

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

**Wirkung von Typ I - Interferonen auf die Enhancer I, II und core
promoter-regulierte Transkription des Hepatitis B Virus**

Tobias Maximilian Freilinger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender : Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation :

1. Priv.-Doz. Dr. E. Schulte-Frohlinde
2. Univ.-Prof. Dr. V. Erfle
3. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 14.01.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.11.2004 angenommen.

Für meine lieben Eltern
und meine Tante Ina

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINFÜHRUNG.....	1
1.1 Grundzüge der Biologie des Hepatitis B Virus.....	1
1.2 Klinik der Hepatitis B Infektion	3
1.3 Interferon-Therapie der chronischen Hepatitis B.....	4
1.4 Fragestellung	7
2. MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 Allgemeines.....	10
2.2 Herstellung der Reporter-Plasmid-Konstrukte.....	10
2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	10
2.2.1.1 Isolation, Reinigung und Quantifizierung von DNA.....	10
2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion und „Bakterienkolonie“-PCR.....	11
2.2.1.3 Auftrennung von DNA-Molekülen in Agarosegelen	13
2.2.1.4 Enzymatische Modifikation von DNA-Molekülen	15
2.2.1.5 Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA und Auswertung von Sequenzdaten	17
2.2.1.6 Transformation von E.coli	18
2.2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli	20
2.2.2 Allgemeines zur Herstellung der Reporterplasmide.....	23
2.2.2.1 Reporter-Gen-Systeme	23
2.2.2.2 Verwendete Plasmide.....	23
2.2.3 Konstruktion der Testplasmide	25
2.2.3.1 Herstellung von <i>pGL3HBV_{adv6/9}</i>	25
2.2.3.2 Herstellung der <i>pGL3HBV_{adv6/9}</i> -Deletionsmutanten	29
2.2.3.3 Herstellung der NCO-Mutante	31
2.2.4 Konstruktion des Referenzplasmids <i>pRLE7</i>	33
2.3 Transfektionsexperimente.....	35
2.3.1 Zellkultur.....	35
2.3.1.1 Allgemeines Material und Geräte für die Zellkultur	35
2.3.1.2 Verwendete Zellen und allgemeine Kulturbedingungen	36
2.3.1.3 Grundlegende Zellkulturtechniken.....	37
2.3.2 Transfektionsexperimente	39
2.3.2.1 Theorie der Transfektion.....	39
2.3.2.2 Transfektionsexperimente	40
2.3.2.3 Inkubation der transfizierten Zellen mit Interferon	41
2.3.2.4 Ernte durch passive Lyse.....	41
2.3.3 Dual-Luciferase Reporter Assay System	42
2.3.3.1 Theoretischer Hintergrund	42
2.3.3.2 Bioluminometer Messung	43
2.3.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz : β -Gal-Staining.....	45
2.3.5 Kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford).....	45
2.3.6 Zytotoxizität	46
2.4 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	47
2.4.1 Theoretischer Hintergrund : Prinzip des EMSA	47
2.4.2 Nukleäre Extrakte	49
2.4.2.1 Verwendete Kontrollextrakte	49
2.4.2.2 Präparation nukleärer Extrakte aus HuH7-Zellen	49

2.4.3 Oligonukleotid-Sonden	51
2.4.3.1 Verwendete Oligonukleotide.....	51
2.4.3.2 5' Endmarkierung der verwendeten Oligonukleotide	53
2.4.4 Bindereaktion	54
2.4.5 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	55
2.4.6 Autoradiographie	56
2.5 Auswertung und Statistik	57
3. ERGEBNISSE	58
3.1 Ergebnisse der Transfektionsexperimente.....	58
3.1.1 Rahmenbedingungen des Transfektionssystems	58
3.1.1.1 Abhängigkeit von den Transfektionsbedingungen.....	58
3.1.1.2 Transfektionseffizienz.....	59
3.1.2 Allgemeine Charakterisierung der Wirkung von IFN	60
3.1.2.1 IFN-vermittelte Wirkung in Abhängigkeit von der Dosis.....	60
3.1.2.2 IFN-vermittelte Wirkung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer	60
3.1.2.3 Vergleich verschiedener IFN-Subtypen	61
3.1.2.4 Proteinbestimmung und Zytotoxizität	62
3.1.3 Unterschiede zwischen HepG2 und HuH7-Zellen	63
3.1.4 Identifizierung einer für die IFN-Wirkung notwendigen Region in der HBV-Enh I, II, c/p-Sequenz	64
3.1.4.1 (Relative) Promoterstärke der Deletionsmutanten	64
3.1.4.2 IFN-Wirkung auf die Deletionsmutanten.....	65
3.2 Ergebnisse der EMSAs	68
3.2.1. Kontrollversuche zur Etablierung des Systems.....	68
3.2.2 Versuche mit verschiedenen regulativen HBV-Abschnitten als Sonden.....	71
3.2.2.1 Ergebnisse mit der gesamten HBV-Region nt 1578 – 1704 (RS) als Sonde	71
3.2.2.2 Ergebnisse mit kurzen Sonden (GS)	74
4. DISKUSSION	76
4.1 Typ I-Interferon-induzierte Inhibition regulativer HBV-Sequenzen.....	76
4.1.1 Allgemeine Diskussion und Besonderheiten der eigenen Arbeit	76
4.1.2 Spezielle Diskussion im detaillierten Vergleich mit anderen Reporter-gen-Studien	77
4.1.3 Bedeutung des HBV-X-Proteins für die inhibitorische IFN-Wirkung	80
4.1.3.1 Allgemeine Bedeutung des HBV X-Proteins	80
4.1.3.2 Bedeutung des HBV X-Proteins in Hinblick auf die IFN-Wirkung im untersuchten System.....	81
4.2 Signaltransduktion der Typ I-IFN-Wirkung auf die regulativen HBV-Sequenzen	83
4.2.1 Allgemeiner bekannter Signaltransduktionsmechanismus der Typ I-Interferone	83
4.2.1.1 Der Typ I-Interferon-Rezeptor	84
4.2.1.2 Der Jak-STAT-Signaltransduktionsweg.....	85
4.2.1.3 Übertragung auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit	88
4.2.2 Mögliche IFN-sensitive Zielregionen auf Ebene der HBV-DNA	89
4.2.2.1 Bedeutung der ISRE-Region im HBV-Enhancer I.....	89
4.2.2.2 Evaluation einer möglichen IFN-sensitiven Zielregion (nt 1578- nt 1704).....	91
4.2.3 Zelluläre Faktoren als Mediatoren der Typ I-IFN-Wirkung	92
4.3 Relevanz der Ergebnisse bezüglich des gesamten Wirkungsspektrums der Typ I-IFN auf das HBV ..	96
4.3.1 Immunvermittelte antivirale Wirkung von IFN	96
4.3.2. Direkte antivirale Effekte von IFN gegen das HBV	97
4.3.2.1 Direkte Wirkung auf der Ebene der Transkription des HBV	98
4.3.2.2 Andere (u.a. posttranskriptionelle) Aspekte der IFN-Wirkung	101
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	105

Inhaltsverzeichnis

6. LITERATURVERZEICHNIS.....	108
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	121
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	125
9. TABELLENVERZEICHNIS.....	127
10. DANKSAGUNG.....	128
11. LEBENSLAUF.....	129

1. Einführung

Die Infektion mit dem in den 60er Jahren durch Arbeiten von B. Blumberg und H. Alter entdeckten (Blumberg 1965) humanen Hepatitis B Virus (HBV) stellt mit mehr als 350 Millionen HBV Trägern weltweit ein globales Gesundheitsproblem dar; durch die Langzeitfolgen einer chronischen Hepatitis mit Leberzirrhose sowie hepatozellulärem Karzinom werden bis zu 1 Million Todesfälle pro Jahr verursacht (Lee 1997, S. 1733).

1.1 Grundzüge der Biologie des Hepatitis B Virus

Das HBV zählt wie auch das „ground squirrel hepatitis virus“ (= GSHV; Testut 1996, S. 4216-7) und das „wood chuck hepatitis virus“ (=WHV; Summers 1978, S. 4536-7) zum Genus der Orthohepadna-Viren, die mit den Avihepadna-Viren (Sprengel 1988, Mason 1980) zusammen die Familie der Hepadna-Viren bilden (Seeger 2000, S.51).

Das virale Genom (siehe Abbildung 1), ein zirkuläres, partiell doppelsträngiges DNA-Molekül mit einer Länge von ca. 3200 bp, besteht aus einem vollständigen minus- und einem inkompletten plus-Strang (Ganem 1987, S. 654); der minus-Strang kodiert dabei in einer sehr kompakten genomischen Organisation für vier sich teilweise überlappende offene Leserahmen (ORF): S (= surface) für die viralen Hüll- oder envelope-Proteine, C (= core) für das virale Nukleokapsid oder core, P (= polymerase) für die virale DNA-Polymerase mit reverser Transkriptase-Funktion sowie X für das virale X-Protein, das als unspezifischer transkriptioneller Transaktivator fungiert (siehe 4.1.3.1); die S- und C-Gene verfügen jeweils über zusätzliche stromaufwärts liegende Regionen, nämlich preS (preS1 / preS2) bzw. preC (Ganem 1987, S. 656).

Die vom S-Gen kodierten Hüllproteine treten in drei unterschiedlichen Formen, als großes (L), mittleres (M) und kleines (S) Hüllprotein auf, je nachdem ob ihre Translation beim preS1, preS2 oder nur dem S-Gen alleine beginnt. Die großen Hüllproteine (L) finden sich im Gegensatz zu M und S ausschließlich in vollständigen Virionen. Analog hierzu erfolgt auch beim core-Gen je nach gewähltem Startkodon eine differentielle Genexpression: beim Translationsbeginn vom core-Startkodon aus entsteht das eigentliche core-Protein, das das Nukleokapsid bildet, beim Translationsbeginn vom precore-Startkodon aus hingegen entsteht ein precore-Polypeptid, das nach posttranslationeller Modifikation als lösliches Protein (HBe-Ag) sezerniert wird (Lee 1997, S. 1734).

In vollständigen Viruspartikeln (siehe Abbildung 2) umgeben die surface Proteine als eine äußere Hülle das Nukleokapsid, das als innere Hülle das virale Genom umkapselt. Neben diesen nach ihrem Erstbeschreiber (Dane 1970) als Dane-Partikel bezeichneten kompletten Virionen sezernieren HBV-infizierte Zellen auch in großem Überschuss subvirale nichtinfektiöse Virusprodukte in Form von 22nm großen filamentösen oder sphärischen Partikeln, die ausschließlich aus Hüllprotein bestehen.

Die Expression der viralen Genprodukte steht unter der Kontrolle von insgesamt vier Promoter-Elementen, denen wiederum zwei Enhancerregionen (Enh I und EnhII) übergeordnet sind (vgl. 4.3.2.1.2).

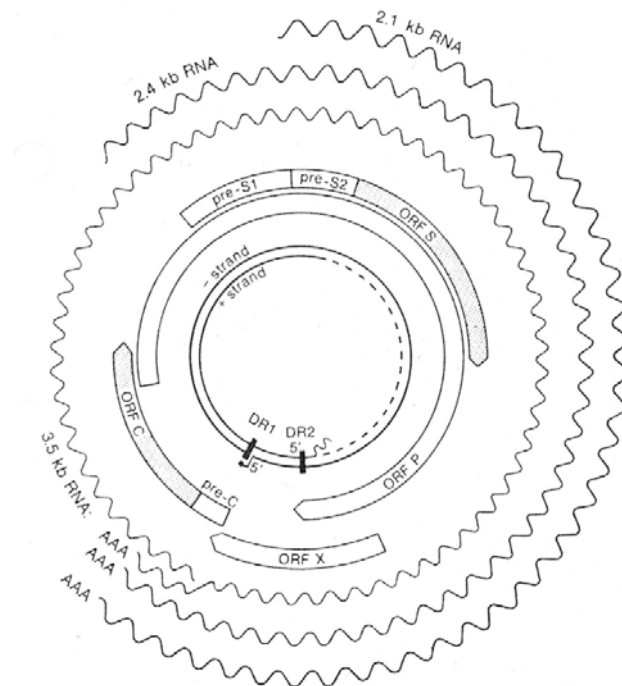


Abb. 1: Genomische Organisation des Hepatitis B Virus; dargestellt sind das partiell doppelsträngige Genom (einfache Kreise ganz im Zentrum), die vier ORF (Mitte) sowie die wesentlichen Transkripte (gewellte Linien ganz außen). Erläuterungen siehe Text (modifiziert nach Ganem 1987, S. 655).

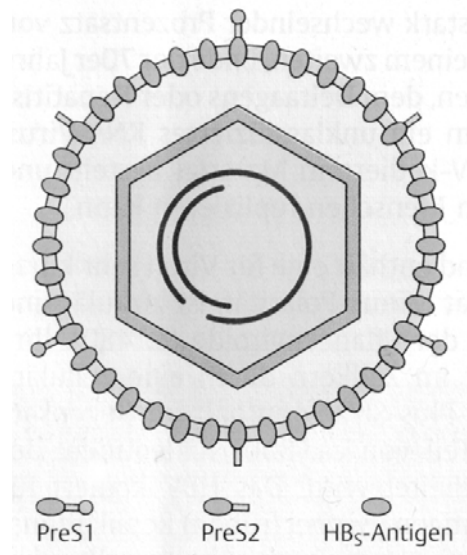


Abb. 2: Schematische Darstellung des Dane-Partikels; das innere Sechseck symbolisiert das HBV-core-Protein, das die partiell doppelsträngige Virus-DNA (schwarze Linien im Zentrum) umgibt; die äußere Virushülle wird von den drei verschiedenen Formen des vom HBs-Gen kodierten Hüll-Proteins (PreS1, PreS2, HBs; siehe Legende) gebildet.

1.2 Klinik der Hepatitis B Infektion

Die Infektion mit dem Hepatitis B Virus erfolgt auf parenteralem Weg. Während in endemischen Gebieten mit hoher Prävalenz, insbesondere Südostasien und Zentralafrika, die perinatale Infektion als der führende Übertragungsweg für 40-50% der chronischen Infektionen verantwortlich ist, stehen in Gegenden mit niedriger Prävalenz (USA, Westeuropa, Australien, Neuseeland) die sexuelle (d.h. sowohl homo- als auch heterosexuelle) sowie die perkutante Übertragung (v.a. durch i.v. Drogenkonsum) deutlich im Vordergrund (Chan 1999, S. 758); zu bedenken sind auch die Möglichkeit einer beruflichen Exposition (durch akzidentelle Nadelstichverletzungen im Gesundheitssektor) sowie die Übertragung durch Blutkonserven, die freilich durch die Einführung entsprechender serologischer Screening-Verfahren drastisch an Bedeutung verloren hat.

Da das Hepatitis B Virus, von Ausnahmefällen abgesehen, keinen direkten zytopathischen Effekt zeigt (Chisari, Ferrari 1997), kommt es erst durch die Immunreaktion des Wirtsorganismus zur Zerstörung virusbefallener Hepatozyten und damit zur Leberzellschädigung. Der klinische Verlauf der Erkrankung wird somit durch die Wechselwirkung zwischen Virusreplikation einerseits und Immunantwort andererseits bestimmt. Im Falle einer ausreichend starken Aktivierung des Immunsystems kommt es, vereinfacht dargestellt, zu vollständiger Elimination der HBV-infizierten Zellen und Suppression der HBV-Replikation, die Erkrankung ist dann nach der akuten Phase ausgeheilt und beendet¹; ist die Immunantwort hingegen insuffizient, so kann das Virus persistieren, und es kommt zu einer chronischen Hepatitis B Virus-Infektion (serologisch definiert als HBsAg-Positivität ≥ 6 Monate).

Die akute Hepatitis verläuft nach einer Inkubationszeit zwischen einem und vier Monaten in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle (ca. 70%) subklinisch, d.h. asymptomatisch, oder anikterisch; in 30% hingegen kommt es zu einer ikterischen Hepatitis, fulminante Verläufe sind eher selten (0,1-0,5%) (Chan 1999, S.763). Die klinisch manifeste Erkrankung äußert sich nach einer zwei- bis siebentägigen Prodromalphase, die einer Serumkrankheit ähnelt, mit allgemeinem Krankheitsgefühl, Appetitlosigkeit, Übelkeit und Erbrechen, niedriggradigem Fieber, Muskelschmerzen und leichter Ermüdbarkeit. Bei der körperlichen Untersuchung findet sich evtl. eine leichte Splenomegalie. Verläuft die Erkrankung ikterisch, kommt es i.d.R. innerhalb von 10 Tagen nach dem Beginn der genannten Allgemeinsymptome zum Auftreten eines Ikterus, was meist mit einer Besserung des Krankheitsgefühls einhergeht. Die akute Symptomatik verschwindet normalerweise nach einem bis zu drei Monaten.

Die Progredienz der Erkrankung zur chronischen Hepatitis wird ganz wesentlich beeinflusst vom Alter zum Zeitpunkt der Infektion: während sie bei perinataler Infektion mit bis zu 90% die Regel darstellt², ist bei Infektion im Erwachsenenalter nur in weniger als 5% mit einem chronischen Verlauf zu rechnen (Chan 1999, S. 764).

¹ In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass wahrscheinlich auch nach Ende der akuten HBV-Infektion kleinste Virusmengen persistieren, auch wenn im Serum HBsAg und HBV DNA nicht mehr nachweisbar sind (Chisari 1997).

² Das Überwiegen der chronischen Erkrankung bei perinataler Infektion erklärt man sich mit einer Immuntoleranz gegenüber dem HBc-Antigen; vermutlich wird durch transplazentaren Transfer maternalen HBe-

Aufgrund der großen Zahl der asymptomatischen Verläufe während der akuten Phase hat die überwiegende Mehrzahl der Patienten mit chronischer Hepatitis vorher keine symptomatische akute Hepatitis durchgemacht. Viele Patienten mit chronischer Hepatitis sind asymptomatisch, während andere an unspezifischen Symptomen, insbesondere Abgeschlagenheit und Müdigkeit leiden; auch leichter Oberbauch-Schmerz im rechten oder mittleren Epigastrium wird angegeben. Darüber hinaus können immer wieder entzündliche Exazerbationen auftreten, die wiederum asymptomatisch sein oder mit Appetitlosigkeit, Übelkeit und evtl. Ikterus einer akuten Hepatitis ähneln können. Bei der körperlichen Untersuchung können sich die Stigmata einer fortgeschrittenen chronischen Lebererkrankung (Spider Naevi, Palmarerythem, Ikterus, Aszites, Splenomegalie) zeigen. In 10-20% der Patienten mit chronischer Hepatitis B treten, vermutlich bedingt durch zirkulierende Immunkomplexe, auch extrahepatische Manifestationen auf, vor allem Polyarteriitis nodosa, Glomerulonephritis, seltener auch eine essentielle gemischte Kryoglobulinämie. Die Langzeitfolgen der chronischen Hepatitis schließlich reichen von einem asymptomatischen, „gesunden“ Träger-Status über die Entwicklung einer Leberzirrhose (evtl. mit hepatischer Dekompensation) bis hin zu Hepatozellulärem Karzinom (HCC) und Tod, wobei die jeweilige Progression der Erkrankung u.a. vom Immunstatus, dem Alter des Patienten, der serologischen Phase der Erkrankung (siehe unten) sowie genetischen und geographischen Faktoren abhängt (Lee 1997, S. 1739).

Insbesondere sind es die (prolongierten) Phasen der aktiven HBV-Replikation, die durch die hierbei ablaufenden inflammatorischen und nekrotisierenden Prozesse das Risiko für Fibrose, Zirrhose und Karzinogenese signifikant erhöhen und so die Prognose der Patienten massiv verschlechtern. So waren in einer Studie die 5-Jahres-Überlebensraten von Patienten mit bzw. ohne HBe-Positivität 72% respektive 97%, eine Elimination des HBe-Ag brachte eine 2,2fache Absenkung der Mortalitätsrate (de Jongh 1992, S. 1633). Analog hierzu unterstrich eine erst kürzlich veröffentlichte großangelegte Studie die Bedeutung der HBe-Seropositivität als Ausdruck einer aktiven HBV-Replikation für die Entwicklung des HCC (Yang 2002, S. 170).

Als Folge aus diesen klinischen Daten muß sich konsequenterweise für die Therapie der chronischen Hepatitis B die Zielsetzung ergeben, die HBV Replikation möglichst vor der Entwicklung irreversibler Leberschäden wirkungsvoll zu supprimieren und so den schwerwiegenden Langzeit-Folgen vorzubeugen.

1.3 Interferon-Therapie der chronischen Hepatitis B

Auch wenn in letzter Zeit das zur Gruppe der Nukleosid-Analoga zählende Lamivudin zusehends in den Blickpunkt des Interesses rückt (Lok 2002, S. 1683), ist das primär empfohlene Medikament für die Therapie der chronischen Hepatitis B das IFN α (Chan 1999, S.777; Hoofnagle 1997, S. 347). Dieses Zytokin zählt zur Familie der Interferone, einer Gruppe strukturell und funktionell verwandter Glykoproteine, die ursprünglich 1957 dank ihrer Eigenschaft, Zellen eine Resistenz gegenüber viralen

Antigens eine T-Helfer-Zell-Areaktivität gegenüber HBe beim Neugeborenen induziert (Milich 1990), die, bedingt durch ein hohes Maß an T-Zell-Kreuzreaktivität zwischen HBe und HBc Antigen (Milich 1988), eine mangelhafte T-Zellantwort gegenüber HBc zur Folge hat.

1 Einführung

Infektionen verleihen zu können, entdeckt wurden (Isaacs 1957). Sie lassen sich in die Gruppe der Typ I und der Typ II-Interferone unterteilen, die an jeweils verschiedene Zelloberflächen-Rezeptoren binden (siehe 4.2.1.1). Die Typ I-IFNs, deren Gene sich allesamt auf dem kurzen Arm des Chromosom 9 befinden, umfassen (mindestens) 13 verschiedene IFN α -Subtypen (IFN α 1, IFN α 2 usw.), einen IFN β -Subtyp („Fibroblasten-Interferon“) sowie einen IFN ω -Subtyp; sie werden innerhalb der ersten Stunden jeder viralen Infektion freigesetzt und führen über einen als Jak-STAT-Weg charakterisierten Signaltransduktionsmechanismus (siehe 4.2.1.2) zur verstärkten Expression verschiedener antiviral wirksamer Gene und so zu einer unspezifischen Inhibition der viralen Replikation. Die Gruppe der Typ II-Interferone hingegen besteht ausschließlich aus dem auf Chromosom 12 kodierten IFN γ , das nach Antigen-Stimulation von Immunzellen produziert wird („Immuninterferon“) und modulierend in die spezifische Immunantwort eingreift, während die antiviralen Eigenschaften weniger stark ausgeprägt sind (Foster 1997, S. 287 und Landolfo 1995, S. 416).

Entsprechend ihres breiten biologischen Wirkungsspektrums werden Interferone heute klinisch für eine Vielzahl von Indikationen verwendet: IFN β 1a bzw. β 1b etwa spielt eine wesentliche Rolle bei der Therapie der Multiplen Sklerose (Rudick 1997, Jacobs 1996), IFN α wird v.a. im Bereich der Therapie hämatologischer Erkrankungen wie etwa der Haarzell-Leukämie oder der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML), aber auch anderer Tumoren wie des Nierenzellkarzinoms, des Malignen Melanoms (Krown, Burk *et al.* 1984) oder Kaposi Sarkoms (Krown 1983; Krown, Real *et al.* 1984) eingesetzt (Dorr 1993); es dient darüber hinaus auch der antiviralen Therapie von Infektionen mit Papillomaviren (Condylomata accuminata) (Eron 1986) oder dem Herpesvirus (Herpes genitalis) (Eron 1987). Die bekannte antivirale Aktivität des IFN α war auch der Ausgangspunkt für seinen therapeutischen Einsatz bei der chronischen Hepatitis B, insbesondere vor dem Hintergrund des Fehlens einer wirkungsvollen, über supportive Maßnahmen hinausgehenden medikamentösen Therapie dieser Erkrankung. Eine logisch nachvollziehbare Basis hierfür lieferte zunächst einmal die Tatsache, daß *in vivo* im Rahmen der chronischen Hepatitis B dem IFN α , neben anderen inflammatorischen Zytokinen wie IFN γ , TNF α , IL-1 α und IL-6, offensichtlich eine Funktion als Regulator der HBV-Infektion zukommt (Gilles 1992, S. 3955); insbesondere konnte in humanem Lebergewebe von Patienten mit chronischer Hepatitis B mittels Immunfluoreszenz demonstriert werden, daß IFN α von mononukleären Zellen und Fibroblasten (nicht jedoch von Hepatozyten) in unmittelbarer Nähe der von aktiver HBV-Replikation betroffenen Zellen sezerniert wird (Jilbert 1986, S. 960). Dabei scheint jedoch die endogene Produktion von Interferon - zumindest bei einigen Patienten mit chronischer Hepatitis B - defizitär zu sein: Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Patienten mit chronischer Hepatitis B – sowohl Kinder als auch Erwachsene – sezernierten nämlich in mehreren Studien als Reaktion auf *in vitro* Stimuli gegenüber Kontrollindividuen signifikant reduzierte Mengen an IFN (Ikeda 1986, S. 963; Tolentino 1975, S. 460; Abb 1985, S. 173). Dabei ließ sich allerdings nicht in allen Arbeiten eine eindeutige Korrelation zwischen der Defizienz der IFN-Antwort und dem Ausmaß der Lebererkrankung etablieren (Kato 1982). Auch der *in vivo* Aktivierungszustand des IFN-Systems lag sowohl in Hepatozyten (Ikeda 1986, S. 963) als auch in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Poitrine 1985) deutlich unter dem Kontrollniveau. Verschiedene Faktoren

werden als Ursachen für dieses Phänomen in Erwägung gezogen, so etwa ein primärer Defekt des IFN-Systems, der eine Prädisposition für die Chronifizierung der Infektion darstellen würde (Ikeda 1986, S. 963-4), ein möglicher „Refraktärzustand“ der Lymphozyten infolge wiederholter *in vivo* Stimulation (Abb 1985, S. 175; Tolentino 1975, S. 461), aber auch eine direkte inhibitorische Wirkung von HBV-Bestandteilen auf das IFN-System. Beispiele hierfür sind etwa das HBV-core-Protein, das einen negativen *trans* Effekt auf das IFN β Gen ausübt (Twu 1988, S. 255; Twu 1989, S. 3067-8), oder die terminale Proteindomäne des HBV-Polymerase-Gens, die die zelluläre Antwort auf IFN α (und γ) inhibiert (Foster 1991, S. 2890-1).

Die ersten klinischen Daten zur IFN-Therapie bei der Hepatitis B liegen vor aus dem Jahr 1976, als Greenberg *et al.* in einer kleineren Studie mit nur vier Patienten einen suppressiven Effekt von humanem Leukozyten-Interferon auf die Serum-Spiegel verschiedener Dane-Partikel-assoziiierter Parameter (DNA Polymerase, HBc Ag, HBV DNA) im Rahmen der chronischen Hepatitis B-Infektion demonstrieren konnten (Greenberg 1976, S. 518-9). Während dann in den frühen 80er Jahren alternative Behandlungsstrategien mit Adenin-Arabinosid (Pollard 1978, Bassendine 1981), Adenin-Arabinosid-Monophosphat (Hoofnagle 1984, Perrillo 1985, Yokosuka 1985, Garcia 1987) und Acyclovir (Schalm 1985) nur sehr begrenzt Erfolg zeigten (Hoofnagle 1988, S. 1318; Lee 1997, S. 1739), konnte sich die IFN-Therapie durch weitere Studien mit unterschiedlichen Fallzahlen und i.d.R. 3- bis 6-monatiger Therapiedauer sowohl in den USA (v.a. Hoofnagle 1988) als auch Europa (Alexander 1987, Brook 1989, Saracco 1989) zunehmend etablieren: die Ansprechraten, definiert als Verlust der viralen Replikationsmarker (HBeAg und Serum HBV DNA, nachgewiesen mit nicht PCR-basierten Assays) innerhalb von 12 Monaten nach Beginn der Behandlung, lagen übereinstimmend jeweils zwischen 30 und 40% (Alexander 1987, S. 67; Brook 1989, S. 653; Hoofnagle 1988, S. 1319 und 1321; Saracco 1989, S. 337), wobei für die Serokonversion von HBeAg zu AntiHBe ein verzögertes Auftreten beobachtet wurde; ein Verschwinden auch des HBsAg trat mit nur 5-10% der Patienten seltener auf (Chan 1999, S. 778). Insbesondere nach Ergebnissen einer multizentrischen Studie mit 169 Patienten, die eine statistisch signifikante Ansprechrate von 37% (Perrillo 1990, S. 297) zeigte, wurde Interferon schließlich 1992 durch die US Food and Drug Administration (FDA) zugelassen (Lee 1997, S. 1739). Berücksichtigt man die spontan auftretenden Serokonversionsraten bei den unbehandelten Kontrollen, die in der Größenordnung von 10 – 15% liegen (Chan 1999, S. 778), so verringert sich der durch die Therapie erreichte Erfolg entsprechend. Eine Meta-Analyse von 16 randomisierten und kontrollierten Studien konnte jedoch eindeutig einen günstigen Effekt der Interferontherapie belegen (Wong 1993, S. 319)

Die in Deutschland üblichen Therapieschemata sehen eine Behandlung mit 3x 5-6 Millionen I.E. s.c / Woche für 6 Monate oder 3x 10 Millionen I.E. s.c./ Woche für 4 Monate vor (Hopf 1997); eine Indikation besteht für Patienten mit einer chronischen HBV Infektion mit Nachweis einer aktiven Virusreplikation sowie mit biochemisch und histologisch aktiver Leberentzündung, wobei u.a. eine hohe ALT und eine niedrige Serum HBV-DNA vor Therapiebeginn – als Ausdruck einer bereits ablaufenden Immunantwort – als günstige Prädiktoren zu betrachten sind (Chan 1999, S. 779).

Die Signifikanz der Interferontherapie für die klinische Prognose der behandelten Patienten (outcome) hatten Carreno *et al.* bereits 1992 demonstriert (Carreno 1992). Insbesondere eine 1996 publizierte

1 Einführung

Studie, in der Niederau *et al.* 103 mit Interferon behandelte Patienten für im Mittel 50 Monate weiterverfolgt hatten, zeigte, daß Patienten mit einer Serokonversion von HBe zu antiHBe höhere Gesamtüberlebensraten und seltenere Entwicklung hepatischer Dekompensation aufwiesen (Niederau 1996, S. 1425).

Im Gegensatz zur Behandlung mit Lamivudin - hier kommt es mit einer Häufigkeit von bis zu 20% pro Jahr zur Entstehung resistenter HBV-Mutanten - wird unter der Therapie mit IFN keine virale Resistenzentwicklung beobachtet (Jaeckel 1997, Papatheodoridis 2002).

Die erreichte Remission kann bei initial HBe-Ag-positiven Patienten i.d.R. ohne weitere Behandlung aufrechterhalten werden, während vor Therapiebeginn HBe-Ag-negative Patienten hohe Rezidivraten zeigen. Das Spektrum möglicher Nebenwirkungen ist groß, die häufigsten - die i.d.R. keine Dosisanpassung erfordern - sind eine grippeähnliche Allgemeinreaktion, neuropsychiatrische Veränderungen (u.a. Apathie und andere Stimmungsänderungen), Durchfall, Übelkeit, Abfall von Granulo- und Thrombozyten u.v.a.m. (Balfour 1999, S. 1259; Dusheiko 1997, S. 113S), aber auch schwerwiegende Reaktionen wie etwa psychotische Veränderungen oder Thrombozytopenie (Dusheiko 1997, S. 114S) kommen vor.

Trotz dieses beträchtlichen Nebenwirkungspotentials und trotz der hohen Kosten sprechen angesichts der Prävention von Zirrhose und HCC durchaus auch ökonomische Erwägungen für die Behandlung der chronischen Hepatitis B mit Interferon (Dusheiko 1995; Wong 1995), auch wenn für die Zukunft höhere Ansprechraten wünschenswert wären.

1.4 Fragestellung

Die klinische Wirksamkeit von Interferon α bei der Therapie der chronischen Hepatitis B ist eindeutig etabliert (siehe 1.3); demgegenüber ist der genaue seiner Wirkung zu Grunde liegende Mechanismus noch nicht hinreichend aufgeklärt (Lee 1997, S. 778). Aus diesem Grund soll sich die vorliegende Arbeit mit der intrazellulären Vermittlung des inhibitorischen IFN-Effekts auf das HBV auseinandersetzen.

Bezüglich der allgemeinen (antiviralen) Wirkung von Typ I-Interferonen ist eine als sog. Jak-STAT-Weg bekannt gewordene Signaltransduktionskaskade in vielen Details entschlüsselt worden. Vereinfacht dargestellt kommt es nach Rezeptorbindung von IFN zur Aktivierung und Oligomerisierung verschiedener Proteinfaktoren, sog. STATs (signal transducers and activators of transcription), die dann über die Bindung an ein Erkennungsmotiv in der 5'-Region IFN-sensitiver Gene, das sog. ISRE (interferon stimulable response element), die Transkription der nachgeschalteten für antivirale Proteine kodierenden Gene hochregulieren (siehe 4.2.1); wie genau und unter Beteiligung welcher zellulärer Faktoren diese initialen Schritte der IFN-Signaltransduktion letztlich zur Inhibition der HBV-Replikation führen, ist nicht im einzelnen bekannt.

Bedenkt man die Pathogenese der chronischen Hepatitis B und die Bedeutung des Immunsystems für die Elimination der viral infizierten Hepatozyten (vgl. 1.2, S.3), so liegt die Vermutung nahe, daß zumindest *ein* wesentlicher Wirkmechanismus des Interferon – einer immunmodulatorischen und -stimulativen Substanz – darin besteht, diese Immunantwort zu stärken und so eine effektivere Virus-

Clearance zu fördern; dieser Mechanismus (vgl. 4.3.1) könnte etwa auf einer Interferon-induzierten verstärkten Präsentation von MHC Klasse I Molekülen zusammen mit degradierten HBV-Proteinkomponenten auf der Oberfläche der Hepatozyten und nachfolgend verstärkter Zellyse durch zytotoxische T-Lymphozyten beruhen. Von klinischer Seite her wird diese Theorie etwa durch die Beobachtung gestützt, daß es bei erfolgreicher Interferon-Therapie zu einem Anstieg der Amino-Transferasen als Ausdruck immunvermittelter Lyse infizierter Leberzellen kommt (Liaw 1987, S.2, Perillo 1994, S. 35S). Da dieses Phänomen in zeitlichem Zusammenhang mit der Serokonversion von HBeAg zu anti-HBe auftritt, spricht man auch von Serokonversionshepatitis.

Es gibt aber auch Hinweise aus *in vivo* Modellen, daß es über diesen auf das Immunsystem bezogenen Effekt hinaus noch eine weitere, nicht zytolytische Komponente der IFN-Wirkung gibt, die zu einer (direkten) Hemmung der hepadnaviralen Replikation führt (siehe 4.3.2). In WHV-infizierten immundefizienten (!) Mäusen konnten durch exogene Verabreichung von IFN α die WHV-Virus-Titer signifikant gesenkt werden (Petersen 1998, S. 313). Entsprechende Ergebnisse liegen auch aus Tiermodellen der HBV-Infektion vor. Aktuelle Tierversuche mit Schimpansen zeigen, daß in der Anfangsphase der akuten HBV-Infektion vor der Zerstörung der HBV-Antigen-präsentierenden Hepatozyten durch zytotoxische T-Zellen zunächst die HBV-Replikation herunterreguliert wird (Guidotti, Rochford *et al.* 1999, S. 827-8). Ebenso konnte in einem transgenen Mausmodell eine Suppression der HBV-Transkripte begleitet von einer parallelen Hochregulation der Zytokin-mRNA-Expression demonstriert werden, wenn eine gleichzeitige Koinfektion mit LCMV stattfand; mittels neutralisierender Antikörper konnten neben TNF α die Typ I-Interferone als die wesentlichen Mediatoren dieser nicht-zytolytischen Downregulation der HBV-Replikation identifiziert werden (Guidotti, Borrow *et al.* 1996, S. 4591-2 und 4592-3).

Diese Interferon-induzierte Replikationshemmung ist in verschiedenen Studien auch *in vitro*, d.h. unter bewußter Ausschaltung möglicher (wahrscheinlich synergistischer) Effekte des Immunsystems näher untersucht worden (u.a. Hayashi 1989, Korba 1990, Tur-Kaspa 1990, Caselmann 1992, Hamasaki 1992, Kakumu 1992, Romero 1996, Nakao 1999, Rang 1999); die in den meisten Arbeiten experimentell nachgewiesene Reduktion verschiedener Virus-assoziiierter Parameter - virale RNA, replikative DNA-Intermediate sowie insbesondere die verschiedenen HBV-Protein-Produkte - spiegelt dabei möglicherweise die aus der Klinik bekannte Abnahme der verschiedenen Replikations-Marker von HBV wider. Es konnte eine Vielzahl unterschiedlicher Aspekte dieser Komponente der Interferonwirkung erarbeitet werden, wobei sich im wesentlichen *zwei* Angriffspunkte darstellen:

- i) Zum *ersten* eine Hemmung auf posttranskriptioneller Ebene (hier spielen verminderte RNA-Stabilität, verstärkte RNA-Degradation und Inhibition des Virus-Assembly eine Rolle; siehe 4.3.2.2).
- ii) Zum *zweiten* eine direkte Inhibition des HBV auf Ebene der Transkription (siehe 4.3.2.1).

Letztere zeigt sich in Reporter-Gen-Assays als hemmende Wirkung der Typ I Interferone sowohl auf den HBV Enhancer I (Tur-Kaspa 1990, Hamasaki 1992, Romero 1996, Nakao 1999) als auch den core promoter (Romero 1996). Da diese regulatorischen HBV-Sequenzen (siehe 4.3.2.1.2) mit der

1 Einführung

Bildung der sog. p(re)g(enomic) RNA einen Schlüsselschritt bei der HBV-Replikation (siehe 4.3.2.1.1) steuern, liegt es nahe, daß diesem Aspekt der IFN-Wirkung eine besondere Bedeutung zukommt.

Über die genauen IFN-sensitiven Angriffspunkte innerhalb der regulatorischen HBV-Sequenzen liegen jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur vorläufige Ergebnisse vor (siehe Nakao 1999, Rang 2001). Noch nicht endgültig identifiziert sind auch die vorgeschalteten intrazellulären Signaltransduktionsschritte, über die das hemmende Interferonsignal an die regulatorischen HBV-Elemente - insbesondere die komplette Enh I, II und core promoter-Sequenz, wie sie im Wildtyp-Virus vorkommt - weitergeleitet wird.

Vor diesem Hintergrund war es somit **Ziel** der vorliegenden Arbeit:

- i) mittels eines Reportergen-Systems in einem möglichst nativen Kontext **den inhibitorischen Effekt von Typ I-Interferonen auf die gesamte HBV Enhancer I, II und core promoter-Sequenz** genauer zu charakterisieren (siehe 3.1.2 und 3.1.3)
- ii) mittels Deletionsanalysen **für die Interferon-Wirkung essentielle HBV-DNA-Bereiche** näher einzugrenzen (siehe 3.1.4).
- iii) mittels EMSA **für den Interferon-Effekt entscheidende Veränderungen DNA-bindender nukleärer Proteine, d.h. Transkriptionsfaktoren**, zu untersuchen (siehe 3.2).

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeines

Alle verwendeten Chemikalien stammten, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Sigma, Deisenhofen. Die Chemikalien hatten mindestens den Reinheitsgrad zur Analyse oder, falls erhältlich, den Reinheitsgrad für die Molekularbiologie.

Autoklavierte Lösungen und Materialien wurden für 20 min bei 121°C und 1bar Überdruck behandelt.

Sterilfiltrierte Lösungen wurden durch ein 0,22 µm Filter (Millex-GS, Millipore) filtriert.

Alle Enzyme stammten, soweit nicht anders angegeben, von New England Biolabs, Schwalbach.

Alle sonstigen Substanzen und Materialien wurden von den im Text angegebenen Firmen bezogen.

2.2 Herstellung der Reporter-Plasmid-Konstrukte

2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Im folgenden sollen nun zunächst einige grundlegende molekularbiologische Methoden zum Arbeiten mit DNA erläutert werden, die bei der Herstellung der Reporterplasmide (vgl. 2.2.3) zur Anwendung kamen.

2.2.1.1 Isolation, Reinigung und Quantifizierung von DNA

Phenolextraktion von störendem Protein aus DNA-Lösungen:

Wässrige DNA-Lösungen lassen sich durch Phenol/Chloroform-Extraktion von störendem Protein reinigen. Dazu wurden mindestens 100µl neutral bis leicht alkalisch gepufferte DNA-Lösung mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1, Roth) versetzt, 5min bis zur Bildung einer Emulsion kräftig geschüttelt und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert (18000 g, 5min, RT). Die obere wässrige Phase mit den wiederzugewinnenden Nukleinsäuren wurde in ein neues Gefäß überführt und mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, um restliches Phenol zu entfernen. Die gereinigte DNA-Lösung wurde anschließend mit Ethanol gefällt (siehe nächster Punkt).

Ethanolpräzipitation von DNA-Lösungen:

Die Ethanolpräzipitation erfolgte nach Phenol/Chloroform-Extraktion oder zur Aufkonzentrierung von DNA-Lösungen (Sambrook 1989, S. E10-E14). Dazu wurden die DNA-Lösungen nach Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat, pH 5,2 mit 2,5 Volumen Ethanol absolut gemischt. Der Ansatz wurde mindestens 2h bei -20°C oder 15 min bei -80°C gefällt, zentrifugiert (15000g, 15min, 4°C), und der Überstand vorsichtig entfernt. Das Präzipitat wurde mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in einem geringen Volumen A.d. oder 10mM Tris-HCl, pH 8,0 gelöst.

Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen:

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA-Präparationen wurde ein Aliquot der Lösung in TE-Puffer verdünnt und anschließend in Quarzküvetten bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ und 280 nm im Spektralphotometer gemessen; bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ wurde die Absorption der heterozyklischen, aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen der DNA, bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ die Absorption der aromatischen Reste von Proteinverunreinigungen bestimmt (Sambrook 1989, S.E5). Für die Berechnung der Konzentration wurde der Näherungswert von Cryer *et al.* zugrundegelegt (Cryer 1975), wonach eine Extinktion (OD) von 1,0 bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ und einer Schichtdicke von 1 cm etwa $50 \mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA entspricht.

Durch Vergleich der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm lassen sich Rückschlüsse auf die Reinheit und den Grad der Proteinkontamination der DNA-Präparation ziehen; dabei gilt als Richtwert für gute Präparationen ein Quotient ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) $> 1,8$.

Die minimale Konzentration der zu vermessenden Lösung ist $1 \mu\text{g/ml}$, kleinere Nukleinsäure-Mengen lassen sich mit dieser Methode nicht bestimmen.

2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion und „Bakterienkolonie“-PCR

Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (Bloch 1991; Ibelgaufts 1990, S. 380-381):

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) stellt ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen dar; sie beruht auf der Fähigkeit von DNA-Polymerasen, einen Einzelstrang zum Doppelstrang zu polymerisieren, wenn ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Primer vorliegt. Dazu verwendet man zwei chemisch synthetisierte Oligonukleotide, die strangspezifisch komplementär zu kurzen Abschnitten auf beiden Seiten der zu amplifizierenden Sequenz sind und durch spezifische Hybridisierung mit diesen Abschnitten an den kodierenden bzw. nicht-kodierenden Strang der DNA binden können.

Die DNA wird zunächst durch Hitzebehandlung in Einzelstränge zerlegt (Denaturierung, $92\text{-}95^\circ\text{C}$); anschliessend können sich die im Überschuss vorliegenden Primer spezifisch an die jeweils komplementären Bereiche der nun einzelsträngigen DNA anlagern (Anhybridisierung oder Annealing, $45\text{-}65^\circ\text{C}$). Die so entstandenen kurzen doppelsträngigen Bereiche wiederum dienen nun in einem dritten Schritt als Startpunkt für eine (hitze stabile) DNA-Polymerase, die in Gegenwart von dNTPs die beiden partiell doppelsträngigen Hybridmoleküle zu zwei vollständigen Doppelstrangmolekülen auffüllt (Extension, 72°C).

Durch zyklische Wiederholung dieser Reaktionsschritte (Denaturierung, Annealing und Extension) kommt es im Idealfall in jeder Reaktionsfolge zu einer Verdopplung der Zahl der DNA-Doppelstrangmoleküle und damit in einer Kettenreaktion zu einer selektiven, exponentiellen, etwa 10^6 – 10^7 -fachen Anreicherung der durch die Oligonukleotide flankierten DNA-Sequenz. Die Hitzestabilität der verwendeten DNA-Polymerase erübrigt dabei die erneute Zugabe des Enzyms nach jedem Denaturierungsschritt.

2 Material und Methoden

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene hitzestabile DNA-Polymerasen verwendet, die sich hinsichtlich ihrer Amplifikationsgenauigkeit und Prozessivität unterscheiden: Für die Herstellung eines DNA-Fragmentes, bei dem eine exakte Übereinstimmung des PCR-Produktes mit der Matrizen-DNA erforderlich war, wurde die Pwo-DNA-Polymerase (Roche) verwendet, die über eine 3'->5'-Exonuklease-Korrekturaktivität (=Proofreading Aktivität) verfügt (Fehlerrate: $1,3 \times 10^{-6}$ pro amplifiziertem Nukleotid). Für Routineanwendungen, wo eine basengenaue Amplifikation nicht zwingend war, wurde mit der hochprozessiven Taq-DNA-Polymerase (Gibco) gearbeitet, die aufgrund des Fehlens einer 3'->5'-Exonuklease-Aktivität eine im Vergleich zur Pwo-DNA-Polymerase höhere Fehlerrate (2×10^{-4} pro amplifiziertem Nukleotid) aufweist.

Routinemäßig wurden bei jedem PCR-Ansatz eine Negativkontrolle ohne Matrizen-DNA und wenn möglich eine Positivkontrolle mit bekanntem PCR-Produkt mitgeführt.

5-15 µl eines 100µl PCR-Ansatzes wurden durch Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1.3) analysiert.

Bakterienkolonie-PCR zur Charakterisierung von transformierten Bakterienklonen

Der pGL3 basic Vektor (Promega) verfügt nicht über den zur α -Komplementation der β -Galaktosidase erforderlichen Teil des LacZ-Gens. Die Untersuchung von mit pGL3-Konstrukten transformierten Bakterienkolonien daraufhin, ob sie Vektor-Religanten ohne inserierte DNA oder Plasmide mit korrekt inkloniertem Insert enthalten, kann deshalb nicht über die Methode der „Blau-Weiß-Selektion“ erfolgen. Eine einfache und schnelle Alternativmethode zum Screenen der Transformanten stellt hier die Bakterienkolonie-PCR dar.

Hierzu wurde 1/10 einer Bakterienkolonie (Durchmesser ca. 2mm) mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen und zu 50µl eines bereits im Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegten fertigen PCR-Reaktionsmixes gegeben, der als thermostabile DNA-Polymerase Taq-DNA-Polymerase (Gibco) enthielt. Zur Bestimmung der Größe eines inserierten DNA-Fragmentes wurden die für den Klonierungsvektor spezifischen Sequenzierprimer auf der 3' und 5'-Seite der Klonierungsregion (MCS) gewählt; zur Ermittlung von Größe und Orientierung eines inserierten DNA-Fragmentes wurde ein Vektorprimer und ein für das DNA-Fragment spezifischer Gegenstrangprimer gewählt. Zur Untersuchung von pGL3 Klonen wurden die pGL3 Sequenzierprimer RV primer 3 (CTAGCAAATAGGCTGTCCC) und GL primer 2 (CTTTATGTTTTGGCGTCTCC) (beide: Promega) benutzt.

Tabelle 1: PCR-Reaktionsmix

Taq PCR Puffer	1x
MgCl ₂	1,5mM
dNTP-Mix	0,2mM je dNTP
5'-Primer	0,8µM
3'-Primer	0,8µM
Taq DNA Polymerase	2,5 units/100µl
A.d.	ad 100µl

Tabelle 2: Bedingungen für die Bakterienkolonie-PCR der pGL3-Klone

Zyklus	Denaturierung	Annealing	Extension
	94°C, 3min		
1 – 30	94°C, 30sec	50°C, 30sec	72°C, 1min
	94°C, 30sec	50°C, 30sec	72°C, 5min

2.2.1.3 Auftrennung von DNA-Molekülen in Agarosegelen

Prinzip:

Das biochemische Trennverfahren der Elektrophorese beruht auf der Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld. Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats bei allen pH-Werten negativ geladen und wandern deshalb bei der Elektrophorese zur Anode, wobei sie nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können.

Als Trägermaterial wird eine elektrisch neutrale, horizontal gegossene Agarose-Gelmatrix verwendet, wobei die Prozentigkeit und damit die Porengröße des Gels den jeweils zu trennenden DNA-Fragmenten angepasst werden muß (siehe Tabelle 3). Kleine Taschen im Agarosegel dienen der Aufnahme der aufzutrennenden Proben; die aufgetrennten Moleküle erscheinen nach der Elektrophorese als sogenannte Banden. Als Laufpuffer können sowohl 1x TBE als auch 1x TAE verwendet werden, wobei TAE-Puffer für präparative Gele geeignet ist, während mit TBE-Puffer schärfere Banden und hochauflösendere Gele erzielt werden. Um die separierten Banden im Gel sichtbar zu machen, wird Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenanthridiniumbromid) in geringen Konzentrationen (0,5-1 µg/ml) dem Gel oder dem Gelpuffer hinzugefügt. Das Ethidiumbromid interkaliert sequenzunspezifisch zwischen einzelnen Basenpaaren des DNA-Doppelstranges und läßt die DNA rot-orangefarbig fluoreszieren, wenn man das Gel mit UV-Licht von 300nm bestrahlt.

Um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren, wird der Auftragspuffer mit den Elektrophorese-Farbmarkern Bromphenolblau und Xylencyanol versetzt, die, je nach Prozentigkeit des Gels, mit DNA-Fragmenten einer Länge von ca. 100-10 bp bzw. 5kb wandern und so die Elektrophoresefront bzw. den Elektrophorese-Mittelbereich markieren.

Läßt man DNA-Fragmente mit bekannter Molmasse als Eichsubstanzen mitlaufen (sog. DNA-Längenstandards: 100bp bzw. 1kb Leiter, Gibco), so kann man aus deren Laufverhalten Rückschlüsse auf die Molmasse / Länge der experimentellen DNA-Fragmente ziehen.

Materialien:

50x TAE-Puffer (Laufpuffer)

40mM Tris pH 8,2

2mM EDTA

20mM Essigsäure

als 50fach konzentrierte Lösung herstellen und vor Gebrauch verdünnen

2 Material und Methoden

Auftragspuffer

50% Ficoll 400
0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylencyanol

Ethidiumbromidstammlösung

1mg/ml, wässrig

Analytische Agarosegelelektrophorese:

DNA-Fragmente im Bereich von 0,1 bis 6 kb wurden durch horizontale Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde Agarose (Appligene) in geeigneter Konzentration von 0,7% - 2,0% (siehe Tabelle 3) in 1x TAE im Mikrowellenherd geschmolzen, auf 60°C abgekühlt und in einer Geldicke von ca. 0,5 cm gegossen.

Vor dem Einpipettieren in die Taschen des Gels wurde den DNA-Proben 1/6 Volumen Auftragspuffer zugegeben. Die Elektrophorese erfolgte für 1 – 5h bei konstanter Spannung von 1-5V/cm (Abstand zwischen den Elektroden) in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit 1xTAE als Laufpuffer. Als DNA-Längenstandard zum Größenvergleich dienten eine 100bp bzw. 1kb Leiter (Gibco). Zur Anfärbung der DNA enthielt der Laufpuffer 1µl/ml Ethidiumbromid. Gefärbte DNA wurde bei $\lambda = 312\text{nm}$ auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Sofortbildkamera fotografisch dokumentiert (Polaroid Filmtyp 667).

Tabelle 3: Trenneigenschaften von Agarosegelen (Ibelgaufts 1990, S. 211)

Konzentration (%)	Trennbereich (kb)
0,7	0,8 – 10
0,9	0,5 – 7
1,2	0,4 – 6
1,5	0,2 – 4
2,0	0,1 – 3

Die Auflösung kann je nach Agarosekonzentration etwa 0,5% der Fragmentgröße betragen. Die Werte sind Anhaltswerte und gelten für lineare DNA.

Präparative Agarosegelelektrophorese:

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA mit dem Ziel, definierte DNA-Fragmente präparativ aus dem Gel zu gewinnen, wurden je nach Volumen und Konzentration der zu trennenden DNA-Lösung präparative Gele mit größeren Geltaschen mit entsprechend erhöhtem Auftragsvolumen gegossen.

Nach Agarosegelelektrophorese analog zu oben (Probenhandhabung, Konzentration des Gels und Elektrophoresebedingungen) wurden die zu isolierenden DNA-Moleküle unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, wobei zur Vermeidung von DNA-Strangbrüchen die Zeit der UV-Bestrahlung möglichst zu minimieren war. Die DNA konnte anschließend mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers durch Auflösung der Agarose und selektive Bindung an eine Silica-Gel Membran gereinigt werden.

2.2.1.4 Enzymatische Modifikation von DNA-Molekülen

Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen:

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die auf einem doppelsträngigen DNA-Molekül spezifische Bindungsstellen erkennen (Erkennungssequenzen) und in beiden Strängen des DNA-Moleküls innerhalb spezifischer Basensequenzen (Spaltstellen) Phosphodiester-Bindungen spalten.

Bei den für gentechnologische Anwendungen wichtigsten Restriktionsendonukleasen vom Typ II sind die (meist palindromischen) Bindungs- und Spaltstellen identisch; sie erzeugen entweder 3'- oder 5'-überhängende oder glatte Enden mit jeweils 5'-Phosphat- bzw. 3'-OH-Gruppen, die die Voraussetzung für eine enzymatische Neuverknüpfung kompatibler Enden darstellen (siehe „Verknüpfung von DNA-Molekülen“, unten). Je nach Enzym variiert die Pufferzusammensetzung und die Temperatur, bei denen die Reaktion bezüglich Spezifität und Geschwindigkeit optimal abläuft. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit eingesetzten Restriktionsendonukleasen mit ihren jeweiligen Erkennungssequenzen und Puffern.

In einem analytischen Restriktionsansatz wurden bis zu 1µg DNA in einem Endvolumen von 10µl mit 5-10 Units Enzym im optimalen Reaktionspuffer und bei optimaler Temperatur für mindestens 90 min inkubiert. Die durch den Restriktionsverdau entstandenen DNA-Spaltprodukte wurden anschließend durch analytische Agarosegelelektrophorese getrennt (siehe 2.2.1.3).

Für präparative Zwecke wurde der analytische Restriktionsansatz entsprechend der eingesetzten DNA-Menge auf ein geeignetes Endvolumen hochgerechnet; um eine quantitativ vollständige Spaltung zu erreichen, wurde die Inkubationszeit auf mindestens 16h erhöht. Anschließend wurde eine präparative Agarosegelelektrophorese durchgeführt (siehe 2.2.1.3).

Bei gleichzeitiger Spaltung der DNA durch mehrere Restriktionsendonukleasen konnte mit Hilfe entsprechender Tabellen des Herstellers ein geeigneter Reaktionspuffer ermittelt werden, der ausreichende Reaktionsbedingungen für alle beteiligten Enzyme gewährleistete. War kein solcher Puffer zu finden, wurde die DNA nacheinander mit den einzelnen Enzymen verdaut, wobei Puffer und Enzym jeweils nach den einzelnen Schritten durch Phenolextraktion und Ethanolextraktion entfernt wurden (siehe 2.2.1.1).

Tabelle 4: Verwendete Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzym	Firma	Erkennungssequenz	Puffer
AatII	NEB	GACGT↑C	NEB4
AfIII	NEB	A↑CpuPyGT	NEB3; BSA
Asp718I (*)	NEB (Acc65I)	G↑GTACC	NEB3; BSA
Bsu36I	NEB	CC↑TNAGG	NEB3; BSA
EcoRV	NEB	GAT↑ATC	NEB2; BSA
FspI	NEB	TGC↑GCA	NEB4
HindIII	NEB	A↑AGCTT	NEB2
MluI	NEB	A↑CGCGT	NEB3
NcoI	NEB	C↑CATGG	NEB4
NsiI	NEB	ATGCA↑T	NEBuffer NsiI
PfIMI	NEB	CCANNNN↑NTGG	NEB3; BSA
RsrII	NEB	CG↑G (A/T)CCG	NEB4
SacI	NEB	GAGCT↑C	NEB1; BSA

2 Material und Methoden

SmaI	NEB	CCC↑GGG	NEB4
StuI	NEB	AGG↑CCT	NEB2
XhoI	NEB	C↑TCGAG	NEB2; BSA

Schnittstellen sind mit ↑ dargestellt; N steht für ein beliebiges Nukleotid, Pu für ein Purin-, Py für ein Pyrimidinnukleotid. Das Temperaturoptimum liegt bei allen Enzymen bei 37°C (außer: SmaI: 25°C). Die angegebenen Puffer sind kommerziell bei NEB erhältlich; die mit BSA gekennzeichneten Puffer wurden nach Angaben des Herstellers mit 100 µg/ml BSA supplementiert. Anstelle von Asp718I wurde das bei NEB erhältliche Isoschizomer Acc65I verwendet.

Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase:

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP = calf intestinal phosphatase, Roche) spaltet endständige 5'-Phosphatgruppen von DNA-Molekülen ab. Diese durch CIP katalysierte Dephosphorylierungsreaktion kam zum Einsatz bei linearisierten Vektoren, die mit lediglich einem Restriktionsenzym gespalten worden waren, um so Religationen, d.h. einen intramolekularen Ringschluß des Vektors während einer intermolekularen Ligation zu verhindern und die Klonierungseffizienz zu steigern.

Das linearisierte Plasmid (etwa 5 pmol) wurde in 1x Reaktionspuffer mit 1 U CIP für 1h bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde bei 75°C 10 min hitzeinaktiviert und durch präparative Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1.3) oder Phenolextraktion (siehe 2.2.1.1) entfernt.

Überführung 3'- oder 5'-überhängender DNA-Enden in glatte Enden mit T4-DNA-Polymerase:

T4-DNA-Polymerase katalysiert in Anwesenheit von dNTPs sowohl die Auffüllung überhängender 5'-DNA-Enden als auch die exonukleolytische Entfernung von 3'-DNA-Überhängen zu glatten Enden.

1 µg DNA wurde mit 1 Unit T4-DNA-Polymerase in 100µl Reaktionspuffer mit 100mM jedes dNTPs bei 12°C für 20 min inkubiert. Das Enzym wurde anschließend bei 75°C für 10 min hitzeinaktiviert.

Phosphorylierung mit T4-Polynukleotid-Kinase:

Die T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert ATP-abhängig das 5'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 5 pmol eines DNA-Fragmentes wurden in 25µl 1x Reaktionspuffer mit 1mM ATP und 10 Units T4-Polynukleotid-Kinase bei 37°C 10min inkubiert. Das Enzym wurde bei 65°C für 20min hitzeinaktiviert.

Entfernung überhängender DNA-Enden mit Mung Bean Nuklease:

Mung Bean Nuklease ist eine Einzelstrang-spezifische DNA- und RNA-Endonuklease, die 3'- und 5'-überhängende Enden in doppelsträngiger DNA zu glatten 5'-phosphorylierten, ligierbaren DNA-Enden abbaut. 1µg DNA wurde mit 1 Unit Mung Bean Nuklease in 20µl Reaktionspuffer 30min bei 30°C inkubiert. Zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms wurde mit Phenol extrahiert und die DNA durch Ethanolpräzipitation zurückgewonnen (siehe 2.2.1.1).

Verknüpfung von DNA-Molekülen mit T4-DNA-Ligase:

Die T4-DNA-Ligase katalysiert ATP-abhängig die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe von doppelsträngiger DNA, wodurch eine Neukombination von DNA-Fragmenten und ein Einbau in ein geeignetes Plasmid möglich ist. Als Substrat dienen sowohl kompatible kohäsive Enden als auch glatte Enden. Linearisierter Vektor und

Fremd-DNA wurden in einem 1:1 bis 1:5 molaren Verhältnis in 1x Ligasepuffer für 24h bei 15°C mit T4-DNA-Ligase (5 Units/µl, Roche) inkubiert. Die rekombinanten Plasmide wurden anschließend durch Transformation in E.coli eingeschleust (siehe 2.2.1.6).

Herstellung von Deletionen durch Exonuklease III-, Mung Bean Nuklease- und T4-DNA-Ligase-Behandlung:

Für die Herstellung von ortsspezifischen Deletionen innerhalb eines Plasmids wurde mit dem Exo-size-deletion Kit (New England Biolabs) gearbeitet.

Das Plasmid sollte auf der 5´-Seite des inserierten DNA-Fragmentes eine Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease, die einen 3´-Überhang produziert, besitzen. Dieser 3´-Überhang kann von Exonuklease III, einer 3´->5´-Exonuklease, nicht abgebaut werden. Ferner ist zwischen dieser Schnittstelle und dem zu deletierenden DNA-Insert eine Restriktionsschnittstelle notwendig, bei der ein 5´-Überhang oder ein glattes Ende entsteht. Nach Spaltung des Plasmids durch diese Enzyme dient das 5´-überhängende bzw. glatte Ende als Startpunkt für den unidirektionalen Abbau durch Exonuklease III. Um verschieden große Deletionen zu erhalten, werden Aliquots dieses Reaktionsansatzes zu verschiedenen Zeiten inaktiviert. Durch Behandlung aller Proben mit Mung Bean Nuklease werden überstehende DNA-Einzelstränge entfernt und glatte DNA-Enden hergestellt, die nach Reinigung durch Phenol-Extraktion (siehe 2.2.1.1) mittels T4-DNA-Ligase (siehe oben) religiert werden können. Nach Transformation in E.coli (siehe 2.2.1.6) werden die entstandenen Plasmide mit einer geeigneten Methode analysiert. Teilweise wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen des Exonuklease III Reaktionsschritts abgeändert, um verkürzte Deletionen der HBV-DNA-Sequenz (siehe 2.2.4) zu erhalten.

2.2.1.5 Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA und Auswertung von Sequenzdaten

Die Sequenzierung von klonierten DNA-Fragmenten wurde kommerziell von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt. Doppelsträngige Plasmid-DNA wurde dabei mittels Cycle Sequencing mit der Dideoxy-Methode nach Sanger sequenziert (Sanger 1977).

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit dem Chromas Programmpaket (Version 1.45) sowie dem DNA-Analyseprogramm DNAsis des HIBIO Programmpakets. Zum Auffinden von Sequenzhomologien wurden mit Hilfe des Algorithmus BLASTn die Datenbanken des EMBL (European Molecular Biology Laboratories in Heidelberg) durchsucht (Altschul 1990).

2 Material und Methoden

2.2.1.6 Transformation von E.coli

2.2.1.6.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Verwendeter Bakterienstamm:

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden als Wirtsorganismen Escherichia coli-Bakterien des bereits in kompetentem Zustand gelieferten und gut transformierbaren Stammes E. coli SURE 2 (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Dieser besitzt nicht mehr die Fähigkeit, durch DNA-Rearrangements atypische Sekundär- und Tertiärstrukturen von Fremd-DNA zu entfernen, und eignet sich deshalb besonders auch für schwierige Klonierungsanwendungen. E coli SURE 2 weist folgende genetische Merkmale auf: e14⁻(McrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5(Kan^r) uvrC [F⁺ proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10(tet^r) Amy Cam^r]^a

Nährmedien und Antibiotika:

Es kamen zwei verschiedene Nährmedien zur Anwendung: Die routinemäßige Anzucht von E. coli Bakterien zur Plasmidamplifikation erfolgte in dem Vollmedium Luria-Bertani mit Glukose; frisch transformierte Bakterien hingegen wurden in SOC-Medium resuspendiert. Beide Medien wurden 20min bei 121°C und 2bar autoklaviert, nicht autoklavierbare Zusätze wurden sterilfiltriert (Sterifilter 0,2µm Porenweite, Schleicher & Schüll, Dassel) und nachträglich dem Medium zugefügt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Nährmedien zur Bakterienkultur

	LB-Medium	SOC-Medium
Caseinpepton 140 (Gibco)	10g	20g
Hefeextrakt (Gibco)	5g	5g
NaCl	5g	10mM
Glucose	-	20mM
MgCl ₂	-	10mM
Mg ₂ SO ₄	-	10mM
KCl	-	2,5mM
A.d.	Ad 1000ml	ad 1000ml
pH	7,2 (Lagerung bei +4°C)	7,0 (Lagerung bei -20°C)

Zur Selektion erfolgreich transformierter und somit plasmid-tragender Bakterien wurde dem LB-Medium bzw. LB-Agar nach dem Autoklavieren Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Die Ampicillin-Na⁺-Stammlösung wurde mit A.d. auf eine Konzentration von 100 mg/ml eingestellt, sterilfiltriert und aliquotiert bei -20°C gelagert.

Zur Herstellung von Agarplatten wurde vor dem Autoklavieren 1,5% Agar (USB) zum LB-Medium hinzugefügt. Nach dem Autoklavieren wurden das Medium im Wasserbad auf 50°C abgekühlt, das Antibiotikum zugegeben, gemischt und in keimarme Petrischalen (Greiner) gegossen (ca. 50 ml /

Schale). Nachdem der LB-Agar fest geworden ist, wurden die Platten mit Parafilm versiegelt und bei 4°C gelagert.

Kultivierung:

Die Kultivierung der E.coli SURE 2 Bakterien erfolgte unter aeroben Bedingungen in den jeweiligen Kulturmedien. Nach einem bestimmten Zeitintervall, der sog. lag-Phase, beginnen sich die Bakterien alle 20-30min zu verdoppeln und treten in eine Phase exponentiellen Wachstums ein (log-Phase), die schliesslich bei knapp werdendem O₂ oder sich anhäufenden Stoffwechselprodukten in eine Sättigungsphase eintritt.

Zur kurzfristigen Aufbewahrung und zur Anzucht von Einzelkolonien wurden Bakteriensuspensionen auf Ampicillin-Platten ausgestrichen, bei 37°C inkubiert und bei 4°C bis zu 8 Wochen gelagert. Zur längeren Aufbewahrung dienten sogenannte Glycerinkulturen (siehe 2.2.1.6.2).

Flüssigkulturen wurden in sterilen Plastikgefäßen oder Erlenmeyerkolben unter ausreichender O₂-Zufuhr bei 37°C und 225 rpm angezogen; bei für die Plasmidpräparation mittels Maxi bzw. Midi-Prep (siehe 2.2.1.7.2) bestimmten Flüssigkulturen wurden dabei nacheinander eine Vor- und Hauptkultur durchgeführt: für eine Vorkultur wurde eine Einzelkolonie von einer Ampicillin-Platte für ca. 8 h in ca. 3 – 5 ml LB + inkubiert; für eine Hauptkultur wurde anschließend die Vorkultur mit ca. 100 ml LB+ Medium im Verhältnis 1:500 – 1:1000 verdünnt und für weiter 12 – 16 h (über Nacht) inkubiert.

Bestimmung der Zelldichte:

Die Zelldichte wurde für Bakterien durch photometrische Trübungsmessung bei $\lambda = 600\text{nm}$ bestimmt, wobei das entsprechende Medium als Referenzlösung diente. Eine Extinktion von 1,0 bei dieser Wellenlänge (OD₆₀₀) entspricht einer Zelldichte von 10⁹ E.coli Zellen / ml.

2.2.1.6.2 Transformation

Transformation von E.coli SURE 2:

Unter Transformation versteht man das Einschleusen von DNA in Bakterienzellen (Ibelgauffs 1990, S. 460); liegt, z.B. in Form eines Antibiotika-haltigen Mediums, ein geeigneter Selektionsdruck vor, so wird ein durch Transformation in die Zelle eingebrachtes Plasmid stabil auf die Tochterzellen weitergegeben. Die hier verwendeten Bakterien des Stammes E.coli SURE 2 sind bereits kompetent, d.h. in der Lage, Fremd-DNA aufzunehmen, auf eine entsprechende Vorbereitung der Bakterien etwa durch die KCM-Methode kann somit verzichtet werden.

Die Einschleusung von DNA in bakterielle Zellen kann mittels verschiedener Techniken erreicht werden, z.B. mittels eines elektrischen Impulses oder aber wie im Rahmen dieser Arbeit mit der Hitzeschockmethode:

Dazu wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut (100 µl E. coli SURE 2 in einem vorgekühlten 15 ml Polypropylen-Röhrchen), mit 1,7 µl 2-Mercaptoethanol (14,2M) versetzt, vorsichtig gemischt und für 10 min, unter kurzem Aufschütteln in 2 minütigen Abständen, auf Eis inkubiert.

2 Material und Methoden

Anschließend wurde die einzuschleusende DNA, deren Volumen 2µl nicht übersteigen sollte, hinzugefügt, der Ansatz wiederum leicht geschüttelt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 45 sec Hitzeschock bei 42°C wurden die Bakterien wieder für 2 min auf Eis gestellt, wobei auf genaues Einhalten sowohl der Temperatur als auch der Dauer des Hitzeschocks besonders zu achten war.

Nach der Zugabe von 0,9ml SOC-Medium (Raumtempertur) wurden die Bakterien 60min unter Schütteln (225 rpm) bei 37°C kultiviert, so daß das Ampicillin-Resistenz-Gen exprimiert werden konnte. Anschließend wurden verschiedene Anteile (10%, 20%, 70%) des Kulturvolumens auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen.

Anlegen von Glyzerinkulturen:

Zur Aufbewahrung von Bakterien über längere Zeiträume müssen Dauerkulturen angelegt werden; hierfür eignet sich glyzerinhaltiges Medium, in dem sich Bakterien bei –80°C ohne Verlust ihrer Vitalität über lange Zeit lagern lassen.

Je 800 µl einer LB-Übernachtskultur, die sich in der frühen Sättigungsphase befand, wurden mit 200µl sterilem Glycerin gemischt und bei –80°C aufbewahrt. Um die so präservierten Bakterien wieder anzuzüchten, wurde mit einer Impföse ein kleiner Teil der gefrorenen Glyzerinkultur abgenommen und entweder in das gewünschte Flüssigmedium überführt oder auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen.

Charakterisierung der Transformanten:

Zur Identifizierung positiver Bakterienklone, d.h. Bakterien, die das Plasmid mit dem gewünschten Insert aufgenommen hatten, wurden die Transformanten entweder mittel Bakterienkolonie-PCR (siehe 2.2.1.2) oder mittels Restriktionsverdau (siehe 2.2.1.4) weiter analysiert.

2.2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

Beide nachfolgend beschriebenen Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA beruhen auf demselben Prinzip: Die Bakterien, die das zu isolierende Plasmid enthalten, werden in einem geeigneten Selektionsmedium vermehrt und anschließend lysiert, so daß die Plasmid-DNA und, in geringerem Umfang, auch die chromosomale DNA freigesetzt und gemeinsam mit den bakteriellen Proteinen denaturiert werden. Durch die anschließende Neutralisierung des Lysats unter Hochsalzbedingungen kommt es zur Renaturierung der Plasmid-DNA, wohingegen die anderen makromolekularen Bestandteile präzipitieren und abgetrennt werden können.

2.2.1.7.1 Plasmidminipräparation zur Charakterisierung von Transformanten (Kochschnelltest)

Hierbei handelt es sich um eine Präparation kleinerer Mengen von Plasmid-DNA, bei der die Bakterien durch Lysozym, Triton und Hitze aufgeschlossen werden (Holmes 1981).

Eine 5 ml LB-Ampicillin-Bakterien-Übernachtskultur (37°C, 225 rpm, 14h) wurde abzentrifugiert (1500 g, 10 min), das Bakterienpellet in 300µl STET-Puffer (8% Saccharose, 5% Triton-X-100, 50mM EDTA,

50 mM Tris, pH 8,0) resuspendiert und nach Zugabe von 10µl einer Lysozym-Lösung (10 mg/ml) für 45 sec in einem kochenden Wasserbad inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer (15000 g, 2min, 4°C) wurde die im Überstand befindliche Plasmid-DNA mit 250µl Isopropanol gefällt (15 min, RT), abzentrifugiert (5 min, 15000g, RT) und anschließend mit 500µl 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde sodann in ca. 20µl 10mM Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert; 1/10 bis 1/5 der Präparation wurde für eine Restriktionsanalyse verwendet (siehe 2.2.1.4).

Um, z.B. für Sequenzierungen, die Qualität der DNA-Präparation zu verbessern, wurde die Plasmid-DNA 15 min bei Raumtemperatur mit 1µl RNase A (1mg/ml in 10mM Tris, pH 8,0) inkubiert, das Protein mit 250µl Chloroform/Isoamylalkohol 24/1 extrahiert (S) und die wässrige Phase anschließend wie oben beschrieben weiterbehandelt.

2.2.1.7.2 Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse und Säulen- chromatographie

Für die Isolierung hochreiner Plasmid-DNA in präparativem Maßstab wurde das QIAGEN Plasmid Maxi bzw. Midi Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet, dem das Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim 1979) in Verbindung mit einer anschließenden chromatographischen Reinigung über ein Anionenaustauschersäulchen (QIAGEN-tip 500 bzw. QIAGEN-tip 100, QIAGEN, Hilden) zu Grunde liegt. Hierbei beruht die Reinigung der zu isolierenden Plasmid-DNA auf der Interaktion zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und den positiv geladenen DEAE-Gruppen auf der Oberfläche des Ionenaustauscherharzes, das aus Silika-Perlen mit einer definierten Partikel-Größe von 100µm besteht und so durch seine hohe Oberfläche eine sehr dichte Anordnung der DEAE-Gruppen erlaubt; die vorliegenden pH- und Salzbedingungen bestimmen, ob die Plasmid-DNA gebunden bleibt (pH 7,0, NaCl 0,1M-1,4M) oder eluiert wird (pH 7,0, NaCl 1,4 – 1,6M).

Die Präparation der Plasmid-DNA wurde mit geringen Modifikationen entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt; Ausgangspunkt bildeten 100 ml (Maxi-Prep) bzw. 25 ml (Midi-Prep) einer LB-Übernachtskultur (37°C, 225 rpm, 14h), wobei mit einer Ausbeute von 3 – 5 µg Plasmid-DNA pro ml Kulturmedium gerechnet werden konnte. Die Bakterien wurden zentrifugiert (15 min, 5000 rpm, 4°C) und anschließend mittels SDS/NaOH für 5 min bei RT lysiert, wobei das SDS die Phospholipid- und Proteinkomponenten der Zellmembran auflöste und zur Freisetzung der Zellbestandteile führte, während das NaOH die chromosomale DNA, Plasmid-DNA ebenso wie die Proteine denaturierte; freigesetzte RNA-Moleküle wurden durch im Lysepuffer enthaltene RNase A verdaut. Anschließend erfolgte die Neutralisierung des Lysats unter Hochsalzbedingungen mit Kaliumacetat und eine 20min Inkubation auf Eis. Dabei renaturiert die niedermolekulare und kovalent geschlossene Plasmid-DNA korrekt und bleibt in Lösung, während die Proteine, Zelltrümmer sowie die (zellwandgebundene) chromosomale DNA gemeinsam mit SDS in Salz-Detergens-Komplexen als Präzipitat (makroskopisch als weissliche Schlieren sichtbar) ausfallen. Diese nicht-löslichen Kontaminationen wurden vor der weiteren Aufarbeitung des Lysats durch einen Zentrifugationsschritt (30 min, 4°C, 11000 rpm) und durch zusätzliche Behandlung des Überstandes mit Hilfe einer speziellen spritzenartigen Filtervorrichtung (QIAfilter Maxi / Midi Cartridge, QIAGEN, Hilden) eliminiert. Zur Entfernung

2 Material und Methoden

bakterieller Endotoxine, die in Plasmid-Präparationen zu einer Ko-Purifikation mit der Plasmid-DNA neigen und später die Transfektionseffizienz drastisch verringern können, wurde das Lysat mit 1/10 des gewonnenen Volumens ER (= Endotoxin removal) Puffer vermischt und anschliessend für 30 min auf Eis inkubiert¹.

Dann folgte nach Präequilibrierung der Anionenaustauschersäulchen die säulenchromatographische Reinigung des Lysates. Hierbei und bei den einzelnen Waschsritten wurden die Bedingungen so gewählt, daß nacheinander zunächst nur Proteine, Polysaccharide, RNA und andere Verunreinigungen quantitativ im Durchlauf abgetrennt wurden und anschließend die zu isolierende Plasmid-DNA mittels eines Hochsalz-Puffers eluiert werden konnte.

Das Eluat wurde mit raumtemperiertem Isopropanol (0,7 x Eluatvolumen) gefällt und für 30 min bei 8°C zentrifugiert; nach Verwerfen des Überstandes wurde das Plasmid-DNA-Pellet unter der Sterilbank in insgesamt ca. 300 µl TE Endofree gelöst. Um restliches Salz zu entfernen und den Isopropanol durch Alkohol zu ersetzen, schloss sich nun noch eine ethanolische Fällung (vgl. 2.2.1.1) an. Abschliessend wurde die Plasmid-DNA nach kurzer Lufttrocknung (30-40min unter der Trockenglocke) durch Auflösung in einem geringen Volumen TE, pH 8,0 (ca. 200-300µl) wieder resuspendiert.

Die Konzentration der 1:50 verdünnten Plasmid-DNA wurde photometrisch (siehe 2.2.1.1) bestimmt, und die Qualität der DNA nach einem Restriktionsverdau (siehe 2.2.1.4) auf einem Agarose-Gel (siehe 2.2.1.3) überprüft. Die fertige Lösung wurde bei +4°C gelagert.

¹ Der hier eingesetzte Endotoxin Removal Buffer (QIAGEN, Hilden) verhindert die Bindung von Endotoxin-Molekülen an das Ionenaustauscherharz (< 0,1 units Endotoxin pro µg Plasmid-DNA im Eluat). Um eine Rekontamination mit Endotoxin zu verhindern, müssen alle Puffer (inklusive speziell gereinigten Wassers) endotoxin-frei sein. Darüberhinaus ist darauf zu achten, daß alle für die Transfektion eingesetzten Plastikgefäße Endotoxin-frei sind.

2.2.2 Allgemeines zur Herstellung der Reporterplasmide

2.2.2.1 Reporter-Gen-Systeme

Ein weit verbreiteter Ansatz zur Untersuchung der Regulation eukaryontischer Genexpression (Analyse von Rezeptoraktivität, Transkriptionsfaktoren, intrazellulärer Signaltransduktion etc.) besteht in der Verwendung sogenannter Reporter-Gen-Systeme. Anstelle wie in Northern Blots oder Nuclease Protection Assays direkt die vom betreffenden Gen transkribierte mRNA oder wie in Western Blots das entsprechende Proteinprodukt zu messen, greift man auf eine indirekte Methode zurück: durch Klonierung wird die zu untersuchende gen-regulatorische DNA-Sequenz in einem sog. Reporterplasmid mit einem nicht verwandten Reporter-Gen verknüpft. Schleust man nun das so gewonnene Plasmidkonstrukt in eine eukaryontische Zelle ein (=Transfektion, vgl. unten) und setzt die genregulatorischen Abschnitte je nach Versuchsansatz verschiedenen experimentellen Parametern aus, so stellt in diesem System die Expression des Reportergens ein indirektes Maß dar für die (positive bzw. negative regulatorische) Aktivität der zu untersuchenden regulatorischen Sequenz unter den gewählten experimentellen Bedingungen.

Bei der Auswahl eines geeigneten Reporter-Gens spielen folgende Gesichtspunkte eine Rolle: Das Reporter-Gen sollte in den in den Zellkultur-Experimenten verwendeten Zellen nicht vorkommen oder leicht von der natürlichen Form des Gens zu unterscheiden sein; die Anwesenheit des Reportergen-Produkts sollte die Zellphysiologie der verwendeten Zellen nicht beeinträchtigen; der Ansatz zur Messung des Genprodukts des Reportergens sollte über einen breiten linearen Bereich verfügen und einfach, schnell, empfindlich und preisgünstig sein. Neben z.B. dem CAT- und dem β -Gal-Reportergen erfüllen insbesondere die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Firefly bzw. Renilla Luciferase-Reportergene diese Kriterien.

Um eine höhere experimentelle Genauigkeit zu gewährleisten, empfiehlt sich die gleichzeitige Expression und Messung von zwei verschiedenen Reporter-Genen innerhalb eines Systems („dual reporter“-Technik); der sog. experimentelle Reporter korreliert mit dem Effekt der spezifischen experimentellen Bedingungen, während der kotransfizierte Kontroll-Reporter eine interne Kontrolle darstellt: bezieht man die Aktivität des experimentellen Reporters zur Normalisierung auf die des Kontroll-Reporters, so kann man durch unterschiedliche Transfektionseffizienz, Zustand der Zellen, unterschiedliche Pipettierolumina etc. verursachte Variabilität minimieren und zuverlässigere Daten erhalten. Dieses Prinzip ist in der vorliegenden Arbeit durch parallele Verwendung von Firefly- und Renilla-Luciferase Reportergenen im Rahmen eines Dual Luciferase Reporter Assay System verwirklicht.

2.2.2.2 Verwendete Plasmide

Für die Konstruktion der Test- und Referenzplasmide für das Dual-Luciferase System (vgl. 2.2.2.1) wurden die kommerziell erhältlichen Vektoren pGL3-Basic (EMBL accession no. U47295) bzw. pRL-null (EMBL accession no. AF025844) (beide: Promega) verwendet.

2 Material und Methoden

Diese verfügen über folgende gemeinsamen strukturellen Elemente:

- Das Ampicillin-Resistenz Gen **Amp^r** (pGL3-Basic: nt 3940 - 3083; pRL-null: nt 1634 - 2494): Es kodiert für eine β -Lactamase, die die Selektion erfolgreich transformierter Bakterien in Ampicillin-haltigen Medien gestattet.
- Die **multiple cloning region** (pGL3-Basic: nt 1 - 58; pRL-null: nt 1 - 78), die die Erkennungssequenzen verschiedener Restriktionsendonukleasen enthält und die Einklonierung von Fremd-DNA erlaubt.
- Den origin of replication (**ori**), der die Voraussetzung für die Replikation der Plasmidkonstrukte in den transformierten E.coli Bakterien darstellt.

Der **pGL3-Basic-Vektor**, der zur Klonierung der genregulatorischen HBV-Sequenzen verwendet wurde, enthält das für die Firefly (*Photinus pyralis*) Luciferase kodierende Gen *luc+* (nt 88 - 1737). Da dem Vektor Promoter- und Enhancer-Elemente fehlen, steht die Expression der Luciferase in transfizierten eukaryontischen Zellen nur unter der Kontrolle der in der multiple cloning region inserierten Test-DNA und erlaubt eine Analyse der von ihr ausgehenden Promoter-Aktivität.

Zusätzlich zum *luc+* Gen verfügt der Vektor über das *f1ori* (nt 4073 - 4527), das SV40 late poly(A) Signal (nt 1772 - 1993), ein Polyadenylierungssignal (nt 4658 - 4811) und Transkriptionsterminationssequenzen sowie Sequenzierprimerbindungsstellen für die Primer Rvprimer3 und Glprimer2.

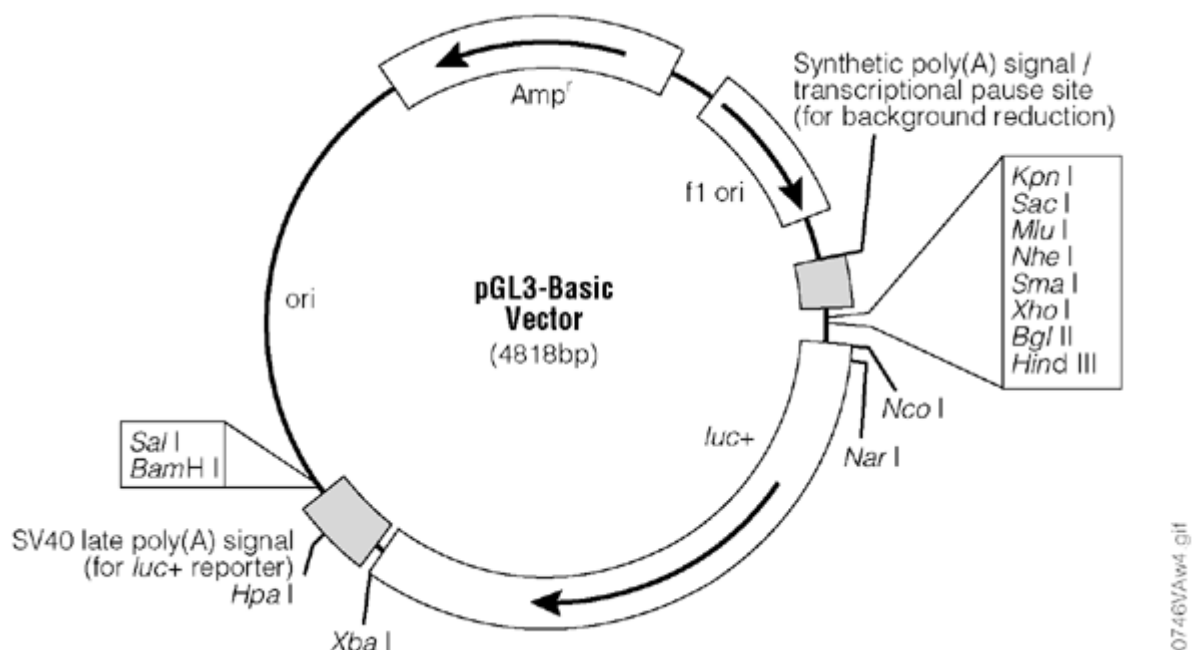


Abb. 3: Vektor-Karte des pGL3-Basic-Vektors

Der **pRL-null-Vektor**, der in der vorliegenden Arbeit für die Klonierung einer kurzen Kontroll-DNA-Sequenz verwendet wurde, enthält das für die Renilla (*Renilla renalis*) Luciferase kodierende Reporter Gen *Rluc* (nt 309 - 1244), dessen Expression analog zum *luc+* Gen im pGL3-Basic-Vektor nur unter der Kontrolle der in der MCS einklonierten Sequenz steht. Das entstehende pRL-null-Konstrukt

konnte somit durch Kotransfektion in den Transfektionsexperimenten als Referenzplasmid zur internen Kontrolle dienen.

Weitere strukturelle Elemente des pRL-null-Vektors sind das Chimeric intron (nt 101 - 237), der T7 RNA Polymerase Promoter (nt 281 - 299), die T7 RNA Polymerase Promoter Transkriptions-Initiationsstelle sowie das SV 40 late polyadenylation Signal (nt 1286 - 1487).

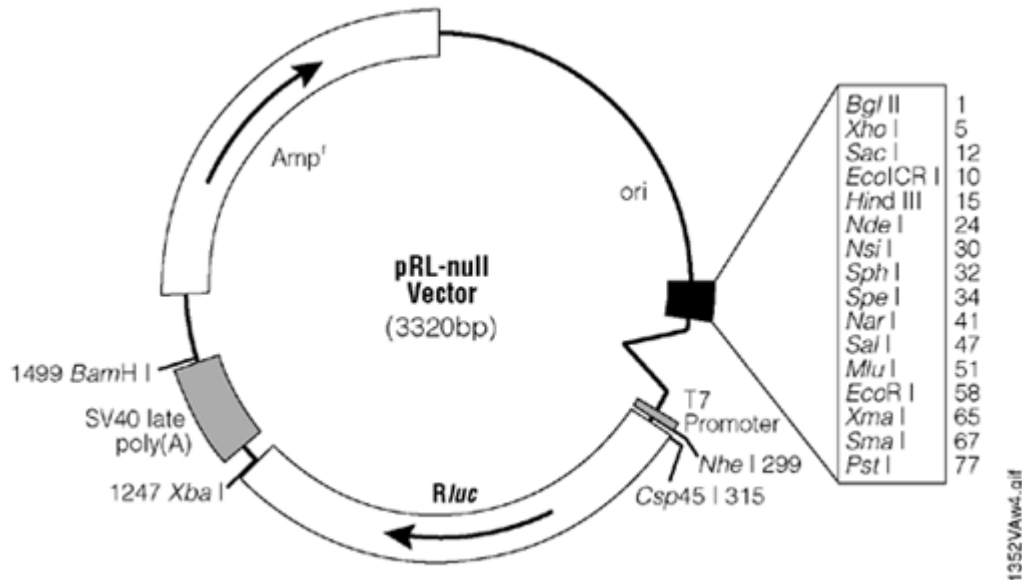


Abb. 4: Vektor-Karte des pRL-null-Vektors

2.2.3 Konstruktion der Testplasmide

2.2.3.1 Herstellung von *pGL3HBVadw6/9*

Überblick:

Ausgangspunkt für die Konstruktion des Luciferase-Reportergen-Plasmids *pGL3-HBVadw6/9* waren der pGL3 Basic Vektor (siehe 2.2.2.2), dem eukaryontische Promoter- und Enhancerelemente fehlen, und ein DNA-Fragment, das die genregulatorischen Sequenzen (nt 901 – nt 1840²) des HBV Wildtyp Genoms umfasste (siehe Abb.5, grau hinterlegte Sequenz). Als Matrize für die Amplifizierung der genregulatorischen HBV-Sequenz mittels PCR diente Klon 991 eines pBluescript SKII + Konstrukts, das ein Dimer des HBV Subtyps adw2, Genotyp A (EMBL accession no. X51970) enthielt (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Schäfer, Universität Gießen). Das phosphorylierte PCR-Produkt wurde in die dephosphorylierte SmaI Schnittstelle der Klonierungsregion des pGL3-Basic Vektors ungerichtet inkloniert, und das entstehende Konstrukt zur Transfektion von *E.coli* verwendet. Mittels „Bakterienkolonie-PCR“ konnten transformierte Bakterien, deren Plasmide eine regulatorische HBV-Sequenz enthielten, identifiziert werden. Nachdem die Plasmid-DNA solcher positiver Klone mittels Kochschnelltest isoliert worden war, wurden Klone mit korrekter Orientierung des inserierten Fragments durch Restriktionsanalyse identifiziert und durch Sequenzierung verifiziert.

² Das erste Adenosin der einmaligen EcoRI-Schnittstelle wird hier als Nukleotid 1 des HBV Genoms definiert.

2 Material und Methoden

- **Vorbereitung des pGL3 Basic Vektors für die Einklonierung des HBV-Inserts:**

Zur Vorbereitung des pGL3-Basic Vektors wurden 10µg Vektor-DNA in einem Gesamtvolumen von 200µl im optimalen Reaktionspuffer mit 100 Units Smal für 16h bei 25°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend mit Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt (siehe 2.2.1.1) und zur Entfernung der endständigen 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase CIP behandelt (siehe 2.2.1.4), so daß dephosphorylierte glatte Enden entstanden. Die Plasmid-DNA wurde durch präparative Agarosegelelektrophorese gereinigt (siehe 2.2.1.3) und spektralphotometrisch gemessen (siehe 2.2.1.1).

- **Amplifizierung des genregulatorischen HBV-Fragments mittels PCR:**

Für die Amplifizierung des genregulatorischen HBV-Fragmentes mittels PCR (siehe 2.2.1.2) wurde mit der Pwo-DNA-Polymerase gearbeitet. Mit Hilfe des Programms „Oligo5“ wurden die Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer (siehe Tabelle 6) dabei so ausgewählt, daß die genregulatorische HBV-Sequenz mit Enhancer I und dem Enhancer II / core / pregenomic-Promoter Komplex mit Erhalt des ORF des HBV-X-Proteins amplifiziert wurde.

Tabelle 6: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer

Sense-primer:
5' CAGCTTAAGGGGAAGTTTGCCACAGGATCA-3'
Antisense-primer:
5' TTAGGCAGAGGTGAAAAAGTTGCATGGTGCTGGT-3'

Für einen PCR-Ansatz eines Volumens von 100 µl wurden die einzelnen Reaktionsbestandteile in den aus Tabelle 7 ersichtlichen Konzentrationen zusammenpipettiert, und die PCR in einem Eppendorf Thermocycler mit dem in Tabelle 8 beschriebenen Temperaturprofil durchgeführt. Um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen und einen Abbau von Primern durch die 3'->5'-Exonukleaseaktivität der Pwo-DNA-Polymerase zu verhindern, wurde die PCR mit der „hot start“-Technik begonnen, d.h. Zugabe der Pwo-DNA-Polymerase erfolgte erst nach Erhitzung des Reaktionsansatzes auf Denaturierungstemperatur. Zur Vorbeugung von Flüssigkeitsverlusten wurden die Reaktionsansätze mit Mineralöl überschichtet.

Tabelle 7: Bestandteile des PCR-Ansatzes (Volumen: 100µl)

Matrizen-DNA	0,5µg/100µl
Pwo PCR Puffer mit Mg ₂ SO ₄	1x
dNTP-Mix	0,2mM je dNTP
5'-Primer	0,8µM
3'-Primer	0,8µM
Pwo DNA Polymerase	2,5 Units/100µl
A.d.	Ad 100µl

Tabelle 8: Temperaturprofil der PCR

Zyklus	Denaturierung	Annealing	Extension
	94°C, 3min		
1-28	94°C, 30sec	62°C, 30sec	72°C, 1min
	94°C, 30sec	62°C, 30sec	72°C, 5min

10 µl des PCR-Produktes wurden anschließend im 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.2.1.3), bei positivem PCR-Produkt (Bande bei ca. 0,95 kb) wurde das restliche PCR-Produkt durch Phenolisierung gereinigt (siehe 2.2.1.1). Die Phosphorylierung der 5'-Hydroxylenden des PCR-Produktes wurde mittels T4-Polynukleotid-Kinase in einem Gesamtvolumen von 100µl durchgeführt (siehe 2.2.1.4).

Zur Isolierung und Reinigung des phosphorylierten PCR-Produktes wurde eine präparative Agarosegelelektrophorese mit Gelelution durchgeführt (siehe 2.2.1.3), die DNA-Konzentration photometrisch gemessen (siehe 2.2.1.1) und ein Aliquot in die folgende Ligations-Reaktion eingesetzt.

- **Einklonierung des HBV-Fragments in pGL3 und Transformation von E.coli SURE 2:**

Für die kovalente Verknüpfung des 5'-phosphorylierten HBV-PCR-Fragments mit dem dephosphorylierten linearisierten pGL3-Luciferase-Vektor wurden 100ng Vektor-DNA und 60ng Insert-DNA (entspricht einem molaren Verhältnis von 1:3) in einem Gesamtvolumen von 20µl mit T4-DNA-Ligase ligiert (siehe 2.2.1.4) und 5 µl des Ansatzes für die Transformation von E.coli SURE 2 eingesetzt (siehe 2.2.1.6).

- **Charakterisierung der Transformanten:**

- „**Bakterienkolonie-PCR**“: Bei Durchführung dieser PCR (siehe 2.2.1.2) mit den kommerziell erhältlichen pGL3-Sequenzierprimern Rvprimer3 und Glprimer2 (Promega) und Analyse der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese ergab sich für pGL3-Religanten ohne Insert ein PCR-Produkt von 0,17kb und für pGL3-Vektoren mit HBV-Insert ein PCR-Produkt von ca. 1,11 kb. Die Plasmid-DNA aus Klonen mit dem gesuchten HBV-Fragment wurde mittels Kochschnelltest für die weitere Charakterisierung isoliert (siehe 2.2.1.7.1).

- **Restriktionsanalyse zur Identifizierung richtig orientierter inserierter DNA-Fragmente:** Plasmide mit einkloniertem HBV-Fragment wurden durch Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen Bsu36I (Schnittstelle entsteht bei korrekter Ligation des 3'-Endes des HBV-Fragments mit einem Ende des SmaI geschnittenen pGL3-Vektors) und MluI (Schnittstelle liegt in der pGL3-Klonierungsregion auf der 5'-Seite des Inserts) und mit anschließender Gelelektrophorese analysiert (siehe 2.2.1.4 und 2.2.1.3). Bei korrekter Orientierung entstanden DNA-Fragmente in den erwarteten Größen von 4,8kb und 0,95 kb, bei umgekehrter Orientierung von ca. 5,7 kb und ein auf dem Agarosegel nicht mehr erkennbares Fragment von 13 bp.

- **Sequenzierung einiger ausgewählter Plasmide:** Nach Aufreinigung von Plasmide mit korrekter Orientierung mittels Plasmid-Minipräparation (siehe 2.2.1.7.2) wurden die genauen DNA-Sequenzen von der Firma GATC bestimmt und die ermittelten Sequenzen der inserierten HBV-

2 Material und Methoden

DNA mit Hilfe des Programms BLASTn auf Sequenzidentität mit der EMBL Datenbank Sequenz X51970 überprüft (siehe 2.2.1.5).

- **Plasmidisolierung:**

Nach Auswahl eines geeigneten Plasmids (*pGL3HBVadw6/9*, Sequenz siehe Abbildung 5) für Transfektionsexperimente wurde der entsprechende Bakterienklon in präparativem Maßstab angezogen, die Plasmid-DNA mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit isoliert (siehe 2.2.1.7.2), spektralphotometrisch gemessen (siehe 2.2.1.1) und bei 4°C gelagert. Zur Überprüfung der Plasmid-DNA-Qualität wurde diese im Agarosegel kontrolliert (siehe 2.2.1.3).

```
1 GGTACCGAGC TCTTACGCGT GCTAGCCCCA GCTTAAAGGGG AACTTTGCCA CAGGATCATA
61 TTGTACAAAA AATCAAACAC TGTTTTAGAA AACTTCCTGT TAACAGGCCT ATTGATTGGA
121 AAGTATGTCA AAGAAATGTG GGTCTTTTGG GCTTTTGTGC TCCTTTTACA CAATGTGGAT
181 ATCCTGCCTT AATGCCCTTG TATGCATGTA TACAAGCTAA ACAGGCTTTC ACTTCTCGC
241 CAACCTTACAA GGCCCTTCTA AGTAAACAGT ACATGAACCT TTACCCCGTT GCTCGGCAAC
301 GGCTTGGTCT GTGCCAAGTA TTTGCTGATG CAACCCCCAC TGGCTGGGGC TTGGCCATAG
361 GCCATCAGCG CATGCGCGGA ACCTTTGTGG CTCCTCTGCC GATCCATACT GCGGAACCTC
421 TAGCCGCTTG TTTTGTCTCG AGCCGGTCTG GAGCGAACT CATCGGAAC GACAATCTG
481 TCGTCCTCTC GCGGAAATAT ACCTCGTTTC CATGGCTACT AGGCTGTGCT GCCAACTGGA
541 TCCTTCGCGG GACGTCCTTT GTTTACGTCC CGTCGGCGCT GAATCCCGCG GACGACCCCT
601 CTCGGGGCCG CTTGGGACTC TCTCGTCCCC TTCTCCGTCT GCCGTTCAG CCGACCACGG
661 GGCGCACTC TCTTTACGCG GTCTCCCCGT CTGTGCCTTC TCATCTGCCG TTCCTGTGTC
721 ACTTCGCTTC ACCTCTGCAC GTTGCATGGA GACCACCGTG AACGCCCATC AGATCCTGCC
781 CAAGGTCTTA CATAAGAGGA CTCTTGGACT CCCAGCAATG TCAACGACCG ACCTTGAGGC
841 CTACTTCAAA GACTGTGTGT TTAAGGACTG GGAGGAGCTG GGGGAGGAGA TTAGGTAAAA
901 GGTCTTTGTA TTAGGAGGCT GTAGGCATAA ATTGGTCTGC GCACCAGCAC CATGCAACTT
961 TTTCACTCTC GCCTAAAGGG TCGAGATCTG CGATCTAAGT AAGCTTGGCA TTCCGGTACT
1021 GTTGGTAAAG CCACCATGGA AGACGCCAAA AACATAAAGA AAGGCCCGGC GCCATTCTAT
1081 CCGCTGGAAG ATGGAACCCG TGGAGAGCAA CTGCATAAGG CTATGAAGAG ATACGCCCTG
1141 GTTCTGGAA CAATTGCTTT TACAGATGCA CATATCGAGG TGGACATCAC TTACGCTGAG
1201 TACTTCGAAA TGTCCGTTCG GTTGGCAGAA GCTATGAAAC GATATGGGCT GAATACAAAT
1261 CACAGAATCG TCGTATGCAG TGAAAACCTCT CTTCAATTCT TTATGCCGGT GTTGGGCGCG
1321 TTATTTATCG GAGTTGCAGT TGCGCCCGCG AACGCATTTT ATAATGAACG TGAATTGCTC
1381 AACAGTATGG GCATTTTCGA GCCTACCGTG GTGTTCTGTT CCAAAAAGGG GTTGCAAAAA
1441 ATTTTGAACG TGCAAAAAAT ATCCCAATC ATCCAAAAAT TATATATCAT GATTCTAAA
1501 ACGGATTACC AGGGATTTCA GTCGATGTAC ACGTTCGTCA CATCTCATCT ACCTCCCGGT
1561 TTTAATGAAT ACGATTTTGT GCCAGAGTCC TTCGATAGGG ACAAGACAAT TGCACTGATC
1621 ATGAACTCCT CTGGATCTAC TGGTCTGCCT AAAGGTGTGC CTCTGCCTCA TAGAAGTCC
1681 TGCGTGAAG TCTCGCATGC CAGAGATCCT ATTTTGGCA ATCAAATCAT TCCGATCACT
1741 GCGATTTTAA GTGTTGTTCC ATTCCATCAC GGTTTTGGAA TGTTTACTAC ACTCGGATAT
1801 TTGATATGTG GATTTTCGAGT CGTCTTAATG TATAGATTTG AAGAAGAGCT GTTCTGAGG
1861 AGCCTTCAGG ATTACAAGAT TCAAAGTGCG CTGCTGGTGC CAACCCTATT CTCCTTCTTC
1921 GCCAAAAGCA CTCTGATTGA CAAATACGAT TTATCTAATT TACACGAAAT TCGTCTGTT
1981 GGCGCTCCCC TCTCTAAGGA AGTCGGGGAA GCGGTTGCCA AGAGGTTCCA TCTGCCAGGT
2041 ATCAGGCAAG GATATGGGCT CACTGAGACT ACATCAGCTA TTCTGATTAC ACCCGAGGGG
2101 GATGATAAAC CGGGCGCGGT CGGTAAGTGT GTTCCATTTT TTGAAGCGAA GGTGTGTTGAT
2161 CTGGATACCG GGAAAAACGCT GGGCGTTAAT CAAAAGAGCG AACCTGTGTG TCAAGGCTCT
2221 ATGATTATGT CCGGTTATGT AAACAATCCG GAAGCGACCA ACGCCTTGAT TGACAAGGAT
2281 GGATGGCTAC ATTCTGGAGA CATAGCTTAC TGGGACGAAG ACGAACACTT CTTTATCGTT
2341 GACCGCTGTA AGTCTCTGAT TAAGTACAAA GGCTATCAGG TGGCTCCCGC TGAATTGGAA
2401 TCCATCTTGC TCCAACACCC CAACATCTTC GACGAGGTG TCCGAGGTCT TCCCGACGAT
2461 GACGCCGGTG AACTTCCCGC CGCCGTTGTT GTTTTGGAGC ACGGAAAGAC GATGACGGAA
2521 AAAGAGATCG TGGATTACGT CGCCAGTCAA GTAACAACCG CGAAAAAGTT GCGCGGAGGA
2581 GTTGTGTTTG TGGACGAAGT ACCGAAAGGT CTTACCGGAA AACTCGACGC AAGAAAAATC
2641 AGAGAGATCC TCATAAAGGC CAAGAAGGGC GGAAAGATCG CCGTGTAAAT CTAGAGTCCG
2701 GGCGGCCCGC CGCTTCGAGC AGACATGATA AGATACATTG ATGAGTTTGG ACAAAACCACA
2761 ACTAGAATGC AGTGAAAAAA ATGCTTTATT TGTGAAATTT GTGATGCTAT TGCTTTATTT
2821 GTAACCATTA TAAGTGCATA TAAACAAGTT AACAACAACA ATTGCATTCA TTTTATGTTT
2881 CAGGTTTCAG GGGAGTGTG GAGGTTTFTT TAAAGCAAGT AAAACCTCTA CAAATGTGTT
2941 AAAATCGATA AGGATCCGTC GACCGATGCC CTTGAGAGCC TTCAACCCAG TCAGCTCCTT
3001 CCGGTGGGCG CGGGGCATGA CTATCGTFCG CGCACTTATG ACTGTCTTCT TTATCATGGA
3061 ACTCGTAGGA CAGGTGCCGG CAGCGCTCTT CCGCTTCCTC GCTCACTGAC TCGCTGCGCT
3121 CGGTCTGTTG GCTGCGGCGA GCGGTATCAG CTCACTCAAA GGCGGTAATA CCGTTATCCA
3181 CAGAATCAGG GGATAACGCA GGAAAGAACA TGTGAGCAAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA
3241 ACCGTAAGAA GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCTT GACGAGCATC
3301 ACAAAAATCG ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA AGTATACCAGG
3361 CGTTCTCCCC TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT CTCCTGTTCC GACCCTGCGC CTTACCGGAT
3421 ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG TGGCGTTTTT TCAATGCTCA CGCTGTAGGT
3481 ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC GTTCTGCTCA AGCTGGGCTG TGTGACGAAA CCCCCGTTT
```

```

3541 AGCCCGACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT ATCGTCTTGA GTCCAACCCG GTAAGACACG
3601 ACTTATCGCC ACTGGCAGCA GCCACTGGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGGCG
3661 GTGCTACAGA GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA ACTACGGCTA CACTAGAAGG ACAGTATTTG
3721 GTATCTGCGC TCTGCTGAAG CCAAGTTACCT TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC TCTTGATCCG
3781 GCAAAACAAAC CACCGCTGGT AGCGGTGGTT TTTTTGTTTTG CAAGCAGCAG ATTACGCGCA
3841 GAAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTTGA TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGGA
3901 ACGAAAACTC ACGTTAAGGG ATTTTGGTCA TGAGATTATC AAAAAAGGATC TTCACCTAGA
3961 TCCTTTTAAA TTAAAAATGA AGTTTTAAAT CAATCTAAAG TATATATGAG TAAACTTGGT
4021 CTGACAGTTA CCAATGCTTA ATCAGTGAGG CACCTATCTC AGCGATCTGT CTATTTCCGT
4081 CATCCATAGT TGCCTGACTC CCCGTCGTGT AGATAACTAC GATACGGGAG GGCTTACCAT
4141 CTGGCCCCAG TGCTGCAATG ATACCGCGAG ACCCACGCTC ACCGGCTCCA GATTTATCAG
4201 CAATAAACCA GCCAGCCGGA AGGGCCGAGC GCAGAAAGTG TCCTGCAACT TTATCCGCT
4261 CCATCCAGTC TATTAATTTG TGCCGGGAAG CTAGAGTAAG TAGTTCGCCA GTTAAATAGTT
4321 TGCGCAACGT TGTTGCCATT GCTACAGGCA TCGTGGTGTG ACGCTCGTGC TTTGGTATGG
4381 CTTCAATCAG CTCCGTTCC CAACGATCAA GGCGAGTTAC ATGATCCCCC ATGTTGTGCA
4441 AAAAAAGCGG TAGCTCCTTC GGTCTCCGA TCGTTGTGAG AAGTAAGTTG GCCGCAGTGT
4501 TATCACTCAT GGTTATGGCA GCACCTGCATA ATTCTCTTAC TGTCATGCCA TCCGTAAGAT
4561 GCTTTTCTGT GACTGGTGAG TACTCAACCA AGTCATTCTG AGAATAGTGT ATGCGCGCAC
4621 CGAGTTGCTC TTGCCCGCGG TCAATACGGG ATAATACCGC GCCACATAGC AGAACTTTAA
4681 AAGTGCTCAT CATTGGAAAA CGTTCTTCGG GGCGAAAACT CTCAAGGATC TTACCCTGT
4741 TGAGATCCAG TTCGATGTAA CCCACTCGTG CACCCAAC TGCTTCAGCA TCTTTACTT
4801 TCACCAGCGT TTCTGGGTGA GCAAAAAACAG GAAGGCAAAA TGCCGCAAAA AAGGGAATAA
4861 GGGCGACACG GAAATGTTGA ATACTCATA TCTTCCTTTT TCAATATTAT TGAAGCATT
4921 ATCAGGGTTA TTGTCTCATG AGCGGATACA TATTTGAATG TATTTAGAAA AATAAACAAA
4981 TAGGGGTTC GCGCACATTT CCCCGAAAAG TGCCACCTGA CGCGCCCTGT AGCGGCGCAT
5041 TAAGCGCGGC GGGTGTGGTG GTTACGCGCA GCGTGACCGC TACACTTGCC AGCGCCCTAG
5101 CGCCCGCTC TTTCGCTTTC TTCCCTTCTC TTCTCGCCAC GTTCGCCGCG TTTCCCGCTC
5161 AAGCTCTAAA TCGGGGGCTC CCTTTAGGGT TCCGATTTAG TGCTTTACGG CACCTCGACC
5221 CCAAAAAACT TGATTAGGGT GATGGTTCAC GTAGTGGGCC ATCGCCCTGA TAGACGGTTT
5281 TTCGCCCTTT GACGTTGGAG TCCACGTTCT TTAATAGTGG ACTCTGTGTC CAACTGGAA
5341 CAACACTCAA CCCTATCTCG GTCTATCTTT TTGATTTATA AGGGATTTTG CCGATTTCCG
5401 CCTATTGGTT AAAAAATGAG CTGATTTAAC AAAAAATTTA CGCGAATTTT AACAAAAAT
5461 TAACGTTTAC AATTTCCTAT TCGCCATTCA GGCTGCGCAA CTGTGGGAA GGGCGATCGG
5521 TGCGGGCCTC TTCGCTATTA CGCCAGCCCA AGCTACCATG ATAAGTAAGT AATATTAAGG
5581 TACGGGAGGT ACTTGGAGCG GCCCAATAA AATATCTTA TTTTCATTAC ATCTGTGTGT
5641 TGGTTTTTTG TGTGAATCGA TAGTACTAAC ATACGCTCTC CATCAAAACA AAACGAAACA
5701 AAACAAACTA GCAAAATAGG CTGTCCCAG TGCAAGTGCA GGTGCCAGAA CATTCTCTA
5761 TCGATA

```

Abb. 5: Sequenz des Plasmids *pGL3-HBV_{adv6/9}*; der grau hinterlegte Teil entspricht dem HBV-DNA-Insert (nt 901 –1840).

2.2.3.2 Herstellung der *pGL3HBV_{adv6/9}*-Deletionsmutanten

Durch 5'-Deletionen des HBV-DNA-Inserts im *pGL3HBV_{adv6/9}*-Plasmid wurden die Reporter-Plasmide *pHBV-EcoRV*, *pHBV-Nsil*, *pHBV-PfIMI*, *pHBV-AatII*, *pHBV-SacI*, *pHBV-RsrII* und *pHBV-StuI* erzeugt.

10µg *pGL3HBV_{adv6/9}* DNA wurden mit AfIII, das im *pGL3HBV_{adv6/9}*-Plasmid an Position 33 auf der 5'-Seite des HBV-Inserts schneidet, 24h bei 37°C verdaut (siehe 2.2.1.4) und durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt (siehe 2.2.1.1). Je 1/7 der linearisierten DNA wurden mit EcoRV, Nsil, PfIMI, AatII, SacI, RsrII bzw. StuI verdaut (Die Schnittstellen dieser Restriktionsendonukleasen in der genomischen HBV-DNA X51970 bzw. im *pGL3HBV_{adv6/9}* Plasmid sowie die Größen der Spaltprodukte sind Tabelle 9 zu entnehmen). Jeder Restriktionsansatz wurde im präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.2.1.3), und das größere DNA-Fragment mit dem pGL3-Vektor Anteil durch Gelelution zurückgewonnen. Bei je 0,5µg der entsprechenden DNA-Fragmente wurden durch T4-DNA-Polymerase-Behandlung glatte DNA-Enden erzeugt (siehe 2.2.1.4), die nach Reinigung durch Phenolisierung und Ethanol-fällung (siehe 2.2.1.1) durch T4-DNA-Ligase in je 50µl Gesamtvolumen religiert wurden (siehe 2.2.1.4). Je 5µl der Ligationsansätze wurden jeweils zur Transformation von E.coli SURE 2 eingesetzt (siehe 2.2.1.6).

2 Material und Methoden

Charakterisierung der Plasmide mittels Restriktionsanalyse

Nach Isolierung der verschiedenen Deletionsplasmide im Kochschnelltest (siehe 2.2.1.7.1) wurden diese mit den Restriktionsendonukleasen MluI und XhoI, die auf der 5'- bzw. 3'-Seite der HBV-DNA schneiden, verdaut (siehe 2.2.1.4), um anschließend im analytischen Agarosegel die Deletionen des HBV-Fragments zu bestätigen (siehe 2.2.1.3). Die Fragmentgrößen der deletierten HBV-Fragmente sind in Tabelle 9 angegeben.

Plasmidisolierung

Bakterienklone mit den einzelnen Deletionsmutanten wurden in präparativem Maßstab angezogen, die Plasmid-DNA wurde mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit isoliert (siehe 2.2.1.7.2), spektralphotometrisch gemessen (siehe 2.2.1.1) und für nachfolgende Transfektionsexperimente bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 9: Überblick über die pGL3HBVadw6/9-Deletionsmutanten

Plasmid	Schnittstelle im HBV-Genom	Schnittstelle im Ausgangs- Plasmid	Spaltprodukte des pGL3HBVadw6/9	Größe des deletierten HBV-Inserts	HBV-DNA-Bereich der Deletionsmutanten
pHBV-EcoRV	1045	181	5622, 144	796	1045-1840
pHBV-NsiI	1071	207	5596, 170	770	1071-1840
pHBV-PflMI	1208	344	5459, 307	633	1208-1840
pHBV-AatII	1420	556	5247, 519	421	1420-1840
pHBV-SacI	1454	590	5213, 553	387	1454-1840
pHBV-RsrII	1575	711	5092, 674	266	1575-1840
pHBV-StuI	972, 1117, 1704	108, 253, 840	4963, 587, 145, 71	137	1704-1840

2.2.3.3 Herstellung der NcoI-Mutante

Bei der NcoI-Deletionsmutante des Plasmids *pGL3HBVadw6/9* wurde das ATG-Translations-Startcodon des HBV-X-Protein ORF, das Teil der Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease NcoI (C[↑]CATGG, Schnittstelle an Position 511 der *pGL3HBVadw6/9* DNA-Sequenz bzw. Position 1375 im HBV-Genom der EMBL Datenbank Sequenz X51970) ist, deletiert. Die Entfernung des Startcodons wurde durch Inkubation der NcoI geschnittenen Plasmid-DNA mit der DNA-Einzelstrang-spezifischen endonukleolytisch wirkenden Mung Bean Nuklease erreicht. Da im Plasmid *pGL3HBVadw6/9* die NcoI-Erkennungssequenz zweimal vorkommt (Schnittstelle neben Position 511 auch an Position 1035), mußten die HBV-DNA-Fragmente gerichtet in einen neuen pGL3-Basic-Vektor umkloniert werden.

Vorbereitung des pGL3-Basic-Vektors für die Einklonierung der HBV-DNA-Fragmente

10µg der pGL3-Basic DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 100µl mit je 50 Units der Restriktionsendonukleasen Asp718I und HindIII (Roche), die in der pGL3-Basic-Klonierungsregion an den Positionen 2 und 54 schneiden, für 24h bei 37°C verdaut (siehe 2.2.1.4). Das größere (4766 bp große) DNA-Fragment wurde durch präparative Agarosegelelektrophorese von dem kleineren (52bp) großen DNA-Fragment getrennt (siehe 2.2.1.3), und die Konzentration spektralphotometrisch gemessen (siehe 2.2.1.1).

Deletion der NcoI-Schnittstelle und Subklonierung der pGL3-HBVadw6/9-NcoI-Fragmente

20µg der *pGL3HBVadw6/9* Plasmid-DNA wurden mit der Restriktionsendonuklease NcoI für 24h bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 200µl verdaut (siehe 2.2.1.4). Nach Zugabe von ZnSO₄ (1mM Endkonzentration) wurden 20 Units Mung Bean Nuklease zugegeben, und das Reaktionsgemisch für 30min bei 30°C inkubiert, um 5'-überhängende zu glatten DNA-Enden abzubauen und dadurch eine Deletion im Bereich der (ehemaligen) NcoI-Schnittstelle zu erzielen (siehe 2.2.1.4). Nach Entfernung des Enzyms durch Phenolextraktion (siehe 2.2.1.1) wurde ein weiterer Restriktionsverdau mit je 75 Units der Restriktionsendonukleasen Asp718I und HindIII (Roche) in einem Gesamtvolumen von 150µl für 24h bei 37°C durchgeführt. Diese Restriktionsenzyme schnitten in der pGL3HBVadw6/9 Klonierungsregion auf der 5'- bzw. der 3'-Seite des HBV-DNA-Inserts (5': Asp718I -> Position 2; 3': HindIII -> Position 1002, d.h. noch vor der zweiten NcoI-Schnittstelle an Position 1035) und produzierten kohäsive DNA-Überhänge, die für die gerichtete Einklonierung in den ebenfalls mit Asp718I und HindIII vorverdauten pGL3-Basic (siehe oben) erforderlich waren. Hierdurch entstanden zwei 509bp und 487bp große Fragmente mit HBV-DNA-Anteilen sowie die zwei 33bp und 4729bp großen Vektor-DNA-Fragmente. Nach gemeinsamer Isolierung der 509bp und 487bp großen Fragmente mit HBV-DNA durch präparative Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1.3) wurden in einem 20µl Gesamtansatz 20ng dieser beiden Fragmente in einem äquimolaren Verhältnis mit 100ng des 4766 bp großen pGL3 DNA-Fragments mittels T4-DNA-Ligase verknüpft (siehe 2.2.1.4). 5µl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation von E.coli SURE2 eingesetzt (siehe 2.2.1.6).

2 Material und Methoden

Charakterisierung der Transformanten mittels Bakterienkolonie-PCR

Zur Bestimmung der Größe der inserierten DNA wurde eine PCR mit den kommerziell erhältlichen pGL3-Sequenzierprimern Rvprimer3 und Glprimer2 (Promega) durchgeführt (siehe 2.2.1.2). Die Analyse der PCR-Produkte ergab für Plasmide mit korrekt einklonierten DNA-Fragmenten eine Länge des PCR-Produkts von 1,11kb.

Restriktionsanalyse

Nach Isolierung der Plasmide mit korrekter Größe der inserierten DNA-Fragmente mittels Kochschnelltest (siehe 2.2.1.7.1) wurden die Ligationsstellen durch Restriktionsanalyse mit den Endonukleasen Asp718I und HindIII überprüft (siehe 2.2.1.4), dabei zeigten sich bei Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1.3) DNA-Banden bei 4,8kb und 1,0kb. Um die Deletion des ATG-Startkodons mit der NcoI Schnittstelle zu verifizieren, wurde ein NcoI Restriktionsverdau durchgeführt. Dabei entstand nach erfolgreicher Deletion der NcoI Erkennungsstelle bei Position 511 nur noch ein linearisiertes DNA Fragment mit einer Größe von ca. 5,8kb.

Sequenzierung einiger ausgewählter Plasmide

Nach Aufreinigung einiger Plasmidminipräparationen (siehe 2.2.1.7) wurden die DNA-Sequenzen von der Firma GATC bestimmt und mit Hilfe des Programms BLASTn mit der EMBL Datenbank Sequenz X51970 verglichen (siehe 2.2.1.5).

Plasmidisolierung

Das Plasmid *pGL3HBVadw6/9-Nco/3* zeigte an der ehemaligen NcoI Erkennungsstelle eine 3bp-Deletion der HBV-adw Nukleotide 1376, 1377, 1378 (CC---G); die DNA-Sequenz seines HBV-Inserts ist in Abbildung 6 dargestellt. Der entsprechende Bakterienklon wurde in präparativem Maßstab angezogen, und die Plasmid-DNA mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit für nachfolgende Transfektionsexperimente isoliert (siehe 2.2.1.7.2).

```
GGGGAAC TTT GCCACAGGAT CATATTGTAC AAAAAATCAA ACACTGTTTT AGAAAACTTC
CTGTTAACAG GCCTATTGAT TGGAAAGTAT GTCAAAGAAT TGTGGGTCTT TTGGGCTTTG
CTGCTCCTTT TACACAATGT GGATATCCTG CCTTAATGCC CTTGTATGCA TGTATACAAG
CTAAACAGGC TTTCAC TTTC TCGCCAACTT ACAAGGCCTT TCTAAGTAAA CAGTACATGA
ACCTTTACCC CGTTGCTCGG CAACGGCCTG GTCTGTGCCA AGTATTTGCT GATGCAACCC
CCACTGGCTG GGGCTTGGCC ATAGGCCATC AGCGCATGCG CGGAACCTTT GTGGCTCCTC
TGCCGATCCA TACTGCGGAA CTCCTAGCCG CTTGTTTTGC TCGCAGCCGG TCTGGAGCGA
AACTCATCGG AACTGACAAT TCTGTGCTCC TCTCGCGGAA ATATACCTCG TTTCC---GC
TGCTAGGCTG TGCTGCCAAC TGGATCCTTC GCGGGACGTC CTTTGT TTAC GTCCCGTCCG
CGCTGAATCC CGCGGACGAC CCCTCTCGGG GCCGCTTGGG ACTCTCTCGT CCCCTTCTCC
GTCTGCCGTT CCAGCCGACC ACGGGGCGCA CCTCTCTTTA CGCGGTCTCC CCGTCTGTGC
CTTCTCATCT GCCGGTCCGT GTGCACTTCG CTTACCTCT GCACGTTGCA TGGAGACCAC
CGTGAACGCC CATCAGATCC TGCCCAAGGT CTTACATAAG AGGACTCTTG GACTCCCAGC
AATGTCAACG ACCGACCTTG AGGCCTACTT CAAAGACTGT GTGTTTAAGG ACTGGGAGGA
GCTGGGGGAG GAGATTAGGT TAAAGGTCTT TGTATTAGGA GGCTGTAGGC ATAAATTGGT
CTGCGCACCA GCACCATGCA ACTTTTTTCAC CTCTGCCTAA
```

Abb. 6: DNA-Sequenz des HBV-DNA-Fragments des Plasmids *pGL3HBVadw6/9-Nco/3*; die ehemalige NcoI-Erkennungsstelle ist grau hinterlegt angegeben, --- markiert die deletierten Nukleotide (ATG).

2.2.4 Konstruktion des Referenzplasmids *pRLE7*

Das Referenzplasmid *pRLE7* enthält in der *Sma*I-Schnittstelle des Vektors pRL-null (Promega) ein 13 bp großes DNA-Fragment (identisch mit nt 1793 – nt 1805 des HBV-Genoms mit der EMBL Datenbank Sequenz X51970). Für die Konstruktion von *pRLE7* wurde das HBV-DNA-PCR-Produkt (siehe 2.2.3.1) mit den Restriktionsenzymen *Stu*I und *Fsp*I verdaut (Schnittstellen im HBV-Genom: nt 1704 und nt 1805) und das entstandene 101bp große *Stu*I-*Fsp*I Restriktionsfragment in den dephosphorylierten mit *Sma*I geschnittenen pRL-null Vektor ungerichtet inkloniert. Nach Auswahl eines Plasmid mit korrekt orientiertem Insert mittels Bakterienkolonie-PCR wurde das inserierte HBV-Fragment mittels Exonuklease III- und Mung Bean Nuklease-Behandlung unidirektional deletiert und durch T4-DNA-Ligase religiert. Die Identifizierung eines Plasmids, das nur noch einen minimalen HBV Core-Promoter enthielt, erfolgte mittels Bakterienkolonie-PCR und DNA-Sequenzierung. Eine ausreichend hohe Promoteraktivität des gewählten Plasmids wurde in späteren Transfektionsexperimenten verifiziert.

Vorbereitung des pRL-null Vektors:

Dephosphorylierte glatte DNA-Enden wurden durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *Sma*I und Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase CIP erzeugt (siehe 2.2.1.4).

10µg Vektor-DNA wurden in 200µl 1x Reaktionspuffer mit 100 Units *Sma*I 16h bei 25°C inkubiert (Schnittstelle im pRL-null Vektor bei Position 68). Der Ansatz wurde mittels Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt (siehe 2.2.1.1) und zur Entfernung der endständigen 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase behandelt (siehe 2.2.1.4). Die Plasmid-DNA wurde durch präparative Agarosegelelektrophorese gereinigt (siehe 2.2.1.3), und die DNA-Konzentration spektralphotometrisch gemessen (siehe 2.2.1.1).

Inklonieren des *Stu*I-*Fsp*I DNA-Fragments des HBV-DNA PCR-Produkts:

200 µl des HBV-DNA PCR-Produkts wurden im *Stu*I – *Fsp*I Doppelverdau in drei Fragmente gespalten (siehe 2.2.1.4). Das kleinste, 101 bp große *Stu*I-*Fsp*I Restriktionsfragment wurde mittels präparativer Agarosegelelektrophorese und Gelelution gereinigt (siehe 2.2.1.3), und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 2.2.1.1). In einem molaren Verhältnis von 1:1 wurden 3ng dieses DNA-Fragments mit 100ng des dephosphorylierten pRL-null-Vektors in einem Gesamtvolumen von 20µl ligiert (siehe 2.2.1.4), und 5µl des Ligationsansatzes zur Transformation von *E. coli* SURE2 verwendet (siehe 2.2.1.6).

Charakterisierung der Transformanten mittels Bakterienkolonie-PCR:

Zur Ermittlung der Größe und Orientierung des inserierten DNA-Fragments wurde eine PCR (siehe 2.2.1.2) mit einem vektor-spezifischen 5'-Primer UP-PRL03160 (entspricht nt 3160 – nt 3180 von pRL-null, siehe Tabelle 10) und dem 3'-Gegenstrangprimer LP-FSP PRL (siehe Tabelle 10), der an die letzten 12 Nukleotide des *Stu*I-*Fsp*I-DNA-Fragments und an 8 Nukleotide des pRL-null Vektors (nt 68-75) bindet, durchgeführt. Bei Analyse der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese (siehe

2 Material und Methoden

2.2.1.3) zeigten sich nur bei pRL-null Vektoren mit richtig orientiertem StuI-FspI-Fragment DNA-Banden bei 337bp, bei Religanten und Vektoren mit falsch orientiertem DNA-Fragment entstand kein PCR-Produkt. Die Plasmid-DNA eines positiven Bakterienklons wurde mittels Kochschnelltest (siehe 2.2.1.7.1) isoliert und im Anschluß weiter deletiert.

Tabelle 10: Für die Charakterisierung der Transformanten verwendete Primer

Sense-Primer: UP-PRL03160
5'-CGCCTGGTATCTTTATAGTCC-3'
Antisense-Primer: LP-FSPRL
5'- CAGTACCC CGCAGACCAATT-3'

Die fett dargestellten und unterstrichenen Nukleotide des Antisense-Primers entsprechen den Nukleotiden 68-75 des pRL-Null-Vektors. Die grau hinterlegten Nukleotide des Antisense-Primers entsprechen den letzten 12 Nukleotiden des StuI-FspI-DNA-Fragments.

Herstellung von Deletionen durch Exonuklease III-, Mung Bean Nuklease- und T4-DNA-Ligase-Behandlung:

10µg der isolierten Plasmid-DNA wurden mit den Restriktionsendonukleasen NsiI (Schnittstelle im pRL-Null an Position 31) und EcoRI (Schnittstelle in pRL-Null an Position 59) linearisiert, so daß ein 3'- bzw. ein 5'-Überhang entstand. Nach Phenolextraktion, Ethanol fällung und Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.1.1) wurden 5µg Plasmid-DNA mit 25 Units Exonuklease III bei Raumtemperatur inkubiert, und Aliquots davon in 2 sec Intervallen inaktiviert. Überstehende DNA-Einzelstränge wurden durch Inkubation mit Mung Bean Nuklease entfernt, so daß glatte Enden entstanden. Nach Phenolextraktion wurde die DNA-Konzentration spektralphotometrisch bestimmt. Jeweils 100ng dieser DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 25µl mit T4-DNA-Ligase religiert (siehe 2.2.1.4), und 5µl jedes Ansatzes zur Transformation von E.coli SURE 2 eingesetzt (siehe 2.2.1.6).

Charakterisierung der Transformanten mittels Bakterienkolonie-PCR und DNA-Sequenzierung:

Zur Größenbestimmung der deletierten DNA-Fragmente wurde eine PCR (siehe 2.2.1.2) mit dem oben beschriebenen Primerpaar (siehe Tabelle 10) durchgeführt. Die Größe der im Agarosegel sichtbaren Fragmente lag zwischen 206 bp und 300bp. Plasmide mit weitgehend deletierten DNA-Fragmenten wurden mittels Plasmid-Minipräparation (siehe 2.2.1.7.2) isoliert und sequenziert (siehe 2.2.1.5).

Plasmidisolierung:

pRL-E7 zeigte die größte Deletion im HBV-DNA-Anteil, die 13bp lange inserierte DNA-Sequenz (AAATTGGTCTGCG) entsprach der HBV-adw Sequenz nt 1793-1805. Der entsprechende Bakterienklon wurde in präparativem Maßstab angezogen, die Plasmid-DNA wurde mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit isoliert (siehe 2.2.1.7.2), spektralphotometrisch gemessen (siehe 2.2.1.1) und für nachfolgende Transfektionsexperimente bei 4°C aufbewahrt.

2.3 Transfektionsexperimente

Im folgenden soll nun dargestellt werden, wie die gemäß 2.2 konstruierten Reporterplasmide zu Transfektionsexperimenten in der Zellkultur verwendet wurden, um in diesem System den Einfluß von Typ I-Interferonen auf die inklonierten regulatorischen HBV-Sequenzen zu analysieren.

2.3.1 Zellkultur

2.3.1.1 Allgemeines Material und Geräte für die Zellkultur

Material:

- Medien:

Dulbecco`s Modified Eagle Medium (D-MEM) (1x): high glucose, with LGlutamine (Gibco BRL)

RPMI Medium 1640 (1x): with L-Glutamine (Gibco BRL)

Die Zellkulturmedien wurden nach der Supplementation mit Penicillin-Streptomycin und FCS bei +4°C im Kühlschrank gelagert und vor Verwendung in der Zellkultur normalerweise im Wasserbad für einige Zeit bei 37°C angewärmt.

- Supplemente:

Fetal Bovine Serum / Fetal Calve Serum (FCS) (Gibco BRL)

Penstrep (Gibco BRL)

Das FCS wurde nach Auftauen zur Inaktivierung von Komplementbestandteilen für 30 Minuten im Wasserbad bei 65°C inkubiert und anschliessend in Aliquots zu ca. 25ml in 30ml Falcons abpipettiert, die, sofern nicht sofort zur Herstellung von Medium verwendet, bei -20°C gelagert wurden. Die Penicillin-Streptomycin-Lösung wurde vor Verwendung nach Auftauen in Aliquots von ca. 6ml abpipettiert und, sofern nicht sofort verwendet, bei -20°C gelagert.

- Allgemeines Material:

Trypsin-EDTA (0,25%) (Gibco BRL)

Um einen Aktivitätsverlust zu vermeiden, wurde die Trypsinlösung nach dem Auftauen nicht bei +4°C gelagert, sondern in Aliquots a ca. 7-8ml in sterile Röhrchen abpipettiert, die bei -20°C gelagert und je nach Bedarf unmittelbar vor Verwendung im Wasserbad aufgetaut wurden.

PBS

Geräte:

- Sterilbank HERASafe Heraeus INSTRUMENTS

2 Material und Methoden

- Brutschrank SANYO CO2 INCUBATOR MCO-17A1
- Zellkulturpumpe VACUSAFE (INTEGRA BIOSCIENCES)
- Mikroskop WILOVERT S (hund WETZLAR)

2.3.1.2 Verwendete Zellen und allgemeine Kulturbedingungen

Die Hepatom-Zelllinie HuH7 wurde von Dr. J. Monjardino (St. Mary's Hospital, London, UK) zur Verfügung gestellt, die Hepatom-Zelllinie HepG2 stammte von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ, Braunschweig).

Für die HuH7-Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), für die HepG2-Zellen RPMI 1640-Medium verwendet, das jeweils mit 10% FCS, 100 units/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin-Sulfat supplementiert war; die Kultur beider Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37°C und, zur Konstanthaltung des pH-Wertes, einem CO₂-Gehalt von 5%.

Sowohl HuH7 als auch HepG2 wachsen in adhärennten Kulturen, sogenannten Monolayern, angeheftet an Kulturgefäße aus Plastik (Polystyrol, Falcon). Zur normalen Passage der Zellen zwischen den Transfektionen wurden Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche A= 75cm² verwendet; in der Passage unmittelbar vor einer Transfektion wurden größere Flaschen mit einer Fläche von A= 175cm² verwendet.

Bei der üblicherweise gewählten Aussähdichte war nach etwa vier Tagen das Stadium der Konfluenz erreicht, so daß die Zellen routinemäßig im Verhältnis 1:3 – 1:4 in neue Zellkulturgefäße umgesetzt werden mussten; dabei wurden die HepG2 erfahrungsgemäß etwas rascher konfluent und neigten eher zur Bildung von Klumpen, so dass bei ihnen eher etwas häufigeres Umsetzen erforderlich war.

Das Lösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen erfolgte nach dem Absaugen des Kulturmediums und Waschen mit PBS durch Behandlung für 10 min bei 37°C mit einem Volumen Trypsin/EDTA, das geeignet war, die gesamte Wachstumsfläche gleichmäßig zu benetzen (ca. 7 ml für die Standardflaschen, ca. 14 ml für die großen Flaschen). Anschließend wurde das Trypsin durch die Zugabe eines gleichen Volumens an serumhaltigen Medium inaktiviert, und die abgelösten Zellen gründlich resuspendiert, abzentrifugiert (ca. 5min, 1000 rpm, RT), wiederum resuspendiert und in einem geeigneten Volumen Medium aufgenommen (ca. 12 ml bei den kleinen, ca. 24 ml bei den grossen Flaschen). Diese Zellsuspension wurde zur Beimpfung neuer Zellkulturflaschen, in denen bereits vorgewärmtes und mit 5% CO₂ angereichertes serumhaltiges Medium vorgelegt war, verwendet; war, etwa für Transfektionen, eine exakt definierte Aussähdichte erforderlich, musste die genaue Zelldichte der Zellsuspension durch Zählen mit einem Hämocytozometer (siehe 2.3.1.3.1) bestimmt werden.

Bevor neu aufgetaute Zellen (vgl. 2.3.1.3.2) für eine Transfektion eingesetzt wurden, liess man an die 10 – 15 Passagen vergehen; ebenso wurde darauf geachtet, dass Zellen, die mehr als 40-50mal passagiert worden waren, nicht mehr für Transfektionsexperimente eingesetzt wurden.

2.3.1.3 Grundlegende Zellkulturtechniken

2.3.1.3.1 Zellzählung mit einem Häemocytometer

Ein Häemocytometer enthält zwei Zählkammern. Jede Kammer besteht aus neun großen Quadraten (begrenzt von Dreierlinien) mit einem Volumen von je $0,1\text{mm}^3$ oder 1×10^{-4} ml. Durch Zählen der Zellzahl in einem bestimmten definierten Volumen der Zählkammer kann die Zellkonzentration einer Lösung bestimmt werden.

Zunächst wurde die Oberfläche des Häocyotometer mit 70% EtOH gereinigt, wobei der zentrale Bereich nicht verkratzt werden durfte. Danach wurde das Deckgläschen ebenfalls gereinigt, an den Ecken leicht mit A.d. befeuchtet und unter sanftem Druck über die Vertiefungen und den zentralen Bereich des Häocyotometer geschoben; ein korrekter Sitz des Deckplättchens ist Voraussetzung für eine korrekte Kammertiefe und somit eine richtige Berechnung der Zelldichte und kann anhand der Anwesenheit der sog. „Newtonschen Ringe“ am Rand des Plättchens überprüft werden.

Die Zellsuspension, aus der eine Probe zum Zählen entnommen wurde, sollte nach gründlichem Mischen als Einzel-Zell-Suspension mit möglichst wenig Klumpen vorliegen und für ein zuverlässiges Zählergebnis eine Dichte von mindestens 10^6 Zellen/ml aufweisen; evtl. war hierfür ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt mit anschließender Resuspension in einem geringeren Volumen erforderlich.

Zunächst wurde ca. 0,1 ml der Probe mit 0,5ml 0,4% (w/v) Trypanblau und 0,3 ml 1xPBS versetzt und für 1-2 Minuten stehen gelassen; dies dient dem Anfärben avitaler Zellen, die später beim Zählen nicht berücksichtigt werden. Dann wurden die beiden Kammern des Häocyotometer mit der 1:1 mit Färbemittel versetzten Zelllösung beschickt; dazu wurde je ein Aliquot von ca. 20µl in einer Pipettenspitze aufgezogen und an den Rand des Deckgläschens herangeführt, so daß es durch Kapillarkräfte unter das Deckgläschen in die Kammern gezogen werden konnte. Die Zellsuspension sollte die Kammer gerade eben füllen, überschüssiger Rest am Rand konnte, jedoch ohne wieder Flüssigkeit aus der Kammer zu saugen, mit einem Wischtüchchen entfernt werden. Das gleiche wurde bei der anderen Kammer wiederholt, wobei eine homogene Zellverteilung in beiden Kammern erreicht werden sollte.

Dann wurde unter dem Mikroskop zunächst eines der beiden Zählfelder aufgesucht und bei 100x Vergrößerung (Objektiv 10x, Okular 10x) die Zellzahl in 4 der großen von Dreierlinien begrenzten Quadrate (mit jeweils 16 kleinen Unter-Quadraten) ausgezählt. Um Zellen, die überlappend auf den Grenzlinien der (kleinen) Quadrate liegen, nicht doppelt zu zählen, sollten solche Zellen nur dann mitgezählt werden, wenn sie die obere und linke, nicht aber wenn sie die untere und rechte Grenze von Quadraten berührten. Ebenso wurden blau gefärbte Zellen nicht berücksichtigt. Das gleiche wurde auf dem zweiten Zählfeld wiederholt, so daß insgesamt die Gesamtzahl der Zellen in 8 großen Quadraten N_{vital} bestimmt wurde.

Daraus errechnete sich dann die Dichte D der Ausgangssuspension (in Zellen / ml) mittels folgender Formel, wobei sich der Faktor 2 aus der 1:1 Verdünnung mit Färbelösung ergibt (evtl. weitere

2 Material und Methoden

Verdünnungen der Ausgangssuspension sind entsprechend durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen).

$$[D = (N_{\text{vital}} / 8) \times 2 \times 10000]$$

Werden zusätzlich alle Zellen inklusive der blau gefärbten Zellen gezählt (N_{gesamt}), so ergibt sich der Prozentsatz der vitalen Zellen als $[(N_{\text{vital}} / N_{\text{gesamt}}) \times 100\%]$.

Abschliessend wurden Hämozytometer und Deckgläschen mit A.d. und EtOH gewaschen und in A.d. in einem Gefäß aufbewahrt.

2.3.1.3.2 Zellen einfrieren und auftauen

Vor dem Einfrieren wurde sicher gestellt, dass die Zellen gesund und nicht kontaminiert waren und die korrekten morphologischen Charakteristika aufwiesen. Ausserdem wurde 24h vorher noch einmal ein Mediumswechsel vorgenommen. Am Tag des Einfrierens wurden die Zellen abtrypsiniert, in Serumhaltigen Medium resuspendiert, durch Zentrifugation pelletiert und anschließend in Gefriermedium (siehe unten) resuspendiert und in Aliquots von ca. 1 ml in spezielle Gefriergefäße abgefüllt; diese wurden in eine mit Baumwolle ausgekleidete Polystyren-Schachtel überführt und dann über Nacht bei -80°C gelagert, so dass ein Einfrieren der Zellen mit einer Rate von ca. $1^{\circ}\text{C} / \text{min}$ erfolgen konnte. Am nächsten Tag wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Material:

Gefrier-Medium: Wachstums-Medium (d.h. DMEM bzw. RPMI-1640) mit 10-20% FCS und 5-20% DMSO

Das Auftauen von in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen erfolgte durch Inkubation in einem auf 37°C temperierten Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen in ein Zellkulturgefäß mit einem je nach gewünschter Dichte geeigneten Volumen bereits auf 37°C vorgewärmten Mediums überführt und über Nacht inkubiert, wobei am nächsten Tag ein Mediumswechsel vorgenommen wurde.

2.3.2 Transfektionsexperimente

2.3.2.1 Theorie der Transfektion

Unter Transfektion versteht man allgemein das Einführen fremder Moleküle, i.d.R. DNA, in eukaryontische Zellen. Es lassen sich dabei grundsätzlich zwei verschiedene Formen unterscheiden, nämlich die *stabile* und die *transiente* Transfektion: Während bei der stabilen oder permanenten Transfektion die transfizierten linearen DNA-Moleküle in das Genom der Zielzelle integriert werden, wird bei der transienten Transfektion die zirkuläre Plasmid-DNA nur in den Zellkern eingeführt, jedoch nicht in die Chromosomen eingebaut.

Die Expression des transfizierten Gens kann typischerweise innerhalb von 24 bis 96 Stunden nach dem Einschleusen der DNA analysiert werden. Da bei der transienten Transfektion hohe Kopien-Zahlen des jeweiligen Plasmids vorliegen, kann die im Rahmen von Reporter-Gen-Assays zu untersuchende Expression des Reportergens auf einem hohen Niveau stattfinden. Die höchste Transfektionseffizienz wird erreicht, wenn sog. „supercoiled“ Plasmid-DNA verwendet wird. Weiterhin sollte die Plasmid-DNA den höchsten möglichen Reinheitsgrad haben und frei von bakteriellen Endotoxinen sein. Bezüglich der Zellkultur ist auf optimale Bedingungen in Hinblick auf Medium und Serum und Konfluenzgrad der Zellen sowie eine niedrige vorhergehende Passagenzahl der transfizierten Zellen (<50) zu achten, darüberhinaus wird durch ein Umsetzen der Zellen ca. 24h vor der Transfektion („Aussähen“) ein normaler Metabolismus gewährleistet.

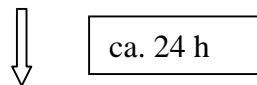
Zum Einschleusen der DNA in die Zellen steht eine Vielzahl von Transfektionsmethoden zur Verfügung, so etwa als klassische Methoden die DEAE-Dextran-Methode (Vaheri 1965), die Kalzium-Phosphat-Methode (Graham 1973), die Elektroporations-Methode (Wong 1982, Neumann 1982) oder die (Kationische) Liposomen –Methode (Felgner 1987). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Technik der Transfektion über nicht-liposomale Lipide (Effectene Transfection Reagent Kit, QIAGEN, Hilden) stellt eine Weiterentwicklung der ursprünglichen Liposomenmethode dar. Dabei wird zunächst in einem ersten Schritt die DNA durch Interaktion der negativ geladenen Phosphat-Gruppen der Nuklein-Säuren mit einem spezifischen positiv geladenen „Enhancer“ stark kondensiert. Die solchermassen verdichtete DNA wird dann mit einer Schicht von kationischem nicht-liposomalem Lipid umgeben. Der DNA-Lipid-Komplex wird durch Endozytose in die Zielzellen aufgenommen. Das Effectene Transfection Reagent gewährleistet dabei im Vergleich zu Liposomen-basierten Transfektions-Reagentien bei sehr niedriger Zytotoxizität deutlich höhere Transfektionseffizienzen, so daß mit geringeren DNA-Mengen gearbeitet werden kann. Ein Weglassen des Serums während der Transfektion ist nicht erforderlich, ausserdem ist ein Entfernen der Transfektionskomplexe nicht essentiell notwendig.

2 Material und Methoden

2.3.2.2 Transfektionsexperimente

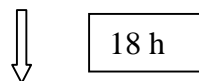
Kernstück der in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionsexperimente bildete die transiente Ko-Transfektion der Zellen mit den verschiedenen *pGL3-HBV_{adw6/9}* Reporter Plasmiden und dem *pRLE7* Referenz Vektor (als interner Kontrolle für die Transfektionseffizienz) unter Verwendung eines nicht-liposomalen Lipid-Transfektionsreagens (Effectene Transfection Reagent, QIAGEN, Hilden). Dieser eigentliche Transfektionsschritt erfolgte am Tag 2 der sich über insgesamt fünf Tage erstreckenden Transfektionsexperimente, deren allgemeiner zeitlicher Ablauf überblicksartig in folgender Skizze dargestellt ist:

Tag 1: Aussähen der Zellen in 6 well Platten



Tag 2: Zugabe der Transfektionskomplexe

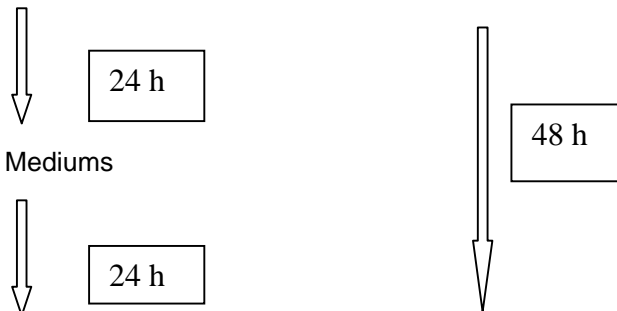
(Kotransfektion mit dem zu untersuchenden *pGL3*-Konstrukt und dem *pRLE7* Referenzvektor)



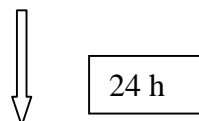
Tag 3: Entfernung der Transfektionskomplexe und

Zugabe der Interferonlösung in der jeweiligen Konzentration (experimenteller Ansatz, 2.3.2.3)

bzw. Zugabe des Zellkulturmediums ohne Interferon (Kontrollansatz)



Tag 4: Wechsel des jeweiligen Mediums



Tag 5: „Ernte“ der Zellen durch passive Lyse (2.3.2.4)

Abb. 7: Zeitliches Schema der Transfektionsexperimente

Ein Tag (ca. 24h) nach der Aussaat von zu diesem Zeitpunkt gerade eben konfluenten Zellen in einer Dichte von $1,8 \times 10^5$ (HuH7) bzw. 4×10^5 (HepG2) Zellen in einem Volumen von 2,5 ml pro (\varnothing 3,5cm)-well einer 6well Platte erfolgte die transiente Kotransfektion mit den verschiedenen *pGL3*-Konstrukten und dem *pRLE7*-Referenz-Plasmid nach Angaben des Herstellers des Effectene Kits (QIAGEN, Hilden).

Nach Entfernen des Mediums und zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden pro well 1,6 ml frisches serum- und antibiotikahaltiges Medium zu den Zellen gegeben. Zur Transfektion wurden für jedes well 0,15 μ g der verschiedenen *pGL3*-Konstrukte und 0,15 μ g des *pRLE7*-Plasmids mit einem

Endvolumen von 100 µl EC-Puffer gemischt, 2,4 µl Enhancer hinzugefügt (DNA:Enhancer-Ratio 1:8), und nach kurzem Vortexen (1 sec) für 5 min bei RT inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde 2µl Effectene Transfection Reagent zu den Ansätzen gegeben, die Lösung kurz gevortext (10 sec) und zur Komplexbildung für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 600 µl serum- und antibiotikahaltigen Zellkulturmedium wurden die Ansätze mit der nun liposomal gecoateten DNA zu den Zellen gegeben (704,4 µl pro well).

2.3.2.3 Inkubation der transfizierten Zellen mit Interferon

18 h nach der Transfektion (= Tag 3) wurden die Effectene-DNA-Komplexe entfernt und nach Waschen der Zellen mit PBS pro well 2,5 ml serum- und antibiotikahaltiges Medium mit Interferon in der gewünschten Konzentration (behandelte Zellen) bzw. ohne Interferon (unbehandelte Zellen) hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 48h im jeweiligen Medium inkubiert, wobei nach 24 h (= Tag 4) das jeweilige Medium erneuert wurde.

Die jeweiligen IFN-Lösungen wurden jeweils unmittelbar vor der Verwendung frisch hergestellt, die Stammlösung wurde während des Pipettierens auf Eis gehalten. Die IFN (IFN α 2b, α 8, α 17, β 1a) wurden von PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, NJ, USA) bezogen. Um Aktivitätsverluste durch wiederholte Auftau- und Gefrierzyklen zu vermeiden, wurden die IFN standardmäßig mit 0,1% BSA verdünnt, aliquotiert und bei -80°C gelagert; bei IFN β konnte eine Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ erfolgen.

2.3.2.4. Ernte durch passive Lyse

48 h nach Beginn der Inkubation (= Tag 5) erfolgte die „Ernte“ der jetzt gerade eben konfluenten (95%) Zellen durch passive Lyse. Dazu wurden die Zellen nach Absaugen des Zellkulturmediums und Waschen mit PBS unter unsterilen Bedingungen mit 800 µl Homogenisierungspuffer pro well (1x PLB, Passive Lysis Puffer, Promega, Mannheim) benetzt und zur Ablösung für 15 min bei RT auf eine Schwenkplattform (Rocky[®] 3D) gestellt; der 1x PLB wurde nach Angaben des Herstellers unmittelbar vor Verwendung durch Verdünnung mit A.d. aus 5x PLB (Lagerung bei -20°C) hergestellt.

Der Passive Lysis Buffer erlaubt ohne weiteres mechanisches Abschaben oder zusätzliche Gefrier-/Auftauzyklen (= aktive Lyse) eine rasche Lyse der adhären Zellen und verhindert ein übermäßiges Schäumen der Lysate. Weiterhin gewährleistet er eine quantitative und zuverlässige Freisetzung der Firefly und Renilla Luciferase Reporter Enzyme, garantiert neben seinen lytischen Eigenschaften eine optimale Stabilität dieser Enzyme und supprimiert schließlich Autolumineszenz-Signale, die von Coelenterazin, dem Substrat der Renilla-Luciferase-Reaktion, ausgehen können.

Nach der 15 min Inkubationszeit wurden die Zelllysate durch Pipettieren gründlich homogenisiert und routinemäßig auf Trockeneis eingefroren, auch wenn sofort anschließend an die Ernte die Messung mit dem Dual-Luciferase Assay System erfolgen sollte. Längerfristige Lagerung der Proben erfolgte

2 Material und Methoden

bei -80°C , mehr als ein Einfrier-/Auftauzyklus wurden nicht durchgeführt, um einen stärkeren Verlust der Enzymaktivität zu verhindern.

2.3.3 Dual-Luciferase Reporter Assay System

2.3.3.1 Theoretischer Hintergrund

Das Reportergeren der verschiedenen pGL3-Testplasmidkonstrukte exprimiert das Enzym Firefly Luciferase (Herkunft: *Photinus pyralis*), das Reportergeren des jeweils kotransfizierten *pRLE7* Referenzplasmidkonstrukts exprimiert das Enzym Renilla Luciferase (Herkunft: *Renilla renalis*). Da die transfizierten Zellen keine endogenen Luciferase-Enzyme enthalten, stellt die Aktivität dieser beiden Enzyme, die in den nach 2.3.2.4 präparierten Zellysaten jeweils gemeinsam enthalten sind, ein Maß dar für die Stärke der Expression der Test/Referenz-Plasmidkonstrukte (in Abhängigkeit von der IFN-Konzentration in den jeweiligen Ko-transfektionsansätzen).

Grundlage für die Messung der Enzymaktivitäten sind die vom jeweiligen Enzym katalysierten Biolumineszenz-Reaktionen:

- Die *Firefly Luciferase*, ein monomerisches Protein von 61kDa, benötigt für seine enzymatische Aktivität keine post-translationale Prozessierung und funktioniert deshalb unmittelbar nach der Translation als genetischer Reporter (Wood 1984, de Wet 1985). Sie katalysiert unter Mitwirkung von ATP, O^2 und Mg^{2+} die Oxidation des Substrats Beetle Luciferin zu Oxyluciferin, wobei es zur Photonenemission kommt:

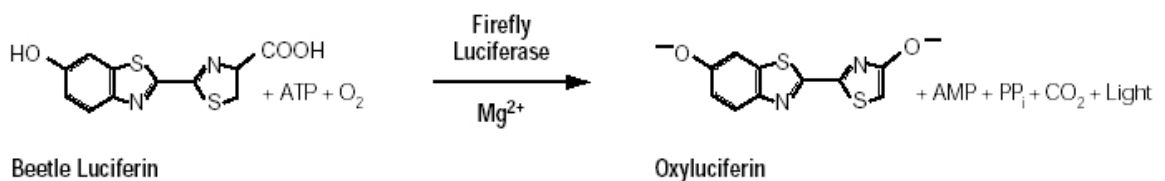


Abb. 8: Durch *Firefly Luciferase* katalysierte Biolumineszenz-Reaktion mit Umsetzung von Beetle Luciferin zu Oxyluciferin

Unter konventionellen Reaktionsbedingungen läuft die Reaktion über ein Luciferyl-AMP-Zwischenprodukt mit einem sehr langsamen Umsatz, so daß nur ein schnell vergehender Licht“blitz“ emittiert wird. Deshalb wird im Dual Luciferase Reporter Assay dem Ansatz zusätzlich Coenzym A hinzugefügt. In der Anwesenheit von Coenzym A erfolgt die Oxidation nämlich über ein (vermutlich) Luciferyl-CoA-Zwischenprodukt, was einen schnelleren enzymatischen Umsatz erlaubt und zu einem länger-anhaltenden, mehr einem „Glühen“ ähnlichen Lumineszenz-Signal mit deutlich höherer Intensität führt. Der Assay zur Bestimmung der Firefly Luciferase Aktivität ist sehr sensitiv und verfügt über einen breiten linearen Bereich.

- Die *Renilla Luciferase*, ein monomerisches Protein von 36kDa, enthält zwar in seiner natürlichen Form, wie es aus *Renilla reniformis* isoliert wird (Matthews 1977), einen Kohlenhydratanteil von 3%, der aber für die enzymatische Aktivität nicht erforderlich ist. Sie katalysiert unter Sauerstoffverbrauch die Umwandlung des Substrats Coelenterat-Luciferin (=Coelenterazin) in Coelenteramid:

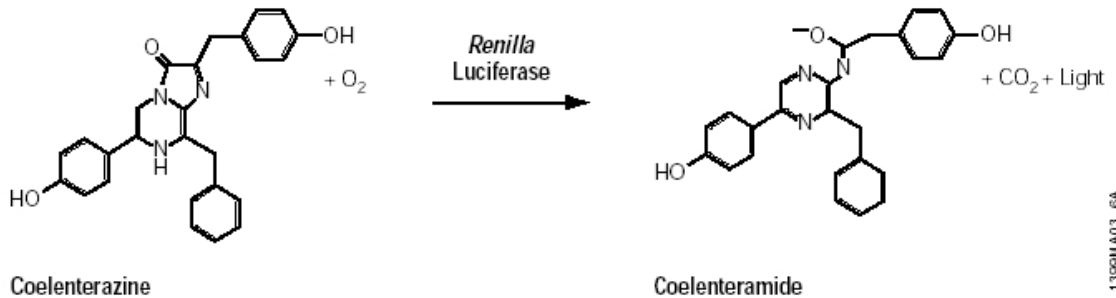


Abb. 9: Durch *Renilla Luciferase* katalysierte Biolumineszenz-Reaktion mit Umsetzung von Coelenterazin zu Coelenteramid

Das dabei emittierte Lumineszenz-Signal nimmt, einem „Glühen“ gleich, über den Zeitraum der Messung nur langsam an Intensität ab. Die Biolumineszenzreaktion weist wie die der Firefly Luciferase auch eine sehr hohe Sensitivität und einen breiten linearen Bereich auf.

Da die Firefly und die *Renilla Luciferase* entsprechend ihres verschiedenen evolutionären Ursprungs verschiedene Enzymstrukturen und Substraterfordernisse haben, kann selektiv zwischen ihren jeweiligen Biolumineszenz-Reaktionen unterschieden werden.

2.3.3.2 Bioluminometer Messung

Auf der Grundlage der von Firefly- und *Renilla*-Luciferase katalysierten Biolumineszenz-Reaktionen erfolgte die Messung ihrer Aktivitäten mittels des Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Mannheim); dieses erlaubt eine integrierte Quantifizierung beider Reporter, die sequentiell in einer einzigen Probe gemessen werden können. Zunächst wird der Firefly Luciferase Assay gestartet, indem in einem Meßröhrchen Luciferase Assay Reagent II, das das entsprechende Substrat enthält, zu einem Aliquot des zu messenden Zellsats hinzupipettiert wird. Unmittelbar nach Quantifizierung der Firefly Luciferase Aktivität in einem Bioluminometer wird zum Ansatz im gleichen Meßröhrchen Stop&Glo Reagent hinzugefügt; dadurch wird innerhalb einer Sekunde das Biolumineszenz-Signal aus der Firefly Luciferase Reaktion um mindestens den Faktor 10^5 (d.h. auf $\leq 0,00001\%$ der ursprünglichen Lichtintensität) „gestoppt“ und simultan durch das im Stop&Glo Reagent enthaltene *Renilla Luciferase* Substrat die *Renilla Luciferase* Biolumineszenz in Gang gesetzt. Das Pipettieren der jeweiligen Mengen LARII und Stop&Glo erfolgte automatisiert über zwei separate Injektoren des verwendeten Bioluminometers (Lumat LB 9507; EG&G Berthold, Bad Wildbad), die Messung der

2 Material und Methoden

entsprechenden Biolumineszenz-Reaktionen wurde in zeitlich genau definierten Abständen hierzu ebenso automatisch in Gang gesetzt.

Pro Messung wurden 20 µl der nach 2.3.2.4 hergestellten Zellysate sowie jeweils 100 µl Luciferase Assay Reagent II (LARII) und 100 µl Stop & Glo Lösung eingesetzt. Die Zellysate wurden nach dem Auftauen jeweils kurz gevortext und zur Pelletierung von Zelldebris für ca. 30 sec in einer gekühlten Zentrifuge abzentrifugiert. Jeweils 20 µl der Proben wurden zur Messung in silikonisierten Polypropylen-Röhrchen (Sarstedt) vorgelegt, dabei wurden die Proben während des Pipettierens auf Eis gehalten und zur Verhinderung von Hintergrundlumineszenz-Signalen von Sonnenlicht und sehr hellen Lichtquellen abgeschirmt.

Zur Herstellung von LAR II wurde eine Einheit lyophilisierten Luciferase Assay Substrate in einem lichtundurchlässigen Gefäß in 10 ml Luciferase Assay Buffer gelöst; zur Herstellung von Stop & Glo wurde eine Einheit getrockneten Stop & Glo Substrate in 200 µl Stop & Glo Substrate Solvent rekonstituiert und in einem lichtundurchlässigen Glasgefäß in 10 ml Stop & Glo Buffer gelöst. Um Kontaminationen des LARII mit Stop&Glo Reagens zu verhindern, die zu falsch niedrigen Firefly Luciferase Werten führen können, wurde auf eine strenge Trennung sowohl der Injektorsysteme als auch der jeweils verwendeten Gefäße geachtet. Nach gründlichen Waschen mit A.d. wurden beide Schlauchsysteme des Bioluminometers durch Durchführung von 10 – 15 „Leermessungen“ mit dem jeweiligen Meßreagens befüllt; vor der eigentlichen Messung wurde eine Probe mehrmals gemessen, um zu überprüfen, ob das Gerät konstante Werte lieferte.

Entsprechend der Kinetik der Biolumineszenz-Reaktionen von Firefly und Renilla-Luciferase (vgl. 2.3.3.1) wurde das Bioluminometer so konfiguriert, daß es, nach einer 2 sec dauernden Meßverzögerung, die Lichtemission fortlaufend über einen definierten Zeitraum von 10 sec registrierte; vor Beginn der Messung wurde zum Ausschluß unspezifischer Phosphoreszenz eine automatische Nulleffektbestimmung durchgeführt. Die gemessene Biolumineszenz wurde als relative light units / sec (RLU / sec) quantifiziert, wobei diese definiert sind als $RLU/sec = \text{Summe der gezählten Impulse} / 10 \times RLU\text{-Faktor}$. Dieser RLU-Faktor soll Schwankungen verschiedener Photomultiplier ausgleichen. Der Photomultiplier war als ultraschneller Photonenzähler mit einem spektralen Empfindlichkeitsbereich zwischen 390 und 620 nm betrieben, durch das Rauschen des Photomultipliers bedingte niederenergetische Einzelimpulse wurden durch einen Schwellendiskriminator unterdrückt.

Die Meßwerte wurden über das Terminal-Programm des Windows 3.11-Betriebssystems (Microsoft, Unterschleissheim) direkt an einen Personal Computer übertragen und standen im „*.txt“-Format zur Bearbeitung zur Verfügung; die gemessenen Firefly-Luciferase-Aktivitäten wurden vor der weiteren statistischen Auswertung (siehe 2.5) durch Bildung des Quotienten Firefly Luciferase / Renilla Luciferase-Aktivität normalisiert.

Das Schlauchsystem wurde nach der Messung routinemäßig mit ca. 10 ml A.d. gewaschen, mit ca. 10 ml 70% EtOH durchgespült, für 30 min in 70% EtOH stehen gelassen und abschließend noch einmal gründlich mit A.d. gewaschen.

2.3.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz: β -Gal-Staining

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden HuH7-Zellen analog zu 2.3.2.2 mit 0,3 μ g eines für das Enzym β -Galactosidase kodierenden Plasmids (pSV- β -Galactosidase Control Vector; Promega, Mannheim) transfiziert. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von β -Galaktosid-Verbindungen. Bietet man den Zellen in der Färbelösung nun ein β -Galaktosid, z.B. X-Gal, als Substrat an, so entsteht in den erfolgreich transfizierten Zellen durch hydrolytische Spaltung ein blaues Reaktionsprodukt. Dieses erlaubt es, die transfizierten Zellen lichtmikroskopisch von den nicht transfizierten Zellen zu unterscheiden, da HuH7 über keine endogene β -Galactosidaseproduktion verfügen, was sich durch Verwendung nicht-transfizierter Zellen für das β -Gal-Staining als Negativkontrolle verifizieren ließ.

Das Anfärben der Zellen erfolgte 24 h nach der Transfektion mit Hilfe des β -Gal Staining Kit nach Angaben des Hersteller (Fa. Invitrogen). Für die Färbelösung wurden 70 μ l Solution A, 70 μ l Solution B, 70 μ l Solution C, 350 μ l X-Gal-Lösung (20 mg/ml in DMF) und 6440 μ l 1x PBS zusammenpipettiert. Die Zellen wurden nach Entfernen des Zellkulturmediums und Waschen mit 1x PBS mit 1,5 ml 1x Fixative Solution pro well einer 6 well Platte versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde noch einmal gründlich mit 1x PBS gewaschen und je 1 ml Staining Solution pro well zu den Zellen gegeben. Nach 0,5 – 2 h Inkubation bei 37°C im Brutschrank unter gelegentlichem Schwenken wurde bei 200 x Gesamtvergrößerung in 5 – 10 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern die Gesamtzahl der Zellen sowie die Zahl der blau gefärbten Zellen bestimmt. Daraus wurde die Transfektionseffizienz (%) bestimmt als [(Zahl der gefärbten Zellen / Gesamtzellzahl) x 100].

Durch Überschichten der Zellen mit 70% Glycerol konnten die Zellen für spätere Untersuchungen konserviert und in diesem Zustand bei + 4°C gelagert werden.

2.3.5 Kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford)

Um möglicherweise auftretende unspezifische Veränderungen des Proteingehaltes der transfizierten und Interferon-behandelten Zellen erfassen zu können, erfolgte routinemäßig eine kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration der nach 2.3.2.4 präparierten Zellysate mittels der Methode nach Bradford (Bradford 1976) mit bovinem Serumalbumin als Standard. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Änderung des Absorptionsmaximums von Coomassie Blau G250 (Fa. BioRad) von 465 nm nach 595 nm durch Proteinbindung. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption einer Probe mit unbekanntem Proteingehalt mit Hilfe einer vom Hersteller vorgegebenen Standard-Verdünnungsreihe mit der Absorption von Proteinstandard-Proben mit bekanntem Proteingehalt (zwischen 0,013 und 0,91 μ g/ml) verglichen (Ausubel 1995). Die Absorptionsmessung erfolgte in einem Photometer der Fa. Bio-Rad bei 595 nm unter Einbeziehung von jeweils einem Leerwert und

2 Material und Methoden

zwei Standards. Die Proteinkonzentration der Proben wurde über die Absorption der Standards und nach Abzug des Leerwerts errechnet und lag etwa im Größenbereich von ca. 0,4 µg/ml.

Materialien:

Bradford-Reagens:

100 mg Coomassie Brilliant Blau G-250 wurden in 47,5 ml absolutem Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 100 ml Phosphorsäure (85%) wurde die Lösung mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt. Sie ist bei +4°C für ca. 1 Jahr haltbar.

Protein-Standard-Proben:

Bovines Serum Albumin gelöst in Lyse-Puffer (vgl. 2.3.2.4)

2.3.6 Zytotoxizität

Um eine Aussage über eine mögliche IFN-abhängige Zelltoxizität bzw. insbesondere mitochondriale Funktionseinschränkung der IFN-behandelten Zellen zu erlauben, wurde mittels des Cell Titer 96Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega GmbH, Mannheim) ein sog. MTS-Assay durchgeführt. Dieser beruht auf der Reduktion von MTS (3-(4,5-Dimethylthiazolin-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium) zu Formazan, wobei als Reduktionsmittel ein Elektronen-gekoppeltes Reagens (Phenazin Ethosulfat) dient, das vorher durch ausschließlich in stoffwechselaktiven Zellen gebildetes NAD(P)H oxidiert wurde. Somit steht die Bildung von Formazan, die mit einer Verfärbung der Reaktionslösung einhergeht und sich durch Bestimmung der Absorptionsänderung bei 490 nm in einem ELISA-Reader quantifizieren lässt, in einem direkt proportionalen Zusammenhang mit der Anzahl der lebenden Zellen.

Die Durchführung des MTS-Assay erfolgte in 96-well-Platten, wobei Zelldichte und Volumen der Transfektionslösung ausgehend von den 6-well-Platten entsprechend angeglichen wurden und die zeitliche Abfolge identisch beibehalten blieb, d.h. die Zytotoxizitätsmessung fand 48h nach Zugabe von IFN statt. Herstellung der erforderlichen Lösung sowie Durchführung des Assay erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Hintergrundabsorption wurde auch das reine Medium ohne Zellen mit dem Reagens inkubiert und der entsprechende Wert von den mit Zellen erhaltenen Resultaten subtrahiert. Zur Auswertung wurde die bei nicht Interferon-behandelten Zellen gemessene Absorption gleich 100% gesetzt, entsprechend 0% IFN-induzierter Zytotoxizität.

2.4 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

2.4.1 Theoretischer Hintergrund: Prinzip des EMSA

Hintergrund:

Sequenzspezifisch an DNA bindende Proteine spielen u.a. als Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der DNA-Transkription eine bedeutende Rolle: sie binden i.d.R. an in 5'-Richtung zu einer Transkriptionseinheit gelegene Promoter- oder Enhancer-Sequenzen und üben so einen positiven oder negativen Einfluß auf die Transkription des in 3'-Richtung folgenden Gens aus.

Die Interaktionen zwischen solchen DNA-bindenden Proteinen und dem entsprechenden DNA-Molekül über eine für das betreffende Protein spezifische Bindungsstelle lassen sich mit Hilfe einer ursprünglich von Fried und Crothers sowie Garner und Revzin entwickelten Methode (Fried 1981, Garner 1981), dem sog. Electrophoretic mobility shift assay (DNA mobility shift assay, gel retardation assay, band shift assay), analysieren; er erlaubt insbesondere auch, die Schwankungen der Spiegel bestimmter (bekannter) Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von bestimmten Stimuli, z.B. Wachstumsfaktoren oder Zytokinen, zu untersuchen. So ermöglicht er es etwa im Rahmen unserer Fragestellung, etwaige Veränderungen im Muster der Transkriptionsfaktoren bei der Behandlung von Hepatom-Zellen mit Typ I-Interferonen aufzudecken.

Prinzip des EMSA:

Der EMSA beruht auf der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität von freier DNA und DNA-Protein-Komplexen. Ausgangspunkt sind zunächst die zu testenden DNA-Fragmente („Sonden“), die mit z.B. ³²P radioaktiv (oder alternativ auch mit Fluoreszenz) markiert werden, um im Anschluß an die Gelelektrophorese eine Visualisierung der Banden durch Autoradiographie des Gels zu gestatten. Diese Sonden - Restriktionsfragmente oder synthetische Oligonukleotide im Längenbereich zwischen 30bp und mehreren Kilobasen, meist jedoch unter 250bp - werden nun mit den zu testenden Proteinen bzw. dem zu testenden Proteingemisch gemischt, so daß eine Komplexbildung mit den entsprechenden DNA-bindenden Faktoren stattfinden kann; als Proteinquelle kommen neben aufgereinigten Proteinen (z.B. bestimmten bekannten und kommerziell erhältlichen nukleären Faktoren) insbesondere entsprechend zu präparierende nukleäre oder Ganz-Zellen-Proteinextrakte aus kultivierten Zellen in Frage. Die Inkubationsansätze werden bei niedriger Ionenstärke elektrophoretisch in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die während der Inkubationsphase gebildeten Protein-DNA-Komplexe können ebenso wie die freie Sonde in die Matrix des Polyacrylamidgels hineinwandern und bleiben ohne Dissoziation während der Elektrophorese als Komplexe erhalten. Da sie größer als die ungebundenen proteinfreien DNA-Fragmente sind, ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit im Gel (d.h. ihre „electrophoretic mobility“) in Abhängigkeit von der Größe des jeweiligen Bindeproteins auch entsprechend geringer. Die ihnen entsprechenden Banden sind deshalb im Vergleich zu den Banden der freien DNA retardiert und erscheinen (auf einem vertikalen Gel mit Laufrichtung von oben nach unten) entsprechend nach oben „geschifft“, wie in Abbildung 10 schematisch illustriert:

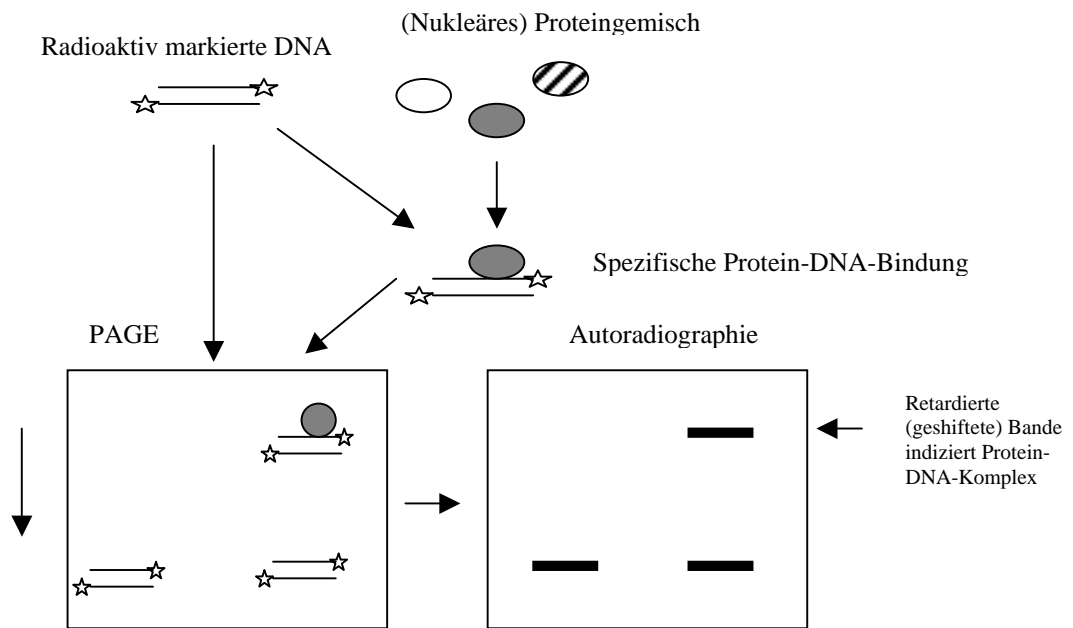


Abb. 10: Prinzip des Electrophoretic mobility shift assay

Nachweis der Sequenz-Spezifität und Identifizierung beteiligter Bindeproteine:

Die Sequenz-Spezifität der Komplexbildung im EMSA läßt sich überprüfen, indem man der Bindereaktion im Sinne einer Kompetition einen molaren Überschuß unmarkierten Oligonukleotids mit der gleichen spezifischen Erkennungssequenz, das das am Komplex beteiligte Protein binden kann, hinzufügt; dann wird dieses unmarkierte Oligonukleotid bereits einen großen Teil des Proteins „abfangen“ und von der Bindung mit dem radioaktiven Oligonukleotid abhalten, so daß die entsprechende retardierte Bande schwächer oder sogar eliminiert wird.

Umgekehrt können zur Kompetition auch unmarkierte unspezifische Oligonukleotide eingesetzt werden, denen das spezifische Erkennungsmotiv fehlt. Ist die DNA-Protein-Interaktion in der Tat sequenzspezisch, so können diese das Protein nicht von der Komplexbildung fernhalten, und die Stärke der retardierten Banden wird sich nicht verändern.

Um an der Komplexbildung beteiligte Proteine identifizieren zu können, kann man der Bindereaktion auch Antikörper gegen bekannte Proteine hinzufügen. Wenn diese ein Protein innerhalb des Komplexes erkennen und an es binden, dann wird der Komplex größer und bei der Wanderung im Gel noch stärker retardiert, was in einer noch stärker nach oben hin verlagerten Bande führt; dieses Phänomen wird auch als „super-shift“ bezeichnet.

2.4.2 Nukleäre Extrakte

2.4.2.1 Verwendete Kontrolleextrakte

Zur Etablierung des Gelshift-Systems und als Kontrolle für die Präparation eigener nukleärer Extrakte aus HuH7-Zellen (vgl. 2.4.2.2) wurden folgende kommerziell erhältliche nukleären Extrakte eingesetzt:

- **A431-Extrakt:**

A431 (Geneca, Cat. No. 100152): Nukleärer Extrakt aus einer humanen Epidermoid-Karzinom-Zelllinie; 5,9 µg/µl Protein in 20 mM HEPES (pH 7,9), 0,1 M KCl, 1mM MgCl₂, 20% Glycerol, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF

- **Ratten-Leber-Extrakt:**

Rat Liver (Geneca, Cat. No. 100870)

- **HeLa-Extrakt:**

HeLa Nuclear Extract (Promega, E352A): 5 mg/ml Protein in 20 mM HEPES (pH 7,9), 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 20% Glycerol

Daneben wurde ein Extrakt aus monozytären Zellen (THP-1) verwendet, der freundlicherweise von der Arbeitsgruppe PD Dr. K. Brand (Institut für Klinische Chemie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) zur Verfügung gestellt worden war.

2.4.2.2 Präparation nukleärer Extrakte aus HuH7-Zellen

2.4.2.2.1 Zellkultur

Die zur Präparation der nukleären Extrakte bestimmten HuH7-Zellen wurden (entsprechend dem Aussehen der Zellen an Tag 1 der Transfektionsexperimente; vgl. 2.3.2.2) in einer Dichte von ca. $7,0 \times 10^4$ Zellen/ml in einem Volumen von ca. 40 ml DMEM in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 150 cm² (sog. „peel off“-Flaschen mit einer speziellen abziehbaren Folie als Deckel, TPP®) ausgesät. Nach 24h erfolgte nach Entfernung des Mediums und Waschen mit PBS die Inkubation der Zellen mit IFN α 2b bzw. β in einer Dosis von 0 U/ml (Kontrolle), 250 U/ml, 750 U/ml und 1500 U/ml in serum- und antibiotikahaltigem Medium, wobei die jeweilige Interferonlösung nach 24h und 48 h erneuert wurde. 72h nach der ersten Interferon-Zugabe wurde mit der Präparation der nukleären Extrakte aus den jetzt gerade eben konfluenten Zellen fortgefahren (vgl. 2.4.2.2.2 bzw. 3), wobei von einer Ausbeute von $1,5 - 2,0 \times 10^7$ Zellen pro Flasche ausgegangen werden konnte.

2 Material und Methoden

2.4.2.2.2 Methode A

Die Lösungen A und B wurden nach den Angaben der Tabelle 11 jeweils vor der Präparation frisch angesetzt und bei +4°C bereit gehalten. Während der Präparation wurden die Zellkulturflaschen, um eine Degradation der nukleären Faktoren durch Erhitzung zu verhindern, auf einem +4°C Kühlblock gehalten. Nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem Scraper (TPP®) mechanisch von der Oberfläche des Wachstumsgefäßes gelöst und in ein vorgekühltes 2 ml ERG überführt, wobei die Ausbeute durch Nachwaschen der Platte mit ca. 500 µl PBS optimiert wurde. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugieren (2000g, 4°C, 2min) pelletiert, in 300µl Lösung A resuspendiert und nach kurzem Vortexen (2 sec) für 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (30 sec, 25600 g, 4°C; „quick run“-Funktion der Zentrifuge) wurde das Lysat wieder in 600 µl Lösung A resuspendiert, ca. 2 sec gevortext, nochmals abzentrifugiert (30 sec, 25600 g, 4°C; „quick run“-Funktion der Zentrifuge), in 100 – 150 µl Lösung B resuspendiert und schließlich unter kurzem Vortexen alle 2 min für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Lösung zentrifugiert (1 min, 25600g, 4°C), der Überstand in ein vorgekühltes ERG überführt und auf Eis in Aliquots von ca. 10µl in vorgekühlte 0,5ml ERGs abpipettiert, die jeweils sofort in flüssigen N₂ eingefroren und bei -80°C gelagert wurden.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Lösungen A und B

	Lösung A	Lösung B
1M HEPES pH 7,9	100 µl	200 µl
1M KCl	100 µl	1,0 ml
5M NaCl	-	200 µl
1M Sucrose	3,0 ml	-
1M MgCl ₂	15 µl	-
1M DTT	5,0 µl	5,0 µl
NP40 (10%)	500 µl	-
Protease inhibitor cocktail	30 µl	30 µl
0,1M PMSF	50 µl	50 µl
Glycerol (100%)	-	2,0 ml
Aqua dest.	6,2 ml	6,5 ml
Gesamt	10 ml	10 ml

2.4.2.2.3 Methode B (modifiziert nach Scott *et al.*)

Die Methode wurde modifiziert nach den Angaben von Scott *et al.* (Scott 1994, S. 342-343). Die Lösungen H und G wurden nach den Angaben der Tabelle 12 jeweils vor der Präparation frisch angesetzt und bei +4°C bereit gehalten. Die weiteren Arbeitsschritte inklusive des ersten Zentrifugationsschritts (2min, 2000g, 4°C) erfolgten analog zum unter 2.4.2.2.2 beschriebenen Protokoll. Anschließend wurde das Zell-Pellet in 500 µl Puffer H resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Hinzupipettieren von 32µl NP40 (10%) und 15 sec Vortexen wurde zentrifugiert (1min, 25600g, 4°C), das Pellet in 100µl Lösung G resuspendiert, für 15 sec stark gevortext und rasch in flüssigem N₂ eingefroren. Sofort anschließend (oder nach einer an dieser Stelle möglichen Unterbrechung des Protokolls) wurde das ERG mit dem Extrakt zum Auftauen auf Eis gestellt, mit Hilfe eines Klebestreifens auf einem Vortexer mit einem flachen, plattenartigen Aufsatz befestigt und

für ca. 30 min auf Stufe 6-7 bei +4°C (in einem Kühlraum) mechanisch behandelt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (1,5 min, 14000 rpm, 4°C) wurde der Überstand rasch in ein neues vorgekühltes ERG überführt und auf Eis in vorgekühlte 0,5 ml ERGs in Aliquots zu 10µl abpipettiert, die jeweils sofort in flüssigem N₂ eingefroren und bei –80°C gelagert wurden.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Lösungen H und G

	Lösung H	Lösung G
1M HEPES, pH 7,9	100 µl	200 µl
1M KCl	100 µl	1000 µl
1M MgCl ₂	15 µl	10 µl
Glycerol (100%)	-	2 ml
1M DTT	5 µl	5 µl
0,1M PMSF	50 µl	50 µl
Protease inhibitor cocktail	50 µl	50 µl
Aqua dest.	9,680 ml	6,685 ml
Gesamt	10 ml	10 ml

2.4.2.2.4 Proteinbestimmung (Methode nach Bradford)

Um in der Bindereaktion (vgl. 2.4.4) jeweils eine definierte Menge Protein einsetzen zu können, musste die Proteinkonzentration der nukleären Extrakte ermittelt werden. Dies erfolgte analog zu 2.3.5 entsprechend der Methode nach Bradford mit bovinem Serumalbumin als Standard, wobei die Standards in dem jeweils bei der Präparation der nukleären Extrakte verwendeten Puffer (B bzw. G) gelöst wurden. Aus jeder Kernextrakt-Präparation (d.h. von jeder Präparation, die sich aus der selben Flasche herleitete) wurde zur Konzentrations-Bestimmung ein Aliquot a 10 µl eingesetzt. Um den Einfluß von Pipettierfehlern zu minimieren, wurden pro Probe drei parallele Verdünnungen separat pipettiert und vermessen, wobei zunächst eine Vorverdünnung im Maßstab 1:2,8 und anschließend davon ausgehend eine Hauptverdünnung im Maßstab 1:20 angesetzt wurden.

Herstellung der Reagentien, Durchführung der Messung sowie Berechnung der Proteinkonzentration erfolgten analog zu 2.3.5; als Leerwerte wurde anstelle nukleären Extrakts ausschließlich Lösung B bzw. G vermessen und die erhaltenen Werte von den Absorptionswerten der Proben subtrahiert.

2.4.3 Oligonukleotid-Sonden

2.4.3.1 Verwendete Oligonukleotide

Als (radioaktiv markierte) Testsonden verwendete Oligonukleotide:

Folgende Oligonukleotide wurden radioaktiv markiert und in der Bindereaktion als Testsonden („probes“) verwendet:

RS:

```
5'..GTC CGT GTG CAC TTC GCT TCA CCT CTG CAC GTT GCA TGG AGA CCA CCG TGA ACG.
3'..CAG GCA CAC GTG AAG CGA AGT GGA GAC GTG CAA CGT ACC TCT GGT GGC ACT TGC.
```

```
... CCC ATC AGA TCC TGC CCA AGG TCT TAC ATA AGA GGA CTC TTG GAC TCC CAG CAA ...
... GGG TAG TCT AGG ACG GGT TCC AGA ATG TAT TCT CCT GAG AAC CTG AGG GTC GTT ...
```


2 Material und Methoden

... TGT CAA CGA CCG ACC TTG AGG-3'
... ACA GTT GCT GGC TGG AAC TCC-5'

GS 1:

5'..GTC CGT GTG CAC TTC GCT TCA CCT CTG CAC GTT GCA TGG AGA CCA CCG TG-3'
3'..CAG GCA CAC GTG AAG CGA AGT GGA GAC GTG CAA CGT ACC TCT GGT GGC AC-5'

GS 2:

5'..TGC ACG TTG CAT GGA GAC CAC CGT GAA CGC CCA TCA GAT CCT GCC CAA GG-3'
3'..ACG TGC AAC GTA CCT CTG GTG GCA CTT GCG GGT AGT CTA GGA CGG GTT CC-5'

GS 3:

5'..AAC GCC CAT CAG ATC CTG CCC AAG GTC TTA CAT AAG AGG ACT CTT GGA CT-3'
3'..TTG CGG GTA GTC TAG GAC GGG TTC CAG AAT GTA TTC TCC TGA GAA CCT GA-5'

GS 4:

5'..TCT TAC ATA AGA GGA CTC TTG GAC TCC CAG CAA TGT CAA CGA CCG ACC TT-3'
3'..AGA ATG TAT TCT CCT GAG AAC CTG AGG GTC GTT ACA GTT GCT GGC TGG AA-5'

C/EBP: CEBP Consensus Sequence Element (Geneka, Cat. No. 1200009)

5'..CTA GGG CTT GCG CAA TCT ATA TTC G-3'
3'..GAT CCC GAA CGC GTT AGA TAT AAG C-5'

Als (radioaktiv markierte) Kontrollsonde verwendetes Oligonukleotid:

Zur Überprüfung des Funktionierens des Assays wurde das Oligonukleotid Oct 1 radioaktiv markiert und als Kontrollsonde eingesetzt.

Oct 1: OCT1 Consensus Oligonucleotide (Promega, E3242)

5'-d(TGT CGA ATG CAA ATC ACT AGA A)-3'
3'-d(ACA GCT TAC GTT TAG TGA TCT T)-5'

Zur Konkurrenz verwendete (unmarkierte) Oligonukleotide:

Für Wettbewerbsansätze wurden den Bindungsreaktionen folgende unmarkierten Oligonukleotide im Überschuß hinzugefügt:

C/EBP: vgl. oben

SP1: Sp1 Consensus Oligonucleotide (Santa Cruz, sc-2502)

5'..ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C-3'
3'..TAA GCT AGC CCC GCC CCG CTC G-5'

NF1: NF-1 Consensus Oligonucleotide (Santa Cruz, sc-2553)

5'..TTT TGG ATT GAA GCC AAT ATG ATA A-3'
3'..AAA ACC TAA CTT CGG TTA TAC TAT T-5'

CREB: CREB Consensus Oligonucleotide (Promega, E3281)

5'..AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG-3'
3'..TCT CTA ACG GAC TGC AGT CTC TCG ATC-5'

2.4.3.2 5' Endmarkierung der verwendeten Oligonukleotide

Hinweise zum Umgang mit ^{32}P :

^{32}P ist ein harter β -Strahler und wird deshalb mit Plexiglas anstatt mit Blei abgeschirmt, um das Entstehen von elektromagnetischer Bremsstrahlung zu verhindern. Vor Beginn der Arbeit wurden alle hierfür verwendeten Geräte auf eine bestehende Kontamination überprüft. Bei der Arbeit wurde ein Filmdosimeter getragen, feste und flüssige Abfälle wurden getrennt gesammelt und entsorgt. Nach Beendigung der Arbeit wurden alle benutzten Geräte sowie der Arbeitsplatz auf eine Kontamination überprüft.

Markierungsreaktion:

Die T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) phosphoryliert ATP-abhängig das 5-Hydroxylende von Polynukleotiden und ist dadurch in der Lage, ^{32}P von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ auf das 5'-Ende eines Polynukleotids zu übertragen. Diese Reaktion wird zur radioaktiven 5'-Markierung der Sonden für den EMSA genutzt. 6 pmol Enden des entsprechenden Polynukleotids wurden hierzu in einem Endvolumen von 20 μl in 1x PNK-Reaktionspuffer (Promega) mit 4 μl $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (Spez. Aktivität > 4500 Ci/mmol; ICN Biomedicals GmbH, Katalog-Nr. 35001X.2) und 10 units T4-Polynukleotid-Kinase (Promega) bei 37°C 30 min inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 1 μl 0,5M EDTA sowie 9 μl Aqua dest. hinzupipettiert, und das Enzym bei 70°C für 15 min hitzeinaktiviert. Danach wurde das Reaktionsgemisch ausreichend lange bis auf ca. 30°C abgekühlt.

Reinigung der markierten Sonden:

Nicht eingebaute $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -Nukleotide wurden mit Hilfe einer Säulenchromatographie (MicroSpin™ G-25 Columns, Amersham Pharmacia Biotech, prod. no. 27-5325-01) nach dem Größenausschluß-Prinzip von den markierten Sonden abgetrennt. Die Sephadex G25 Säulen wurden zunächst gevortext, um das Trägermaterial zu resuspendieren, und dann für 1 min bei 735 g zentrifugiert, um den Aufbewahrungspuffer zu entfernen. Der gesamte radioaktive Reaktionsansatz (siehe oben) wurde auf die so vorbehandelten Säulchen aufgebracht und für 2 min bei 735 g zentrifugiert. Im Durchfluß befanden sich dann die gereinigten Sonden, die in der Bindereaktion (siehe 2.4.4) eingesetzt wurden; dieses Eluat kann bis zum Gebrauch (für maximal 2 – 3 Tage) bei -20°C gelagert werden.

Messung der Aktivität der markierten Sonden:

Für die Bestimmung der Aktivität der markierten Sonden (d.h. auch der Effizienz der Markierungsreaktion) wurden 2 μl des Eluats mit 10 μl A.d. in einem ERG gemischt. Die Messung erfolgte in einem β -Counter (Wallac Trilux 1450 Microbeta Liquid Scintillation and Luminescence Counter) über das Programm Micro Beta Windows Workstation mit folgenden Einstellungen:

Plate / Filter:	Polyethylene vial, 1450-117 cassette; 4ml vial, 4 by 6
Jet:	Disable Injector Assembly
Labels:	Single; P-32-Che
Counting time:	3 min

Es ergaben sich dabei typischerweise Aktivitäten im Bereich von ca. $1 - 5 \times 10^5$ cpm.

2 Material und Methoden

2.4.4 Bindereaktion

Die Bindereaktionen (Gesamtvolumen 20µl) wurden entsprechend den Angaben der Tabelle 13 in 0,5ml ERGs auf Eis angesetzt, wobei zunächst A.d., Bindepuffer (vgl. Tabelle 14), poly (dl-dC)• poly (dl-dC) (vgl. Tabelle 14, rechte Spalte) und die jeweilige Menge an nukleärem Extrakt (3µg; 10µg; 20µg) in dieser Reihenfolge zusammenpipettiert wurden. Die bei –20°C gelagerten Bindepuffer und die bei –80° gelagerten Aliquots der nukleären Extrakte wurden jeweils unmittelbar vor dem Pipettieren frisch aufgetaut.

Für die Berechnung des Volumens der in einigen Anätzen zur Kompetition mitzuführenden unmarkierten Oligonukleotide wurde im Vergleich zur markierten Sonde ein 100-200facher molarer Überschuss zu Grunde gelegt.

Zur Durchführung eines sog. Supershift-Assays wurde in einigen Reaktionen ein polyklonaler Rabbit-Antikörper gegen C/EBPβ von der Ratte, das sich vom entsprechenden humanen Protein nur durch eine Aminosäure unterscheidet, mitgeführt (C/EBPβ (C-19) X TransCruz antibody: sc-150 X; 200 µg IgG in 0,1 ml PBS mit 0,1 % Natriumazid; Santa Cruz Biotechnology); es wurde dabei pro Reaktion 2µl des Antikörpers eingesetzt, wobei der Antikörper nach Angaben des Herstellers vor dem Starten der Bindereaktion bereits für ca. 20 min mit dem entsprechenden nukleären Extrakt bei Raumtemperatur präinkubiert wurde.

Die Ansätze wurden durch kurzes Vortexen gemischt, abzentrifugiert und zur Präinkubation für 10min bei RT (20°C) in einer PCR-Maschine (eppendorf Mastercycler 5330) inkubiert. Danach wurden pro Ansatz 2µl der mit A.d. auf eine Aktivität von 5×10^4 cpm / 2 µl verdünnten radioaktiv markierten Sonden (vgl. 2.4.3.2) hinzugefügt. Nach Mischen durch leichtes Vortexen und Abzentrifugieren wurden die Anätze wieder zur Inkubation bei RT für 20min in die PCR-Maschine gestellt. Um die Bindereaktion nicht zu stören, wurde auf das Hinzupipettieren von Loading-Buffer verzichtet.

Tabelle 13: Grundansatz der Bindereaktionen

Bindepuffer (vgl. Tabelle 14)	4µl (für 5x Puffer) bzw. 5µl (für 4x Puffer)
Poly (dl-dC)• poly (dl-dC)	(vgl. Tabelle 14, rechte Spalte)
Proteinlösung	Zwischen 10 µg und 20 µg
Aqua dest.	Ad 20 µl
Vorverdünnte ³² P-markierte Sonde	2µl

Tabelle 14: Überblick über die verwendeten Bindepuffer

Puffer	Zusammensetzung des Puffers	Poly (dl-dC)• poly (dl-dC)
Puffer 1a (5x)	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 250mM NaCl; 2,5mM DTT; 20% Glycerol; 2,5mM EDTA; 5mM MgCl ₂ (*)	2µl mit 1µg/µl
Puffer 1b (5x)	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 250mM NaCl; 2,5mM DTT; 20% Glycerol; 2,5mM EDTA	2µl mit 1µg/µl

Puffer 1c (5x)	200 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1000 mM NaCl; 10 mM DTT; 20% Glycerol; 2,5 mM EDTA; 5mM MgCl ₂ (*)	2µl mit 1µg/µl
Puffer 1d (5x)	50mM Tris-HCl (pH 7,5); 250mM NaCl; 2,5mM DTT; 20% Glycerol; 0,5mM EDTA; 5mM CaCl ₂	2µl mit 1µg/µl
Puffer 1e (5x)	50mM Tris-HCl (pH 7,5); 250mM NaCl; 2,5mM DTT; 20% Glycerol; 0,5mM EDTA; 5mM ZnCl ₂	2µl mit 1µg/µl
Puffer 2 (5x)	100 mM HEPES (pH 7,9); 250 mM KCl; 5mM DTT; 25% Glycerol; 2,5 mM EDTA; 0,5% NP-40; 5 mg/ml BSA	2µl mit 0,5µg/µl
Puffer 3 (5x)	62,5 mM HEPES (pH 7,9); 250 mM KCl; 2,5 mM DTT; 50% Glycerol; 2,5 mM EDTA; 5 mM MgCl ₂	4µl mit 1µg/µl
Puffer 4 (5x)	100 mM HEPES (pH 7,9); 500 mM KCl; 2,5 mM DTT; 50% Glycerol; 2,5 mM EDTA; 0,5 mg/ml BSA (vgl. Strand 2000, S. 621)	1µl mit 0,5µg/µl

* neben den angegebenen EDTA und MgCl₂-Konzentrationen wurden – als Variation – verwendet: 50 mM EDTA bzw. 25 mM MgCl₂. Die angegeben 5x bzw. 4x Konzentrate der Puffer wurden in ausreichender Menge auf Eis pipettiert und in Aliquots zu ca. 10µl bei –20°C gelagert.

2.4.5 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Zur Detektion der Bildung von DNA-Protein-Komplexen wurden die Ansätze aus 2.4.4 durch vertikale nicht denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) in einer kühlbaren Gelkammer mit doppeltem (äußerem und inneren) Pufferreservoir (Owl Separation Systems) aufgetrennt. Hierzu wurden mit Hilfe zweier Glasplatten (20cm x 20cm, 5mm Dicke; Owl Separation Systems) 4,75%-ige Polyacrylamidgele mit 20 Taschen und 1,5 mm Dicke gegossen (Sambrook 1989), wobei je nach Wahl des Laufpuffers (0,5x TBE bzw. 1x TGE) nach den Angaben der Tabelle 15 bzw. 16 verfahren wurde. Die Gellösungen wurden jeweils vor dem Hinzufügen von TEMED und APS über eine 50 ml Spritze mit aufgesetzter Filtrierkanüle von Luftblasen gereinigt. Die Glasplatten sowie Abstandhalter wurden vor Verwendung mit 70% EtOH und A.d. gereinigt, die Platte mit den „Öhrchen“ wurde auf der später zum Gel weisenden Seite mit Acrylease-Spray (Stratagene) vorbehandelt und nach ca. 2 min mit einem feuchten Wischtuch poliert, um ein Zerreißen des Gels beim Ablösen der Platten zu verhindern. Die Taschen des Gels wurden vor dem Auftrag der Proben mit einer Kanüle parallel ausgerichtet und durch Ausspülen mit einer 5ml-Spritze von Verunreinigungen befreit.

Das Beschicken der Taschen mit den Ansätzen aus 2.4.4 erfolgte ohne Verwendung von Auftragspuffer, so daß eine mögliche Interferenz mit den DNA-Protein-Komplexen ausgeschlossen werden konnte; um für alle Ansätze eine ungefähr gleiche Inkubationszeit von ca. 20min zu gewährleisten, wurde dabei die gleiche Reihenfolge eingehalten wie vorher beim Hinzupipettieren der „probe“ zu den einzelnen Ansätzen.

Die Elektrophorese erfolgte mit 0,5x TBE bzw. 1x TGE als Laufpuffer bei konstanter Spannung von 300 – 350V, wobei die Gelkammer mittels eines Kühlsystems (LKB Bromma 2219 MULTITEMP II Throstatic Circulator) auf +4°C temperiert wurde. Nach ca. 1h 15min wurde das Gel aus der

2 Material und Methoden

Apparatur genommen, mit Blotting-Paper (Schleicher&Schuell) von den Glasplatten abgehoben, mit Frischhaltefolie (Dow Saran Barrier food wrap) überzogen und unter Vakuum auf dem bereits während des Gellaufs auf 70-80°C vorgeheizten Geltrockner für 1 – 2 h getrocknet.

Tabelle 15: Gellösung für ein 0,5x TBE Polyacrylamid-Gel

10x TBE	15 ml
30% Acrylamid / Bis Solution, 19:1	47,5 ml
Glycerin (50%)	15 ml
Aqua dest.	Ad 300 ml
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (=TEMED)	255 µl
Ammoniumperoxodisulfat (= APS) - (30%)	600 µl

Tabelle 16: Gellösung für ein 1x TGE Polyacrylamid-Gel

5 x TGE	60 ml
30% Acrylamid / Bis Solution, 19:1 ³	47,5 ml
Glycerin (50%)	15 ml
Aqua dest.	Ad 300 ml
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (=TEMED)	255 µl
Ammoniumperoxodisulfat (= APS) - (30%)	600 µl

1x TGE: 50 mM Tris, 400 mM Glycin, 2mM EDTA

0,5x TBE: 44,5 mM Tris, 44,5 mM Borsäure, 1mM EDTA

2.4.6 Autoradiographie

Zum Sichtbarmachen der Gel-Banden durch Autoradiographie wurde in einer Kassette (SIEMENS, Rubin, high definition, 24 x 30 cm) ein Film (HyperfilmTM MP, amersham pharmacia biotech) so auf dem getrockneten Gel plaziert, daß sowohl unter dem Gel als auch über dem Film jeweils eine Verstärkerfolie zu liegen kam. Der Film wurde in dieser Vorrichtung für 2 – 48 h bei Raumtemperatur oder zur Verstärkung bei –20°C oder –80°C belichtet und dann entwickelt.

³ Für einige Gele wurde versuchsweise auch ein Vernetzungsgrad 60:1 gewählt.

2.5 Auswertung und Statistik

Für die Ermittlung der Interferon-induzierten Hemmung der Firefly-Luciferase Aktivität in den Reporter-Gen-Assays wurde die prozentuale Restaktivität der Firefly-Luciferase Aktivität in IFN-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt und von 100% subtrahiert; die Firefly-Luciferase Aktivität wurde dabei durch Bildung des Quotienten mit der Renilla-Luciferase Aktivität normalisiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Angabe der jeweiligen Standardabweichung (SD) dargestellt; n steht für die Anzahl der unabhängigen Versuche bei den verschiedenen Experimenten. Beim Vergleich mehrerer Meßwerte wurde zur Berechnung der Signifikanzen ein zweiseitiger Student's t-Test für unabhängige Stichproben verwendet, wobei Werte von $p < 0,05$ als statistisch signifikant bewertet wurden. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des EXCEL 97-Programmpakets (Microsoft, Unterschleissheim) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Transfektionsexperimente

Zur Analyse der Wirkung von Typ I-Interferonen auf die Genregulation des HBV wurde in einem Transfektionssystem zunächst mit folgendem Luciferase-Reportergen-Assay gearbeitet: im Testplasmid *pGL3HBVadw6/9* wurde das Luciferase-Reporter-Gen unter die Kontrolle der HBV Enh I, Enh II und des core promoter gestellt, die eine Schlüsselstellung in der Genregulation des HBV einnehmen. Zwei verschiedene Hepatomzell-Linien (HepG2 und HuH7) wurden mit diesem Testplasmid und der Deletionsmutante *pRLE7*, die als Insert nur noch eine minimale, stark trunkierte HBV-Region enthielt, als interner Kontrolle kotransfiziert. Nach Inkubation der transfizierten Zellen mit verschiedenen Typ I-Interferonen unter unterschiedlichen Bedingungen bezüglich Inkubationszeit und Konzentration und anschließender passiver Lyse wurde mittels eines Biolumineszenz-Assays die jeweilige Luciferase-Expression untersucht, wobei die Firefly-Luciferase-Aktivität durch Bildung des Quotienten mit der Renilla-Luciferase-Aktivität des Referenzplasmids normalisiert wurde.

3.1.1 Rahmenbedingungen des Transfektionssystems

3.1.1.1 Abhängigkeit von den Transfektionsbedingungen

Zur Etablierung optimaler Transfektionsbedingungen hinsichtlich einzusetzender Gesamt-DNA-Menge und Transfektionsreagens für die weiteren Experimente wurden HuH7-Zellen mit unterschiedlichen Mengen eines Firefly-Luciferase-Testplasmid-Konstruktes (*pGL3HBVadw6/9*) unter Verwendung unterschiedlicher Mengen Effectene (QIAGEN, Hilden) transfiziert; 72h nach der Transfektion wurde die jeweilige Firefly-Luciferase-Aktivität der Lysate bestimmt.

Dabei zeigte sich einerseits, daß die Höhe der Luciferase-Expression in einem direkten Verhältnis zur verwendeten Menge Plasmid stand, andererseits, daß bei jeweils gleicher eingesetzter Plasmidmenge mit geringeren Mengen Effectene-Reagens höhere Aktivitäten erzielt wurden (vgl. Abb. 11).

Deshalb wurden, in der Absicht, ein möglichst günstiges Verhältnis zwischen der benötigten Menge Plasmid und der erzielten Aktivität zu erreichen, für die weiteren Versuche 0,3µg Gesamt-DNA (je 0,15µg Testplasmid und 0,15µg Referenzplasmid) und 2µl Effectene-Reagens eingesetzt.

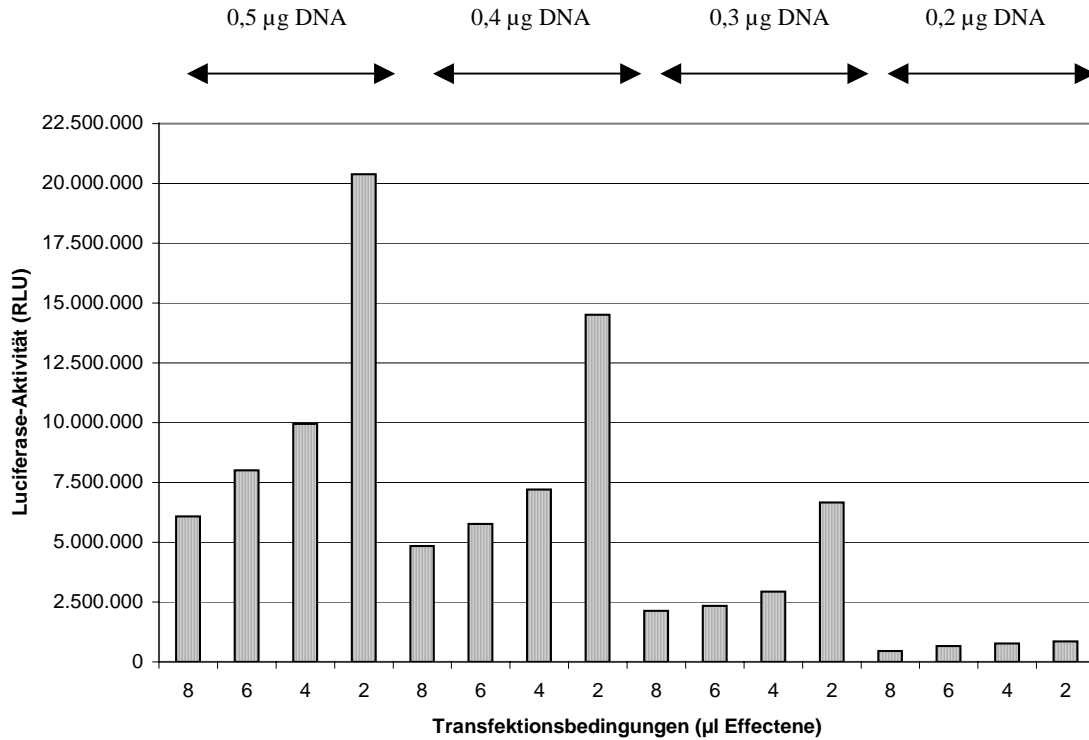


Abb. 11: Zusammenhang zwischen Transfektionsbedingungen (Menge [µg] DNA sowie Menge [µl] Effectene Transfektionsreagens) und Firefly-Luciferase-Expression [RLU] nach 72h in mit *pGL3HBVadw6/9* transfizierten HuH7-Zellen; dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, wobei pro Experiment jeweils vier parallele Versuche durchgeführt wurden.

3.1.1.2 Transfektionseffizienz

Um in allen weiteren Versuchen einheitliche Transfektions-Bedingungen sicher zu stellen, wurde routinemäßig mittels der β -Galaktosidase-Methode die Transfektionseffizienz bestimmt. Diese lag typischerweise im Bereich zwischen 20-25%.

Abbildung 12 zeigt ein repräsentatives Gesichtsfeld transfizierter und mit β -Gal gefärbter HuH7-Zellen.

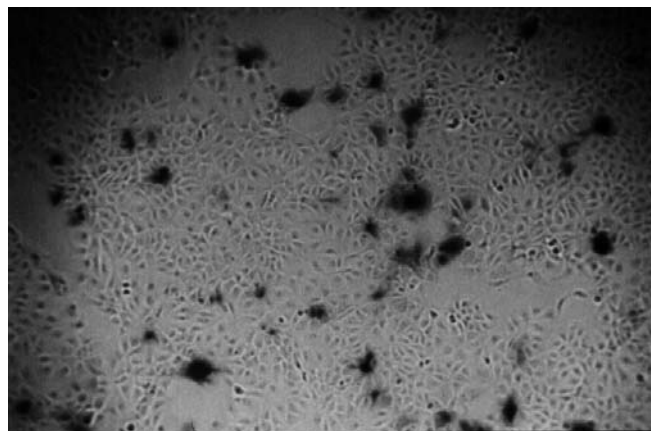


Abb. 12: Kontrolle der Transfektionseffizienz mittels der β -Gal-Methode in HuhH7-Zellen: Die hier dunkel dargestellten Zellen (im Original: blau) repräsentieren die erfolgreichen transfizierten und erlauben durch Zählen und Berechnung des Quotienten mit den nicht gefärbten Zellen die Abschätzung der Transfektionseffizienz.

3.1.2 Allgemeine Charakterisierung der Wirkung von IFN

3.1.2.1 IFN-vermittelte Wirkung in Abhängigkeit von der Dosis

Um eine allgemeine Charakterisierung der Wirkung von Typ I-Interferonen in unserem experimentellen System vornehmen zu können, wurden in einer ersten Reihe von Versuchen zunächst HuH7-Zellen mit *pGL3HBVadw6/9* und *pRLE7* kotransfiziert und für 18h mit IFN α 2b (50 U/ml und 250 U/ml) behandelt.

Dabei zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine deutliche Reduktion der Firefly-Luciferase-Expression bzw. des Quotienten (Firefly / Renilla-Luciferase); die beobachtete Hemmung (siehe Abbildung 13), berechnet als der durch IFN induzierte prozentuale Abfall des Quotienten F/R, betrug 31,71% vs. 40,63%.

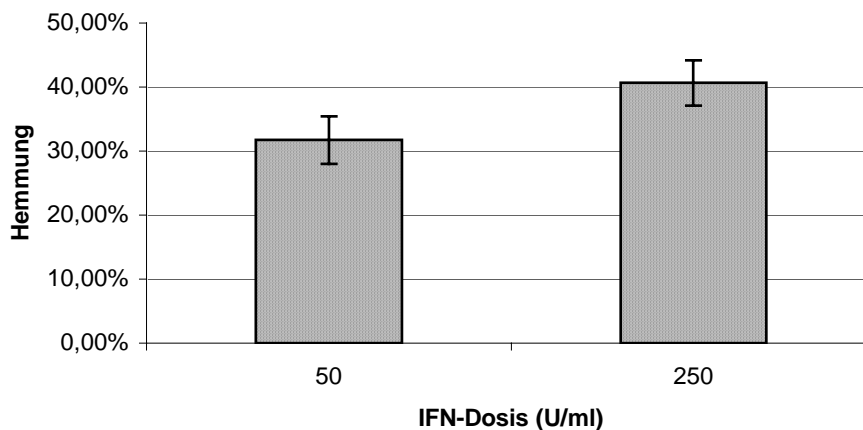


Abb. 13: Inhibition der HBV Enh I, II und core promoter-regulierten Transkription durch IFN α 2b in HuH7-Zellen; die Hemmung entspricht der durch IFN-Behandlung induzierten prozentualen Reduktion des Quotienten Firefly Luciferase / Renilla Luciferase im Vergleich zum Ausgangswert in unbehandelten Zellen (Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten \pm SD; pro Experiment und Bedingung wurden drei parallele Einzelversuche durchgeführt).

3.1.2.2 IFN-vermittelte Wirkung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Um die optimale Inkubationsdauer mit IFN zu ermitteln, wurden HuH7-Zellen mit *pGL3HBVadw6/9* und *pRLE7* kotransfiziert und für verschiedene Zeiträume mit IFN α 2b (50 U/ml bzw. 250 U/ml) inkubiert. Im Gegensatz zu den kürzeren Inkubationszeiten (< 12h) liessen sich nach 24h bei beiden gewählten Konzentrationen bereits spezifische Hemmungen im Bereich von 30% (27% bzw. 31%) nachweisen. Diese ließen sich durch 48h-Inkubation zwar noch weiter steigern, insbesondere bei einer Konzentration von 50 U/ml jedoch nur unwesentlich (siehe Abbildung 14).

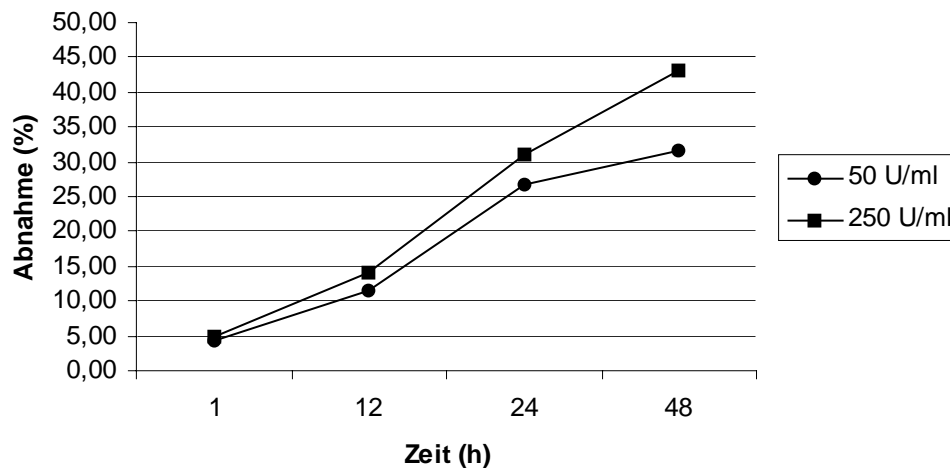


Abb. 14: Inhibition der HBV Enh I, II und core promoter-regulierten Transkription durch IFN $\alpha 2b$ in HuH7-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit IFN $\alpha 2b$ (50 bzw. 250 U/ml); dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchsreihen, bei denen die HuH7-Zellen jeweils parallel ausgesät und transfiziert und dann für die angegebenen Zeiten mit IFN inkubiert wurden; bei jeder Versuchsreihe wurden pro Zeitpunkt die Werte aus drei unabhängigen wells einer 6well Platte gemittelt.

Für die weiteren Experimente wurde eine Inkubationszeit von 48h gewählt, die sich auch in anderen bereits publizierten Transfektionsversuchen mit Hepatomzellen bewährt hatte (Romero 1996)

3.1.2.3 Vergleich verschiedener IFN-Subtypen

Zum Vergleich der Wirkung verschiedener Typ I-IFN-Subtypen wurden HuH7-Zellen analog zu den bisherigen Versuchen mit dem Plasmid *pGL3HBV Δ w6/9* und dem Referenzplasmid *pRLE7* kotransfiziert und für 48h anstelle von IFN $\alpha 2b$ mit IFN $\alpha 5$, $\alpha 8$, $\alpha 17$ bzw. β in einer Konzentration von jeweils 0,25 ng/ml inkubiert.

Dabei war die mit IFN $\alpha 2b$ beobachtete Inhibition der HBV Enh I, II und core promoter-gesteuerten Transkription auch bei Verwendung der anderen Typ I-Interferone in einer vergleichbaren Größenordnung reproduzierbar (siehe Abbildung 15). IFN $\alpha 5$ wies den schwächsten Effekt aller getesteten Interferon-Subtypen auf (mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$); demgegenüber waren IFN $\alpha 8$ und IFN β am stärksten wirksam.

Um darüber hinaus den Effekt der Kombination verschiedener Interferone zu analysieren, wurden zur Inkubation der transfizierten Zellen IFN $\alpha 2b$, $\alpha 8$, $\alpha 17$ bzw. β in einer Dosis von 0,25 ng/ml additiv jeweils mit IFN $\alpha 5$ ebenfalls in einer Dosis von 0,25 ng/ml kombiniert, so dass sich eine Gesamt-IFN-Konzentration von 0,5 ng/ml ergab.

Bei dieser Ko-Inkubation mit IFN $\alpha 5$ konnte keine signifikante Steigerung der bereits durch IFN $\alpha 5$, $\alpha 8$, $\alpha 17$ bzw. β allein induzierten Inhibition beobachtet werden (siehe Abbildung 15).

3 Ergebnisse

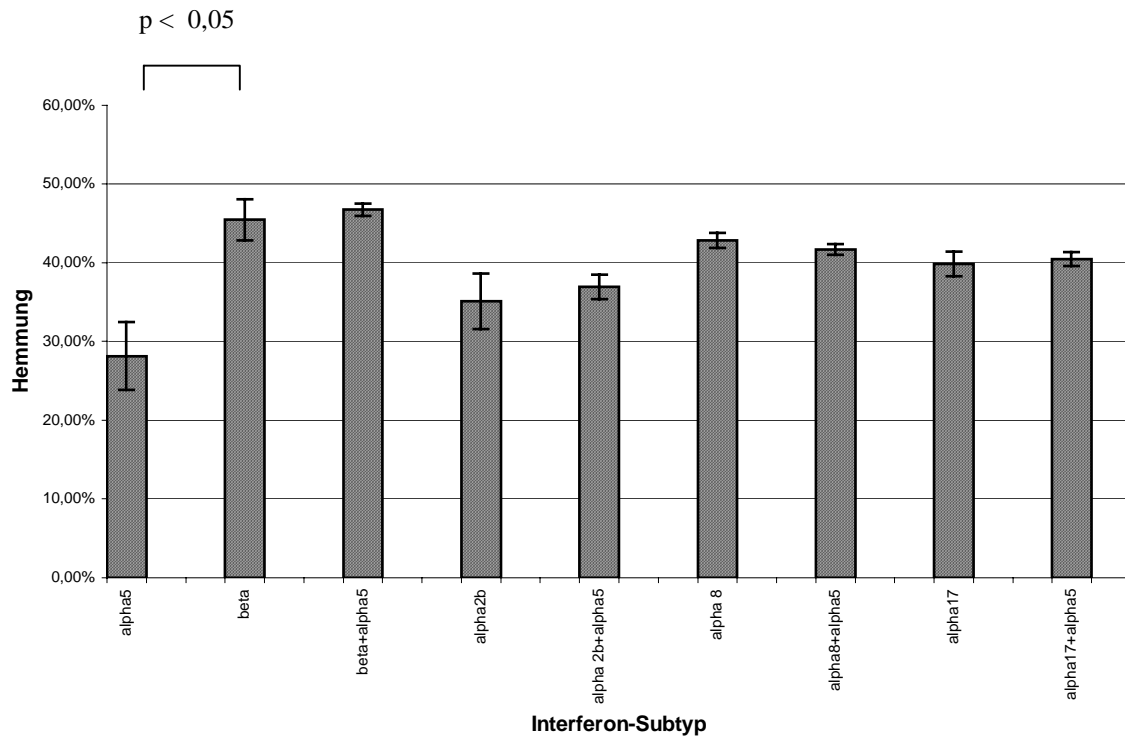


Abb. 15: Inhibition der HBV Enh I, II und core promoter-regulierten Transkription durch 48h Inkubation mit verschiedenen Typ I-IFN-Subtypen (0,25 ng /ml) bzw. durch Ko-inkubation mit verschiedenen Typ I-IFN-Subtypen und IFN α 5 (Gesamtkonzentration 0,5 ng/ml) in HuH7-Zellen; dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchsreihen (Mittelwerte \pm SD), wobei pro Versuchsreihe für jede Bedingung drei parallele Versuche angesetzt wurden.

3.1.2.4 Protein-Bestimmung und Zytotoxizität

Um eine allgemein antiproliferative oder toxische Wirkung der Inkubation mit IFN auf die transfizierten Zellen auszuschließen, wurden HuH7-Zellen für 48h mit IFN α 8, das einen besonders starken inhibitorischen Effekt auf die untersuchten genregulatorischen HBV-Elemente gezeigt hatte (siehe 3.1.2.3), inkubiert, lysiert und im Vergleich zu nicht behandelten Zellen kolorimetrisch auf ihren Proteingehalt und mittels eines MTS-Assays auf ihre mitochondriale Funktion untersucht.

In einem Dosisbereich von 50 – 250 U/ml war keine wesentliche Interferon-induzierte Reduktion der Proteinkonzentration der zellulären Extrakte festzustellen, die jeweils in der Größenordnung von ca. 30 mg/dl lag. Ebenso zeigte sich bei der Untersuchung der antiproliferativen Wirkung von IFN α 8 mittels des MTS-Assays keine entscheidende Änderung der gemessenen Absorption.

3.1.3 Unterschiede zwischen HepG2 und HuH7-Zellen

Um zu ermitteln, ob in verschiedenen Hepatomzelllinien Unterschiede bezüglich der IFN-vermittelten Wirkung vorlagen, wurden neben HuH7-Zellen auch HepG2-Zellen zunächst mit *pGL3HBV_{adv6/9}*, das die HBV Wildtyp-Sequenz enthält, und *pRLE7* kotransfiziert und für 48h mit 250 U/ml IFN α 2b behandelt.

Bei Verwendung dieses Plasmids („Wildtyp“) war in HepG2-Zellen eine deutlich niedrigere Hemmung nachzuweisen als in HuH7-Zellen (6,58% vs. 36,40%, siehe Abbildung 16). Wurde hingegen das Plasmid *pGL3HBV_{adv6/9-Nco/3}* verwendet, bei dem das Start-Codon des HBV-X-Proteins, eines promiskuitiven Transaktivators, deletiert worden war (sog. „Xminus-Mutante“), so zeigte sich auch in HepG2-Zellen eine Hemmung, die in etwa so groß war wie in HuH7-Zellen (31,51%). In HuH7-Zellen hingegen war bei Transfektion mit dem Wildtyp-Plasmid und der Xminus-Variante kein Unterschied bezüglich der IFN-induzierten Hemmung festzustellen (36,40% vs. 36,63%, siehe Abbildung 16, rechte Hälfte).

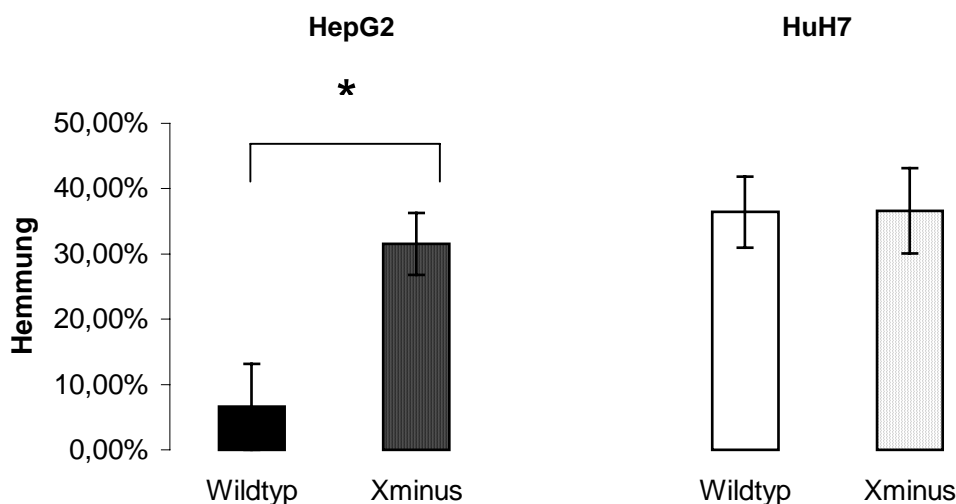


Abb. 16: In HepG2 (linke Hälfte) bzw. HuH7 (rechte Hälfte) durch 250 U/ml IFN α 2b induzierte Hemmung der Firefly-Luciferase-Aktivität (berechnet als Quotient Firefly / Renilla Luciferase) bei Verwendung von jeweils *pGL3HBV_{adv6/9}* (Wildtyp) und des HBx-Gen-defizienten Plasmids *pGL3HBV_{adv6/9-Nco/3}* (Xminus). Dargestellt sind die Mittelwerte aus insgesamt drei (HepG2), sechs (HuH7, Wildtyp) bzw. vier (HuH7, Xminus) unabhängigen Experimenten, wobei pro Experiment und Bedingung jeweils mindestens drei parallele Versuche angesetzt wurden (Mittelwert +/- SD; * $p < 0,01$).

Bei den weiteren Transfektions-Experimenten wurde deshalb ausschließlich mit HuH7-Zellen gearbeitet.

3.1.4 Identifizierung einer für die IFN-Wirkung notwendigen Region in der HBV-Enh I, II, c/p-Sequenz

Um eine spezifische Region innerhalb der HBV (Enh I, II und core promoter)-Sequenz einzugrenzen, die für die Vermittlung der in unserem System beobachteten Typ I-Interferon-Wirkung erforderlich war, wurden in HuH7-Zellen Transfektionsexperimente mit sog. „Deletionsmutanten“ durchgeführt, die durch vom 5'-Ende ausgehende Deletion verschieden langer Abschnitte des HBV-Inserts der Plasmide *pGL3HBVadw6/9* bzw. *pGL3HBVadw6/9-Nco*/3 hergestellt wurden.

Abbildung 17 gibt einen Überblick über die Deletionsmutanten, die von *pGL3HBVadw6/9* abgeleitet wurden.

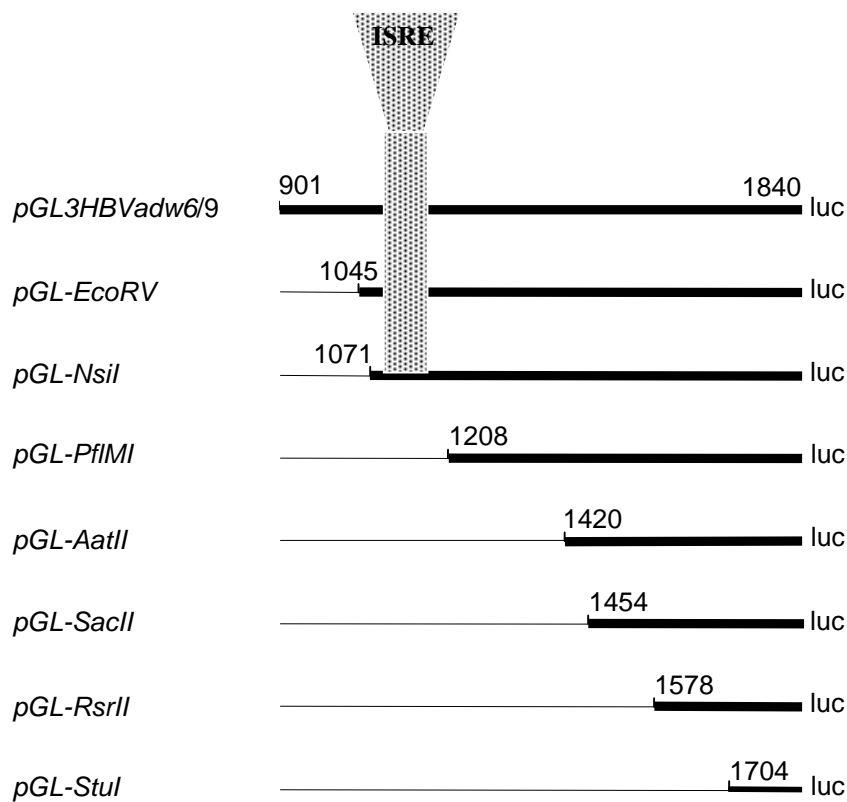


Abb. 17: Überblick über *pGL3HBVadw6/9* und die daraus abgeleiteten Deletionsmutanten (benannt nach den verwendeten Restriktionsendonukleasen); die fetten Balken stehen für das HBV-Insert der jeweiligen Konstrukte, die Zahlen links davon geben den Beginn des Inserts im HBV-Genom an, luc steht für das Firefly-Luciferasegen, der punktierte Bereich (ISRE) gibt die Lage des sog. interferon stimulierbaren Response Element innerhalb des HBV-Inserts an (bp 1085 – 1099). Es wird deutlich, dass das Insert der Deletionsmutanten konsekutiv vom 5'-Ende her verkürzt ist. In *pGL-PfIMI* und allen folgenden Deletionsmutanten fehlt im Insert der Bereich, der das ISRE-Motiv enthält.

3.1.4.1 (Relative) Promoterstärke der Deletionsmutanten

Durch sequentielle Verkürzung der genregulatorischen Enhancer- und Promoterabschnitte mittels Herstellung von Deletionsmutanten nahm die Basisexpression (d.h. ohne IFN-Behandlung) der jeweiligen Firefly-Luciferase-Konstrukte (berechnet als Quotient F/L) in den transfizierten HuH7-Zellen

im Vergleich zum Wildtyp-Plasmid deutlich ab (s. Abb. 18). Setzte man die Luciferase-Expression in mit dem Wildtyp-Plasmid transfizierten HuH7-Zellen als 100%, so betrug die Expression in den letzten, d.h. am meisten deletierten Mutanten jeweils unter 20% des Ausgangswertes. Die Rohwerte der Firefly-Luciferase-Expression (in RLU) lagen jedoch auch im niedrigsten Fall noch im sechsstelligen Bereich und somit deutlich über den Werten, die bei Transfektion mit dem promoterlosen Plasmid pGL3 erzielt wurden.

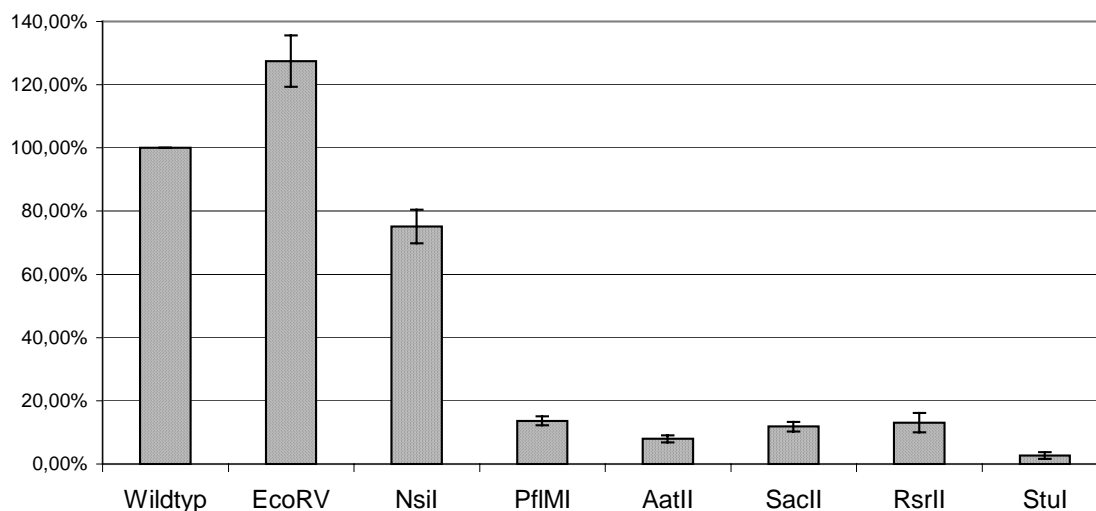


Abb. 18: Relative Promoterstärke der verschiedenen von *pGL3HBVadw6/9* abgeleiteten Deletionsmutanten in HuH7-Zellen; die auf die Renilla-Luciferase normalisierte Aktivität des Wildtyp-Plasmids wurde als 100% vorgegeben, und die Aktivitäten der anderen Plasmide prozentual darauf bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus insgesamt sieben unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm SD).

3.1.4.2 IFN-Wirkung auf die Deletionsmutanten

HuH7-Zellen wurden mit den genannten Deletionsmutanten transfiziert und für 48h mit 250 U/ml IFN α 2b bzw. β inkubiert. Anschließend wurde wiederum mittels des Dual Luciferase Assay die jeweilige Luciferase-Aktivität gemessen und die Interferon-induzierte Hemmung der Luciferase-Expression der einzelnen Deletionsmutanten bestimmt.

Es zeigte sich, daß die Interferon-induzierbare Hemmung, sowohl bei Verwendung von IFN α 2b als auch β , bei allen Deletionsmutanten, die noch über die HBV-Region nt 1578 – nt 1703 verfügten, nicht nennenswert abfiel, sondern konstant im ursprünglichen Bereich von über 40% blieb. Lediglich bei der Mutante, der auch dieser Abschnitt fehlte (*pGLStul*) kam es jeweils zu einem deutlichen Abfall der Hemmung auf ca. 13% (siehe Abbildungen 19a und b).

Auch bei Verwendung analoger, von der Xminus Mutante abgeleiteter Deletionsmutanten kam es zu entsprechenden Ergebnissen (siehe Abbildungen 19c und d).

3 Ergebnisse

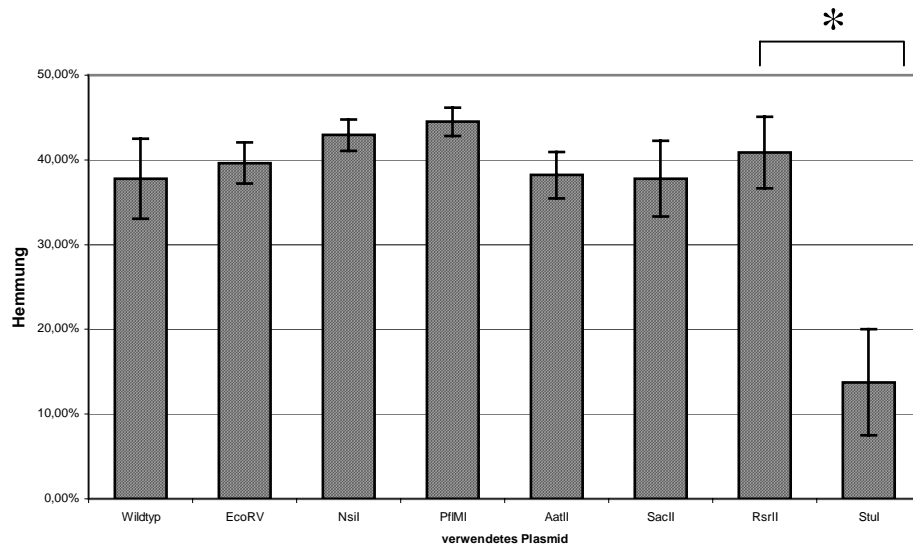


Abb. 19a: Inhibition der HBV-regulierten Transkription in mit *pGL3HBVadw6/9* und den daraus abgeleiteten **Deletionsmutanten** transfizierten HuH7-Zellen durch 48h Inkubation mit **250 U/ml IFN α 2b**; dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit jeweils drei parallelen Versuchen pro Experiment und Bedingung (Mittelwert +/- SD; * $p < 0,0001$).

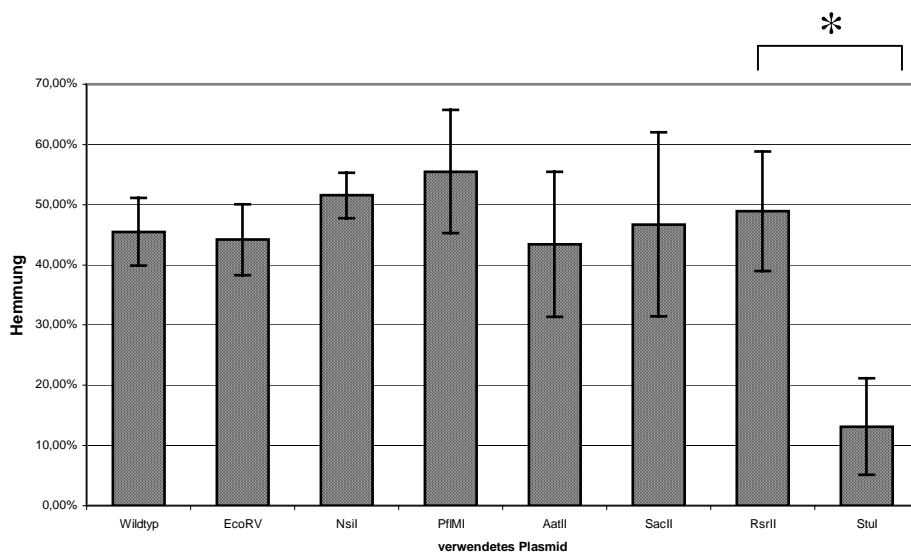


Abb. 19b: Inhibition der HBV-regulierten Transkription in mit *pGL3HBVadw6/9* und den daraus abgeleiteten **Deletionsmutanten** transfizierten HuH7-Zellen durch 48h Inkubation mit **250 U/ml IFN β** ; dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit jeweils drei parallelen Versuchen pro Experiment und Bedingung (Mittelwert +/- SD; * $p < 0,0001$).

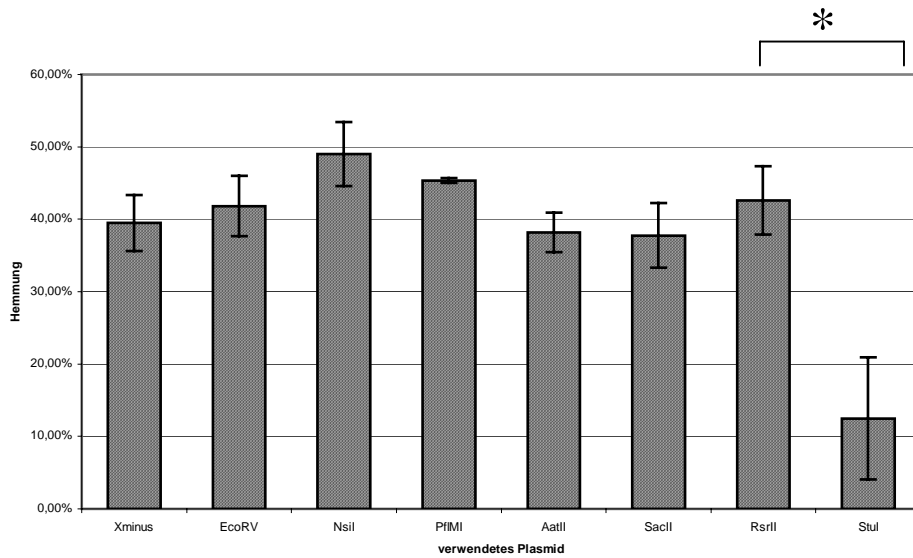


Abb. 19c: Inhibition der HBV-regulierten Transkription in mit *pGL3HBVadw6/9-Nco*³ und den daraus abgeleiteten **Deletionsmutanten** transfizierten HuH7-Zellen durch 48h Inkubation mit **250 U/ml IFN α 2b**; dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit jeweils drei parallelen Versuchen pro Experiment und Bedingung (Mittelwert +/- SD; * $p < 0,0001$).

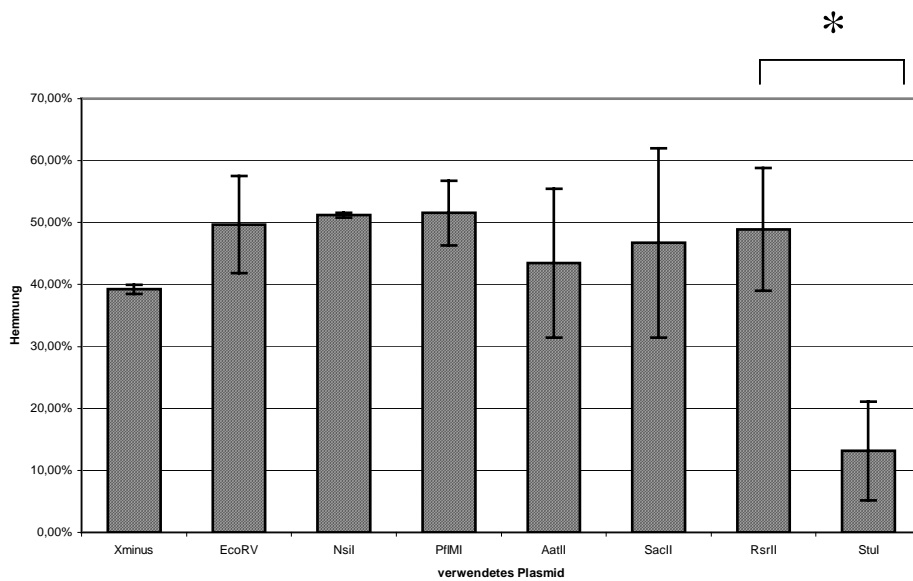


Abb. 19d: Inhibition der HBV-regulierten Transkription in mit *pGL3HBVadw6/9-Nco*³ und den daraus abgeleiteten **Deletionsmutanten** transfizierten HuH7-Zellen durch 48h Inkubation mit **250 U/ml IFN β** ; dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit jeweils drei parallelen Versuchen pro Experiment und Bedingung (Mittelwert +/- SD; * $p < 0,0001$).

3.2 Ergebnisse der EMSAs

Zur genaueren Analyse der Interferonwirkung auf die HBV-Enhancer I, II und core promoter-regulierte Transkription wurden mittels EMSAs nukleäre Extrakte aus mit verschiedenen Konzentrationen IFN behandelten Hepatomzellen (HuH7) auf Veränderungen bezüglich ihres Gehalts an DNA-bindenden Proteinen, sprich nukleären Faktoren, untersucht. Dies geschah unter der Annahme, daß sich die in den Transfektionsexperimenten beobachteten Ergebnisse (siehe 3.1) durch die (direkte / indirekte) Wirkung von Interferon auf DNA-bindende nukleäre Proteine erklären, die ihrerseits an die regulativen HBV-Sequenzen binden und so die hemmende IFN-Wirkung vermitteln.

3.2.1. Kontrollversuche zur Etablierung des Systems

Um die Funktionstüchtigkeit des experimentellen Systems hinsichtlich Markierung der Sonde, Bindebedingungen, Gel und insbesondere Qualität der nukleären Extrakte sicher zu stellen, wurden zunächst einige Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) durchgeführt, in denen neben unseren eigenen Extrakten (unbehandelt, 0 U/ml IFN) zur Kontrolle verschiedene kommerziell erhältliche Säugetier-Zell-Extrakte (HeLa, Ratten-Leber, THP-1) eingesetzt und mit einer kommerziell erhältlichen Sonde inkubiert wurden; die Sonde enthielt das Bindemotiv des nukleären Faktors OCT1, eines Mitglieds der OCT-Familie von Transkriptionsfaktoren, die in Säugetierzellen ubiquitär vorkommen, so daß, intakte nukleäre Extrakte und experimentelle Bedingungen vorausgesetzt, mit einer funktionierenden Bindereaktion zu rechnen war.

Wie die Abbildung eines repräsentativen EMSA illustriert (siehe Abbildung 20), fand in der Tat sowohl in den Kontrollextrakten als auch in unseren eigenen Extrakten jeweils eine spezifische Protein-DNA-Interaktion statt, erkennbar an den geschifteten Banden. Die jeweiligen Banden liessen sich durch Verwendung eines molaren Überschusses unmarkierten OCT1-Oligonukleotids verdrängen, während ein Überschuss eines unspezifischen unmarkierten Oligonukleotids (SP1) keine vergleichbare Wirkung zeigte.

Bei Verwendung von nukleärem Extrakt aus A431-Zellen und einer C/EBP-Sonde ließ sich mittels eines der Bindereaktion hinzugefügten polyklonalen Rabbit-Antikörpers gegen C/EBP β von der Ratte (das sich vom entsprechenden humanen Protein nur durch eine Aminosäure unterscheidet) auch nachweisen, daß in unserem System das Phänomen des Supershifts demonstriert werden kann (vgl. Abbildung 21).

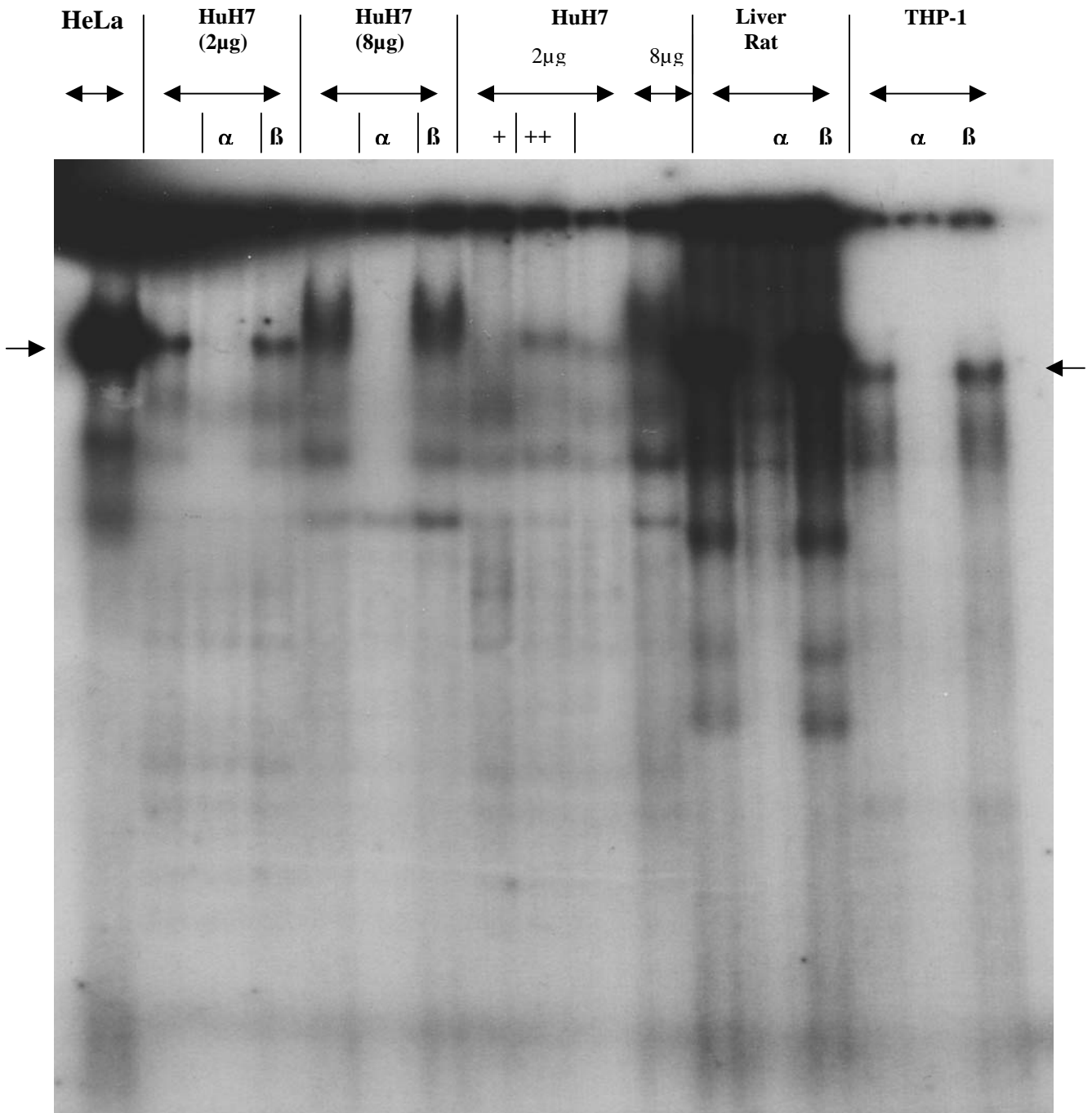
EMSA: Nukleäre Extrakte aus verschiedenen Zellen + OCT1

Abb. 20: Autoradiographie eines repräsentativen EMSAs (Belichtung: 6h), bei dem nukleäre Extrakte aus verschiedenen Zellen (HeLa, 10µg; HuH7, 2µg, 8µg [präpariert nach Methode A]; Ratten-Leber, 20µg; THP-1, 3µg) mit einer **OCT1-Sonde** inkubiert wurden (Bindepuffer 1a (1x); „+“ : + 0,5 µl NP40 (1%); „++“ : + 1,2µl Glycerol (50%)); die Auftrennung der Komplexe von der freien Sonde erfolgte über ein 4,75% Polyacrylamid-Gel (AA:Bis = 19:1) in **0,5x TBE** bei 350V; in den mit α bzw. β gekennzeichneten Ansätzen wurde der Bindereaktion zur **Kompetition** ein molarer Überschuß an unmarkierter **OCT1-** bzw. **SP1-Sonde** hinzugefügt. Der Pfeil kennzeichnet die geschiftete Hauptbande; das den ungebundenen markierten Oligos entsprechende Signal ist auf der Abbildung nicht mehr dargestellt.

3 Ergebnisse

A431 + C/EBP (+ Anti-C/EBP-AK): Super-Shift

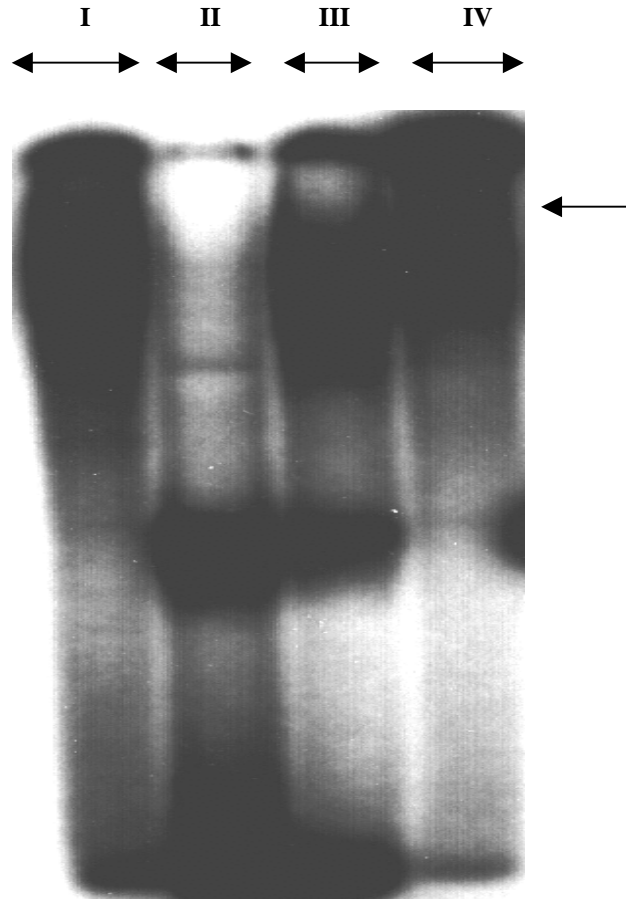


Abb. 21: Autoradiographie eines repräsentativen EMSAs (Belichtung: 6h), bei dem kommerziell erhältliche nukleäre Extrakte aus einer humanen Epidermoid-Karzinom-Zell-Linie (A431, 12µg) mit einer C/EBP-Sonde inkubiert wurden (Bindepuffer 4 (1x)); die Auftrennung der Komplexe von der freien Sonde erfolgte über ein 4,75% Polyacrylamid-Gel (AA:Bis = 19:1) in 0,5x TBE bei 350V; lane 1 entspricht dem unmodifizierten Grundansatz, in lane 2 wurde zur Competition unmarkiertes C/EBP-Oligo hinzugefügt, lane 3 zeigt die Competition mit einem mutierten C/EBP-Oligo, in lane 4 wurde zur Demonstration des Phänomens des **Supershift** ein polyklonaler **Antikörper gegen C/EBPβ** (2µl; C/EBP β(C-19) X TransCruz Antibody : sc-150 X; Santa Cruz Biotechnology) in den Ansatz miteinbezogen. Der Pfeil (->) indiziert die Lage der Supershift-Bande.

3.2.2 Versuche mit verschiedenen regulativen HBV-Abschnitten als Sonden

3.2.2.1 Ergebnisse mit der gesamten HBV-Region nt 1578 – 1704 (RS) als Sonde

3.2.2.1.1 Ausgangsversuche

Mit dem Ziel, geshiftete Banden nachzuweisen, die nur in Extrakten aus behandelten (bzw. unbehandelten) Zellen zu identifizieren oder zumindest in behandelten Zellen stärker (bzw. schwächer) ausgeprägt waren, wurden verschiedene Mengen von Extrakten aus HuH7-Zellen (3µg, 10µg, 20µg), die für 48h mit verschiedenen Dosen IFN α 2b (0, 250, 750, 1500 U/ml) behandelt worden waren, mittels EMSA auf ihr DNA—Bindeverhalten hin untersucht; dabei wurde als Sonde zunächst das Oligonukleotid RS verwendet, das dem Teil der regulativen HBV-Sequenzen entsprach, der sich in den Transfektionsexperimenten als kritisch für die Vermittlung der IFN-Wirkung erwiesen hatte. Die Bindebedingungen wurden dabei durch Verwendung sechs verschiedener Bindepuffer systematisch variiert.

In allen so durchgeführten Experimenten ließ sich jeweils eine spezifische Bandenbildung nachweisen; die jeweiligen Banden liessen sich durch Verwendung eines Überschusses unmarkierter RS-Sonde signifikant abschwächen (siehe Abb. 22, Konkurrenz in den mit * markierten Spuren). Unter allen gewählten Bedingungen konnte jedoch weder ein qualitativer noch ein quantitativer Unterschied im Bandenmuster zwischen Extrakten aus behandelten und unbehandelten Zellen gefunden werden. Gelegentlich wurden, bedingt durch leichte Unregelmäßigkeiten in der Breite der einzelnen lanes, minimale Unterschiede in der Stärke einzelner Banden beobachtet, die jedoch in weiteren Versuchen nicht reproduzierbar waren. Dieses Ergebnis war unabhängig von der verwendeten Präparationsmethode der nukleären Extrakte und auch unabhängig von den angewandten Gelbedingungen (0,5xTBE vs. 1xTGE). Abbildung 22 zeigt die Autoradiographie eines repräsentativen Gels, das exemplarisch (Bindepuffer 4 (1x)) die in behandelten (hier : 250 U/ml IFN α 2b) und unbehandelten Zellen (HuH7, präpariert hier nach Methode B) im Prinzip identische Bildung von geshifteten Banden illustriert .

Analog hierzu ließen sich diese Ergebnisse auch bei Verwendung von IFN β (250 U/ml) reproduzieren (siehe Abbildung 22, rechtes Drittel).

3.2.2.1.2 Untersuchung spezieller nukleärer Faktoren

In einigen Versuchen aus dieser Reihe (mit RS als radioaktiv markierter Sonde) wurde den Bindereaktionen ein molarer Überschuss nicht markierter Oligonukleotide mit den Bindemotiven bekannter nukleärer Faktoren (SP1, NF1, CREB, C/EBP) zur Konkurrenz hinzugefügt. Dadurch liess sich sowohl in unbehandelten als auch in behandelten Zellen jeweils keine Abschwächung der beobachteten Banden induzieren, wie im Gel aus Abb. 22 für SP1, NF1 und CREB illustriert.

3 Ergebnisse

Einigen Ansätzen wurde versuchsweise ein polyklonaler Antikörper gegen C/EBP β hinzugefügt; dadurch ließ sich – im Gegensatz zu den Befunden in einem entsprechenden Kontrollansatz (siehe Abbildung 21) - kein Supershift der beobachteten Banden bewirken (keine Abbildung).

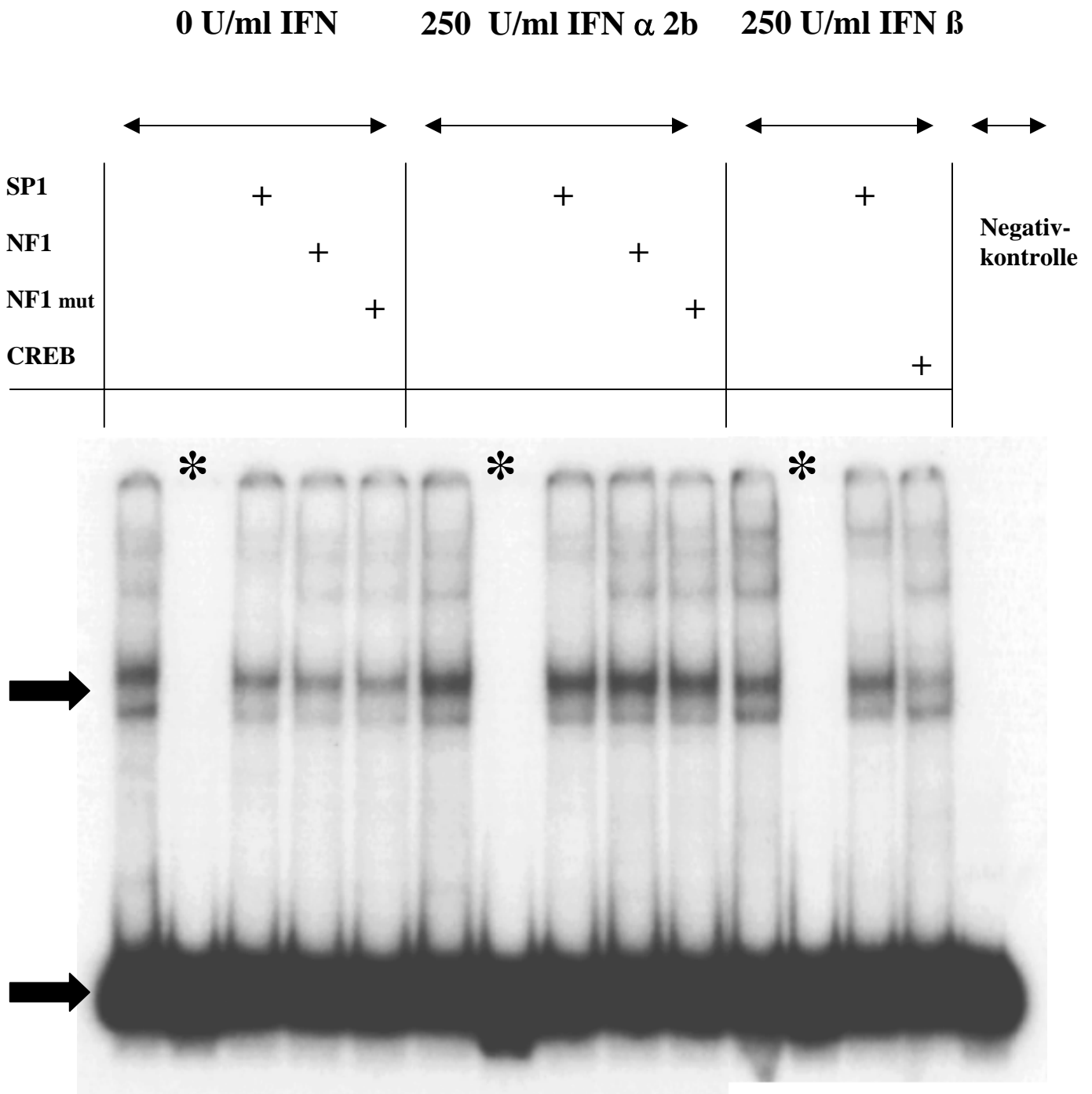
EMSA: Nukleärer Extrakt aus HuH7-Zellen + Sonde „RS“

Abb. 22: Autoradiographie eines repräsentativen EMSAs (Belichtung: 6h), bei dem nukleäre Extrakte (10 μ g, präpariert nach Methode B) aus **HuH7**-Zellen (unbehandelt, *links*; 250 U/ml IFN α 2b, *Mitte*; 250 U/ml IFN β , *rechts*) mit der Sonde **RS** inkubiert wurden (Bindepuffer 4 (1x)); die Trennung der Komplexe (*oberer Pfeil ->*) von der freien Sonde (*unterer Pfeil ->*) erfolgte über ein 4,75% Polyacrylamid-Gel (AA:Bis = 19:1) in 0,5x TBE bei 350V; in den mit * gekennzeichneten Spuren wurde unmarkierte Sonde RS zur Konkurrenz hinzugefügt; in den mit + gekennzeichneten Spuren wurden zur Konkurrenz die aus der Tabelle ersichtlichen unmarkierten Oligonukleotide zur Konkurrenz hinzugefügt; die äußerste rechte Spur repräsentiert eine Negativkontrolle (nur markierte Sonde ohne nukleären Extrakt).

3 Ergebnisse

3.2.2.2 Ergebnisse mit kurzen Sonden (GS)

In einer weiteren Serie von Experimenten wurden wiederum nukleäre Extrakte aus für 48h mit IFN α 2b (0, 750 U/ml) behandelten Hepatomzellen (HuH7) eingesetzt, anstatt der gesamten Sequenz RS wurden als Sonde nun jedoch vier verschiedene kürzere Teilabschnitte der RS-Sequenz (GS1 – GS4) als Sonden verwendet. Auch bei diesem Versuchsdesign ließen sich unter systematischer Variation der Versuchsbedingungen (zwei verschiedene Präparationsmethoden, unterschiedliche eingesetzte Mengen Protein, fünf verschiedene Bindepuffer; Gel : 0,5xTBE vs. 1xTGE) keine konsistenten und reproduzierbaren Unterschiede im Bandenmuster zwischen Extrakten aus behandelten und unbehandelten Zellen nachweisen.

Abbildung 23 zeigt exemplarisch die Autoradiographie eines repräsentativen Gels aus dieser Versuchsreihe, im konkreten Fall mit HuH7-Zellen (unbehandelt, A vs. 750 U/ml IFN α 2b, B; 3 μ g, präpariert nach Methode A) und den Sonden GS1, GS2, GS3, GS4.

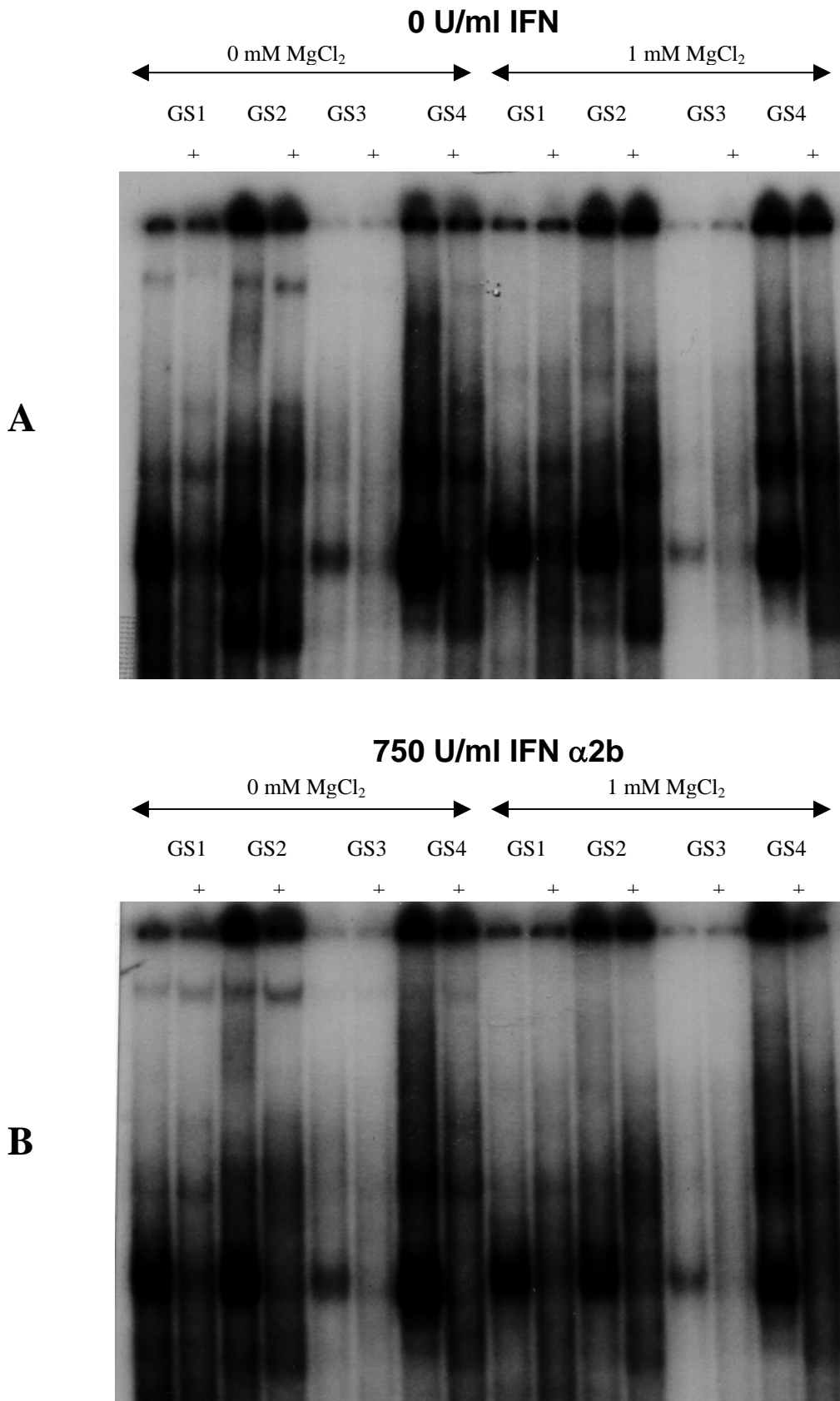


Abb. 23: Autoradiographie eines repräsentativen EMSAs (Belichtung: 2h), bei dem nukleäre Extrakte ($3\mu\text{g}$, präpariert nach Methode A) aus **HuH7**-Zellen (unbehandelt, A; 750 U/ml IFN α 2b, B) mit den Sonden **GS1-4** inkubiert wurden (Bindepuffer 1b (1x), linke Hälfte; Bindepuffer 1a (1x), rechte Hälfte; siehe Angaben); die Trennung der Komplexe von den ungebundenen Sonden erfolgte über ein 4,75 % Polyacrylamid-Gel (AA:Bis = 19:1) in 0,5 x TBE bei 350V ; in den mit + gekennzeichneten Spuren wurde zur Konkurrenz die jeweilige Sonden in molarem Überschuss als unmarkiertes Oligonukleotid dem Ansatz hinzugefügt.

4. Diskussion

Durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Reporteragen-Assays ließ sich eindeutig eine inhibitorische Wirkung von Typ I-Interferonen auf die Enhancer I, II und core promoter-regulierte Transkription des Hepatitis B-Virus demonstrieren. Mittels Deletionsanalysen und EMSAs konnte weiterhin genauer Einblick gewonnen werden in die dabei beteiligten Signaltransduktionswege, wobei insbesondere eine für die IFN-Wirkung kritische HBV-DNA-Region eingegrenzt werden konnte.

Diese Resultate werden im folgenden i) kritisch zu Ergebnissen der veröffentlichten Literatur in Beziehung gesetzt (siehe 4.1 und 4.2) und ii) auf ihre Relevanz in Hinblick auf das gesamte Spektrum der Interferonwirkungen auf das Hepatitis B Virus bewertet (siehe 4.3). Hierbei erfolgt eine besondere Berücksichtigung der klinisch etablierten Wirksamkeit von IFN als therapeutischer Substanz bei chronischer Hepatitis B.

4.1 Typ I-Interferon-induzierte Inhibition regulativer HBV-Sequenzen

4.1.1 Allgemeine Diskussion und Besonderheiten der eigenen Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst, die Wirkung von Typ I-Interferonen auf die HBV-Enhancer I, II und core promoter-regulierte Transkription zu charakterisieren. Die hierfür gewählte humane Hepatomzelllinie (HuH7) stellt ein geeignetes, den *in vivo* Verhältnissen nahes experimentelles System dar: die untersuchten Enhancer-Elemente sind in HuH7 nachweislich aktiv (Su 1992, S. 2711), und HuH7 erlauben – bei Verwendung der gesamten genomischen HBV-DNA – sogar die Replikation des HBV-Genoms (Colgrove 1989, S. 4022; Yaginuma 1987); darüber hinaus ist auch die effektive Aktivierung IFN-spezifischer Signale in HuH7 nachgewiesen (Rang 1999, S. 793-4).

In Transfektionsexperimenten in diesem System ließ sich reproduzierbar sowohl dosis- als auch zeitabhängig eine spezifische Interferon-induzierte Inhibition der genannten regulativen HBV-Elemente (nt 901 – nt 1840) nachweisen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer veröffentlichter Arbeiten, wobei sich diese, mit Ausnahme von Romero *et al.* (Romero 1996), isoliert auf die IFN-Wirkung auf die Enhancer I-Region konzentrieren, während bei uns durch Verwendung der gesamten HBV Enhancer I, II und core promoter-Sequenz ein möglichst nativer Kontext geschaffen wurde.

Insbesondere durch die Berücksichtigung sowohl verschiedener Interferon-Dosen (50 – 250 U/ml) als auch unterschiedlicher Inkubationszeiten (1, 12, 24, 48h) konnte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit eine umfassendere Charakterisierung der IFN-Wirkung erzielt werden. Außerdem ließ sich durch Verwendung unterschiedlicher Typ I-IFN-Subtypen ($\alpha 5$, $\alpha 8$, $\alpha 17$, β) neben dem therapeutisch

hauptsächlich eingesetzten IFN α 2b eine gewisse Verallgemeinerung des Ergebnisses erreichen: dabei wurde der Effekt der als hochwirksam bekannten IFN-Typen α 2b, α 8, α 17, β (Foster 1996) durch Kombination jeweils mit IFN α 5, dem in der menschlichen Leber überwiegenden IFN α -Subtyp (Castelruiz 1999), nicht potenziert. Weiterhin wurde durch IFN β und auch IFN α 8 durchgehend eine geringfügig höhere Inhibition induziert als durch die anderen IFN-Subtypen. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund der für IFN β und auch α 8 beschriebenen alternativen Signaltransduktionswege interessant (Pellegrini 1989).

Die vorliegende Arbeit liefert - neben einer weiteren Arbeit, die nur 100 U/ml IFN einsetzte (Tur-Kaspa 1990, S. 1821) - als einzige Daten zur Wirkung von Interferon in einem vergleichsweise niedrigen Dosisbereich (50 – 250 U/ml vs. 750 – 1000 U/ml); hier ist in sehr viel geringerem Umfang mit zytotoxischen IFN-Wirkungen zu rechnen, so dass isoliert die Untersuchung der IFN-Wirkung auf der Transkriptionsebene möglich ist. Eine wesentliche Verfälschung des Ergebnisses durch zytotoxische IFN-Effekte oder eine allgemeine unspezifische IFN-induzierte Transkriptionshemmung konnte desweiteren durch Durchführung eines MTS-Zytotoxizitätsassays sowie Bestimmung des Proteingehaltes in den behandelten vs. unbehandelten Zellen ausgeschlossen werden; ähnliche Kontrolluntersuchungen fehlen in vielen der vergleichbaren Arbeiten (z.B. Tur-Kaspa 1990, Hamasaki 1992).

Die Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse wird auch dadurch erhöht, daß durch das Design der Versuche als Kotransfektionsexperimente Schwankungen bezüglich Zelldichte und Transfektionseffizienz als mögliche Störfaktoren wirkungsvoll ausgeschaltet werden konnten; nur in zwei der veröffentlichten Studien (Romero 1996, Nakao 1999) erfolgte ebenfalls eine Abgleichung der Ergebnisse durch Kotransfektionen, es wurde aber für die Test- und Referenzplasmide jeweils ein unterschiedliches Reportergensystem (Luc + CAT bzw. CAT + β -Gal) eingesetzt und nicht wie hier mit einem Dual-Luciferase-System gearbeitet, das eine besonders zuverlässige Normalisierung der Werte erlaubt. Als Besonderheit hervorzuheben ist auch das hier verwendete Referenzplasmid *pRLE7*, das nur noch ein rudimentäres HBV-Insert (nt 1793 – nt 1805) enthielt.

Als günstig zu bewerten sind ferner das verwendete moderne Reportergensystem (im Vergleich etwa zu CAT-basierten Assays), die schonende Transfektionsmethode (durch nicht-liposomale Lipide) sowie die geringen verwendeten Effectene-Mengen (2 μ l), durch die eine störende Beeinträchtigung der natürlichen Zellfunktion durch das Transfektionsreagens minimiert werden konnte.

4.1.2 Spezielle Diskussion im detaillierten Vergleich mit anderen Reporter-gen-Studien

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen in der Kernaussage mit denen anderer Reporter-gen-Studien aus der Literatur überein, im Detail ergeben sich jedoch z.T. durchaus beträchtliche Unterschiede, insbesondere bezüglich der Höhe des inhibitorischen Effektes und bezüglich der genauen Dosisabhängigkeit. Diese Unterschiede soll der folgende genaue Vergleich näher

4 Diskussion

analysieren, unter besonderer Berücksichtigung der zu Grunde liegenden methodischen Differenzen, die bereits angerissen wurden (einen Überblick hierzu gibt Tabelle 17).

Die erste verfügbare Reporter-Gen-Arbeit stammt aus dem Jahr 1990: **Tur-Kaspa et al.** transfizierten humane Hepatomzelllinien (PCL/PRF/5 bzw. Hep3B) mit CAT-Reporterplasmiden, in die HBV-Sequenzen verschiedener Länge inklusive des Enhancers I inkloniert waren, und behandelten sie jeweils mit 100 U/ml IFN α bzw. γ ; dabei zeigte sich in IFN α -behandelten Zellen (im Gegensatz zu den mit IFN γ behandelten Zellen) eine 4-5fache Reduktion der CAT-Expression; das gleiche Ergebnis wurde mit Plasmiden erzielt, die - analog zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konstrukten - eine längere HBV-Sequenz inklusive des Enhancers I und des core promoters enthielten (Tur-Kaspa 1990, S. 1821-2). Der von Tur-Kaspa beobachtete 4-5fache inhibitorische Effekt entspricht (in Prozent) einer Hemmwirkung, die - bei etwa gleicher IFN-Dosis - mit bis zu 80% deutlich über der 30-40%igen Hemmung in den Experimenten der vorliegenden Arbeit liegt. Aufgrund der unterschiedlichen Zelllinien (PCL/PRF/5 und Hep3B vs. HuH7), des unterschiedlichen zeitlichen Versuchsdesigns (IFN-Zugabe bereits nach 6h und Ernte 48h nach der Transfektion vs. IFN-Zugabe nach 18h und 48h Inkubation), der verschiedenen Transfektionsmethoden (Calciumphosphat-Präzipitationsmethode vs. Nicht-liposomale Lipide) sowie der unterschiedlichen Reporter-Gen-Assays (CAT vs. Luc) ist die direkte Vergleichbarkeit mit den hier vorgelegten Ergebnissen jedoch eingeschränkt. Möglicherweise liegt aber bei Tur-Kaspa auch eine gewisse Überschätzung des Interferon-Effektes vor, bedingt durch das Fehlen von Kotransfektionsansätzen. Zwar wurde mit mutmaßlich nicht Interferon-sensitiven Referenzplasmiden (mit der SV40 Promoter – pA₁₀CAT₂ - bzw. Promoter-Enhancer-Region – pSV₂CAT) gearbeitet, bei denen es i.d.T. zu keiner IFN-induzierbaren Inhibition der Transkription kam (Tur-Kaspa 1990, S. 1821) – genaue, quantitative Angaben fehlen - jedoch wurden diese Kontrollplasmide nicht in einer Kotransfektion in den eigentlichen experimentellen Ansätzen mitgeführt, sondern separat verwendet; dabei wurden zudem für die Transfektion der Testplasmide in der Mehrzahl der Versuche PLC/PRF/5-Zellen verwendet, für die Referenzplasmide jedoch ausschließlich Hep3B-Zellen (Tur-Kaspa 1990, S. 1822, Tabelle 1). Messungen bezüglich einer Veränderung des Proteingehalts der Hepatomzellen wurden nicht durchgeführt; jedoch konnte mittels eines CAT-Reporter-Plasmids, in dem das CAT-Gen unter die Kontrolle der 5'-regulatorischen Sequenzen des Interferon-induzierbaren 2'-5'-OAS-Gens gestellt worden war (pGEM-CAT-E), eine Hochregulation der CAT-Transkription demonstriert werden (Tur-Kaspa 1990, S. 1822). Ferner ließ sich in den Lysaten der IFN-behandelten Zellen eine Upregulation der IFN-induzierten 2'-5'-OAS beobachten (Tur-Kaspa 1990, S. 1822). Dies spricht gegen den Verdacht, die Interferon-Effekte liessen sich primär über eine allgemeine Transkriptions-Suppression erklären.

Die Ergebnisse von Tur-Kaspa *et al.* wurden in einer weiteren Reporter-Gen-Studie aus dem Jahr 1992 bestätigt, die der hier vorgelegten Arbeit bezüglich der verwendeten Zellen (HuH7) und der Inkubationsdauer (48h) näher steht, für die aber die gleichen methodischen Einschränkungen gelten: **Hamasaki et al.** führten - neben Experimenten mit einer humanen Hepatom-Zelllinie mit integriertem HBV-Genom (PLC/PRF/5), in der eine Interferon-induzierte Reduktion des HBs-Ags sowie der entsprechenden mRNA nachweisbar war (Hamasaki 1992, S. 906-7) - Transfektionsexperimente in HuH7-Zellen durch (Calcium-Phosphat-Methode). Dabei ergab sich bei 48h Behandlung mit 1000

U/ml IFN α (Angaben über den Subtyp fehlen) eine 44%-ige Reduktion (Standardabweichungen fehlen) der CAT-Expression des verwendeten Testplasmids (pHBE-CAT), das durch Einklonierung des HBV Enhancers in den Vektor pSV2-CAT konstruiert wurde, wobei sich – hier lag der eigentliche Schwerpunkt der Fragestellung - diese Suppression durch Ko-inkubation mit IL-1 β (100 U/ml) bzw. TNF- α (100 U/ml) synergistisch auf 79% bzw. 76% steigern ließ (Hamasaki 1992, S. 906-7). Diese Ergebnisse ließen sich auch reproduzieren, wenn anstelle von HuH7 die genannte Zelllinie mit integriertem HBV-Genom transfiziert wurde. Wie auch bei Tur-Kaspa (vgl. oben) wurde keine Normalisierung der Werte durch Kotransfektion eines Referenzplasmides durchgeführt. Zur Kontrolle wurde lediglich die IFN-Wirkung auf das Vektorplasmid pSV2-CAT (mit dem SV40 Enhancer) untersucht; dabei fand sich eine mit ca. 16% relativ hohe Suppression (Hamasaki 1992, S. 906), die angesichts der im Vergleich zu den Versuchen der hier vorgelegten Arbeit hohen IFN-Konzentration jedoch nicht überrascht.

Bezüglich der verwendeten Zellen, Konstrukte und anderer Parameter am ehesten mit den Versuchen der vorgelegten Arbeit vergleichbar sind Untersuchungen von **Romero und Lavine** aus dem Jahr 1996: sie führten primär in HepG2-, daneben auch in HuH7-Zellen Transfektionsexperimente (Calciumphosphatmethode) mit einem Reporterplasmid durch, in dem – analog zu unseren Konstrukten - ein Luciferasegen unter der Kontrolle der gesamten Enh I, II und core promoter-Sequenz des HBV stand (pHCL). Die Zellen wurden nach einem zeitlichen Schema, das nahezu dem in unserer Arbeit entspricht (Zytokinzugabe 16h nach Transfektion, Ernte wieder 48h später), mit verschiedenen Zytokinen, darunter auch IFN α in einer Dosis von 750 U/ml behandelt. Analog zu unserer Arbeit wurden die Ergebnisse durch Bezug auf ein kotransfiziertes Referenzplasmid (pTKCAT, ein CAT-Reporter-Plasmid mit dem Herpes simplex Virus Thymidin Kinase Promoter) normalisiert, ebenso fand eine Bestimmung des zellulären Proteingehalts statt (Romero 1996, S.18). Dabei ergab sich in HepG2 eine nahezu 50%-ige Hemmung der Luciferaseexpression. Angaben bezüglich des spezifischen IFN α -Subtyps, Versuche mit unterschiedlichen α -Subtypen und zur Dosis-Wirkungsbeziehung hingegen fehlen (Romero 1996, S. 19-20), Deletionsanalysen finden sich nur für TNF α , nicht jedoch für IFN (Romero 1996, S. 21).

Werte in einer ähnlichen Größenordnung liefern die aktuellsten verfügbaren Daten von **Nakao et al.**; sie führten u.a. in HuH7-Zellen Transfektionen (Lipofection-Methode) mit einem CAT-Reporterplasmid (pXEn-CAT) durch, das die HBV Enhancer 1 und X-Promoter-Region enthielt (Nakao 1999, S. 28076); bei Behandlung mit 1000 U/ml IFN α (48h) ließ sich, normalisiert auf den kotransfizierten β -Gal-Vektor (pSV- β -Gal), eine Hemmung von ca. 45% erreichen (Nakao 1999, S. 28077). Im Gegensatz zu unserer Arbeit zeigte sich bei niedrigeren Konzentrationen (10 - 100 U/ml) kaum eine nennenswerte Inhibition (Nakao 1999, S. 28077).

Tabelle 17: Überblick über die wesentlichen methodischen Unterschiede zwischen den verschiedenen veröffentlichten und den eigenen Reporter-Gen-Ansätzen

Arbeit	Zellen	Untersucher HBV-Abschnitt	IFN	Transfektions- Methode	Reporter- Gen	Referenz- Plasmid
Tur-Kaspa (1990)	PCL/PRF/5 Hep3B	Enh I	α (100 U/ml)	Calcium- Phosphat	CAT	\emptyset
Hamasaki (1992)	HuH7	Enh I	α (1000 U/ml)	Calcium- Phosphat	CAT	\emptyset
Romero (1996)	HepG2 HuH7	Enh I, II + core promoter	α (750 U/ml)	Calcium- Phosphat	Luciferase	CAT
Nakao (1999)	HuH7	Enh I + X promoter	α (1000 U/ml)	Lipofektion	CAT	β -Gal
Eigene Arbeit	HuH7 (HepG2)	Enh I, II + core promoter	α 2b, andere α - Subtypen; β (50 – 250 U/ml)	Nicht-liposomales Lipid- Transfektionsreagens	Luciferase (Firefly)	Luciferase (Renilla)

4.1.3 Bedeutung des HBV-X-Proteins für die inhibitorische IFN-Wirkung

Das von uns verwendete Ausgangs-Plasmid *pGL3HBV_{adv6/9}* enthielt neben den genannten regulativen HBV-Sequenzen auch das komplette HBV-X-Gen und dessen Promoter, so daß von einer Transkription unbekanntem Ausmaßes auszugehen war. Vor dem Hintergrund der bekannten Wirkung des X-Proteins als allgemeiner transkriptioneller Transaktivator (Andrisani 1999, Henkler 1996, Rossner 1992; siehe 4.1.3.1) sollte deshalb geklärt werden, inwieweit möglicherweise eine Interferenz des X-Proteins mit dem beobachteten inhibitorischen IFN-Effekt vorlag (siehe 4.1.3.2).

4.1.3.1 Allgemeine Bedeutung des HBV X-Proteins

Einer der vier sich überlappenden offenen Leserahmen (ORF) des HBV-Genoms kodiert für das sog. X-Protein (HBx), das nur bei den Orthohepadna-, nicht jedoch bei den Avihepadna-Viren vorkommt (Seeger 2000, S. 56). Es handelt sich wohl um ein kleines (17 kDa) lösliches intrazelluläres Protein (Colgrove 1989, S. 4019), dessen Funktion, wie der Name sagt, im Gegensatz zu den Proteinprodukten der anderen HBV-Gene noch nicht vollständig identifiziert ist. HBx scheint zwar für das Zustandekommen einer Infektion *in vivo* (Chen 1993, Zoulim 1994), nicht jedoch für die Virus-Replikation in transfizierten Zellen erforderlich zu sein (Blum 1992, S. 1226, Yaginuma 1987); bei Patienten mit chronischer Hepatitis B Infektion konnte sogar eine positive Korrelation zwischen X-Protein-Expression und Ausmaß der HBV-Replikation demonstriert werden (Haruna 1991, S. 420).

In mehreren Arbeiten (Seto 1988, Spandau 1988, Twu 1987) konnte gezeigt werden, daß das X-Protein als promiskuitiver Transaktivator der Genexpression wirkt und in verschiedenem zellulärem Kontext sowohl HBV-Promoter-Elemente als auch unspezifische Promotoren positiv reguliert; wurden Plasmide, in denen ein CAT-Reportergen unter der Kontrolle eines nicht-Hepadnavirus-Promoters oder des HBV enhancers und core promoters stand, gemeinsam mit für das HBV X-Protein kodierenden Plasmiden kotransfiziert, so ließ sich eine entsprechende X-Protein-abhängige Transaktivierung der CAT-Konstrukte beobachten. Diese Ergebnisse aus für eine HBV-Replikation nicht permissiven Zellen ließen sich auch in einem nativen Kontext, d.h. in Zellen, in denen eine HBV-Replikation möglich ist, reproduzieren (Colgrove 1989 S. 4022-4023). Es gibt Hinweise, z.B. aus Nuclear run-on transcription assays, daß die Aktivierung der Genexpression durch das X-Protein auf der Ebene der Transkription stattfindet (Colgrove 1989, S. 4024); dabei ist nicht eine unmittelbare Wirkung auf DNA-Ebene, sondern eine Wirkung über Protein-Protein-Interaktionen wahrscheinlich (Colgrove 1989 S. 4024-4025; Choi 1999, S. 2858), insbesondere, da dem X-Protein DNA-Bindemotive oder ein Signal für eine nukleäre Lokalisation fehlen (Melegari 1998, S. 1737). In diesen Zusammenhang paßt auch, daß für das X-Protein eine Protein-Kinasefunktion beschrieben wurde (Wu 1990).

Bezüglich der Bedeutung des HBx im Rahmen der chronischen Hepatitis B soll noch erwähnt werden, daß ihm, u.a. basierend auf Experimenten mit transgenen Mäusen (Kim 1991), eine Rolle bei der Genese des HCC zugeschrieben wird.

4.1.3.2 Bedeutung des HBV X-Proteins in Hinblick auf die IFN-Wirkung im untersuchten System

Bei unserem Wildtyp-Plasmid *pGL3HBVadw6/9* mußte bezüglich des HBV X-Proteins von einer Transkription unbekanntem Ausmasses ausgegangen werden (vgl. oben). Da das HBV X-Protein als promiskuitiver transkriptioneller Transaktivator betrachtet wird (siehe 4.1.3.1) und auch HBV-Genomabschnitte transaktiviert (Colgrove 1989, S. 4025), konnte eine mögliche Beeinflussung der beobachteten IFN-induzierten HBV-Inhibition nicht sicher ausgeschlossen werden. Zur genaueren Untersuchung dieses Problems wurde deshalb eine sog. X-defiziente Mutante (NcoI⁻-Mutante), bei der das X-Gen-Startkodon deletiert war, konstruiert und parallel zum Wildtypplasmid sowohl in HuH7 als auch HepG2-Zellen zur Transfektion eingesetzt.

In HuH7 konnte bei Verwendung dieser X-minus Mutante eine IFN-induzierte Hemmung erreicht werden, die auf dem gleichen Niveau lag wie beim Wildtypplasmid. Hier kam es also entweder nicht zu einer wesentlichen Beeinflussung des IFN-Effekts durch das X-Protein, oder das X-Protein lag nicht in aktiver Form vor oder wurde gar nicht exprimiert (siehe unten).

In HepG2 hingegen konnte nur mit der X-minus Mutante eine ähnlich hohe Hemmung wie in den HuH7-Zellen demonstriert werden, während das Wildtyp-Plasmid nur geringfügig inhibiert wurde. Dieses Ergebnis steht in gewissem Widerspruch zu den oben erwähnten Experimenten von Romero *et al.* Hier konnte in HepG2-Zellen kein Unterschied zwischen analogen Wildtyp- und Xminus-Konstrukten nachgewiesen werden. In ihrer Arbeit wurde zwar nicht die Hemmbarkeit durch IFN,

4 Diskussion

sondern durch $\text{TNF}\alpha$ (Romero 1996, S. 20) untersucht; da jedoch IFN und $\text{TNF}\alpha$ in Bezug auf die Inhibition der regulativen HBV-Sequenzen synergistisch wirken können (Hamasaki 1992), ist dieses Ergebnis dennoch auch im Rahmen unserer Fragestellung von Interesse.

In Bezug auf unsere Ergebnisse in HepG2 wäre es zwar denkbar, daß das Fehlen einer wesentlichen IFN-induzierten Inhibition beim Wildtypplasmid Folge einer „trans“ Beeinflussung des Referenzplasmides durch HBx und somit ein artifizielles Phänomen ist. Dennoch kann eine Interferenz des HBx mit der inhibitorischen IFN-Wirkung nicht sicher ausgeschlossen werden. Hierbei müßte man eine zum IFN-Effekt antagonistische Wirkung des HBx annehmen; dies würde nicht weiter überraschen, da HBx positiv regulatorisch, also entgegengesetzt zu IFN, in die HBV-Transkription eingreifen kann. Man könnte spekulieren, daß in HuH7 ein entsprechender antagonistischer Effekt nicht zu beobachten ist, weil dort eine andere Situation bezüglich des HBx vorliegt (vgl. oben) – etwa in Form eines nicht oder auf niedrigerem Niveau exprimierten oder inaktiven HBx. Diese Hypothese würde von den Ergebnissen einer Arbeit von Melegari *et al.* gestützt: in HuH7 bestand hier sowohl bezüglich sezernierter viraler Antigene¹ als auch bezüglich replikativer HBV-Intermediate kein Unterschied zwischen mit einem Wildtyp und einem X-Minus-HBV-Plasmid transfizierten Zellen; in HepG2-Zellen hingegen lagen die entsprechenden Parameter bei Verwendung der X-Minus-Mutante deutlich unter dem beim Wildtyp-Plasmid erreichten Niveau (Melegari 1998, S. 1741-2).

Einer zur IFN-induzierten Inhibition antagonistischen Wirkung des HBx, wie man sie aus den HepG2-Daten der vorgelegten Arbeit ableiten könnte, widersprechen Ergebnisse aus einer Arbeit von Lee *et al.*, die in einer konstitutiv HBx-exprimierenden murinen Hepatom-Zelllinie eine Jak1-STAT-Aktivierung nachweisen konnten (Lee 1998, S. 25513); wenn HBx also den gleichen Signaltransduktionsweg wie IFN aktivieren kann (siehe 4.2.1), sollte man eigentlich eine synergistische Verstärkung der IFN-Wirkung durch HBx und umgekehrt eine weniger stark ausgeprägte Inhibition bei der X-defizienten Mutante erwarten. Dies entspricht nicht den Ergebnissen in unserem System. Andererseits könnte man auch argumentieren, dass HBx mit IFN um den gleichen Signaltransduktionsweg konkurriert, was in der Summe, wie bei uns beobachtet, zu einem verringerten IFN-Effekt in Anwesenheit von HBx führen könnte.

Um eine wie auch immer geartete Interaktion von HBx mit den von uns primär untersuchten Effekten auszuschließen, wurden alle weiteren Versuche ausschließlich in HuH7-Zellen durchgeführt.

¹ Analoge Ergebnisse liegen auch aus einer Arbeit von Blum *et al.* vor (Blum 1992, S. 1223-4).

4.2 Signaltransduktion der Typ I-IFN-Wirkung auf die regulativen HBV-Sequenzen

Der suppressive Effekt von Typ I-Interferonen auf die HBV-gesteuerte Transkription in unserem experimentellem System ist also eindeutig etabliert und wird, von gewissen v.a. methodisch bedingten Differenzen abgesehen, auch von den aus der Literatur verfügbaren Daten untermauert (siehe 4.1).

Somit stellt sich konsequenterweise in einem nächsten Schritt die Frage nach der intrazellulären Vermittlung dieser Wirkung. Als Ausgangspunkt für die Diskussion dieser Fragestellung soll der allgemeine Signaltransduktionsmechanismus dienen, mittels dessen die Interferone als Reaktion auf Virusinfektionen einen generellen zellulären Abwehrzustand induzieren können (Foster 1997, S. 287-288); im Rahmen dieses sog. „antiviral state“ wird die Transkription vieler unterschiedlicher Gene (sog. interferon responsive genes oder interferon-stimulated genes = ISG) hochreguliert, die für verschiedene antiviral wirksame zelluläre Proteine wie die RNA-abhängige Proteinkinase R (dsRNA-dependent protein kinase = PKR) (Meurs 1990 und Samuel 1979), die Mx-Proteine (Staheli 1986) und die 2-5´Oligoadenylat-Synthetase (2-5´OAS) (Staheli 1990)² kodieren (genauer Überblick siehe Landolfo 1995, S. 421-423). Die hier genannten ISG sind nur die am längsten und besten bekannten, das gesamte Spektrum hat sich aber durch Untersuchungen in den letzten Jahren entscheidend erweitert und umfaßt insgesamt mehr als 300 Gene³ (de Veer 2001), die neben Proteinen mit antiviralen auch solche mit antiproliferativen oder immunmodulatorischen Eigenschaften kodieren.

Unabhängig davon, ob z.B. die genannten antiviral wirksamen Proteine wie MxA, PKR oder 2-5´OAS bei der hier untersuchten Wirkung von IFN auf die regulativen HBV-Sequenzen eine Rolle spielen, gibt der zu ihrer Induktion führende Signaltransduktionsmechanismus (siehe 4.2.1) Aufschluß darüber, wie allgemein das (extrazelluläre) IFN-Signal über eine Kaskade intrazellulärer Schritte in eine Wirkung auf der Ebene der DNA-Transkription übersetzt wird; dies ist für die weiteren Überlegungen im Rahmen unserer Fragestellung (siehe 4.2.2 und 4.2.3) von offensichtlicher Relevanz.

4.2.1 Allgemeiner bekannter Signaltransduktionsmechanismus der Typ I-Interferone

Die zu den Zytokinen zählende Substanz-Gruppe der Interferone lässt sich in die Typ I und Typ II-Interferone untergliedern. Diese unterscheiden sich nicht nur bezüglich der chromosomalen Lokalisation ihrer Gene (Chrom. 9 vs. 12; vgl. 1.3) und ihres unterschiedlichen Wirkungsschwerpunktes (primär antiviral vs. primär immunmodulatorisch), sondern insbesondere

² Diese wiederum aktiviert die RNase L aktiviert (Lengyel 1982, S. 265-6).

³ Eine Auflistung einer Vielzahl von ISG mit Einteilung in funktionelle Kategorien ist zu finden unter <http://www.lerner.ccf.org/labs/williams/>.

4 Diskussion

auch hinsichtlich ihrer Rezeptoren auf der Zelloberfläche und somit auch der jeweils nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden:

Während die Typ-I-Interferone IFN α und β miteinander um die Bindung an einen gemeinsamen Rezeptor, den Typ I-Interferon-Rezeptor (siehe 4.2.1.1), in Konkurrenz stehen, bindet IFN γ an einen separaten Rezeptor, den Typ II-Interferon-Rezeptor (Constantinescu 1994, S. 9602; Branca 1982). An die Rezeptor-Bindung schließt sich bei den Typ-I-Interferonen der klassische Jak-STAT-Weg (siehe 4.2.1.2) an, während es bei den Typ-II-Interferonen über grundsätzlich ähnliche, im Detail jedoch unterschiedliche Schritte letztlich zur Aktivierung sog. GAS (gamma aktivierende Sequenzen) in der DNA kommt (siehe hinten, Fußnote 6).

4.2.1.1 Der Typ I-Interferon-Rezeptor

Der Typ I-Interferon-Rezeptor oder auch IFN α/β -Rezeptor besteht, wie Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern zeigten (Colamonici 1990, 1992, 1993), aus (mindestens) zwei (jeweils einen cytoplasmatischen, transmembranären und extrazellulären Abschnitt aufweisenden) Untereinheiten, nämlich der α -Kette (IFNAR1: 110 kDa; 557 Aminosäuren) und der β -Kette (IFNAR2). Die β -Kette tritt in einer langen ($\beta_{L=Long}$ = IFNAR2c: 100 kDa; 515 Aminosäuren) und kurzen Form ($\beta_S =_{Short}$: 55 kDa; 331 Aminosäuren) auf, die jeweils identische extrazelluläre und transmembranöse, jedoch (abgesehen von den ersten 15 Aminosäuren) unterschiedliche zytoplasmatische Domänen haben (Domanski 1995, S. 21606 und S. 21610-21611; Domanski 1998, S. 3144). Sowohl die α als auch die β -Kette werden zur Familie der Klasse II Zytokin-Rezeptoren gerechnet (Uzé 1995, S. 16-17).

Zwei für diese beiden Interferonrezeptor-Komponenten kodierende cDNAs (IFNAR und IFN $\alpha\beta$ R) konnten Anfang der 90er Jahre kloniert werden; die entsprechenden Gene sind, wie auch die anderer Mitglieder der Class II cytokine receptor family, alle in der gleichen Region von Chromosom 21 lokalisiert (Uzé 1995, S. 4-5), im Fall des Gens für die α -Untereinheit auf 21q22.1 (Lutfalla 1990). Das Proteinprodukt der IFNAR cDNA, die Uzé *et al.* 1990 durch Transfer von humaner DNA in Mäusezellen und Selektion IFN-sensitiver transfizierter Zellen (Uzé 1990, S. 226) klonieren konnten (Uzé 1990, S. 227-230), entspricht dabei der α -Kette (Colamonici 1994); die β -Kette (bzw. ihre kurze Form β_S) wird kodiert von der IFN $\alpha\beta$ R cDNA (Domanski 1995, S. 21606), die Novick *et al.* 1994, ausgehend von einem aus dem Urin isolierbaren IFN-bindenden Protein, p40 (Novick 1994, S. 392), das der Ektodomäne einer membrangebundenen IFN-Rezeptor-Komponente entsprach (Novick 1994, S. 393), klonierten.

Für die Bildung vollständiger funktioneller Rezeptoren sind sowohl die α -Kette als auch die β -Kette Voraussetzung: Dabei ist die β -Kette die eigentliche IFN-bindende Untereinheit, wohingegen die α -Untereinheit für die Bildung hochaffiner Rezeptoren verantwortlich ist (Domanski 1995, S. 21611); beide Formen der β -Kette (β_S und β_L) können Interferone mit niedriger Affinität binden, für eine Bindung mit hoher Affinität ist jedoch zusätzlich noch die α -Kette erforderlich, die ihrerseits isoliert, in Abwesenheit der β -Untereinheit, keine IFN-Bindung zeigt (Nadeau 1999, S.4045). Für eine vollständige Funktionalität des Rezeptors in Hinblick auf die nachgeschaltete

Signaltransduktionskaskade (siehe 4.2.1.2) müssen sowohl die α - als auch die β_L -Kette vorhanden sein (Domanski 1998, S. 3144).

Diese beiden Rezeptoruntereinheiten sind auf der Zelloberfläche noch nicht präassoziiert, sondern verbinden sich erst in Anwesenheit des Liganden, also IFN, miteinander (Croze 1996, S. 33165 und Nadeau 1999, S.4045 und Russell-Harde 2000, S. 33165) und bilden in dieser dimerisierten Form den funktionell aktiven IFN-Rezeptor.

4.2.1.2 Der Jak-STAT-Signaltransduktionsweg

Der wesentliche Schritt, der auf die Rezeptor-Stimulation folgt, ist die Aktivierung latenter zytosolischer Transkriptionsfaktor-Untereinheiten aus der Familie der signal transducers and activators of transcription (= STATs), nämlich konkret von STAT 1 und STAT2. STAT1 existiert beim Menschen in zwei Isoformen: als STAT1 α (= p91) mit 750 AS und STAT1 β (= p84), dem die 38 Carboxy-terminalen AS fehlen (Schindler, Fu *et al.* 1992); STAT2 (=p113) umfaßt 851 AS (Fu, Schindler *et al.* 1992). STAT1 und STAT2 bilden nach ihrer Aktivierung Heterodimere und verbinden sich mit einem weiteren zellulären Faktor mit einem Molekulargewicht von ca. 48kDa, dem p48 (=interferon stimulated gene factor 3 γ), um so den heterotrimeren ISGF3 (interferon stimulated gene factor) zu bilden (Fu 1992; Schindler, Shuai *et al.* 1992). Dieser wird anschließend in den Nukleus transloziert, wo er mittels p48 als DNA-bindender Komponente an eine spezifische, allen Interferon-induzierbaren Genen gemeinsame Erkennungssequenz im 5' terminalen Abschnitt der ISGs bindet und ihre Expression transaktiviert. Dieses Erkennungsmotiv, das zuerst im 5'-Abschnitt der menschlichen Klasse I MHC sowie Metallothionein Gene (Friedman 1985) und in der Promoter-Region des murinen Klasse 1 H-2K Gens (Israel 1986) identifiziert wurde, wird auch als interferon stimuable response element (= ISRE) bezeichnet. Es weist die Konsensus-Sequenz 5'-GGAAANNGAAACT-3' auf und ist für die Vermittlung der IFN-Wirkung sowohl notwendig als auch hinreichend (Levy 1986).

Neben ISGF3 ist auch der Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) ein wichtiger von Typ I (und auch Typ II) Interferonen induzierter Faktor (Miyamoto 1988). Die Sequenz der IRF-1 Bindungsstelle (IRF-E) überlappt sich mit ISRE (Kimura 1996), so daß IRF-1 auch an die ISRE-Sequenz bindet (Reis 1992) und so die Interferon-induzierbare Genexpression aktiviert. p48 und IRF-1 weisen innerhalb ihrer aminoterminalen Regionen eine Homologie auf und gehören beide zur Familie der IRFs (Nguyen 1997); sie sind jedoch, zumindest teilweise, funktionell unterschiedlich, da für die Induktion einiger ISG p48 erforderlich ist und nicht durch IRF-1 kompensiert werden kann (Kimura 1996).

Die Aktivierung von STAT1 und STAT2 erfolgt wie auch bei anderen Mitgliedern der STAT-Familie über eine durch Tyrosinkinasen aus der Familie der Januskinasen⁴ (Jak) katalysierte Phosphorylierung; konkret sind die Enzyme Jak 1⁵ und Tyk2 beteiligt (Muller 1993, Velazquez 1992),

⁴ Die Bezeichnung als Januskinasen – in Anlehnung an den doppelköpfigen römischen Gott Janus – erfolgte aufgrund der Tatsache, daß sie über jeweils zwei potentielle Kinasedomänen verfügen.

⁵ Jak1 ist gemeinsame Komponente sowohl der IFN α/β - als auch der IFN γ -Signaltransduktion; demgegenüber ist Tyk2 IFN α/β -spezifisch. Am IFN γ -Weg ist neben Jak1 auch die IFN γ -spezifische Tyrosinkinase Jak2 beteiligt.

4 Diskussion

die im Fall von Tyk2 mit IFNAR1 (Velazquez 1992, Colamonici 1994, Yan 1996) und im Fall von Jak1 mit IFNAR2 (Novick 1994, S. 394; Domanski 1997) assoziiert sind.

Die Dimerisierung des IFN-Rezeptors (siehe 4.2.1.1) induziert eine intra- und intermolekulare Phosphorylierung und damit Aktivierung der Jak Kinasen (Nadeau 1999, S. 4051) (vgl. Abb. 24). Man nimmt an, daß die so aktivierten Kinasen die Rezeptorketten und anschließend die STATs an C-terminalen Tyrosinresten phosphorylieren (Croze 1996, S. 33165, Constantinescu 1995, S. 10487, Constantinescu 1994, S.9606), was eine Interaktion der SH2-Domäne des einen STATs mit dem phosphorylierten Tyrosin eines anderen STATs erlaubt und die Grundlage für die STAT-Oligomerisierung bildet (Usacheva 2001, S. 22948). Die Aktivierung von STAT1 scheint dabei einer vorhergehenden Aktivierung von STAT2 zu bedürfen (Leung 1995). Einen Überblick über die Schritte Rezeptordimerisierung und STAT-Aktivierung gibt in vereinfachter und schematisierter Form die Abbildung 24.

Der exakte Mechanismus, wie (und in welcher Reihenfolge) die STATs dabei mit den Rezeptor-Proteinen bzw. den Tyrosinkinase interagieren – insbesondere die Frage, inwieweit die STATs an ganz bestimmte Phosphotyrosinreste innerhalb des Rezeptorkomplexes rekrutiert werden (Ransohoff 1998) bzw. bereits mit dem Rezeptor präassoziiert vorliegen (Usacheva 2001, Russell-Harde 2000), ist gegenwärtig noch Gegenstand intensiver Forschung und geht über den Rahmen der hier vorgelegten Arbeit hinaus. Es sei nur auf folgendes hingewiesen: Für die Rezeptor- α -Kette ist eine Bindungsstelle für STAT2 beschrieben, die zwei phosphorylierte Tyrosine umfaßt (Tyr⁴⁶⁶ und Tyr⁴⁸¹), an die STAT2 mittels einer SH2-Domäne andocken kann (Russell-Harde 2000, S. 23981); für die Rezeptor- β -Kette sind zwei Bindestellen beschrieben worden; die eine ist eine konstitutive, phosphorylierungs-unabhängige Bindestelle, für die eine Präassoziation mit STAT1 und STAT2 aufgezeigt wurde, wobei für eine effektive STAT2-Aktivierung zusätzlich eine zweite, phosphorylierungs-abhängige Bindestelle erforderlich ist (Russell-Harde 2000, S. 23981-2). Für STAT1 wurde kürzlich eine funktionell bedeutsame Interaktion mit der β -Kette des IFN-Rezeptors berichtet, die über das sog. RACK1 (= Recceptor for Activated C Kinase)-Protein zustande kommt (Usacheva 2001, S. 22948 und 22952).

Im Gegensatz zu den exakten Vorgängen bei der Interaktion zwischen Rezeptor und STATs, die noch Gegenstand intensiver Forschung sind, ist der weitere Jak-STAT-Weg fest etabliert; es hat sich herausgestellt, daß die Schritte über Jak-Aktivierung, STAT-Phosphorylierung sowie Oligomerisierung bis hin zur Gen-Aktivierung - mit jeweils verschiedenen Jaks und STATs - neben den Interferonen⁶ von verschiedenen anderen Cytokinen (IL-2,3,4 etc.), Wachstumsfaktoren (G-CSF etc.) und Hormonen (Erythropoetin, Prolactin) benutzt werden (einen Überblick gibt Foster 1997, S. 292, Tabelle 1). Der Jak-STAT-Weg kann somit als paradigmatisch für einen für verschiedenste biologische Botenstoffe zentralen Signaltransduktionsmechanismus gelten (Ransohoff 1998).

⁶ Bei IFN γ etwa kommt es nach Aktivierung von Jak1 und Jak2 zu einer Phosphorylierung von p91, das Homodimere, den sog. GAF (Gamma-activating factor), bildet; dieser wiederum bindet dann an sog. GAS (Gamma aktivierende Sequenzen) in der DNA.

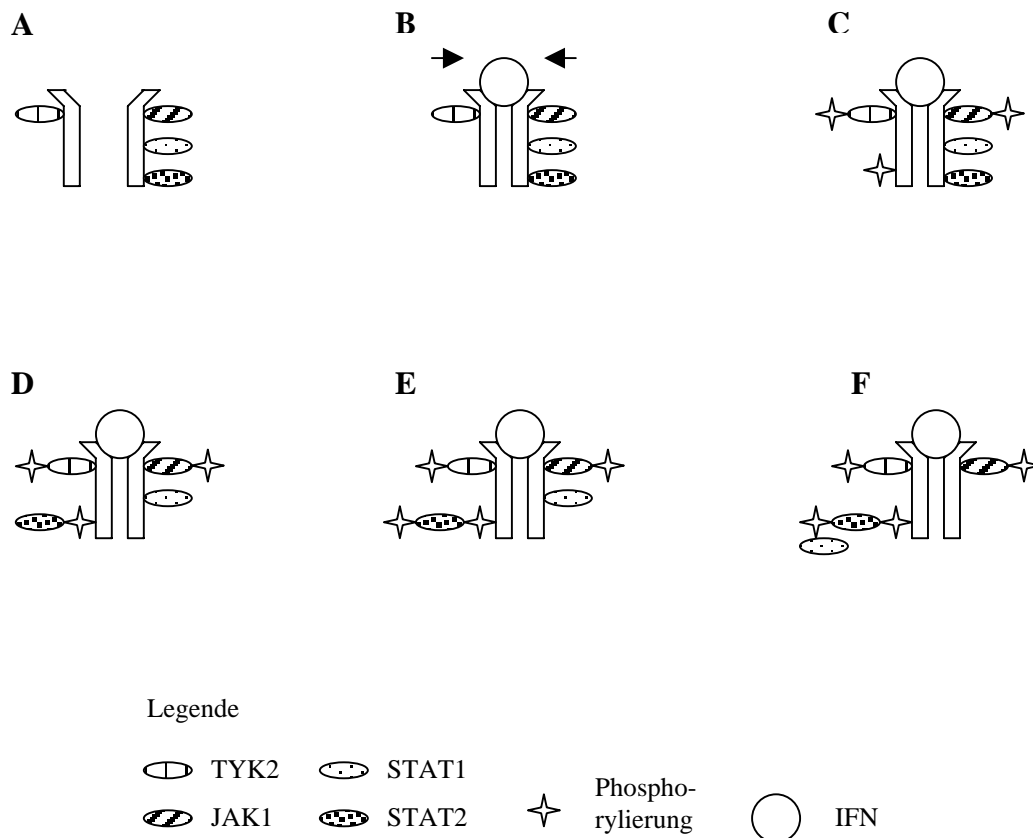


Abb. 24: Darstellung der Anfangsschritte des Jak-STAT-Wegs in schematisierter Form

A: Ausgangssituation: die beiden membrangebundenen Ketten des Typ-I-IFN-Rezeptors mit den assoziierten Jaks und STATs

B: Durch IFN-Bindung induzierte Rezeptor-Dimerisierung

C: Phosphorylierung von Jak1, Tyk2 und der Rezeptorkette

D: Repositionierung von STAT2, das so zum Substrat für Jak1 wird

E: STAT2-Phosphorylierung

F: Repositionierung von STAT1, das ebenfalls zum Substrat für Jak1 und dadurch phosphoryliert wird.

Weitere Details siehe Text (modifiziert nach Ransohoff 1998).

4 Diskussion

4.2.1.3 Übertragung auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Zusammengefaßt gilt also: Man weiß, daß Typ I-Interferone über die Schritte: Rezeptoraktivierung – Phosphorylierung von STATs durch Rezeptor-assoziierte Jaks – Bildung von ISGF3 aus phosphorylierten STATs – nukleäre Translokation von ISGF3 – ISRE-Bindung von ISGF3 – die Transkription eines weiten Spektrums von Interferon-induzierbaren Genen hochregulieren können (vgl. 4.2.1.2).

Weiterhin ist bekannt, daß IFN über eine Wirkung auf die HBV Enh I, II und core promoter-Region spezifisch die HBV-Transkription und -Replikation hemmt (4.1). Auf DNA-Ebene kommt es also entweder zu einer verstärkten Bindung negativ regulatorischer Transkriptionsfaktoren oder zu einer verringerten Bindung positiv regulatorischer Transkriptionsfaktoren. Alternativ wäre möglich, dass bestimmte DNA-bindende Faktoren durch die IFN-Wirkung nicht hinsichtlich ihrer DNA-Bindungsaktivität, jedoch bezüglich ihres transkriptionellen Aktivationspotentials modifiziert werden (siehe 4.2.3, ii).

Davon ausgehend lassen sich, bezogen auf unsere Fragestellung, folgende Hypothesen bezüglich möglicher Mechanismen der Transduktion des inhibitorischen IFN-Signals aufstellen:

(1) Da IFN nicht selbst an die DNA bindet (*cis*-Wirkung), wird der IFN Effekt *trans* vermittelt. Durch IFN werden über den Jak-STAT-Weg – neben anderen schon länger bekannten Proteinen mit antiviraler Wirkung – auch solche induziert, die eine Inhibition der HBV-Transkription zur Folge haben. Diese Proteine üben entweder direkt als Repressoren durch unmittelbare Bindung an die regulativen HBV-Sequenzen negative *cis*-Wirkung aus (Tur-Kaspa 1990, S. 1823), oder sie führen indirekt zu einer verringerten Bindung von anderen Proteinen mit positiver *cis*-Wirkung⁷.

(2) Alternativ wäre zu fordern, daß IFN zur Entfaltung seiner inhibitorischen Wirkung direkt über die bekannten STATs an der HBV-DNA angreift und so seine hemmende Wirkung entfaltet; Voraussetzung hierfür wäre die Präsenz von ISRE-(ähnlichen) Sequenzen in den genregulatorischen HBV-DNA-Abschnitten; dieser Mechanismus wäre insofern ungewöhnlich, als das ISRE-Element in diesem Fall im Gegensatz zur sonst üblichen Induktion IFN-sensitiver Gene eine Repression der Genexpression bewirken würde.

(3) Als weitere Alternative wäre denkbar, daß die bekannten Interferon-induzierten antiviralen Proteine, insbesondere MxA, am Zustandekommen der Inhibition des HBV beteiligt sind. Diese Erklärung ist eher unwahrscheinlich, da MxA in HepG2 und HuH7 nur nach Prä-Stimulation mit Typ I-Interferonen in Dosen, die weit über den von uns verwendeten liegen (1000 U/ml), exprimiert wird (Keskinen 1999).⁸

⁷ Letzterer Aspekt – Inhibition der Bindung von positiv regulatorischen Faktoren an die regulativen HBV-Sequenzen - wurde z.B. nachgewiesen für eine andere Substanz mit anti-HBV-Wirkung, nämlich den Pflanzenextrakt *Phyllanthus amarus* (Ott 1997, S. 911-2).

⁸ Bezüglich der posttranskriptionellen Hemmung des HBV durch IFN – die hier nicht Gegenstand der Betrachtung ist – konnte in zwei aktuellen Arbeiten eine Unabhängigkeit der IFN-Wirkung sowohl von MxA (Rang 2002, S. 7646) - was einer

Die zentralen Fragen zur Signaltransduktion der IFN-Wirkung beziehen sich also einerseits auf die IFN-sensitiven HBV-Abschnitte innerhalb der Enh I, II und core promoter-Region als Angriffspunkt auf DNA-Ebene (siehe 4.2.2) und andererseits auf die beteiligten zellulären Faktoren (siehe 4.2.3). Die Ergebnisse bezüglich dieser Aspekte sollen in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

4.2.2 Mögliche IFN-sensitive Zielregionen auf Ebene der HBV-DNA

Um eine für die Vermittlung der inhibitorischen IFN-Wirkung kritische IFN-sensitive Zielregion innerhalb der gesamten HBV Enhancer I, II und core promoter-Sequenz genauer einzugrenzen, wurden ausgehend vom Plasmid *pGL3HBV_{adv6/9}*, das diese regulatorischen Elemente in voller Länge enthielt, Deletionsmutanten hergestellt, bei denen vom 5'-Ende her sukzessive unterschiedlich lange Abschnitte des HBV-Inserts entfernt worden waren (siehe Abb. 17 im Ergebnisteil). Bei der transienten Transfektion von humanen Hepatomzellen (HuH7) mit diesen Plasmiden kam es - außer bei dem am stärksten deletierten Plasmid *pGL-Stul* - zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung der IFN-induzierten Hemmung; sie blieb insbesondere auch dann unverändert erhalten, wenn der Bereich zwischen nt 1085 und nt 1099 entfernt wurde (*pGL-PfIMI* und alle folgenden Mutanten); dieser Abschnitt enthält eine Sequenz, die Ähnlichkeit aufweist mit dem von der allgemeinen IFN-Signaltransduktion über den Jak-STAT-Weg bekannten ISRE (siehe 4.2.1.2).

4.2.2.1 Bedeutung der ISRE-Region im HBV-Enhancer I

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu einer Arbeit von Nakao *et al.*, die in einem auf den HBV Enhancer I limitierten System mittels EMSAs und Transfektionsexperimenten speziell die Bedeutung dieses ISRE-ähnlichen Elements untersuchten:

Sie konnten mittels *EMSA* nachweisen, i) daß in nukleären Extrakten aus mit IFN behandelten HuH7-Zellen (1000 U/ml IFN α , 2h) Proteine bzw. Proteinkomplexe induziert werden, die an diese ISRE-ähnliche Sequenz binden (Nakao 1999, S. 28076-7), und ii) daß p48 (der vom Jak-STAT-Weg bekannte, für die ISRE-Bindung erforderliche Bestandteil des Interferon-induzierten Multiprotein-Komplexes ISGF3), nicht jedoch der verwandte IRF-1, Bestandteil dieser Proteinkomplexe ist (Nakao 1999, S.28077). Insbesondere war in *Transfektionsexperimenten* die inhibitorische Wirkung von IFN- α in einer Dosis von 1000 U/ml auf die Expression von Plasmidkonstrukten, in denen der HBV-Enhancer I und der X-Gen-Promoter vor ein CAT-Reportergen geschaltet war, abhängig von einer intakten ISRE-Sequenz; bei Verwendung von Plasmiden, in denen ISRE fehlte oder mutiert war, ließ sich kein suppressiver Effekt nachweisen. Demgegenüber ließ sich der inhibitorische Effekt von IFN auf die Plasmide mit Wildtyp-Sequenz sogar steigern, wenn gleichzeitig p48-Expressionsplasmide

früheren Arbeit mit gegenteiliger Aussage widerspricht (Gordien 2001) -, als auch von RNase L (Guidotti 2002, S. 2620) demonstriert werden.

4 Diskussion

kotransfiziert wurden, was wiederum auf p48 als Bindungspartner von ISRE hinwies (Nakao 1999, S. 28077-8). Auf Grundlage dieser Ergebnisse postulieren die Autoren, dass das ISRE-ähnliche Element innerhalb des HBV Enhancers I für die Signaltransduktion des inhibitorischen IFN-Effekts unverzichtbar sei (Nakao 1999, S. 28077).

Diese Befunde, insbesondere die Ergebnisse aus den Transfektionsexperimenten, ließen sich in unserer Arbeit nicht bestätigen, da in den Deletionsanalysen sowohl in Plasmiden mit als auch ohne erhaltenes ISRE-ähnliches Element die IFN-induzierte Hemmung in gleicher Höhe nachweisbar war (vgl. oben). Eine Funktion einer ISRE-ähnlichen Sequenz als negativ regulatorisches Element wäre ohnehin ungewöhnlich – wie auch Nakao *et al.* in dem genannten Artikel anmerken (Nakao 1999, S., 28077), da sie eine Ausnahme von der sonstigen Wirkung von ISRE als positives *cis*-Element in den Promotoren Interferon-induzierbarer Gene darstellen würde. Diese positiv regulatorische Wirkung konnte - konkret auf die HBV ISRE-ähnliche Region bezogen – in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit aufgezeigt werden, wo IFN im Kontext eines nur minimalen Promotorelements über das HBV-ISRE-Element zu einer Aktivierung der Transkription in Luciferase-Reporterassays in HepG2-Zellen führte (Alcantara 2002, S. 2071).

Ganz entscheidend werden unsere Ergebnisse bezüglich des HBV-ISRE untermauert von einer Arbeit von Rang *et al.*; die Autoren konnten in Transfektionsexperimenten mit HBV-Expressionsplasmiden nachweisen, daß die Inaktivierung der ISRE-ähnlichen Sequenz innerhalb des Enhancers I keine nachweisbaren Veränderungen der IFN-induzierten HBV-Suppression zur Folge hat. HuH7-Zellen wurden mit Plasmiden, in die entweder ein komplettes voll funktionsfähiges HBV-Wildtyp-Genom bzw. ein HBV-Genom mit mutierter ISRE-ähnlicher Sequenz integriert war, transfiziert und 16h danach für insgesamt 48h mit 1000 U/ml IFN α behandelt. Dabei bestand, unabhängig davon, ob das Wildtyp oder das mutierte ISRE-Motiv vorlag, kein Unterschied bezüglich der Interferon-induzierbaren Inhibition der HBV-Gen-Expression, und zwar sowohl auf der Ebene der HBV-RNA-Transkripte als auch auf der Ebene der aus intrazellulären Core-Partikeln isolierten replikativen HBV-DNA-Intermediate (Rang 2001, S. 3534-5). Die antivirale Antwort gegen HBV auf DNA- und RNA-Ebene ließ sich zwar durch gleichzeitige Kotransfektion mit einem p48-Expressionsplasmid weiter verstärken, dieser Effekt war jedoch unabhängig von der Funktionalität des ISRE-Motivs (Rang 2001, S. 3535). Daraus läßt sich ableiten, daß p48 zwar einen kritischen Faktor für die IFN-Wirkung auf das HBV darstellt, jedoch nicht direkt (bzw. im Komplex mit anderen Interferon-induzierten Proteinen) an die ISRE-Sequenz innerhalb des HBV-Enhancers I bindet. Diese nicht vorhandene unmittelbare Bindung von p48 an ISRE konnte auch in EMSAs mit nukleären Extrakten aus IFN-behandelten HuH7-Zellen (16 h Vorbehandlung mit 100 U/ml IFN γ , 30 min Inkubation mit 1000 U/ml IFN α) demonstriert werden: p48 war zwar in den Extrakten vorhanden und auch aktiv, zeigte aber keine Bindung an eine Sonde mit der Wildtyp HBV-ISRE-Sequenz (demonstriert mittels Super-Shift-Versuchen); demgegenüber ließ sich eine solche Bindung für IRF-1 etablieren (Rang 2001, S. 3533-4). Diese Befunde aus den EMSAs stehen ebenso im Gegensatz zu den Ergebnissen von Nakao *et al.*

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der Transfektionsexperimente von Nakao *et al.* und Rang *et al.* wäre, daß Rang *et al.* im Unterschied zu Nakao *et al.* mit dem gesamten intakten HBV-Genom arbeiteten und nicht mit subgenomischen Abschnitten, sprich der isolierten HBV-Enhancer I und X-Promoter-Sequenz; es wäre denkbar, daß in der gesamten genomischen

Sequenz Proteine an der ISRE-Sequenz benachbarte und in den limitierten Konstrukten gar nicht vorhandene Motive binden und so die ISRE-Stelle gar nicht frei verfügbar ist (Rang 2001, S. 3535). So liessen sich grundsätzlich auch die Unterschiede zwischen Nakao und unserer Arbeit bezüglich der Relevanz der ISRE-Region interpretieren, denn die in unseren Reporterplasmiden einklonierte HBV Enhancer I, II und core promoter-Sequenz ist, wenn auch nicht komplett, so doch deutlich weniger limitiert als das Insert in den Konstrukten der Arbeit von Nakao. In diesem Zusammenhang ist auch eine ganz aktuelle Arbeit zu sehen, die - mit Luciferase-Reporter-Gen-Assays in HepG2-Zellen - wiederum belegt, daß das HBV ISRE-ähnliche Element im Kontext des gesamten viralen Genoms nicht in der Lage ist, eine IFN-induzierte (1000 U/ml) Transkriptionsmodulation zu vermitteln (Alcantara 2002, S. 2072-73).

Abschließend ist zu erwähnen, daß sowohl die Ergebnisse von Rang *et al.*, die grundsätzlich mit unserer Arbeit übereinstimmen, als auch die Ergebnisse von Nakao *et al.*, die unserer Arbeit widersprechen, bei 1000 U/ml IFN α erzielt wurden; somit ist eine Dosisabhängigkeit der beobachteten Unterschiede zwischen unserer Arbeit und der von Nakao eher unwahrscheinlich.

4.2.2.2 Evaluation einer möglichen IFN-sensitiven Zielregion (nt 1578 - nt 1704)

Neben diesen Befunden zur Bedeutung der ISRE-ähnlichen Sequenz haben die Deletionsanalysen noch ein weiteres Ergebnis erbracht, nämlich hinsichtlich der HBV-Region nt 1578 – nt 1704, deren Entfernung (siehe Mutante *pGLStul*), im Gegensatz zu allen vorhergehenden Deletionen (*pGL-EcoRV* bis *pGL-RsrII*), einen deutlichen Abfall der IFN-induzierten HBV-Inhibition zur Folge hatte (von ca. 40% auf ca. 14%). Daraus läßt sich ableiten, daß sich in diesem Abschnitt ein für die IFN-Wirkung zumindest kritisches Erkennungsmotiv befindet.

Im Sinne einer kritischen Einordnung dieses Ergebnisses lassen sich folgende Überlegungen anstellen:

i) Weitgehend ausgeschlossen werden kann, daß die Ergebnisse mit der *pGLStul*-Mutante nur Folge einer durch weitgehende Verkürzung der Enhancer- und Promotersequenz bereits (zu) stark reduzierten Promoterstärke dieses Konstrukts sind. Die Luciferase-Expression von *pGLStul* ist zwar in der Tat im Vergleich zum Wildtyp signifikant abgefallen (siehe 3.1.4.1, Abb. 18); dies gilt jedoch in gleicher Weise auch für die vorhergehenden Mutanten. Das Fehlen der inhibitorischen IFN-Wirkung bei *pGLStul* kann somit nicht etwa auf ein nicht mehr zuverlässiges Funktionieren des Reporter-Gen-Assays bei (zu) niedrigen Luciferasewerten zurückgeführt werden. Auch ergaben sich in ähnlichen Deletionsanalysen in der (bereits unter 4.1.2 erwähnten) Arbeit von Romero und Lavine für die stärker deletierten Mutanten mit bereits deutlich reduzierten Enhancer- und Promoterelementen Promoterstärken, die im Vergleich zum Ausgangsplasmid in etwa der gleichen Größenordnung abfielen wie in unserer Arbeit (Romero 1996, S.21).

ii) Einschränkend zu bedenken ist jedoch die bei der Konstruktion der Deletionsmutanten verwendete Klonierungsstrategie. Da nicht isoliert einzelne Abschnitte der HBV-DNA entfernt, sondern vom 5'-Ende ausgehend sukzessive immer größere Deletionen eingeführt wurden, fehlen der

4 Diskussion

pGLStul-Mutante neben der HBV-Region nt 1578-1704 auch alle weiter upstream gelegenen HBV-Regionen. Es kann also nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass das Abfallen der IFN-induzierten HBV-Inhibition beim *pGLStul*-Konstrukt nicht z.T. auch einen Summationseffekt nach Wegfall mehrerer IFN-sensitiver Zielregionen in der HBV-DNA – sowohl im Bereich nt 1578-1704, als auch weiter stromaufwärts – darstellt. Vor diesem Hintergrund muß man also relativierend einwenden, daß auf Grundlage unserer Ergebnisse die Rsr-Stu-Region nicht notwendigerweise den einzigen und alleinigen IFN-Angriffspunkt auf der DNA-Ebene darstellt (siehe auch hinten, S. 93, i).

iii) In Bezug auf dieses Ergebnis ist ein kritischer Vergleich mit den anderen Reportergergen-Arbeiten aus 4.1.2 nicht möglich, da in diesen jeweils auf Deletionsanalysen verzichtet wurde; auch im Fall der Arbeit von Romero und Lavine wurden die Deletionsmutanten nicht verwendet, um eine IFN-sensitive Region einzugrenzen, sondern vielmehr für die nähere Untersuchung der Vermittlung der TNF α -Wirkung; unmittelbar vergleichbare Ergebnisse fehlen somit auch hier. Dennoch sei darauf hingewiesen, daß sich für die TNF α -Wirkung eine Region zwischen nt 1370 und 1697 als essentiell erwies (Romero 1996, S. 20-21), die sich also in weiten Teilen mit der hier beschriebenen Region nt 1578-1704 überlappt.

In einer kritischen **Zusammenschau** von eigenen Ergebnissen und der veröffentlichten Literatur bezüglich eines IFN-Angriffspunktes auf DNA-Ebene läßt sich festhalten: In unserem experimentellem System ist die Typ I-IFN-induzierte Inhibition der HBV-Enhancer I, II und core promoter-regulierten Transkription – im Gegensatz zu einer Arbeit von Nakao *et al.* und in Übereinstimmung mit Arbeiten von Rang *et al.* und Alcantara *et al.* - unabhängig von der Präsenz einer ISRE-ähnlichen Sequenz innerhalb des HBV Enhancers I. Demgegenüber stellte sich die Sequenz nt 1578 bis nt 1704 als für die IFN-Wirkung zumindest kritische, jedoch nicht notwendigerweise einzige IFN-sensitive Region heraus; hierzu fehlen unmittelbar vergleichbare Daten aus der Literatur.

4.2.3 Zelluläre Faktoren als Mediatoren der Typ I-IFN-Wirkung

Ausgehend von den Ergebnissen der Transfektionsexperimente und insbesondere der Deletionsanalysen sollte in einem nächsten Schritt im Rahmen eines *in vitro*-Systems genauer Einblick gewonnen werden in die Vermittlung der IFN-Wirkung auf der Ebene DNA-bindender Proteine. Hierzu wurden EMSAs durchgeführt, in denen jeweils die Bindung von nukleären Extrakten aus mit verschiedenen Konzentrationen IFN α 2b bzw. β (0, 250, 750, 1500 U/ml) behandelten HuH7-Zellen an radioaktive Sonden untersucht wurde, die die in den Deletionsanalysen identifizierte kritische HBV-Region (RsrII – Stul, nt 1578 – nt 1704) in verschiedener Länge enthielten.

Es ergab sich dabei jeweils ein scharfes Bandenmuster, das – wie die Theorie des Gelshifts (siehe 2.4.1) fordert - durch Zugabe eines Überschusses an unmarkierter Sonde abgeschwächt wurde und somit als spezifisch zu werten war; jedoch konnte bei allen gewählten Versuchsbedingungen (siehe unten) kein reproduzierbarer Unterschied zwischen Extrakten aus behandelten und unbehandelten Zellen nachgewiesen werden: es zeigten sich weder Banden, die durch Behandlung mit IFN

verschwanden / völlig neu auftraten, noch Banden, die durch die Behandlung mit IFN verstärkt oder abgeschwächt wurden. Gelegentlich auftretende minimale Unterschiede waren jeweils auf Ungenauigkeiten bezüglich der Menge des eingesetzten Proteins und Unregelmäßigkeiten des Gels, insbesondere der Breite der Spuren, zurückzuführen und liessen sich nicht reproduzieren.

Durch entsprechende Kontrollversuche konnte ausgeschlossen werden, daß die fehlende Nachweisbarkeit eines Unterschiedes auf ein möglicherweise nicht zuverlässiges Funktionieren unseres experimentellen Systems oder mindere Qualität unserer nukleären Extrakte zurückzuführen war. Einerseits konnte mit standardisierten nukleären Extrakten (A431, Ratten Leber, HeLa, THP-1) und Sonden für ubiquitäre nukleäre Faktoren (OCT1) eindeutig eine Bandenbildung demonstriert werden, die auch wiederum durch entsprechende Kompletionsansätze abgeschwächt wurde; andererseits konnte auch die Bindung nukleärer Faktoren aus unseren eigenen Extrakten an Standardsonden mit den Erkennungsmotiven ubiquitärer Faktoren (OCT1) nachgewiesen werden. Bezüglich der nukleären Extrakte wurde für ein weiteres Maß an Sicherheit gesorgt, indem die Präparationen nach zwei verschiedenen Protokollen durchgeführt und unterschiedliche Mengen an Protein (3, 10, 20 µg) eingesetzt wurden.

Da viele nukleäre Faktoren im EMSA nur unter ganz spezifischen Bedingungen, insbesondere hinsichtlich der Zusammensetzung des Bindepuffers, nachzuweisen sind (Garabedian 1993, S. 251-3), wurden möglichst viele Parameter unseres experimentellen Systems systematisch variiert, um mit größerer Wahrscheinlichkeit die für den putativen IFN-induzierten oder –supprimierten Faktor optimalen Nachweisbedingungen zu treffen. Es wurden insgesamt acht unterschiedliche Bindepuffer eingesetzt, und sowohl die Gelzusammensetzung (Vernetzungsverhältnis 19: 1 bzw. 60:1) als auch der Laufpuffer (0,5x TBE bzw. 1x TGE) variiert. Außerdem wurden die Zellen nicht nur mit den in den Transfektionen verwendeten 250 U/ml IFN, sondern ebenso mit höheren Konzentrationen (750 und 1500 U/ml) IFN inkubiert, um den nachzuweisenden IFN-Effekt auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren zu erhöhen.

Da auch die Länge der Sonde das Bindeverhalten von nukleären Faktoren im EMSA beeinflusst (Dent 1993, Abschnitt 2.2), wurde sowohl mit einer langen Sonde, die gesamte Rsr-Stu Sequenz umfaßte (RS), als auch mit mehreren kürzeren Sonden, die Teilabschnitte dieser Sequenz abdeckten (GS1 – GS4), gearbeitet.

Trotz all dieser systematischen Variationen ließ sich kein reproduzierbarer Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen nachweisen.

Zur Erklärung dieser EMSA-Ergebnisse und zur Frage, wie sie mit den Resultaten der Deletionsanalysen in Einklang gebracht werden können, lassen sich verschiedene Überlegungen anstellen:

i) Das EMSA-Ergebnis wäre zum ersten sehr gut vereinbar mit einem Modell, das, wie oben angedeutet (siehe 4.2.2.2, ii), für die IFN-Wirkung zusätzlich zu einem Angriffspunkt im Bereich nt 1578 – nt 1704 multiple bzw. repetitive Bindestellen für einen nukleären Faktor / nukleäre Faktoren annimmt, die sich über die gesamte HBV Enh I, II und c/p-Sequenz erstrecken. Die Gesamtheit dieser Bindestellen wäre demnach in ihrer Summe für das Zustandekommen des IFN-Effektes

4 Diskussion

verantwortlich, wohingegen die IFN-induzierten Veränderungen bezüglich der einzelnen im Rsr-Stu-Bereich bindenden Faktoren isoliert betrachtet nicht groß genug wären, um im EMSA einen detektierbaren Unterschied zu bewirken. Dieser Erklärungsansatz wäre auch in Einklang zu bringen mit den Ergebnissen der Deletionsanalysen, die zwar auf die Rsr-Stu-Region als für die IFN-Wirkung besonders kritischen Bereich hinweisen, jedoch nicht automatisch bedeuten, daß sie notwendigerweise die einzigen und entscheidenden für die Vermittlung des IFN-Effekts erforderlichen Bindestellen enthält. In unserer Arbeit wurden nicht isoliert einzelne DNA-Abschnitte deletiert, sondern sukzessive vom 5´-Ende ausgehend immer umfassendere Deletionen durchgeführt; dadurch fehlen in der betreffenden *pGL-StuI*-Mutante nicht nur der Bereich nt 1578-nt1704, sondern ebenso alle weiter stromaufwärts gelegenen regulativen Elemente. Es wäre demnach möglich, daß die IFN-Wirkung multipler Bindestellen für mehrere oder ein und denselben DNA-bindenden Faktor bedarf, die sowohl in der Region nt 1578 – nt 1704, als auch in der weiter in 5´-Richtung lokalisierten Region liegen und in ihrer Gesamtheit das IFN-Signal auf die DNA-Ebene übertragen. Vom 5´-Ende ausgehende Deletionen und damit der Verlust einer Reihe von Bindestellen würde, wie im Fall der ersten Deletionsmutanten, zunächst keine wesentliche Auswirkung auf die IFN-Wirkung haben, da noch weitere Bindestellen in 3´-Richtung folgen. Wenn jedoch die Deletionen bereits einen Großteil der regulativen HBV-Sequenzen erfaßt und somit ein kritisches, nicht mehr kompensierbares Ausmaß erreicht hätten, würde als Summationseffekt die IFN-Wirkung stark abfallen, wie im Fall der *pGL-StuI*-Mutante beobachtet.

ii) Zum zweiten ist zu bedenken, dass sich der EMSA auf die Untersuchung der Transkriptionsregulation unmittelbar auf Ebene der DNA-Bindung nukleärer Faktoren beschränkt.

Dabei zeigen sich in unseren Versuchen zwischen den Bedingungen „mit IFN-Behandlung“ und „ohne IFN-Behandlung“ keine signifikanten Unterschiede. Daraus könnte man schlussfolgern, dass die IFN-induzierte Inhibition der HBV-Transkription nicht direkt durch Veränderung der DNA-Bindungs-Aktivität bestimmter nukleärer Faktoren geschieht, sondern vielmehr über vorgeschaltete Schritte, welche die transkriptionelle Aktivität der DNA-bindenden Faktoren modulieren. Nach diesem Modell würden unter beiden Untersuchungs-Bedingungen („IFN Behandlung“ vs. „keine IFN-Behandlung“) jeweils die gleichen nukleären Faktoren an die untersuchte DNA-Region binden, und der IFN-Effekt würde über eine Modulation der Aktivität dieser nukleären Faktoren zustande kommen.

Dieses zwar rein spekulative, aber gut zur Erklärung unserer Ergebnisse geeignete Modell lässt sich durch einige Beispiele aus der Literatur untermauern; diese (s.unten) zeigen - im Rahmen anderer Fragestellungen - auf, dass Stimulus-abhängige Transkriptionsregulation über bestimmte DNA-Motive ohne im EMSA nachweisbare Änderung der DNA-Bindeaktivität der daran andockenden nukleären Faktoren zustande kommen kann:

Li et al. konnten etwa mit Luciferase-Reporter-Gen-Assays zeigen, dass TGF- β die HIV-1 LTR (= long terminal repeat)-Promoter-gesteuerte HIV-1-Transkription hochregulieren kann (Li 1998, S. 111). Mittels seriellen Deletionskonstrukten (ähnlich zu denen in unserer Arbeit) liess sich nachweisen, dass NF- κ B-Bindestellen innerhalb des LTR-Promoters für die Vermittlung dieses Effekts erforderlich waren (Li 1998, S. 111-2). In EMSAs zeigte sich, dass ein Heterodimer aus den Proteinen p50 und p65 an diese NF- κ B-Motive bindet (Li 1998, S. 113-114); interessanterweise fand sich dabei jedoch bezüglich

der DNA-Bindungs-Aktivität an die NF- κ B-Motive kein Unterschied zwischen TGF- β -behandelten bzw. unbehandelten Zellen (Li 1998, S. 115-6, insbesondere figure 5). Die Autoren schlussfolgern daraus, dass in den verwendeten Zellen (HaCaT) die TGF- β -vermittelte Transkriptionsaktivierung über NF- κ B-Bindestellen nicht durch eine Änderung der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität zustande kommt; vielmehr gebe es im Nukleus eine konstitutive NF- κ B-DNA-Bindung, deren trans-aktivierende Aktivität durch TGF- β über einen noch nicht identifizierten Mechanismus moduliert werde (Li 1998, S. 119).

In einer ähnlichen Arbeit weisen **Rohr et al.** nach, dass analog auch Dopamin über einen NF- κ B-abhängigen-Mechanismus die HIV-Transkription stimulieren kann – wiederum ohne Veränderung in der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität (Rohr 1999).

Abschließend sei noch eine Arbeit von **Dowell und Cooke** erwähnt, in der Insulin über O/E-1-Proteine (=Olf-1/Early B cell factor) die Transkription des *glut4*-Gens supprimierte; für diesen Effekt war die O/E-Bindung an die entsprechende Erkennungsstelle innerhalb des *glut4*-Promoters erforderlich, in EMSAs war jedoch keine Insulin-induzierte Änderung der O/E-DNA-Bindungsaktivität nachweisbar. Die Autoren schlussfolgern, dass Insulin möglicherweise über eine Phosphorylierung oder eine andere Form der Modifikation das „transkriptionelle Aktivationspotential“ von O/E moduliere (Dowell 2002).

Diese beiden unter i) und ii) erläuterten Modelle wären geeignet, um die Ergebnisse der EMSAs (kein Unterschied bezüglich der DNA-Bindung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen) und der Deletionsanalysen (Relevanz der Rsr-Stu-Region für die IFN-Wirkung) in Einklang zu bringen.

Aus der aktuellen Literatur liegen – außer der bereits oben diskutierten Studie von Nakao *et al.* (Nakao 1999) - keine Arbeiten vor, die zu möglicherweise an der IFN-Wirkung auf die HBV-Transkription beteiligten nukleären Faktoren Aussagen machen; es wird im Gegenteil immer wieder betont, daß die intrazellulären an der IFN-Signaltransduktion beteiligten Proteine noch unbekannt sind (Rang 1999, S. 792; Rang 2001, S. 3531). Eine kritische Beleuchtung unserer EMSA-Befunde von dieser Seite her ist somit nicht möglich.

Über eine Computer-gestützte Analyse der HBV-EnhI, EnhII und c/p-Region (Genomatix Suite, MatInspector; Genomatix Software GmbH, Landsberger Str. 6, 80339 München) konnten in dem untersuchten HBV-DNA-Abschnitt multiple Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor CCAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP), der in hochdifferenzierten Zellen wie Leber- oder Fettzellen vorkommt und bei der Differenzierung von Hepatozyten eine Rolle zu spielen scheint (Diehl 1994), nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis könnte zu Gunsten des unter i) vorgeschlagenen Modells repetitiver Bindestellen gewertet werden.

Daß IFN über C/EBP eine negativ regulatorische Wirkung auf die virale Transkription ausüben kann, zeigt eine Arbeit von Honda *et al.*, die eine Suppression des HIV Long terminal repeat (LTR) über eine Interferon (IFN β)-induzierte Induktion von C/EBP (bzw. des inhibitorischen 16-kD C/EBP β) demonstrieren konnte (Honda 1998, S. 1258-9). Demgegenüber wurde in einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit darauf hingewiesen, daß IFN γ seine inhibitorische Wirkung auf die HBV-Genexpression möglicherweise über eine Suppression von C/EBP α ausübt, wobei hier allerdings nur von der IFN γ -Wirkung die Rede ist und die Typ I-Interferone *expressis verbis* ausgeschlossen werden (Pasquetto 2002, S. 5652).

4 Diskussion

Zusammenfassend lässt sich festhalten:

In vitro ließen sich bezüglich der an die HBV-Region nt 1578 – nt 1704 bindenden nukleären Faktoren keine deutlichen und reproduzierbaren Unterschiede zwischen IFN-behandelten und unbehandelten Zellen nachweisen. Dies steht durchaus im Einklang mit den Ergebnissen aus den *in vivo* Experimenten, in denen Deletionsanalysen zwar eine kritische Rolle der HBV-Region nt 1578 – nt 1704 für die IFN-Signaltransduktion nahelegten, jedoch nicht mit Sicherheit ausschlossen, daß auch die weiter stromaufwärts lokalisierten Regionen am Zustandekommen des IFN-Effektes beteiligt sind (siehe Erklärung i). Alternativ wäre zu postulieren, dass der inhibitorische IFN-Effekt nicht unmittelbar auf Ebene der DNA-Bindung regulativer Faktoren angreift, sondern über vorgeschaltete Schritte die transkriptionelle Aktivität dieser Faktoren moduliert (siehe Erklärung ii).

4.3 Relevanz der Ergebnisse bezüglich des gesamten Wirkungsspektrums der Typ I-IFN auf das HBV

Wenn man die aktuelle Literatur in Hinblick auf mögliche anti-HBV Wirkmechanismen der Typ I-Interferone prüft, stellt man fest, daß die im Rahmen der vorgelegten Arbeit untersuchte Wirkung von IFN α/β auf regulative HBV-Elemente nur einen Teilaspekt des gesamten antiviralen Wirkungsspektrums von IFN gegen das HBV darstellt, was angesichts der pleiotropen Aktivität von Zytokinen nicht überrascht.

Abgesehen von der offensichtlich auch relevanten Modulation der Immunantwort auf virusbefallene Zellen (siehe 4.3.1) handelt es sich in den entsprechenden Arbeiten hauptsächlich um intrazelluläre, direkte antivirale Effekte des IFN (sog. nicht-zytopathische Wirkkomponente des IFN, siehe 4.3.2). Eine bedeutende Rolle spielen hier neben der von uns untersuchten Wirkung auf Ebene der Transkription (siehe 4.3.2.1) offensichtlich eine Reihe anderer – vielfach posttranskriptioneller - Mechanismen, die v.a. in Experimenten mit einem transgenen HBV-Mausmodell und Hepatomzellen mit integriertem HBV-Genom charakterisiert wurden (siehe 4.3.2.2).

Auf diese Komponenten der IFN-Wirkung sowie die jeweiligen experimentellen und methodischen Hintergründe gilt es im Sinne einer kritischen Einordnung des Stellenwerts unserer eigenen Ergebnisse zumindest Überblickshaft einzugehen. Dabei sollen die vorgestellten molekularbiologischen und immunologischen Ergebnisse nicht nur isoliert betrachtet, sondern in einen Kontext gestellt werden mit den bekannten Daten zur Effektivität der IFN-Wirkung aus dem klinischen Bereich.

4.3.1 Immunvermittelte antivirale Wirkung von IFN

Daß die anti-HBV-Wirkung des Interferons zumindest zum Teil auf einer als IFN-Effekt bekannten Modulation des Immunsystems beruht (Haria 1995), ergibt sich bereits aus folgender klinischer Beobachtung: bei der chronischen Hepatitis B Infektion kommt es während der IFN-induzierten Serokonversion – ebenso wie bei der spontanen Serokonversion (Liaw 1987, S. 2) - in etwa parallel zum Abfall der HBV-DNA im Rahmen einer „immunologischen Aktivierung“ des Patienten zu einem

Anstieg der Transaminasen (sog. Interferon „flare“) (Perrillo 1994, S. 35S). Dies interpretiert man als Ausdruck einer durch IFN bewirkten verstärkten Destruktion virusinfizierter Hepatozyten, vermutlich durch NK Zellen und zytotoxische T-Zellen (Foster 1997, S. 288). In Einklang mit diesem Erklärungsmodell steht, daß Typ I-Interferone *in vitro* das virale Wachstum durch eine Zerstörung der Virus-tragenden Zellen supprimieren können (Blackman 1985). Dies setzt voraus, daß Virusprotein-Bestandteile auf der Oberfläche der infizierten Zellen gebunden an HLA Klasse I Antigene dem Immunsystem präsentiert werden. In der Tat können Typ I-IFN die Expression der HLA Klasse I Antigene erhöhen (Harris 1986); dies ist nicht nur *in vitro* an einer humanen Hepatomzelllinie demonstriert worden (Caselmann 1992, S. 968 u. 970), sondern insbesondere auch für Hepatozyten während der IFN-Behandlung bei chronischer Hepatitis B (Pignatelli 1986); außerdem induzieren sie eine Reihe von Proteinen, die beteiligt sind an der Prozessierung von Fremdprotein oder, wie im Fall der TAP Transporter-Proteine, am Transport degradierter Fremdproteine ins endoplasmatische Retikulum, wo dann eine Assoziation mit den HLA-Molekülen stattfinden kann (Foster 1997, S. 288). Darüber hinaus spielt möglicherweise auch die Stimulation von NK Zellen durch IFN α/β eine Rolle (Dienstag 1982).

All diese Aspekte der Interferon-Wirkung sind in unserer Arbeit durch das Fehlen von Immunzellen im Zellkultur-Modell ausgeschaltet, so daß, wie auch in der Mehrzahl der veröffentlichten Arbeiten, andere Komponenten der IFN-Wirkung, nämlich direkte antivirale Effekte im intrazellulären Bereich isoliert zum Tragen kommen (siehe 4.3.2).

4.3.2. Direkte antivirale Effekte von IFN gegen das HBV

Auf die Bedeutung solcher *direkter*, d.h. nicht vom Immunsystem abhängiger, antiviraler Effekte wurde erst kürzlich wieder hingewiesen durch eine tierexperimentelle Arbeit mit Schimpansen, die – allerdings für eine frühe Phase der *akuten* HBV-Infektion – eine nicht-zytolytische Suppression des HBV demonstrieren konnte (Guidotti, Rochford *et al.* 1999, S. 827-8). Diese direkte Inhibition der Virusreplikation ohne Zellzerstörung scheint jedoch auch – neben der bereits besprochenen immunvermittelten Lyse infizierter Zellen (siehe 4.3.1) - für die antivirale Wirkung von Interferon gegen das HBV von entscheidender Bedeutung zu sein (sog. nicht-zytopathische oder nicht-zytolytische Wirkkomponente), wie man aus mehreren *in vivo* Studien weiß:

So konnte etwa in einem transgenen Mausmodell demonstriert werden, daß es während einer gleichzeitigen (transienten bzw. permanenten) Infektion mit dem LCMV vermittelt durch IFN α/β (und auch TNF α) zu einer nicht-zytolytischen (transienten bzw. permanenten) Suppression der HBV-Genexpression und -replikation kommt (Guidotti, Borrow *et al.* 1996, S. 4591-2 und 4592-3); analoge Ergebnisse konnten erzielt werden durch parallele Infektion mit Adenovirus oder dem murinen Cytomegalievirus (Cavanaugh 1998). Ebenso konnte in einem chimären uPA/RAG-2 mit xenogenen Woodchuck-Hepatozyten transplantierten Mausmodell, in dem reife B- und T-Lymphozyten fehlten(!) und somit Einflüsse des Immunsystems eliminiert waren, ein deutlicher durch IFN α induzierter antiviraler Effekt gegen eine Infektion mit dem WHV erreicht werden (Petersen 1998, S. 313 und 315).

4 Diskussion

Daß IFN u.a. auch über nicht-zytolytische Mechanismen seine antivirale Wirkung entfaltet, ist also offensichtlich, wobei sich die Frage stellt, inwieweit dies über eine Wirkung auf Ebene der Transkription (siehe 4.3.2.1) oder über andere (vorwiegend posttranskriptionelle) intrazelluläre Mechanismen (siehe 4.3.2.2) geschieht. Beide Aspekte sollen im Folgenden näher beleuchtet werden. Auf folgenden Umstand sein an dieser Stelle noch hingewiesen: die hier betrachteten „direkten“ antiviralen Aspekte der Interferonwirkung sind zwar insofern unabhängig vom Immunsystem, als sie ohne einen zytopathischen Effekt, d.h. ohne Destruktion Virus-tragender Zellen zustande kommen; *in vivo* (im transgenen Mausmodell) sind es aber gerade Zellen des (spezifischen / unspezifischen) Immunsystems, insbesondere zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), NK Zellen und Makrophagen, die über eine Ausschüttung verschiedener Zytokine, nämlich IFN γ und TNF α (Guidotti, Ando *et al.* 1994; Guidotti, Ishikawa *et al.* 1996; Guidotti, Chisari *et al.* 1999) bzw. TNF α und IFN α/β (Guidotti, Borrow *et al.* 1996) diese nicht-zytolytische HBV-Inhibition bewirken.

Noch nicht abschließend geklärt ist, ob die im folgenden zu diskutierenden und in der vorliegenden Arbeit untersuchten direkten antiviralen Effekte von IFN *in vivo*, d.h. im Rahmen der Wirt-Virus-Interaktion bei der „natürlichen“ HBV-Infektion in der Tat einer Kontrolle der Virusreplikation dienen oder durch verminderte Virusproduktion zu einer verringerten Immunstimulation führen und somit evtl. sogar zu einer Viruspersistenz beitragen (Romero 1996, S. 22; Gilles 1992, S. 3958); ebenso ist die Frage nach dem relativen Verhältnis der zytopathischen und der nicht-zytopathischen Komponente der Kontrolle der HBV-Infektion in der *in vivo* Situation noch nicht eindeutig zu beantworten (Guidotti, Borrow *et al.* 1996, S. 4594).

4.3.2.1 Direkte Wirkung auf der Ebene der Transkription des HBV

In der vorliegenden Arbeit, wie auch in verschiedenen anderen Studien (Tur-Kaspa 1990, Hamasaki 1992, Romero 1996, Nakao 1999; siehe 4.1), wurde eine inhibitorische Wirkung des IFN auf regulative HBV-Elemente, also letztlich eine Hemmung auf Transkriptionsebene, etabliert. Diese direkte auf die Transkription des HBV bezogene Wirkung überrascht nicht:

IFN greift bei der Induktion zahlreicher zellulärer Gene im Rahmen des „antiviral state“ in die Transkription ein (siehe 4.2). Hierbei handelt es sich um eine positiv regulatorische Wirkung, aber auch ein negativ regulatorischer Effekt auf die Expression zahlreicher eukaryontischer Gene ist bekannt (Lengyuel 1982; Der 1998). Darüber hinaus gibt es auch eine Reihe von Berichten über die Inhibition der primären Transkription einiger viraler Gene durch IFN, z.B. des Influenza Virus (Krug 1985, Ransohoff 1985) oder des Vesikuläre Stomatitis Virus (Belkowski 1987). Insbesondere findet auch eine Inhibition der Replikation von DNA-Viren statt, wie im Fall des SV40 und Herpes Simplex Virus über eine Hemmung der Transkription der frühen viralen Gene (Brennan 1983, Oberman 1988) gezeigt wurde.

Um nun im Detail nachvollziehen zu können, welche Rolle die (hier untersuchte) Inhibition auf Transkriptions-Ebene für die antivirale Wirkung des Interferons gegen das HBV spielt, soll im Folgenden zunächst der HBV-Replikationszyklus (4.3.2.1.1) sowie die virale Transkription und deren Regulation (siehe 4.3.2.1.2) dargestellt werden:

4.3.2.1.1 HBV-Replikation mittels reverser Transkription

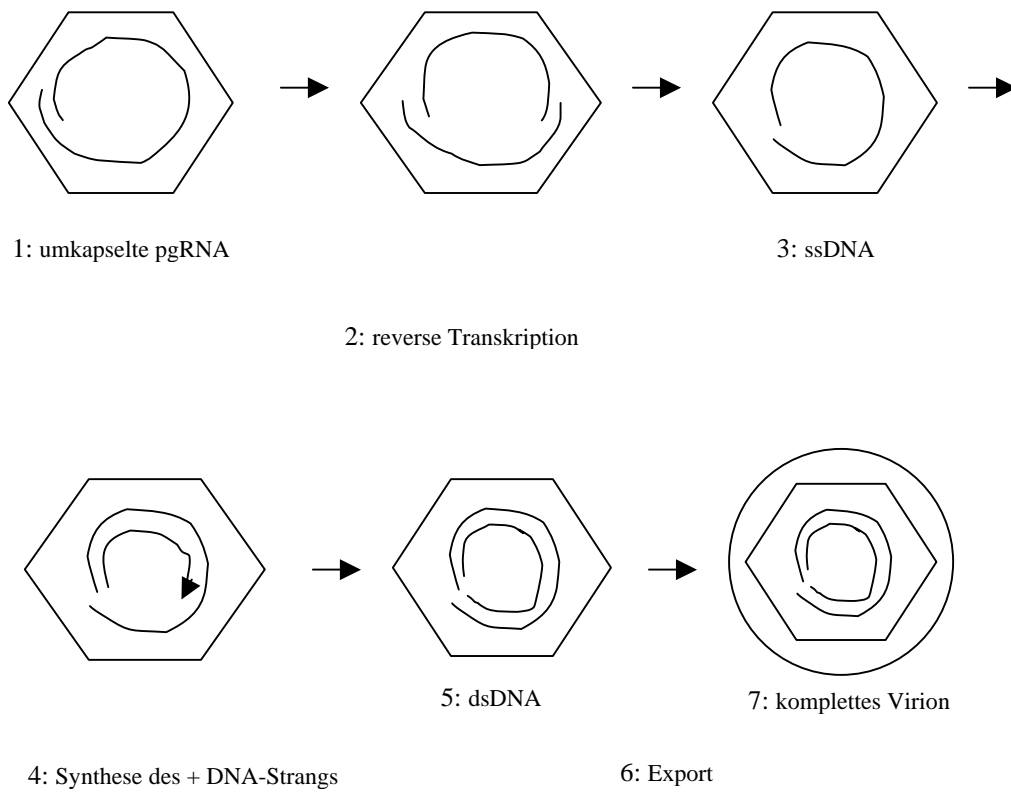


Abb. 25: Darstellung der posttranskriptionellen Schritte des HBV-Replikationszyklus (modifiziert nach Wieland 2000, S. 4167); Erläuterung vgl. Text.

Der Replikationszyklus des HBV umfasst zu Beginn, d.h. vor der eigentlichen Vermehrung des Virusgenoms mittels reverser Transkription (siehe Abb. 25), einige weniger genau bekannte Schritte, begonnen bei der wohl über die pre-S1 Region des envelopes vermittelten Anheftung des Virions an die Zellmembran von Hepatocyten, über das uncoating (Verlust der Virushülle), bis hin zur Translokation des Genoms in den Nukleus.

Dort erfolgt durch Synthese eines kompletten plus-Stranges die Umwandlung der partiell doppelsträngigen DNA (rcDNA) in ein kovalent geschlossenes zirkuläres DNA-Molekül, die sog. ccc (=covalently closed circular) DNA (Seeger 2000, S.55). Diese wiederum ist Matrize für die - wie unter 4.3.2.1.2 beschrieben regulierte - Transkription aller viralen mRNAs (siehe 4.3.2.1.2), u.a. der sogenannten p(re)g(enomic) RNA (Tuttleman 1986). Die pgRNA trägt als einziges Transkript die gesamte genetische Information des HBV und dient als Substrat für die Replikation des Virus mittels reverser Transkription, wie man u.a. aus Versuchen mit dem DHBV weiß (Summers 1982, S. 412).

Die pgRNA wird, im Komplex mit der HBV Polymerase, die an eine spezielle „packaging“ Sequenz (ϵ) innerhalb der pgRNA bindet, von Core-Polypeptid umkapselt, so daß (unreife) Core-Partikel entstehen, in denen die reverse Transkription stattfindet (siehe Abb.25): Vereinfacht ausgedrückt

4 Diskussion

(detaillierte Darstellung siehe Ganem 1987, S. 664-6) entsteht erst ein neuer minus-DNA-Strang, wobei die pgDNA, während sie in DNA umgeschrieben wird, von der RNase H-Funktion der Polymerase abgebaut wird. Dem schließt sich die Synthese eines neuen (unvollständigen) plus-DNA-Strangs an, so daß neue partiell doppelsträngige HBV-DNA entsteht (Seeger 2000, S.57).

Reife Core-Partikel, die vollständige partiell doppelsträngige DNA enthalten, werden entweder in Richtung Zellkern transportiert, wo sie mehr cccDNA bilden können, oder nach Umhüllung mit envelope-Proteinen als vollständige Virus-Partikel via endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat sezerniert (Seeger 2000, S.58), so daß der Replikations- und Lebenszyklus des HBV geschlossen ist.

4.3.2.1.2 HBV-Transkription und Transkriptionsregulation

Die Expression des viralen Genoms erfolgt in erster Linie über zwei wesentliche RNA-Transkripte (siehe Abb. 1 in 1.1) von 3,5 bzw. 2,1kb Länge (mit plus-Polarität). Die sog. 3,5 kb RNA weist heterogene 5'-Enden auf: die geringfügig längere precore mRNA, die stromaufwärts vom precore Start-Kodon initiiert wird, kodiert für das precore-Polypeptid (HBe), die kürzere pgRNA wird innerhalb der precore Region initiiert und dient zum einen als Ausgangspunkt für die reverse Transkription in neue HBV-DNA (siehe 4.3.2.1.1), zum anderen als mRNA für das Nucleocapsid-Protein und die Polymerase (Seeger 2000, S. 56). Die 2,1 kb RNA, die innerhalb der preS1 Region initiiert wird, fungiert als mRNA für das mittlere und kleine S Protein. Neben diesen beiden wesentlichen Transkripten gibt es mindestens zwei weitere Transkripte, nämlich die für das grosse Hüllprotein kodierende 2,4kb RNA und eine kleinere RNA (0,7 kb), die für das HBV-X-Protein kodiert (Scaglioni 1996).

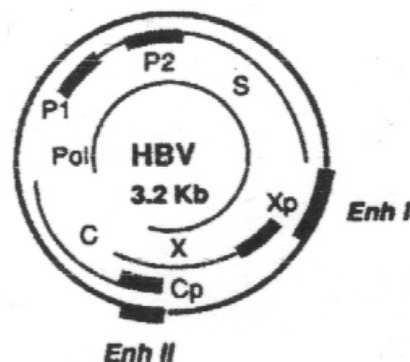


Abb. 26: Genomische Organisation der HBV-DNA: dargestellt sind die vier ORF (S, C, Pol und X), die Promotorelemente P1 (=Pre-S), P2 (=S), Xp und Cp sowie die beiden Enhancer Enh I und Enh II (nach Huan 1993).

Die Regulation der Expression dieser Gene erfolgt über insgesamt vier Promoter-Elemente (siehe Abb. 26), nämlich die preS (=P1) bzw. S(=P2)-Promoter für die Transkription der 2,4 bzw. 2,1 kb RNA, den X- Promoter Xp (für die 0,7 kb RNA) und schließlich den core promoter (Cp), der die Transkription der 3,5 kb RNA und damit u.a. der pregenomischen RNA steuert. Als zusätzliche übergeordnete Steuerelemente sind zwei Enhancerregionen beschrieben worden, nämlich der Enhancer I (Enh I) und der Enhancer II (EnhII). Der Enhancer I (Shaul 1985) ist in einer strategisch günstigen Position

zwischen dem S und X ORF lokalisiert (nt 1074 – nt 1234), der Enhancer II (nt 1646 – 1741), der erst später entdeckt wurde (Yee 1989), liegt unmittelbar stromaufwärts von der für das Core-Protein kodierenden Region und überlappt sich mit dem core promoter. Beide Enhancer können die Aktivität aller genannten Promotoren modulieren (Su 1992, S. 2709 und 2711), wobei der Enhancer I bevorzugt auf den core und den X promoter wirkt, während der Enhancer II insbesondere die S Promotoren beeinflusst (Trujillo 1991, S. 3801). Enhancer I und II weisen beide Bindungsstellen sowohl für leberspezifische als auch für ubiquitäre Transkriptionsfaktoren auf (Patel 1989 S. 5294 und 5299), für den Enhancer II ist jedoch ein deutlich höheres Maß an Hepatotropismus beschrieben (Su 1992, S. 2711). Im Zusammenhang mit der Hepatozyten-spezifischen Replikation scheinen nukleäre Hormonrezeptoren, u.a. HNF 4, eine Rolle zu spielen (Tang 2001).

Aus dem bisher Gesagten wird deutlich, daß die in unserer Arbeit untersuchte regulative Region inklusive Enh I, II und c/p ganz offensichtlich für die Vermehrung des HBV von entscheidender Bedeutung ist: zum einen, da sie (über die Enhancer) die Expression aller viralen Transkripte (sowohl für Funktions- als auch Strukturproteine) steuert, zum zweiten, und noch entscheidender, da sie (über die Enhancer und den core promoter) die Entstehung der pregenomischen RNA regelt, die den Ausgangspunkt für die HBV-Replikation darstellt (siehe 4.3.2.1.1).

Wenn einerseits Interferon, wie aufgezeigt, über die genannten regulativen Elemente die Transkription der pgRNA inhibieren kann, und andererseits diese pgRNA an einer Schlüsselstelle der Vermehrung des HBV steht, dann ist unmittelbar einleuchtend, daß der hier untersuchte Aspekt der Interferon-Wirkung auf Transkriptionsebene letztlich zu einer Inhibition der Virusreplikation führen kann (Alcantara 2002, S. 2068 und Romero 1996, S. 18).

4.3.2.2 Andere (u.a. posttranskriptionelle) Aspekte der IFN-Wirkung

Die verschiedenen Reporter-Gen-Studien inklusive der hier vorgelegten Arbeit demonstrieren zwar eindeutig eine Suppression regulativer HBV-Elemente durch Typ I-IFN; inwieweit dieser Effekt auf Ebene der Transkription jedoch innerhalb des gesamten Wirkungsspektrums von IFN α / β eine Rolle spielt, läßt sich daraus insofern nicht ermessen, als Reporter-Gen-Studien ja *a priori* nur auf die Analyse dieser Wirkungskomponente beschränkt sind, während andere möglicherweise relevante Aspekte der IFN-Wirkung auf die HBV-Replikation (z.B. im posttranskriptionellen Bereich) der Untersuchung nicht zugänglich sind.

Zur umfassenderen Charakterisierung der intrazellulären IFN-Wirkung wird, da Zelllinien, die eine direkte Infektion mit dem HBV zulassen, nicht zur Verfügung stehen (Hayashi 1989, S. 2936; Heise 1999, S. 474; Rang 1999, S. 791), im wesentlichen mit zwei experimentellen Systemen gearbeitet: zum einen *in vitro* mit humanen Hepatomzellen, die – im Gegensatz zu den subgenomischen HBV-Fragmenten unserer Arbeit - die komplette HBV-DNA in ihr zelluläres Genom integriert haben (z.B. 2.2.15, vgl. Lampertico 1991 oder HB611, vgl. Ueda 1989), zum anderen *in vivo* mit einem transgenen HBV-Mausmodell (Chisari 1985, Guidotti 1995), wobei jedoch insbesondere die *in vivo* Arbeiten

4 Diskussion

vielfach über die bloße Aufklärung des Wirkmechanismus der therapeutischen Substanz IFN deutlich hinausgehen und sich in einem umfassenderen Kontext mit der Zytokin-gesteuerten Kontrolle der HBV-Infektion allgemein beschäftigen (siehe S. 104).

Untersucht wird in diesen Systemen eine Vielzahl von Parametern der HBV-Genexpression und – Replikation, nämlich die Bildung viraler RNA und replikativer DNA-Intermediate sowie die Produktion viraler Proteine. Die Ergebnisse sind zwar sehr heterogen, bezüglich der viralen Antigene HBs, HBe und HBc (Berthillon 1996, S. 16-17; Cavanaugh 1997, S. 3239 ; Kakumu 1992, S. 64 ; Korba 1990, S. 274; Rang 1999, S. 794) und der replikativen Intermediate (Caselmann 1992, S. 967; Cavanaugh 1997, S. 3237; Hayashi 1989, S. 2937; Kakumu 1992, S. 64-65; Pasquetto 2002, S. 5652; Rang 1999, S. 794; Wieland 2000, S. 4166) wird jedoch übereinstimmend in einer Vielzahl von Arbeiten eine IFN-induzierte Reduktion berichtet; da die Bildung all dieser viralen Produkte letztlich unter der Kontrolle der in unserer Arbeit untersuchten regulativen HBV-Elemente steht, sind diese Ergebnisse durchaus im Einklang mit dem von uns geforderten und untersuchten IFN-Wirkmechanismus, wobei auch die Möglichkeit einer reduzierten Translation der HBV-Proteine bedacht werden muß (Hayashi 1989, S. 2936).

Im Rahmen unserer Fragestellung von besonderem Interesse, da entscheidender Parameter der HBV-Transkription, ist jedoch die Beeinflussung der viralen mRNA. Daten hierzu finden sich in der Mehrzahl der Arbeiten – nicht etwa in Berthillon 1996, Kakumu 1992 und Lampertico 1991, eine IFN-induzierte Reduktion findet jedoch nicht durchweg statt. Dort, wo sich eine Verminderung der mRNA nachweisen läßt, wird z.T. eine Inhibition der HBV-Transkription als Ursache angenommen - in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen aus den Reportergenansätzen, z.T. werden aber auch andere, alternative Wirkmechanismen postuliert.

Kein Einfluß auf die Transkription konnte etwa festgestellt werden von **Korba et al.**, die in der HBs-Ag produzierenden PLC/PRF/5-Zelllinie unter IFN-Behandlung unveränderte HBV-RNA-Spiegel fanden, wobei hier allerdings nur die für die HBs-Bildung relevante RNA untersucht wurde (Korba 1990, S. 274). Auch in den Experimenten von **Hayashi und Koike** reduzierten IFN α , β (und γ) in einer stabil transfizierten HepG2-basierten Zelllinie (Hep-HB107) ausschließlich die HBV-DNA in intrazellulären Core-Partikeln, waren jedoch ohne Einfluß auf die HBV-DNA in vollständigen Viruspartikeln im Kulturmedium, die HBV Proteine (HBs, HBe, HBc) und insbesondere die HBV-Transkripte (Hayashi 1989, S. 2937-8); davon ausgehend schlagen die Autoren vor, daß IFN einen Schritt in der pgRNA-abhängigen Bildung von Core-Partikeln („assembly“) hemmt (Hayashi 1989, S. 2939). Eine durch IFN bewirkte gestörte Bildung oder beschleunigte Degradation dieser Kapside als wesentlicher intrazellulärer Angriffspunkt von IFN α / β wird auch favorisiert von **Wieland et al.** (Wieland 2000, S. 4170-1), die in transgenen HBV-Mäusen nach Stimulation mit dem IFN- α/β -Induktor [poly(I-C)] (McClary 2000) keine Veränderungen in Bezug auf die gesamte zelluläre HBV-RNA (Wieland 2000, S. 4166), aber eine Reduktion bzw. Elimination der pgRNA-enthaltenden Kapside fanden (Wieland 2000, S. 4167). In einer Linie hiermit steht auch eine Arbeit von **Cavanaugh et al.**, die in transgenen HBV-Mäusen, die mit IL12 stimuliert wurden, bei wiederum unveränderter HBV RNA, eine Elimination von HBV-Nukleokapsiden nachwiesen (Cavanaugh 1997, S. 3239) und dafür analoge Mechanismen postulieren (Cavanaugh 1997, S. 3242), wobei hier in erster Linie zwar IFN γ , daneben aber durchaus auch IFN α/β untersucht wurden (Cavanaugh 1997, S. 3240).

Im Gegensatz zu all diesen Arbeiten und in Übereinstimmung mit unserer Arbeit (und allen anderen Reporter-gen-Studien) demonstrierten **Caselmann** und Kollegen in HepG2.2.15-Zellen, daß IFN α 2b und β sehr wohl – neben einer Wirkung auf replikative DNA-Intermediate und die intrazellulären Spiegel an HBs und HBe - auch die HBV-RNA-Level reduziert, insbesondere das wahrscheinlich der pgRNA entsprechende 3,6kb Transkript (Caselmann 1992, S. 967-8). Übereinstimmend hiermit konnten auch Davis *et al.* eine IFN-induzierte Abnahme der viralen RNA aufzeigen (Davis 1994). Auch **Hamasaki** *et al.* wiesen in PLC/PRF/5-Zellen eine Reduktion der HBsAg-spezifischen RNA nach (Hamasaki 1992, S. 906). Ebenso fanden **Tur-Kaspa** *et al.* in HepG2.2.15 eine Reduktion der HBV-RNA, wobei Ergebnisse aus puls-labeling Untersuchungen mit [³H]Juridin nahelegten, daß es sich in der Tat um einen Effekt auf Ebene der Transkription und nicht etwa eine Degradation handelte (Tur-Kaspa 1990, S. 1823).

Analoge Effekte liessen sich auch im transgenen Mausmodell reproduzieren: So konnten **Gilles** *et al.* nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) verminderte HBV RNA-Spiegel feststellen - v.a. der 2,1 kb, aber auch der 2, 4kb und insbesondere der unter der Kontrolle des core promoters stehenden 3,5 kb RNA (Gilles 1992, S. 3956-7), wobei dieser Effekt vorwiegend über TNF α , aber zumindest z.T. auch über IFN vermittelt war (Gilles 1992, S. 3958). Auch **Guidotti** *et al.* zeigten nach Behandlung mit IFN α / β eine signifikante Verminderung der HBV-RNA, wobei der Effekt unabhängig von TNF α war (Guidotti, Guilhot *et al.* 1994)

Es muß eingewendet werden, daß die hier nachgewiesene Suppression der HBV-RNA nicht notwendigerweise Ausdruck einer verringerten Transkription ist, sondern möglicherweise auch, wie etwa Caselmann *et al.* bemerken (Caselmann 1992, S. 968), durch eine verstärkte RNA-Degradation zustande kommen könnte: ein entsprechender Mechanismus einer RNA-Destabilisierung und nachfolgenden -Degradation ist z.B. im Zusammenhang mit TNF α (Guilhot 1993) bzw. IFN γ (Tsui 1995) beschrieben worden, wobei sogar hieran beteiligte RNA-bindende Proteine publiziert wurden (Heise 1999). Daß Analoges möglicherweise auch für die Wirkung von IFN α / β zutrifft, legt eine Arbeit von **Rang** und Kollegen nahe: sie konnten in Experimenten in HuH7-Zellen, die im Gegensatz zu allen bisher angesprochenen Arbeiten transient mit der gesamten genomischen HBV-DNA transient transfiziert worden waren, neben einer Reduktion aller viralen Produkte (Core-Protein, replikative DNA-Intermediate) auch eine Suppression der HBV-RNA demonstrieren (Rang 1999, S. 793-5); da sich in Nuclear run-on transcription assays keine Unterschiede in der Transkriptionsrate zwischen IFN-behandelten und unbehandelten Zellen fand (Rang 1999, S. 796), wurde der auf die RNA bezogene Effekt, für den sich sogar eine entsprechende Zielregion eingrenzen ließ (Rang 1999, S. 795-7), neben einer möglicherweise auf Transkriptionsebene stattfindenden Wirkung von untergeordneter Bedeutung, in erster Linie auf *post*-transkriptionelle Schritte, konkret eine verstärkte RNA-Degradation, zurückgeführt (Rang 1999, S. 797).

In der Zusammenschau aller bisher diskutierten Arbeiten und eigener Ergebnisse ist festzuhalten: die gegen das HBV gerichtete intrazelluläre antivirale Aktivität der Typ I-Interferone stellt ein komplexes multifaktorielles Geschehen dar; die relative Ausprägung der einzelnen Aspekte der Interferon-Wirkung scheint u.a. von dem jeweils benutzten experimentellen System abzuhängen (vgl. u.a. Rang 1999, S. 791-2). Daß es – neben anderen Effekten – auch zu einer Reduktion viraler

4 Diskussion

Transkripte kommt, wird sowohl durch die Ergebnisse von Reporter-Gen-Assays als auch anderer experimenteller Ansätze eindeutig belegt. Nicht endgültig beantwortet werden kann jedoch die Frage, ob und inwieweit dieser Effekt auf eine Inhibition der Transkription oder aber eine verstärkte RNA-Degradation zurückzuführen ist oder ob möglicherweise beide Mechanismen parallel eine Rolle spielen.

Außerdem scheint unabhängig davon auch die Elimination von pgRNA-enhaltenden zytoplasmatischen Core-Partikeln (der eine Abnahme replikativer HBV-Intermediate entspricht) von Bedeutung zu sein. Somit kämen (mindestens) zwei unabhängige Mechanismen zum Tragen – wie etwa von Rang *et al.* (Rang 1999, S. 792) und Guidotti *et al.* (Guidotti, Ishikawa *et al.* 1996) betont.

Als gewisser Ausblick sei abschließend auch noch auf Folgendes hingewiesen: Die IFN α/β -abhängigen Mechanismen insgesamt stellen für die Zytokin-gesteuerte Kontrolle der HBV-Replikation im Rahmen des natürlichen Verlaufes der HBV-Infektion, deren Untersuchung - über die Aufklärung der Wirkung der therapeutischen Substanz IFN α hinaus – in einer Vielzahl aktueller Arbeiten immer mehr in den Mittelpunkt rückt, nur einen Teilaspekt dar. Insbesondere TNF α und IFN γ , die von HBV-spezifischen CTL freigesetzt werden, scheinen hier eine bedeutende Rolle zu spielen (Guidotti, Ando *et al.* 1994; Guidotti, Ishikawa *et al.* 1996). Erst kürzlich wurde ausgehend von einem transgenen HBV-Mausmodell eine immortalisierte hochdifferenzierte heptozytäre Zelllinie (HBV-Met) etabliert, in der HBV-Genexpression, HBV-Replikation und Virus-Sekretion stattfinden (Pasquetto 2002); in diesem System können isoliert die jeweils von IFN α , β und γ sowie von TNF α ausgelösten (differentiellen) Veränderungen untersucht werden. Dies wird über die hier angesprochenen Ergebnisse mit weniger hochdifferenzierten Zellen und in einem überschaubareren und reproduzierbareren Kontext als im transgenen Mausmodell neue Einblicke in die Wirkung von Typ I-Interferonen und anderer Zytokine auf das HBV gewähren.

5. Zusammenfassung

Hintergrund

Die durch das Hepatitis B Virus (HBV) verursachte chronische Hepatitis B stellt weltweit ein großes Gesundheitsproblem mit hoher Morbidität und Mortalität dar. Die etablierte Therapie der chronischen Hepatitis B ist derzeit die Behandlung mit IFN α ; mit einem positiven Ansprechen kann jedoch nur bei ca. 30 – 40% der Patienten gerechnet werden. Angesichts dieser keineswegs befriedigenden klinischen Wirksamkeit der IFN-Therapie stellt sich die Frage nach dem genauen Mechanismus des inhibitorischen Effekts von IFN α auf die HBV-Replikation. Daran knüpft sich die Hoffnung, dass ein besseres Verständnis der IFN-Wirkung langfristig zur Entwicklung effektiverer Therapieformen beitragen könnte.

Zielsetzung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war ein spezieller Teilaspekt der IFN-Wirkung: die Wirkung von Typ I-Interferonen auf die Enhancer I, II und core promoter-regulierte Transkription des Hepatitis B Virus. Diese genregulatorischen HBV-Elemente spielen nicht nur eine entscheidende Rolle für die Steuerung der Transkription aller viralen Genprodukte; sie kontrollieren auch die Bildung der pgRNA, die eine zentrale Stellung innerhalb des viralen Replikationszyklus einnimmt. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass im Falle einer Wirkung von IFN α auf die genannten regulativen HBV-Sequenzen dieser Effekt zumindest teilweise für die IFN α -vermittelte Inhibition der HBV-Replikation verantwortlich ist.

Ergebnisse

(1) Allgemeine Charakterisierung des IFN-Effekts

Mittels Plasmidkonstrukten, in denen ein Luciferase-Gen unter der Kontrolle der zu untersuchenden regulativen HBV-Sequenzen (nt 901 – nt 1840) stand, ließ sich in Reporter-gen-Assays eindeutig ein sowohl zeit- als auch dosisabhängiger spezifischer inhibitorischer Effekt von verschiedenen Typ I-Interferonen auf die HBV-Enh I, II und c/p-regulierte Transkription nachweisen. Diese hemmende Wirkung war bereits bei relativ niedrigen IFN-Konzentrationen vorhanden und lag in der Größenordnung von ca. 30-40%.

(2) Bedeutung des HBV-X-Proteins

Da das Insert der Plasmidkonstrukte neben der regulativen HBV-Sequenz auch das gesamte für das HBV-X-Protein kodierende Gen sowie dessen Promoter enthielt, musste von einer Expression des als allgemeiner unspezifischer transkriptioneller Transaktivator bekannten X-Proteins in unbestimmter Höhe und einer daraus resultierenden möglichen Interferenz mit der zu untersuchenden IFN-Wirkung ausgegangen werden. Deshalb wurde mit einem X-Minus-Konstrukt gearbeitet, in dem das Startkodon des X-ORF deletiert worden war. Unter Verwendung dieser Mutante konnte nur in den HuH7, nicht

jedoch in den HepG2-Zellen eine Interferenz des X-Proteins mit der zu untersuchenden IFN-induzierten HBV-Inhibition ausgeschlossen werden. Alle weiteren Versuche wurden deshalb ausschließlich in HuH7-Zellen durchgeführt.

(3) Eingrenzung einer IFN-sensitiven Zielregion mittels Deletionsanalysen

In einem nächsten Schritt sollte eine für die IFN-Wirkung kritische Zielregion innerhalb der gesamten HBV Enhancer I, II und core promoter-Sequenz genauer eingegrenzt werden. Für Deletionsanalysen wurden hierzu die Plasmidkonstrukte sukzessive vom 5'-Ende beginnend verkürzt.

Sofern die HBV-Region von nt 1578 – nt 1704 nicht entfernt worden war, blieb bei allen Deletionsmutanten die IFN-induzierte HBV-Inhibition in nahezu unveränderter Höhe erhalten. Dies zeigte sich insbesondere auch nach Deletion der HBV-Region 1085-1099; diese Region enthält ein Motiv, das der für die Induktion IFN-sensitiver Gene mittels des sog. Jak-STAT-Wegs erforderlichen ISRE-Sequenz ähnelt. Innerhalb des verwendeten experimentellen Systems war der inhibitorische IFN-Effekt unabhängig von der Anwesenheit dieses ISRE-ähnlichen Elements. Demgegenüber stellte sich der erwähnte HBV-Bereich nt 1578 bis nt 1704 als für die inhibitorische IFN-Wirkung zumindest kritische Region heraus.

(4) EMSAs: DNA-bindende Faktoren als Vermittler der IFN-Wirkung

Ausgehend von den Ergebnissen der Reporteragen-Assays und insbesondere der Deletionsanalysen wurde mittels EMSAs versucht, mögliche IFN-induzierte Veränderungen DNA-bindender Proteine nachzuweisen. Nukleäre Extrakte aus Typ I-IFN behandelten bzw. unbehandelten HuH7-Zellen wurden mit einer radioaktiv markierten Sonde, die den in den Deletionsanalysen als kritisch erkannten HBV-Bereich nt 1578 bis nt 1704 in unterschiedlicher Länge enthielt, inkubiert und mittels EMSA untersucht. Unter allen systematisch variierten Bedingungen ließen sich zwischen nukleären Extrakten aus IFN-behandelten bzw. unbehandelten Zellen keine signifikanten und konsistenten Unterschiede hinsichtlich ihres DNA-Bindungsverhaltens an die verwendeten HBV-DNA-Sonden nachweisen.

(i) Daraus lässt sich schlußfolgern, dass die IFN-Wirkung auf die untersuchten HBV-Sequenzen nicht direkt auf Ebene der DNA-Bindungsaktivität bestimmter nukleärer Faktoren stattfindet, sondern vielmehr über eine Beeinflussung vorgeschalteter Schritte zustande kommt, welche die transkriptionelle Aktivität der beteiligten Faktoren modulieren.

(ii) Als alternatives Erklärungs-Modell wäre denkbar, dass neben der HBV-Region 1578-1704 noch weitere stromaufwärts gelegene für die IFN-Wirkung bedeutsame DNA-Abschnitte innerhalb der regulativen HBV-Bereiche existieren; die in den Deletionsanalysen gefundene deutlich reduzierte Hemmung bei Deletion der Region nt 1578 – nt 1704 würde dabei einen Summationseffekt nach Deletion auch der weiteren stromaufwärts gelegenen Regionen darstellen. Bei diesen multiplen Angriffspunkten des IFN innerhalb der HBV Enh I, II und c/p-Region könnte es sich auch um repetitive Erkennungsmotive für ein und denselben DNA-bindenden Faktor handeln. Ein Kandidat für einen solchen Transkriptionsfaktor mit repetitiven Bindungsstellen innerhalb der untersuchten regulativen HBV-DNA-Abschnitte wäre auf der Grundlage einer Computer-gestützten Analyse der Enh I, II und c/p-Region der bekannte nukleäre Faktor C/EBP.

5 Zusammenfassung

Diese aus den Deletionsanalysen und EMSAs abgeleiteten Hypothesen eröffnen interessante Perspektiven für weitere Untersuchungen der HBV-Transkriptionsregulation durch die Typ I-Interferone.

Ausblick: weitere Aspekte der antiviralen Wirkung von Typ I-IFN

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte hemmende Effekt von Typ I-Interferonen auf die EnhI, II und c/p-regulierte Transkription des HBV trägt wesentlich zur bekannten Inhibition der HBV-Replikation durch IFN bei.

Daneben spielt auch eine Hemmung auf Ebene post-transkriptioneller Schritte des HBV-Replikationszyklus eine Rolle. Diese beiden Aspekte der IFN-Wirkung finden ohne eine Zerstörung der virusinfizierten Hepatozyten statt und werden deshalb als sog. nicht-zytolytische Wirkkomponente des Interferons zusammengefasst. Demgegenüber existiert auch eine sog. zytolytische Wirkung des IFN, hier kommt es über eine Modulation des Immunsystems zu einer verstärkten Elimination infizierter Leberzellen.

Für ein genaueres Verständnis dieser und anderer gegen das HBV gerichteter antiviraler Mechanismen der Typ I-Interferone sind weitere Arbeiten erforderlich. Perspektiven eröffnen könnten hier Versuche mit stabil mit dem gesamten HBV-Genom transfizierten Zelllinien sowie transgene HBV-Mausmodelle.

6. Literaturverzeichnis

1. Abb, J., Zchoval, R., Eisenburg, J., Pape, G.R., Zchoval, V., Deinhardt, F. Production of interferon alpha and interferon gamma by peripheral blood leukocytes from patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol* **16** (1985) 171-176.
2. Alcantara, F.F., Tang, H., McLachlan, A. Functional characterization of the interferon regulatory element in the enhancer 1 region of the hepatitis B virus genome. *Nucleic Acids Res* **30** (2002) 2068-2075.
3. Alexander, G.J., Brahm, J., Fagan, E.A., Smith, H.M., Daniels, H.M., Eddleston, A.L., Williams, R. Loss of HBsAg with interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection. *Lancet* **2** (1987) 66-69.
4. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215** (1990) 403-410.
5. Andrisani, O.M., Barnabas, S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review). *Int J Oncol* **15** (1999) 373-379.
6. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Analysis of Proteins, In: "Current protocols in molecular biology", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995.
7. Balfour, H.H., Jr. Antiviral drugs. *N Engl J Med* **340** (1999) 1255-1268.
8. Bassendine, M.F., Chadwick, R.G., Salmeron, J., Shipton, U., Thomas, H.C., Sherlock, S. Adenine arabinoside therapy in HBsAg-positive chronic liver disease: a controlled study. *Gastroenterology* **80** (1981) 1016-1022.
9. Belkowski, L.S., Sen, G.C. Inhibition of vesicular stomatitis viral mRNA synthesis by interferons. *J Virol* **61** (1987) 653-660.
10. Berthillon, P., Crance, J.M., Leveque, F., Jouan, A., Petit, M.A., Deloince, R., Trepo, C. Inhibition of the expression of hepatitis A and B viruses (HAV and HBV) proteins by interferon in a human hepatocarcinoma cell line (PLC/PRF/5). *J Hepatol* **25** (1996) 15-19.
11. Birnboim, H.C., Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7** (1979) 1513-1523.
12. Blackman, M.J., Morris, A.G. The effect of interferon treatment of targets on susceptibility to cytotoxic T-lymphocyte killing: augmentation of allogeneic killing and virus-specific killing relative to viral antigen expression. *Immunology* **56** (1985) 451-457.
13. Bloch, W. A biochemical perspective of the polymerase chain reaction. *Biochemistry* **30** (1991) 2735-2747.
14. Blum, H.E., Zhang, Z.S., Galun, E., von Weizsacker, F., Garner, B., Liang, T.J., Wands, J.R. Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro. *J Virol* **66** (1992) 1223-1227.
15. Blumberg, B.S., Alter, H.J., Visnich, S. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* **191** (1965) 541 - 546.
16. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72** (1976) 248-254.

17. Branca, A.A., Faltynek, C.R., D'Alessandro, S.B., Baglioni, C. Interaction of interferon with cellular receptors. Internalization and degradation of cell-bound interferon. *J Biol Chem* **257** (1982) 13291-13296.
18. Brennan, M.B., Stark, G.R. Interferon pretreatment inhibits simian virus 40 infections by blocking the onset of early transcription. *Cell* **33** (1983) 811-816.
19. Brook, M.G., Chan, G., Yap, I., Karayiannis, P., Lever, A.M., Jacyna, M., Main, J., Thomas, H.C. Randomised controlled trial of lymphoblastoid interferon alfa in European men with chronic hepatitis B virus infection. *Bmj* **299** (1989) 652-656.
20. Carreno, V., Castillo, I., Molina, J., Porres, J.C., Bartolome, J. Long-term follow-up of hepatitis B chronic carriers who responded to interferon therapy. *J Hepatol* **15** (1992) 102-106.
21. Caselmann, W.H., Meyer, M., Scholz, S., Hofschneider, P.H., Koshy, R. Type I interferons inhibit hepatitis B virus replication and induce hepatocellular gene expression in cultured liver cells. *J Infect Dis* **166** (1992) 966-971.
22. Castelruiz, Y., Larrea, E., Boya, P., Civeira, M.P., Prieto, J. Interferon alfa subtypes and levels of type I interferons in the liver and peripheral mononuclear cells in patients with chronic hepatitis C and controls. *Hepatology* **29** (1999) 1900-1904.
23. Cavanaugh, V.J., Guidotti, L.G., Chisari, F.V. Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* **71** (1997) 3236-3243.
24. Cavanaugh, V.J., Guidotti, L.G., Chisari, F.V. Inhibition of hepatitis B virus replication during adenovirus and cytomegalovirus infections in transgenic mice. *J Virol* **72** (1998) 2630-2637.
25. Chan, H.L., Ghany, M.G., Lok, A.S.F., Hepatitis B, In: "Schiff's Diseases of the Liver", Schiff, E.F., Sorrell, M.F., Maddrey, W.C. (Ed.), Lippincott Raven, Philadelphia, 1999, 8th edition, 757-791.
26. Chen, H.S., Kaneko, S., Girones, R., Anderson, R.W., Hornbuckle, W.E., Tennant, B.C., Cote, P.J., Gerin, J.L., Purcell, R.H., Miller, R.H. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J Virol* **67** (1993) 1218-1226.
27. Chisari, F.V. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest* **99** (1997) 1472-1477.
28. Chisari, F.V., Ferrari, C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* **13** (1995) 29-60.
29. Chisari, F.V., Ferrari, C. Viral Hepatitis. In: "Viral Pathogenesis", Nathanson, N. (Hrsg.), Lippincott-Raven, 1997, 745 - 778.
30. Chisari, F.V., Pinkert, C.A., Milich, D.R., Filippi, P., McLachlan, A., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science* **230** (1985) 1157-1160.
31. Choi, B.H., Park, G.T., Rho, H.M. Interaction of hepatitis B viral X protein and CCAAT/enhancer-binding protein alpha synergistically activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter. *J Biol Chem* **274** (1999) 2858-2865.
32. Coccia, E.M., Romeo, G., Nissim, A., Marziali, G., Albertini, R., Affabris, E., Battistini, A., Fiorucci, G., Orsatti, R., Rossi, G.B., et al. A full-length murine 2-5A synthetase cDNA transfected in NIH-3T3 cells impairs EMCV but not VSV replication. *Virology* **179** (1990) 228-233.
33. Colamonici, O., Yan, H., Domanski, P., Handa, R., Smalley, D., Mullersman, J., Witte, M., Krishnan, K., Krolewski, J. Direct binding to and tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of the type I interferon receptor by p135tyk2 tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* **14** (1994) 8133-8142.

6 Literaturverzeichnis

34. Colamonici, O.R., D'Alessandro, F., Diaz, M.O., Gregory, S.A., Neckers, L.M., Nordan, R. Characterization of three monoclonal antibodies that recognize the interferon alpha 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** (1990) 7230-7234.
35. Colamonici, O.R., Domanski, P. Identification of a novel subunit of the type I interferon receptor localized to human chromosome 21. *J Biol Chem* **268** (1993) 10895-10899.
36. Colamonici, O.R., Pfeffer, L.M., D'Alessandro, F., Plataniias, L.C., Gregory, S.A., Rosolen, A., Nordan, R., Cruciani, R.A., Diaz, M.O. Multichain structure of the IFN-alpha receptor on hematopoietic cells. *J Immunol* **148** (1992) 2126-2132.
37. Colgrove, R., Simon, G., Ganem, D. Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for viral replication. *J Virol* **63** (1989) 4019-4026.
38. Constantinescu, S.N., Croze, E., Murti, A., Wang, C., Basu, L., Hollander, D., Russell-Harde, D., Betts, M., Garcia-Martinez, V., Mullersman, J.E., et al. Expression and signaling specificity of the IFNAR chain of the type I interferon receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (1995) 10487-10491.
39. Constantinescu, S.N., Croze, E., Wang, C., Murti, A., Basu, L., Mullersman, J.E., Pfeffer, L.M. Role of interferon alpha/beta receptor chain 1 in the structure and transmembrane signaling of the interferon alpha/beta receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (1994) 9602-9606.
40. Croze, E., Russell-Harde, D., Wagner, T.C., Pu, H., Pfeffer, L.M., Perez, H.D. The human type I interferon receptor. Identification of the interferon beta-specific receptor-associated phosphoprotein. *J Biol Chem* **271** (1996) 33165-33168.
41. Cryer, D.R., Eccleshall, R., Marmur, J. Isolation of yeast DNA. *Methods Cell Biol* **12** (1975) 39-44.
42. Dane, D.S., Cameron, C.H., Briggs, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1** (1970) 695-698.
43. Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., Stark, G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264** (1994) 1415-1421.
44. Davis, M.G., Jansen, R.W. Inhibition of hepatitis B virus in tissue culture by alpha interferon. *Antimicrob Agents Chemother* **38** (1994) 2921-2924.
45. de Jongh, F.E., Janssen, H.L., de Man, R.A., Hop, W.C., Schalm, S.W., van Blankenstein, M. Survival and prognostic indicators in hepatitis B surface antigen-positive cirrhosis of the liver. *Gastroenterology* **103** (1992) 1630-1635.
46. de Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., Williams, B.R. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* **69** (2001) 912-920.
47. de Wet, J.R., Wood, K.V., Helinski, D.R., DeLuca, M. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82** (1985) 7870-7873.
48. Dent, C.L., Latchman, D.S., The DNA mobility shift assay, In: "Transcription Factors: a Practical Approach", Latchman, D.S. (Ed.), Oxford University Press, 1993.
49. Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., Silverman, R.H. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (1998) 15623-15628.
50. Diehl, A.M., Michaelson, P., Yang, S.Q. Selective induction of CCAAT/enhancer binding protein isoforms occurs during rat liver development. *Gastroenterology* **106** (1994) 1625-1637.

51. Dienstag, J.L., Savarez, A.M., Biham, A.K. Increased NK cell activity in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* **2** (1982) 170S-115S.
52. Domanski, P., Fish, E., Nadeau, O.W., Witte, M., Platanius, L.C., Yan, H., Krolewski, J., Pitha, P., Colamonici, O.R. A region of the beta subunit of the interferon alpha receptor different from box 1 interacts with Jak1 and is sufficient to activate the Jak- Stat pathway and induce an antiviral state. *J Biol Chem* **272** (1997) 26388-26393.
53. Domanski, P., Nadeau, O.W., Platanius, L.C., Fish, E., Kellum, M., Pitha, P., Colamonici, O.R. Differential use of the betaL subunit of the type I interferon (IFN) receptor determines signaling specificity for IFNalpha2 and IFNbeta. *J Biol Chem* **273** (1998) 3144-3147.
54. Domanski, P., Witte, M., Kellum, M., Rubinstein, M., Hackett, R., Pitha, P., Colamonici, O.R. Cloning and expression of a long form of the beta subunit of the interferon alpha beta receptor that is required for signaling. *J Biol Chem* **270** (1995) 21606-21611.
55. Dorr, R.T. Interferon-alpha in malignant and viral diseases. A review. *Drugs* **45** (1993) 177-211.
56. Dowell, P., Cooke, D.W. Olf-1/Early B cell factor is a regulator of glut4 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **277** (2002) 1712-1718.
57. Dusheiko, G. Side effects of alpha interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* **26** (1997) 112S-121S.
58. Dusheiko, G.M., Roberts, J.A. Treatment of chronic type B and C hepatitis with interferon alfa: an economic appraisal. *Hepatology* **22** (1995) 1863-1873.
59. Eron, L.J., Judson, F., Tucker, S., Praver, S., Mills, J., Murphy, K., Hickey, M., Rogers, M., Flannigan, S., Hien, N., et al. Interferon therapy for condylomata acuminata. *N Engl J Med* **315** (1986) 1059-1064.
60. Eron, L.J., Toy, C., Salsitz, B., Scheer, R.R., Wood, D.L., Nadler, P.I. Therapy of genital herpes with topically applied interferon. *Antimicrob Agents Chemother* **31** (1987) 1137-1139.
61. Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987) 7413-7417.
62. Foster, G.R. Interferons in host defense. *Semin Liver Dis* **17** (1997) 287-295.
63. Foster, G.R., Ackrill, A.M., Goldin, R.D., Kerr, I.M., Thomas, H.C., Stark, G.R. Expression of the terminal protein region of hepatitis B virus inhibits cellular responses to interferons alpha and gamma and double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** (1991) 2888 - 2892.
64. Foster, G.R., Rodrigues, O., Ghouze, F., Schulte-Frohlinde, E., Testa, D., Liao, M.J., Stark, G.R., Leadbeater, L., Thomas, H.C. Different relative activities of human cell-derived interferon-alpha subtypes: IFN-alpha 8 has very high antiviral potency. *J Interferon Cytokine Res* **16** (1996) 1027-1033.
65. Fried, M., Crothers, D.M. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **9** (1981) 6505-6525.
66. Friedman, R.L., Stark, G.R. alpha-Interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences. *Nature* **314** (1985) 637-639.
67. Fu, X.Y. A transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an interferon alpha-induced cytoplasmic protein tyrosine kinase(s). *Cell* **70** (1992) 323-335.

6 Literaturverzeichnis

68. Fu, X.Y., Schindler, C., Improta, T., Aebersold, R., Darnell, J.E., Jr. The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (1992) 7840-7843.
69. Ganem, D., Varmus, H.E. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* **56** (1987) 651-693.
70. Garabedian, M.J., Labaer, J., Liu, W.-H., Thomas, J.R. Analysis of protein-DNA interactions. In: "Gene Transcription, A Practical Approach". Hames, B.D., Higgins, S.J. (Ed.), IRL Press, Oxford, 1993.
71. Garcia, G., Smith, C.I., Weissberg, J.I., Eisenberg, M., Bissett, J., Nair, P.V., Mastre, B., Rosno, S., Roskamp, D., Waterman, K., et al. Adenine arabinoside monophosphate (vidarabine phosphate) in combination with human leukocyte interferon in the treatment of chronic hepatitis B. A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* **107** (1987) 278-285.
72. Garner, M.M., Revzin, A. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* **9** (1981) 3047-3060.
73. Gilles, P.N., Fey, G., Chisari, F.V. Tumor necrosis factor alpha negatively regulates hepatitis B virus gene expression in transgenic mice. *J Virol* **66** (1992) 3955-3960.
74. Gordien, E., Rosmorduc, O., Peltekian, C., Garreau, F., Brechot, C., Kremsdorf, D. Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein. *J Virol* **75** (2001) 2684-2691.
75. Graham, F.L., van der Eb, A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52** (1973) 456-467.
76. Greenberg, H.B., Pollard, R.B., Lutwick, L.I., Gregory, P.B., Robinson, W.S., Merigan, T.C. Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis. *N Engl J Med* **295** (1976) 517-522.
77. Guidotti, L.G., Ando, K., Hobbs, M.V., Ishikawa, T., Runkel, L., Schreiber, R.D., Chisari, F.V. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (1994) 3764-3768.
78. Guidotti, L.G., Borrow, P., Hobbs, M.V., Matzke, B., Gresser, I., Oldstone, M.B., Chisari, F.V. Viral cross talk: intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (1996) 4589-4594.
79. Guidotti, L.G., Chisari, F.V. Cytokine-induced viral purging--role in viral pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **2** (1999) 388-391.
80. Guidotti, L.G., Guilhot, S., Chisari, F.V. Interleukin-2 and alpha/beta interferon down-regulate hepatitis B virus gene expression in vivo by tumor necrosis factor-dependent and -independent pathways. *J Virol* **68** (1994) 1265-1270.
81. Guidotti, L.G., Ishikawa, T., Hobbs, M.V., Matzke, B., Schreiber, R., Chisari, F.V. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* **4** (1996) 25-36.
82. Guidotti, L.G., Matzke, B., Schaller, H., Chisari, F.V. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* **69** (1995) 6158-6169.
83. Guidotti, L.G., Morris, A., Mendez, H., Koch, R., Silverman, R.H., Williams, B.R., Chisari, F.V. Interferon-regulated pathways that control hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* **76** (2002) 2617-2621.
84. Guidotti, L.G., Rochford, R., Chung, J., Shapiro, M., Purcell, R., Chisari, F.V. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* **284** (1999) 825-829.

85. Guilhot, S., Guidotti, L.G., Chisari, F.V. Interleukin-2 downregulates hepatitis B virus gene expression in transgenic mice by a posttranscriptional mechanism. *J Virol* **67** (1993) 7444-7449.
86. Hamasaki, K., Nakata, K., Nakao, K., Mitsuoka, S., Tsutsumi, T., Kato, Y., Shima, M., Ishii, N., Tamaoki, T., Nagataki, S. Interaction of interferon-alpha with interleukin-1 beta or tumor necrosis factor-alpha on hepatitis B virus enhancer activity. *Biochem Biophys Res Commun* **183** (1992) 904-909.
87. Haria, M., Benfield, P. Interferon-alpha-2a. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of viral hepatitis. *Drugs* **50** (1995) 873-896.
88. Harris, H.W., Gill, T.J., 3rd Expression of class I transplantation antigens. *Transplantation* **42** (1986) 109-117.
89. Haruna, Y., Hayashi, N., Katayama, K., Yuki, N., Kasahara, A., Sasaki, Y., Fusamoto, H., Kamada, T. Expression of X protein and hepatitis B virus replication in chronic hepatitis. *Hepatology* **13** (1991) 417-421.
90. Hayashi, Y., Koike, K. Interferon inhibits hepatitis B virus replication in a stable expression system of transfected viral DNA. *J Virol* **63** (1989) 2936-2940.
91. Heise, T., Guidotti, L.G., Cavanaugh, V.J., Chisari, F.V. Hepatitis B virus RNA-binding proteins associated with cytokine-induced clearance of viral RNA from the liver of transgenic mice. *J Virol* **73** (1999) 474-481.
92. Henkler, F.F., Koshy, R. Hepatitis B virus transcriptional activators: mechanisms and possible role in oncogenesis. *J Viral Hepat* **3** (1996) 109-121.
93. Holmes, D.S., Quigley, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114** (1981) 193-197.
94. Honda, Y., Rogers, L., Nakata, K., Zhao, B.Y., Pine, R., Nakai, Y., Kurosu, K., Rom, W.N., Weiden, M. Type I interferon induces inhibitory 16-kD CCAAT/ enhancer binding protein (C/EBP)beta, repressing the HIV-1 long terminal repeat in macrophages: pulmonary tuberculosis alters C/EBP expression, enhancing HIV-1 replication. *J Exp Med* **188** (1998) 1255-1265.
95. Hoofnagle, J.H., di Bisceglie, A.M. The treatment of chronic viral hepatitis. *N Engl J Med* **336** (1997) 347-356.
96. Hoofnagle, J.H., Hanson, R.G., Minuk, G.Y., Pappas, S.C., Schafer, D.F., Dusheiko, G.M., Straus, S.E., Popper, H., Jones, E.A. Randomized controlled trial of adenine arabinoside monophosphate for chronic type B hepatitis. *Gastroenterology* **86** (1984) 150-157.
97. Hoofnagle, J.H., Peters, M., Mullen, K.D., Jones, D.B., Rustgi, V., Di Bisceglie, A., Hallahan, C., Park, Y., Meschievitz, C., Jones, E.A. Randomized, controlled trial of recombinant human alpha-interferon in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **95** (1988) 1318-1325.
98. Hopf, U., Niederau, C., Kleber, G., Fleig, W.E. The treatment of chronic viral hepatitis B/D and acute and chronic viral hepatitis C. The consensus of the German Society for Digestive and Metabolic Diseases. *Z Gastroenterol* **35** (1997) 971-986.
99. Huan, B., Siddiqui, A. Regulation of hepatitis B virus gene expression. *J Hepatol* **17** (1993) S20-23.
100. Ibelgauts, H., "Gentechnologie von A bis Z" VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1990, 1st edition.

6 Literaturverzeichnis

101. Ikeda, T., Lever, A.M., Thomas, H.C. Evidence for a deficiency of interferon production in patients with chronic hepatitis B virus infection acquired in adult life. *Hepatology* **6** (1986) 962-965.
102. Isaacs, A., Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B* **147** (1957) 258-267.
103. Israel, A., Kimura, A., Fournier, A., Fellous, M., Kourilsky, P. Interferon response sequence potentiates activity of an enhancer in the promoter region of a mouse H-2 gene. *Nature* **322** (1986) 743-746.
104. Jacobs, L.D., Cookfair, D.L., Rudick, R.A., Herndon, R.M., Richert, J.R., Salazar, A.M., Fischer, J.S., Goodkin, D.E., Granger, C.V., Simon, J.H., Alam, J.J., Bartoszak, D.M., Bourdette, D.N., Braiman, J., Brownschidle, C.M., Coats, M.E., Cohan, S.L., Dougherty, D.S., Kinkel, R.P., Mass, M.K., Munschauer, F.E., 3rd, Priore, R.L., Pullicino, P.M., Scherokman, B.J., Whitham, R.H., et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* **39** (1996) 285-294.
105. Jaeckel, E., Manns, M.P. Experience with lamivudine against hepatitis B virus. *Intervirology* **40** (1997) 322-336.
106. Jilbert, A.R., Burrell, C.J., Gowans, E.J., Hertzog, P.J., Linnane, A.W., Marmion, B.P. Cellular localization of alpha-interferon in hepatitis B virus-infected liver tissue. *Hepatology* **6** (1986) 957-961.
107. Kakumu, S., Ito, Y., Wakita, T., Yoshioka, K., Ishikawa, T., Takayanagi, M., Higashi, Y., Yang, Z.Q. Effects of transforming growth factor-beta 1 against the inhibitory action of interferon on DNA synthesis and viral replication in hepatitis B virus DNA-transfected cell. *J Med Virol* **38** (1992) 62-66.
108. Kato, Y., Nakagawa, H., Kobayashi, K., Hattori, N., Hatano, K. Interferon production by peripheral lymphocytes in HBsAg-positive liver diseases. *Hepatology* **2** (1982) 789-790.
109. Keskinen, P., Nyqvist, M., Sareneva, T., Pirhonen, J., Melen, K., Julkunen, I. Impaired antiviral response in human hepatoma cells. *Virology* **263** (1999) 364-375.
110. Kim, C.M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., Jay, G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* **351** (1991) 317-320.
111. Kimura, T., Kadokawa, Y., Harada, H., Matsumoto, M., Sato, M., Kashiwazaki, Y., Tarutani, M., Tan, R.S., Takasugi, T., Matsuyama, T., Mak, T.W., Noguchi, S., Taniguchi, T. Essential and non-redundant roles of p48 (ISGF3 gamma) and IRF-1 in both type I and type II interferon responses, as revealed by gene targeting studies. *Genes Cells* **1** (1996) 115-124.
112. Korba, B.E., Boumpas, D., Mann, D., Yoakum, G.H. Direct modulation of HBV surface antigen in a human, HBsAg-producing hepatocellular carcinoma cell line by alpha, beta, or gamma interferons. *J Med Virol* **31** (1990) 272-276.
113. Krown, S.E., Burk, M.W., Kirkwood, J.M., Kerr, D., Morton, D.L., Oettgen, H.F. Human leukocyte (alpha) interferon in metastatic malignant melanoma: the American Cancer Society phase II trial. *Cancer Treat Rep* **68** (1984) 723-726.
114. Krown, S.E., Real, F.X., Cunningham-Rundles, S., Myskowski, P.L., Koziner, B., Fein, S., Mittelman, A., Oettgen, H.F., Safai, B. Preliminary observations on the effect of recombinant leukocyte A interferon in homosexual men with Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* **308** (1983) 1071-1076.
115. Krown, S.E., Real, F.X., Krim, M., Cunningham-Rundles, S., Koziner, B., Myskowski, P.L., Safai, B., Oettgen, H.F. Recombinant leukocyte A interferon in Kaposi's sarcoma. *Ann N Y Acad Sci* **437** (1984) 431-438.

116. Krug, R.M., Shaw, M., Broni, B., Shapiro, G., Haller, O. Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx gene product. *J Virol* **56** (1985) 201-206.
117. Lampertico, P., Malter, J.S., Gerber, M.A. Development and application of an in vitro model for screening anti-hepatitis B virus therapeutics. *Hepatology* **13** (1991) 422-426.
118. Landolfo, S., Gribaudo, G., Angeretti, A., Gariglio, M. Mechanisms of viral inhibition by interferons. *Pharmacol Ther* **65** (1995) 415-442.
119. Lara-Pezzi, E., Majano, P.L., Gomez-Gonzalo, M., Garcia-Monzon, C., Moreno-Otero, R., Levrero, M., Lopez-Cabrera, M. The hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor alpha gene expression in hepatocytes. *Hepatology* **28** (1998) 1013-1021.
120. Lee, W.M. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* **337** (1997) 1733-1745.
121. Lee, Y.H., Yun, Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* **273** (1998) 25510-25515.
122. Lengyel, P. Biochemistry of interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* **51** (1982) 251-282.
123. Leung, S., Qureshi, S.A., Kerr, I.M., Darnell, J.E., Jr., Stark, G.R. Role of STAT2 in the alpha interferon signaling pathway. *Mol Cell Biol* **15** (1995) 1312-1317.
124. Levy, D., Lerner, A., Chaudhuri, A., Babiss, L.E., Darnell, J.E., Jr. Interferon-stimulated transcription: isolation of an inducible gene and identification of its regulatory region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83** (1986) 8929-8933.
125. Li, J.M., Shen, X., Pei-Chi Hu, P., Wang, X.F. Transforming growth factor β stimulates the human immunodeficiency virus 1 enhancer and requires NF- κ B activity. *Mol Cell Biol* **18** (1998) 110-121.
126. Liaw, Y.F., Pao, C.C., Chu, C.M., Sheen, I.S., Huang, M.J. Changes of serum hepatitis B virus DNA in two types of clinical events preceding spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in chronic type B hepatitis. *Hepatology* **7** (1987) 1-3.
127. Lok, A.S. Chronic hepatitis B. *N Engl J Med* **346** (2002) 1682-1683.
128. Lutfalla, G., Roeckel, N., Mogensen, K.E., Mattei, M.G., Uze, G. Assignment of the human interferon-alpha receptor gene to chromosome 21q22.1 by in situ hybridization. *J Interferon Res* **10** (1990) 515-517.
129. Mason, W.S., Seal, G., Summers, J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* **36** (1980) 829-836.
130. Matthews, J.C., Hori, K., Cormier, M.J. Purification and properties of Renilla reniformis luciferase. *Biochemistry* **16** (1977) 85-91.
131. McClary, H., Koch, R., Chisari, F.V., Guidotti, L.G. Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines. *J Virol* **74** (2000) 2255-2264.
132. Melegari, M., Scaglioni, P.P., Wands, J.R. Cloning and characterization of a novel hepatitis B virus x binding protein that inhibits viral replication. *J Virol* **72** (1998) 1737-1743.
133. Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N.S., Kerr, I.M., Williams, B.R., Hovanessian, A.G. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* **62** (1990) 379-390.
134. Milich, D.R., Jones, J.E., Hughes, J.L., Price, J., Raney, A.K., McLachlan, A. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** (1990) 6599-6603.

6 Literaturverzeichnis

135. Milich, D.R., McLachlan, A., Stahl, S., Wingfield, P., Thornton, G.B., Hughes, J.L., Jones, J.E. Comparative immunogenicity of hepatitis B virus core and E antigens. *J Immunol* **141** (1988) 3617-3624.
136. Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T., Taniguchi, T. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* **54** (1988) 903-913.
137. Muller, M., Briscoe, J., Laxton, C., Guschin, D., Ziemiecki, A., Silvennoinen, O., Harpur, A.G., Barbieri, G., Witthuhn, B.A., Schindler, C., et al. The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon- alpha/beta and -gamma signal transduction. *Nature* **366** (1993) 129-135.
138. Nadeau, O.W., Domanski, P., Usacheva, A., Uddin, S., Platanius, L.C., Pitha, P., Raz, R., Levy, D., Majchrzak, B., Fish, E., Colamonici, O.R. The proximal tyrosines of the cytoplasmic domain of the beta chain of the type I interferon receptor are essential for signal transducer and activator of transcription (Stat) 2 activation. Evidence that two Stat2 sites are required to reach a threshold of interferon alpha-induced Stat2 tyrosine phosphorylation that allows normal formation of interferon-stimulated gene factor 3. *J Biol Chem* **274** (1999) 4045-4052.
139. Nakao, K., Nakata, K., Yamashita, M., Tamada, Y., Hamasaki, K., Ishikawa, H., Kato, Y., Eguchi, K., Ishii, N. p48 (ISGF-3gamma) is involved in interferon-alpha-induced suppression of hepatitis B virus enhancer-1 activity. *J Biol Chem* **274** (1999) 28075-28078.
140. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* **1** (1982) 841-845.
141. Nguyen, H., Hiscott, J., Pitha, P.M. The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev* **8** (1997) 293-312.
142. Niederau, C., Heintges, T., Lange, S., Goldmann, G., Niederau, C.M., Mohr, L., Haussinger, D. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* **334** (1996) 1422-1427.
143. Novick, D., Cohen, B., Rubinstein, M. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* **77** (1994) 391-400.
144. Oberman, F., Panet, A. Inhibition of transcription of herpes simplex virus immediate early genes in interferon-treated human cells. *J Gen Virol* **69** (1988) 1167-1177.
145. Ott, M., Thyagarajan, S.P., Gupta, S. Phyllanthus amarus suppresses hepatitis B virus by interrupting interactions between HBV enhancer I and cellular transcription factors. *Eur J Clin Invest* **27** (1997) 908-915.
146. Papatheodoridis, G.V., Dimou, E., Papadimitropoulos, V. Nucleoside analogues for chronic hepatitis B : antiviral efficacy and viral resistance. *Am J Gastroenterol* **97** (2002) 1618-1628.
147. Pasquetto, V., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Tripodi, M., Chisari, F.V. Cytokine-sensitive replication of hepatitis B virus in immortalized mouse hepatocyte cultures. *J Virol* **76** (2002) 5646-5653.
148. Patel, N.U., Jameel, S., Isom, H., Siddiqui, A. Interactions between nuclear factors and the hepatitis B virus enhancer. *J Virol* **63** (1989) 5293-5301.
149. Pellegrini, S., John, J., Shearer, M., Kerr, I.M., Stark, G.R. Use of a selectable marker regulated by alpha interferon to obtain mutations in the signaling pathway. *Mol Cell Biol* **9** (1989) 4605-4612.
150. Perrillo, R.P. The management of chronic hepatitis B. *Am J Med* **96** (1994) 34S-39S; discussion 39S-40S.

151. Perrillo, R.P., Mason, A.L. Therapy for hepatitis B virus infection. *Gastroenterol Clin North Am* **23** (1994) 581-601.
152. Perrillo, R.P., Regenstein, F.G., Bodicky, C.J., Campbell, C.R., Sanders, G.E., Sunwoo, Y.C. Comparative efficacy of adenine arabinoside 5' monophosphate and prednisone withdrawal followed by adenine arabinoside 5' monophosphate in the treatment of chronic active hepatitis type B. *Gastroenterology* **88** (1985) 780-786.
153. Perrillo, R.P., Schiff, E.R., Davis, G.L., Bodenheimer, H.C., Jr., Lindsay, K., Payne, J., Dienstag, J.L., O'Brien, C., Tamburro, C., Jacobson, I.M., et al. A randomized, controlled trial of interferon alfa-2b alone and after prednisone withdrawal for the treatment of chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* **323** (1990) 295-301.
154. Petersen, J., Dandri, M., Gupta, S., Rogler, C.E. Liver repopulation with xenogenic hepatocytes in B and T cell-deficient mice leads to chronic hepadnavirus infection and clonal growth of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (1998) 310-315.
155. Pignatelli, M., Waters, J., Brown, D., Lever, A., Iwarson, S., Schaff, Z., Gerety, R., Thomas, H.C. HLA class I antigens on the hepatocyte membrane during recovery from acute hepatitis B virus infection and during interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* **6** (1986) 349-353.
156. Poitrine, A., Chousterman, S., Chousterman, M., Naveau, S., Thang, M.N., Chaput, J.C. Lack of in vivo activation of the interferon system in HBsAg-positive chronic active hepatitis. *Hepatology* **5** (1985) 171-174.
157. Pollard, R.B., Smith, J.L., Neal, A., Gregory, P.B., Merigan, T.C., Robinson, W.S. Effect of vidarabine on chronic hepatitis B virus infection. *Jama* **239** (1978) 1648-1650.
158. Rang, A., Bruns, M., Heise, T., Will, H. Antiviral activity of interferon-alpha against hepatitis B virus can be studied in non-hepatic cells and is independent of MxA. *J Biol Chem* **277** (2002) 7645-7647.
159. Rang, A., Gunther, S., Will, H. Effect of interferon alpha on hepatitis B virus replication and gene expression in transiently transfected human hepatoma cells. *J Hepatol* **31** (1999) 791-799.
160. Rang, A., Heise, T., Will, H. Lack of a role of the interferon-stimulated response element-like region in interferon alpha -induced suppression of Hepatitis B virus in vitro. *J Biol Chem* **276** (2001) 3531-3535.
161. Ransohoff, R.M. Cellular responses to interferons and other cytokines: the JAK-STAT paradigm. *N Engl J Med* **338** (1998) 616-618.
162. Ransohoff, R.M., Maroney, P.A., Nayak, D.P., Chambers, T.M., Nilsen, T.W. Effect of human alpha A interferon on influenza virus replication in MDBK cells. *J Virol* **56** (1985) 1049-1052.
163. Reis, L.F., Harada, H., Wolchok, J.D., Taniguchi, T., Vilcek, J. Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN-beta and IFN-inducible genes. *Embo J* **11** (1992) 185-193.
164. Rohr, O., Sawaya, B.E., Lecestre, D., Aunis, D., Schaeffer, E. Dopamine stimulates expression of the human immunodeficiency virus type 1 via NF-κB in cells of the immune system. *Nucleic Acids Res* **27** (1999) 3291-3299.
165. Romero, R., Lavine, J.E. Cytokine inhibition of the hepatitis B virus core promoter. *Hepatology* **23** (1996) 17-23.
166. Rossner, M.T. Review: hepatitis B virus X-gene product: a promiscuous transcriptional activator. *J Med Virol* **36** (1992) 101-117.

6 Literaturverzeichnis

167. Rudick, R.A., Cohen, J.A., Weinstock-Guttman, B., Kinkel, R.P., Ransohoff, R.M. Management of multiple sclerosis. *N Engl J Med* **337** (1997) 1604-1611.
168. Russell-Harde, D., Wagner, T.C., Rani, M.R., Vogel, D., Colamonici, O., Ransohoff, R.M., Majchrzak, B., Fish, E., Perez, H.D., Croze, E. Role of the intracellular domain of the human type I interferon receptor 2 chain (IFNAR2c) in interferon signaling. Expression of IFNAR2c truncation mutants in U5A cells. *J Biol Chem* **275** (2000) 23981-23985.
169. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. "Molecular cloning. A laboratory manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, 2nd edition.
170. Samuel, C.E. Mechanism of interferon action: phosphorylation of protein synthesis initiation factor eIF-2 in interferon-treated human cells by a ribosome-associated kinase processing site specificity similar to hemin-regulated rabbit reticulocyte kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** (1979) 600-604.
171. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** (1977) 5463-5467.
172. Saracco, G., Mazzella, G., Rosina, F., Cancellieri, C., Lattore, V., Raise, E., Rocca, G., Giorda, L., Verme, G., Gasbarrini, G., et al. A controlled trial of human lymphoblastoid interferon in chronic hepatitis B in Italy. *Hepatology* **10** (1989) 336-341.
173. Scaglioni, P.P., Melegari, M., Wands, J.R. Recent advances in the molecular biology of hepatitis B virus. *Baillieres Clin Gastroenterol* **10** (1996) 207-225.
174. Schalm, S.W., Heytink, R.A., van Buuren, H.R., de Man, R.A. Acyclovir enhances the antiviral effect of interferon in chronic hepatitis B. *Lancet* **2** (1985) 358-360.
175. Schindler, C., Fu, X.Y., Improta, T., Aebersold, R., Darnell, J.E., Jr. Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84- kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (1992) 7836-7839.
176. Schindler, C., Shuai, K., Prezioso, V.R., Darnell, J.E., Jr. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* **257** (1992) 809-813.
177. Scott, V., Clark, A., Docherty, K., The Gel Retardation Assay, In: "Protocols for Gene Analysis", Harwood (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, 1994, 339-347.
178. Seeger, C., Mason, W.S. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* **64** (2000) 51-68.
179. Seto, E., Yen, T.S., Peterlin, B.M., Ou, J.H. Trans-activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by the hepatitis B virus X protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** (1988) 8286-8290.
180. Shaul, Y., Rutter, W.J., Laub, O. A human hepatitis B viral enhancer element. *Embo J* **4** (1985) 427-430.
181. Spandau, D.F., Lee, C.H. trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J Virol* **62** (1988) 427-434.
182. Sprengel, R., Kaleta, E.F., Will, H. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* **62** (1988) 3832-3839.
183. Staeheli, P. Interferon-induced proteins and the antiviral state. *Adv Virus Res* **38** (1990) 147-200.
184. Staeheli, P., Haller, O., Boll, W., Lindenmann, J., Weissmann, C. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* **44** (1986) 147-158.

185. Strand, P., Carlsson, L., Rask, K., Skrtic, S., Ekberg, S., Hedin, L., Oscarsson, J., Jansson, J.O. Growth hormone induces CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha) in cultured rat hepatocytes. *J Hepatol* **32** (2000) 618-626.
186. Su, H., Yee, J.K. Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (1992) 2708-2712.
187. Summers, J., Mason, W.S. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* **29** (1982) 403-415.
188. Summers, J., Smolec, J.M., Snyder, R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75** (1978) 4533-4537.
189. Tang, H., McLachlan, A. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (2001) 1841-1846.
190. Testut, P., Renard, C.A., Terradillos, O., Vitvitski-Trepo, L., Tekaiia, F., Degott, C., Blake, J., Boyer, B., Buendia, M.A. A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol* **70** (1996) 4210-4219.
191. Tolentino, P., Dianzani, F., Zucca, M., Giacchino, R. Decreased interferon response by lymphocytes from children with chronic hepatitis. *J Infect Dis* **132** (1975) 459-461.
192. Tolentino, P., Dianzani, F., Zucca, M., Giacchino, R. Decreased interferon response by lymphocytes from children with chronic hepatitis. *J Interferon Res Spec No* (1992) 3-6.
193. Trujillo, M.A., Letovsky, J., Maguire, H.F., Lopez-Cabrera, M., Siddiqui, A. Functional analysis of a liver-specific enhancer of the hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (1991) 3797-3801.
194. Tsui, L.V., Guidotti, L.G., Ishikawa, T., Chisari, F.V. Posttranscriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (1995) 12398-12402.
195. Tur-Kaspa, R., Teicher, L., Laub, O., Itin, A., Dagan, D., Bloom, B.R., Shafritz, D.A. Alpha interferon suppresses hepatitis B virus enhancer activity and reduces viral gene transcription. *J Virol* **64** (1990) 1821-1824.
196. Tuttleman, J.S., Pourcel, C., Summers, J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* **47** (1986) 451-460.
197. Twu, J.S., Lee, C.H., Lin, P.M., Schloemer, R.H. Hepatitis B virus suppresses expression of human beta-interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** (1988) 252-256.
198. Twu, J.S., Schloemer, R.H. Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J Virol* **61** (1987) 3448-3453.
199. Twu, J.S., Schloemer, R.H. Transcription of the human beta interferon gene is inhibited by hepatitis B virus. *J Virol* **63** (1989) 3065-3071.
200. Ueda, K., Tsurimoto, T., Nagahata, T., Chisaka, O., Matsubara, K. An in vitro system for screening anti-hepatitis B virus drugs. *Virology* **169** (1989) 213-216.
201. Usacheva, A., Smith, R., Minshall, R., Baida, G., Seng, S., Croze, E., Colamonici, O. The WD motif-containing protein receptor for activated protein kinase C (RACK1) is required for recruitment and activation of signal transducer and activator of transcription 1 through the type I interferon receptor. *J Biol Chem* **276** (2001) 22948-22953.
202. Uze, G., Lutfalla, G., Gresser, I. Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell* **60** (1990) 225-234.

6 Literaturverzeichnis

203. Uze, G., Lutfalla, G., Mogensen, K.E. Alpha and beta interferons and their receptor and their friends and relations. *J Interferon Cytokine Res* **15** (1995) 3-26.
204. Vaheri, A., Pagano, J.S. Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology* **27** (1965) 434-436.
205. Velazquez, L., Fellous, M., Stark, G.R., Pellegrini, S. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* **70** (1992) 313-322.
206. Wieland, S.F., Guidotti, L.G., Chisari, F.V. Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA- containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* **74** (2000) 4165-4173.
207. Wong, D.K., Cheung, A.M., O'Rourke, K., Naylor, C.D., Detsky, A.S., Heathcote, J. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Ann Intern Med* **119** (1993) 312-323.
208. Wong, J.B., Koff, R.S., Tine, F., Pauker, S.G. Cost-effectiveness of interferon-alpha 2b treatment for hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Ann Intern Med* **122** (1995) 664-675.
209. Wong, T.K., Neumann, E. Electric field mediated gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* **107** (1982) 584-587.
210. Wood, K.V., de Wet, J.R., Dewji, N., DeLuca, M. Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochem Biophys Res Commun* **124** (1984) 592-596.
211. Wu, J.Y., Zhou, Z.Y., Judd, A., Cartwright, C.A., Robinson, W.S. The hepatitis B virus-encoded transcriptional trans-activator hbx appears to be a novel protein serine/threonine kinase. *Cell* **63** (1990) 687-695.
212. Yaginuma, K., Nakamura, I., Takada, S., Koike, K. A transcription initiation site for the hepatitis B virus X gene is directed by the promoter-binding protein. *J Virol* **67** (1993) 2559-2565.
213. Yaginuma, K., Shirakata, Y., Kobayashi, M., Koike, K. Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987) 2678-2682.
214. Yan, H., Krishnan, K., Lim, J.T., Contillo, L.G., Krolewski, J.J. Molecular characterization of an alpha interferon receptor 1 subunit (IFNaR1) domain required for TYK2 binding and signal transduction. *Mol Cell Biol* **16** (1996) 2074-2082.
215. Yang, H.I., Lu, S.N., Liaw, Y.F., You, S.L., Sun, C.A., Wang, L.Y., Hsiao, C.K., Chen, P.J., Chen, D.S., Chen, C.J. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **347** (2002) 168-174.
216. Yee, J.K. A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus. *Science* **246** (1989) 658-661.
217. Yokosuka, O., Omata, M., Imazeki, F., Hirota, K., Mori, J., Uchiumi, K., Ito, Y., Okuda, K. Combination of short-term prednisolone and adenine arabinoside in the treatment of chronic hepatitis B. A controlled study. *Gastroenterology* **89** (1985) 246-251.
218. Zoulim, F., Saputelli, J., Seeger, C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol* **68** (1994) 2026-2030.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A.d.	destilliertes Wasser
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides
bp	Basen-Paar(e)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
β -Gal	β -Galaktosidase
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-transferase
cDNA	complementary DNA
C/EBP	CCAAT / enhancer binding protein
CIP	calf intestinal phosphatase
c/p	Core Promoter
cpm	counts per minute
CTL	cytotoxic T-lymphocytes
DEAE	Diethylaminoethyl
d.h.	das heißt
DHBV	duck hepatitis B virus
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Natrium-ethylendiamin-N,N,N',N-tetraacetat
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratories
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
Enh	Enhancer
ERG	Eppendorf® Reaktionsgefäß
EtOH	Ethanol

7 Abkürzungsverzeichnis

FCS	Fetales Kälberserum
g	Gravitätskonstante
GAS	gamma aktivierende Sequenzen
GSHV	ground squirrel hepatitis virus
h	Stunde(n)
HBc	Hepatitis B Virus Core-Antigen
HBe	Hepatitis B Virus Precore-Antigen
HBs	Hepatitis B Virus Surface-Antigen
HBx	Hepatitis B Virus X-Protein
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEPES	Hydroxyethylpiperazine-N´-2-ethan-sulfonsäure
HLA	human leucocyte antigen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor
ISG	interferon stimuable gene
ISGF3	interferon stimulated gene factor 3
ISRE	interferon stimuable response element
Jak	Januskinase
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani
LCMV	Erreger der lymphozytischen Choriomeningitis
Luc	Luciferase
M	Mol
mM	Millimol
MCS	multiple clonig site
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter

7 Abkürzungsverzeichnis

mRNA	messenger RNA
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazolin-2-yl)-5-(3-Carboxymethophenyl)-2(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
OAS	Oligoadenylatsynthetase
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pgRNA	pregenomic RNA
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PLB	passive lysis buffer
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (= Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
STAT	signal transducer and activator of transscription
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGE	Tris-Glycerol-EDTA
TNF	Tumor Nekrose Faktor (tumor necrosis factor)
Tris	Tris(hydroxy)aminomethan
Tyk	Tyrosinkinase
U	Unit(s)
u.a.	unter anderem

V	Volt
v.a.	vor allem
WHV	woodchuck hepatitis virus
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

8. Abbildungsverzeichnis

Abb.	Inhalt
1	Genomische Organisation des Hepatitis B Virus
2	Schematische Darstellung des Dane-Partikels
3	Vektor-Karte des pGL3-Basic-Vektors
4	Vektor-Karte des pRL-null-Vektors
5	Sequenz des Plasmids <i>pGL3-HBVadw6/9</i>
6	Sequenz des HBV-DNA-Fragments des Plasmids <i>pGL3HBVadw6/9-Nco¹/3</i>
7	Zeitliches Schema der Transfektionsexperimente
8	Durch <i>Firefly Luciferase</i> katalysierte Biolumineszenz-Reaktion
9	Durch <i>Renilla Luciferase</i> katalysierte Biolumineszenz-Reaktion
10	Prinzip des Electrophoretic mobility shift assay
11	Zusammenhang zwischen Transfektionsbedingungen und Firefly-Luciferase Expression nach 72h in mit <i>pGL3adw6/9</i> transfizierten HuH7-Zellen
12	Kontrolle der Transfektionseffizienz mittels der β -Gal-Methode in HuH7-Zellen
13	Inhibition der HBV Enh I, II und core promoter-regulierten Transkription durch IFN α 2b in HuH7-Zellen
14	Inhibition der HBV Enh I, II und core promoter-regulierten Transkription durch IFN α 2b in HuH7-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit IFN α 2b
15	Vergleich verschiedener Typ-I-IFN-Subtypen
16	Vergleich zwischen HepG2 und HuH7
17	Überblick über <i>pGL3HBVadw6/9</i> und die daraus abgeleiteten Deletionsmutanten
18	Relative Promoterstärke der verschiedenen von <i>pGL3HBVadw6/9</i> abgeleiteten Deletionsmutanten in HuH7-Zellen
19 a-d	IFN-Wirkung auf die Deletionsmutanten
20	EMSA : Nukleäre Extrakte aus verschiedenen Zellen + OCT1

8 Abbildungsverzeichnis

21	EMSA : A431 + C/EBP (+Anti-C/EBP-AK) : Super-Shift
22	EMSA : Nukleärer Extrakt aus HuH7-Zellen + Sonde "RS"
23	EMSA : Nukleärer Extrakt au HuH7-Zellen + Sonden "GS"
24	Darstellung der Anfangsschritte des Jak-STAT-Wegs in schematisierter Form
25	Darstellung der posttranskriptionellen Schritte des HBV-Replikationszyklus
26	Genomische Organisation der HBV-DNA inkl. genregulatorischer Elemente

9. Tabellenverzeichnis

Tab.	Inhalt
1	PCR-Reaktionsmix
2	Bedingungen für die Bakterienkolonie-PCR der pGL3-Klone
3	Trenneigenschaften von Agarosegelen
4	Verwendete Restriktionsendonukleasen
5	Zusammensetzung der Nährmedien zur Bakterienkultur
6	Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer (Klonierung von <i>pGL3HBVadw6/9</i>)
7	Bestandteile des PCR-Ansatzes (Klonierung von <i>pGL3HBVadw6/9</i>)
8	Temperaturprofil der PCR (Klonierung von <i>pGL3HBVadw6/9</i>)
9	Überblick über die <i>pGL3HBVadw6/9</i> -Deletionsmutanten
10	Für die Charakterisierung der Transformanten verwendete Primer
11	Zusammensetzung der Lösungen A und B
12	Zusammensetzung der Lösungen H und G
13	Grundansatz der Bindereaktionen
14	Überblick über die verwendeten Bindepuffer
15	Gellösung für ein 0,5x TBE Polyacrylamid-Gel
16	Gellösung für ein 1x TGE Polyacrylamid-Gel
17	Überblick über die wesentlichen methodischen Unterschiede zwischen den verschiedenen veröffentlichten und den eigenen Reporter-Gen-Ansätzen

10. Danksagung

Allen, die mir beim Erstellen dieser Arbeit - von der ersten Einarbeitung in die Methoden, über die praktische Durchführung der Experimente, die Auswertung der Ergebnisse bis hin zum Abfassen des schriftlichen Teils – in verschiedenster Weise geholfen haben, möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen. Ganz besonders gedankt sei :

Herrn Professor Dr. Dres. h.c. mult. M. Classen für die Arbeitsmöglichkeit in den verschiedenen Labors der II. Medizinischen Klinik und die Bereitstellung der technischen Einrichtungen an seinem Lehrstuhl.

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. E. Schulte-Frohlinde, für die Möglichkeit zur Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe, die freundliche Überlassung des Themas, die ausgezeichnete und kompetente Betreuung, seine stets freundliche, offene und gesprächsbereite Haltung und die immerwährende Unterstützung in allen Aspekten der Arbeit.

Frau Dipl. Biol. B. Seidler für ihre fachkundige und engagierte Einführung in die Methoden der Zellkultur und Molekularbiologie, ihre geduldige, freundliche, hilfsbereite und kompetente Betreuung vor Ort im Labor und die vielen anregenden und gewinnbringenden Diskussionen über alle Bereiche unserer Arbeit.

Frau M. Dublinyc, Frau W. Schädel und Frau M. Werb, mit denen ich in wechselnder Folge den Arbeitsplatz in den verschiedenen Labors der II. Medizinischen Klinik teilen durfte und die meine Arbeit mehr als einmal mit freundlicher Hilfsbereitschaft erleichtert haben.

Frau I. Burkard für die gute und immer reibungslose Zusammenarbeit an der „Flowbank“ sowie allen anderen Doktoranden der II. Medizinischen Klinik, insbesondere Herrn Dr. O. Weigert, für viele gute Diskussionen und aufbauende Gespräche bei allen Problemen des Labor-Alltags.

11. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name Tobias Maximilian Freilingner
Geburtsdatum 8. April 1976
Geburtsort Straubing

SCHULISCHE LAUFBAHN

1982 – 1986 Grundschule St. Jakob Straubing
1986 – 1995 Anton-Bruckner-Gymnasium Straubing, Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

1995 – 1997 Vorklinisches Studium an der Universität Regensburg
1997-2002 Klinisches Studium am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

STAATSPRÜFUNGEN

September 1997 Ärztliche Vorprüfung
August 1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

PRAKTISCHES JAHR UND BERUFLICHE TÄTIGKEIT

April – August 2001 Terial im Fach Innere Medizin im Rahmen des Praktischen Jahrs am NYU Medical Center der New York University in New York City (USA)
August–November 2001 Terial im Fach Neurologie am Baylor College of Medicine in Houston (USA)
Dezember–März 2002 Terial im Fach Chirurgie an der Neurochirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar
September 2002 – Februar 2004 Arzt im Praktikum an der Neurologischen Klinik am Klinikum Grosshadern der Universität München (LMU)
Seit März 2004 Assistent an der Neurologischen Klinik am Klinikum Grosshadern der Universität München (LMU)

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

1999 – 2001 Doktorand in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. E. Schulte-Frohlinde an der II. Med. Klinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München
seit 09/ 2002 Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Molekulare Neurogenetik (PD Dr. M. Dichgans) an der Neurologischen Klinik des Klinikums Grosshadern, München