

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene und Medizinische
Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg.

Institut für Immunologie

Direktor: Prof. Dr. med. D. Gemsa

**Einfluss einer Influenza A Virus-Infektion auf die
Expression von Transkriptionsfaktoren in
murinen Makrophagen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Medizin dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Henner Kalden

aus Marburg/Lahn

Marburg, 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität.
Marburg am 14.11.2002, gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. D. Gemsa

Korreferent: PD Dr. U. Herz

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP-1	engl.: <i>activating protein-1</i>
A/PR/8	Influenza A/Puerto Rico/8/34
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser (lat.: <i>aqua bidestillata</i>)
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-bindendes Protein
cDNA	engl.: <i>complementary DNA</i>
CRE	engl.: <i>cAMP-response element</i>
CREB	engl.: <i>cAMP-response element-binding protein</i>
CREM	engl.: <i>cAMP-response element-modulator</i>
CFU-GMs	engl.: <i>colony-forming unit granulocyte macrophages</i>
CSFs	engl.: <i>colony-stimulating factors</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
eIF-2	engl.: <i>eukaryotic initiation factor 2</i>
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere (lat.: <i>et altera</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i>
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G	Guanin

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	engl.: <i>granulocyte-colony-stimulating factor</i>
HA	Hämagglutinin
ICSBP	engl.: <i>Interferon consensus sequence binding protein</i>
IFN	Interferon
I κ B	Inhibitor-kappa B
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IRF	engl.: <i>interferon response factor</i>
ISRE	engl.: <i>interferon stimulated response element</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KID	engl.: <i>kinase-inducible domain</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
Max	engl.: <i>myc-associated x factor</i>
M-CSF	engl.: <i>monocyte-colony-stimulating factor</i>
MHC	engl.: <i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MOI	multiplicity of infection
MPS	mononukleäres Phagozyten-System
mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i>
NA	Neuraminidase
NES	engl.: <i>nuclear export sequence</i>
NF- κ B	nukleärer Faktor-kappa B
NLS	engl.: <i>nuclear localisation sequence</i>
NP	Nukleoprotein
OD	optische Dichte
PBS	engl.: <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
PKA	cAMP-abhängige Protein-Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	engl.: <i>revolutions per minute</i>

RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA
taq	lat.: <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	engl.: <i>tris buffered saline</i>
TF	Transkriptionsfaktor(en)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRE-1	engl.: <i>Tax-responsive element-1</i>
U	Unit
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	engl.: <i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)

Nicht aufgeführte Abkürzungen wurden entsprechend den Empfehlungen für Autoren des European Journals of Biochemistry verwendet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	II
1. Einleitung	1
1.1. Die Regulation der Transkription	1
1.1.1. Der Aufbau eukaryontischer Gene	1
1.1.2. Prinzipien der Transkriptionsregulation	2
1.1.3. Allgemeine Transkriptionsfaktoren	4
1.1.4. Spezielle Transkriptionsfaktoren	5
1.1.4.1. CREB und CREM	7
1.1.4.2. ICSBP	8
1.1.4.3. Das Myc/Max/Mad-Netzwerk von Transkriptionsfaktoren	9
1.1.4.4. NF- κ B	11
1.2. Monozyten / Makrophagen	13
1.2.1. Ursprung und Struktur der Monozyten / Makrophagen	13
1.2.2. Funktionen der mononukleären Phagozyten	15
1.2.3. Aktivierung von Makrophagen	15
1.2.4. Sekretorische Produkte von Makrophagen	16
1.3. Influenza A Viren	17
1.3.1. Taxonomie und Einordnung des Virusstammes A/PR/8	17
1.3.2. Struktur und Charakterisierung	18
1.3.3. Vermehrungszyklus	20
1.3.4. Antigendrift und Antigen shift	22
1.3.5. Krankheitsbild	22
1.3.6. Therapie und Prophylaxe	23
1.4. Interaktionen von Influenza A Viren mit monozytären Zellen	24
1.4.1. Wechselwirkung zwischen Influenza A Viren und Makrophagen ...	25
1.4.1.1. Zytokinmuster in A/PR/8-infizierten mononukleären Phagozyten ...	26

1.5.	Zielsetzung	28
2.	Material & Methoden	29
2.1.	Zellkultur	29
2.1.1.	Tumorlinie PU5-1.8 (Maus-Makrophagenlinie)	29
2.1.1.1.	Zellkulturbedingungen	29
2.1.1.2.	Medien und verwendete Lösungen	29
2.1.1.3.	Zählen der Zellen	30
2.1.2.	Stimulation der PU5-1.8 Makrophagen	30
2.2.	Virologische Methoden	32
2.2.1.	Präparation von Influenza A Virus	32
2.2.1.1.	Vorbereitung der Eier und Beimpfung	32
2.2.1.2.	Ernte der virushaltigen Allantoisflüssigkeit	33
2.2.1.3.	Reinigung und Lagerung des Influenza A Virus	33
2.3.	Molekularbiologische Methoden	36
2.3.1.	Herstellung von DEPC-Wasser	36
2.3.2.	Photometrische Messung von Nukleinsäuren	36
2.3.3.	RNA-Isolierung	37
2.3.4.	Fällung von Nukleinsäuren	40
2.3.5.	Agarose-Gelelektrophorese für RNA	41
2.3.6.	cDNA-Synthese	43
2.3.7.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.3.7.1.	Primersequenzen	49
2.3.8.	Agarose-Gelelektrophorese für DNA	50
2.3.9.	Gelretentionsanalyse	51
2.3.9.1.	Isolierung von Zellkernproteinen	51

2.3.9.2.	Bindungsreaktion	52
2.3.9.3.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
2.3.10.	Western-Blot	53
3.	Ergebnisse	55
3.1.	Methodenentwicklung	55
3.1.1.	RNA-Isolierung	55
3.1.2.	Polymerase-Kettenreaktion	56
3.1.2.1.	Optimierung des Temperaturprofils	56
3.1.2.2.	Optimierung der Zyklenzahl	58
3.2.	Expression von Transkriptionsfaktoren nach A/PR/8-Infektion	60
3.2.1.	Expression von CREB und CREM	62
3.2.1.1.	Expression von CREB	62
3.2.1.1.1.	Regulation auf Transkriptionsebene	62
3.2.1.1.2.	Regulation auf Proteinebene	64
3.2.1.2.	Expression von CREM	65
3.2.2.	Expression von ICSP	66
3.2.3.	Expression von MAX	67
3.2.4.	Expression von NF- κ B	70
3.2.4.1.	Regulation auf Transkriptionsebene	70
3.2.4.2.	Regulation auf Proteinebene	71
3.2.5.	Expression von I κ B	76
3.2.5.1.	Regulation auf Transkriptionsebene	76
3.2.5.2.	Regulation auf Proteinebene	77
3.2.6.	Expression von TFIID	79
3.2.7.	Expression von AP-1	80

3.3	Zytokinexpression nach A/PR/8-Infektion	81
3.3.1.	Expression von IL-6	81
3.3.2.	Expression von TNF- α	82
4.	Diskussion	83
5.	Zusammenfassung	95
6.	Literaturverzeichnis	97
7.	Danksagung	109
8.	Verzeichnis der akademischen Lehrer	110

1. Einleitung

1.1 Die Regulation der Transkription

Eine der faszinierendsten Fragen der molekularen Biologie ist, wie in vielzelligen Organismen Gene angeschaltet werden. Wie können aus einer befruchteten Eizelle die vielen verschiedenen Typen von Körperzellen hervorgehen, wobei jede eine etwas andere Auswahl seiner insgesamt rund 30.000 – 40.000 Gene nutzt, um die zelltypische Mixtur von Proteinen herzustellen? Und wie erhalten die Zellen eines ausgewachsenen Organismus ihren Betrieb aufrecht, steigern oder drosseln ihre Proteinsynthese?

Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass die Regulation der Proteinsynthese auf allen Stufen der Genexpression erfolgen kann. Die Regulation der Transkriptionsrate eines Genes stellt die effektivste Kontrolle über die Proteinsynthese dar, da sie sicherstellt, dass keine weiteren Zwischenprodukte entstehen können¹.

1.1.1. Der Aufbau eukaryontischer Gene

Typische Eukaryontengene zeigen einen modularen Aufbau. Dabei unterscheidet man zwei Sorten von Modulen. Die eine Sorte besteht aus kodierenden Sequenzen, die man als Exons bezeichnet. Ihre Länge beträgt in der Regel etwa 50 bis 200 bp. Sie stellen die eigentlichen Informationsträger der Proteinsequenzen dar. Oftmals kodieren Exons für funktionell abgrenzbare Proteindomänen bzw. Sekundärstrukturen. Die andere Sorte Module besteht aus kurzen DNA-Sequenzen, die der Transkriptionsregulation dienen. Diese Sequenzen verteilen sich in der Genkontrollregion und sind die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren.

Die zwischen den Exons liegenden Sequenzen werden als Introns bezeichnet. Ihre Länge kann mehrere kb überschreiten und ist großen Schwankungen

¹ Darnell et al., 1990

unterworfen. In einem als Spleißen bezeichneten Prozess werden diese intronischen Sequenzen aus dem Primärtranskript mit Hilfe eines Multienzymkomplexes (Spleißosom) entfernt. Dabei werden konservierte Bereiche im Intron/Exon-Übergang und innerhalb der Introns als Erkennungsstellen benutzt. Die wahlweise Benutzung des einen oder anderen Spleißortes, auch als alternatives Spleißen bezeichnet, führt durch unterschiedliche Exonzusammensetzungen zu Veränderungen in der Proteinsequenz. Dieses Prinzip wird nur von manchen Genen benutzt². In den meisten Fällen haben Introns keine weiteren Funktionen, jedoch sind Fälle bekannt, in denen komplette andere Gene in Introns enthalten sind³, oder Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in Introns gefunden wurden⁴. Als Gegenstück zu Introns lässt sich Spacer-DNA betrachten. Sie verbindet die einzelnen Module der Genkontrollregionen miteinander, ohne eine besondere Funktion inne zu haben.

Der modulare Aufbau der eukaryontischen Gene macht Sinn, wenn man bedenkt, dass durch Insertion oder Deletion einzelner Module eine schnelle und effiziente Möglichkeit der regulativen und funktionellen Neuorganisation des Genomes realisierbar ist. Damit wären Eukaryonten in der Lage gewesen, sich schnell an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Introns bei Prokaryonten sind außergewöhnlich selten⁵. Man vermutet, dass sie unter dem evolutionären Druck ihre Genome klein zu halten, diese Sequenzen verloren haben. Somit stellt vielleicht das eukaryontische System der Genorganisation das phylogenetisch ältere Modell dar⁶.

1.1.2. Prinzipien der Transkriptionsregulation

Der Transkriptionsregulation kommt hinsichtlich der Steuerung der Expression in allen Organismen eine wichtige Rolle zu. Als erster Schritt in der Entstehung von Proteinen kann hier die sinnlose Synthese von Zwischenprodukten verhindert werden. Gerade für Prokaryonten war dies ein starker Selekt-

² Mazarakis et al., 1996

³ Levinson et al., 1990

⁴ Sun und Means, 1995

⁵ Daniels et al., 1985

⁶ Alberts et al., 1995

tionsfaktor in der Evolution. Andererseits ist dieses System der Regulation relativ träge. Veränderungen der Transkriptionsrate bewirken erst mit einer gewissen Latenz eine Änderung der Proteinkonzentration. Deshalb eignet sich die Transkriptionsregulation besonders für Grundsatzentscheidungen einer Zelle, den einen oder anderen Satz an Proteinen zu synthetisieren.

Frühe Erkenntnisse stammten aus der Erforschung von Prokaryonten, die zeigen konnten, dass Gene durch regulatorische Sequenzen in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes kontrolliert werden. Diese relativ kurzen Sequenzen interagieren mit Proteinen, sogenannten Transkriptionsfaktoren, und entscheiden über eine An- oder Abschaltung von Genen sowie die Geschwindigkeit und die Häufigkeit der Transkriptionsinitiation.

Eine Möglichkeit diese Faktoren zu klassifizieren besteht in der Beschreibung ihrer Bindungsmotive, von denen sich bis heute im wesentlichen sechs verschiedene herauskristallisierten. Dies sind das Helix-Turn-Helix-Motiv, das Homöodomänen-Motiv, das Zinkfinger-Motiv, das β -Faltblatt-Motiv, das Leucin-Zipper-Motiv und das Helix-Loop-Helix-Motiv⁷. Eine charakteristische Eigenschaft vieler Transkriptionsfaktoren ist die Bildung von Homo- und Heterodimeren⁸.

Nach der Bindung der Faktoren an ihre spezifischen DNA-Sequenzen wechselwirken sie mit dem Transkriptionsinitiationskomplex. Dieser besteht bei Prokaryonten aus der Polymerase in Verbindung mit verschiedenen σ -Faktoren, bei Eukaryonten aus einem Satz allgemeiner Transkriptionsfaktoren inklusive der Polymerase, die an einem spezifischen, sequenzdeterminierten Ort (meistens der TATA-Box) binden. Dieser Komplex wird als Promotor bezeichnet. Das heutige Modell favorisiert die These, dass spezifische Transkriptionsfaktoren die Ansammlung von allgemeinen Transkriptionsfaktoren beschleunigen, indem sie zusätzliche Bindungsstellen anbieten (Enhancer) oder verlangsamen, indem sie den Aufbau des Komplexes allgemeiner Transkriptionsfaktoren stören (Silencer).

⁷ Watson et al., 1993

⁸ Alberts et al., 1995

1.1.3. Allgemeine Transkriptionsfaktoren

Als man begann, die Promotoren der eukaryontischen Gene zu analysieren, stieß man auf eine AT-reiche Konsensussequenz um die Position -30, die man nach der Sequenz als TATA-Box bezeichnete. Dieses Element ist eine Komponente der überwiegenden Mehrzahl aller Promotoren, die von der Polymerase II verwendet wird. Ausgehend von der Erkenntnis, dass gereinigte

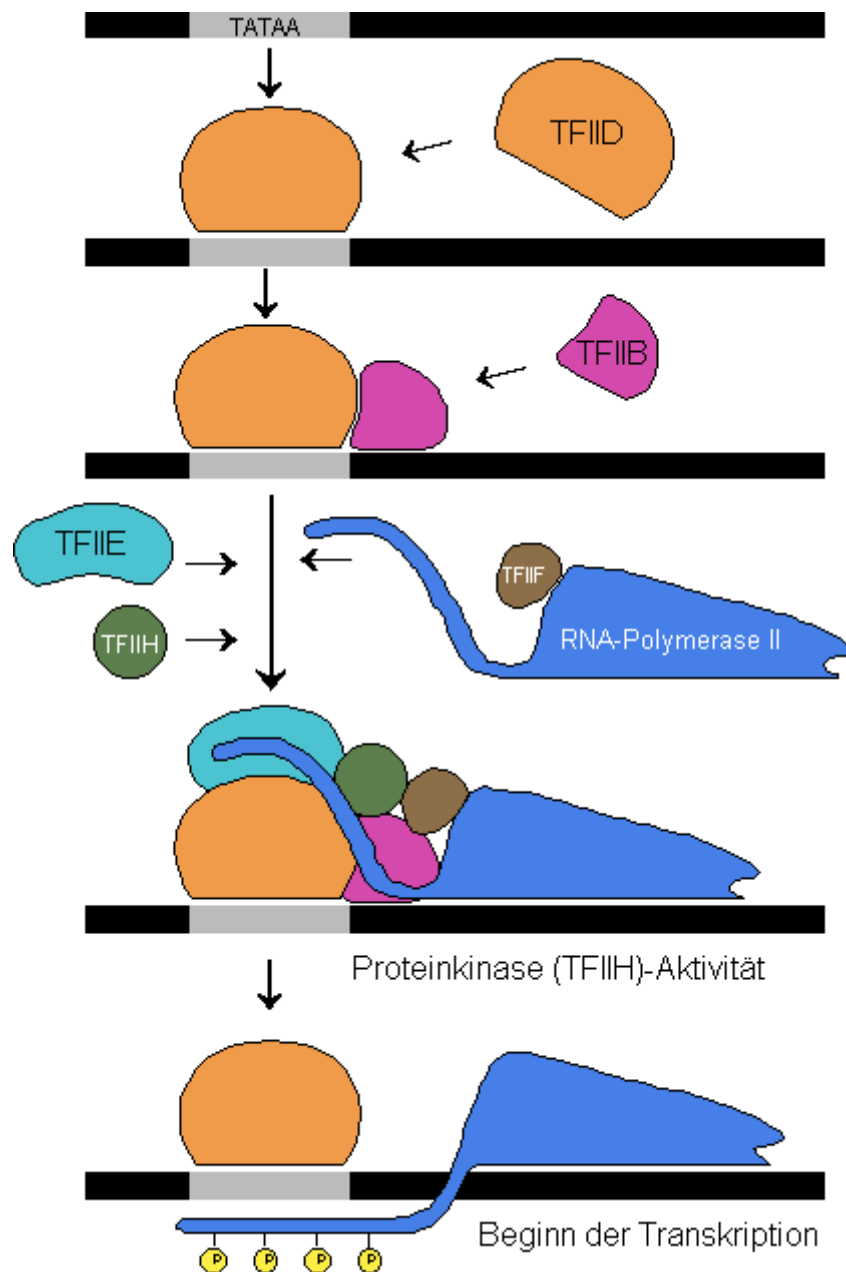


Abb. 1: Ansammlung allgemeiner Transkriptionsfaktoren am Promotor.
TF = Transkriptionsfaktor.

Polymerase II nicht in der Lage war, die Transkription zu initialisieren, isolierte man nach und nach die Faktoren, welche zusätzlich erforderlich waren. Die Abb. 1 zeigt, wie der Komplex aus Polymerase und Transkriptionsfaktoren vermutlich gebildet wird⁹.

1.1.4. Spezielle Transkriptionsfaktoren

Die Geschwindigkeit, mit der diese Prozesse *in vivo* ablaufen, ist ohne spezielle Transkriptionsfaktoren vernachlässigbar. Erst durch sie wird die Ansammlung allgemeiner Transkriptionsfaktoren auf messbare Werte gesteigert. Diese speziellen Transkriptionsfaktoren binden an Regulator-Sequenzen. Als Genkontrollregion bezeichnet man den Promotor inklusive Regulator-Sequenzen. Diese Region beschränkt sich bei der Mehrzahl der gefundenen Gene auf einen stromaufwärts gelegenen Bereich von etwa -500 bp.

Transkriptionsfaktoren enthalten im allgemeinen zwei, häufig voneinander abgegrenzte, funktionelle Domänen. Die eine Domäne ist für die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA verantwortlich, die andere für die Transkriptionsaktivierung¹⁰. Die Transkriptionsfaktoren weisen unterschiedliche Struktur motive in ihrer DNA-Bindungsdomäne auf. So lassen sie sich aufgrund ihrer Aminosäurestruktur in mehrere Familien, wie Helix-Turn-Helix, Zinkfinger, Leucin-Zipper und Helix-Loop-Helix einteilen¹¹. Genspezifische regulatorische Transkriptionsfaktoren binden an kurze DNA-Elemente im 5'-Bereich des Promotors oder an Enhancer- (Silencer-) Sequenzen¹². Enhancer können sich in großem Abstand zum Transkriptionsstart befinden¹³ und stromaufwärts (in 5'-Richtung), stromabwärts (in 3'-Richtung)¹⁴ oder innerhalb eines Introns liegen¹⁵ und in jeder Orientierung wirksam sein¹⁶.

⁹ Alberts et al., 1995

¹⁰ Ptashne, 1988

¹¹ Watson et al., 1993

¹² Scheidereit et al., 1996

¹³ Tuan et al., 1989

¹⁴ Stamatoyannopoulos et al., 1997

¹⁵ Sun und Means, 1995

¹⁶ Mitchell et al., 1989

Regulatorische Transkriptionsfaktoren stellen einen Bestandteil für die differenzielle Genexpression dar. Die meisten grundlegenden Prozesse der Zellbiologie stehen im Zusammenhang mit einer veränderten Transkription spezifischer Gene. Schon geringe Veränderungen in der Menge oder Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren können zu einer modifizierten Expression von Genen führen¹⁷.

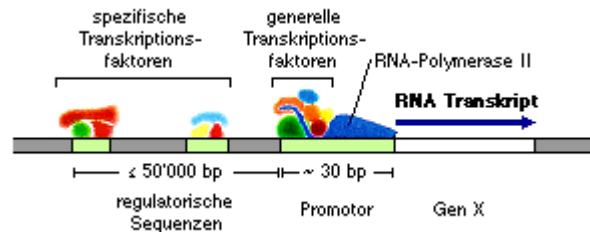


Abb. 2: Regulatorische Region eines eukaryontischen Gens (Erklärungen siehe Text). Transkriptionsfaktoren können in zwei Kategorien eingeteilt werden. (1) Faktoren, die in jeder Zelle exprimiert werden und unabhängig von extrazellulären Signalen wirken. (2) Eine andere Klasse von Transkriptionsfaktoren aktiviert oder inhibiert die Expression eines bestimmten Gens aufgrund eines extrazellulären Signals. Koordinierte transkriptionelle Regulation führt zu einer zeit-, zell- und umgebungsabhängigen Synthese eines primären RNA-Transkriptes.

Eine heute im Zentrum der Forschung stehende Frage ist, auf welche Weise die Regulatorproteine mit dem Promotor wechselwirken. Wie schon erwähnt, findet der Zusammenbau des Transkriptionskomplexes am Promotor sequenziell statt, und jeder einzelne Schritt kann theoretisch beeinflusst werden. Der Transkriptionsfaktor GAL4 der Hefe überwindet vermutlich die zeitlimitierende Anlagerung des TFIIB an den TFIID durch gleichzeitige Bindung an beide Faktoren. Weil dem TFIIB nun zwei unabhängige Bindungsstellen zur Verfügung stehen, ist die Reaktion kinetisch begünstigt. Der Faktor GAL4 ist auch ein gutes Beispiel für den modularen Aufbau der Transkriptionsfaktoren. Zwei Sekundärstrukturen, eine für die Bindung an die Regulator-Sequenzen und eine für die Bindung an die allgemeinen Transkriptionsfaktoren (saure Aktivierungsdomäne), konnten als wechselwirkende Domänen durch Protein-Hybrid-Experimente eindeutig bestimmt werden¹⁸.

¹⁷ Nichols und Nimer, 1992

¹⁸ Alberts et al., 1995

1.1.4.1. CREB und CREM

Die transkriptionelle Regulation der Genexpression ist eine wichtige Komponente zellulärer Veränderungen, die durch Second-Messenger Transduktionswege als Antwort auf extrazelluläre Stimuli hervorgerufen werden. Der Second-Messenger zyklisches Adenosin Monophosphat (cAMP) reguliert eine Vielzahl physiologischer Prozesse durch Veränderung des basalen Genexpressionsmusters. Dazu gehören beispielsweise der Glukosestoffwechsel, die Wachstumsfaktor-abhängige zelluläre Proliferation und neuronale Signale (Bedeutung beim Lernen und der Erinnerung). An G-Protein gekoppelte Rezeptoren regulieren den Adenylatzyklase- und somit auch den cAMP-Spiegel. In Eukaryonten wirkt cAMP über die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA); cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit des tetrameren Enzyms und setzt eine katalytische Untereinheit frei. Diese wandert in den Zellkern und kann dort Substrate wie CREB (*cAMP-response element binding protein*) phosphorylieren und dadurch aktivieren¹⁹.

CREB und CREM (*cAMP-response element modulator*) gehören zusammen mit ATF-1 (*activating transcription factor 1*) zu einer Subfamilie der Genfamilie der *cAMP responsive element* (CRE) bindenden Transkriptionsfaktoren^{20, 21}. Die CREB/CREM-Subfamilie ist dabei charakterisiert durch ein Motiv von vier konservierten Leucinresten in einer DNA-bindenden Domäne sowie ihre konservierten Phosphorylierungsstellen in einem regulatorischen Bereich. Ein weiteres Charakteristikum dieser Subfamilie ist die Präsenz einer konservierten Transaktivierungsdomäne. CRE ist eine Konsensusnukleotid-Sequenz der acht Basen 5'-TGACGTCA-3', die von Transkriptionsfaktoren der CREB/CREM-Familie erkannt und gebunden wird. Die Promotoren der Gene *c-fos*, Somatostatin, Tyrosinhydroxylase, DNA-Polymerase- β und Proenkephalin weisen CRE in ihren Promotoren auf²².

Für die transkriptionelle Aktivität von CREB ist seine Phosphorylierung von entscheidender Bedeutung. Als Antwort auf cAMP, Kalzium, Stress und mitogene Stimuli aktiviert die PKA CREB durch Phosphorylierung eines

¹⁹ Karin und Smeal, 1992

²⁰ Habener et al., 1995

²¹ Sassone-Corsi, 1995

²² Montminy et al., 1990

einzigem Serin an Position 133^{23, 24}. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Aktivierung der KID-Transaktivierungsdomäne durch Änderung ihrer Konformation, wodurch CREB effizienter mit der Transkriptionsmaschinerie interagieren kann²⁵. Die maximale Transkription nach Zugabe eines cAMP Agonisten wird nach 20-30 Minuten erreicht, dies entspricht analog der höchsten Konzentration an Serin133²⁶. CREB entfaltet Eigenschaften eines klassischen Enhancers, indem es die Transkription unabhängig von der Entfernung vom Promotor und der Orientierung stimuliert²⁷.

Mittlerweile sind einige Erkenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen Mitgliedern der CREB/ATF-1/CREM-Familie und klinisch bedeutender Viren, einschließlich Herpesviren, Adenoviren, Parvoviren, Hepadnaviren und Retroviren, gewonnen worden²⁸. Diese Transkriptionsfaktoren sind in der Lage an das Tax-responsive element-1 (TRE-1) innerhalb des HTLV-1 Promotors zu binden und dadurch die basale wie auch die Tax-vermittelte Transkription zu beeinflussen²⁹.

1.1.4.2. ICSBP

Das *Interferon consensus sequence binding protein* (ICSBP) wurde als ein 48 kD Protein mit etwa 45%iger Aminosäurehomologie zu den bis dahin bekannten Vertretern aus der *Interferon response factor-* (IRF-) Familie, dem IRF-1 und dem IRF-2, beschrieben. Das murine ICSBP-Gen befindet sich auf dem Chromosom 8, erstreckt sich über 21 kb und ist in neun Exons unterteilt³⁰. Das neunte Exon, das zum großen Teil für einen nicht translatierten Bereich codiert, enthält drei potentielle poly (A)⁺-Signale. Vermutlich entstehen durch die unterschiedliche Nutzung dieser Signale bei der Transkription des ICSBP-Gens zwei unterschiedlich lange mRNA-Moleküle (3,0 und 1,7 kb). Die Expression

²³ Yamamoto et al., 1988

²⁴ Gonzales und Montminy, 1989

²⁵ Karin und Smeal, 1992

²⁶ Mayr und Montminy, 2001

²⁷ Montminy et al., 1990

²⁸ Gilchrist et al., 1996

²⁹ Newbound et al., 1999

³⁰ Kanno et al., 1993

des ICSBP ist weitgehend auf Zellen lymphoiden und monozytären Ursprungs limitiert³¹. Zwar ist die Expression zumindest in B-Lymphozyten und Makrophagen konstitutiv, doch lässt sie sich deutlich durch IFN- γ stimulieren^{31, 32}.

Das ICSBP bindet nach einem ähnlichem Prinzip wie die anderen Mitglieder aus der IRF-Familie an die *Interferon stimulated response element-* (ISRE-) Motive innerhalb der regulatorischen Sequenzen. Detaillierte Reporterstudien zeigten, dass das ICSBP ein Negativregulator von IFN-induzierten Genen ist³³. Wichtig für die DNA-Bindung des ICSBP sind die N-terminal gelegenen 115 Aminosäuren³¹. Das ICSBP ist allerdings ein sehr schwaches DNA-Bindungsprotein, es bedarf zur Bildung eines effektiveren ICSBP/DNA-Komplexes vielmehr der zusätzlichen Interaktion weiterer Proteine. So wurden bisher IRF-1, IRF-2³⁴ und PU.1³⁵ als Bindungspartner von ICSBP identifiziert.

1.1.4.3. Das Myc/Max/Mad-Netzwerk von Transkriptionsfaktoren

Die Proteine des Myc/Max/Mad-Netzwerkes spielen eine essentielle Rolle in der Regulation von Proliferation und Differenzierung, während Myc-Proteine das Zellwachstum positiv regulieren, beeinflussen Mad-Proteine es negativ. Das erste Mitglied der Myc-Familie wurde zunächst als virales Onkogen (v-myc) identifiziert. Bei den zellulären myc-Genen, zu dem die verwandten Gene c-myc, N-myc und L-myc gehören, handelt es sich um Proto-Onkogene, die durch deregulierte Expression oder Überexpression zu Onkogenen werden³⁶. Bei der Familie der Mad-Proteine handelt es sich um potentielle Tumorsuppressorgene, wobei der Verlust der Funktion die Transformation bewirkt.

In einer Vielzahl von Tumoren ist c-myc aufgrund chromosomaler Translokationen, Genamplifikationen und retroviraler Insertionen konstitutiv oder in großen Mengen exprimiert. c-Myc übt in verschiedenen zellulären Systemen unterschiedliche Funktionen aus, u. a. bewirkt es die Induktion der S-Phase, die Inhibition der Differenzierung und die Induktion der Apoptose und

³¹ Driggers et al., 1990

³² Politis et al., 1994

³³ Nelson et al., 1993

³⁴ Bovolenta et al., 1994

³⁵ Brass et al., 1996

³⁶ Henrikson und Lüschen, 1996

ist *in vitro* an der Zelltransformation beteiligt. c-Myc ist essentiell für das Durchlaufen der G1-Phase des Zellzyklus³⁷ und kann in ruhenden Zellen den Eintritt in die S-Phase erzwingen³⁸. c-Myc homodimerisiert bei physiologischen Konzentrationen nicht und bindet alleine auch nicht an DNA. Wegen Homologien von c-Myc am C-Terminus zu Mitgliedern der basische Region/ Helix-Loop-Helix-Familie von Transkriptionsfaktoren wurde daher vermutet, dass c-Myc wie diese heterodimerisieren und so spezifisch an DNA bindet³⁹. Auf der Suche nach einem Partnerprotein wurde Max (*myc-associated x factor*) identifiziert und gezeigt, dass c-Myc und Max *in vivo* assoziieren^{40, 41} und dass diese Interaktion notwendig ist für alle zuvor beschriebenen biologischen Funktionen von c-Myc^{42, 43}.

Die Funktion von c-Myc wird aber nicht nur durch Proteine, die direkt an c-Myc binden, reguliert, sondern auch indirekt über Proteine, die mit Max assoziieren. Dazu zählen die Mitglieder der Mad-Familie, die zur Zeit aus den Proteinen Mad-1, Mxi-1, Mad3 und Mad4 besteht, und die ebenfalls mit Max heterodimerisieren⁴⁴⁻⁴⁶. Zusammenfassend werden diese vier Proteine als Mad-Proteine bezeichnet.

Max ist die zentrale Komponente dieses Myc/Max/Mad-Netzwerkes, da es mit Myc und den Mad-Proteinen heterodimerisieren kann und als einziges Mitglied dieses Netzwerkes auch Homodimere bilden kann^{41, 43, 47}. Zusätzlich ist Max mit einer Halbwertszeit von 12 Stunden im Gegensatz zu c-Myc und Mad (20 min bzw. 30-45 min) sehr stabil.

³⁷ Heikkila et al., 1987

³⁸ Eilers et al., 1991

³⁹ Blackwell et al., 1990

⁴⁰ Blackwood et Eisenman 1991

⁴¹ Prendergast et al., 1991

⁴² Amati et al., 1993

⁴³ Kato et al., 1992

⁴⁴ Ayer et al., 1993

⁴⁵ Zervos et al., 1993

⁴⁶ Hurlin et al., 1995

⁴⁷ Blackwood et al., 1991

1.1.4.4. NF- κ B

Der nukleäre Faktor kappa B (NF- κ B) wurde bereits 1986 im Labor von David Baltimore als ein Regulator der Expression des Gens für die kappa Leicht-Kette des Immunglobulins in murinen B-Lymphozyten entdeckt⁴⁸. Mittlerweile hat man herausgefunden, dass dieser Transkriptionsfaktor ubiquitär vorkommt und als Genschalter und zentraler Koordinator der menschlichen Immunantwort fungiert⁴⁹. In den meisten Zelltypen liegt NF- κ B in einer inaktiven, zytoplasmatischen Form vor⁵⁰. Diese besteht aus drei Untereinheiten: zwei DNA-bindenden Untereinheiten, wobei am häufigsten p50 und p65 (auch RelA genannt) vorkommen, sowie der inhibitorischen Untereinheit I κ B⁵⁰.

Die Aktivierung der zytoplasmatischen Form von NF- κ B erfolgt durch die Stimulation der Zelle mit pathogenen Signalen⁵¹. Zu diesen Signalen gehören virale und bakterielle Infektionen, energiereiche Strahlung (UV-, γ -Strahlung), inflammatorische Zytokine und andere.

Der 700-900 kDa große Proteinkomplex IKK (I κ B Kinase) phosphoryliert I κ B und nimmt damit als Hauptregulator eine Schlüsselposition bei der NF- κ B-Aktivierung ein⁵². Nach der Phosphorylierung des I κ B wird dieses polyubiquitinyliert und so für den Abbau durch das 26S-Proteosom markiert⁵³. Nach der Degradation von I κ B ist die NLS (engl.: *nuclear localisation sequence*) von NF- κ B nicht länger maskiert. Erst jetzt kann die Bindung von Karyopherinen und die anschließende Translokation des aktivierten NF- κ B-Dimers in den Zellkern erfolgen. Dort wird durch die Bindung an κ B-Motive in Promotor- und Enhancersequenzen die Bildung neuer mRNA initiiert. Den Zielgenen von NF- κ B ist gemeinsam, dass sie eine oder mehrere hochaffine Bindestellen mit der Konsensussequenz GGGRNNYYCC in ihren genregulatorischen Elementen besitzen, wobei R für ein Purin, Y für ein Pyrimidin und N für eine x-beliebige Aminosäure steht⁵⁴. Da konstitutiv aktiviertes NF- κ B für die Zelle schädlich ist

⁴⁸ Sen und Baltimore, 1986

⁴⁹ Pahl und Bäumler, 1997

⁵⁰ Bäumler und Baltimore, 1988

⁵¹ Zur Übersicht siehe Pahl, 1999

⁵² Karin und Delhase, 2000

⁵³ Verna et al., 1995

⁵⁴ Baldwin, Jr, 1996

gibt es eine negative Feedback-Regulation, bei der I κ B eine wichtige Rolle spielt. So ist aktiviertes NF- κ B in der Lage, mit zeitlicher Verzögerung die Expression des Gens für I κ B zu induzieren⁵⁵. Neu synthetisierte I κ B Moleküle wandern in den Zellkern und binden an NF- κ B, wodurch das Dimer infolge einer höheren Affinität zu seinem Inhibitor von der DNA dissoziiert. Danach erfolgt mit Hilfe der Zellkern-Exportsequenz NES (engl.: *nuclear export sequence*) von I κ B der Transport des Trimer in das Zytoplasma der Zelle⁵⁶.

⁵⁵ Sun et al., 1993

⁵⁶ Arenzana-Seisdedos et al., 1997

1.2. Monozyten / Makrophagen

Bei der Erkennung körperfremder Stoffe, insbesondere Krankheitserreger, und deren Elimination spielt das Immunsystem eine entscheidende Rolle. Das menschliche Immunsystem besteht aus annähernd 1 Billion Zellen mit einem Gesamtgewicht von etwa 1 kg, die über den ganzen Organismus verteilt sind. Funktionsträger der unspezifischen Immunabwehr sind hauptsächlich Granulozyten und Makrophagen, die als erste Abwehrfront nach der Invasion verschiedenster Keime aktiv werden.

1.2.1. Ursprung und Struktur der Monozyten / Makrophagen

Durch Phagozytose kann das mononukleäre Phagozyten-System (MPS; früher als retikuloendotheliales System bezeichnet) körperfremde Strukturen, die Antigene eliminieren. Darüber hinaus sind Zellen des MPS in der Lage, den Lymphozyten die Antigene zu präsentieren und damit die spezifische Immunantwort zu initiieren. Das MPS besteht aus Promonozyten und deren Vorläufern im Knochenmark, Monozyten in der Zirkulation und Gewebsmakrophagen.

Alle hämatopoetischen Zellpopulationen stammen von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ab. Diese wiederum sind aus dem embryonalen Mesenchym abgeleitet. Unter dem Einfluß von Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren ("colony-stimulating factors", CSFs), welche die weitere Zellteilung und -differenzierung steuern, entwickeln sich aus den pluripotenten Zellen lymphozytäre und myeloische Stammzellen.

Unter dem Einfluß des Faktors Multi-CSF (IL-3) gliedert sich die myeloische Zellreihe in vier Entwicklungslinien auf: die erythrozytäre Linie, die megakaryozytäre Linie, die Linie der eosinophilen Granulozyten und die granulozytär-monozytäre Linie. Ausgangszellen der letzten Linie sind die sogenannten CFU-GMs ("colony-forming unit granulocyte macrophages"). Unter der Einwirkung von M-CSF (Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) entwickeln sie sich im Knochenmark zu Monoblasten. G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) jedoch läßt sie zu Myeloblasten werden. Monoblasten differenzieren sich zu Promonozyten und werden sofort nach deren letzter Teilung als

Monozyten in die Zirkulation entlassen. Aus den Myeloblasten werden schließlich neutrophile und basophile Granulozyten.

Der Monozyt ist die größte Zelle des Blutes und hat einen Durchmesser von etwa 15 μm . Er hat eine unregelmäßige Zellbegrenzung, Vakuolen als Zeichen einer gut ausgebildeten Phagozytosefähigkeit, einen meist eingebuchteten bzw. mehrfach gelappten, ovalen oder nierenförmigen Kern, ein locker strukturiertes Chromatin und ein Zytoplasma mit azurophilen Granula. Werden Monozyten aus dem Blut isoliert und in ein Kulturgefäß gegeben, adhärieren sie und breiten sich über die Oberfläche aus.

Im Blut eines Erwachsenen zirkulieren etwa $1,7 \times 10^9$ Monozyten und bilden damit 1-6% aller Leukozyten.

Es sollte betont werden, dass Monozyten keine unreifen Vorläuferzellen sind, sondern gut phagozytieren können, zytotoxische Aktivität entfalten und viele biologische Mediatoren sezernieren⁵⁷. Monozyten sind auch Progenitorzellen für die Mehrzahl der dendritischen Zellen.

Ungefähr 20-30 Stunden lang zirkulieren Monozyten im Blut. Ständig findet eine Migration von Monozyten aus dem Blutkreislauf in das umliegende Gewebe statt, hier wandeln sie sich zu Makrophagen um.

Makrophagen unterscheiden sich von Monozyten in ihren Enzymaktivitäten, ihren phagozytischen Kapazitäten und ihren Zelloberflächen-Charakteristika. Sie zeichnen sich aus durch spezifische Rezeptoren auf der Zellmembran, wie beispielsweise Rezeptoren für Immunglobuline (IgG, IgM, IgE), Komplement-Faktoren (C3b, C5a), $\text{IFN-}\gamma$, IL-1, IL-6, $\text{TNF-}\alpha$, GM-CSF, M-CSF, Lipoproteine, Peptide und Polysaccharide.

Zu den weitgehend ortständigen Makrophagen werden gezählt: die *Histiozyten* im Bindegewebe unter der Haut und um die Muskeln herum, die *Uferzellen* in der Milz, die *von-Kupffer-Sternzellen* in der Leber, die *Mikroglia* im Zentralen Nervensystem, die *Alveolarmakrophagen* in der Lunge, die *Osteoklasten* im Knochengewebe sowie die *Ammenzellen* in den erythropoetischen Inseln des Knochenmarks. Andere Makrophagen (Gewebsmakrophagen) sind nicht fest in den Geweben lokalisiert.

⁵⁷ Gemsa et al., 1997

1.2.2. Funktionen der mononukleären Phagozyten

Durch Phagozytose und nachfolgenden Abbau sind die Zellen des MPS die erste Instanz der Abwehr gegen körperfremde Substanzen, dienen aber auch der Beseitigung körpereigener Stoffe. Sie sind somit ein wichtiger Bestandteil bei der Abwehr von Krankheitserregern. Bei einer Primärreaktion mit Viren spielt dieses Abwehrsystem in den ersten Tagen die entscheidende Rolle, bis sich die Reaktion des spezifischen Immunsystems ausgebildet hat⁵⁸.

Es bestehen jedoch auch wichtige Interaktionen zwischen dem MPS und dem spezifischen Immunsystem: Makrophagen sind antigen-präsentierende Zellen und können Monokine sezernieren. Mit Hilfe dieser Mediatoren induzieren sie die spezifische Immunantwort durch Aktivierung von T-Lymphozyten. Letztere wiederum sezernieren Produkte zur B-Lymphozyten- und Makrophagen-Aktivierung. Die gegenseitige Regulation von Zellen des unspezifischen und des spezifischen Abwehrsystems erfolgt über komplizierte Vernetzungen, die über Oberflächenmoleküle und Zytokine vermittelt werden.

Die Hauptfunktionen der Makrophagen sind:

1. Endozytose von Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Parasiten), geschädigten Zellen, gealterten Erythrozyten und Immunkomplexen.
2. Zytotoxizität gegenüber Parasiten, Tumorzellen, transplantierten Zellen und virusinfizierten Zellen.
3. Sekretion einer Vielzahl von Substanzen (Tab. 1).
4. Immunregulation (Kooperation mit Lymphozyten über Antigenprozessierung und -präsentation, Sekretion von Monokinen, unspezifische Immunsuppression).

1.2.3. Aktivierung von Makrophagen

Makrophagen existieren in drei verschiedenen Stadien: ruhend, voraktiviert ("primed") und aktiviert ("triggered"). Der höchste Aktivierungsgrad wird in

⁵⁸ Mogensen, 1979

der Regel erst durch die Einwirkung zweier Signale erreicht^{59, 60}. Als Faktoren zur Voraktivierung ("Priming") ruhender Makrophagen können IFN- γ und andere Lymphokine, sowie Hormone, Entzündungsmediatoren und exogene Substanzen wirken. Eine Aktivierung von Makrophagen kann Lipopolysaccharid (LPS) oder ein zweites Zytokin wie TNF- α verursachen^{61, 62}.

1.2.4. Sekretorische Produkte von Makrophagen

Makrophagen zählen zu den sekretorisch aktivsten Zellpopulationen. Sie sind in der Lage, ungefähr 100 verschiedene Produkte - teils konstitutiv, teils nach Aktivierung - zu produzieren. Eine Übersicht über die wichtigsten Produkte zeigt Tab. 1.

Enzyme: - Elastase, Kollagenase, Lysozym, Plasminogenaktivator

Proteine, die in Abwehr und Entzündung involviert sind:

- C2, C3, C4, C5, Faktor B und D, Faktor H und I
- Interferon- α und - β
- Fibronectin

Faktoren zur Wachstumsregulation:

- G-CSF, GM-CSF, M-CSF

Zytokine, die Entzündung fördern und Lymphozytenantwort regulieren:

- IL-1, IL-6, IL-8, IL-12
- TNF- α , TNF- β

Inhibitorische Zytokine:

- IL-10; TGF- β 1, -2, -3; IL-1 Rezeptor-Antagonist

Tab. 1: Eine Auswahl sekretorischer Makrophagen-Produkte⁶³.

⁵⁹ Gemsa und Kozan, 1984

⁶⁰ Hamilton und Adams, 1987

⁶¹ Gong et al., 1991

⁶² Sprenger et al., 1994

⁶³ Paul, 1993

1.3. Influenza A Viren

Klinisch sind die Influenzaviren von großer Bedeutung. Schon in der Antike wurden Epidemien beobachtet, die retrospektiv Influenzavirus-Infektionen zugeordnet werden können. Doch erst mit der Isolierung dieser Erreger im Jahre 1933⁶⁴ wurde es möglich, systematisch die mit diesen Viren assoziierten Erkrankungen zu analysieren. In den Vereinigten Staaten ist Influenza für bis zu 70.000 Todesfälle jährlich verantwortlich⁶⁵. Zweifellos sind Influenzaviren auch für weltweite Epidemien verantwortlich, wie z. B. die in den Jahren 1918/19 aufgetretene Pandemie, der schätzungsweise 20 bis 40 Millionen Menschen zum Opfer fielen.

1.3.1. Taxonomie und Einordnung des Virusstammes A/PR/8

Das Influenza Virus gehört zur Familie der Orthomyxoviridae. Beim Genus Influenza Virus unterscheidet man drei Typen: Influenza A, B und C. Influenza A ist das wichtigste und am häufigsten auftretende Influenzavirus. Die Typenklassifizierung erfolgt aufgrund unterschiedlicher Nukleoproteine (NP) und Membranproteine (M). Benannt werden die Subtypen von Influenza nach der Spezies der Erstisolation (diese entfällt beim Menschen), gefolgt von der Typenbezeichnung (A, B oder C), dem Ort der Isolation (z. B. PR für Puerto Rico), der Stammnummer und dem Jahr der Erstisolation. So wurde das Influenza Virus A/PR/8/34 erstmals 1934 in Puerto Rico isoliert.

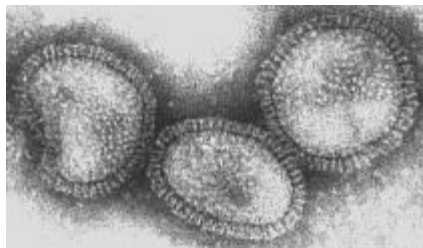


Abb. 3: Das Influenzavirus

⁶⁴ Smith et al., 1933

⁶⁵ Garfinkel et al., 1993

1.3.2. Struktur und Charakterisierung

Orthomyxoviren sind negative Einzelstrang-RNA Viren mit pleomorpher, kugeliger Gestalt, einem Durchmesser von 80-120 nm und helikaler Kapsid-symmetrie. Die Außenhülle des Influenza Virus stammt von der Zellmembran der Wirtszelle und stellt eine bei der Virusreifung von dieser übernommene Lipiddoppelschicht dar. Während die Innenseite der Außenhülle von dem viralen Membran- oder Matrixprotein (M) gebildet wird, finden sich auf der Oberfläche des Viruspartikels die stachelartig angeordneten Glykoproteine (Spikes) Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA; Abb. 3).

Gemeinsam mit dem Nukleoprotein (NP) bilden PB1, PB2 und PA den Nukleoprotein-RNA-Polymerase Komplex. Die Polymerasen bewirken sowohl die Transkription als auch die Replikation der viralen RNA. Weiterhin spalten sie neue zelluläre mRNAs ca. 12 Nukleotide stromabwärts vom 5'-Cap entfernt, um den für die virale mRNA-Synthese notwendigen Primer zu beschaffen (sogenanntes "cap-stealing")⁶⁶.

Das Hämagglutinin liegt als Trimer vor und erkennt ein Sialinsäure-enthaltendes Zelloberflächenmolekül. Es ist von entscheidender Bedeutung für die virale Penetration der Zellmembran nach der Endozytose. Voraussetzung dafür ist die proteolytische Spaltung eines jeden HA-Monomers in die Polypeptide HA1 und HA2, die durch eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Findet diese Spaltung nicht statt, ist das Influenza A Virus nicht infektiös.

Die Neuraminidase besteht aus einer einzigen Polypeptidkette und bewirkt eine Abspaltung terminaler Sialinsäuren von Oligosacchariden auf Zelloberflächen und Glykolipiden. Sie ist verantwortlich für das virale Durchdringen der Schleimschicht auf Epitheloberflächen, verhindert die Selbstaggregation von Viruspartikeln und erleichtert die Virusfreisetzung aus infizierten Zellen.

Darüber hinaus tragen die beiden viralen Oberflächenglykoproteine die wichtigen antigenen Determinanten, die die Ausbildung von humoralen und zellulären Immunreaktionen im infizierten Organismus bewirken.

Influenza A besitzt ein segmentiertes Genom. Jedes der 8 Gensegmente ist assoziiert mit einem eigenen Nukleokapsid und eigener Transkriptase. Die

⁶⁶ Fields, 1991

Segmente kodieren die folgenden 10 Proteine:

Segment	RNA Länge (nt)	Protein	Protein Länge (aa)	Anzahl pro Virion	Funktion
1	2341	PB2	759	30-60	Endonuklease, „Cap stehlen“ für virale mRNA
2	2341	PB1	757	30-60	RNA Polymerase (Replikase)
3	2233	PA	716	30-60	Unterstützt Synthese genomischer Virus RNA
4	1778	HA	566	500	Hämagglutinin; nach Spaltung in HA1 und HA2 auch Fusionsprotein
5	1565	NP	498	1000	Nukleokapsid-Protein, fördert Transport der RNA-Segmente in den Zellkern, später Synthese und Verpackung der neuen RNA ⁶⁷
6	1413	NA	454	100	Neuraminidase für Freisetzung. Zielmolekül für Neuraminidase-Hemmer
7	1027	M1	252	3000	Matrixprotein bildet Schicht innen an Virus-Envelope
	Gespleist	M2	97	20-60	Protonenkanal in Zell- und Virusmembran zur pH-Senkung. Zielmolekül für das Medikament Amantadin
8	890	NS1	230	0	Einziges Nichtstrukturprotein, bindet RNA, fördert Virus-Proteinsynthese durch Bindung an Initiationsfaktor
	Gespleist	NS2	121	130-200	Bindet an M1, wirkt auf NS1 Synthese

Tab. 2: Influenza A Virus-Proteine

⁶⁷ Fields und Knipe, 1991

1.3.3. Vermehrungszyklus

Die Adsorption der Influenza Viren an Wirtszellen erfolgt über eine Bindungsstelle im HA1. Diese erkennt sialinsäurehaltige Proteine oder Lipide auf der Zelloberfläche. Nach rezeptorvermittelter Endozytose gelangt das Virus in ein Endolysosom, in dem das Milieu angesäuert wird (pH 5). Die dadurch verursachte Konformationsänderung des HA2 führt zur Freilegung unpolarer Aminosäuren am N-Terminus. Nachfolgend können die viralen und zellulären Membranen miteinander verschmelzen. Das Nukleokapsid gelangt daraufhin in das Zytoplasma der Zelle. Unter Mithilfe von M2 wird die RNA freigesetzt (uncoating), indem die Nukleoproteine von ihr abgetrennt werden.

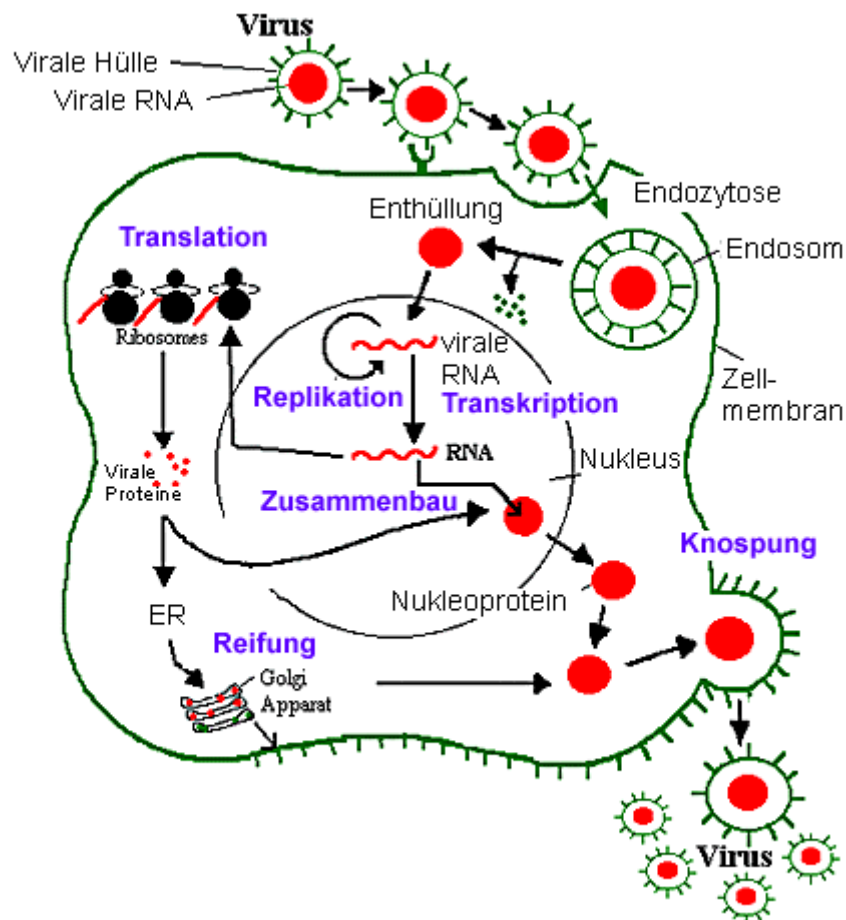


Abb. 4: Replikationszyklus des Influenzavirus

Als Negativstrang RNA Virus wird die Transkription des Influenza Virus hauptsächlich durch den viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Komplex

durchgeführt. Allerdings ist er nicht in der Lage, die mRNA-Synthese zu initiieren oder das 5'-Ende von mRNA-Molekülen durch Capping und Methylierung zu modifizieren. Daher benötigt der initiale Schritt der mRNA-Synthese einen Primer in Form eines 5'-Cap-Endes. Der virale Polymerasekomplex spaltet diese Struktur von wirtseigener, zellulärer mRNA ab und zwar ca. 12 Nukleotide stromaufwärts vom 5'-Cap entfernt. Anschließend verwendet er diesen Primer zur Herstellung der mRNA. Die fertige virale mRNA wird in das Zytoplasma transportiert, wo dann an den Ribosomen die Translation erfolgt.

Wahrscheinlich bewirken die meisten oder alle der Proteine, die die Influenza mRNA Segmente transkribieren, auch die Replikation. Die ersten Produkte der replikativen RNA-Synthese sind komplementäre Kopien aller viralen RNA-Segmente. Diese Positivstrang-Kopien unterscheiden sich von den Positivstrang-Transkripten (mRNAs) durch die Struktur ihrer Enden: Den Kopien fehlt sowohl das Cap als auch der Poly(A)-Schwanz. Sie dienen als Matrizen für die Produktion von Minusstrang-RNA-Segmenten, die identisch sind mit der ursprünglichen viralen RNA.

Die Glykoproteine HA und NA werden am rauhen ER (endoplasmatischen Retikulum) translatiert. Die Glykosilierung findet im Lumen des ER statt und wird im Golgi-Apparat vervollständigt bzw. modifiziert. Wegen des ständigen Membranflusses werden die Golgi-Vesikel in die Zellmembran eingebaut, so dass sich dort Bereiche der entstehenden Virushülle formen. Die übrigen Virusproteine werden im Zytoplasma an freien Ribosomen hergestellt.

Das NP wandert in den Zellkern und es kommt zum Zusammenbau des Nukleokapsids (zusammen mit den Retroviren sind die Orthomyxoviren die einzigen RNA Viren, deren Nukleokapsid im Zellkern und nicht im Zytoplasma entsteht).

An der Innenseite der Plasmamembran lassen sich die M-Proteine nachweisen, die an die HA-Moleküle gebunden sind. Sie haben die Funktion, beim Zusammenbau des Virions den Kontakt zwischen den viralen Glykoproteinen in der Membran und dem Nukleokapsid zu vermitteln.

In der Regel lagern sich von jedem der 8 Gensegmente je eine Kopie vor der Abschnürung der Virionen zusammen. Die Abknospung der Viruspartikel

(budding) am apikalen Zellpol wird durch enzymatische Aktivität der NA unterstützt⁶⁸.

1.3.4. Antigen drift und Antigen shift

Influenzaviren des Typs A können wegen ihrer starken antigenischen Variabilität immer wieder Epidemien hervorrufen, indem neu auftretende Virustypen auf eine nicht-immune Bevölkerung treffen. Fortwährend kommt es zu kleineren Antigenveränderungen (Antigen drift), die erklärt werden durch Selektion von Punktmutanten im HA unter immunologischem Druck, zumal nur Antikörper gegen das HA einen vollständigen Infektionsschutz gewährleisten. Größere genetische Veränderungen hingegen resultieren aus dem Antigen shift. Mit diesem Begriff bezeichnet man den Austausch von kompletten RNA-Gensegmenten (Reassortment) zwischen verschiedenen Influenzastämmen bei Doppelinfektion einer Zelle. Aufgrund des segmentierten Genoms tritt dieses Ereignis erheblich häufiger auf als eine "klassische" genetische Rekombination.

1.3.5. Krankheitsbild

Nach zumeist ein- bis dreitägiger Inkubation beginnt die Krankheit plötzlich mit Frösteln, Fieber, Appetitlosigkeit, Kopfschmerzen, Abgeschlagenheit und Muskelschmerzen. Danach kommt es infolge eines Reizzustandes in Rachenraum, Kehlkopf und Luftröhre zu Heiserkeit und zu einer dunklen Rötung des Rachens sowie Schmerzen hinter dem Brustbein (deszendierende Tracheobronchitis). Der Husten liefert primär meist wenig Auswurf. Der Gipfel der Temperatur (39-40°C) wird meist schon am ersten Krankheitstag erreicht. Nasennebenhöhlen- und Mittelohrentzündung können hinzutreten. Bei Kindern werden Fieberkrämpfe und nicht selten auch gastrointestinale Symptome beobachtet. Zu Beginn ist eine mehr oder weniger ausgeprägte Leukopenie häufig. An den Lungen ist klinisch meist kein Befund zu erheben, röntgenologisch finden sich oft flüchtige Verschattungen. Die am meisten

⁶⁸ Fields und Knipe, 1991

gefürchteten Verlaufsformen sind der perakute Todesfall bei Jugendlichen und jüngeren Erwachsenen innerhalb weniger Stunden und die primäre Influenzaviruspneumonie. Ansteckungsfähigkeit besteht bei Erwachsenen wahrscheinlich bis zum 5. Tag nach Krankheitsbeginn. Kleinkinder können den Erreger auch länger ausscheiden.

Die Mehrzahl der Fälle verläuft ohne Komplikationen und klingt nach 4-8 Tagen mit allmählicher Entfieberung ab. Gefürchtet sind perakute Verlaufsformen, die entweder durch akutes Herz-Kreislaufversagen oder infolge einer hämorrhagischen Viruspneumonie innerhalb von 24-48 Stunden zum Tode führen. Die meisten schweren Verläufe werden jedoch durch bakterielle Superinfektionen, am häufigsten anzutreffen sind hier *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae*⁶⁹, oder durch eine bestehende Grundkrankheit bestimmt. Ältere Personen und Patienten mit einer Einschränkung der Lungenfunktion (z. B. chronische Bronchitis, Emphysem, Bronchiektasen, Asthma bronchiale, Lungen-Tbc, Kyphoskoliose) sind dadurch besonders gefährdet, desgleichen Personen mit angeborenen und erworbenen Herzkrankheiten, vor allem mit Mitralstenose, Koronarsklerose und Bluthochdruck.

1.3.6. Therapie und Prophylaxe

Die Behandlung erfolgt weitgehend symptomatisch. Die Möglichkeiten einer spezifischen Therapie sind sehr begrenzt. Mit Amantadin, dessen Wirkung ausschließlich auf Influenzaviren des Typs A begrenzt ist, können Krankheitsverlauf und -dauer günstig beeinflusst werden. Allerdings muss mit der Medikation spätestens 48 Stunden nach Krankheitsausbruch begonnen werden. Seit 1999 steht mit dem Neuraminidase-Inhibitor Zanamivir (Relenza®) ein weiteres Virustatikum zur Verfügung. Bakterielle Komplikationen werden mit Antibiotika behandelt.

Als Prophylaxe steht eine aktive Immunisierung aus inaktivierten Krankheitserregern (Spalt- und Subunitimpfstoffe) zur Verfügung, die vor Beginn der „Erkältungssaison“ (September, Oktober) verabreicht werden sollte.

⁶⁹ Schwarzmann et al., 1971

1.4. Interaktionen von Viren mit mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen sind wesentlich in die unspezifische Immunabwehr eines Organismus gegen virale Infektionen einbezogen. Generell unterscheidet man bei den Reaktionen mononukleärer Phagozyten gegenüber einer Virusinfektion zwei Kategorien: eine virusunspezifische "intrinsische Aktivität" gegen intrazelluläre Viren nach Infektion oder Phagozytose und eine "extrinsische Aktivität" gegen extrazelluläre Viren oder andere virusinfizierte Zellen^{70, 71}.

Extrinsische Interaktionen umfassen die extrazelluläre Inaktivierung von Viruserregern sowie die Unterdrückung der Virusvermehrung in anderen Zelltypen. Sie bestehen beispielsweise darin, infizierte Zellen vor der Freisetzung infektiöser Viren zu phagozytieren, die Virusreifung zu verhindern, extrazelluläre Viren durch Enzyme oder Sauerstoffmetabolite zu inaktivieren oder Interferone freizusetzen.

Intrinsische Aktivität bedeutet, dass mononukleäre Phagozyten zwar im allgemeinen infizierbar sind, es jedoch zu keiner nennenswerten Virusvermehrung kommt. Diese Form der Interaktion ist bisher allerdings nur wenig erforscht.

Eine Modifikation der antiviralen Wirkung von Makrophagen kann indirekt durch Lymphozyten, Antikörper, Komplement oder Lymphokine vermittelt werden. Die Hemmung der Virusreplikation durch extrinsische Resistenzmechanismen der Makrophagen konnten beispielsweise für HSV, CMV, EMCV und VSV beschrieben werden^{70, 72, 73}. Dagegen ist eine lytische Infektion dieser Zellen eher die Ausnahme. Im Hinblick auf den Differenzierungsgrad von Makrophagenkulturen wurde festgestellt, dass *in vitro* gealterte Makrophagen offensichtlich permissiver für bestimmte Viren sind, wie zum Beispiel für HSV⁷². Einige Viren (z. B. Sendaivirus) können mononukleäre Phagozyten persistent infizieren, ohne dass zelluläre zytopathische Veränderungen ausgeprägt werden⁷⁵. Dadurch werden Zellen zum Virusreservoir, die eigentlich wesentlich

⁷⁰ Stohlman et al., 1982

⁷¹ Morahan et al., 1985

⁷² Morahan und Miller, 1984

⁷³ Rager-Zisman et al., 1982

⁷⁴ Görtz, 1984

⁷⁵ Mills, 1979

in die unspezifische Immunabwehr eines Organismus einbezogen sind und fördern die Ausbreitung der Krankheitserreger im Körper. Virusinfektionen können bei Makrophagen ein breites Spektrum an funktionellen Veränderungen bewirken⁷⁶. Dazu zählen unter anderem die Beeinträchtigung der Chemotaxis, der Antigenpräsentation, der Zelldifferenzierung, der Phagozytose und der DNA-Synthese. Aber auch metabolische Veränderungen, die die Synthese und Freisetzung von Prostaglandinen, Proteasen, Komplementfaktoren und Zytokinen beeinflussen können, sind zu beobachten^{77, 78}.

1.4.1. Wechselwirkungen zwischen Influenza A Viren und Makrophagen

Influenza Virus-Infektionen von Makrophagen können sich unterschiedlich auf deren Phagozytosefähigkeit auswirken. Diese Viren infizieren abortiv murine Alveolar-Makrophagen und einen Teil der Peritoneal-Makrophagen *in vitro*, ohne die Phagozytenfunktion zu beeinträchtigen^{79, 80}. Nach einer *in vivo*-Infektion von murinen Makrophagen dagegen werden Einschränkungen der Phagozytosefähigkeit gefunden⁸¹. Die Aktivierung von Peritonealmakrophagen durch Interferon bewirkt eine effektive extrinsische Aktivität gegenüber virusinfizierten Zielzellen⁸².

Im humanen System sind ebenfalls Beeinträchtigungen verschiedener Effektorleistungen festgestellt worden: Die Infektion humaner Monozyten vermindert ihre chemotaktische Reaktion, ihre Phagozytose und ihre Fähigkeit zur intrazellulären Abtötung von *Candida albicans*, während die Zelladhäsion unbeeinflusst blieb⁸³. Verschiedene lösliche Faktoren von infizierten humanen Alveolar-Makrophagen werden für die Entstehung u. a. von Lungenfibrosen nach einer langen, Influenzavirus-bedingten Alveolitis verantwortlich gemacht⁸⁴.

⁷⁷ Morahan et al., 1985

⁷⁸ McChesney und Oldstone, 1987

⁷⁹ Nugent und Pesanti, 1979 und 1982

⁸⁰ Rodgers und Mims, 1981

⁸¹ Jakab et al., 1980

⁸² Mak und Ada, 1984

⁸³ Gardner und Lawton, 1982

⁸⁴ Jennings et al., 1984

Bakterielle Superinfektionen induzieren durch Endotoxin $\text{TNF-}\alpha$ ⁸⁵. Vermutlich ist $\text{TNF-}\alpha$ als Mediator des Fiebers oder der Fibrose von Bedeutung.

1.4.1.1. Zytokinmuster in A/PR/8-infizierten mononukleären Phagozyten

Viele Zytokine aktivieren Monozyten und Makrophagen. Diese Funktion ist bei der Verteidigung des Körpers gegen eindringende Mikroorganismen von essentieller Bedeutung. Mittlerweile ist auch bei einigen Viren gefunden worden, dass sie die Zytokin-Produktion stimulieren. Die Virus-stimulierte Zytokin-Synthese spielt eine wichtige Rolle bei akuter und chronischer Entzündung, sowie bei der Initiation von Virus-spezifischen Lymphozyten-Antworten.

Folgende Zytokine werden beispielsweise bei Infektion von Monozyten oder Makrophagen mit A/PR/8 freigesetzt: $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 und IL-6⁸⁵⁻⁸⁷. Jedoch ist bisher über die exakten Mechanismen, die die Transkription der Zytokingene anschalten, noch sehr wenig bekannt. Abgesehen von HIV⁹⁰ hat man nur sehr wenige Informationen über Virus-induzierbare Transkriptionsfaktoren oder sogenannte "virus-responsive elements" in den flankierenden Regionen der Zytokingene gefunden.

Humane Monozyten, Alveolarmakrophagen aus Ratten und murine Makrophagen sind empfänglich für eine Influenza A Virus-Infektion. A/PR/8 infiziert diese Makrophagen-Zelltypen nicht abortiv, sondern sogar produktiv⁸⁵.

Replizierende Influenza A Viren bewirken eine Lyse der infizierten Zellen⁸⁸. Schon innerhalb eines Tages nach der Infektion mit 2 MOI A/PR/8 sterben *in vitro* etwa 50% der humanen Monozyten⁸⁹.

Eine Infektion von humanen Monozyten mit A/PR/8 stimuliert die Expression einer Reihe von Zytokinen: Dieses Virus induziert die Freisetzung von $\text{IFN-}\alpha$ und aktiviert die $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β und IL-6 Gentranskription. Die Akkumulation der mRNA der zuletzt genannten drei Zytokine kann noch verstärkt werden durch

⁸⁵ Nain et al., 1990

⁸⁶ Roberts et al., 1986

⁸⁷ Sprenger et al., 1994

⁸⁸ Kilbourne, 1987

⁸⁹ Bender et al., 1993

⁹⁰ Griffin et al., 1989

Kostimulation der Zellen mit A/PR/8 und GM-CSF. Außerdem triggert die Kombination beider Stimuli eine effiziente Translation und Freisetzung der biologisch aktiven Proteine⁹¹.

In den letzten Jahren konzentrierten sich die meisten Studien über A/PR/8-bedingte Veränderungen der Zytokinexpression in Monozyten und Makrophagen auf TNF- α . Übereinstimmungen zwischen klinischen Symptomen einer Influenza A-Infektion und Wirkungen von TNF- α lassen eine Bedeutung dieses Proteins bei der viralen Infektion vermuten. Verschiedene Typen von mononukleären Phagozyten einschließlich der Monozyten antworten innerhalb von 3 h bis 9 h nach einer Influenza A Virus-Infektion (2 MOI) mit starker TNF- α -mRNA-Akkumulation. Diese wird offenbar sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch posttranskriptionell induziert. Das führt zu verstärkter TNF- α -Gentranskription auf der einen und zu verlängerter Halbwertszeit der TNF- α -mRNA auf der anderen Seite. Die mRNA-Akkumulation ist aber von einer nur geringen TNF- α -Produktion begleitet. Durch eine Influenza A Virus-Infektion werden Makrophagen vermutlich nur voraktiviert ("primed"). Zu einer starken TNF- α -Freisetzung kommt es dann erst bei Einwirkung von sekundären triggernden Signalen, wie zum Beispiel von LPS als bakteriellem Produkt⁹²⁻⁹⁴.

LPS bewirkt bei Makrophagen aber in jedem Fall eine Verstärkung der TNF- α -mRNA-Transkription und einen deutlichen Anstieg der TNF- α -Freisetzung^{91, 95}. Dies könnte ein Grund für die ernstesten klinischen Komplikationen sein, die sich bei einer Koinfektion von Influenza A Viren und Bakterien ergeben.

Es bleibt unklar, durch welchen genauen Mechanismus eine A/PR/8-Infektion die TNF- α -Gentranskription in mononukleären Phagozyten aktivieren kann. Eine denkbare Möglichkeit wäre, dass das Virus oder virale Produkte die TNF- α -Genexpression direkt über transkriptionelle Aktivatoren stimulieren⁹⁶.

⁹¹ Bender et al., 1993

⁹² Nain et al., 1990

⁹³ Gong et al., 1991

⁹⁴ Sprenger et al., 1994

⁹⁵ Peschke et al., 1993

⁹⁶ Leung et al., 1988

1.5. Zielsetzung

Das primäre Ziel vieler Viren nach der Infektion besteht in der Übernahme des zellulären Transkriptionsapparates. So können einige humanpathogene Viren Proteine bilden, die die zelluläre Transkription beeinflussen (aktivieren oder unterdrücken), wodurch das Virus direkt Einfluss auf die Differenzierung und das Wachstum der Zellen nimmt.

Das Influenza A Virus, welches sich in Epithelzellen und Leukozyten repliziert, reguliert die zellulären Transkriptions- und Translations-Systeme und ist in der Lage, Apoptose zu induzieren.

Eine Infektion mit Influenza A Virus führt zu einer Induktion chemotaktischer (RANTES, MIP-1 α , MCP-1, MCP-3 und IP-10), pro-inflammatorischer (IL-1 β , IL-6, IL-18 und TNF- α) und antiviraler (IFN α/β) Zytokine⁹⁷.

Über die molekularen Hintergründe der Aktivität regulierender Signaltransduktions-Moleküle der Zytokingenexpression in Influenza-infizierten Zellen ist allerdings noch wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Hypothese zu testen, dass die Übernahme des zellulären Transkriptionsapparates nach einer Influenza A Virus-Infektion durch die Regulation der Expression / Aktivierung zellulärer Transkriptionsfaktoren bedingt ist.

Zu diesem Zweck wurde die Genexpression der Transkriptionsfaktoren AP-1, CREB, CREM, ICSBP, Max, NF- κ B und TFIID in Influenza A Virus-infizierten murinen Makrophagen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion untersucht. Die Aktivität der Faktoren CREB und NF- κ B wurde ergänzend auf Proteinebene untersucht.

⁹⁷ Julkunen et al., 2001

2. Material & Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Tumorlinie PU5-1.8 (Maus-Makrophagenlinie)

Ursprünglich entstammte diese Makrophagenlinie einem spontanen Tumor der BALB/c-Maus und wird in der "Tumor Immunology Bank" der *American Type Culture Collection* (ATCC; Rockville, MD, USA) unter der Nummer TIB 61 geführt. Die Verdopplungszeit der unstimulierten und mykoplasmenfreien Kultur liegt bei ca. 16-24 h.

Als Dauerkultur wurde diese überwiegend adhärent wachsende Linie in 145 x 20 mm Petrischalen (Greiner, Frickenhausen) inkubiert und, vor der Übersäuerung des Mediums durch Stoffwechselprodukte, drei mal in der Woche subkultiviert. Nach Absaugen des Nährmediums wurden die Zellen einmal kurz mit 37°C warmen PBS^{def} gewaschen, um die nicht-adhärenenten Zellen und zweiwertige Ionen (Ca²⁺ und Mg²⁺) zu entfernen. Mit frischem RPMI^{sup} plus 5% FCS konnten die Makrophagen dann schonend suspendiert (kräftiges Losspülen der Makrophagen führte zu einer unerwünschten Voraktivierung) und, je nach Zelldichte, auf 2-3 neue Kulturschalen verteilt werden.

2.1.1.1. Zellkulturbedingungen

Die Zellkulturen wurden in einem begasteten Brutschrank (Heraeus) als offenes System bei 37°C, 5% CO₂ und ca. 80% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.1.1.2. Medien und verwendete Lösungen

Die PU5-1.8-Makrophagen wurden in RPMI 1640-Medium kultiviert, das mit den unten aufgeführten Supplementen (Glutamin, Pyruvat, HEPES-Puffer, Penicillin/Streptomycin, nicht-essentielle Aminosäuren) 1:100 (v/v) vervoll-

ständig wurde und bei den weiteren Ausführungen als RPMI^{sup} bezeichnet wird.

Für die Kultur der PU5-1.8-Makrophagen wurde RPMI^{sup} mit 5% FCS (durch γ -Bestrahlung inaktiviert) verwendet.

RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)	Biochrom, Berlin
200 mM (100x) L-Glutamin	Life Technologies, Eggenstein
100 mM Natriumpyruvat	Life Technologies, Eggenstein
1 M (50x) HEPES-Pufferlösung	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin (10000 U / 10 mg/ml)	Biochrom, Berlin
100x Nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
FCS (γ -inaktiviert)	Life Technologies, Eggenstein

Weitere Lösungen:

PBS ^{def} (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Biochrom, Berlin
PBS ⁺⁺ (mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Biochrom, Berlin

2.1.1.3. Zählen der Zellen

Alle Zellzählungen wurden mit Hilfe von Neubauer-Zählkammern durchgeführt. Zur Ermittlung des Mittelwertes wurden jeweils vier Kleinquadrate ausgezählt und die Zellzahl in der Suspension wurde anhand folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl im Kleinquadrat} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Zellzahl / ml}$$

2.1.2. Stimulation der PU5-1.8-Makrophagen

Die PU5-1.8-Makrophagen wurden aus der Zellkulturschale mit RPMI^{sup} plus 5% FCS losgespült und gezählt.

Danach wurden die Zellen in 100 x 20 mm Primaria Platten (Falcon, New Jersey, USA) zu je $1,5 \times 10^7$ Zellen ausgesät. Nach zwei Stunden Adhärenz bei

37°C unter gelegentlichem Schwenken wurden die Zellen zweimal mit PBS⁺⁺ (auf 37°C vorgewärmt) gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen.

Nach Zugabe von 5 ml RPMI^{sup} (ohne Serum) fand dann die Virusinfektion (Influenza A Virus, Stamm Puerto Rico 8 (A/PR/8)) statt. Infiziert wurden die Zellen mit 2 MOI (multiplicity of infection), d.h. mit zwei infektiösen Partikeln pro Zelle.

In die LPS-Gruppe wurde entsprechend 10 ng/ml LPS (von E. coli; Difco, Detroit, USA) zugegeben. Um Aggregate wieder aufzulösen, wurde das LPS direkt vor der Zugabe mit Ultraschall (Stufe 9; Elma Transsonic Digital, T 480/H.2) 3 min bei 4°C behandelt.

Je nach Versuch wurde zwischen 0,5 und 20 Stunden der Mediumüberstand von den Zellen abgesaugt. Die Zellen wurden durch Zugabe von Lösung D (siehe 2.3.3.) lysiert, zur RNA-Präparation weiterverwendet oder bei -70°C gelagert.

2.2. Virologische Methoden

2.2.1. Präparation von Influenza A Virus

Als Vermehrungssystem für das Influenza A Virus dienen 11 Tage alte Hühnerembryonen; es können Titer von 10^9 - 10^{10} PFU (engl.: *plaque-forming units*) erzielt werden⁹⁷. Man injiziert das Virusinokulum in die Allantoishöhle, von wo aus es die Chorioallantois-Membran infiziert. Vermehrte Viruspartikel werden in die Allantoisflüssigkeit abgegeben und die Ernte dieser Flüssigkeit erfolgt 2 Tage nach der Infektion. Zur Reinigung des Virus werden mehrere Zentrifugationsschritte durchgeführt, einschließlich einer Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation.

2.2.1.1. Vorbereitung der Eier und Beimpfung

Befruchtete Hühnereier wurden 11 Tage bei 37°C und 40-60% relativer Luftfeuchte gelagert und dabei alle 6 h gewendet. Mit Hilfe einer UV-Schierlampe (Blohm Apparatebau, Hamburg) wurden die Embryonen zur Beimpfung ausgewählt, deren Vitalität durch Eigenbewegung erkennbar und deren Gefäßversorgung intakt war. Nach Markierung der Luftkammergrenze am stumpfen Eipol und einer angrenzenden gefäßarmen Region wurde die so markierte Injektionsstelle mit Jodlösung (0,05 M J₂, Tritisol, Merck, Darmstadt) desinfiziert. Wenige Millimeter oberhalb der Kennzeichnung wurde die Kalkschale angebohrt und 0,2 ml Virusinokulum mit einer feinen Kanüle vertikal eingespritzt. Als Virusinokulum wurde native, virushaltige Allantoisflüssigkeit (1:1000 in HBSS (Hanks' balanced salt solution, Life Technologies BRL, Gaithersburg, MD, USA) verdünnt) verwendet. Ein Tropfen Holzleim verschloss das Bohrloch als Schutz vor Infektionen während der folgenden, 48 h dauernden Inkubation bei 37°C und 80% Luftfeuchte. Bereits abgestorbene Tiere wurden mit Hilfe der Schierlampe identifiziert und aussortiert.

⁹⁷ Barrett und Inglis, 1985

2.2.1.2. Ernte der virushaltigen Allantoisflüssigkeit

Die Abkühlung der verwendeten Eier über Nacht (4-18 h) bei 4°C führte zur Gefäßkonstriktion und somit zum Absterben der Embryonen. Dadurch wurde die Erythrozytenkontamination möglichst gering gehalten. Nach Desinfektion des stumpfen Eipols wurde die Kalkschale oberhalb der Luftkammergrenze abgetragen und die virushaltige Allantoisflüssigkeit vorsichtig mit einer Kanüle und einer 10 ml Spritze (Omnifix^R, Braun, Melsungen) abgesaugt. Nur klare Flüssigkeit wurde in einem sterilen Glasbehälter auf Eis gesammelt; jede hämorrhagische, dotter-gelbe oder weißlich-trüb verunreinigte Suspension wurde verworfen. Da aus jedem Ei etwa 7-12 ml Allantoisflüssigkeit geerntet werden konnte, entsprach die Gesamtausbeute bei 250 Eiern ca. 2-3 l Virussuspension.

2.2.1.3. Reinigung und Lagerung des Influenza A Virus

Um Zelltrümmer und Zellen zu entfernen, wurden diese in einem ersten Zentrifugationsschritt für 30 min bei 6000 rpm (ohne Bremse) und, wie alle folgenden Schritte, bei 4°C sedimentiert (Rotor JA-10 mit max. 6x500 ml Fassungsvermögen, Zentrifuge J21, Beckman, München). Das Virus im Überstand wurde durch Zentrifugation bei hoher Geschwindigkeit für 55 min bei 18000 rpm ohne Bremse (Rotor JA-10 mit max. 6x250 ml, Ultrazentrifuge L7-55; Beckman, München) pellettiert. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes und Überschichtung des Virusediments mit 500 µl PBS^{def} je Zentrifugenbecher konnte das Virus 1 h auf Eis quellen. Anschließend wurde das Pellet sorgfältig resuspendiert - zunächst mit einer feinen Kanüle, dann mit einer 1 ml-Tuberkulinspritze. Aus autoklavierten Saccharose-Stammlösungen (Saccharose, Merck, Darmstadt) wurden Gebrauchslösungen von 30-55% Saccharose (in 5%-Schritten, w/v) in PBS^{def} verdünnt hergestellt. In Ultra-ClearTM Röhrchen (Röhrchenvolumen: je ca. 39 ml für Rotor SW28, Beckman), die für 90 min mit 3% H₂O₂ (Merck, Darmstadt) sterilisiert worden sind, wurde aus diesen Lösungen wie folgt ein Dichtegradient hergestellt: Je 6,1 ml einer jeden Saccharosekonzentration, bei 55% beginnend, wurde mit der nächst

niedrigeren Konzentration überschichtet, bis die Endkonzentration von 30% Saccharose erreicht war. Bei der Lagerung über Nacht bei 4°C glichen sich die Randbereiche der unterschiedlichen Konzentrationen zu einem kontinuierlichen Gradienten an. Der Gradient eines jeden Röhrchens wurde dann mit 1,5 ml der ankonzentrierten Virussuspension überschichtet und über Nacht bei hoher Geschwindigkeit zentrifugiert (16 h bei 24000 rpm, 4°C, ohne Bremse; Rotor SW28, Ultrazentrifuge L7-55, Beckmann). Am Ende dieser Zentrifugation fanden sich in der gelblich-klaaren Zuckerlösung weißlich-trübe Zonen, die das Virus enthielten. Der höchste Titer war in einer deutlichen Bande im unteren Viertel des Gradienten bei ca. 45% Saccharose zu finden. Nach großzügiger Abnahme dieser Bande wurde sie mit kaltem PBS^{def} auf 20 ml aufgefüllt und zur Virus-Pelletion erneut mit hoher Geschwindigkeit zentrifugiert (45-60 min bei 24000 rpm, 4°C, ohne Bremse, Rotor SW28, Zentrifuge L7-55, Beckmann). Quellvorgang und Resuspendierung schlossen sich wie oben beschrieben an. Nun erfolgte eine Dialyse der Virussuspension, um die Reste der Saccharose zu entfernen.

Der verwendete Dialyseschlauch (Schlauch Visking mit 1,5-3 nm Porenweite; Roth, Karlsruhe) wurde zur Entfernung von beispielsweise Glycerin, Spuren von Schwefelverbindungen und Schwermetallen 1 h lang in EDTA-Lösung (100 mM EDTA-Na₂-Salz; Serva, Heidelberg) erhitzt. Die Virussuspension wurde in den Schlauch eingefüllt und dieser dann an beiden Enden möglichst luftblasenfrei durch Knoten verschlossen. Die Dialyse erfolgte bei 4°C für 21 h gegen das 500-fache Volumen PBS^{def}.

Zur Bestimmung des Virustiters macht man sich zunutze, dass die Influenzaviren auf ihrer Oberfläche das Hämagglutinin (HA) tragen, das an Sialinsäurereste von Glykoproteinen binden kann. Da auch Erythrozyten auf ihrer Oberfläche Sialinsäuren tragen, können sie über das HA der Viren vernetzt werden. Diese Tatsache verwendet man nun im sog. HA-Test zur Titerbestimmung in HAU ("Hämagglutinationsunits") / ml.

Anschließend wurde das Dialysat mit PBS^{def} auf einen Titer von 10⁵ HAU/ml eingestellt und in Aliquots von 400-500 µl in flüssigem Stickstoff bei -170°C gelagert.

Die Ermittlung des Infektionstiters als PFU / ml erfolgte im Plaque-Test. Dabei wurden virushaltige Proben in verschiedenen Verdünnungen auf permissive MDCK II-Zellen (Madin and Darby Canine Kidney; Nierenepithelzellen eines Cockerspaniels) gegeben und mit Agar überschichtet, um eine stärkere Diffusion des Virus zu verhindern. Das Testprinzip liegt in der Lysierung kleiner Zellareale durch die Viren, die nach Anfärbung des Agarose-haltigen Mediums als Plaques sichtbar werden und ausgezählt werden können⁹⁸.

⁹⁸ Wagner, 1961

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Herstellung von DEPC-Wasser

Zur Inaktivierung von RNasen in A. dest. wurden 1 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat; Sigma, München) und 9 ml Ethanol (100%) (Riedel-de Haen, Seelze) vermischt, auf 1000 ml mit H₂O aufgefüllt und 12 h lang bei Raumtemperatur belassen, bevor die 0,1%-ige DEPC-Lösung autoklaviert wurde. DEPC modifiziert Histidinreste in Proteinen zu N-Carboxyhistidin. Anschließendes Autoklavieren der Lösung bewirkte den Zerfall von toxischem DEPC zu CO₂ und Ethanol, DEPC würde ansonsten die RNA-Analyse beeinflussen.

2.3.2. Photometrische Messung von Nukleinsäuren

Wenn die Probe frei von nennenswerten Mengen an Proteinen, Phenol, Agarose und anderen Nukleinsäuren ist, erfolgt die Quantifizierung über spektralphotometrische Messung der ultravioletten Strahlung, die von den Basen absorbiert wird. Man bestimmt die Absorption bei den Wellenlängen 260 nm (Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine). Die Messung bei 260 nm erlaubt Aussagen über die Konzentration der Nukleotide in der Probe. Eine OD (optische Dichte) von 1 entspricht annähernd 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA oder 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide (Länge: ca. 20 Nukleotide). Somit können zur Konzentrationsbestimmung folgende Formeln verwendet werden⁹⁸:

$$\text{Oligonukleotide } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times 33 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

⁹⁸ Maniatis et al., 1989

Das Verhältnis der OD bei 260 nm zu der OD von 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der Nukleinsäuren-Präparation. Bei einer reinen Präparation erreicht der Quotient $OD_{260\text{nm}} / OD_{280\text{nm}}$ Werte zwischen 1,5 und 2,0, wohingegen Quotienten unter 1,5 Protein- oder Phenol-Kontaminationen anzeigen und eine Quantifizierung mit dieser Methode dann nicht mehr verlässlich ist.

Die Aufnahme des Absorptionsspektrums erfolgte mit Hilfe des Response II UV-VIS-Spectrophotometers von Gilford Systems, OH, USA.

2.3.3. RNA-Isolierung

Im Gegensatz zur DNA ist die RNA nicht sonderlich stabil, da sie durch die ubiquitär vorkommenden RNA-abbauenden Enzyme, die RNasen, ständig attackiert wird. Bei der Arbeit mit RNA wird daher grundsätzlich auf Eis gearbeitet, DEPC-behandeltes Wasser verwendet und sterilisierte Instrumente benutzt.

Die Single-Step-Methode mit Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion zur Isolierung der gesamten RNA ist eine Kombination aus der Verwendung von Guanidinium-Thiocyanat und der Phenol-Chloroform-Extraktion und gilt als ein Verfahren zur Gewinnung von RNA sowohl in großer Ausbeute als auch in hoher Reinheit⁹⁹.

Durch Phenol-Chloroform-Extraktion kann man Nukleinsäurelösungen von Verunreinigungen durch Proteine befreien.

Das Reinigungsprinzip beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit der Proteine und Nukleinsäuren in den unpolaren bzw. polaren Phasen.

Die einzelnen Komponenten und ihre Wirkungen:

Guanidinium-Thiocyanat dient der Proteindenaturierung und inaktiviert RNasen.

⁹⁹ Chomczynski und Sacchi, 1987

Phenol dissoziiert Protein-Nukleinsäurekomplexe, durch H-Brücken auf der einen und hydrophobe Wechselwirkungen auf der anderen Seite, in ihre einzelnen Bestandteile.

Chloroform denaturiert Proteine und erleichtert die Phasentrennung. Die Proteine sammeln sich in der Interphase.

Isoamylalkohol verhindert Schäumen und das Ausbilden einer breiten, undeutlichen Interphase.

Sehr wichtig ist es, das pH-Optimum des Extraktionssystems bei den verschiedenen Nukleinsäuren zu beachten, da bei saurem pH-Wert die DNA in die Phenol-Chloroformphase geht, was bei der RNA-Präparation genutzt wird.

Zur Extraktion werden folgende Reagenzien zugegeben, gründlich gemischt, zur schnelleren Phasentrennung kurz abzentrifugiert und die obere (wässrige) Phase, welche die Nukleinsäuren enthält, abgenommen:

0,1 x Volumen 3 M Natriumacetat (NaAc) pH 4,2 (Merck, Darmstadt)

1,0 x Volumen wassergesättigtes Phenol pH 4,5 (Sigma, München)

0,2 x Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) (Merck, Darmstadt)

Dadurch werden die DNA (die sich bei dem sauren pH-Wert von 4,2 in der Phenol-Chloroformphase befindet) sowie die denaturierten Proteine (die sich aufgrund ihres amphipathischen Charakters in der Interphase zwischen wässriger Phase und Phenol-Chloroformphase befinden) entfernt.

Nach der Phenol-Chloroform-Extraktion sollte eine Chloroform-Extraktion angeschlossen werden, um noch vorhandene Phenolreste zu entfernen.

Dazu extrahiert man den wässrigen Überstand mit 1 x Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) und nimmt erneut die obere, wässrige Phase ab.

Benötigte Reagenzien:

Lösung D: 12,5 g Guanidiniumthiocyanat (Fluka, Buchs) werden bei 37°C in 14,6 ml DEPC-Wasser gelöst. Nach Zugabe von 0,88 ml 1 M Na-Citrat (pH 7,0; Roth, Karlsruhe) und 1,32 ml 10% N-Laurosyl-sarkosyl (Sigma, München) kann Lösung D bei 4°C gelagert werden.

Unmittelbar vor dem Gebrauch werden pro 100 ml Lösung D 720 µl 2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt) zugegeben.

Protokoll:

Die zur RNA-Präparation verwendeten PU5-1.8-Makrophagen wurden durch Lösung D (1 ml) lysiert und das Lysat bei -70°C zwischengelagert. Zur RNA-Präparation wurden die lysierten Zellen auf Eis aufgetaut und mit Hilfe eines sterilen Gummischabers vom Boden des Gefäßes abgelöst. Nach einem gründlichen Scheren der DNA durch 5-maliges Aufziehen mit einer dünnen Kanüle (24 G x 1") und einer 1 ml-Tuberkulinspritze (Omnifix^R-F, Braun, Melsungen) wurde das Zellmaterial in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Anschließend wurden 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat pH 4,2 (Merck, Darmstadt), 1 Vol. wassergesättigtes Phenol pH 4,5 (Sigma, München) und 0,2 Vol. Chloroform / Isoamylalkohol-Mischung (24:1) (Merck, Darmstadt) unter kräftigem Schütteln nach jeder neuen Substanzzugabe hinzugefügt. Die endgültige Suspension wurde 10 s lang geschüttelt und 15 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 10000 x g, 4°C und Auslaufen bei ausgeschalteter Bremse. Nach diesem Zentrifugationsschritt befand sich die RNA in der wässrigen, oberen Phase, die Proteine und die DNA hingegen in der Interphase und der unteren organischen Phase. Die Wasserphase wurde möglichst komplett in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Protein- oder Phenolkontaminationen mussten unbedingt vermieden werden. Zur Fällung der RNA wurde die abgenommene Phase mit 2,5 Vol. eisgekühltem 100%-igen Ethanol (Riedel-de Haen, Seelze) versetzt. Die Fällung erfolgte bei -20°C entweder mindestens 45 min oder über Nacht.

Im erstgenannten Fall wurde die sich anschließende Zentrifugation bei 4°C und 14000 g für eine Dauer von 90 min. durchgeführt, im letzteren nur für 30 min. Der Überstand wurde dekantiert und die pelletierte RNA mit 500 µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation bei 14000 x g und 4°C für 20 min). Nach dem Waschen und Vakuumtrocknen der RNA wurde sie in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und ihre Konzentration nach einer Quellzeit von ca. 15 min anhand einer 1:750 Verdünnung in H₂O photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die RNA wurde bei -70°C gelagert.

2.3.4. Fällung von Nukleinsäuren

RNA wird durch die Zugabe folgender Reagenzien gefällt:

0,1 x Volumen 3 M NaAc pH 4,2 (Merck, Darmstadt)

2,5 x Volumen 100% Ethanol (Riedel-de Haen, Seelze)

Durch die Salze werden den Nukleinsäuren die Hydrathüllen entzogen, so dass sie im 100%-igen Ethanol, der nur noch Spuren an Wasser enthält, nicht mehr löslich sind und ausfallen. Da RNA bei niedrigeren pH-Werten besser gefällt werden kann als bei hohen, wird zur RNA-Fällung saures NaAc verwendet.

Die Fällung erfolgt 1h bei -70°C oder über Nacht bei -20°C.

Anschließend wird die Nukleinsäure durch Zentrifugation (mit 14000 x g, bei 4°C für mind. 30 min) pelletiert, mit ca. 500 µl 70% Ethanol (zur Entfernung der Salze) gewaschen, erneut zentrifugiert und im Vakuum ca. 10 min getrocknet.

Anschließend kann die Nukleinsäure z. B. in A. dest. aufgenommen werden.

Ist der pH-Wert jedoch zu sauer, löst sie sich nicht oder nur schlecht. Deshalb empfiehlt es sich, das Wasser leicht (z. B.: mit 10 mM Tris, pH 8,0) im alkalischen zu puffern.

2.3.5. Agarose-Gelelektrophorese für RNA

Nukleinsäuremoleküle können durch Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und analysiert werden. Agarose-Gele werden durch Schmelzen der Agarose in dem gewünschten Puffer hergestellt. Nach Erhärten bildet die Agarose eine Matrix, deren Dichte durch die Agarose-Konzentration bestimmt wird. Sobald an das Gel ein elektrisches Feld angelegt wird, wandern die Nukleinsäuren, die unter den elektrophoretischen Bedingungen negativ geladen sind, im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsrate hängt von einer Vielzahl von Parametern ab, wie beispielsweise von der Molekülgröße, der Agarose-Konzentration, der Konformation der Nukleinsäuren (linear, ringförmig entspannt oder ringförmig superhelikal) und der angelegten Spannung.

Die gebräuchlichste Detektionsmethode der Nukleinsäuren im Gel ist die Färbung mit Ethidiumbromid. Diese Substanz interkaliert zwischen die Basen der Nukleinsäuren, und nach Anregung mit UV-Licht (254, 302 oder 312 nm) erscheint der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex im sichtbaren Licht (500 bis 590 nm) als rot-orange leuchtende Bande.

RNA wird vor der Elektrophorese durch Glyoxal und DMSO denaturiert. Durch DMSO werden bei erhöhter Temperatur (60°C) intramolekulare Wasserstoff-Brückenbindungen in der RNA aufgebrochen, so dass Guanin-Reste für die kovalente Modifikation mit Glyoxal freigelegt werden. Das Produkt der Reaktion ist bei neutralem oder saurem pH-Wert stabil; unter alkalischen Bedingungen kann die Reaktion reversibel verlaufen. Nach Detektion mit Ethidiumbromid stellen sich in der Regel drei ribosomale RNA-Banden dar, bestehend aus 28 S rRNA, 18 S rRNA und 5 S rRNA. Ihre Form und Intensität erlaubt eine qualitative und semiquantitative Aussage zur Präparation.

Benötigte Reagenzien:

Färbelösung:

0,2% Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt), 1:2000 verdünnt in 50 mM NaOH (Merck, Darmstadt).

Entfärbelösung:

0,2 M Natriumacetat (Merck, Darmstadt), pH 4,2

0,1 M Natriumphosphatpuffer (10x), pH 7,0:	NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
	Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Glyoxal, pH 5,6	Deionisiertes 30% Glyoxal	Aldrich Chemie, Steinheim
DMSO (= Dimethylsulfoxid)		Merck, Darmstadt
RNA-Ladepuffer (5x)	50 % Glycerin	Life Technologies, Eggenstein
	20 mM EDTA	Serva, Heidelberg
	0,4 % Bromphenolblau	Sigma, München

Vor Benutzung wurden die Elektrophoresekammer, der Schlitten und der Kamm für 1 h in 3% H₂O₂ sterilisiert und anschließend gründlich mit H₂O gewaschen. 1% Agarose (Life Technologies, Eggenstein) wurde durch Kochen in Phosphatpuffer (1x) gelöst und luftblasenfrei in den Schlitten eingefüllt. Nach Positionierung des Kamms wurde das Gel zum Erstarren bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Zur Denaturierung etwaiger basengepaarter Nukleotidabschnitte wurden die RNA-Proben für 20 min bei 60°C wie folgt inkubiert:

8,1 µl RNA-Lösung (= 16 µg Gesamt-RNA in H₂O; photometrisch eingestellt)

4,5 µl Phosphatpuffer (10x)

8,1 µl Glyoxal, pH 5,6

24 µl DMSO

5,3 µl RNA-Ladepuffer

50 µl

Anschließend wurden die Ansätze sofort auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Das Gel wurde mit 45 µl pro Tasche beladen, nachdem die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (1x Phosphatpuffer) gefüllt und der Kamm gezogen worden war. Die Elektrophorese erfolgte mit 5-10 V/cm (Abstand zwischen den Elektroden). Sobald die Proben in das Gel eingewandert waren, wurde der Laufpuffer durch eine Umwälzpumpe zwischen

Anode und Kathode rezirkuliert, um eine pH-Wert Verschiebung mit Dissoziation des Glyoxals von der RNA zu verhindern. Nach einer Wanderung des Farbmarkers von ca. 6 cm wurde die Elektrophorese abgeschaltet und das Gel im Dunkeln zunächst für 1 h lang in der Ethidiumbromidlösung gefärbt und dann für 45 min entfärbt. Die Detektion der RNA erfolgte mit einem UV-Transilluminator (UV-Kontaktlampe Fluo Link, Biometra, Göttingen) bei kurzwelligem UV-Licht (312 nm).

2.3.6. cDNA Synthese

Um eine PCR ausgehend von mRNA durchzuführen, muss man diese zunächst in cDNA umschreiben.

Praktisch jedes eukaryontische mRNA-Molekül hat an seinem 3'-Ende eine Abfolge von Adenin-Nucleotiden, den Poly(A)-Schwanz. An diesen können synthetische Oligonukleotide binden, die nur aus Desoxythymidin bestehen [Poly(dT)] und von dem retroviralen Enzym Reverse Transkriptase (RT) als Primer benutzt werden. Dieses Enzym synthetisiert eine komplementäre DNA ("complementary DNA" oder cDNA) von jedem vorhandenen mRNA-Matrizen-Molekül, so dass eine DNA/RNA-Hybridhelix entsteht. Im allgemeinen entspricht die relative Häufigkeit einer cDNA der relativen Häufigkeit der entsprechenden mRNA¹⁰⁰.

Pro Ansatz wurden 11 µl RNA-Lösung mit 1 µg Gesamt-RNA zusammen mit 1 µl Poly-dT-Primer 10 min lang auf 70°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden folgende Zusätze zupipettiert und sorgfältig vermischt:

4 µl Erststrang-Puffer (5x)
2 µl 0,1 M DTT
1 µl dNTP-Mix

¹⁰⁰ Gubler und Hoffmann, 1983

Benötigte Reagenzien:

Poly-dT-Primer		MWG Biotech, Ebersberg
Erststrang-Puffer (5x)		Life Technologies, Eggenstein
0,1 M DTT (=Dithiotreitol)		Life Technologies, Eggenstein
10 mM dNTP-Mix aus:	10 mM dATP	Promega, Madison, WI, USA
	10 mM dCTP	Promega, Madison, WI, USA
	10 mM dGTP	Promega, Madison, WI, USA
	10 mM dTTP	Promega, Madison, WI, USA
SuperScript II RNase H ⁻ Reverse Transkriptase		Life Technologies, Eggenstein

Nach einer 2-minütigen Inkubation bei 42°C erfolgte die Zugabe von 1 µl Reverse Transkriptase zu jedem Ansatz, der danach bei 42°C für die Dauer von 1 h inkubiert wurde. Die anschließende Erwärmung auf 95°C für 10 min diente der Denaturierung der Reversen Transkriptase und der Trennung der DNA/RNA-Hybride. Danach wurde die cDNA sofort auf Eis abgekühlt und bei -20°C gelagert oder in der PCR eingesetzt.

2.3.7. Polymerase-Kettenreaktion

Die konventionelle Klonierung durch Transformation von z. B. Bakterien- oder Hefezellen mit einem rekombinanten DNA-Molekül wurde Mitte der achtziger Jahre von Kary Mullis durch die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) revolutioniert. Die PCR-Methode, auch zellfreies Klonieren genannt, stellt ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Amplifikation von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen dar, ein Verfahren, welches Kary Mullis zehn Jahre später den Nobelpreis für Chemie einbringen sollte. Die PCR ist zu einem wichtigen, effizienten und insbesondere schnellen Instrument in der Diagnose von Infektionskrankheiten, Tumorerkrankungen

(Tab. 3), dem Nachweis von Erbkrankheiten (z.B. Hämophilie, Mukoviszidose, Muskeldystrophie Typ Duchenne) und der Identifikation von kompatiblen Organ Spendern und -empfängern geworden¹⁰¹. Die Anwendungsmöglichkeiten gehen über die *in-vitro-Diagnostik* weit hinaus, so wird in der Grundlagenforschung mit Hilfe der PCR-Methode das genetische Material von Lebewesen entschlüsselt und verglichen¹⁰².

Onkogen	Mutationsart	Tumor
HTLV I, II	Virusinfektion	T-Zell-Leukämie
HPV	Virusinfektion	Zervixkarzinom
bcr-abl	Chromosomen-Translokation	ALL, CML
Ras	Punktmutation	Blasenkarzinom

Tumor-Suppressor-Gen	Mutationsart	Tumor
RB-1	Deletion, Punktmutation	Retinoblastom
p53	Deletion, Punktmutation	Dickdarmkarzinom

Tab. 3: PCR-Diagnostik: Krebserkrankungen

Prinzip:

Ausgangsmaterial einer PCR ist DNA, welche die gewünschte Sequenz enthält. Man braucht diese Sequenz nicht zu isolieren, da diese durch die verwendeten Primer definiert wird. Ähnlich wie bei der natürlichen Verdopplung der DNA werden bei der PCR-Methode die beiden DNA-Stränge geteilt und dupliziert. Um ein DNA-Segment oder RNA nach reverser Transkription in eine cDNA zu vervielfältigen, synthetisiert man zunächst zwei Oligonukleotide (Primer), die jeweils komplementär zu einem der beiden 3'-Einzelsträngenden des zu amplifizierenden doppelsträngigen Segmentes sind. Primer 1 als sense Primer wird vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende des ersten Stranges abgeleitet und Primer 2 entsprechend als antisense Primer vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende des Gegenstranges. Durch die Anlagerung der Primer an die komplementäre

¹⁰¹ Saiki et al. 1988

¹⁰² Innis et al. 1988

Sequenz eines Einzelstranges entsteht somit ein kurzes Stück doppelsträngige DNA, welches von der DNA-Polymerase benötigt wird, um die Synthese zu beginnen.

Heute wird hauptsächlich die *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* Y71 verwendet, einem Bakterium, das natürlicherweise in heißen Quellen und Geysiren des Yellowstone-Nationalparks bei einer Temperatur von 75°C vorkommt. Bei einem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase zwischen 70 und 75°C (kurze Zeit bei 95°C stabil) ist die Basenpaarung zwischen Oligonukleotid-Primern und DNA spezifischer als bei 37°C, der optimalen Temperatur des früher benutzten Klenow-Fragmentes der *E. coli* DNA-Polymerase I. Die wesentlich hitzestabilere *Taq*-Polymerase ist sogar bei 94°C noch aktiv, so dass das Enzym nur einmalig zugegeben werden muss.

Das Prinzip der PCR ist in Abbildung 5 dargestellt, jeder einzelne Zyklus der PCR lässt sich in drei Schritte gliedern:

1. Denaturierung:

Zu Beginn eines jeden Zyklus wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzung auf 94°C wie ein Reißverschluss in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt.

2. Annealing/Hybridisierung der Primer:

In diesem Schritt hybridisieren die im Überschuss vorhandenen Primer spezifisch mit den komplementären DNA-Sequenzen. Nach Anlagerung der Primer entstehen zwei kurze Abschnitte doppelsträngiger DNA, die im dritten Schritt als Startblöcke für das Enzym *Taq*-Polymerase dienen. Die Annealing Temperatur hängt von der Länge und Basenfolge der Primer ab.

3. Extension/Polymerisation zum Doppelstrang:

Die hybridisierte Mischung wird bei der optimalen Temperatur der Polymerase (72°C) inkubiert, so dass die stromabwärts der Primer gelegenen DNA-Abschnitte selektiv synthetisiert werden.

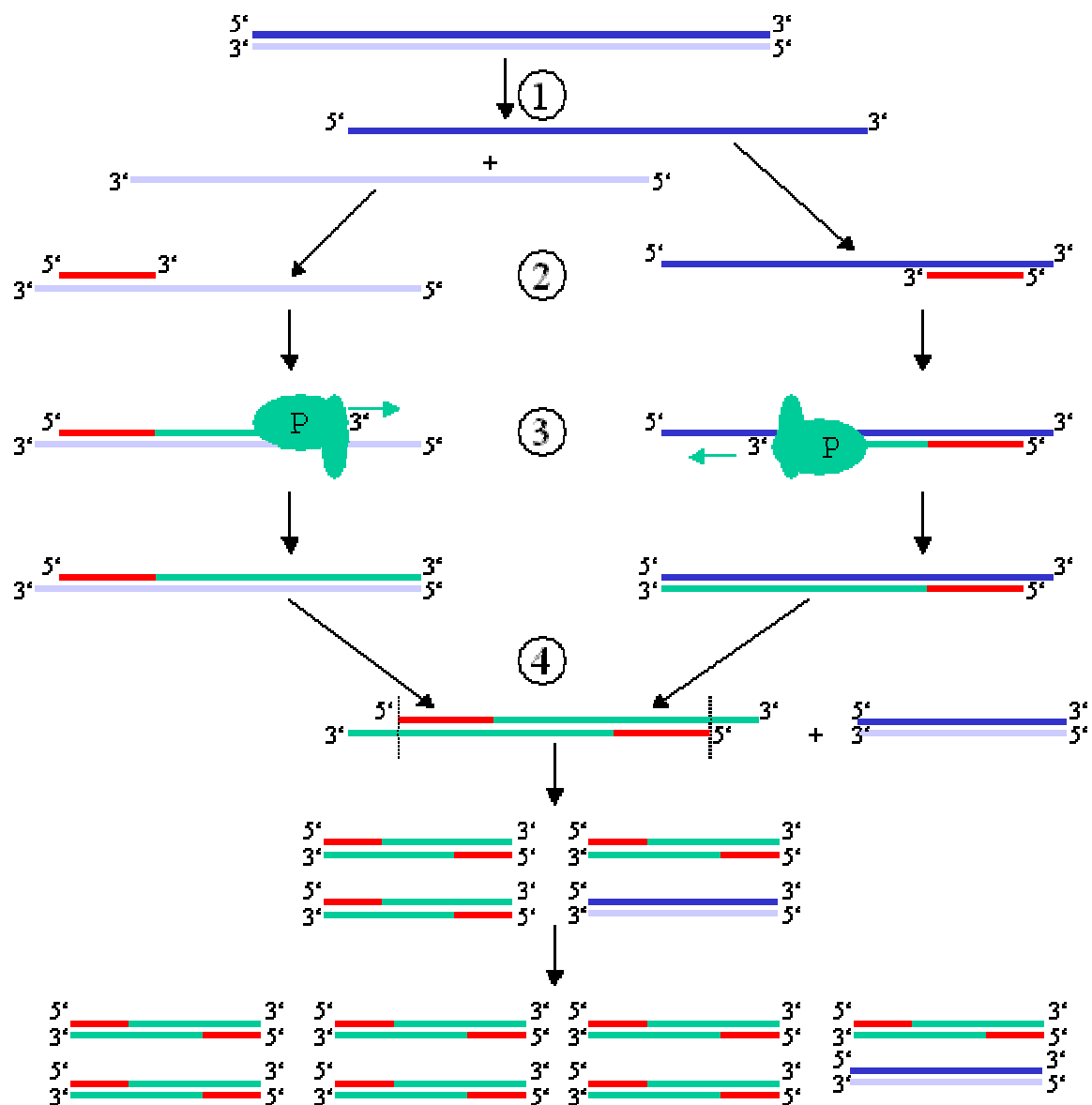


Abb. 5: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus. (1) Schmelzen bei 94°C. (2) Anlagerung (Temperatur abhängig von Primerlänge und -sequenz). (3) Verlängerung bei 72°C (P=Polymerase). (4) Der erste Zyklus ist komplett. Die beiden erzeugten DNA-Stränge werden zum Ausgangsmaterial für den nächsten Zyklus, wodurch sich die Menge an DNA bei jedem Zyklus verdoppelt. Weitere Einzelheiten sind im Text erläutert.

Die Dauer der einzelnen Schritte ist abhängig von den zu amplifizierenden Sequenzen. Die Annealing-Temperatur bestimmt entscheidend über die Spezifität der PCR und variiert in Abhängigkeit von den Schmelztemperaturen (T_m) der Oligonukleotide¹⁰³. In der Praxis verdoppelt sich die gewünschte

Sequenz nach jedem Zyklus, bis die Menge so groß wird, dass die Polymerase in einem Reaktionszyklus nicht mehr alle Primer verlängern kann, von diesem Zeitpunkt an wächst die Menge der zu vermehrenden DNA nicht mehr exponentiell, sondern nur noch linear. Die DNA-Menge kann theoretisch mit folgender Formel beschrieben werden:

$$N = N_0 \times 2^n \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} N = \text{Zahl der amplifizierten DNA-Moleküle} \\ N_0 = \text{anfängliche Zahl der DNA-Moleküle} \\ n = \text{Zahl der Zyklen} \end{array}$$

Die Rate eines Fehleinbaus, gemessen in einem natürlich replizierten DNA-Molekül, beträgt etwa 1 von 10^9 Nukleotiden. Die Zellen erreichen solch eine Präzision, weil die DNA-Replikationsmaschine unpassende Nukleotide, die an die DNA-Kette angehängt wurden, entfernt. *In vitro* besitzt die *Taq* Polymerase diese Fähigkeit des „Korrekturlesens“ nicht. Bei den für die PCR-Methode typischen Temperaturen und Salzkonzentrationen baut das Enzym etwa alle 2×10^4 Nukleotide ein falsches Nukleotid ein.

Benötigte Reagenzien:

DNTP-Mix:	10 mM dATP	Promega, Madison, WI, USA
	10 mM dCTP	Promega, Madison, WI, USA
	10 mM dGTP	Promega, Madison, WI, USA
	10 mM dTTP	Promega, Madison, WI, USA
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	5 U/ μ l	Boehringer, Mannheim
Reaktionspuffer (10x):	0,1M Tris-HCl, pH 8,3	Serva, Heidelberg
	500 mM KCl	Merck, Darmstadt
	15 mM MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Mineralöl		Sigma, München
DMSO		Merck, Darmstadt

Die Reaktion wurde vollautomatisch in einem PCR-Block ("Temperature Cycler" von Hybaid Omnigene, Middlesex, Großbritannien) durchgeführt.

2.3.7.1. Primersequenzen

Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg in lyophilisiertem Zustand geliefert und mussten nur noch in A. dest. aufgenommen werden. Die Mengenermittlung erfolgte nach den Angaben der Firma MWG Biotech. Die Primer wurden auf eine Konzentration von 50 pmol/ μ l eingestellt.

1. CREB:	Oligo A	5' CCA GTC TCC ACA AGT CCA AAC AG 3'
	Oligo B	5' GGC ACT GTT ACA GTG GTG ATG G 3'
2. CREM:	A	5' GAT TGA AGA AGA AAA ATC AGA 3'
	B	5' CAT GCT GTA ACT AGT TCA TAG 3'
	C	5' TTG ACA TAT TCT TTC TTC TT 3'
	D	5' GAG GAC AAA TGT AAG GCA AAT GAC 3'
3. GAPDH:	S	5' CAC TTG AAG GGT GGA GCC AA 3'
	AS	5' TCA CGC CAC AGC TTT CCA GA 3'
4. ICSBP:	S	5' GAA GTT CCT GAG ATG GAG TG 3'
	AS	5' TCC AGG TGC CCA AAC AGC TT 3'
5. Max:	S	5' CCG TAG GAA ATG AGC GAT AAC 3'
	AS	5' AGT GGC TTA GCT GGC CTC CAT 3'
6. TNF- α :	S	5' ATG AGC ACT GAA AGC ATG ATC 3'
	AS	5' TCA CAG GGC AAT GAT CCC AAA GTA GAC CTG CCC 3'

Die spezifischen Primer für die PCR zum Nachweis des Transkriptionsfaktors NF- κ B, sowie die Primer für IL-6 wurden freundlicherweise von der Universitäts-Hautklinik in Münster zur Verfügung gestellt.

2.3.8. Agarose-Gelelektrophorese für DNA

Die Wanderungsrate linearer doppelsträngiger DNA durch Gelmatrizes ist invers proportional zum \log_{10} der Anzahl der Basenpaare¹⁰⁴. 1,2%-ige Agarosegele trennen lineare DNA-Moleküle effizient im Bereich von 0,4 - 6 kb, 1,5%-ige von 0,2 - 3 kb und 2%-ige von 0,1 - 2 kb¹⁰⁵.

Nach Lösen von 1,5% Agarose in 1 x TAE durch Kochen erfolgt das Einfüllen in den Elektrophorese-Schlitten nach Abkühlen auf ca. 60°C, nach Einführen des Kamms und Erhärten des Gels bei Raumtemperatur wurde 1 x TAE in die Kammer als Laufpuffer eingefüllt und der Kamm entfernt.

Von den Markern (1 kb Leiter und 100 bp Leiter) wurden je 3 μ l verwendet und auf 10 μ l mit A. dest. aufgefüllt.

Die zu untersuchenden Proben wurden in einem Gesamtvolumen von 10 μ l analysiert.

Benötigte Reagenzien:

TAE-Puffer	0,04 M Tris-acetat	USB, Cleveland, OH, USA
	0,001 M EDTA	Serva, Heidelberg
DNA-Ladepuffer (6x):	0,25 % Bromphenolblau	Sigma, München
	0,25 % Xylene cyanol	Sigma, München
	30 % Glycerol	Life Technologies, Eggenstein
Agarose		Life Technologies, Eggenstein
DNA-Längenstandard:	100 bp Leiter	Pharmacia, Freiburg
	1 kb Leiter	Life Technologies, Eggenstein
0,2 % Ethidiumbromid		Merck, Darmstadt

Alle Ansätze wurden mit 2 μ l DNA-Ladepuffer (6x) vermischt, 20 min lang bei

¹⁰⁴ Helling et al., 1974

¹⁰⁵ Maniatis et al., 1989

60°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und herunterzentrifugiert; 10 µl der Ansätze wurden langsam in die Taschen des Gels pipettiert.

Die Elektrophorese erfolgte mit 3 bis 5 V/cm (Abstand zwischen den Elektroden) und wurde beendet, nachdem die Front des Farbstoffmarkers annähernd 8 cm gewandert war.

Gele wurden im Anschluss ca. 20 min lang in 200 ml H₂O gefärbt, das zuvor mit 100 µl 0,2%-igem Ethidiumbromid versetzt worden war. Anschließend wurden sie mit einem UV-Transilluminator (UV-Kontaktlampe Fluo Link, Biometra, Göttingen) bei 312 nm betrachtet und fotografisch dokumentiert.

2.3.9. Gelretentionsanalyse

Die Gelretentionsanalyse, auch EMSA (engl.: *electrophoretic mobility shift assay*) oder Gel-Shift-Assay genannt, dient zur Bestimmung der Interaktion von DNA-bindenden Proteinen, wie der Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit regulatorischen Regionen. Der Assay beruht auf der verringerten Migrationsgeschwindigkeit von DNA/RNA-Protein-Komplexen im nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel im Vergleich zur ungebundenen DNA/RNA. Bildet sich ein Multi-Protein-Komplex aus, so verringert sich die Migrationsrate mit jedem weiteren Protein¹⁰⁶.

2.3.9.1. Isolierung von Zellkernproteinen¹⁰⁷

- 5×10^5 – 1×10^7 Zellen
- 7 min bei 1.000 x g zentrifugieren
- Pellet mit 5 ml kaltem, sterilem PBS waschen
- 10 sec bei 13.000 x g zentrifugieren
- Zugabe von 400 – 4.000 µl Kernproteinextraktions-Puffer A zum Pellet
- mischen

¹⁰⁶ Ausubel et al., 1993

¹⁰⁷ Andrews und Faller, 1991

- 10 min bei 0°C
- 10 sec vortexen
- 10 sec bei 13.000 x g (RT) zentrifugieren
- 100 – 2.000 µl Kernextraktions-Puffer B zum Pellet geben
- 20 min bei 0°C
- 2 min bei 13.000 x g (4°C) zentrifugieren
- einfrieren bei –70°C

2.3.9.2. Bindungsreaktion

- 10 ml EMSA-Puffer
- 1 ng ³²P-markierte dsDNA (30.000 – 100.000 cpm)
- 10 –20 mg Kernproteinextrakt
- mit Aqua bidest. auf 20 ml auffüllen
- 30 min bei 30°C

Die spezifischen Oligonukleotide zum Nachweis von AP-1, CREB, NF-κB und TFIID wurden von der Universitäts-Hautklinik in Münster zur Verfügung gestellt.

2.3.9.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Polyacrylamidgele werden oftmals als Trägermedium in der Elektrophorese eingesetzt, da sie chemisch inert sind und sich leicht aus Acrylamid herstellen lassen. Ihre Porengröße lässt sich durch unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid und dem quervernetzenden Agens Methylenbisacrylamid variieren.

Protokoll zur Herstellung eines 6%igen Gels:

- 8 ml 5 x Tris-Glycin-Puffer
- 8 ml 30% Acrylamid
- 1 ml 2% Bisacrylamid
- 2 ml 50% Glycerin
- 20,7 ml Aqua bidest.

- 300 μ l 10% APS
- 34 μ l TEMED

Vorbereiten der Glasplatten:

Die Glasplatten wurden sorgfältig mit EtOH und Aceton gereinigt und anschließend mit 5% Dichlorsilan in Chloroform behandelt und nach dem Trocknen vorsichtig mit EtOH nachpoliert.

Das Gemisch wurde zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen.

Nach dem Auspolymerisieren (ca. 1 h) wurde das Gel in die Gelapparatur eingespannt, 1 x Tris-Glycin-Puffer in die Puffertanks gefüllt und der 30-minütige Vorlauf bei 20 mA gestartet.

Gellauf:

Die Elektrophorese der Proben erfolgte im nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel für ca. 3 – 4 h bei 30 mA. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zwischen Filterpapier und einer Klarsichtfolie fixiert und über Nacht im Geltrockner getrocknet. Zur anschließenden Autoradiographie erfolgte die Auflage eines Röntgenfilmes auf das Gel.

2.3.10. Western-Blot

Im Western-Blot erfolgt der Protein-Nachweis durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern. Der erste Antikörper ist gegen das nachzuweisende Protein gerichtet, während der zweite Antikörper den ersten Antikörper erkennt. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, welches im Nachweis mit dem Färbesubstrat reagiert.

- SDS-PAGE der zu untersuchenden Proteine
- Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran
- Membran eine Stunde in BLOTTO prähybridisieren
- mit TBS (+ 0,1% Tween 20) waschen
- eine Stunde in 1% BSA in TBS mit erstem Antikörper inkubieren
- 3 x 10 min mit TBS (+ 0,1% Tween 20) waschen

- eine Stunde in 1% BSA in TBS mit zweitem Antikörper inkubieren
- 3 x 10 min mit TBS (+ 0,1% Tween 20) waschen
- Membran kurz in HP3 inkubieren
- Zugabe von Färbelösung (88 μ l NBT, 186 μ l BCIP, in 20 ml HP3)
- die Reaktion wird durch Waschen mit Aqua bidest. abgestoppt

Die Antikörper zum Nachweis von I κ B und α -Tubulin wurden freundlicherweise von der Universitäts-Hautklinik in Münster zur Verfügung gestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Methodenentwicklung

3.1.1. RNA-Isolierung

Eine der wichtigsten Voraussetzungen bei der Untersuchung der Expression unterschiedlicher Gene ist die qualitative und quantitative Gleichheit der verwendeten RNA. Für die Gewinnung und Aufreinigung der RNA aus Zellen stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben der Single-Step-Methode mit Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion von Chomczynski und Sacchi auch diverse käufliche RNA-Kits (z. B. RNeasy von Qiagen) getestet, die zumeist zu einer ähnlichen Ausbeute an RNA führten. Die Qualität der gewonnenen RNA wurde durch ein entsprechendes RNA-Gel und die photometrische Messung überprüft. Nach photometrischer Bestimmung ergaben sich OD_{260nm}/OD_{280nm} -Quotienten zwischen 1,8 und 2,0, so dass eine ausgezeichnete RNA-Quantifizierung möglich war. Abbildung 6 zeigt die elektrophoretische Auftrennung einer intakten, quantitativ gleichwertigen RNA.

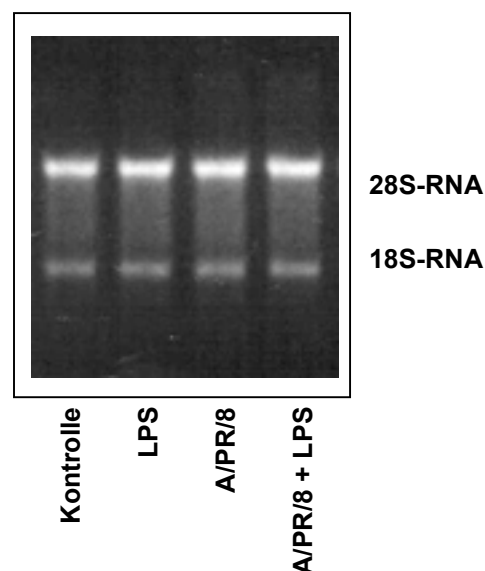


Abb. 6: RNA aus murinen Makrophagen der Zelllinie PU5-1.8. Die Zellen wurden 8h mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Die RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid detektiert.

3.1.2. Polymerase-Kettenreaktion

Im Verlauf der Versuche fiel auf, dass unter identischen Zyklusbedingungen eine große Variation in der Effizienz der DNA-Polymerasen in der PCR bestand. Nach einer entsprechenden Austestung der unterschiedlichen Polymerasen wurde im weiteren Verlauf die Polymerase von Boehringer eingesetzt, da diese die qualitativ und quantitativ beste Amplifikation der untersuchten Transkriptionsfaktor-Gene unter den gegebenen Versuchsbedingungen aufwies.

3.1.2.1. Optimierung des Temperaturprofils

Insbesondere für die Spezifität der PCR ist neben anderen Faktoren, wie z.B. der $MgCl_2$ -Konzentration, die Annealing-Temperatur von entscheidender Bedeutung. Die optimale Anlagerungs-Temperatur der Primer ist abhängig von der Länge und Basenzusammensetzung der Oligonukleotide. Bei einer zu niedrig gewählten Annealing-Temperatur werden häufig auch unspezifische Produkte amplifiziert, wodurch die Menge des spezifischen Produktes verändert wird und somit keine Aussage über eine Regulation getroffen werden kann. Wenn die Temperatur auf der anderen Seite zu hoch gewählt wird, so wird die Anlagerung der Primer an die entsprechenden Sequenzen der eingesetzten cDNA verhindert, es entsteht kein Produkt. Aus diesem Grund ist es zwingend notwendig, für jedes Primerpaar die optimale Annealing-Temperatur zu bestimmen. In der Regel liegen die Annealing-Temperaturen zwischen 55 und 68°C, so dass alle Primerpaare zunächst in diesem Temperaturspektrum getestet wurden. Die Spezifität der einzelnen Amplifikationen wurde überprüft, indem die einzelnen PCR-Produkte über ein DNA-Agarosegel (1,5%) elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht wurden.

Die Abbildung 7 zeigt die Auswirkung unterschiedlicher Annealing-Temperaturen am Beispiel von NF- κ B. In diesem besonderen Fall kam es bei niedriger Temperatur zwar nicht zu einer Amplifikation zusätzlicher Banden, doch konnte, wie bei zu hoch gewählter Temperatur, eine deutliche Abnahme der Bandenintensität, also des amplifizierten Produktes beobachtet werden.

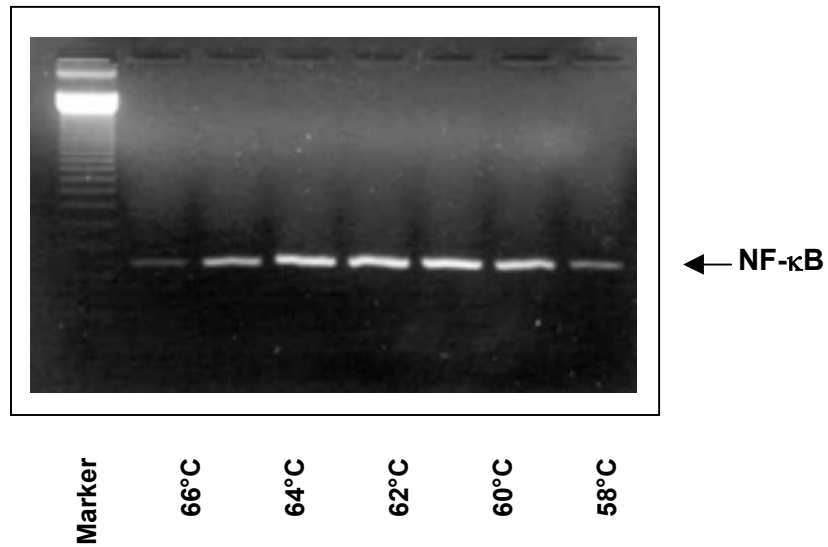


Abb. 7: Optimierung des Temperaturprofils für NF- κ B in der PCR. PU5-1.8-Makrophagen wurden 8h mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Nach Transkription der RNA in cDNA wurde diese in der PCR mit spezifischen NF- κ B-Primern mit den angegebenen Annealing-Temperaturen amplifiziert und das Produkt im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

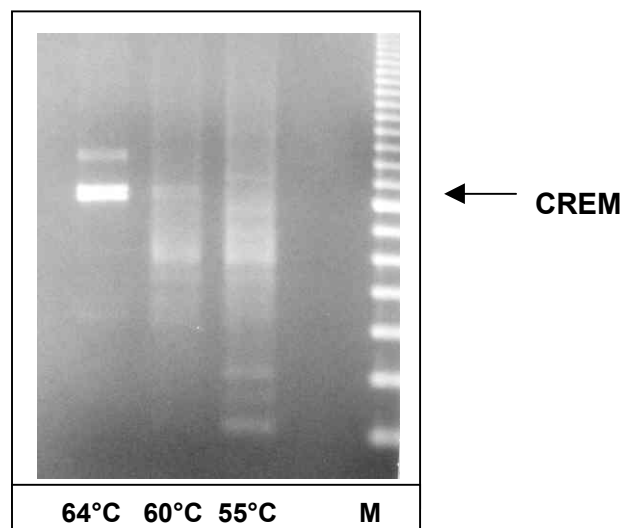


Abb. 8: Optimierung des Temperaturprofils für CREM in der PCR. PU5-1.8-Makrophagen wurden 8h mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Nach Transkription der RNA in cDNA wurde diese in der PCR mit spezifischen CREM-Primern mit den angegebenen Annealing-Temperaturen amplifiziert und das Produkt im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Deutlicher war die Abhängigkeit von der gewählten Annealing-Temperatur bei der Amplifikation des CREM-spezifischen Produktes (Abb. 8). Weder bei 55°C noch bei 60°C wurde ein CREM-spezifisches Produkt amplifiziert. Bei niedriger Temperatur wurden hier viele unspezifische Produkte generiert, die bei einer Erhöhung der Annealing-Temperatur auf 64°C nicht mehr nachweisbar waren.

3.1.2.2 Optimierung der Zyklenzahl

Nach einer Anzahl von Zyklen in der PCR verliert sich die Eigenschaft des exponentiellen Wachstums, die PCR tritt in eine Plateau-Phase ein. Dies kommt dadurch zustande, dass das molekulare Verhältnis von Polymerase zu Matrize unter einen optimalen Wert fällt oder eine oder mehrere notwendige Komponenten der Reaktion limitiert werden. Das PCR-Produkt akkumuliert bis zu einer bestimmten Konzentration, bei der die Reassoziations mit dem Primerannealing und der Extension kompetiert¹⁰⁸.

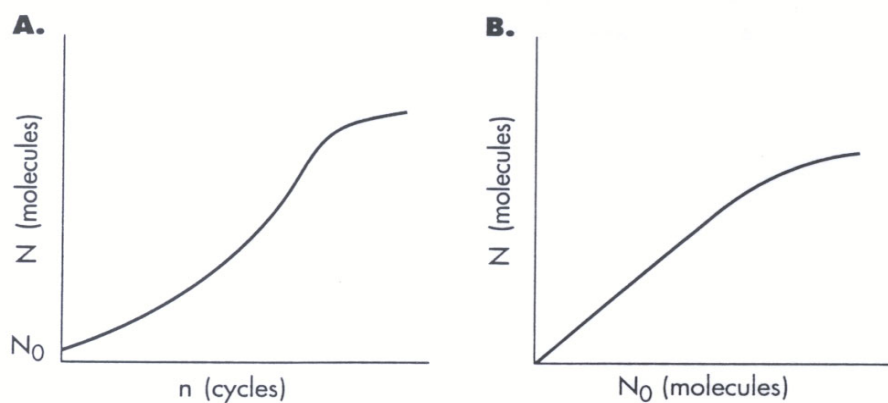


Abb. 9: Charakteristika einer PCR-Amplifikation.

N_0 = Anzahl der Zielmoleküle zu Beginn der Reaktion

N = Anzahl der amplifizierten Zielmoleküle

n = Anzahl der Zyklen

¹⁰⁸ Ehrlich et al., 1991

Die Zahl der amplifizierten Zielmoleküle (N) ist als Funktion der PCR-Zyklen (n) in Abbildung 9 A dargestellt und Abbildung 9 B zeigt die amplifizierten Zielmoleküle (N) in Abhängigkeit von der Anfangszahl der Moleküle (N_0).

Ist die PCR in die Plateau-Phase eingetreten, ist ein quantitativer Vergleich der PCR-Produkte (z. B. zwischen unbehandelter Kontrolle und LPS-Stimulation) nicht mehr möglich. Aus diesem Grund wurde für jedes der verwendeten Primerpaare die optimale Zyklenzahl bestimmt (Abb. 10).

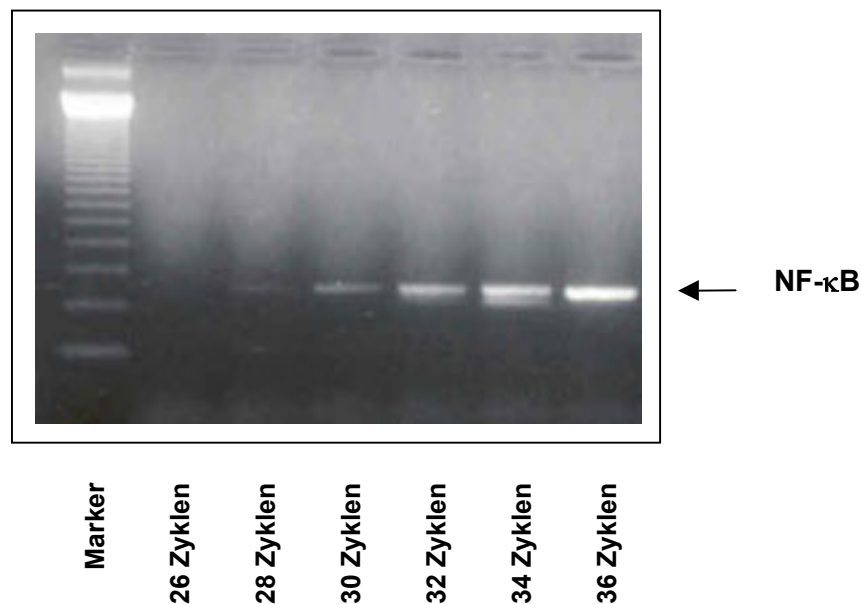


Abb. 10: Optimierung der Zyklenzahl in der PCR.

PU5-1.8-Makrophagen wurden 8h mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Nach Transkription der RNA in cDNA wurde diese in der PCR mit spezifischen NF- κ B-Primern amplifiziert und das Produkt im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach 26 Zyklen war kaum eine Bande nachweisbar. Bei Zunahme der Zyklenzahl ließ sich die exponentielle Amplifikation der PCR auch optisch gut darstellen. Interessanterweise zeigte sich im vorliegenden Beispiel nach 34 Zyklen eine Doppelbande, die nach 36 Zyklen nicht mehr detektierbar war, obwohl alle Proben aus dem gleichen Ansatz stammten und sich lediglich in der Anzahl der PCR-Zyklen unterschieden. Betrachtet man die Intensität der Banden nach 32, 34 und 36 Zyklen, so deutete sich hier bereits das Erreichen der Plateau-Phase an.

3.2. Expression von Transkriptionsfaktoren nach A/PR/8-Infektion

Zellen der murinen Makrophagen-Zelllinie PU5-1.8 wurden nach der Aussaat und anschließender Ruhephase über einen Zeitraum von 30 min bis zu 20 Stunden mit 10 ng/ml LPS stimuliert beziehungsweise mit 2 MOI A/PR/8 infiziert, als entsprechende Kontrollen wurden Zellen für die angegebenen Zeiträume unbehandelt kultiviert.

Nach Versuchsende wurde die RNA der Zellen gewonnen, photometrisch quantifiziert und im Anschluss unter Verwendung von Oligo dT-Primern in cDNA transkribiert. Diese cDNA wurde dann in der PCR unter Verwendung der spezifischen Primer für die unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren eingesetzt.

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurden diese im gleichen Mengenverhältnis über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid detektiert.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die cDNA-Menge dem spezifischen mRNA-Gehalt der Zellen direkt proportional ist, daher lässt sich aus der Menge des spezifischen Amplifikationsproduktes auf die Expression des Gens für den untersuchten Transkriptionsfaktor zurückschließen. Alle Ansätze eines Versuches wurden stets parallel untersucht. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Färbung der spezifischen PCR-Produkte wurden diese densitometrisch quantifiziert. Durch einen direkten Vergleich der Banden innerhalb eines Zeitpunktes konnte somit eine Aussage über die Regulation des Transkriptionsfaktors getroffen werden.

Um eventuelle Differenzen bei der cDNA-Synthese in der Auswertung auszugleichen, wurde zu jedem Zeitpunkt eine interne Kontrolle durch Oligonukleotide für das konstitutiv exprimierte, unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nicht regulierte¹⁰⁹ GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)-Gen durchgeführt. Dadurch konnte eine semi-quantitative Auswertung der Expression der untersuchten Gene gewährleistet werden.

¹⁰⁹ Watson et al., 1993

Zusätzlich zu der Expression der Transkriptionsfaktoren auf Transkriptionsebene erfolgte für die Transkriptionsfaktoren TFIID, AP-1, NF- κ B und CREB auch ein Nachweis auf Proteinebene mittels Gelretentionsanalyse, auch EMSA oder Gel-Shift-Assay genannt. Der Nachweis des inhibitorischen Proteins I κ B erfolgte durch Western Blot.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse der Expression der spezifischen Transkriptionsfaktoren im Vergleich zur erfolgten GAPDH- (PCR) beziehungsweise α -Tubulin-Kontrolle (Western Blot). Alle Versuche wurden in der Regel dreimal durchgeführt.

3.2.1. Expression von CREB und CREM

3.2.1.1. Expression von CREB

3.2.1.1.1. Regulation auf Transkriptionsebene

Unter Verwendung der CREB-spezifischen Primer wurden vier spezifische Produkte (CREB- α , CREB- β , CREB- γ , CREB- δ) amplifiziert, die durch alternatives Spleißen entstanden sind.

Innerhalb der ersten Stunde ließ sich keine signifikante Veränderung der CREB-Expression nachweisen. Nach 2 Stunden kam es dann zu einer deutlichen Induktion der CREB-Expression durch LPS (Abb. 11).

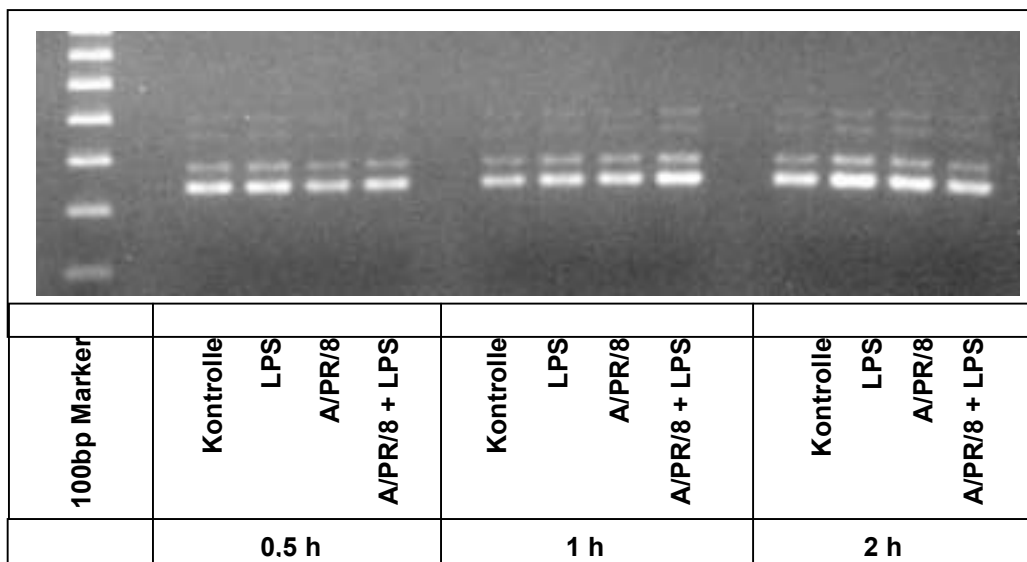


Abb. 11: Regulation der CREB-Expression in murinen Makrophagen. PU5-1.8-Makrophagen wurden 30 min, 1 h und 2 h lang mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach Umschreiben der RNA in cDNA wurde diese dann in der PCR mit CREB-Primern amplifiziert, das Produkt elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

Die stärkste CREB Expression zeigte sich 8 Stunden nach LPS-Gabe. Zu diesem Zeitpunkt führte eine Infektion mit A/PR/8 zu einer signifikanten Unterdrückung der Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 12).

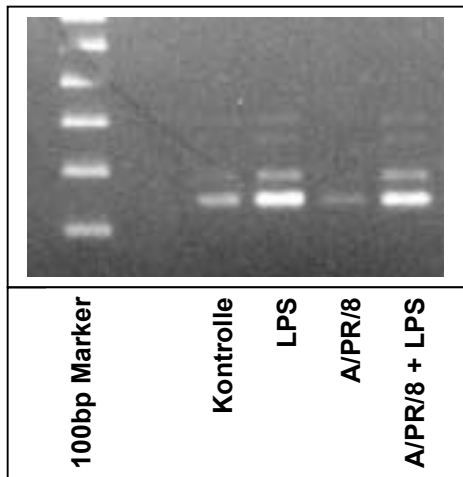


Abb. 12: CREB Expression nach 8 h.

PU5-1.8-Makrophagen wurden 8 Stunden mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach der reversen Transkription wurde die cDNA in der PCR mit CREB-spezifischen Primern amplifiziert. Das Produkt wurde anschließend im 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

In der Zeitkinetik war die Induktion der CREB-Synthese durch LPS nach 16 Stunden nicht mehr nachweisbar. A/PR/8 alleine zeigte auch zu diesem Zeitpunkt eine deutlich schwächere Expression. Während die Infektion mit A/PR/8 nach 8 Stunden keinen Einfluß auf die LPS-induzierte Expression von CREB hatte, zeigte sich nach 16 Stunden in der A/PR/8 + LPS-Gruppe eine im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit LPS, aber auch im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, deutliche Hemmung der CREB-Expression (Abb. 13).

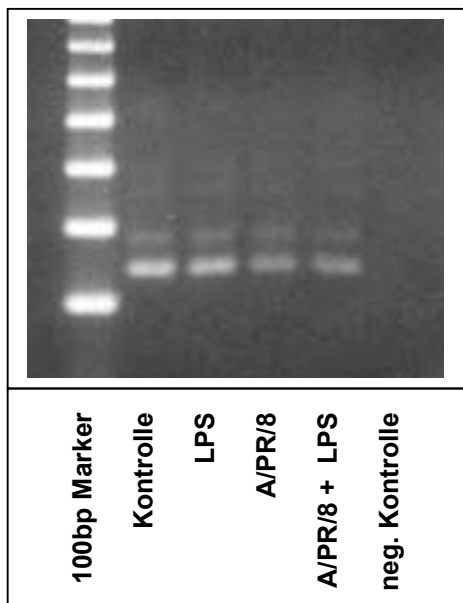


Abb. 13: CREB-Expression nach 16 h.

PU5-1.8-Makrophagen wurden 16 Stunden mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach der reversen Transkription wurde die cDNA in der PCR mit CREB-spezifischen Primern amplifiziert, in der negativ Kontrolle wurde H₂O anstatt der cDNA eingesetzt. Das Produkt wurde anschließend im 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

3.2.1.1.2. Regulation auf Proteinebene

Nachdem auf Transkriptionsebene gezeigt werden konnte, dass CREB in PU5-1.8 durch LPS induzierbar ist und eine A/PR/8-Infektion neben der Basisexpression auch die LPS-induzierte Expression von CREB signifikant unterdrückt, wurde im Folgenden nun die Regulation bzw. Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB auf Proteinebene untersucht.

Bereits nach 30 min wurde CREB durch Stimulation mit LPS im Zellkern vermehrt nachgewiesen. Transkriptionsfaktoren gelten als eine schnelle und spezifische Möglichkeit die Genexpression zu regulieren, aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass die Transkriptionsfaktoren schnell in den Zellkern transportiert werden, aber auch schnell wieder eliminiert werden müssen. So war nach 1 Stunde kein Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und der LPS-Stimulation zu erkennen. A/PR/8 vermochte hingegen nach 1 Stunde die Konzentration an CREB im Zellkern im Vergleich zur Kontrolle zu senken (Abb. 14).

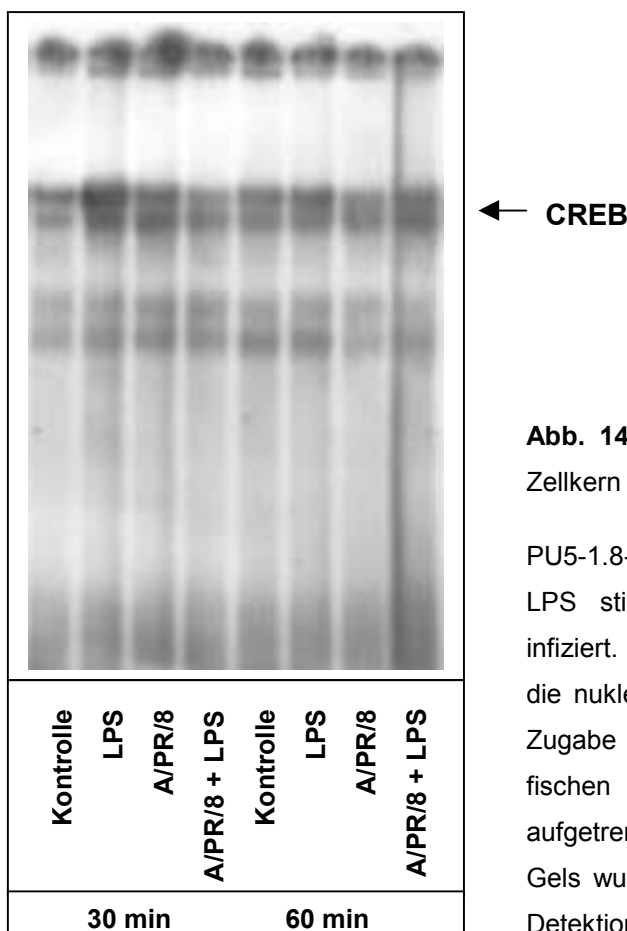


Abb. 14: Nachweis von CREB-Protein im Zellkern von murinen Makrophagen.

PU5-1.8-Makrophagen wurden mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach 30 bzw. 60 min wurden dann die nukleären Proteine gewonnen und nach Zugabe eines ^{32}P -markierten, CREB-spezifischen Oligonukleotids gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Vakuumtrocknung des Gels wurde ein Röntgenfilm über Nacht zur Detektion aufgelegt.

3.2 .1.2. Expression von CREM

In der untersuchten Zelllinie PU5-1.8 zeigte sich insgesamt eine schwache CREM-Basisexpression, die insbesondere durch eine Infektion mit A/PR/8 signifikant gesteigert werden konnte. Bereits nach 4 Stunden (Abb. 15 A) zeigte sich eine deutliche Bande in der A/PR/8-Gruppe für CREM- α (867 bp). Im Gegensatz zu einer LPS-Stimulation, die ebenfalls signifikant CREM- α induzierte, war das Influenza A Virus auch in der Lage CREM- β (470 bp) und CREM- γ (434 bp) zu induzieren. Ein ähnliches Bild ergab sich nach 8 Stunden (Abb. 15 B), hier zeigte sich neben der deutlichen Induktion von CREM durch LPS oder Virus auch ein synergistischer Effekt in der Gruppe A/PR/8 + LPS. Auch die durch Influenza A Virus induzierte Expression von CREM- β und CREM- γ zeigte in dieser Gruppe die stärkste Bande.

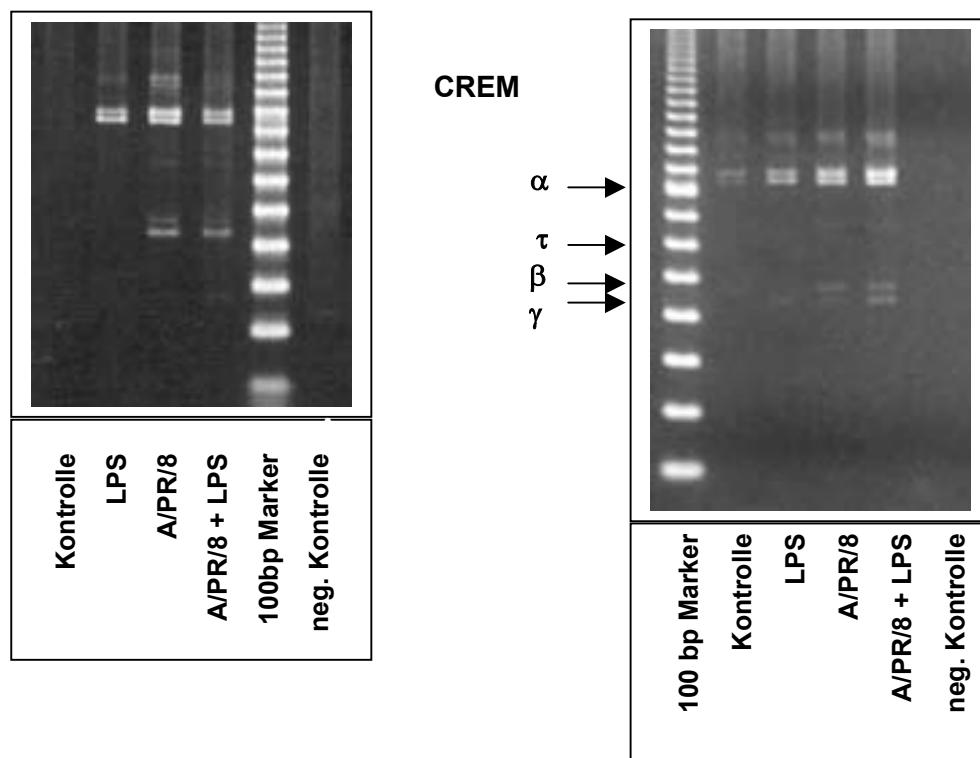


Abb. 15: Expression von CREM in murinen Makrophagen. PU5-1.8-Makrophagen wurden über 4 (A) bzw. 8 (B) Stunden mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach Umschreiben der RNA in cDNA wurde diese mit spezifischen Primern für CREM amplifiziert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

3.2.2. Expression von ICSBP

Das *Interferon consensus sequence binding protein* (ICSBP) wurde in PU5-1.8-Makrophagen stark exprimiert und konnte durch eine Infektion mit Influenza A/PR/8 signifikant induziert werden (Abb. 16). LPS hatte hingegen keinen Effekt auf die Expression von ICSBP.

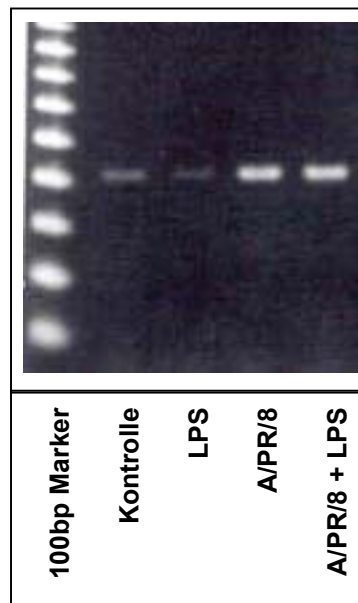


Abb.16: Expression von ICSBP in murinen Makrophagen.

PU5-1.8-Makrophagen wurden über 8 Stunden mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach der Ernte der RNA wurde diese revers transkribiert und die cDNA in der PCR mit ICSBP-spezifischen Primern amplifiziert. Die Abbildung zeigt die elektrophoretische Auftrennung im 1,5%igen Agarosegel nach Ethidiumbromid-Färbung.

3.2.3. Expression von MAX

Im Myc/Max/Mad-Netzwerk von Transkriptionsfaktoren gilt Max aufgrund seiner Fähigkeit zur Dimerisierung mit den anderen Familienmitgliedern als zentraler Regulator der Aktivität.

In der Gelelektrophorese zeigte sich die erwartete Doppelbande (468 und 495 bp), die durch eine Insertion von 27 Aminosäuren zustande kommt. Max wurde durch die Stimulation mit LPS in PU5-1.8 bereits nach 4 Stunden induziert (Abb. 18) und war auch nach 8 Stunden noch deutlich erhöht (Abb. 17). Eine Infektion mit Influenza A/PR/8 hatte zu den frühen Zeitpunkten keinen Einfluss auf die Max Expression, vermochte diese aber im weiteren Verlauf signifikant zu unterdrücken (Abb. 19).

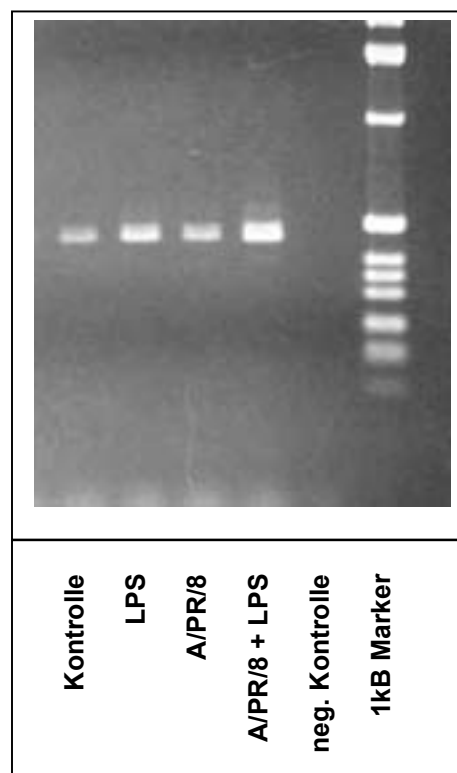


Abb. 17: Max-Expression in murinen Makrophagen nach 8 Stunden. PU5-1.8-Makrophagen wurden mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. 2 MOI A/PR/8 infiziert und nach 8 Stunden lysiert. Nach reverser Transkription wurde die cDNA in der PCR mittels spezifischer Primer amplifiziert. In der Negativ-Kontrolle wurde entsprechend H₂O anstatt der cDNA eingesetzt. Das Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

In Abbildung 18 ist die quantitative Auswertung der Max-PCR nach vier Stunden dargestellt. Die Grafik zeigt eine Induktion der Max Expression durch LPS um den Faktor 21. Auch A/PR/8 vermochte zu diesem Zeitpunkt die Expression zu steigern, interessanterweise war die Max Expression in der A/PR/8 + LPS-Gruppe im Vergleich zur alleinigen LPS Stimulation schon zu diesem Zeitpunkt verringert.

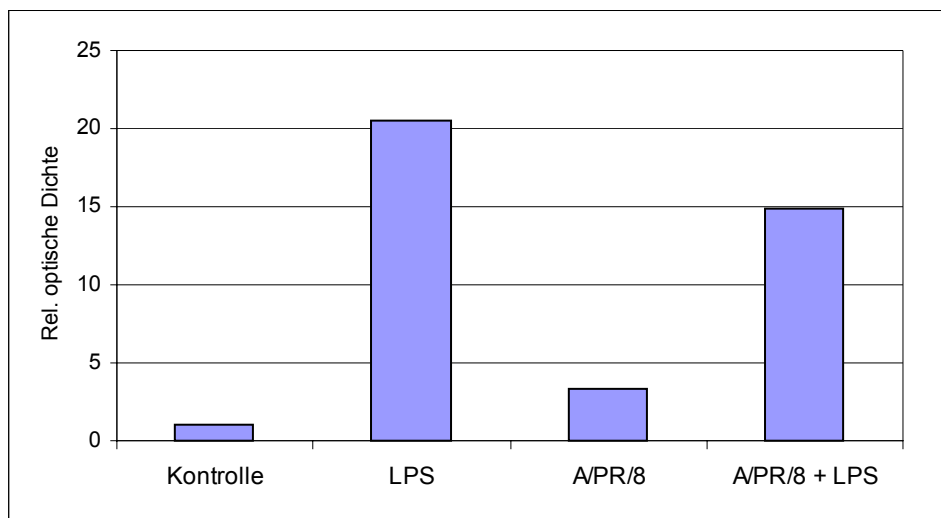


Abb. 18: Expression von MAX-mRNA in PU5-1.8-Makrophagen. PU5-1.8 wurden mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert und nach 4h wurde die RNA gewonnen. Nach reverser Transkription wurde mit Hilfe spezifischer Primer MAX cDNA in der PCR amplifiziert und anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt. Zur Darstellung kommt die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten nach GAPDH-Abgleich, die Kontrolle wurde hierbei gleich 1 gesetzt.

Betrachtet man nun die Expression über die Zeit, so ließ sich nach 8, 10 und 12 Stunden eine LPS-induzierte Max-Expression nachweisen, die allerdings im Vergleich zum 4 Stunden Wert deutlich vermindert war. Influenza A Virus reduzierte die Basisexpression auf bis zu 50% nach 12 Stunden und konnte darüber hinaus auch die LPS-induzierte Expression signifikant reduzieren, ja bis auf Kontrollniveau senken (Abb. 19).

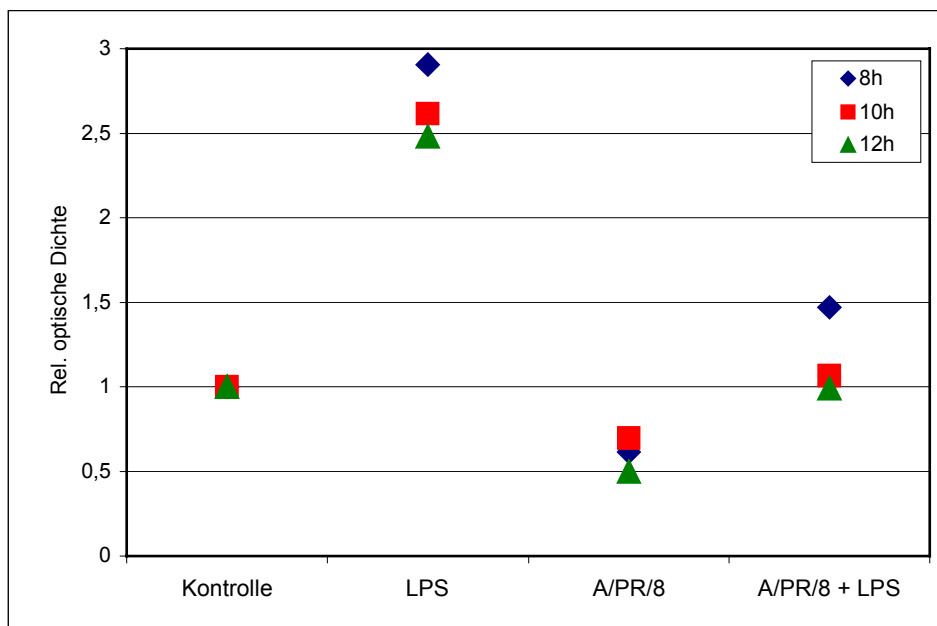


Abb. 19: Zeitkinetik der Max-Expression in murinen Makrophagen. PU5-1.8-Makrophagen wurden über den angegebenen Zeitraum mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Die RNA wurde gewonnen und nach reverser Transkription in cDNA in der PCR amplifiziert. Nach Auftrennung der spezifischen Produkte im Agarosegel wurden diese densitometrisch berechnet und mit der GAPDH-Kontrolle (= 1) abgeglichen.

3.2.4. Expression von NF- κ B

3.2.4.1. Regulation auf Transkriptionsebene

Die Expression von NF- κ B in murinen Makrophagen wurde durch LPS und auch durch Influenza A Virus signifikant induziert. Abbildung 20 zeigt die Expression nach 8 Stunden.

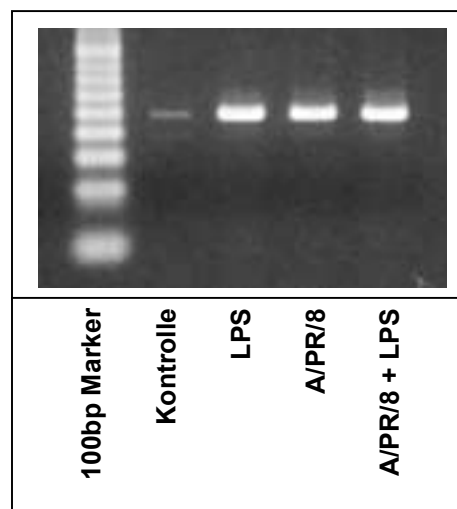


Abb. 20: Expression von NF- κ B in murinen Makrophagen. PU5-1.8-Makrophagen wurden für 8 Stunden mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach reverser Transkription der RNA wurde die cDNA mit Hilfe spezifischer Primer amplifiziert und das Produkt elektrophoretisch aufgetrennt.

Wie in Abbildung 21 ersichtlich, wurde die Expression von NF- κ B in murinen Makrophagen bereits nach 2 Stunden durch LPS-Stimulation und/oder Influenza A Virus-Infektion induziert. Nach 4 Stunden war diese Induktion noch stärker und nach 8 Stunden unter den gegebenen Versuchsbedingungen am größten (Abb. 20).

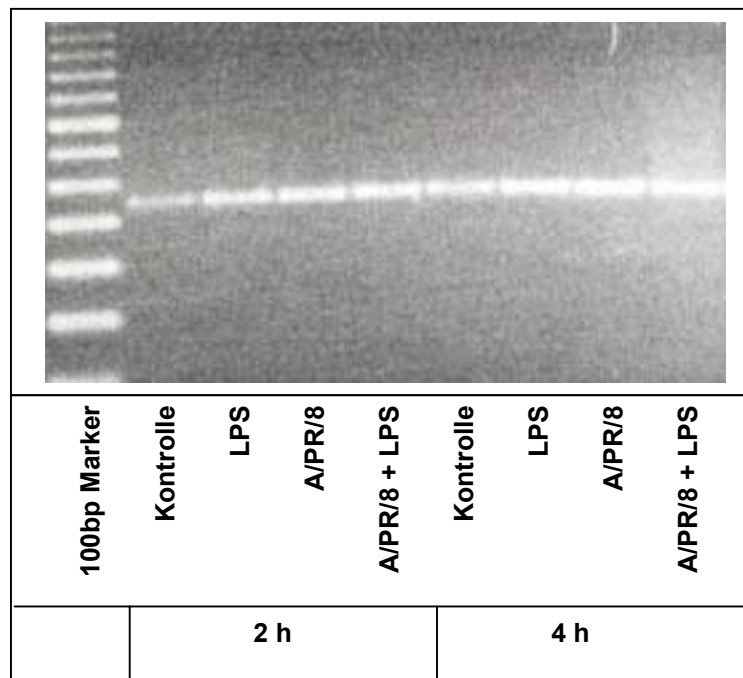


Abb. 21: Modulation der Expression von NF- κ B durch A/PR/8 bzw. LPS in murinen Makrophagen der Zelllinie PU5-1.8.
Versuchsaufbau wie in Abb. 20.

3.2.4.2 Regulation auf Proteinebene

Über die Bedeutung der transkriptionellen Regulation von NF- κ B liegen nur wenig Daten vor, daher wurde im Folgenden das Protein im Zellkern untersucht. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird unter normalen Bedingungen durch die Bindung an seinen Inhibitor I κ B im Zytoplasma gehalten und kann erst nach dem Proteosom-medierten Abbau von I κ B freigesetzt werden, in den Zellkern wandern und dort die Transkription stimulieren.

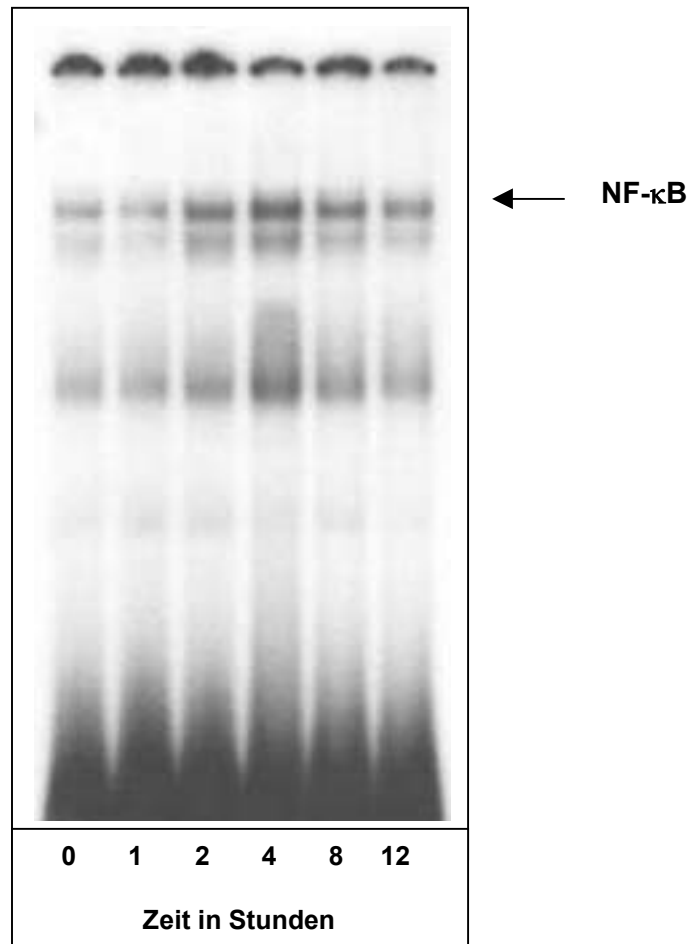


Abb. 22: Zeitkinetik der Influenza A/PR/8 induzierten NF- κ B-Bindung. PU5-1.8-Makrophagen wurden über den angegebenen Zeitraum mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Die nukleären Extrakte wurden präpariert und mit einer 32 P-markierten NF- κ B-spezifischen Oligonukleotid-Sonde im EMSA analysiert.

In der Zeitkinetik zeigte sich nach 2 Stunden eine Aktivierung von NF- κ B, die am stärksten nach 4 Stunden ausgeprägt war und nach 12 Stunden wieder auf Kontrollniveau sank (Abb. 22).

Bereits nach 2 Stunden ließ sich eine signifikante Induktion von NF- κ B durch LPS in murinen Makrophagen zeigen (Abb. 23). Interessanterweise zeigte sich in der Virus + LPS-Gruppe eine im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation abgeschwächte Aktivität. Eine A/PR/8 Infektion zeigte auch hier eine erhöhte Aktivität nach 2 und 4 Stunden.

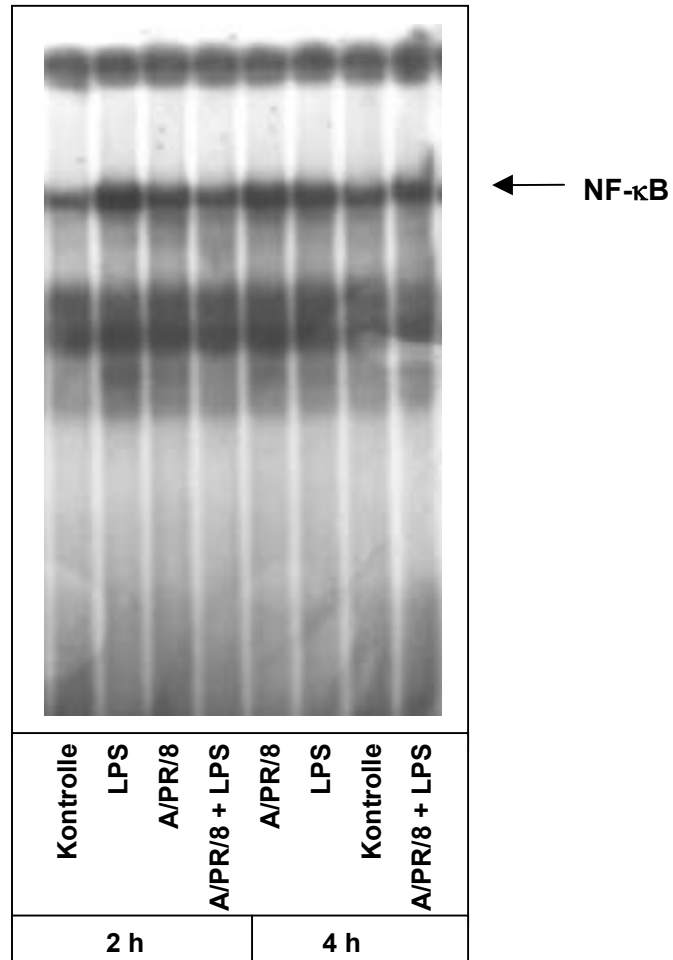


Abb. 23: Aktivierung von NF-κB durch LPS und A/PR/8. PU5-1.8-Makrophagen wurden über 2 bzw. 4 Stunden unter den angegebenen Bedingungen kultiviert. Die nukleären Extrakte wurden im EMSA nach Zugabe einer NF-κB-spezifischen Sonde elektrophoretisch getrennt.

Unter Zugabe geringer Mengen von nicht radioaktiv markiertem, NF-κB-spezifischen Oligonukleotid konnte die Qualität des EMSA deutlich verbessert werden. Abbildung 24 zeigt den Nachweis von NF-κB im Zellkern 4 bzw. 8 Stunden nach Infektion mit A/PR/8.

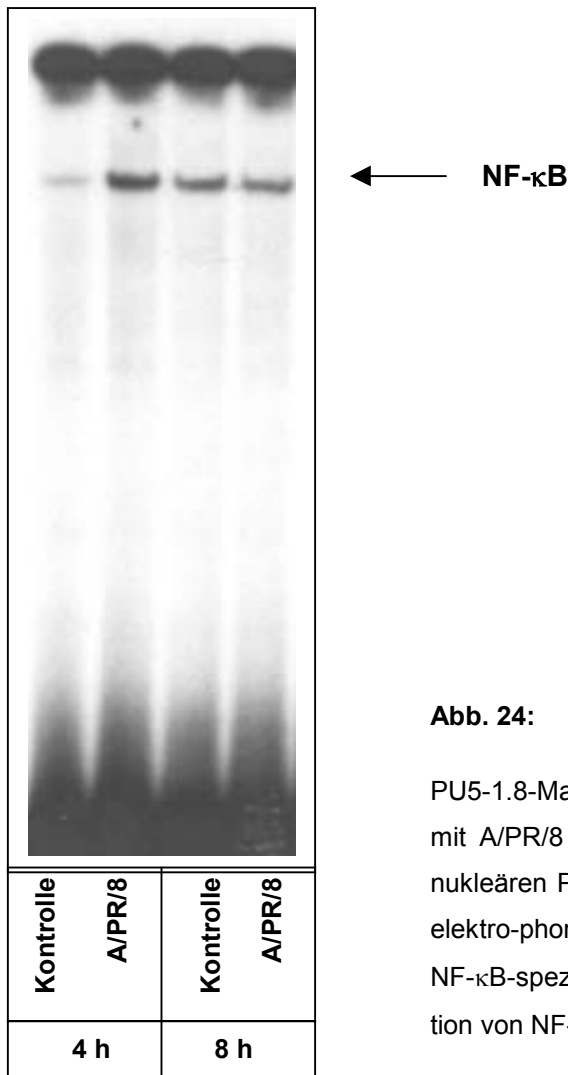


Abb. 24: Induktion von NF-κB durch A/PR/8.

PU5-1.8-Makrophagen wurden für 4 bzw. 8 Stunden mit A/PR/8 infiziert bzw. unbehandelt kultiviert. Die nukleären Proteine wurden gewonnen und im EMSA elektro-phoretisch aufgetrennt. Hierbei wurde eine NF-κB-spezifische, ³²P-markierte Sonde zur Detektion von NF-κB eingesetzt.

Abbildung 25 zeigt die densitometrische Auswertung der NF-κB-Expression nach LPS-Stimulation bzw. Infektion mit Influenza A Virus in einer Zeitkinetik von 0,5 bis 20 Stunden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Hier ist deutlich zu erkennen, dass bereits nach 0,5 Stunden die Expression von NF-κB sowohl durch LPS als auch durch Infektion mit A/PR/8 gesteigert war (Faktor 1,5). Nach 2 Stunden war die größte LPS-induzierte Expression erreicht, A/PR/8 hatte seinen Gipfel nach 4 Stunden. Während die LPS Gruppe im weiteren zeitlichen Verlauf zurück auf Kontrollniveau fiel, war eine Influenza A-Infektion in der Lage, die Expression nach 12 Stunden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant zu unterdrücken (Abb. 25).

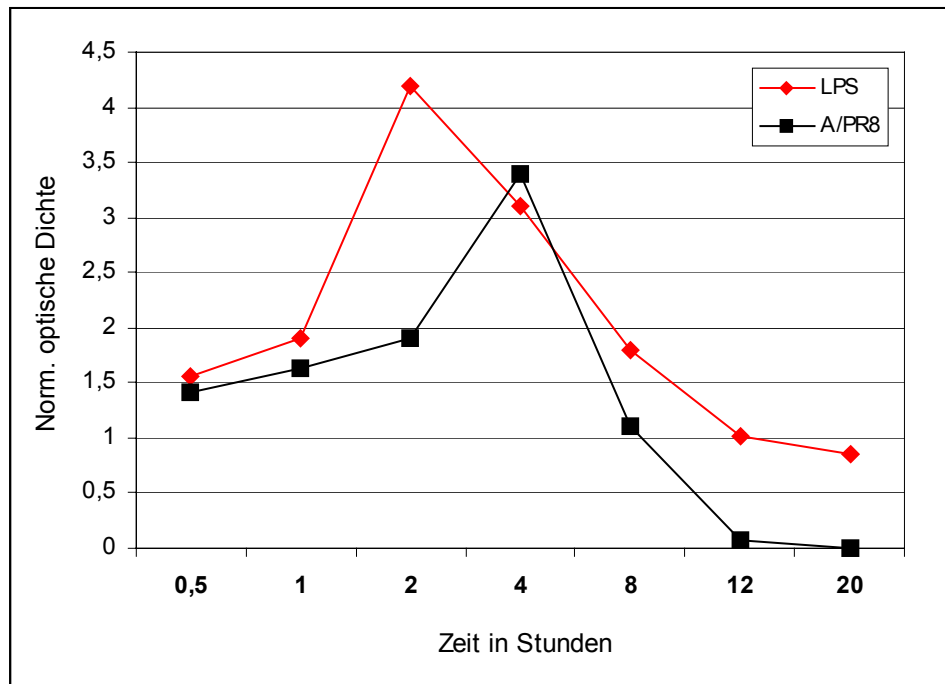


Abb. 25: Densitometrische Darstellung der NF- κ B-Zeitkinetik.

PU5-1.8-Makrophagen wurden über den angegebenen Zeitraum mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Die nukleären Proteine wurden im EMSA nach Inkubation mit einem radioaktiv markierten, NF- κ B-spezifischen Oligonukleotid elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Trocknen des Gels wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und die spezifischen Signale densitometrisch ausgewertet, hierbei wurde die Kontrolle gleich 1 gesetzt.

3.2.5. Expression von I κ B

3.2.5.1. Regulation auf Transkriptionsebene

Das inhibitorische Protein I κ B reguliert die Aktivität von NF- κ B, indem es diesen bindet und somit die Translokation von NF- κ B in den Zellkern verhindert. Die Expression von I κ B wird auf Transkriptionsebene reguliert und NF- κ B induziert die Transkription des I κ B-Gens.

Abbildung 26 zeigt die PCR zum Nachweis von I κ B. Nachdem gezeigt wurde, dass LPS sowohl die Genexpression als auch die Aktivität von NF- κ B induziert, ist es nicht verwunderlich, dass LPS auch die Expression von I κ B induziert. Es zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Expression nach A/PR/8 + LPS. Interessanterweise blieb die I κ B-Expression durch eine alleinige Influenza A Virus-Infektion unberührt, obwohl gezeigt werden konnte, dass A/PR/8 NF- κ B induziert.

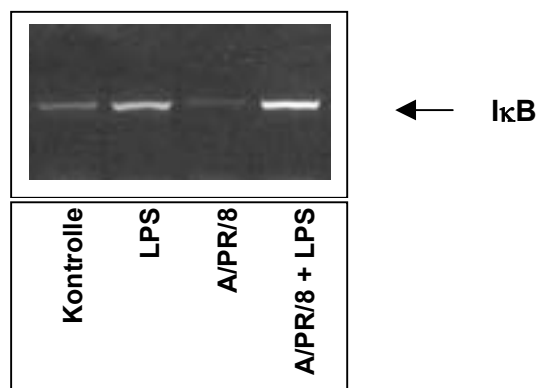


Abb. 26: Modulation der I κ B-Expression in Makrophagen.

PU5-1.8-Makrophagen wurden 4 Stunden mit 10 ng/ml stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach reverser Transkription der RNA in cDNA wurde diese mit Hilfe spezifischer Primer in der PCR amplifiziert. Nach elektrophoretischer Auftrennung im 1,5%igen Agarosegel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

3.2.5.2. Regulation auf Proteinebene

Die Darstellung des I κ B-Proteins erfolgte im Western Blot, eine quantitativ gleichwertige Proteinmenge wurde durch den Nachweis von α -Tubulin, welches unter den angegebenen Versuchsbedingungen nicht reguliert wird, gewährleistet.

In Abbildung 27 zeigt sich eine deutliche Abnahme der I κ B-Konzentration in der zytoplasmatischen Zellfraktion bereits nach zweistündiger LPS-Stimulation. I κ B wurde hingegen durch Influenza A Virus auch auf Proteinebene nicht beeinflusst.

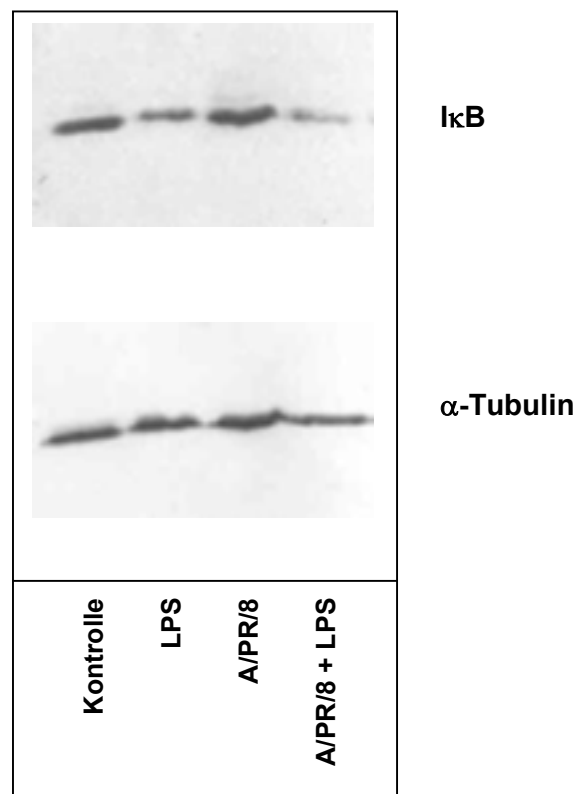


Abb. 27: Zytoplasmatischer Nachweis von I κ B in murinen Makrophagen. PU5-1.8-Makrophagen wurden 2 Stunden mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach Gewinnung der zytoplasmatischen Proteine wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern für I κ B bzw. α -Tubulin inkubiert.

Nach 8 Stunden war kein Unterschied in der zytoplasmatischen I κ B-Konzentration, weder durch LPS noch durch A/PR/8 bedingt, detektierbar (Abb. 28).

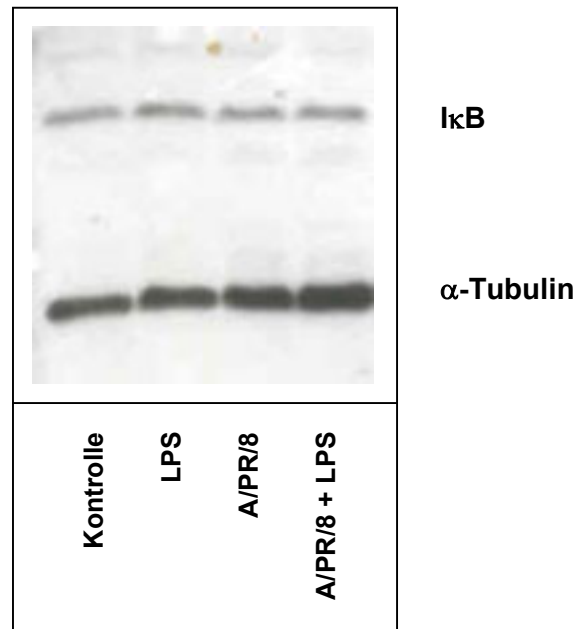


Abb. 28: I κ B-Proteinexpression in murinen Makrophagen. PU5-1.8-Makrophagen wurden 8 Stunden mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach Gewinnung der zytoplasmatischen Proteine wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern für I κ B bzw. α -Tubulin inkubiert.

3.2.6. Expression von TFIID

Einer der allgemeinen Transkriptionsfaktoren, die in der Frühphase der Transkription bei der Bildung des Transkriptionskomplexes eine entscheidende Rolle spielen, ist TFIID (siehe Kapitel 1.1.3 und Abbildung 1). Abbildung 29 zeigt die Modulation dieses Faktors durch eine Infektion mit A/PR/8 in murinen Makrophagen. Die Konzentration von TFIID im Zellkern war nach einer einstündigen Inkubation mit Influenza A Virus kaum verändert. Im weiteren Verlauf der Infektion kam es zu einer signifikanten Abnahme der TFIID-Konzentration, welche nach 12 Stunden kaum mehr nachweisbar war.

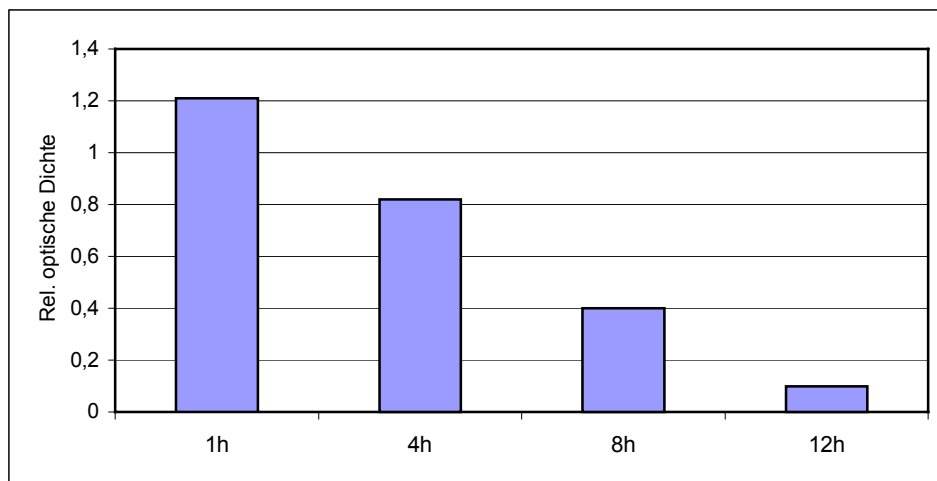


Abb. 29: Nukleärer TFIID in murinen Makrophagen.

PU5-1.8-Makrophagen wurden mit 2 MOI A/PR/8 infiziert und nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die nukleären Proteine wurden aufgereinigt und im EMSA nach Zugabe eines spezifischen, ^{32}P -markierten Oligonukleotids aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die densitometrische Quantifizierung im Vergleich zur Kontrolle, die gleich 1 gesetzt wurde.

3.2.7. Expression von AP-1

Der Transkriptionsfaktor activating protein-1 (AP-1) wurde nach A/PR/8-Infektion bereits nach einer Stunde signifikant erhöht im Zellkern von PU5-1.8 nachgewiesen. LPS hatte zu diesem Zeitpunkt keinen Effekt, eine gleichzeitige Infektion mit A/PR/8 und Stimulation mit LPS hingegen zeigte eine gesteigerte Konzentration an AP-1 im Vergleich zur alleinigen Infektion mit Influenza A Virus.

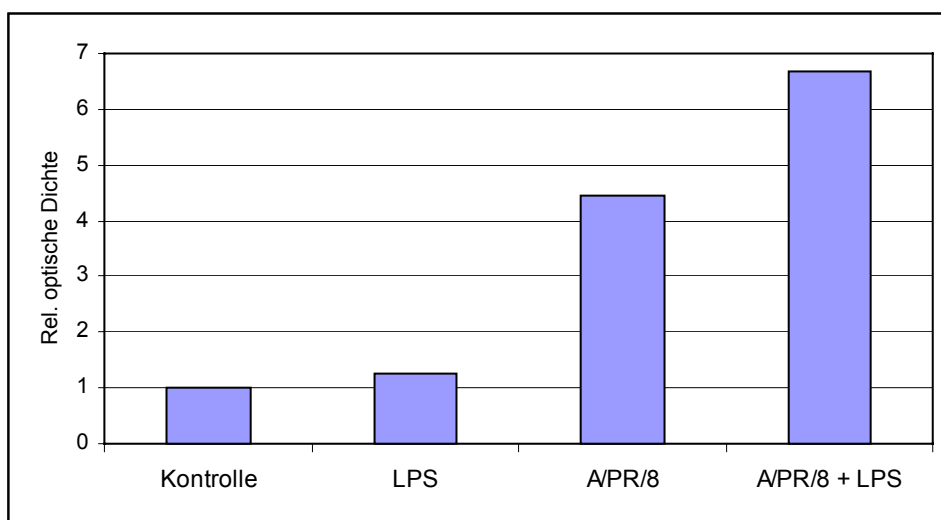


Abb. 30: Induktion von AP-1 in murinen Makrophagen. PU5-1.8-Makrophagen wurden mit 10 ng/ml LPS stimuliert oder mit 2 MOI A/PR/8 infiziert und nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die nukleären Proteine wurden aufgereinigt und im EMSA nach Zugabe eines spezifischen, ^{32}P -markierten Oligonukleotids aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die densitometrische Quantifizierung.

3.3. Zytokinexpression nach A/PR/8-Infektion

Eine Infektion mit Influenza A Virus führt zu einer Induktion chemotaktischer (RANTES, MIP-1 α , MCP-1, MCP-3 und IP-10), pro-inflammatorischer (IL-1 β , IL-6, IL-18 und TNF- α) und antiviraler (IFN α/β) Zytokine. Da die Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren durch eine Infektion mit Influenza A Virus in den späten Zeitpunkten signifikant erniedrigt wurde bzw. in einigen Fällen kaum mehr nachweisbar war, sollte im Folgenden durch den Nachweis der Zytokinexpression gezeigt werden, dass der zelluläre Transkriptionsapparat noch in Takt ist.

3.3.1. Expression von IL-6

IL-6 wird bekanntlich durch Influenza A Virus induziert. Die Abbildung 31 zeigt die Expression in PU5-1.8 nach 16 Stunden. LPS induzierte zu diesem Zeitpunkt IL-6 um den Faktor 6 und A/PR/8 sogar um den Faktor 12. In der A/PR/8 + LPS-Gruppe zeigte sich ein signifikanter additiver Effekt der beiden Stimuli.

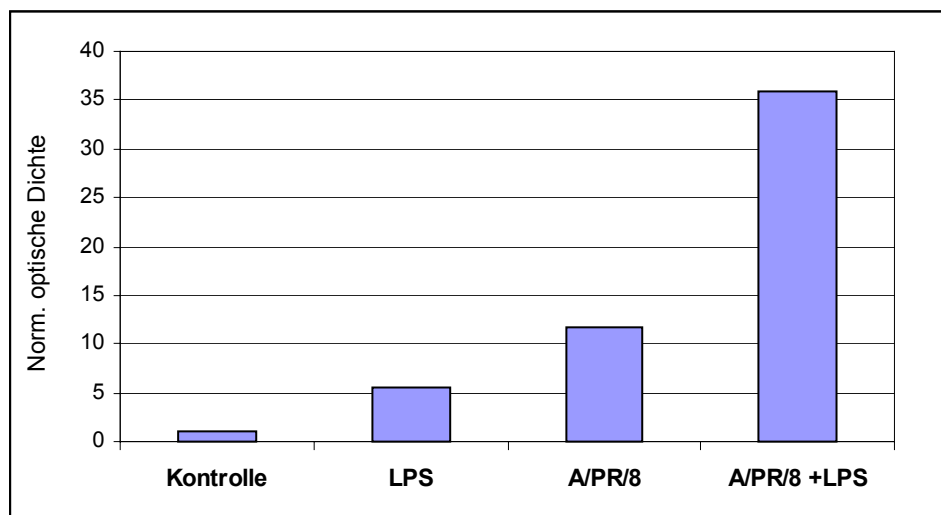


Abb. 31: Expression von IL-6 in murinen Makrophagen nach 16 Stunden. PU5-1.8-Makrophagen wurden über den angegebenen Zeitpunkt mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach Gewinnung der RNA und reverser Transkription wurde die cDNA in der PCR amplifiziert. Das Produkt wurde im Anschluss elektrophoretisch aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid densitometrisch quantifiziert, wobei die Kontrolle gleich 1 gesetzt wurde.

3.3.2. Expression von TNF- α

Neben der deutlichen Induktion von IL-6 (Abb. 31) zeigte sich auch eine Steigerung der TNF- α -Expression durch A/PR/8 nach 12 Stunden (Abb. 32).

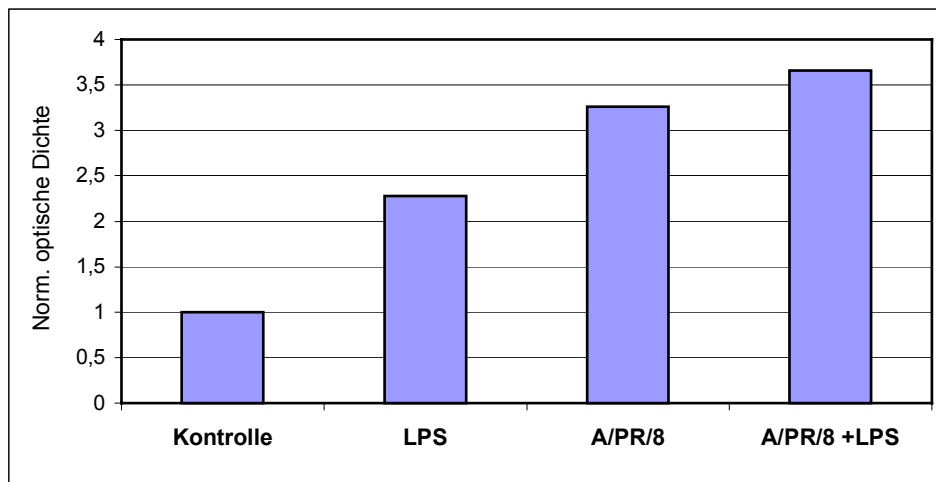


Abb. 32: Expression von TNF- α in PU5-1.8 nach 12 Stunden.

PU5-1.8-Makrophagen wurden über den angegebenen Zeitpunkt mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach Gewinnung der RNA und reverser Transkription wurde die cDNA in der PCR amplifiziert. Das Produkt wurde im Anschluss elektrophoretisch aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid densitometrisch quantifiziert. Die unbehandelte Gruppe (Kontrolle) wurde gleich 1 gesetzt.

4. Diskussion

Die unspezifische Immunantwort durch phagozytierende Zellen und Serumfaktoren dient der Bekämpfung und Elimination von Mikroorganismen im menschlichen Körper. Das mononukleäre Phagozyten-System übernimmt hierbei zwei wichtige Funktionen: Durch Endozytose werden Antigene direkt ausgeschaltet und durch die Antigen-Präsentation wird die spezifische Immunantwort initiiert. Insbesondere bei der Abwehr von Viruserkrankungen spielen die Monozyten / Makrophagen eine entscheidende Rolle, sie sind zugleich Zielzellen der Infektion und Effektorzellen der antiviralen Immunität¹¹⁰.

Influenza A Viren infizieren primär die Epithelzellen des oberen Respirationstraktes, sind aber auch in der Lage T Zellen und Monozyten / Makrophagen zu infizieren¹¹¹⁻¹¹⁴. Während einer Influenza A Virus-Infektion produzieren Makrophagen unter anderem Zytokine wie IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- α/β und IL-18¹¹³⁻¹¹⁷, welche T Zellen, Makrophagen und auch Dendritische Zellen aktivieren^{118, 119}. Chemokine spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, der Entzündungsreaktion¹²⁰ und bei viralen Infektionen. Monozyten / Makrophagen nehmen auch in diesem System eine zentrale Rolle ein, indem sie nach Virusinfektion Chemokine wie RANTES, MIP-1 α , MCP-1, MCP-3 und IP-10 produzieren^{112, 117, 121, 122}.

Während der Interaktion vieler RNA Viren, wie z. B. Influenza A Virus, mit empfänglichen Zellen, wie z. B. Monozyten / Makrophagen, übernehmen die

¹¹⁰ Mogensen, 1979

¹¹¹ Bussfeld et al., 1997

¹¹² Bussfeld et al., 1998

¹¹³ Sareneva et al., 1998

¹¹⁴ Pirhonen et al., 1999

¹¹⁵ Gong et al., 1991

¹¹⁶ Peschke et al., 1993

¹¹⁷ Hofmann et al., 1997

¹¹⁸ Dinarello, 1999

¹¹⁹ Meer et al., 1998

¹²⁰ Luster, 1998

¹²¹ Julkunen et al., 2001

¹²² Sprenger et al., 1996

Viren das zelluläre Genexpressions-System, was zu einer bevorzugten Produktion viraler Produkte führt und die zelluläre Genexpression ausschaltet¹²³.

Regulatorische Transkriptionsfaktoren stellen einen Bestandteil für die differenzielle Genexpression dar. Die meisten grundlegenden Prozesse der Zellbiologie stehen im Zusammenhang mit einer veränderten Transkription spezifischer Gene. Schon geringe Veränderungen in der Menge oder Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren können zu einer modifizierten Expression von Genen führen¹²⁴.

Über die molekularen Hintergründe, nämlich der Aktivität regulierender Signaltransduktions-Moleküle bei der Zytokingenexpression in Influenza-infizierten Zellen, ist allerdings noch wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren bei der Übernahme des zellulären Transkriptionsapparates durch das Influenza A Virus zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die Genexpression der Transkriptionsfaktoren AP-1, CREB, CREM, ICSBP, Max, NF- κ B und TFIID in A/PR/8-infizierten murinen Makrophagen untersucht.

Die hohe Sensitivität der Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht unter optimalen Bedingungen den Nachweis geringster mRNA-Mengen nach reverser Transkription. Obwohl diese Methode sehr sensitiv und einfach für qualitative Untersuchungen ist, tauchen doch Schwierigkeiten bei der exakten Quantifizierung auf. Beim Vergleich unterschiedlicher Quantifizierungsmethoden zeigt sich die Limitierung der quantitativen Aussage einer konventionellen PCR, die Amplifikation kann je nach Primerkonzentration und Qualität der Matrize variieren¹²⁵. Um eine möglichst genaue Aussage über die Genexpression der untersuchten Faktoren zu erreichen, wurden die einzelnen Reaktionen mit unterschiedlichem Ausgangsmaterial wiederholt. Eine semi-quantitative Aussage wurde durch die GAPDH-Kontrolle als Referenz erzielt. Durch die Weiterentwicklung der PCR, die *real time* PCR, ist mittlerweile eine

¹²³ Huarte et al., 2001

¹²⁴ Nichols und Nimer, 1992

¹²⁵ Babu et al., 1993

genauere Quantifizierung nach jedem einzelnen PCR-Zyklus möglich¹²⁶. Damit ist diese neue Technik in der Lage, den „Gold-Standard“ des RNA-Nachweises und der RNA-Quantifizierung, den Northern Blot, zu ersetzen.

Nach Optimierung der Annealing-Temperatur (Abb. 7 und 8) und der Zyklenzahl (Abb. 10) erfolgte die Quantifizierung der Genexpression der untersuchten Transkriptionsfaktoren anhand der Densitometrie der spezifischen Produkte in Bezug auf die GAPDH-Kontrolle.

Die Interferone gehören zu der ersten Verteidigungslinie der zellulären Antwort auf eine virale Infektion¹²⁷. Man unterscheidet zwei Gruppen von Interferonen, IFN- α/β und IFN- γ . IFN- α/β wird innerhalb weniger Stunden nach Virusinfektion induziert und verhindert die Replikation und Ausbreitung der Viren. Die Induktion der Produktion von IFN- α/β erfordert verschiedene regulatorische Faktoren, die hauptsächlich auf der Ebene der Transkription wirken und die IFN- α/β mRNA induzieren.

Das *Interferon consensus sequence binding protein* (ICSBP) ist ein Negativ-Regulator von IFN-induzierten Genen¹²⁸. Die vorliegende Arbeit zeigt eine signifikante Induktion von ICSBP in PU5-1.8 durch A/PR/8 nach 8 Stunden (Abb. 16). Der bakterielle Stimulus LPS hat unter diesen Versuchsbedingungen keinen Effekt auf die Expression von ICSBP, verhindert aber auf der anderen Seite auch nicht die A/PR/8-induzierte Expression. Die schnelle Aktivierung der Transkriptions-Systeme durch Influenza A Virus wird unter anderem durch IRFs (*Interferon response factors*) vermittelt¹²⁹. ICSBP ist ein Bindungspartner der IRFs und beeinflusst dadurch die Expression der IFN- α/β -induzierten Genexpression. Das vorliegende Ergebnis zeigt eine Möglichkeit auf, wie das Influenza A Virus den zellulären Transkriptionsapparat beeinflusst, um der antiviralen Antwort zu entkommen, indem es die IFN- α/β -induzierte Genexpression durch die Induktion von ICSBP blockiert. Um die Signifikanz der gezeigten ICSBP-Regulation zu zeigen, müssen sich hier weitere Untersuchungen, wie

¹²⁶ Giulietti et al., 2001

¹²⁷ Sen und Ransohoff, 1993

¹²⁸ Nelson et al., 1993

¹²⁹ Ronni et al., 1995

Proteinnachweis und Gelretentions-Analysen, anschließen.

Das NS1-Protein (siehe 1.3.2.) wird in der frühen Phase einer Influenza Infektion produziert¹³⁰ und verhindert ebenfalls die antivirale IFN-Antwort. Es konnte gezeigt werden, dass das NS1-Protein die Aktivierung von IRF-3, einem der Hauptregulatoren der IFN- α/β Genexpression, inhibiert¹³¹.

Viele Viren, wie Adenoviren, Polioviren und auch Influenza Viren, haben Strategien entwickelt, um den Abfall der Proteinsynthese-Rate zu verhindern, der von einer unkontrollierten Interferon-Antwort begleitet wird. Eines der zellulären Proteine, die während dieser Antwort synthetisiert werden, ist die Interferon-induzierte, dsRNA-aktivierte Protein-Kinase (PKR). Diese Kinase hat zwei unterschiedliche Wirkungen, sie bedingt eine Autophosphorylierung bzw. Aktivierung und zusätzlich verfügt sie über eine Proteinkinase-Aktivität gegenüber ihrem natürlichen Substrat, der α -Untereinheit des eIF-2 (engl.: *eukaryotic initiation factor 2*). Funktionelles eIF-2 ist für die Zelle erforderlich für die Bindung der Initiator met-tRNA an die ribosomale Untereinheit, bevor mRNA gebunden wird. Durch die Abschwächung der PKR-Aktivität erreichen die Viren, insbesondere auch das Influenza A Virus¹³², eine Drosselung bis hin zur kompletten Abschaltung der Proteinsynthese in infizierten Zellen.

Ein weiterer wichtiger Faktor, der in die Regulation der IFN- α/β -Transkription involviert ist, ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B. NF- κ B spielt eine entscheidende Rolle in der Regulierung vieler physiologischer Zellantworten, von der Immunantwort und der Entzündungsreaktion bis hin zur Differenzierung der Zelle und zur Apoptose¹³³. Unter normalen Bedingungen ist NF- κ B an seinen Inhibitor I κ B gebunden und wird dadurch im Zytoplasma gehalten. Die meisten Faktoren, die NF- κ B induzieren, wirken durch die Beeinflussung des erst kürzlich entdeckten I κ B Kinase Komplexes (IKK)¹³⁴. Der aktivierte IKK phosphoryliert I κ B, welches daraufhin rasch ubiquitiniert und der 26S Proteosom-vermittelten Degradierung zugeführt wird. NF- κ B wird dadurch

¹³⁰ Shapiro et al., 1987

¹³¹ Talon et al., 2000

¹³² Katze et al., 1988

¹³³ Ghosh et al., 1998

¹³⁴ DiDonato et al., 1997

freigesetzt und wandert in den Zellkern, wo es die Transkription von Genen stimuliert, die im Promotorbereich das NF- κ B-Bindungsmotiv enthalten¹³⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Regulation der NF- κ B-Genexpression durch A/PR/8 auf Transkriptionsebene untersucht. Bereits innerhalb der ersten 4 Stunden (Abb. 21) zeigte sich eine deutliche Induktion der mRNA-Expression durch eine Influenza A Virus Infektion. Es ist bekannt, dass LPS NF- κ B induzieren kann, somit ist die LPS-Gruppe eine Positivkontrolle der Genexpression und zeigte entsprechend starke Banden nach 2, 4 und 8 Stunden in der PCR (Abb. 20 und 21). Die stärkste Expression von NF- κ B durch Virus und/oder LPS erschien nach 8 Stunden (Abb. 20). Da kaum etwas über die Bedeutung der NF- κ B-mRNA in der Regulation dieses Transkriptionsfaktors bekannt ist, wurde im Folgenden die Aktivität von NF- κ B in der Gelretentions-Analyse untersucht. In einer zunächst durchgeführten Zeitkinetik zeigte sich die größte Aktivität bzw. größte Menge von NF- κ B im Zellkern muriner Makrophagen der Linie PU5-1.8 vier Stunden nach A/PR/8-Infektion (Abb. 22). Eine signifikante Steigerung der NF- κ B-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle konnte bereits nach 2 Stunden nachgewiesen werden. Auch nach 8 Stunden war NF- κ B im Zellkern noch erhöht, fiel im weiteren Verlauf aber zurück auf Kontrollniveau (Abb. 22). Bereits nach 2 Stunden ließ sich eine signifikante Induktion von NF- κ B durch LPS in murinen Makrophagen zeigen (Abb. 23). Interessanterweise zeigte sich in der Virus + LPS-Gruppe eine im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation abgeschwächte Aktivität. Dies ist insofern verwunderlich, da z. B. die Induktion von TNF- α -Gentranskripten durch zusätzliche Stimulation mit LPS signifikant stärker ist als durch eine alleinige Influenza A Virus Infektion¹³⁶ und einer der verantwortlichen Transkriptionsfaktoren für die TNF- α Induktion NF- κ B ist. Abbildung 23 zeigt eine erhöhte Aktivität von NF- κ B nach 2 und 4 Stunden durch eine A/PR/8-Infektion in murinen Makrophagen. Die anfangs im EMSA sichtbaren unspezifischen Banden bei der Darstellung von NF- κ B konnten durch Zugabe geringer Mengen des NF- κ B-spezifischen, nicht radioaktiv-markierten Oligonukleotids eliminiert werden. Abbildung 24 zeigt den Nachweis von NF- κ B in

¹³⁵ Karin et al., 2000

¹³⁶ Nain et al., 1990

nukleären Proteinen unter den veränderten Bedingungen nach 4 bzw. 8 Stunden. Auch hier war eine deutliche Aktivierung von NF- κ B in PU5-1.8 nach 4 Stunden (vergleiche auch Abb. 22) sichtbar, die nach 8 Stunden nicht mehr nachgewiesen wurde. Abbildung 25 zeigt die densitometrische Auswertung der NF- κ B-Expression nach LPS-Stimulation bzw. nach Infektion mit Influenza A Virus in einer Zeitkinetik von 0,5 bis 20 Stunden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Hier war deutlich zu erkennen, dass bereits nach 0,5 Stunden die Expression von NF- κ B sowohl durch LPS als auch durch Infektion mit A/PR/8 gesteigert war (Faktor 1,5). Nach 2 Stunden war die stärkste LPS-induzierte Expression erreicht (> 4fach), A/PR/8 induzierte NF- κ B am stärksten (ca. 3,5fach) nach 4 Stunden. Während die LPS-Gruppe im weiteren zeitlichen Verlauf zurück auf Kontrollniveau fiel, war eine Influenza A-Infektion in der Lage, die Expression bereits nach 12 Stunden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant zu unterdrücken (Abb. 25).

In Makrophagen beginnt die virale Proteinsynthese 4 – 6 h nach Influenza A Virus-Infektion¹³⁷. Die schnelle Aktivierung des Transkriptionsapparates durch Influenza A Virus wird neben den IRFs auch durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B bedingt. Damit gesellt sich Influenza A Virus zu einer großen Gruppe NF- κ B-induzierender Viren, wie HIV-1, HTLV-1, Hepatitis B, HSV1, Sendai Virus, EBV und anderen. Die Expression eines einzelnen Influenza Virus-Proteins, dem Hämagglutinin, führt zur starken Aktivierung der NF- κ B-DNA-Bindung und -Transaktivierung. Das Hämagglutinin führt zur Bildung von Sauerstoffradikalen, die den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren¹³⁸. Im Vergleich mit dem Sendai Virus zeigte sich eine ähnlich starke Aktivierung der NF- κ B DNA-Bindung durch Influenza A Virus¹³⁹. Einige Faktoren, einschließlich der dsRNA, die während einer Influenza A Virus-Infektion generiert wird, können zu einer Aktivierung von NF- κ B führen. Die Überexpression viraler Proteine, wie NP, M und HA, führen zu einer erhöhten Transkriptionsrate NF- κ B-abhängiger Gene¹⁴⁰. Diese Untersuchungen unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Wang et al. konnten im Gegensatz dazu nur eine marginale Aktivierung von NF- κ B in

¹³⁷ Saraneva et al., 1998

¹³⁸ Pahl und Bäumler, 1995

¹³⁹ Matikainen et al., 2000

¹⁴⁰ Flory et al., 2000

Influenza Virus-infizierten Zellen finden. Hier wurde vielmehr gezeigt, dass das NS1-Protein von Influenza A Virus die Aktivierung von NF- κ B verhindert¹⁴¹. NF- κ B reguliert die IFN- β -mRNA-Expression und IFN- β induziert wiederum die Expression antiviraler Gene, somit wäre die Drosselung der NF- κ B-Aktivität durch das NS1-Protein ein möglicher Mechanismus, wie Influenza Virus die zellulären, antiviralen Abwehrmechanismen verhindert. Betrachtet man die Zeitkinetik der NF- κ B-Aktivität in Abbildung 25, so zeigte sich nach dem 8 Stunden-Zeitpunkt ein signifikanter Abfall der NF- κ B-Aktivität unter die Basisaktivität in der Virus-infizierten Gruppe, die nach 20 Stunden kaum mehr nachweisbar war. Dieses Ergebnis ist mit den Untersuchungen von Wang et al. vereinbar und unterstützt somit den beschriebenen Mechanismus der zellulären Abwehr zu entgehen.

Da die Aktivität von NF- κ B durch das inhibitorische Protein I κ B reguliert wird, wurde im Folgenden die Expression dieses Proteins im Western Blot untersucht. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinkonzentration diente der Nachweis von α -Tubulin. Es ist bekannt, dass aktiviertes NF- κ B in der Lage ist, mit zeitlicher Verzögerung die Expression des Gens für I κ B zu induzieren¹⁴². In der Abbildung 25 zeigte sich eine maximale Aktivität von NF- κ B in murinen Makrophagen der Linie PU5-1.8 durch eine LPS-Stimulation bereits nach 2 Stunden. In Einklang mit diesem Ergebnis konnte in der PCR eine deutliche Induktion der I κ B-Expression durch LPS nach 4 Stunden gezeigt werden (Abb. 26). Die größte Expression unter den angegebenen Bedingungen wurde durch Stimulation mit LPS und gleichzeitiger Influenza A Virus-Infektion beobachtet, wohingegen die alleinige A/PR/8-Infektion keine Steigerung der I κ B-Expression bedingte. Da A/PR/8 die Expression und auch die Aktivität von NF- κ B zumindest in den frühen Zeitpunkten induzierte (Abb. 20, 22, 24 und 25), ist es verwunderlich, dass das Virus nicht auch die I κ B mRNA induzierte (Abb. 26).

Die Translokation in den Zellkern und die Aktivierung von NF- κ B erfolgt nach der Abspaltung des inhibitorischen Proteins, welches abgebaut wird¹⁴³. Abbildung 27 zeigt die durch LPS bedingte Abnahme von I κ B im Zytoplasma

¹⁴¹ Wang et al., 2000

¹⁴² Sun et al., 1993

¹⁴³ Karin und Delhase, 2000

von PU5-1.8 nach 2 Stunden. Analog zu der Induktion der I κ B-mRNA (Abb. 26) in der Virus + LPS-Gruppe, war beim Proteinnachweis eine deutliche Reduktion von I κ B zu erkennen (Abb. 27). Auch hier war eine A/PR/8-Infektion nicht in der Lage, I κ B im Zytoplasma der murinen Makrophagen zu reduzieren, obwohl doch eine NF- κ B-Induktion durch A/PR/8 (Abb. 20, 22, 24 und 25) gezeigt wurde. Um dieses Phänomen zu ergründen, sollte die Aktivität der IKK nach Influenza A Virus und eventuell auch weitere Mitglieder der I κ B-Familie untersucht werden. Denkbar wäre, dass ein Influenza-Protein beispielsweise p105 bindet und somit ebenfalls das Heterodimer NF- κ B freisetzt, welches dann in den Zellkern gelangen kann. Diese Fähigkeit hat Tax, ein 40 kDa Polypeptid, des HTLV-1¹⁴⁴. In der Abbildung 28 wird deutlich, dass nach 8 Stunden keine Reduktion des zytoplasmatischen I κ B durch LPS und/oder A/PR/8 mehr nachweisbar war. Zu diesem Zeitpunkt sind die neu synthetisierten I κ B-Moleküle (Abb. 26) bereits in den Zellkern gewandert und haben an NF- κ B gebunden, wodurch das Dimer infolge einer höheren Affinität zu seinem Inhibitor von der DNA dissoziiert ist. Danach erfolgte der Transport des Trimer in das Zytoplasma der Zelle¹⁴⁵.

Die transkriptionelle Regulation der Genexpression ist eine wichtige Komponente zellulärer Veränderungen, die durch Second-Messenger-Transduktionswege als Antwort auf extrazelluläre Stimuli hervorgerufen werden. Der Second-Messenger zyklisches Adenosin Monophosphat (cAMP) reguliert eine Vielzahl physiologischer Prozesse durch Veränderung des basalen Genexpressionsmusters. CREB und CREM gehören zusammen mit ATF-1 zu einer Subfamilie der Genfamilie der *cAMP responsive element* (CRE) bindenden Transkriptionsfaktoren¹⁴⁶.

Abbildung 11 zeigt die Modulation der CREB Expression in murinen Makrophagen in einer Zeitkinetik von 0,5 bis 2 Stunden. LPS konnte nach 2 Stunden signifikant die Expression von CREB induzieren, wohingegen eine A/PR/8-Infektion keinen Einfluss auf die mRNA-Synthese von CREB innerhalb der ersten 2 Stunden hatte. Die stärkste CREB Expression zeigte sich 8

¹⁴⁴ Mosialos, 1997

¹⁴⁵ Arenzana-Seisdedos et al., 1997

¹⁴⁶ Sassone-Corsi, 1995

Stunden nach LPS-Gabe. Zu diesem Zeitpunkt führte eine Infektion mit A/PR/8 zu einer signifikanten Unterdrückung der Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 12). Die gleichzeitige Infektion der Zellen mit Influenza A Virus hatte keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Expression innerhalb der ersten Stunden (Abb. 11 und 12). Nach 16 Stunden war keine Induktion der CREB-Expression durch LPS mehr nachweisbar (Abb. 13), in der A/PR/8-Gruppe war die Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auch zu diesem Zeitpunkt reduziert. Auch in der Gruppe mit Virus + LPS erschien die Expression im Vergleich zur Kontrolle abgeschwächt. Bei der Untersuchung von CREB-Protein im EMSA konnte es bereits 30 min nach Stimulation mit LPS im Zellkern vermehrt nachgewiesen werden (Abb. 14). Transkriptionsfaktoren gelten als eine schnelle und spezifische Möglichkeit die Genexpression zu regulieren, aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass die Transkriptionsfaktoren schnell in den Zellkern transportiert werden, aber auch schnell wieder eliminiert werden müssen. So war nach 1 Stunde kein Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und der LPS-Stimulation zu erkennen. A/PR/8 konnte hingegen nach 1 Stunde die Konzentration an CREB im Zellkern im Vergleich zur Kontrolle senken (Abb. 14). Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtung, dass cAMP einer Makrophagen-Aktivierung generell entgegenwirkt, so wird bekanntlich die TNF- α -Synthese in Makrophagen durch cAMP herunterreguliert¹⁴⁷. In Monozyten steigt die TNF- α -Synthese nach A/PR/8-Infektion¹⁴⁸⁻¹⁵¹. Entsprechend sollten bei erhöhter TNF- α -Produktion die cAMP-abhängigen Transduktionswege negativ reguliert werden. Bestätigt wird dies durch die Abnahme an CREB, sowohl der mRNA als auch des Proteins im Zellkern.

CREM Proteine zeigen eine hohe Homologie zu CREB, insbesondere in ihrer DNA-Bindungs-Domäne und der Kinase-induzierten Domäne (engl.: *kinase-inducible domain*, KID), einer Region, die mit dem Co-Aktivator CREB-bindendes Protein (CBP) interagiert. Die meisten CREM-Proteine sind transkriptionelle Repressoren. Beispielsweise fehlt CREM- α die Glutamin-reiche

¹⁴⁷ Renz et al., 1988

¹⁴⁸ Nain et al., 1990

¹⁴⁹ Gong et al., 1991

¹⁵⁰ Bender et al., 1993

¹⁵¹ Sprenger et al., 1994

Domäne, welche im CREB-Protein für die transkriptionelle Aktivierung essentiell ist¹⁵². Der Transkriptionsfaktor CREM scheint bei der Spermatogenese¹⁵³ und auch in der Physiologie und Entwicklung innerhalb der hypothalamisch-hypophysär-gonadalen Achse eine entscheidende Rolle zu spielen¹⁵⁴. Über die Funktion von CREM Proteinen in Monozyten / Makrophagen liegen zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Daten vor. Unstimulierte murine Makrophagen der Linie PU5-1.8 exprimierten den Transkriptionsfaktor CREM (Abb. 15). Bereits nach 4 Stunden (Abb. 15 A) zeigte sich eine deutliche Steigerung in der A/PR/8-Gruppe für CREM- α . Im Gegensatz zu einer LPS-Stimulation, die ebenfalls signifikant CREM- α induzierte, war das Influenza A Virus auch in der Lage CREM- β und CREM- γ zu induzieren. Ein ähnliches Bild zeigte sich nach 8 Stunden (Abb. 15 B), hier war neben der deutlichen Induktion von CREM durch LPS oder Virus auch ein synergistischer Effekt in der Gruppe A/PR/8 + LPS zu erkennen. Auch die durch Influenza A Virus-induzierte Expression von CREM- β und CREM- γ zeigte in dieser Gruppe die stärkste Bande. CREM ist ein transkriptioneller Repressor und wurde durch A/PR/8 induziert und auf der anderen Seite unterdrückte Influenza A Virus zusätzlich die Aktivität von CREB. Somit hat das Virus auch einen Einfluss auf die zelluläre, cAMP-induzierte Genexpression in murinen Makrophagen.

Im Myc/Max/Mad-Netzwerk von Transkriptionsfaktoren gilt Max aufgrund seiner Fähigkeit zur Dimerisierung mit den anderen Familienmitgliedern als zentraler Regulator der Aktivität. Max wurde durch die Stimulation mit LPS in PU5-1.8 bereits nach 4 Stunden induziert, in der densitometrischen Auswertung hatte LPS eine um den Faktor 20 erhöhte Max-Expression (Abb. 18). Eine Infektion mit Influenza A/PR/8 hatte zu den frühen Zeitpunkten kaum einen Einfluss auf die Max-Expression (Abb. 17 und 18), konnte diese aber im weiteren Verlauf (nach 10 - 12 Stunden) signifikant unterdrücken (Abb. 19). Bereits nach 4 Stunden zeigte sich in der Virus + LPS-Gruppe eine deutlich niedrigere Induktion im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation, obwohl zu diesem Zeitpunkt A/PR/8 alleine einen positiven Einfluss auf die Max-Expression

¹⁵² Stehle et al., 1993

¹⁵³ Peri und Serio, 2000

¹⁵⁴ Laurance et al., 1997

aufwies (Abb. 18). Dieser Einfluss einer Influenza A Virus-Infektion muriner Makrophagen wurde noch deutlicher im weiteren Verlauf. Abbildung 19 zeigt die Expression nach densitometrischer Quantifizierung nach 8, 10 und 12 Stunden. Zu allen drei Zeitpunkten war die Expression von Max durch eine A/PR/8-Infektion im Vergleich zu den unbehandelten Zellen um ca. 50% reduziert. LPS alleine steigerte die Expression um den Faktor 2,5 – 3 über den untersuchten Zeitraum. Während die Max-mRNA nach 8 Stunden LPS und zusätzlicher Infektion mit A/PR/8 im Vergleich zur Kontrolle noch um ca. 50% erhöht war, so fiel die Expression im weiteren Verlauf auf Kontrollniveau zurück (Abb. 19), eine Influenza A Virus-Infektion wirkte also einer LPS-induzierten Max-Expression entgegen. Die Proteine des Myc/Max/Mad-Netzwerkes spielen eine essentielle Rolle in der Regulation von Zell-Proliferation und –Differenzierung und Max vermittelt durch seine Fähigkeit zur Dimerisierung mit den anderen Familienmitgliedern diese Wirkung. Durch den hier dokumentierten Einfluss von A/PR/8 auf die Expression von Max kann das Virus auch auf die Proliferation und Differenzierung der infizierten Zelle einwirken. Um hier eine finale Aussage treffen zu können, wäre es notwendig, die Proteine des Myc/Max/Mad-Netzwerkes von Transkriptionsfaktoren durch Gelretentionsanalysen weiter zu charakterisieren.

Einer der allgemeinen Transkriptionsfaktoren, die in der Frühphase der Transkription bei der Bildung des Transkriptionskomplexes eine entscheidende Rolle spielen, ist TFIID. Abbildung 29 zeigt den Nachweis von TFIID in der Kernfraktion muriner Makrophagen in einer Zeitkinetik. Der EMSA wurde densitometrisch quantifiziert und es zeigte sich im Verlauf der Kinetik eine deutliche Abnahme der TFIID-Aktivität durch eine Infektion mit Influenza A Virus, die nach 12 Stunden kaum mehr nachweisbar war. Die zelluläre Transkription war somit stark beeinträchtigt.

Der Transkriptionsfaktor AP-1 wurde durch A/PR/8 bereits nach einer Stunde signifikant erhöht im Zellkern von PU5-1.8 nachgewiesen (Abb. 30). LPS hatte zu diesem Zeitpunkt keinen Effekt, eine gleichzeitige Infektion mit A/PR/8 und Stimulation mit LPS hingegen zeigte eine gesteigerte Konzentration an AP-1 im Vergleich zur alleinigen Infektion mit Influenza A Virus.

Da die Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren durch eine Infektion mit Influenza A Virus in den späten Zeitpunkten signifikant erniedrigt wurde bzw. in einigen Fällen kaum mehr nachweisbar war, wurde anschließend durch den Nachweis der Zytokinexpression untersucht, ob der zelluläre Transkriptionsapparat noch funktionsfähig ist.

IL-6 wird bekanntlich durch Influenza A Virus induziert. Die Abbildung 31 zeigt die Expression in PU5-1.8 nach 16 Stunden. LPS induzierte zu diesem Zeitpunkt IL-6 um den Faktor 6 und A/PR/8 sogar um den Faktor 12. In der A/PR/8 + LPS-Gruppe fand sich ein signifikanter additiver Effekt der beiden Stimuli (Faktor 35).

Als zweiter Faktor zum Nachweis eines intakten Transkriptionsapparates wurde die Expression von TNF- α in murinen Makrophagen untersucht. Abbildung 32 zeigt eine deutliche Induktion der mRNA-Synthese nach 12 Stunden sowohl durch LPS als auch durch eine Infektion mit A/PR/8.

Die Vermutung, dass die erniedrigte Expression und Aktivität der untersuchten Transkriptionsfaktoren durch eine allgemeine Drosselung des Transkriptionsapparates bedingt ist, konnte somit durch den Nachweis erhöhter Zytokinexpression widerlegt werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass das Influenza A Virus gleich mehrere Transkriptionsfaktoren moduliert und dadurch die Kontrolle über die zelluläre Transkription übernimmt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um das komplizierte Netzwerk der Transkriptionsfaktoren und deren Regulation durch Influenza A Virus zu verstehen.

5. Zusammenfassung

Das primäre Ziel vieler Viren nach der Infektion der Zielzelle besteht darin, die Kontrolle über den zellulären Transkriptionsapparat zu gewinnen und diesen zur Synthese viraler Proteine zu nutzen. Das Influenza A Virus, welches sich in Epithelzellen und Leukozyten repliziert, führt zu einer Induktion chemotaktischer, pro-inflammatorischer und antiviraler Zytokine. Die Expression dieser Zytokine wird durch regulatorische Kernproteine, sogenannte Transkriptionsfaktoren (TF), kontrolliert. Da über die molekularen Hintergründe der Zytokinexpression in Influenza-infizierten Zellen wenig bekannt ist, war das Ziel dieser Arbeit, die A/PR/8-bedingte Regulation der Expression / Aktivierung zellulärer TF näher zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden die TF activating protein-1 (AP-1), cAMP-response element-binding factor (CREB), cAMP-response element modulator (CREM), interferon consensus sequence binding protein (ICSBP), Myc-associated x factor (Max), nukleärer Faktor- κ B (NF- κ B) und TFIID in Influenza A Virus-infizierten PU5-1.8 untersucht.

Die Interferone (IFN) gehören zu der ersten Verteidigungslinie der zellulären Antwort auf eine virale Infektion. Das ICSBP ist ein Bindungspartner der IFN response factors (IRFs) und beeinflusst als Negativ-Regulator die Expression von IFN-induzierten Genen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Infektion muriner Makrophagen mit A/PR/8 zu einer signifikanten Induktion von ICSBP führt. Ein weiterer wichtiger Faktor in der Regulation der IFN- α/β Expression ist NF- κ B, der darüber hinaus eine essentielle Rolle in der Regulierung vieler physiologischer Zellantworten spielt. In Übereinstimmung mit Matikainen et al. konnte gezeigt werden, dass eine Influenza A Virus-Infektion zu einer Aktivierung von NF- κ B führt. Im weiteren zeitlichen Verlauf der Infektion kam es dann zu einer signifikanten Verminderung an NF- κ B im Zellkern der PU5-1.8 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen von Wang et al., die zeigen konnten, dass das NS1-Protein von Influenza A Virus die Aktivität von NF- κ B verhindert. Unter normalen Bedingungen ist NF- κ B an seinen Inhibitor I κ B gebunden und wird dadurch im Zytoplasma gehalten. Nach Phosphorylierung von I κ B wird dieses abgebaut und somit kann NF- κ B in den Zellkern wandern, wo es die Transkription von Genen stimuliert, die im Promotorbereich das NF-

κ B-Bindungsmotiv enthalten. Lipopolysaccharid (LPS) aktivierte NF- κ B und führte sowohl zu einer Reduktion von I κ B-Protein im Zytoplasma als auch zu einer I κ B mRNA-Induktion. Interessanterweise zeigte eine A/PR/8-Infektion muriner Makrophagen keinen Einfluss auf die I κ B-Expression, obwohl innerhalb der frühen Zeitpunkte eine Aktivierung von NF- κ B durch A/PR/8 gezeigt werden konnte. Die Influenza A Virus-induzierte NF- κ B-Aktivierung erscheint somit unabhängig von I κ B zu verlaufen. Durch den Einfluss auf ICSBP, I κ B und NF- κ B ist das Influenza A Virus in der Lage, die IFN- α/β -induzierte Genexpression zu drosseln und somit der zellulären, antiviralen Antwort zu entkommen.

Der Second-Messenger cAMP reguliert ebenfalls das basale Genexpressionsmuster der Zelle. CREB und CREM gehören zu der Familie der CRE-bindenden TF, wobei CREB Eigenschaften eines klassischen Enhancers aufweist und CREM ein transkriptioneller Repressor ist. Grundsätzlich wirkt cAMP einer Makrophagen-Aktivierung entgegen und so konnte gezeigt werden, dass CREB sowohl auf mRNA-Ebene wie auch das Protein im Zellkern nach einer A/PR/8-Infektion signifikant vermindert war. Zusätzlich wurde CREM durch Influenza A Virus induziert. Somit hat das Virus auch eine Kontrollmöglichkeit über die cAMP-induzierte Genexpression erlangt.

Im Myc/Max/Mad-Netzwerk von TF gilt Max aufgrund seiner Fähigkeit zur Dimerisierung mit den anderen Familienmitgliedern als zentraler Regulator der Aktivität. In murinen Makrophagen führte eine A/PR/8-Infektion zu einer signifikant erniedrigten Expression von Max im Vergleich zur Kontrolle. Zusätzlich konnte A/PR/8 die LPS-induzierte Expression von Max reduzieren. Das Virus kann somit auf die Proliferation und Differenzierung der infizierten Zelle einwirken, da diese durch das Myc/Max/Mad-Netzwerk vermittelt wird.

Einer der entscheidenden Faktoren der basalen Transkription ist TFIID, dessen nukleäre Aktivität durch A/PR/8 verhindert wurde. Somit hat das Influenza A Virus auch Kontrolle über die basale zelluläre Transkription.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass das Influenza A Virus gleich mehrere TF beeinflusst, um die Kontrolle über den zellulären Transkriptionsapparat zu erlangen. Nichtsdestoweniger kann sich die infizierte Zelle dagegen wehren, denn die Transkription oder Translation wichtiger Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor- α oder Interleukin-6 wurde nicht behindert, sondern durch Influenza A Virus noch induziert.

6. Literaturverzeichnis

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1995): Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Amati, B., Brooks, M.W., Levy, N., Littlewood, T.D., Evan, G.I., Land, H. (1993): Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell*. 72(2): 233-245.

Andrews, N.C., Faller, D.V. (1991): A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 19(9): 2499.

Arenzana-Seisdedos, F., Turpin., P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R.T., Virelizier, J.L., Dargemont, C. (1997): Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J. Cell. Sci.* 110 (Pt 3): 369-378.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1994): *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc.

Ayer, D.E., Eisenman, R.N. (1993): A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. *Genes Dev.* 7(11): 2110-2119.

Babu, J.S., Kanangat, S., Rouse, B.T. (1993): Limitations and modifications of quantitative polymerase chain reaction: Application to measurement of multiple mRNAs present in small amounts of sample RNA. *J. Immunol. Meth.* 165: 207-216.

Bäuerle, P.A., Baltimore, D. (1988): I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 242, 540-546.

Baldwin, A.S., Jr. (1996): The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual Review of Immunology* 14: 649-683.

Barrett, T., Inglis, S.C. (1985): Growth, purification and titration of influenza viruses. In: *Virology: A practical approach*. Mahy, B.W.J. (ed) Oxford IRL Press 1993: 119-150.

Bender, A. (1992): Freisetzung von Mediatoren aus Influenza A Virus-infizierten Makrophagen. Promotionsarbeit.

Bender, A., Amann, U., Jäger, R., Nain, M., Gemsa, D. (1993): Effect of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on human monocytes infected with influenza A virus. *J. Immunol.* 151: 5416-5424.

Blackwell, T.K., Kretzner, L., Blackwood, E.M., Eisenman, R.N., Weintraub, H. (1990): Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* 250: 1149-1151.

Blackwood, E.M., Eisenman, R.N. (1991): Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251(4998): 1211-1217.

Blackwood, E.M., Luscher, B., Kretzner, L., Eisenman, R.N. (1991): The Myc:Max protein complex and cell growth regulation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 56: 109-117. Review.

Bovolenta, C., Driggers, P.H., Marks, M.S., Medin, J.A., Politis, A.D., Vogel, S.N., Levy, D.E., Sakaguchi, K., Appella, E., Coligan, J.E., Ozato, K. (1994): Molecular interactions between interferon consensus sequence binding protein and members of the interferon regulatory factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 24, 91(11): 5046-5050.

Brass, A.L., Kehrl, E., Eisenbeis, C.F., Storb, U., Singh, H. (1996): Pip, a lymphoid-restricted IRF, contains a regulatory domain that is important for autoinhibition and ternary complex formation with the Ets factor PU.1. *Genes Dev.* 15;10(18): 2335-2347.

Bussfeld, D., Bacher, M., Moritz, A., Gemsa, D., Sprenger, H. (1997): Expression of transcription factor genes after influenza A virus infection. *Immunobiology* 198: 291-298.

Bussfeld, D., Kaufmann, A., Meyer, R.G., Gemsa, D., Sprenger, H. (1998): Differential mononuclear leukocyte attracting chemokine production after stimulation with active and inactivated influenza A virus. *Cell. Immunol.* 186: 1-7.

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem.* 162: 156-159.

Daniels, C.J., Gupta, R., Doolittle, W.F. (1985): Transcription and excision of a large intron in the tRNA TRP gene of an archaebacterium, *Halobacterium volcanii*. *J. Biol. Chem.* 260(5): 3132-3134.

Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1990): *Molecular Cell Biology*. 2nd edition. Scientific American Books.

Descoteaux, A., Matlashewski, G. (1990): Regulation of TNF gene expression and protein synthesis in murine macrophages treated with recombinant TNF. *J. Immunol.* 145: 846-853.

Dinarello, C.A. (1999): IL-18, a TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103: 11-24.

Driggers, P.H., Ennsit, D.L., Gleason, S.L., Mak, W.H., Marks, M.S., Levi, B.Z., Flanagan, J.R., Appella, E., Ozato, K. (1990): An interferon gamma-regulated protein that binds the interferon-inducible enhancer element of major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(10): 3743-3747.

Eilers, M., Schirm, S., Bishop, J.M. (1991): The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J.* 10(1): 133-141.

Fields, B.N. Knipe, D.M. (Hrsg.) (1991): *Fundamental Virology*. Second edition. Raven Press New York.

Flory, E., Kunz, M., Scheller, C., Jassoy, C., Stauber, R., Rapp, U.R., Ludwig, S. (2000): Influenza virus-induced NF- κ B-dependent gene expression is mediated by overexpression of viral proteins and involves oxidative radicals and activation of I κ B kinase. *J. Biol. Chem.* 275: 8307-8314.

Fultz, M.J., Vogel, S.N. (1998): Analysis of the antagonist effect of IFN-alpha on IFN-gamma-induced interferon consensus sequence binding protein messenger RNA in murine macrophages. *J. Inflamm.* 48(1): 28-39.

Gardner, I.D., Lawton, J.W.M. (1982): Depressed human monocyte function after influenza infection in vitro. *J. Ret. Soc.* 32: 443-448.

Garfinkel, M.S., Katze, G. (1993): How does influenza virus regulate gene expression at the level of mRNA translation? Let us count the ways. *Gene Expression* 3 (2): 109-118.

Gemsa, D., Kozan, B. (1984): Entzündungszellen. *Allergologie* 7: 183.

Gemsa, D., Kalden, J.R., Resch, K. (Hrsg). (1997): *Immunologie*. 4.Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Gilchrist, C.A., Orten, D.J., Hinrichs, S.H. (1996): Evidence for the role of cyclic AMP-responsive elements in human virus replication and disease. *J. Biomed. Sci.* 3(5): 293-306.

Giulietti A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. (2001): An overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25(4): 386-401.

Görtz, J., Brake, B., Härle-Grupp, V., Falke, D. (1984): Replication of HSV-1 in murine peritoneal macrophages: Comparison of various virus strains with different properties. *Arch. Virol.* 79: 173-187.

Gong, J.H., Sprenger, H., Hinder, F., Bender, A., Schmidt, A., Horch, S., Nain, M., Gemsa, D. (1991): Influenza A virus infection of macrophages: Enhanced tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene expression and lipopolysaccharide-triggered TNF-alpha release. *J. Immunol.* 147: 3507-3513.

Gonzalez, G.A., Montminy, M.R. (1989): Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59: 675-680.

Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B. (1998): NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225-260.

Griffin, G.E., Leung, K., Folks, T.M., Kunkel, S., Nabel, G.J. (1989): Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF- κ B. *Nature* 339: 70-73.

Habener, J.F., Miller, C.P., Vallejo, M. (1995): cAMP-dependent regulation of gene transcription by cAMP response element-binding protein and cAMP response element modulator. *Vitam. Horm.* 51: 1-57. Review.

Hamilton, T.A., Adams, D.O. (1987): Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol. Today* 8: 151-158.

Heikkila, R., Schwab, G., Wickstrom, E., Loke, S.L., Pluznik, D.H., Watt, R., Neckers, L.M. (1987): A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G0 to G1. *Nature* 328(6129): 445-449.

Henke, A., Mohr, C., Sprenger, H., Graebner, C., Stelzner, A., Nain, M., Gemsa, D. (1992): Coxsackievirus B3-induced production of tumor necrosis factor- α , IL-1 β and IL-6 in human monocytes. *J. Immunol.* 148: 2270-2277.

Henriksson, M., Lüscher, B. (1996): Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv. Cancer Res.* 68: 109-182. Review.

Hofmann, P., Sprenger, H., Kaufmann, A., Bender, A., Hasse, C., Nain, M., Gemsa, D. (1997): Susceptibility of mononuclear phagocytes to influenza A virus infection and possible role in the antiviral response. *J. Leukocyte Biol.* 61: 408-414.

Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J.J., Roncal, F., Ortín, J., Nieto, A. (2001): PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J. Virology* 75(18): 8597-8604.

Hurlin, P.J., Queva, C., Koskinen, P.J., Steingrimsson, E., Ayer, D.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Eisenman, R.N. (1995): Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *EMBO J.* 14(22): 5646-5659.

Jakab, G.J., War, A., Sannes, P.L. (1980): Alveolar macrophage ingestion and phagosome-lysosome fusion defect associated with virus pneumonia. *Infect. Immun.* 27: 960-968.

Jennings, S.T., Etensohn, D.B., Roberts, N.J. (1984): Influenza virus infection of human alveolar and peripheral blood macrophages. *Ann. Rev. Res. Dis.* 130: 98-101.

Julkunen, I., Sareneva, T., Pirhonen, J., Ronni, T., Melen, K., Matikainen, S. (2001): Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12(2-3): 171-180. Review.

Kanno, Y., Kozak, C.A., Schindler, C., Driggers, P.H., Ennist, D.L., Gleason, S.L., Darnell, J.E. Jr., Ozato, K. (1993): The genomic structure of the murine ICSBP gene reveals the presence of the gamma interferon-responsive element, to which an ISGF3 alpha subunit (or similar) molecule binds. *Mol. Cell. Biol.* 13(7): 3951-3963.

Karin, M., Smeal, T. (1992): Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. *TIBS* 17: 418-422.

Karin, M., Delhase, M. (2000): The I kappa B Kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Seminars in Immunology* 12: 85-98.

Karin, M., Ben-Neriah, Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 621-663.

Kato, G.J., Lee, W.M., Chen, L.L., Dang, C.V. (1992): Max: functional domains and interaction with c-Myc. *Genes Dev.* 6(1): 81-92.

Katze, M.G., Tomita, J., Black, T., Krug, R.M., Safer, B., Hovanessian, A.G. (1988): Influenza virus regulates protein synthesis during infection by repressing autophosphorylation and activity of the cellular 68.000-Mr protein kinase. *J. Virol.* 62: 3710-3717.

Keller, A.D. (1994): Specifying epigenetic states with autoregulatory transcription factors. *J. Theor. Biol.* 170(2): 175-181.

Kilbourne, E.D. (1987): *Influenza*. Plenum Press, New York.

Laurance, M.E., Kwok, R.P., Huang, M.S., Richards, J.P., Lundblad, J.R., Goodman, R.H. (1997): Differential activation of viral and cellular promoters by human T-cell lymphotropic virus-1 tax and cAMP-responsive element modulator isoforms. *J. Biol. Chem.* 272(5): 2646-2651.

Leung, K., Nabel, G.J. (1988): HTLV-I transactivator induces interleukin-2 receptor expression through a NF- κ B like factor. *Nature* 333: 776-778.

Levinson, B., Kenwrick, S., Lakich, D., Hammonds, G., Gitschier, J. (1990): A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics* 7(1): 1-11.

Luster, A.D. (1998): Chemokines – Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338: 436-445.

Mak, N.K., Ada, G.L. (1984): The acquisition of anti-influenza virus activity by macrophages. *Immunobiol.* 166: 458-472.

Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E.F. (1989): *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Second Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Mayr, B., Montminy, M. (2001): Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2(8): 599-609. Review.

Mazarakis, N., Michalovich, D., Karis, A., Groveld, F., Galjart, N. (1996): Zfp-37 is a member of the KRAB zinc finger gene family and is expressed in neurons of the developing and adult CNS. *Genomics* 33(2): 247-254.

McChesney, M.B., Oldstone, M.B.A. (1987): Viruses perturb lymphocyte functions: Selected principles characterizing virus-induced immuno-suppression. *Ann. Rev. Immunol.* 5: 279-304.

Mills, J. (1979): Effects of sendai virus infection on function of cultured mouse alveolar macrophages. *Am. Rev. Resp. Dis.* 120: 1239-1244.

Mitchell, P.J., Tijan, R. (1989): Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245(4916): 371-378.

Mogensen, S.C. (1979): Role of macrophages in natural resistance to virus infections. *Microbiol. Rev.* 43: 1-26.

Montminy, M.R., Gonzalez, G.A., Yamamoto, K.K. (1990): Characteristics of the cAMP response unit. *Metabolism* 9, Suppl. 2: 6-12.

Morahan, P.S., Connor, J.R., Leary, K.R. (1985): Viruses and the versatile macrophage. *British Medical Bulletin* 41: 15-21.

Morahan, P.S., Miller, G.A. (1984): Ectoenzymes in the expression of mononuclear phagocyte differentiation: Minireview. In: *Biology of mononuclear phagocytes*. Hrsg.: Volkmann, A., New York.

Mosialos, G. (1997): The role of Rel/NF- κ B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription. *Cancer Biology* 8: 121-129.

Nain, M., Hinder, H., Gong, J.H., Schmidt, A., Bender, A., Sprenger, H., Gemsa, D. (1990): TNF- α production of influenza A virus infected macrophages and potentiating effect of lipopolysaccharides. *J. Immunol.* 145: 1921-1928.

Nelson, N., Marks, M.S., Driggers, P.H., Ozato, K. (1993): Interferon consensus sequence-binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 13(1): 588-599.

Newbound, G.C., O'Rourke, J.P., Collins N.D., DeWille, J., Lairmore, M.D. (1999): Comparison of HTLV-I basal transcription and expression of CREB/ATF-1/CREM family members in peripheral blood mononuclear cells and Jurkat T cells. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 20(1):1-10.

Nichols, J., Nimer, S.D. (1992): Transcription factors, translocations, and leukemia. *Blood* 80(12): 2953-2963.

Nugent, K.M., Pesanti, E.L., (1979): Effect of influenza infection on the phagocytic and bactericidal activities of pulmonary macrophages. *Infect. and Immun.* 26: 651-657.

Pahl, H.L., Bäuerle, P.A. (1995): Expression of influenza virus hemagglutinin activates transcription factor NF-kappa B. *J. Virol.* 69: 1480-1484.

Pahl, H.L., Baeuerle, P.A. (1997): The ER-overload response – activation of NF- κ B. *Trends in Biochemical Sciences* 22: 63-67.

Pahl, H.L. (1999): Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18(49): 6853-6866. Review.

Paul, W.E., (Hrsg.) (1993): *Fundamental Immunology*. Third edition. Raven Press. Ltd., New York.

Peri, A., Serio, M. (2000): The CREM system in human spermatogenesis. *J. Endocrinol. Invest.* 23(9): 578-583. Review.

Peschke, T., Bender, A., Nain, M., Gemsa, D. (1993): Role of macrophage cytokines in influenza A virus infections. *Immunobiol.* 189: 340-355.

Pirhonen, J., Sareneva, P., Kurimoto, M., Julkunen, I., Matikainen, S. (1999): Virus infection activates IL-1 α and IL-18 secretion by caspase-1-dependent pathway in human macrophages. *J. Immunol.* 162: 7322-7329.

Politis, A.D., Ozato, K., Coligan, J.E., Vogel, S.N. (1994): Regulation of IFN-gamma-induced nuclear expression of IFN consensus sequence binding protein in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 152(5):2270-2278.

Prendergast, G.C., Lawe, D., Ziff, E.B. (1991): Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* 65(3): 395-407.

Ptashne M. (1988): How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335(6192): 683-689.

Rager-Zisman, B., Kunkel, M., Tanaka, Y., Bloom, B.R. (1982): Role of macrophage oxidative metabolism in resistance to vesicular stomatitis virus infection. *Infect. Immun.* 36: 1229-1237.

Renz, H., Gong, J.H., Schmidt, A., Nain, M., Gemsa, D. (1988): Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages: enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E₂ and cyclic nucleotides. *J. Immunol.* 141: 2388-2393.

Roberts, N.J., Prill, A.H., Mann, T.N. (1986): Interleukin 1 and Interleukin 1 inhibitor production by human macrophages exposed to influenza virus and respiratory syncytial virus. *J. Exp. Med.* 163: 511-519.

Rodgers, B. Mims, C.A. (1981): Interaction of influenza virus with mouse macrophages. *Infect. Immun.* 31: 751-757.

Ronni, T. Sareneva, T., Pirhonen, J., Julkunen, I. (1995): Activation of IFN- α , IFN- β , MxA, and interferon regulatory factor 1 genes in influenza A-infected human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.* 154: 2764-2774.

Sareneva, T., Matikainen, S., Kurimoto, M., Julkunen, I. (1998): Influenza A virus-induced IFN- α/β and IL-18 synergistically enhance IFN- α gene expression in human T cells. *J. Immunol.* 160: 6032-6038.

Sassone-Corsi, P. (1995): Transcription factors responsive to cAMP. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11: 355-377. Review.

Scheidereit, C. (1996): Transcription factors: important tools and targets for molecular medicine [editorial]. *J. Mol. Med.* 74(12): 707-709.

Schwarzmann, S.W., Adler, I.L., Sullivan, R.J., Marine, W.M. (1971): Bacterial pneumonia during the Hongkong influenza epidemic of 1968-1969. Experience in a city-country hospital. *Arch. Intern. Med.* 127: 1037-1041.

Sen, G.C., Ransohoff, R.M. (1993): Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Adv. Virus Res.* 42: 57-102.

Sen, R., Baltimore, D. (1986): Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46: 705-716.

Shapiro, G.I., Gurney, T., Krug, R.M. (1987): Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J. Virol.* 61: 764-773.

Smith, W., Andrews, C.H., Laidlaw, P.P. (1933): A virus obtained from influenza patients. *Lancet*: 66-68. In: *The influenza viruses. Virology Monogr.* (Hoyle, L.). Springer Verlag, Wien, New York (1968).

Sprenger, H., Bacher, M., Rischkowsky, E., Bender, A., Nain, M., Gemsa, D., (1994): Characterization of a high molecular weight tumor necrosis factor- α mRNA in influenza A virus-infected macrophages. *J. Immunol.* 152: 280-289.

Sprenger, H., Meyer, R.G., Kaufmann, A., Bussfeld, D., Rischkowsky, E., Gemsa, D. (1996): Selective induction of monocyte and not neutrophil-attracting chemokines after influenza A virus infection. *J. Exp. Med.* 184: 1191-1196.

Stamatoyannopoulos, J.A., Clegg, C.H., Li, Q. (1997): Sheltering of gamma globin expression from position effects requires both an upstream control region and a regulatory element 3' to the gamma-globin gene. *Mol. Cell Biol.* 17(1): 240-247.

Stehle, J.H., Foulkes, N.S., Molina, C.A., Simonneaux, V., Pévet, P., Sassone-Corsi, P. (1993): Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 365: 314-320.

Stohlmann, S.A., Woodward, J.G., Frelinger, J.A. (1982): Macrophage antiviral activity: extrinsic versus intrinsic activity. *Infect. Immun.* 36: 672-677.

Sun, Z., Means, A.R. (1995): An intron facilitates activation of the caldesmon gene by the testis-specific transcription factor CREM tau. *J. Biol. Chem.* 270(36): 20962-20967.

Sun, S.C., Ganchi, P.A., Ballare, D.W., Greene, W.C. (1993): NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259(5103): 1912-1915.

Talon, J., Horvath, C.M., Polley, R., Basler, C.F., Muster, T., Palese, P., García-Sastre, A. (2000): Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* 74(17): 7989-7996.

Tuan, D.Y.H., Solomon, W.B., London, I.M., Lee, D.P. (1989): An erythroid-specific, developmental-stage-independent enhancer far upstream of the human " ϵ -like globin" genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2554-2558.

Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., Miyamoto, S. (1995): Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & Development* 9, 2723-2735.

Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A.A., García-Sastre, A. (1999): Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF- κ B and induction of alpha/beta interferon. *J. Virol.* 74: 11566-11573.

Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J., Zoeller, M. (1993): *Rekombinierte DNA*, 2. Auflage Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Wu, D.Y., Ugozzoli, L., Qian, J., Wallace, R.B. (1991): Laboratory Methods: The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and Cell Biol.* 10: 233-238.

Yamamoto, K.K., Gonzales, G.A., Biggs, W.H., Montminy, M.R. (1988): Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334: 494-498.

Zervos, A.S., Gyuris, J., Brent, R. (1993): Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 72(2): 223-32.

7. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. D. Gemsa, der neben der Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Überlassung des interessanten Themas jederzeit eine schier unerschöpfliche Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung weit über die wissenschaftliche Thematik hinaus angeboten hat.

Herrn PD Dr. M. Bacher danke ich für die wissenschaftliche Ausbildung und Betreuung der Arbeit. Seine fachliche Kompetenz in Verbindung mit seinem Humor haben mir sehr geholfen, die aufgetretenen Schwierigkeiten des Doktoranden-Daseins zu meistern.

Bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes möchte ich mich für die effektive Zusammenarbeit in einer optimalen Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. M. Nain für ihre ständige Ansprechbarkeit und Anregungen bedanken.

Dass nach so vielen Jahren die unzähligen Versuche und Ergebnisse letztendlich in Form dieser Arbeit zusammengestellt wurden, verdanke ich insbesondere meiner Freundin Jacqueline Peil, die in jeder Situation für mich da war und mich unterstützt hat meine Ziele zu verfolgen und zu erreichen.

Dank gilt auch meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben.

8. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren

in Giessen: Benedum, Breithaupt, Dorndorf, Duncker, Glanz, Oksche, Hempelmann, Knorpp, Künzel, Lampert, Lasch, Rothauge, Schulz, Schumacher, Schwemmle, Teschemacher , Wellensiek

in Mainz: Huber

in Marburg: Baum, Gemsa, Happle, Lennartz, Maisch, Rothmund

in Münster: Luger