

**Untersuchungen zur Suppression der IFN- $\beta$ -Induktion  
durch Proteine des Hepatitis A-Virus, unter besonderer  
Berücksichtigung des HAV/2B-Proteins**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

im Fachbereich Biologie / Chemie  
der Universität Bremen

vorgelegt von

**Rebecca Lia Schwarz**

Bremen, Januar 2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Angelika Vallbracht
2. Gutachter: PD Dr. Bernd Kazmierczak

## **Erklärung gemäß § 6 Abs. 5 der Promotionsordnung**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zur Suppression der IFN- $\beta$ -Induktion durch Proteine des Hepatitis A-Virus, unter besonderer Berücksichtigung des HAV/2B-Proteins“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Bremen, den 19.01.2011

Rebecca Lia Schwarz

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Paulmann D., Magulski T., Schwarz R., Heitmann L., Flehmig B., Vallbracht A.  
& Dotzauer A.:

**Hepatitis A virus protein 2B suppresses beta interferon (IFN) gene  
transcription by interfering with IFN regulatory factor 3 activation**

Journal of General Virology (2008), 89: 1593-1604

## Danksagung

Meine Doktorarbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Menschen nicht möglich gewesen. Deshalb geht von Herzen folgender Dank an:

Frau Prof. Dr. Angelika Vallbracht für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit am Institut für Virologie durchführen zu können, für ihre Unterstützung während der theoretischen und praktischen Arbeit, vor allem aber für ihre Offenheit, Gesprächsbereitschaft und nicht zuletzt für ihr Vertrauen in mich.

Herrn PD Dr. Bernd Kazmierczak, der so freundlich war, die Rolle des Zweitgutachters zu übernehmen und dessen Vorlesungen während meines Studiums stets erfrischend und lehrreich waren.

Ein Besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Andreas Dotzauer für seine bereitwillige Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit. Danken möchte ich auch für seine hilfreiche und stetige Betreuung und Beratung, vor allem aber für seine ständige Diskussionsbereitschaft und Geduld dabei.

Zusätzlich geht ein großer Dank an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe für die schöne Zeit, das angenehme Arbeitsklima, eine nette Zusammenarbeit und für die ständige Hilfsbereitschaft. Hier danke ich besonders Leena Krämer, Oliver Janssen-Weets, Dajana Paulmann, Sonja Händschke, Erna Domsgen und Thomas Magulski.

Renate Mester, Heike Kettler, Gisela Gunkel und Beate Piel danke ich für ihr Engagement. Ohne sie wäre ein reibungsloser Laborbetrieb nicht möglich gewesen.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie. Meine Eltern Heike und Ulrich Schwarz haben mir einen kontinuierlichen Rückhalt während meiner gesamten Ausbildung gegeben, haben mich immer unterstützt und allzeit an mich geglaubt. Meine Schwester Theresa Schwarz hatte immer ein offenes Ohr für mich, konnte mich stets aufmuntern und mir gut zureden.

Nicht zuletzt geht ein besonderer Dank an meinen Freund Tim Weilandt für seine immer währende Unterstützung. Tim hat immer Verständnis für mich gehabt und es stets geschafft, mich aufzumuntern und aufzubauen. Ohne ihn wäre ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

# Inhaltsverzeichnis

## ABKÜRZUNGEN

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Interferonsystem</b>	<b>1</b>
1.1.1	Das Interferon- $\beta$ -Enhanceosom	2
1.1.2	Interferon- $\beta$ -Induktion	5
1.1.3	Der Transkriptionsfaktor IRF-3	11
<b>1.2</b>	<b>Suppression der Interferon-<math>\beta</math>-Induktion durch HAV</b>	<b>14</b>
<b>1.3</b>	<b>Das Hepatitis A-Virus</b>	<b>15</b>
1.3.1	Die Nicht-Strukturproteine 2B und 2C des Hepatitis A-Virus	20
1.3.2	Zellkulturadaption des Hepatitis A-Virus	23
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>27</b>
2.1.1	Viren	27
2.1.2	Zellen	27
2.1.3	Kompetente Bakterien	27
2.1.4	Plasmide	28
2.1.5	Synthetische Nukleinsäuren	30
2.1.5.1	<i>RT-PCR-Primer zur Amplifikation der cDNA von HAV-Proteinen (biomers)</i>	30
2.1.5.2	<i>Primer für die Sequenzierung der cDNA von HAV-Proteinen (biomers)</i>	31
2.1.5.3	<i>Sonstige Nukleotide</i>	32
2.1.6	Antibiotika	32
2.1.7	Antikörper, Enzyme und sonstige Proteine	33
2.1.7.1	<i>Antikörper</i>	33
2.1.7.2	<i>Enzyme</i>	33
2.1.7.3	<i>Sonstige Proteine</i>	33
2.1.8	Kits und Standards	34
2.1.9	Puffer, Lösungen und Kulturmedien	34
2.1.10	Chemikalien und Reagenzien	38
2.1.11	Verbrauchsmaterialien	40
2.1.12	Geräte und Hilfsmittel	41
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>43</b>
2.2.1	Zellkultivierung von FRhK-4-Zellen	43
2.2.2	Mycoplasmen-Test mittels PCR (VenorGeM)	43
2.2.3	Bestimmung der Zellzahl	43
2.2.4	Herstellung eines NDV-Pools und Bestimmung der TCID <sub>50</sub> /ml mittels Endpunkttitration	44
2.2.5	NDV-Infektion	44
2.2.6	Herstellung eines HAV/7-Pools und Bestimmung der TCID <sub>50</sub> /ml mittels Endpunkttitration	45
2.2.7	Infektion von FRhK-4-Zellen mit HAV/7 bzw. mit Mock-Lysat	46
2.2.8	Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von HAV-Antigen	46
2.2.9	Extraktion von HAV-RNA	47
2.2.9.1	<i>Extraktion von HAV-RNA mit peqGOLD TriFast™</i>	47
2.2.9.2	<i>Extraktion von HAV-RNA mit dem QIAamp® Viral RNA Kit</i>	47
2.2.9.3	<i>Extraktion von HAV-RNA aus Patientenstuhl mit dem QIAamp® DNA Stool Mini Kit</i>	48
2.2.10	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zur Amplifikation der cDNA von HAV-Proteinen	48
2.2.11	Präparation von Vektor und Insert	49
2.2.11.1	<i>Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment</i>	49

2.2.11.2	<i>Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation</i>	50
2.2.11.3	<i>Restriktionsenzymspaltung von DNA</i>	50
2.2.11.4	<i>Dephosphorylierung von Plasmid-DNA</i>	51
2.2.11.5	<i>DNA-Reinigung mit LMP-Agarose</i>	51
2.2.11.6	<i>Ligations-Reaktion</i>	52
2.2.12	Vermehrung und Isolierung von Plasmiden	52
2.2.12.1	<i>Transformation kompetenter Bakterien</i>	52
2.2.12.2	<i>Schnelltest zur Überprüfung von Plasmid-DNA (Miniprep)</i>	53
2.2.12.3	<i>Vermehrung und Isolierung bakterieller Plasmid-DNA mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (Maxiprep)</i>	54
2.2.12.4	<i>Restriktionsspaltungsanalyse nach der Maxiprep</i>	55
2.2.13	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	56
2.2.14	Agarose-Gelelektrophorese	56
2.2.15	Sequenzierung der cDNA der HAV-Proteine	57
2.2.16	Transfektion von FRhK-4 Zellen mittels PEI	57
2.2.17	Zelllyse nach der <i>Freeze &amp; Thaw</i> -Methode	58
2.2.18	Proteinbestimmung nach Bradford	58
2.2.19	Luciferase-Assay	59
2.2.20	Immunfluoreszenz	59
2.2.21	Anfärben von Mitochondrien mit MitoTracker Rot	61
2.2.22	MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität	61
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>63</b>
<b>3.1</b>	<b>Einfluss von HAV/7-Proteinen auf die IRF-3-Aktivierung</b>	<b>63</b>
3.1.1	Einfluss von HAV/7-Proteinen auf die NDV-induzierte IRF-3-Aktivierung	64
3.1.2	Einfluss von HAV/7-Proteinen auf die RIG-I-vermittelte IRF-3-Aktivierung	66
3.1.3	Einfluss von HAV/7-Proteinen auf die MAVS-vermittelte IRF-3-Aktivierung	68
3.1.4	Einfluss von HAV/7-Proteinen auf die TBK1- und IKK $\epsilon$ -vermittelte IRF-3-Aktivierung	70
<b>3.2</b>	<b>Untersuchung zur Lokalisation von HAV/7-2B in FRhK-4-Zellen</b>	<b>73</b>
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen des 2B- und 2C-Proteins aus HAV-Wildtypen</b>	<b>77</b>
3.3.1	Sequenzvergleiche der codierenden Regionen der 2B-Proteine aus Zellkultur-adaptierten und Wildtyp HAV-Varianten	78
3.3.2	Einfluss von HAV-2B aus HAV-Wildtypen auf die Aktivierung von IRF-3	81
3.3.3	Sequenzvergleiche der codierenden Regionen der 2C-Proteine aus Zellkultur-adaptierten und Wildtyp HAV-Varianten	85
3.3.4	Einfluss von HAV-2C aus HAV-Wildtypen auf die Proteinexpression	88
3.3.5	Untersuchung der Cytotoxizität von verschiedenen 2C-Proteinen auf FRhK-4-Zellen	89
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>92</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>111</b>

# Abkürzungen

AGMK-Zellen	Primary African green monkey kidney Zellen
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP-1	Activating protein 1
AS	Aminosäure
ASGPR	Asialoglykoprotein-Rezeptor
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATF-2	Activating transcription factor-2
BLAST	basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BS-C-1	African green monkey kidney Zellen
CARD	Caspase recruitment domain
Cardif	CARD adaptor inducing IFN- $\beta$
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CBP	CREB-binding protein (homolog zu p300)
cDNA	complementary DNA
cER	kristalloides ER
c-Jun	cellular v-jun homolog
CMV	Cytomegalievirus
CPE	Cytopathischer Effekt
CREB	cAMP response element (CRE)-binding protein
CTL	Cytotoxischer T-Lymphozyt
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DBD	DNA-Bindedomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DRAF1	dsRNA-activated factor 1
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2 $\alpha$	eukaryotic (translation) initiation factor 2 $\alpha$
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERIS	Endoplasmic reticulum IFN stimulator
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FRhK-4-Zellen	Fetal Rhesus monkey kidney Zelllinie-4
g	Erdbeschleunigung (9,80665 m/s)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
GP-Zellen	Guinea pig Zellen (Meerschweinchen-Zellen)
h	Stunde
HAV	Hepatitis A-Virus
HAVcr-1	HAV cellular receptor-1
HAVcyt	cytopathogenes HAV
HCV	Hepatitis C-Virus
HMG-I(Y)	High mobility group protein-I(Y)
HRP	Horseradish Peroxidase
IAD	IRF association domain
IBiD	IRF-3-binding domain
ID	autoinhibitorische Domäne
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKAP	IKK-complex-associated protein
I $\kappa$ B	Inhibitor of NF- $\kappa$ B

IKK	I $\kappa$ B kinase (Komplex aus IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ und IKK $\gamma$ )
IKK $\epsilon$	Inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase $\epsilon$
IL	Interleukin
IPS-1	IFN- $\beta$ promoter stimulator 1
IRES	Internal ribosomal entry site
IRF	Interferon regulatory factor
ISG	Interferon-stimulated gene
ISRE	Interferon-stimulated response element
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LCPS	Luminescence counts per second
LMP	Low melting point
Luc	Luciferase
MAM	Mitochondrien-assoziierte ER-Membran
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAVS	Mitochondrial antiviral signaling protein
MCS	Multiple cloning site
MDA-5	Melanoma differentiation-associated gene-5
MHC	Major histocompatibility complex
MITA	Mediator of IRF3 activation
MOI	Multiplicity of infection
MPYS	N-terminal methionine-proline-tyrosine-serine amino acid sequence
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Mx	Myxovirus resistance
NADH	Nicotinamadeninidinukleotid
NADPH	Nicotinamadeninidinukleotidphosphat
NAP1	NAK-associated protein 1
NDV	Newcastle Disease-Virus
NEMO	NF- $\kappa$ B essential modifier
NES	Nuclear export signal
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLS	Nuclear localization signal
nt	Nukleotid
NRD	Negative regulatory domain
NRF	NF- $\kappa$ B-repressing factor
NTR	nicht-translatierte Region
OAS	2',5'-Oligoadenylatsynthetase
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame
p38	Mitogen-activated protein kinase 38
p300	300 kDa-Protein (homolog zu CBP)
PABP	poly(A)-binding protein
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PCBP2	poly(rC)-binding protein
PCR	Polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimin
p.i.	post infection
pIgR	polymerer Immunglobulin-Rezeptor
PKR	dsRNA-activated protein kinase R
poly(IC)	poly-Inosinsäure:poly-Cytidylsäure
PRD	Positive regulatory domain (II, III-I, IV des IFN- $\beta$ -Enhancers)
PRDI-BF1	PRDI-binding factor 1
PTB	Polypyrimidine tract binding protein
RD	Regulatorische Domäne
rER	rauhes ER
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene-I
RIP1	receptor-interacting protein 1

RNA	Ribonukleinsäure
RNase L	latente Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
siRNA	short interfering RNA
ssRNA	einzelsträngige RNA
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STING	Stimulator of interferon genes
SV40	Simian virus 40
TAB1/2	TAK1-binding protein 1/2
TAE	Tris Acetat EDTA-Puffer
TAK1	transforming growth factor $\beta$ -activated kinase 1
TANK	TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator
TBK1	TANK-binding kinase 1
TBP	TATA-Box binding protein
TCID <sub>50</sub>	Tissue culture infectious dose 50%
TFIID	Transkriptionsfaktor D der RNA-Polymerase II
TICAM-1	TIR domain-containing adaptor molecule 1
TIM-1	T cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-1
TIR	Toll/IL-1 receptor homology domain
TNF	Tumor necrosis factor
TLR	Toll-like receptor
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRIF	TIR-domain containing adaptor inducing IFN- $\beta$
U	Unit (Einheit)
Ub	Ubiquitin
VAK	Virus-activated kinase
VISA	Virus-induced signaling adaptor
VPg	Virus protein genome-associated
VT	Volumenteil
v/v	volume / volume
WT	Wildtyp
w/v	weight / volume
ZK	Zellkultur

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Interferonsystem

Virale Infektionen lösen die angeborene und die adaptive Immunantwort aus, welche für das Überleben des Wirts essentiell sind. Eine sehr effektive antivirale Immunantwort ist die Produktion und Sekretion von Interferonen (IFNs). Interferone wurden erstmals im Jahre 1957 von Isaacs und Lindenmann beschrieben. Hier stellte man fest, dass ein sezerniertes Makromolekül die Fähigkeit besaß, mit der Replikation von Influenza-Viren zu „interferieren“, sie also zu hemmen (Isaacs & Lindenmann, 1957). Innerhalb der nächsten 53 Jahre wurden die Induktion und die Wirkung jener „interferierenden“ Moleküle, sowie ihre zentrale Rolle innerhalb des angeborenen, unspezifischen Immunsystems untersucht.

Interferone sind multifunktionale sezernierte Proteine, die zu den Cytokinen zählen. Sie sind beteiligt an antiviralen Abwehrmechanismen, an der zellulären Wachstumsregulation und an der Aktivierung der Immunantwort. Sie werden ihrer Aminosäuresequenz nach in drei Klassen eingeteilt: Typ-I-, Typ-II- und Typ-III-IFN. Zu den Interferonen vom Typ-I gehören beim Menschen vor allem die bisher beschriebenen 13 Subtypen des IFN- $\alpha$  und ein Subtyp des IFN- $\beta$ , sowie IFN- $\omega$ , - $\epsilon$  und - $\kappa$  (Pestka et al., 2004). Während IFN- $\alpha$  insbesondere von Leukozyten produziert wird, wird IFN- $\beta$  von den meisten Zelltypen, im besonderen Maße jedoch von Fibroblasten gebildet. Die Induktion der Expression von IFN- $\alpha/\beta$  erfolgt direkt als Antwort auf eine virale Infektion. Vor einigen Jahren wurde noch ein weiterer Interferon-Typ beschrieben, Typ-III-IFN, dem 3 Subtypen des IFN- $\lambda$  angehören, IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 und IFN- $\lambda$ 3 (auch als Interleukin-29 (IL-29), IL-28A und IL-28B bekannt) (Pestka et al., 2004). Diese Cytokine werden ebenfalls als direkte Reaktion auf eine Virusinfektion produziert und deren Induktion scheinen sie ähnlich wie IFN- $\alpha/\beta$  zu erlangen (Onoguchi et al., 2007). Typ-II-IFNs, zu denen ausschließlich IFN- $\gamma$  zählt, werden als Antwort auf die Erkennung von infizierten Zellen durch aktivierte T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK) gebildet. Ihre Wirkung beruht hauptsächlich auf immunomodulatorischen Funktionen innerhalb des spezifischen Immunsystems. Sie spielen im Gegensatz zu Typ-I-Interferonen erst im späteren Infektionsverlauf eine Rolle (Goodbourn et al., 2000; Randall & Goodbourn, 2008).

Allen Interferonen gemein ist ihre zentrale Rolle bei der Immunantwort des Wirts. Sie stimulieren einen antiviralen Status in ihren Zielzellen, limitieren das Zellwachstum, können Apoptose auslösen und beeinflussen die Effektorzellen des Immunsystems. Die biologische Aktivität von Interferonen wird durch die Bindung an ihren entsprechenden Rezeptor auf der

Zelloberfläche vermittelt. Alle Typ-I-Interferone nutzen den gleichen heterodimeren IFN- $\alpha/\beta$ -Rezeptor, der ubiquitär verbreitet zu sein scheint. Durch die Bindung von sezerniertem IFN- $\alpha/\beta$  an diesen Rezeptor wird mittels Signaltransduktion über den JAK-STAT-Weg die Expression von zahlreichen IFN-stimulierten Genen (ISG) aktiviert und über diese ein antiviraler Status in den Zellen erreicht (Darnell et al., 1994; Randall & Goodbourn, 2008). Bisher sind über 300 Proteine bekannt, deren Synthese durch Interferon induziert werden kann (Der et al., 1998). Zu ihnen gehören zum Beispiel die Proteinkinase R (PKR), die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS) und die Mx-Proteine. Diese Proteine besitzen die Eigenschaft, die Replikation von Viren auf unterschiedlichste Weise negativ zu beeinflussen, was hier jedoch nicht näher erörtert werden soll (Goodbourn et al., 2000; Randall & Goodbourn, 2008).

Es bleibt festzuhalten, dass Typ-I-Interferone vor allem in der frühen Infektionsphase eine bedeutende Rolle bei der Unterbindung oder Verlangsamung der Replikation von Viren spielen. Diese Eigenschaft kann bis zur Eliminierung des Virus führen, wenigstens aber dem spezifischen Immunsystem genügend Zeit verschaffen, eine T- und B-Zellantwort zu etablieren. Aus diesem Grund haben die meisten Viren Mechanismen zur Beeinträchtigung der IFN-Induktion, des IFN-Signalweges oder der Funktion der ISGs entwickelt. Es sei an dieser Stelle vorweggenommen, dass das in dieser Arbeit untersuchte Hepatitis A-Virus (HAV) die Fähigkeit zur Suppression der IFN- $\beta$ -Induktion besitzt. Daher werden in den folgenden Abschnitten die Signalwege zur Induktion der IFN- $\beta$ -Expression näher betrachtet.

### 1.1.1 Das Interferon- $\beta$ -Enhanceosom

Die Induktion von IFN- $\beta$  als Antwort auf eine virale Infektion erfordert die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) durch zelluläre Rezeptoren. Die größte Bedeutung zeigte hierbei dsRNA, welche sowohl von RNA- als auch von DNA-Viren gebildet werden kann. dsRNA kann sowohl intrazellulär über verschiedene Sensorproteine als auch extrazellulär über den Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3) detektiert werden. Über unterschiedliche Signalwege kommt es dann zur Aktivierung von bestimmten Transkriptionsfaktoren. Diese translozieren in den Zellkern und induzieren dort die Transkription des IFN- $\beta$ -Gens (Randall & Goodbourn, 2008).

Die regulatorischen Sequenzen, welche die Transkription des IFN- $\beta$ -Gens kontrollieren, wurden innerhalb einer 110-bp Region unmittelbar stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle

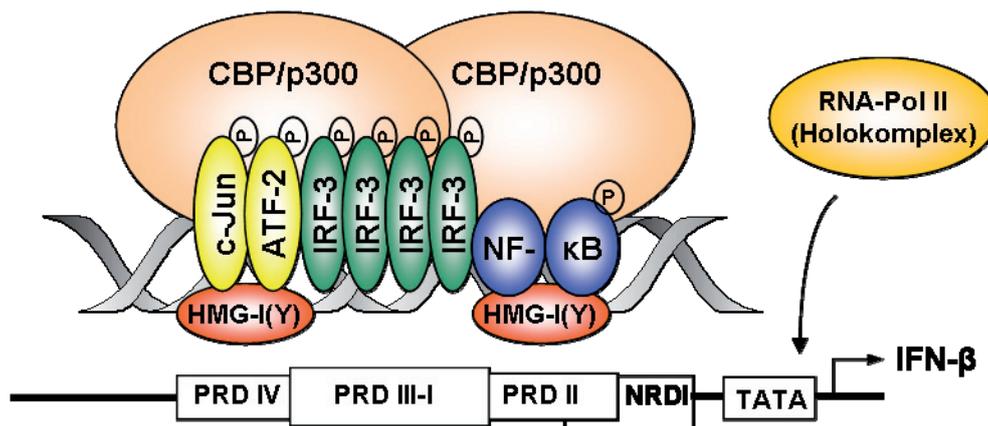
lokalisiert (Maniatis et al., 1992). Dieser Enhancer ist direkt einer TATA-Box vorgeschaltet und im Gegensatz zu dieser nicht von Histon-Proteinen eines Nukleosoms maskiert, somit also frei zugänglich (Maniatis et al., 1998; Lomvardas & Thanos, 2001). Der Interferon- $\beta$ -Enhancer gliedert sich in drei positiv regulatorische Domänen (PRDs; PRDIV, PRDIII-I und PRDII), die von bestimmten Transkriptionsfaktoren erkannt und gebunden werden, sowie einer negativ regulatorischen Domäne (NRD I) (Maniatis et al., 1998). An die NDR I können Repressorproteine, wie der *NF- $\kappa$ B-repressing factor* (NRF), binden, um den inaktiven Zustand des Gens zu gewährleisten und spontane Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren zu verhindern (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Außerdem vermittelt der *PRDI-binding factor 1* (PRDI-BF1) die Rekrutierung von Proteinen, welche die nukleosomale Chromatinstruktur der TATA-Box durch Deacetylierung oder Methylierung stabilisieren und somit das Gen inaktivieren (Keller & Maniatis, 1991; Yu et al., 2000; Györy, 2004).

Bei der Detektion einer viralen Infektion binden in der betreffenden Zelle aktivierte Transkriptionsfaktoren nach der Verdrängung der Repressoren an ihre spezifischen PRDs. Dabei bindet an die PRDIV ein Heterodimer aus ATF-2 (*activating transcription factor 2*) und c-Jun (*cellular v-jun homolog*), während die PRDII die Bindestelle für den dimeren *Nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) darstellt. An die PRDIII-I lagern sich ferner Dimere aus IRF-3-Proteinen (*Interferon regulatory factor 3*) an (Maniatis et al., 1998; Wathélet et al., 1998; Munshi et al., 1999), wobei zwei IRF-3-Dimere an eine PRDIII-I binden (Panne et al., 2004). Neben IRF-3-Homodimeren können Heterodimere aus IRF-3 und IRF-7 oder auch IRF-7 Homodimere an die PRDIII-I binden (Sato et al., 2000; Au et al., 2001; Yang et al., 2004). IRF-7 ist in den meisten Zellen ein Interferon-stimuliertes Genprodukt (ISG), dessen Expression erst durch die autokrine Wirkung des IFN- $\beta$  induziert wird und folglich sowohl die Expression des IFN- $\beta$ -Gens verstärken als auch die Transkription der IFN- $\alpha$ -Subtypen auslösen kann. Alle IFN- $\alpha$ -Subtypen sind, mit Ausnahme des humanen IFN- $\alpha$ 1, nicht durch IRF-3 induzierbar (Lin et al., 2000a; 2000b).

Alle genannten Faktoren haben die Fähigkeit die Proteine p300 und CBP (*CREB-binding protein*) zu rekrutieren. Diese sind transkriptionelle Coaktivatoren, die viele weitere Transkriptionsfaktoren binden können und somit an der Induktion zahlreicher Gene beteiligt sind (Maniatis et al., 1998; Merika et al., 1998; Vo & Goodman, 2001). Des Weiteren besitzen diese funktionell homologen Proteine eine Acetyltransferase-Funktion (Ogryzko et al., 1996). Eine weitere Rolle bei der IFN- $\beta$ -Induktion spielen die *High mobility group proteins* (HMG-I(Y)). Diese Proteine besitzen architektonische Wirkung und ihre Bindung an die DNA bewirkt eine Krümmung dieser, welche die Anlagerung der übrigen Proteine

erleichtert (Falvo et al., 1995; Yie et al., 1997, 1999). Zusammen mit den bereits erwähnten Transkriptionsfaktoren bilden die Coaktivatoren p300 und CBP und die HMG-I(Y) das IFN- $\beta$ -Enhanceosom (Abb. 1) (Maniatis et al., 1998; Kim & Maniatis, 1997; Thanos & Maniatis, 1995).

Für die Transkription des IFN- $\beta$ -Gens wird zunächst durch Acetylierung der Histone benachbarter Nukleosomen die Bildung einer offenen Chromatinstruktur gewährleistet. Dieser Prozess führt zu einer Auflockerung der Histon/DNA-Komplexierung. Somit kann die Bindung der, auf diese Weise freigelegten, TATA-Box durch den allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIID, welcher das *TATA-Box binding protein* (TBP) enthält, erfolgen. Dies und die zusätzliche Anwesenheit der übrigen Transkriptionsfaktoren (wie TFIIB, TFIIA und TFIIH) ermöglichen die Assoziation der RNA-Polymerase II an das IFN- $\beta$ -Enhanceosom und somit die Initiation der Transkription (Kee et al., 1996; Kim et al., 1998; Agalioti et al., 2000; Lomvardas & Thanos, 2001).



**Abb. 1: Das IFN- $\beta$ -Enhanceosom.** Untergliederung des IFN- $\beta$ -Enhancers in die *positive regulatory domains* (PRDs), sowie Darstellung des *Assemblys* von Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren auf dem Enhancer des IFN- $\beta$ -Gens, was nach Rekrutierung der RNA-Polymerase II zur Induktion der IFN- $\beta$ -Transkription führt (nähere Erläuterungen im Text).

Der spezielle Aufbau des IFN- $\beta$ -Enhancers ermöglicht einen Synergie-Effekt des Enhanceosoms bezüglich der Aktivierung der Transkription. Jeder der erwähnten Transkriptionsfaktoren ist lediglich in der Lage, eine basale Transkriptionsrate zu initiieren; im Falle von IRF-3 ist diese am stärksten. Bei jedoch gleichzeitiger Bindung aller Komponenten kommt es zu einer überproportional gesteigerten Gentranskription (Thanos & Maniatis, 1995; Kim & Maniatis, 1997; Juang et al., 1998; Merika et al., 1998; Yang et al., 2004). Auf diese Weise wird eine ungewollte, übermäßige IFN- $\beta$ -Induktion verhindert, zumal ATF-2/c-Jun und NF- $\kappa$ B auch über eine Vielzahl anderer Signalmoleküle aktiviert werden können (Pahl, 1999; Schaeffer & Weber, 1999; Zhou et al., 2003; Hayakawa et al., 2004).

Nach dieser Einführung des Mechanismus der IFN- $\beta$ -Transkription durch das Enhanceosom, wird sich der nächste Abschnitt mit den, über intra- und extrazelluläre dsRNA initiierten, Signalwegen zur Aktivierung der einzelnen Transkriptionsfaktoren befassen.

### 1.1.2 Interferon- $\beta$ -Induktion

Wie bereits erwähnt, erfordert die Induktion von IFN- $\beta$  infolge einer Virusinfektion die Erkennung von dsRNA. Neben dsRNA kann auch die Erkennung von ssRNA mit 5'-Triphosphaten zu einer Induktion der IFN- $\beta$ -Expression führen, worauf erst an späterer Stelle in diesem Kapitel eingegangen wird. DNA-Viren könnten dsRNA als Ergebnis von konvergenten Transkriptionsvorgängen generieren. Bei Viren mit einem RNA-Genom kann dieses selbst aus dsRNA bestehen (z.B. *Reoviridae* oder *Birnaviridae*) oder sie wird im Zuge der Genomreplikation als Replikationsintermediat gebildet (Jacobs & Langland, 1996), wie es bei HAV der Fall ist. Zusätzlich können mögliche doppelsträngige Sekundärstrukturen einzelsträngiger RNA auftreten. Schon seit Ende der 1960er ist bekannt, dass dsRNA aus *Penicillium*-Extrakten und das synthetische, experimentell oft eingesetzte, dsRNA-Analogon Poly-Inosinsäure:Poly-Cytidylsäure (poly(IC)) starke Induktoren der IFN- $\beta$ -Expression sind (Field et al., 1967; Lampson et al., 1967). dsRNA kann sowohl intrazellulär über verschiedene Sensorproteine als auch extrazellulär über den TLR3 detektiert werden. Die Reaktion auf intrazellulär vorliegende dsRNA ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

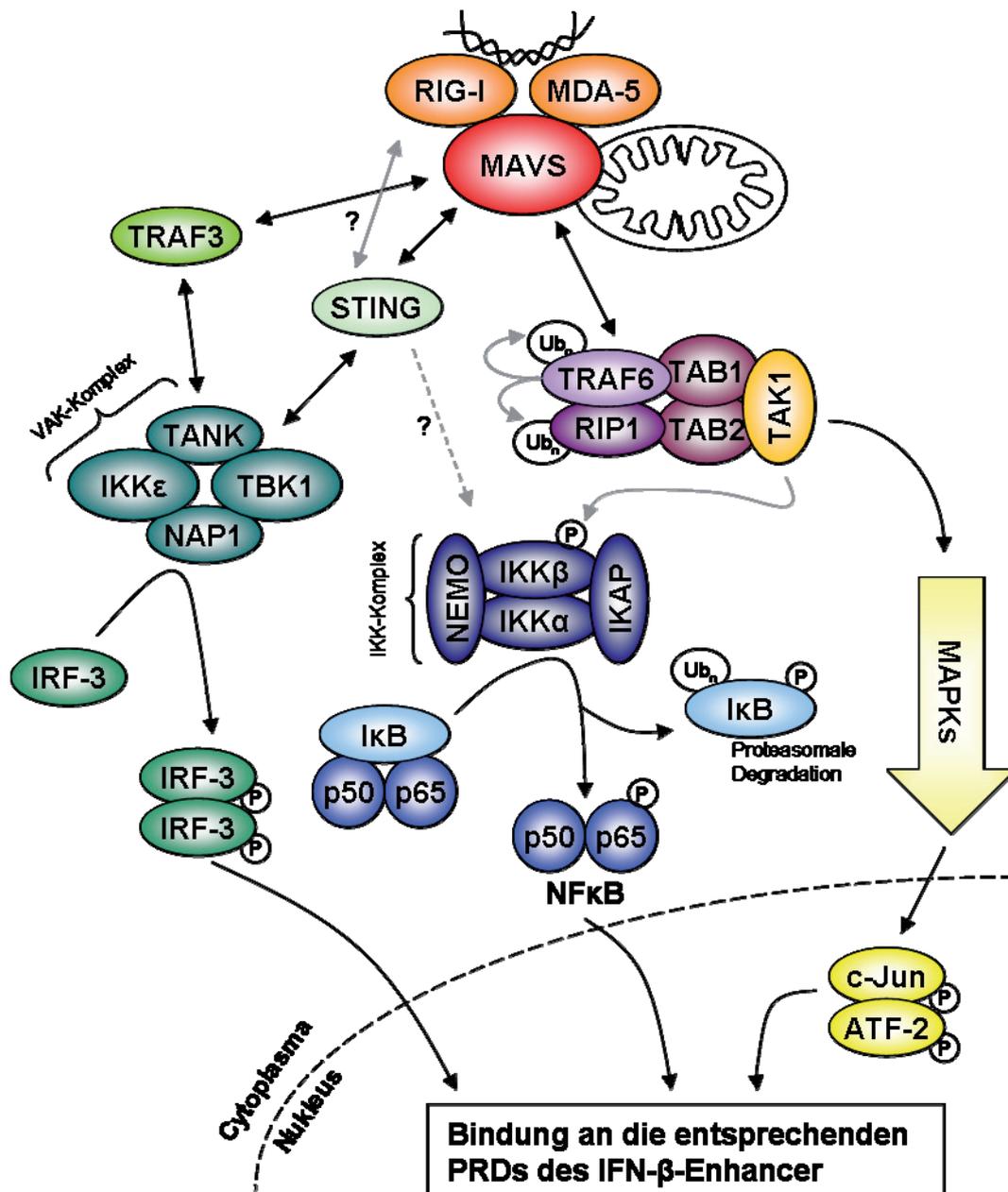
Lange war die PKR als einziges dsRNA-Bindeprotein bekannt. Die PKR ist eine Serin/Threonin Kinase, die durch IFNs induziert und deren katalytische Aktivität durch Bindung von dsRNA aktiviert wird. Nach der Interaktion mit dsRNA autophosphoryliert die PKR als Dimer und phosphoryliert ihrerseits eine Anzahl von verschiedenen Substraten (Samuel, 2001).

2002 gelang dann die Identifizierung zweier miteinander nahe verwandter intrazellulärer dsRNA-Rezeptoren aus der Familie der DExD/H-Box RNA-Helikasen. Hierbei handelt es sich um RIG-I (*Retinoic acid-inducible gene 1*) und um MDA-5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) (Andrejeva et al., 2004; Kang et al., 2002; Silverman et al., 2003; Yoneyama et al., 2004). Beide Proteine besitzen eine carboxyterminale DExD/H-Box RNA-Helikase Domäne und zwei aminoternale CARD-Domänen (*Caspase recruitment domain*). Über die RNA-Helikase Domäne erfolgt die Bindung viraler RNA und anschließend über die CARD-Domäne die Signaltransduktion zur Aktivierung von IRF-3, NF- $\kappa$ B und ATF-2/c-Jun

(Yoneyama et al., 2004; 2005). Des Weiteren werden beide Proteine in vielen Geweben exprimiert und sind durch Interferon-Stimulation hochregulierbar. Dies erhöht die Sensitivität der Zelle gegenüber dsRNA und bedeutet somit eine positive-*feedback* Regulation des IFN-Signalweges, die damit indirekt dem antiviralen Status förderlich ist (Kang et al., 2002; Cui et al., 2004; Yoneyama et al., 2004). Die essentielle Rolle von RIG-I und MDA-5 bei der, durch eine virale Infektion, ausgelösten IRF-3-Aktivierung und IFN- $\beta$ -Induktion, konnte durch genetische *knock out*-Studien bestätigt werden (Yoneyama et al., 2004; Sumpter et al., 2005; Kato et al., 2005, 2006). Bei der Detektion von intrazellulär vorliegender RNA scheinen RIG-I und MDA-5 unterschiedliche Erkennungs-Muster zu binden. Beide sind in der Lage auf transfiziertes poly(IC) zu reagieren (Yoneyama et al., 2005), wobei in bestimmten Systemen MDA-5 der bevorzugte cytosolische Rezeptor zu sein scheint (Kato et al., 2006). Auch bei der Detektion von Picornavirus-Infektionen, in deren Verlauf dsRNA generiert wird, scheint MDA-5 der primäre Detektor intrazellulärer dsRNA zu sein (Gitlin et al., 2006; Kato et al., 2006). RIG-I hingegen besitzt nicht nur die Fähigkeit dsRNA zu erkennen, sondern vermittelt auch eine Reaktion auf einzelsträngige RNA mit 5'-Triphosphaten (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006), die während der Replikation einiger Viren entsteht oder bereits als virale genomische RNA vorliegen kann. So konnte RIG-I beispielsweise als Detektor des Influenzavirus und des in dieser Arbeit verwendeten Newcastle Disease-Virus (NDV) identifiziert werden (Kato et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). Einzelsträngige zelluläre RNA-Spezies besitzen meist keine 5'-Triphosphate, sondern verfügen über Modifikationen, wie zum Beispiel 5'-Monophosphate oder 5'-Cap-Strukturen, so dass hier eine Differenzierung möglich ist. Es bleibt festzuhalten, dass RIG-I und MDA-5 zu kooperieren scheinen, um eine effektive IFN-Induktion während einer viralen Infektion zu gewährleisten.

Nach der Aktivierung von RIG-I und MDA-5 kommt es zur CARD-vermittelten Weiterleitung des Signals über das Adaptorprotein MAVS (*mitochondrial antiviral signalling protein*; analoge Bezeichnungen: Cardif, VISA und IPS-1), welches 2005 von vier verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert wurde (Seth et al., 2005; Meylan et al., 2005; Xu et al., 2005; Kawai et al., 2005). MAVS besitzt eine N-terminale CARD-Domäne, über die eine Interaktion mit den CARD-Domänen von MDA-5 und RIG-I vermittelt wird. Des Weiteren befindet sich am Carboxyterminus von MAVS eine hydrophobe Transmembrandomäne, die es in der äußeren Mitochondrienmembran verankert (Seth et al., 2005). Untersuchungen mit MAVS-defizienten Mäusen konnten seine essentielle Rolle bezüglich der IFN-Induktion bestätigen, wobei sowohl die CARD- als auch die

Transmembrandomäne für seine Funktion essentiell sind (Kumar et al., 2006; Sun et al., 2006).



**Abb. 2: IFN-β-Induktion durch intrazelluläre dsRNA.** Die dsRNA-Rezeptoren RIG-I und MDA-5 vermitteln über ihren Adapter MAVS die Aktivierung der Signalwege zu den Transkriptionsfaktoren IRF-3, NF-κB und ATF-2/c-Jun, was in der Initiation der Transkription des IFN-β-Gens resultiert (nähere Erläuterungen im Text).

Nach der Aktivierung von MAVS kommt es über drei verschiedene Signalwege zur Aktivierung der IFN-relevanten Transkriptionsfaktoren ATF-2/c-Jun, NF-κB und IRF-3. Es sei an dieser Stelle vorweggenommen, dass das Hepatitis A-Virus lediglich die IRF-3-

Aktivierung zu supprimieren vermag. Deshalb wird die Aktivierung von ATF-2/c-Jun und NF- $\kappa$ B nur kurz erläutert, während der Signalweg zur IRF-3-Aktivierung ausführlicher beschrieben wird.

MAVS interagiert zunächst mit dem Protein TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*) (Kawai et al., 2005; Xu et al., 2005), woraufhin dieses sich selbst sowie RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) ubiquitinyliert (Chen, 2005). Dies führt zur Erkennung durch TAB1 und TAB2 (*TAK1-binding protein 1/2*) und einer anschließenden Komplexbildung mit TAK1 (*transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1*). Diese Komplexbildung führt zur Phosphorylierung und Aktivierung mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPKs) (Jiang et al., 2003; Sakurai et al., 2000; Wang et al., 2001), an deren Ende die Phosphorylierung der beiden, zur AP-1-Familie gehörenden, nukleären Transkriptionsfaktoren ATF-2 und c-Jun steht. Auf diese Weise werden deren Heterodimerisierung und die Bindung an die PRDIV des IFN- $\beta$ -Enhancers induziert (May et al., 1998; Maniatis et al., 1998; Schaeffer & Weber, 1999).

Ein weiterer Signalweg führt zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Dieser Transkriptionsfaktor ist ein, zur Familie der NF- $\kappa$ B/Rel-Proteine gehörendes Heterodimer, bestehend aus den Untereinheiten p65 und p50. NF- $\kappa$ B befindet sich normalerweise im Cytoplasma, gebunden an seinem Inhibitor I $\kappa$ B (*inhibitor of NF- $\kappa$ B*). I $\kappa$ B maskiert somit ein *nuclear localization signal* (NLS) und verhindert den Transport von NF- $\kappa$ B in den Zellkern. Durch verschiedene Signale wird I $\kappa$ B durch eine spezifische, aus mehreren Komponenten bestehende I $\kappa$ B-Kinase, den IKK-Komplex (*I $\kappa$ B kinase complex*), phosphoryliert. Der IKK-Komplex besteht aus zwei katalytischen Domänen – IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  – und dem Protein NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modifier*), welches die regulatorische Untereinheit IKK $\gamma$  darstellt, sowie dem Protein IKAP (*IKK-complex-associated protein*), das als Gerüstprotein im IKK-Komplex fungiert (Cohen et al., 1998; Zandi & Karin, 1999). Durch die Komplexbildung von TAK1 mit TAB1 und TAB2 kommt es zur Phosphorylierung der IKK $\beta$ -Untereinheit des IKK-Komplexes durch TAK1 (Jiang et al., 2003; Wang et al., 2001), was folglich zur Ubiquitinylierung und proteasomalen Degradation von I $\kappa$ B führt (Alkalay et al., 1995; DiDonato et al., 1997; Chen, 2005). NF- $\kappa$ B ist somit frei und kann in den Zellkern translozieren. Zuvor wird es ebenfalls an seiner p65-Untereinheit phosphoryliert, wodurch die Interaktion mit den Coaktivatoren p300/CBP stabilisiert wird (Zhong et al., 2002). Im Zellkern bindet NF- $\kappa$ B an die PRDII-Domäne des IFN- $\beta$ -Enhancers und unterstützt so die Transkription des IFN- $\beta$ -Gens (Leonardo et al., 1989; Escalante et al., 2002).

Der für diese Arbeit entscheidende Transkriptionsfaktor ist aber IRF-3. Sein genauer Aufbau wird im nächsten Abschnitt näher erläutert. Hier soll zunächst einmal nur seine Aktivierung dargestellt werden. IRF-3 wird ubiquitär exprimiert und liegt in unstimulierten Zellen als Monomer überwiegend im Cytoplasma vor (Au et al., 1995). Virale Infektionen führen zur Phosphorylierung von IRF-3, zu dessen Dimerisierung und der Translokation der IRF-3-Dimere in den Zellkern (Yoneyama et al., 1998; Hiscott et al., 1999; Kumar et al., 2000; Servant et al., 2001). Die Phosphorylierung von IRF-3 wird hierbei durch zwei Komponenten des virusaktivierten Kinase-Komplexes (VAK), gewährleistet. Hierbei handelt es sich um die zwei IKK-verwandten Kinasen TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) und IKK $\epsilon$  (*inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase  $\epsilon$* ), die IRF-3 direkt phosphorylieren können (Fitzgerald et al., 2003; Sharma et al., 2003; Hemmi et al., 2004; McWhirter et al., 2004). TBK1 wird konstitutiv und ubiquitär exprimiert (Tojima et al., 2000), während die Expression von IKK $\epsilon$  möglicherweise zelltypabhängig ist (Shimada et al., 1999). Beide Kinasen funktionieren unabhängig voneinander, wobei IKK $\epsilon$  eher eine TBK1-unterstützende Funktion zugesprochen wird (Hemmi et al., 2004). Die Proteine TANK (*TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator*) und NAP1 (*NAK associated protein 1*) können in Komplexen mit TBK1 und IKK $\epsilon$  vorliegen und bilden somit weitere Komponenten des VAK-Komplexes (Cheng & Baltimore, 1996; Pomerantz & Baltimore, 1999; Chariot et al., 2002; Fujita et al., 2003; Sasai et al., 2005). Damit es zur Phosphorylierung von IRF-3 durch die Kinasen TBK1 und IKK $\epsilon$  kommt, erfolgt auch hier zunächst die Signalweiterleitung von MAVS. MAVS assoziiert dabei direkt mit IKK $\epsilon$ , während eine Interaktion mit TBK1 nicht beobachtet werden konnte (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005), weshalb hier ein weiteres Protein interagieren könnte. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass das Protein TRAF3 eine entscheidende Rolle bei der RIG-I/MDA-5-induzierten IRF-3-Aktivierung spielt. TRAF3 interagiert dabei direkt mit MAVS und es erfolgt die Weiterleitung des Signals an den VAK-Komplex (Oganesyan et al., 2006; Saha et al., 2006). Hier konnte eine direkte Assoziation von TRAF3 sowohl mit den Kinasen (Oganesyan et al., 2006; Saha et al., 2006), als auch mit TANK (Li et al., 2002) gezeigt werden. TANK kann auch mit dem Protein NEMO des bereits beschriebenen IKK-Komplexes interagieren, was auf einen potentiellen Co-Regulationsmechanismus des IRF-3- und NF- $\kappa$ B-Signalweges hindeutet (Chariot et al., 2002). Schlussendlich kommt es zur Phosphorylierung von IRF-3 durch TBK1 und IKK $\epsilon$ . Infolge seiner Phosphorylierung, dimerisiert IRF-3, transloziert in den Zellkern und bildet dort mit den Coaktivatoren p300 und CBP den DRAF1 (*dsRNA-activated factor 1*)-Komplex. Eine anschließende Acetylierung des IRF-3 durch p300/CBP vermittelt die Bindung an die PRDIII-I des IFN- $\beta$ -Enhancers (Suhara

et al., 2002) und schlussendlich erfolgt zusammen mit ATF-2/c-Jun und NF- $\kappa$ B die Expression des IFN- $\beta$ -Gens (Maniatis et al., 1998).

Erst kürzlich wurde von vier unterschiedlichen Arbeitsgruppen ein weiteres Protein im Signalweg zur IFN- $\beta$ -Induktion identifiziert. STING (*stimulator of interferon genes*; analoge Bezeichnungen: MITA, MPYS und ERIS) scheint dabei als Adapterprotein zwischen MAVS und TBK1 zu fungieren. Bezüglich der Struktur, der Lokalisation und der Funktion des gleichen Proteins waren die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen kontrovers. Das Transmembran-Protein enthält entweder vier (Sun et al., 2009; Zhong et al., 2009) oder fünf mutmaßliche Transmembrandomänen (Ishikawa & Barber, 2008). Für die Lokalisation von STING wurden die äußere Mitochondrienmembran (Jin et al., 2008; Zhong et al., 2008), das Endoplasmatische Retikulum (Ishikawa & Barber; Sun et al., 2009) und die Mitochondrien-assoziierten ER-Membranen (MAMs) (Ishikawa et al., 2009) detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass STING eine zentrale Rolle bei der sowohl RIG-I-induzierten (Ishikawa & Barber, 2008; Zhong et al., 2008; Sun et al., 2009), als auch bei der dsDNA-induzierten (Sun et al., 2009; Ishikawa et al., 2009; Saitho et al., 2009) IFN-Induktion spielt, während die MDA-5-induzierte Expression von IFN durch STING nicht beeinflusst wird (Ishikawa & Barber, 2008; Ishikawa et al., 2009). Im RIG-I-vermittelten Signalweg zur IFN- $\beta$ -Induktion führte eine STING-Überexpression immer zur Aktivierung von IRF-3 (Ishikawa & Barber, 2008; Zhong et al., 2008; Sun et al., 2009), während die Rolle des Proteins bei der NF- $\kappa$ B-Aktivierung umstritten ist. Ishikawa & Barber (2008) und Sun et al. (2009) stellten eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors fest, während Zhong et al. (2008) keinen Effekt auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung zeigen konnte. Im Signalweg zur IRF-3-Aktivierung fungiert STING, neben TRAF3, als zusätzliches Adapterprotein zwischen MAVS und TBK1. Dabei konnte eine direkte Assoziation von STING mit MAVS (Ishikawa & Barber, 2008; Zhong et al., 2008) und mit TBK1 (Zhong et al., 2008; Ishikawa & Barber, 2008; Sun et al., 2009) detektiert werden. Eine direkte Interaktion von STING mit IRF-3 wurde durch Zhong et al. (2008) beobachtet, während Sun et al. (2009) diese Assoziation nicht feststellen konnten. Des Weiteren konnte eine Assoziation von STING mit IKK $\epsilon$  beobachtet werden (Zhong et al., 2008; Sun et al., 2009), während Ishikawa & Barber (2008) auch eine direkte Interaktion des Proteins mit RIG-I detektierten.

Die bis hier beschriebenen Signalwege zur IFN- $\beta$ -Induktion bezogen sich auf die Reaktion auf intrazellulär vorliegende dsRNA. Zusätzlich kann aber auch extrazelluläre oder

endosomal vorliegende dsRNA zur Expression von IFN- $\beta$  führen. Zunächst stellte man fest, dass manche Zelltypen nur nach vorangegangener IFN-Gabe auf extrazelluläres poly(IC) zu reagieren vermochten; Fibroblasten reagierten dabei besonders gut (King & Goodbourn, 1994; Nir et al., 1985). Die extrazelluläre Stimulation benötigte offenbar einen IFN-induzierbaren Oberflächenrezeptor, der möglicherweise auf Fibroblasten konstitutiv exprimiert wird. Tatsächlich gelang 2001 die Entdeckung solch eines Rezeptors, der TLR3 (*Toll-like receptor 3*) (Alexopoulou et al., 2001). Zunächst bindet dsRNA an die extrazelluläre Domäne des TLR3, was dessen Dimerisierung zur Folge hat (Choe et al., 2005). Anschließend erfolgt die Rekrutierung des Proteins TRIF (*TIR domain containing adaptor-inducing IFN*), auch bekannt als TICAM-1 (*TIR domain-containing adapter molecule 1*), an die intrazelluläre TIR (*Toll-IL-1 receptor*)-Domäne des TLR3 (Oshiumi et al., 2003; Yamamoto et al., 2002; 2003). Die Signalweiterleitung geschieht nun ähnlich wie bei der intrazellulären Signaltransduktion, wobei TRIF hier anstelle von MAVS als Adapterprotein fungiert. Die Aktivierung von ATF-2/c-Jun und NF- $\kappa$ B geschieht über TRAF6, RIP1 und den TAK1-Komplex (Sato et al., 2003; Meylan et al., 2004), während eine Aktivierung von IRF-3 durch TBK1 und IKK $\epsilon$  über TRAF3 erfolgt (Oganessian et al., 2006; Sasai et al., 2005).

Nachdem hier ausführlich die Signalwege beschrieben wurden, die zu einer Induktion der IFN- $\beta$ -Expression führen, soll nun der, für die vorliegende Arbeit wichtigste Transkriptionsfaktor der IFN- $\beta$ -Induktion, IRF-3, besprochen werden.

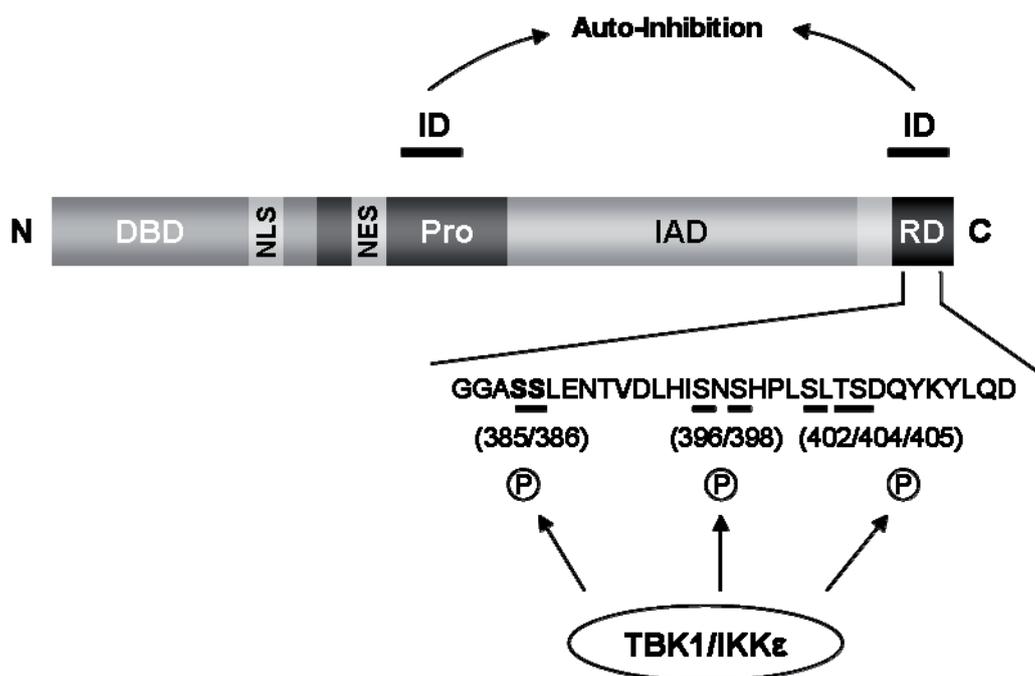
### 1.1.3 Der Transkriptionsfaktor IRF-3

1995 gelang die Entdeckung von IRF-3 als virusaktivierbarer Faktor, der die Fähigkeit besitzt, an die PRDIII-I des IFN- $\beta$ -Enhancers zu binden (Au et al., 1995). IRF-3 ist ein Mitglied der IRF-Familie aus bislang neun humanen Vertretern. Diese besitzen eine aminoternale DNA-Bindedomäne (DBD) und eine carboxyterminale Transaktivierungsdomäne und spielen vor allem bei der Immunregulation eine entscheidende Rolle (Mamane et al., 1999; Taniguchi et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass IRF-3 sogar alleine zur IFN- $\beta$ -Induktion befähigt und für diese auch essentiell notwendig ist (Schafer et al., 1998; Sato et al., 2000). Neben seiner Beteiligung bei der IFN- $\beta$ -Induktion, induziert IRF-3 auch viele andere ISGs und er scheint eine Rolle bei der Apoptose-Induktion zu spielen (Au et al., 1995; Heylbroeck et al., 2000; Weaver et al., 2001).

IRF-3 ist ein 427 Aminosäuren umfassendes, 55 kDa großes Protein, welches in allen bisher untersuchten Zelltypen konstitutiv exprimiert wird. Für die Induktion der IFN- $\beta$ -Transkription ist also keine *de-novo*-Proteinsynthese vonnöten (Au et al., 1995). IRF-3 liegt im inaktiven Zustand als Monomer vorwiegend im Cytoplasma vor (Lin et al., 1998; Lin et al., 1999). Es findet zwar ein kontinuierliches *Shuttling* zwischen Cytoplasma und Kern statt, das Gleichgewicht liegt aber klar auf cytoplasmatischer Seite (Kumar et al., 2000). Das Protein (Abb. 3) besteht aus einer aminoterminalen DNA-Bindedomäne, gefolgt von einem *nuclear localization signal* (NLS) und einem *nuclear export signal* (NES). Daran schließt sich eine Prolin-reiche Region und eine *IRF association domain* (IAD) an, welche die Homodimerisierung zweier IRF-3-Moleküle oder die Heterodimerisierung mit IRF-7 ermöglicht. Der Carboxyterminus von IRF-3 bildet schlussendlich eine Regulatorische Domäne (RD) (Lin et al., 1999). Analysen der Struktur von IRF-3 zeigten, dass sich innerhalb der Prolin-reichen Region und innerhalb der RD zwei autoinhibitorische Domänen (ID) befinden, die im inaktiven Zustand von IRF-3 miteinander reagieren. Auf diese Weise wird die IAD maskiert, so dass keine Dimerisierung stattfinden kann und somit IRF-3 in einem inaktiven Zustand bewahrt wird. Hierdurch wird möglicherweise auch die Funktion der NLS beeinträchtigt, was die dominante cytoplasmatische Lokalisation von IRF-3 erklären würde (Lin et al., 1999; Qin et al., 2003; Takahasi et al., 2003).

Die durch dsRNA induzierte Aktivierung von IRF-3 wird aufgrund von Phosphorylierungen an bestimmten Serin- und Threoninresten innerhalb der Regulatorischen Domäne durch die bereits beschriebenen Kinasen TBK1 und IKK $\epsilon$  vermittelt. Diese Reste befinden sich in Clustern an den Positionen 385/386 und zwischen den Aminosäuren 396-405 (Lin et al., 1998, 1999; Yoneyama et al., 1998). 3D-Strukturanalysen zeigten, dass Serin 385 und Serin 386 besonders zugänglich sind und dadurch wahrscheinlich dort die ersten Phosphorylierungen stattfinden. Sie wurden als die minimal benötigten und entscheidenden Phosphorylierungsstellen von IRF-3 beschrieben. Die anderen Reste werden womöglich erst durch Konformationsänderungen nach der Modifikation der ersten beiden zugänglich (Qin et al., 2003; Servant et al., 2003; Takahasi et al., 2003; Mori et al., 2004). Diese Phosphorylierungen in der Regulatorischen Domäne von IRF-3 führen zu konformatorischen Veränderungen des Proteins, wodurch zunächst die IAD freigelegt und eine Dimerisierung von IRF-3 möglich wird. Hierbei spielt vermutlich das chaperonähnliche Cyclophilin B eine Rolle (Lin et al., 1999; Obata et al., 2005). Durch die zusätzliche Freilegung des NLS transloziert das Dimer in den Zellkern, wo es über seine IAD und RD an die *IRF-3-binding domain* (IBiD) von CBP/p300 bindet und so den schon erwähnten DRAFI-Komplex bildet.

Auf diese Weise wird IRF-3 im Zellkern gehalten und kann nicht durch sein NES ins Cytoplasma zurücktransportiert werden (Lin et al., 1998; Kumar et al., 2000; Lin et al., 2001; Qin et al., 2005). Eine anschließende Acetylierung des IRF-3 durch p300/CBP vermittelt die Bindung an die PRDIII-I des IFN- $\beta$ -Enhancers (Suhara et al., 2002) und IRF-3 kann nun zusammen mit ATF-2/c-Jun und NF- $\kappa$ B die Expression des IFN- $\beta$ -Gens induzieren. Schlussendlich wird IRF-3 im Cytoplasma in einem Proteasom-vermittelten Mechanismus degradiert (Lin et al., 1998).



**Abb. 3: Domänenstruktur von IRF-3.** IRF-3 besitzt eine DNA-Bindedomäne (DBD), ein *nuclear localization signal* (NLS) und ein *nuclear export signal* (NES). Im inaktiven Zustand des Proteins interagieren die autoinhibitorischen Domänen (ID) in der Prolin-reichen Region (Pro) und der Regulatorischen Domäne (RD) miteinander. Durch die TBK1/IKK $\epsilon$ -vermittelte Phosphorylierung an drei Stellen in der RD von IRF-3, kommt es zur Dimerisierung des Proteins über die *IRF association domain* (IAD) (nähere Erläuterungen im Text).

Es ist offensichtlich geworden, dass IRF-3 eine entscheidende Bedeutung bei der Induktion der IFN- $\beta$ -Expression hat und dass das Interferon selbst eine zentrale Rolle bei der Reaktion auf eine virale Infektion spielt. Es ist nicht überraschend, dass die meisten Viren Mechanismen zur Beeinträchtigung von Interferonen entwickelt haben. So kann ein Angriffspunkt bereits schon die IFN-Induktion sein. Der nächste Abschnitt wird sich deshalb damit beschäftigen, auf welche Weise das Hepatitis A-Virus hier intervenieren kann.

## 1.2 Suppression der Interferon- $\beta$ -Induktion durch HAV

Während des Replikationszyklus von HAV entsteht als Replikationsintermediat dsRNA. Da, wie bereits beschrieben, dsRNA zur Induktion der IFN- $\beta$ -Expression führt, könnte man davon ausgehen, dass es auch durch eine HAV-Infektion zu einer Synthese von IFN- $\beta$  kommt. Das Hepatitis A-Virus ist interferonsensitiv. Denn eine exogene Gabe von geringen Mengen an IFN- $\beta$  führte zur Eliminierung einer HAV-Infektion in humanen Fibroblasten (Vallbracht & Flehmig, 1985). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass während einer HAV-Infektion zu keiner Zeit weder IFN- $\beta$  in Fibroblasten noch IFN- $\alpha$  in Lymphozyten gebildet wird (Vallbracht et al., 1985). Nach Stimulation HAV-infizierter Zellkulturen sowohl mit intra- als auch extrazellulärem poly(IC) blieb ebenfalls die Interferonsekretion aus und es war keine IFN- $\beta$ -mRNA nachweisbar (Vallbracht et al., 1985; Brack et al., 2002). Das bedeutet, dass HAV nicht nur verhindert, selbst IFN- $\beta$  zu induzieren, sondern auch die Induktion der IFN- $\beta$ -Synthese generell blockiert, also bereits schon die Transkription des IFN- $\beta$ -Gens supprimiert. Außerdem war HAV in der Lage, die durch dsRNA ausgelöste Apoptose zu unterdrücken (Brack et al., 2002).

Durch Verwendung von Reporterplasmiden, die einzelne Subdomänen des IFN- $\beta$ -Enhancers enthielten, konnte gezeigt werden, dass lediglich die PRDIII-I-Region durch eine HAV-Infektion negativ beeinflusst wird. Die Suppression der IFN- $\beta$ -Expression durch HAV ist demnach auf den Signalweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 beschränkt. Die PRDIV-abhängige Reporterexpression blieb durch eine HAV-Infektion unbeeinflusst, auf Ebene der PRDII-Region konnte sogar eine Aktivierung detektiert werden. Analog zum Gesamtenhancer zeigte die PRDIII-I-abhängige Reporterexpression nach poly(IC)-Induktion eine vollständige Blockade durch HAV (Astrosini, 2001; Brandt 2002; Kaumanns 2003; Fensterl et al., 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor IRF-3 in HAV-infizierten Zellen nicht phosphoryliert wird und keine Translokation in den Zellkern stattfindet, so dass auch keine Aktivierung der PRDIII-I-Region erfolgen konnte (Fensterl et al., 2005).

Es folgten Untersuchungen zur Klärung der Frage, wo HAV im Signalweg zur IRF-3-Aktivierung eingreift. Dabei konnte gezeigt werden, dass HAV die RIG-I-vermittelte IFN- $\beta$ -Induktion oberhalb der aktivierenden Kinasen TBK1 und IKK $\epsilon$  und unterhalb des dsRNA-Rezeptors RIG-I blockiert. Zusätzlich kommt es zu einer Reduktion der TRIF-vermittelten IRF-3-Aktivierung des TLR3-Signalweges (Fensterl et al., 2005). Die Blockade der RIG-I-vermittelten IRF-3-Aktivierung durch HAV findet dabei wahrscheinlich auf Höhe von MAVS statt (Paulmann et al., 2008). Dabei scheint das 3ABC-Intermediat des Hepatitis A-Virus eine

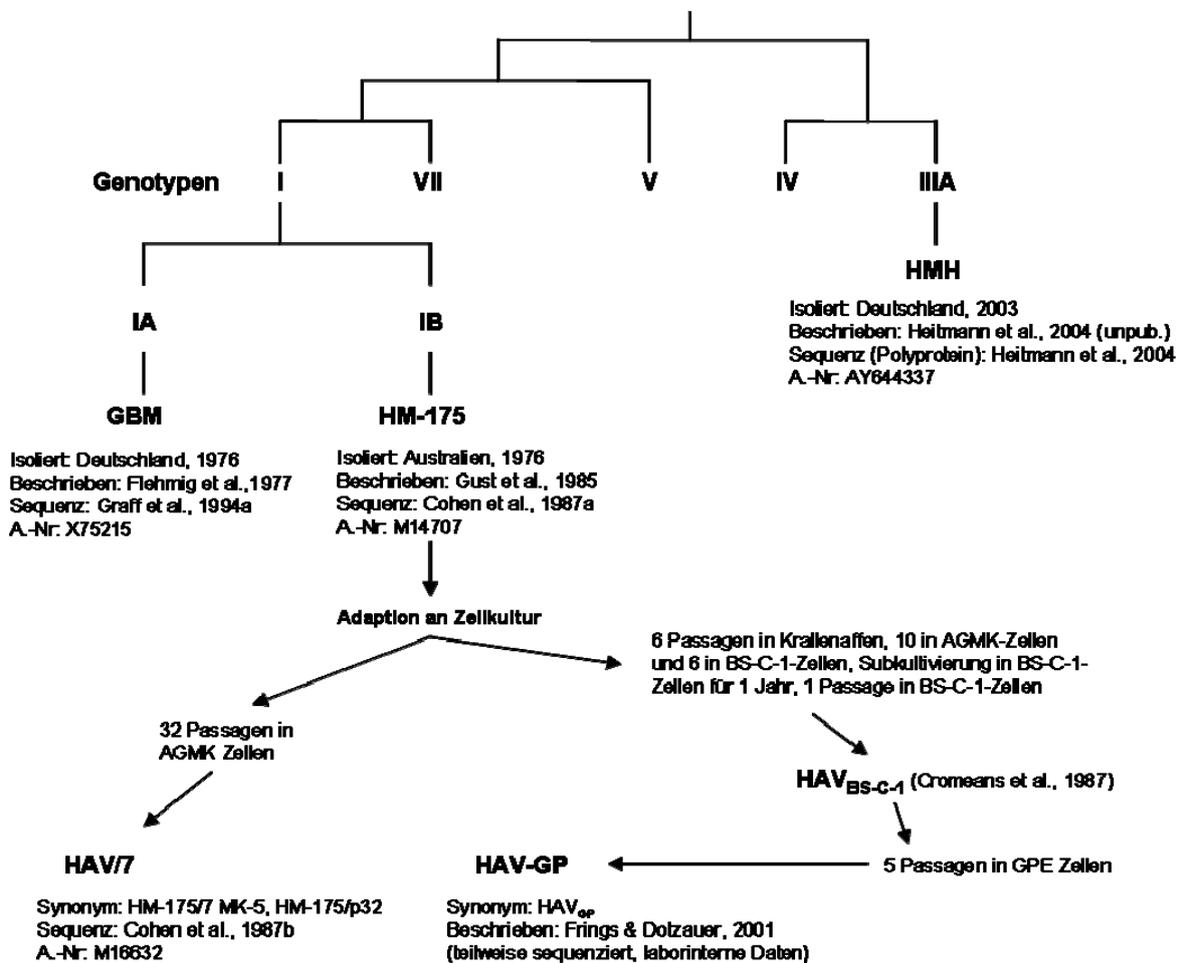
Rolle zu spielen. 3ABC führte, vermittelt durch die virale Protease 3C, zu einer Spaltung von MAVS (Yang et al., 2007). Ähnlich diesem Mechanismus führt auch das virale NS3/4A-Protein des Hepatitis C-Virus (HCV) zu einer proteolytischen Spaltung von MAVS und somit zu einer Inhibition der Induktion der IFN- $\beta$ -Expression (Meylan et al., 2005; Li et al., 2005). Auch das 2B-Protein von HAV ist möglicherweise bei der HAV-vermittelten Suppression der IRF-3-Aktivierung beteiligt (Magulski, 2007; Paulmann et al., 2008). Für dieses Protein konnte jedoch noch kein zelluläres *Target* im IRF-3-Signalweg identifiziert werden.

Eine HAV-Infektion führt also zu einer Unterdrückung der dsRNA- und NDV-induzierten IRF-3-Aktivierung und somit zu einer Suppression der IFN- $\beta$ -Induktion. Der folgende Abschnitt soll sich deshalb nun eingehender mit dem in dieser Arbeit eingesetzten Hepatitis A-Virus beschäftigen.

### 1.3 Das Hepatitis A-Virus

Das weltweit verbreitete Hepatitis A-Virus (HAV) ist heute der häufigste Erreger der Gelbsucht. Die HAV-Infektion war bereits im Mittelalter unter dem Namen Feldzug-Gelbsucht (*Campaign jaundice*) als Erkrankung bekannt, ohne jedoch jegliche Kenntnisse über dessen Ursprung zu haben. 1947 führte MacCallum die Begriffe „Hepatitis A“ für die infektiöse Hepatitis und „Hepatitis B“ für eine ähnliche Erkrankung, bis dahin bekannt unter dem Namen „Serum Hepatitis“, ein (MacCallum, 1947). Mittlerweile kennt man weitere virale Hepatitiden, wie Hepatitis C, D und E. 1973 gelang dann mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie der Nachweis des Hepatitis A-Virus aus Stuhlproben infizierter Patienten (Feinstone et al., 1973), woraufhin sechs Jahre später die *in vitro* Kultivierung des Virus erreicht wurde (Provost & Hilleman, 1979). HAV lässt sich mittlerweile, im Gegensatz zu den anderen Hepatitis-Viren, in verschiedenen Zellkulturen vermehren. Anfänglich wurde das Hepatitis A-Virus innerhalb der Familie der *Picornaviridae* als Enterovirus klassifiziert (Gust et al., 1983). Bereits zehn Jahre später wurde, aufgrund neuer Erkenntnisse und dem in dieser Virusfamilie unüblichen Hepatotropismus, der Genus Hepatovirus definiert, dessen einziger Vertreter bis heute HAV ist (Minor, 1991). Alle bislang isolierten HAV-Stämme entsprechen einem Serotyp. Aufgrund genetischer Analysen wurde das Virus zunächst in sieben Genotypen eingeteilt (Robertson et al., 1992); später erfolgte ein Vorschlag zur Neuklassifizierung in nur fünf Genotypen (Costa-Mattioli et al., 2002). Ein Stammbaum mit den für diese Arbeit wichtigen HAV-Stämmen ist in Abb. 4 dargestellt. Der zum Subgenotyp

IB gehörende HAV-Stamm HM-175 gilt als gegenwärtiger HAV-Referenzstamm und wird auch als solcher in der vorliegenden Arbeit verwendet. HAV HM-175 wurde 1976 aus Stuhlproben infizierter Patienten in Australien isoliert (Gust et al., 1985), während 1978 die komplette Nukleotidsequenz des Genoms beschrieben wurde (Cohen et al., 1987a).



**Abb. 4: Stammbaum der Genotypen des Hepatitis A-Virus.** Dargestellt ist der Stammbaum der Genotypen von HAV, beruhend auf der kompletten VP1-Sequenz (verändert nach Costa-Mattioli et al., 2002) mit den für diese Arbeit relevanten HAV-Stämmen und ihren Zellkultur-adaptierten Varianten (nähere Erläuterungen im Text). Die Länge der Balken zeigt keine genetische Distanz der Genotypen untereinander an. A.-Nr. = *Accession-Number*. Unpub. = Angabe aus, unter der A.-Nr. befindlichen Information.

Die Infektion mit dem Hepatitis A-Virus erfolgt normalerweise über eine fäkal-orale Übertragung und kann eine akute Leberentzündung hervorrufen, die keinen chronischen Verlauf nimmt und in der Regel ausheilt. Während eine HAV-Infektion bei Kindern sogar häufig inapparent verläuft, kann eine, in seltenen Fällen und meist bei älteren Personen, fulminante Hepatitis, eine sehr schwere Verlaufsform, auftreten (Lemon, 1997; Cuthbert, 2001). Eine Ausscheidung großer Virusmengen über den Stuhl findet schon in der frühen

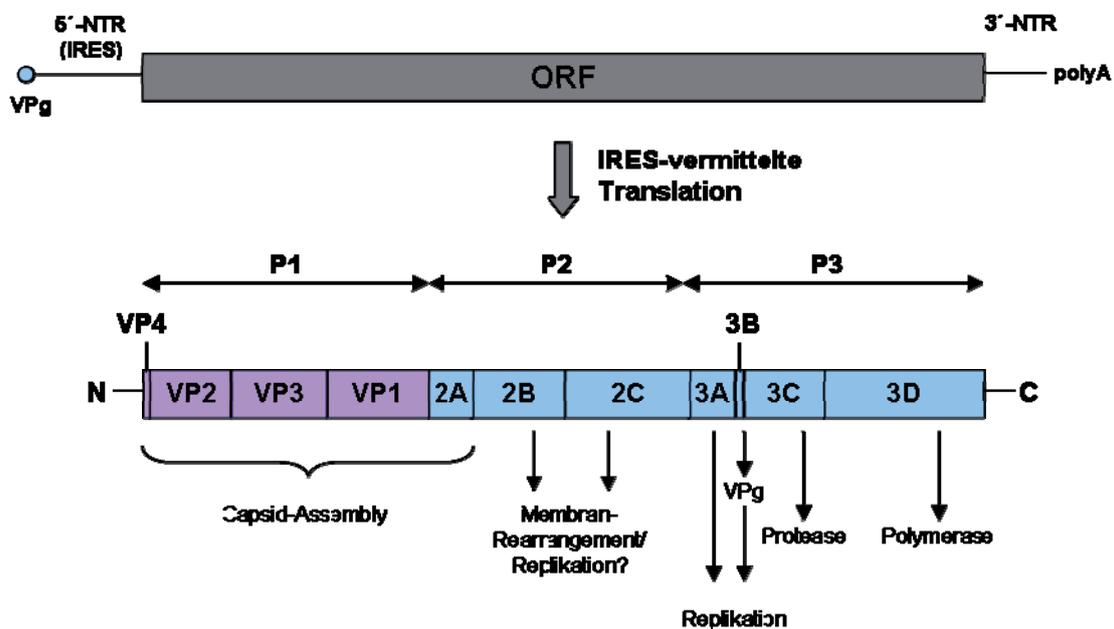
Phase der Erkrankung, während der etwa einmonatigen Inkubationszeit, statt. Außerdem ist in dieser Phase die Viruslast im Blut (Virämie) am höchsten; auch einige Monate nach der Erkrankung können detektierbare Mengen an HAV-Genom im Serum nachweisbar sein (Stapleton, 1995; Normann et al., 2004). Mit Auftreten der ersten Symptome wie Appetitlosigkeit, Übelkeit und Erbrechen, Erschöpfung und Fieber, sind im Serum HAV-spezifische Antikörper (IgM, IgG und IgA) nachweisbar. Kurze Zeit nach Auftreten der ersten Symptome kann es zu einer Gelbsucht (Ikterus) mit typischer Gelbfärbung von Haut und Augen kommen, die durch eine Ablagerung von freiem Bilirubin in Haut und Bindegewebe des Auges hervorgerufen wird. Zusätzlich zeigt ein Anstieg von Leberenzymen (AST und ALT) im Blut eine Schädigung der Leberzellen an (Stapleton, 1995; Lemon, 1997). Diese ist jedoch keine direkte Wirkung des Virus auf die Zellen, sondern ist vielmehr immunpathologisch zu erklären. CD8-positive cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) wandern im Zuge der Infektion in die Leber ein, zerstören infizierte Zellen und bewirken nekrotische Gewebeveränderungen in der Leber (Vallbracht et al., 1986; 1989; Fleischer et al., 1990).

Nach der oralen Aufnahme gelangt das Hepatitis A-Virus aus dem Magen-Darm-Trakt über das Blut in die Leber und infiziert dort die Hepatozyten. Das Virus weist *in vivo* einen starken Hepatotropismus auf und die Leber ist wahrscheinlich der einzige Replikationsort des Virus, obwohl eine schwache extrahepatische Vermehrung im Tiermodell diskutiert wurde (Heitmann, 2008). Die Leber spielt eine zentrale Rolle im IgA-Metabolismus, indem sie IgA und IgA-Komplexe aus dem Organismus eliminieren kann. Da auch HAV aus der Leber in das Darmlumen gelangt und daraufhin ausgeschieden wird, könnte dies ein Hinweis auf eine Verbindung des Virus und seinem strikten Hepatotropismus mit dem IgA sein. Tatsächlich wurde der Übergang des Virus aus dem Darm in den Blutstrom und der Transport zur Leber durch Komplexierung mit IgA postuliert (Dotzauer et al., 2005). Der Rücktransport neusynthetisierter Virionen aus der Leber in das Darmlumen erfolgt über die Gallenwege, bis schließlich das Virus über die *Faeces* ausgeschieden werden kann (Schulman et al., 1976; Lemon, 1997).

Der zelluläre Rezeptor für das Hepatitis A-Virus konnte noch nicht eindeutig identifiziert werden. Lediglich das Bindeprotein HAVcr-1 (*HAV cellular receptor-1*), auch bezeichnet als TIM-1 (*T cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-1*), wurde bislang als möglicher Rezeptor beschrieben (Kaplan et al., 1996; Ashida & Hamada, 1997; Feigelstock et al., 1998). Dieses Transmembran-Protein wird ubiquitär und nicht selektiv in der Leber exprimiert und

steht somit in keinem Zusammenhang mit der selektiven Infektion von Leberzellen durch HAV. Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine Infektion von Hepatozyten mit HAV über die Bindung von den bereits beschriebenen HAV-IgA-Komplexen an den Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGPR) vermittelt wird (Dotzauer et al., 2000). Dieser Rezeptor wird nur auf Hepatozyten exprimiert (Spiess, 1990) und könnte somit den starken Hepatotropismus von HAV erklären. Des Weiteren können HAV-IgA-Komplexe von polarisierten Epithelzellen über den Immunglobulin-Rezeptor (pIgR) transcytiert werden (Dotzauer et al., 2005). So könnte HAV im Komplex mit IgA also vom Darmlumen in die Blutbahn und daraufhin zur Leber als sein *Targetorgan* gelangen.

Das Hepatitis A-Virus besteht aus einem nicht umhüllten ikosaedrischen Nukleocapsid mit einem Durchmesser von 27-32 nm. Das 7,5 kb große Genom liegt als ssRNA in Plusstrangorientierung vor und enthält einen einzigen *open reading frame* (ORF), der für ein etwa 250 kDa großes Polyprotein codiert (Abb. 5) (Feinstone et al., 1973; Provost et al., 1975; Ticehurst et al., 1983).



**Abb. 5: Genomorganisation und Polyprotein des Hepatitis A-Virus.** Das einzelsträngige RNA-Genom des Hepatitis A-Virus liegt in Positivstrangorientierung vor und enthält einen einzigen *open reading frame* (ORF). Dieser wird von einer 5'-NTR, die eine *internal ribosomal entry site* (IRES) enthält, und einer polyadenylierten 3'-NTR flankiert und ist zudem am 5'-Ende kovalent mit dem viralen VPg verbunden. Durch die IRES-vermittelte Translation entsteht ein Polyprotein, welches in die einzelnen HAV-Proteine prozessiert wird.

Der ORF wird am 5'- und 3'-Ende von nicht translatierten Regionen (NTR) flankiert. Die 5'-NTR ist reich an Sekundärstrukturen und enthält eine *internal ribosomal entry site* (IRES), welche die Cap-unabhängige Translationsinitiation vermittelt und somit dem Genom den Charakter einer mRNA verleiht (Glass et al., 1993). Des Weiteren ist an das 5'-Ende des HAV-Genoms kovalent ein Peptid, das VPg (*virus protein genome-associated*), gebunden (Weitz et al., 1986). Die 3'-NTR enthält eine schwächer ausgeprägte Sekundärstruktur und zudem einen *poly-A-Tail* (Ticehurst et al., 1983).

Das von dem ORF codierte Polyprotein wird co- und posttranslational in seine Komponenten, die Strukturproteine und Nicht-Strukturproteine, prozessiert. Die Strukturproteine (P1) bilden das Capsid und werden als VP4, VP3, VP2 und VP1 bezeichnet. Bei den Nicht-Strukturproteinen handelt es sich um 2A, 2B, 2C (P2), sowie 3A, 3B, 3C und 3D (P3) (Totsuka & Moritsugu, 1999). Fast alle Spaltungen übernimmt die virale Protease 3C (Jia et al., 1991; Schultheiss et al., 1994) lediglich die VP1/2A (Martin et al., 1999; Rachow et al., 2003) und VP4/VP2 Spaltung (Gauss-Müller et al., 1986; Tesar et al., 1993; Probst et al., 1999) geschieht in einer 3C-unabhängigen Weise. Die Primärspaltung des Polyproteins findet zwischen 2A und 2B statt (Martin et al., 1995; Jia et al., 1993).

Das 2A-Protein des Hepatitis A-Virus verfügt im Gegensatz zu den anderen Vertretern der Picornaviren über keine Protease-Funktion. Es scheint vielmehr beim *Assembly* eine Rolle zu spielen und wird zeitweilig in Form des Vorläufers VP1-2A auf der Oberfläche der HAV-Virionen gefunden (Martin et al., 1999; Probst et al., 1999; Cohen et al., 2002; Rachow et al., 2003).

Der Vorläufer 3AB vermittelt über den hydrophoben Anker des 3A die Membranassoziation des viralen Genoms, wobei das 3B-Protein nach seiner Abspaltung das VPg darstellt. Dieses dient vermutlich, wie auch beim Poliovirus, als „Primer“ für die Replikation der RNA durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase 3D (Beneduce et al., 1999; Totsuka & Moritsugu, 1999).

Die Nicht-Strukturproteine 2B und 2C sind vermutlich an der viralen Replikation beteiligt und liegen membranassoziiert vor (Kusov et al., 1998; Gosert et al., 2000). HAV-2B und 2C spielen in der vorliegenden Arbeit eine besondere Rolle, weshalb ihnen ein eigenes Kapitel im nächsten Abschnitt gewidmet wird.

Nach der Translation der HAV-RNA liegt nun ein an Membranen, die vermutlich dem zellulären endoplasmatischen Retikulum entstammen, lokalisierter makromolekularer Replikase-Komplex aus Nicht-Strukturproteinen vor. Der Wechsel zu der RNA-Synthese wird möglicherweise durch die HAV-3C-Protease-vermittelte Spaltung von dem *poly(A)*-

*binding protein* (PABP) und dem *poly(rC)-binding protein* (PCBP2) eingeleitet (Zhang et al., 2007a; 2007b).

Nach der Replikation und Translation akkumuliert virales Antigen um den Zellkern (Klinger et al., 2001) und die Virionen gelangen nach dem *Assembly* über einen noch unbekanntem Weg aus der Zelle.

### 1.3.1 Die Nicht-Strukturproteine 2B und 2C des Hepatitis A-Virus

Die biochemischen Eigenschaften der Nicht-Strukturproteine 2B und 2C des Hepatitis A-Virus und ihre Rolle bei der HAV-Replikation sind noch weitestgehend unklar, zum Teil wahrscheinlich auch dadurch, dass 2B und 2C, sowie ihr proteolytischer Vorläufer 2BC lange Zeit nicht in HAV-infizierten Zellen nachgewiesen werden konnten (Updike et al., 1991).

Die primäre Spaltung des HAV-Polyproteins findet zwischen 2A und 2B statt, so dass das 2BC-Intermediat zusammen mit den Produkten P1-2A und P3 früh im Replikationszyklus entsteht (Martin et al., 1995; Jia et al., 1993). Die nachfolgende 3C-vermittelte Spaltung von 2BC scheint am effizientesten zu sein, wenn 3C in Form des proteolytischen Vorläufers 3ABC vorliegt, so dass eine Membranassoziation für die Prozessierung von großer Bedeutung zu sein scheint (Jecht et al., 1998).

Das 2C-Protein ist innerhalb der Picornaviren das am stärksten konservierte Nicht-Strukturprotein; HAV-2C zeigt dennoch nur etwa 23-29% Sequenzidentität zu den anderen Viren dieser Familie (Ticehurst et al., 1989). Das etwa 35 kDa große HAV-Protein besitzt eine N-terminale amphipathische  $\alpha$ -Helix und zeigt, wie auch das Intermediat 2BC, Eigenschaften eines integralen Membranproteins (Schultheiss et al., 1994; Jecht et al., 1998). Für die Assoziation von 2C mit Membranen scheint die N-terminale amphipathische  $\alpha$ -Helix essentiell zu sein, da ein N-terminal verkürztes 2C-Protein diese Eigenschaft aufhebt (Kusov et al., 1998). Des Weiteren konnte die Kapazität zur Bindung von RNA *in vitro* gezeigt werden, die unabhängig von der N-terminalen amphipathischen  $\alpha$ -Helix statt findet (Kusov et al., 1998). Nach einer Überexpression von sowohl 2C als auch 2BC kam es in HeLa- und FRhK-4-Zellen zu einem Rearrangement von intrazellulären Membranen. Diese als kristalloides Endoplasmatisches Retikulum (cER) bezeichnete Membran-Veränderung war bei der Expression von 2C und 2BC aus Wildtyp- und Zellkultur-adaptierten HAV-Varianten identisch. Lediglich die Überexpression von 2C aus einem cytopathogenen HAV-Stamm führte zu einer anderen Erscheinungsform des Rearrangements (Teterina et al., 1997). Diese HAV-Variante enthält in der 2C-codierenden Region Mutationen, die zu acht Aminosäure-

Substitutionen im Protein führen und Computeranalysen zeigten, dass diese Mutationen die Ausbildung der N-terminalen  $\alpha$ -Helix erschweren. Durch diese Erkenntnisse könnte demnach spekuliert werden, dass ein Zusammenhang zwischen Membran-Assoziation, Induktion von intrazellulären Membran-Veränderungen und der viralen Replikation besteht (Teterina et al., 1997). Allerdings konnten derartige 2C- und 2BC-induzierten Membran-Strukturen nicht bei einer HAV-Infektion beobachtet werden. Es ist denkbar, dass eine Überexpression von einem Membran-bindenden Protein zu einem Rearrangement der assoziierten Membranen führt, ohne dass dieses der Fall bei einer Infektion sein muss. Des Weiteren konnte für HAV-2C ein cytotoxischer Effekt in Bakterienzellen nachgewiesen werden. Eine Expression von 2C führte in *Escherichia coli* (*E. coli*) zu einer Inhibition des Wachstums der Bakterien, zur Reduktion der Proteinsynthese und zu einer gesteigerten Durchlässigkeit der Bakterien-Membranen. Auch hier scheint die N-terminale amphipathische  $\alpha$ -Helix von 2C essentiell für dessen Funktion zu sein, da eine Deletion des N-Terminus zum Aktivitätsverlust führte (Kusov et al., 1998).

Im Gegensatz zu 2C und 2BC zeigt das 2B-Protein von HAV nicht die Eigenschaften eines integralen Membranproteins, sondern besitzt den Charakter eines peripheren Membranproteins, das an der luminalen Seite von Membranvesikeln lokalisiert zu sein scheint (Jeht et al., 1998). HAV-2B ist mit fast 28 kDa (251 Aminosäuren) größer als das von anderen Picornaviren und zeigt weniger als 20% Sequenzidentität im Vergleich mit weiteren Viren dieser Familie (Gosert et al., 1996; de Jong et al., 2008). Computer-Analysen zeigten für HAV-2B eine C-terminale hydrophobe Region, die das Potential zur Bildung einer amphipathischen  $\alpha$ -Helix besitzt (Gosert et al., 2000). Eine Überexpression von HAV-2B führte in FRhK-4-Zellen, wie schon für 2C und 2BC gezeigt, zu einem Rearrangement intrazellulärer Membranen. Allerdings offenbarten sich diese Membran-Veränderungen eher in einem tubulär-vesikulären Netzwerk, das immer in enger Nachbarschaft zum rER, Mitochondrien und dem Zellkern zu finden war (Gosert et al., 2000). Im Gegensatz zu den 2C-induzierten kristalloiden Strukturen, konnten jedoch die 2B-induzierten Membran-Veränderungen auch und in gleicher Weise in HAV-infizierten Zellen detektiert werden (Teterina et al., 1997; Gosert et al., 2000). Dabei konnten morphologisch keine Unterschiede zwischen Wildtyp-, Zellkultur-adaptierten, und cytopathogenen HAV-Varianten beobachtet werden (Gosert et al., 2000). Es zeigte sich, dass das 2B-Protein dabei immer mit den veränderten Membranen assoziiert ist, was seine Rolle bei der Induktion des intrazellulären Membran-Rearrangement unterstützen würde; ungeklärt bleibt jedoch, ob dort auch die virale Replikation statt findet (Gosert et al., 2000). Auch blieb bis dahin unklar, welchen Ursprung

die veränderten Membranstrukturen hatten. Später konnte jedoch in der Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass HAV-2B mit dem ER colokalisiert (de Jong et al., 2008). Das 2B-induzierte tubulär-vesikuläre Netzwerk könnte demnach, zumindest zum Teil, dem ER entstammen (Gosert et al., 2000; de Jong et al., 2008). Im Gegensatz zu den Polio-, Cocksackie- und Rhinovirus-2B-Proteinen, erfolgte aber keine Colokalisation von HAV-2B mit dem Golgi (de Jong et al., 2008). Obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass HAV-2B und -2BC zu einer gesteigerten Permeabilität eukaryotischer Membranen führt (Jecht et al., 1998), konnte für das 2B-Protein von HAV kein Effekt auf die Calcium-Homöostase von ER und Golgi detektiert werden (de Jong et al., 2008). Im Gegensatz zu anderen Vertretern der Picornaviren führte eine Expression von HAV-2B nicht zu einer Inhibition des Protein-Transports durch den Golgi-Komplex (de Jong et al., 2008). Dies würde auch die Hypothese unterstützen, dass das nicht-cytolytische Hepatitis A-Virus den sekretorischen Weg benutzt, um die Zelle zu verlassen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die HAV-Freisetzung aus polarisierten Epithelzellen sensitiv gegenüber Proteintransport-inhibierenden Substanzen ist (Blank et al., 2000).

Zusammenfassend zeigt sich also, dass sich die HAV-Proteine 2B, 2C und 2BC sowohl strukturell als auch funktionell deutlich von den entsprechenden Proteinen anderer Picornaviren unterscheiden. Alle drei HAV-Proteine zeigen Eigenschaften von Membranproteinen (Jecht et al., 1998) und induzieren intrazelluläre Membran-Veränderungen, deren Erscheinung sich jedoch unterscheiden. Während eine Überexpression von 2C und 2BC zu kristalloiden Strukturen führt, induziert HAV-2B ein tubulär-vesikuläres Netzwerk, mit dem es assoziiert und dessen Erscheinung mit den HAV-induzierten Membran-Veränderungen identisch ist (Teterina et al., 1997; Gosert et al., 2000). Unklar bleibt der mögliche Zusammenhang zwischen HAV-induzierten Membran-Veränderungen, der Assoziation von Proteinen mit diesen Membranen und der Beteiligung dieser Proteine an der viralen Replikation.

Den HAV-Proteinen 2B und 2C wird noch eine weitere Funktion zugesprochen. Das Hepatitis A-Virus unterscheidet sich in Bezug auf seinen langsamen und nicht-cytolytischen Lebenszyklus deutlich von anderen Picornaviren. Mutationen in den Regionen, die für die Nicht-Strukturproteine 2B und 2C codieren, konnten in schneller replizierenden HAV-Varianten identifiziert werden und lassen vermuten, dass diese Proteine eine wichtige Rolle bei der viralen Replikation und der Zellkultur-Adaption spielen (Emerson et al., 1993; Graff

et al., 1994b). Deshalb soll sich der folgende Abschnitt mit der Anpassung von HAV an die Zellkultur beschäftigen.

### 1.3.2 Zellkulturadaption des Hepatitis A-Virus

Die Replikationseffizienz von Wildtyp (WT) Hepatitis A-Viren in Zellkultur (ZK) ist in der Regel minimal und es braucht Wochen bis Monate, um maximale Virus-Titer zu erreichen (Provost & Hilleman, 1979; Daemer et al., 1981; Flehmig, 1981; Flehmig et al., 1981). HAV-Varianten dagegen, die beschleunigt in Zellkultur wachsen, wurden durch kontinuierliche Passagierung des Virus in kultivierten Zellen selektiert. Sie erreichten eine schnellere Produktion von viralem Antigen und einen höheren Virus-Titer (Daemer et al., 1981; Jansen et al., 1988; Cohen et al., 1987b). Das Virus muss also einen Prozess der Zellkulturadaption durchmachen, um die Fähigkeit einer effizienten Replikation zu etablieren. Hierbei kommt es zu ZK-adaptierenden Mutationen, die dem Virus diese Fähigkeit verleihen.

Eine dieser ZK-adaptierten Varianten ist das in dieser Arbeit verwendete HAV/7 (Abb. 4). Das Virus war nach 32 Passagen des HAV-Wildtypstammes HM-175 in AGMK-Zellen an das Wachstum in Zellkultur adaptiert und für Schimpansen und Krallenaffen attenuiert (Cohen et al., 1987b; Karron et al., 1988). Ein Vergleich der Nukleotidsequenz von HAV HM-175 und der ZK-adaptierten Variante HAV/7, zeigt 24 Nukleotidveränderungen innerhalb des 7,5 kb Genoms. Nukleotidsubstitutionen treten dabei in allen Regionen des Genoms, mit Ausnahme der VP4- und der 3C-Region auf. Auch in der 5'- und 3'-NTR treten Mutationen auf, wobei 5 Basen in der 5'-NTR der adaptierten Variante deletiert sind. 12 Aminosäure-Substitutionen in 7 der 11 viralen Proteine konnten im Polyprotein identifiziert werden (Cohen et al., 1987b).

Die Sequenz einer zweiten Zellkultur-adaptierten Variante von HAV HM-175 (HM175/p16), die 16 Mal in Zellkultur passagiert wurde (Jansen et al., 1988), zeigt im Vergleich zur Sequenz von HAV/7 (Cohen et al., 1987b) drei identische Mutationen in den NTRs der RNA und vier Mutationen, die zu den gleichen Aminosäuren-Substitutionen im Polyprotein führen. Das Auftreten identischer Mutationen in beiden HAV-Varianten lässt vermuten, dass diese Mutationen besonders wichtig für die Zellkulturadaption sind (Jansen et al., 1988).

Konstruktionen von HAV-Chimären, die Teile von HAV-WT und ZK-adaptierten HAV-Varianten enthielten, erlaubten eine Abschätzung, welche Mutationen zur ZK-Adaption beitragen. Zunächst wurden diese Mutationen in der P2/P3-Region des Genoms identifiziert (Cohen et al., 1989), später gelang eine weitere Beschränkung auf die 2B/2C-Region

(Emerson et al., 1991). In weitere Studien wurden mittels gezielter Punktmutation definierte Kombinationen der 2B- und 2C-Mutationen in HAV-WT cDNA Klone eingebracht. Die Experimente offenbarten, dass eine Mutation in der 2B- und zwei Mutationen in der 2C-Region verantwortlich für die beschleunigte Virusreplikation in kultivierten Zellen sind. In der 2B-codierenden Region befindet sich die Mutation an Position 3889, was ein Aminosäure-Austausch von Alanin zu Valin verursacht, während Mutationen in der 2C-codierenden Region an Position 4087, wodurch die Aminosäure Lysin durch Methionin ersetzt wird und an 4222, was eine Aminosäure-Substitution von Phenylalanin zu Serin zur Folge hat, auftreten. Allerdings war keine der Mutationen alleine effektiv, während eine Kombination von zwei der drei Mutationen die Fähigkeit für die Replikation des Virus in Zellkultur dramatisch verstärkte. Eine Kombination der 3889-Mutation mit Mutationen außerhalb der P2-Region führte ebenfalls zu einer beschleunigten Replikation. Die Kombination der beiden 2C-Mutationen war zwar am wenigsten effektiv, aber auch hier konnte ein Effekt auf die virale Replikation durch Kombination mit Mutationen außerhalb der P2-Region beobachtet werden (Emerson et al., 1992, 1993). Neben der 3889-Mutation tritt in der 2B-Region der ZK-adaptierten Variante HAV/7 eine Basensubstitution an Position 3919 auf, die ein Aminosäure-Austausch von Glycin zu Alanin zur Folge hat (Cohen et al, 1987b). Da die 3919-Mutation in diesen Experimenten immer mit der Mutation an Position 3889 gepaart und nie alleine untersucht wurde, kann die Möglichkeit, dass die 3919 Mutation die Mutation an Position 3889 ersetzen kann, nicht ausgeschlossen werden (Emerson et al., 1992).

Keine der verwendeten chimären Konstrukte zeigt so eine schnelle Replikation wie HAV/7 alleine, so dass die Vermutung nahe liegt, dass viele oder die meisten Mutationen, die während der Adaption von HAV-WT an Zellkultur entstehen, eine Rolle bei der Effektivität der Virusreplikation spielen müssen (Emerson et al., 1993).

Bei einem Sequenzvergleich zwischen dem HAV-WT GBM und zwei Zellkultur-adaptierten Varianten von HAV GBM, konnte wieder die Mutation an Position 3889 identifiziert werden, während die anderen Mutationen, die in Zellkultur-adaptierten Varianten von HAV HM-175 auftreten, nicht beobachtet werden konnten. Letztere könnten vielleicht zur Zellspezifität beitragen (Graff et al., 1994a; 1994b).

Mutationen in der 5'-NTR scheinen ebenfalls zur ZK-Adaption beizutragen (Cohen et al., 1989; Ross et al., 1989; Day et al., 1992). Während die 2B- und 2C-Mutationen aber zu einer allgemeinen Steigerung der viralen RNA-Replikation in Zellkultursystemen führen, stehen die Mutationen in der 5'-NTR eher in Verbindung mit einer zelltypabhängigen Steigerung der Cap-unabhängigen Translation (Day et al., 1992; Schultz et al., 1996a). Hier konnten drei

zelluläre Proteine identifiziert werden, die an die 5'-NTR Region des Virus binden können und somit einen Einfluss auf die Funktion der HAV-IRES ausüben. Diese Proteine sind PTB (*polypyrimidine tract-binding protein*) (Chang et al., 1993), GAPDH (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) (Schultz et al., 1996b) und PCBP2 (*poly(rC)-binding protein 2*) (Graff et al., 1998). GAPDH verursacht nach Bindung an die IRES eine Destabilisierung ihrer Sekundärstruktur und so finden sich in ZK-adaptierten HAV-Varianten Mutationen innerhalb der 5'-NTR, welche die GAPDH-Bindung an die IRES herabsetzen (Schultz et al., 1996b; Yi et al., 2000). Die 5'-NTR scheint aber nicht die einzige Region mit wirtszellspezifischen Informationen darzustellen. Eine, auch in dieser Arbeit verwendete, Variante von HAV HM-175 (HAV-GP), die an BS-C-1 Zellen adaptiert ist (Cromeans et al., 1987), konnte nach Passagierung in Meerschweinchen (*Guinea pig*, GP)-Zellen an diese angepasst werden (Abb. 4). Diese Adaption an den neuen Wirt geht nicht mit Mutationen in der 5'-NTR Region einher; es tritt lediglich je eine Mutation in der 2B- (an Position 3679) und der 2C-Region (an Position 4419) auf, die zu Aminosäure-Substitutionen im Protein führen. Die in der ZK-adaptierten HAV-Variante HAV/7 auftretenden Mutationen in der 2B- und 2C-codierenden Region konnten nicht identifiziert werden (Frings & Dotzauer, 2001).

Dennoch zeigen ZK-adaptierte HAV-Varianten im Gegensatz zu anderen Picornaviren ein ausgesprochen langsames Replikationsverhalten und führen in der Regel in Zellkulturen zu persistenten Infektionen ohne einen cytopathischen Effekt zu verursachen (Vallbracht et al., 1984; Harmon et al., 1989). Während beispielsweise Polioviren weniger als 8 h für einen kompletten Replikationszyklus benötigen und 500-5.000 Partikel pro infizierter Zelle produzieren können, werden bei einer erfolgreichen Infektion von kultivierten Zellen mit HAV nur durchschnittlich 20 Partikel pro infizierter Zelle generiert (Harmon et al., 1989; Rueckert, 1990). Eine Ausnahme bilden hierbei cytopathogene Varianten des HAV (HAV<sub>cyt</sub>), die ein vergleichsweise schnelles Replikationsverhalten aufweisen. Eine cytopathogene Variante von HAV HM-175, HAV<sub>cyt/HB1.1</sub>, wurde aus, mit HAV HM-175 persistent infizierten BS-C-1 Zellen, nach kontinuierlicher Passagierung in FRhK-4-Zellen isoliert und der Phänotyp charakterisiert (Brack et al., 1998). Es zeigte sich, dass HAV<sub>cyt/HB1.1</sub> eine schnellere Replikation aufweist, als die ZK-adaptierte Variante HAV/7. Außerdem löst HAV<sub>cyt/HB1.1</sub> in von ihm infizierten Zellen Apoptose aus. Eine Sequenzanalyse von HAV<sub>cyt/HB1.1</sub> zeigte ebenfalls die Anwesenheit der 3889-Mutation in der 2B- und der 4222-Mutation in der 2C-Region, während die Mutation an Position 4087 in der 2C-Region nicht vorhanden ist. Des Weiteren konnten 7 Mutationen in der 5'-NTR detektiert werden (Brack et al., 1998).

Obwohl Mutationen in der 2B- und 2C-codierenden Region von HAV auf ein Zusammenhang zwischen diesen Proteinen und dem beschleunigten Replikationsverhalten ZK-adaptierter HAV-Varianten hinweisen und somit eine potentielle Beteiligung der Proteine an der HAV-Replikation möglich wäre, konnte jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden, welche Proteine in welcher Weise zu dem speziellen Replikationsverhalten von HAV beitragen.

### **1.4 Zielsetzung**

Wie beschrieben, greift das Hepatitis A-Virus in den RIG-I/MDA-5-vermittelten Signalweg zur IRF-3-Aktivierung, als Komponenten der IFN- $\beta$ -Induktion, ein. Es stellte sich nun die Frage, welches Protein bzw. welche Proteine des Virus ihm diese Fähigkeit verleihen und wo sie im Signalweg zur IRF-3-Aktivierung intervenieren. Zu Beginn dieser Arbeit wurde bereits das HAV-2B Protein als möglicher Kandidat vorgeschlagen, so dass hier das Hauptaugenmerk lag. Unklar blieb jedoch wo und in welcher Weise dieses Protein in den IRF-3-Signalweg eingreift und ob ein direkter Angriff auf zelluläre Proteine erfolgt oder eine indirekte Beeinflussung der IRF-3-Aktivierung, z.B. über Interaktionen mit zellulären Membrankompartimenten, vorliegt. Da HAV-2B intrazelluläre Membran-Veränderungen induziert, sollte zudem die Lokalisation des Proteins in Bezug auf zelluläre Membranen ermittelt werden.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die Effekte der HAV-Proteine auf den RIG-I/MDA-5-vermittelten Signalweg zur IRF-3-Aktivierung mit der HAV-Zellkulturadaption in Zusammenhang stehen oder ob auch entsprechende Proteine aus HAV-Wildtypen diese Eigenschaften aufweisen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Viren

HAV/7: Abgeleitet von dem 1976 isolierten HAV-Stamm HM-175; durch Transfektion mit dem Transkript des infektiösen HM-175 cDNA-Klons pHAV/7 erhalten (Cohen et al., 1987b); passagiert in FRhK-4 Zellen.

HAV-Wildtypen (WT): Aus Patientenstuhl; freundlicherweise von Ulrike Krause (Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Von mir als HAV-WT A, HAV-WT B, HAV-WT C und HAV-WT D bezeichnet.

HAV<sub>GP</sub>: Aus Zellkultur-Überständen (Passage 1, 8.12.1994); von mir als HAV-GP bezeichnet.

HAV-HMH: Aus Blutplasma eines Patienten; freundlicherweise von Dr. Alke Heitmann (Qiagen GmbH, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

NDV: NDV-Stamm R 05/93, erhalten vom Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems; passagiert in FRhK-4 Zellen.

#### 2.1.2 Zellen

FRhK-4-Zellen: Zelllinie von fetalen Rhesusaffen-Nierenzellen, Laboratory of Hepatitis Research, CBER/FDA, Bethesda, Maryland, USA.

#### 2.1.3 Kompetente Bakterien

*Escherichia (E.) coli*, Stämme DH5 $\alpha$  und HB101.

### 2.1.4 Plasmide

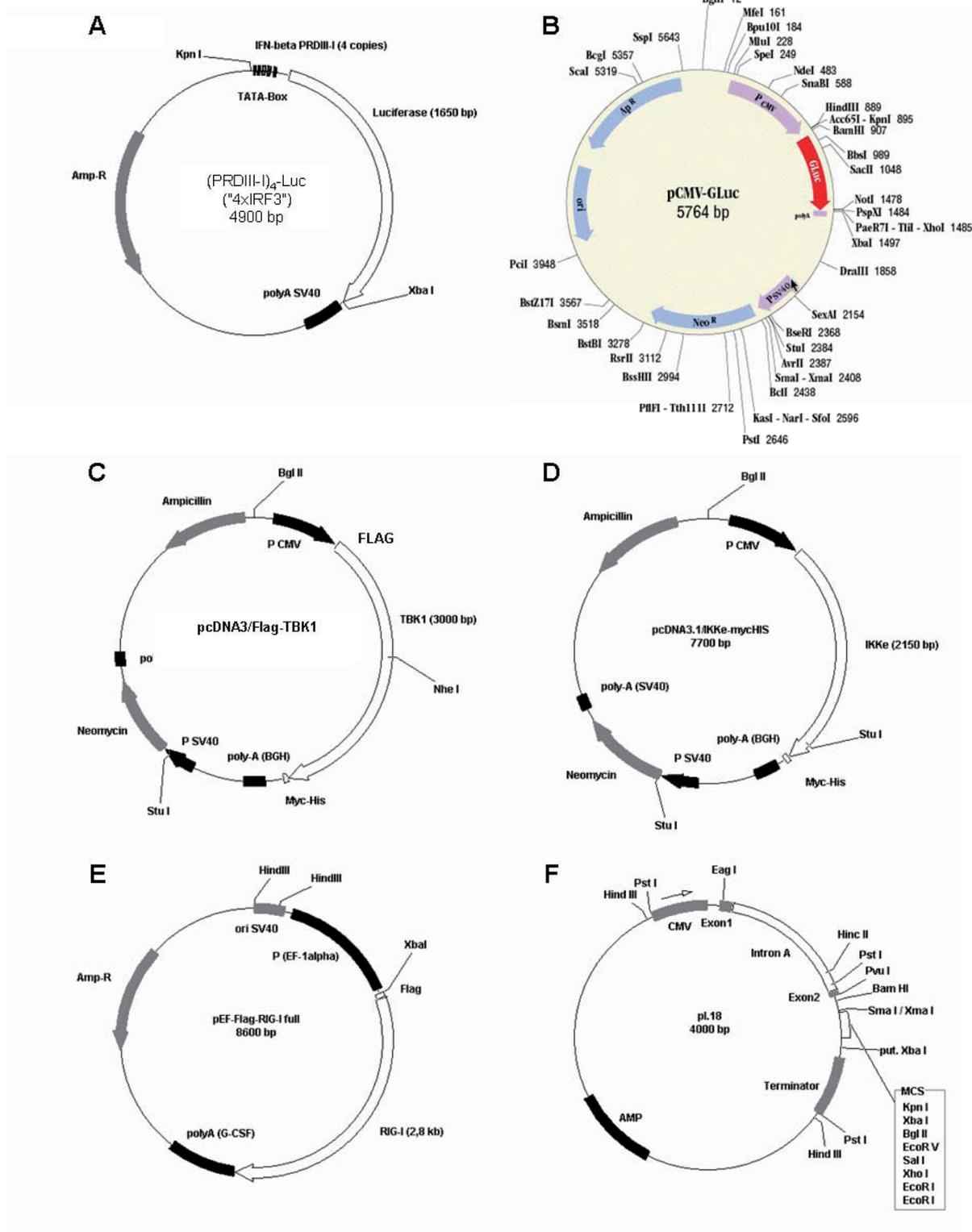
(PRDIII-I)<sub>4</sub>-Luc (Abb. 6 A): Bei diesem Reporterplasmid befindet sich die PRDIII-I-Domäne des humanen IFN- $\beta$ -Enhancers, welche die Bindestelle für die IRF-3-Dimere ist, in vierfacher Wiederholung vor dem Leuchtkäfer (*Firefly*) Luciferase-Gen. Der Basisvektor ist pGL3 (Promega) inklusive einer TATA-Box. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. Stephan Ludwig (Institute of Molecular Medicine, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

pCMV-GLuc (Abb. 6 B): Hierbei handelt es sich ebenfalls um ein Reporterplasmid, welches das Ruderfußkrebs (*Gaussia*) Luciferase-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthält. Das Plasmid ist konstitutiv aktiv und wurde in Transfektions-Experimenten als interne Kontrolle eingesetzt (New England BioLabs).

pcDNA3/Flag-TBK1 (Abb. 6 C): Dies ist ein Expressionsvektor, der die cDNA des humanen TBK1 in N-terminaler Fusion mit einem FLAG-Tag unter der Kontrolle eines CMV-Promotors enthält. Der Basisvektor ist pcDNA3 (Invitrogen), der in den Experimenten als Leervektor verwendet wurde. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Makoto Nakanishi (Department of Biochemistry, University Medical School, Nagoya City, Japan) zur Verfügung gestellt (Tojima et al., 2000).

pcDNA3.1/IKK $\epsilon$ -myc (Abb. 6 D): Auch hierbei handelt es sich um einen Expressionsvektor, der die cDNA des humanen IKK $\epsilon$  in C-terminaler Fusion mit einem myc-Tag unter der Kontrolle eines CMV-Promotors enthält. Der Basisvektor ist pcDNA3.1 (Invitrogen), der in den Experimenten als Leervektor Einsatz fand. pcDNA3.1/IKK $\epsilon$ -myc wurde freundlicherweise von Ulrich Siebenlist (NIAID, NIH Bethesda, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt (Chariot et al., 2002).

pEF-Flag-RIG-I full (Abb. 6 E): Dieses Plasmid ist ebenfalls ein Expressionsvektor, der die cDNA des humanen *full-length* RIG-I in N-terminaler Fusion mit einem FLAG-Tag unter der Kontrolle des EF-1 $\alpha$ -Promotors enthält. Der Basisvektor ist pEF-BOS, der in den Experimenten als Leervektor genutzt wurde. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Takashi Fujita (Department of Tumor Cell Biology, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan) zur Verfügung gestellt (Yoneyama et al., 1998).



**Abb. 6: Plasmidkarten.** Darstellung einiger der eingesetzten Plasmide mit Genen und Promotoren, Resistenz-Genen und Restriktionsenzym-Schnittstellen (nähere Erläuterungen im Text).

pcDNA3/Flag-MAVS: Hierbei handelt es sich auch um einen Expressionsvektor, der die cDNA des humanen MAVS in N-terminaler Fusion mit einem FLAG-Tag unter der Kontrolle eines CMV-Promotors enthält. Der Basisvektor ist pcDNA3 (Invitrogen), der in den

Experimenten als Leervektor eingesetzt wurde. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Z. J. Chen (University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, Texas) zur Verfügung gestellt (Seth et al., 2005).

**pI.18 (Abb. 6 F):** pI.18 ist ein CMV-Promotor kontrollierter Expressionsvektor, der eine, von zwei Exonsequenzen (Splice Donor/Akzeptor) flankierte, Intron A-Sequenz enthält, die im Zuge der mRNA-Reifung herausgeschnitten wird. Dieses führt zu einer stark gesteigerten Expression. Dieser Vektor wurde zur Expression von HAV-Proteinen verwendet. Hierfür standen bereits die Expressionsvektoren der verschiedenen HAV/7-Proteine zur Verfügung (Magulski, 2007). Ebenfalls wurden bereits die Plasmide für die Expression *getaggtter* 2B-Proteine, pI.18/FLAG-2B und pI.18/2B-myc, generiert (Domsgen, 2008). Für die Expression von HAV-Wildtyp-Proteinen wurde deren cDNA Sequenzen zuvor mittels RT-PCR amplifiziert und anschließend innerhalb der *KpnI*- und *EcoRV*-Schnittstellen der *Multiple Cloning Site* (MCS) in den Vektor eingebracht. Das pI.18/2B-Stop Plasmid, wo die cDNA ebenfalls aus einem HAV-Wildtyp-Isolat stammte, stand bereits zur Verfügung (Schwarz, 2006). Das Plasmid pI.18 wurde freundlicherweise von Dr. J. Robertson (NIBSC, Herfordshire, UK) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.5 Synthetische Nukleinsäuren

#### 2.1.5.1 RT-PCR-Primer zur Amplifikation der cDNA von HAV-Proteinen (biomers)

Die folgenden Primer dienen der Amplifikation der cDNA von HAV-2B und HAV-2C. Rot sind hier diejenigen Nukleotide dargestellt, die spezifisch für die Enden der cDNA des jeweiligen Proteins sind. Bei allen Primern ist jeweils eine für HAV unspezifische Sequenz vorgeschaltet (schwarz). Diese beinhaltet die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *KpnI* bzw. *EcoRV* (unterstrichen) und einen vorgeschalteten *Spacer*, damit die Enzyme ihre Schnittstellen besser erkennen können. Bei den Sense-Primern schließt sich nach der Schnittstelle noch eine Kozak-Sequenz für eine höhere Effizienz der Initiation der Translation an. Das Start- und Stopp-Codon wurde für die Expression der Proteine in Frame eingefügt. Der Antisense-Primer ist in einer revers-komplementären Form zur Sequenz der cDNA dargestellt.

### Primer zur Amplifikation der cDNA des 2B-Proteins von HAV

Die cDNA-Sequenz des 2B-Proteins reicht, bezogen auf HAV HM-175 (*Accession-Nr.:* M14707), von Nukleotid 3243 bis 3995 und ist damit 753 bp lang.

Sense-Primer:

5' GG TTG GGT ACC ACC ATG **GCC AAA ATT TCT CTT TTT TA** 3'  
Spacer *KpnI* Kozak Start HAV-2B

→ Nukleotide 3243-3262

Antisense-Primer:

5' C GCC GGA TAT CTA **CTG AGT CCT TAA CTC CAT CA** 3'  
Spacer *EcoRV* Stopp HAV-2B

→ Nukleotide 3976-3995

### Primer zur Amplifikation der cDNA des 2C-Proteins von HAV

Die cDNA-Sequenz des 2C-Proteins reicht, bezogen auf HAV HM-175 (*Accession-Nr.:* M14707), von Nukleotid 3996 bis 5000 und ist damit 1005 bp lang.

Sense-Primer:

5' GGT TGG GTA CCA CCA TGA **GTT TTT CCA ACT GGT TAA** 3'  
Spacer *KpnI* Kozak Start HAV-2C

→ Nukleotide 3996-4014

Antisense-Primer:

5' CGC CGG ATA TCT **ACT GAG ACC ACA ACT CAA TGA ATT CAG TCA TGT** 3'  
Spacer *EcoRV* Stopp HAV-2C

→ Nukleotide 4969-5000

#### **2.1.5.2 Primer für die Sequenzierung der cDNA von HAV-Proteinen (biomers)**

Die folgenden Primer dienen der Sequenzierung der 753 bp großen 2B-Protein-cDNA und der 1005 bp großen 2C-Protein-cDNA des Hepatitis A-Virus.

### Primer für die Sequenzierung der cDNA von HAV-2B

HAV-2B 3' (200nt):

5' ATG AAA CAA TCT TGT CAT CC 3'

→ Nukleotide 3443-3462

HAV-2B 5':

5' GCC AAA ATT TCT CTT TTT TA 3'

→ Nukleotide 3243-3262

### Primer für die Sequenzierung der cDNA von HAV-2C

HAV-2C 5':

5' AGT TTT TCC AAC TGG TTA AG 3'

→ Nukleotide 3996-4015

HAV-2C 4596:

5' ACA GAT GAG GAT TGG TCA GA 3'

→ Nukleotide 4596-4615

HAV-2C 4296 rev:

5' TTG GAT CAA CCT GAG CCA TT 3'

→ Nukleotide 4277-4296

#### **2.1.5.3 Sonstige Nukleotide**

Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP)-Set

Roche

#### **2.1.6 Antibiotika**

Ampicillin

Serva

Penicillin (10 U/ $\mu$ l) / Streptomycin (10 mg/ml)

Sigma-Aldrich

### 2.1.7 Antikörper, Enzyme und sonstige Proteine

#### 2.1.7.1 Antikörper

Maus-anti-HAV Antikörper „7E7“, monoklonal	Mediagnost
Kaninchen-anti-2B, polyklonal	Genovac
Kaninchen-anti-VP1, polyklonal	A. Dotzauer, Doktorarbeit
Kaninchen-anti-FLAG, polyklonal	Sigma-Aldrich
Maus-anti-FLAG „M2“, monoklonal	Sigma-Aldrich
Maus-anti-myc, monoklonal	Invitrogen
Maus-anti-Calreticulin, monoklonal	Abcam
Ziege-anti-Maus, FITC-konjugiert	Kierkegaard & Perry (KPL)
Ziege-anti-Maus, Texas Rot-konjugiert	Kierkegaard & Perry (KPL)
Ziege-anti-Kaninchen, FITC-konjugiert	Santa Cruz
Ziege-anti-Kaninchen, Texas Rot-konjugiert	Santa Cruz

#### 2.1.7.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase mit 10 x Dephosphorylierungspuffer	Boehringer Mannheim
Restriktionsendonukleasen mit 10 x Puffer	Roche
Klenow-Fragment (von <i>E. coli</i> DNA-Pol. I) mit 10 x Puffer	Invitrogen
Lysozym aus Hühnereiklar	Serva
Reverse Transkriptase „Expand-RT“ mit 5 x Puffer	Roche
RNase A	Roche
T4 DNA-Ligase mit 10 x Puffer	Roche
MolTaq DNA-Polymerase mit 10 x Puffer	Molzym
Trypsin mit Na-EDTA (0,2 g/l)	Sigma-Aldrich

#### 2.1.7.3 Sonstige Proteine

Bovines Serumalbumin (BSA)	Roche
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL
MitoTracker Rot CMXRos	Invitrogen

### 2.1.8 Kits und Standards

Bio-Rad Protein Assay (5 x Bradford-Reagenz)	Bio-Rad
DNA-Längenstandard „1 kb DNA ladder“	Invitrogen
<i>Gaussia</i> Luciferase Assay Kit	New England BioLabs
Luciferase-Assay-System	Promega
peqGOLD TriFast™	Peqlab
QIAamp® DNA Stool Mini Kit	Qiagen
QIAamp® Viral RNA Kit	Qiagen
VenorGeM PCR-based Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs

### 2.1.9 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

#### Gebrauchslösungen

PBS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,2
DEPC-H <sub>2</sub> O (RNase-frei)	H <sub>2</sub> O übernacht mit DEPC (0,1 % v/v) rühren und anschließend zweimal autoklavieren

#### Zellkulturmedien

Zur Kultivierung von FRhK-4-Zellen wurde *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) verwendet. Diesem wurde ein variabler Anteil an fetalem Kälberserum (FCS) zugesetzt.

Grundmedium	DMEM (Sigma) mit 2 mM L-Glutamin 26 mM NaHCO <sub>3</sub> 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Wachstumsmedium	Grundmedium mit 10 % (v/v) FCS



### Schnelltest zur Überprüfung von Plasmid-DNA (Miniprep)

Lösung 1	50 mM Glucose 10 mM EDTA 10 mM Tris pH 8,0 mit HCl einstellen; autoklavieren kurz vor Gebrauch Zugabe von 2 mg/ml Lysozym
Lösung 2	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS frisch ansetzen
Lösung 3	3 M Natriumacetat pH 4,8 mit Eisessig einstellen

### Plasmidpräparation (Maxiprep) nach Sambrook et al., 1989, verändert

0,5 M EDTA	pH 8,0 mit NaOH einstellen
2 M Tris	pH 8,0 mit HCl einstellen
TES-Puffer	50 mM Tris (pH 8,0) 50 mM NaCl 5 mM EDTA (pH 8,0)
STET-Puffer	50 mM Tris (pH 8,0) 50 mM EDTA (pH 8,0) 8 % (w/v) Saccharose 5 % (v/v) Triton X-100 frisch ansetzen
Lysozymlösung	20 mg/ml Lysozym in 20 mM Tris (pH 8,0) frisch ansetzen
1 % Sarcosyl	1 % (w/v) Sarcosyl in 20 mM Tris (pH 8,0)
Ethidiumbromid	10 mg/ml Ethidiumbromid in Aqua dest.
Cäsiumchlorid (CsCl)	50 g CsCl in 65 ml 20 mM Tris (pH 8,0) lösen Refraktionsindex von 1,3865 mit 20 mM Tris einstellen
NaCl-gesättigtes Isopropanol	Isopropanol ausschütteln in 10 mM Tris (pH 8,0) / 1 mM EDTA, gesättigt mit NaCl

### Agarose-Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer	2 M Tris 0,25 M Natriumacetat 50 mM EDTA pH 7,8 mit Eisessig einstellen für Gebrauch Verdünnung mit Aqua dest. auf 1 x
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in Aqua dest.
DNA-Probenpuffer	40 % (w/v) Saccharose 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 1 mM EDTA (pH 8,0) 0,1 % (w/v) SDS
DNA-Längenstandard („1 kb ladder“)	60 µl 1 kb ladder (Invitrogen) 40 µl 10 x TAE-Puffer 100 µl DNA-Probenpuffer 300 µl Aqua dest. 10 min bei 56 °C inkubieren Lagerung bei -20 °C

### Transfektion eukaryotischer Zellen mittels PEI

PEI (Sigma-Aldrich)	1 µg/µl PEI in Aqua dest. steril-filtrieren Lagerung der Aliquots bei 4°C
---------------------	---

### Zell-Lyse nach der Freeze & Thaw-Methode

Tris-HCl	250 mM Tris pH 7,5 einstellen mit HCl autoklavieren Lagerung bei 4°C
TEN-Puffer	40 mM Tris (pH 7,5) 1 mM EDTA (pH 8,0) 150 mM NaCl autoklavieren Lagerung bei 4°C

### Proteinbestimmung nach Bradford

BSA-Stammlösung	10 mg/ml BSA in 0,25 M Tris-HCl (pH 7,5) Verdünnen in Tris-HCl für Standards
Bradford-Reagenz	5 x Bradford-Reagenz auf 1 x mit Aqua dest. verdünnen und filtrieren

### Indirekte Immunfluoreszenz

Aceton	90 % (v/v) Aceton in PBS
Paraformaldehyd	4 % (v/v) Paraformaldehyd in PBS über Nacht rühren lassen steril-filtrieren bei Raumtemperatur 1 Monat haltbar
Triton X-100	0,2 % (v/v) in PBS
DAPI	1 µg/ml DAPI in PBS
MitoTracker Rot	1 mM MitoTracker Rot CMX Ros in DMSO Lagerung lichtgeschützt bei -20 °C

### MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität

MTT-Lösung	5 mg/ml MTT in 1 x PBS lösen steril-filtrieren Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C
Solubilisierungslösung	10 % SDS (w/v) in 0,01 N HCl lösen Lagerung bei Raumtemperatur

### **2.1.10 Chemikalien und Reagenzien**

Aceton	Merck
Acrylamid	Pharmacia Biotech

Agar „Bacto Agar“	Becton & Dickinson
Agarose “LM-MP” low melting point”	Roche
Agarose „Biozym LE Agarose”	Biozym
Ammoniumpersulfat	Serva
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Merck
Cäsiumchlorid	Serva
Chloroform	Fluka
DAPI	Sigma-Aldrich
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich
Diethylether	Riedel-de Haen
Dinatriumhydrogenphosphat	Riedel-de Haen
DMEM (mit L-Glutamin)	Sigma-Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich
EGTA (Ethylenglycoltetraacetat)	Roche
Eindeckmedium (Glycerol/PBS)	Euroimmun
Entwickler und Fixierer „Adefodur“	Adefo
Essigsäure (Eisessig)	Fluka
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Glucose	Merck
Glycerol	Riedel-de Haen
Glycin	Roth
Hefe-Extrakt „Bacto Yeast Extract“	Becton Dickinson
Immersionsöl “Immersol F”	Zeiss
Isoamylalkohol (Isopentylalkohol)	Merck
Isopropanol (2-Propanol)	Roth
Kaliumacetat	Riedel-de Haën
Kaliumchlorid	Riedel-de Haën
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haën
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Riedel-de Haën

Mineralöl	Sigma-Aldrich
MTT (Thiazolyl-Blau Tetrazolium-Bromid)	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Fluka
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Fluka
N-Lauroyl-Sarcosin (Sarcosyl)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Fluka
Phenol (H <sub>2</sub> O-gesättigt)	Roth
Phenol (TE-gesättigt)	Roth
Saccharose	Acros
Salzsäure	Merck
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Roth
Tris Base (Tris-hydroxymethyl-aminomethan)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Serva
Trypan Blau	Sigma-Aldrich
Trypton „Bacto Tryptone“	Becton Dickinson

### 2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Bakterienröhrchen 14 ml	Greiner
Combitips	Eppendorf
Deckgläschen, rund (ø 15 mm)	Menzel-Gläser
Dialyseschläuche „Visking“	Serva
Einmalküvetten, 1,5 ml Plastik	Plastibrand
Filterpapier „Schwarzband“	Sartorius
Glasobjektträger (76 x 26 mm)	Menzel-Gläser
Kanülen (0,9 x 40 mm und 0,45 x 25 mm)	B. Braun
Kimwipes lite (Wischtücher)	Kimberly-Clark
Nitrocellulosemembran „Protan“	Schleicher&Schuell
Parafilm „M“	American National Can
Pasteur-Pipetten	Brand
PCR-Reaktionsgefäße „PCR 8-Strip Tubes“	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf

Quick-Seal-Röhrchen (Polyallomer)	Beckman
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml („Eppendorf-Cups“)	Eppendorf
Sample Plates (96-well) 1450-401 (Luminometer)	Wallac
Spritzen	B. Braun
Sterilfilter für Spritzen „Millex“	Millipore
Ultrafree-MC Filter (0,45 µm)	Millipore
Whatman Chromatographie-Papier	Whatman
Zellkulturplastikwaren Nunclon Δ	Nunc
Zellschaber	Nunc
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml („Falcons“)	Greiner

### 2.1.12 Geräte und Hilfsmittel

Analysewaage BP 61	Sartorius
Analysewaage MC 1	Sartorius
Begasungsbrutschränke	Heraeus
Chemikalien-Digestorium	Prutscher
Digitalkamera	Fujifilm
Eismaschine AF-10	Scotsman
Elektrophoresekammern (Agarosegele)	Bio-Rad
Fluoreszenzmikroskop „Axioskop 2“ (HAL 100 & HBO 100)	Carl Zeiss
Fluoreszenzfilter-Sets 02 (365 nm), 09 (450-490 nm), 15 (546 nm) und 24 (485 + 578 nm)	Carl Zeiss
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Assistent
Glaspipetten	Hirschmann EM
Glaswaren	Brand, B. Braun, Schott
Inkubator Certomat HK	Braun Biotech Int.
Kolbenhubpipetten (µl-/Multi-Pipetten)	Eppendorf, Gilson
Kühlblock TR-L 288	Liebisch
Lichtmikroskop Wilovert S	Hund
Lumineszenz Counter „Trilux 1450 MicroBeta“ mit Software	Wallac
Magnetrühr Tisch RCT basic	Ika Labortechnik
Mehrkanalpipetten (8 Kanäle)	Eppendorf
Messzylinder	VitLab

pH-Meter pH 537	WTW
Pipettierhilfe „Acuboy“	TecNoMara
Pipettierhilfe „Pipetboy acu“	Integra Biosciences
Power Pac 300	Bio-Rad
Power-Supply 200/2.0	Bio-Rad
Quarzküvetten Suprasil	Hellma
Refraktometer	Optronic
Reinstwassersystem “NANOpure”	Barnstead Int.
Saugpumpe “Vacuboy”	Integra Biosciences
Schüttler Certomat S	B. Braun Biotech Int.
Schweißgerät für Quick Seal-Röhrchen	Beckman
SpeedVac SC 110 Vakuumentrifuge	Savant
Spektralphotometer DU 640	Beckman
Sterilwerkbank Clean Air (Typ: CA/REV 4)	Clean Air Supplies GmbH
Sterilwerkbank LaminAir HB 2448	Heraeus
Taumler “Red Rotor”	Hofer
Thermoblock TR-L 288	Liebsch
Thermocycler Gene Amp PCR System 2400	Perkin-Elmer
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge GS-6R mit Rotor GH 3.7 (Falkons)	Beckman
Tischzentrifuge 5403 (Cups)	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415 C (Cups)	Eppendorf
Tischzentrifuge miniSpin plus	Eppendorf
Ultraschallgerät UW 200	Bandelin
Ultrazentrifuge LE-70 mit Rotor Typ FW 65	Beckman
UV-Handlampe VL-6C	Serva
UV-Transluminator “Mighty Bright”	Hofer
Vortexer VF2	Ika Labortechnik
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge RC28S mit Rotor F-28/50 und F-16/250	Sorvall
Zentrifugenröhrchen 50/250 ml („Sorvall-Zentrifugenröhrchen“)	Sorvall

### 2.2 Methoden

Die Angaben der Beschleunigung bei Zentrifugationen erfolgen in  $g_{\max}$ .

#### 2.2.1 Zellkultivierung von FRhK-4-Zellen

FRhK-4-Zellen wurden kontinuierlich bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in 1 % FCS-DMEM mit den Zusätzen 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin gehalten. Das Medium wurde zweimal pro Woche ausgewechselt. Alle ein bis zwei Wochen erfolgte eine Passagierung. Dazu wurden die Zellen zunächst mit Trypsin/EDTA gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA für etwa 8 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Aufgrund der Trypsin/EDTA-Behandlung konnte durch leichtes Abklopfen das Ablösen der Zellen vom Boden des Zellkulturgefäßes erfolgen. Die Zellen wurden dann in 10 % FCS-DMEM resuspendiert, in einem 1:5-Splitverhältnis in neue Zellkulturgefäße umgesetzt und mit frischem Wachstumsmedium (10 % FCS-DMEM) versehen.

#### 2.2.2 Mycoplasmen-Test mittels PCR (VenorGeM)

Mycoplasmen sind intrazelluläre bakterielle Parasiten, die den Stoffwechsel der Wirtszellen beeinflussen und somit Ergebnisse verfälschen können. Deshalb wurde in regelmäßigen Abständen dieser PCR-basierte Mycoplasmen-Test nach Angaben des Herstellers Minerva Biolabs durchgeführt. Dabei konnte in keinem der Tests eine Mycoplasmen-Kontamination nachgewiesen werden.

#### 2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Um bei sich anschließenden Versuchen gleiche Zellzahlen einsetzen zu können, sollte die Zellzahl ermittelt werden. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen zunächst mit Trypsin/EDTA abgelöst und in 10 % FCS-DMEM resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden dann 1:20 (v/v) mit PBS gemischt. Diese Vorverdünnung wurde dann wiederum 1:2 (v/v) mit 0,4 %igem Trypan-Blau versehen, wodurch tote Zellen identifiziert werden konnten, die im Gegensatz zu vitalen Zellen blau gefärbt waren. Anschließend wurden 20 µl der Zellsuspension in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer überführt, 8 B-Felder ausgezählt und

daraus der Mittelwert gebildet. Unter Berücksichtigung des Verdünnungs- und des Kammerfaktors erfolgte dann die Berechnung der Zellzahl/ml.

### **2.2.4 Herstellung eines NDV-Pools und Bestimmung der TCID<sub>50</sub>/ml mittels Endpunkttitration**

FRhK-4-Zellen wurden für die Herstellung eines NDV-Pools 1:5 in 185 cm<sup>2</sup>-Flaschen umgesetzt. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zum Erreichen der Konfluenz (2-3 Tage). Die Zellen wurden dann mit 7 ml sterilem PBS gewaschen und anschließend mit 0,5 ml einer NDV-Suspension und 19,5 ml 1 % FCS-DMEM versehen. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, bis sich 50 % der Zellen durch den virusinduzierte cytopathischen Effekt (CPE) abgelöst hatten (etwa 4-5 Tage). Der Überstand wurde daraufhin in 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und für 7 min bei 850 x g zentrifugiert. Die Zelltrümmer wurden somit pelletiert und der virushaltige Überstand konnte zu 1 ml Aliquots in Eppendorf-Cups bei -80 °C eingefroren werden.

Zur Bestimmung der TCID<sub>50</sub>/ml (*tissue culture infectious dose 50 %*) wurden zwei unabhängige Verdünnungsreihen aus dem virushaltigem Überstand hergestellt (10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-11</sup>). Dazu wurden in je 11 Eppendorf-Cups 900 µl 1 % FCS-DMEM vorgelegt und, nach Zugabe von 100 µl Virussuspension in die 1:10-Verdünnung, je 100 µl von Stufe zu Stufe überführt. Von zwei 96-Well-Platten, die konfluent gewachsene FRhK-4-Zellen enthielten, wurde das Medium abgesaugt und je 100 µl der verschiedenen Verdünnungen in die ersten 11 Spalten pipettiert. Die 12. Spalte wurde dabei mit Mock-Lysat beschickt. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 7 Tage. Anschließend wurde die Bestimmung der TCID<sub>50</sub>/ml im Lichtmikroskop durchgeführt. Ein Well wurde als positiv betrachtet, wenn durch den CPE eine deutliche Läsion im Zellrasen zu erkennen war. Mittels der Kärber-Gleichung (Hawkes, 1979, nach Kärber, 1931) konnte dann der Virustiter pro ml (TCID<sub>50</sub>/ml) errechnet werden.

### **2.2.5 NDV-Infektion**

Das Newcastle Disease-Virus (NDV) diente in den nachfolgenden Experimenten als intrazellulärer Aktivator der IFN-β-Induktion.

Eine NDV-Infektion wurde stets 24 h nach der Transfektion vorgenommen. Dafür wurden zunächst in 6-Well-Platten transfizierte FRhK-4-Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer MOI von 0,1 in 1,25 ml 1 % FCS-DMEM pro Well

inokuliert. Zur Kontrolle wurden jeweils Parallelansätze mit Mock-Lysat behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 18 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zur Proteinextraktion mittels *Freeze & Thaw*-Lyse (2.2.17) inkubiert.

### **2.2.6 Herstellung eines HAV/7-Pools und Bestimmung der TCID<sub>50</sub>/ml mittels Endpunkttitration**

FRhK-4-Zellen wurden für die Herstellung eines HAV/7-Pools in 185 cm<sup>2</sup>-Flaschen umgesetzt und bis zum Erreichen einer etwa 80 %igen Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 1 % FCS-DMEM gewaschen und das Virusinokulum aus 1 ml Virus-Lysat und 4 ml 1 % FCS-DMEM aufgebracht. Zur Herstellung einer Mock-Kontrolle wurden die Zellen parallel dazu nur mit dem entsprechenden Volumen an Erhaltungsmedium beschickt. Es folgte eine Inkubation bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 2 h unter mehrmaligen Schwenken. Anschließend wurde das Inokulum entfernt und die Zellen mit 25 ml 1% FCS-DMEM beschickt. Dann wurden die Zellen für 14 Tage bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, wobei nach 7 Tagen 10 ml Erhaltungsmedium zugegeben wurde. Um die Zellen anschließend zu lysieren, wurden diese dreimal bei -80 °C eingefroren und bei Raumtemperatur (RT) wieder aufgetaut. Nach Überführung der Lysate in 50 ml Falcon-Röhrchen schloss sich eine dreimalige Ultraschallbehandlung für je 20 sec (20 kHz/200W) an. Daraufhin wurden überschüssige Zellbestandteile durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 1700 x g pelletiert und der virushaltige Überstand konnte zu 1 ml Aliquots bei -80 °C eingefroren werden.

Die Bestimmung des Virustiters (TCID<sub>50</sub>/ml) erfolgte durch die Endpunkttitration. Dafür wurden zunächst FRhK-4-Zellen 1:5 in zwei 96-Well-Platten umgesetzt und übernacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden Virus- und Mock-Lysat aufgetaut und dreimal für 20 sec ultraschallbehandelt (20 kHz/200W). Daraufhin wurden zwei unabhängige Verdünnungsreihen aus dem virushaltigem Überstand hergestellt (10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-11</sup>). Dazu wurden in je 11 Eppendorf-Cups 900 µl 1 % FCS-DMEM vorgelegt und, nach Zugabe von 100 µl Virussuspension in die 1:10-Verdünnung, je 100 µl von Stufe zu Stufe überführt. 100 µl der jeweiligen Verdünnungen wurden anschließend, nach Entfernung des Mediums, in die ersten 11 Spalten der Mikrotiterplatten gegeben. Die 12. Spalte enthielt 100 µl unverdünntes Mock-Lysat. Es folgte eine Inkubation für 2 h bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Nach zweimaligen Waschen mit je 150 µl 1% FCS-DMEM erfolgte die Zugabe von 200 µl 1 % FCS-DMEM und eine Inkubation für 14 Tage bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Im Anschluss erfolgte

die Fixierung der Zellen und der Nachweis von HAV-Antigen mittels indirekter Immunfluoreszenz (2.2.8). Mit Hilfe der Kärber-Gleichung (Hawkes, 1979, nach Kärber, 1931) konnte dann der Virustiter pro ml ( $TCID_{50}/ml$ ) errechnet werden.

### **2.2.7 Infektion von FRhK-4-Zellen mit HAV/7 bzw. mit Mock-Lysat**

Am Tag vor der HAV/7-Infektion wurden FRhK-4-Zellen 1:5 in 80 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen umgesetzt. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml 1 % FCS-DMEM mit 1 ml HAV/7-Lysat (entspricht einer MOI von 1) bzw. 1 ml Mock-Lysat auf die Zellen gegeben und für 2 h bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Während der Inkubation wurden die Zellkulturgefäße des Öfteren geschwenkt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Nach der Inkubationszeit wurde anschließend das Inokulum wieder abgenommen und 20 ml 1% FCS-DMEM auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation für 10 Tagen bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, um eine Infektion aller Zellen zu erreichen. Nach 5 Tagen wurde die Hälfte des Mediums gewechselt. Die so behandelten Zellen wurden dann in die folgenden Versuche eingesetzt. Zum Nachweis der HAV/7-Infektion diente eine indirekte Immunfluoreszenz.

### **2.2.8 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von HAV-Antigen**

Um eine HAV/7-Infektion nachzuweisen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierfür wurde der monoklonale Maus-anti-HAV IgG „7E7“ zur Visualisierung von intrazellulärem HAV-Antigen verwendet. Diese Methode wurde zur einfachen Infektionskontrolle und zur Bestimmung des Virustiters eines HAV/7-Pools angewendet.

Dazu wurden zunächst HAV/7-infizierte FRhK-4-Zellen bzw. Mock-behandelte Zellen der zu untersuchenden Zellkulturen in 96-Well-Platte kultiviert. Für die Fixierung der Zellen wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und diese einmal mit je 150 µl PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl 90 %igem Aceton in PBS (-20 °C) und eine Inkubation von 20 min bei -20 °C. Dieser Schritt diente der Fixierung der Zellen. Danach wurde das Aceton wieder von den Zellen abgenommen und diese daraufhin dreimal mit 150 µl PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe von 50 µl primärer HAV-spezifischer Antikörper-Lösung (5 mg/ml, monoklonaler Maus-anti-HAV Antikörper „7E7“, 1:800

verdünnt mit PBS). Nach einer Inkubation von 45-60 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen abermals dreimalig mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl der sekundären Antikörper-Lösung (Ziege-anti-Maus Antikörper, FITC-konjugiert, 1:80 verdünnt mit PBS). Wieder wurde für 45-60 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit PBS, wurde die Mikrotiterplatte trocken geklopft. Die Auswertung erfolgte anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung von 495 nm. Dabei war das FITC als grün leuchtend erkennbar. Ein Well wurde dabei als positiv, also als HAV/7-infiziert, betrachtet, sobald nur eine Zelle die spezifische HAV-Fluoreszenz aufwies.

### **2.2.9 Extraktion von HAV-RNA**

#### ***2.2.9.1 Extraktion von HAV-RNA mit peqGOLD TriFast™***

Zur Gewinnung von HAV-RNA wurden 10 Tage infizierte FRhK-4-Zellen verwendet (2.2.7). Nach der zehntägigen Inkubation folgte die RNA-Extraktion aus den HAV-infizierten FRhK-4-Zellen mit peqGOLD TriFast™ (Peqlab). Diese Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode basiert auf einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation, mit der man nicht-degradierte RNAs erhält. Die RNA-Extraktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, an deren Ende die Aufnahme des RNA-Pellets in 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O stand. Nach der Konzentrationsbestimmung der RNA im Photometer (2.2.13) erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

#### ***2.2.9.2 Extraktion von HAV-RNA mit dem QIAamp® Viral RNA Kit***

Die Extraktion von HAV-HMH-RNA aus Blutplasma (freundlicherweise von Alke Heitmann, Qiagen GmbH Hamburg, zur Verfügung gestellt) und von HAV-GP aus Zellkultur-Überstand erfolgte mit dem QIAamp® Viral RNA Kit (Qiagen). Diese Methode beruht auf den selektiven Bindeeigenschaften von Silica-Membranen und wurde speziell für die Aufreinigung viraler RNA aus zellfreien Körperflüssigkeiten oder Zellkultur-Überständen entwickelt. Die Extraktion der RNA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Am Ende erfolgte die Konzentrationsbestimmung der RNA im Photometer (2.2.13) und die Lagerung bei -80 °C.

### **2.2.9.3 Extraktion von HAV-RNA aus Patientenstuhl mit dem QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit**

Aus verschiedenen Stuhlproben von Patienten, die mit dem Hepatitis A-Virus infiziert waren, sollte mittels des QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit (Qiagen) die RNA extrahiert werden. Diese Methode basiert ebenfalls auf den selektiven Bindeeigenschaften von Silica-Membranen. Der Patientenstuhl wurde freundlicherweise von Ulrike Krause (Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die Durchführung der RNA-Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Lediglich die Adsorption von Inhibitoren mittels einer InhibitEx-Tablette erfolgte durch dreimaliges, statt einmaliges Vortexen und Inkubieren bei RT. Nach der sich anschließenden Zentrifugation für 3 min bei 14.000 x g und RT zur Bindung der Inhibitoren wurde statt 200 µl des Überstandes, die doppelte Menge, jedoch in zwei getrennten Ansätzen, zur weiteren Durchführung verwendet. Dies sollte eine Erhöhung der Menge an Material bewirken. Am Ende konnten sodann die Ansätze wieder vereint werden. Nach der Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA im Photometer (2.2.13) erfolgte eine Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

### **2.2.10 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zur Amplifikation der cDNA von HAV-Proteinen**

Bei der Reversen Transkription sollte die extrahierte RNA (2.2.9) in cDNA umgeschrieben werden. In der sich anschließenden PCR sollte dann die cDNA des 2B- und 2C-Proteins des Hepatitis A-Virus amplifiziert werden.

Für die Reverse Transkription wurde zunächst aus den RNA-Extraktionen die RNA in verschiedenen Konzentrationen in einem Endvolumen von 10 µl (eingestellt mit DEPC-H<sub>2</sub>O) eingesetzt. Zusätzlich wurde eine H<sub>2</sub>O-Kontrolle aus 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O mitgeführt, um ausschließen zu können, dass andere Komponenten der Reaktion kontaminiert waren. Die Proben bzw. die H<sub>2</sub>O-Kontrolle wurden dann mit 2 µl RT-Primer-Mix (33 pmol Antisense-Primer + 1,7 µl DEPC-H<sub>2</sub>O) versehen und für 10 min bei 65 °C im Thermocycler zur Denaturierung von Sekundärstrukturen inkubiert. Anschließend wurden 9 µl RT-Mix, bestehend aus 4 µl RT-Puffer [5 x], 2 µl dNTP-Mix [10 mM], 2 µl DTT [100 mM] und 5 U Expand-Reverse-Transkriptase, auf Eis zugegeben. Das Gesamtvolumen betrug nun 21 µl. Es folgte eine Inkubation für 45 min bei 42 °C im Thermocycler (Reverse Transkription).

An die Reverse Transkription schloss sich dann die PCR an. Dafür wurden 5 µl cDNA aus der RT vorgelegt. Dazu wurde 45 µl PCR-Mix aus folgenden Komponenten pipettiert: 38,2 µl

DEPC-H<sub>2</sub>O, 5 µl Taq-Puffer [5 x], 1 µl dNTP-Mix [10 mM], 1 U Taq-Polymerase, 33 pmol Sense-Primer und 33 pmol Antisense-Primer. Das Temperaturprogramm für die PCR sah wie folgt aus: 10 min 94 °C Denaturierungsphase, 20 Zyklen mit 1 min 94 °C Denaturierung, 2 min 56 °C Annealing und 3 min 72 °C Extension und abschließend eine einmalige 20-minütige Extension bei 72 °C.

Da die Menge des Amplifikats nach der PCR jeweils zu gering für die Folgeanwendungen war, schloss sich stets eine Re-PCR an. Dazu wurden 5 µl PCR-Amplifikat mit 45 µl PCR-Mix (Zusammensetzung siehe PCR) versehen und das gleiche Temperaturprogramm wie bei der PCR benutzt mit der Ausnahme, dass 35 statt 20 Zyklen eingestellt wurden.

An die Re-PCR schloss sich zur Visualisierung der cDNA der HAV-Proteine eine Agarose-Gelelektrophorese an (2.2.14). Alle Proben wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.2.11 Präparation von Vektor und Insert

Für die Expression von HAV-Proteinen in FRhK-4-Zellen wurde der Expressionsvektor pI.18 (erhalten von J. Robertson, NIBSC, UK) eingesetzt. Die Einklonierung der cDNA des 2B- und 2C-Proteins von HAV in den Vektor erfolgte unter Verwendung der Enzyme *KpnI* und *EcoRV*, welche Bestandteile der *Multiple Cloning Site* (MCS) des Vektors sind. Die einzufügenden viralen Sequenzen (Inserts) wurden per RT-PCR generiert (2.2.10). Für die Einklonierung der cDNA der HAV-Proteine in den Vektor, mussten die PCR-Produkte zunächst mittels Klenow-Fragment aufgefüllt und anschließend per Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation aufgereinigt werden. Vektor und Insert sollten dann im Restriktionsverdau mit den oben erwähnten Enzymen die gleichen Enden erhalten, während der Vektor mittels alkalischer Phosphatase dann noch dephosphoryliert wurde. In einer sich anschließenden LMP-Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung und Isolierung von Vektor und Insert, um diese dann direkt in einer Ligations-Reaktion vereinigen zu können. Im Folgenden sind diese Schritte näher beschrieben.

#### 2.2.11.1 Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment

Eine Auffüllreaktion der cDNA-Bereiche der PCR-Produkte mittels des großen Fragments der DNA-Polymerase I von *E. coli*, dem Klenow-Fragment, war notwendig, um deren unvollständige 3'-Enden aufzufüllen. Dadurch wird ermöglicht, dass die Restriktionsenzyme im sich anschließenden Restriktionsverdau richtig schneiden können. Dazu wurden jeweils

40 µl PCR-Amplifikat mit 4 µl 0,1 M MgCl<sub>2</sub> und 1 µl (2 U) Klenow-Fragment versehen und auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation von 15 min bei RT. An die Klenow-Reaktion schloss sich dann eine Phenol-Chloroform-Extraktion an.

### ***2.2.11.2 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation***

Mit dieser Methode können Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen von störenden Bestandteilen extrahiert werden. Sie wurde angewendet, um die cDNA der PCR-Amplifikate von unerwünschten Proteinen zu befreien, die sich im sich anschließenden Restriktionsverdau negativ auswirken könnten. Dazu wurde zunächst das Volumen der cDNA-Lösung auf 500 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Anschließend wurde 500 µl Phenol (TE-gesättigt) zugegeben, 2 min geschüttelt und 2 min bei 14.000 x g und RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die nun die cDNA enthielt, wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt, dann wurde erst 250 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) und anschließend 250 µl Phenol (TE-gesättigt) zugegeben. Daraufhin wurde erneut 2 min geschüttelt und 2 min bei 14.000 x g und RT zentrifugiert. Wieder wurde die obere Phase in ein neues Eppendorf-Cup überführt, 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) zugegeben und ein drittes Mal 2 min geschüttelt und 2 min bei 14.000 x g und RT zentrifugiert. Zu der in ein neues Eppendorf-Cup überführten oberen Phase wurden anschließend 1/10 Volumenteil (VT) 3 M Natrium-Acetat (pH 4,8) und, nach Durchmischung, 2,5 VT 100 %iges Ethanol (-20 °C) gegeben. Es folgte die DNA-Fällung für 30-60 min bei -80 °C. Nach der Fällung wurde dann 30 min bei 14.000 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend das Pellet zweimal mit 1 ml 70 %igem Ethanol (-20 °C) gewaschen (jeweils 15 min bei 14.000 x g und 4 °C zentrifugiert). Nach Vakuum-Trocknung des Pellets für 4-5 min in der *SpeedVac*-Vakuumzentrifuge wurde das Pellet in 20 µl autoklaviertem Aqua dest. aufgenommen. Es folgte die Konzentrationsbestimmung (2.2.13) und die Restriktionsenzymsspaltung der extrahierten cDNA.

### ***2.2.11.3 Restriktionsenzymsspaltung von DNA***

Die nun aufgereinigten PCR-Amplifikate sollten in den Vektor pI.18 inkloniert werden. Dafür mussten sowohl PCR-Amplifikat als auch Vektor vorher mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten werden, um diese dann in einer sich anschließenden Ligations-Reaktion vereinigen zu können. Dafür wurden die Restriktionsendonukleasen *EcoRV* und *KpnI* benutzt. In den Restriktionsverdau wurde dazu im Falle der PCR-

Amplifikate das komplette Produkt aus der Phenol-Chloroform-Extraktion eingesetzt. In die Reaktion wurden dann noch je 5 U *KpnI* und *EcoRV*, 2,5 µl Puffer B [10 x] und 2,5 µl BSA [1 mg/ml] hinzu gegeben und das Reaktionsvolumen von 25 µl durch Auffüllen mit autoklaviertem Aqua dest. erreicht. Im Falle der Vektor-DNA wurden 5 µg pI.18 eingesetzt und mit je 10 µl *KpnI* und *EcoRV* und 4 µl Puffer B [10 x] auf ein Endvolumen von 40 µl mit autoklaviertem Aqua dest. aufgefüllt. Es erfolgte in beiden Fällen eine Inkubation von 2 h bei 37 °C. Im Anschluss wurde die Vektor-DNA dephosphoryliert und zusammen mit dem Insert in ein LMP-Gel eingesetzt.

### **2.2.11.4 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA**

Um eine Rezirkularisierung des linearisierten pI.18-Vektors aus dem Restriktionsschnitt in einer sich anschließenden Ligations-Reaktion zu verhindern, wurden die Phosphatgruppen an den 5'-Enden der Plasmid-DNA unter Verwendung einer alkalischen Phosphatase hydrolysiert. Dazu wurden 40 µl des geschnittenen pI.18-Plasmids aus dem Restriktionsverdau mit 5 µl Reaktionspuffer [10 x] und 2 U alkalische Phosphatase versetzt und auf ein Reaktionsvolumen von 50 µl mit Aqua dest. gebracht. Es erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C und ein Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 10 µl 100 mM EGTA und einer Inkubation für 10 min bei 65 °C. Es folgte eine Auftrennung der Fragmente aus dem Restriktionsverdau im LMP-Gel.

### **2.2.11.5 DNA-Reinigung mit LMP-Agarose**

Um gewünschte Produkte aus einem Restriktionsverdau, einer Plasmidpräparation oder eines PCR-Produktes zu isolieren, wurde ein *low melting point* (LMP-) Agarosegel eingesetzt. Nach der Auftrennung in dem Gel, konnten die Fragmente sodann ausgeschnitten und ohne vorherige Extraktion aus dem Gel in die Ligation eingesetzt werden. Hierfür ist ein LMP-Gel aufgrund seiner niedrigen Schmelztemperatur gut geeignet.

Dazu wurde zunächst ein 0,6 %iges LMP-Agarosegel mit 1 x TAE-Puffer hergestellt und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versehen. Nach Aushärtung des Gels konnten die mit 1/6 (v/v) Probenpuffer versehenen Proben in die Geltaschen pipettiert werden. Zur Bestimmung der Fragment-Größe wurde stets ein DNA-Größenstandard (1 kb DNA *ladder*, 120 ng DNA/µl) mit aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung (4-5 V/cm Elektrodenabstand). Unter UV-Licht (366 nm) wurden die gewünschten DNA-Fragmente mit

einem Skalpell ausgeschnitten und in Eppendorf-Cups überführt. Es folgte eine Ligation der PCR-Produkte mit dem Vektor aus dem Gel ohne vorherige Extraktion.

### **2.2.11.6 Ligations-Reaktion**

Die Ligations-Reaktion diente der Insertion der per PCR amplifizierten cDNA der HAV-Proteine in den linearisierten und dephosphorylierten Expressionsvektors pI.18. Dabei wurden sowohl Insert als auch Vektor ohne Extraktion aus dem Gel in die Ligation eingesetzt. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor betrug stets 3:1. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Ligationsansatz ohne Insert mit Vektor durchgeführt, um die Menge an reeligiertem Vektor feststellen zu können.

Da sich Insert und Vektor nicht in wässriger Lösung, sondern in einem LMP-Gelstück befanden, mussten diese zunächst für 10 min bei 68 °C zum schmelzen gebracht und der Ligationsansatz bei 37 °C vorgewärmt werden. 1,5 pmol Insert und 0,5 pmol Vektor wurden mit dem Ligationsansatz aus 5 µl 10 x Ligase-Puffer, 2,5 µl BSA [1 mg/ml], 1 U T4-DNA-Ligase in insgesamt 50 µl Reaktionsvolumen, aufgefüllt mit autoklavierten Aqua dest., gemischt und anschließend für 5 min bei 37 °C und daraufhin für 60 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 14 °C im Thermoblock. Am folgenden Tag wurden erneut 1 U T4-DNA-Ligase hinzu gegeben und noch einmal für 2 h bei 14 °C inkubiert. Die Ligationsprodukte wurden daraufhin in die Transformation (2.2.12.1) eingesetzt.

## **2.2.12 Vermehrung und Isolierung von Plasmiden**

Um aus den in Abschnitt 2.2.11 generierten Expressionsplasmiden große Mengen herstellen zu können, mussten diese zunächst in kompetente Bakterien transformiert werden, daraufhin deren Identität in einer Miniprep überprüft werden, um schlussendlich mittels Maxiprep größere Mengen davon zu isolieren. Im Folgenden sind diese Schritte näher erläutert.

### **2.2.12.1 Transformation kompetenter Bakterien**

Bei einer Transformation wird Plasmid-DNA in kompetente Bakterien eingebracht, um sie von diesen replizieren zu lassen und später in großer Menge wieder isoliert werden zu können. Dafür wurden die kompetenten *Escherichia coli* Stämme HB101 oder DH5α

verwendet. Die korrekte Identität der Plasmid-DNA wurde dann mittels Miniprep überprüft und die Plasmid-DNA über die Maxiprep vervielfältigt und isoliert.

Zunächst wurden 80 µl (bzw. 30 µl) kompetente Bakterien aufgetaut und 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 20 µl der Plasmid-DNA aus der Ligations-Reaktion (bzw. 1 µl bereits aufgereinigter Plasmid-DNA) auf Eis hinzu pipettiert und gemischt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Der sich anschließende Hitzeschock für exakt 2 min bei 42 °C im Thermoblock sollte die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien bewirken. Weitere exakte 2 min auf Eis folgten. Anschließend wurden das vierfache Volumen an LB<sup>++</sup>-Medium hinzu gegeben und die Transformanten für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Dies sollte die plasmidcodierte Expression des Ampicillin-Resistenzgens ermöglichen. Nach der Inkubationszeit folgte dann das Ausplattieren der transformierten Bakterien auf LB-Agar-Platten (mit 100 µg/ml Ampicillin) und eine Inkubation bei 37 °C über Nacht. Der Zusatz von Ampicillin sollte eine Selektion der Bakterien bewirken, die das Plasmid aufgenommen haben. Die so kultivierten Bakterien konnten dann in die Miniprep eingesetzt werden.

### ***2.2.12.2 Schnelltest zur Überprüfung von Plasmid-DNA (Miniprep)***

Um sicherzustellen, dass die transformierten Bakterien auch die gewünschten Plasmide aufgenommen hatten, wurde eine Miniprep durchgeführt, an deren Ende die isolierte Plasmid-DNA über einen Restriktionsspaltungstest identifiziert werden kann.

Dazu wurden zunächst mehrere Transformanten-Klone einzeln mit einer Pipettenspitze gepickt und in je 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin übernacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden dann 1 ml dieser Übernachtskultur für 30 sec bei 9000 x g und RT in Eppendorf-Cups zentrifugiert. Der Rest der Kultur wurde bei 4 °C bis zur Durchführung der Maxiprep gelagert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und 100 µl Lösung 1 zum Pellet gegeben, dieses bis zur vollständigen Resuspension gevortext und zur Lyse 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 µl frisch angesetzte Lösung 2 zur Suspension gegeben, gemischt und 5 min bei 60 °C im Thermoblock inkubiert. Dieser Schritt diente der vollständigen Lyse und der Proteindenaturierung. Daraufhin wurden 150 µl Lösung 3 hinzu pipettiert, wieder gemischt und 15 min auf Eis inkubiert, was zur Neutralisation und zur Präzipitation denaturierter Proteine führte. Nach einer darauf folgenden Zentrifugation für 10 min bei 14.000 x g und RT wurde der Überstand, der nun die Plasmid-DNA enthielt, in ein neues Eppendorf-Cup überführt, 1 ml 100 %iges Ethanol (-20 °C) hinzu gegeben und 15-30 min bei -80 °C gefällt.

Es folgte eine weitere Zentrifugation für 10-30 min bei 14.000 x g und RT. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit 1 ml 70 %igem Ethanol (-20 °C) gewaschen, wobei jeweils für 15 min bei 14.000 x g und RT zentrifugiert wurde. In der *SpeedVac*-Vakuumentrifuge wurde dann das Pellet Vakuum getrocknet und schließlich in 50 µl autoklaviertem Aqua dest. aufgenommen.

Zur eigentlichen Überprüfung der Plasmid-DNA wurde dann eine Restriktionsspaltung mit geeigneten Enzymen durchgeführt. Dazu wurden 20 µl aus der oberen Prozedur mit 3 µl 10 x Puffer B, 2 µl RNase A [2 mg/ml], je 3 U *EcoRV* und *KpnI* und 4,4 µl H<sub>2</sub>O versetzt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C im Thermoblock inkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe von 1/6 (v/v) Probenpuffer gestoppt. Zur Visualisierung der erzeugten DNA-Fragmente wurde anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (2.2.14).

### **2.2.12.3 Vermehrung und Isolierung bakterieller Plasmid-DNA mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (Maxiprep)**

- nach Sambrook et al., 1989, verändert -

Um die Plasmid-DNA in den, in der Miniprep als richtig identifizierten, transformierten Klonen in größeren Mengen zu isolieren, wurde eine Maxiprep durchgeführt.

Dazu wurden zunächst 20 µl der Transformanten-Übernachtskultur aus der Miniprep in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert, um davon am nächsten Tag 500 µl in 500 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überimpfen und erneut über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubieren zu können. Am darauf folgenden Tag wurde die Bakteriensuspension für 20 min bei 2500 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet, welches die Bakterien enthielt, in 20 ml TES-Puffer resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 3200 x g und 4 °C. Nach Verwerfen des Überstandes und der Resuspension des Pellets in 22 ml frisch angesetztem STET-Puffer, wurde die Suspension in 100 ml-Erlenmeyerkolben überführt, 1 ml Lysozymlösung hinzu gegeben, die Suspension über dem Bunsenbrenner für 40 sec aufgeköcht und daraufhin auf Eis kurz abgekühlt. Dieser Schritt diente der Lyse der Zellen. Anschließend wurde die Suspension in neue Zentrifugenröhrchen überführt und für 45 min bei 33.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde daraufhin in neue Röhrchen gegeben und mit 1 VT Isopropanol gemischt. Es folgte die DNA-Fällung bei -80 °C für 15-30 min. Anschließend wurde wiederum für 60 min bei 18.500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 10 min in der *SpeedVac*

Vakuum getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 8,7 ml einer 1 %igen Sarcosyl-Lösung resuspendiert. Nach der Resuspension wurde dann die Plasmidlösung zu exakt 9,4 g Cäsiumchlorid (CsCl) in 50 ml Falcons gegeben und gelöst. Es erfolgte die Zugabe von 900 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml in H<sub>2</sub>O). Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe von Pasteurpipetten in Quick-Seal-Zentrifugenröhrchen überführt, mit Mineralöl überschichtet, austariert und zugeschweißt. Schlussendlich erfolgte eine isopyknische Ultrazentrifugation für 20 h bei 263.000 x g und 20 °C. Während dieser Zentrifugation stellte sich ein CsCl-Gradient ein, in dem sich Plasmid-DNA und genomische DNA entsprechender Dichte bandenförmig separierten, während RNA pelletierte.

Durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA, konnten die DNA-Banden unter UV-Licht nach der Zentrifugation sichtbar gemacht werden. Die Plasmid-DNA wurde dann mit Hilfe einer Kanüle und einer 5 ml Spritze abgezogen, in Falcon-Röhrchen überführt und auf 12 ml mit einer CsCl-Lösung aufgefüllt. Es erfolgte anschließend wieder die Überführung in Quick-Seal-Röhrchen, das Auffüllen mit Mineralöl und das Austarieren und Zuschweißen. Dann wurde für 24 h bei 218.000 x g und 20 °C zentrifugiert. Wie oben beschrieben, wurden die DNA-Banden am folgenden Tag wieder unter UV-Licht abgezogen. Um das toxische Ethidiumbromid aus der Plasmid-DNA-Lösung zu entfernen, musste diese dann 5-7 x mit 1 VT NaCl-gesättigtem Isopropanol ausgeschüttelt werden. Dazu wurde jeweils die Lösung mit dem Isopropanol geschüttelt, kurz gewartet, bis die Phasentrennung erreicht wurde und anschließend die obere Phase abgenommen und verworfen. Am Ende wurde zur Prüfung der Reinheit eine Kontrolle mit einem Tropfen der Plasmid-DNA-Lösung unter UV-Licht durchgeführt. Zur Entfernung des CsCl aus der Lösung wurde dann eine Dialyse gegen 5 mM Tris (pH 8,0) bei 4 °C unter Rühren über Nacht durchgeführt, wobei der Dialyse-Puffer dreimal ausgetauscht wurde. Dabei diffundieren die Salze in den Tris-Puffer. Abschließend erfolgten eine photometrische Konzentrationsbestimmung (2.2.13) und ein Restriktionsspaltungstest zur Überprüfung der Identität der Plasmide.

### ***2.2.12.4 Restriktionsspaltungsanalyse nach der Maxiprep***

Um sicherzustellen, dass bei der Maxiprep die gewünschten Plasmide isoliert und vervielfältigt wurden, schloss sich an die Maxiprep ein Restriktionsspaltungstest an.

Hierfür wurden 500 ng Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 20 µl eingesetzt. Zur korrekten Beurteilung wurde die Plasmid-DNA jeweils einmal fragmentiert und einmal linearisiert. Für die Fragmentierung wurden zu 500 ng Plasmid-DNA, 2 µl Puffer B [10 x]

und je 4 U *KpnI* und *EcoRV* mit Aqua dest. auf 20 µl aufgefüllt. Linearisiert wurde mit 2 µl Puffer H [10 x] und 4 U *EcoRI* in einem Endvolumen von 20 µl (aufgefüllt mit Aqua dest.). Für die Restriktionsspaltung erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 37 °C im Thermoblock. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/6 (v/v) Probenpuffer gestoppt. Anschließend wurde zur Visualisierung der Ergebnisse eine 1 %ige Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (2.2.14), wobei zusätzlich als Kontrolle des Verdauungsschnittes Plasmid mit aufgetragen wurde.

### 2.2.13 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Eine Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde nach der RNA-Extraktion und nach einer Maxiprep vorgenommen. Dazu wurden die Proben mit autoklaviertem Aqua dest. (im Falle von DNA) oder mit DEPC-H<sub>2</sub>O (im Falle von RNA) verdünnt und am Photometer (Beckman DU-600) bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette gemessen. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml oder einer ssRNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die Reinheit der Probe kann über den Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ermittelt werden, da aromatische Aminosäuren in Proteinen ihr Absorptionsmaximum bei einer OD von 280 nm und Nukleinsäuren bei einer OD von 260 nm haben. Der Quotient sollte dabei für DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen, während ein Quotient von 2,0 (± 0,15) eine reine wässrige RNA-Lösung anzeigt.

### 2.2.14 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erlaubt eine Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe im elektrischen Feld. Eine Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Beurteilung von DNA-Fragmenten nach der RT-PCR oder nach Restriktionsschnitten wie z.B. nach der Miniprep und der Maxiprep durchgeführt. Dazu wurde ein 1 %iges Agarosegel (w/v) aus Agarose und TAE-Puffer hergestellt. Das noch flüssige Gel wurde dann mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Nach der Aushärtung konnten die Geltaschen mit den zu untersuchenden Proben, die 1/6 (v/v) mit DNA-Probenpuffer verdünnt wurden, versehen werden. Zur Beurteilung der Größe der DNA-Fragmente wurde stets ein DNA-Größenstandard (1 kb DNA *ladder*, 120 ng DNA/µl) mit aufgetragen. Nach einer Laufzeit von etwa 60 min bei einer konstanten Spannung (4-5 V/cm Elektrodenabstand) konnte das Gel auf dem UV-Transluminator begutachtet und fotografiert werden.

### 2.2.15 Sequenzierung der cDNA der HAV-Proteine

Die cDNA des HAV-2B- und HAV-2C-Proteins der unterschiedlichen HAV-Wildtypen, von HAV-HMH und von HAV-GP sollte zum Vergleich sequenziert werden. Die Sequenzierung wurde von LGC Genomics durchgeführt. Die Proben mussten aufgrund ihrer Größe von zwei (für 2B) bzw. drei (für 2C) unterschiedlichen Primern sequenziert werden. Dafür wurde eine Konzentration der Plasmide von 100 ng/μl in H<sub>2</sub>O in einem Volumen von 10 μl pro Reaktion benötigt. Da die Plasmid-DNA jedoch in Puffer gelöst war, musste noch einmal eine Natrium-Acetat/Ethanol-Fällung vorgenommen werden (2.2.11.2). Von den Primern wurden 4 μl pro Reaktion mit einer Konzentration von 5 pmol/μl bereitgestellt.

Nach der Sequenzierung wurden die Sequenzen pro Probe zusammengesetzt und mit der cDNA-Sequenz der Proteine von HAV HM-175 *aligned* (NCBI → BLAST). Die Basensubstitutionen wurden gekennzeichnet und notiert.

### 2.2.16 Transfektion von FRhK-4 Zellen mittels PEI

Die Transfektion von Plasmid-DNA wurde mit dem kationischen Polymer PEI (Polyethylenimin) erreicht. Dieses bildet über die negativen Ladungen der DNA mit dieser Komplexe, wobei eine positive Nettoladung die Interaktion mit anionischen Proteoglykanen auf der Zelloberfläche und die Aufnahme der Komplexe per Endocytose in die Zellen ermöglicht. Somit kann der Effekt eines Zielgens auf der Plasmid-DNA auf die Zellen untersucht werden, wenn es exprimiert wird.

Am Tag vor der Transfektion wurden die zu transfizierenden FRhK-4-Zellen umgesetzt, um für die Transfektion eine Konfluenz von 60-80 % erreichen zu können. Dafür wurden für 96-Well-Platten  $1,2 \times 10^4$ , für 24-Well-Platten  $1,2 \times 10^5$  und für 6-Well-Platten  $4 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät. Im Folgenden beziehen sich die Mengenangaben jeweils auf 6-Well-Platten. Für 24-Well-Platten wurde die Menge immer um den Faktor 0,4 und für 96-Well-Platten um den Faktor 0,04 reduziert. Eine Stunde vor Zugabe des Transfektionsmixes wurde das Medium von den Zellen entfernt und durch 1 ml DMEM ohne weitere Zusätze ersetzt. Pro Ansatz wurden 6 μg DNA-Plasmid in 400 μl DMEM ohne Zusätze pipettiert und zur Durchmischung kurz gevortext. Für die Reporterexperimente wurden Expressionsplasmid zu Reporterplasmid im Verhältnis 5:1 eingesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 8 μl PEI zu 400 μl DMEM ohne Zusätze und eine Inkubation von 5 min bei RT. Danach wurde die DNA-Lösung in die PEI-Lösung überführt und es folgte nach kurzem Vortexen eine

20-minütige Inkubation bei RT. Nach der Inkubationszeit erfolgte die tropfenweise Zugabe des Transfektionsmixes auf die Zellen. Nach Schwenken der Zellen wurden diese bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, wobei nach drei Stunden ein Medium-Wechsel mit 10 % FCS-DMEM erfolgte. Nach 24 h erfolgte dann entweder eine NDV-Infektion (2.2.5) oder ein weiterer Medium-Wechsel mit 1 % FCS-DMEM.

### **2.2.17 Zellyse nach der *Freeze & Thaw*-Methode**

Mittels der *Freeze & Thaw*-Methode wurden die Zellen lysiert und der Proteingehalt im sich anschließenden Bradford-Assay bestimmt.

Dazu wurde zunächst das Medium 42 h nach der Transfektion von den transfizierten FRhK-4-Zellen abgenommen und zweimal mit sterilem PBS (4 °C) gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml sterilem TEN-Puffer (4 °C) pro Well erfolgte eine Inkubation von 15 min auf Eis, wobei die Platten des Öfteren geschwenkt wurden. Hier kam es zum Ablösen der Zellen vom Zellkulturgefäß. Die 6-Well-Platten wurden daraufhin schrittweise vom Eis genommen und auf RT erwärmt. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren abgespült und auf Eis in Eppendorf-Cups überführt. Nach einer Zentrifugation von 1 min bei 14.000 x g wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet, das die Zellen enthielt, wurde dann in 50 µl sterilem 0,25 M Tris-HCl (4 °C) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen. Dafür wurde die Zellsuspension in Eppendorf-Cups jeweils für 6 min in 100 %igem Ethanol (-80 °C) bei -80 °C eingefroren und anschließend für 4 min bei 37 °C im Thermoblock aufgetaut. Die Prozedur wurde weitere zwei Male wiederholt. Das hatte ein Freisetzen der intrazellulären Proteine zur Folge. Nach dem dritten Mal Auftauen erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 14.000 x g, um die Zellreste zu pelletieren. Nach der Zentrifugation erfolgte die Überführung des proteinhaltigen Überstandes in neue Eppendorf-Cups auf Eis und anschließend die Proteinbestimmung nach Bradford oder die Lagerung der Proben bei -80 °C.

### **2.2.18 Proteinbestimmung nach Bradford**

Um in sich anschließenden Proteinanalysen definierte Mengen an Protein einsetzen zu können, musste der Proteingehalt nach Bradford bestimmt werden. Der Säurefarbstoff Coomassie-Blau bindet bei Anwesenheit von Proteinen an diese, wodurch seine spektralen

Eigenschaften verändert werden. Es kommt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 zu 595 nm, was ein Farbumschlag von Braun zu Blau bewirkt und photometrisch bestimmt werden kann. Je höher dabei die Proteinkonzentration ist, desto stärker ist die Absorption. Durch eine Eichgerade, die mit verschiedenen Konzentrationen an BSA angefertigt wurde, kann dadurch die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

Die Proteinbestimmung erfolgte in Doppelansätzen. Dafür wurden 5 µl Zell-Lysat in 1,5 ml Einmalküvetten vorgelegt. Als Blank wurde 5 µl des verwendeten Lysereagens eingesetzt. Dann erfolgte in Abstand von 15 sec die Zugabe von 1 ml Bradford-Reagenz (1:5 in H<sub>2</sub>O, filtriert). Nach einer Inkubation von 15 min bei RT, erfolgte die photometrische Messung im Abstand von 15 sec.

### 2.2.19 Luciferase-Assay

Das Luciferase-Assay System ermöglicht die Messung der Luciferase-Reporter-Aktivität in Protein-Extrakten im Luminometer nach Zugabe des geeigneten Luciferase-Substrates. In dieser Arbeit kamen die *Firefly* Luciferase und die *Gaussia* Luciferase zum Einsatz. Die *Firefly* Luciferase ist ein Enzym, welches aus Luciferin, Sauerstoff und ATP unter Emission von Licht Oxyluciferin bildet. Die *Gaussia* Luciferase hingegen benötigt kein ATP für die, ebenfalls unter Emission von Licht stattfindende, Oxidation des Substrates Coelenterazin.

Für den Luciferase-Assay wurden 20 µg Protein eingesetzt. Dazu wurden zunächst 25 µg Proteinextrakt mit dem Luciferase-spezifischen Puffer auf 25 µl aufgefüllt, was einer Konzentration von 1 µg/µl entsprach. Anschließend wurden 20 µl der Proben in 96-Well *Sample Plates* mit Rundboden überführt. Als Blank dienten 20 µl des Luciferase-spezifischen Puffers. Nach zügiger Zugabe von 100 µl Luciferase-Substrat wurden die *luminescence counts per second* (LCPS) im Wallac-Luminometer gemessen, die nach Subtraktion des Blank-Wertes abschließend korrigiert werden mussten. Die Lumineszenz wurde von beiden Luciferasen getrennt hintereinander gemessen.

### 2.2.20 Immunfluoreszenz

Um die Lokalisation von HAV-VP1, HAV-2B, HAV-FLAG-2B und HAV-2B-myc in der Zelle zu untersuchen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Ein gleichzeitiger Nachweis von Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), sollte eine

mögliche Colokalisation mit diesen Kompartimenten anzeigen. Der Nachweis des ER geschah dabei über einen Antikörper, der das Calreticulin erkennt. Das Protein Calreticulin ist Teil eines Proteinkomplexes im Lumen des ER der Eukaryoten und fungiert während der Faltung von Glykoproteinen als Chaperon. Der Nachweis der Mitochondrien hingegen wurde über einen speziellen Farbstoff realisiert (2.2.21). In der folgenden Tabelle ist dargestellt, welche primären Antikörper in welcher Verdünnung (in 1 % FCS in PBS) für die unterschiedlichen Proteine verwendet wurden. Als sekundäre Antikörper wurden, verdünnt in 1 % FCS in PBS, der Ziege-anti-Maus-FITC (1:80), Ziege-anti-Kaninchen-FITC (1:75), Ziege-anti-Kaninchen-Texas Rot (1:200) und der Ziege-anti-Maus-Texas Rot (1:200) eingesetzt.

**Tab. 1: Übersicht über verwendete primäre Antikörper mit entsprechender Verdünnung.**

<b>Protein</b>	<b>1st Antikörper (Verdünnung)</b>
HAV-VP1	Kaninchen-anti-HAV-VP1 (1:50)
HAV-2B	Kaninchen-anti-HAV-2B (1:50)
HAV-FLAG-2B	Kaninchen-anti-FLAG (1:200)
HAV-2B-mycHis	Maus-anti-myc (1:100)
Calreticulin (ER)	Maus-anti-Calreticulin (1:500)

Dazu wurden FRhK-4-Zellen in 24-Well-Platten, die Glasplättchen enthielten, umgesetzt, um am folgenden Tag transfiziert zu werden (2.2.16). 42 h nach der Transfektion erfolgte ein dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS und die Fixierung der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd in PBS für 10 min bei RT. Anschließend mussten die Zellen für 15 min bei RT mit 0,2 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert werden. Auf dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS folgte dann die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 10 % FCS in PBS für 1 h bei 37 °C. Bevor nun die Zellen 1 h bei 37 °C mit den entsprechenden primären Antikörpern inkubiert werden konnten, war ein erneutes dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS erforderlich. Dies erfolgte auch vor der Zugabe der sekundären Antikörper, womit die Zellen ebenfalls für 1 h bei 37 °C inkubiert wurden. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde stets zur sekundären Antikörper-Lösung 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (1:10.000) hinzu gegeben. DAPI lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA an und fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht blau. Abschließend wurde wieder dreimal mit PBS gewaschen, bevor die Glasplättchen trocknen gelassen wurden. Anschließend wurden die Glasplättchen in Eindeckmedium auf einen Objektträger platziert. Schlussendlich erfolgte die Auswertung am Epifluoreszenzmikroskop bei einer 400-fachen Vergrößerung unter Verwendung eines 40 x Ölimmersions-Objektivs. Dabei wurden zur Visualisierung unterschiedliche Filter verwendet: DAPI: Filter 365 nm, FITC: Filter

450-490 nm, Texas Rot: Filter 546 nm, FITC-Texas Rot-Kombination: Filter 485 + 578 nm. Die Fotos wurden mit Hilfe einer Digitalkamera und der dazugehörigen Software „analySIS“ aufgenommen.

### **2.2.21 Anfärben von Mitochondrien mit MitoTracker Rot**

Der Nachweis von Mitochondrien in FRhK-4-Zellen wurde mit MitoTracker Rot CMXRos realisiert. Dieser Farbstoff diffundiert durch die Plasmamembran und akkumuliert in aktiven Mitochondrien, wo dieser mit Thiol-Gruppen von Peptiden und Proteinen reagiert. Anschließend können die Zellen fixiert und permeabilisiert werden, ohne dass der Farbstoff heraus gewaschen wird.

Für das Anfärben der Mitochondrien wurden FRhK-4-Zellen für 30 min bei 37 °C mit MitoTracker Rot mit einer Konzentration von 200 nM in 200 µl 1 % FCS-DMEM inkubiert. Anschließend mussten die Zellen je 1 x mit 1 % FCS-DMEM und PBS gewaschen werden, um daraufhin fixiert und permeabilisiert werden zu können (2.2.20).

### **2.2.22 MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität**

Der MTT-Test ist ein Cytotoxizitäts-Test zur Bestimmung der Zellvitalität. Diese colorimetrische Methode beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein dunkelblaues, wasserunlösliches Formazanprodukt. Dabei wird die Spaltung des MTT hauptsächlich von den Pyridin-haltigen Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH, in Abhängigkeit von Enzymen des ER lebender Zellen, durchgeführt. Der Test kann mit Hilfe eines ELISA-Readers ausgewertet werden, wobei die Menge des umgesetzten und letztendlich gemessenen Farbstoffs direkt proportional zur Zellzahl lebender Zellen ist.

Der MTT-Test sollte Aufschluss darüber geben, inwiefern sich die Expression unterschiedlicher 2C-Proteine cytotoxisch auf die Vitalität von Zellen auswirkt. Hierfür wurden FRhK-4-Zellen in eine 96-Well-Platte umgesetzt und am Folgetag bei einer Konfluenz von 60-80 % mit 0,24 µg Expressionsplasmid mittels PEI transfiziert (2.2.16). Als 100 % vitale Zellen dienten untransfizierte FRhK-4-Zellen, während tote Zellen durch einen, 3 h nach dem Umsetzen erfolgten, Medium-Entzug als Kontrolle dienten. Als weitere Kontrollen wurden nur mit dem Leervektor und ohne jeglichen Vektor transfizierte FRhK-4-Zellen verwendet. 24 h nach der Transfektion erfolgte ein Medium-Wechsel der Zellen.

Weitere 18 h später wurden die Zellen mit je 100  $\mu\text{l}$  frischem Wachstumsmedium versehen und es erfolgte die Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  MTT-Lösung. Während der anschließenden 4-stündigen Inkubationszeit bei 37 °C kam es zur Bildung der Formazankristalle. Abschließend wurde jeweils 100  $\mu\text{l}$  Solubilisierungslösung hinzu gegeben, um die Zellen zu lysieren und die Formazankristalle zu lösen. Hierfür war eine Inkubationszeit von 20 h bei 37 °C erforderlich. Schlussendlich erfolgte die Auswertung im *ELISA-Reader* mit Hilfe der Software SOFTmaxPRO bei einer Wellenlänge von 490 nm. Als Blank diente MTT-Lösung mit Solubilisierungslösung ohne Zellen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Einfluss von HAV/7-Proteinen auf die IRF-3-Aktivierung

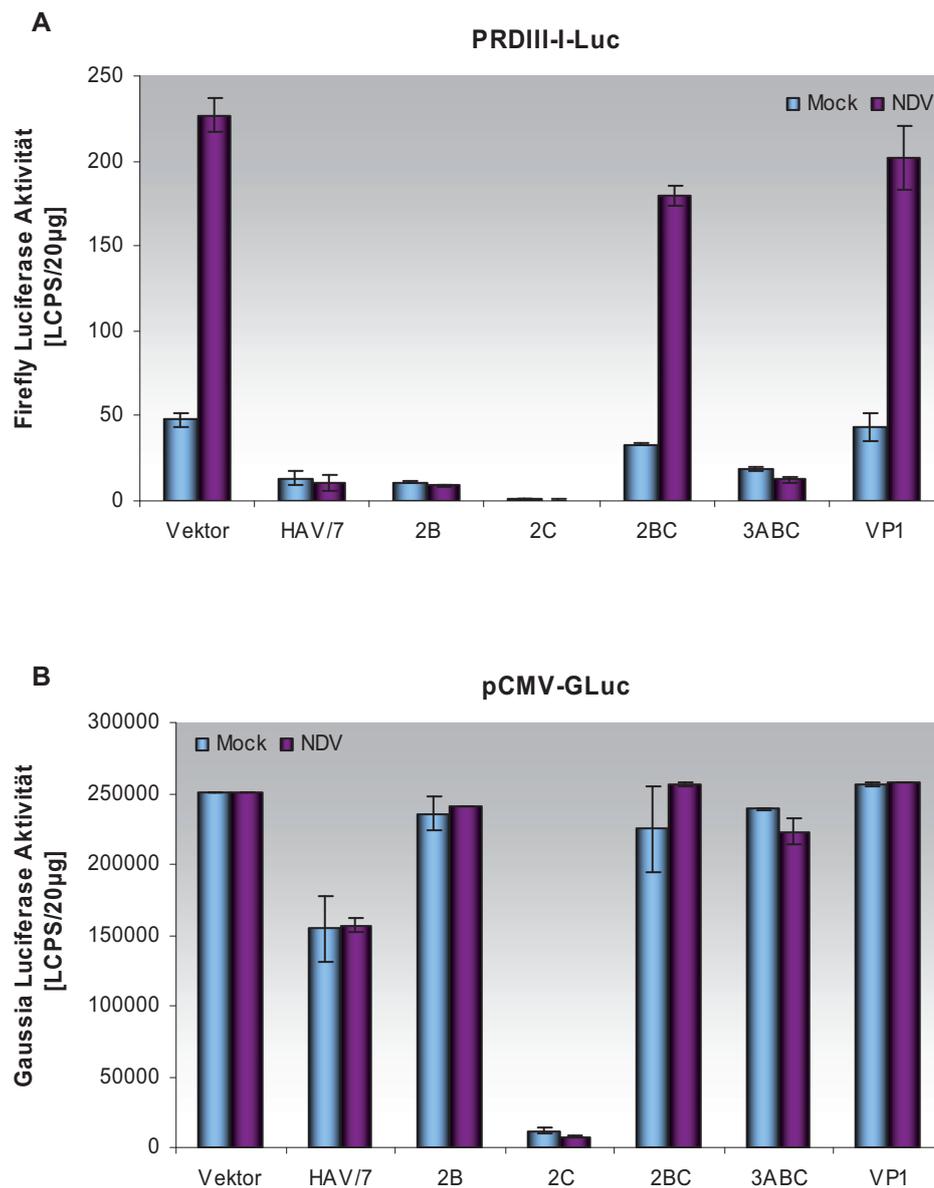
Bisherige Untersuchungen zeigten, dass eine HAV-Infektion zu einer Suppression der IRF-3-Aktivierung führt (Fensterl et al., 2005). Zunächst sollte nun untersucht werden, welche Proteine dem Virus diese Fähigkeit verleihen und wo sie in dem Signalweg zur IRF-3-Aktivierung eingreifen. Dafür wurden bereits die HAV-Proteine 2B und 3ABC als mögliche Kandidaten vorgeschlagen. Das Intermediat 3ABC degradiert dabei, über seine 3C-vermittelte Protease-Aktivität, MAVS (Yang et al., 2007) und blockiert somit die Aktivierung von IRF-3. Für das 2B-Protein konnte noch nicht eindeutig bestimmt werden, wie es in dem IRF-3-Signalweg eingreift. Hier wurde ebenfalls MAVS als möglicher Angriffspunkt diskutiert (Paulmann et al., 2008). In den folgenden Versuchen sollte deshalb der Einfluss von HAV-2B auf die IRF-3-Aktivierung mittels Reporterexperimenten eingehender untersucht werden. Daneben wurden auch die Proteine HAV-2C und -2BC in die Untersuchungen mit einbezogen. Für 2C konnte ebenfalls eine Suppression der poly(IC)-induzierten Aktivierung von IRF-3 beobachtet werden (Paulmann et al., 2008). Des Weiteren wurde als Negativkontrolle HAV-VP1 mitgenommen. VP1 sollte als Strukturprotein des Hepatitis A-Virus keinen Einfluss auf die IRF-3-Aktivierung haben, was nach poly(IC)-Induktion schon gezeigt werden konnte (Paulmann et al., 2008). Für die Versuche lag hierfür bereits die in den Expressionsvektor pI.18 inklonierte cDNA der viralen Proteine vor (Magulski, 2007). Die Plasmide wurden anschließend in FRhK-4-Zellen transient mittels des Transfektionsreagenz PEI transfiziert. Da ein supprimierender Effekt auf die IRF-3-Aktivierung durch das Hepatitis A-Virus zuvor belegt wurde (Fensterl et al., 2005), wurden HAV-infizierte FRhK-4-Zellen als Positivkontrolle in die Versuche mit einbezogen. Somit konnte zudem der Unterschied zwischen Überexpression von HAV-Proteinen und einer Virus-Infektion offenbart werden. Als Referenz wurden jeweils Zellen nur mit dem Leervektor transfiziert. Um nun zu überprüfen, ob die jeweiligen HAV-Proteine einen Effekt auf die IRF-3-Aktivierung zeigen, wurde immer das Reporterplasmid PRDIII-I-Luc cotransfiziert. Bei diesem Konstrukt steht das Gen, welches die *Firefly* Luciferase exprimiert, unter der Kontrolle einer vierfachen Kopie der PRDIII-I, so dass ein Nachweis der IRF-3-Aktivität anhand der Reporter-Aktivität detektiert werden kann. Eine Induktion der IRF-3-Aktivierung wurde durch eine NDV-Infektion bzw. der Überexpression von unterschiedlichen Komponenten des IRF-3-Signalweges erreicht. Um einen spezifischen Effekt der HAV-Proteine auf die IRF-3-

Aktivierung zu detektieren und um einen möglichen generellen Einfluss auf die Proteinexpression ausschließen zu können, war es erforderlich, eine interne Kontrolle in die Reporterexperimente einzusetzen. Hierfür fand das Reporterkonstrukt pCMV-GLuc Verwendung. Bei diesem Plasmid ist dem, für die *Gaussia* Luciferase codierenden Gen, ein konstitutiv aktiver CMV-Promotor vorgeschaltet. Dieser Vektor wurde in allen folgenden Reporterexperimenten in FRhK-4-Zellen cotransfiziert. Da beide Reporter verschiedene Substratspezifitäten aufweisen war eine parallele Detektion möglich, wodurch ein spezifischer Einfluss auf die IRF-3-Aktivierung von generellen Effekten auf die Proteinexpression differenziert werden konnte.

#### **3.1.1 Einfluss von HAV/7-Proteinen auf die NDV-induzierte IRF-3-Aktivierung**

Zunächst sollte der Einfluss der verschiedenen Proteine des Hepatitis A-Virus auf die NDV-induzierte IRF-3-Aktivierung untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden FRhK-4-Zellen in 6-Well-Platten umgesetzt und am nächsten Tag bei einer Konfluenz von 60-80 % mit Plasmiden cotransfiziert. Hierfür wurden die Expressionsvektoren für die jeweiligen HAV/7-Proteine zusammen mit dem PRDIII-I-Luc und pCMV-GLuc Reporterplasmid transfiziert. Zudem erfolgte eine Transfektion von HAV/7-infizierten Zellen 10 Tage p.i. mit dem Leervektor und den beiden Reporterplasmiden. 24 h danach erfolgte zur Induktion der IRF-3-Aktivierung eine NDV-Infektion (MOI = 0,1). Weitere 18 h später konnten sodann die Proteine extrahiert und 20 µg in den Luciferase-Assay eingesetzt werden (Abb. 7).

Eine NDV-Infektion führt, wie erwartet, zu einer starken Induktion der IRF-3-Aktivierung. Wie bereits gezeigt wurde (Fensterl et al., 2005), wird auch hier diese Aktivierung durch eine HAV/7-Infektion stark reduziert (Abb. 7 A). Eine Expression der HAV/7-Proteine 2B, 2C und 3ABC wies dabei das gleiche Verhalten wie eine Infektion mit HAV/7 auf. Auch hier kommt es durch die Expression der Proteine zu einer nahezu vollständigen Blockade der Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Für HAV/7-2B konnte dies ebenfalls schon gezeigt werden (Paulmann et al., 2008). Das Intermediat HAV-2BC zeigt im Gegensatz zu seinen Komponenten einen geringen Einfluss auf die PRDIII-I-Luc-Aktivität. 2B und 2C scheinen demnach ihren Effekt erst als reife Proteine entfalten zu können. Erwartungsgemäß zeigte eine Expression des HAV/7-Strukturproteins VP1 keine Beeinflussung der IRF-3-Aktivierung.



**Abb. 7: Einfluss der HAV/7-Proteine bzw. einer HAV/7-Infektion auf die NDV-induzierte IRF-3-Aktivierung (A) bzw. auf die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität (B).** Mock- bzw. HAV/7-infizierte FRhK-4-Zellen wurden 10 Tage nach der Infektion in 6-Well-Platten umgesetzt und am Folgetag mit 4,8 µg Leer- oder Expressionsvektor + 1,2 µg Reporterplasmid (0,6 µg PRDIII-I-Luc + 0,6 µg pCMV-GLuc) mittels PEI cotransfiziert. 24 h danach erfolgte eine Mock- bzw. NDV-Infektion (MOI = 0,1). Weitere 18 h später wurden die Zellen mittels dreimaligen Einfrieren und Auftauen lysiert und 20 µg extrahiertes Protein in den Luciferase-Assay eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen. Die erfolgreiche HAV/7-Infektion der Zellen wurde am Tag der Transfektion per Immunfluoreszenztest bestätigt.

Alle HAV/7-Proteine, mit Ausnahme von HAV/7-2C, führen zu keiner Reduktion der konstitutiven pCMV-GLuc-Aktivität (Abb. 7 B) und haben folglich keinen Einfluss auf die Proteinexpression. Deshalb kann hier auf einen IRF-3-spezifischen Effekt der HAV/7-Proteine geschlossen werden. HAV/7-2C hingegen führt zu einer nahezu vollständigen

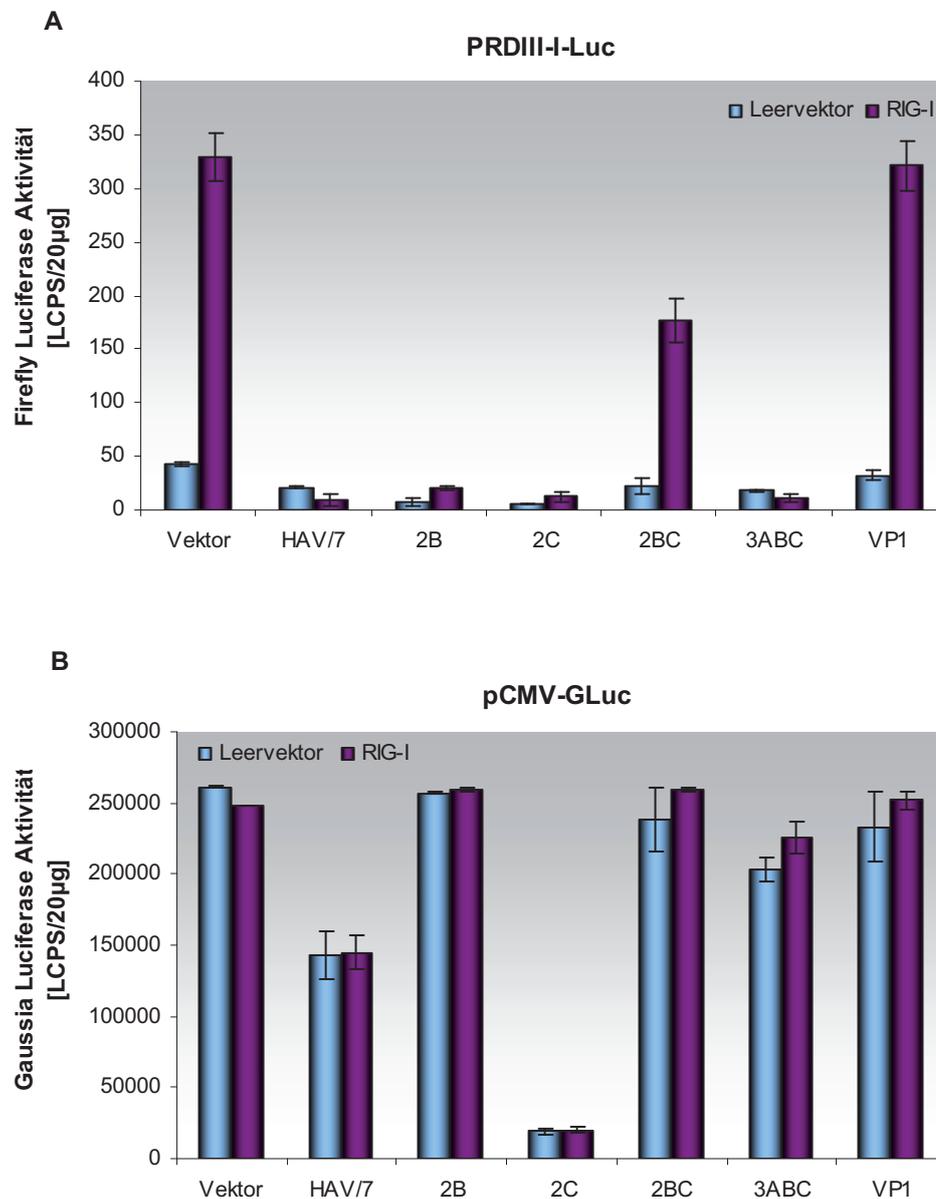
Blockade der konstitutiven Reporteraktivität. Dieses Protein scheint somit die allgemeine Proteinexpression zu inhibieren. Da HAV/7-2BC die pCMV-GLuc-Aktivität nicht hemmt, ist die 2BC-vermittelte Suppression der IRF-3-Aktivierung eher ein 2B- und nicht 2C-abgeschwächter Effekt. Auch eine HAV/7-Infektion supprimiert, jedoch zu einem sehr viel geringeren Ausmaß, die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität. Dieser Effekt ist jedoch nicht so stark wie der Einfluss auf die Aktivierung von IRF-3. Während eine HAV/7-Infektion zu einer etwa 95 %igen Suppression der NDV-induzierten IRF-3-Aktivierung führt, ist die pCMV-GLuc-Aktivität durch das Virus nur zu zirka 38 % reduziert.

Um nun einen möglichen Angriffspunkt der unterschiedlichen HAV/7-Proteine im Signalweg zur Aktivierung von IRF-3 feststellen zu können, folgten Reporterexperimente, bei denen jeweils eine Komponente des IRF-3-Signalweges überexprimiert wurde.

#### **3.1.2 Einfluss von HAV/7-Proteinen auf die RIG-I-vermittelte IRF-3-Aktivierung**

RIG-I ist der intrazelluläre dsRNA-Rezeptor, der mithilfe seiner C-terminalen Helikasedomäne dsRNA binden kann und somit die erste Komponente im Signalweg zur IRF-3-Aktivierung darstellt. Um nun den Einfluss der HAV/7-Proteine auf die RIG-I-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors zu untersuchen, wurden wieder Mock- bzw. HAV/7-infizierte FRhK-4-Zellen umgesetzt und wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben mit entsprechenden Plasmiden transfiziert. Zusätzlich wurden entweder ein Plasmid für die Expression von RIG-I bzw. sein Leervektor cotransfiziert. 24 h danach geschah ein Medium-Wechsel, um die Bedingungen möglichst nahe an denen der NDV-Infektion anzupassen. Weitere 18 h später erfolgten dementsprechend die Proteinextraktion und die Auswertung im Luciferase-Assay (Abb. 8). Wie auch eine NDV-Infektion, führt eine Überexpression von RIG-I zu einer deutlichen IRF-3-Aktivierung (Abb. 8 A), ohne dabei einen Einfluss auf die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität zu haben (Abb. 8 B). Die RIG-I-induzierte Aktivierung von IRF-3 wird durch eine HAV/7-Infektion wieder stark reduziert, was erneut die Ergebnisse von Festerl et al. (2005) bestätigt. Auch die Expression der HAV/7-Proteine 2B, 2C und 3ABC führen zu einer starken Suppression der RIG-I-vermittelten (Abb. 8 A), und im Falle von 2B und 3ABC spezifischen (Abb. 8 B), Aktivierung von IRF-3. Für HAV/7-2C kann aus genannten Gründen kein spezifischer IRF-3-Effekt interpretiert werden. Während HAV/7-VP1 erwartungsgemäß erneut keinen Einfluss zeigt, führt die Expression des 2BC-Intermediats zu einer etwa 50 %igen, im Gegensatz zu seiner Komponente 2B jedoch deutlich

schwächeren, Suppression der RIG-I-vermittelten IRF-3-Aktivierung (Abb. 8 A). Für das 2B-Protein konnte bereits ein supprimierender Effekt auf die RIG-I-vermittelte IRF-3-Aktivierung gezeigt werden (Magulski, 2007). Hier erfolgte jedoch keine Untersuchung zu einem Einfluss des Proteins auf die allgemeine Proteinexpression.



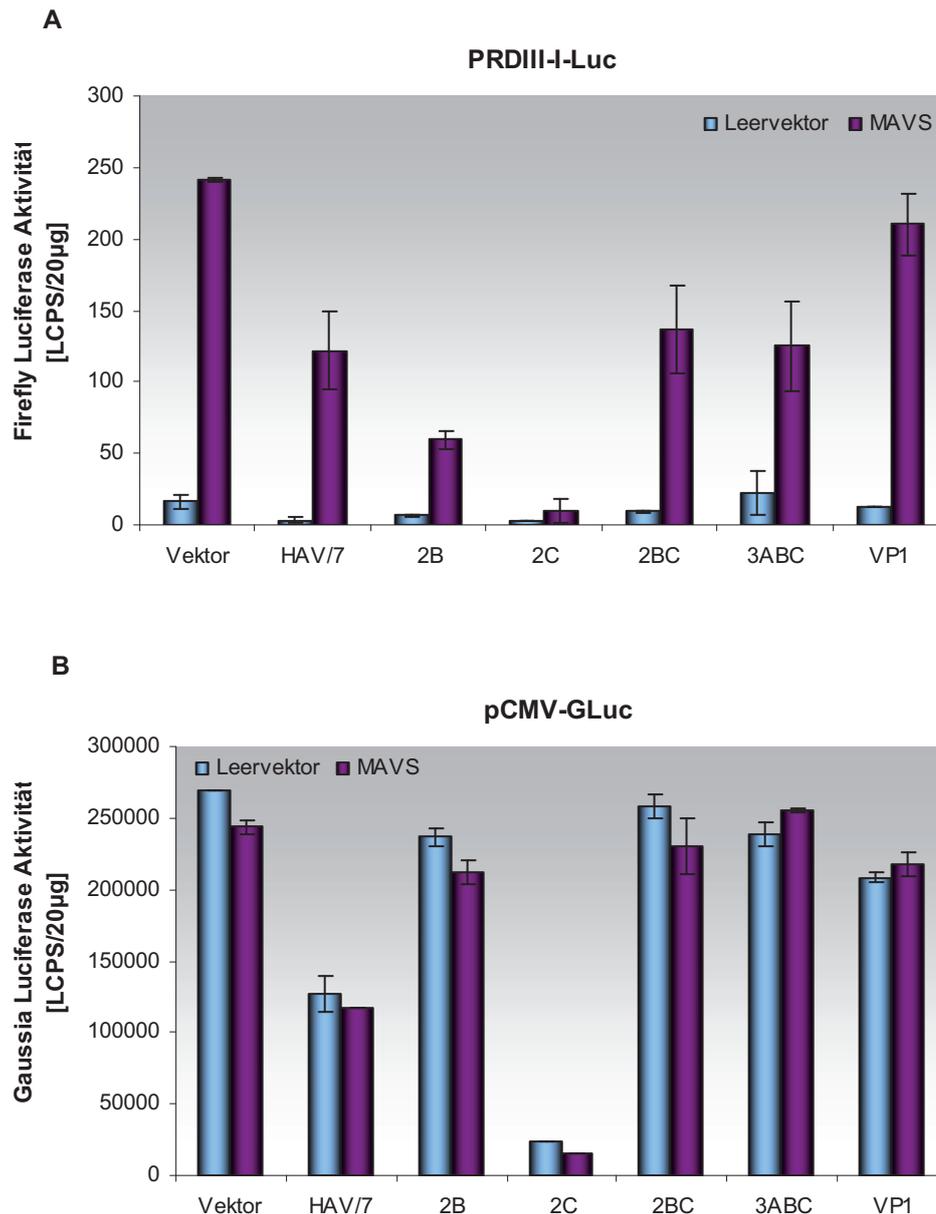
**Abb. 8: Einfluss der HAV/7-Proteine bzw. einer HAV/7-Infektion auf die RIG-I-vermittelte IRF-3-Aktivierung (A) bzw. auf die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität (B).** Mock- bzw. HAV/7-infizierte FRhK-4-Zellen wurden 10 Tage nach der Infektion in 6-Well-Platten umgesetzt und am Folgetag mit 2,4 µg Leer- oder HAV/7-Protein-Expressionsvektor + 2,4 µg Leervektor oder RIG-I + 1,2 µg Reporterplasmid (0,6 µg PRDIII-I-Luc + 0,6 µg pCMV-GLuc) mittels PEI cotransfiziert. 24 h danach erfolgte ein Medium-Wechsel. Weitere 18 h später wurden die Zellen mittels dreimaligen Einfrieren und Auftauen lysiert und 20 µg extrahiertes Protein in den Luciferase-Assay eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen. Die erfolgreiche HAV/7-Infektion der Zellen wurde am Tag der Transfektion per Immunfluoreszenztest bestätigt.

HAV/7, HAV/7-2B und -3ABC scheinen also *downstream* von RIG-I in den Signalweg zur Aktivierung von IRF-3 einzugreifen. Zur weiteren Einschränkung erfolgte deshalb nun die Untersuchung eines möglichen Einflusses dieser auf die MAVS-vermittelte IRF-3-Aktivierung.

### 3.1.3 Einfluss von HAV/7-Proteinen auf die MAVS-vermittelte IRF-3-Aktivierung

MAVS ist das Adapterprotein, welches im Signalweg zur IRF-3-Aktivierung zwischen RIG-I und den Kinasen TBK1 und IKK $\epsilon$  fungiert und somit hinter RIG-I ein potentiell *Target* von HAV/7 bzw. dessen Proteine sein könnte. Die MAVS-vermittelte Aktivierung von IRF-3 erfolgte durch den Einsatz eines MAVS-Expressionsvektors. Ansonsten entsprach die Abfolge des Experiments der mit RIG-I (Abschnitt 3.1.2). Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt.

Analog zu RIG-I führt auch eine MAVS-Überexpression zu einer deutlichen Aktivierung von IRF-3 (Abb. 9 A), während die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität durch eine MAVS-Expression unbeeinflusst bleibt (Abb. 9 B). Erneut ist wieder festzustellen, dass das HAV/7-Strukturprotein VP1 keinen Effekt auf die IRF-3-Aktivierung zeigt und es durch HAV/7-2C zu einer nahezu kompletten (Abb. 9 A), jedoch IRF-3-unspezifischen (Abb. 9 B), Blockade der PRDIII-I-Luc-Aktivität kommt. Eine Expression von HAV/7-3ABC supprimiert die MAVS-vermittelte Aktivierung von IRF-3 hier nur partiell (Abb. 9 A; publiziert in Paulmann et al., 2008). Dies würde für eine Konkurrenz von MAVS und 3ABC sprechen und somit bestätigen, dass MAVS ein *Target* von HAV-3ABC ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass 3ABC, vermittelt über seine 3C-Protease-Aktivität, MAVS zu degradieren vermag (Yang et al., 2007), was dieses Ergebnis erklären könnte. Analog zu 3ABC führt auch eine HAV/7-Infektion zu einer partiellen Suppression der MAVS-vermittelten Aktivierung von IRF-3 (Abb 9 A), was bereits in früheren Experimenten gezeigt werden konnte (Paulmann et al., 2008). Dieser Effekt könnte demnach 3ABC-vermittelt sein. Auch eine Expression des Intermediates HAV/7-2BC inhibiert die MAVS-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors lediglich partiell. Unklar bleibt, ob auch hier eine Konkurrenz von MAVS und 2BC vorliegt, oder ob der Einfluss von 2BC auf die IRF-3-Aktivierung einen abgeschwächten Effekt des Proteins 2B darstellt.



**Abb. 9: Einfluss der HAV/7-Proteine bzw. einer HAV/7-Infektion auf die MAVS-vermittelte IRF-3-Aktivierung (A) bzw. auf die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität (B).** Mock- bzw. HAV/7-infizierte FRhK-4-Zellen wurden 10 Tage nach der Infektion in 6-Well-Platten umgesetzt und am Folgetag mit 2,4 µg Leer- oder HAV/7-Protein-Expressionsvektor + 2,4 µg Leervektor oder MAVS + 1,2 µg Reporterplasmid (0,6 µg PRDIII-I-Luc + 0,6 µg pCMV-GLuc) mittels PEI cotransfiziert. 24 h danach erfolgte ein Medium-Wechsel. Weitere 18 h später wurden die Zellen mittels dreimaligen Einfrieren und Auftauen lysiert und 20 µg extrahiertes Protein in den Luciferase-Assay eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen. Die erfolgreiche HAV/7-Infektion der Zellen wurde am Tag der Transfektion per Immunfluoreszenztest bestätigt.

Durch eine Expression von HAV/7-2B kommt es, im Gegensatz zu 3ABC und HAV/7, zu einer stärkeren Inhibierung der MAVS-induzierten IRF-3-Aktivierung. Dieser Effekt bestätigt die Ergebnisse von Paulmann et al. (2008). Das Protein könnte demnach *downstream* von MAVS im IRF-3-Signalweg eingreifen. Mögliche Kandidaten hierfür wären die Kinasen

TBK1 und IKK $\epsilon$ . Da die MAVS-induzierte IRF-3-Aktivierung durch die Expression von HAV/7-2B im Gegensatz zu der Suppression der RIG-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors schwächer ausfiel, ist MAVS als direktes *Target* von dem 2B-Protein nicht auszuschließen.

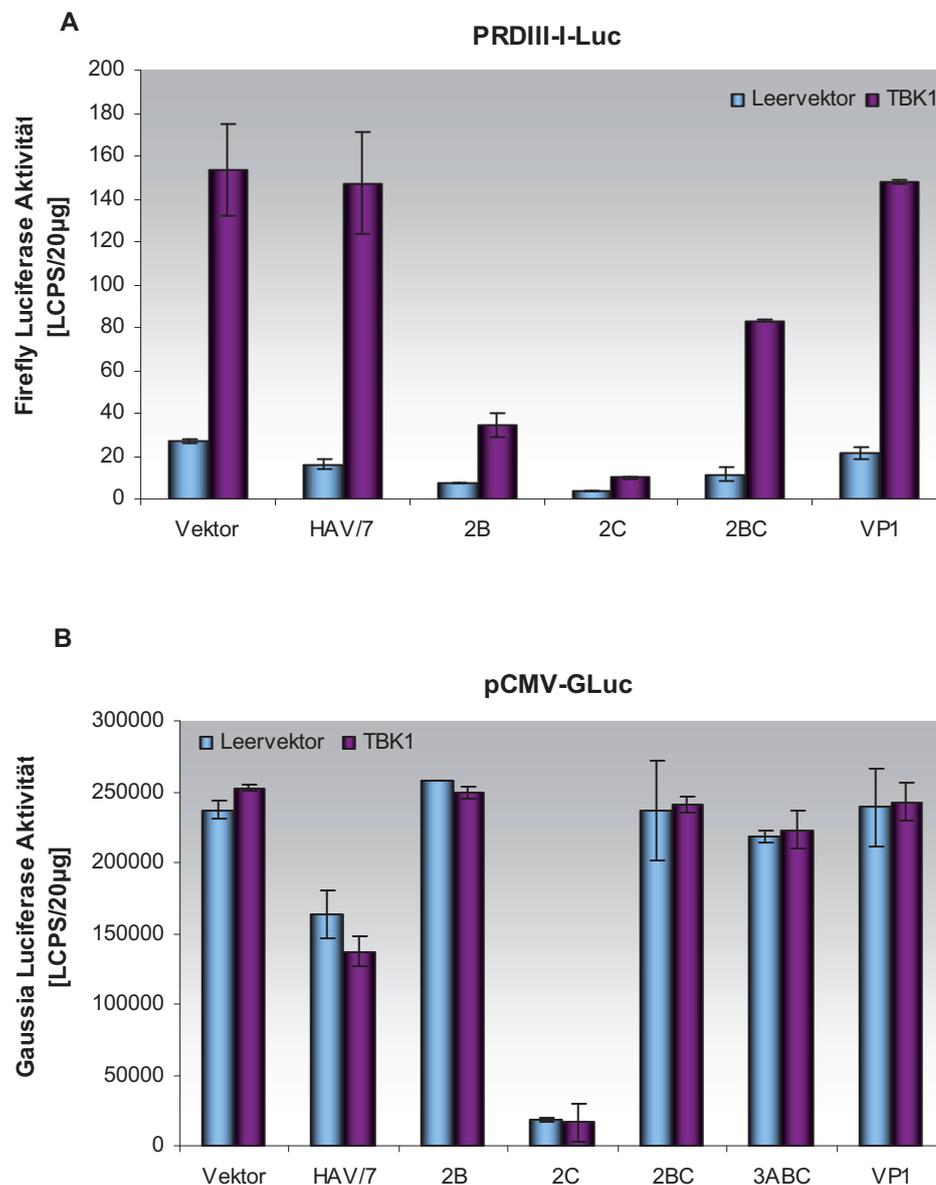
### **3.1.4 Einfluss von HAV/7-Proteinen auf die TBK1- und IKK $\epsilon$ -vermittelte IRF-3-Aktivierung**

Als Bestandteile des VAK-Komplexes vermögen die Kinasen TBK1 und IKK $\epsilon$  IRF-3 zu phosphorylieren, was zu seiner Dimerisierung und Translokation in den Zellkern und folglich zur Induktion der IFN- $\beta$ -Expression führt. TBK1 und IKK $\epsilon$  könnten ebenfalls mögliche Angriffspunkte der HAV/7-Proteine bzw. von HAV/7 im Signalweg zur Aktivierung von IRF-3 darstellen, was im Folgenden untersucht werden sollte.

Hierfür wurden Plasmide verwendet, die eine Expression von TBK1 bzw. IKK $\epsilon$  ermöglichen. Ansonsten wurden die Experimente analog zu denen mit RIG-I und MAVS durchgeführt (Abschnitt 3.1.2).

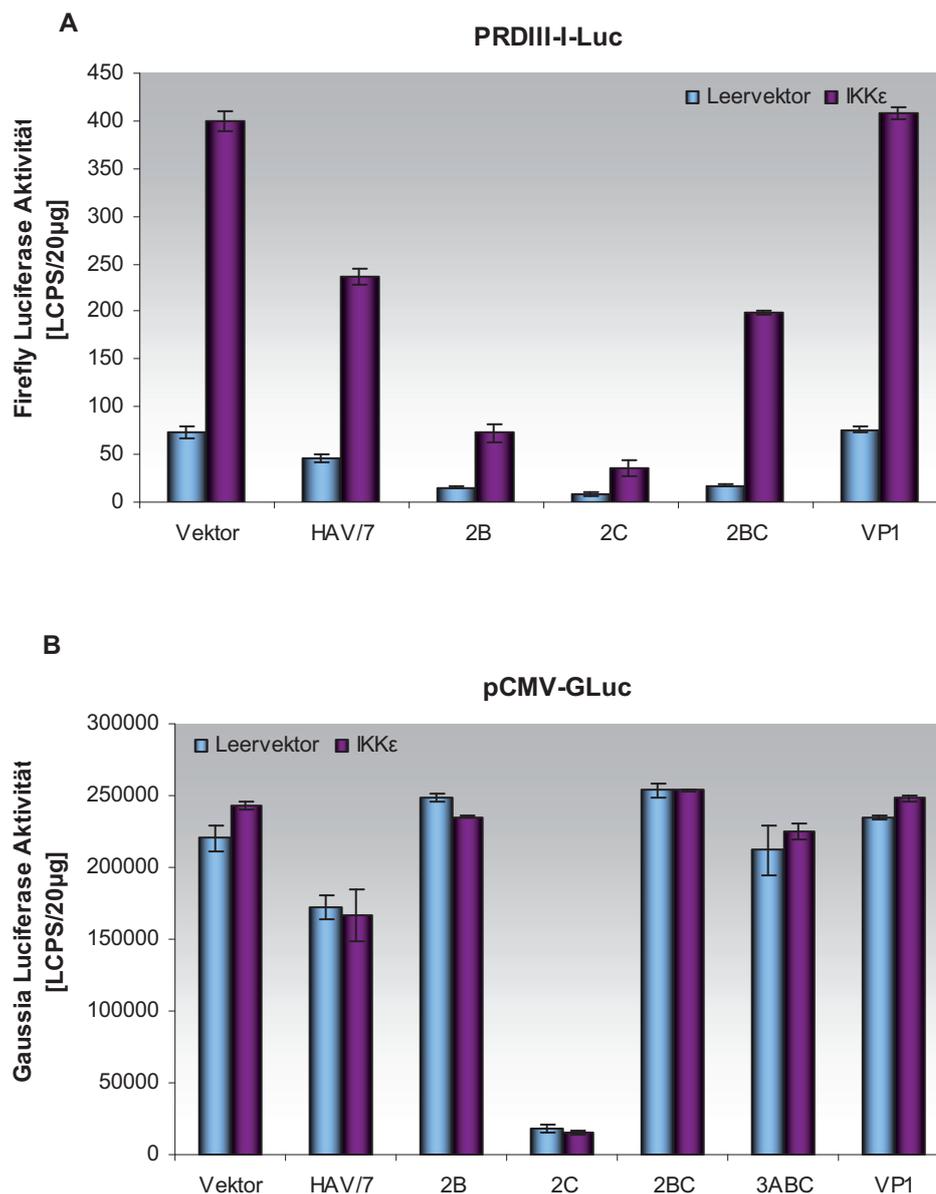
Eine Überexpression beider Kinasen führt zu einer deutlichen Aktivierung von IRF-3 (Abb. 10 A und 11 A), ohne dabei einen generellen Einfluss auf die Proteinexpression zu haben (Abb. 10 B und 11 B). Wieder zeigt das Strukturprotein HAV/7-VP1 erwartungsgemäß keinen Effekt, während eine Expression von HAV/7-2BC erneut zu einer etwa 50 %igen Suppression der sowohl TBK1- (Abb. 10 A) als auch IKK $\epsilon$ - (Abb. 11 A) vermittelten IRF-3-Aktivierung führt. Wie schon für die MAVS-induzierte IRF-3-Aktivierung beschrieben, könnte dieser 2BC-vermittelte Effekt entweder auf eine direkte Interaktion des Proteins mit den Kinasen zurückzuführen sein oder es handelt sich hierbei um einen abgeschwächten 2B-vermittelten Effekt. HAV/7-2C zeigt abermals eine fast komplette Suppression der Aktivierung von IRF-3 nach TBK1- (Abb 10 A) und IKK $\epsilon$ -Überexpression (Abb. 11 A), die aber aufgrund der Blockade der konstitutiven Aktivität des internen Reporters auf einen Einfluss der Proteinexpression zurückzuführen ist (Abb. 10 B und 11 B). Die Expression von HAV/7-2B führt wieder zu einer relativ starken Suppression der sowohl TBK1- (Abb. 10 A) als auch IKK $\epsilon$ -induzierten (Abb. 11 A) IRF-3-Aktivierung (publiziert in Paulmann et al., 2008), die jedoch ebenfalls im Gegensatz zu der RIG-I-induzierten IRF-3-Aktivierung nicht komplett ist. Eine Infektion mit HAV/7 hingegen zeigt nur eine partielle Suppression der IKK $\epsilon$ -induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Abb. 11 A), während ein Einfluss auf die IRF-3-Aktivierung nach TBK1-Überexpression nicht detektiert werden konnte (Abb.

10 A). Somit könnte auch IKK $\epsilon$  ein direktes *Target* von HAV/7 sein. Dieses steht im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen, die zeigten, dass HAV/7 weder die TBK1- noch die IKK $\epsilon$ -induzierte Aktivierung von IRF-3 beeinflusst (Fensterl et al., 2005).



**Abb. 10: Einfluss der HAV/7-Proteine bzw. einer HAV/7-Infektion auf die TBK1-vermittelte IRF-3-Aktivierung (A) bzw. auf die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität (B).** Mock- bzw. HAV/7-infizierte FRhK-4-Zellen wurden 10 Tage nach der Infektion in 6-Well-Platten umgesetzt und am Folgetag mit 2,4 µg Leer- oder HAV/7-Protein-Expressionsvektor + 2,4 µg Leervektor TBK1 + 1,2 µg Reporterplasmid (0,6 µg PRDIII-I-Luc + 0,6 µg pCMV-GLuc) mittels PEI cotransfiziert. 24 h danach erfolgte ein Medium-Wechsel. Weitere 18 h später wurden die Zellen mittels dreimaligen Einfrieren und Auftauen lysiert und 20 µg extrahiertes Protein in den Luciferase-Assay eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen. Die erfolgreiche HAV/7-Infektion der Zellen wurde am Tag der Transfektion per Immunfluoreszenztest bestätigt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sowohl HAV/7 als auch die HAV/7-Proteine 2B und 3ABC in den Signalweg zur IRF-3-Aktivierung eingreifen, und zwar *downstream* des dsRNA-Rezeptors RIG-I. Das direkte *Target* von 3ABC im IRF-3-Signalweg ist hierbei MAVS, denn hier kommt es zu einer partiellen Suppression der Aktivierung von IRF-3, was auf eine Konkurrenz von 3ABC und MAVS zurückzuführen ist.



**Abb. 11: Einfluss der HAV/7-Proteine bzw. einer HAV/7-Infektion auf die IKK $\epsilon$ -vermittelte IRF-3-Aktivierung (A) bzw. auf die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität (B).** Mock- bzw. HAV/7-infizierte FRhK-4-Zellen wurden 10 Tage nach der Infektion in 6-Well-Platten umgesetzt und am Folgetag mit 2,4  $\mu$ g Leer- oder HAV/7-Protein-Expressionsvektor + 2,4  $\mu$ g Leervektor oder IKK $\epsilon$  + 1,2  $\mu$ g Reporterplasmid (0,6  $\mu$ g PRDIII-I-Luc + 0,6  $\mu$ g pCMV-GLuc) mittels PEI cotransfiziert. 24 h danach erfolgte ein Medium-Wechsel. Weitere 18 h später wurden die Zellen mittels dreimaligen Einfrieren und Auftauen lysiert und 20  $\mu$ g extrahiertes Protein in den Luciferase-Assay eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen. Die erfolgreiche HAV/7-Infektion der Zellen wurde am Tag der Transfektion per Immunfluoreszenztest bestätigt.

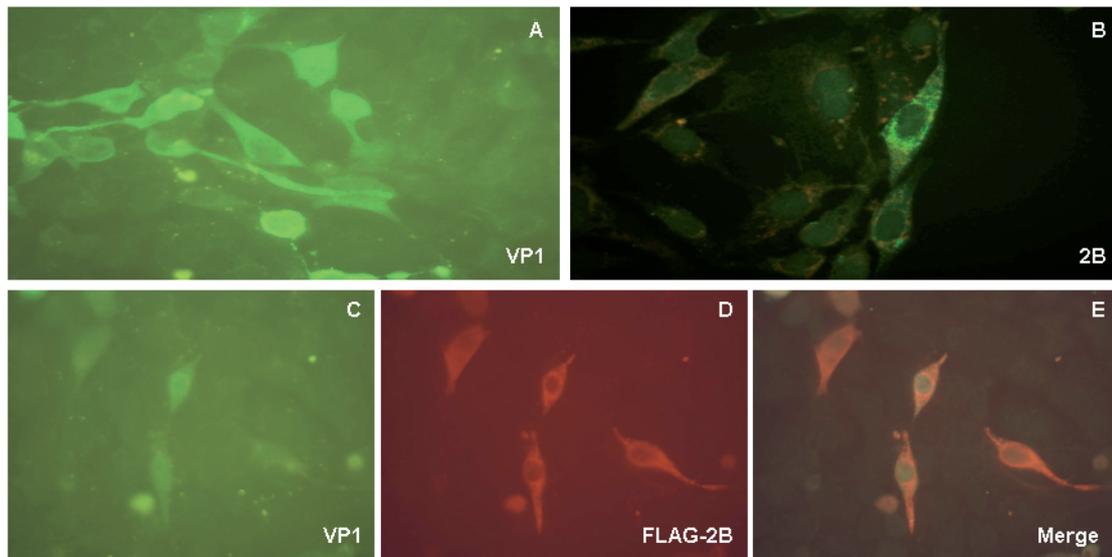
Durch eine Überexpression von HAV/7-2B kommt es hingegen auf allen Ebenen im IRF-3-Signalweg zu einer deutlichen Suppression der PRDIII-I-Luc-Aktivität, die nach RIG-I-Induktion nahezu komplett war. Möglicherweise greift das 2B-Protein direkt an dem Adapterprotein MAVS und zudem an die Kinasen TBK1 und IKK $\epsilon$  an. Denkbar wäre aber auch, dass 2B keinen direkten Einfluss auf eine der Komponenten des Signalweges hat. Es zeigte sich bereits, dass das HAV-Protein 2B intrazelluläre Membran-Veränderungen induziert (Gosert et al., 2000). So könnte 2B mit Membranen interagieren und dadurch die Ausbildung von Komplexen verschiedener Komponenten des IRF-3-Signalweges stören. Da für einige Komponenten eine Membran-Assoziation für ihre Aktivität vonnöten ist, wäre somit eine Suppression der Aktivierung von IRF-3 durch die Expression von HAV/7-2B denkbar. Im nächsten Abschnitt soll deshalb die Lokalisation von 2B in Bezug auf Membranen mittels Immunfluoreszenz bestätigt werden.

Es bleibt festzuhalten, dass 3ABC und 2B wahrscheinlich bei der Suppression der IRF-3-Aktivierung während einer HAV/7-Infektion kooperieren. Tatsächlich zeigte eine Coexpression von 2B und 3ABC den stärksten inhibierenden Effekt auf die NDV-induzierte IRF-3-Aktivierung (Daten nicht gezeigt, publiziert in Paulmann et al., 2008). Dass eine HAV/7-Infektion nicht immer die gleichen Effekte zeigt wie seine Proteine, wäre damit zu erklären, dass die Mengen an überexprimierten Protein nicht der entspricht, die während einer Infektion generiert wird.

### **3.2 Untersuchung zur Lokalisation von HAV/7-2B in FRhK-4-Zellen**

Es zeigte sich, dass das 2B-Protein des Hepatitis A-Virus auf allen untersuchten Ebenen in den Signalweg zur Aktivierung von IRF-3 eingreift (Abb. 7-11). Eine Interaktion des Proteins mit intrazellulären Membranen könnte die Ausbildung von Komplexen der Komponenten im IRF-3-Signalweg stören, was in einer Suppression der IRF-3-Aktivierung resultieren könnte. Nun sollte überprüft werden, ob HAV/7-2B tatsächlich mit intrazellulären Membranen interagiert. Dafür wurde mittels Immunfluoreszenz die Lokalisation von ektopisch exprimierten HAV/7-2B in FRhK-4-Zellen in Bezug auf Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum (ER), als mögliche intrazelluläre Membranstrukturen, untersucht. Zu diesem Zweck wurden FRhK-4-Zellen in 24-Well-Platten umgesetzt und am nächsten Tag bei einer Konfluenz von 60-80 % mit 2,4  $\mu$ g Plasmid transfiziert. Hierfür wurde jeweils 1,92  $\mu$ g Expressionsvektor mit 0,48  $\mu$ g Leervektor aufgefüllt, um gleiche Bedingungen entsprechend den Reporterexperimenten zu schaffen. Demgemäß erfolgte

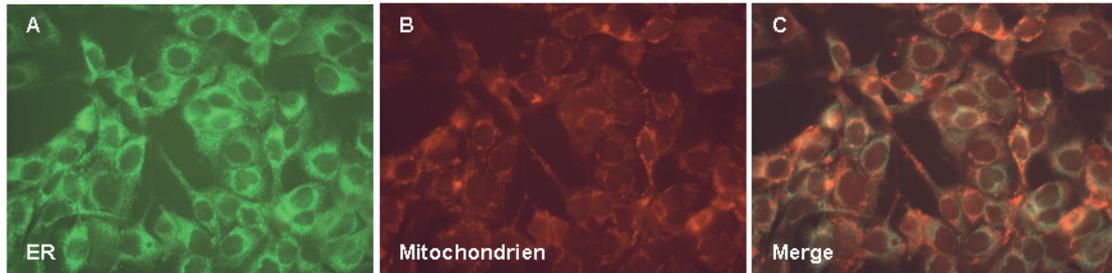
24 h nach der Transfektion ein Medium-Wechsel und weitere 18 h später die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen und die anschließende Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Als Negativkontrolle dienten nur mit dem Leervektor bzw. nicht-transfizierte FRhK-4-Zellen. Neben *ungetaggt*en HAV/7-2B wurden zwei markierte 2B-Varianten nachgewiesen. FLAG-2B trägt N-terminal sein *Tag*, während 2B-myc C-terminal markiert ist (Domsgen, 2008). Ebenfalls sollte VP1 als Vergleich zu einem HAV/7-Strukturprotein detektiert werden. Für den Nachweis von 2B bzw. VP1 kamen spezifische polyklonale Antikörper aus einem Kaninchen zum Einsatz, während die markierten 2B-Varianten über ihre *Tag*-Epitope detektiert wurden. Als sekundäre Antikörper wurden FITC- oder Texas Rot-konjugierte anti-Kaninchen Antikörper verwendet. Der Nachweis des ER wurde zudem durch einen Maus-Antikörper gegen das ER-Protein Calreticulin und einem anti-Maus FITC-konjugierten Antikörper erreicht. Die Mitochondrien hingegen wurden mit einem für Mitochondrien speziellen Farbstoff, dem MitoTracker Rot, angefärbt und so sichtbar gemacht.



**Abb. 12: Immunfluoreszenz zum Nachweis von HAV/7-2B, -FLAG-2B und -VP1 in FRhK-4-Zellen.** FRhK-4-Zellen wurden in 24-Well-Platten umgesetzt und am Folgetag mit 1,92  $\mu\text{g}$  Expressionsvektor (VP1 (A), 2B (B) oder VP1 + FLAG-2B (C-D)) und 0,48  $\mu\text{g}$  Leervektor mittels PEI cotransfiziert. 24 h danach erfolgte ein Medium-Wechsel. Weitere 18 h später wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und es erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Der Nachweis von 2B wurde durch die Verwendung des Antikörpers rabbit- $\alpha$ -2B, der von VP1 durch rabbit- $\alpha$ -VP1 und der von FLAG-2B durch mouse- $\alpha$ -FLAG erreicht. Als sekundäre Antikörper wurden goat- $\alpha$ -rabbit-FITC und goat- $\alpha$ -mouse-Texas Rot eingesetzt. Vergrößerung 400x.

Der Nachweis von HAV/7-VP1 (Abb. 12 A und C) zeigt eine deutlich cytoplasmatische Verteilung, ohne eine erkennbare Konzentrierung des Proteins. Dahingegen weisen 2B-transfizierte Zellen (Abb. 12 B) granuläre Strukturen auf und 2B ist konzentriert an einigen

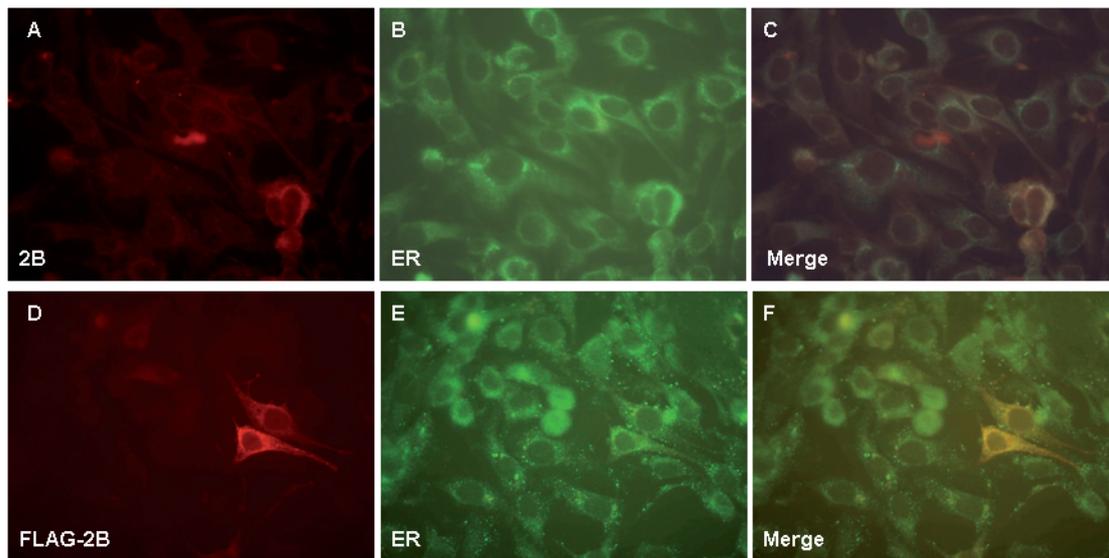
Punkten, bevorzugt um den Zellkern, lokalisiert. Für FLAG-2B (Abb. 12 D) und 2B-myc (nicht gezeigt) ist die Immunfluoreszenz vergleichbar mit der des unmarkierten 2B-Proteins. Hier konnte zudem ein gleichzeitiger Nachweis mit VP1 vollzogen werden, da es sich um Antikörper aus zwei verschiedene Tieren handelte (Abb. 12 C-E). Unter Verwendung des Kombinationsfilters wird noch einmal die unterschiedliche Lokalisation von VP1 und FLAG-2B deutlich (Abb. 12 E).



**Abb. 13: Immunfluoreszenz zum Nachweis von ER und Mitochondrien in FRhK-4-Zellen.** FRhK-4-Zellen wurden in 24-Well-Platten umgesetzt und am Folgetag mit 2,4  $\mu\text{g}$  Leervektor mittels PEI transfiziert. 24 h danach erfolgte ein Medium-Wechsel. Weitere 18 h später wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und es erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Der Nachweis des ER wurde unter Verwendung der Antikörper mouse- $\alpha$ -Calreticulin und goat- $\alpha$ -mouse-FITC realisiert. Für den Nachweis der Mitochondrien diente der Mitochondrien-spezifische Farbstoff MitoTracker Rot. Vergrößerung 400x.

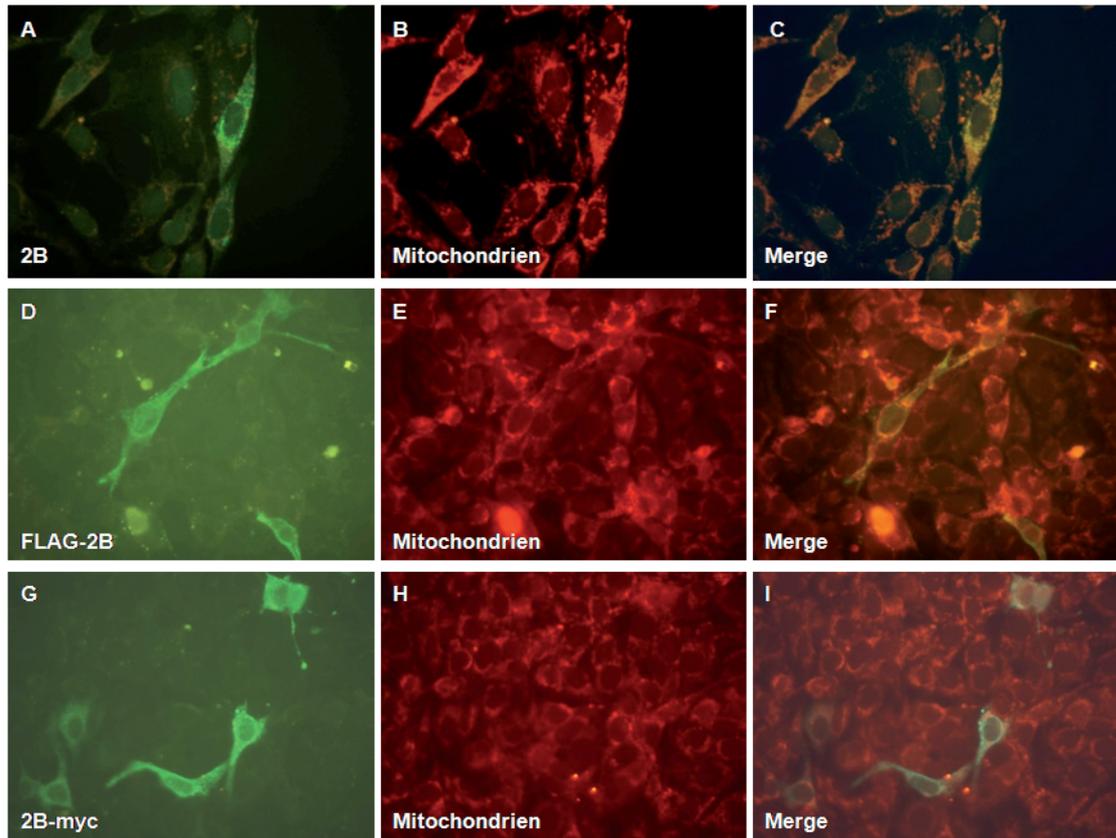
Als nächstes sollte die Lokalisation von HAV/7-2B, -FLAG-2B und -2B-myc in Bezug auf das ER und die Mitochondrien untersucht werden. Sowohl der Antikörper-vermittelte Nachweis des ER, als auch die Farbstoff-gekoppelte Detektion der Mitochondrien zeigen eine deutliche spezifische Fluoreszenz (Abb. 13 A und B). Beide Zellkompartimente weisen ein granuläres Muster auf und sind bevorzugt um den Zellkern konzentriert. Betrachtet man nun das ER und die Mitochondrien unter dem Kombinationsfilter, zeigt sich eine weitestgehend deutlich getrennte Lokalisation in der Zelle und nur einige Bereiche sind überlagert (Abb. 13 C).

In Abb. 14 ist der Nachweis von HAV/7-2B und -FLAG-2B mit dem ER dargestellt. Eine gleichzeitige Detektion von 2B-myc und dem ER konnte nicht realisiert werden, da beide Antikörper aus der Maus stammten. Es zeigt sich wieder die offensichtliche, bevorzugt um den Zellkern lokalisierte, granuläre Konzentrierung von sowohl 2B (Abb. 14 A) und FLAG-2B (Abb. 14 D), als auch des ER (Abb. 14 B und E). Betrachtet man nun gleichzeitig das ER mit dem jeweiligen Protein unter dem Kombinationsfilter (Abb. 14 C und F), ist eine deutliche Colokalisation zu erkennen. Die Fluoreszenz ist hier überwiegend gelb und nur einige wenige Bereiche sind grün oder rot. Diese Colokalisation mit dem ER konnte bereits für ein myc-getaggetes HAV-2B-Protein gezeigt werden (de Jong et al., 2008).



**Abb. 14: Immunfluoreszenz zum Nachweis von HAV/7-2B, -FLAG-2B und ER in FRhK-4-Zellen.** FRhK-4-Zellen wurden in 24-Well-Platten umgesetzt und am Folgetag mit 1,92  $\mu\text{g}$  Expressionsvektor (2B (A-C) bzw. FLAG-2B (D-F)) und 0,48  $\mu\text{g}$  Leervektor mittels PEI cotransfiziert. 24 h danach erfolgte ein Medium-Wechsel. Weitere 18 h später wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und es erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Der Nachweis von 2B wurde durch die Verwendung des Antikörpers rabbit- $\alpha$ -2B, der von FLAG-2B durch rabbit- $\alpha$ -FLAG und der des ER durch mouse- $\alpha$ -Calreticulin erreicht. Als sekundäre Antikörper wurden goat- $\alpha$ -rabbit-Texas Rot und goat- $\alpha$ -mouse-FITC Rot eingesetzt. Vergrößerung 400x.

Im Gegensatz zum ER, konnte keine eindeutige Colokalisation von den 2B-Proteinen mit den Mitochondrien detektiert werden (Abb. 15). Wie schon in Abbildung 13 B dargestellt, zeigt sich für die Mitochondrien eine deutliche granuläre Struktur, mit einer bevorzugten Konzentrierung um den Zellkern (Abb. 15 B, E und H). Unter Verwendung des Kombinationsfilters kann nun 2B, FLAG-2B und 2B-myc zusammen mit den Mitochondrien betrachtet werden (Abb. 15 C, F und I). Für die Proteine kann nur zu einem geringen Teil eine Colokalisation detektiert werden, denn nach der Überlagerung sind zum großen Teil weiterhin die grüne Fluoreszenz des jeweiligen 2B-Proteins und die rote Fluoreszenz des MitoTrackers zu erkennen. Nur wenige Bereiche erscheinen hier in einer gelben Fluoreszenz. Da ein geringer Anteil von Mitochondrien und ER ebenfalls in der Immunfluoreszenz colokalisiert (Abb. 13 C), wäre es möglich, dass hier keine partielle Colokalisation von 2B mit den Mitochondrien vorliegt, sondern dies durch die Überlagerung von ER und Mitochondrien zustande kommt. Eine Colokalisation von 2B mit den Mitochondrien ist aber nicht auszuschließen.



**Abb. 15: Immunfluoreszenz zum Nachweis von HAV/7-2B, -FLAG-2B, -2B-myc und Mitochondrien in FRhK-4-Zellen.** FRhK-4-Zellen wurden in 24-Well-Platten umgesetzt und am Folgetag mit 1,92  $\mu\text{g}$  Expressionsvektor (2B (A-C) bzw. FLAG-2B (D-F) bzw. 2B-myc (G-I)) und 0,48  $\mu\text{g}$  Leervektor mittels PEI cotransfiziert. 24 h danach erfolgte ein Medium-Wechsel. Weitere 18 h später wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und es erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Der Nachweis von 2B wurde durch die Verwendung des Antikörpers rabbit- $\alpha$ -2B, der von FLAG-2B durch mouse- $\alpha$ -FLAG und der von 2B-myc durch mouse- $\alpha$ -myc erreicht. Als sekundäre Antikörper wurden goat- $\alpha$ -rabbit-FITC und goat- $\alpha$ -mouse-FITC eingesetzt. Zur Detektion der Mitochondrien wurden die Zellen vor der Fixierung mit dem Mitochondrien-spezifischen Farbstoff MitoTracker Rot angefärbt. Vergrößerung 400x.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 2B deutlich mit dem ER colokalisiert, während eine Colokalisation mit den Mitochondrien nur partiell detektiert werden konnte. Ein Unterschied zwischen dem 2B-Protein und seinen Varianten FLAG-2B und 2B-myc, in Bezug auf die Lokalisation innerhalb der Zelle, war hier nicht erkennbar.

### 3.3 Untersuchungen des 2B- und 2C-Proteins aus HAV-Wildtypen

Wie gezeigt werden konnte, führt die Expression von HAV/7-2B auf allen untersuchten Ebenen im IRF-3-Signalweg zu einer Suppression der Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Dieser Effekt ist IRF-3-spezifisch, während HAV/7-2C generell die Proteinexpression deutlich inhibiert. Bei diesen Untersuchungen entstammten diese beiden Proteine der

Zellkultur-adaptierten HAV HM-175-Variante HAV/7. Es wurde postuliert, dass bestimmte Mutationen in den 2B- und 2C-codierenden Regionen von ZK-adaptierten HAV-Varianten zur mutationellen Anpassung des Virus an Zellkultur beitragen (Emerson et al., 1992). So stellt sich die Frage, ob die supprimierenden Effekte von HAV/7-2B auf die Aktivierung von IRF-3 bzw. von HAV/7-2C auf die Proteinexpression Zellkultur-Effekte sind oder ob diese Proteine auch aus HAV-Wildtypen diese Eigenschaften zeigen. Dieser Fragestellung sollte im Folgenden nachgegangen werden.

Hierfür wurde zunächst die RNA aus unterschiedlichen HAV-Wildtyp-Isolaten extrahiert und anschließend die cDNA der 2B- bzw. 2C-Proteine mittels RT-PCR amplifiziert. Als Untersuchungsobjekte dienten Stuhlproben aus drei HAV-infizierten Patienten (HAV-WT A-C). Aus einem der Patienten stand nach dreimonatiger HAV-Infektion eine weitere Stuhlprobe zu Verfügung (HAV-WT C und D). Aus allen vier Proben wurde die cDNA aus zwei unabhängigen RT-PCRs amplifiziert und für die sich anschließenden Untersuchungen verwendet. Des Weiteren stand Blutserum eines HAV-infizierten Patienten zur Verfügung, bei dem der Genotyp bereits bestimmt worden ist. Hierbei handelt es sich um HAV-HMH (Abb. 4), der den Genotyp IIIA trägt. Außerdem wurde zusätzlich zum HAV/7 eine weitere Zellkultur-adaptierte HAV-Variante mit in die Untersuchungen einbezogen. HAV-GP (Abb. 4) ist dabei, ebenso wie HAV/7, eine an Zellkultur adaptierte Variante des HAV HM-175.

Die cDNA des 2B- bzw. 2C-Proteins unterschiedlicher HAV-Varianten wurde dann in den Expressionsvektor pI.18 inkloniert. Es erfolgte die Überprüfung der Sequenz der Proteincodierenden Regionen (Abschnitt 3.3.1 und 3.3.3) und die Überprüfung der Effekte der Proteine auf die IRF-3-Aktivierung bzw. auf die Proteinexpression (Abschnitt 3.3.2 und 3.3.4).

#### **3.3.1 Sequenzvergleiche der codierenden Regionen der 2B-Proteine aus Zellkultur-adaptierten und Wildtyp HAV-Varianten**

Während der Adaption des Hepatitis A-Virus an Zellkultur sollen zwei Mutationen in der 2B-codierenden Region zur Zellkultur-Anpassung des Virus beitragen. Diese Mutationen befinden sich, bezogen auf die Sequenz des HAV-Wildtyps HM-175, an Position 3889, was ein Aminosäure-Austausch von Alanin zu Valin zur Folge hat, und an Position 3919, wodurch die Aminosäure Glycin durch Alanin ersetzt wird. Beide Aminosäure-Substitutionen treten in der, in dieser Arbeit verwendeten, Zellkultur-adaptierten HAV-Variante HAV/7 auf. Nun sollte

die Sequenz der 2B-codierenden Region aus verschiedenen HAV-Wildtyp-Isolaten und Zellkultur-adaptierten HAV-Varianten untereinander bzw. mit der Sequenz des HAV-Wildtyps HM-175 verglichen werden. Die cDNA des 2B-Proteins entspricht dem codierenden Bereich zwischen Nukleotid 3243 und 3995 (bezogen auf HAV HM-175) auf dem HAV-Genom und ist somit 753 bp lang. Eine Zusammenfassung der Sequenzanalyse ist in Tab. 2 dargestellt. Hier werden Literaturdaten mit Daten aus der Sequenzierung verglichen. Aufgelistet sind jeweils die Anzahl der Basensubstitutionen und die daraus resultierenden Aminosäure-Austausche.

**Tab. 2: Vergleich der Sequenz der codierenden Region für 2B-Proteine unterschiedlicher HAV-Varianten.** Aufgeführt werden hier Basensubstitutionen und daraus resultierende Aminosäure (AS)-Substitutionen in den Sequenzen der codierenden Region verschiedener 2B-Proteine im Vergleich zu der vom HAV-Wildtyp HM-175 (Cohen et al., 1987a). Die Nukleotidposition, die zu dem entsprechenden AS-Austausch führt, ist ebenfalls angegeben und bezieht sich auf HAV-Stamm HM-175. HAV/7 (Cohen et al., 1987b) und HAV-GP (Frings & Dotzauer, 2001) wurden bereits sequenziert. Hier waren den Literaturdaten lediglich die AS-Substitutionen zu entnehmen (n.a.).

2B	HAV/7	GP	WT A1	WT A2	WT B1	WT B2	WT C1	WT C2	WT D1	WT D2	HMH	Stop
<b>Basen-Substitutionen</b>	n.a.	n.a.	39	2	41	3	38	41	3	2	2	12
<b>AS-Substitutionen</b>	2	6	0	2	3	2	0	1	2	2	2	3
3451 Lys → Arg		+										
3453 Ile → Val		+										+
3459 Ser → Pro		+										
3622 Asn → Ser					+							
3717 Ile → Phe												+
3794 Cys → Stop												+
3795 Phe → Leu		+										
3850 His → Leu					+							
3861 Ile → Val								+				
3889 Ala → Val	+	+		+		+			+	+	+	
3919 Gly → Ala	+			+		+			+	+	+	
3924 Val → Ile		+										
3957 Trp → Arg					+							

n.a.: nicht angegeben

Zunächst fällt auf, dass die Sequenzen aus dem gleichen HAV-Isolat, jedoch aus separaten RT-PCR-Reaktionen, unterschiedlich viele Basensubstitutionen und zudem verschiedene Aminosäure-Austausche aufweisen. Des Weiteren ist festzustellen, dass 2B-WT A1, B1, C1 und C2 sehr viele Nukleotid-Substitutionen haben. Diese sind fast alle identisch und zudem zum größten Teil stille Mutationen. 2B-WT A1 und C1 weisen sogar keinerlei Aminosäure-Substitutionen auf, so dass die 2B-Proteine dem des HAV-Wildtyps HM-175 entsprechen. Die zur Zellkultur-Adaption beitragenden postulierten Mutationen an Position 3889 und 3919 treten bereits in der Sequenz von fünf aus neun 2B-Wildtypen auf. Da diese HAV-Wildtyp-Isolate noch keinerlei Kontakt zu Zellkultur-Systemen hatten, bedeutet dies, dass die erwähnten Mutationen, anders als von Emerson et al. (1992) postuliert, nicht während der Adaption von HAV an Zellkultur entstehen und somit nicht als Markermutationen für die Anpassung des Virus an Zellkultur verwendet werden können. In der Sequenz des 2B-Proteins der zweiten Zellkultur-adaptierten Variante, 2B-GP, tritt lediglich die Basensubstitution an der Nukleotid-Position 3919 auf.

Die cDNA-Sequenz des 2B-Proteins eines weiteren HAV-Wildtyp-Isolates, 2B-Stop, lag bereits vor (Schwarz, 2006). Diese Sequenz der 2B-Stop-codierenden Region offenbart an Nukleotid-Position 3794 eine Basensubstitution, die zu einem Stoppcodon führt. Bei 2B-Stop handelt es sich demnach um ein C-terminal verkürztes Protein. Gosert et al. (2000) postulierten bereits für das 2B-Protein eine Transmembrandomäne am C-Terminus. So ist es denkbar, dass 2B-Stop die Fähigkeit verliert, mit Membranen zu interagieren.

Innerhalb der 2B-codierenden Sequenz von 2B-WT B1 treten drei Mutationen auf, welche die anderen Protein-codierenden Regionen nicht aufweisen: Durch eine Basensubstitution an Position 3622 kommt es zu einem Asparagin-zu-Serin-Austausch, durch eine an Position 3850 wird die Aminosäure Histidin durch Leucin ersetzt und durch eine an Position 3957 findet ein Austausch von Tryptophan zu Arginin statt. Die letzten beiden Aminosäuren befinden sich im C-terminalen Drittel des Proteins. Auch die 2B-GP-codierende Sequenz weist innerhalb des Carboxyterminus des Proteins zwei Aminosäure-Substitutionen auf: Durch eine Mutation an Position 3795 kommt es zu einen Phenylalanin-zu-Leucin-Austausch und durch eine Mutation an Position 3924 wird die Aminosäure Valin durch Isoleucin substituiert.

Die Sequenzanalysen ließen nun einige Fragen aufkommen. Führen bestimmte Mutationen in der 2B-codierenden Region zu unterschiedlichen Effekten auf die Aktivierung von IRF-3? Ist auf diesem Weg zu klären, ob für die Fähigkeit des 2B-Proteins die IRF-3-Aktivierung zu

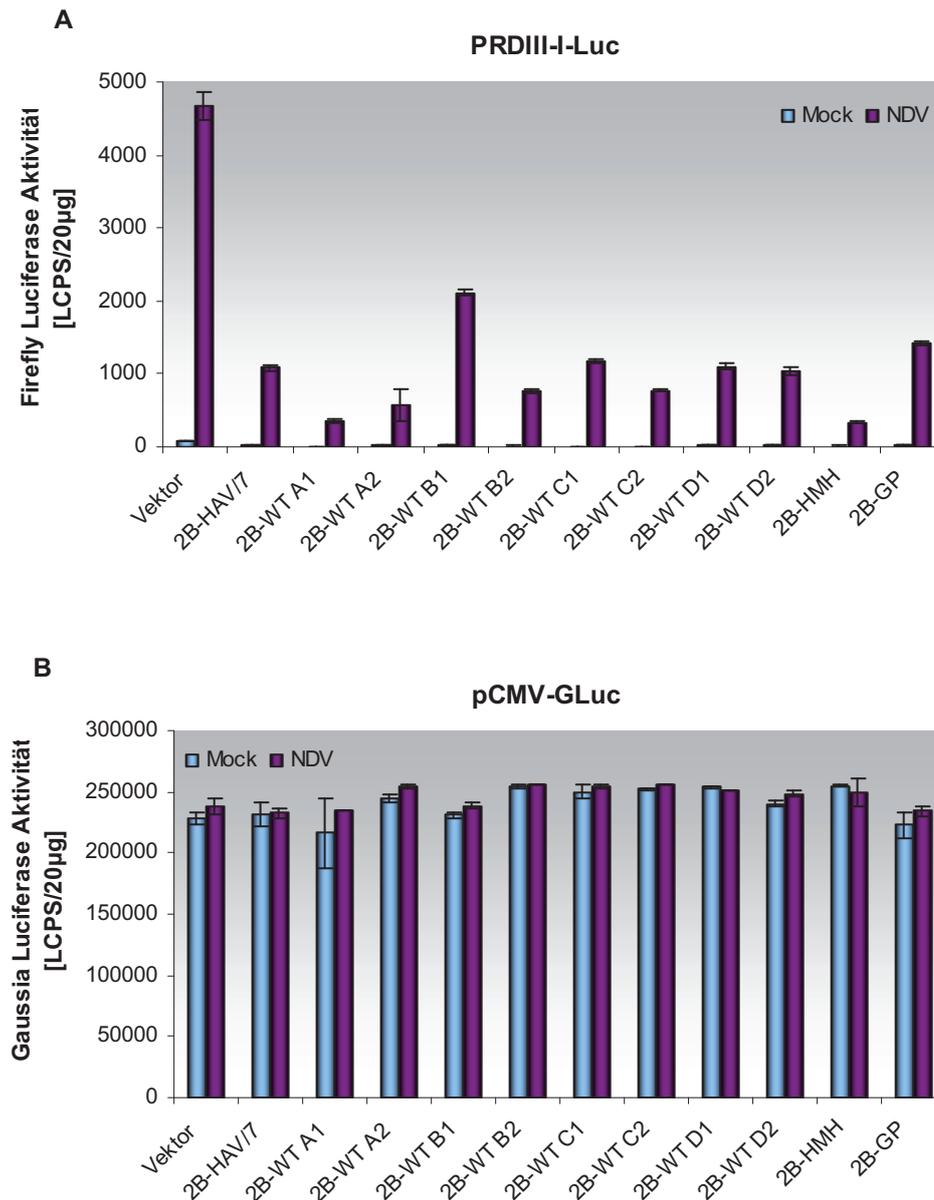
supprimieren, eine Membran-Assoziation notwendig ist? Ist dieser supprimierende Effekt der Aktivierung von IRF-3 durch das 2B-Protein, unabhängig der Mutationen an Position 3889 und 3919, trotzdem Zellkultur-bedingt? Um diesen Fragestellungen nachzugehen wurden die Effekte der unterschiedlichen 2B-Proteine auf die IRF-3-Aktivierung mittels Reporterexperimenten untersucht.

#### **3.3.2 Einfluss von HAV-2B aus HAV-Wildtypen auf die Aktivierung von IRF-3**

Für die Untersuchung des Effekts von HAV-2B aus unterschiedlichen HAV-Wildtyp-Isolaten auf die Aktivierung von IRF-3, wurden FRhK-4-Zellen in 6-Well-Platten umgesetzt und am nächsten Tag bei einer Konfluenz von 60-80 % mit Plasmiden cotransfiziert. Hierfür wurden die Expressionsvektoren für die unterschiedlichen 2B-Proteine zusammen mit dem PRDIII-I-Luc und pCMV-GLuc Reporterplasmid, analog zu den Experimenten in Abschnitt 3.1, transfiziert. Als Vergleich dienten 2B-HAV/7 transfizierte Zellen. 24 h danach erfolgte zur Induktion der IRF-3-Aktivierung eine NDV-Infektion (MOI = 0,1). Weitere 18 h später konnten sodann die Proteine extrahiert und 20 µg in den Luciferase-Assay eingesetzt werden (Abb. 16).

Zunächst zeigt sich wieder, dass NDV ein starker Induktor der IRF-3-Aktivierung ist (Abb. 16 A). Diese NDV-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors wird durch die Expression aller untersuchten 2B-Proteine mehr oder weniger gleich stark supprimiert. Am stärksten inhibieren die PRDIII-I-Luc-Aktivität hierbei die 2B-Proteine aus HAV-WT A1 und HAV-HMH, während 2B-WT B1, der eine Mutation im C-Terminus aufweist (Tab. 2), den geringsten Effekt ausübt (Abb. 16 A). Auch die Expression von 2B-GP zeigt eine leicht abgeschwächte Suppression der IRF-3-Aktivierung. Die Eigenschaften der verschiedenen 2B-Proteine, die NDV-induzierte Aktivierung von IRF-3 negativ zu beeinflussen, sind IRF-3-spezifisch, denn die konstitutive Aktivität der internen Reporterkontrolle blieb unbeeinflusst (Abb. 16 B).

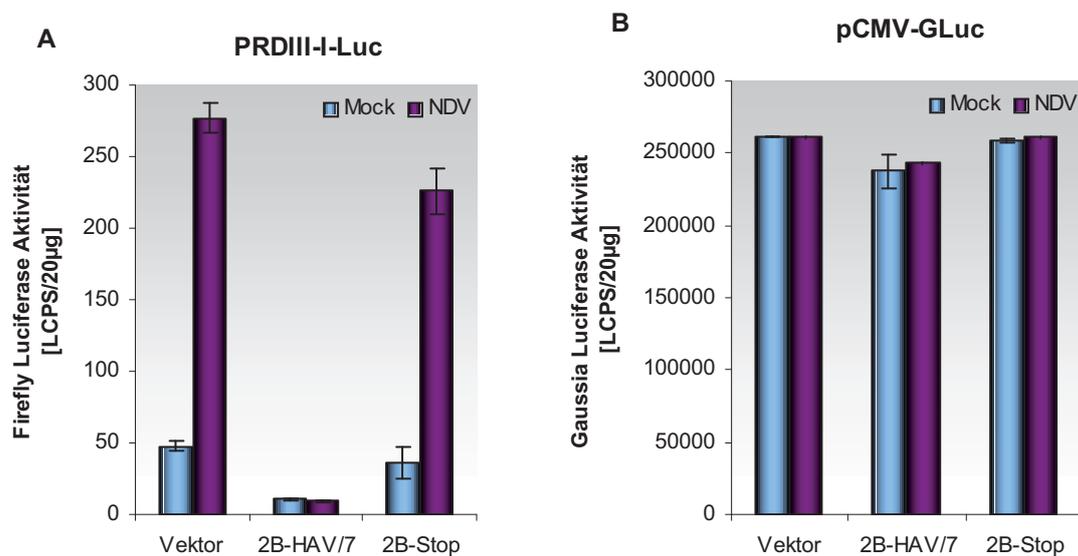
Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass die Fähigkeit von HAV/7-2B, die IRF-3-Aktivierung zu inhibieren, kein Zellkultur-Effekt ist. Auch die 2B-Proteine aus unterschiedlichen HAV-Wildtyp-Isolaten besitzen diese Eigenschaften, supprimieren sogar zum Teil noch stärker die IRF-3-Aktivierung im Vergleich zu 2B-HAV/7.



**Abb. 16: Einfluss von HAV-2B-Proteinen auf die NDV-induzierte IRF-3-Aktivierung (A) und auf die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität (B).** FRhK-4-Zellen wurden in 6-Well-Platten umgesetzt und am Folgetag mit 4,8 µg Leer- oder Expressionsvektor + 1,2 µg Reporterplasmid (0,6 µg PRDIII-I-Luc + 0,6 µg pCMV-GLuc) mittels PEI cotransfiziert. 24 h danach erfolgte die Mock- bzw. NDV-Infektion (MOI = 0,1). Weitere 18 h später wurden die Zellen mittels dreimaligen Einfrieren und Auftauen lysiert und 20 µg extrahiertes Protein in den Luciferase-Assay eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen.

Diese Fähigkeit des 2B-Proteins aus HAV-Wildtypen, ebenfalls die Aktivierung von IRF-3 zu inhibieren, wurde bereits vermutet (Schwarz, 2006). Allerdings zeigte hier das 2B-Protein aus einem HAV-WT-Isolat, 2B-Stop, einen stark abgeschwächten Effekt auf die NDV-induzierte Aktivierung von IRF-3 im Vergleich zu 2B-HAV/7. Der Effekt dieses Proteins sollte nun noch einmal überprüft werden.

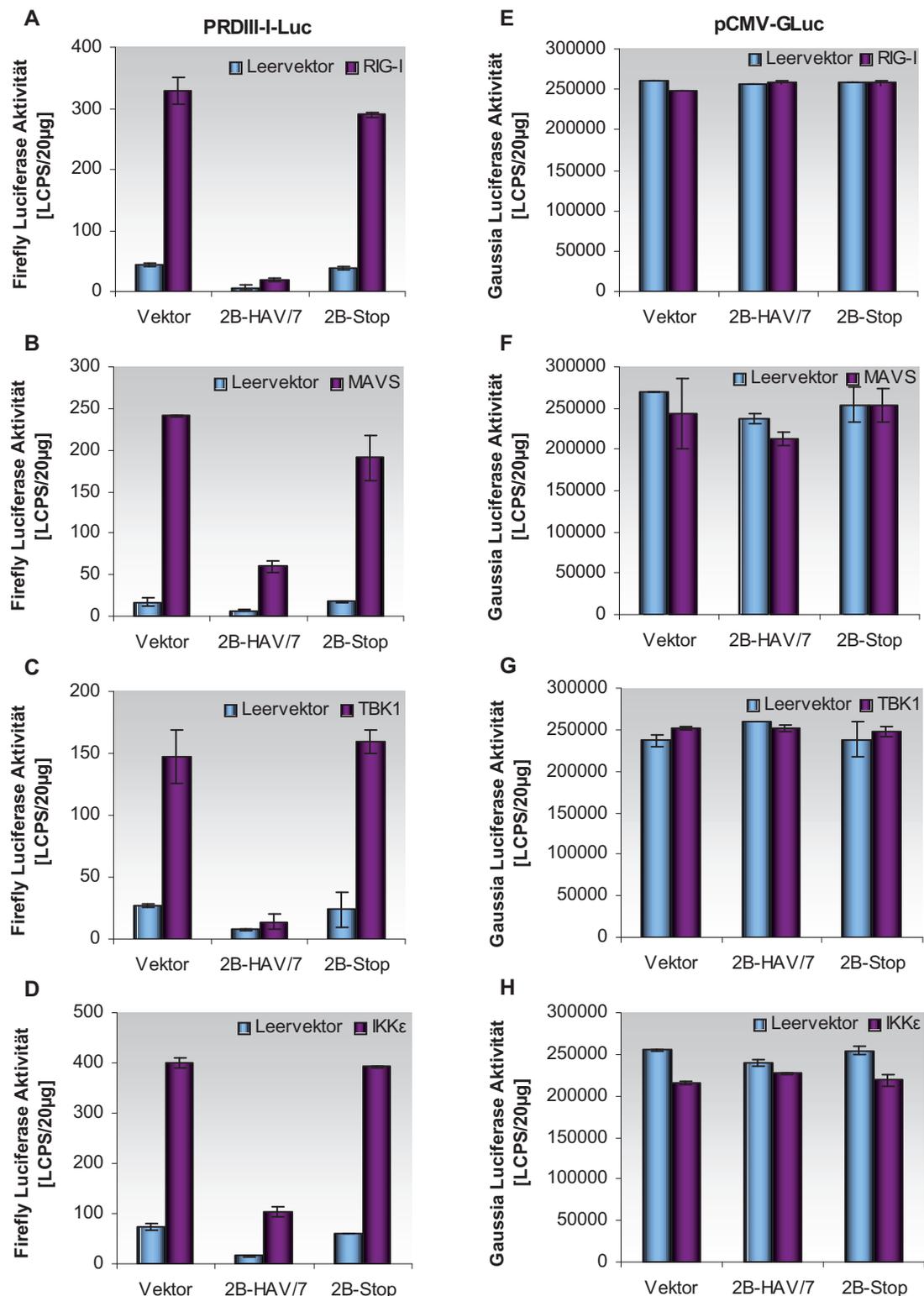
Tatsächlich kommt es nach einer Expression von 2B-Stop nur zu einer etwa 20 %igen Reduktion der NDV-induzierten IRF-3-Aktivierung, während 2B-HAV/7 abermals zu einer starken Suppression der PRDIII-I-Luc-Aktivität führt (Abb. 17 A). Da keine Beeinflussung der konstitutiven pCMV-GLuc-Aktivität nachweisbar war (Abb. 17 B), sind diese Effekte IRF-3-spezifisch.



**Abb. 17: Einfluss von HAV-2B-Stop auf die NDV-induzierte IRF-3-Aktivierung (A) und auf die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität (B).** FRhK-4-Zellen wurden in 6-Well-Platten umgesetzt und am Folgetag mit 4,8 µg Leer- oder Expressionsvektor + 1,2 µg Reporterplasmid (0,6 µg PRDIII-I-Luc + 0,6 µg pCMV-GLuc) mittels PEI cotransfiziert. 24 h danach erfolgte die Mock- bzw. NDV-Infektion (MOI = 0,1). Weitere 18 h später wurden die Zellen mittels dreimaligen Einfrieren und Auftauen lysiert und 20 µg extrahiertes Protein in den Luciferase-Assay eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen.

Dass HAV-2B-Stop nur einen geringen negativen Einfluss auf die IRF-3-Aktivierung hat, bestätigt Abb. 18. Hier wurde der Effekt von 2B-Stop auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors noch einmal auf unterschiedlichen Ebenen des IRF-3-Signalweges untersucht. Zu diesem Zweck wurden der Expressionsvektor für HAV-2B-Stop bzw. 2B-HAV/7 zusammen mit denen für RIG-I, MAVS oder den Kinasen TBK1 und IKKε in FRhK-4-Zellen cotransfiziert und 42 h später die Effekte auf die PRDIII-I-Luc und pCMV-GLuc-Aktivität im Luciferase-Assay untersucht.

Es zeigte sich, dass die Expression von 2B-Stop zu einer minimalen Suppression der RIG-I- oder MAVS- und Kinasen-vermittelten IRF-3-Aktivierung führt, während das 2B-Protein aus HAV/7 wieder auf allen untersuchten Ebenen eine relativ starke Reduktion der PRDIII-I-Luc-Aktivität induziert (Abb. 17 A-D).



**Abb. 18: Einfluss von HAV-2B-Stop auf die RIG-I- (A), MAVS- (B), TBK1- (C) und IKKε- (D) vermittelte IRF-3-Aktivierung und auf die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität (E-H).** FRhK-4-Zellen wurden in 6-Well-Platten umgesetzt und am Folgetag mit 2,4 µg Expressionsvektor (pL18, 2B-Stop oder 2B-HAV/7) + 2,4 µg Leervektor oder MAVS, RIG-I, TBK1 oder IKKε + 1,2 µg Reporterplasmid (0,6 µg PRDIII-I-Luc + 0,6 µg pCMV-GLuc) mittels PEI cotransfiziert. 24 h danach erfolgte ein Medium-Wechsel. Weitere 18 h später wurden die Zellen lysiert und 20 µg extrahiertes Protein in den Luciferase-Assay eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppellansätzen.

Beide Proteine haben keinen Einfluss auf die Proteinexpression, denn die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität blieb nach ihrer Expression unbeeinflusst (Abb. 17 E-H). Dies bestätigt abermals den IRF-3-spezifischen Effekt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 2B-Proteine aus HAV-Wildtyp-Isolaten, vergleichbar mit 2B aus der Zellkultur-adaptierten HAV-Variante HAV/7, einen supprimierenden und IRF-3-spezifischen Effekt auf die NDV-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors haben (Abb. 16). Dieser supprimierende Effekt ist demnach kein Zellkultur-Effekt, der durch Mutationen in der 2B-codierenden Region, die während der Adaption von HAV an Zellkultur entstehen, hervorgerufen wird. Die Expression von 2B-Stop, welches ebenfalls aus einem HAV-WT-Isolat generiert wurde, zeigte aber nur einen sehr geringen Effekt auf die NDV-induzierte IRF-3-Aktivierung (Abb. 17). Dieses Ergebnis konnte auf allen untersuchten Ebenen im IRF-3-Signalweg gezeigt werden (Abb. 18). Da es sich bei 2B-Stop um ein C-terminal verkürztes Protein handelt und der Carboxyterminus eine potentielle Transmembrandomäne trägt (Gosert et al., 2000), wäre eine Interaktion des 2B-Proteins mit Membranen als Voraussetzung für die Fähigkeit die IRF-3-Aktivierung zu supprimieren, denkbar. Auch durch Expression von HAV-2B-WT B1 kam es zu einer abgeschwächten Suppression der IRF-3-Aktivierung. Dieses Protein trägt in seinem C-Terminus eine Mutation, welche die anderen 2B-Proteine nicht aufweisen. Deshalb wäre auch hier ein Einfluss auf die Transmembrandomäne durch diese Mutation möglich.

Nicht nur Mutationen in der 2B-, sondern auch welche in der 2C-codierenden Region von Zellkultur-adaptierten HAV-Varianten wurden als zur Zellkulturanpassung von HAV beitragend postuliert. Deshalb werden sich die kommenden Abschnitte mit dem 2C-Protein aus Zellkultur-adaptierten HAV-Varianten und aus HAV-Wildtypen beschäftigen.

#### **3.3.3 Sequenzvergleiche der codierenden Regionen der 2C-Proteine aus Zellkultur-adaptierten und Wildtyp HAV-Varianten**

Es wurde postuliert, dass zwei Mutationen in der 2C-codierenden Region während der Adaption von HAV an Zellkultur entstehen und zu der effektiveren Replikation Zellkultur-adaptierter HAV-Varianten beitragen (Emerson et al., 1992). Diese Mutationen befinden sich (bezogen auf die Sequenz von HAV HM-175) an Position 4087, was eine Aminosäure-Substitution von Lysin zu Methionin verursacht und an Position 4222, wodurch die Aminosäure Phenylalanin durch Serin ersetzt wird. Analog zur 2B-codierenden Region,

befinden sich auch diese Mutationen in der hier verwendeten HAV-Variante HAV/7. Für HAV-2B konnte bereits gezeigt werden, dass die zur Zellkulturadaption beitragenden postulierten Mutationen bereits in 2B-Wildtyp-Isolaten vorhanden waren (Tab. 2). Mittels Sequenzanalysen sollte dies auch für HAV-2C überprüft werden. Hierfür wurde die Sequenz der 2C-codierenden Region aus verschiedenen HAV-Wildtyp-Isolaten und Zellkultur-adaptierten HAV-Varianten untereinander bzw. mit der Sequenz des HAV-Wildtyps HM-175 verglichen. Die cDNA des 2C-Proteins entspricht dem codierenden Bereich zwischen Nukleotid 3996 und 5000 (bezogen auf HAV HM-175) auf dem HAV-Genom und ist somit 1005 bp lang. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tab. 3 dargestellt. Auch hier werden Literaturdaten mit Daten aus der Sequenzierung verglichen. Aufgelistet sind jeweils die Anzahl der Basensubstitutionen und die daraus resultierenden Aminosäure-Austausche.

Wie auch schon für HAV-2B gezeigt, offenbaren die Sequenzen aus der gleichen Stuhlprobe, jedoch aus separaten RT-PCR-Reaktionen, unterschiedlich viele Basensubstitutionen, die zu verschiedenen Aminosäure-Austauschen führen (2C-WT C1 und C2). Des Weiteren weisen die Sequenzen der codierenden Region von 2C-WT B1, C1 und C2 deutlich mehr Nukleotid-Substitutionen auf, als die anderen Sequenzen. Diese sind zum größten Teil jedoch identisch (39 gleiche Basen-Austausche) und zudem fast alles stille Mutationen. Die Mutation an Position 4222, die nach Emerson et al. (1992) zur mutationellen Anpassung von HAV an Zellkultur beitragen soll, tritt nicht nur in den beiden Zellkultur-adaptierten 2C-Varianten 2C-HAV/7 und 2C-GP auf, sondern ist ebenfalls in der Sequenz des 2C-WT D1 vorhanden. Dies würde bedeuten, analog zu den Ergebnissen mit HAV-2B, dass diese Mutation nicht während der Adaption von HAV an Zellkultur entsteht. Die zweite zur HAV-Anpassung an Zellkultur beitragende Mutation an Position 4087 ist ausschließlich in der Sequenz des 2C-HAV/7 zu finden.

Vergleicht man nun die codierenden Sequenzen der 2C-Proteine miteinander, fallen zwei deutliche Unterschiede auf. Zum einen befindet sich eine Mutation an der Nukleotid-Position 4125 nur in den Sequenzen von 2C-WT B1, -C1 und -C2. Diese Basensubstitution führt zu einem Aminosäure-Austausch von Isoleucin zu Valin. Zum anderen beinhalten die Sequenzen von 2C-HAV/7, -GP und -WT D1 die erwähnte Mutation an Position 4222, welche die anderen nicht aufweisen. Beide Aminosäure-Substitutionen finden im N-terminalen Drittel des 2C-Proteins statt. Für den N-Terminus von HAV-2C wurde bereits eine Transmembrandomäne vorgeschlagen, über die das integrale Protein mit intrazellulären Membranen interagieren könnte (Jecht et al., 1998).

**Tab. 3: Vergleich der Sequenz der codierenden Region für 2C-Proteine unterschiedlicher HAV-Varianten.** Aufgeführt werden hier Basensubstitutionen und daraus resultierende Aminosäure (AS)-Substitutionen in den Sequenzen der codierenden Region verschiedener HAV-2C-Proteine im Vergleich zu der vom HAV-Wildtyp HM-175 (Cohen et al., 1987a). Die Nukleotidposition, die zu dem entsprechenden AS-Austausch führt, ist ebenfalls angegeben und bezieht sich auf HAV-Stamm HM-175. HAV/7 (Cohen et al., 1987b) und HAV-GP (Frings & Dotzauer, 2001) wurden bereits sequenziert. Hier waren den Literaturdaten lediglich die AS-Substitutionen zu entnehmen (n.a.).

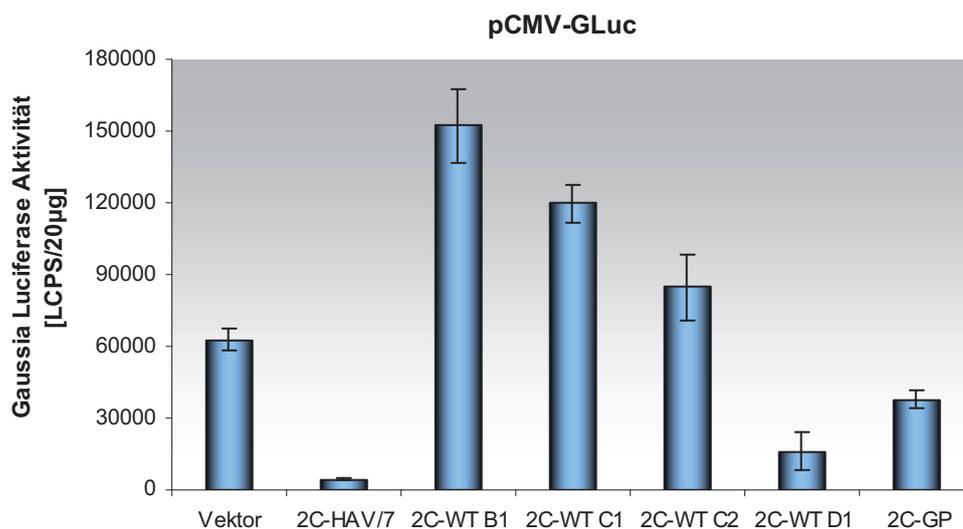
2C	HAV/7	GP	WT B1	WT C1	WT C2	WT D1
<b>Basen-Substitutionen</b>	n.n.	n.n.	41	41	45	7
<b>AS-Substitutionen</b>	4	4	3	3	6	5
4032 Ile → Val			+			
4087 Lys → Met	+					
4125 Ile → Val			+	+	+	
4185 Glu → Lys	+	+	+	+	+	+
4222 Phe → Ser	+	+				+
4233 Gln → Glu		+				+
4407 Val → Ile					+	
4419 Tyr → His						+
4515 Thr → Ala					+	
4563 Val → Ile	+					
4594 Thr → Ile					+	
4739 Lys → Asn				+		
4829 Asp → Glu					+	
4971 Met → Val		+				+

n.a.: nicht angegeben

Die Sequenzanalysen zeigten, dass, die Mutation an Position 4222, die nach Emerson et al. (1992) während der Zellkulturadaption des Hepatitis A-Virus entstehen soll, schon in einer Wildtyp-Sequenz vorhanden ist. Ist der supprimierende Effekt von 2C der Zellkultur-adaptierten HAV-Variante HAV/7 auf die Proteinexpression trotzdem Zellkultur bedingt? Oder haben auch 2C-Proteine aus HAV-WT-Isolaten diese Eigenschaft? Führen Mutationen im Aminoterminus des Proteins zu unterschiedlichen Effekten auf die Proteinexpression? Um diesen Fragestellungen nachzugehen wurden die Effekte der unterschiedlichen HAV-2C-Proteine auf die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität untersucht.

### 3.3.4 Einfluss von HAV-2C aus HAV-Wildtypen auf die Proteinexpression

Die Expression des 2C-Proteins von HAV/7 führte in allen Reporterexperimenten zu einer starken Reduktion der konstitutiven pCMV-GLuc-Aktivität und demnach zu einer Suppression der Proteinexpression (Abb. 7-11 B). Nun sollten die Effekte von 2C-HAV/7, 2C-GP und 2C-Proteinen aus HAV-Wildtyp-Isolaten auf die konstitutive Aktivität des internen Reporters mittels Reporterexperimenten untersucht werden. Um gleiche Verhältnisse analog den bisherigen Experimenten zu schaffen, wurden hierfür FRhK-4-Zellen in 6-Well-Platten umgesetzt und am nächsten Tag mit den 2C-Expressionsvektoren und den Reporterplasmiden PRDIII-I-Luc (Daten nicht gezeigt) und pCMV-GLuc cotransfiziert. 24 h danach erfolgte ein Medium-Wechsel. Weitere 18 h später konnten sodann die Proteine extrahiert und in den Luciferase-Assay eingesetzt werden (Abb. 19).



**Abb. 19 Einfluss von HAV-2C-Proteinen auf die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität.** FRhK-4-Zellen wurden in 6-Well-Platten umgesetzt und am Folgetag mit 4,8 µg Leer- oder Expressionsvektor + 1,2 µg Reporterplasmid (0,6 µg PRDIII-I-Luc + 0,6 µg pCMV-GLuc) mittels PEI cotransfiziert. 24 h danach erfolgte ein Medium-Wechsel. Weitere 18 h später wurden die Zellen mittels dreimaligen Einfrieren und Auftauen lysiert und 20 µg extrahiertes Protein in den Luciferase-Assay eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen.

Wieder zeigte sich, dass die Expression von 2C-HAV/7 zu einer starken Reduktion der konstitutiven Aktivität des internen Reporters führt. Durch die zweite Zellkultur-adaptierte Variante, 2C-GP, kommt es ebenfalls zu einer Reduktion der konstitutiven pCMV-GLuc-Aktivität, jedoch in deutlich abgeschwächter Form. Drei der vier 2C-Wildtyp-Proteine vermögen die Proteinexpression nicht zu supprimieren, sondern zeigen sogar einen aktivierenden Effekt. Lediglich 2C-WT D1 inhibiert deutlich und ähnlich stark wie 2C-

HAV/7 die Aktivierung der konstitutiven pCMV-GLuc-Aktivität. Da zusätzlich zu 2C aus der ZK-adaptierten HAV-Variante HAV/7, auch das 2C-Protein aus einem Wildtyp-Isolat zu einer Suppression der Proteinexpression führte, kann davon ausgegangen werden, dass die reduzierenden Effekte von 2C-HAV/7 auf die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität nicht Zellkultur-bedingt sind.

Die Sequenzanalyse (Tab. 3) zeigte zwei deutliche Unterschiede in der codierenden Sequenz zwischen den 2C-Proteinen aus HAV-WT B1, C1 und C2, die einen aktivierenden Effekt auf die Proteinexpression haben, und 2C-HAV/7, -GP und WT D1, dessen Expression die Proteinexpression inhibiert. Da sich diese Mutationen im Aminoterminus des Proteins befinden, wäre es denkbar, dass dadurch die Ausbildung einer N-terminalen Transmembrandomäne erleichtert oder erschwert wird. So bestünde die Möglichkeit, dass der Effekt der unterschiedlichen 2C-Proteine auf die generelle Proteinexpression an eine Interaktion des Proteins an Membranen gekoppelt ist.

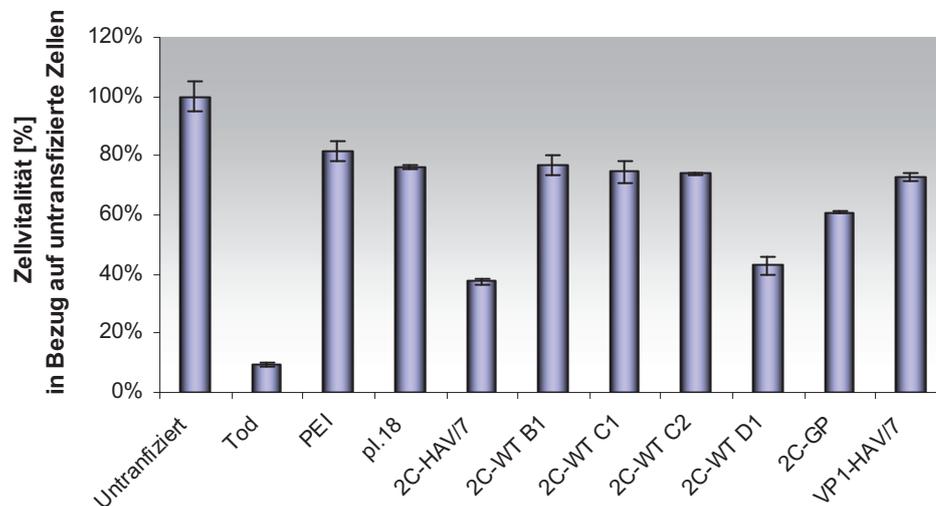
Eine Suppression der generellen Proteinexpression könnte soweit führen, dass es sich für die Zellen cytotoxisch auswirken könnte. Deshalb soll im folgenden Abschnitt die potentielle Cytotoxizität der unterschiedlichen 2C-Proteine auf FRhK-4-Zellen untersucht werden.

#### **3.3.5 Untersuchung der Cytotoxizität von verschiedenen 2C-Proteinen auf FRhK-4-Zellen**

Kusov et al. (1998) konnten bereits zeigen, dass das 2C-Protein des Hepatitis A-Virus in Bakterienzellen cytotoxisch wirkt. In FRhK-4-Zellen führte eine Expression des 2C-Proteins aus den beiden Zellkultur-adaptierten HAV-Varianten HAV/7 und HAV-GP und aus dem HAV-Wildtyp HAV-WT D1 zu einer Suppression der Proteinexpression, während das Protein aus den Wildtyp Hepatitis A-Isolaten B1, C1 und C2 diese nicht zu inhibieren vermochten (Abb. 19). Ein MTT-Test sollte nun Aufschluss darüber geben, ob die unterschiedlichen 2C-Proteine auch in eukaryotischen Zellen cytotoxisch wirken und ob hier ein Zusammenhang zum Einfluss auf die Proteinexpression besteht.

Zu diesem Zweck wurden FRhK-4-Zellen in eine 96-Well-Platte umgesetzt, um am Folgetag bei einer Konfluenz von 60-80 % mit den Expressionsplasmiden der verschiedenen 2C-Proteine transfiziert werden zu können. Zudem erfolgte zur Kontrolle eine Transfektion nur mit dem Leervektor, eine ohne jegliches Plasmid und eine mit dem Expressionsvektor des HAV/7-Strukturproteins VP1. Als Bezug zu 100 % vitalen Zellen, wurden untransfizierte

FRhK-4-Zellen verwendet, während Zellen, denen 3 h nach dem Umsetzen das Medium entzogen wurde, als Tod-Kontrolle dienten. 24 h nach der Transfektion erfolgte ein Medium-Wechsel und weitere 18 h später konnte sodann das MTT auf die Zellen gegeben werden. Nach Bildung der Formazankristalle des MTT, konnten diese durch eine 20-stündige Inkubationszeit durch Zugabe einer Solubilisierungslösung gelöst und die Zellen lysiert werden. Als Blank dienten MTT und Solubilisierungslösung ohne Zellen. Die Auswertung erfolgte im *ELISA-Reader* bei einer Wellenlänge von 490 nm. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 dargestellt.



**Abb. 20 Cytotoxischer Effekt von HAV-2C-Proteinen auf FRhK-4-Zellen im MTT-Test.** FRhK-4-Zellen wurden in eine 96-Well-Platte umgesetzt. 3 h später erfolgte der Entzug des Mediums als Kontrolle für nicht-vitale Zellen (Tod). Am Folgetag wurden die Zellen mit 0,24 µg Expressionsvektor mittels PEI transfiziert. Als 100 % vitale Zellen dienten untransfizierte FRhK-4-Zellen (Untransfiziert). Zudem wurden Zellen nur mit PEI versehen (PEI). 24 h danach erfolgte ein Medium-Wechsel und weitere 18 h später wurden die Zellen mit 10 µl MTT-Lösung versehen. Eine 4-stündige Inkubationszeit erlaubte die Bildung der Formazankristalle, die durch die Zugabe von 100 µl Solubilisierungslösung innerhalb der nächsten 20 h gelöst wurden. Die Auswertung erfolgte im *ELISA-Reader* bei einer Wellenlänge von 490 nm. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Doppelansätzen.

Der Medium-Entzug führt zu einem nahezu vollständigen Vitalitätsverlust der FRhK-4-Zellen (Abb. 20, Tod). Des Weiteren kommt es schon durch eine alleinige Gabe des Transfektionsreagenz PEI zu einem geringfügigen cytotoxischen Effekt auf die Zellen (Abb. 20, PEI). Hier sind nur etwa 80 % der Zellen vital im Gegensatz zu untransfizierten Zellen. Eine hierzu vergleichsweise Vitalität kann durch die Expression des Leervektors, der 2C-Proteine aus HAV-WT B1, C1 und C2 und des HAV/7-Strukturproteins VP1 detektiert

werden. Dieser geringfügige Vitalitätsverlust könnte jedoch auf den Effekt des Transfektionsreagenzes zurückzuführen sein. Dahingegen zeigte sich durch die Expression der 2C-Proteine aus den ZK-adaptierten HAV-Varianten HAV/7 und HAV-GP und aus dem HAV-WT D1 ein stärkerer cytotoxischer Effekt auf die Zellen. Diese Proteine zeigten auch im Reporterexperiment einen supprimierenden Effekt auf die Proteinexpression, während 2C-WT B1, -WT C1 und -WT C2 diesen nicht offenbarten (Abb. 19). Es kann deshalb spekuliert werden, dass eine Suppression der Proteinexpression cytotoxisch auf die transfizierten FRhK-4-Zellen wirkt.

## 4 Diskussion

Virale Infektionen lösen die angeborene und die adaptive Immunantwort aus, die für das Überleben des Wirts essentiell sind. Eine sehr effektive antivirale Immunantwort ist die Produktion und Sekretion von Interferonen, die erstmals im Jahre 1957 von Isaacs und Lindenmann beschrieben wurden. So haben Zellen mit der Induktion der IFN- $\beta$ -Synthese eine effektive, schnellgreifende und unspezifische Möglichkeit entwickelt auf Virusinfektionen zu reagieren. Es ist deshalb nicht überraschend, dass viele Viren Überlebensstrategien entwickelt haben, die auf das Umgehen dieser Abwehrmechanismen basieren.

Das Interferonsystem bietet zahlreiche Angriffsmöglichkeiten während einer Virusinfektion. So kann bereits die Induktion der IFN-Expression, seine anschließende Sekretion oder aber auch die Wirkung von Interferonen durch ein Virus beeinträchtigt sein.

Auch das in dieser Arbeit untersuchte Hepatitis A-Virus induziert in Zellkultur bei Ausbildung einer persistenten Infektion keine Interferonsekretion. Eine exogene Gabe von IFN- $\beta$  hingegen führte zur Eliminierung einer persistenten HAV-Infektion in humanen Fibroblasten (Vallbracht et al., 1984; Vallbracht & Flehmig, 1985). Die Wirkung von IFN- $\beta$  bleibt demnach durch HAV unbeeinflusst. Erste Untersuchungen zeigten, dass nach poly(IC)-Induktion HAV-infizierter Zellen keine IFN- $\beta$ -mRNA in den Zellen nachweisbar war (Brack et al., 2002). IFN- $\beta$  wird demnach schon auf Transkriptionsebene durch HAV gehemmt. Mittels sowohl transienter als auch stabiler Reporter-Gen-Transfektionsexperimente konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass ausschließlich die PRDIII-I-Region des IFN- $\beta$ -Enhancers durch HAV supprimierbar ist. Die PRDIV erfährt hier durch HAV keine Negativregulation; die PRDII wurde nach poly(IC)-Stimulation sogar verstärkt aktiviert (Astrosini, 2001; Brandt 2002; Kaumanns 2003). Die HAV-induzierte Suppression der IFN- $\beta$ -Induktion ist demnach auf den Transkriptionsfaktor IRF-3 beschränkt. IRF-3 wird in HAV-infizierten Zellen nicht phosphoryliert, kann deshalb nicht dimerisieren und nicht in den Zellkern translozieren. Daher erfolgt keine Aktivierung der PRDIII-I-Region (Fensterl et al., 2005). Die Eigenschaft, die IFN-Induktion unterbinden zu können, ist für das Hepatitis A-Virus von zentraler Bedeutung. Das IFN-sensitive Virus repliziert sehr langsam und ist deshalb besonders anfällig für eine Negativregulation des schnellgreifenden unspezifischen Immunsystems. Eine produktive HAV-Infektion wäre somit vor der Etablierung der spezifischen Immunantwort nicht gewährleistet. Es folgten daraufhin Untersuchungen, wo und wie HAV in den Signalweg zur IRF-3-Aktivierung eingreift.

Die größte Bedeutung bei der Induktion der IFN- $\beta$ -Expression zeigte dsRNA. Diese wird intrazellulär durch die RNA-Helikase RIG-I oder MDA-5 erkannt und gebunden. (Andrejeva et al., 2004; Kang et al., 2002; Silverman et al., 2003; Yoneyama et al., 2004). Über ihre CARD-Domänen erfolgt dann die Bindung und Signalweiterleitung an das Adapter-Molekül MAVS. Das Mitochondrien-assoziierte Protein aktiviert anschließend seinerseits die Kinasen TBK1 und IKK $\epsilon$  (Seth et al., 2005; Meylan et al., 2005; Xu et al., 2005; Kawai et al., 2005). Diese beiden Proteine, im Komplex mit weiteren Faktoren, können IRF-3 direkt an seinem Carboxyterminus phosphorylieren, woraufhin der Transkriptionsfaktor dimerisiert, folglich in den Zellen transloziert und dort zur Induktion der IFN- $\beta$ -Induktion beitragen kann (Servant et al., 2002; 2003; Yoneyama et al., 2002). Zwei weitere Proteine scheinen im dsRNA-induzierten IRF-3-Signalwege eine Rolle zu spielen. Für TRAF3 konnte dabei eine direkte Assoziation mit sowohl MAVS als auch mit den Kinasen gezeigt werden (Oganesyan et al., 2006; Saha et al., 2006). Das Protein STING fungiert wahrscheinlich ebenfalls als Adapter-Molekül zwischen MAVS und TBK1 (Ishikawa & Barber, 2008; Jin et al., 2008; Zhong et al., 2008; Sun et al., 2009). Beide Proteine scheinen aber in FRhK-4-Zellen, welche in dieser hier vorliegenden Arbeit für die Untersuchungen verwendet wurden, keine Rolle zu spielen (Krämer, 2008; laborinterne Untersuchungen).

Auf der Suche nach einem potentiellen *Target* des Hepatitis A-Virus im intrazellulär vorliegenden dsRNA-vermittelten IRF-3-Signalweg, konnte zunächst der Angriffspunkt von HAV zwischen RIG-I/MDA-5 und TBK1/IKK $\epsilon$  eingegrenzt werden (Fensterl et al., 2005). Später gelang die Beschränkung auf das Adapter-Protein MAVS, wobei die Kinasen als eventuelle *Targets* des Virus nicht ausgeschlossen wurden (Paulmann et al., 2008).

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es nun zu zeigen, welches Protein oder welche Proteine des Hepatitis A-Virus ihm diese Fähigkeit zur Suppression der IRF-3-Aktivierung verleihen. Im Verlauf dieser Arbeit wurden die HAV-Proteine 2B und 3ABC hierfür vorgeschlagen (Yang et al., 2007; Paulmann et al., 2008). Hierrauf soll zu einem späteren Zeitpunkt der Diskussion genauer eingegangen werden.

Ein verlässliches Expressionssystem für die einzelnen HAV/7-Proteine wurde bereits in einer anderen Doktorarbeit etabliert (Magulski, 2007). Hier wurde die cDNA einzelner HAV/7-Proteine in den Expressionsvektor pI.18 inkloniert. Dieser enthält zwischen seinem CMV-Promotor und der *Multiple Cloning Site* (MCS) eine von zwei Exon Sequenzen flankierte Intron A Sequenz, die im Zuge der mRNA-Reifung deletiert wird, was zu einer Steigerung

der Expressionsrate führt. Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher HAV/7-Proteine auf die Aktivierung von IRF-3 wurden die jeweiligen Expressionsvektoren zusammen mit Reporterplasmiden mittels des Transfektionsreagenz PEI in FRhK-4-Zellen eingebracht. Eine Optimierung der PEI-vermittelten Transfektion wurde in einer parallel stattfindenden Bachelorarbeit vollzogen (Brinkhaus, 2009). Um nun eine mögliche Suppression der IRF-3-Aktivierung durch HAV/7-Proteine untersuchen zu können, musste zunächst die Aktivierung von IRF-3 erfolgen. Hierfür wurde das Newcastle Disease-Virus (NDV) eingesetzt. NDV induziert über RIG-I die Expression des IFN- $\beta$ -Gens (Yoneyama et al., 2004; Li et al., 2005a). Diese Induktion wird durch HAV unterdrückt, wobei hierfür eine Inhibition der NDV-Replikation nicht ursächlich war (Fensterl et al., 2005). Deshalb konnte NDV in den folgenden Experimenten als potenter IRF-3-Aktivator eingesetzt werden. Zur Untersuchung der Aktivierung von IRF-3 kam das Reporterplasmid PRDIII-I-Luc zum Einsatz, so dass ein Nachweis der IRF-3-Aktivität über die Luciferase-Expression detektiert werden konnte. Kam es in den Reporterexperimenten zu einer Suppression der induzierten IRF-3-Aktivierung, so war auch immer die Basisaktivität des Reporters beeinflusst (Abb. 7-11 A), so dass ein genereller Effekt auf die Proteinexpression denkbar und eine Differenzierung zu einem potentiellen spezifischen Effekt auf die Aktivierung von IRF-3 nicht möglich wäre. Deshalb war es erforderlich, eine interne Kontrolle in die Experimente mit einzubeziehen. Das pCMV-GLuc ist ein Reporterplasmid, bei dem das Gen für die *Gaussia* Luciferase unter der Kontrolle eines konstitutiven CMV-Promotors steht. Dieser Vektor wurde in allen Reporterexperimenten cotransfiziert. Somit war es möglich, einen spezifischen IRF-3-Effekt von einer generellen Beeinflussung der Proteinexpression zu differenzieren.

Welche Proteine HAV/7 die Eigenschaft zur Suppression der IRF-3-Aktivierung verleihen und wo sie im Signalweg zur IRF-3-Aktivierung eingreifen, sollte nun untersucht werden. Dafür wurden bereits die HAV/7-Proteine 2B und 3ABC als mögliche Kandidaten vorgeschlagen. Das Intermediat 3ABC degradiert dabei, über seine 3C-vermittelte Protease-Aktivität, MAVS und blockiert somit die Aktivierung von IRF-3 (Yang et al., 2007). Für das 2B-Protein konnte noch nicht eindeutig bestimmt werden, wie es in dem Signalweg zur IRF-3-Aktivierung eingreift. Hier wurde ebenfalls MAVS als möglicher Angriffspunkt diskutiert (Paulmann et al., 2008). In den Versuchen sollte deshalb der Einfluss von HAV/7-2B auf die IRF-3-Aktivierung mittels Reporterexperimenten eingehender untersucht werden. Des Weiteren wurden die Proteine HAV/7-2C und -2BC in die Untersuchungen mit einbezogen. Für 2C konnte ebenfalls eine Suppression der poly(IC)-induzierten Aktivierung von IRF-3 beobachtet werden (Paulmann et al., 2008). Das 2BC-Intermediat entsteht relativ

früh im Replikationszyklus des Hepatitis A-Virus (Martin et al., 1995; Jia et al., 1993) und die nachfolgende 3C-vermittelte Spaltung von 2BC scheint am effizientesten zu sein, wenn 3C in Form von 3ABC vorliegt, so dass eine Membranassoziation für die Proteolyse eine entscheidende Rolle spielen könnte (Jecht et al., 1998). Nach poly(IC)-induzierter Aktivierung von IRF-3 führte eine Expression von HAV/7-2BC zu einer etwa 60 %igen Suppression der Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Paulmann et al., 2008).

Des Weiteren wurde als Negativkontrolle HAV/7-VP1 verwendet. VP1 sollte als Strukturprotein des Hepatitis A-Virus keinen Einfluss auf die IRF-3-Aktivierung haben, was nach poly(IC)-Induktion bereits gezeigt wurde (Paulmann et al., 2008) und in den hier vollzogenen Reporterexperimenten nach jeglicher Induktion bestätigt werden konnte (Abb. 7-11). Dadurch konnte von einem bestimmten Effekt auf die IRF-3-Aktivierung eines HAV/7-Proteins auf seine spezifische Funktion geschlossen werden und ist weder eine Eigenschaft von HAV/7-Proteinen allgemein, noch ein Überexpressions-Effekt von Proteinen generell.

Zunächst wurde die IRF-3-Aktivierung nach NDV-Induktion untersucht. Wie schon in früheren Experimenten dargestellt werden konnte (Fensterl et al., 2005), führte eine HAV/7-Infektion von FRhK-4-Zellen zu einer deutlichen Suppression der NDV-induzierten IRF-3-Aktivierung. Diese Inhibierung konnte ebenfalls durch eine alleinige Expression der HAV/7-Proteine 2B, 2C und 3ABC erreicht werden (Abb. 7 A), was für das 2B-Protein bereits gezeigt werden konnte (Paulmann et al., 2008). Dieser Effekt Der 2B- und 3ABC-vermittelte Effekt ist IRF-3-spezifisch, denn die Expression dieser beiden Proteine führte zu keinem Einfluss der konstitutiven pCMV-GLuc-Aktivität (Abb. 7 B). Dass auch immer eine Suppression der Basisaktivität des Reporters detektiert wurde, könnte damit erklärt werden, dass ein gewisses geringfügiges Level an IRF-3 auch ohne Induktion aktiviert würde. Führt nun die Expression von 2B bzw. 3ABC zu einer Suppression der IRF-3-Aktivierung, so wäre natürlich auch das Basislevel an aktiviertem IRF-3 negativ beeinflusst. Überexprimiertes HAV/7-2C supprimiert neben der IRF-3-Aktivierung hingegen auch die Aktivität der internen konstitutiven Reporterkontrolle (Abb. 7). Dieser Effekt konnte in allen Reporterexperimenten detektiert werden. Dieses Protein scheint demnach einen generellen Einfluss auf die Proteinexpression zu haben und es kann aus diesen Ergebnissen nicht auf einen möglichen Effekt auf die Aktivierung von IRF-3 geschlossen werden. Das Intermediat HAV/7-2BC zeigte im Gegensatz zu seinen Komponenten eine deutlich abgeschwächte Suppression der PRDIII-I-Luc-Aktivität bzw. keinen Effekt auf die generelle Proteinexpression. HAV/7-2B

und -2C scheinen demnach ihre Funktion bei der Beeinflussung der IRF-3-Aktivierung bzw. der Proteinexpression, erst als reife Proteine zu entfalten.

Um nun einen möglichen Angriffspunkt von HAV/7 bzw. seinen Proteinen im Signalweg zur IRF-3-Aktivierung einzugrenzen, wurden Komponenten des Signalweges überexprimiert. Eine alleinige Überexpression jeder der Komponenten resultierte bereits, ohne weitere Induktion, in einer deutlichen IRF-3-Aktivierung (Abb. 8-11). Warum dies der Fall war, bleibt unklar, bedeutet aber keinerlei Nachteil für die Interpretation der Ergebnisse. Weder die Expression von RIG-I und MAVS noch die der Kinasen TBK1 und IKK $\epsilon$  führte jedoch zu einer Beeinflussung der konstitutiven pCMV-GLuc-Aktivität (Abb. 8-11 B).

Eine Expression von HAV/7-3ABC zeigte nach RIG-Induktion eine deutliche Suppression der IRF-3-Aktivierung (Abb. 8). Dies lässt darauf schließen, dass das Protein demnach *downstream* des dsRNA-Rezeptors im IRF-3-Signalweg eingreift. Dahingegen konnte die MAVS-induzierte PRDIII-I-Luc-Aktivität durch eine 3ABC-Expression nur partiell inhibiert werden (Abb. 9; publiziert in Paulmann et al., 2008). Diese Konkurrenz zeigt eine direkte Beeinflussung der MAVS-Funktion durch 3ABC an und wird durch die Tatsache bestätigt, dass 3ABC in der Lage ist, MAVS zu degradieren (Yang et al., 2007). Läge der Angriffspunkt *upstream*, so bliebe die MAVS-vermittelte Induktion unbeeinflusst, während ein Ziel *downstream* zu einer vollständigen Suppression führen würde. Mittels Immunfluoreszenz konnte bereits in 3ABC-überexprimierenden FRhK-4-Zellen ein supprimierender Effekt auf die Anwesenheit von endogenem MAVS detektiert werden, was diese Ergebnisse weiterhin untermauert (Paulmann et al., 2008). Allerdings wäre ein weiteres *Target* von 3ABC *downstream* im Signalweg nicht auszuschließen. Vorgeschlagen hierfür wurde bereits die Kinase IKK $\epsilon$  (Paulmann et al., 2008).

Im Gegensatz zu 3ABC führte eine Expression von HAV/7-2B auf allen untersuchten Ebenen im Signalweg zur IRF-3-Aktivierung zu einer deutlichen Suppression der PRDIII-I-Luc-Aktivität (Abb. 7-11), während die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität immer unbeeinflusst blieb. Die Suppression der IRF-3-Aktivierung durch HAV/7-2B war nach RIG-I-Induktion nahezu vollständig, während die MAVS- und Kinasen-vermittelte Aktivierung von IRF-3 zwar deutlich, aber nicht komplett inhibiert wurde. 2B könnte demnach direkt an das Adapterprotein MAVS und an die Kinasen TBK1 und IKK $\epsilon$  im IRF-3-Signalweg angreifen, was durch die starke Konkurrenz von 2B und den jeweiligen Proteinen erklärt werden könnte. HAV/7-2B könnte aber auch einen IRF-3-spezifischen Effekt haben, ohne jedoch an einer bestimmten Komponente im Signalweg anzugreifen. Es wäre möglich, dass das Protein durch die Interaktion mit Membranen die Ausbildung der Komplexe von Komponenten des

IRF-3-Signalweges so stört, dass diese ihrer Funktion nicht mehr nachkommen können. Für MAVS konnte gezeigt werden, dass eine Membranassoziation für seine Funktion essentiell ist (Kumar et al., 2006; Sun et al., 2006). Passenderweise konnte, im Gegensatz zu 3ABC, kein Effekt in 2B-überexprimierenden FRhK-4-Zellen auf die Anwesenheit von endogenem MAVS in der Immunfluoreszenz detektiert werden (Paulmann et al., 2008), so dass 2B zwar die Funktion von MAVS beeinflusst, ohne jedoch direkt mit der antigenen Struktur des Adapterproteins zu interferieren. Eine Membran-Assoziation von HAV-2B und ein 2B-induziertes Membran-Rearrangement konnten bereits gezeigt werden. So scheint das periphere Membranprotein mit seinem C-Terminus an der luminalen Seite von Membranvesikeln zu lokalisieren (Jecht et al., 1998) und Membran-Veränderungen in Form eines tubulär-vesikulären Netzwerkes zu induzieren (Gosert et al., 2000). Man könnte demnach spekulieren, dass HAV-2B erst durch seine Membran-Assoziation den supprimierenden Effekt auf die IRF-3-Aktivierung ausübt. Dieses würden die Ergebnisse mit HAV-2BC bestätigen. Denn HAV-2BC führte, im Gegensatz zu seinen Komponenten, auf allen Ebenen des IRF-3-Signalweges zu einer deutlich abgeschwächten Suppression der IRF-3-Aktivierung (Abb. 7-11). Der für die Membran-Interaktion zuständige postulierte C-Terminus des 2B-Proteins ist im 2BC-Intermediat an das 2C-Protein gekoppelt und somit nicht mehr frei zugänglich. Unterstützt wird die Hypothese, dass HAV-2B seinen Effekt auf die IRF-3-Aktivierung über seine Assoziation mit Membranen ausübt, durch die Ergebnisse einer parallel stattfindenden Diplomarbeit (Domsgen, 2008). Hier wurde die Fähigkeit zur Suppression der IRF-3-Aktivierung zweier mit *Tag*-Epitopen fusionierten 2B-Proteinen untersucht. FLAG-2B trägt dabei N-terminal sein *Tag*, während 2B-myc C-terminal markiert ist. Während die Expression von FLAG-2B eine Suppression der Aktivierung von IRF-3, vergleichbar mit der von 2B-HAV/7, zeigte, führte sie von 2B-myc zu einer deutlich abgeschwächten Inhibierung der NDV-induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Hier kam es lediglich zu einer etwa 25 %igen Reduktion der PRDIII-I-Luc-Aktivität. Die C-terminale Markierung des 2B-myc könnte somit möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Ausbildung der am Carboxyterminus postulierten Transmembrandomäne des 2B-Proteins haben und dadurch die Suppression der IRF-3-Aktivierung reduzieren.

Vorraussetzung für die Hypothese, dass HAV-2B seine Funktion der Suppression der IRF-3-Aktivierung mit Hilfe von Membran-Interaktionen ausübt, ist der Nachweis einer Colokalisation des Proteins mit intrazellulären Membranen. Hierfür wurde mittels Immunfluoreszenz die Lokalisation von HAV/7-2B in FRhK-4-Zellen in Bezug auf

Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum (ER), als potentielle intrazelluläre Membranstrukturen, untersucht. Ebenfalls wurde die Lokalisation der beiden markierten 2B-Proteine, FLAG-2B und 2B-myc bezüglich der beiden Zellkompartimente überprüft. Die transfizierten Mengen und die Dauer des Experiments entsprachen zu Vergleichszwecken den experimentellen Bedingungen der Reportergenexperimente. Eine mögliche partielle Colokalisation von HAV/7-2B mit MAVS und eine potentielle Lokalisation von 2B an Mitochondrien wurde bereits vorgeschlagen (Paulmann et al., 2008). Ebenfalls konnte 2B schon im ER detektiert werden, während ein Nachweis im Golgi nicht stattfand. Allerdings wurde hier eine C-terminal markierte HAV-2B-Variante verwendet (de Jong et al., 2008). Der Nachweis des *ungetaggen* 2B-Proteins wurde durch den Einsatz eines polyklonalem  $\alpha$ -HAV-2B Serum erreicht. Hierfür erfolgte durch die Firma Genovac (Freiburg) die Immunisierung von Kaninchen mit zwei je 14 Aminosäuren langen Peptiden, die aufgrund ihrer potentiellen Antigenität ausgewählt wurden. Nachdem die Antikörper aus dem Blut der Tiere mittels ELISA ausgetestet wurden, konnten die Kaninchen ausgeblutet werden und das HAV-2B Antiserum stand für den Nachweis des HAV-2B-Proteins zur Verfügung.

Die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz zeigten deutlich, dass HAV/7-2B in FRhK-4-Zellen exprimiert wird (Abb. 12, 14 und 15). Die spezifische Fluoreszenz hob sich dabei deutlich vom unspezifischen Hintergrund ab. Zudem traten im Cytoplasma granuläre Strukturen auf, in denen vermehrt das Protein gebunden wurde und sich insbesondere um den Zellkern konzentrierte. Im Zellkern selbst hingegen war kein HAV/7-2B detektierbar. Die über Antikörper gegen ihre *Tags* vermittelte Detektion der 2B-Varianten FLAG-2B (Abb. 12, 14 und 15) und 2B-myc (Abb. 15) zeigte ein identisches Fluoreszenz-Muster. Der Nachweis des HAV/7-Strukturproteins VP1, der ebenfalls über ein Antiserum aus Kaninchen erreicht wurde, offenbarte hingegen eine ganz andere Erscheinung in der Immunfluoreszenz (Abb. 12). Hier waren keine granulären Strukturen erkennbar und das Protein war über das gesamte Cytoplasma, ohne besondere Konzentrierungen, verteilt.

Bei der Untersuchung einer möglichen Colokalisation der 2B-Proteine mit Mitochondrien und dem ER wurden die Mitochondrien über einen für Mitochondrien speziellen Farbstoff, dem MitoTracker Rot, detektiert. Dieser Farbstoff diffundiert durch die Plasmamembran und akkumuliert in aktiven Mitochondrien, wo er mit Thiol-Gruppen von Peptiden und Proteinen reagiert. Die Detektion des ER hingegen erfolgte über einen Antikörper gegen das Calreticulin. Calreticulin ist ein Protein im Lumen des ER, welches zusammen mit Calnexin als Chaperon während der Faltung von Glykoproteinen im ER fungiert. Ein gleichzeitiger Nachweis von HAV-2B bzw. FLAG-2B konnte mittels unterschiedlicher sekundärer

Antikörper und unter Einsatz des Kombinationsfilters realisiert werden (Abb. 14). Für beide Proteine zeigte sich eine deutliche Colokalisation mit dem Calreticulin. Die Fluoreszenz war hier überwiegend gelb und nur einige wenige Bereiche erschienen grün oder rot. Eine Betrachtung von HAV/7-2B bzw. den markierten 2B-Varianten zusammen mit den Mitochondrien gelang ebenfalls. Im Gegensatz zum ER, konnte jedoch nur eine geringfügige Colokalisation von den 2B-Proteinen mit den Mitochondrien detektiert werden (Abb. 15). Denn nach der Überlagerung im Kombinationsfilter sind zum großen Teil weiterhin die grüne Fluoreszenz des jeweiligen 2B-Proteins und die rote Fluoreszenz des MitoTrackers zu erkennen. Nur wenige Bereiche erschienen hier in einer gelben Fluoreszenz. Eine Betrachtung der Mitochondrien und des ER in der Überlagerung zeigte, dass ein geringer Anteil der Mitochondrien mit dem ER ebenfalls colokalisiert (Abb. 13 C). So wäre es möglich, dass hier keine partielle Colokalisation von 2B mit den Mitochondrien vorliegt, sondern durch die Überlagerung von ER und Mitochondrien zustande kommt. Eine Colokalisation von 2B mit den Mitochondrien ist aber nicht auszuschließen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass 2B mit Mitochondrien-assoziierten ER Membranen (MAM) colokalisiert. Diese physikalische Interaktion zwischen ER und Mitochondrien spielt eine zentrale Rolle im  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signaling*, im Lipidtransport und beim Energie-Metabolismus. Tatsächlich konnte mittlerweile das Chaperon Calreticulin in Fraktionierungsexperimenten an MAMs detektiert werden, wo es zusammen mit anderen Proteinen als  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein für den Transport von Calcium aus dem ER in die Mitochondrien verantwortlich ist (Hayashi et al., 2009). So würde der Antikörper gegen das Calreticulin nicht seine Funktion zur Detektion des ER erfüllen, sondern wahrscheinlich ER und MAMs nachweisen. Eine potentielle Lokalisation von 2B könnte auch die bereits gezeigte partielle Lokalisation des Proteins mit Mitochondrien erklären (Paulmann et al., 2008). Zur Abklärung, ob HAV-2B nun am ER, an MAMs oder an beiden Zellkompartimenten lokalisiert ist, sollten zukünftig Antikörper gegen Proteine eingesetzt werden, die ausschließlich in einem der beiden Membran-Kompartimenten lokalisiert sind. Eine andere und vielleicht bessere Methode in diesem Zusammenhang wäre die Fraktionierung der zellulären Proteine durch eine differentielle Zentrifugation. So wäre es möglich HAV-2B in derselben Fraktion wie Mitochondrien-, ER- oder MAM-spezifischen Proteinen nachzuweisen. Allerdings kann dies erst geschehen, wenn ein Nachweis von 2B im Westerblot gelingt, was bislang fehlgeschlagen ist. Dies war bisher nur mit den markierten 2B-Varianten FLAG-2B und 2B-myc möglich. Es zeigte sich, dass FLAG-2B in der Fraktion membrangebundener Proteine detektiert werden konnte, während 2B-myc hier nicht nachgewiesen wurde (Domsgen, 2008). So könnte das C-terminal fusionierte *Tag*-Epitop von

2B-myc einen negativen Effekt auf das Einlagern des 2B-Proteins in Membranen ausüben. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass HAV/7-2B mit intrazellulären Membranen zu interagieren scheint. So wäre es demnach auch möglich, dass diese Interaktion eine Voraussetzung für die Fähigkeit des Proteins, die IRF-3-Aktivierung zu supprimieren, ist. Durch ein mögliches Rearrangement dieser Membranen könnte somit die Ausbildung der Komplexe von Komponenten des IRF-3-Signalweges gestört sein, sodass keine Aktivierung des Transkriptionsfaktors mehr erfolgen kann. Allerdings konnte in 2B-transfizierten FRhK-4-Zellen kein optischer Unterschied der ER-Struktur im Gegensatz zu untransfizierten Zellen beobachtet werden. Auch die Expression der C-terminal markierten 2B-Variante, 2B-myc, welche eine deutlich abgeschwächte Suppression in Reporterexperimenten zeigte (Domsgen, 2008), führte zu keiner Differenz in der Immunfluoreszenz im Vergleich zur Expression des *ungetaggt* Proteins. Wahrscheinlich sind offensichtliche Merkmals-Unterschiede von intrazellulären Membran-Strukturen erst elektronenmikroskopisch nachweisbar.

Auch für das 2C-Protein des Hepatitis A-Virus wurde eine Interaktion mit Membranen und eine Induktion von Membran-Veränderungen postuliert. Dieses integrale Membranprotein interagiert mit seiner N-terminalen amphipathischen  $\alpha$ -Helix mit intrazellulären Membran-Strukturen (Jecht et al., 1998; Kusov et al., 1998) und induziert ein Membran-Rearrangement, welches sich in kristalloiden Strukturen offenbart (Teterina et al., 1997). Eine Überexpression von HAV/7-2C führte auf allen Ebenen zu einer nahezu vollständigen Suppression der Aktivierung von IRF-3 (Abb. 7-11 A), die jedoch durch einen generellen Einfluss auf die Proteinexpression zu erklären ist. Denn durch die Expression des Proteins kam es auch immer zu einer fast kompletten Inhibition der pCMV-GLuc-Aktivität (Abb. 7-11 B). Wie für HAV-2B wäre auch für HAV-2C denkbar, dass dieses Protein seine Funktion bezüglich des Einflusses der Proteinexpression über seine Assoziation mit Membranen ausübt. Passenderweise hängt 2C im Intermediat 2BC über seinen, als Membran-Assoziations-Domäne postulierten, N-Terminus an dem 2B-Protein, wodurch dieser nicht mehr frei zugänglich ist. Eine Expression von 2BC beeinflusste in keinem der Experimente die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität und hatte demnach keinen Einfluss auf die generelle Proteinexpression. Ein Nachweis von HAV-2C bezüglich intrazellulärer Membranstrukturen konnte, im Gegensatz zu HAV-2B, noch nicht erfolgen. Zum jetzigen Zeitpunkt standen weder Antikörper gegen das 2C-Protein zur Verfügung, noch gab es mit *Tag*-Epitopen markierte 2C-Varianten.

Es zeigte sich, dass sowohl die Expression von HAV/7-2B als auch die von HAV/7-3ABC zu einer Suppression der IRF-3-Aktivierung führten, während die von HAV/7-2C in einer Inhibition der genrellen Proteinexpression resultierte. Es stellte sich nun die Frage, ob sich diese Effekte auch in einer HAV/7-Infektion widerspiegeln oder ob es sich lediglich um Überexpressions-Effekte handelt. Eine HAV/7-Infektion führte nach einer RIG-I-Überexpression zu einer fast vollständigen Suppression der Aktivierung von IRF-3 (Abb. 8). Das Virus greift demnach *downstream* des dsRNA-Rezeptors in den IRF-3-Signalweg ein, was bereits bereits gezeigt wurde (Fensterl et al., 2005). Dahingegen vermochte eine Infektion mit HAV/7 die MAVS-induzierte IRF-3-Aktivierung nur partiell zu supprimieren (Abb. 9), was die Ergebnisse von Paulmann et al. (2008) bestätigt. Diese Konkurrenz lässt auf eine direkte Beeinflussung der MAVS-Funktion durch HAV/7 schließen. Einen ähnlichen Effekt zeigte HAV/7 nach einer IKK $\epsilon$ -Überexpression (Abb. 11 A). Auch hier kam es durch die Virusinfektion nur zu einer partiellen Suppression der IRF-3-Aktivierung. IKK $\epsilon$  scheint demnach ein weiteres *Target* von HAV/7 im Signalweg zur IRF-3-Aktivierung zu sein. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den bisherigen Vermutungen, dass eine HAV/7-Infektion keinen Einfluss auf die IKK $\epsilon$ -induzierte IRF-3-Aktivierung hat (Fensterl et al., 2005). Warum die Ergebnisse kontrovers sind, bleibt unklar. Dahingegen konnte kein Effekt des Virus auf die TBK1-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors beobachtet werden (Abb. 10 A), was mit den Ergebnissen von Fensterl et al. (2005) übereinstimmt. Die Ergebnisse lassen spekulieren, dass sowohl 2B als auch 3ABC wahrscheinlich zu der Eigenschaft von HAV beitragen, die IRF-3-Aktivierung zu supprimieren. Während einer Virusinfektion entstehen jedoch nie die Mengen an Protein, die während einer Überexpression mittels transfizierten Plasmiden in der Zelle vorliegen, weshalb die Interpretation der Ergebnisse mit Vorsicht zu behandeln ist. Die Expression von 3ABC führte zu einer partiellen Suppression der MAVS-induzierten IRF-3-Aktivierung (Abb. 9 A; publiziert in Paulmann et al., 2008). Dieser Effekt war durch eine HAV/7-Infektion gleich stark ausgeprägt, obwohl hier geringere Mengen an 3ABC in der Zelle vorliegen müssten. Aber auch die Expression des 2B-Proteins zeigte eine deutliche Inhibition der PRDIII-I-Luc-Aktivität (Abb. 9 A), was bereits gezeigt werden konnte (Paulmann et al., 2008). So könnten eventuell beide Proteine zu der HAV/7-vermittelten Suppression der MAVS-induzierten IRF-3-Aktivierung beitragen. Ebenfalls erklärbar wäre die partielle Inhibition der IKK $\epsilon$ -induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch HAV/7. Auch hier führte eine Expression von HAV-2B zu einer deutlichen Suppression (Abb. 11 A; publiziert in Paulmann et al., 2008), während für 3ABC ebenfalls ein möglicher Effekt auf die Kinase diskutiert wurde (Paulmann et al., 2008).

Dahingegen scheint der Effekt, den 2B nach seiner Überexpression auf die TBK1-induzierte IRF-3-Aktivierung zeigte, bei einer Virusinfektion nicht auszureichen, denn hier blieb die PRDIII-I-Luc-Aktivität bei einer HAV/7-Infektion unbeeinflusst (Abb. 10 A). Für 3ABC konnte ebenfalls kein Effekt auf die TBK1-induzierte Aktivierung von IRF-3 detektiert werden (Paulmann et al., 2008). Ein mögliches Zusammenwirken der beiden HAV/7-Proteine 2B und 3ABC bei der HAV/7-vermittelten Suppression der IRF-3-Aktivierung könnte folgendermaßen interpretiert werden: Durch einen generellen Einfluss von HAV-2B auf intrazelluläre Membranstrukturen könnte möglicherweise MAVS für die Degradation durch 3ABC zugänglicher werden, was auf eine potentielle Kooperation der beiden Proteine schließen lässt. Tatsächlich zeigte eine Coexpression beider Proteine den stärksten supprimierenden Effekt auf die MAVS-induzierte Aktivierung von IRF-3 (Daten nicht gezeigt; publiziert in Paulmann et al., 2008). Gleiches galt für die Untersuchung der IKKε-induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors, wobei hier der Coexpressions-Effekt weniger stark ausfiel. Für das Virus wäre es nur von Vorteil mehrere Mechanismen entwickelt zu haben, um in den Signalweg zur Aktivierung von IRF-3 einzugreifen. So hat beispielsweise auch das Hepatitis C-Virus zwei verschiedene Möglichkeiten entwickelt, der IFN-β-Induktion entgegen zu wirken. Das NS3/4A-Protein von HCV ist in der Lage, ebenso wie HAV-3ABC, MAVS zu spalten (Li et al., 2005; Meylan et al., 2005). Das Protein NS4B greift ebenfalls in den RIG-I-vermittelten Signalweg zur Aktivierung von IRF-3 ein, wobei das *Target* in der Signalkaskade noch nicht klar definiert werden konnte. HCV-NS4B weist eine ähnliche Größe wie HAV-2B auf und konnte analog zu HAV-2B an ER-Membranen lokalisiert werden, wo es den Aufbau dieser Membranen ebenfalls zu verändern vermag (Tasaka et al., 2007)

Es bleibt die Frage, welche Rolle das Protein 2C für HAV spielt. Die Expression von HAV/7-2C resultierte immer in einer fast vollständigen Suppression der Proteinexpression. Auch bei einer HAV/7-Infektion konnte ein leichter Effekt des Virus auf die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität beobachtet werden (Abb. 7-11 B). Dieser Effekt des Virus scheint demnach 2C-vermittelt zu sein, da keines der anderen HAV/7-Proteine diese Eigenschaft aufwies. Dass der Effekt durch die Überexpression von 2C eindeutig stärker ausfiel, ist wieder damit zu erklären, dass während einer Virusinfektion die Mengen an generiertem Protein deutlich geringer ausfallen. Eine Suppression der Proteinexpression scheint auf den ersten Blick keine Vorteile für ein Virus mit sich zu bringen. Denn Viren sind als obligat intrazelluläre Parasiten bei ihrem Infektionszyklus auf zelluläre Komponenten angewiesen. Doch würde dieser Effekt die Ausbildung einer persistenten Infektion von HAV/7 in Zellkultur und seinen langsamen

Replikationszyklus erklären. Hierbei scheint das Einstellen eines Gleichgewichts für HAV essentiell zu sein. Würde das Virus schneller replizieren, würde mehr 2C-Protein generiert werden und dadurch eventuell komplett die Proteinexpression gehemmt sein. Es zeigte sich bereits, dass eine Inkubation von HAV/7-infizierten FRhK-4-Zellen mit einer Proteinsynthese-hemmenden Substanz zur Apoptose der Zellen führte (Brack et al., 1998). In diesem Kontext schien HAV/7 seinen antiapoptotischen Funktionen nicht mehr nachkommen zu können. So wäre es auch denkbar, dass durch eine schnellere Replikation des Virus eine 2C-vermittelte Apoptose auftreten könnte, die durch HAV nicht mehr ausgeglichen werden könnte und somit das Überleben des Virus nicht gesichert wäre. Eine Drosselung der zellulären Proteinsynthese hätte auch den Vorteil, dass mehr Rohstoffe der Zelle für die virale Proteinsynthese zur Verfügung stünden.

Bei allen bisherigen Versuchen bezüglich des Einflusses von HAV-2B und -2C auf die Aktivierung von IRF-3 bzw. die generelle Proteinexpression wurden jeweils die Proteine einer Zellkultur-adaptierten Variante von HAV HM-175, HAV/7, verwendet. Es wurde postuliert, dass die Adaption von HAV an Zellkultur unter anderem mit Mutationen innerhalb der Genabschnitte, welche für das 2B- und 2C-Protein codieren, einhergeht (Emerson et al., 1992; 1993). Diese Mutationen befinden sich, bezüglich des HAV-Wildtyps HM-175, an Position 3889, was zu einer Aminosäure-Substitution von Alanin zu Valin führt, an Position 3919, wodurch Glycin durch Alanin ersetzt wird, an Position 4087, was einen Aminosäure-Austausch von Lysin zu Methionin zur Folge hat, und an Position 4222, wodurch die Aminosäure Phenylalanin durch Serin substituiert wird (Cohen et al., 1987b). Könnten nun womöglich die supprimierenden Effekte von 2B auf die Aktivierung von IRF-3 und von 2C auf die generelle Proteinexpression Zellkultur-Effekte sein? Erlangen die Proteine erst durch diese Mutationen ihre spezifische Fähigkeit, wodurch eine persistente Infektion durch HAV in Zellkultur unterstützt werden könnte? Oder besitzen auch entsprechende Proteine aus HAV-Wildtypen die Eigenschaften zur Interferenz mit IFN bzw. mit der Proteinexpression? Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurde die RNA aus unterschiedlichen HAV-WT-Isolaten extrahiert und anschließend die cDNA der 2B- bzw. 2C-Proteine mittels RT-PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pI.18 inkloniert. Es erfolgte die Überprüfung der Sequenz der Protein-codierenden Regionen und die Untersuchung der Effekte der Proteine auf die IRF-3-Aktivierung bzw. auf die generelle Proteinexpression.

Zunächst erfolgt die Analyse der Ergebnisse mit HAV-2B. Hierfür wurden die Sequenzen der für die unterschiedlichen 2B-Proteine codierenden Regionen untereinander und mit der des

HAV-Wildtyps HM-175 verglichen und die Effekte der verschiedenen 2B-Proteine auf die NDV-induzierte IRF-3-Aktivierung mittels Reporterexperimenten untersucht. In Bezug zu der cDNA-Sequenz des 2B-Proteins von HAV-WT HM-175 wiesen die Sequenzen der verschiedenen 2B-Proteine unterschiedlich viele Basensubstitutionen auf (Tab. 2). Dabei waren die Anzahl und die Positionen der ausgetauschten Basen innerhalb eines HAV-WT-Isolats, jedoch aus separaten RT-PCRs, ebenfalls verschieden. Es handelt sich demnach bei den Viren innerhalb einer Stuhlprobe um Mischpopulationen (Quasispezies). Das Hepatitis A-Virus ist ein Virus mit einem RNA-Genom und dadurch bei seiner Replikation auf die Verwendung einer viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase angewiesen. Dieser Polymerase fehlt, im Gegensatz zu zellulären DNA-Polymerasen, die Fähigkeit der *Proofreading*-Aktivität, wodurch eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit von einer falsch eingebauten Base pro  $10^3$  bis  $10^4$  Nukleotide zustande kommt. Für HAV mit einem Genom von ca. 7,5 kb entspricht das in etwa einem Fehler pro Replikationszyklus. Viren mit vorteilhaften Mutationen können sich bei einer Infektion besser durchsetzen und bilden den Hauptanteil dieser Mischpopulation.

Die zur Zellkultur-Adaption beitragenden postulierten Mutationen an Position 3889 und an Position 3919, treten bereits in der Sequenz von fünf aus neun 2B-Wildtyp-Isolaten auf. Da diese HAV-Wildtypen noch keinerlei Kontakt zu Zellkultur-Systemen hatten, bedeuten dies, dass die erwähnten Mutationen, anders als von Emerson et al. (1992) postuliert, nicht während der mutationellen Anpassung von HAV an Zellkultur entstehen und daher nicht als Markermutationen für die Zellkultur-Adaption von HAV dienen können. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass die cDNA des 2B-Proteins aus der zweiten Zellkultur-adaptierten HAV-Variante, HAV-GP, lediglich die Mutation an Position 3919 trägt, während die 3889-Mutation in der Sequenz nicht auftritt. Somit kann die Mutation an Position 3889 nicht alleine zur Zellkultur-Adaption beitragen. Auszuschließen ist aber nicht, dass diese Genomvariante aus der Quasispezies-Population selektiert wird, da sie möglicherweise Vorteile für das Wachstum des Virus in Zellkultur bieten könnte. Die NDV-induzierte Aktivierung von IRF-3 wurde durch die Expression der meisten 2B-Proteine ähnlich stark supprimiert (Abb. 16). Somit kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass die Fähigkeit von HAV-2B, die IRF-3-Aktivierung zu inhibieren, nicht Zellkultur-bedingt ist. Auch die 2B-Proteine aus unterschiedlichen HAV-Wildtyp-Isolaten besitzen diese Eigenschaften, supprimieren sogar zum Teil noch stärker die IRF-3-Aktivierung im Vergleich zu 2B-HAV/7. Einen stark abgeschwächten Effekt bei der Suppression der NDV-induzierten IRF-3-Aktivierung konnte lediglich durch die Expression von 2B-Stop, welches ebenfalls aus

einem HAV-Wildtyp-Isolat generiert wurde, detektiert werden (Abb. 17). Dieser 2B-Stop-spezifische Effekt konnte auf allen untersuchten Ebenen im IRF-3-Signalweg bestätigt werden (Abb. 18). Die Sequenz der 2B-Stop-codierenden Region offenbarte an Nukleotid-Position 3794 eine Basensubstitution, die zu einem Stoppcodon führte (Tab. 2). Bei 2B-Stop handelt es sich demnach um ein C-terminal um 67 Aminosäuren verkürztes Protein. Da das 2B-Protein an seinem C-Terminus eine potentielle Transmembrandomäne trägt, wäre es denkbar, dass 2B-Stop, die Fähigkeit mit Membranen zu interagieren, nicht mehr besitzt. Dies würde die bereits postulierte Hypothese unterstützen, dass die Membran-Interaktion des 2B-Proteins eine mögliche Voraussetzung für die 2B-vermittelte Reduktion der Aktivierung von IRF-3 ist. Auch die Expression von 2B-WT B1 führte zu einem leicht abgeschwächten Effekt in Bezug auf die Suppression der IRF-3-Aktivierung (Abb. 16). Im Vergleich zur Sequenz der codierenden Region der anderen 2B-Proteine, befinden sich in der Sequenz von 2B-WT B1 drei Mutationen (an Position 3622, 3850 und 3957), die zu einem Aminosäure-Austausch im Protein führen (Tab. 2). Die letzten beiden Aminosäuren befinden sich im C-terminalen Drittel des Proteins. So könnte man nun spekulieren, dass durch die Mutationen in der 2B-WT B1-codierenden Region die Interaktion des Proteins mit Membranen erschwert und dadurch die Suppression der Aktivierung von IRF-3 reduziert wird. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Membran-Interaktion von HAV-2B und der Suppression der IRF-3-Aktivierung durch die Expression des Proteins zu stützen, könnten zukünftig spezifische Punktmutationen in die 2B-codierende Region eingeführt werden, so dass die Ausbildung einer Transmembrandomäne deutlich gestört wird. Führt dann die Expression dieser mutierten 2B-Proteine im Reporterexperiment zu einer deutlich abgeschwächten Aktivierung von IRF-3, so würde diese Hypothese unterstützt werden. Interessant wäre auch zu sehen, wie sich die beiden 2B-Varianten bezüglich der Colokalisation intrazellulärer Membranstrukturen in der Immunfluoreszenz verhalten. Bestenfalls wäre eine Detektion von 2B-Stop mit dem ER hier nicht möglich.

Auch Mutationen in der 2C-codierenden Region wurden, als zur Zellkultur-Adaption von HAV beitragend, postuliert. Die Expression des 2C-Proteins von HAV/7 führte in allen Reporterexperimenten zu einer starken Reduktion der konstitutiven pCMV-GLuc-Aktivität und demnach zu einer Suppression der Proteinexpression (Abb. 7 B). Könnten somit diese Mutationen in der Zellkultur-adaptierten Variante HAV/7 zu der Eigenschaft des 2C-Proteins führen, die Proteinexpression generell zu supprimieren? Oder besitzen auch die 2C-Proteine aus HAV-Wildtyp-Isolaten diese Eigenschaft? Sind möglicherweise die postulierten

Mutationen, analog zu 2B, auch schon in der codierenden Sequenz der 2C-Protein aus HAV-Wildtypen vorhanden? Um diesen Fragen nachzugehen, wurde die Sequenz der codierenden Region von 2C-HAV/7, 2C-GP und 2C-Proteinen aus HAV-Wildtyp-Isolaten miteinander und mit der von HAV HM-175 verglichen und der Effekt dieser Proteine auf die konstitutive Aktivität des internen Reporters mittels Reporterexperimenten untersucht.

Wie auch schon für HAV-2B gezeigt, offenbarten die Sequenzen aus der gleichen Stuhlprobe, jedoch aus separaten RT-PCR-Reaktionen, unterschiedlich viele Basensubstitutionen, die zu verschiedenen Aminosäure-Austauschen führen (Tab. 3). Die Mutation an Position 4222, die nach Emerson et al. (1992) während der Adaption von HAV an Zellkultur entstehen soll, tritt nicht nur in den beiden Zellkultur-adaptierten 2C-Varianten 2C-HAV/7 und 2C-GP auf, sondern ist ebenfalls in der Sequenz des 2C-WT D1 vorhanden. Dies würde bedeuten, analog zu den Ergebnissen mit HAV-2B, dass diese Mutation nicht während der Zellkultur-Adaption entsteht. Auszuschließen ist jedoch nicht, dass diese Genomvariante dem Virus einen Vorteil für die effizientere Replikation in Zellkultur verschafft, was zur Selektion dieser aus der Quasispezies-Population führen würde. Die zweite zur HAV-Anpassung an Zellkultur beitragende Mutation an Position 4087 ist ausschließlich in der Sequenz des 2C-HAV/7 zu finden. Würde diese Mutation generell während der Adaption von HAV an Zellkultur entstehen, müsste sie jedoch auch in der codierenden Sequenz des 2C-Proteins aus der Zellkultur-adaptierten HAV-Variante, HAV-GP, zu finden sein. Also kann auch diese Mutation, anders als von Emerson et al. (1992) postuliert, nicht als Markermutation für die mutationelle Anpassung von HAV an Zellkultur dienen.

Drei der vier 2C-Wildtyp-Proteine vermochten die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität nicht zu supprimieren, sondern zeigten sogar einen aktivierenden Effekt auf die Proteinexpression (Abb. 19). Lediglich 2C-WT D1 inhibierte deutlich und ähnlich stark wie 2C-HAV/7 die konstitutive Reporteraktivität. Durch die zweite Zellkultur-adaptierte Variante, 2C-GP, kam es ebenfalls zu einer Reduktion der Reporteraktivität, jedoch in deutlich abgeschwächter Form. Da zusätzlich zu 2C aus der ZK-adaptierten HAV-Variante HAV/7, auch das 2C-Protein aus einem Wildtyp-Isolat zu einer Suppression der Proteinexpression führte, kann davon ausgegangen werden, dass die bisherigen detektierten Effekte von 2C-HAV/7 auf die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität nicht Zellkultur-bedingt sind. Vergleicht man nun die Sequenzen der 2C-Proteine WT B1, C1 und C2, die einen aktivierenden Effekt auf die Proteinexpression zeigten, mit denen der 2C-Proteine aus HAV/7, HAV-GP und HAV-WT D1, welche die Proteinexpression supprimierten, fallen zwei deutliche Unterschiede auf. Zum einen befindet sich eine Mutation an der Nukleotid-Position 4125 nur in den Sequenzen von

2C-WT B1, -C1 und -C2. Zum anderen beinhalten die Sequenzen von 2C-HAV/7, -GP und -WT D1 die erwähnte Mutation an Position 4222, welche die anderen nicht aufweisen. Diese Unterschiede in der Aminosäuresequenz könnten die verschiedenen Effekte der 2C-Proteine vielleicht erklären. Ob nun das Vorhandensein einer Mutation oder das Fehlen einer anderen Mutation oder eventuell auch beides zu den unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen 2C-Proteine beitragen könnte, bleibt unklar. Eine Einführung von Punktmutationen in die entsprechenden codierenden Sequenzen der 2C-Proteine und eine anschließende Aktivitätsüberprüfung im Reporterexperiment, würde darüber Aufschluss geben. Beide Aminosäure-Substitutionen finden im N-terminalen Drittel des 2C-Proteins statt. Da der Aminoterminus von HAV-2C die postulierte Transmembrandomäne trägt, wäre es denkbar, dass diese Mutationen die Ausbildung solcher Transmembrandomänen erleichtern oder erschweren könnten. So könnte der Effekt der unterschiedlichen 2C-Proteine auf die Proteinexpression an eine Interaktion des Proteins mit intrazellulären Membranstrukturen gekoppelt sein.

Eine Suppression der generellen Proteinexpression könnte soweit führen, dass es für die Zellen cytotoxisch sein könnte. Wirkt demnach die Expression der verschiedenen 2C-Proteine sich unterschiedlich stark toxisch auf die Zellen aus? Kusov et al. (1998) konnten bereits zeigen, dass das 2C-Protein des Hepatitis A-Virus in Bakterienzellen cytotoxisch wirkt. Ein MTT-Test sollte Aufschluss darüber geben, ob die unterschiedlichen 2C-Proteine auch in FRhK-4-Zellen cytotoxisch wirken und ob hier ein Zusammenhang zum Einfluss auf die generelle Proteinexpression besteht (Abb. 20). Tatsächlich zeigte die Expression der 2C-Proteine WT-B1, WT-C1 und WT-C2 einen nur geringfügigen Vitalitätsverlust der Zellen, während der cytotoxische Effekt durch die Expression der 2C-Proteine aus den Zellkultur-adaptierten HAV-Varianten HAV/7 und GP und dem HAV-Wildtyp D1 stärker ausfiel. Diese Ergebnisse korrelierten somit mit dem Einfluss der jeweiligen Proteine auf die konstitutive pCMV-GLuc-Aktivität. Zwar waren die Effekte hier nicht so stark ausgeprägt, was aber dadurch erklärt werden könnte, dass im MTT-Test der Bezug auf alle Zellen genommen wird, während im Reporterexperiment lediglich transfizierte Zellen betrachtet werden. Interessant wäre in diesem Kontext die Betrachtung des 2C-Proteins aus der cytopathogenen HAV-Variante, HAV<sub>cytHB1.1</sub>. Dieses cytopathogene Virus repliziert in Zellkultur deutlich schneller und führt zudem zur Apoptose der Zellen (Brack et al., 1998). Da auch eine HAV/7-Infektion einen geringen negativen Effekt auf die generelle Proteinexpression zeigte (Abb. 7-11 B), wäre in diesem Kontext auch ein geringer cytotoxischer Effekt auf die Zellen denkbar. Dies sollte in Zukunft noch überprüft werden.

Zusammenfassend ist es also denkbar, dass das 2C-Protein des Hepatitis A-Virus mittels seiner Membran-Assoziation möglicherweise ein Rearrangement intrazellulärer Membranstrukturen induziert. Dadurch könnte es zu einer Suppression der allgemeinen Proteinexpression kommen. Möglich wäre in diesem Kontext ein negativer Einfluss des 2C-Proteins auf Transportvorgänge in der Zelle, die auch die Transkription beeinflussen könnten, auf die Modifikation von Proteinen oder aber ein direkter inhibierender Effekt auf die Translation. All diese Prozesse finden an Membranen statt, so dass eine Interaktion von HAV-2C mit intrazellulären Membranstrukturen diese Vorgänge negativ beeinflussen könnte. Der negative Einfluss des 2C-Proteins auf die Expression zellulärer Proteine wirkte sich cytotoxisch auf die Zellen aus. Mutationen in der N-terminalen Transmembrandomäne von HAV-2C könnten möglicherweise die Interaktion des Proteins mit Membranen erschweren, wodurch die Proteinexpression nicht mehr beeinflusst wird und somit kein Vitalitätsverlust der Zellen detektiert wird.

## 5 Zusammenfassung

Das Hepatitis A-Virus ist in der Lage, die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 zu hemmen und dadurch die IFN- $\beta$ -Induktion zu supprimieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche HAV-Proteine dem Virus diese Fähigkeit verleihen und wo und auf welche Weise diese in den Signalweg zur Aktivierung von IRF-3 eingreifen.

Mittels Reporterexperimenten konnte gezeigt werden, dass HAV innerhalb des intrazellulären RIG-I-vermittelten Signalweges der IRF-3-Aktivierung an dem Adapter-Protein MAVS und der Kinase IKK $\epsilon$  angreift. Hierbei scheinen die HAV-Proteine 2B, 2C und 3ABC zu dieser Eigenschaft des Virus beizutragen.

Für 3ABC konnte ein direkter Angriff an MAVS bestätigt werden. Schon vorher war bekannt, dass das Protein, vermittelt über seine 3C-Proteaseaktivität, MAVS zu spalten vermag.

2B greift im Signalweg zur IRF-3-Aktivierung wahrscheinlich nicht direkt an einer der Komponenten an. Vielmehr scheint es durch seine Membran-Interaktion und ein potentielles induziertes Membran-Rearrangement seiner Funktion nachzukommen. Per Immunfluoreszenz konnte eine Lokalisation von HAV-2B mit ER- bzw. MAM-Membranen offenbart werden. Für seine Membran-Integration scheint der Carboxyterminus des 2B-Proteins essentiell zu sein. Eine C-terminal verkürzte 2B-Variante zeigte keinerlei supprimierende Effekte auf die Aktivierung von IRF-3, sodass dies ein Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Membran-Interaktion und Aktivität des Proteins bezüglich der Inhibierung der IRF-3-Aktivierung bestätigt. Dabei scheinen auch schon bestimmte Mutationen innerhalb des Carboxyterminus zu einem abgeschwächten Aktivitätsverlust des Proteins bezüglich der Suppression der IRF-3-Aktivierung zu führen.

Für das 2C-Protein des Hepatitis A-Virus konnte im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden, dass es dem Virus die Fähigkeit verleiht, partiell die Proteinexpression zu supprimieren. Dies könnte den langsamen Replikations-Charakter und die Ausbildung einer Persistenz von HAV in Zellkultur erklären. Zudem führte die 2C-induzierte Inhibition der Proteinexpression zu einem Vitalitätsverlust der Zellen. Auch HAV-2C scheint seine Aktivität mittels einer Interaktion mit Membranen zu entfalten. Dabei führten bestimmte Mutationen in der N-terminalen Transmembranregion des Proteins zu einem abgeschwächten Effekt bezüglich der Suppression der Proteinexpression.

Der zweite Teil dieser Arbeit sollte Aufschluss darüber geben, ob die Suppression der IRF-3-Aktivierung durch das 2B-Protein bzw. die der Proteinexpression des 2C-Proteins, Zellkultureffekte oder prinzipielle Funktionen der Proteine sind. Zur Klärung dieser

Fragestellung wurden Reporterexperimente mit den jeweiligen Proteinen aus HAV-Wildtyp-Isolaten im Vergleich zu der Zellkultur-adaptierten HAV-Variante HAV/7 durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Suppression der IRF-3-Aktivierung durch das 2B-Protein bzw. die Inhibierung der Proteinexpression durch das 2C-Protein nicht an der Adaption des Virus an Zellkultur gekoppelt ist. Des Weiteren offenbarten Sequenzanalysen, dass die postulierten Mutationen in der 2B- und 2C-codierenden Region, die während der Adaption von HAV an Zellkultur entstehen sollen, schon in Wildtypsequenzen vorhanden sind. Erstmals konnte dadurch belegt werden, dass diese Mutationen nicht erst während der Anpassung von HAV an Zellkultur entstehen und daher nicht als Markermutationen für die HAV-Zellkulturadaption dienen können.

So scheint die gezeigte Suppression der IRF-3-Aktivierung durch eine HAV-Infektion vermutlich auch *in vivo* möglich. Da das interferonsensitive Hepatitis A-Virus nur sehr langsam repliziert, wäre die Unterwanderung des unspezifischen Immunsystems ein wirksames Mittel zur Sicherung der eigenen Replikation.

## 6 Literatur

- Agalioti T., Lomvardas S., Parekh B., Yie J., Maniatis T., Thanos D.** (2000). Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN- $\beta$  Promoter. *Cell* **103**: 667-678.
- Alexopoulou L., Holt A.C., Medzhitov R., Flavell R.A.** (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**: 732-738.
- Alkalay I., Yaron A., Hatzubai A., Orian A., Ciechanover A., Ben-Neriah Y.** (1995). Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Sci USA* **92**(23): 10599-10603.
- Andrejeva J., Childs K.S., Young D.F., Carlos T.S., Stock N., Goodbourn S., Randall R.E.** (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN- $\beta$  promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 17264-17269.
- Ashida M. & Hamada C.** (1997). Molecular cloning of Hepatitis A virus receptor from a simian cell line. *J Gen Virol* **78**: 1565-1569.
- Astrosini C.** (2001). Einfluss des Hepatitis A-Virus auf die transaktivierenden Eigenschaften verschiedener Komponenten des Interferon- $\beta$ -Enhanceosomes. Diplomarbeit im Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen.
- Au W.C., Moore P.A., Lowther W., Juang Y.T., Pitha P.M.** (1995). Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(25): 11657-11661.
- Au W.-C., Yeow W.-S., Pitha P.M.** (2001). Analysis of functional domains of Interferon regulatory factor-7 and its association with IRF-3. *Virology* **280**: 273-282.
- Basler C.F. & García-Sastre A.** (2002). Viruses and the type I Interferon antiviral system: induction and evasion. *Intern Rev Immunol* **21**: 305-337.
- Beneduce F., Ciervo A., Kusov Y.Y., Gauss-Müller V., Morace G.** (1999). Mapping of protein domains of Hepatitis A virus 3AB essential for interaction with 3CD and viral RNA. *Virology* **264**: 410-421.
- Blank C.A., Anderson D.A., Beard M., Lemon S.M.** (2000). Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. *J Virol* **74**: 6476-6484.
- Brack K., Frings W., Dotzauer A., Vallbracht A.** (1998). A cytopathogenic, apoptosis-inducing variant of hepatitis A virus. *J Virol* **72**(4): 3370-3376.
- Brack K., Berk I., Magulski T., Lederer J., Dotzauer A., Vallbracht A.** (2002). Hepatitis A virus inhibits cellular antiviral defense mechanisms induced by double-stranded RNA. *J Virol* **76**(23): 11920-11930.
- Brandt S.** (2002). Die Auswirkungen einer Hepatitis A-Virusinfektion auf die regulatorische Domäne PRDIV des humanen Interferon- $\beta$  Enhanceosomes. Diplomarbeit im Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen.

- Brinhaus, R.** (2009). Optimierung der Transfektionseffizienz von Polyethylenimin (PEI) für FRhK-4-Zellen, HepG2-Zellen und U937-Zellen. Bachelorarbeit im Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen.
- Chang K.H., Brown E.A., Lemon S.M.** (1993). Cell-type specific proteins which interact with the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA. *J Virol* **67**: 6716-6725.
- Chariot A., Leonardi A., Müller J., Bonif M., Brown K., Siebenlist U.** (2002). Association of the adaptor TANK with the I $\kappa$ B kinase (IKK) regulator NEMO connects IKK complexes with IKK $\epsilon$  and TBK1 kinases. *J Biol Chem* **277**(40): 37029-37036.
- Chen Z.J.** (2005). Ubiquitin signalling in the NF- $\kappa$ B pathway. *Nat Cell Biol* **7**(8): 758-765.
- Cheng G. & Baltimore D.** (1996). TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD40L-mediated NF $\kappa$ B activation. *Genes Dev* **10**(8): 963-973.
- Choe J., Kelker M.S., Wilson I.A.** (2005). Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* **309**: 581-585.
- Cohen J.I., Ticehurst J.R., Purcell R.H., Buckler-White A., Baroudy B.M.** (1987a). Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *J Virol* **61**(1): 50-59.
- Cohen J.I., Rosenblum B., Ticehurst J.R., Daemer R.J., Feinstone S.M., Purcell R.H.** (1987b). Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 2497-2501.
- Cohen J.I., Rosenblum B., Feinstone S.M., Ticehurst J., Purcell R.H.** (1989). Attenuation and cell culture adaptation of hepatitis A virus (HAV): a genetic analysis with HAV cDNA. *J Virol* **63**(12): 5364-5370.
- Cohen L., Henzel W.J., Baeuerle P.A.** (1998). IKAP is a scaffold protein of the I $\kappa$ B kinase complex. *Nature* **395**: 292-296.
- Cohen L., Bénichou D., Martin A.** (2002). Analysis of deletion mutants indicates that the 2A polypeptide of hepatitis A virus participates in virion morphogenesis. *J Virol* **76**(15): 7495-7505.
- Costa-Mattioli M., Cristina J., Romero H., Perez-Bercof R., Casane D., Colina R., Garcia L., Vega I., Glikman G., Romanowsky V., Castello A., Nicand E., Gassin M., Billaudel S., Ferré V.** (2002). Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J Virol* **76**(18): 9516-9525.
- Cromeans T., Sobsey M.D., Fields H.A.** (1987). Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. *J Med Virol* **22**: 45-56.
- Cui X.-F., Imaizumi T., Yoshida H., Borden E.C., Satho K.** (2004). Retinoic acid-inducible gene-I is induced by interferon- $\gamma$  and regulates the expression of interferon- $\gamma$  stimulated gene 15 in MCF-7 cells. *Biochem Cell Biol* **82**: 401-405.
- Cuthbert J.A.** (2001). Hepatitis A: Old and new. *Clin Microbiol Rev* **14**(1): 38-58.
- Daemer J.R., Feinstone S.M., Gust I.D., Purcell R.H.** (1981). Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect Immun* **32**(1): 388-393.

- Darnell J.E. Jr., Kerr I.M., Stark G.R.** (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**(5164): 1415-1421.
- Day S.P., Murphy P., Brown E.A., Lemon S.M.** (1992). Mutations within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA which enhance replication in BS-C-1 cells. *J Virol* **66**(11): 6533-6540.
- De Chastonay J. & Siegl G.** (1987). Replicative events in hepatitis A virus-infected MRC-5 cells. *Virology* **157**(2): 268-275.
- de Jong A.S., de Mattia F., Van Dommelen M.M., Lanke K., Melchers W.J.G., Willems P.H.G.M., van Kuppeveld F.J.M.** (2008). Functional analysis of picornavirus 2B proteins: effects on calcium homeostasis and intracellular protein trafficking. *J Virol* **82**(7): 3782-3790.
- Der S.D., Zhou A., Williams B.R., Silverman H.R.** (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(26): 15623-15628.
- DiDonato J.A., Hayakawa M., Rothwarf D.M., Zandi E., Karin M.** (1997). A cytokine-responsive I $\kappa$ B-kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* **388**: 548-554.
- Domsgen E.** (2008). Einklonierung von Tag-Fusionssequenzen in den pI.18 Vektor zur Detektion von Proteinexpressionen. Diplomarbeit im Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen.
- Dotzauer A., Gebhardt U., Bieback K., Göttke U., Kracke A., Mages J., Lemon S.M., Vallbracht A.** (2000). Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with Hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. *J Gen Virol* **86**(10): 2747-2751.
- Dotzauer A., Brenner M., Gebhardt U., Vallbracht A.** (2005). IgA-coated particles of Hepatitis A virus are translocated antivectorially from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor. *J Virol* **74**(23): 10950-10957.
- Emerson S.U., McRill C., Rosenblum B., Feinstone S., Purcell R.H.** (1991). Mutations responsible for the adaption of hepatitis A virus to efficient growth in cell culture. *J Virol* **65**(9): 4882-4886.
- Emerson S.U., Huang Y.K., McRill C., Lewis M., Purcell R.H.** (1992). Mutations in both the 2B and 2C genes of hepatitis A virus are involved in adaption to growth in cell culture. *J Virol* **66**(2): 650-654.
- Emerson S.U., Huang Y.K., Purcell R.H.** (1993). 2B and 2C mutations are essential but mutations throughout the genome of HAV contribute to adaption to cell culture. *Virology* **194**: 475-480.
- Escalante C.R., Shen L., Thanos D., Aggarwal A.K.** (2002). Structure of p50/p65 NF- $\kappa$ B heterodimer bound to the PRDII DNA element from the interferon- $\beta$  promoter. *Structure* **10**: 383-391.
- Falvo J.V., Thanos D., Maniatis T.** (1995). Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN $\beta$  gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y). *Cell* **83**: 1101-1111.
- Feigelstock D., Thompson P., Mattoo P., Zhang Y., Kaplan G.G.** (1998). The human homolog of HAVcr-1 codes for a Hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol* **72**(8): 6621-6628.
- Feinstone S.M., Kapikian A.Z., Purcell R.H.** (1973). Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* **182**: 1026-1028.

- Fensterl V., Grotheer D., Berk I., Schlemminger S., Vallbracht A., Dotzauer A.** (2005). Hepatitis A virus suppresses RIG-I-mediated IRF-3 activation to block induction of beta interferon. *J Virol* **79**(17): 10968-10977.
- Field A.K., Tytell A.A., Lampson G.P., Hilleman M.R.** (1967). Inducers of Interferon and host resistance, II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **58**: 1004-1010.
- Fitzgerald K.A., McWhirter S.M., Faia K.L., Rowe D.C., Latz E., Golenbock, D.T., Coyle A.J., Liao S., Maniatis T.** (2003). IKK $\epsilon$  and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4**(5): 491-496.
- Flehmg B., Frank H., Frösner G.G., Gerth H.J.** (1977). Hepatitis A-virus particles in stools of patients from a natural hepatitis outbreak in Germany. *Med Microbiol Immunol* **163**(3): 209-214.
- Flehmg B.** (1981). Hepatitis A Virus in cell culture. II: Growth characteristics of hepatitis A virus in Frhk-4/R cells. *Med Microbiol Immunol* **170**(2): 73-81.
- Flehmg B., Vallbracht A., Wurster G.** (1981). Hepatitis A Virus in cell culture. III: Propagation of hepatitis A virus in human embryo kidney cells and human embryo fibroblast strains. *Med Microbiol Immunol* **170**(2): 83-89.
- Fleischer B., Fleischer S., Maier K., Wiedmann K.H., Sacher M., Thaler H., Vallbracht A.** (1990). Clonal analysis of infiltrating T lymphocytes in liver tissue in viral hepatitis A. *Immunology* **69**: 14-19.
- Frings W. & Dotzauer A.** (2001). Adaptation of primate cell-adapted hepatitis A virus strain HM 175 to growth in guinea pig cells is independent of mutations in the 5' nontranslated region. *J Gen Virol* **82**: 597-602.
- Fujita F., Taniguchi Y., Kato T., Marita Y., Furuya A., Ogawa T., Sakurai H., Joh T., Itoh M., Delhase M., Karin M., Nakanishi M.** (2003). Identification of NAP1, a regulatory subunit of I $\kappa$ B kinase-related kinases that potentiates NF $\kappa$ B signalling. *Mol Cell Biol* **23**(21): 7780-7793.
- Gauss-Müller V., Lottspeich F., Deinhardt F.** (1986). Characterization of Hepatitis A virus structural proteins. *J Virol* **155**(2): 732-736.
- Gitlin L., Barchet W., Gilfillan S., Cella M., Beutler B., Flavell R.A., Diamond M.S., Colonna M.** (2006). Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(22): 8459-8464.
- Glass M.J., Jia X.Y., Summers D.F.** (1993). Identification of the hepatitis A virus internal ribosome entry site: in vivo and in vitro analysis of bicistronic RNAs containing the HAV 5' noncoding region. *Virology* **193**(2): 842-852.
- Goodbourn S., Didcock L., Randall R.E.** (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* **81**: 2341-2364.
- Gosert R., Cassinotti P., Siegl G., Weitz M.** (1996). Identification of hepatitis A virus non-structural protein 2B and its release by the major virus protease 3C. *J Gen Virol* **77**: 247-255.
- Gosert R., Egger D., Bienz K.** (2000). A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Virology* **266**: 157-169.
- Graff J., Normann A., Feinstone S.M., Flehmg B.** (1994a). Nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus GBM in comparison with two cell culture-adapted variants. *J Virol* **68**: 548-554.

- Graff J., Kasang C., Normann A., Pfisterer-Hunt M., Feinstone S.M., Flehmig, B.** (1994b). Mutational events in consecutive passages of hepatitis A virus strain GBM during cell culture adaption. *Virology* **204**(1): 60-68.
- Graff J., Cha J., Blyn L.B., Ehrenfeld E.** (1998). Interaction of poly(rC)-binding protein 2 with the 5' noncoding region of hepatitis A virus RNA and its effects on translation. *J Virol* **72**: 9668-9675.
- Gust I.D., Coulepis A.G., Feinstone S.M., Locarnini S.A., Moritsugu Y., Najera R., Siegl G.** (1983). Taxonomic classification of hepatitis A virus. *Intervirology* **20**(1): 1-7.
- Gust I.D., Lehmann N.I., Crowe S., McCrorie M., Locarnini S.A., Lucas C.R.** (1985). The origin of the HM175 strain of hepatitis A virus. *J Infect Dis* **151**: 365-367.
- Györy I., Wu J., Fejér G., Seto E. Wright K.L.** (2004). PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nat Immunol* **5**(3): 299-308.
- Harmon S.A., Summers D.F., Ehrenfeld E.** (1989). Detection of hepatitis A virus RNA and capsid antigen in individual cells. *Virus Res* **12**(4):361-369.
- Hayakawa J., Mittal S., Wang Y., Korkmaz K.S., Adamson E., English C., Omichi M., McClelland M., Mercola D.** (2004). Identification of promoters bound by c-Jun/ATF-2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress. *Mol Cell* **16**: 521-535.
- Hayashi T., Rizzuto R., Hajnoczky G., Su T.-P.** (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* **19**(2): 81-88.
- Heitmann A.** (2008). Untersuchungen zum Gewebetropismus des Hepatitis A-Virus im Mausmodell durch quantitative Analyse viraler Nukleinsäure. Dissertation im Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen.
- Hemmi H., Takeuchi O., Sato S., Yamamoto M., Kaisho T., Sanjo H., Kawai T., Hoshino K., Takeda K., Akira S.** (2004). The roles of two I $\kappa$ B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double-stranded RNA signalling and viral infection. *J Exp Med* **199**(12): 1641-1650.
- Heylbroeck C., Balachandran S., Servant M.J., DeLuca C., Barber G.N., Lin R., Hiscott J.** (2000). The IRF-3 transcription factor mediates Sendai virus-induced apoptosis. *J Virol* **74**(8): 3781-3792.
- Hillebrecht W.** (2002). Einfluss der viralen genomischen RNA des Hepatitis A-Virus auf die Induktion der Interleukin-6-Expression über eine Aktivierung des Toll-like Rezeptors 3. Diplomarbeit im Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen.
- Hiscott J., Pith a P., Genin P., Nguyen H., Heylbroeck C., Mamane Y., Algarte M., Lin R.** (1999). Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. *J Interferon Cytokine Res* **19**(1): 1-13.
- Hornung V., Ellegast J., Kim S., Brzózka K., Jung A., Kato H., Poeck H., Akira S., Conzelmann K., Schlee M., Endres S., Hartmann G.** (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**: 994-997.
- Isaacs A. & Lindenmann J.** (1957). Virus interference. I. The interferone. *Proc R Soc Lond (Biol)* **147**: 258-267.
- Ishikawa H. & Barber G.N.** (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**: 674-679.

- Ishikawa H., Ma Z., Barber G.N.** (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* **461**: 788-792.
- Jacobs B.L. & Langland J.O.** (1996). When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* **219**(2): 339-349.
- Jansen R.W., Newbold J.E., Lemon S.M.** (1988). Complete nucleotide sequence of a cell culture-adapted variant of hepatitis A virus: comparison with wild-type virus with restricted capacity for in vitro replication. *Virology* **163**(2): 299-307.
- Jecht M., Probst C., Gauss-Müller V.** (1998). Membrane permeability induced by hepatitis A virus proteins 2B and 2BC and proteolytic processing of HAV 2BC. *Virology* **252**: 218-227.
- Jia X.Y., Ehrenfeld E., Summers D.F.** (1991). Proteolytic activity of hepatitis A virus 3C protein. *J Virol* **65**: 2595-2600.
- Jia X.Y., Summers D.F., Ehrenfeld E.** (1993). Primary cleavage of the HAV capsid protein precursor in the middle of the proposed 2A coding region. *Virology* **193**: 515-519.
- Jiang Z., Zamanian-Daryoush M., Nie H., Silva A.M., Williams B.R.G., Li X.** (2003). Poly(dI-dC)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NF- $\kappa$ B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signalling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J Biol Chem* **278**(19): 16713-16719.
- Jin L., Waterman P.M., Jonsher K.R., Short C.M., Reisdorph N.A. Cambier J.C.** (2008). MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals. *Mol Cell Biol* **28**(16): 5014-5026.
- Juang Y.-T., Lowther W., Kellum M., Au W.-C., Lin R., Hiscott J., Pitha P.M.** (1998). Primary activation of Interferon A and Interferon B gene transcription by Interferon regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9837-9842.
- Kang D.C., Gopalkrishnan R.V., Wu Q., Jankowsky E., Pyle A.M., Fisher P.B.** (2002). mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(2): 637-642.
- Kaplan G.G., Totsuka A., Thompson P., Akatsuka T., Moritsugu Y., Feinstone S.M.** (1996). Identification of a surface glycoprotein on african green monkey kidney cells as a receptor for Hepatitis A virus. *EMBO J* **15**(16): 4282-4296.
- Karron R.A., Daemer R., Ticehurst J., D'Hondt E., Popper H., Mihalik K., Phillips J., Feinstone S., Purcell R.H.** (1988). Studies of prototype live hepatitis A virus vaccines in primate models. *J Infect Dis* **157**(2): 338-345.
- Kato H., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Uematsu S., Matsui K., Tsujimura T., Takeda K., Fujita T., Takeuchi O., Akira S.** (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**: 19-28.
- Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii K.J., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh C., e Sousa C.R., Matsuura Y., Fujita T., Akira S.** (2006). Differential roles of MDA-5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**: 101-105.
- Kaumanns P.** (2003). Untersuchungen zum Einfluss einer Hepatitis A-Virusinfektion auf Expression eines unter der Kontrolle definierter Interferon- $\beta$  Enhancerdomänen stehenden CAT-Reportergens. Diplomarbeit im Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen.

- Kawai T., Takahashi K., Sato S., Coban C., Kumar H., Kato H., Ishii K.J., Takeuchi O., Akira S.** (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**(10): 981-988.
- Kee B.L., Arias J., Montminy M.R.** (1996). Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J Biol Chem* **271**(5): 2373-2375.
- Keller A.D. & Maniatis T.** (1991). Identification and characterization of a novel repressor of  $\beta$ -interferon gene expression. *Genes Dev* **5**: 868-879.
- Kim T.K. & Maniatis T.** (1997). The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon- $\beta$  enhanceosome. *Mol Cell* **1**: 119-129.
- Kim T.K., Kim T.H., Maniatis T.** (1998). Efficient recruitment of TFIIB and CBP-RNA polymerase II holoenzyme by an interferon- $\beta$  enhanceosome in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12191-12196.
- King P. & Goodbourn S.** (1994). The  $\beta$ -Interferon promoter responds to priming through multiple independent regulatory elements. *J Biol Chem* **269**(48): 30609-30615.
- Klinger M.H., Kammerer R., Hornei B., Gauss-Muller V.** (2001). Perinuclear accumulation of hepatitis A virus proteins, RNA, and particles and ultrastructural alterations in infected cells. *Arch Virol* **146**(12): 2291-2307.
- Krämer, A.-L.** (2008). Untersuchungen zur Rolle des TRAF3 bei der HAV-vermittelten Hemmung der Interferon- $\beta$ -Expression. Diplomarbeit im Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen.
- Kumar K.P., McBride K.M., Weaver B.K., Dingwall C., Reich N.C.** (2000). Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1. *Mol Cell Biol* **20**(11): 4159-4168.
- Kumar K.P., Kawai T., Kato H., Sato S., Takahashi K., Coban C., Yamamoto M., Uematsu S., Ishii K.J., Takeuchi O., Akira S.** (2006). Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J Exp Med* **203**: 1795-1803.
- Kusov Y.Y., Probst C., Jecht M., Gauss-Müller V.** (1998). Membrane association and RNA binding of recombinant hepatitis A virus protein 2C. *Arch Virol* **143**: 931-944.
- 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., Moore P.A.** (2001). Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J Biol Chem* **276**: 39765-39771.
- Lampson G.P., Tytell A.A., Field A.K., Nemes M.M., Hilleman M.R.** (1967). Inducers of Interferon and host resistance, I. Double-stranded RNA from extracts of *Penicillium funiculosum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **58**: 782-789.
- Lemon S.M.** (1997). Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. *Clin Chem* **43**(8B): 1494-1499.
- Lemon S.M. & Robertson B.H.** (1993). Current perspectives in the virology and molecular biology of Hepatitis A-Virus. *Semin Virol* **4**: 285-295.
- Leonardo M.J., Fan C.M., Maniatis T., Baltimore D.** (1989). The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. *Cell* **57**(2): 287-294.

- Li C., Ni C.Z., Havert M.L., Cabezas E., He J., Kaiser D., Reed J.C., Satterthwait A.C., Cheng G., Ely K.R.** (2002). Downstream regulator TANK binds to the CD40 recognition site on TRAF3. *Structure* **10**: 403-411.
- Li K., Chen Z., Kato N., Gale M Jr., Lemon S.M.** (2005). Distinct poly(I-C) and virus-activated signalling pathways leading to interferon- $\beta$  production in hepatocytes. *J Biol Chem* **280**(17): 16739-16747.
- Li X., Sun L., Seth R.B., Pineda G., Chen Z.J.** (2005). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signalling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**(49): 17717-17722.
- Lin C.H., Hare B.J., Wagner G., Harrison S.C., Maniatis T., Fraenkel E.** (2001). A Small domain of CBP/p300 binds diverse proteins: solution structure and functional studies. *Mol Cell* **8**: 581-590.
- Lin R., Heylbroeck C., Pitha P., Hiscott, J.** (1998). Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **18**(5): 2986-2996.
- Lin R., Mamane Y., Hiscott, J.** (1999). Structural and functional analysis of Interferon regulatory factor 3: Localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol Cell Biol* **19**(4): 2465-2474.
- Lin R., Genin P., Mamane Y., Hiscott J.** (2000a). Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7. *Mol Cell Biol* **20**(17): 6342-6353.
- Lin R., Mamane Y., Hiscott J.** (2000b). Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection. *J Biol Chem* **275**(44): 34320-34327.
- Lomvardas S. & Thanos D.** (2001). Nucleosome sliding via TBP DNA binding in vivo. *Cell* **106**: 685-696.
- MacCullam F.O.** (1947). Homologous serum jaundice. *Lancet* **2**: 691-692.
- Magulski, T.** (2007). Inhibition zellulärer antiviraler Abwehrmechanismen durch das Hepatitis A-Virus – eine Analyse der beteiligten viralen Faktoren: Inhibition des IRF-3-vermittelten Signalweges durch das Nichtstrukturprotein 2B des Hepatitis A-Virus. Dissertation im Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen.
- Mamane Y., Heylbroeck C., Génin P., Algarté M., Servant M.J., LePage C., DeLuca C., Kwon H., Lin R., Hiscott J.** (1999). Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* **237**: 1-14.
- Maniatis T., Whittemore L., Du W., Fan C., Keller A.D., Palombella V.J., Thanos D.** (1992). Positive and negative control of human interferon- $\beta$  gene expression in Transcription Regulation. (McKnight S.I., Yamamoto K.R. eds.). *Cold Spring Harbor Press*, Cold Spring Harbor, New York, 1193-1220.
- Maniatis T., Falvo J.V., Kim T.H., Kim T.K., Lin C.H., Parekh B.S., Wathelet M.G.** (1998). Structure and function of the Interferon- $\beta$  Enhanceosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**: 609-620.
- Martin A., Escriou N., Chao S.-F., Girard M., Lemon S.M., Wychowski C.** (1995). Identification and site-directed mutagenesis of the primary (2A/2B) cleavage site of the hepatitis A virus polyprotein: Functional impact on the infectivity of HAV RNA transcripts. *Virology* **213**: 213-222.

- Martin A., Bénichou D., Chao S.-F., Chen L.M., Lemon S.M.** (1999). Maturation of the Hepatitis A virus capsid protein VP1 is not dependent on processing by the 3C<sup>pro</sup> proteinase. *J Virol* **73**(8): 6220-6227.
- May G.H.W., Allen K.E., Clark W., Funk M., Gillespie D.A.F.** (1998). Analysis of the interaction between c-Jun and c-Jun N-terminal kinase in vivo. *J Biol Chem* **273**(50): 33429-33435.
- McWhirter S.M., Fitzgerald K.A., Rosains J., Rowe D.C., Golenbock D.T., Maniatis T.** (2004). IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *PNAS* **101**(1): 233-238.
- Merika M., Williams A.J., Chen G., Collins T., Thanos D.** (1998). Recruitment of CBP/p300 by the IFN $\beta$  Enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell* **1**: 277-287.
- Meylan E., Burns K., Hofmann K., Blancheteau V., Martinon F., Kelliher M., Tschopp J.** (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF- $\kappa$ B activation. *Nat Immunol* **5**(5): 503-507.
- Meylan E., Curran J., Hofmann K., Moradpour D., Binder M., Bartenschlager R., Tschopp J.** (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**: 1167-1172.
- Minor P.** (1991). Picornaviridae. In: Francki R., Fauquet C., Knudson D., Brown F. (Hrsg.). Classification and nomenclature of viruses. (2 (Suppl.)) *Arch. Virol.*: 339-345.
- Mori M., Yoneyama M., Ito T., Takahashi K., Inagaki F., Fujita T** (2004). Identification of Ser-386 of Interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem* **279**(11): 9698-9702.
- Munshi N., Yie J., Merika M., Senger K., Lomvardas S., Agalioti T., Thanos D.** (1999). The IFN- $\beta$  Enhancer: A paradigm for understanding activation and repression of inducible gene expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**: 149-159.
- Najarian R., Caput D., Gee W., Potter S.J., Renard A., Merryweather J., Van Nest G., Dina D.** (1985). Primary structure and gene organization of human hepatitis A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**(9): 2627-2631.
- Nir U., Maroteaux L., Cohen B., Mory I.** (1985). Priming affects the transcription rate of human interferon-beta 1 gene. *J Biol Chem* **260**(26): 14242-14247.
- Normann A., Jung C., Vallbracht A., Flehmig B.** (2004). Time course of Hepatitis A viremia and viral load in the blood of human Hepatitis A patients. *J Med Virol* **72**: 10-16.
- Nourbakhsh M. & Hauser H.** (1999). Constitutive silencing of IFN- $\beta$  promoter is mediated by NRF (NF- $\kappa$ B-repressing factor), a nuclear inhibitor of NF- $\kappa$ B. *EMBO J* **18**(22): 6415-6425.
- Obata Y., Yamamoto K., Miyazaki M., Shimotohno K., Kohno S., Matsuyama T.** (2005). Role of cyclophilin B in activation of Interferon regulatory factor-3. *J Biol Chem* **280**(18): 18355-18360.
- Oganesyan G., Saha S.K., Guo B., He J.Q., Shahangian A., Zarnegar B., Perry A., Cheng G.** (2006). Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* **439**: 208-211.
- Ogryzko V.V., Schiltz R.L., Russanova V., Howard B.H., Nakatani Y.** (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**: 953-959.

- Onoguchi K., Yoneyama M., Takemura A., Akira S., Taniguchi T., Namiki H., Fujita T.** (2007). Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J Biol Chem* **282**: 7576-7581.
- Oshiumi H., Matsumoto M., Funami K., Akazawa T. Seya T.** (2003). TICAM-1, an adapter molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon- $\beta$  induction. *Nat Immunol* **4**(2): 161-167.
- Pahl H.L.** (1999). Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* **18**: 6853-6866.
- Panne D., Maniatis T., Harrison S.C.** (2004). Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF-3 bound to the interferon- $\beta$  enhancer. *EMBO J* **23**(22): 4384-4393.
- Paulmann D., Magulski T., Schwarz R., Heitmann L., Flehmig B., Vallbracht A., Dotzauer A.** (2008). Hepatitis A virus protein 2B suppresses beta interferon (IFN) gene transcription by interfering with IFN regulatory factor 3 activation. *J Gen Virol* **89**: 1593-1604.
- Pestka S., Krause C.D., Walter M.R.** (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* **202**: 8-32.
- Pichlmair A., Schulz O., Tan C.P., Näslund T.I., Liljeström P., Weber F., e Sousa C.R.** (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**: 997-1001.
- Pomerantz J.L. & Baltimore D.** (1999). NF- $\kappa$ B activation by a signalling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *EMBO J* **18**(23): 6694-6704.
- Probst C., Jecht M., Gauss-Müller V.** (1999). Intrinsic signals for the assembly of Hepatitis A virus particles – Role of structural proteins VP4 and 2A. *J Biol Chem* **274**(8): 4527-4531.
- Provost P.J., Wolanski B.S., Miller W.J., Ippensohn O.L., McAleer W.J., Hilleman M.R.** (1975). Physical, chemical and morphological dimensions of human hepatitis A virus strain CR326 (38578). *Proc Soc Exp Biol Med* **148**(2): 532-539.
- Provost P.J. & Hilleman M.R.** (1979). Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* **160**(2): 213-221.
- Qin B.Y., Liu C., Lam S.S., Srinath H., Delston R., Correia J.J., Derynck R., Lin K.** (2003). Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphoactivation. *Nat Struct Biol* **10**(11): 913-921.
- Qin B.Y., Liu C., Srinath H., Lam S.S., Correia J.J., Derynck R., Lin K.** (2005). Crystal structure of IRF-3 in complex with CBP. *Structure* **13**: 1269-1277.
- Rachow A., Gauss-Müller V., Probst C.** (2003). Homogenous Hepatitis A virus particles – Proteolytic release of the assembly signal 2A from procapsids by factor Xa. *J Biol Chem* **278**(32): 29744-29751.
- Randall R.E. & Goodbourn S.** (2008). Interferon and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* **89**(1): 1-47.
- Robertson B.H., Jansen R.W., Khanna B., Totsuka A., Nainan O.V., Siegl G., Widell A., Margolis H.S., Isomura S., Ito K.** (1992). Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* **73**(6): 1365-1377.

**Ross B.C., Anderson B.N., Edwards P.C., Gust I.D.** (1989). Nucleotide sequence of high-passage hepatitis A virus strain HM175: comparison with wild-type and cell culture-adapted strains. *J Gen Virol* **70**: 2805-2810.

**Rueckert R.** (1990). Picornaviridae and their replication. In: Fields B., Knipe D., Chanock R., Melnick J., Roizman B., Hirsch M., Monath J. (Hrsg.) Virology. (2. Auflage) New York, Raven Press: 507-548.

**Saha S.K., Pietras E.M., He J.Q., Kang J.R., Liu S.Y., Oganessian G., Shahangian A., Zarnegar B., Shiba T.L., Wang Y., Cheng G.** (2006). Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J* **25**: 3257-3263.

**Saitoh T., Fujita N., Hayashi T., Takahara K., Satho T., Lee H., Matsunaga K., Kageyama S., Omori H., Noda T., Yamamoto N., Kawai T., Ishii K., Takeuchi O., Yoshimori T., Akira S.** (2009). Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**(49): 20842-20846.

**Sakurai H., Miyoshi H., Mizukami J., Sugita T.** (2000). Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Letters* **474**: 141-145.

**Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989). Molecular cloning – A laboratory manual (Vol. 1). 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA.

**Samuel C.E.** (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**(4) : 778-809.

**Sasai M., Oshiumi H., Matsumoto M., Inoue N., Fujita F., Nakanishi M., Seya T.** (2005). Cutting Edge: NF- $\kappa$ B-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol* **174**: 27-30.

**Sato M., Suemori H., Hata N., Asagiri M., Ogasawara K., Nakao K., Nakaya T., Katsuki M., Noguchi S., Tanaka N., Taniguchi T.** (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- $\alpha/\beta$  gene induction. *Immunity* **13**: 539-548.

**Sato M., Sugiyama M., Yamamoto M., Watanabe Y., Takeda K., Akira S.** (2003). Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF- $\kappa$ B and IFN-regulatory factor-3, in the toll-like receptor signalling. *J Immunol* **171**: 4307-4310.

**Schaeffer H.J. & Weber M.J.** (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**(4): 2435-2444.

**Schafer S.L., Lin R., Moore P.A., Hiscott J., Pitha P.M.** (1998). Regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor-3. *J Biol Chem* **273**(5): 2714-2720.

**Schulman A.N., Dienstag J.L., Jackson D.R., Hoofnagle J.H., Gerety R.J., Purcell R.H., Barker L.F.** (1976). Hepatitis A antigen particles in liver, bile and stool of chimpanzees. *J Infect Dis* **134**(1): 80-84.

**Schultheiss T., Kusov Y.Y., Gauss-Müller V.** (1994). Proteinase 3C of Hepatitis A virus (HAV) cleaves the HAV polyprotein P2-P3 at all sites including VP1/2A and 2A/2B. *Virology* **198**: 275-281.

**Schultz D.E., Honda M., Whetter L.E., McKnight K.L., Lemon S.M.** (1996a). Mutations within the 5' nontranslated RNA of cell culture-adapted hepatitis A virus which enhance cap-independent translation in cultured African green monkey kidney cells. *J Virol* **70**(2): 1041-1049.

- Schultz D.E., Hardin C.C., Lemon S.M.** (1996b). Specific interaction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the 5'-nontranslated RNA of hepatitis A virus. *J Biol Chem* **271**: 14134-14142.
- Schwarz, R.L.** (2006). Untersuchungen zur Suppression der IFN- $\beta$ -Induktion durch das 2B-Protein des Hepatitis A-Virus. Diplomarbeit im Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen.
- Sen G.C.** (2001). Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* **55**: 255-281.
- Servant M.J., ten Oever B., LePage C., Conti L., Gessani S., Julkunen I., Lin R., Hiscott J.** (2001). Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Biol Chem* **276**(1): 355-363.
- Servant M.J., Grandvaux N., Hiscott J.** (2002). Multiple signaling pathways leading to the activation of interferon regulatory factor 3. *Biochem Pharmacol* **64**: 985-992.
- Servant M.J., Grandvaux N., tenOever B., Duguay D., LinR., Hiscott J.** (2003). Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of Interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA. *J Biol Chem* **278**(11): 9441-9447.
- Seth R.B., Sun L., Ea C., Chen Z.J.** (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signalling protein that activates NF- $\kappa$ B and IRF3. *Cell* **122**(5): 669-682.
- Sharma S., tenOever B.R., Grandvaux N., Zhou G., Lin R., Hiscott J.** (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**: 1148-1151.
- Shimada T., Kawai T., Takeda K., Matsumoto M., Inoue J.-I., Tatsumi Y., Kanamaru A., Akira S.** (1999). IKK-i, a novel Lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to I $\kappa$ B kinases. *Int Immunol* **11**(8): 1357-1362.
- Siegl G., Frosner G.G., Gauss-Müller V., Tratschin J.D., Deinhardt F.** (1981). The physicochemical properties of infectious hepatitis A virion. *J Gen Virol* **57**: 331-341.
- Silverman E., Edwalds-Gilbert G., Lin R.-J.** (2003). DExD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene* **312**: 1-16.
- Spiess M.** (1990). The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic receptors. *Biochemistry* **29**: 10009-10018.
- Stapleton J.T.** (1995). Host immune responses to Hepatitis A virus. *J Infect Dis* **171**(Suppl 1): S9-S14.
- Suhara W., Yoneyama M., Kitabayashi I., Fujita T.** (2002). Direct involvement of CREB-binding protein/p300 in sequence-specific DNA binding of virus-activated interferon regulatory factor-3 holocomplex. *J Biol Chem* **277**(25): 22304-22313.
- Sumpter R. Jr., Loo Y., Foy E., Li K., Yoneyama M., Fujita T., Lemon S.M., Gale M. Jr.** (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* **79**(5): 2689-2699.
- Sun Q., Sun L., Liu H.H., Chen X., Seth R.B., Forman J., Chen Z.J.** (2006). The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune response. *Immunity* **24**: 633-642.
- Sun W., Li Y., Chen L., Chen H., You F., Zhou X., Zhou Y., Zhai Z., Chen D., Jiang Z.** (2009). ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signalling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**(21): 8653-8658.

**Takahasi K., Suzuki N.N., Horiuchi M., Mori M., Suhara W., Okabe Y., Fukuhara Y., Terasawa H., Akira S., Fujita T., Inagaki F.** (2003). X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nat Struct Biol* **10**(11): 922-927.

**Taniguchi T., Ogasawara K., Takaoka A., Tanaka N.** (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defence. *Annu Rev Immunol* **19**: 623-655.

**Tasaka M., Sakamoto N., Itakura Y., Nakagawa M., Itsui Y., Sekine-Osajima Y., Nishimura-Sakurai Y., Chen C.-H., Yoneyama M., Fujita T., Wakita T., Maekawa S., Enomoto N., Watanabe M.** (2007). Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J Gen Virol* **88**: 3323-3333.

**Tesar M., Jia X.-Y., Summers D.F., Ehrenfeld E.** (1993). Analysis of a potential myristoylation site in Hepatitis A virus capsid protein VP4. *Virology* **194**: 616-626.

**Teterina N., Bienz K., Egger D., Gorbalenya A.E., Ehrenfeld E.** (1997). Induction of intracellular membrane rearrangements by HAV proteins 2C and 2BC. *Virology* **237**: 66-77.

**Thanos D. & Maniatis T.** (1995). Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* **83**(7): 1091-1100.

**Ticehurst J.R., Racaniello V.R., Baroudy B.M., Baltimore D., Purcell R.H., Feinstone S.M.** (1983). Molecular cloning and characterization of hepatitis A virus cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**(19): 5885-5889.

**Ticehurst J.R., Cohen J.I., Feinstone S.M., Purcell R.H., Lemon S.M.** (1989). Replication of hepatitis A virus: new ideas from studies with cloned cDNA. In: B.L. Semler & E. Ehrenfeld (Hrsg.). *Molecular Aspects of Picornavirus Infection and Detection* (1989). Washington D.C., American Society for Microbiology: 27-50.

**Tojima Y., Fujimoto A., Delhase M., Chen Y., Hatakeyama S., Nakayama K.-I., Kaneko Y., Nimura Y., Motoyama N., Ikeda K., Karin M., Nakanishi M.** (2000). NAK is an I $\kappa$ B kinase-activating kinase. *Nature* **404**: 778-782.

**Totsuka A. & Moritsugu Y.** (1999). Hepatitis A virus proteins. *Intervirology* **42**(2-3): 63-68.

**Updike W.S., Tesar M., Ehrenfeld E.** (1991). Detektion of hepatitis A virus proteins in infected BS-C-1 cells. *Virology* **185**: 411-418.

**Vallbracht A., Hofmann L., Wurster K.G., Flehmig B.** (1984). Persistent infection of human fibroblasts by hepatitis A virus. *J Gen Virol* **65**: 609-615.

**Vallbracht A. & Flehmig B.** (1985). Elimination of a persistent hepatitis A infection in cell cultures by interferon. In: H. Kirchner und H. Schellekens (Hrsg.). *The biology of the interferon system* (1985). Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V.: 339-345.

**Vallbracht A., Gabriel P., Zahn J., Flehmig B.** (1985). Hepatitis A virus infection and the interferon system. *J Infectious Diseases* **152**(1): 211-213.

**Vallbracht A., Gabriel P., Maier K., Hartmann F., Steinhardt H.J., Müller C., Wolf A., Manncke K.H., Flehmig B.** (1986). Cell-mediated cytotoxicity in Hepatitis A virus infection. *Hepatology* **6**(6): 1308-1314.

**Vallbracht A., Maier K., Stierhof Y.-D., Wiedmann K.H., Flehmig B., Fleischer B.** (1989). Liver-derived cytotoxic T cells in Hepatitis A virus infection. *J Infect Dis* **160**(2): 209-217.

- Vo N. & Goodman R.H.** (2001). CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* **276**(17): 13505-13508.
- Wang C., Deng L., Hong M., Akkaraju G.R., Inoue J.-I., Chen Z.J.** (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**: 346-351.
- Wathelet M.G., Lin C.H., Parekh B.S., Ronco L.V., Howley P.M., Maniatis T.** (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN- $\beta$  enhancer in vivo. *Mol Cell* **1**(4): 507-518.
- Weaver B.K. Ando O., Kumar K.P., Reich N.C.** (2001). Apoptosis is promoted by the dsRNA-activated factor (DRAF1) during viral infection independent of the action of Interferon or p53. *FASEB J* **15**: 501-501.
- Weitz M., Baroudy B.M., Maloy W.L., Ticehurst J.R., Purcell R.H.** (1986). Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs. *J Virol* **60**: 124-130.
- Xu L., Wang Y., Han K., Li L., Zhai Z., Shu H.** (2005). VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN- $\beta$  signalling. *Mol Cell* **19**(6): 727-740.
- Yamamoto M., Sato S., Mori K., Hoshino K., Takeuchi O., Takeda K., Akira S.** (2002). Cutting Edge: A novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- $\beta$  promoter in the Toll-like receptor signalling. *J Immunol* **169**: 6668-6672.
- Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H., Takeuchi O., Sugiyama M., Okabe M., Takeda K., Akira S.** (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**(5633): 640-643.
- Yang H., Ma G., Lin C.H., Orr M., Wathelet M.G.** (2004). Mechanism for transcriptional synergy between interferon regulatory factor (IRF)-3 and IRF-7 in activation of the interferon- $\beta$  gene promoter. *Eur J Biochem* **271**: 3693-3703.
- Yang Y., Liang Y., Qu L., Chen Z., Yi M., Li K., Lemon S.M.** (2007). Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(17): 7253-7258.
- Yi M., Schultz D.E., Lemon S.M.** (2000). Functional significance of the interaction of hepatitis A virus RNA with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): opposing effects of GAPDH and polypyrimidine tract binding protein on internal ribosome entry site function. *J Virol* **74**: 6459-6468.
- Yie J., Liang S., Merika M., Thanos D.** (1997). Intra- and intermolecular cooperative binding of high-mobility group protein I(Y) to the beta-interferon promoter. *Mol Cell Biol* **17**(7): 3649-3662.
- Yie J., Merika M., Munshi N., Chen G., Thanos D.** (1999). The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN- $\beta$  enhanceosome. *EMBO J* **18**(11): 3074-3089.
- Yoneyama M., Suhara W., Fukuhura Y., Fukuda M., Nishida E., Fujita T.** (1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* **17**(4): 1087-1095.
- Yoneyama M., Suhara W., Fujita T.** (2002). Control of IRF-3 activation by phosphorylation. *J Interferon Cytokine Res* **22**(1):73-76.

**Yoneyama M., Kikuchi M., Natsukawa T., Shinobu N., Imaizumi T., Miyagishi M., Taira K., Akira S., Fujita T.** (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in the double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**(7): 730-737.

**Yoneyama M., Kikuchi M., Matsumoto K., Imaizumi T., Miyagishi M., Taira K., Foy E., Loo Y.-M., Gale M. Jr., Akira S., Yonehara S., Kato A., Fujita T.** (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA-5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* **175**: 2851-2858.

**Yu J., Angelin-Duclos C., Greenwood J., Liao J., Calame K.** (2000). Transcriptional repression by Blimp-1 (PRDI-BF1) involves recruitment of histone deacetylase. *Mol Cell Biol* **20**(7): 2592-2603.

**Zandi E. & Karin M.** (1999). Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I $\kappa$ B kinase complex. *Mol Cell Biol* **19**(7): 4547-4551.

**Zhang H., Chao S.F., Ping L.H., Grace K., Clarke B., Lemon S.M.** (1995). An infectious cDNA clone of a cytopathic hepatitis A virus: genomic regions associated with rapid replication and cytopathic effect. *Virology* **212**(2): 686-697.

**Zhang B., Morace G., Gauss-Müller V., Kusov Y.** (2007a). Poly(A) binding protein, C-terminally truncated by the hepatitis A virus proteinase 3C, inhibits viral translation. *Nucleic Acids Res* **35**(17): 5975-5984.

**Zhang B., Seitz S., Kusov Y., Zell R., Gauss-Müller V.** (2007b). RNA interaction and cleavage of poly(C) binding protein 2 by hepatitis A virus protease. *Biochem Biophys Res Commun* **364**(4): 725-730.

**Zhong B., Yang Y., Li S., Wang Y.-Y., Li Y., Diao F., Lei C., He X., Zhang L., Tien P., Shu H.-B.** (2008). The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* **29**: 538-550.

**Zhong B., Zhang L., Lei C., Li Y., Mao A.-P., Yang Y., Wang Y.-Y., Zhang X.-L., Shu H.-B.** (2009). The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA. *Immunity* **30**: 397-407.

**Zhong H., May M.J., Jimi E., Gosh S.** (2002). The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CPP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell* **9**(3): 625-636.

**Zhou A., Scoggin S., Gaynor R.B., Williams N.S.** (2003). Identification of NF- $\kappa$ B-regulated genes induced by TNF $\alpha$  utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene* **22**: 2054-2064.