detektiert und anschließend mit einem Alexa488-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Ratte-Sekundärantikörper (1:250) visualisiert (mittlere Spalte). Die Lokalisation des Calnexins, Yip1A, Sec13A und Sec31A wurden mit polyklonalen Kaninchenantikörpern (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) analysiert (linke Spalte). Der verwendete Sekundärantikörper war ein Alexa564-konjugierter Ziege- $\alpha$ -Kaninchen Antikörper (1:250). Die rechte Spalte zeigt die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale. Der Größenbalken entspricht 20 $\mu\text{m}$ . Parameter: Argon-Laser mit 488 nm und LP 505-530-Filter; He-Ne-Laser mit 543 nm und LP 560-Filter; 63x Plan-Apochromat-Objektiv.

### **4.13 Etablierung von transfizierten Zelllinien mit stabiler IFRG28-Expression**

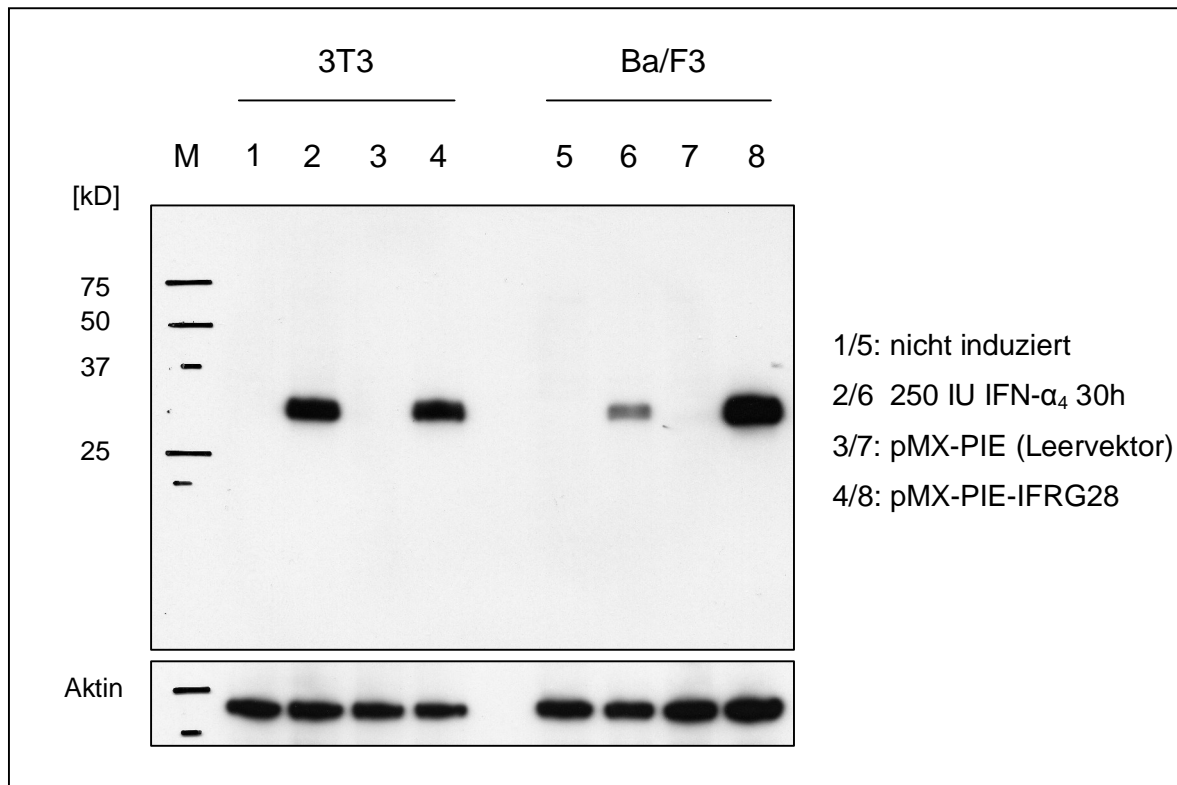
Zur Funktionsbestimmung eines noch nicht charakterisierten Proteins werden häufig zwei unterschiedliche zellbiologische Ansätze verfolgt. Die eine Methode versucht das Gen mit Hilfe der RNA-Interferenz-Technik (RNAi) auszuschalten. Über die veränderte Zellphysiologie können dann Hinweise über die Funktion des Proteins gesammelt werden. Dieses Verfahren setzt allerdings eine konstitutive Expression des Gens voraus. Im Fall von induzierten Genen ergeben sich funktionsbezogene Rückschlüsse oftmals erst nach einer vorangegangenen Überproduktion des betreffenden Proteins. Denn nur dann können Veränderungen im Zellstoffwechsel stattfinden, die Aussagen über dessen Aufgabe in der Zelle zulassen. Ziel war es daher, den alleinigen Einfluss einer konstitutiven IFRG28-Expression in Abwesenheit von IFN auf die Zellphysiologie zu untersuchen.

#### **4.13.1 Klonierung des retroviralen Expressionsvektors**

Dazu wurde mit dem Primer-Pärchen *K3-retro-F3* / *K3-retro-R2* die IFRG28-cDNA aus vorhandenen Plasmiden amplifiziert, mit Xho1 verdaut und über die Xho1-Schnittstelle in den retroviralen Expressionsvektor pMX-PIE kloniert. Durch anschließende Transfektion des pMX-PIE-IFRG28-Vektors in die Phoenix-Verpackungszelllinie konnten Retroviren für den Gentransfer in Ba/F3- und 3T3-Zellen gewonnen werden. Als Negativkontrolle für spätere Untersuchungen dienten Ba/F3 und 3T3-Zellen, die mit dem verpackten Leervektor infiziert wurden. Die vier infizierten Zelllinien wurden anschließend mit Puromycin auf chromosomale Integration des Expressionsvektors selektioniert. Anschließend wurden besonders stark exprimierende Zellen (die besten 35%) unter Verwendung einer FACS-Sortiereinrichtung angereichert (vgl. Kap 3.4.1).

#### **4.13.2 Nachweis der IFRG28-Expression in den transfizierten Zellen**

Im Folgenden wurde untersucht, wie stark IFRG28 in den transfizierten Zellen exprimiert wird (vgl. Abb. 4.13-1). Zum Vergleich wurden die Ausgangszelllinien 3T3 bzw. Ba/F3 für 30 h mit IFN- $\alpha_4$  induziert, wodurch Bedingungen geschaffen wurden, die einer maximalen IFRG28-Expression entsprechen sollten. Als Negativkontrollen wurden Proteinextrakte aus nicht-induzierten Kontrollzellen aufgetragen.



**Abb. 4.13-1 Vergleich der IFN-induzierten und der ektopischen Expression von IFRG28**

Nicht-transfizierte 3T3- und Ba/F3-Zellen wurden mit 250 IU IFN- $\alpha_4$  induziert, nach 30 h geerntet und mit Zellextrakten aus den stabil-transfizierten Linien in einem 12%-SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis des IFRG28 erfolgte über Western-Blot mit einem Pool aus monoklonalen Antikörpern (1 $\mu$ g/ml). Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege- $\alpha$ -Ratte-Antikörper (1:400) verwendet. M = Proteinmarker; Zur Verifizierung der aufgetragenen Proteinmengen wurden der Blot nach Detektion des IFRG28 gestrippt und auf seinen Aktin-Gehalt geprüft.

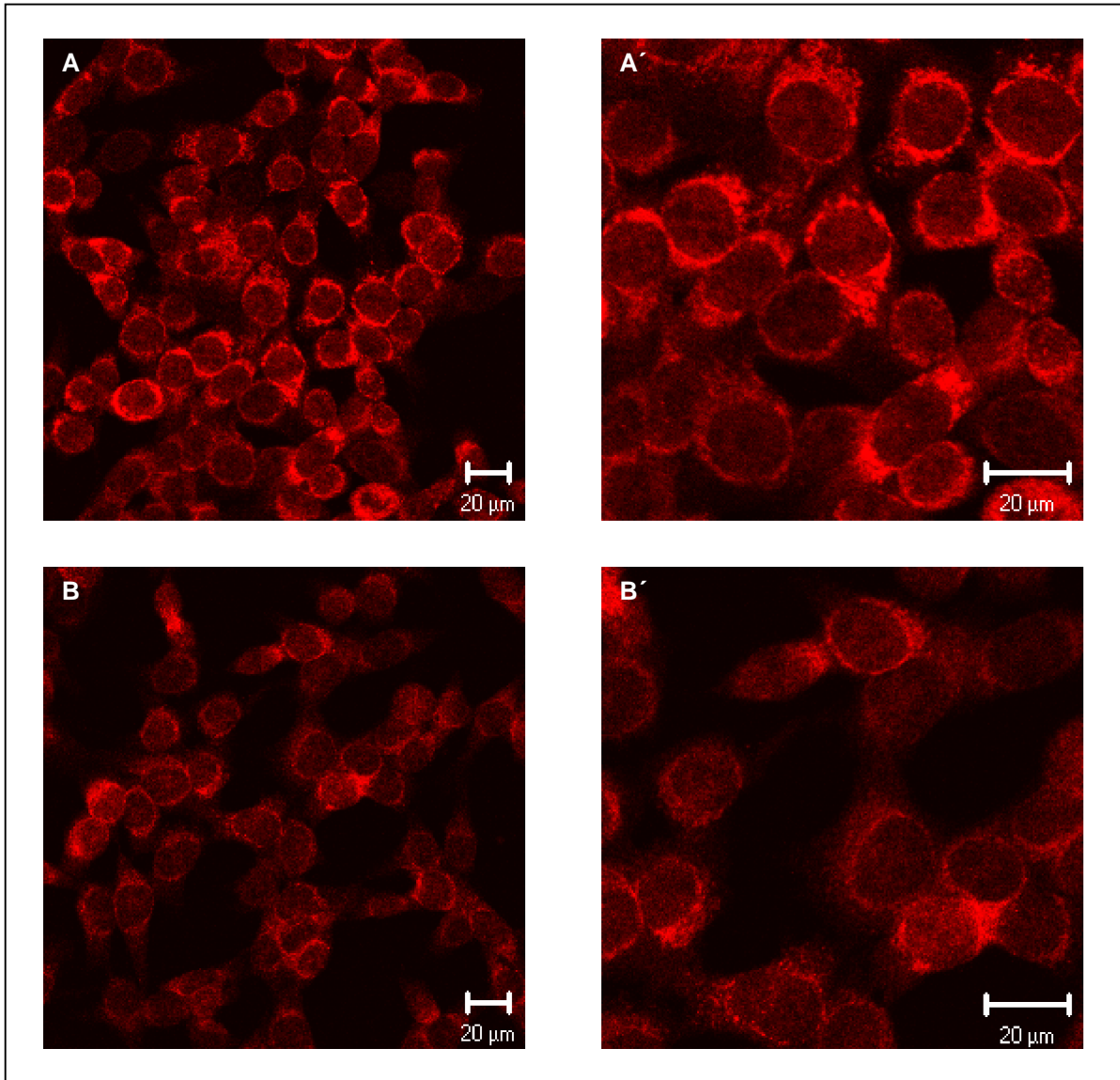
Mit dem Ergebnis der Western-Blot-Analyse konnte eine hohe Expressionsrate für das IFRG28-Protein in den stabil-transfizierten Zellen (Spur 4 und 8) nachgewiesen werden. Die retroviral-infizierten 3T3-Zellen (3T3-IFRG28) unterschieden sich nur geringfügig von ihren induzierten wt-Zellen (Spur 2 und 4). Deutlichere Unterschiede ergaben sich jedoch in den Ba/F3-Zellen; hier ist die Proteinexpression des IFRG28 zugunsten der stabil-transfizierten Zelllinie (Ba/F3-IFRG28) verschoben (Spur 6 und 8). Der direkte Vergleich zwischen 3T3-IFRG28 (Spur 4) und Ba/F3-IFRG28 (Spur 8) macht deutlich, dass letztere etwas mehr IFRG28 exprimieren. Zellen, die mit dem verpackten Leervektor infiziert wurden (3T3-pMX-PIE und Ba/F3-pMX-PIE) zeigten erwartungsgemäß keine IFRG28-Expression (Spur 3 und 7).

### **4.13.3 Nachweis der Lokalisation des IFRG28-Proteins in den transfizierten 3T3-IFRG28-Zellen**

Da mit den stabil-transfizierten Zelllinien physiologische Tests durchgeführt werden sollten, musste zur Absicherung von etwaigen Befunden zuvor die Lokalisation des Proteins in diesen Zellen bestimmt werden. Ergeben sich hierbei gravierende Unterschiede zur IFN-induzierten Kontrolle, findet die Expression nicht mehr innerhalb physiologischer Parameter statt, so dass die erzielten Testergebnisse an Beweiskraft verlieren. Um dies zu überprüfen wurden 3T3-Zellen für 16 h mit IFN- $\alpha_4$  induziert und mit der stabilen 3T3-Zelllinie (3T3-IFRG28) verglichen. Die Entscheidung für die 3T3-Zelllinie fiel aus dem einfachen Grund, dass es sich dabei um adhärenz wachsende Zellen handelt. Sie sind auf Grund ihrer Morphologie für eine Immunfluoreszenz besser zugänglich als die in Suspension wachsenden Ba/F3-Zellen. Die Erfassung der indirekten Immunfluoreszenz erfolgte mit Hilfe der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie und ist in Abbildung 4.13-2 gezeigt.

Es stellte sich heraus, dass die transfizierten 3T3-Zellen im Vergleich zur induzierten Probe eine verstärkte Fluoreszenzfärbung zeigten, wobei die rote Fluoreszenz, die Ausdruck der IFRG28-Expression ist, sich in beiden Aufnahmen hauptsächlich in perinukleären Vesikeln des Zytoplasmas wiederfand. Diese Beobachtung wurde auch schon mit den LMTK<sup>-</sup>- und MEF-Zellen gemacht. Eine weitere Übereinstimmung wurde in der prozentualen Häufigkeit von IFRG28-positiven Zellen festgestellt, da sich in beiden Fällen nahezu alle Zellen anfärben ließen. Das Verhältnis von stark- zu schwach exprimierenden Zellen ist in beiden Proben ebenfalls ähnlich hoch.

Morphologische Abnormalitäten, die aus einer Überexpression des Proteins resultieren, konnten in den stabil-exprimierenden 3T3-Zellen nicht nachgewiesen werden. Somit entsprechen sich die beiden Zelllinien bezüglich ihrer Fluoreszenzverteilung und es ist davon auszugehen, dass durch die Expression die physiologischen Bedingungen im Zellinneren nicht stärker beeinflusst werden als in IFN-behandelten Kontrollzellen.



**Abb. 4.13-2 Vergleich der IFRG28-Expression in stabil-transfizierten und induzierten 3T3-Zellen mit Hilfe der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie**

Fluoreszenzmikroskopie von ektopisch-exprimierenden 3T3-IFRG28-Zellen (A) und IFN-induzierten 3T3-Kontrollzellen (B) nach indirekter Immunfärbung mit MAB-Pool (0,1 µg/µl) und Alexa564-konjugiertem Sekundärantikörper (1:250); Detailausschnitte aus A und B zeigen A' bzw. B'. Parameter: He-Ne-Laser mit 543 nm und LP 560-Filter; 40x Plan-Neofluar-Objektiv.

#### 4.14 Antivirale Eigenschaften des IFRG28

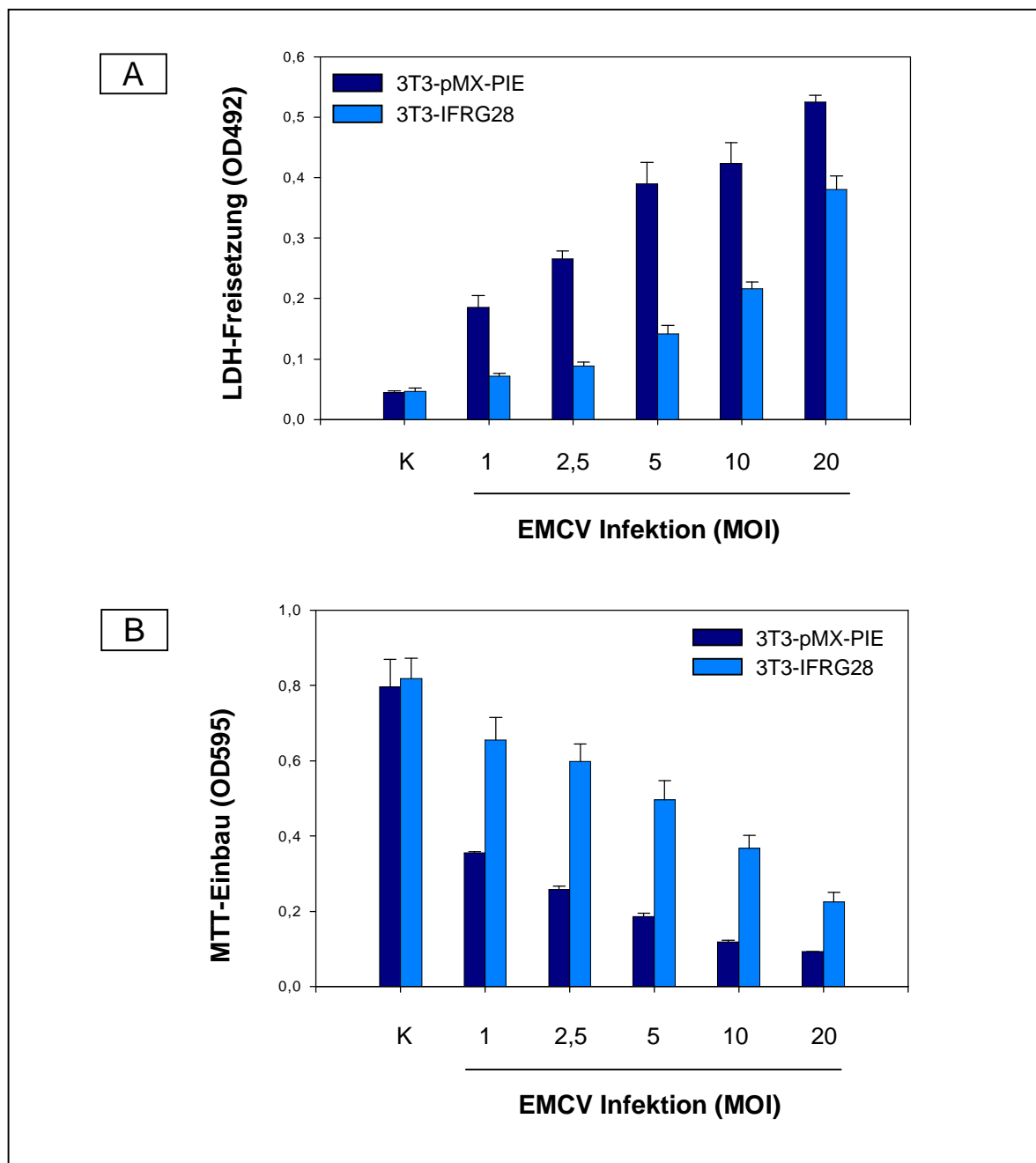
Die Analysen zur Induktion haben eindeutig gezeigt, dass eine Expression von IFRG28 nur in IFN-stimulierten Zellen stattfindet. Potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren anderer Signaltransduktionswege konnten zwar identifiziert, aber nicht durch Western-Blot-Experimente und Reporterassays verifiziert werden. Demnach wird IFRG28 nur durch IFN induziert, wobei die Expression nicht vom Typ des exogen zugesetzten INF abhängig ist, denn im Western-Blot ließ sich das Protein in Zellextrakten aus IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  behandelten Zellen nachweisen. Somit kann IFRG28 an einer oder mehreren der zahlreichen IFN-typischen Effekten beteiligt sein. Zu den eindrucksvollsten zählt sicherlich deren antivirale Wirkung, die durch verschiedene IFN-induzierte Gene vermittelt wird. In diesem Zusammenhang kann die schnelle Induktion des IFRG28 schon durch kleinste IFN-Mengen von besonderer Bedeutung sein, denn die rasche Etablierung einer viralen Resistenz nach IFN-Kontakt ist entscheidend für die erfolgreiche Kontrolle von Virusinfektionen. Die Frage, ob das IFN-induzierte Gen IFRG28 an der antiviralen Wirkung beteiligt ist, sollte anhand von stabil-transfizierten Zelllinien untersucht werden, denn nur mit diesen Zellen können dessen biologische Effekte in Abwesenheit von IFN analysiert werden. Das Vorhandensein eines antiviralen Status wurde durch Infektion mit dem Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) und dem Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV) geprüft. Beide Viren lösen zytopathische Effekte (CPE) aus, wodurch sich infizierte Zellen mit der Zeit abrunden und schließlich vom Plattenboden ablösen. Zur Detektion zellschädigender Einflüsse wurde der CytoTox 96-Assay der Fa. Promega eingesetzt (vgl. Kapitel 3.2.7). Der Kit basiert auf der Quantifizierung der Laktat-Dehydrogenase (LDH), einem stabilen zytosolischen Enzyms, das nach Schädigung oder Ruptur der Zellmembran freigesetzt wird. Damit ist die Menge des freigesetzten LDH's proportional zur Anzahl geschädigter oder lysierter Zellen.

Als Indikator für die Vitalität der Zellen nach Virus-Exposition, diente der MTT-Assay (vgl. Kapitel 3.2.8). Dieser Test basiert darauf, dass stoffwechselaktive Zellen mit Hilfe ihrer mitochondrialen Dehydrogenasen das schwach gelbe Tetrazolium-Salz MTT zu einem dunkelblauen, wasserunlöslichem Formazanderivat umsetzen. Die optische Dichte des Farbstoffs entspricht dem Anteil der lebenden, stoffwechselaktiven Zellen.



#### 4.14.1 Untersuchung auf antivirale Effekte in den 3T3-Zelllinien

Zur Untersuchung auf antivirale Eigenschaften, wurden die stabil-transfizierten 3T3-IFRG28- und 3T3-pMX-PIE-Zellen auf 96-Lochplatten ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen des EMCV-Virus infiziert (vgl. Kapitel 3.4.2). Auf jeder Platte befand sich auch eine unbehandelte Zellkontrolle, die den spontanen LDH-Release bzw. den MTT-Einbau unter Normalbedingungen wiedergibt. Als Positivkontrolle dienten nicht-infizierte Kontrollzellen, deren maximale LDH-Freisetzung durch Lyse mit Triton X-100 bestimmt wurde (vgl. Abb. 4.14-1).



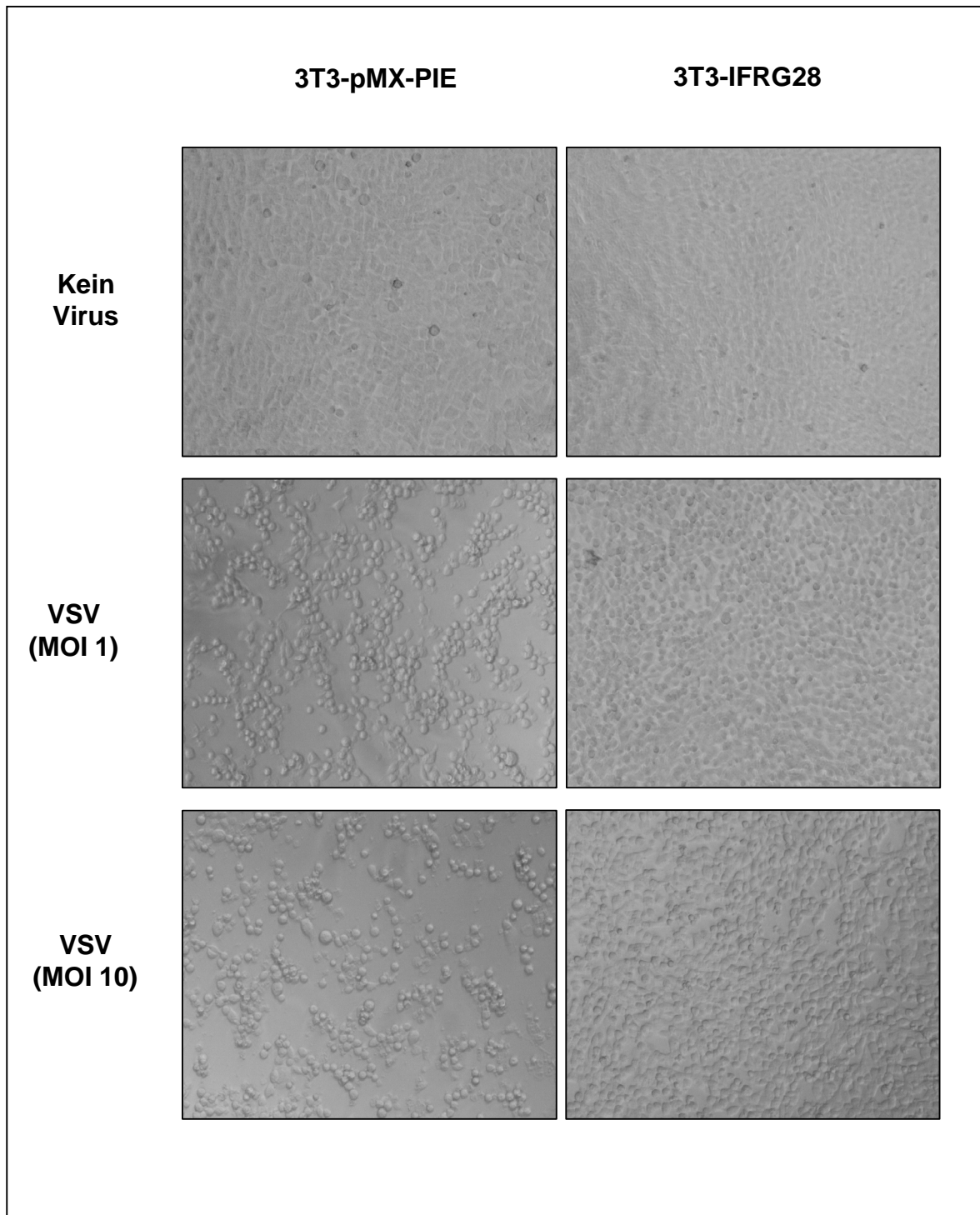
**Abb. 4.14-1 Einfluss einer EMCV-Infektion auf stabil-transfizierte 3T3-Zellen**

Die stabil-transfizierten Zelllinien 3T3-IFRG28 und 3T3-pMX-PIE wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^4$ /Kultur auf eine 96-Lochplatte ausgesät, wobei für jede Viruskonzentration 8 Werte zur Verfügung standen. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit verschiedenen EMCV-Dosen. Die Vitalität der Zellen wurde nach 16 h über die Freisetzung von LDH (A) bzw. den Einbau von MTT (B) bestimmt. Als Negativkontrolle (K) blieben 8 Werte uninfiziert. Die Lyse von unbehandelten Zellen mit Detergens ergab gleiche Werte für die LDH-Freisetzung, egal ob die Zellen IFRG28 konstitutiv exprimierten oder nicht (Daten nicht gezeigt).

In unbehandelten Kulturen konnten keine Unterschiede zwischen 3T3-pMX-PIE und 3T3-IFRG28 festgestellt werden, da sowohl die LDH-Freisetzung als auch der MTT-Einbau im gleichen Umfang stattfand (vgl. Abb. 4.14-1). Die untersuchten Messgrößen lassen demnach den Schluss zu, dass die konstitutive Expression des IFRG28 weder die Vitalität noch das Wachstum der 3T3-Zellen negativ beeinflusst.

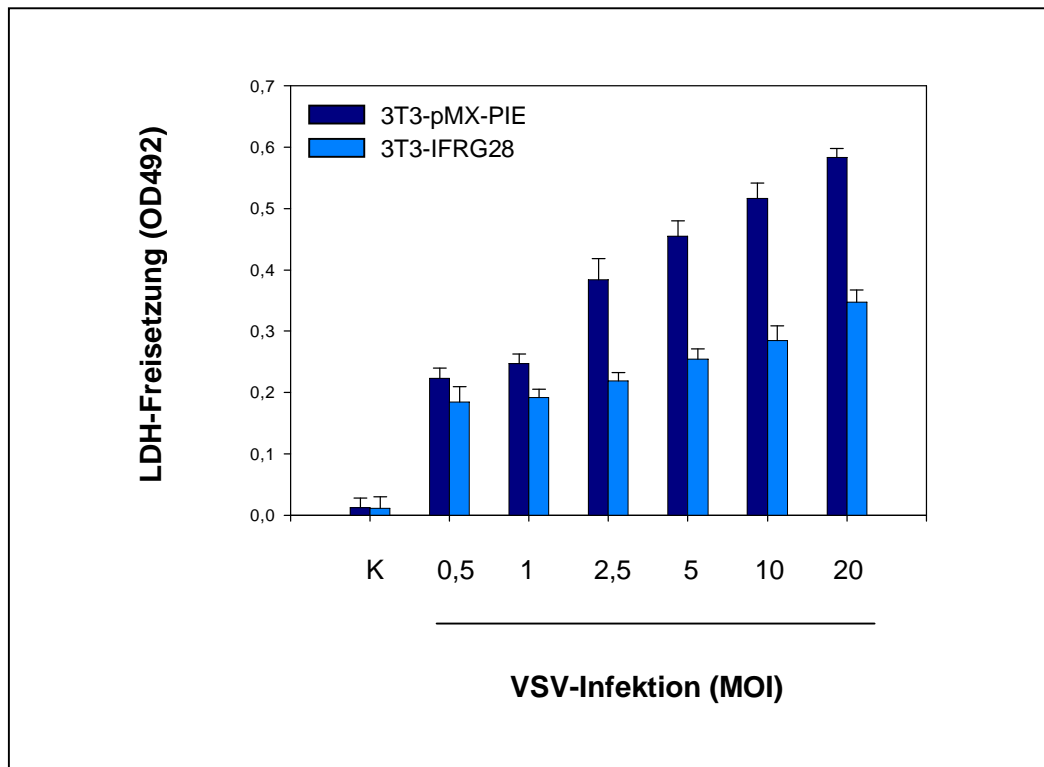
Beeindruckende Unterschiede ergaben sich allerdings 16 h nach Infektion mit EMCV. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die 3T3-pMX-PIE-Zellen bei gleichen Viruskonzentrationen wesentlich stärkere zytopathische Effekte. Dies drückte sich zum einen in einer geringeren MTT-Vitalfärbung und zum anderen in einer verstärkten Freisetzung von LDH aus. Wie aus Abb. 4.14-1 A ersichtlich, ist dieser Effekt bei niedrigeren Viruskonzentrationen deutlicher ausgeprägt. Denn hier waren die IFRG28-exprimierenden Zellen wesentlich stärker vor einer Virus-induzierten Lyse geschützt.

Um zu klären, ob es sich hierbei um eine generelle oder um eine spezifische antivirale Wirkung handelt, wurde der Versuch mit dem Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV) wiederholt (vgl. Abb. 4.14-3). Gleichzeitig wurden die zytopathischen Effekte durch mikroskopische Aufnahmen dokumentiert (vgl. Abb. 4.14-2).



**Abb. 4.14-2 Lichtmikroskopische Aufnahmen der VSV-infizierten Zelllinien 3T3-pMX-PIE und 3T3-IFRG28 bei unterschiedlichen Viruskonzentrationen**

Die stabil-transfizierten Zelllinien wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^4$ /Kultur auf eine 96-Lochplatte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit VSV. Nach weiteren 19 h wurden die Zellen unter Verwendung der Software Firecam fotografiert. Parameter: 10fach Vergrößerung; Gain 1.0.



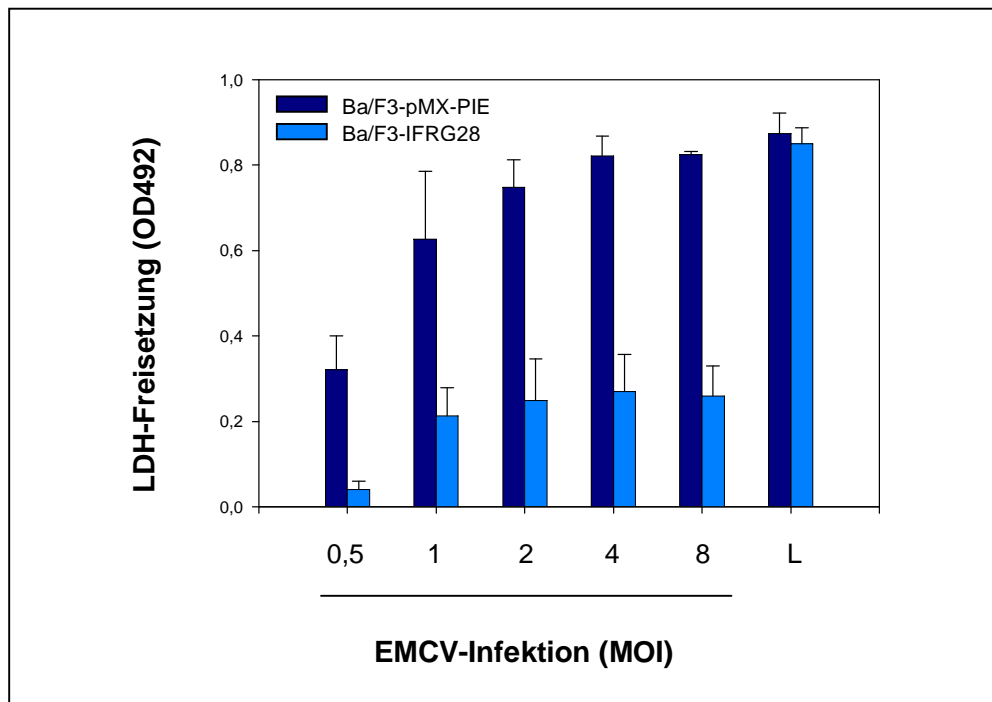
**Abb. 4.14-3 VSV-Infektion von stabil-transfizierten 3T3-Zellen**

Die stabil-transfizierten Zelllinien 3T3-IFRG28 und 3T3-pMX-PIE wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^4$ /Kultur auf eine 96-Lochplatte ausgesät, wobei für jede Viruskonzentration 6 Werte zur Verfügung standen. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit VSV. Die Vitalität der Zellen wurde nach 19 h über die Freisetzung von LDH bestimmt. Als Negativkontrolle (K) blieben 10 Werte uninfiziert, die in der Grafik die spontane LDH-Freisetzung wiedergeben.

Erstaunlicherweise konnte auch in diesem Experiment eine erhöhte virale Resistenz in den IFRG28-exprimierenden Zellen festgestellt werden, wobei die Infektionszeit mit 19 h nur unwesentlich länger war (vgl. Abb. 4.14-3). Vergleicht man die Ergebnisse des LDH-Assays mit den lichtmikroskopischen Aufnahmen, dann stellt man fest, dass sich die Unterschiede auch morphologisch äußern (vgl. Abb. 4.14-2). Während sich die infizierten Kontrollzellen bei einer MOI von 1 schon fast vollständig vom Plattenboden abgelöst hatten, waren die 3T3-IFRG28-Zellen noch mehrheitlich im Stadium des Abrundens.

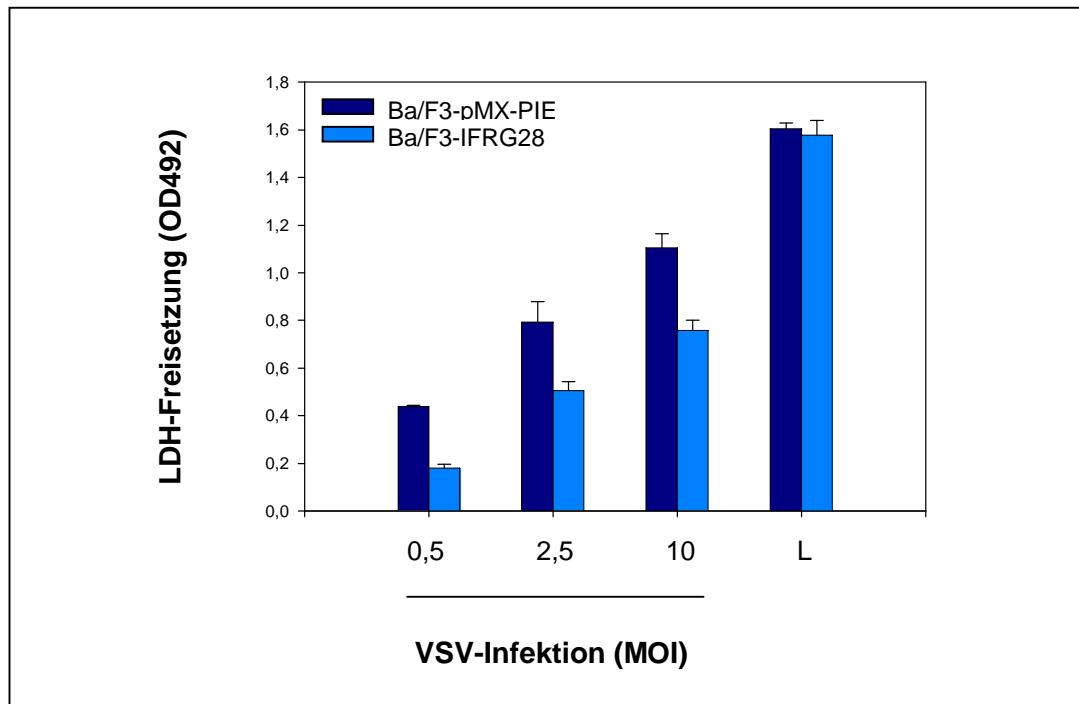
#### 4.14.2 Untersuchung auf antivirale Effekte in den Ba/F3-Zelllinien

Mit den beiden letzten Versuchen konnte gezeigt werden, dass IFRG28 in 3T3 protektive Eigenschaften gegenüber EMCV und VSV vermittelt. Im weiteren sollten die Ergebnisse mit den stabil-transfizierten Ba/F3-Zellen verifiziert werden. Für die Infektion mit EMCV wurde der gleiche Versuchsansatz wie unter 4.14.1 gewählt. Da sich die zytopathischen Effekte bei den Ba/F3-Zellen etwas später bemerkbar machten, wurde für EMCV die LDH-Aktivität im Überstand 42 h nach Infektion bestimmt (vgl. Abb. 4.14-4). Für die Analyse einer Protektion gegenüber VSV wurden die Zellen auf 24-Lochplatten ausgesät, wobei für jede Viruskonzentration Doppelwerte angelegt wurden (vgl. Abb. 4.14-5). Als Positivkontrolle dienten nicht-infizierte Kontrollzellen, deren maximale LDH-Freisetzung durch Lyse mit Triton X-100 bestimmt wurde.



**Abb. 4.14-4 EMCV-Infektion von stabil-transfizierten Ba/F3-Zellen**

Die stabil-transfizierten Zelllinien Ba/F3-IFRG28 und Ba/F3-pMX-PIE wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^4$ /Kultur auf eine 96-Lochplatte ausgesät, wobei für jede Viruskonzentration 6 Werte zur Verfügung standen. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit EMCV. Die Vitalität der Zellen wurde nach 42 h über die Freisetzung von LDH bestimmt. Für die Positivkontrolle (L) wurden 6 Werte lysiert. Der spontane LDH-Release von unbehandelten Zellen ergab für beide Zelllinien die gleichen Werte (Daten nicht gezeigt).



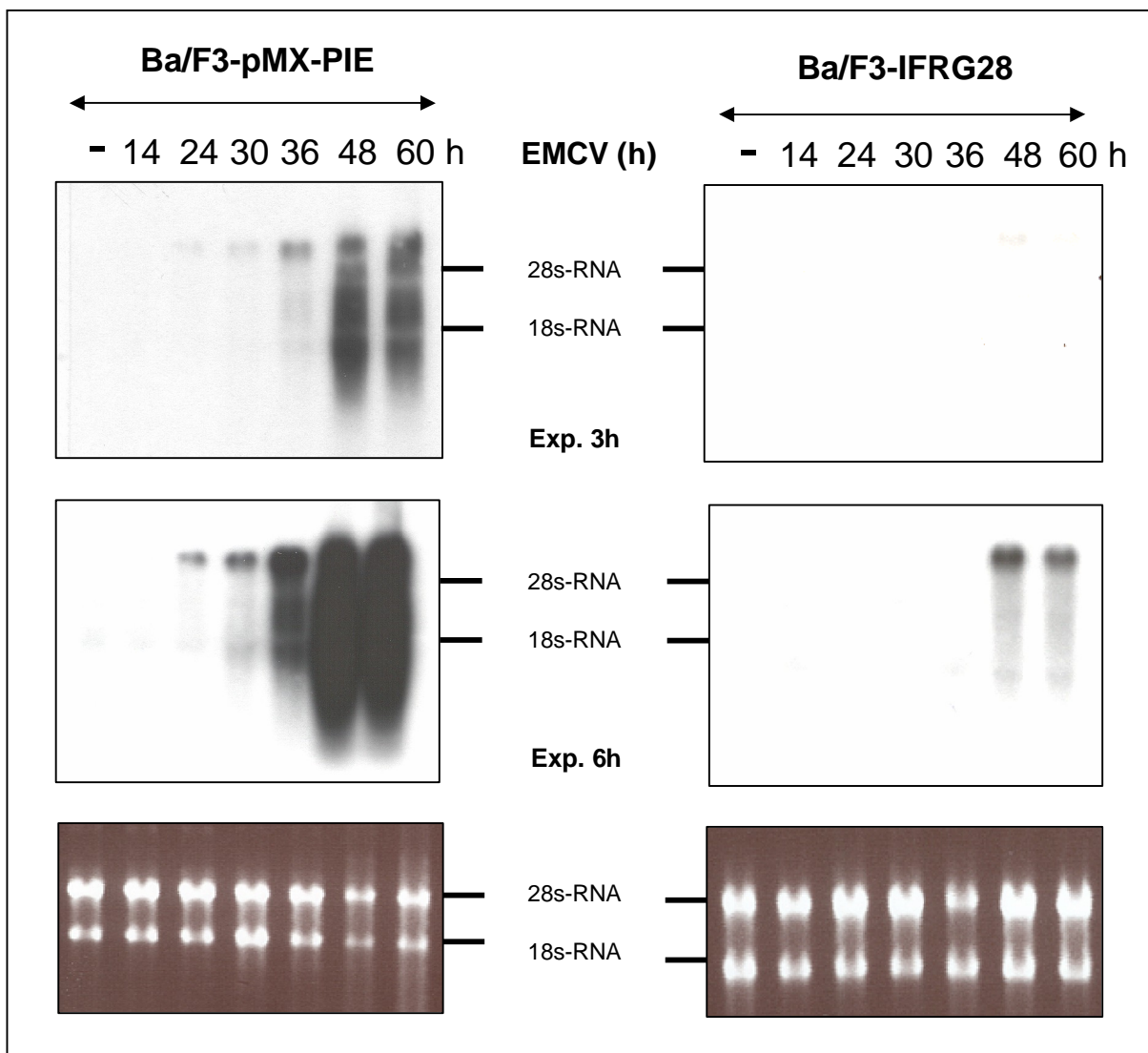
**Abb. 4.14-5 VSV-Infektion von stabil-transfizierten Ba/F3-Zellen**

Die stabil-transfizierten Zelllinien Ba/F3-IFRG28 und Ba/F3-pMX-PIE wurden in einer Dichte von  $6 \times 10^4$ /Kultur auf eine 24-Lochplatte ausgesät, wobei für jede Viruskonzentration Doppelwerte angelegt wurden. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit VSV. Die Vitalität der Zellen wurde nach 29 h über die Freisetzung von LDH bestimmt. Für die Positivkontrolle (L) wurden 2 Werte lysiert. Der spontane LDH-Release von unbehandelten Zellen ergab für beide Zelllinien die gleichen Werte (Daten nicht gezeigt).

Aus den Daten der LDH-Assays wurde ersichtlich, dass die IFRG28-exprimierenden Ba/F3-Zellen einen Schutz vor den zellschädigenden Einflüssen einer EMCV- und VSV-Infektion besitzen (vgl. Abb. 4.14-4/5). Besonders stark war der Unterschied in den EMCV-infizierten Zellen ausgeprägt, denn trotz hoher Dosen konnten hier keine vollständige Virus-vermittelte Lyse bewirkt werden. Beeindruckend ist auch, dass bei der niedrigsten Viruskonzentration (MOI 0,5) fast keine LDH-Freisetzung stattfand. Betrachtet man die Ergebnisse der VSV-Infektion, dann stellt man auch hier fest, dass bei niedrigen Viruskonzentrationen die Unterschiede am deutlichsten ausfallen. Allerdings muss angemerkt werden, dass der Schutz vor einer VSV-Infektion nicht so stark ausgebildet ist, wie der vor einer EMCV-Infektion. Dies erkennt man z.B. daran, dass sich bei sehr hohen Virusdosen die Werte der LDH-Freisetzung stärker angleichen als im vergleichbaren Versuch mit EMCV. Grund hierfür kann eine allgemein höhere Sensitivität der Ba/F3-Zellen gegenüber VSV sein. Dafür spricht die kürzere Infektionszeit von 29 h bis zum Auftreten des CPE. Demgegenüber konnten zytopathische Effekte in den EMCV-infizierten Zellen erst nach 42 h detektiert werden.

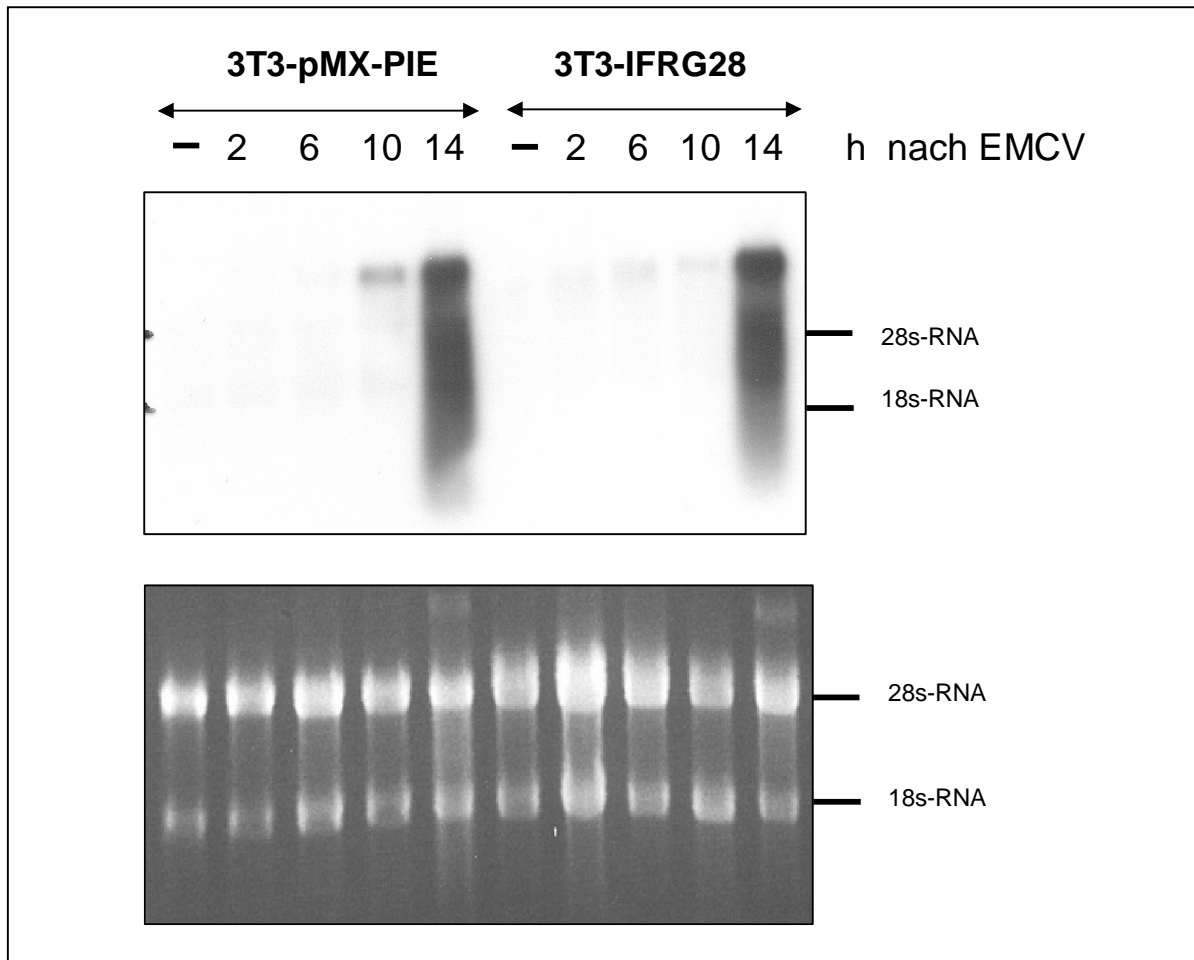
#### 4.14.3 Untersuchung zur EMCV-Replikation in 3T3 und Ba/F3

Die vorangegangenen Versuche haben gezeigt, dass die antiviralen Eigenschaften des IFRG28 besonders stark gegenüber EMCV ausgeprägt sind. In diesem Zusammenhang war es deshalb interessant, die EMCV-Replikation in den IFRG28-exprimierenden Zellen zu verfolgen. Dazu wurden RNA-Extrakte zu bestimmten Zeitpunkten aus den infizierten Ba/F3 und 3T3-Zelllinien hergestellt und nach Northern-Blot mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten EMCV-Sonde hybridisiert (vgl. Kapitel 3.1.18 zur Hybridisierung des Northern-Blots mit radioaktiv markierter DNA).



**Abb. 4.14-6 Northern-Blot zur EMCV-Replikation in den Ba/F3-Zelllinien**

Die stabil-transfizierten Zelllinien Ba/F3-IFRG28 und Ba/F3-pMX-PIE wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^6$ /Kultur auf 90 mm-Schalen ausgesät und am nächsten Tag mit EMCV (MOI 1) infiziert. Anschließend wurden nach den angegebenen Zeitpunkten RNA-Extrakte mit Hilfe des Biomol-Kits für Gesamt-RNA hergestellt, die in einem 1,2% Agarose-Gel ( $15 \mu\text{g}$  RNA/Spur) unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen wurden. Nach Hybridisierung mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten EMCV-Sonde wurden die Blots für 3 oder 6 h autoradiographiert. Vor der Durchführung des Northern-Blots wurden die aufgetragenen RNA-Mengen durch UV-Belichtung (266 nm) verifiziert.



**Abb. 4.14-7 Northern-Blot zur EMCV-Replikation in den 3T3-Zelllinien**

Die Proben wurden, wie unter Abb. 4.14-6 beschrieben, behandelt.

Den Ergebnissen der Northern-Blot-Analyse zu folge, wird die EMCV-Replikation in den Ba/F3-IFRG28-Zellen gehemmt, wobei über den gesamten Zeitraum deutliche Unterschiede zu den Kontrollzellen beobachtet wurden (vgl. Abb. 4.14-6). Im Gegensatz dazu war die Signalstärke in den untersuchten 3T3-Zellen vergleichbar, so dass für die 3T3-IFRG28-Zellen keine hemmenden Eigenschaften auf die virale Replikation nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb. 4.14-7).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die IFRG28-exprimierenden 3T3- und Ba/F3-Zellen im LDH-Assay eine erkennbare Resistenz gegenüber dem jeweils verwendeten Virus zeigten. Die zytopathischen Effekte waren nicht so stark ausgeprägt. Bei niedriger MOI ergaben sich meist deutlichere Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien. Dieses Ergebnis konnte für die Ba/F3-Zellen durch den Northern-Blot zur EMCV-Replikation bestätigt werden. Strittig bleibt die Frage, ob die Virusvermehrung in den analogen 3T3-Zellen ebenfalls gehemmt ist. Mit den bisherigen Versuchen konnte dies jedenfalls nicht belegt werden.



## 5. Diskussion

Die molekularen Mechanismen, über die IFN seine Wirkungen in den Zellen entfaltet, sind trotz intensiver Bemühungen erst teilweise aufgeklärt, so dass die Identifizierung und Charakterisierung weiterer IFN-induzierter Gene wohl die beste Chance für die Forschung auf diesem Gebiet darstellt. Der umfangreichste Teil dieser Arbeit setzt sich mit der biochemischen und funktionellen Charakterisierung des noch nicht weiter untersuchten IFN-induzierten Gens IFRG28 auseinander. Während der erste Punkt mit etablierten Standardmethoden relativ einfach zugänglich ist, stellt die Aufklärung möglicher Funktionen eine große Herausforderung dar. Ausgehend von einem 5'-RACE wurde zunächst der Transkriptionsstart bestimmt, quasi als Voraussetzung für die Herstellung von Reportergenkonstrukten. Dieser Startpunkt lag 22 Nukleotide oberhalb der bekannten cDNA. Durch Sequenzanalysen konnte gezeigt werden, dass sich an dieser Stelle ein konservierter Sequenzbereich befindet, der an Stelle eines TATA-Box-Motiv für den korrekten Start der mRNA verantwortlich ist [Fukue et al., 2004]. Dieses als „Initiator“ bezeichnete Element stellt die häufigste identifizierte Initiationsstelle für die Transkription der IFRG28-mRNA dar, daneben wurden aber auch cDNAs isoliert, deren Startpunkt sich oberhalb oder unterhalb davon befand. Nach sorgfältiger Untersuchung der proximalen Promotorregion wurde mit der heterologen Expression des IFRG28 in Bakterien begonnen, was mit einem eigens modifizierten und verbesserten Expressionsvektors durchgeführt wurde. Mit dem aufgereinigtem Protein wurde eine Sprague Dawley Ratte zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern und ein Kaninchen des Stammes NZW zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern immunisiert. Mit Hilfe der gewonnenen Antikörper war es möglich, die Expression des IFRG28 anhand von Western-Blot-Experimenten und Immunfluoreszenzen zu untersuchen. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit befasste sich mit der Frage, ob das IFN-induzierte Protein IFRG28 an der antiviralen Wirkung von IFN beteiligt ist und darüber hinaus auch apoptotische Wirkungen besitzt. Für einige IFN-induzierte Gene wurde in diesem Zusammenhang eine apoptotische Wirkung beschrieben, die jedoch erst nach viraler Infektion manifest wird [Tanaka et al., 1998; Barber, 2001; Balachandran et al., 2000]. Zu diesem Zweck wurden Zellen mit stabiler IFRG28-Expression hergestellt und anschließend untersucht, ob dadurch der Verlauf einer Virusinfektion beeinflusst wird.

## 5.1 Kontrollelemente im proximalen Promotorbereich

Zur Beantwortung der Frage, welche Sequenzmotive für die Induktion des IFRG28 verantwortlich sind, wurde eine computergestützte Analyse auf Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Als IFN-spezifische Kontrollelemente konnten im proximalen Promotorbereich drei ISRE-Motive sowie ein GAS-Element für STAT1-Homodimere identifiziert werden. In Übereinstimmung mit der Konsensussequenz fanden sich aber auch Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B, STAT3 und STAT5.

Durch Reporteranalysen von proximalen Deletionskonstrukten konnte klar gezeigt werden, dass die Induzierbarkeit der untersuchten Promotorregion in den ISRE begründet liegt (vgl. Kapitel 4.4). In diesem Zusammenhang erwies sich das Konstrukt LK1, in welchem die ISRE vom 3'-Ende deletiert wurden, als sehr nützlich, denn eine gesteigerte Promotoraktivität konnte nach IFN-Behandlung nicht mehr nachgewiesen werden. Des Weiteren scheinen aber auch die Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B, STAT3 und STAT5 die Promotoraktivität als cis-regulatorische Elemente positiv zu beeinflussen. Zwar nahm nach deren Deletion die Promotoraktivität nicht vollständig ab, doch eine Reduktion des Stimulationsfaktors war deutlich zu erkennen. Um zu prüfen, ob durch diese Transkriptionsfaktoren eine Expression des Reportergens bewirkt werden kann, wurden transfizierte Zellen mit TNF- $\alpha$  oder IL-6 behandelt. Während für TNF- $\alpha$  keine Induktion des Reportergens dokumentiert wurde, konnte in der IL-6 induzierten Probe eine leicht erhöhte Expression der Luciferase festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass IL-6 aktivierende Einflüsse auf die untersuchte Promotorregion besitzt. Auskunft über den tatsächlichen Sachverhalt können Mutationsanalysen geben, in denen die STAT3-Bindungsstelle inaktiviert ist und deren Einfluss auf die Promotoraktivität im Vergleich zum Ausgangsvektor LK5-1 analysiert wird. Dadurch könnte eindeutig geklärt werden, ob ein bindendes Element für STAT3 im proximalen Promotorbereich existiert. An dieser Stelle muss allerdings darauf verwiesen werden, dass sehr häufig solche Bindungsstellen im Promotorbereich von IFN-induzierten Genen vorkommen, aber an einer direkten Induktion derselben nicht beteiligt sind. Ronni et al. [1998] zeigten dies z.B. anhand des MxA-Promotors. Ähnlich zum IFRG28-Promotor besitzt auch dieser neben drei ISRE mehrere regulatorische Elemente für den IL-6 Signaltransduktionsweg und eine Bindungsstelle für NF $\kappa$ B. In diesem Fall blieb eine Aktivierung des Reportergens nicht nur nach TNF- $\alpha$  sondern auch nach IL-6 Stimulation aus. Somit ist die Existenz solcher Sequenzmotive keine Gewähr dafür, dass eine Induktion über diese Bindungsstellen auch erfolgen muss.

## 5.2 Mutationsanalyse der IFN-spezifischen Kontrollelemente

Im Rahmen der Promotoruntersuchung sollte auch geklärt werden, welches der drei proximalen ISRE durch IFN aktiviert werden kann und wie sich die einzelnen Motive eventuell gegenseitig beeinflussen. Dazu wurden die ISRE-Motive nacheinander durch Punktmutationen inaktiviert und im Vergleich zum Ausgangsvektor LK5-1 analysiert (vgl. Kapitel 4.5).

Es zeigte sich, dass jedes ISRE eine Induktion des Reportergens bewirken kann, wenngleich individuelle Unterschiede in ihrer Aktivität festgestellt wurden. Bei der Analyse von Konstrukten, in denen 2 der 3 Module inaktiviert waren, konnte dem Abstand zwischen den intakten Modulen eine wichtige Rolle zugeschrieben werden. Anscheinend muss ein Mindestabstand zwischen den Modulen bestehen, damit an jedes ISRE der Transkriptionskomplex ISGF3 binden kann. Diese Vermutung wird durch zwei Beobachtungen gestützt. Zum einen wird das Promotorprofil des IM 1, in dem der Abstand zwischen den intakten ISRE-Modulen 2 und 3 nur drei Nukleotide beträgt, hauptsächlich durch das stärkste Modul 2 geprägt, so dass in diesem Fall das Modul 3 keinen Beitrag zur Promotoraktivität leistet. Dies geht ganz eindeutig aus dem Vergleich mit dem Promotorprofil des IM 1-3 hervor, in dem nur das Modul 2 funktionell ist. Man erkennt, dass das Aktivitätsprofil des IM 1 dem des IM 1-3 gleicht (vgl. Abb. 4.5-2). Zum anderen brachte die Inaktivierung des Moduls 3 im Ausgangsvektors keine tiefgreifende Veränderung auf das Promotorprofil des IM 3 mit sich, wodurch dessen Funktion auf die Gesamtaktivität des LK5-1 fraglich ist. Will man nun dieser Frage nachgehen, müssten Nukleotide zwischen dem Modul 2 und 3 eingeführt werden und deren Einfluss auf die Promotoraktivität untersucht werden. Ergeben sich durch die Insertion synergistische Effekte auf den Maximalwert, kann dadurch der minimale Abstand zwischen zwei ISRE-Motiven bestimmt werden. Wie wichtig die Entfernung einzelner Promotorelementen sein kann, wurde z.B. am humanen Protein-C Promotor gezeigt [Spek et al., 1999]. In dieser Arbeit wurde durch Nukleotid-Insertionen der unmittelbare Abstand zwischen den leberspezifischen Bindungsstellen für HNF1/HNF6 und HNF3 erhöht und im Vergleich zur wt-Sequenz analysiert. Es stellte sich heraus, dass die Promotoraktivität durch Einfügen von Nukleotiden signifikant erhöht wird. Für diesen Befund wurden sterische Behinderungen im Ausgangsvektor verantwortlich gemacht, die eine simultane Besetzung beider Bindungsstellen unmöglich machen.

### 5.3 Identifizierung einer bisher unbekanntenen Splice-Variante des IFRG28

Mit dem aufgereinigten polyklonalen Antiserum konnte im Western-Blot ein zusätzliches Signal bei ~15 kD detektiert werden (vgl. Abb. 4.8-1). Dieser Befund legte die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine kürzere Splice-Variante des IFRG28 handeln könnte. Um diesen Verdacht zu überprüfen, wurden RT-PCR-Untersuchungen durchgeführt, mit denen auch eine zusätzliche Bande im Agarose-Gel nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 4.8-2). Die Klonierung dieses PCR-Fragmentes ergab, dass die ermittelte Nukleotidsequenz homolog zur genomischen DNA des IFRG28 ist und ein Splice-Produkt (*IFRG28s*) desselben darstellt, da sich die cDNA aus der Donor-Splice-Site des 1. Exons und einer verschobenen Akzeptor-Splice-Site des 2. Exons zusammensetzt. Allerdings stimmte das errechnete Molekulargewicht von 7 kD nicht mit der detektierten Proteinbande bei ~15 kD überein.

Dieser Widerspruch lässt zwei Schlussfolgerungen zu. Entweder stellt das zusätzliche Signal im Western-Blot eine anderes IFN-induziertes Protein dar, mit dem das Antiserum zufälligerweise kreuzreagiert, oder es handelt sich tatsächlich um die klonierte Splice-Variante, die ein atypisches Laufverhalten im SDS-PAGE zeigt. Um festzustellen, ob es sich bei dem detektierten Protein um das Genprodukt der identifizierten cDNA handelt, bieten sich zwei Möglichkeiten an. Die sicherste wäre, wenn man die Proteinsequenz ermitteln würde, wobei diese Methode mit dem hohen Aufwand einer Proteinaufreinigung verbunden wäre. Ein anderer und zugleich einfacherer Ansatz bestünde in der eukaryontischen Expression des *IFRG28s*. Ergeben sich in Zellextrakten aus transfizierten und induzierten Zellen Signale bei dem gleichem Molekulargewicht, könnte man mit hoher Sicherheit davon ausgehen, dass die identifizierte Splice-Variante zum detektierten Protein im Western-Blot translatiert wird.

Im Gegensatz zu den polyklonalen Antikörpern erkannte keiner der monoklonalen Antikörper die 15 kD-Bande im Western-Blot. Als mögliche Ursache kann hier der Antigen-Index und die Homologie zwischen dem Maus und Ratten-IFRG28 angeführt werden. Der Antigen-Index beschreibt die Wahrscheinlichkeit mit der eine bestimmte Proteinsequenz als Antigen in Frage kommt und errechnet sich aus der Oberflächenwahrscheinlichkeit, der Rückgrat-Flexibilität und der Sekundärstruktur der untersuchten Sequenz [Jameson und Wolf, 1988]. Der Vergleich beider IFRG28-

Proteine zeigte, dass in den ersten 54 Aminosäuren eine Homologie zu 91% besteht und keine längeren Abschnitte existieren, in denen sich die Sequenzen unterscheiden, damit eine Antikörperbildung wahrscheinlich wird. Dagegen ist die Homologie in den letzten 66 Aminosäuren mit 54% wesentlich geringer, so dass in diesem Bereich auch längere Sequenzabschnitte vorkommen, in denen sich beide Proteine unterscheiden. Gleichzeitig weist das IFRG28-Protein in dieser Region den höchsten Antigen-Index auf, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Reaktivität der monoklonalen Antikörper hier am größten ist. Als Nachweisverfahren für den hier geäußerten Verdacht, würde sich ein Peptid-Mapping anbieten, in dem die Reaktivität der monoklonalen Antikörper gegen kurze Proteinfragmente im ELISA geprüft wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Ansatz ebenfalls verfolgt. Es wurde versucht die letzten 66 Aminosäuren bakteriell zu exprimieren und auf ELISA-Platten zu adsorbieren. Leider ließ sich das aufgereinigte Fragment nicht auf die Plastikoberfläche verschiedener 96-Lochplatten binden, so dass keine eindeutigen Aussagen zur Reaktivität der Antikörper gemacht werden konnten.

#### **5.4 IFN-spezifische Expression des IFRG28-Proteins**

Die Reporteranalysen haben die Fragen zur Induktion des IFRG28 nur unzureichend beantwortet. Strittig blieb, ob IFRG28 durch IFN- $\gamma$ , IL-6 oder TNF- $\alpha$  induziert werden kann. Nach der Herstellung von monoklonalen Antikörper bestand nun auch die Möglichkeit, dieser Frage in den MEF der IFNAR<sup>-/-</sup> Linie nachzugehen. Da diese Zellen über keinen funktionellen Typ-I-IFN-Rezeptor verfügen, ist damit auch eine indirekte Induktion von IFRG28 über IFN- $\alpha$  ausgeschlossen.

Es stellte sich heraus, dass IFRG28 sehr wohl durch IFN- $\gamma$  induziert wird, obwohl Ausmaß und Geschwindigkeit der Induktion im Vergleich zu IFN- $\alpha$  wesentlich geringer sind (vgl. Abb. 4.10-1). Eine Begründung könnte in der IFN- $\gamma$  vermittelten Expression von IRF1 liegen, welches an bestimmte ISRE-Module bindet und als Transkriptionsfaktor die Expression von IFN- $\alpha$  induzierbaren Genen bewirken kann [Sims et al., 1993; Kimura et al., 1994]. Dafür spricht die verzögerte Expression des Proteins nach IFN- $\gamma$ , dem eine Induktion von IRF1 vorausgehen könnte. Als weitere Argumente können an dieser Stelle die Ergebnisse aus den Reporteranalysen mit dem Ausgangsvektor LK5-1 und IM 1-2-3, in dem alle ISRE-Module inaktiviert wurden, angeführt werden (vgl. Kapitel 4.6.1). In diesen Experimenten zeigten

Zellextrakte aus LK5-transfizierten Zellen zunächst eine gesteigerte Luciferase-Aktivität nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ . Wurden aber die Versuche in Gegenwart von neutralisierenden Antikörpern durchgeführt, nahm der Stimulationsfaktor erkennbar ab (vgl. Abb. 4.6-1). Der deutlichste Hinweis, dass die ISRE für die Induktion durch IFN- $\gamma$  essentiell sind, wurde mit Versuchen erbracht, in denen die Promotoraktivität des IM 1-2-3 untersucht wurde. In diesem Fall konnte keine Induktion des Reportergens nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass kein aktives GAS-Element im untersuchten Promotorbereich vorliegt.

Zur Klärung der Frage, ob IRF1 an die ISRE-Motive im IFRG28-Genpromotor bindet und damit eine Expression desselben induzieren kann, bieten sich Gel-Shift-Assays an, in denen die Affinität des IRF1 an die einzelnen Modulen untersucht wird. Zeigt sich kein Super-Shift in diesen Experimenten, so könnte diese Möglichkeit zumindest ausgeschlossen werden. Ist IRF-1 nachweisbar, sollte die Induktion von IFRG28 durch IFN- $\gamma$  in Zellen aus IRF1<sup>-/-</sup> Mäusen analysiert werden, wodurch diese Frage eindeutig beantwortet werden könnte. An dieser Stelle soll auch auf den begrenzten genomischen Abschnitt verwiesen werden, den man bei solchen Reporter-genanalysen untersucht. Es ist nicht auszuschließen, dass außerhalb der untersuchten Promotorregion GAS-Sequenzen existieren, die zu einer Induktion des IFRG28 durch IFN- $\gamma$  beitragen.

In den Reporter-genanalysen mit LK5-1 ließ sich die Expression der Luciferase nur schwach durch IL-6 induzieren, wodurch diesem Zytokin allenfalls modulierende Einflüsse zugesprochen werden konnten (vgl. Kapitel 4.6-2). Ein anderes Bild zeigten die analogen Zellversuche, in denen keine Induktion des IFRG28-Proteins durch IL-6 nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 4.10-2). Aus zellbiologischer Sicht, sind die Ergebnisse aus dem Western-Blot denen aus der Reporter-genstudie vorzuziehen, da letzteres ein artifizielles System darstellt, in dem genomische Abschnitte außerhalb ihrer chromosomalen Umgebung analysiert werden.

Ein einheitliches Bild zeigten die Versuche zu einer Induktion durch TNF- $\alpha$ , da sowohl im Reporter-gen-Assay als auch im entsprechenden Zellversuch keine Expression der Luciferase bzw. des IFRG28 festgestellt werden konnten. Demnach können die identifizierten Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B allein kein IFRG28 induzieren.

## 5.5 Subzelluläre Lokalisation des IFRG28-Proteins

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Lokalisation des IFRG28 mit Hilfe der monoklonalen Antikörper untersucht. Erste Experimente zu dieser Fragestellung machten eine Lokalisation mit kernnahen Strukturen des ER-Golgi-Komplexes wahrscheinlich, da sich die Fluoreszenzsignale in einer Art punktförmiger Verteilung in der Nähe des Zellkerns konzentrierten (vgl. Kapitel 4.12). Als vesikuläre Strukturen kamen u.a. COP-II-Vesikel in Frage, die aus drei Komponenten aufgebaut den Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat bewerkstelligen [Barlowe, 1998]. Einer dieser Komponenten ist der Sec13A/Sec31A Komplex, der zum Ausschleusen neugebildeter Vesikel aus dem ER an die so genannten „exit sites“ rekrutiert wird. Hierfür wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit Sec13A und Sec31A-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Ein weiteres Protein, das in diesem Zusammenhang analysiert wurde, war Yip1A. Im Gegensatz zu dem Sec13A/Sec31A-Komplex befindet sich Yip1A hauptsächlich an diesen „exit sites“. Tang et al. [2001] zeigten, dass dieses Protein an der Regulation des ER-Golgi-Transports beteiligt ist. Des Weiteren sollte eine mögliche Assoziation mit dem ER untersucht werden, weshalb Kollokalisationsstudien mit Calnexin-Antikörpern durchgeführt wurden. Nach der 1. Immunfärbung wurden die Markerproteine mit einem rot-fluoreszierenden und das IFRG28-Protein mit einem grün-fluoreszierenden Sekundärantikörper visualisiert.

Bei der Untersuchung auf eine Beteiligung am frühen sekretorischen Signalweg, vom ER zum Golgi, konnte durch die Überlagerung beider Signale keine gelbe Mischfarbe detektiert werden, wodurch eine Assoziation des IFRG28 mit COP-II-Vesikeln ausgeschlossen werden kann (vgl. Abb. 4.12-3). Eine partielle Überlappung der Signale konnte lediglich mit dem Calnexin-Antikörper detektiert werden. Dieser Befund könnte für einen temporären Aufenthalt des IFRG28 am ER sprechen, wie es z.B. auch für die COP-I-Vesikel nachgewiesen wurde. Ähnlich zu den COP-II-Vesikeln sind die COP-I-Vesikel aus mehreren Untereinheiten aufgebaut, zu denen u.a. die Proteine Ret2p ( $\sigma$ -Untereinheit), Ret3p ( $\zeta$ -Untereinheit) und Sec21p ( $\gamma$ -Untereinheit) zählen [Bednarek et al., 1996]. Ihre Aufgabe ist es Proteine vom cis- zum trans-Golgi-Apparat (anterograd) zu transportieren; daneben sind sie auch am Rücktransport vom Golgi zum ER (retrograd) involviert. Damit sind die COP-I-Vesikel im Vergleich zu den COP-II-Vesikeln über einen größeren Bereich der Zelle verteilt.

Betrachtet man die Immunfluoreszenzen der IFRG28-Probe unter diesen Gesichtspunkten genauer, so stellt man fest, dass die Signale nicht nur in der Nähe des Zellkerns vorkommen. Es hat vielmehr den Anschein, als ob sich die vesikulären Strukturen über das gesamte Zytoplasma auflösen würden, so dass Kollokalisationsstudien mit diesen COP-I-Strukturen durchaus interessant wären. Abgesehen von fluoreszenzoptischen Methoden, können auch elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Klärung des Aufenthaltsortes eines Proteins beitragen, da die verwendeten Instrumente eine viel höhere Auflösung besitzen und daher die subzelluläre Struktur besser darstellen.

## **5.6 Etablierung von transfizierten Zelllinien mit stabiler IFRG28-Expression**

Ziel dieser Doktorarbeit war es, neben der biochemischen Charakterisierung Hinweise zur Funktion des IFRG28-Proteins zu sammeln, wobei sich hierfür zwei unterschiedliche Ansätze anboten. Mit der RNA-Interferenz-Technik, wird gezielt und sehr wirksam die Aktivität von einem einzelnen Genen abgeschaltet (*knock out*) und dann die daraus resultierenden Effekte studiert. Diese Methode kann allerdings bei Säugerzellen auf Hindernisse stoßen, da kleine dsRNA als Effektormolekül die IFN-Produktion aktiviert oder sogar Apoptose auslöst. Ein weiterer Nachteil ist, dass dieses Verfahren nur auf konstitutiv exprimierte Gene anwendbar ist. Da es sich bei dem IFRG28 um ein IFN-induziertes Protein handelt, konnte daher dieser Ansatz nicht verfolgt werden. Als Alternative wurde deshalb die cDNA des IFRG28 in einen retroviralen Expressionsvektor kloniert, womit die stabil-transfizierten 3T3-IFRG28- und Ba/F3-IFRG28-Zelllinien hergestellt wurden. Dieses Verfahren gestattete es auch, den alleinigen Einfluss einer IFRG28-Expression auf die Zellphysiologie in Abwesenheit von IFN zu untersuchen. Um etwaige Befunde abzusichern, wurden mit dem verpackten Leervektor ebenfalls stabil-transfizierte 3T3-pMX-PIE und Ba/F3-pMX-PIE-Zellen hergestellt. Alle vier Zelllinien wurden anschließend auf ihre Puromycin-Resistenz selektioniert und im Western-Blot bzw. in der Immunfluoreszenz auf Expression analysiert (vgl. Kapitel 4.13).

Im Western-Blot war die Signalstärke der IFRG28-Expression in den transfizierten und induzierten 3T3-Zellen vergleichbar (vgl. Abb. 4.13-1). Im Fall der Ba/F3-Zellen konnten allerdings deutlichere Unterschiede festgestellt werden, wobei die Protein-



expression in den retroviral-infizierten Ba/F3-IFRG28 deutlich stärker war als in den induzierten Ba/F3-Zellen. Dies kann mehrere Gründe haben.

Einer davon ist sicherlich, dass die Ba/F3-Zellen generell wenig IFRG28 nach IFN-Stimulation bilden, wie ein Vergleich mit 3T3-Zellen zeigt (vgl. Abb. 4.13-1). Von Prietzsch et al. [2002] konnte in diesem Zusammenhang nachgewiesen werden, dass IFN- $\alpha$  die Expression von Cyclin E und verschiedenen D-Typ-Cyclinen in den Ba/F3-Zellen hemmt und damit als Gegenspieler zu den proliferativen Effekten des IL-3 auftritt. Dieser Befund kann für die Ba/F3 von besonderer Bedeutung sein, da deren Zellteilung fortwährend mit IL-3 stimuliert werden muss, ansonsten findet der Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase des Zellzyklus nur verzögert statt. Daneben konnte auch eine Hemmung auf die Cyclin-abhängigen-Kinasen (CDK) 2 und 4 festgestellt werden, über die eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F erfolgt. Diese IFN- $\alpha$  vermittelten Effekte können in den Ba/F3 eine Ursache für die geringe IFRG28-Expression nach IFN-Stimulation sein.

Zur weiteren Charakterisierung der transfizierten Zellen wurde die Lokalisation des IFRG28 im Vergleich zu den induzierten Zelllinien des Wildtyps untersucht (vgl. Abb. 4.13-2). Da sich adhärent wachsende Zellen besser auf Mikroskopie-Deckgläschen präparieren lassen, wurden für diese Untersuchungen die 3T3-Zellen den Ba/F3-Zellen vorgezogen. Es stellte sich heraus, dass sich die 3T3-IFRG28 in ihrer Fluoreszenzverteilung nicht von den induzierten wt-Zellen unterschieden. Allerdings zeigten die stabil-transfizierten 3T3-Zellen etwas stärkere Signale.

Der Grund weshalb im Western-Blot keine Unterschiede zwischen den induzierten und transfizierten 3T3-Zellen festgestellt wurden, aber die 3T3-IFRG28 stärkere Signale in der Immunfluoreszenz zeigten, könnte sehr wahrscheinlich in der Dauer der IFN-Induktion liegen. Im Western-Blot sollte die IFRG28-Proteinmenge einer transfizierten 3T3-Zelllinie mit der einer möglichst lang induzierten Probe verglichen werden. Dazu war es nötig, die wt-Zellen für min 30 h mit IFN zu stimulieren. Dagegen sollten in der Immunfluoreszenz Aussagen über die Lokalisation gemacht werden. Hierfür dürfen die Zellen aber keinen geschlossenen Zellrasen ausbilden, da ansonsten keine eindeutigen Angaben über den Aufenthaltsort eines Proteins gemacht werden können. Daher mussten die induzierten 3T3-Zellen bereits nach 16 h präpariert werden. Wie der Vergleich mit Abb. 4.10-1 zur Induktion des IFRG28 zeigt, steigt die Menge an exprimierten IFRG28 zwischen dem 8 und 48 h Wert noch

deutlich an, so dass nach 16 h weniger IFRG28-Protein in den Zellen vorliegen sollte als nach 30 h.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ba/F3-IFRG28 im Vergleich zum Wildtyp mehr IFRG28 exprimieren. Demgegenüber unterscheiden sich die 3T3-IFRG28 nur geringfügig von den induzierten 3T3-Zellen. Des Weiteren konnten keine negativen Einflüsse einer konstitutiven IFRG28-Expression auf das Wachstumsverhalten und die Zellmorphologie im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

### **5.7 Antivirale Aktivität des IFRG28 gegen EMCV und VSV**

Nachdem sichergestellt war, dass die Expression des IFRG28 in den stabiltransfizierten Zellen unter physiologischen Bedingungen stattfindet, konnte mit der funktionellen Charakterisierung des Proteins begonnen werden. Wichtige Aspekte waren in diesem Zusammenhang (i) die schnelle Induktion des Proteins durch IFN- $\alpha$  und (ii) die ausschließliche Expression nach IFN-Stimulation. Es wurden zwar noch weitere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- $\kappa$ B bzw. STAT3 identifiziert, doch eine alleinige Induktion durch TNF- $\alpha$  bzw. IL-6 konnte durch die entsprechenden Western-Blot-Experimente ausgeschlossen werden (vgl. Abb. 4.10-2). Damit unterliegt die Expression des IFRG28 nur der Kontrolle von IFN, weshalb IFRG28 einen der zahlreichen IFN-vermittelten Effekte ausführen sollte. Wie unter 4.14 schon dargelegt, zählt zu den eindrucksvollsten sicherlich deren antivirale Wirkung, die durch IFN-induzierte Gene zu Stande kommt. Zu den bekanntesten Vertretern dieser Gruppe von Proteinen zählen eindeutig die PKR, die RNase L und die Mx-Proteine. In Anbetracht der Vielfalt an verschiedenen Virusfamilien und der Tatsache, dass Viren zahlreiche Strategien entwickelt haben, mit denen sie die antiviralen Aktivitäten von IFN-induzierten Genen umgehen können, ist es sehr wahrscheinlich, dass Säugerzellen zu den oben genannten Proteinen noch weitere IFN-induzierte Mechanismen besitzen, mit denen Virusinfektionen abgewehrt werden können. Für die Existenz alternativer Signalwege sprechen Versuche an Mäusen, die durch Kreuzung aus RNase L<sup>-/-</sup>, PKR<sup>-/-</sup> und Mx<sup>-/-</sup> Linien hervorgingen [Zhou et al., 1999]. In dieser Studie wurde die Sterblichkeit dieser dreifach defizienten Mäuse nach EMCV-Infektion (100 PFU) im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Wie erwartet, hatte der Wildtyp eine höhere Überlebenschance, die es ihm ermöglichte durchschnittlich 3 - 4 Tage länger zu leben. Die Überlebensdauer konnte für die

Knock-out-Mäuse jedoch durch intraperitonealer Verabreichung von  $10^4$  IU IFN- $\alpha$  von 6 auf 8 Tage erhöht werden, wodurch angedeutet wird, dass noch weitere antiviral wirkenden Proteine durch IFN induziert werden.

Anhand der stabil-transfizierten Zelllinien konnte geprüft werden, ob IFRG28 an der Abwehr von Virusinfektionen beteiligt ist. Dazu wurden sowohl Zellen mit stabiler IFRG28-Expression als auch solche, die mit dem verpackten Leervektor infiziert wurden, auf 96-Lochplatten ausgesät und mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen an EMCV und VSV infiziert (vgl. Kapitel 4.14). Die Quantifizierung von zytotoxischen Effekten, die im Zuge einer Virusinfektion auftreten, erfolgte mit Hilfe des MTT- bzw. LDH-Assays. Durch beide Messgrößen konnte in diesen Versuchen gleichzeitig sichergestellt werden, dass keine Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den IFRG28-exprimierenden Zellen bestehen. Mit diesem Ergebnis wird noch einmal verdeutlicht, dass die konstitutive Expression des IFRG28 keinen Einfluss auf das Zellwachstum hat und beide Zelllinien damit auch vergleichbar sind.

Im weiteren stellte sich heraus, dass die IFRG28-exprimierenden Zellen geringere zytopathische Effekte nach Infektion mit EMCV bzw. VSV zeigten. Dabei war es egal, ob die Versuche mit den 3T3- oder mit den Ba/F3-Zelllinien durchgeführt wurden. In beiden Fällen konnten die protektiven Effekte des IFRG28 über die Hemmung der Freisetzung von LDH dokumentiert werden. Damit ist auch gewährleistet, dass die antivirale Aktivität kein Positionseffekt der integrierten DNA darstellt, sondern Ausdruck der IFRG28-Expression ist. Unterschiede ergaben sich allerdings für die Dauer der Infektion mit Virus. Während in den 3T3-Zellen die zytotoxischen Effekte bereits nach 16 h erkennbar wurden, zeigten sich diese in den Ba/F3 deutlich später (vgl. Abb. 4.14-1 und 4.14-4). Offenbar werden die Ba/F3-Zellen nicht so effizient mit diesen Viren infiziert, weshalb sich die Virus-vermittelte Lyse für VSV erst nach 42 h und die des EMCV nach 29 h einstellte. Die Infektionszeit betreffend kamen Meurs et al. [1992] zu vergleichbaren Ergebnissen, als sie die antiviralen Eigenschaften der PKR an transfizierten 3T3-Zellen mit stabiler PKR-Expression untersuchten. Ähnlich zu dem hier beschriebenen Ansatz diente als Zellkontrolle in dieser Versuchsreihe der transfizierte Leervektor. Sie stellten fest, dass sich Unterschiede in der EMCV-Replikation nach 12 h bemerkbar machten. Ein weiteres IFN-induziertes Protein, für welches ebenfalls antivirale Eigenschaften dokumentiert wurden, ist das humane Guanylat-Bindende-Protein-1 (hGBP-1). Allerdings sind die biologischen Effekte des hGBP-1 erst teilweise verstanden, so dass auf dessen Beschreibung in der

Einleitung verzichtet wurde. Neben der Affinität zu Guanylat besitzt hGBP-1 ein GTPase-Motiv als funktionelle Domäne, die GTP zu GDP und GMP hydrolysiert [Neun et al., 1996]. Untersuchungen zur EMCV- bzw. VSV-Replikation an adhären wachsenden Hela-Zellen ergaben, dass die zytopathischen Effekte in den Zellen, die das hGBP-1 konstitutiv exprimierten, nach 18 h deutlich schwächer waren als in denen des Wildtyps [Anderson et al., 1999]. Zur Quantifizierung wurde hierfür Kristallviolett verwendet, das ähnlich zum MTT nur lebende Zellen anfärbt. Analog zum hGBP-1 besitzt auch das murine GBP-2 (mGBP-2) eine antivirale Aktivität gegenüber EMCV und VSV. Für diesen Nachweis wurden von Carter et al. [2005] 3T3-Zellen mit stabiler mGBP-2-Expression (3T3-mGBP-2) hergestellt und im Vergleich zu einer GTPase-defizienten Mutante analysiert, die durch Substitution eines Serins durch Asparagin (S52N) generiert wurde. Auch hier stellte sich heraus, dass die Virusmenge in den S52N-exprimierenden Zellen nach 16 h mindestens doppelt so hoch war wie in den 3T3-mGBP2. Diese Resultate decken sich sehr gut mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, wonach Unterschiede in den zytopathischen Effekten in den 3T3-Zellen nach 16 h sichtbar wurden. Für die unterschiedliche Infektionszeit in den Ba/F3 bzw. 3T3-Zellen könnte auch das Wachstumsverhalten der Zelllinien verantwortlich gemacht werden, so dass die in Suspension wachsenden Ba/F3-Zellen nicht so effizient mit Virus infiziert werden.

Wie erwartet waren die Unterschiede bei einer niedrigen Viruskonzentration wesentlich stärker ausgeprägt. So konnten z.B. in den EMCV-infizierten 3T3-IFRG28-Zellen fast keine zytopathischen Effekte bei einer MOI von 1 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.14-1). Dies lässt vermuten, dass IFRG28 die zytotoxischen Effekte einer EMCV-Infektion bei niedrigen Virusdosen aufhalten bzw. antagonisieren kann. Eine Dosisabhängigkeit der protektiven Wirkung wurde auch für die PKR beschrieben [Meurs et al.; 1992]. In dieser Studie wurde die EMCV-Replikation in Zellen mit stabiler PKR-Expression untersucht. Dazu wurden Zellen mit unterschiedlich hohen Viruskonzentrationen infiziert und nach 12 h durch mehrmaliges Frieren und Tauen lysiert. Anschließend wurde der virushaltige Überstand auf Hela-Zellen titriert, deren Plaques nach drei Tagen durch Färbung mit Kristallviolett quantifiziert wurden. Es stellte sich heraus, dass sich die Virusmenge verdoppelt, wenn die MOI von 1 auf 5 angehoben wird. Als weiteres Beispiel kann an dieser Stelle die Untersuchung an dem IFN-stimulierten Gen 20 (ISG20) angeführt werden. Espert et al. [2003] konnten zeigen, dass die RNase-Domäne des ISG20

maßgeblich für die antivirale Wirkung gegen VSV, EMCV und Influenza-Virus verantwortlich ist, indem sie ISG20 konstitutiv in Hela-Zellen exprimierten und im Vergleich zu einer RNase-defizienten Mutante analysierten. In diesem Fall stieg die Menge an replizierendem VSV um den Faktor 28 an, nachdem die MOI von 0,1 auf 1 erhöht wurde.

Die protektiven Effekte gegenüber EMCV waren besonders hervorstechend in den Ba/F3-IFRG28-Zellen. In diesen Versuchen konnte selbst bei sehr hohen Virusdosen eine nur geringe LDH-Freisetzung detektiert werden (vgl. Abb. 4.14-4). Es hat den Anschein, als ob die IFRG28-vermittelten Effekte in den Ba/F3-Zellen besonders stark ausgeprägt sind. Als mögliche Ursache könnte die deutlich höhere IFRG28-Expression in den Ba/F3-IFRG28 in Frage kommen, denn der Vergleich mit dem Western-Blot-Ergebnis zeigt, dass diese Zellen deutlich mehr IFRG28 exprimieren als die analogen 3T3-Zellen (vgl. Abb. 4.13-1). Ein ähnlicher Befund wurde für das hGBP-1 gemacht, nach welchem zwei unterschiedlich stark exprimierende Klone transfizierter Zellen mit EMCV und VSV infiziert wurden [Anderson et al., 1999]. In dieser Untersuchung konnte eine höhere Resistenz für den stärker exprimierenden Klon nachgewiesen werden. Ein weiteres Beispiel, in welchem eine Korrelation zwischen der Höhe der Proteinexpression und der antiviralen Wirkung festgestellt wurde, stellt der Beitrag von Li et al. [1998b] zur antiviralen Wirkung der RNase L dar. In dieser Arbeit wurden 3T3-Zellen mit einem induzierbaren Expressionsvektor für die RNase L transfiziert und der zusätzliche Effekt einer induzierten Proteinexpression nach IFN-Behandlung analysiert. Durch Vitalfärbung mit einem modifizierten MTT-Reagenz konnte gezeigt werden, dass die antivirale Wirkung gegenüber EMCV in den induzierten und IFN-behandelten Zellen wesentlich stärker ausgeprägt war als in den IFN-behandelten Zellkontrollen.

Um festzustellen, ob IFRG28 eine hemmende Wirkung auf die virale RNA-Synthese ausübt, wie es z.B. für das murine Mx1 im Falle einer Influenza-Virus-Infektion nachgewiesen wurde [Pavlovic, Haller, und Staeheli, 1992], wurden RNA-Extrakte aus EMCV-infizierten 3T3- und Ba/F3-Zellen nach bestimmten Zeitintervallen hergestellt, im Agarose-Gel aufgetrennt und nach Northern-Blot mit einer radioaktiv markierten EMCV-Sonde hybridisiert (vgl. Kapitel 4.14-3).

Beeindruckenderweise konnte in dieser Untersuchung ein hemmender Einfluss auf die EMCV-Replikation in den Ba/F3-IFRG28 abgeleitet werden. Die Menge an EMCV-Transkripten war im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich reduziert, so

dass erst nach einer 6stündigen Exposition der radioaktiv markierten Filter EMCV-spezifische Signale in RNA-Extrakten aus Ba/F3-IFRG28-Zellen detektiert werden konnten (vgl. Abb. 4.14-6). Dieser Kinetik ist ebenfalls zu entnehmen, dass eine Replikation von EMCV in den Ba/F3-IFR28 hinausgezögert wird und erst allmählich nach 48 h einsetzt. Bis zu diesem Zeitpunkt konnten in diesen Zellen fast keine EMCV-Transkripte im Northern-Blot registriert werden. Demgegenüber konnten in dem analogen 3T3-Versuch keine Unterschiede auf die Virusreplikation festgestellt werden (vgl. Abb. 4.14-7). Offenbar ist der antivirale Effekt des IFRG28 in den Ba/F3-Zellen stärker ausgeprägt. Der Grund könnte, wie oben vermutet, in der Höhe der IFRG28-Expression liegen, so dass es sich vermutlich um einen dosisabhängigen Effekt der IFRG28-Expression handelt. Um dies zu prüfen, sollte der Versuch zur EMCV-Replikation bei einer niedrigeren Viruskonzentration in den 3T3-Zellen wiederholt werden. Ergibt sich in diesem Zusammenhang ein ähnliches Bild wie in den Ba/F3-Zellen, so wäre dies ein Beweis dafür, dass die Replikation des EMCV mit der Menge an exprimierten IFRG28 korreliert. Falls nicht, könnte dies auf eine zellspezifische Eigenschaft der Ba/F3-Zellen hindeuten. Dies ist allerdings sehr unwahrscheinlich, da in den 3T3-IFRG28 ebenfalls protektive Effekte über die Hemmung der Freisetzung von LDH dokumentiert wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Hinweise gefunden, die auf eine zusätzliche apoptotische Wirkung des IFRG28 hindeuten. Allerdings können Oligonukleotid-Arrays, die an fetalen RNA-Extrakten der Leber von DNase2a defizienten Mäusen (DNase<sup>-/-</sup>) durchgeführt wurden, dazu erste Anhaltspunkte liefern [Yoshida et al., 2005]. Bei der Dnase2 handelt es sich um ein Enzym, das von Makrophagen zum Abbau von DNA genutzt wird. Eine wichtige Funktion kommt diesem Protein bei der hepatischen Erythropoese zu, die bei Mäusen am 9. Tag nach der Befruchtung stattfindet. In dieser Phase stoßen die Erythrozyten-Vorläuferzellen ihren Kern aus, der anschließend von Makrophagen mit Hilfe der DNase2 degradiert wird. In dieser Studie wurde untersucht, weshalb DNase2<sup>-/-</sup> Mäuse das Embryostadium nicht überlebten. Hierfür wurde mit Hilfe eines DNA-Chips das Expressionsprofil von über 20.000 verschiedenen Genen untersucht. Es stellte sich heraus, dass in Makrophagen der fetalen Leber insgesamt 60 Gene verstärkt exprimiert werden, die allesamt IFN-induziert sind. Um den Zusammenhang einer IFN-vermittelten Apoptose näher zu prüfen, wurden deshalb heterozygote RNase-defiziente Mäuse (RNase<sup>+/-</sup>), die sich normal entwickelten, mit einer IFNAR<sup>-/-</sup> Linie gekreuzt.

---

Interessanterweise zeigten Mäuse, die in beiden Genen negativ homozygot waren, geringere letale Effekte, so dass sie nach der Geburt einen Zeitraum von mindestens 8 Wochen problemlos überlebten. Durch einen weiteren Oligonukleotid-Array wurde geklärt, bei welchen der 60 IFN-induzierten Gene die Expression wieder auf ein normales Niveau zurückkehrt. Vom Autor werden diesen insgesamt 13 IFN-induzierten Genen, zu denen u.a. auch IFRG28 gehört, eine mögliche Rolle in der IFN-vermittelten Apoptose während der Embryonalentwicklung zugeschrieben. Diese Studie liefert somit erste Hinweise, die auf eine zusätzliche apoptotische Wirkung des IFRG28 - entweder alleine, oder im Zusammenspiel mit anderen IFN-induzierten Genen - schließen lassen und daher eine Untersuchung auf apoptotische Effekte sehr interessant machen.

## 5.8 Ausblick

Zu den wichtigsten Fragen, die in dieser Arbeit unbeantwortet blieben, zählen die subzelluläre Lokalisation des IFRG28-Proteins und die molekularen Mechanismen, über die IFRG28 seine antiviralen und eventuell weiteren Wirkungen entfaltet.

Für weitere Lokalisations-Studien würden sich daher Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit Markerproteinen für COP-I-Vesikel, Clathrin-coated-Vesikel und Lysosome anbieten. In diesem Kontext könnte auch eine Beteiligung am anterograden Transport, vom cis zum trans Golgi, durch Infektion mit der temperatursensitiven VSV-Mutante *ts045* untersucht werden, da dessen Hüllprotein G temperaturabhängig vom ER zum Golgi-Apparat transportiert wird [Tang et al., 1997]. Bei 40°C wird eine Akkumulation dieses Proteins am ER beobachtet, die durch Reduktion der Temperatur auf 32°C aufgehoben wird, wodurch das Hüllprotein das ER über die „exit sites“ verlassen kann. Wird dagegen die Temperatur gleich auf 15°C gesenkt, verbleibt das G-Protein im ER-Golgi-Intermediat-Kompartiment. Unter diesen Bedingungen ist das Protein punktförmig über die gesamte Zelle verteilt. In Anbetracht, dass IFRG28 auch die zytopathischen Effekte von VSV antagonisiert, könnte dieser Ansatz durchaus interessant sein.

Da sich die Untersuchungen zur antiviralen Wirkung in dieser Arbeit auf die beiden RNA-Viren EMCV und VSV beschränkten, sollte im weiteren geklärt werden, ob IFRG28 ebenfalls die Replikation von DNA-Viren hemmen kann. Für diese Untersuchungen würde sich u.a. die Adeno-Virus-Mutante *AdCMV-beta-Gal* anbieten, die das Reportergen für die  $\beta$ -Galaktosidase unter einem CMV-Promotor konstitutiv exprimiert. Durch histochemisches Anfärben infizierter Zellen ließe sich leicht die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmen und damit Aussagen zur viralen Proteinexpression machen.

Durch eine computergestützte Analyse auf funktionelle Domänen des IFRG28-Proteins konnten keine Homologien mit bekannten Proteinen identifiziert werden. Die einzigen Besonderheiten sind eine Prolin-reiche Sequenz und die schon angesprochene Transmembranregion am C-terminalen Ende. Kay et al. [2002] beschrieben in diesem Zusammenhang, dass Interaktionen zwischen Proteinen sehr



häufig über Prolin-reiche Motive vermittelt werden. Daher wäre es interessant, den Einfluss dieser Region auf die antivirale Wirkung des IFRG28 zu untersuchen. Damit könnte geklärt werden, ob für diese Aktivität die Interaktion mit einem weiteren Protein erforderlich ist. Hierfür müsste ein retroviraler Expressionsvektor konstruiert werden, in dem dieser Sequenzbereich deletiert ist. In einem weiteren Ansatz könnte auch die hydrophobe Transmembranregion entfernt werden. Neben Hinweisen zu den molekularen Mechanismen, können diese Analysen auch zur Lokalisation des IFRG28 beitragen, wie es z.B. für das UL56-Genprodukt des Herpes-Simplex-Virus 2 gezeigt wurde [Koshizuka et al., 2002]. In dieser Arbeit konnten durch Deletionsmutanten des UL56-Proteins die hydrophobe Region am C-terminalen Ende und die Prolin-reiche Sequenz für die Lokalisation des Proteins am Golgi-Apparat bzw. in den zytoplasmatischen Vesikeln verantwortlich gemacht werden.

## 6. Literatur

- Adolf, G.R., Maurer-Fogy, I., Kalsner, I., and Cantell, K. 1990. Purification and characterization of natural human interferon omega 1. Two alternative cleavage sites for the signal peptidase. *J. Biol. Chem.* 265:9290-9295.
- Anderson, S.L., Carton, J.M., Lou, J., Xing, L., and Rubin, B.Y. 1999. Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology* 256:8-14.
- Arnheiter, H., Frese, M., Kambadur, R., Meier, E., and Haller, O. 1996. Mx transgenic mice--animal models of health. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 206:119-147.
- Asano, A., Jin, H.K., and Watanabe, T. 2003. Mouse Mx2 gene: organization, mRNA expression and the role of the interferon-response promoter in its regulation. *Gene* 306:105-113.
- Bach, E.A., Tanner, J.W., Marsters, S., Ashkenazi, A., Aguet, M., Shaw, A.S., and Schreiber, R.D. 1996. Ligand-induced assembly and activation of the gamma interferon receptor in intact cells. *Mol. Cell Biol.* 16:3214-3221.
- Balachandran, S., Kim, C.N., Yeh, W.C., Mak, T.W., Bhalla, K., and Barber, G.N. 1998. Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *EMBO J.* 17:6888-6902.
- Balachandran, S., Roberts, P.C., Kipperman, T., Bhalla, K.N., Compans, R.W., Archer, D.R., and Barber, G.N. 2000. Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *J. Virol.* 74:1513-1523.
- Bandyopadhyay, S.K., Leonard, G.T., Jr., Bandyopadhyay, T., Stark, G.R., and Sen, G.C. 1995. Transcriptional induction by double-stranded RNA is mediated by interferon-stimulated response elements without activation of interferon-stimulated gene factor 3. *J. Biol. Chem.* 270:19624-19629.
- Barber, G.N. 2001. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death. Differ.* 8:113-126.
- Barlowe, C. 1998. COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 1404:67-76.
- Barnard, P., and McMillan, N.A. 1999. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology* 259:305-313.
- Bass, B.L. 1997. RNA editing and hypermutation by adenosine deamination. *Trends Biochem. Sci.* 22:157-162.

- Bass,B.L., and Weintraub,H. 1988. An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate. *Cell* 55:1089-1098.
- Bazan,J.F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:6934-6938.
- Bednarek,S.Y., Orci,L., and Schekman,R. 1996. Traffic COPs and the formation of vesicle coats. *Trends Cell Biol.* 6:468-473.
- Bonnet,M.C., Weil,R., Dam,E., Hovanessian,A.G., and Meurs,E.F. 2000. PKR stimulates NF-kappaB irrespective of its kinase function by interacting with the IkappaB kinase complex. *Mol. Cell Biol.* 20:4532-4542.
- Braganca,J., Genin,P., Bandu,M.T., Darracq,N., Vignal,R., Casse,C., Doly,J., and Civas,A. 1997. Synergism between multiple virus-induced factor-binding elements involved in the differential expression of interferon A genes. *Journal of Biological Chemistry* 272:22154-22162.
- Briscoe,J., Rogers,N.C., Witthuhn,B.A., Watling,D., Harpur,A.G., Wilks,A.F., Stark,G.R., Ihle,J.N., and Kerr,I.M. 1996. Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state. *EMBO J.* 15:799-809.
- Carter,C.C., Gorbacheva,V.Y., and Vestal,D.J. 2005. Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain. *Arch. Virol.*
- Casey,J.L., and Gerin,J.L. 1995. Hepatitis D virus RNA editing: specific modification of adenosine in the antigenomic RNA. *J. Virol.* 69:7593-7600.
- Cattaneo,R. 1994. Biased (A-->I) hypermutation of animal RNA virus genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:895-900.
- Cayley,P.J., Davies,J.A., McCullagh,K.G., and Kerr,I.M. 1984. Activation of the ppp(A2'p)nA system in interferon-treated, herpes simplex virus-infected cells and evidence for novel inhibitors of the ppp(A2'p)nA-dependent RNase. *Eur. J. Biochem.* 143:165-174.
- Chu,W.M., Ostertag,D., Li,Z.W., Chang,L., Chen,Y., Hu,Y., Williams,B., Perrault,J., and Karin,M. 1999. JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity.* 11:721-731.
- Civas,A., Island,M.L., Genin,P., Morin,P., and Navarro,S. 2002. Regulation of virus-induced interferon-A genes. *Biochimie* 84:643-654.
- Colamonici,O., Yan,H., Domanski,P., Handa,R., Smalley,D., Mullersman,J., Witte,M., Krishnan,K., and Krolewski,J. 1994. Direct binding to and tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of the type I interferon receptor by p135tyk2 tyrosine kinase. *Mol. Cell Biol.* 14:8133-8142.

- Daly,C., and Reich,N.C. 1995. Characterization of specific DNA-binding factors activated by double-stranded RNA as positive regulators of interferon alpha/beta-stimulated genes. *J. Biol. Chem.* 270:23739-23746.
- Darnell,J.E., Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-1635.
- Darnell,J.E., Jr., Kerr,I.M., and Stark,G.R. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415-1421.
- Decker,T., Kovarik,P., and Meinke,A. 1997. GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.* 17:121-134.
- Der,S.D., Zhou,A., Williams,B.R., and Silverman,R.H. 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:15623-15628.
- Dreiding,P., Staeheli,P., and Haller,O. 1985. Interferon-induced protein Mx accumulates in nuclei of mouse cells expressing resistance to influenza viruses. *Virology* 140:192-196.
- Du,W., Thanos,D., and Maniatis,T. 1993. Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements. *Cell* 74:887-898.
- Espert,L., Degols,G., Gongora,C., Blondel,D., Williams,B.R., Silverman,R.H., and Mechti,N. 2003. ISG20, a new interferon-induced RNase specific for single-stranded RNA, defines an alternative antiviral pathway against RNA genomic viruses. *J. Biol. Chem.* 278:16151-16158.
- Farrar,M.A., and Schreiber,R.D. 1993. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 11:571-611.
- Frese,M., Kochs,G., Meier-Dieter,U., Siebler,J., and Haller,O. 1995. Human MxA protein inhibits tick-borne Thogoto virus but not Dhori virus. *J. Virol.* 69:3904-3909.
- Fukue,Y., Sumida,N., Nishikawa,J., and Ohyama,T. 2004. Core promoter elements of eukaryotic genes have a highly distinctive mechanical property. *Nucleic Acids Res.* 32:5834-5840.
- Gao,J., Morrison,D.C., Parmely,T.J., Russell,S.W., and Murphy,W.J. 1997. An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 272:1226-1230.
- Garcin,D., Latorre,P., and Kolakofsky,D. 1999. Sendai virus C proteins counteract the interferon-mediated induction of an antiviral state. *J. Virol.* 73:6559-6565.

- Ghosh,A., Sarkar,S.N., Rowe,T.M., and Sen,G.C. 2001. A specific isozyme of 2'-5' oligoadenylate synthetase is a dual function proapoptotic protein of the Bcl-2 family. *J. Biol. Chem.* 276:25447-25455.
- Gil,J., Alcami,J., and Esteban,M. 1999. Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB. *Mol. Cell Biol.* 19:4653-4663.
- Greenlund,A.C., Farrar,M.A., Viviano,B.L., and Schreiber,R.D. 1994. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J.* 13:1591-1600.
- Griffith,O.W., and Stuehr,D.J. 1995. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol* 57:707-736.
- Guo,J., Hui,D.J., Merrick,W.C., and Sen,G.C. 2000a. A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3. *EMBO J.* 19:6891-6899.
- Guo,J., Peters,K.L., and Sen,G.C. 2000b. Induction of the human protein P56 by interferon, double-stranded RNA, or virus infection. *Virology* 267:209-219.
- Guo,J., and Sen,G.C. 2000. Characterization of the interaction between the interferon-induced protein P56 and the Int6 protein encoded by a locus of insertion of the mouse mammary tumor virus. *J. Virol.* 74:1892-1899.
- Haller,O., Frese,M., and Kochs,G. 1998. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev. Sci. Tech.* 17:220-230.
- Iordanov,M.S., Paranjape,J.M., Zhou,A., Wong,J., Williams,B.R., Meurs,E.F., Silverman,R.H., and Magun,B.E. 2000. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase by double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus: involvement of RNase L, protein kinase R, and alternative pathways. *Mol. Cell Biol.* 20:617-627.
- Isaacs,A., and Lindenmann,J. 1987. Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J. Interferon Res.* 7:429-438.
- Jameson,B.A., and Wolf,H. 1988. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput. Appl. Biosci.* 4:181-186.
- Jin,H.K., Takada,A., Kon,Y., Haller,O., and Watanabe,T. 1999. Identification of the murine Mx2 gene: interferon-induced expression of the Mx2 protein from the feral mouse gene confers resistance to vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 73:4925-4930.
- Kay,B.K., Williamson,M.P., and Sudol,M. 2000. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 14:231-241.

- Kerr, I.M. 1987. The 2-5A system: a personal view. *J. Interferon Res.* 7:505-510.
- Kim, S., and Ponka, P. 2000. Effects of interferon-gamma and lipopolysaccharide on macrophage iron metabolism are mediated by nitric oxide-induced degradation of iron regulatory protein 2. *J. Biol. Chem.* 275:6220-6226.
- Kim, T.K., and Maniatis, T. 1997. The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome. *Mol. Cell* 1:119-129.
- Kimura, T., Nakayama, K., Penninger, J., Kitagawa, M., Harada, H., Matsuyama, T., Tanaka, N., Kamijo, R., Vilcek, J., Mak, T.W., and . 1994. Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons. *Science* 264:1921-1924.
- Koshizuka, T., Goshima, F., Takakuwa, H., Nozawa, N., Daikoku, T., Koiwai, O., and Nishiyama, Y. 2002. Identification and characterization of the UL56 gene product of herpes simplex virus type 2. *J. Virol.* 76:6718-6728.
- Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Pollack, B.P., Mariano, T.M., Donnelly, R.J., Muthukumar, G., Cook, J.R., Garotta, G., Silvennoinen, O., Ihle, J.N., and . 1995. Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex. *J. Biol. Chem.* 270:20915-20921.
- LaFleur, D.W., Nardelli, B., Tsareva, T., Mather, D., Feng, P., Semenuk, M., Taylor, K., Buergin, M., Chinchilla, D., Roshke, V., Chen, G., Ruben, S.M., Pitha, P.M., Coleman, T.A., and Moore, P.A. 2001. Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 276:39765-39771.
- Leung, S., Qureshi, S.A., Kerr, I.M., Darnell, J.E., Jr., and Stark, G.R. 1995. Role of STAT2 in the alpha interferon signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 15:1312-1317.
- Levanon, E.Y., Hallegger, M., Kinar, Y., Shemesh, R., Djinovic-Carugo, K., Rechavi, G., Jantsch, M.F., and Eisenberg, E. 2005. Evolutionarily conserved human targets of adenosine to inosine RNA editing. *Nucleic Acids Res.* 33:1162-1168.
- Li, M., Lee, H., Guo, J., Neipel, F., Fleckenstein, B., Ozato, K., and Jung, J.U. 1998a. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor. *J. Virol.* 72:5433-5440.
- Li, X.L., Blackford, J.A., and Hassel, B.A. 1998b. RNase L mediates the antiviral effect of interferon through a selective reduction in viral RNA during encephalomyocarditis virus infection. *J. Virol.* 72:2752-2759.
- Liu, C.J., Wang, H., and Lengyel, P. 1999. The interferon-inducible nucleolar p204 protein binds the ribosomal RNA-specific UBF1 transcription factor and inhibits ribosomal RNA transcription. *EMBO J.* 18:2845-2854.
- Maas, S., Melcher, T., Herb, A., Seeburg, P.H., Keller, W., Krause, S., Higuchi, M., and O'Connell, M.A. 1996. Structural requirements for RNA editing in

- glutamate receptor pre-mRNAs by recombinant double-stranded RNA adenosine deaminase. *J. Biol. Chem.* 271:12221-12226.
- Marecki,S., and Fenton,M.J. 2000. PU.1/Interferon Regulatory Factor interactions: mechanisms of transcriptional regulation. *Cell Biochem. Biophys.* 33:127-148.
- Marie,I., Durbin,J.E., and Levy,D.E. 1998. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* 17:6660-6669.
- Mathews,M.B. 1995. Structure, function, and evolution of adenovirus virus-associated RNAs. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199 ( Pt 2):173-187.
- Matsumoto,M., Tanaka,N., Harada,H., Kimura,T., Yokochi,T., Kitagawa,M., Schindler,C., and Taniguchi,T. 1999. Activation of the transcription factor ISGF3 by interferon-gamma. *Biol. Chem.* 380:699-703.
- Matsuyama,T., Kimura,T., Kitagawa,M., Pfeffer,K., Kawakami,T., Watanabe,N., Kundig,T.M., Amakawa,R., Kishihara,K., Wakeham,A., and . 1993. Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development. *Cell* 75:83-97.
- Meurs,E., Chong,K., Galabru,J., Thomas,N.S., Kerr,I.M., Williams,B.R., and Hovanessian,A.G. 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62:379-390.
- Meurs,E.F., Watanabe,Y., Kadereit,S., Barber,G.N., Katze,M.G., Chong,K., Williams,B.R., and Hovanessian,A.G. 1992. Constitutive expression of human double-stranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth. *J. Virol.* 66:5805-5814.
- Michel,T., and Feron,O. 1997. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J. Clin. Invest* 100:2146-2152.
- Miller,D.M., Zhang,Y., Rahill,B.M., Waldman,W.J., and Sedmak,D.D. 1999. Human cytomegalovirus inhibits IFN-alpha-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. *J. Immunol.* 162:6107-6113.
- Min,W., Ghosh,S., and Lengyel,P. 1996. The interferon-inducible p202 protein as a modulator of transcription: inhibition of NF-kappa B, c-Fos, and c-Jun activities. *Mol. Cell Biol.* 16:359-368.
- Mogensen,K.E., Lewerenz,M., Reboul,J., Lutfalla,G., and Uze,G. 1999. The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J. Interferon Cytokine Res.* 19:1069-1098.

- Murphy, D.G., Dimock, K., and Kang, C.Y. 1991. Numerous transitions in human parainfluenza virus 3 RNA recovered from persistently infected cells. *Virology* 181:760-763.
- Neun, R., Richter, M.F., Staeheli, P., and Schwemmle, M. 1996. GTPase properties of the interferon-induced human guanylate-binding protein 2. *FEBS Lett.* 390:69-72.
- Nickolaus, P. 1996. Charakterisierung des If-1<sup>l</sup>-Effekts und molekulare Klonierung von Interferon-induzierbaren cDNAs. Dissertation Uni-Heidelberg
- Novick, D., Cohen, B., and Rubinstein, M. 1994. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 77:391-400.
- Pavlovic, J., Haller, O., and Staeheli, P. 1992. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J. Virol.* 66:2564-2569.
- Penix, L.A., Sweetser, M.T., Weaver, W.M., Hoeffler, J.P., Kerppola, T.K., and Wilson, C.B. 1996. The proximal regulatory element of the interferon-gamma promoter mediates selective expression in T cells. *J. Biol. Chem.* 271:31964-31972.
- Pine, R., Decker, T., Kessler, D.S., Levy, D.E., and Darnell, J.E., Jr. 1990. Purification and cloning of interferon-stimulated gene factor 2 (ISGF2): ISGF2 (IRF-1) can bind to the promoters of both beta interferon- and interferon-stimulated genes but is not a primary transcriptional activator of either. *Mol. Cell Biol.* 10:2448-2457.
- Pitossi, F., Blank, A., Schroder, A., Schwarz, A., Hussi, P., Schwemmle, M., Pavlovic, J., and Staeheli, P. 1993. A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins. *J. Virol.* 67:6726-6732.
- Ponten, A., Sick, C., Weeber, M., Haller, O., and Kochs, G. 1997. Dominant-negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. *J. Virol.* 71:2591-2599.
- Prietzsch, H., Brock, J., Kleine, H.D., Liebe, S., and Jaster, R. 2002. Interferon-alpha inhibits cell cycle progression by Ba/F3 cells through the antagonisation of interleukin-3 effects on key regulators of G(1)/S transition. *Cell Signal.* 14:751-759.
- Qureshi, S.A., Leung, S., Kerr, I.M., Stark, G.R., and Darnell, J.E., Jr. 1996. Function of Stat2 protein in transcriptional activation by alpha interferon. *Mol. Cell Biol.* 16:288-293.
- Ronco, L.V., Karpova, A.Y., Vidal, M., and Howley, P.M. 1998. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* 12:2061-2072.



- Ronni,T., Matikainen,S., Lehtonen,A., Palvimo,J., Dellis,J., Van,E.F., Goetschy,J.F., Horisberger,M., Content,J., and Julkunen,I. 1998. The proximal interferon-stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *J. Interferon Cytokine Res.* 18:773-781.
- Sarkar,S.N., Bandyopadhyay,S., Ghosh,A., and Sen,G.C. 1999. Enzymatic characteristics of recombinant medium isozyme of 2'-5' oligoadenylate synthetase. *J. Biol. Chem.* 274:1848-1855.
- Sato,M., Tanaka,N., Hata,N., Oda,E., and Taniguchi,T. 1998. Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene. *FEBS Lett.* 425:112-116.
- Sharp,T.V., Schwemmle,M., Jeffrey,I., Laing,K., Mellor,H., Proud,C.G., Hilse,K., and Clemens,M.J. 1993. Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic Acids Res.* 21:4483-4490.
- Shors,T., Kibler,K.V., Perkins,K.B., Seidler-Wulff,R., Banaszak,M.P., and Jacobs,B.L. 1997. Complementation of vaccinia virus deleted of the E3L gene by mutants of E3L. *Virology* 239:269-276.
- Sims,S.H., Cha,Y., Romine,M.F., Gao,P.Q., Gottlieb,K., and Deisseroth,A.B. 1993. A novel interferon-inducible domain: structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter. *Mol. Cell Biol.* 13:690-702.
- Spek,C.A., Bertina,R.M., and Reitsma,P.H. 1999. Unique distance- and DNA-turn-dependent interactions in the human protein C gene promoter confer submaximal transcriptional activity. *Biochem. J.* 340 ( Pt 2):513-518.
- Symons,J.A., Alcamì,A., and Smith,G.L. 1995. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell* 81:551-560.
- Tanaka,N., Sato,M., Lamphier,M.S., Nozawa,H., Oda,E., Noguchi,S., Schreiber,R.D., Tsujimoto,Y., and Taniguchi,T. 1998. Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. *Genes Cells* 3:29-37.
- Tang,B.L., Ong,Y.S., Huang,B., Wei,S., Wong,E.T., Qi,R., Horstmann,H., and Hong,W. 2001. A membrane protein enriched in endoplasmic reticulum exit sites interacts with COPII. *J. Biol. Chem.* 276:40008-40017.
- Tang,B.L., Peter,F., Krijnse-Locker,J., Low,S.H., Griffiths,G., and Hong,W. 1997. The mammalian homolog of yeast Sec13p is enriched in the intermediate compartment and is essential for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *Mol. Cell Biol.* 17:256-266.

- Thanos,D. 1996. Mechanisms of transcriptional synergism of eukaryotic genes - The interferon-beta paradigm. *Hypertension* 27:1025-1029.
- Vilcek,J.T. 1996. Cytokines in 1995. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7:103-106.
- Weaver,B.K., Kumar,K.P., and Reich,N.C. 1998. Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1. *Mol. Cell Biol.* 18:1359-1368.
- Yan,H., Krishnan,K., Greenlund,A.C., Gupta,S., Lim,J.T., Schreiber,R.D., Schindler,C.W., and Krolewski,J.J. 1996. Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (IFN $\alpha$ R1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein. *EMBO J.* 15:1064-1074.
- Yie,J., Merika,M., Munshi,N., Chen,G., and Thanos,D. 1999. The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN-beta enhanceosome. *EMBO J.* 18:3074-3089.
- Yoshida,H., Okabe,Y., Kawane,K., Fukuyama,H., and Nagata,S. 2005. Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA. *Nat. Immunol.* 6:49-56.
- Yoshimoto,T., Takeda,K., Tanaka,T., Ohkusu,K., Kashiwamura,S., Okamura,H., Akira,S., and Nakanishi,K. 1998. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J. Immunol.* 161:3400-3407.
- Zamanian-Daryoush,M., Mogensen,T.H., DiDonato,J.A., and Williams,B.R. 2000. NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. *Mol. Cell Biol.* 20:1278-1290.
- Zhang,F., Wang,D.Z., Boothby,M., Penix,L., Flavell,R.A., and Aune,T.M. 1998. Regulation of the activity of IFN-gamma promoter elements during Th cell differentiation. *J. Immunol.* 161:6105-6112.
- Zhou,A., Paranjape,J., Brown,T.L., Nie,H., Naik,S., Dong,B., Chang,A., Trapp,B., Fairchild,R., Colmenares,C., and Silverman,R.H. 1997. Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *EMBO J.* 16:6355-6363.
- Zhou,A., Paranjape,J.M., Der,S.D., Williams,B.R., and Silverman,R.H. 1999. Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways. *Virology* 258:435-440.

## 7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rainer Zawatzky danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die intensive Förderung des Projekts, seine ständige Bereitschaft über aktuelle Problemstellungen zu diskutieren und seine Geduld bei der Durchsicht der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Gert Fricker danke ich für die Beurteilung der Arbeit. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Jürgen Reichling und Herrn Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte für die Mitwirkung in meiner Disputation und die Bereitschaft die Arbeit zu prüfen.

Bei Heribert Wurmbäck und Anita Weyland möchte ich mich für die hilfreiche Unterstützung im Labor, die netten Gespräche am Arbeitsplatz, die belebenden Kaffeepausen und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre ausdrücklich bedanken.

Für sehr unterhaltsame Diskussionen über Gesellschaft, Politik und Computertechnik bedanke ich mich bei Herrn Prof. Charles Knopf, Frau Dr. Elke Kehm und Frau Dr. Sabine Schenk.

Dank auch an Herrn Dr. Ralf Spannagel, der mir als treuer Gefährte im Labor zur Seite stand.

Bei den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. Frank Rösl und Frau Dr. Ingrid Hoffmann; mein besonderer Dank gilt hierbei Frau Dr. Anastasia Bachmann und meinen beiden Kollegen Daniel und Alex.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Herrn Dr. Peter Sehr für die zahlreichen Tipps im Umgang mit der French-Press sowie für dessen Ratschläge zur Aufreinigung bakteriell exprimierter Proteine.

Herbert Spring für die tollen Aufnahmen am konfokalen Mikroskop.

Der größte Dank gilt meinen lieben Eltern! In erster Linie für ihre permanente Unterstützung in allen Belangen und natürlich auch für die Finanzierung meines Pharmazie-Studiums. Vielen Dank !!! Bei meiner Schwester Rabea bedanke ich mich für ihre aufbauende Art und ihre Motivation in sportlichen Aspekten. Meiner Freundin Alime Can, die es im Verlauf der Doktorarbeit nicht immer leicht mit mir hatte, danke ich für ihre Geduld und die sehr schöne Zeit, die wir dennoch in good old Heidelberg hatten.