

Aus dem Institut für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam in Zusammenarbeit
mit dem Robert Koch-Institut in Berlin

**Charakterisierung der viralen Genprodukte p10 und P
des Borna Disease Virus**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)**

in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie“

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam**

von

**Gunhild Unterstab
aus Stralsund**

Potsdam, den 10.10.2005

Für meine Schwester

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Borna Disease Virus	1
1.1.1	Die Bornasche Krankheit	3
1.1.1.1	Immunbiologie und -pathogenese	4
1.1.1.2	BDV-Infektion und Pathogenität im Menschen?	5
1.1.2	Molekular- und Zellbiologie	7
1.1.2.1	Transkription und Replikation	8
1.1.2.2	Die viralen Proteine	10
1.2	Der Kernimport	13
1.2.1	Topogene Sequenzen karyophiler Proteine – Kernlokalisierungssignale	14
1.2.2	Karyopherine – Die Kerntransportrezeptoren	14
1.2.3	Virusinfektion und Kernimport	19
1.3	Das Typ I Interferon-System	20
1.3.1	Interferone	20
1.3.2	Virus induzierte IFN- β Aktivierung	22
1.3.2.1	Der IFN- β Promotor	23
1.3.2.2	Interferon regulatorische Faktoren („Interferon regulatory factors“, IRFs)	24
1.3.3	Typ I IFN-Produktion in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs)	26
1.3.4	Die IFN- β Signaltransduktion	26
1.3.5	Antivirale Wirkung IFN induzierbarer Proteine	27
1.3.6	Antagonisierung des Typ I IFN-Systems durch Viren	28
1.4	Fragestellung	31
2	MATERIAL UND METHODEN	32
2.1	Material	32
2.1.1.	Chemikalien und Verbrauchsmittel	32
2.1.2.	Zelllinien	33
2.1.3.	Viren	34
2.1.4.	Bakterienstämme	34
2.1.5.	Zellkulturmedien	34
2.1.6.	Medien für Bakterien	34
2.1.7.	Plasmide	35
2.1.8.	Oligonukleotide	36
2.1.9.	Enzyme	37
2.1.10.	Kits	37
2.1.11.	Primäre Antikörper	37
2.1.12.	Sekundäre Antikörper	38
2.1.13.	Puffer und Lösungen	39
2.1.14.	Geräte	42
2.2.	Methoden	42
2.2.1.	Zellkultur	42
2.2.1.1	Transfektion von Zellen	43

2.2.1.2	Infektion von Zellen	43
2.2.1.3	Etablierung persistenter BDV-Infektionen	44
2.2.1.4	Viruspräparation	44
2.2.1.5	Plaquetest	45
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	45
2.2.2.1	Klonierungen	45
2.2.2.2	RT-PCR	46
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	46
2.2.3.1	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	46
2.2.3.2	Cy5-Markierung der GST-Fusionsproteine	47
2.2.3.3	<i>In vitro</i> Translation	47
2.2.3.4	GST-Ko-Präzipitationsexperiment	48
2.2.3.5	Herstellen von Zellysaten für Ko-IPs und Kinaseassays	48
2.2.3.6	Ko-Immunpräzipitation	49
2.2.3.7	Dephosphorylierung des ko-präzipitierten BDV-P Proteins	49
2.2.3.8	Kinaseassays	49
2.2.3.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	49
2.2.3.10	Immunoblot	50
2.2.4	Reportergenexperimente	50
2.2.5	IFN- β ELISA („Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay“)	51
2.2.6	Indirekte Immunfluoreszenz	51
3	ERGEBNISSE	52
3.1	Analyse und Charakterisierung der Importin α/p10 Interaktion	52
3.1.1	Analyse des Kerntransportes des BDV-p10 Proteins	52
3.1.2	Die ersten 20 Aminosäuren des p10 Proteins sind für die Interaktion mit Importin α essentiell	55
3.1.3	p10 interagiert <i>in vivo</i> mit Importin α	56
3.1.4	p10 bindet unabhängig von Importin β an Importin α	57
3.1.5	p10 bindet direkt an Importin α	58
3.1.6	p10 bindet verschiedene Importin α Isoformen	59
3.1.7	Mutationsanalyse der N-terminalen p10 Domäne	60
3.1.7.1	GST-Ko-Präzipitationsassays zur Analyse der Interaktion mutierter GST-p10 Fusionsproteine mit Importin α 1	60
3.1.7.2	<i>In vitro</i> Transportassay mit GST-p10 Mutanten	62
3.2	Das P Protein des Bornavirus ist ein Typ I Interferon-Antagonist	64
3.2.1	Das BDV-P Protein inhibiert Virus induzierte IFN- β Promotoraktivierung	64
3.2.2	BDV-P inhibiert Virus induzierte Aktivierung von IRF3	67
3.2.3	Eine BDV-Infektion führt nicht zur Aktivierung von IRF3	68
3.2.4	Analyse des Mechanismus der BDV-P vermittelten IRF3-Aktivierung	70
3.2.4.1	P inhibiert TRIF induzierte IFN- β Promotoraktivierung	70
3.2.4.2	P inhibiert TBK1 induzierte IFN- β Promotoraktivierung	72
3.2.4.3	P interferiert mit TBK1 induzierter IRF3/CBP-Komplexbildung	73
3.2.4.4	P interferiert mit TBK1 vermittelter IRF3-Phosphorylierung	74
3.2.5	Einfluss von P auf IFN- β Zytokinexpression und seine biologische Wirkung	75
3.2.5.1	P inhibiert IFN- β Proteinexpression	76
3.2.5.2	P inhibiert TBK1 induzierte ISRE-Promotoraktivierung ohne die IFN abhängige Signalkaskade zu blockieren	77

3.2.5.3 IFN-Bioassay	79
3.2.6 Proteinbiochemische Analysen der P vermittelten IFN- β Inhibition	80
3.2.6.1 TBK1-Kinaseaktivität wird durch P inhibiert	80
3.2.6.2 Nachweis der Interaktion von TBK1 und P	81
3.2.6.3 Das BDV-P Protein wird durch TBK1 phosphoryliert	83
3.2.6.4 Negative Beeinflussung der TBK1/P-Komplexbildung durch	85
4 DISKUSSION	87
4.1 Übersicht über die Ziele der Arbeit	87
4.2 Charakterisierung der NLS-Sequenz von p10	88
4.2.1 Das BDV-p10 Protein interagiert <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> mit Importin α	88
4.2.2 Mutationsanalyse des N-terminalen Bereiches von p10	89
4.2.3 Die Funktion von nukleärem p10 im Kontext einer BDV-Infektion	92
4.3 Identifizierung und Charakterisierung des BDV-P Proteins als Typ I Interferon-Antagonist	93
4.3.1 Das BDV-P Protein inhibiert die virale Aktivierung von IRF3 und die Induktion des IFN- β Gens	93
4.3.2 BDV-P inhibiert TBK1 vermittelte IRF3-Aktivierung	96
4.3.3 BDV-P ist ein Bindungspartner und ein Substrat von TBK1	98
4.3.4 Die IFN antagonistische Aktivität von BDV-P Protein führt zu einer verstärkten Replikation eines IFN sensitiven Virus	100
4.4 Ausblick	102
5 ZUSAMMENFASSUNG	104

Literaturverzeichnis

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATF	„activated transcription factor“
ATP	Adenosin 5´-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinder Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	zenti
ca.	zirka
CBP	„CREB binding protein“
cDNA	„copy DNA“ kopierte DNA
CO ₂	Kohlendioxid
cRNA	„copy/complementary RNA“
C-terminal	carboxyterminal
Ci	Curie (1 Ci = 3,7*10 ⁶ Bq)
CIP	„calf intestine alkaline phosphatase“, alkalische Phosphatase (Kälberdarm)
d	Tag
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMEM	„Dulbecco's modified Eagle's Medium“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxiribonukleosid-triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
eIF	eukaryontischer Initiationsfaktor
ELISA	„enzyme-linked immuno-sorbent assay“
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
hCMV	humanes Cytomegalovirus
HCV	Hepatitis C Virus
H ₂ O	Wasser
IFN	Interferon
IκB	„Inhibitor of κB“
IKK	IκB Kinase
IL	Interleukin
Imp	Importin

IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalctopyranidose
IRF	Interferon Regulatorischer Faktor
ISRE	„Interferon stimulated responsive element“
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K	kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli
M	molar
M	Matrixprotein
Mda-5	„melanoma differentiation-associated gene 5“
MEM	„Minimal Essential Medium“
MKK	MEK Kinase
MOI	„multiplicity of infection“
min	Minute
NF- κ B	„nuclear factor-kappa B“
NES	„nuclear export signal“, Kernexportsignal
NLS	„nuclear localization signal“, Kernlokalisierungssignal
NPC	„nuclear pore complex“, Kernporenkomplex
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NS	Nichtstrukturprotein
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
P	Phosphoprotein
p.I.	„post infection“, nach Infektion
PBS	„Phosphate buffered saline“
pfu	„plaque forming units“
PGA	ProteinG-Agarose
pH	potentia hydrogenii
PKR	dsRNA-abhängige Proteinkinase R
PRD	„positive regulatory domain“
RIG-I	„Retinoic acid inducible gene I“
RL	<i>Renilla</i> Luziferase
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
ssRNA	„singlestranded RNA“, einzelsträngige RNA
STAT	„Signal transducer and activator of transcription“
TBK1	„Traf family member-associated NF κ B activator (TANK) binding kinase1“
TBST	„tris buffered saline with tween“
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyldiamin
TK	Tymidinkinase

TLR	„Toll-like receptor“
TRIF	„TollIL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN“
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit
ÜN	über Nacht
V	Volt
vRNA	virale RNA
WT	Wildtyp

Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleuzin
K	Lysin
L	Leuzin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

1 Einleitung

Viren sind obligat intrazelluläre Parasiten, welche auf zelluläre Systeme angewiesen sind, um ihre Replikation, ihre Ausbreitung oder, bei bestimmten Viren, ihre Persistenz zu gewährleisten. Von zentraler Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Fähigkeit des Virus, sich so an die Wirtszelle anzupassen, dass virale Komponenten ähnlich den zelleigenen Strukturen in zellbiologische Abläufe integriert werden. Als Beispiele hierfür können das Andocken von Viren an spezifische zelluläre Oberflächenrezeptoren und nachfolgende Internalisierung, die nukleäre Translokation viraler Proteine durch zelluläre Importrezeptoren und das Spleißen viraler Transkripte angeführt werden. Insbesondere die erst seit kurzem verstandenen Strategien der Immunevasion durch Viren bringen die enorme Vielfalt eines präzisen, hoch angepassten Wechselspiels von Virus und Zelle zum Ausdruck. In dieser Arbeit werden zwei Proteine des Bornavirus, die von überlappenden Leserahmen der zweiten Transkriptionseinheit kodiert werden, im Hinblick auf Interaktionen mit Proteinen der Wirtszelle analysiert: I. das BDV-p10 Protein, das über den klassischen Kernimportweg in den Zellkern transportiert wird und dessen ungewöhnliches NLS im Folgenden charakterisiert wird und II. das BDV-P Protein, das durch Interaktion mit einer zellulären Kinase die Inhibition der zellulären antiviralen Immunantwort zu antagonisieren vermag.

1.1 Das Borna Disease Virus

Das Borna Disease Virus (BDV, Virus der Bornaschen Krankheit) ist ein RNA-Virus, dessen einzelsträngiges Genom negative Polarität besitzt. Daher wird das Virus der Ordnung der *Mononegavirales* zugeordnet. Innerhalb dieser Ordnung ist das Bornavirus der Prototyp der Virusfamilie *Bornaviridae* (siehe Abb 1.1).

Viren mit (-)RNA-Genom	Mononegavirales nicht segmentiertes Genom	<i>Bornaviridae</i>	(Bornavirus)
		<i>Filoviridae</i>	(Marburg-, Ebolavirus)
		<i>Paramyxoviridae</i>	(Mumps-, Masernvirus)
		<i>Rhabdoviridae</i>	(Tollwutvirus)
	segmentiertes Genom	<i>Arenaviridae</i>	(Lymphozytäres Choriomeningitis Virus)
		<i>Bunyaviridae</i>	(Hantavirus)
		<i>Orthomyxoviridae</i>	(Influenza A, B, C Viren)

Abb. 1.1: Taxonomie der Negativ-Strang RNA-Viren.

Erst Ende der 90er Jahre gelang es, durch elektronenmikroskopische Untersuchungen detaillierte Aussagen über die Morphologie und Feinstruktur der BD-Viruspartikel zu treffen (siehe Abb. 1.2). Diese sind kugelförmig, haben einen Durchmesser von 100 - 130 nm und sind von einer Membran umhüllt, die ca. 7 nm lange Spikes aufweist. Im Inneren der Partikel befindet sich das ca. 4 nm große Nukleokapsid (Kohno et al., 1999).

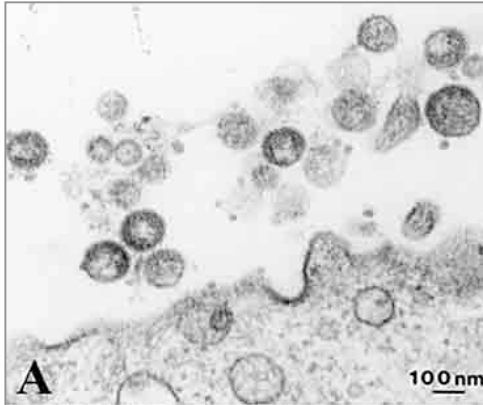


Abb. 1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von BDV-Partikeln.

Toshiyuki Goto, Kyoto University, Kyoto, Japan

Das Bornavirus vermag in Zellkultur nicht-zytotoxische persistente Infektionen zu etablieren. Infizierte Zellen zeigen keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zu Kontrollzellen, obwohl virale Antigene in großen Mengen exprimiert werden. Charakteristisch sind die nukleären Foci, in denen einige Virusproteine akkumulieren (siehe Abb. 1.3).

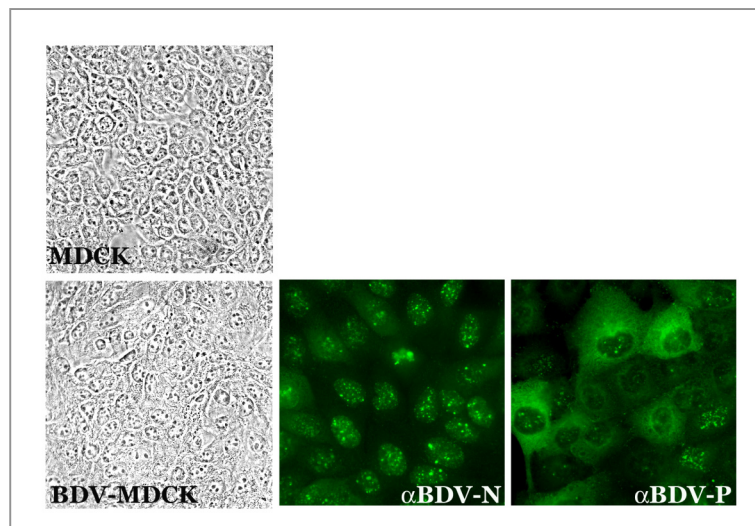


Abb. 1.3: Vergleich persistent BDV infizierter und nicht infizierter MDCKII Zellen in Durchlicht- bzw. fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.

Die linken Abbildungen zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen von konfluenten Zellrasen nicht infizierter bzw. persistent BDV infizierter MDCKII Zellen. Der Nachweis des Nukleoproteins (N) bzw. des Phosphoproteins (P) erfolgte durch spezifische Antikörper mittels indirekter Immunfluoreszenzanalysen.

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften des Bornavirus sind persistent infizierte Zellen ein geeignetes Modell, um die Zellbiologie des Virus *in vitro* zu studieren. Dieses System bildete auch im Rahmen dieser Arbeit die experimentelle Grundlage.

1.1.1 Die Bornasche Krankheit

Das Bornavirus ist das ätiologische Agens der Bornaschen Krankheit, deren Symptome Ende des 19. Jahrhunderts erstmals beschrieben wurden, als nahe der sächsischen Stadt Borna Kavalleriepferde zunächst Verhaltensauffälligkeiten zeigten und später größtenteils verstarben (Walther, 1899). Zwick charakterisierte 1939 im „Handbuch der Viruskrankheiten“ einen viralen Erreger als Ursache für diese sporadisch auftretenden Enzephalopathien in bestimmten Regionen Zentraleuropas (Zwick, 1939). Natürliche Infektionen fand man seither auch in Schafen, Rindern, Ziegen, Kaninchen und einer Reihe weiterer warmblütiger Tiere.

Das Bornavirus ist neurotrop, d.h. es infiziert bevorzugt sowohl das periphere als auch das zentrale Nervensystem (ZNS). Es wird vermutlich durch Aerosol- und Tröpfcheninfektion übertragen und gelangt in den Riechkolben (*Bulbus olfactorius*), von wo es sich über die Synapsen der Nervenzellen entlang der Nervenbahnen ausbreitet (Morales et al., 1988). Virale Antigene sind in Neuronen aber auch in Astrozyten und Oligodendrozyten nachgewiesen worden (Gosztanyi & Ludwig, 1995). Letztere sind Bestandteil der Neuroglia, dem interstitiellen Zellgewebe des Nervensystems, das die Räume zwischen Nervenzellen und Blutgefäßen bis auf einen 20 nm breiten Spalt ausfüllt, die Markscheiden bildet und Stütz-, Nähr- und Phagozytosefunktionen ausübt (Roche Lexikon Medizin). Virus spezifische Antigene können in diesen Zellen im Zellkern und im Zytoplasma detektiert werden. Besonders charakteristisch ist das Auftreten intranukleärer Foci, der Joest-Degenschen Einschlüsse, die bereits 1909 durch Lichtmikroskopie entdeckt wurden (Joest & Degen, 1909) und in denen virale Proteine akkumulieren. Darüber hinaus konnte auch virale RNA in infiziertem Gewebe durch *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden. Das Bornavirus besitzt eine Präferenz für das limbische System, was in hohen Viruslasten u.a. im Hippocampus und der Amygdala resultiert. Die Virusausbreitung ist jedoch nicht nur auf das limbische System beschränkt, sondern findet im gesamten ZNS statt. Über periphere Nervenbahnen kann das Virus im späteren Verlauf der Infektion auch in andere Organe und Gewebe einwandern.

Die Konsequenzen natürlich vorkommender Bornavirusinfektionen bei Pferden und Schafen sind äußerst variabel. Betroffene Tiere können durchaus frei von jeglichen klinischen Symptomen sein. In anderen Fällen treten zunächst unspezifische Anzeichen, wie z.B. Fieber, Appetitlosigkeit, unruhiges oder antrieblooses Verhalten, Gelbsucht (Ikterus), Verstopfungen sowie Koliken auf (Jordan & Lipkin, 2001). Im späteren Verlauf einer akuten Infektion manifestiert sich die klassische Bornasche Krankheit. Die Tiere sind in ihrer motorischen Koordination massiv beeinträchtigt, zeigen keine Reflexe, wirken müde und apathisch und können nach Infektion des Sehnervs eine Retinitis aufweisen. Die klinischen Symptome dauern in der Regel bis zu drei Wochen an. Die Mortalitätsrate liegt bei Pferden bei bis zu 80 %, bei Schafen um ca. 50 %. Überlebende Tiere zeigen oft anhaltende Bewegungs- und Verhaltensauffälligkeiten (Rott & Becht, 1995).

1.1.1.1 Immunbiologie und -pathogenese

Es ist hervorzuheben, dass das Bornavirus nicht-zytolytisch ist und die Fähigkeit besitzt, in infizierten Tieren und auch in Zellkultur persistente Infektionen zu etablieren. In einigen Fällen löst es jedoch einen fulminanten Krankheitsverlauf als Folge der zellulären Immunantwort des Wirtes aus. Untersuchungen an experimentell infizierten Tieren haben maßgeblich zum Verständnis der Pathogenese beigetragen. Dabei gelang es, zahlreiche Nagetiere, z.B. Ratten (Narayan et al., 1983), Mäuse (Hallensleben et al., 1998) und Kaninchen (Krey et al., 1979), aber auch Rhesusaffen und Hühner zu infizieren. Die Suszeptibilität, die Inkubationszeit, der Krankheitsverlauf und die Mortalitätsraten variierten nicht nur in Abhängigkeit von der Wirtsspezies und vom Virusstamm, sondern sind auch zwischen Arten einer Gattung variabel.

Eine wichtige Determinante der Immunpathogenese ist der Immunstatus des Wirtes. So entwickeln immunkompetente, adulte Lewis-Ratten beispielsweise eine Virus induzierte Meningoenzephalitis, wohingegen neugeborene oder immunsupprimierte Ratten frei von Inflammationen sind. Während der akuten Phase hat die Infiltration des ZNS mit Makrophagen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Plasmazellen immunpathologische Konsequenzen (Gosztanyi & Ludwig, 1995, Jordan & Lipkin, 2001, Rott & Becht, 1995, Staeheli et al., 2000). Die lange vorherrschende Meinung, dass das ZNS immunprivilegiert ist, weil die Blut-Hirn-Schranke für Zellen des Immunsystems unüberwindbar ist, wurde in den letzten Jahren präzisiert. So ist inzwischen unstrittig, dass aktivierte Leukozyten in das ZNS einwandern können (Hickey, 1999,

Hickey, 2001). Eine zentrale Rolle spielen dabei die zytotoxischen T-Zellen. Diese Zellen erkennen Peptidfragmente von Fremdanitigenen, die über MHC-I-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert werden, induzieren proinflammatorische Chemokine und leiten schließlich die Lyse der infizierten Zelle ein. In Mäusen, die β_2 -Mikroglobulin defizient sind und daher kein funktionelles MHC-I-Molekül exprimieren, haben $CD8^+$ T-Lymphozyten keinen Angriffspunkt. Aufgrund der Tatsache, dass diese Tiere als Folge einer Bornavirusinfektion keine entzündliche Meningoenzephalitis entwickeln, wurde abgeleitet, dass die Gehirnschädigungen immunpathologischer Natur sind und auf die biologische Aktivität zytotoxischer T-Zellen zurückzuführen sind (Hallensleben et al., 1998). Folglich führt eine *in vivo* Depletion der $CD8^+$ Zellen mit spezifischen Antikörpern zu einem zeitlich verzögerten Auftreten der Krankheitssymptome (Hausmann et al., 1999).

Die biologische Relevanz der humoralen Immunantwort im Kontext einer Bornavirusinfektion ist noch immer nicht hinreichend verstanden. Dies gilt insbesondere für die Rolle neutralisierender Antikörper. Die chronische Phase der Infektion (ca. 10-15 Wochen nach Infektion) ist gekennzeichnet von einer Abnahme der T-Zellen im ZNS bei gleichzeitigem Anstieg der Plasmazellpopulation (Hatalski et al., 1998a). Die BDV spezifischen Antikörper sind zunächst überwiegend gegen das lösliche Phosphoprotein und das Nukleoprotein gerichtet und zeigen keine neutralisierende Wirkung. Die im weiteren Infektionsverlauf gegen das Glykoprotein gebildeten spezifischen Antikörper weisen neutralisierende Eigenschaften auf. Dennoch sind diese Antikörper in infizierten Tieren nicht in der Lage, das Virus zu eliminieren. Die Virustiter in der akuten und chronischen Phase unterscheiden sich nicht signifikant (Hatalski et al., 1995). Es gibt Hinweise, dass neutralisierende Antikörper einen Einfluss auf den Virustropismus außerhalb des ZNS ausüben. Während das Virus in immunkompetenten Tieren meist ausschließlich im ZNS zu finden ist, breitet es sich in neugeborenen oder immunsupprimierten Tieren auch in nicht-neuronalen Geweben und Organen aus. Wurde diesen Tieren nach experimenteller BDV-Infektion ein BDV spezifisches Serum appliziert, blieb die Virusausbreitung auf das ZNS beschränkt (Stütz et al., 1998).

1.1.1.2 BDV-Infektion und Pathogenität im Menschen?

In den vergangenen 20 Jahren wurde die Frage nach der Humanpathogenität des Bornavirus intensiv bearbeitet. Die Tatsache, dass das Virus ein ungewöhnlich breites

Wirtsspektrum besitzt und in experimentell infizierten Tieren Verhaltensauffälligkeiten verursacht, sorgte für Spekulationen, ob psychische Störungen bei Menschen mit BDV assoziiert sein könnten. In der Tat wurden in einer ersten Studie, im Gegensatz zu einer Kontrollgruppe, in 1,5 % der getesteten Psychiatriepatienten BDV spezifische Antikörper nachgewiesen (Rott et al., 1985). Die Brisanz dieser Befunde veranlasste viele Forscher weltweit, menschliches Probenmaterial zu analysieren. Bis heute sind die Befunde und deren Konsequenzen aufgrund fehlender standardisierter Diagnostikprotokolle jedoch äußerst umstritten [siehe Übersichtsartikel: (Chalmers et al., 2005, Lieb & Stacheli, 2001, Schwemmler, 2001)].

In serologischen Untersuchungen wurden BDV reaktive Antikörper vermehrt in Psychiatriepatienten (0,6 – 45 %) im Vergleich zu Kontrollgruppen (0 – 4 %) nachgewiesen. Die Prävalenz ist jedoch in verschiedenen Studien äußerst variabel. Niedrige Antikörpertiter und die Tatsache, dass die humanen Antikörper oft nur gegen ein virales Antigen gerichtet sind und zumeist eine geringe Avidität aufweisen, haben den diagnostischen Wert der serologischen Untersuchungen infrage gestellt (Allmann et al., 2001). Erst durch Affinitätsreinigung konnten in einigen Seren hoch-affine humane Antikörper nachgewiesen werden. Die Ursachen für die unterschiedlichen Effizienzen der Antikörperreifung bleiben bisher jedoch unklar. Es werden daher geringe Antigenkonzentrationen oder eine Infektion mit einem eng verwandten Virus als Erklärung für diese Befunde diskutiert (Billich et al., 2002).

In einer weiteren Untersuchung wurde über zirkulierende BDV spezifische Immunkomplexe („circulating immune complexes“, CICs) aus Plasmaproben berichtet und es wurde sogar vorgeschlagen, dass es in der menschlichen Blutbahn zu einer ausgeprägten Antigenämie mit bis zu 100 ng viralen N- und P-Antigens pro ml kommt (Bode et al., 2001). Dies impliziert das Auftreten virämischer Phasen, in denen das Virus im Blut nachweisbar sein sollte. In vielen Labors wird die hoch-sensitive „nested RT-PCR“ zum Nachweis viraler RNA in der Diagnostik eingesetzt. Während einige Arbeitsgruppen BDV spezifische RNA im Blut in peripheren mononukleären Zellen (Bode et al., 1995, Fukuda et al., 2001) oder in Granulozyten (Planz et al., 1999) detektierten, konnten diese Ergebnisse von anderen jedoch nicht reproduziert werden (Lieb et al., 1997), mit dem Hinweis, dass auch im Blut BD-kranker Pferde und experimentell infizierter Mäuse keine virale RNA nachweisbar war (Stacheli et al., 2000). Einige Virusisolate aus

Patientenmaterial wurden als Beweis für die Existenz von BDV-Infektionen im Menschen gewertet. Allerdings wiesen sie eine hohe Sequenzhomologie zu Bornavirus-Laborstämmen auf. Daraus ergibt sich der begründete Einwand einiger Forscher, dass es sich nicht um humane BDV-Isolate, sondern schlicht um Laborkontaminationen handelt. Diese Diskrepanzen wurden heftig in der wissenschaftlichen Literatur diskutiert (Bode et al., 2000, Lieb et al., 1997, Planz et al., 1998, Planz et al., 2000, Schwemmler et al., 1999a).

Aufgrund fehlender diagnostischer Standards kann daher die Frage der Humanpathogenität und möglicher Konsequenzen für den Menschen nicht sicher beantwortet werden. Besonders für das öffentliche Gesundheitswesen dürften weitere Untersuchungen im Hinblick auf mögliche Kontaminationen von Blutspenden mit dem Bornavirus von großem Interesse sein. Sollte sich ein Zusammenhang zwischen einer BDV-Infektion und psychischen Störungen bewahrheiten, bestünde die Möglichkeit, Patienten durch den Einsatz antiviraler Medikamente zu therapieren.

1.1.2 Molekular- und Zellbiologie

Das Bornavirus weist genetische und biologische Besonderheiten auf und ist daher innerhalb der Ordnung *Mononegavirales* der Prototyp einer eigenen Virusfamilie, der *Bornaviridae* (de la Torre, 1994). Das einzelsträngige RNA-Genom negativer Polarität ist etwa 8,9 kb groß. Es kodiert für mindestens sechs virale Proteine, deren offene Leserahmen („open reading frames“, ORFs) teilweise überlappen und in für Vertreter der *Mononegavirales* typischer Reihenfolge angeordnet sind: Nukleoprotein (N), akzessorisches Protein (p10), Phosphoprotein (P), Matrixprotein (M), Glykoprotein (G) und virale Polymerase (L). Abb.1.4 zeigt eine schematische Darstellung der Genomstruktur. Drei verschiedene Transkriptionsinitiationsstellen und vier Polyadenylierungs-/Terminationssignale, die von der viralen Polymerase partiell überlesen werden können, führen zum Entstehen unterschiedlicher Transkripte. Im Gegensatz zu anderen Vertretern der *Mononegavirales* können polycistronische mRNA-Moleküle posttranskriptional durch alternatives Spleißen modifiziert werden. Dafür benutzt das Bornavirus den zellulären Spleißapparat (Cubitt et al., 1994). Transkription und Replikation finden daher im Zellkern statt. Hier werden genomische, antigenomische und subgenomische RNA-Spezies durch die virale Polymerase synthetisiert (Briese et al., 1992).

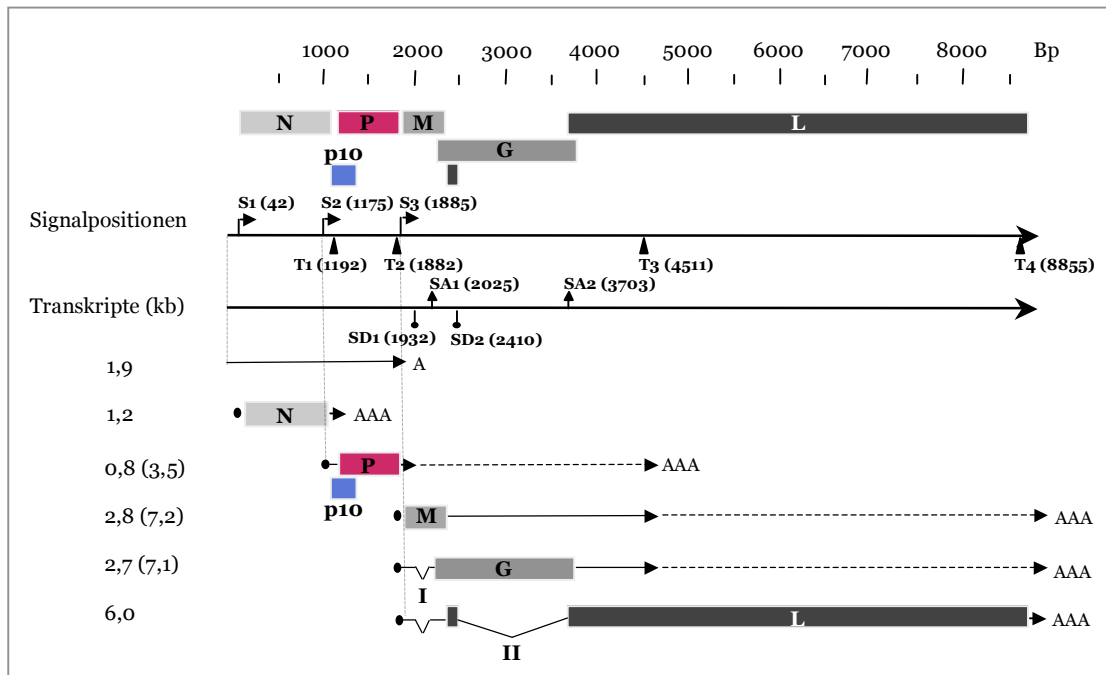


Abb. 1.4: Darstellung des BDV-Genoms und der Transkripte.

N, Nukleoprotein p38/p40N; p10 Protein; P, Phosphoprotein p24/p16; M, Matrixprotein gp18; G, Hüllprotein gp94; L, Polymerase p190; S1-S3, Transkriptionsinitiationsstellen; T1-T4 Polyadenylierungs- und Terminationssignale; SA1, SA2, Spleißakzeptoren; SD1, SD2 Spleißdonorstellen. In Anlehnung an Tomonaga et al., 2002.

Das RNA-Genom zeichnet sich durch eine hohe Sequenzstabilität aus. Innerhalb einer geografischen Region, in der die Bornasche Krankheit endemisch ist, sind die Sequenzen von isolierten Viren über Jahre hinaus stabil (Kolodziejek et al., 2005).

1.1.2.1 Transkription und Replikation

Das virale Genom wird vom Nukleoprotein (N) in einem viralen Ribonukleoprotein-komplex (vRNP) enkapsidiert. Vermutlich sind auch die RNA-abhängige RNA-Polymerase (L), ihr Kofaktor, das Phosphoprotein (P), und das p10 Protein Bestandteile des Komplexes, da diese viralen Proteine miteinander interagieren (siehe Abschnitt 1.1.2.2). Als im Zellkern replizierendes und transkribierendes Virus muss das Bornavirus zunächst den Kernimport seines RNA-Genomes und der erforderlichen viralen Proteine sicherstellen. Der Import der vRNPs in den Nukleus wird durch ein entsprechendes Kernlokalisierungssignal („nuclear localization signal“, NLS) des Nukleoproteins vermittelt (Kobayashi et al., 1998, Shoya et al., 1998). Sowohl L als auch P weisen eigene NLS-Sequenzen auf und werden aktiv in den Nukleus importiert. Der Export der neu synthetisierten vRNAs erfolgt vermutlich als vRNP-Komplex über ein Kernexportsignal

(„nuclear export signal“, NES) des Nukleoproteins (Kobayashi et al., 2001). Das Phosphoprotein P vermag dieses durch Bindung an das N Protein zu maskieren (Berg et al., 1998) und kann somit den Export der vRNPs regulieren (Kobayashi et al., 2001). Die viralen Transkripte sind wie zelluläre Transkripte am 3'-Ende polyadenyliert und weisen am 5'-Ende eine CAP-Struktur auf. Sie werden daher wie zelleigene mRNA-Moleküle exportiert. Abb. 1.5 zeigt ein Modell dieser Transportvorgänge.

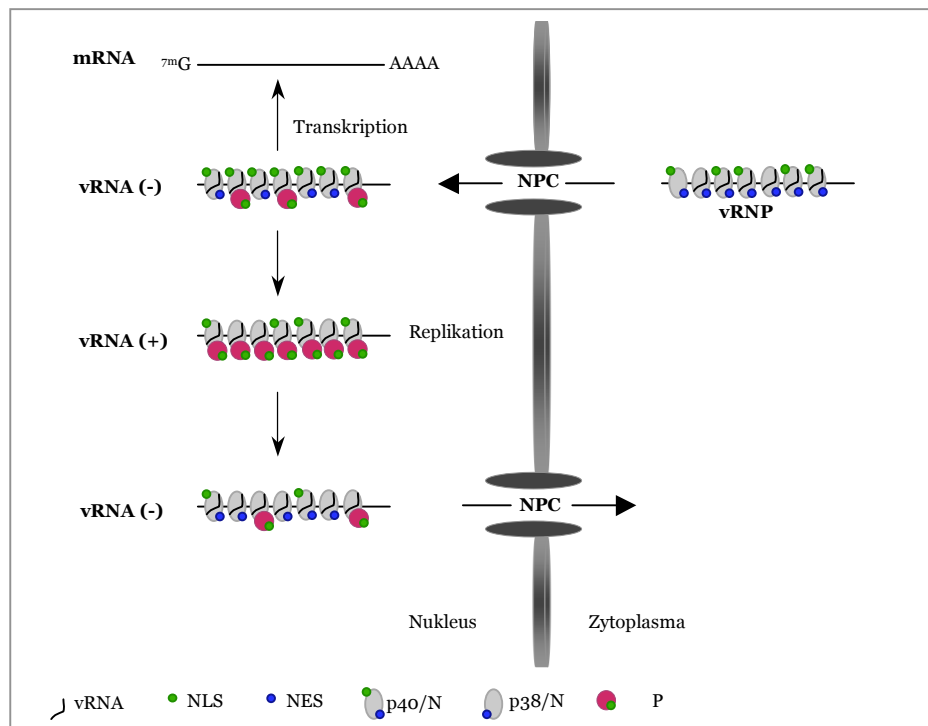


Abb. 1.5: Modell des Transports von vRNPs über die Kernmembran.

Der Transport der vRNP-Komplexe, bestehend aus vRNA und dem Nukleoprotein, durch die Kernporenkomplexe („nuclear pore complex“, NPC) wird durch das NLS des Nukleoproteins (grüne Kreise) und durch ein NES (blaue Kreise) vermittelt. Die Interaktion von P und N führt zur Maskierung des NES (Cros & Palese, 2003).

In der frühen Phase werden die viralen Transkripte synthetisiert und im späteren Verlauf werden antigenomische RNAs gebildet, die als Matrize für die Synthese des viralen Genoms durch die virale Polymerase fungieren.

Lange Zeit war es schwierig, die regulatorischen Mechanismen der viralen Transkription und Replikation zu studieren, weil keine revers genetischen Methoden verfügbar waren. Diese Technik erlaubt die Generierung Virus ähnlicher Partikel („virus like particles“, VLPs) und sogar rekombinanter, infektiöser Viren auf der Grundlage klonierter viraler cDNA. Für zahlreiche RNA-Viren wird diese Methode bereits erfolgreich angewendet, so

z.B. für Influenza A und B Viren (Fodor et al., 1999, Hoffmann et al., 2002), für Tollwutviren (Schnell et al., 1994), Masernviren (Radecke & Billeter, 1995), und Ebolaviren (Volchkov et al., 2001). 2003 gelang es zwei Arbeitsgruppen, zunächst ein Minireplikonsystem für das Bornavirus zu etablieren (Perez et al., 2003, Schneider et al., 2003) und später auch rekombinante Bornaviren aus klonierter cDNA zu generieren (Schneider et al., 2005).

1.1.2.2 Die viralen Proteine

In Analogie zu anderen Vertretern der *Mononegavirales* kodiert der erste ORF des BDV-Genoms für das 40 kDa große Nukleoprotein N. In infizierten Zellen wird es stark exprimiert und ist das Antigen, gegen das sich vor allem die zytotoxischen T-Zellen richten (Schamel et al., 2001). Es ist sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert. Im Allgemeinen besitzen virale Nukleoproteine die Fähigkeit, Nukleinsäuren (DNA oder RNA) zu enkapsidieren und somit einen Ribonukleoproteinkomplex (RNP) zu bilden. Die Eigenschaft des BDV-N Proteins, antigenomische und genomische RNA zu binden, wurde *in vitro* demonstriert (Kraus et al., 2003). Weiterhin zeigten Röntgenstrukturanalysen, dass das Nukleoprotein Tetramere bildet, um welche die einzelsträngige vRNA wahrscheinlich gewunden ist (Rudolph et al., 2003). Der gesamte vRNP-Komplex ist bisher jedoch noch nicht kristallisiert worden.

Die Proteine, die von der bicistronischen 0,85 kb großen mRNA kodiert werden, bilden den Fokus dieser Arbeit. Das p10 Protein wurde als sechstes virales Genprodukt identifiziert (Wehner et al., 1997). In infizierten Zellen lokalisiert es sowohl in nukleären Foci als auch im Zytoplasma. Dabei kolokalisiert es mit dem N und dem P Protein und wurde *in vitro* in stabilen p10/P/N-Komplexen nachgewiesen. Hierfür sind die N-terminalen AS 8-15 kritisch (Wolff et al., 2000). Über die Funktion von p10 konnte lange Zeit nur spekuliert werden und die biochemische und zellbiologische Charakterisierung rückte in den Vordergrund. Die Beobachtung, dass solitär exprimiertes p10 auch im Zellkern lokalisiert, ist aufgrund der Tatsache, dass BDV in diesem Kompartiment transkribiert und repliziert durchaus von Bedeutung. Diese initiale Beobachtung war ein Ausgangspunkt für die Studien, die im ersten Abschnitt des Ergebnisteils dieser Arbeit beschrieben sind.

In Minireplikonexperimenten wurde p10 mittlerweile als negativer Regulator der viralen Polymerase identifiziert (Schneider et al., 2003). Ferner wurde gezeigt, dass die Fähigkeit von p10 zur Interaktion mit P essentiell für dessen inhibitorische Funktion ist. Daraus leitet sich ein Modell ab, in dem p10 das für die Polymerasefunktion äußerst kritische N:P Verhältnis im Zellkern reguliert (Poensch et al., 2004). Der Import von p10 in den Zellkern könnte somit ein wichtiger Faktor für die Regulation der Polymerase sein. Zunächst ging man davon aus, dass die Translokation durch Interaktion mit dem P Protein in Form eines „Huckepack-Mechanismus“ stattfindet. Im Rahmen dieser Arbeit wird jedoch gezeigt werden, dass p10 ein eigenes NLS besitzt und unabhängig von P in den Zellkern importiert werden kann. Abb. 1.6 zeigt die Darstellung der Proteine p10 und P (siehe folgender Abschnitt) und ihrer Eigenschaften.

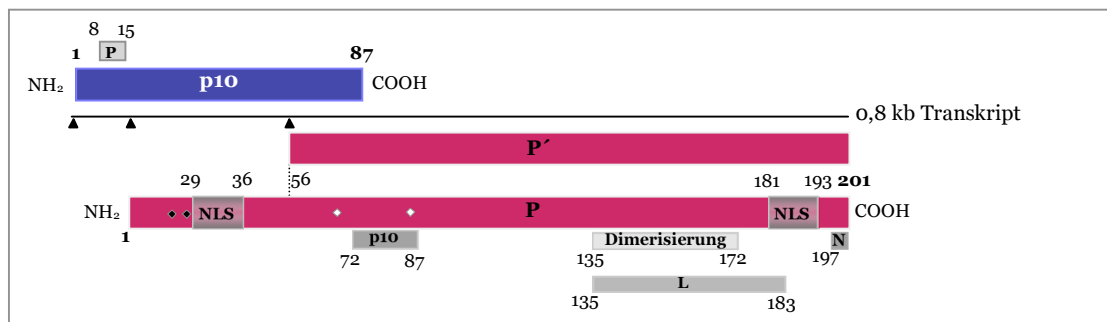


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Proteine p10 und P der zweiten Transkriptionseinheit.

Die Proteine p10 (blau) und P bzw. P' (rot) werden von einer Transkriptionseinheit kodiert und entstehen durch die Nutzung unterschiedlicher Startkodons (▲). Das p10 Protein vermag über die AS 8 - 15 mit P zu interagieren. Das 201 Aminosäuren große P Protein interagiert mit dem viralen p10, L und N Protein und mit sich selbst (siehe gekennzeichnete Bereiche). Im N- und im C-terminalen Bereich befinden sich die NLS-Sequenzen. Die Nutzung eines alternativen Startkodons führt zum Entstehen des N-terminal um 56 AS verkürzten Proteins P'. Die mit ◆ gekennzeichneten Serinreste an den Positionen 26 und 28 sind Phosphorylierungsstellen für die PKCε, die Serinreste an den Positionen 70 und 86 (◆) werden durch die Casein Kinase II phosphoryliert.

Die zweite Transkriptionseinheit kodiert außerdem auch für das Phosphoprotein P, das eine Größe von ca. 24 kDa besitzt. Es lokalisiert ebenso wie die bisher beschriebenen Proteine sowohl in den Foci im Zellkern als auch im Zytoplasma und interagiert mit N, p10 und L (Schneider et al., 2004). Es besitzt zwei NLS Sequenzen (Schwemmle et al., 1999b, Shoya et al., 1998) und bildet Dimere (Schwemmle et al., 1998). In infizierten Zellen ist eine verkürzte, 16 kDa große P Variante namens P' nachgewiesen worden, die durch die Nutzung eines alternativen Startkodons entsteht (vgl. Abb. 1.6). Ebenso wie bei

anderen Viren der Ordnung *Mononegavirales* ist das Phosphoprotein der Kofaktor der viralen Polymerase. Phosphorylierungen durch die zellulären Kinasen Protein Kinase C_ε (PKC_ε) und Casein Kinase II könnten diese Funktion des P Proteins (Schwemmle et al., 1997) regulieren, da Punktmutationen der Phosphorylierungsstellen die Interaktion mit der Polymerase verhindern (Walker et al., 2000). Weiterhin wurde P als Interaktionspartner des zellulären Proteins Amphoterin beschrieben (Kamitani et al., 2001). Letzteres reguliert das Wachstum von Neuronen und ist somit für die Entwicklung des Gehirns essentiell. Diese Tatsache könnte erklären, weshalb neugeborene BDV infizierte Tiere trotz der Abwesenheit einer immunpathologisch verursachten Neurodegeneration deutliche Defizite im Hinblick auf die Gehirnentwicklung zeigen. Amphoterin interagiert seinerseits mit dem Tumorsuppressor p53 und fördert dessen Aktivität. Diese Interaktion wird durch P kompetitiv inhibiert. Es wurde daher spekuliert, dass P durch Inhibition von p53 vermittelter Apoptose die Lebensdauer infizierter Zellen erhöht und die Persistenz des Virus im ZNS fördert (Zhang et al., 2003). Die Phosphoproteine des Ebola- und des Tollwutvirus (beide Vertreter der *Mononegavirales*) sind als Kofaktoren der viralen Polymerase funktionale Analoga des BDV-P Proteins. Beide Virusproteine wurden kürzlich als Interferon (IFN)-Antagonisten charakterisiert (Basler et al., 2000, Brzozka et al., 2005). Obwohl es keine Sequenzhomologie gibt, wird im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass BDV-P ebenfalls ein potenter Inhibitor des IFN-Systems ist.

Die dritte Transkriptionseinheit kodiert für das ca. 16 kDa große Matrixprotein M, welches Tetramere bildet und die Innenseite der Virusmembran auskleidet. In der Vergangenheit gab es widersprüchliche Aussagen über eine mögliche Glykosylierung von M (Kraus et al., 2005, Kraus et al., 2001, Stoyloff et al., 1997), weshalb es in der Literatur oft auch als gp18 (gp für Glykoprotein) bezeichnet wird. Die Sequenz zeigt jedoch keine Homologie zu Konsensus - Glykosylierungsmotiven.

Das Glykoprotein G (gp84) ist ein Typ I Membranprotein, bestehend aus einem 57 kDa großen Proteinanteil (Schneider et al., 1997). Dieses Vorläuferprotein wird durch die Endoprotease Furin in das C-terminale gp43 und das N-terminale gp51 gespalten (Richt et al., 1998). Sowohl gp84 und gp43 konnten auf der Oberfläche von Viruspartikeln nachgewiesen werden. Sie scheinen eine essentielle Rolle beim Eintritt des Virus in die Zelle zu spielen (Gonzalez-Dunia et al., 1997, Perez et al., 2001). Folgerichtig verhindern

neutralisierende Antikörper gegen G bzw. ein „knock down“ der G-Expression durch antisense Technik die Virusausbreitung (Bajramovic et al., 2003). Das N-terminale Spaltprodukt gp51 wurde in Viruspartikeln nachgewiesen, seine subzelluläre Lokalisierung und seine Funktion sind jedoch noch unbekannt (Kiermayer et al., 2002).

Die 170 kDa große RNA-abhängige RNA-Polymerase L ist schließlich das sechste Genprodukt, dessen ORF rund zwei Drittel des Genoms einnimmt. Dieses Enzym muss vom Virus selbst bereitgestellt werden, denn die Wirtszelle verfügt über keine Polymeraseaktivität, die virale RNA ohne ein DNA-Intermediat direkt in RNA zu kopieren vermag. Die Synthese des reifen L-Transkriptes erfordert ein Durchlesen der Polymerase an T3 sowie das Spleißen der Introns I und II. Auch L weist ein NLS auf und lokalisiert daher sowohl in infizierten als auch in transfizierten Zellen im Zellkern.

1.2 Der Kernimport

Die Zelle als kleinste Einheit des Lebens ist strukturell und funktionell hoch organisiert. Durch Kompartimentierung werden in eukaryontischen Zellen Reaktionsräume geschaffen, die sich biochemisch voneinander unterscheiden und in denen distinkte biologische Vorgänge stattfinden. Die Aufrechterhaltung der verschiedenen Milieus ist von existenzieller Bedeutung für die Zelle und wird durch gerichtete Transportprozesse durch die begrenzenden Membranen sichergestellt. Im Zytoplasma translatierte Proteine enthalten topogene Sequenzen, die den Transport in entsprechende Kompartimente, wie z.B. den Zellkern, vermitteln. Derartige Transportvorgänge wurden als aktive, energieverbrauchende Prozesse charakterisiert, die durch zytosolische Proteine vermittelt werden. Neben Proteinen müssen auch andere Biomoleküle innerhalb der Zelle transportiert werden. Dies gilt insbesondere auch für unterschiedliche RNA-Spezies, die im Zellkern synthetisiert werden und durch gezielte Exportvorgänge ins Zytoplasma gelangen.

Karyophile Proteine enthalten ein Kernlokalisierungssignal (NLS) in ihrer AS-Sequenz. Dieses wird von Importrezeptoren im Zytoplasma erkannt, gebunden und vermittelt schließlich den aktiven Transport durch die Kernporen. Letztere werden durch den Kernporenkomplex („nuclear pore complex“. NPC) gebildet, der in der Kernmembran lokalisiert ist. Dieser ungefähr 125 MDa große Proteinkomplex besteht aus ca. 30 verschiedenen Proteinen, den Nukleoporinen. Viele von ihnen besitzen einen

charakteristischen Bereich, in dem sich die Aminosäuren Phenylalanin und Glycin abwechseln („FG repeats“). Diese interagieren mit löslichen Importrezeptoren samt Importsubstrat (Cargo), was zur Translokation des Komplexes in den Zellkern führt (Beck et al., 2004, Fahrenkrog et al., 2004, Rabut et al., 2004, Rout et al., 2003). In kinetischen Studien wurde ermittelt, dass innerhalb einer Sekunde durch eine Pore ein Massenfluss von 800 Millionen Dalton (rund 1000 Translokationen) möglich ist. Diese Zahlen machen deutlich, wie strukturiert und effizient dieser Vorgang ist und weshalb normalerweise auch Proteine durch aktive Transportvorgänge in den Zellkern importiert werden, die kleiner als 9 nm bzw. 40 kDa sind und somit theoretisch auch passiv in den Kern diffundieren können.

1.2.1 Topogene Sequenzen karyophiler Proteine – Kernlokalisierungssignale

Das klassische NLS zeichnet sich durch ein gehäuftes Auftreten der basischen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K) aus. Vor 20 Jahren stellten Kalderon und Mitarbeiter zum ersten Mal einen kausalen Zusammenhang zwischen der Aminosäuresequenz eines Proteins und dessen subzellulärer Lokalisierung am Beispiel des Simian Virus 40 large-T (Tumor) antigens (SV40Tag) her (Kalderon et al., 1984). Die Sequenz **- P K K K R K V E -** ist seither der Prototyp des klassischen monopartiten NLS. Das NLS des Nukleoplasmins besitzt zwei Cluster basischer Aminosäuren, die durch 10 Aminosäuren getrennt sind, und gilt als Prototyp des klassischen bipartiten NLS: **- K R P A A T K K A G Q A K K K K L D -** (Robbins et al., 1991). Das C-terminale basische Cluster entspricht dabei einem monopartiten NLS, ist jedoch für die Translokation in den Zellkern nicht ausreichend. Hierfür ist zusätzlich das zweite basische Cluster nötig. Auf der Basis der Konsensussequenzen **- K R/K x R/K -** bzw. **- K/R K/R (x)₁₀₋₁₂ 3K/R -** können putative NLS-Sequenzen identifiziert werden. Ihre Vorhersage wird mit dem Wissen um die Bedeutung neuer Determinanten, z.B. die flankierender Aminosäuren, komplexer (Fontes et al., 2003).

1.2.2 Karyopherine – Die Kerntransportrezeptoren

Transportprozesse über die Kernmembran werden durch verschiedene nukleäre Transportrezeptoren vermittelt, wobei die Importin β ähnlichen Proteine („importin β like

proteins“) eine Superfamilie bilden. Das menschliche Genom kodiert für mehr als 20 Proteine, die dieser Familie angehören und als Karyopherine bezeichnet werden. Sie vermitteln den Kernexport oder -import von Makromolekülen und werden in Abhängigkeit von der Transportrichtung in Exportine und Importine unterteilt. Den Vertretern dieser hoch-konservierten Proteinfamilie sind folgende Eigenschaften gemein: I. Sie interagieren entweder direkt oder indirekt über ein Adapterprotein mit der topogenen Sequenz ihres Cargos. II. Sie wechselwirken mit den Nukleoporinen. III. Sie besitzen eine Bindedomäne für die GTPase Ran (RanGTP).

Letztere ist ein Sensor für die RanGTP-Konzentration, die im Zellkern hoch und im Zytoplasma niedrig ist. Dieser Konzentrationsgradient determiniert die Polarität des Transportes, weil die Bindungsstärke zwischen Rezeptor und Cargo durch das RanGTP/GDP-Verhältnis bestimmt wird: Die Bindung von RanGTP an den Importin/Cargo-Komplex im Zellkern führt zum Abdissoziieren des karyophilen Proteins. Der Importin/RanGTP-Komplex transloziert über den Exportrezeptor CAS zurück in das Zytoplasma. Hier wird die GTP Hydrolyse durch das GTPase aktivierende Protein (RanGAP) und die Ran bindenden Proteine (RanBP)1 und -2 stimuliert und der Importrezeptor erlangt seine hohe Affinität gegenüber dem Imports substrat wieder und steht für einen neuen Importprozess zur Verfügung. Für den Exportin/Cargo-Komplex verhalten sich die Zusammenhänge genau umgekehrt. Die GTP-Bindung des Exportrezeptors im Zellkern bewirkt dessen hoch-affine Bindung an das Exportsubstrat. Erst die Hydrolyse von GTP im Zytoplasma führt zur Freisetzung des Cargos. Die regulatorische Bedeutung des GTP-Gradienten wurde u.a. in Mikroinjektionsexperimenten demonstriert, in denen die Injektion von RanBP1 bzw. RanGAP in den Zellkern zur Inhibition des Kernexportes führte (Izaurrealde et al., 1997). In Abb. 1.7 sind diese Vorgänge vereinfacht dargestellt.

Innerhalb der Familie der Imp β ähnlichen Transportrezeptoren ist das Imp β 1 der am besten untersuchte Vertreter. Es besteht aus 19 aufeinander folgenden so genannten „HEAT repeats“, die sich aus zwei über einen Loop verbundene Helices zusammensetzen. Die Abkürzung HEAT leitet sich aus einem Motiv des Huntington Proteins ab (Andrade & Bork, 1995). Das Protein bildet eine kurze Superhelix, an deren Innen- und Außenseite andere Proteine interagieren. Bisher wurden fünf Proteine mit Imp β kokristallisiert. Dass alle Proteine mit unterschiedlichen Bereichen von Imp β wechselwirken, weist auf die

Vielfältigkeit der Ligandbindung hin. Diese Liganden sind entweder selbst Importssubstrate oder so genannte Adapterproteine, z.B. Snurportin oder Imp α (siehe Tabelle 1).

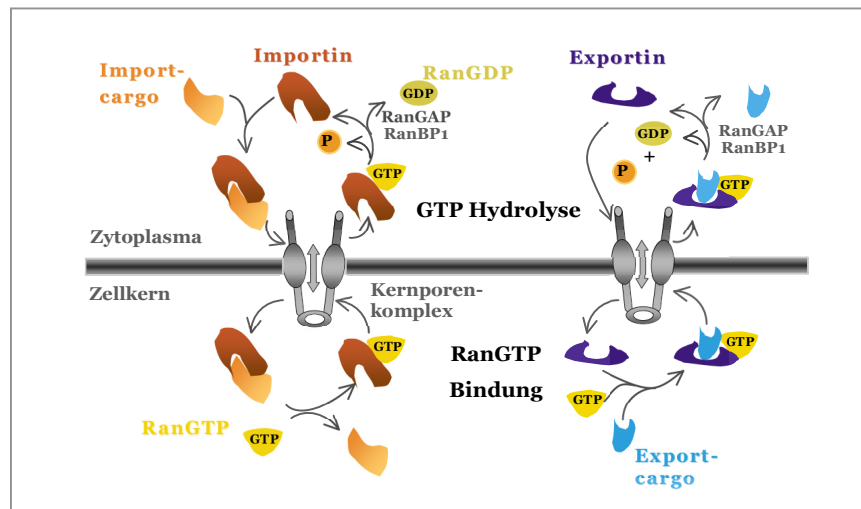


Abb. 1.7: Schematische Darstellung von Kernimport und -export durch die Kernporen.

Zunächst bindet der Importrezeptor sein Substrat im Zytoplasma und transloziert durch die Kernporen in den Zellkern. Bindung von RanGTP an Importin führt zum Abdissoziieren des Cargos. Der Importin/RanGTP-Komplex wird zurück in das Zytosol exportiert, wo die Ran Hydrolyse durch die Proteine RanGAP und RanBP1 stimuliert wird. Dies setzt Importin für den nächsten Importvorgang frei. Die Bindung von Exportsubstraten an Exportine funktioniert genau umgekehrt. Im Zellkern wird ein ternärer Komplex aus Exportin/Exportcargo und RanGTP gebildet, der durch den Kernporenkomplex in das Zytosol exportiert wird. Die RanGTP-Hydrolyse führt zur Freisetzung des Exportsubstrates und zur Rückführung des Exportins in den Zellkern (Strom & Weis, 2001).

Letzteres ist am klassischen Imp α/β abhängigen Kernimport von Proteinen beteiligt, die ein klassisch basisches mono- bzw. bipartites NLS aufweisen. Jedoch werden nicht alle karyophilen Proteine über diesen Weg importiert. So transloziert beispielsweise das „heterogeneous nuclear ribonucleoprotein“ (hnRNP) A1, ein mRNA bindendes Protein, über Transportin I (Importin β 2) und besitzt eine 38 AS große sogenannte M9-Domäne (Bogerd et al., 1999). Ribosomale Proteine binden über eine BIB-Domäne („ β -like importin receptor binding domain“) an unterschiedliche Importin β ähnliche Rezeptoren („importin β like proteins“) (Vgl. Tabelle 1).

Transportrezeptor	Funktion/Cargo
Importin β	Import ribosomaler Proteine, HIV Rev, HIV Tat, HTLV Rex, cyclin B1
Importin β /Adapter Komplexe Importin β /Importin α Importin β /Snurportin Importin β /XRIP α Importin β /Importin 7	Import von Proteinen mit einem klassischen NLS Import von m ₃ G capped U sn RNPs Import von Replikationsprotein A Import von Histon H1, Verhindern von Aggregaten
Transportin 1	Import von hnRNP-A1, -A2, -F, ribosomale Proteine, TAP, Histone
Transportin SR1 und SR2	Import von Proteinen mit SR-Domänen
Importin 5/RanBP5	Import ribosomaler Proteine, Histone
Importin 7/RanBP7	Import ribosomaler Proteine
Crm 1	Export von Proteinen mit NES, m ₇ G capped U snRNAs, Snurportin 1
Exportin-t	Export von tRNA
CAS	Export von Importin α
Exportin 5	Export von Vorläufern von miRNA, tRNA u.a.
Exportin 6	Export von Profilin/Aktin

Tabelle 1: Beispiele für Vertreter der Importin β -Familie (Harel & Forbes, 2004).

Das Adapterprotein Importin α besitzt im Gegensatz zu Imp β ähnlichen Proteinen keine Bindungsstelle für RanGTP und Nukleoporene, sondern kann lediglich Importsubstrate binden und muss daher für den Import mit dem Importrezeptor Imp β interagieren. Inzwischen sind sechs Imp α -Homologe bekannt, die in Vertebraten in drei Subfamilien eingeteilt werden: I. Imp α 1; II. Imp α 3 und 4; III. Imp α 5, 6 und 7. Die Expression der α -Importine ist ubiquitär, mit Ausnahme des α 6-Homologs, welches bisher nur im Hoden nachgewiesen wurde (Kohler et al., 1997, Kohler et al., 1999). Hinsichtlich der Substratspezifität wurde zunächst davon ausgegangen, dass es keine ausschließliche Präferenz eines Importins für ein Substrat gibt. *In vivo* Experimente, in denen mittels RNA-Interferenz („small interfering“ RNA, siRNA) einzelne Imp α -Homologe selektiv ausgeschaltet wurden, zeigten jedoch, dass deren Verlust nicht immer kompensiert werden kann und besonders die Proliferation der Zellen beeinträchtigt wird (Quensel et al., 2004).

Alle Imp α -Homologe (ca. 60 kDa groß) bestehen aus zwei Struktur- und Funktionsdomänen, der N-terminalen Importin β -bindenden (IBB) Domäne (Gorlich et al., 1996) und einer großen NLS-bindenden Domäne, die ähnlich dem Imp β zehn repetitiv aufeinander folgende Sequenzbereiche, so genannte „armadillo (Arm) repeats“, aufweist

(Peifer et al., 1994). Diese werden durch drei Helices (H1-H3), die über Loops miteinander verbunden sind, gebildet. Beide Domänen verbindet eine flexible Region. Abb. 1.8 veranschaulicht die Domänenstruktur.

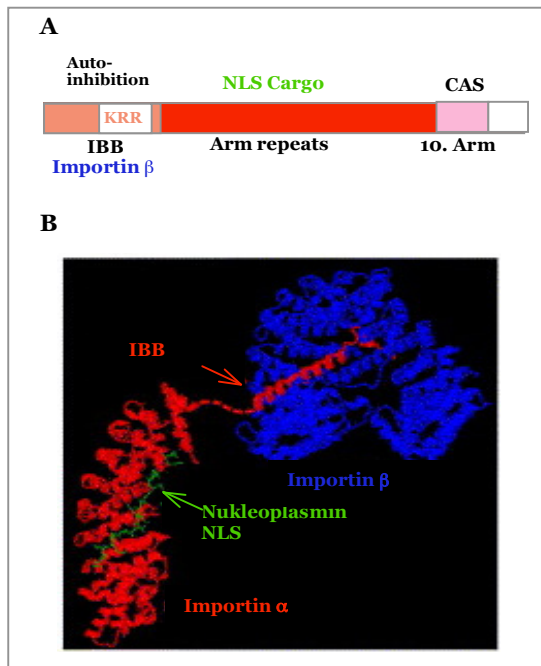


Abb. 1.8: Domänenstruktur von Imp α .

Teil A stellt die funktionalen Domänen und die entsprechenden Bindungspartner von Imp α dar. KRR bezeichnet das autoinhibitorische Motiv, CAS bezeichnet die Bindungsstelle des Imp α -Exportrezeptors (Vgl. Tabelle 1). Teil B veranschaulicht die Struktur des ternären Komplexes bestehend aus Imp α/β und Nukleoplasmin, einem Protein mit klassischem NLS (Goldfarb et al., 2004).

Die IBB-Domäne besitzt einen Bereich basischer Aminosäuren, der ein Pseudo-NLS darstellt und deshalb vom Karyopherin Imp β gebunden werden kann. Diese Wechselwirkung dient nicht nur der Komplexbildung zwischen Adapter und Importrezeptor zum Zweck des Kernimportes, sondern erfüllt auch eine regulatorische Funktion bei der Bindung von Importsubstraten. Da die Region zwischen der IBB- und der NLS-bindenden Domäne flexibel ist, kann das Pseudo-NLS mit den „Arm repeats“ in *cis* interagieren und die Bindung eines Importsubstrates durch Autoinhibition beeinträchtigen (Cingolani et al., 1999, Kobe, 1999). Erst die Interaktion mit Imp β in *trans* bewirkt die Freigabe der NLS-Bindungstasche und ermöglicht eine hoch-affine Bindung zwischen dem Adapter und dem Importsubstrat mit einer Bindungskonstante im nanomolaren Bereich. Diese Interaktion ist in Abwesenheit von Imp β mit einer Bindungskonstante im mikromolaren Bereich wesentlich schwächer. Die Sequenz der Bildung des ternären Komplexes, bestehend aus Imp α/β und Cargo, ist unklar und *in vivo* vermutlich variabel (Goldfarb et al., 2004).

Die α -Helices im NLS-bindenden Bereich von Imp α bilden eine lang gestreckte Bindungstasche. Innerhalb dieser Region sind mehr als 70 % der konservierten Aminosäuren exponiert, besonders Tryptophan- und Asparaginreste, die an der Bindung

der klassischen Kernlokalisierungssequenzen durch hydrophobe bzw. polare Wechselwirkungen beteiligt sind. Abb. 1.9 zeigt die dreidimensionale Struktur von Imp α (ohne IBB-Domäne) im Komplex mit mono- bzw. bipartiten NLS-Sequenzen.

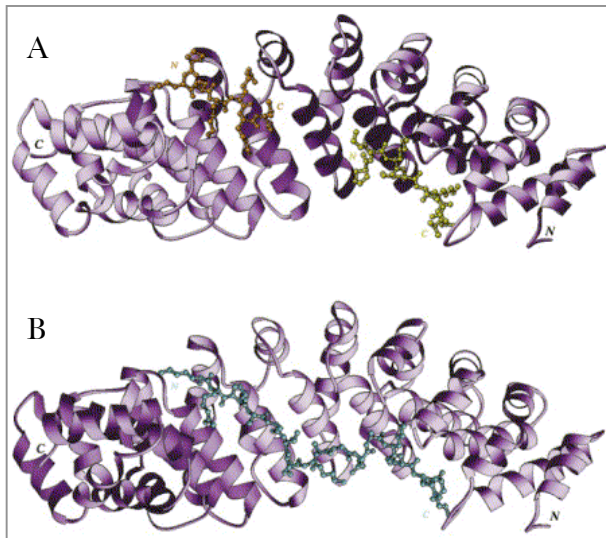


Abb. 1.9: Struktur des Imp α (70-529) im Komplex mit mono- bzw. bipartiten NLS-Sequenzen.

Die „Arm-repeats“ sind als lilafarbene Helices dargestellt. (A) Darstellung des monopartiten SV40-NLS in der „major binding site“ in gelb und in der „minor binding site“ in orange. (B) Das bipartite Nucleoplasmin-NLS ist in zyan dargestellt (Fontes et al., 2000).

Durch Röntgenkristallstruktur-Analysen des Imp α aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden distinkte Bindungstaschen für basische Aminosäuren innerhalb der klassischen NLS-Sequenzen identifiziert (Conti et al., 1998), die auch auf das murine Imp α übertragen werden können: Monopartite NLS-Sequenzen binden präferenziell in der N-terminalen, zwischen der ersten und vierten „Arm-Domäne“ gelegenen Bindungstasche („major binding site“), können aber auch im C-Terminus zwischen den „Arm-repeats“ vier und acht binden („minor binding site“). Ein bipartites NLS interagiert mit beiden Bindungsstellen simultan [Vgl. Abb. 1.9 (Fontes et al., 2000)].

1.2.3 Virusinfektion und Kernimport

Für viele Viren ist der Zugang zum Zellkern essentiell, weil sie für ihre Replikation nukleäre Enzyme und Strukturen nutzen. Dies ist für die meisten DNA-Viren der Fall, die keine eigene DNA-Polymerase besitzen und deshalb die zelluläre Replikationsmaschinerie beanspruchen. Die Kapside, in denen das virale Genom verpackt ist, sind zu groß, um durch die Kernporen diffundieren zu können. Der Weg in den Zellkern führt entweder über aktive Transportmechanismen oder seltener, in sich teilenden Zellen, über die aufgelöste Kernmembran (Whittaker, 2003, Whittaker & Helenius, 1998).

Im Unterschied zu DNA-Viren stellen RNA-Viren ihre eigene RNA-abhängige RNA-Polymerase bereit. In der Regel sind die Viren daher in der Lage, im Zytoplasma der

Wirtszelle zu replizieren. Eine Ausnahme bilden jene Viren, deren Transkripte mit Hilfe des nukleären Spleißapparates prozessiert werden, z.B. Influenzaviren und Bornaviren. Ihr Genom wird vom viralen Nukleoprotein (NP) komplexiert und als vRNP-Komplex in den Kern importiert. Weiterhin unterstützen einige Viren ihre eigene Replikation durch Manipulation zellulärer Prozesse im Zellkern (z.B. Inhibition der Transkription zellulärer Gene, des Spleißens von prä-mRNA bzw. Inhibition des Exportes zellulärer mRNAs). Der Import viraler Proteine in den Zellkern stellt daher für viele Viren eine Grundvoraussetzung für die Vervielfältigung ihrer Genome dar.

1.3 Das Typ I Interferon-System

Eukaryontische Zellen sind in der Lage, mikrobielle Infektionen (z.B. mit Bakterien, Pilzen oder Viren) zu erkennen und Abwehrmechanismen mit dem Ziel zu aktivieren, die Infektion durch eine rasche Reaktion lokal einzugrenzen und nicht infizierte Zellen vor einer Neuinfektion zu schützen. Das angeborene Immunsystem („innate immune system“) spielt dabei eine entscheidende Rolle, weil es unmittelbar reagieren kann. Dies wird durch konstitutiv exprimierte intra- und extrazelluläre Rezeptoren gewährleistet, die Sensoren für evolutionär hoch konservierte molekulare Strukturen von Mikroorganismen sind („pathogen associated molecular patterns“, PAMPs). Die auf der Zelloberfläche befindlichen „Toll like receptors“ (TLRs) erkennen z.B. Lipopolysaccharid (LPS), Flagellin oder unmethylierte Nukleotidsequenzen als Zeichen einer bakteriellen Infektion (Akira, 2001). Virusinfektionen führen zum Entstehen viraler dsRNAs, die durch intrazelluläre Sensoren erkannt werden. Die unterschiedlichen Stimuli lösen verschiedene Antworten aus, z.B. Aktivierung von Makrophagen und Neutrophilen, Phagozytose oder Aktivierung des Komplementsystems. Virus infizierte Zellen werden dazu veranlasst, Typ I Interferon zu synthetisieren.

1.3.1 Interferone

Interferone (IFN) sind multifunktionale Zytokine, die infolge einer Virusinfektion gebildet werden und u.a. antivirale Wirkung zeigen. Sie werden in zwei Gruppen eingeteilt. Als Typ I Interferone werden IFN- α , IFN- β und IFN- ω bezeichnet. Bisher sind 13 humane IFN- α Gene und ein IFN- β Gen bekannt. IFN- γ , für das ein Gen kodiert, ist ein Typ II Interferon. IFN- α/β werden von verschiedenen Säugerzellen als unmittelbare Reaktion

auf eine Virusinfektion produziert, wogegen das nicht verwandte IFN- γ nur von einigen aktivierten Immunzellen, z.B. natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und CD4⁺ Lymphozyten synthetisiert wird und essentiell für eine umfassende Immunantwort ist (Samuel, 2001).

Neben seiner antiviralen Wirkung ist das Typ I IFN-System essentiell für die Aktivierung und Modulierung der adaptiven Immunantwort (Biron, 2001, Le Bon & Tough, 2002). So werden unreife dendritische Zellen durch IFN- α/β zur Reifung angeregt, d.h. sie entwickeln sich zu Antigen präsentierenden Zellen, die T-Zellen aktivieren (Luft et al., 1998). Außerdem ist in IFN- α/β defizienten Mäusen die Myelopoese (Knochenmarksentwicklung) stark beeinträchtigt. Dies resultiert u.a. in einer erheblichen Beeinträchtigung der B-Zellreifung. Ferner zeigten Tumoren in diesen Tieren ein äußerst aggressives Wachstum (Deonarain et al., 2003). Typ I IFN verstärkt weiterhin die Expression von TLRs (Miettinen et al., 2001) und MHC-I-Molekülen. Wegen seiner vielfältigen Wirkungen kommt Typ I IFN u.a. bei der Behandlung chronischer Hepatitiden (B und C), Autoimmunerkrankungen (Multiple Sklerose) und einiger Tumoren zur Anwendung. IFN- α/β entfalten ihre Wirkung in einem biphasischen Prozess, der die Aktivierung von IFN-Promotoren und die anschließende Aktivierung der IFN abhängigen Signalkaskade beinhaltet. Abb.1.10 veranschaulicht diesen Ablauf in vereinfachter Form.

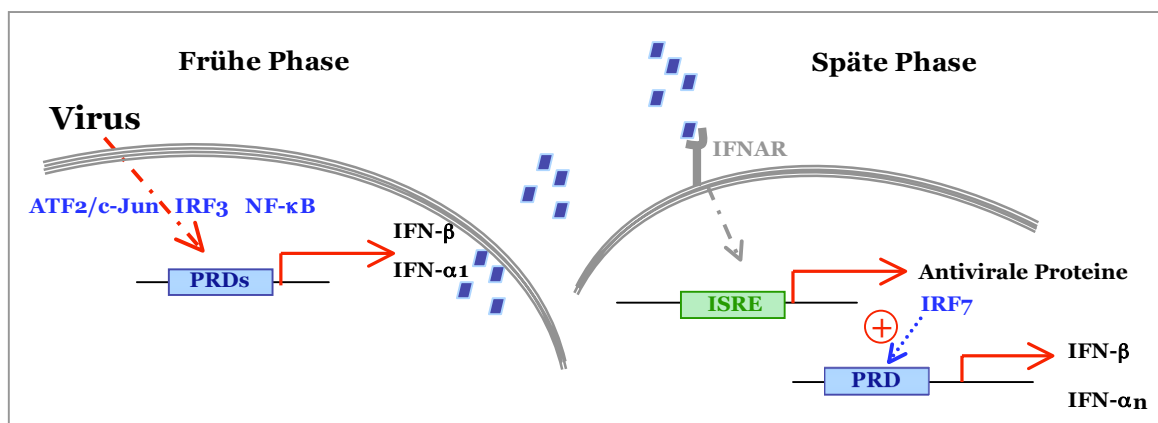


Abb. 1.10: Frühe und späte Aktivierungsphasen des Typ I IFN-Systems.

Infolge einer viralen Infektion werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die an die „positive regulatory domains“ (PRDs) des Typ I IFN-Promotors binden und diesen aktivieren. In der frühen Phase kommt es zunächst zur Synthese von IFN- β und - $\alpha 1$. Die sekretierten Zytokine binden an ihren Rezeptor und lösen eine Signalkaskade aus, die in der späten Phase das „IFN-stimulated response element“ (ISRE) aktiviert und IFN abhängige Gene induziert. Die *de novo* Synthese von „IFN-regulating factor“ (IRF) 7 ist essentiell für die zweite Phase der IFN-Synthese, in der neben IFN- β alle weiteren IFN- α Subtypen gebildet werden.

In Virus infizierten Zellen wird die IFN- α/β Produktion durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren induziert, die den Typ I IFN-Promotor durch Bindung an entsprechende „positive regulatory domains“ (PRDs) anschalten. In der ersten Phase werden IFN- β und - $\alpha 1$ gebildet und sekretiert. Diese interagieren in der späten Phase mit dem gemeinsamen Typ I IFN-Rezeptor (IFN- α Rezeptor, IFNAR) und bewirken die Induktion von „IFN-stimulated response element“ (ISRE) abhängigen Genen. Diese kodieren für Proteine mit antiviraler Wirkung (siehe Abschnitt 1.3.5), welche die Zelle vor Virusinvasion und -ausbreitung schützen. Außerdem werden autokrine und parakrine Rückkopplungsmechanismen („positive feedback“) aktiviert, die eine zweite Welle der IFN- α/β -Produktion einleiten. Die Induktion von „IFN-regulatory factor“ (IRF) 7 ist dabei von zentraler Bedeutung (siehe Abschnitt 1.3.2.2). Während dieser zweiten Phase werden neben IFN- β alle anderen IFN- α Subtypen gebildet.

1.3.2 Virus induzierte IFN- β Aktivierung

Während der Replikation von RNA-Viren in der Wirtszelle kommt es zur Entstehung von dsRNA-Intermediaten, die von zellulären Rezeptoren als „fremd“ erkannt werden und eine Virusinfektion signalisieren. Dies hat die unmittelbare Aktivierung antiviraler Abwehrmechanismen zur Folge.

Erst kürzlich wurden zwei intrazelluläre dsRNA-Sensoren identifiziert: die vom „retinoic acid inducible gene I“ (*RIG-I*) kodierte RNA-Helikase RIG-I (Yoneyama et al., 2004) und die vom „melanoma differentiation-associated gene 5“ (*mda-5*) kodierte RNA-Helikase mda-5 (Andrejeva et al., 2004). Beide Proteine besitzen eine N-terminale „Caspase activating and recruiting domain“ (CARD) und eine C-terminale DExD/H Box Helikase-Domäne. Letztere bindet dsRNA und löst vermutlich eine Konformationsänderung aus, welche die Interaktion der CARD-Domäne mit dem Effektorprotein IPS-1 (auch als MAVS, VISA oder Cardif bezeichnet) bewirkt (Kawai et al., 2005). Außerdem ist davon auszugehen, dass auch andere virale Strukturen von bisher nicht identifizierten Rezeptoren erkannt werden. So bewirkt z.B. die alleinige Expression des Nukleokapsid Proteins des Masernvirus bereits eine antivirale Antwort (tenOever et al., 2002). Auf die molekularen Mechanismen, die zur Aktivierung des IFN- β Promotors führen, wird im folgenden Kapitel genauer eingegangen.

1.3.2.1 Der IFN- β Promotor

Der IFN- β Promotor ist ein komplexes, hoch organisiertes Element, das aus vier PRDs besteht. Die Detektion von dsRNA führt zur Interaktion der CARD-Domäne des Sensorproteins mit dem Adapterprotein IPS-1. Dies führt zu Aktivierung von Kinasen („virus activated kinases“, VAKs), die ihrerseits die konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktoren „activating transcription factor 2“ (ATF2)/c-Jun, „interferon regulatory factor 3“ (IRF3) und „nuclear factor- κ B“ (NF- κ B) phosphorylieren, welche an PRD IV, PRD III-I bzw. PRD II binden (siehe Abb.1.11). Dieser kooperativ verlaufende Vorgang resultiert in der Bildung eines dreidimensionalen Nukleoproteinkomplexes, der als „IFN- β Enhanceosom“ bezeichnet wird und die *ifn- β* Transkription einleitet (Kim et al., 2000, Kim & Maniatis, 1997). Die Bildung des „Enhanceosoms“ ist für die Spezifität der Transkriptionsaktivierung unabdingbar, denn die genannten Transkriptionsfaktoren regulieren darüber hinaus auch andere Zielgene mit unterschiedlichen biologischen Funktionen.

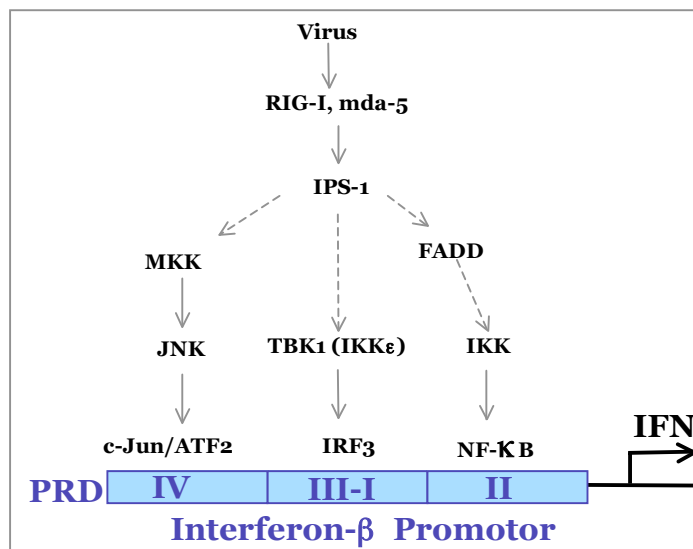


Abb.1.11: Aktivierung des IFN- β Promotors.

Eine Virusinfektion führt zur Aktivierung zellulärer Kinasen (siehe Text), die ihrerseits die Transkriptionsfaktoren c-Jun, ATF2, IRF3 und NF- κ B aktivieren. Diese binden an distinkte PRDs und induzieren die IFN- β Produktion.

Die Aktivierung der Mitogen aktivierten Protein Kinase (MAPK) Kaskade wird durch zahlreiche extrazelluläre Stimuli ausgelöst und bewirkt unterschiedliche zelluläre Antworten, z.B. Proliferation, Differenzierung, Apoptose oder die Induktion entzündlicher Prozesse. Die Phosphorylierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) durch die MAP Kinase Kinasen (MKK) 4 und 7 hat die Translokation von JNK in den Nukleus zur Folge. Hier phosphoryliert sie c-Jun und den aktivierenden Transkriptionsfaktor (ATF2). Beide Proteine bilden stabile, als „activating protein-1“ (AP-1) bezeichnete Heterodimere, die an die PRD IV binden (Karin et al., 1997, Weston & Davis, 2002).

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B kann durch mehr als 150 verschiedene Stimuli aktiviert werden, wie z.B. physikalischen Stress, Zytokine oder virale/bakterielle Infektionen. Seine Zielgene sind ebenso zahlreich (>150) (Pahl, 1999). Die Bezeichnung NF- κ B ist ein Sammelbegriff für derzeit fünf bekannte Transkriptionsfaktoren, die der Rel-Familie angehören. Sie weisen einen konservierten N-terminalen Bereich auf, in dem sich die DNA-bindende Domäne, ein NLS und die Dimerisierungsdomäne befinden. NF- κ B bildet Heterodimere, wobei p50/p65 (NF- κ B1/RelA) als das klassische Dimer gilt. In ihrer inaktiven Form liegen sie im Zytoplasma, komplexiert vom „inhibitor of κ B“ (I κ B), vor. Dadurch wird das NLS maskiert und der NF- κ B Kernimport verhindert. Die Rolle des „fibroblast associated antigen (Fas) associated protein with death domain“ (FADD) bei der Aktivierung des I κ B Kinase-Komplexes (IKK) ist im Detail noch unklar. Letzterer besteht aus den katalytischen Untereinheiten α/β und der regulatorischen γ -Untereinheit und phosphoryliert I κ B. Dies hat das Abdissoziieren des Inhibitors und seinen Ubiquitin vermittelten Abbau zur Folge. NF- κ B kann dann als Dimer in den Zellkern translozieren und an die PRD II binden (Baeuerle & Henkel, 1994, Mercurio & Manning, 1999). Die Interferon regulatorischen Faktoren (IRFs) werden im folgenden Abschnitt ausführlich besprochen.

1.3.2.2 Interferon regulatorische Faktoren („Interferon regulatory factors“, IRFs)

Die Familie der IRFs umfasst neun Transkriptionsfaktoren, die hinsichtlich ihrer Funktionen bemerkenswert vielseitig sind. Einige IRFs sind für die Induktion von IFN bzw. IFN abhängiger Gene absolut unerlässlich, andere sind wichtig für die Reifung und Aktivierung von T-Zellen, Zellzyklusregulation oder Apoptose.

Hinsichtlich ihrer Struktur weisen sie besonders in ihrer N-terminalen, DNA bindenden Domäne homologe Tryptophan-reiche Regionen auf. Dies hat zur Folge, dass sie an ähnliche DNA-Sequenzen verschiedener Promotoren binden. Dazu zählen ISRE-Elemente von IFN induzierbaren Promotoren, die im Promotor des MHCI-Gens lokalisierte „interferon consensus sequence“ (ICS) und die bereits erwähnten PRDs des IFN- β Promotors (Darnell et al., 1994, Nelson et al., 1993, Tanaka et al., 1993). Im Folgenden wird auf die Faktoren IRF3 und 7 näher eingegangen.

Der Transkriptionsfaktor IRF3 spielt bei der Typ I IFN-Induktion eine zentrale Rolle. Dementsprechend fehlt IRF3 defizienten Mäusen der antivirale Schutz (Sato et al., 2000). In infizierten Zellen wird IRF3 rasch aktiviert und überträgt Virus induzierte Signale in den Zellkern. Das 55 kDa große Protein wird ubiquitär exprimiert und lokalisiert in seiner inaktiven Form im Zytoplasma der Zelle. Seine Aktivierung beinhaltet: I. Phosphorylierung, II. Dimerisierung, III. Translokation in den Zellkern und IV. Bindung an responsive Promotoren (Yoneyama et al., 1998).

Die molekularen Mechanismen, die zur IRF3-Aktivierung führen, sind recht gut verstanden. Dabei hat die Identifizierung der IRF3-Kinasen erheblich zum Verständnis des Prozesses beigetragen. Es handelt sich um IKK homologe Kinasen: die konstitutiv exprimierte „Traf family member-associated NF κ B activator- (TANK) binding kinase-1“ (TBK1) und die induzierbare I κ B Kinase- ϵ (IKK ϵ) (Fitzgerald et al., 2003, Sharma et al., 2003). In TBK1 defizienten MEFs führen weder Virusinfektion, Inkubation mit synthetischer dsRNA [„Polydeoxyinosinic-Polydeoxycytidylic acid“, p(IC)] noch die Behandlung mit LPS zur IRF3 Aktivierung. Die Tatsache, dass in diesen Zellen kein IFN produziert wurde, zeigt die Bedeutung von IRF3 als zentrales Signalmolekül des angeborenen Immunsystems (McWhirter et al., 2004). Aktiviertes IRF3 vermag aber auch IFN stimulierte Gene (ISGs) unabhängig von einer IFN-Induktion durch Bindung an distinkte ISRE abhängige Promotoren zu stimulieren (Grandvaux et al., 2002).

Die Virus induzierte Phosphorylierung von IRF3 am C-Terminus löst eine Konformationsänderung aus und es kommt zur Bildung von Homodimeren. Des Weiteren vermittelt diese Modifizierung auch den zeitlich verzögerten Abbau von IRF3 durch Proteasomen. Im Zellkern interagiert IRF3 mit dem Koaktivatorprotein „cAMP responsive element-binding protein (CREB) binding protein“ (CBP) und bildet einen Holokomplex, der an die PRDs binden kann (Suhara et al., 2002).

Im Gegensatz zu IRF3 wird IRF7 nicht konstitutiv exprimiert, sondern ist ein IFN induzierbares Protein. Strukturell weist es eine große Homologie zu IRF3 auf und wird an seinem C-Terminus durch IKK ϵ und TBK1 phosphoryliert. Es bildet entweder Homodimere oder IRF3/IRF7-Heterodimere. IRF7 ist für die positiven Rückkopplungsmechanismen, die vor allem IFN- α Genexpression bewirken, essentiell (Sato et al., 2000).

Außerdem spielt es bei der Typ I IFN-Induktion in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) eine wichtige Rolle (Honda et al., 2005).

1.3.3 Typ I IFN-Produktion in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs)

Plasmazytoide dendritische Zellen sind für die Verbindung von angeborener und adaptiver Immunität von entscheidender Bedeutung. Sie sind I. im Vergleich zu Epithelzellen diejenigen, die am meisten IFN- α/β produzieren und tragen II. durch ihre Zirkulation in der Blutbahn zu systemischen Reaktionen bei. Im Unterschied zu klassischen dendritischen Zellen exprimieren sie nur wenige MHCII-Moleküle und sind daher nicht auf Antigenpräsentation spezialisiert. Stattdessen sind sie mit TLR7 und -9 ausgestattet. Dies befähigt sie zur Erkennung von ssRNA als Indikator einer viralen Infektion und nicht methylierter Cytidin-Guanosin haltiger DNA-Sequenzen (CpG-DNA) als Anzeichen einer bakteriellen Infektion (Diebold et al., 2004, Hemmi et al., 2000). Die Bindung der Agonisten an die TLRs und die Induktion der Signalwege erfolgt dabei in Endosomen. Im Gegensatz zu anderen IFN produzierenden Zellen wird IRF7 in pDCs konstitutiv exprimiert, was eine schnelle IFN-Induktion ermöglicht. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass IRF3 in diesen Zellen für die IFN-Produktion entbehrlich ist (Honda et al., 2005). Diese Befunde deuten auf distinkte Signalwege der Typ I IFN-Induktion in Epithelzellen und pDCs hin.

1.3.4 Die IFN- β Signaltransduktion

Die Bindung von IFN- α/β an den gemeinsamen Rezeptor IFNAR löst den klassischen JAK-STAT Signalweg aus. Die Aktivierung der Rezeptor assoziierten Kinasen „Janus activated kinases“ (JAKs) „Tyrosine kinase 2“ (TYK2) und JAK1 bewirkt die Phosphorylierung der „Signal transducer and activator of transcription“ (STAT) 1 und 2, welche Heterodimere bilden. Durch Interaktion mit IRF9 entsteht ein trimere Komplex, der als „IFN-stimulated gene (ISG) factor 3“ (ISGF3) bezeichnet wird. ISGF3 transloziert in den Nukleus, bindet dort an ISRE-Promotorsequenzen und induziert die Genexpression von antiviralen Proteinen und IRF7 (siehe Abb. 1.12). Die IFN Signalkaskade ist für die Wirksamkeit des Typ I IFN-Systems wichtig, weil erst dadurch Proteine mit antiviraler Wirkung induziert werden und auch nicht infizierte Zellen einen umfassenden antiviralen

Status etablieren. Das Beispiel zweier nicht verwandter Kinder, die eine genetisch bedingte STAT1-Defizienz aufwiesen macht dies deutlich. Beide Kinder starben an viralen Infektionen, die normalerweise in gesunden Menschen keine schwerwiegende Symptomatik herbeiführen (Dupuis et al., 2003).

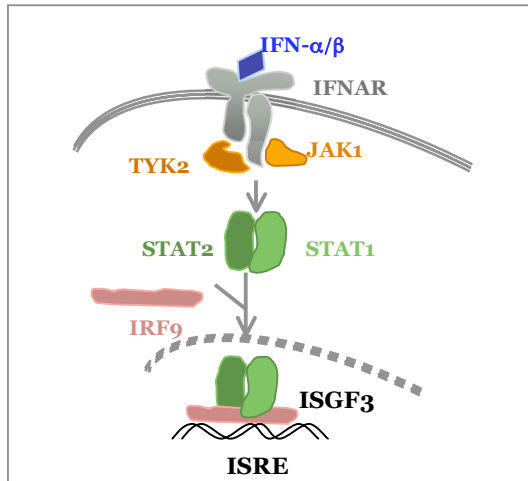


Abb. 1.12: Typ I IFN induzierte Signalkaskade.

Die Bindung von IFN-α/β an IFNAR aktiviert die Janus-Kinasen TYK2 und JAK1. Die Phosphorylierung von STAT1 und -2 führt zu deren Dimerisierung. Durch Bindung von IRF9 entsteht der ISGF3-Komplex, der an ISRE-Promotorsequenzen bindet und zur Genexpression antiviraler Proteine und IRF7 führt.

1.3.5 Antivirale Wirkung IFN induzierbarer Proteine

IFN induzierbare Proteine umfassen mehr als 150 Faktoren, die das Potenzial besitzen, die Virusreplikation zu inhibieren. Einige gut charakterisierte Vertreter sollen im Folgenden vorgestellt werden.

Die Proteinkinase R (PKR) erkennt dsRNA und wird durch deren Bindung aktiviert. Sie phosphoryliert verschiedene Substrate, darunter auch den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor eIF-2α. Dies bewirkt seine Inaktivierung und die Einstellung der Proteintranslation in der Wirtszelle („host cell shut off“). Somit werden auch keine viralen Proteine mehr gebildet und die Virusreplikation wird wirksam inhibiert.

Mx Proteine sind GTPasen, die mit viralen Nucleokapsiden durch Bindung an das Nucleoprotein (NP) interagieren können. Für Viren der Familie der *Orthomyxoviridae*, deren einzelsträngiges RNA-Genom im Zellkern repliziert und transkribiert wird, hat dies weitreichende Folgen. Die Interaktion des humanen MxA bzw. murinen Mx1 Proteins mit vRNPs inhibiert deren Translokation in den Nukleus und damit auch die Transkription. Mx inhibiert jedoch auch die Replikation von Viren, die der Virusfamilie der *Bunyaviridae* angehören, welche im Zytoplasma replizieren (Frese et al., 1996). Dieser Wirkmechanismus ist allerdings noch nicht verstanden.

Ein weiteres IFN induzierbares Protein ist die 2',5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS). Dieses Enzym katalysiert nach Aktivierung durch dsRNA die Bildung von ATP-Oligomeren, in denen die Nukleotide über die 2' und 5' Positionen des Zuckerrestes verbunden sind. Diese Verknüpfung ist untypisch und führt zur Aktivierung der Endoribonuklease RNase L, welche neben zellulären RNAs (mRNA, rRNA) auch virale RNA degradiert und somit effektiv zur Inhibition der Virusreplikation beiträgt.

Die Typ I IFN induzierte verstärkte Expression von MHCI-Molekülen dient im weiteren Sinn auch der antiviralen Abwehr. Durch Präsentation von Peptidantigenen (u.a. viralen Ursprungs) werden zytotoxische T-Zellen aktiviert, die Virus infizierte Zellen eliminieren.

1.3.6 Antagonisierung des Typ I IFN-Systems durch Viren

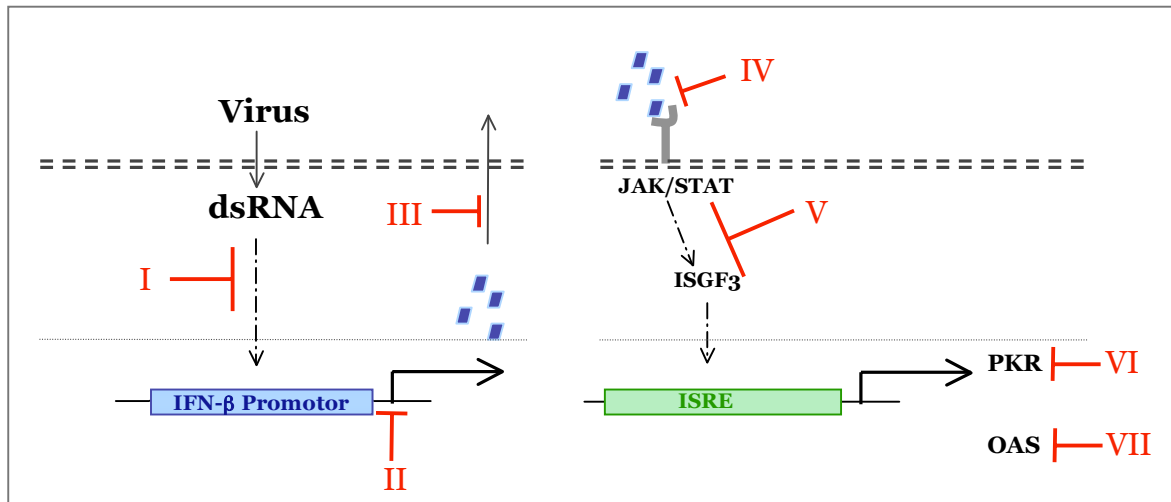
Den zahlreichen antiviralen Mechanismen der Zelle steht eine nicht minder große Zahl viraler Strategien gegenüber, die der Unterwanderung der zellulären Abwehrmechanismen dienen. Von der Effektivität dieser Strategien hängt eine optimale virale Replikation ab. IFN antagonisierende Proteine sind somit Virulenzfaktoren. Ferner können sie auch den Spezies-Tropismus eines Virus determinieren, wenn sie in nur einem bestimmten Wirt effizient funktionieren. Oft handelt es sich bei IFN-Antagonisten um akzessorische Proteine, ohne die eine Replikation möglich ist. Virusmutanten ohne IFN-Antagonisten sind jedoch stark attenuiert. Solche Viren sind mit Blick auf die Entwicklung von Lebendimpfstoffen von großem Interesse.

Um die Diversität der viralen IFN-Antagonisten darzustellen, werden im Folgenden einige ausgewählte Beispiele erläutert, die durch Abb. 1.13 ergänzt werden. RNA-Viren verfügen über kleine Genome (< 30 kb) und kodieren daher meist nur für einen IFN-Antagonisten, wogegen große DNA-Viren (z.B. Herpes- oder Pockenviren) mehrere solcher Genprodukte exprimieren, um der zellulären Abwehr zu entgehen.

IFN- α/β sensitive Viren inhibieren bereits die initiale IFN-Induktion. Prominente Beispiele sind die Influenza A und B Viren, deren Nicht-Strukturproteine 1 (NS1) die IFN- β Induktion auf Transkriptionsebene inhibieren (Talon et al., 2000, Donelan et al., 2004). Außerdem verhindern sie durch die Bindung an dsRNA die Aktivierung der PKR.

Eine weniger spezifische Strategie verfolgen einige Bunyaviren, deren NSs-Proteine die zelluläre RNA-Polymerase II inhibieren. Diese Aktivität wird für die Virusreplikation nicht benötigt, da die Viren ihre eigene Polymerase mitbringen (Weber et al., 2002). Ferner ist das M-Protein des Vesikulären Stomatitisvirus (VSV) ein potenter IFN-Antagonist, indem es mit dem Kernexport zellulärer mRNAs interferiert (Her et al., 1997). Das Hepatitis C Virus (HCV) NS3/4A Protein greift bereits früh in die dsRNA abhängige RIG-I Signalkaskade ein, indem es das Adapterprotein IPS-1 [in der Originalpublikation als „Cardif“ bezeichnet (Meylan et al., 2005)] proteolytisch spaltet. Die V Proteine der Paramyxoviren interagieren dagegen mit der Effektordomäne des intrazellulären dsRNA-Sensors mda-5 und blockieren so die Signaltransduktion (Andrejeva et al., 2004).

Das Vacciniavirus inhibiert durch „molecular mimicry“ die Bindung von IFN- α/β an den Rezeptor kompetitiv, indem es lösliche Rezeptoren exprimiert und sezerniert (Alcami et al., 2000). Somit findet keine IFN-Signaltransduktion statt. Die Inhibition der IFN aktivierten JAK-STAT Signalweges durch virale Proteine ist bei DNA- und RNA-Viren sehr verbreitet. Vielfach werden dabei Signalmoleküle degradiert. Das V-Protein des Simian Virus 5 (SV5) vermittelt z.B. Abbau von STAT1 (Didcock et al., 1999). Das Karposi-Sarkoma-Herpesvirus (KSHV) kodiert für IRF homologe Proteine, welche dominant negative Versionen der zellulären IRFs darstellen und mit der IFN-Signaltransduktion interferieren (Li et al., 1998).



- I. **Inhibition der IFN- β Promotoraktivierung:** E1A Protein (Adenovirus), E3L (Vacciniavirus), NS3A/4 (Hepatitis C Virus), VP35 (Ebola Virus), NS1 (Influenza A und B Viren), P (Tollwutvirus), NS1/2 (Respiratorisches Syncytialvirus), ML (Thogotovirus), V (Simian Virus 5, Mumpsvirus)
- II. **Inhibition der Transkription, mRNA-Export:** NSs (Bunyamveravirus), M (Vesiculäres Stomatitisvirus)
- III. **Inhibition der IFN-Sekretion:** 3A (Poliovirus)
- IV. **Inhibition der IFN-Rezeptorbindung:** B18R (Vacciniavirus)
- V. **Inhibition des JAK/STAT Signalweges:** V (Simian Virus 5, Mumpsvirus, Newcastle Disease Virus, Masernvirus), C (Sendaivirus), E1A (Adenovirus), M27 (murines Cytomegalovirus), E6/7 (humanes Papillomavirus), vIRFs (Karposi-Sarkoma-Herpesvirus)
- VI. **Inhibition der PKR:** NS1 (Influenza A und B Viren), E3L/K3L (Vacciniavirus), ICP.34.5, US11 (Herpes simplex Virus), VAI RNAs (Adenovirus), NS5A, E2 (Hepatitis C Virus)
- VII. **Inhibition der OAS:** E3L (Vacciniavirus), NS1 (Influenza A und B Viren)

(Finke & Conzelmann, 2005, Garcia-Sastre, 2002, Garcia-Sastre, 2004, Samuel, 2001)

Abb. 1.13: Strategien der IFN-Antagonisierung durch Viren.

Die Inhibition der IRF3-Aktivierung wurde für einige Viren, z.B. für das Ebolavirus, beschrieben, der eigentliche Angriffspunkt für virale Antagonisten blieb jedoch unerklärt. In dieser Arbeit wurde das BDV-P Protein als Interaktionspartner und erster viraler Inhibitor der IRF3-Kinase TBK1 identifiziert.

1.4 Fragestellung

Das „Borna Disease Virus“ (Bornavirus, BDV) transkribiert und repliziert sein Genom im Kern der Wirtszelle. Diese Tatsache und andere molekularbiologische Besonderheiten machen es innerhalb der Ordnung der *Mononegavirales* zum Prototypen der neuen Virusfamilie der *Bornaviridae*. Informationen über die Genomsequenz stehen erst seit 1994 zur Verfügung. Daher ist die Molekularbiologie noch wenig charakterisiert und es gibt eine Reihe offener Fragestellungen. Die viralen Proteine p10 und P, die den Fokus dieser Arbeit bilden, werden von der zweiten Transkriptionseinheit kodiert.

Über die Funktion des viralen p10 Proteins war bei Beginn dieser Arbeit in Ermangelung eines revers genetischen Systems nur sehr wenig bekannt. Die Beobachtung, dass solitär exprimiertes p10 unter anderem im Zellkern der Wirtszelle detektiert wurde, jedoch kein klassisches Kernlokalisierungssignal besitzt, warf folgende Fragen auf:

Wird das p10 Protein in einem aktiven Transportprozess in den Nukleus importiert? Welcher zelluläre Importrezeptor ist an der Translokation beteiligt? Wie interagiert dieser mit dem p10 Protein? Kann die topogene Sequenz des viralen Proteins identifiziert und charakterisiert werden? Diese Fragen sollten durch die Anwendung zellbiologischer und proteinbiochemischer Methoden beantwortet werden.

Eine weitere Eigenschaft des Bornavirus besteht in seiner Fähigkeit, *in vivo* und *in vitro* persistente Infektionen zu etablieren. Die Mechanismen dieser Persistenz sind unverstanden. Wie schafft es das Virus, sich der angeborenen Immunantwort des Wirtes, insbesondere dem Typ I IFN-System zu entziehen? BDV wurde als sensitiv für Typ I Interferon beschrieben. Die Induktion von IFN- β in BDV infizierten Zellen ist stark abgeschwächt. Gibt es demnach einen viralen IFN-Antagonisten? Inhibiert er bereits die initiale Aktivierung des IFN- β Promotors oder die parakrinen und autokrinen positiven Rückkopplungsmechanismen? Wie kann eine Antagonisierung auf molekularer Ebene erklärt werden? Durch zellbiologische, proteinbiochemische und virologische Experimente sollten Antworten auf diese Fragen gefunden werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmittel

Acrylamidlösung 30%	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
Ampicillin	Roche, Mannheim
Bacto-Agar	Becton-Dickenson, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
β-Glycerophosphat	Sigma, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
BioMax MR Film	Kodak
Bovines Albumin (BA) Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA) 30 %	PAA Laboratories, Linz
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Ciprofloxacin	MP Biomedicals, Eschwege
DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-oktan)	Sigma, Steinheim
D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco/ Invitrogen™, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Steinheim
DNA-Längenstandard Mass Ruler™	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-6 x loading buffer	Fermentas, St. Leon-Rot
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Steinheim
EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
EGTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 10 % (Methanol-frei)	Worthington, PA
Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Cambridge/U.K.
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glutamin (L-Gln)	MP Biomedicals, Eschweg
Glutahion-Sepharose	Amersham, Freiburg
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
G418-Sulfat Geneticin	PAA Laboratories, Linz
Hefeextrakt	Becton-Dickinson, Heidelberg
HEPES	Roth, Karlsruhe
IPTG (Isopropyl-β-Thiogalaktopyranidose)	Biomol, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
LipofectAMINE™2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe

MEM (Minimal Essential Medium)	Gibco/ Invitrogen™, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumvanadat	Sigma, Steinheim
Nitrocellulose Transfer-Membran (Protran)	Schleicher & Schuell
<i>n</i> -Octyl Glukosid	Calbiochem, Bad Soden
NP-40	Fluka, Heidelberg
OptiMEM	Gibco/ Invitrogen™, Karlsruhe
Oxoid-Agar	Oxoid
PD-10 Säule	Amersham, Freiburg
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Protein G-Agarose	Roche, Mannheim
Protein-Molekulargewichtsstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
Redivue L-[³⁵ S]Methionin	Amersham, Freiburg
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
SuperSignal WestDura Extended Duration Substrat	Pierce
TEMED	Serva, Heidelberg
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton-X100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin (TPCK-behandelt)	Sigma, Steinheim
Trypton	Difco, Heidelberg
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Universal Type I Interferon	PBL, Biomedical Laboratories
Zellkulturflaschen	TPP, Schweiz
Zellkulturschalen	Greiner, Solingen

2.1.2. Zelllinien

Oligodendrozyten	humane Zelllinie, bildet Myelinscheide
MDCKII Zellen	„Madin-Darby Canine Kidney“, Epithelzelllinie aus der Niere eines Hundes
293T Zellen	humane Nierenzelllinie
A549 Zellen	humane Epithelzelllinie aus einem Lungenkarzinom
BHK Zellen	„baby hamster kidney“, Epithelzelllinie aus der Niere eines Hamsters

Persistent BDV infizierte Zelllinien

BDV(RW98)-MDCKII-C3	generiert durch Ko-Kultivierung von MDCKII-C3 Zellen (enthalten stabil integriertes p125-Luc-neoR) mit BDV(RW98)-CRL Zellen (O. Planz, Bundesanstalt für Viruserkrankungen der Tiere, Tübingen)
BDV(H80)-293T	generiert durch Infektion von 293T Zellen mit BDV-H80 aus BDV(H80)-MDCKII-C3
BDV(H80)-Vero	epitheliale Nierenzelllinie aus der Grünen Meerkatze infiziert mit BDV-Stamm H80 (erhalten von P. Stacheli, Universität Freiburg)

2.1.3. Viren

Borna Disease Virus	siehe persistent infizierte Zellen
Influenza A/delNS1 Virus	erhalten von A. Egorov, Universität für Bodenkultur, Wien; (Garcia-Sastre et al., 1998)
Influenza B/delNS1 Virus	(Dauber et al., 2004)
VSV	erhalten von G. Pauli, RKI Berlin
Sendaivirus (Stamm Z)	erhalten von H.-D. Klenk, Institut für Virologie, Marburg

2.1.4. Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> , Stamm XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q ΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]
<i>Escherichia coli</i> , Stamm BL26	[F' <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i>]

2.1.5. Zellkulturmedien

MEM (Minimal Essential Medium)

<u>Ansatz für Zellkultur</u>	10 %	FKS
	2 mM	L-Glutamin
	50 µg/ml	Penicillin / Streptomycin
	10 µg/ml	Ciprofloxacin
<u>Ansatz für Transfektionen</u>	10 %	FKS
	2 mM	L-Glutamin
<u>Ansatz für Infektionen</u>	0,2 %	BSA
	2 mM	L-Glutamin

	50 µg/ml	Penicillin / Streptomycin
	10 µg/ml	Ciprofloxacin
<u>2 x MEM für Plaque-Overlay</u>	2 x	MEM
	0,4 %	BSA

D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Die Zusätze erfolgten in Analogie zum MEM-Medium.

2.1.6. Medien für Bakterien

Alle Nährmedien und Zusätze wurden autoklaviert bzw. bei Hitzeinstabilität sterilfiltriert.

LB-Medium	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	pH 7,2	
2 x YT-Medium	16 g/l	Trypton
	10 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	pH 7,2	
SOC- Medium	20 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	•	nach dem Autoklavieren Zugabe von
	20 mM	Mg ²⁺ -Stock
MgCl₂-Stock	1 M	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
	1 M	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	0,4 % (w/v)	Glukose

LB-Agar mit Ampicillin

LB-Medium
1,5 % (w/v) Bacto-Agar
 • Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50°C, Zugabe von Ampicillin 100 µg/µl
 Gießen des Mediums in Petrischalen

2.1.7. Plasmide

pCAGGS	(Hitoshi et al., 1991)
pcDNA3	Invitrogen
pcDNA3.1-myc/His A	Invitrogen
pGEX-5X-1	Pharmacia, Freiburg
p125-Luc (firefly)	erhalten von T. Fujita (Yoneyama et al., 1996)

p4x(PRD)I/III-Luc = pIRF3-luc	erhalten von S. Ludwig; (Ehrhardt et al., 2004)
pISRE-luc	Stratagene
pRL-TK-Luc (<i>Renilla</i>)	Promega
pGEX-p10	(Wolff et al., 2000)
pGEX-p10-(1-20)	"
pGEX-p10-(21-87)	"
pGEX-UL56c	(Giesen et al., 2000)
pRSET-hSRP1 α	erhalten von K.Weis (Weis et al., 1995)
pRSET-C-hSRP1 α 66-529 = pKW313	erhalten von K.Weis (Weis et al., 1996)
pcDNA-BDV-p10	(Wolff et al., 2000)
pcDNA-p10-myc	"
pcDNA3.1-BDV-M	kloniert von J. Reinhardt (Unterstab et al., 2005)
pcDNA3-BDV-N (nt 54–1166)	(Unterstab et al., 2005, Wolff et al., 2000)
pcDNA3-BDV-P	"
pEGFP-C1-hIRF3	erhalten von A. Garcia-Sastre (Basler et al., 2003)
pCAGGS-IRF3(HA)	erhalten von S. Jennings (Jennings et al., 2005)
pcDNA3-VP35	erhalten von E. Mühlberger (Basler et al., 2003)
pcDNA1-M27-flag	erhalten von H. Hengel (Zimmermann et al., 2005)
pcDNA3-TBK1-flag	erhalten von M. Nakanishi (Tojima et al., 2000)
pcDNA3-TBK1(KD)-flag	"
pcDNA3.1-TRIF	erhalten von X. Li (Jiang et al., 2004)

2.1.8. Oligonukleotide

Klonierprimer:

5' BDV-p24Xho 5' GCC TCG AGA TCA ATG GCA ACG CGA 3'
 3' BDV-p24 5' GCG CTC GAG TTA TGG TAT GAT GTC CCA C 3'

RT-PCR-Primer

5' hu-IFN 5' GGC CAT GAC CAA CAA GTG TCT CCT CC 3'
 3' hu-IFN 5' GCG CTC AGT TTC GGA GGT AAC CTG T 3'

5' β -Aktin 5' GAA GCA TTT GCG GTG GAC CAT 3'

3' β -Aktin 5' TCC TGT GCA TCC ACC AAA CT 3'

2.1.9. Enzyme

Pfu Turbo DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim
CIP (1 U/ μ l)	Fermentas, St. Leon-Rot
RNasin (40 U/ μ l)	Promega, Mannheim
<i>Eco</i> RI, <i>Xho</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.10. Kits

BigDye [®] Terminator 3.1 Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
FluoroLink TM Cy3 monofunctional reaction dye	Amersham Pharmacia, Freiburg
Humanes IFN- β ELISA Kit	Fujirebio Inc., Japan
QIAprep [®] Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAEXII Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN, Hilden
RNeasy [®]	QIAGEN, Hilden
TNT [®] Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Mannheim

2.1.11. Primäre Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Spezies/Eigenschaft	Verdünnung/ Endkonz.	
			IF	IB
α -Flag (M2)	Sigma	Maus, monoklonal		1 μ g/ml
α -HA	Upstate	Kaninchen, polyklonal		1 μ g/ml
α -myc (9E10)	Santa Cruz	Maus, monoklonal		1:100
α -BDV-M (M1)	W. Garten Marburg, (Kraus et al., 2001)	Kaninchenserum		1:2000
α -BDV-N (Bo18)	(Haas et al., 1986, Morales et al., 1988)	Maus, Hybridomaüber- stand		1:50
α -BDV-N (Bo18)	(Haas et al., 1986, Morales et al., 1988)	Maus, Hybridomaüber- stand		1:50
α -BDV-p10	(Wolff et al., 2000)	Kaninchenserum	1:400	
α -BDV-p10	(Wolff et al., 2002)	Ratte, polyklonal	1:400	
α -BDV-p10 (1G3)	O. Planz Tübingen	Maus, Hybridomaüber- stand		1:10

Bezeichnung	Hersteller	Spezies/Eigenschaft	Verdünnung/ Endkonz.	
			IF	IB
α -BDV-P (5846)	BioGenes*	Kaninchenserum	1:1000	1:1000
α -BDV-P (kfu2)	K. Kretschmar, (Ludwig et al., 1993)	Maus, monoklonal	1:100	
α -CBP (A-22)	Santa Cruz	Kaninchen, polyklonal		1:300
α -IRF3 (SL-12.1)	BD Pharmingen	Maus, monoklonal	1 μ g/ IP- Reaktion	
α -IRF3 (FL-425)	Santa Cruz	Kaninchen, polyklonal		1:1000
α -IRF3	Zymed	Kaninchen, polyklonal		1:1000
α -phospho-IRF3 (Ser396)	Upstate	Kaninchen, polyklonal		1:1000
α -karyopherin α 2(C-20)= Imp α 1	Santa Cruz	Ziege, polyklonal		1:400
α - Imp α 3	M. Köhler, Berlin (Kohler et al., 1997)	Kaninchen, Antiserum		1:2000
α - Imp α 5	M. Köhler, Berlin (Kohler et al., 1997)	Kaninchen, Antiserum		1:2000
α - Imp α 7	M. Köhler, Berlin (Kohler et al., 1999)	Kaninchen, Antiserum		1:2000
α -Tubulin (DM1A)	Sigma	Maus, Ascitesflüssigkeit		1:10000

*Immunisierung von Kaninchen mit aufgereinigtem GST-BDV-P Protein aus Bakterien.

2.1.12. Sekundäre Antikörper

Zielspezies	Modifizierung	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Kaninchen	Alexafluor 594 (rot)	Ziege	Molecular Probes	1:750 (IF)
Kaninchen	Alexafluor 488 (grün)	Ziege	Molecular Probes	1:750 (IF)
Kaninchen	Meerrettich- Peroxidase (HRP)	Schwein	DAKO	1:10 000 (IB)
Maus	Alexafluor 594 (rot)	Ziege	Molecular Probes	1:750 (IF)
Maus	Meerrettich- Peroxidase (HRP)	Schwein	DAKO	1:10 000 (IB)
Ratte	FITC	Ziege	Jackson Immunoresearch	1:100 (IF)
Ziege	Meerrettich- Peroxidase (HRP)	Kaninchen	DAKO	1:20 000 (IB)

2.1.13. Puffer und Lösungen

PBS	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
PBS⁺⁺/0,2 % BSA	PBS	
	0,2 %	BSA
	0,1 g/l	MgCl ₂
	0,13 g/l	CaCl ₂
20 % Sucrosekissen	20 mM	HEPES
	1 %	FKS
	20%	Sucrose (w/w)
10 x TBE-Puffer	0,89 M	Tris
	0,89 M	Borsäure
6 x DNA-Probenpuffer	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,1 % (w/v)	Xylencyanol
	30 %	Glycerol
	10 mM	EDTA, pH 8,0
2 x SDS-Probenpuffer	1,2 ml	H ₂ O
	8,3 ml	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	6 ml	10 % SDS (w/v)
	1,5 ml	Glycerin
	9 mg/ml	Bromphenolblau
	5 %	β-Mercaptoethanol
10 x SDS-Elektrophoresepuffer	Tris	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	10 g/l
Semidry-Blot Puffer	48 mM	Tris
	39 mM	Glycin
	1.3 mM	SDS
	20%	Methanol
10 x TBST	100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1,5 M	NaCl
	0,5%	Tween 20
Fixierlösung	30 %	Methanol
	10 %	Essigsäure

Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v)	Coomassie Brillant Blau R250
	10 %	Essigsäure
	45 %	Ethanol

Entfärbelösung	10 %	Methanol
	5 %	Essigsäure

Ko-IP Lysis Puffer	TBK/P	IRF3/CBP
Tris-HCl, pH 7,5	20 mM	20 mM
Nonidet P-40	0,2 %	1 %
NaCl	100 mM	150 mM
EDTA	1 mM	1 mM
Na-β-Glycerophosphat	10 mM	10 mM

• frisch dazugeben:	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	Pefablock

Die Bedingungen für die IRF3/CBP wurden stringenter gewählt, da diese Komplexe im Nukleus gebildet werden und daher der Aufschluss der Zellkerne gewährleistet sein musste.

Triton Lysis Puffer (Kinaseassays)	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	137 mM	NaCl
	10 %	Glycerol
	1 %	Triton X-100
	2 mM	EDTA
	50 mM	Na-β-Glycerophosphat
	<u>20 mM</u>	<u>Na-Pyrophosphat</u>

• frisch dazugeben:	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	Pefablock

Dieser Puffer wurde für die Herstellung der Lysate benutzt, die in den Kinase-Assays analysiert wurden.

HEPES-Lysispuffer	50 mM	HEPES, pH 8,0
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	10 %	Glycerol
	0,5 %	Nonidet P-40

Dieser Puffer hat sich als günstig erwiesen, um die Hyperphosphorylierung von IRF3 im SDS-Gel darzustellen.

Imp α-Bindungspuffer	50 mM	HEPES, pH 8,0
	0,05 %	Nonidet P-40
	0,1 %	BSA
	100 mM	NaCl

p10/Imp α Ko-IP Lysis Puffer

10 mM	HEPES pH 7,9
10 mM	KCl
0,1 mM	EDTA
0,1 mM	EGTA
1 mM	DTT
0,5 mM	Peflabloc

GST-Elutionspuffer

30 mM	Glutathion
100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
2 %	<i>n</i> -Octyl Glukosid

Transportpuffer (*in vitro* Transport-Assay)

2 mM	Mg-Acetat
20 mM	HEPES pH 7,3
110 mM	K-Acetat
1 mM	EGTA
5 mM	Na-Acetat
1 mM	DTT
1 %	BSA
10 %	Ziegenserum

Overlay-Medium für den Plaquetest

50 ml	2 x MEM
600 μ l	35% BSA
100 μ l	1% Dextran
1 ml	NaHCO ₃
1 μ g/ml	Trypsin (TPCK)
<u>25 ml</u>	<u>H₂O</u>

- Inkubation bei 37 °C

25 ml Oxoid-Agar (2 %)

- Aufkochen und bei 56 °C inkubieren
- Kurz vor Gebrauch werden 2 x MEM und Oxoid-Agar gemischt

Plaque-Färbelösung

0,1 %	Kristallviolett
10 %	Formaldehyd

Mowiol

2,4 g	Mowiol 4-88
6 ml	Glycerol
<u>6 ml</u>	<u>dH₂O</u>

- über Nacht quellen lassen

12 ml Tris (0,2 M), pH 8,5

- unter Rühren bei 50-60 °C lösen
- 15 min bei 4000 rpm zentrifugieren und den Überstand mit 10% (w/v) DABCO versetzen
- Aufbewahren der Aliquots bei -20°C

2.1.14. Geräte

ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Brutschränke	Nuaire/Zapf, Sarstedt
Elektrophorese-Zubehör	BioRad
ELISA-Reader Spectrafluor Plus	Tecan
Trans-Blot [®] , Semidry Transfer Cell	BioRad
Power Pac 200 bzw. 300	BioRad
FLA-2000 Fluorescent Image Analyzer mit Imaging-Platte BAS-MP	Fujifilm
Geltrockner Phero-Temp 40	BioTec Fischer
Luminometer LB96V	EG+G Berthold, Bad Wildbad
Personal Cycler	Biometra [®]
SONOPULS HD 70	Bandelin, Berlin

Zentrifugen:

Zentrifuge J2-21 (Rotoren JA-14 und JA-20)	BECKMAN [®]
Zentrifuge RC5C (Rotoren SS-34 und GSA)	Sorvall [®] Instruments
Ultrazentrifuge L8-70M (Rotor SW 28)	BECKMAN [®]
Biofuge pico	Heraeus
Labofuge 400R	Heraeus
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf

Mikroskope:

Immunfluoreszenz-Mikroskop Diaphot 300	Nikon, Düsseldorf
SPOT RT Digitalkamera	Diagnostic Instruments
Leica DM IL	Leica Microsystems, Wetzlar
Laser Scanning Mikroskop LSM 510	Zeiss, Oberkochen

Software:

Lasergene 6	Sequenzauswertung
SPOT 3.5.5 für Windows	Kameraprogramm
LSM 510	Zeiss, Oberkochen
Image Reader V1.5E FLA-2000/2000G	Fuji
Image Gauge V3.01	Fuji

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Kultivierung der unterschiedlichen Zelllinien erfolgte im Brutschrank in einer gesättigten H₂O-Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂. MDCKII Zellen (nicht infiziert und BDV infiziert) wurden in MEM-Kulturmedium kultiviert und alle weiteren Zelllinien in D-MEM. Dem Medium für MDCK-C3 Zellen wurde zusätzlich 0,75 mg/ml G418-Sulfat zugefügt, um den Verlust des p125-Luc-neoR Reportergens zu verhindern. Die

Kultivierung erfolgte in der Regel in T75 Flaschen, für Transfektions- bzw. Infektionsexperimente wurden Schalen benutzt.

T125 Flasche	1,6 x 10 ⁷ Zellen	15 ml Medium
T75 Flasche	1 x 10 ⁷ Zellen	10 ml Medium
10 cm Schale	1 x 10 ⁷ Zellen	10 ml Medium
60 mm Schale	3 x 10 ⁶ Zellen	3 ml Medium
35 mm Schale	1 x 10 ⁶ Zellen	1,5 ml Medium
6 Kalotten-Platte	1 x 10 ⁶ Zellen	1,5 ml Medium
12 Kalotten-Platte	5 x 10 ⁵ Zellen	1 ml Medium

2.2.1.1 Transfektion von Zellen

Die zu transfizierenden Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einem Verhältnis von 1:2 umgesetzt. Die Transfektion erfolgte durch den Einsatz kationischer Lipide mittels LipofectAMINE™ 2000 (LF2000). Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Transfektion von 5 x 10⁵ Zellen. Pro 1 µg DNA wurde 1,5 µl LF2000 in 125 µl OptiMEM aufgenommen, gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde in 25 µl OptiMEM aufgenommen und mit dem LF2000-Mix vereinigt, gemischt und 15 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen gewaschen, trypsiniert, pelletiert und in Transfektionsmedium (ohne Antibiotika) resuspendiert und in der gewünschten Dichte (meist 70% konfluent) ausgesät. Das Endvolumen pro Kavität sollte 0,5 ml nicht überschreiten. Der LF2000-DNA-Mix wurde tropfenweise dazu pipettiert und leicht geschwenkt. Die Zellen wurden anschließend 4-6 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bevor das Medium gegen Infektionsmedium ausgetauscht wurde.

2.2.1.2 Infektion von Zellen

Für die Infektion von Zellen mit Influenza A-Virus bzw. Sendaivirus zur Stimulierung des IFN-β Promotors wurden subkonfluente Zellen zuerst mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die vorbereitete Virusverdünnung in PBS⁺⁺ auf die Zellen pipettiert. Das Inokulum-Volumen wurde so gewählt, dass der Zellrasen mit möglichst wenig Flüssigkeit bedeckt war, aber nicht austrocknete. Die Verdünnung richtete sich nach der gewünschten MOI („multiplicity of infection“ = Anzahl der Viren pro Zelle). Die Zellen wurden 45 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und dabei gelegentlich geschwenkt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit Infektionsmedium (mit 0,2% BSA supplementiert) überschichtet. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.3 Etablierung persistenter BDV-Infektionen

Für die Etablierung der persistent BDV(H80) infizierten 293T Zelllinie wurde ein ca. 80 % konfluenten Zellrasen in einer 35 mm Schale mit 250 µl einer unverdünnten Viruspräparation (vgl. 2.2.1.4) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und dabei gelegentlich geschwenkt. Das Inokulat wurde anschließend entfernt und die Zellen in Kulturmedium kultiviert. Im Laufe der folgenden Tage wurden die Zellen schrittweise in größere Kulturflaschen überführt und expandiert. Mittels Immunfluoreszenz wurde der Fortschritt der Infektion überprüft. Nach ca. drei Wochen waren die Zellen durchinfiziert und wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Eine weitere Möglichkeit, eine persistente BDV-Infektion zu etablieren, besteht in der Kokultivierung infizierter und nicht infizierter Zellen. Dies setzt voraus, dass die neu infizierten Zellen selektioniert werden können. Für die Herstellung der Zelllinie BDV(RW98)-MDCK-C3 wurden BDV(RW98)-CRL Zellen mit MDCKII-C3 Zellen in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Aufgrund ihrer Neomycin-Resistenz konnten die MDCKII-C3 Zellen durch G418 (0,75 mg/ml im Medium) selektioniert werden. Das Antibiotikum wurde nach der ersten Zellpassage zugesetzt. Nach zehntägiger Kokultivierung waren alle BDV-CRL-Zellen abgestorben und die MDCKII-C3 Zellen waren zu 100 % durchinfiziert.

2.2.1.4 Viruspräparation

BDV-Präparation

BDV(H80)-MDCKII-C3 Zellen (acht T125 Flaschen) wurden nach Erreichen von ca. 80 % Konfluenz für drei Tage in MEM-Kulturmedium mit 1 % FKS kultiviert. Die Freisetzung der Viren erfolgte durch einen Salzschock, indem die Zellen für 1,5 h in 20 mM HEPES, 1 % FKS und 250 mM MgCl₂ inkubiert wurden. Die Überstände wurden abgenommen und durch Zentrifugation bei 4 °C mit 2500 x g für 5 min geklärt. Der virushaltige Überstand wurde vorsichtig auf 10 ml eines 20 %igen Sucrosekissens pipettiert. Durch Ultrazentrifugation für 90 min bei 25.000 rpm im SW28-Rotor wurden die Viren durch das Sucrosekissen pelletiert. Das Viruspellet wurde in 500 µl PBS⁺⁺ je Zentrifugenröhrchen aufgenommen und zum Lösen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Viruslösung wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert [siehe auch (Briese et al., 1992, Pleschka et al., 2001)].

VSV-Präparation

1×10^7 BHK-Zellen wurden mit VSV (MOI = 0,001) infiziert. Nach ca. 24 h war der zytopathische Effekt bereits deutlich sichtbar. Sofern alle Zellen tot waren, wurden die Überstände abgenommen, geklärt und in Aliquots bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Mittels Plaquetests auf MDCKII Zellen wurden die Virustiter bestimmt.

Sendai Z, Influenza Δ NS1 Virus

Diese Viren wurden in Bruteiern vermehrt und von B. Dauber und G. Heins (RKI) präpariert.

2.2.1.5 Plaquetest

Zunächst wurde von der zu titernden Viruslösung eine serielle 1:10 Verdünnungsreihe in PBS⁺⁺ hergestellt. Konfluente MDCKII Zellen, welche am Vortag in 6-Kalotten-Platten ausgesät wurden, wurden 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit 250 μl Virusverdünnung infiziert. Nach 45 min Inkubation wurde das Inokulat durch zweifaches Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden anschließend mit Überschichtungsmedium („Overlay“) bedeckt (ca. 3 ml pro Kalotte) und nach Erstarren des Agars bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Dabei sollte die Platte umgekehrt („über Kopf“) positioniert in den Brutschrank gestellt werden. Nach 3tägiger Inkubation wurden die Zellen durch mindestens 60 min Inkubation mit einer Kristallviolett/Formaldehydlösung fixiert und gefärbt. Nach dem Ausspülen des Agarpfropfes, konnten die Plaques im angefärbten Zellrasen ausgezählt werden und der Virustiter unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und des Volumens des Inokulums berechnet werden.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Klonierungen

Die Erzeugung der Expressionskonstrukte erfolgte nach Standard-Klonierungsprotokollen unter Zuhilfenahme entsprechender Kits.

pGEX-p10-Mutanten

Die p10 Di-Alaninaaustauschmutanten lagen bereits als pGilda-Expressionskonstrukte vor (Wolff et al., 2000) und wurden über *EcoRI* und *XhoI* in pGEX-5X-1 umklont.

pCAGGS-P = pCA-P

Ausgehend von dem Konstrukt pcDNA-P wurde die BDV-P cDNA mit den Primern 5' BDV-p24Xho und 3' BDV-p24 mittels PCR amplifiziert und zwischen die *XhoI*-Schnittstellen in pCAGGS ligiert. Alle Expressionsplasmide, die in Reporterexperimenten eingesetzt wurden, wurden mit dem QIAfilter „Endofree“ Plasmid Maxi Kit präpariert, um bakterielle Endotoxine zu entfernen.

2.2.2.2 RT-PCR

Für die Analyse von zellulären mRNA-Transkripten aus der Gesamt-RNA von Zellen wurde das „QIAGEN OneStep RT-PCR“ Kit verwendet. Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde das „RNeasy“ Kit benutzt.

<u>RT-PCR Ansatz:</u>		<u>Cycler Programm</u>		
5x Puffer	10 µl	50 °C	30 min	
dNTPs	2 µl	<u>95 °C</u>	<u>15 min</u>	
5' Primer (100 µM)	0,5 µl	95 °C	30 sec	} 25 Zyklen
3' Primer (100 µM)	0,5 µl	55 °C	30 sec	
Enzymmix	2 µl	<u>72 °C</u>	<u>45 sec</u>	
Template (1µg)	x µl	72 °C	7 min	
H ₂ O	ad 50 µl	4 °C	∞	

5 µl des RT-PCR Ansatzes wurden anschließend im Agarosegel analysiert.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die Expression der GST-Fusionsproteine wurden die pGEX-Konstrukte in *E.coli* BL 26 transformiert. 50 ml einer ÜN-Vorkultur wurden in 450 ml LB-Amp-Medium gegeben und nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) induziert. Die Kultur wurde drei Stunden geschüttelt, anschließend für 15 min bei 6000 x g und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml kaltem PBS aufgenommen. Je nach Expressionsstärke wurde ein Aliquot weiter verarbeitet und der Rest bei -20 °C gelagert. Gewöhnlich waren 1 - 2 ml Bakterien-suspension ausreichend. Diese wurde auf Eis stehend mittels Ultraschall aufgeschlossen (drei Pulse a 15 sec, 40 Watt), mit Triton versetzt (Enkonzentration 1 %) und 30 min bei 4 °C sanft rotiert. Nach 15 min Zentrifugation bei ca. 11 000 x g und 4 °C wurde der geklärte Überstand mit PBS auf 5 ml aufgefüllt und mit 150 µl einer gewaschenen

Glutathion-Sepharose Suspension (1:1 in PBS) für mindestens eine Stunde bei 4 °C sanft rotiert. Anschließend wurde die Matrix 3x gewaschen und konnte in die GST-Ko-Präzipitationsexperimente eingesetzt werden.

Für die Präparation der p10-Importsubstrate wurden 500 ml Bakterienkultur aufgearbeitet. Die Elution der Fusionsproteine von der Matrix erfolgte in drei Schritten durch Inkubation mit 1 Vol Elutionspuffer für je 5 min bei 37 °C. Die Überstände wurden gesammelt, vereinigt und ÜN bei 4 °C gegen 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,3) dialysiert, um nachfolgend mit Cy5 markiert zu werden.

2.2.3.2 Cy5-Markierung der GST-Fusionsproteine

Die Proteinkonzentration wurde zunächst mit 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,3) auf 1 mg/ml eingestellt. 1 mg Protein wurde für 30 min bei RT mit einer vom Hersteller (Amersham) portionierten Menge Cy5-Farbstoff im Dunkeln inkubiert und dabei alle 10 min geschwenkt. Die markierten Proteine wurden im Anschluss durch Gel-Chromatographie mittels einer PD-10 Säule gereinigt und einzelne Eluate gesammelt. Die Eluate, die die markierten Proteine enthielten, wurden ÜN gegen Transportpuffer dialysiert. Das *in vitro* Import-Assay wurde von Michael Kann (Universität Giessen) durchgeführt (Wolff et al., 2002).

2.2.3.3 *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translation wurde benutzt, um Proteine radioaktiv zu markieren. Dabei kam das „TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System“ zum Einsatz.

IVT-Ansatz:

Template 0,5 µg/µl (Expressionskonstrukt mit T7-Promotor)	2 µl
TNT® Kaninchen-Retikulozytenlysat	25 µl
TNT® Reaktionspuffer	2 µl
TNT® T7-Polymerase	1 µl
AS-Mix ohne Methionin, (jeweils 1 mM)	1 µl
[³⁵ S] Methionin (10 mCi/ml)	2 µl
RNasin (40 U/ µl)	1 µl
Nuklease freies H ₂ O	ad 50 µl

- Der Reaktionsansatz wird für 60 - 90 min bei 30 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 13 000 rpm (Tischzentrifuge) und 4°C geklärt.

2.2.3.4 GST-Ko-Präzipitationsexperiment

Je Bindungsansatz wurden 40 µl einer mit GST-Fusionsprotein gekoppelten Glutathion-Sepharose Suspension (1:1 in PBS) mit 20 µl IVT-Ansatz bzw. 1 µg gereinigtem Imp α in 1 ml „Imp α Bindungspuffer“ ÜN bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Matrix wurde anschließend durch Zentrifugation bei 3000 rpm (Tischzentrifuge) ankonzentriert und das Pellet mit dem Bindungspuffer gewaschen. Dieser Waschschrift wurde 3x wiederholt. Abschließend wurde die Matrix in SDS-Probenpuffer aufgeköcht und im SDS-Gel analysiert. Wurde radioaktiv gearbeitet, erfolgte eine Coomassie-Färbung des Geles mit anschließender Trocknung. Die radioaktiv markierten Proteine wurden durch Exposition eines Röntgenfilmes oder einer Imager-Platte detektiert. Für den Fall, dass mit gereinigtem Imp α gearbeitet wurde, wurde das Gel geblottet und nachfolgend im Immunoblot analysiert.

2.2.3.5 Herstellen von Zellysaten für Ko-IPs und Kinaseassays

In Abhängigkeit von der nachzuweisenden Interaktion bzw. Aktivität wurden unterschiedliche Lysispuffer benutzt, die unter 2.1.13 angegeben sind. Für die IRF3/CBP und TBK/P Ko-IPs bzw. für die Kinaseassays wurden die Zellen zunächst 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden Lysispuffer versetzt. Für eine 60 mm Schale wurden 300 µl, für eine 10 cm Schale 1 ml Lysispuffer eingesetzt. Die Zellen wurden 15 min auf Eis inkubiert, mit einem Zellschaber abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Nach 20 min Zentrifugation bei 13 000 rpm (Tischzentrifuge) und 4°C wurden die geklärten Überstände abgenommen, ein Aliquot als Input-Kontrolle abgenommen und anschließend für die Ko-IP Experimente verwendet. Lysate für die Kinaseassays wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Die Extraktion der zytoplasmatischen Proteine für die p10/Imp α Ko-IP erfolgte mit einem hypotonischen Puffer. Dazu wurden die Zellen einer 10 cm Schale in PBS mechanisch abgelöst und pelletiert. Das Pellet wurde in 500 µl Lysispuffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurde das Lysat zehn Mal mit einer 1 ml Spritze durch eine 26G 1'-Nadel hochgezogen. Nach zwei Zentrifugationsschritten (5 min, 5 000 rpm, 4°C und 15 min, 14 000 rpm, 4°C) wurde der geklärte Überstand in die Ko-IP eingesetzt.

2.2.3.6 Ko-Immunpräzipitation

Die Ko-IP erfolgte in der Regel in einem Volumen von 1 ml, auf das mit dem entsprechenden Lysispuffer aufgefüllt wurde. Für die p10/Imp α Ko-IP wurde die zytoplasmatische Proteinfraction so aufgefüllt, dass die Zusammensetzung schließlich dem Imp α -Bindungspuffer entsprach. Für die IP wurde das Lysat mit 1 μ g Antikörper ÜN bei 4 °C rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurde der IP-Ansatz mit 40 μ l eine Protein-G Agarose Suspension (1:1 in PBS) versetzt und für weitere 3 h bei 4 °C rotiert. Die Matrix wurde anschließend 3x mit Ko-IP Puffer gewaschen, pelletiert, in 20 μ l SDS-Probenpuffer aufgenommen, für die SDS-PAGE weiter verarbeitet und im Immunoblot analysiert.

2.2.3.7 Dephosphorylierung des ko-präzipitierten BDV-P Proteins

Für die Phosphatase-Behandlung war es wichtig, die Phosphatase-Inhibitoren aus dem Präzipitat zu entfernen. Daher erfolgte der letzte Waschschrift mit dem IP-Puffer, der keine Inhibitoren enthielt. Das Protein-G Agarose Pellet wurde mit 20 μ l 1x CIP-Puffer und 10 U (10 μ l) CIP versetzt. Der Ansatz wurde für 4 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Abschließend wurde die Matrix pelletiert, mit SDS-Probenpuffer versetzt und für die SDS-PAGE weiter verarbeitet und im Immunoblot analysiert.

2.2.3.8 Kinaseassays

Die Kinaseassays wurden in Zusammenarbeit mit Stephan Ludwig an der Universität Münster durchgeführt (siehe auch Unterstab et al., 2005).

2.2.3.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für die SDS-PAGE wurde das Mini-Protean3-System der Firma Roth verwendet. Entsprechend der jeweiligen Fragestellung wurden die Proteine in Gelen unterschiedlicher Prozentigkeit aufgetrennt.

Zusammensetzung der SDS-Gele	Trenngel			Sammelgel
	8 %	10 %	12,5 %	5 %
30% Acrylamid/Bis (29:1)	2,7 ml	3,3 ml	4,1 ml	0,83 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml			
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)				1,25 ml
H ₂ O	4,6 ml	4 ml	3,2 ml	
10 % SDS	100 μ l			50 μ l
10 % APS	100 μ l			50 μ l
TEMED	6 μ l			6 μ l

Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA pro Gel. Sollte das Gel mit Coomassie gefärbt werden, wurde es zunächst für ca. 20 min fixiert und anschließend bei RT in der Färbelösung inkubiert, bis die Proteinbanden ausreichend intensiv gefärbt waren. Anschließend wurde der Hintergrund des Gels entfärbt. Wenn das Gel geblottet werden sollte, wurde es zuvor kurz in Blot-Puffer äquilibriert.

2.2.3.10 Immunoblot

Der Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte durch das Semidry-Blotverfahren (BioRad-Apparatur). Die Membran und die Whatman-Papiere wurden in Semidry-Blotting Puffer äquilibriert. Danach wurde die Apparatur wie folgt aufgebaut: Anode, 3 x 3 mm Whatman-Papier, Nitrozellulose-Membran, Gel, 3 x 3 mm Whatman-Papier, Kathode. Die Proteine wurden für 55 min (dünne Gele) oder 72 min (dicke Gele) bei 75 mA pro Gel auf die Membran transferiert. Anschließend wurden die Proteine auf der Membran zur Kontrolle mit Ponceau-Rot gefärbt. Die Membranen wurden 1 h in 3 % Magermilchpulver in 1x TBST blockiert und anschließend mit 1x TBST gespült. Die Inkubation mit dem primären Antikörper in 0,5 % Magermilchpulver in 1x TBST erfolgte für 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C unter ständigem Schwenken. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST für je 10 min folgte die Inkubation mit dem sekundären Spezies-spezifischen Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper in 0,5 % Magermilchpulver in 1x TBST für 1 h bei RT. Die Verdünnungen der jeweiligen Antikörper sind in Kap. 2.1.11 und 2.1.12 angegeben. Nach sechs Waschschritten a 5 min wurde die Membran mit dem „SuperSignal WestDura Extended Duration Substrat“ für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion mittels Autoradiographie.

2.2.4 Reportergenexperimente

Die Reportergenexperimente wurden unter Zuhilfenahme des „Dual-Luciferase Reporter Assay Systems“ der Firma Promega durchgeführt. Die individuell transfizierten Mengen der Effektor- und Reporterplasmide sind dem Ergebnisteil zu entnehmen. Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl „passive lysis buffer“ pro Kavität (5 x 10⁵ Zellen) einer 12-Kalotten-Platte für 10 min bei RT inkubiert. Die lysierten Zellen wurden mechanisch abgelöst und bei 13 000 rpm (Tischzentrifuge), 4 °C zentrifugiert. 20 µl des geklärten Überstandes wurden für die Luziferase-Messung eingesetzt. Das Luminometer wurde so programmiert, dass zunächst 100 µl des Firefly-Substrates injiziert wurden und nach einer Verzögerung von 1,6 s die Lumineszenz über eine Zeitspanne von 10 s gemessen wurde. Anschließend wurden 100 µl der „Stop &

Glow“ Lösung injiziert und nach 1,6 s erfolgte die Messung der Renilla-Luziferaseaktivität für 10 s. Über die Aktivität der konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase wurde die Firefly-Luziferaseaktivität als Maß für die Promotorinduktion normalisiert. Jedes Experiment wurde in Doppelansätzen durchgeführt. Die angegebenen Standardabweichungen beruhen auf mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

2.2.5 IFN- β ELISA („Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay“)

In dieser Arbeit wurde ein ELISA Kit für humanes IFN- β verwendet, um die Menge des Zytokins im Überstand TBK1 exprimierender 293T Zellen zu quantifizieren. 5×10^5 Zellen wurden 6 h nach der Transfektion mit 500 μ l Infektionsmedium überschichtet. Nach 24 h wurde der Überstand abgenommen, durch Zentrifugation geklärt und 100 μ l unverdünnt in den Test eingesetzt. Dieser wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.6 Indirekte Immunfluoreszenz

Die auf Deckgläschen in Kulturschalen ausgesäten Zellen wurden zunächst mit 2,5 %iger Formaldehydlösung (Methanol frei) in PBS für 15 min fixiert und anschließend mit 0,2 %iger Triton-X-100-Lösung in PBS für 10 min permeabilisiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Der primäre Antikörper wurden in 3 % BA/PBS verdünnt. 20 μ l der Antikörperverdünnung wurden auf einem Stück Parafilm vorgelegt. Das Deckgläschen wurde mit der Zellbewachsenen Seite nach unten auf die Antikörperlösung gelegt und in einer feuchten Kammer 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper für 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde 3x mit PBS gewaschen und das Deckgläschen kurz in H₂O getaucht. Auf einem Objektträger wurden 7,5 μ l Mowiol-Lösung vorgelegt und das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten darauf gelegt. Die Präparate wurden bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Die so markierten Proteine wurden über konventionelle Fluoreszenzmikroskopie bzw. konfokale Mikroskopie sichtbar gemacht und fotografiert. Die Verdünnungen der Antikörper sind unter 2.1.11 und 2.1.12 aufgeführt.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Funktionen und Aktivitäten der Proteine p10 und P untersucht, die von der zweiten Transkriptionseinheit des Bornavirus exprimiert werden. Im ersten Teil sind die Arbeiten zur Identifizierung und Charakterisierung der Interaktion zwischen Importin α und dem BDV-p10 Protein dargestellt. Dabei wurde das ungewöhnliche NLS von p10 durch Mutationsanalyse detailliert untersucht und beschrieben. Teil zwei des Ergebnisteils dokumentiert die Identifizierung des P Proteins des Bornavirus als IFN-Antagonisten und beschreibt weiterführende Experimente, in denen der Mechanismus der Inhibition entschlüsselt wurde.

3.1 Analyse und Charakterisierung der Importin α /p10 Interaktion

3.1.1 Analyse des Kerntransportes des BDV-p10 Proteins

Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass das BDV-p10 Protein in Virus infizierten Zellen im Zytoplasma und im Zellkern in charakteristischen Foci lokalisiert. Dabei fällt die Kolo-kalisationierung mit dem viralen Phosphoprotein P auf (Abb. 3.1), welche mit der bereits beschriebenen Interaktion beider Proteine erklärt werden kann.

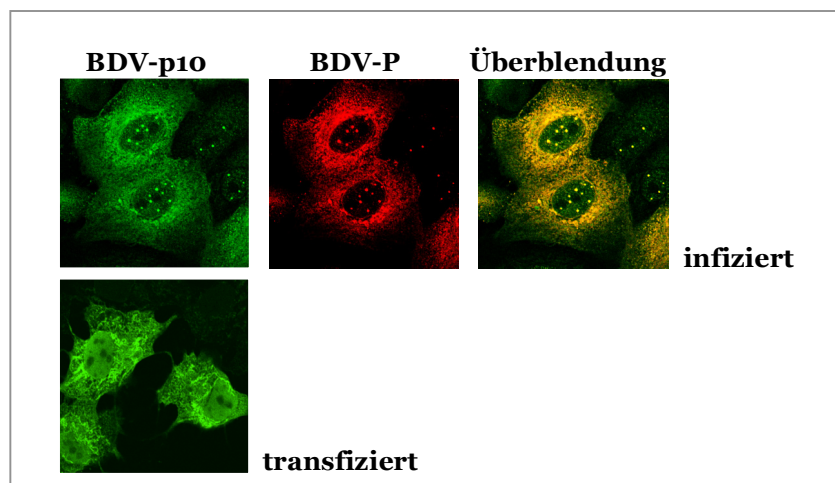


Abb. 3.1: Nachweis des BDV-p10 Proteins in infizierten und transfizierten Zellen mittels konfokaler Mikroskopie.

In persistent BDV infizierten Vero Zellen bzw. in pcDNA-p10 transfizierten Oligodendrozyten wurde das virale p10 Protein, und in infizierten Zellen zusätzlich das P Protein, mit jeweils spezifischen Antikörpern nachgewiesen (siehe Beschriftung). Der Nachweis der Kolo-kalisationierung beider Proteine in infizierten Zellen erfolgte durch Überblendung beider Kanäle.

Das Phosphoprotein besitzt ein NLS und daher wurde ursprünglich angenommen, dass p10 über einen „Huckepack-Mechanismus“ durch Bindung an P in den Zellkern gelangt. Das p10 lokalisierte jedoch nach transienter Expression im Kern von nicht infizierten Zellen (siehe Abb. 3.1). Die nukleäre Lokalisierung muss daher entweder Resultat eines passiven Diffusionsvorganges oder Ergebnis eines aktiven, energieabhängigen Transportprozesses unter Beteiligung zellulärer Importrezeptoren sein. Zu Beginn dieser Arbeit wurde daher in Zusammenarbeit mit Michael Kann (Universität Giessen) in einem *in vitro* Importassay untersucht, ob der Import des viralen p10 Proteins ein aktiver, Rezeptor vermittelter Prozess ist, obwohl in der p10 Sequenz kein klassisches basisches NLS erkennbar war. Die Abb. 3.2 und Abb. 3.3 zeigen die Ergebnisse dieser Studien. Die zu untersuchenden Kulturzellen werden dazu mit Digitonin permeabilisiert und anschließend gewaschen. Dadurch werden die zytoplasmatischen Bestandteile entfernt, die Zellkerne bleiben jedoch intakt. Durch Zugabe von Kaninchenretikulozytenlysat werden die zytoplasmatischen Bedingungen rekonstituiert. Gleichzeitig können das zu untersuchende Imports substrat, in diesem Fall ein GST-p10 Fusionsprotein, ATP als Energiequelle und auch spezifische Inhibitoren zugefügt werden, die Aufschluss über die Natur des Importprozesses geben. Der Reaktionsansatz wird für ca. 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen fixiert und ggf. permeabilisiert, wenn z.B. Antigene im Zellkern detektiert werden sollen.

Abb. 3.2 zeigt die Auswertung eines Importassays mittels konfokaler Mikroskopie. Zum Zweck der Detektion wurden die Imports substrate mit dem Fluorophor Cy3 markiert (obere Reihe). Um den Zellkern sichtbar zu machen, wurden Proteine des Kernporenkomplexes („Nuclear pore complex“, NPC) mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen (mittlere Reihe). In der unteren Reihe ist eine Überblendung beider Aufnahmen (sog. merge) zu sehen. Die ersten vier Spalten zeigen, dass rekombinantes GST-p10 Protein in Anwesenheit von zytosolischen Faktoren und ATP im Kern akkumuliert. Offensichtlich korreliert diese Fähigkeit mit dem Vorhandensein der ersten 20 Aminosäuren. Fehlen diese, findet kein Import von p10 statt. Eine GST-Kontrolle allein wurde nicht in den Kern importiert. Die vier Spalten auf der rechten Seite veranschaulichen, dass der Importprozess energie- und temperaturabhängig ist, zytosolische Faktoren benötigt und durch die Kernporen erfolgt, da Präinkubation der permeabilisierten Zellen mit Weizenkeimagglutinin („Wheat germ agglutinin“, WGA),

einem Lektin, zum Verstopfen der Kernporen führt und den p10 Import verhindert. Ein ungerichteter Diffusionsvorgang konnte somit ausgeschlossen werden.

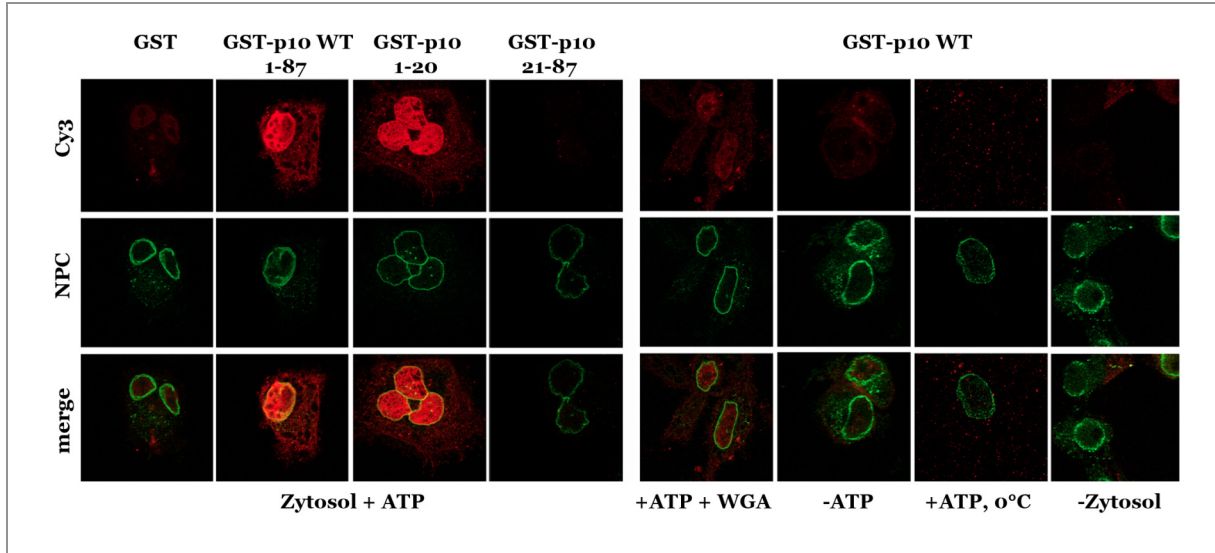


Abb. 3.2: Rekombinantes GST-p10 Protein wird in Digitonin permeabilisierten Zellen aktiv in den Kern importiert.

GST und GST-p10 Wildtyp bzw. trunkiertes GST-p10 wurden bakteriell exprimiert, gereinigt und mit Cy3 markiert. Digitonin permeabilisierte Zellen wurden mit den markierten Proteinen, zytosolischen Extrakten und ATP bei 37°C inkubiert (linke Spalten). Danach wurden die Zellen für die mikroskopische Analyse vorbereitet. NPCs wurden mit einem spezifischen Primärantikörper nachgewiesen, der Sekundärantikörper war mit FITC konjugiert. Der Import Cy3-markierter Proteine wurde mittels konfokaler Mikroskopie analysiert (obere Reihe), die NPCs identischer Zellen wurden parallel dazu detektiert (mittlere Reihe). Die Überblendung beider Kanäle zeigt die untere Reihe (merge). In Kontrollansätzen (rechte Spalten) wurde der Import nach Präinkubation der Zellen mit WGA, nach Inkubation bei 0°C oder in Abwesenheit zytoplasmatischer Faktoren bzw. ohne ATP überprüft.

Zellen verfügen über verschiedene Importrezeptoren, die jeweils nur Proteine mit spezifischen topogenen Sequenzen transportieren. Um den Importweg zu identifizieren, durch den p10 in den Kern transportiert wird, wurden kompetierende Peptide eingesetzt, die bekannte Rezeptoren saturieren können. Das gut charakterisierte SV40 T-Antigen enthält ein klassisches, oligobasisches NLS, das von Imp α gebunden wird. Abb. 3.3 zeigt, dass steigende Mengen eines nicht markierten Peptids, das von erwähntem NLS abgeleitet wurde, den Import eines markierten BSA-Tag-NLS-Konjugates kompetitiv inhibieren konnten (obere Reihe). Der Import von GST-p10 wird in Analogie dazu ähnlich negativ beeinflusst (untere Reihe). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der Kernimport des p10 Proteins ebenfalls Imp α abhängig ist. Als Kontrolle wurde u.a. das glycinreiche M9-

Peptid eingesetzt, das bekanntermaßen über Transportin (Imp β -Homolog) importiert wird und offensichtlich keine Inhibition des p10 Importes verursacht.

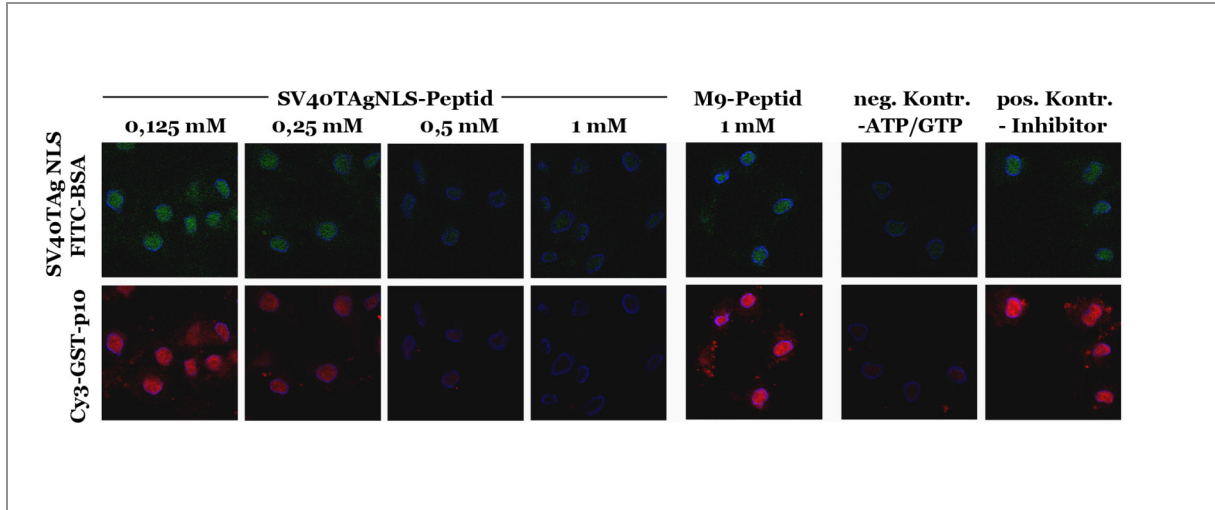


Abb. 3.3: Der Kernimport von GST-p10 wird durch ein Peptid, abgeleitet vom oligobasischen NLS des SV40 T-Antigens, inhibiert.

Digitonin permeabilisierte Zellen wurden mit Cy3-markiertem GST-p10 (gezeigt in rot) und mit einem FITC-markiertem Konjugat von BSA mit SV40TAg-NLS (grün) bei 37°C, in Anwesenheit zytosolischer Faktoren und ATP inkubiert. Für die Analyse einer kompetitiven Inhibition des Kernimportes wurde der Reaktion nicht markiertes SV40TAg-NLS in Konzentrationen zwischen 0,125 mM und 1 mM oder 1 mM M9 Peptid zugesetzt (siehe Beschriftung oben). Die Negativkontrolle erfolgte in Anwesenheit eines ATP/GTP verbrauchenden Systems. NPCs wurden mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper und einem Cy5-markierten Sekundärantikörper detektiert (blau). Die Analyse des Kernimports erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie. Die obere Reihe zeigt eine Überblendung der FITC und Cy5 Signale, die untere die Kombination der Cy3 und Cy5 Signale.

3.1.2 Die ersten 20 Aminosäuren des p10 Proteins sind für die Interaktion mit Importin α essentiell

Im *in vitro* Importassay wurde gezeigt, dass die ersten 20 AS des p10 Proteins seinen Import in den Zellkern vermitteln und dieser Vorgang höchstwahrscheinlich über den klassischen Imp α/β abhängigen Weg vermittelt wird (Abb. 3.2, 3.3). Um diesen Befund zu überprüfen wurde in einem GST-Ko-Präzipitationsassays getestet, ob das p10 Protein mit dem Imp α Importrezeptor interagieren kann. Dafür wurden p10 WT (AS 1-87), p10 (AS 1-20) und die N-terminal trunke Mutante p10 (AS 21-87) als GST-Fusionsproteine bakteriell exprimiert. Das Protein UL56c des humanen Cytomegalovirus (hCMV) diente als Positivkontrolle. Die Fusionsproteine wurden an einer Glutathion-Sepharose-Matrix immobilisiert und in einen Bindungsansatz mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv

markiertem Imp α 1 eingesetzt. Die an der Matrix gebildeten Komplexe wurden gereinigt und anschließend im SDS-Gel aufgetrennt.

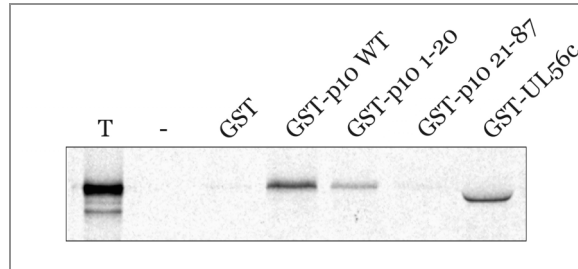


Abb. 3.4: Die ersten 20 AS von p10 vermitteln die Interaktion mit Imp α 1.

20 μ l *in vitro* Translationsreaktion für ^{35}S markiertes Imp α 1 wurden mit 20 μ l einer Glutathion-Sepharose-Matrix, beladen mit GST-Fusionsproteinen (siehe Beschriftung) bzw. GST als Negativkontrolle, inkubiert. Die gereinigten Präzipitate wurden in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Kopräzipitiertes Importin wurde durch Exposition eines Röntgenfilmes detektiert. Spur eins (T) repräsentiert 5 % des eingesetzten Importins pro Reaktion. Die übrigen Spuren entsprechen 10 % eines Bindungsansatzes.

Kopräzipitiertes Imp α wurde mittels Autoradiographie detektiert (Abb. 3.4). Es zeigte sich, dass sowohl der Wildtyp als auch die ersten 20 AS des p10 Proteins mit Imp α 1 interagieren. Dagegen bindet die N-terminal trunkeerte p10 Mutante nicht an Importin. Dieses Ergebnis untermauerte den Befund des *in vitro* Importassays, wonach die ersten 20 AS des p10 Proteins ein Kernlokalisierungssignal tragen. Interessanterweise weisen diese jedoch keine Homologie zu bereits bekannten NLS-Sequenzen auf. Im Folgenden stand daher die Charakterisierung der Rezeptor/Cargo-Interaktion im Mittelpunkt.

3.1.3 p10 interagiert *in vivo* mit Importin α

Die bisherigen Daten hatten gezeigt, dass p10 als karyophiles Protein in *in vitro* Bindungsstudien mit Imp α interagieren kann. Daher sollte folgend durch Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) untersucht werden, ob Imp α und p10 auch in Zellen miteinander wechselwirken. Zu diesem Zweck wurden humane Oligodendrozyten mit dem Expressionsplasmid pcDNA-p10-myc transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und eine Interaktion von p10-myc mit endogenem Imp α durch Ko-IP mit einem myc-spezifischen Antikörper analysiert. In Abb. 3.5 zeigt das untere Feld den Nachweis des transient exprimierten p10-myc in Zelllysaten transfizierter Zellen. In Kontroll-transfizierten Zellen wird das Protein erwartungsgemäß nicht exprimiert. Das

spezifischen monoklonalen Antikörper dar. Die isolierten Immunkomplexe wurden im Western Blot hinsichtlich der kopräzipitierten Proteine analysiert. Entsprechend der Fragestellung wurde dieser mit einem spezifischen Antikörper gegen die Importin Isoform $\alpha 1$ detektiert.

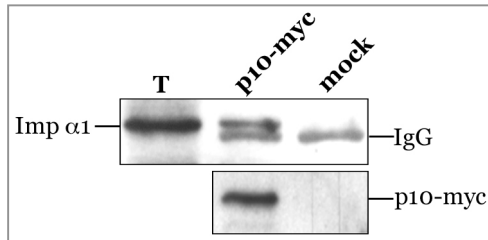


Abb. 3.5: Das p10 Protein interagiert in der Zelle mit Imp $\alpha 1$.

Oligodendrozyten (10^6) wurden mit 4 μg pcDNA-p10-myc bzw. Leervektor transfiziert. Die Präparation der zytoplasmatischen Extrakte erfolgte 24 h nach Transfektion. Für die Ko-IP wurde die Menge an Lysat eingesetzt, der 5×10^5 Zellen entsprachen, und mit 4 μg eines myc-spezifischen monoklonalen Antikörpers inkubiert. Die Immunkomplexe wurden nach Inkubation mit ProteinG-Agarose isoliert und anschließend im Western Blot analysiert. Dabei wurde im oberen Teil der Membran Imp $\alpha 1$ und im unteren Teil p10-myc nachgewiesen. Der Nachweis von Imp $\alpha 1$ im Zellysate ist in Spur eins (T) gezeigt.

Ein Imp $\alpha 1$ -spezifisches Signal wird außerdem in Spur zwei, nicht aber in Spur drei detektiert. Die Bande unterhalb des Imp α -Signals wird durch eine Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers mit der schweren Kette des eingesetzten Immunglobulins verursacht. Somit konnte gezeigt werden, dass das p10 Protein auch in Zellen mit Imp $\alpha 1$ einen Komplex bildet.

3.1.4 p10 bindet unabhängig von Importin β an Importin α

Der klassische Kernimport von karyophilen Proteinen verläuft unter Beteiligung von Imp β , das von dem hoch-konservierten, basischen N-Terminus von Imp α erkannt wird (Gorlich et al., 1996). Diese Imp α -Domäne wird daher auch als Imp β -Bindedomäne (IBB) bezeichnet und stellt gewissermaßen das NLS des Imp α s dar (Weis et al., 1996). Fehlt diese Domäne, findet keine Translokation des Carriers in den Nukleus statt. Die Bildung des Imp α/β -Heterodimers führt als Konsequenz zu einer erhöhten Affinität von Imp α für das NLS des zu importierenden Proteins und zur Kerntranslokation des ternären Komplexes. Das folgende GST-Ko-Präzipitationsassay wurde durchgeführt, um zu klären, ob für die Bindung des p10 Proteins an Imp α eine gleichzeitige Interaktion mit Imp β erforderlich ist. Ein GST-p10 Fusionsprotein wurde an eine Glutathion gekoppelten Sepharose-Matrix gebunden, gereinigt und zusammen mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv

markiertem Imp α inkubiert. Hierbei wurde sowohl der WT als auch eine N-terminal trunkierte Mutante ($\Delta 1-65$ oder ΔIBB) getestet, die nicht mehr in der Lage ist, Imp β zu binden.

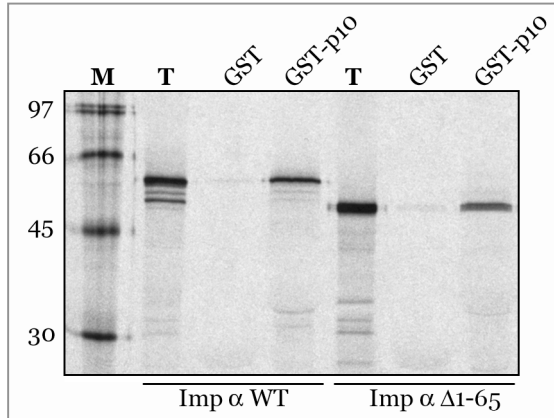


Abb. 3.6: Die Imp α /p10-Interaktion ist unabhängig von Imp β .

20 μ l *in vitro* Translationsreaktion für 35 S markiertes Imp α WT bzw. $\Delta 1-65$ wurden mit 20 μ l einer Glutathion-Sepharose-Matrix, beladen mit GST-p10 bzw. GST als Negativkontrolle, inkubiert. Die gereinigten Präzipitate wurden in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Kopräzipitiertes Importin wurde durch Exposition eines Röntgenfilmes detektiert. Spur zwei (T) repräsentiert 1 % des eingesetzten Importins pro Reaktion. Die übrigen Spuren entsprechen 10 % eines Bindungsansatzes.

Das Autoradiogramm in Abb. 3.6 zeigt, dass sowohl der Importin WT als auch die Mutante mit GST-p10 kopräzipitieren. Die Bildung des Imp α / β -Heterodimers ist somit keine Voraussetzung für die Interaktion von p10 und Imp α .

3.1.5 p10 bindet direkt an Importin α

Die bisher eingesetzten Methoden zur Untersuchung der Bindung von p10 an Imp α sind nicht geeignet, zwischen direkter und indirekter Interaktion zu diskriminieren. So kann z.B. in den bereits gezeigten Immunkomplexen aus Zellextrakt durchaus ein drittes Protein die Bindung von p10 an den Importrezeptor vermitteln. Gleiches gilt für die Ko-Präzipitationsexperimente, in denen *in vitro* translatiertes Imp α als Bindungspartner eingesetzt wird. Ein Bindungsassay mit gereinigtem Importin α sollte klären, ob die Interaktion direkter oder indirekter Natur ist. Zunächst wurde die Interaktion von p10 mit Importin $\alpha 1$ analysiert. Ein GST-p10 Fusionsprotein wurde wie zuvor beschrieben mit affinitätsgereinigtem Imp $\alpha 1$ inkubiert. Parallel dazu fungierte ein Bindungsansatz mit GST und Imp $\alpha 1$ als Negativkontrolle. Die gebildeten Komplexe wurden gereinigt und anschließend im Western Blot analysiert. Abb. 3.7 zeigt, dass Imp α von GST-p10, nicht jedoch von GST allein präzipitiert wurde. Es handelt sich also um eine direkte Interaktion.

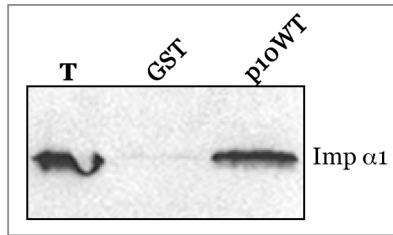


Abb. 3.7: GST-p10 bindet an gereinigtes Imp α .

1 μ g gereinigtes Imp α 1 wurde mit 20 μ l einer Glutathion-Sepharose-Matrix, beladen mit GST-p10 bzw. GST als Negativkontrolle, inkubiert. Die Präzipitate wurden gereinigt und die Hälfte des Bindungsansatzes in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Gebundenes Importin wurde im Western Blot mit einem Importin α 1-spezifischen Antikörper detektiert. In Spur eins sind ca. 12,5 % des in die Reaktion eingesetzten gereinigten Importins aufgetragen (T).

3.1.6 p10 bindet verschiedene Importin α -Isoformen

Der Begriff Importin α bezeichnet die Gesamtheit sechs verschiedener Isoformen (α 1, α 3- α 7), die sich hinsichtlich ihrer Importeffizienz für verschiedene Substrate unterscheiden (Kohler et al., 1999). Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, dass das Fehlen einer Isoform nicht in jedem Fall durch andere Isoformen kompensiert werden kann und insofern nicht nur eine Substratpräferenz, sondern auch eine -spezifität innerhalb der α -Importine möglich ist (Quensel et al., 2004). Die bisherigen Interaktionsstudien wurden ausschließlich mit der Isoform α 1 durchgeführt. Um eine mögliche Präferenz anderer Isoformen für das p10 Protein zu analysieren, wurden die gereinigten Importine α 3, α 5 und α 7 in separaten Ansätzen im GST-Ko-Präzipitationsassay getestet.

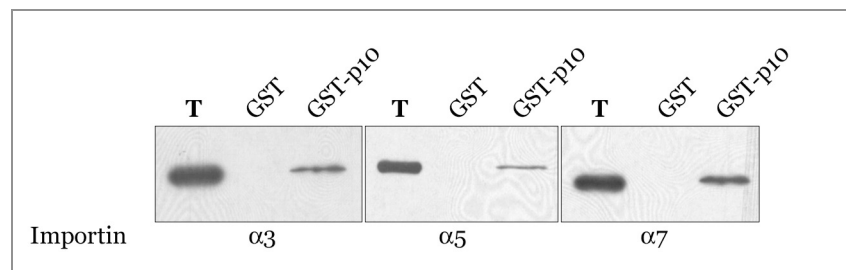


Abb. 3.8: GST-p10 interagiert mit verschiedenen gereinigten Importin α -Isoformen.

1 μ g gereinigtes Imp α 3, -5 bzw. -7 wurde mit 20 μ l einer Glutathion-Sepharose-Matrix, beladen mit GST-p10 bzw. GST als Negativkontrolle, inkubiert. Die Präzipitate wurden gereinigt und die Hälfte des Bindungsansatzes in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Gebundenes Importin wurde im Western Blot mit einem Isotyp-spezifischen Antikörper detektiert. In Spur eins sind ca. 25 % des in die Reaktion eingesetzten gereinigten Importins aufgetragen (T).

Der Western Blot (Abb. 3.8) demonstriert, dass alle untersuchten Isoformen in der Lage sind p10 zu binden, jedoch etwas weniger effizient als die Isoform α 1. In der obigen Abbildung entspricht die jeweils erste Spur (T) 250 ng gereinigten Importins, die Spuren zwei und drei repräsentieren die Hälfte der Präzipitate. Setzt man die spezifischen

Importin-Signale der jeweiligen Spuren eins und drei zueinander ins Verhältnis, kann man die Präzipitationseffizienz auf ca. fünf Prozent schätzen. Eine offensichtliche Präferenz des viralen Proteins für eine bestimmte Isoform kann aus diesem Experiment nicht abgeleitet werden.

3.1.7 Mutationsanalyse der N-terminalen p10 Domäne

Die Fähigkeit des BDV-p10 Proteins mit Importin α zu interagieren, führt in biologischer Konsequenz zum Kernimport des viralen Proteins. Für diesen Vorgang sind die ersten 20 Aminosäuren des Proteins essentiell. Jedoch ist innerhalb der N-terminalen Domäne kein klassisches NLS offensichtlich. Typischerweise zeichnen sich diese durch einen Bereich basischer Aminosäuren aus, dessen Konsensus-Sequenz mit „K(K/R)X(K/R)“ angegeben werden kann. Innerhalb der ersten 20 AS des p10 Proteins befinden sich in Positionen 14 und 15 Arginine, die unter Umständen Teil eines neuartigen NLS sein könnten. Zudem weiß man, dass auch benachbarte polare oder hydrophobe Aminosäuren Einfluss auf die Rezeptorbindung haben können. Aus diesem Grund wurden über einen Bereich von 16 AS, beginnend mit der Position vier, acht Di-Alanin-Austauschmutanten von GST-p10 hergestellt.

3.1.7.1 GST-Ko-Präzipitationsassays zur Analyse der Interaktion mutierter GST-p10 Fusionsproteine mit Importin $\alpha 1$

Die erwähnten Di-Alanin-Austauschmutanten wurden in einem GST-Ko-Präzipitationsassay auf ihre Fähigkeit getestet an Importin $\alpha 1$ zu binden. Die GST-p10 Fusionsproteine wurden mit *in vitro* translatiertem, ^{35}S markiertem Imp $\alpha 1$ inkubiert. Ein Aliquot des Präzipitates wurde in einem 10 %igen SDS-Gel analysiert. Abb. 3.9A zeigt die Ergebnisse der Mutationsanalyse in einem typischen Autoradiogramm, das kopräzipitiertes, radioaktiv markiertes Imp $\alpha 1$ nachweist. Spur eins (T) entspricht einem Aliquot des *in vitro* translatierten Imp $\alpha 1$ und Spur zwei zeigt GST als Negativkontrolle. Die Effizienz der jeweiligen Präzipitation wurde durch Autoradiographie quantifiziert. Wie bereits gezeigt, konnte GST-p10 WT den Importrezeptor auch in diesem Experiment effizient binden. Die Mutanten A4/5, A10/11 zeigten keine signifikant schlechtere Importin α -Bindung und GST-p10 A16/17 band immer noch moderat. Di-Alanin-Austausch-Mutationen in allen übrigen gezeigten Positionen führten dagegen zu einer stark

reduzierten Interaktion oder verhindern diese ganz. Die Coomassiefärbung des SDS-Gels (siehe Abb. 3.9B) diente als Kontrolle um sicherzustellen, dass alle Bindungsansätze gleiche Mengen GST-Fusionsprotein enthielten und unterschiedliche Mengen an kopräzipitiertem Importin tatsächlich auf veränderte Bindungsaffinitäten einzelner Mutanten zurückzuführen sind.

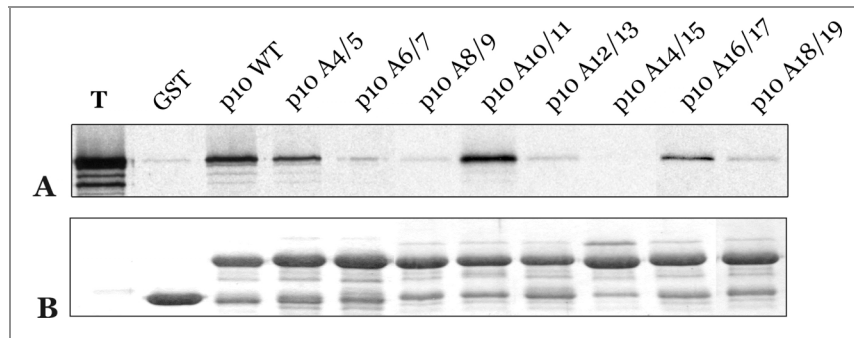


Abb. 3.9: GST-p10 Mutanten interagieren unterschiedlich effizient mit Importin α .

In einem 10 %igen SDS-Gel wurden etwa 10 % des Bindungsassays aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt und anschließend getrocknet. (A) Exposition eines Röntgenfilmes mit dem getrockneten Gel. Spur eins (T) repräsentiert 1 % des in die Bindungsreaktion eingesetzten radioaktiv markierten Importins. (B) Coomassiefärbung als Ladekontrolle. Die Banden repräsentieren GST bzw. die entsprechenden GST-Fusionsproteine.

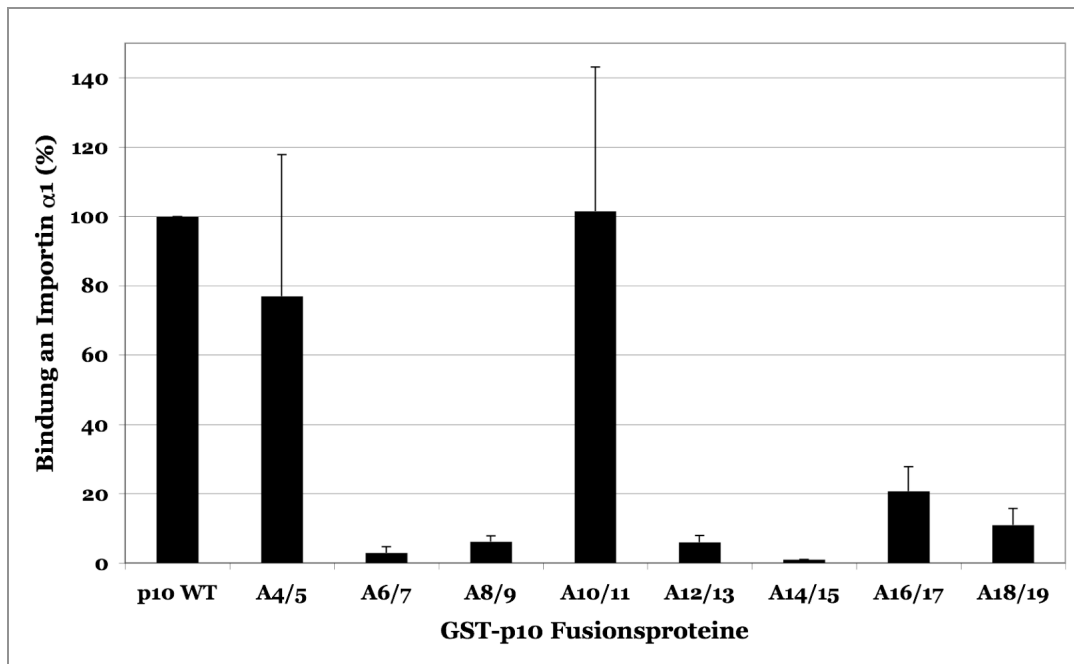


Abb. 3.10: Statistische Auswertung der GST-Ko-Präzipitationsassays.

Die Signalintensitäten aus drei unabhängigen Experimenten wurden mit einem Bioimaging System quantifiziert. Für jedes Experiment wurden die Werte aus der entsprechenden GST-Kontrolle als Hintergrund von den übrigen Messwerten subtrahiert. Die Signalintensitäten wurden als Prozent berechnet, wobei der Wert für den p10 Wildtyp als 100 % Präzipitation zugrunde gelegt wurde.

Abb. 3.10 fasst die statistische Auswertung drei unabhängiger Experimente mittels BioImager in einem Diagramm zusammen. Das Diagramm bestätigt die durch Abb. 3.9 gewonnene Erkenntnis, dass bestimmte Aminosäuren innerhalb der ersten 20 Aminosäuren essentiell für die Importin α -Bindung sind. Insbesondere Mutationen der Positionen 6/7, 8/9, 12/13, 14/15 und 18/19 vermindern die Interaktion mit Importin α bzw. verhindern diese ganz. Die kritischen Aminosäuren sind im Folgenden im Fettdruck dargestellt:

BDV p10 (6-19) **R L T L L E L V R R L N G N**

3.1.7.2 *In vitro* Importassay mit GST-p10 Mutanten

Die Ergebnisse der Bindungsstudien warfen die Frage auf, ob die Unfähigkeit einiger p10 Mutanten Importin α *in vitro* zu binden, auch mit einer veränderten Importaktivität korreliert. Mit Hilfe des eingangs erwähnten *in vitro* Transportassays wurde diese Annahme für den Wildtyp und die Mutanten A6/7 (keine Imp α -Bindung) und A10/11 (unveränderte Imp α -Bindung) geprüft. Die zu testenden p10 Proteine wurden hierfür als GST-Fusionsproteine exprimiert, gereinigt und kovalent mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert. Abb. 3.11 zeigt ein Kontrollgel, in dem nicht markierte und markierte Proteine nebeneinander aufgetrennt sind. Das heterogene, verlangsamte Laufverhalten der markierten Proben ist ein Indikator für die erfolgreiche Cy3-Kopplung.

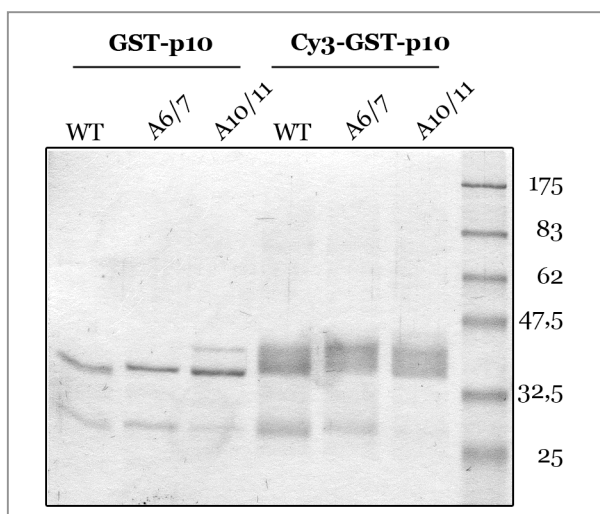


Abb. 3.11: Kontrolle der Cy3-markierten GST-p10 Fusionsproteine im SDS-Gel.

Die Eluate von gereinigten GST-p10 Fusionsproteinen (jeweils ca. 15 μ g) wurden vor und nach Cy3-Markierung in einem 10 %igen SDS-Gel analysiert, das mit Coomassie gefärbt wurde.

Im *in vitro* Transportassay wurde anschließend der Kernimport der markierten Proteine analysiert (siehe Abb. 3.12). Cy3-markierte GST-p10 Proteine wurden mit einem FITC-markierten BSA-M9-Konjugat gemischt und in das Assay eingesetzt. Das BSA-M9-Konjugat trägt ein NLS, das die Translokation unabhängig von Imp α über Transportin, einem Importin β ähnlichen Transportrezeptor, vermittelt. Es dient in diesem Experiment als interne Kontrolle.

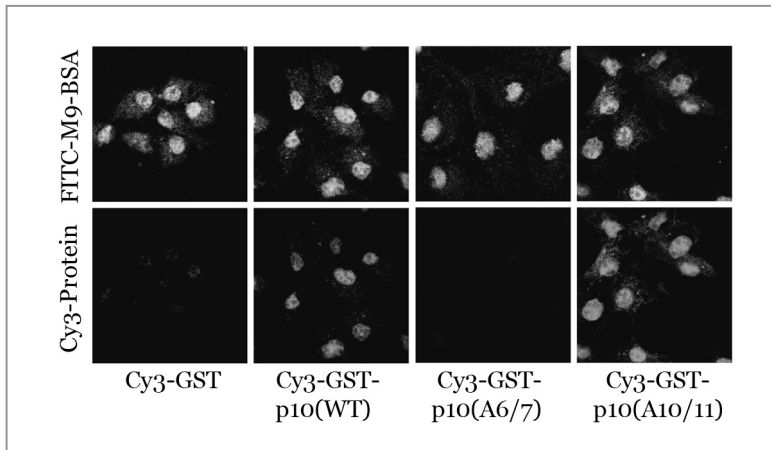


Abb. 3.12: *In vitro* Transportassay mit Cy3-markierten GST-p10 Mutanten.

Der Kernimport vergleichbarer Mengen Cy3-GST-Fusionsprotein und FITC-Kontrollpeptid in permeabilisierten Zellen wurde mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Die obere Reihe zeigt das FITC-markierte Kontrollpeptid, die untere die Cy3-markierten p10-Mutanten bzw. eine GST-Kontrolle.

In der unteren Reihe zeigen Cy3-spezifische Signale den Import des p10 Proteins in den Zellkern an. Dies ist erwartungsgemäß für den p10-WT der Fall. Außerdem wird auch die Mutante A10/11 importiert, die Mutante A6/7 jedoch nicht. Somit korreliert die Fähigkeit zur Importin α -Bindung mit der Translokation in den Zellkern. Ein Cy3-markiertes GST-Protein fungierte als Negativkontrolle. In der oberen Reihe ist die interne Kontrolle gezeigt. Das FITC-spezifische Signal des BSA-M9-Konjugates in allen vier Ansätzen bestätigte, dass die Bedingungen für einen Import in allen Assays korrekt eingestellt waren.

Der Kernimport des BDV-p10 Proteins verläuft über den klassischen Imp α/β abhängigen Weg, obwohl p10 ein NLS besitzt, das nicht dem Konsenssignal dieses Importweges entspricht. Mittels Mutationsanalyse wurden die Aminosäuren identifiziert, welche für die Interaktion mit Imp α kritisch sind. Diese Daten wurde in der Arbeit von Wolff et al. (2002) publiziert. Des Weiteren werfen diese Resultate die interessante Frage nach der Erkennung von p10 durch die zelluläre Importmaschinerie auf.

3.2 Das P Protein des Bornavirus ist ein Typ I Interferon-Antagonist

Das Borna Disease Virus etabliert sowohl in Zellkultur als auch in einer Reihe warmblütiger Tiere persistente Infektionen. Somit muss es in der Lage sein, das Immunsystem seines Wirtes zu unterwandern bzw. diesem entgegenzuwirken. Die Liste von viralen Mechanismen der Wirtsabwehr zu entkommen ist lang und reicht von der Infektion immunprivilegiertes Körperbereiche, langsamer Replikation bzw. Expression viraler Gene auf niedrigem Niveau, über Inhibition der Antigenpräsentation bis hin zur Antagonisierung von Zytokinen mit antiviraler Aktivität. Das Typ I IFN-System (IFN- α und - β) wird bereits kurz nach einer Virusinfektion induziert und gilt als äußerst wirksam. Dabei ist das Erkennen bestimmter Virusproteine, doppelsträngiger RNA, die als Intermediat bei der viralen Transkription entsteht, oder bislang unbekannter Strukturen der Auslöser für die Induktion von IFN. Dieses wird sezerniert und aktiviert über die Bindung an seinen Rezeptor (IFNAR) eine Signalkaskade, die die Expression von Proteinen induziert, die zur Etablierung eines antiviralen Status in den Zellen führen können. Viele Viren sind entweder in der Lage, die IFN induzierte Signaltransduktion zu inhibieren oder die Interferon Induktion per se zu antagonisieren. Für das Bornavirus wurde bereits gezeigt, dass es IFN sensitiv ist (von Rheinbaben et al., 1985) und dass eine BDV-Infektion eine nur schwache Typ I IFN-Induktion bewirkt (Shankar et al., 1992, von Sprockhoff et al., 1975). Auf der Grundlage dieser Befunde sollte der Frage nachgegangen werden, ob das Bornavirus für ein Protein kodiert, das in der Lage ist IFN zu antagonisieren.

3.2.1 Das BDV-P Protein inhibiert Virus induzierte IFN- β Promotoraktivierung

Ausgangspunkt für die weiteren Arbeiten war ein „Screening“ einzelner viraler Genprodukte hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Induktion des IFN- β Promotors zu antagonisieren. Zu diesem Zweck wurden zunächst Transfektionsexperimente mit dem Reportergenkonstrukt p125-luc durchgeführt, in denen die Expression der Luziferase des Glühwürmchens (Firefly, *photinus pyralis*) vom IFN- β Promotor kontrolliert wird. Die Messung der Luziferaseaktivität erlaubt daher Aussagen über die Aktivierung des IFN- β Promotors. Die Stimulierung des Promotors erfolgte durch Infektion der Zellen mit der Influenza A-Virusmutante Δ NS1, die eine Deletion im NS1-Leserahmen aufweist. NS1

wurde als Interferon-Antagonist beschrieben und demzufolge ist das Δ NS1-Influenzavirus ein starker Interferoninduktor (Wang et al., 2000). Abb. 3.13 zeigt eine schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes.

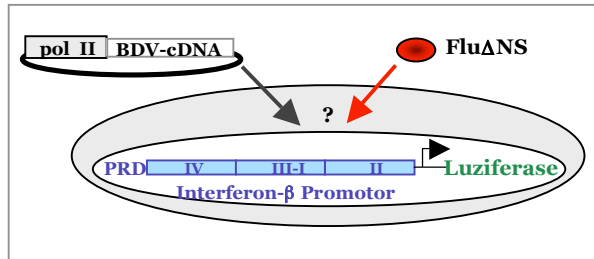


Abb. 3.13: Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes zur Analyse der IFN- β Promotoraktivierung durch eine Virusinfektion.

24 h vor Infektion wurden die Zellen mit unterschiedlichen Expressionsplasmiden, die für die einzelnen Proteine des Bornavirus kodieren, zusammen mit dem IFN- β Reporterkonstrukt transfiziert. Das als Interferonantagonist beschriebene Phosphoprotein des Ebolavirus, VP35, diente als Positivkontrolle (Basler et al., 2000). Für eine spätere Normalisierung der Reportergerätenaktivitäten wurde parallel dazu ein Konstrukt (pRL-TK-luc) für die konstitutive Expression der Luziferase des Korallentieres (*renilla reniformis*) kotransfiziert. Acht Stunden nach Infektion wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität gemessen. Um zu gewährleisten, dass die unterschiedlichen gemessenen Enzymaktivitäten tatsächlich unterschiedliche IFN- β Promotoraktivierungen widerspiegeln und nicht auf variable Transfektionseffizienzen zurückzuführen sind, erfolgte eine Normalisierung mit Hilfe der gemessenen konstitutiven Renilla-Luziferaseaktivität.

Abb. 3.14 zeigt, dass die Expression des Phosphoproteins P des Bornavirus die Δ NS1 induzierte IFN- β Promotoraktivierung signifikant auf ca. 40 % reduzierte. Das Nukleoprotein N, das p10 Protein und das Matrixprotein M ließen kein inhibitorisches Potenzial erkennen. In der Positivkontrolle bewirkte die Expression des Ebola VP35 Proteins eine Reduktion der Promotoraktivierung auf 20 %. Die prozentualen Angaben spiegeln eine mindestens 15fache Reportergerätenaktivierung wider.

Die Fähigkeit des P Proteins, die Aktivierung des IFN-Promotors als Reaktion auf eine Virusinfektion zu antagonisieren, wurde in einer weiteren Zelllinie reproduziert. Dafür wurden humane 293T Zellen in gleicher Weise im IFN-Reportergerätenassay getestet.

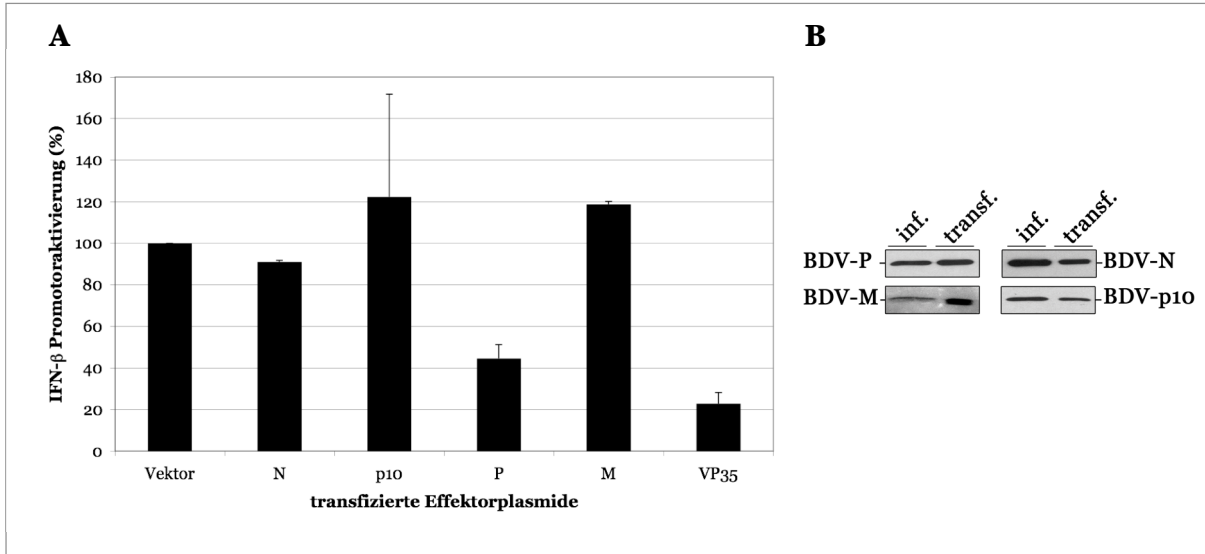


Abb. 3.14: Einfluss verschiedener BDV-Proteine auf die IFN- β Promotoraktivierung durch Influenza Δ NS1-Infektion im Reporterassay in MDCKII Zellen.

(A) MDCKII Zellen ($5 \cdot 10^5$) wurden mit 50 ng p125-luc und 5 ng pRL-TK-luc Reporterplasmid zusammen mit jeweils 2 μ g Effektorplasmid für die Expression der viralen Genprodukte (wie im Diagramm gekennzeichnet) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit dem Influenza Δ NS1-Virus infiziert (MOI=1), bzw. für den Referenzwert scheinbehandelt. 8 h p.i. wurden die Zellen lysiert und die Firefly-Luziferaseaktivität als Maß für die IFN- β Promotorinduktion gemessen. Das Verhältnis der Messwerte aus Kontrollzellen und Virus infizierten Zellen wurde bestimmt und prozentual angegeben, wobei Promotoraktivierung in Vektor transfizierten Zellen als 100 % gesetzt wurde. Die Messwerte wurden durch Einbeziehung der Renilla-Luziferaseaktivität hinsichtlich der Transfektionseffizienz normalisiert. Die Experimente wurden in Doppelansätzen durchgeführt und die Standardabweichung wurde aus zwei unabhängigen Experimenten ermittelt. (B) Kontrollblot zum Nachweis der Expression der viralen Proteine in den transfizierten Zellen. Als Vergleich sind Lysate BDV infizierter Zellen aufgetragen.

Das in Abb. 3.15 gezeigte Diagramm bestätigt das Ergebnis des vorherigen Experimentes. In 293T Zellen, die das P Protein exprimierten, war die Virus induzierte IFN- β Promotoraktivierung verglichen zu Vektor transfizierten Zellen auf 20 % reduziert.

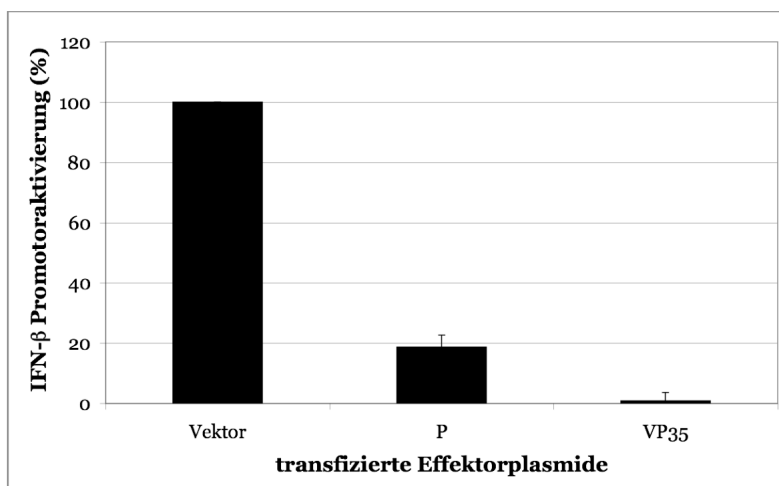


Abb. 3.15: BDV-P inhibiert Influenza Δ NS1-Virus induzierte IFN- β Promotoraktivierung in 293T Zellen.

293T Zellen ($5 \cdot 10^5$) wurden wie in Abb. 3.14 beschrieben transfiziert und infiziert. 8 h p.i. wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt.

Im folgenden Experiment wurde geprüft, ob das BDV-P Protein die IFN- β Promotoraktivierung auch nach Infektion mit einem weiteren Virus supprimieren kann. Hierfür wurde das Sendaivirus (SeV) verwendet, das zur Familie der *Paramyxoviridae* gehört und als starker IFN-Induktor gilt. 293T Zellen wurden wie beschrieben transfiziert und am nächsten Tag mit SeV infiziert. 16 h nach Infektion wurde die Luziferaseaktivität gemessen.

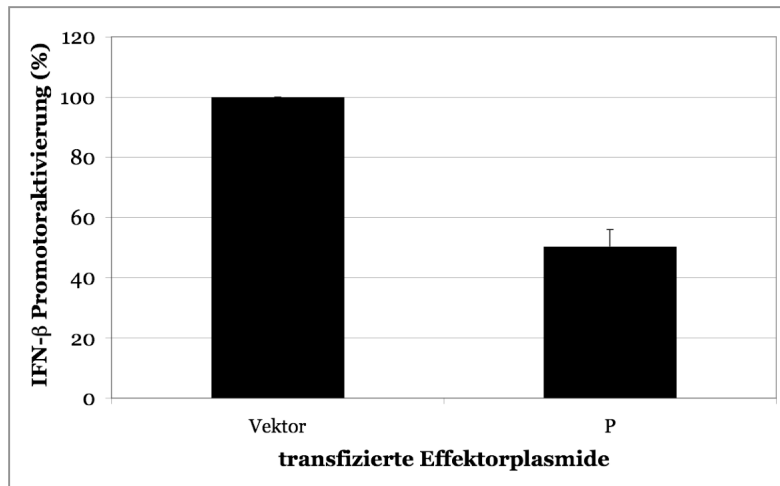


Abb. 3.16: BDV-P inhibiert Sendaivirus induzierte IFN- β Promotoraktivierung in 293T Zellen.

293T Zellen ($5 \cdot 10^5$) wurden standardmäßig transfiziert und 24 h später mit 160 Hämagglutinationseinheiten (HAU) SeV infiziert. 16 h p.i. wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt.

Die Auswertung der Reporterogenaktivitäten zeigt, dass P auch SeV induzierte IFN- β Induktion inhibiert. Die hier gezeigten Angaben für die Promotoraktivierung in Prozent repräsentieren eine rund siebenfache Steigerung der Luziferaseaktivität nach SeV-Infektion.

3.2.2 Das BDV-P Protein inhibiert Virus induzierte Aktivierung von IRF3

Der IFN- β Promotor ist komplex und besitzt Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren AP1, NF- κ B und IRF3. Binden diese an die entsprechenden PRDs („positive regulatory domains“), wird die Transkription des IFN- β Gens initiiert. Die bisherigen Experimente wiesen darauf hin, dass die Bildung eines aktiven Transkriptionskomplexes in Anwesenheit von P ausbleibt bzw. stark eingeschränkt ist und, relativ zu Kontrollansätzen, eine geringere Reporterogenaktivität gemessen wird. Daher stellte sich die Frage, ob ein inhibitorischer Effekt von P auf die Aktivierung der regulatorischen Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden kann. Der Aktivierung von IRF3 kommt bei der IFN-Induktion eine essentielle Bedeutung zu (Sato et al., 2000) und so verwundert es nicht, dass dieser Transkriptionsfaktor als Angriffspunkt für diverse virale IFN-Antagonisten beschrieben

wurde. Um zu testen, ob auch das P Protein mit der IRF3-Aktivierung interferiert, wurde zunächst ein Reporterassay mit dem Konstrukt pIRF3-luc durchgeführt, das einen artifiziellen Promotor mit vier Kopien der IRF3 bindenden PRDI/III Sequenz enthält, die vom IFN- β Promotor abgeleitet wurde (Ehrhardt et al., 2004). Das Experiment wurde wie zuvor beschrieben in MDCKII Zellen durchgeführt. Die Stimulierung des Promotors erfolgte durch Influenza Δ NS1-Infektion.

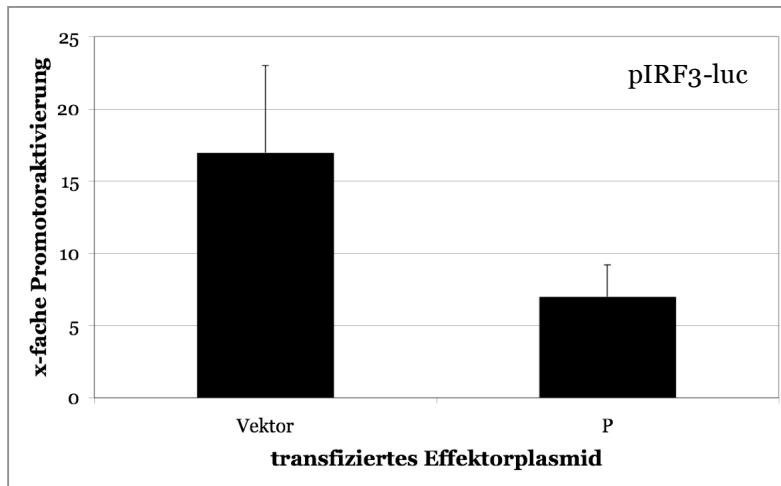


Abb. 3.17: BDV-P inhibiert die Aktivierung eines IRF3 responsiven Promotors in MDCKII Zellen durch Influenza Δ NS1 Virus Infektion.

MDCKII-Zellen ($5 \cdot 10^5$) wurden mit 25 ng pIRF3-luc und 5 ng pRL-TK-luc sowie 2 μ g Effektorplasmid transfiziert. 24 h später wurde mit Influenza Δ NS1 infiziert (MOI=1) und 8 h p.i. wurde die Reporteraktivität in den Lysaten bestimmt.

Das Ergebnis dieses Experimentes (Abb. 3.17) zeigt, dass Expression des BDV-P Proteins auch die Induktion eines artifiziellen IRF3 responsiven Promotors inhibiert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Inhibition und die verringerte IFN- β Promotorinduktion in Anwesenheit des P Proteins Resultate desselben P vermittelten Inhibitionsmechanismus sind.

3.2.3 Eine BDV-Infektion führt nicht zur Aktivierung von IRF3

In den bisher durchgeführten Experimenten wurde solitär exprimiertes P als Inhibitor der IRF3-Aktivierung charakterisiert. Diese Fähigkeit des viralen Proteins wurde auch im Kontext einer Virusinfektion untersucht. Eine einfache Methode, aktiviertes IRF3 zu detektieren, ist die Immunhistologie bzw. -fluoreszenz. Bei diesem Nachweis wird die subzelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktors bestimmt. Eine nukleäre Akkumulation weist auf aktiviertes IRF3 hin, während zytoplasmatisches IRF3 in jedem Fall inaktiv ist. Im folgenden Experiment wurden in Gehirnschnitten akut infizierter Ratten virales Antigen und IRF3 in denselben Zellen mittels Immunhistologie nachgewiesen. Außerdem

wurden persistent BDV infizierte MDCKII Zellen mit einem Expressionsplasmid für ein GFP-IRF3 Fusionsprotein transfiziert. Dies war nötig, weil endogenes IRF3 mit den derzeit verfügbaren Antikörpern nicht ausreichend gut detektiert werden kann. Abb. 3.18 zeigt, dass IRF3 in Virus infizierten Zellen im Zytoplasma verbleibt, d.h. nicht aktiviert ist. Die Aufnahmen in der oberen Tafel A wurden von unserem Kooperationspartner O. Planz (Friedrich-Loeffler-Institut, Tübingen) zur Verfügung gestellt. Sie zeigen den Nachweis viraler Antigene und IRF3 in zwei Serienschritten in Zellen des Cortex einer BDV infizierten Ratte mittels Immunhistochemie. Zwei Virus infizierte Zellen sind mit Pfeilen markiert. Der Nachweis des Nukleoproteins ist im rechten Feld gezeigt, links ist IRF3 im Zytoplasma zu erkennen. Die Pfeilspitze zeigt zum Vergleich eine nicht infizierte Zelle, in der IRF3 in vergleichbarer Weise wie in infizierten Zellen im Zytoplasma lokalisiert ist. In der Immunfluoreszenzanalyse von Kulturzellen (Tafel B) ist IRF3 in grün und das BDV-P in rot dargestellt. Sowohl in BDV infizierten als auch in nicht infizierten Zellen verbleibt GFP-IRF3 im Zytoplasma. Eine Positivkontrolle zeigt die Akkumulation von GFP-IRF3 nach Influenza B ANS1-Infektion im Zellkern. Eine BDV-Infektion, sowohl akut als auch persistent, führt demnach nicht zur Aktivierung von IRF3.

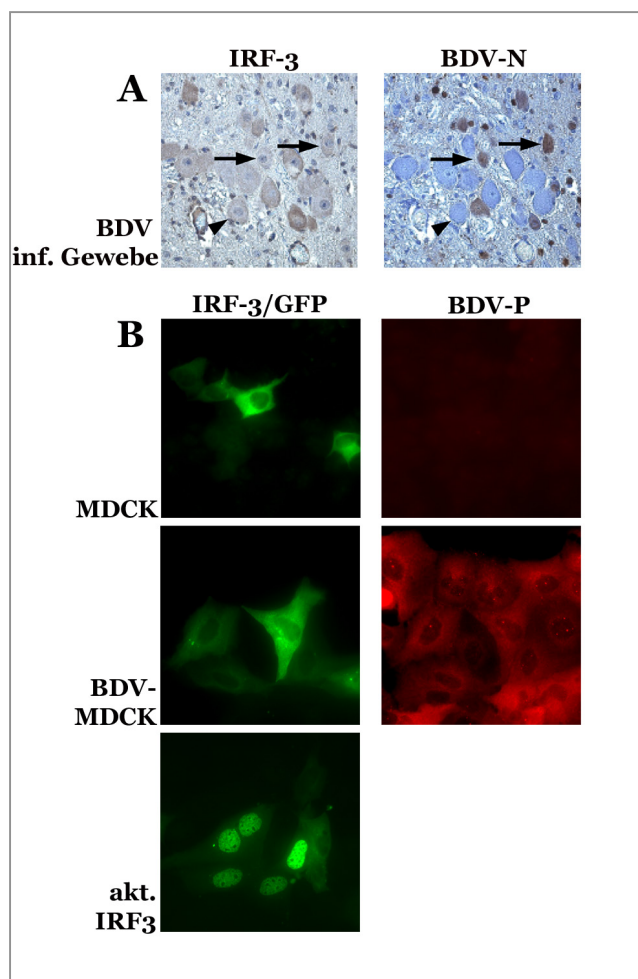


Abb. 3.18: Eine BDV-Infektion *in vivo* und *in vitro* aktiviert IRF3 nicht.

Detektion von IRF3 in infizierten Zellen. (A) In Serienschritten aus dem Gehirn einer experimentell infizierten Lewis Ratte (18 Tage nach Infektion) wurden IRF3 und BDV-N unter Verwendung spezifischer Antikörper detektiert. Außerdem wurden die Präparate mit Hematoxylin-Eosin gegengefärbt (40fache Vergrößerung). Diese Aufnahmen wurden von O. Planz zur Verfügung gestellt. (B) Die zelluläre Lokalisierung von transfiziertem GFP-IRF3 wurde in nicht infizierten bzw. BDV infizierten MDCKII Zellen analysiert. Die Detektion des P Proteins erfolgte mit einem spezifischen Antiserum als Nachweis der Virusinfektion. Als Kontrolle ist aktiviertes IRF3 in MDCKII Zellen gezeigt, die mit Influenza B ANS1-Virus infiziert wurden (400fache Vergrößerung).

3.2.4 Analyse des Mechanismus der BDV-P vermittelten IRF3-Aktivierung

Die IRF3-Aktivierung ist ein mehrstufiger Prozess. Die Phosphorylierung inaktiver IRF3-Monomere im Zytoplasma führt zur Bildung von Homodimeren, welche in den Zellkern translozieren. Hier wird das koaktivierende CBP Protein gebunden und ein transkriptionsaktiver Holokomplex entsteht. Abb. 3.19 stellt die einzelnen Schritte schematisch dar.

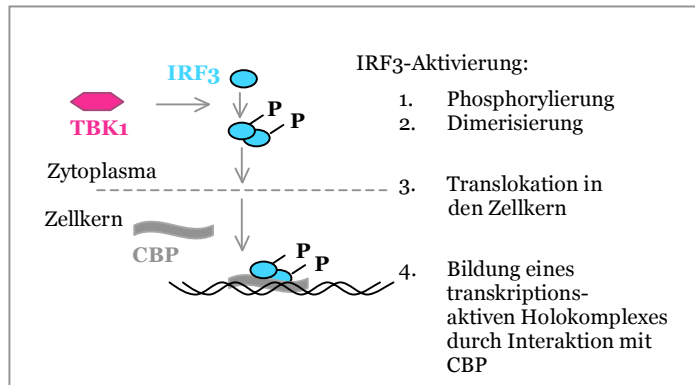


Abb. 3.19: Schematische Darstellung der IRF3-Aktivierung.

Die Inhibition der IRF3-Aktivierung durch das BDV-P Protein kann demnach unterschiedliche Ursachen haben. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, auf welcher Stufe das P Protein die zellulären Signalwege negativ beeinflusst.

3.2.4.1 P inhibiert TRIF induzierte IFN- β Promotoraktivierung

In der Einleitung (1.2.2.1) wurde ein Überblick über den Signalweg gegeben, der das Typ I IFN-System aktiviert. Erst kürzlich wurden die I κ B-Kinasen (IKK) TBK1 („TANK binding kinase 1“) und IKK ϵ als IRF3-Kinasen beschrieben (Fitzgerald et al., 2003, Sharma et al., 2003). Während TBK1 konstitutiv exprimiert wird und für die initiale IFN-Induktion von größter Bedeutung ist, wird IKK ϵ erst durch IFN induziert. Zunächst stellte sich die Frage, ob das P Protein die Aktivierung von IRF3 durch TBK1 inhibiert. Um TBK1 abhängige Prozesse zu studieren, wurde dessen Aktivierung durch Expression von TRIF („TIR[Toll-IL-1 receptor] domain containing adapter inducing IFN- β “) induziert. TRIF ist ein etablierter Aktivator von TBK1 innerhalb des TLR-Signalwegs (Yamamoto et al., 2003). Abb. 3.20 zeigt die Induktion des Promotors durch Plasmid vermittelte TRIF-Expression. In Teil A der Abbildung ist der Einfluss von koexprimiertem P Protein und in Teil B der einer dominant negativen Kinase mutante dargestellt. Es zeigte sich, dass koexprimiertes P sehr effizient in der Lage ist, TRIF induzierte IFN- β Promotoraktivierung zu blockieren. Somit muss der Angriffspunkt für P unterhalb von TRIF liegen. Das in Teil

B zeigte Kontrollexperiment wurde durchgeführt um sicherzustellen, dass die IFN- β Promotoraktivierung tatsächlich über die Aktivierung von TBK1 erfolgt. Daher wurde eine dominant negative TBK1-Mutante („kinase dead“) koexprimiert, die eine dosisabhängige Inhibition der IFN- β Promotoraktivierung bewirkte. Damit wurde bestätigt, dass TRIF-Expression geeignet ist, TBK1 abhängige Prozesse zu induzieren.

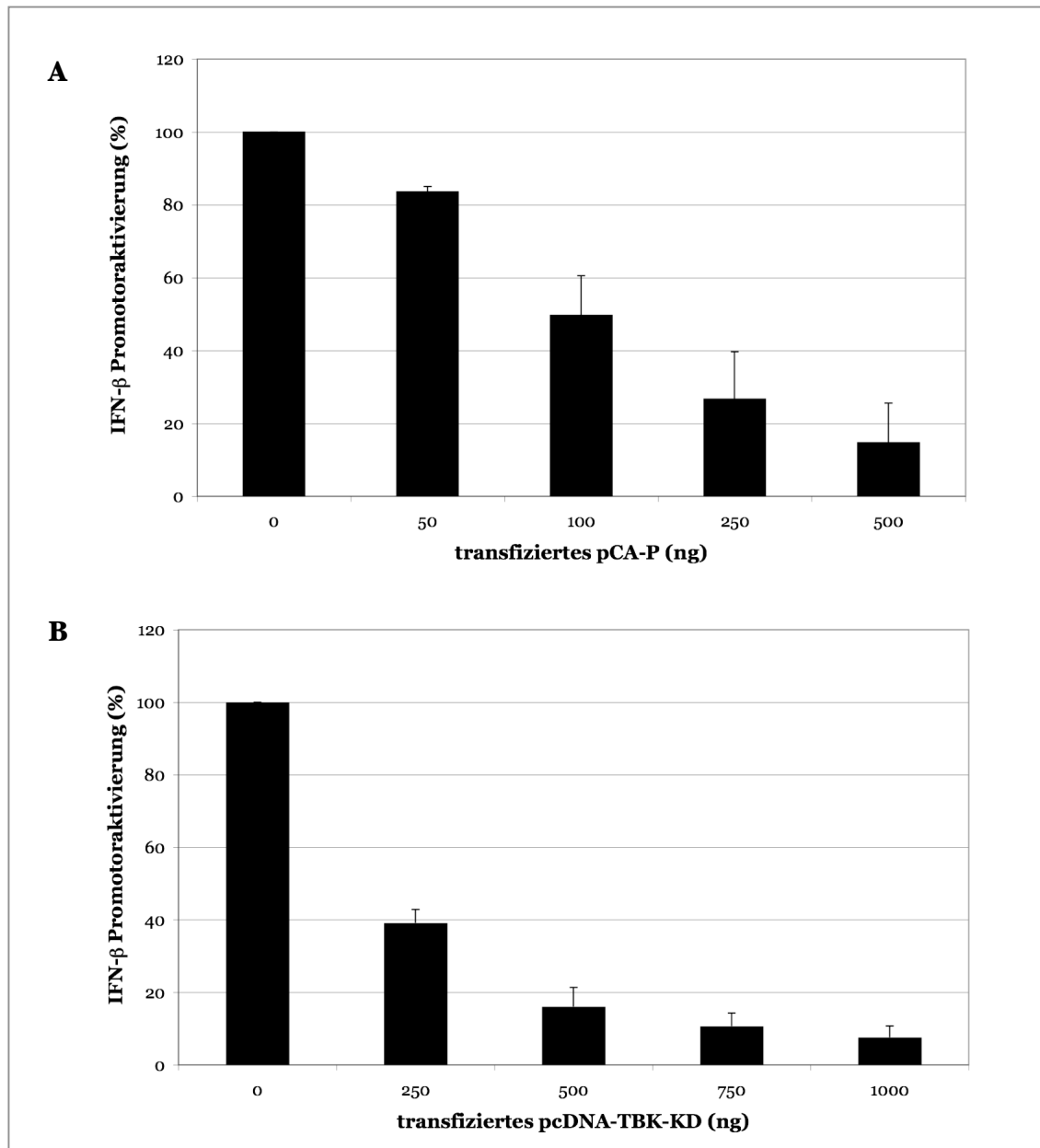


Abb. 3.20: TRIF induzierte IFN- β Promotoraktivierung in 293T Zellen wird durch P-Expression dosisabhängig inhibiert.

293T Zellen ($5 \cdot 10^5$) wurden mit 50 ng p125-luc und 5 ng pRL-TK-luc Reporterplasmid zusammen mit jeweils 500 ng pcDNA-TRIF und den angegebenen Mengen pCA-P (A) bzw. pcDNA-TBK-KD (B) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt.

3.2.4.2 P inhibiert TBK1 induzierte IFN- β Promotoraktivierung

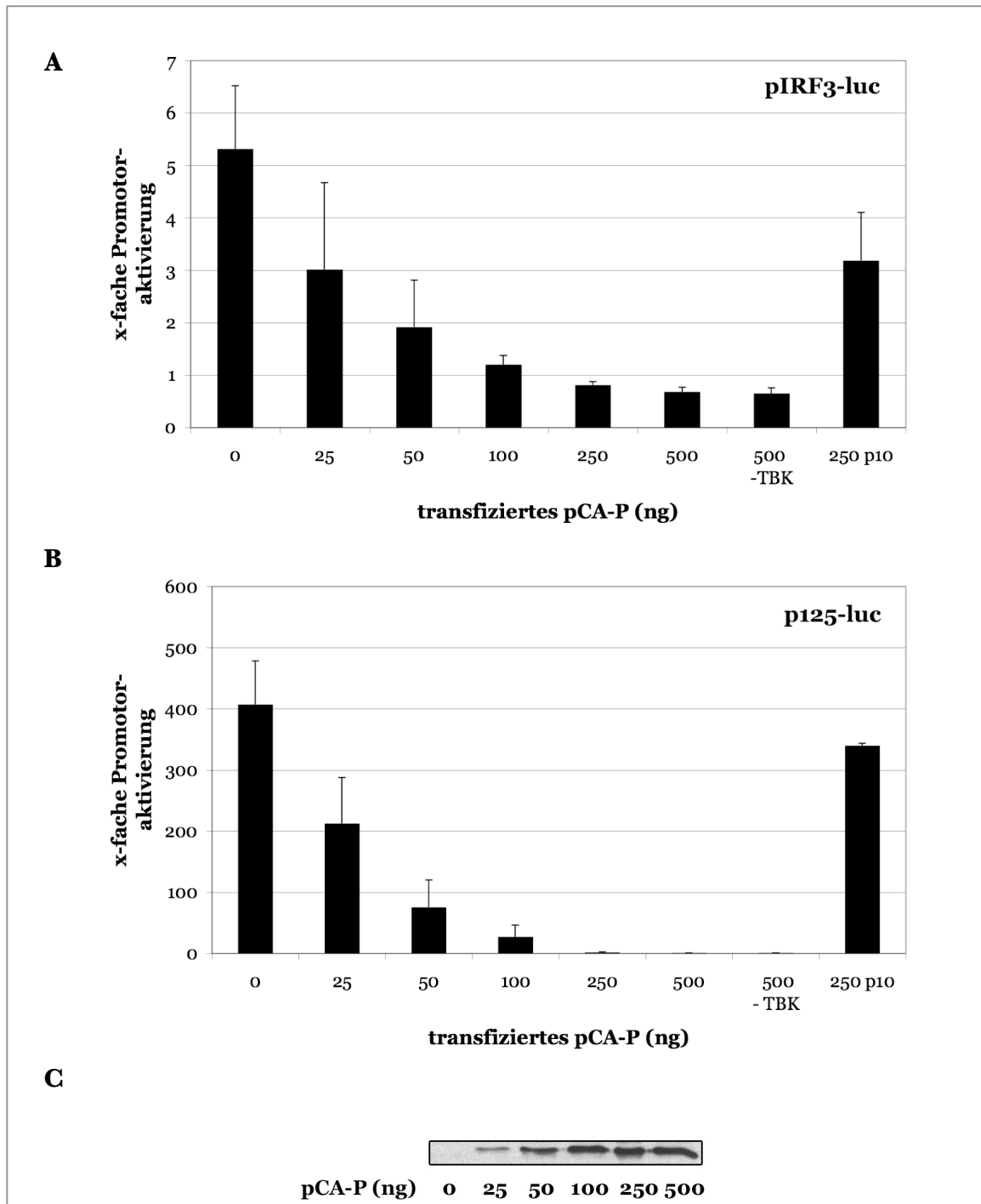


Abb. 3.21: TBK1 induzierte Aktivierung IRF3 abhängiger Promotoren wird in 293T Zellen durch P-Expression inhibiert.

293T Zellen ($5 \cdot 10^5$) wurden mit 50 ng pIRF3-luc (A) bzw. 50 ng p125-luc (B) und 5 ng pRL-TK-luc Reporterplasmid zusammen mit jeweils 50 ng pcDNA-TBK1-flag und den angegebenen Mengen pCA-P transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. In Kontrollansätzen wurden lediglich 500 ng pCA-P transfiziert, bzw. 250 ng eines p10 Expressionskonstruktes zusammen mit 50 ng pcDNA-TBK1-flag. In Abb. C ist ein Western Blot zur Kontrolle der P-Expression dargestellt.

Bislang ist nicht bekannt, ob TRIF und TBK1 direkt miteinander interagieren, oder ob an der Aktivierung von TBK1 durch TRIF weitere Proteine beteiligt sind. Um die molekulare Basis der Hemmung der Signalkaskade durch das P Protein zu klären, wurde der Fokus in den folgenden Experimenten direkt auf TBK1 gelenkt. Fitzgerald und Mitarbeiter beschrieben, dass die Expression von TBK1 IRF3 responsive Promotoren aktiviert und ausreichend ist, um auch IFN- β zu induzieren (Fitzgerald et al., 2003). Es galt daher zu untersuchen, ob das P Protein auch diese Aktivierung inhibieren kann. Zu diesem Zweck wurde in den in Abb. 3.21 dargestellten Reportergenexperimenten ein Expressionskonstrukt für flag-markiertes TBK1 zusammen mit verschiedenen Mengen pCA-P in 293T Zellen transfiziert.

Aus Abb. 3.21 geht hervor, dass die Überexpression von TBK1 zu einer starken Aktivierung von IRF3 abhängiger Genexpression führt und dass P ein äußerst potenter Inhibitor dieser Induktion ist. Dies gilt sowohl für einen artifiziellen IRF3 responsiven Promotor (A) als auch den authentischen IFN- β Promotor (B). In einem Kontrollansatz zeigt die Expression des BDV-p10 Proteins keinen signifikanten inhibitorischen Effekt. Des Weiteren bestätigen die Ergebnisse, dass solitär exprimiertes P die Hintergrundexpression des Reportergens nicht negativ beeinflusst, der Promotor also nicht unspezifisch inhibiert wird. Im Western Blot wurden steigende Mengen P in den Zellysaten nachgewiesen (C). An anderer Stelle (Abb. 3.23 und Abb. 3.33) ist gezeigt, dass auch die TBK1-Expression durch P nicht beeinträchtigt ist.

3.2.4.3 P interferiert mit TBK1 induzierter IRF3/CBP-Komplexbildung

Es wurde bereits erwähnt, dass die IRF3-Aktivierung mehrere Schritte beinhaltet. Die Inhibition der TBK1 abhängigen IRF3-Aktivierung durch P impliziert, dass ein Ereignis innerhalb dieser Kaskade blockiert wird. Diese Vorhersage wurde durch einen weiteren experimentellen Ansatz untersucht, der den Nachweis von IRF3/CBP-Komplexen beinhaltet. Die Induktion derselben durch TBK1-Expression sowie der Einfluss des P Proteins auf die Komplexbildung wurde mit Hilfe eines Ko-Immunpräzipitationsexperimentes (Ko-IP) untersucht. Dazu wurden Zellen mit einem TBK1-flag Expressionsplasmid transfiziert um IRF3 zu aktivieren. 24 h nach Transfektion wurde aus den Gesamtzellysaten endogenes IRF3 durch einen monoklonalen Antikörper gebunden und mittels einer ProteinG-Agarose-Matrix (PGA) präzipitiert. Die Präzipitate wurden in einem 8 %igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und im anschließenden

Western Blot mit Hilfe von CBP- und IRF3-spezifischen Antikörpern untersucht (siehe Abb. 3.22).

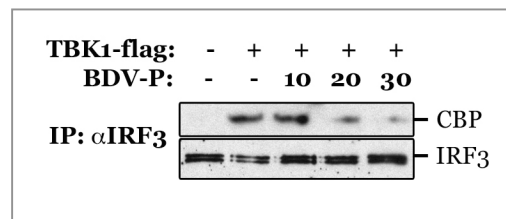


Abb. 3.22: BDV-P inhibiert IRF3/CBP-Komplexbildung.

293T Zellen (10^7) wurden mit 10 μ g pcDNA-TBK1-flag transfiziert um IRF3 zu aktivieren. Für die Expression von BDV-P wurde pCA-P in den angegebenen Mengen (μ g) kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden Gesamtzelllysate gewonnen und mit 1 μ g α IRF3 mab über Nacht inkubiert. Immunkomplexe wurden nach dreistündiger Inkubation mit 40 μ l PGA-Matrix durch anschließende Zentrifugation angereichert. Die Präzipitate wurden in einer 8 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion des Western Blots erfolgte mit IRF3- bzw. CBP-spezifischen Antikörpern.

Die Auswertung der Ko-Immünpräzipitation (Abb. 3.22) zeigt, dass die ektopische Expression von TBK1 die Bildung von IRF3/CBP-Komplexen stimuliert. Koexprimiertes BDV-P führte dosisabhängig zu verminderter Komplexbildung. Dies ist gleichbedeutend mit einer Inhibition der IRF3-Aktivierung durch P und bestätigt die Befunde der Reporterassays.

3.2.4.4 P interferiert mit TBK1 vermittelter IRF3-Phosphorylierung

Wie inhibiert das P Protein die Entstehung des transkriptionsaktiven IRF3/CBP-Holokomplexes? Die Tatsache, dass nur phosphoryliertes IRF3 mit CBP interagieren kann, erlaubte die Spekulation, dass P inhibitorisch auf die TBK1 vermittelte IRF3-Phosphorylierung wirkt. Diese Theorie wurde mit Hilfe eines Antikörpers überprüft, der spezifisch phosphoryliertes IRF3 bindet. 293T Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für HA-markiertes IRF3, TBK1-flag und variablen Mengen pCA-P transfiziert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Zelllysate im SDS-Gel wurde die Expression der transfizierten Proteine, sowie die Phosphorylierung von IRF3 durch Detektion des Phospho-Serins an Position 396 nachgewiesen (Abb. 3.23).

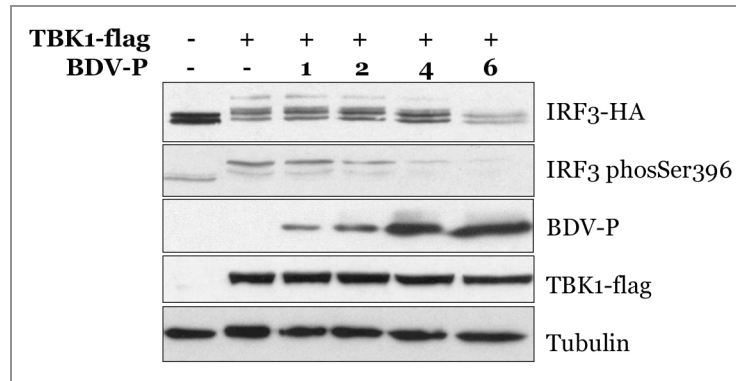


Abb. 3.23: BDV-P inhibiert IRF3-Phosphorylierung an Position 396 durch TBK1.

293T Zellen ($3 \cdot 10^6$) wurden mit 4 μg pcDNA-TBK1-flag, 2 μg pCA-IRF3-HA und den angegebenen Mengen (μg) pCA-P transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden Gesamtzelllysate gewonnen und $4 \cdot 10^4$ Zelläquivalente, bzw. die doppelte Menge für den Nachweis von phosphoryliertem IRF3, im 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend geblottet. Der Nachweis von IRF3 und TBK1 erfolgte mit Tag-spezifischen Antikörpern, die Phosphorylierung von IRF3 an Position Serin 396 mit einem phospho-spezifischen Antikörper. BDV-P wurde mit einem Antiserum und Tubulin mit einem mab detektiert.

Der in Abb. 3.23 gezeigte Western Blot dokumentiert, dass IRF3-HA in Anwesenheit von koexprimiertem TBK1 ein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel besaß (obere Reihe, Vgl. Spur eins und zwei). Die oberen Banden stellen dabei hyperphosphorylierte IRF3-Monomere dar. Diese Interpretation wird durch die phosphospezifischen Signale in der zweiten Reihe von oben unterstützt. Diese erschienen, ebenfalls langsamer laufend, in Lysaten TBK1 exprimierender Zellen. Steigende Mengen des P Proteins (vgl. dritte Reihe von unten) bewirkten eine Abnahme der beschriebenen Signale bis auf Hintergrundniveau. Demzufolge inhibierte P die IRF3-Phosphorylierung und -Aktivierung durch TBK1. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass P zwischen der Kinase TBK1 und ihrem Substrat IRF3 inhibitorisch wirkt.

3.2.5 Einfluss von P auf IFN- β Zytokinexpression und seine biologische Wirkung

Die Fähigkeit des viralen Phosphoproteins, TBK1 abhängige IFN- β Promotoraktivierung zu antagonisieren, wurde auf der Ebene von Reporterexperimenten gezeigt und durch Analysen der IRF3-Aktivierung verifiziert. Können diese Befunde auch auf die Expression des authentischen IFN- β Gens übertragen werden? Um diese Frage zu beantworten, wurde der Einfluss von P auf die *ifn- β* Transkription, die Synthese des Zytokins IFN- β und dessen biologische Wirkung untersucht.

3.2.5.1 P inhibiert IFN- β Proteinexpression

Die robuste Induktion des IFN-Promotors durch TBK1-Expression ist ein Anzeichen für eine starke IFN-Produktion in den Zellen. Daher wurde zunächst mittels RT-PCR die Induktion des IFN- β Transkriptes untersucht und anschließend im ELISA gemessen, wieviel Zytokin als Konsequenz im Überstand transfizierter Zellen nachweisbar ist. Außerdem war von Interesse, wie diese Befunde durch die Expression von P beeinflusst werden. Für diesen Versuch wurden die Zellen mit pcDNA-TBK1-flag und verschiedenen Mengen pCA-P transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde in den Überständen der Zellen IFN- β nachgewiesen, die Gesamt-RNA der Zellen extrahiert und in einer IFN- β spezifischen RT-PCR eingesetzt.

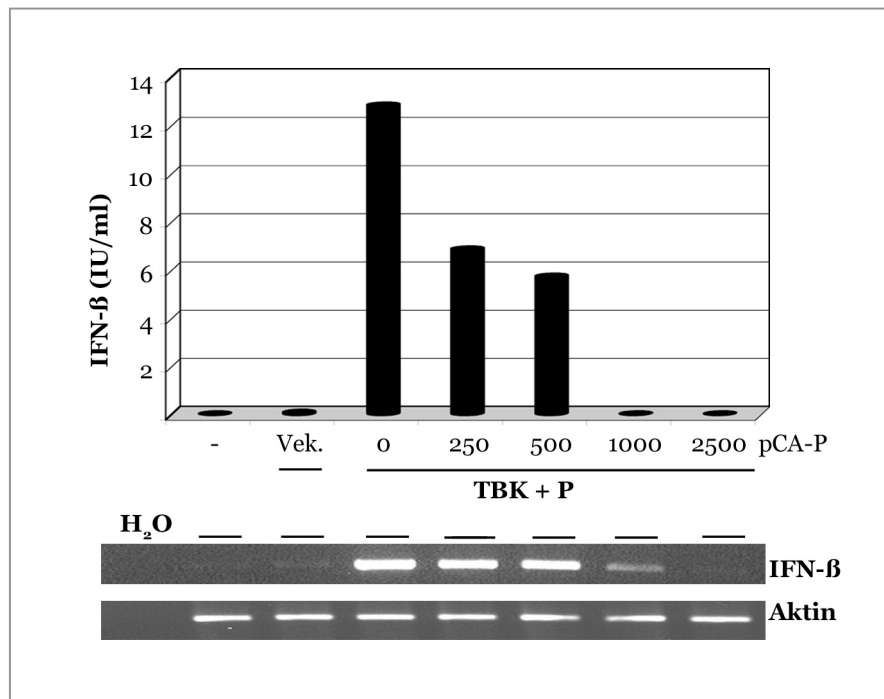


Abb. 3.24: BDV-P inhibiert die TBK1 induzierte *ifn- β* Transkription und Expression.

293T Zellen ($5 \cdot 10^5$) wurden mit 500 ng pcDNA-TBK1-flag und den angegebenen Mengen pCA-P (ng) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde IFN- β im Überstand mittels ELISA gemessen. Gesamt-RNA von transfizierten Zellen wurde isoliert und 1 μ g RNA als Template in eine IFN- β bzw. β -Aktin spezifische RT-PCR eingesetzt. 5 μ l des jeweiligen RT-PCR Ansatzes wurden im Agarosegel analysiert.

Abb. 3.24 zeigt, dass die TBK1-Expression zur zellulären IFN- β Expression führt. Während im Überstand unbehandelter bzw. Vektor transfizierter Zellen kein IFN- β gemessen wurde, führt die TBK1-Expression zur Sekretion des Zytokins (14 IU/ml). Koexprimiertes P wirkt sich dosisabhängig negativ auf die IFN-Konzentration im Medium

aus, die bei 2.5 µg transfiziertem pCA-P nicht mehr messbar war. Das Ergebnis der ergänzenden RT-PCR bestätigte die ELISA Daten.

3.2.5.2 P inhibiert TBK1 induzierte ISRE-Promotoraktivierung ohne die IFN abhängige Signalkaskade zu blockieren

Sekretiertes IFN- α/β aktiviert durch Bindung an den IFN- α/β Rezeptor eine Signalkaskade, in deren Folge die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2, sowie IRF9 (p48) aktiviert werden und den ISGF3 („Interferon stimulated gene factor“) Komplex bilden. Dieser bindet Promotoren mit ISRE („Interferon stimulated responsive elements“) Elementen und bewirkt die Aktivierung von Genen, die für Proteine mit antiviraler Wirkung kodieren. Im folgenden Experiment wurde ein pISRE-luc Reporterkonstrukt benutzt, um die Aktivierung ISRE responsiver Promotoren durch ISGF3 und den Einfluss von P auf diese Aktivierung zu analysieren.

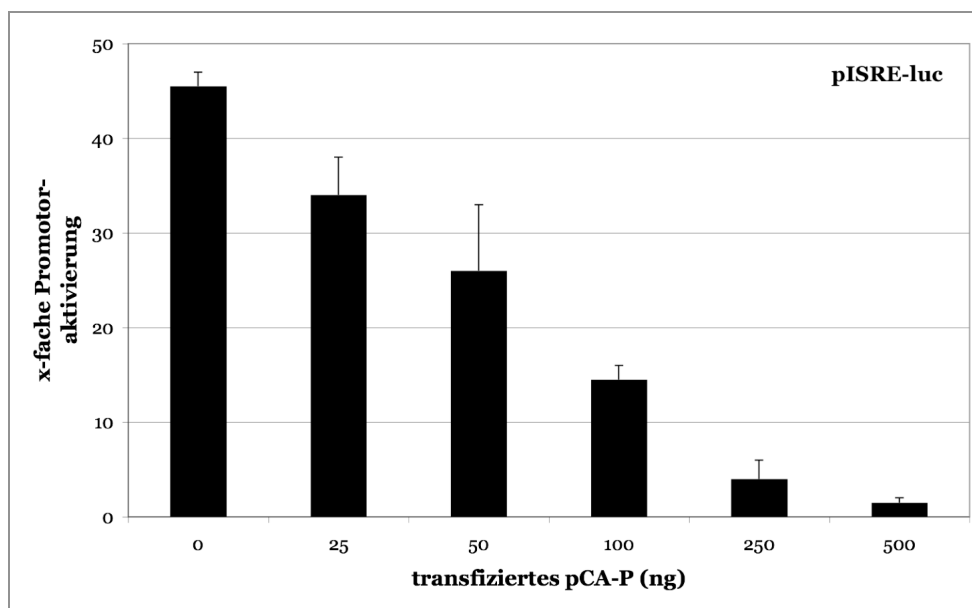


Abb. 3.25: TBK1 induzierte ISRE-Promotoraktivierung in 293T Zellen wird durch P Expression inhibiert.

293T Zellen ($5 \cdot 10^5$) wurden mit 50 ng pISRE-luc und 5 ng pRL-TK-luc Reporterplasmid zusammen mit jeweils 50 ng pcDNA-TBK1-flag und den angegebenen Mengen pCA-P transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt.

Die TBK1-Expression führt zur IFN- β Sekretion (Abb. 3.24) und sollte folglich die Induktion des ISRE-Promotors bewirken. Daher wurde einem weiterführenden Experiment (Abb. 3.25) der gleiche Stimulus gewählt. Dieses Experiment untermauert,

dass als Konsequenz der P-Expression dosisabhängig weniger IFN- β gebildet wird (vgl. Abb. 3.24) und dementsprechend IFN abhängige Prozesse reduziert werden. Außerdem wurde in diesem Zusammenhang überprüft, ob BDV-P zusätzlich auch einen negativen Einfluss auf die IFN-Signalkaskade an sich ausübt. Dazu wurden Zellen mit dem Konstrukt pISRE-luc, variablen Mengen pCA-P sowie pcDNA-M27 als Positivkontrolle transfiziert. Das M27 Protein des murinen Cytomegalovirus (mCMV) ist als Inhibitor des JAK/STAT Signalweges beschrieben worden (Zimmermann et al., 2005). 24 h nach der Transfektion wurde rekombinantes Typ I IFN appliziert (1000 U/ml). Nach sechsständiger Inkubation erfolgte die Messung der ISRE abhängigen Promotoraktivierung.

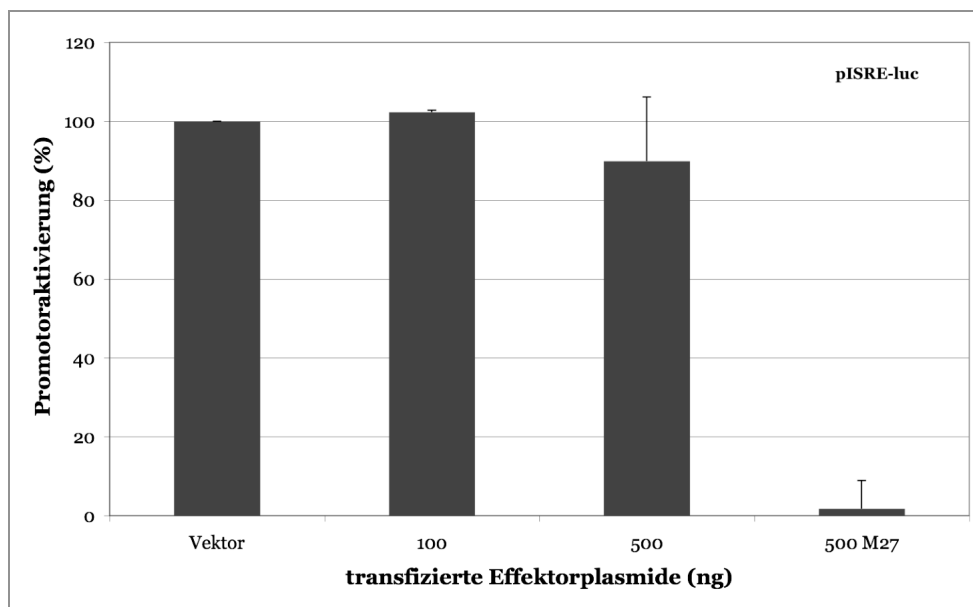


Abb. 3.26: IFN induzierte Aktivierung eines ISRE responsiven Promotors wird durch BDV-P nicht inhibiert.

293T Zellen ($5 \cdot 10^5$) wurden mit 50 ng pISRE-luc und 5 ng pRL-TK-luc Reporterplasmid zusammen mit jeweils angegebenen Mengen pCA-P bzw. 500 ng pcDNA-M27 als Positivkontrolle transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für sechs Stunden mit 1000 U/ml IFN behandelt. Anschließend erfolgte die Messung der Luziferaseaktivität.

Abb. 3.26 stellt dar, dass das P Protein keinen inhibitorischen Einfluss auf die IFN induzierte Signalkaskade ausübt. Die Stimulierung des ISRE-Promotors erfolgt in Zellen, die P exprimieren genauso effizient wie in Vektor transfizierten Zellen. Die Expression des hCMV-M27 Proteins bewirkte dagegen erwartungsgemäß eine Blockade der Signaltransduktion. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die in Abb. 3.25 gezeigte Inhibition des ISRE abhängigen Promotors allein auf die Antagonisierung der initialen IFN- β Aktivierung zurückzuführen ist.

3.2.5.3 IFN-Bioassay

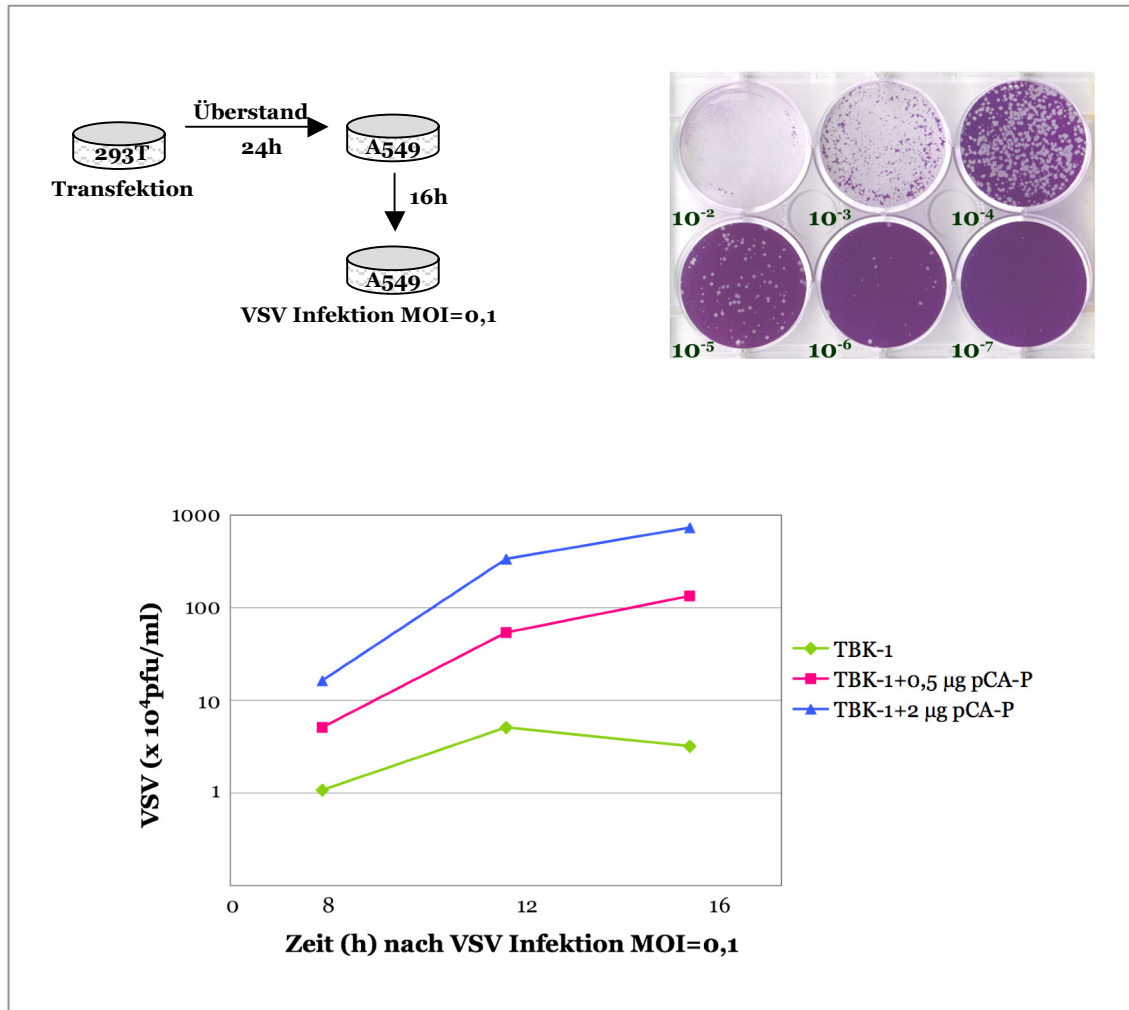


Abb. 3.27: IFN-β Bioassay - P inhibiert die Etablierung des TBK1 induzierten antiviralen Status.

293T Zellen ($5 \cdot 10^5$) wurden mit 500 ng pcDNA-TBK1-flag transfiziert um Interferon zu induzieren. Die Mengen von kotransfiziertem pCA-P sind angegeben. 24 h nach Transfektion wurden die Überstände auf A549 Zellen ($5 \cdot 10^5$) transferiert. 16 h später erfolgte die Infektion der Zellen mit VSV (MOI=0,1). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Virustiter im Plaqueassay auf MDCKII Zellen bestimmt. Die Angabe der Titer erfolgte in „plaque forming unit“ (pfu)/ml.

Die Eigenschaft des P Proteins als IFN-Antagonist zu wirken, wurde weiterführend in einem funktionellen Bioassay überprüft. In diesem Versuchsansatz diente die Replikation des IFN sensitiven Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) als Indikator für biologisch aktives IFN. Für dieses Experiment wurden 293T Zellen mit pcDNA-TBK1-flag und variablen Mengen pCA-P transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde der Überstand auf A549 Zellen transferiert. Dieser Weg wurde gewählt, weil A549 Zellen als potentere IFN-Produzenten gelten. Es wurde erwartet, dass IFN aus dem Überstand der 293T Zellen

in A549 Zellen eine Amplifikation der Zytokinproduktion herbeiführt und die Zellen befähigt, einen antiviralen Status zu etablieren. Zudem ist bekannt, dass 293T Zellen das adenovirale E1A Protein exprimieren, welches die IFN-Signalkaskade in diesen Zellen beeinträchtigen kann und somit mit der Etablierung des antiviralen Status interferiert. Nach Präinkubation der A549 Zellen mit den Überständen wurden diese mit VSV (MOI=0,1) infiziert. Nach 8, 12 und 16 h wurden die Virustiter durch Plaquetests auf MDCKII Zellen bestimmt. Die Abb. 3.27 illustriert den experimentellen Ansatz und zeigt die Auswertung der Plaqueteste.

Die Replikationskurven in Abb. 3.27 unterscheiden sich signifikant. VSV repliziert kaum, wenn die Zellen ursprünglich nur TBK1 exprimierten. Koexpression von P führte dosisabhängig zu einer schnelleren Replikationskinetik und resultierte außerdem in höheren Titern. Die Virustiter nach 16 h wiesen einen Unterschied von bis zu zwei Log-Stufen auf. Dieses Ergebnis belegt die biologische Aktivität des P Proteins als IFN-Antagonist.

3.2.6 Proteinbiochemische Analysen der P vermittelten IFN- β Inhibition

Aus den bisherigen Daten lässt sich ableiten, dass das BDV-P Protein innerhalb der IFN-Induktionskaskade direkt an oder unterhalb von TBK1 inhibitorisch wirksam wird. Im folgenden Abschnitt wurden proteinbiochemische Ansätze verwendet, um den Mechanismus der P vermittelten IFN-Antagonisierung zu entschlüsseln.

3.2.6.1 TBK1-Kinaseaktivität wird durch P inhibiert

Für die IRF3-Aktivierung ist die Phosphorylierung durch TBK1 unerlässlich. Hat die Koexpression von P einen Einfluss auf diese Kinaseaktivität? Um diese Frage zu beantworten wurde in Zusammenarbeit mit Stephan Ludwig (Universität Münster) ein Immunokomplex-Kinaseassay durchgeführt. Hierfür wurden TBK1-flag und variable Mengen P in 293T Zellen exprimiert, bzw. lediglich TBK1-flag in BDV infizierten Zellen. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Kinase mit einem flag-spezifischen Antikörper präzipitiert. Nach Inkubation des Präzipitates mit dem rekombinant hergestellten Substrat GST-IRF3 in Anwesenheit von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP wurde die Phosphorylierung mittels Autoradiographie detektiert.

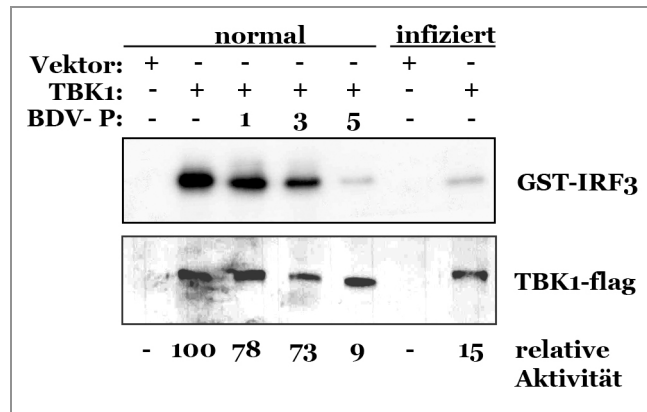


Abb. 3.28: Das BDV-P Protein inhibiert TBK1-Kinaseaktivität.

BDV-293T Zellen (10^7) wurden mit 10 μ g pcDNA-TBK1-flag und pCA Leervektor transfiziert. Nicht infizierte Zellen wurden zusätzlich mit den angegebenen Mengen (μ g) pCA-P kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden Zellysate hergestellt, aus denen TBK-flag unter Verwendung des monoklonalen α flag Antikörpers präzipitiert wurde. Die Präzipitate wurden mit bakteriell exprimiertem GST-IRF3 als Substrat und γ^{32} P-ATP inkubiert. Die Proben wurden im SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Mittels Autoradiographie wurde der Einbau radioaktiver Phosphatreste detektiert (obere Abb.). Der Nachweis der präzipitierten Kinase erfolgte im Western Blot mit dem für die IP eingesetzten α flag Antikörper (untere Abb.). Die Angabe der relativen Aktivität erfolgte unter Berücksichtigung der durch Densitometrie quantifizierten TBK1-flag spezifischen Banden.

Das in Abb. 3.28 gezeigte Kinaseassay demonstriert, dass das P Protein die Kinaseaktivität von TBK1, gemessen an der Phosphorylierung des rekombinant hergestellten Substrates GST-IRF3, in infizierten und transfizierten Zellen effizient inhibieren kann. In pCA-P transfizierten Zellen ist dieser Effekt dosisabhängig und in infizierten Zellen ist das endogen vorhandene P offensichtlich ausreichend, um die Kinaseaktivität fast vollständig zu inhibieren. Im Western Blot (untere Tafel) wurde die präzipitierte TBK1 detektiert und die Banden wurden anschließend quantifiziert. Die Angabe der relativen Kinaseaktivität berücksichtigt die im Präzipitat tatsächlich vorhandenen TBK1-Mengen und bestätigt, dass die reduzierte Kinaseaktivität nicht auf verminderte TBK1-Präzipitation zurückzuführen ist.

3.2.6.2 Nachweis der Interaktion von TBK1 und P

Wie inhibiert P die Aktivität von TBK1? Zur Beantwortung dieser Frage wurde zunächst in einem Ko-Immünpräzipitationsexperiment getestet, ob TBK1 und P miteinander interagieren. BDV infizierte 293T Zellen wurden mit dem pcDNA-TBK1-flag Expressionsplasmid und nicht infizierte Zellen zusätzlich mit pCA-P transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden Zellysate hergestellt und TBK1 wurde mit einem flag-spezifischen

Antikörper präzipitiert. Die Präzipitate wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit TBK1-flag- und P-spezifischen Antikörpern analysiert.

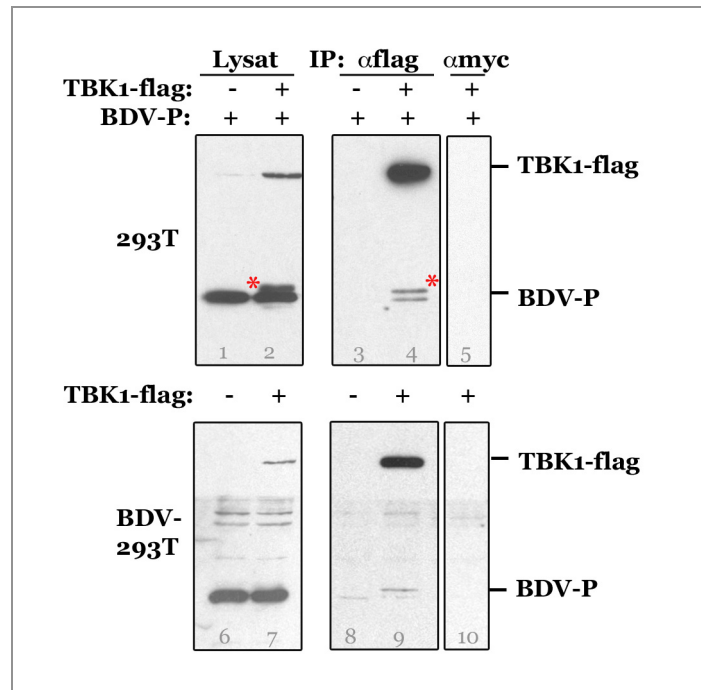


Abb. 3.29: Das BDV- P Protein bildet einen Komplex mit TBK1.

293T bzw. BDV-293T Zellen ($3 \cdot 10^6$) wurden mit 2 μg pcDNA-TBK1-flag und 4 μg pCA-P bzw. pCA Leervektor transfiziert. 24 h nach Transfektion erfolgte die Zellyse. Die IP wurde mit 1 μg eines monoklonalen αflag bzw. αmyc Antikörpers als Kontrolle über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Immunkomplexe wurden durch Zugabe von 40 μl PGA ankonzentriert, gewaschen und in einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Im anschließenden Western Blot wurde TBK1-flag mit dem für die IP eingesetzten monoklonalen αflag Antikörper und P mit einem Antiserum aus Kaninchen detektiert. Im jeweils linken Kasten sind Aliquots der für die IP eingesetzten Lysate analysiert worden. Sie repräsentieren ca. $5 \cdot 10^4$ Zellen, d.h. rund 2 % des Gesamtzellysates. Die Kästen rechts zeigen die IP-Ansätze, die komplett aufgetragen wurden.

In der Abb. 3.29 zeigen die links abgebildeten Gelspuren Aliquots der in die Ko-IP eingesetzten Lysate. Die Analyse der IPs bestätigt, dass TBK1-flag spezifisch mit einem αflag Antikörper präzipitiert (Spur vier) wurde. In den Kontrollen in den Spuren drei und fünf wurde kein TBK-flag nachgewiesen. In der Spur vier wurde neben TBK1 auch P in Form einer Doppelbande detektiert. In Abwesenheit von TBK1, oder wenn die IP mit einem unspezifischen Kontrollantikörper durchgeführt wurde (Spuren drei und fünf), kann kein P spezifisches Signal nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine spezifische Interaktion zwischen TBK1 und P hin. Es wurde konsistent beobachtet, dass diese Interaktion in BDV infizierten Zellen weniger effizient erfolgt (Spur neun). Eine weitere Auffälligkeit betrifft das Auftreten einer langsamer laufenden P spezifischen Bande im

Lysat von 293T Zellen. Diese wurde konsistent immer dann nachgewiesen, wenn TBK1 koexprimiert wurde, und kopräzipitierte ebenfalls mit der Kinase (siehe rotes Sternchen). In BDV infizierten Zellen ist diese zweite P-Bande äußerst schwach und war nicht immer zu detektieren.

3.2.6.3 Das BDV-P Protein wird durch TBK1 phosphoryliert

Das Auftreten der P-spezifischen Doppelbande in Anwesenheit von koexprimierter TBK1, legt die Möglichkeit nahe, dass das virale Protein ein Substrat von TBK1 ist und es sich bei der langsamer laufenden P Bande um eine phosphorylierte Form handelt. Um diese Hypothese zu testen, wurde eine Ko-IP, wie in Abb. 3.29 Spur vier gezeigt, in Doppelansätzen durchgeführt. Anschließend wurde ein Präzipitat mit Phosphatase inkubiert, während das andere Aliquot unbehandelt blieb.

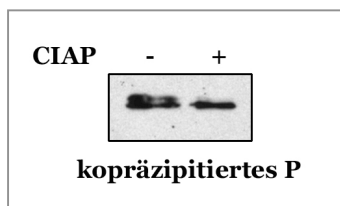


Abb. 3.30: Phosphatasebehandlung des kopräzipitierten P Proteins.

Die Ko-IP erfolgte wie in Abb. 3.29 beschrieben. Die gewaschene PGA-Matrix wurde in 20 μ l CIAP Puffer aufgenommen und mit 10 U Phosphatase für 4 h bei 37 °C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Proben im SDS-Gel aufgetrennt und mit einem P-spezifischen Kaninchenserum im Western Blot analysiert.

Nach Phosphatasebehandlung wurde die langsamer laufende P-spezifische Bande nicht mehr detektiert (siehe Abb. 3.30). Dies ist eine Bestätigung dafür, dass es sich um eine phosphorylierte Form des P Proteins handelt, welche in Abhängigkeit von der TBK1-Aktivität auftritt.

Die vorherigen Experimente hatten gezeigt, dass P die TBK1-Aktivität inhibiert, mit TBK1 interagiert und in Anwesenheit der Kinase phosphoryliert wird. Daher stellte sich die Frage, ob P durch TBK1 direkt phosphoryliert werden kann. In Zusammenarbeit mit Stephan Ludwig (Universität Münster) wurde ein *in vitro* Kinaseassay durchgeführt, in das rekombinant hergestelltes GST-P als putatives Substrat, sowie GST-I κ B α als Positiv- und GST allein als Negativkontrolle eingesetzt wurden.

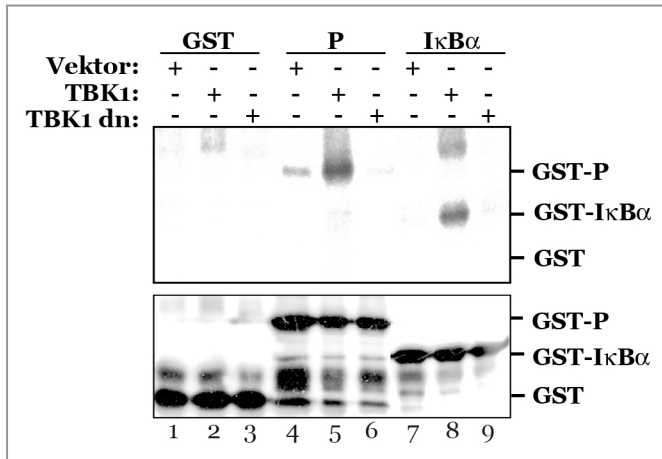


Abb. 3.31: BDV-P wird *in vitro* durch TBK1 phosphoryliert.

Bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine (GST: Spuren 1-3; GST-P: 4-6; GST-IκBα: 7-9) wurden zusammen mit immunpräzipitierter TBK1-WT oder einer dominant negativen Mutante, und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Die Proben wurden im SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und durch Autoradiographie der Einbau radioaktiver Phosphatreste detektiert (obere Tafel). Der Nachweis der GST-Fusionsproteine erfolgte mit einem αGST -Antikörper (untere Tafel).

Die Autoradiographie in Abb. 3.31 zeigt, dass ein GST-P Fusionsprotein ebenso wie das bekannte Substrat IκBα durch TBK1 phosphoryliert werden kann. In Kontrollexperimenten zeigte eine dominant negative Kinasemutante keine Phosphorylierung und in Abwesenheit der Kinase wurde ein nur schwaches Signal in Spur vier detektiert, das als unspezifischer Hintergrund gewertet werden kann. Wurde dagegen GST als Substrat in die Reaktion eingesetzt, blieb eine Phosphorylierung aus. Durch dieses Experiment wurde das virale P Protein als ein Substrat der zellulären Kinase TBK1 identifiziert. Sequenzvergleiche mit authentischen TBK1-Substraten unterstützen diesen Befund. IRF3 und IκBα weisen das gemeinsame Motiv „Ser XXX Ser“ auf, wobei die Serinreste die jeweiligen Phosphoakzeptoren darstellen. Eine Sequenz, die diesem Konsensus-Motiv entspricht ist auch im N-terminalen Bereich von P vorhanden. Des Weiteren bestehen zwischen IκBα und P auch in flankierenden Bereichen Sequenzhomologien (Abb. 3.32). Es kann daher postuliert werden, dass TBK1 das P Protein an den Serinresten sieben und elf phosphoryliert.

IκBα:	29	-RHDS <u>GLD</u> SMKDEE-	41
IRF3:	395	-ISNS <u>HPL</u> SLTSDQ-	407
BDV-P:	4	-RPSS <u>LVD</u> SLEDEE-	16

Abb. 3.32: Sequenzvergleich der authentischen TBK1-Substrate IκBα und IRF3 und BDV-P.

Die (putativen) Phosphorylierungsstellen sind unterstrichen und die Sequenzhomologien zwischen IκBα und P innerhalb der flankierenden Bereichen sind schattiert dargestellt.

3.2.6.4 Negative Beeinflussung der TBK1/P-Komplexbildung durch IRF3

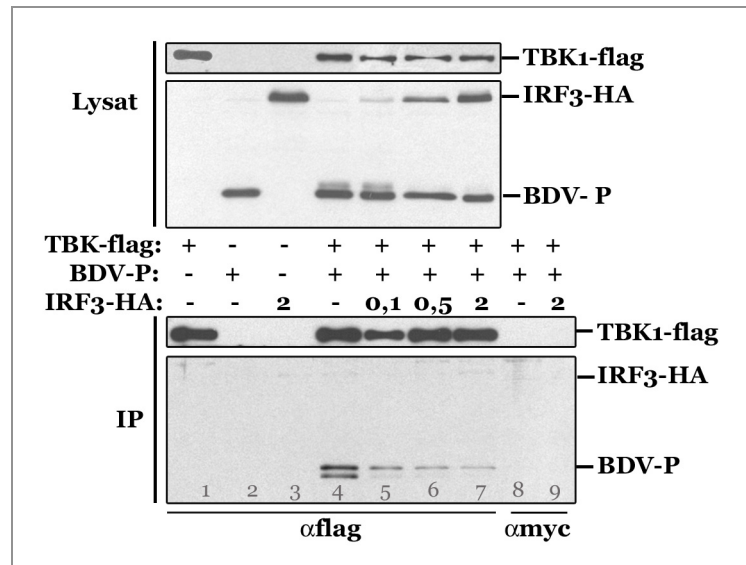


Abb. 3.33: IRF3 interferiert dosisabhängig mit der TBK1/P-Interaktion.

293T ($3 \cdot 10^6$) wurden mit 2 μg pcDNA-TBK1-flag, 4 μg pCA-P und den angegebenen Mengen (μg) pCA-IRF3-HA transfiziert. 24 h nach Transfektion erfolgte die Zellyse. Die IP wurde mit 1 μg eines monoklonalen αflag bzw. αmyc Antikörpers als Kontrolle über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Immunkomplexe wurden durch Zugabe von 40 μl PGA ankonzentriert, gewaschen und in einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Im anschließenden Western Blot wurde TBK1-flag mit dem für die IP eingesetzten monoklonalen αflag Antikörper und P bzw. IRF3-HA mit jeweils spezifischen Antisera detektiert. Im oberen Teil der Abbildung sind Aliquots der für die IP eingesetzten Lysate analysiert worden. Sie repräsentieren ca. $5 \cdot 10^4$ Zellen, d.h. rund 2 % des Gesamtzelllysates. Der untere Teil zeigt die IP-Ansätze, die komplett aufgetragen wurden. Die Detektion der präzipitierten Proteine im Western Blot erfolgte unter Verwendung der oben angeführten Antikörper.

Die Tatsache, dass das virale P Protein mit der zellulären TBK1 interagiert und außerdem durch die Kinase phosphoryliert werden kann, wirft die Frage auf, inwiefern diese Interaktion durch ein authentisches zelluläres TBK1 Substrat wie IRF3 beeinflusst werden kann. Die Phosphorylierung von IRF3 ist unerlässlich für die IFN-Induktion und in diesem Zusammenhang implizieren die bisherigen Daten, dass P und IRF3 möglicherweise um die Bindung an TBK1 kompetieren. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde ein Ko-IP Experiment durchgeführt. 293T Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für TBK-flag und P, sowie steigenden Mengen eines IRF3-HA Konstruktes transfiziert. TBK1 wurde aus den Lysaten mit einem flag-spezifischen Antikörper präzipitiert und kopräzipitiertes P im Western Blot detektiert. Der obere Teil der Abb. 3.33 („Lysat“) zeigt zur Kontrolle die Expression der Proteine als Ergebnis der Transfektionen. Die Darstellung demonstriert u.a. auch, dass die TBK1-Expression von koexprimiertem P Protein unbeeinflusst bleibt. Des

Weiteren zeigt das P-spezifische Signal auch hier die zuvor beschriebene Doppelbande in Anwesenheit von TBK1. Diese nimmt jedoch durch koexprimiertes IRF3 dosisabhängig ab und ist schließlich nicht mehr zu detektieren. Diese Tatsache zeigt einen negativen Einfluss von IRF3 auf die Phosphorylierung von P durch TBK1.

Der untere Teil der Abbildung zeigt die Kopräzipitation von P mit TBK1 (Spur vier). Interessanterweise zeigte sich, dass die TBK1/P-Komplexbildung durch IRF3-Expression negativ beeinflusst wird, denn das P spezifische Signal nahm mit steigenden IRF3-Mengen ab (Spuren fünf bis sieben). Diese Beobachtung weist auf eine kompetitive Inhibition zwischen dem zellulären Substrat und dem viralen Protein um Bindung an und Phosphorylierung durch TBK1 hin. Unter den gleichen experimentellen Bedingungen konnten keine IRF3/TBK1-Komplexe nachgewiesen werden. Dies ist ein Hinweis, dass die Interaktion von TBK1 und P offensichtlich stärker ist als die Bindung von TBK1 an das zelluläre Substrat IRF3.

Die vorgestellten Daten identifizierten das BDV-P Protein als IFN-Antagonisten, das die Induktionskaskade des Zytokins blockiert. Durch Interaktion mit der zellulären Kinase TBK1 wird die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 inhibiert. Dabei fungiert P vermutlich als Pseudosubstrat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde somit erstmalig ein möglicher Inhibitionsmechanismus der IRF3-Aktivierung beschrieben. Diese Ergebnisse sind zusammenfassend in Unterstab et al. (2005) publiziert.

4 Diskussion

4.1 Übersicht über die Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit bilden die Proteine p10 und P des Borna Disease Virus zwei Themenschwerpunkte. Beide Genprodukte werden in überlappenden Leserastern der P-Transkriptionseinheit des Virus kodiert.

Als im Kern der Wirtszelle replizierendes und transkribierendes Virus ist das Bornavirus auf den nukleären Import und Export seiner viralen Bestandteile auf zelluläre Transportmechanismen angewiesen. Obwohl das p10 Protein kein vorhersagbares klassisches NLS besitzt, wird es über den Importin α/β abhängigen Importweg in den Zellkern importiert. Daher stand im ersten Teil der Arbeit die Analyse dieses ungewöhnlichen NLS des p10 Proteins im Mittelpunkt. Durch *in vitro* Importassays und proteinbiochemische Methoden sollten die für den Kernimport kritischen Aminosäuren durch eine Mutationsanalyse im Detail charakterisiert und die Bindung an den zellulären Importrezeptor Importin α untersucht werden.

Das Bornavirus vermag persistente Infektionen zu etablieren, jedoch sind die Mechanismen dieser Persistenz gegenwärtig unverstanden. Im zweiten Teil dieser Arbeit stand deshalb die Frage im Mittelpunkt, wie sich das Bornavirus mit der angeborenen Immunantwort, insbesondere dem IFN-System des Wirts auseinandersetzt. Es ist bekannt, dass die Fähigkeit von Viren dieses zu unterwandern bzw. zu antagonisieren mitentscheidend für deren Virulenz ist. Die viralen Proteine wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, die Aktivierung des IFN- β Gens zu inhibieren. Dabei erwies sich BDV-P als IFN-Antagonist. Nachfolgend sollten die zugrunde liegenden Mechanismen aufgeklärt werden. Dabei wurde deutlich, dass das P Protein durch die Interaktion mit TBK1 die Inhibition der IRF3-Aktivierung bewirkt und somit die IFN- β Induktion reduziert.

4.2 Charakterisierung der NLS-Sequenz von p10

4.2.1 Das BDV-p10 Protein interagiert *in vivo* und *in vitro* mit Importin α

Die Kompartimentierung der Zelle in Membran umhüllte Organellen führt zum Entstehen von Reaktionsräumen, die sich hinsichtlich ihrer biochemischen Zusammensetzung und ihrer zellbiologischen Funktionen unterscheiden. Topogene Sequenzen in karyophilen Proteinen gewährleisten deren kontrollierten Import bzw. Export durch die Kernporenkomplexe (NPCs) der Kernmembran. Diese Vorgänge werden durch zelluläre Transportrezeptoren vermittelt, derer sich auch Viren bedienen. Dies gilt besonders für Viren wie BDV, die ihr Genom im Nukleus transkribieren und replizieren.

Das BDV-p10 Protein wurde in infizierten Zellen und in Zellen, die p10 ektopisch exprimieren, sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert. Aufgrund seiner geringen Größe von 10 kDa bestand a priori die Möglichkeit, dass es entweder durch die Kernporen diffundiert oder über eine topogene Sequenz verfügt, die seinen direkten Kernimport in Abwesenheit anderer viraler Proteine gewährleistet. Innerhalb der Primärsequenz von p10 war allerdings kein klassisches NLS erkennbar. Dennoch wurde durch *in vitro* Kernimportassays in dieser Arbeit demonstriert, dass p10 über den klassischen Imp α/β abhängigen Importweg transportiert wird und dass dafür die ersten 20 Aminosäuren essentiell sind. Dies korrelierte mit den Ergebnissen von Bindungsstudien, die die Interaktion des p10-WT Proteins, nicht aber einer N-terminal trunkeierten Mutante p10 21-87, mit Imp α nachwies. Interessanterweise ist der N-terminale Bereich in p10 Proteinen verschiedener Virusstämme konserviert, was auf eine wichtige Funktion hindeutet (Nowotny et al., 2000). Dass die p10/Imp α -Komplexe auch *in vivo* in Abwesenheit anderer viraler Proteine in der Zelle gebildet werden, wurde mit Hilfe eines Ko-Immünpräzipitationsexperimentes gezeigt. Für die Bildung dieses Komplexes ist Imp β offensichtlich nicht erforderlich, da eine Imp α Mutante ohne die Imp β bindende Domäne (Δ IBB bzw. Δ 1-65) ebenfalls mit p10 interagierte. Das Adapterprotein Imp α hat sich im Laufe der Evolution entwickelt, um dem Imp α/β abhängigen Kernimport Diversität zu verleihen. Während es nur ein Imp β gibt, ist die Imp α Genfamilie expandiert: Das Genom der Hefe *S. cerevisiae* kodiert für ein Imp α , beim Menschen sind es dagegen sechs Isoformen, die sich in drei Gruppen unterteilen lassen (I. α 1; II. α 3, α 4; III. α 5, α 6, α 7) und zumeist ubiquitär exprimiert werden. Sämtliche eukaryontische Zellen

besitzen das Importin α der Gruppe eins, aus dem sich alle weiteren Isoformen entwickelt haben. Die Gruppen zwei und drei treten erstmals in Metazoen auf. Dies spricht für gewebs- und zellspezifische Aufgaben (Goldfarb et al., 2004, Malik et al., 1997). So werden z.B. während der Spermatogenese bei *Drosophila* alle drei Imp α -Isoformen zu bestimmten Zeitpunkten und über einen definierten Zeitraum unterschiedlich exprimiert (Giarre et al., 2002).

Bisherige Studien weisen darauf hin, dass einige Importssubstrate bevorzugt an bestimmte Imp α -Isoformen binden (Kohler et al., 1999). Dies gilt sowohl für zelluläre als auch für virale Proteine: Zum Beispiel werden die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 als Homo- bzw. Heterodimere bevorzugt von Imp $\alpha 5$ gebunden (Fagerlund et al., 2002), während NF- κ B präferenziell mit den Importinen $\alpha 3$ und $\alpha 4$ interagiert (Fagerlund et al., 2005). Das adenovirale E1A Protein bindet lediglich an Imp $\alpha 3$ (Kohler et al., 2001) und das W Protein des Nipahvirus bindet bevorzugt an die Importine $\alpha 3$ und $\alpha 4$ (Shaw et al., 2005). Das virale p10 Protein konnte mit allen getesteten Importin-Isoformen ($\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$) interagieren, die in gereinigter Form angeboten wurden. Sie repräsentieren die drei Subfamilien, die Sequenzunterschiede von bis zu 50 % aufweisen. Ähnliche Beobachtungen wurden bezüglich des UL84 Proteins von hCMV gemacht, welches ebenfalls ein unkonventionelles NLS aufweist, das mit Vertretern aller Subfamilien interagiert (Lischka et al., 2003). Diese Eigenschaft könnte eine Strategie einiger Viren darstellen, um den Kernimport in einem breiten Spektrum verschiedener Zellen sicherzustellen.

4.2.2 Mutationsanalyse des N-terminalen Bereiches von p10

In der vorliegenden Arbeit erwies sich der zelluläre Importapparat als unerwartet flexibel, da p10 trotz eines fehlenden klassischen NLS über den Imp α/β abhängigen Importweg in den Zellkern transportiert wurde. Deshalb war es von Interesse, die topogene Sequenz im N-terminalen Bereich des viralen Proteins zu charakterisieren. Hierfür wurden acht Di-Alanin-Austausch-Mutanten zwischen den AS 4 - 19 generiert:

⁴DL RL TL LE LV RR LN GN¹⁹. Innerhalb dieser Region befinden sich lediglich drei basische Argininreste an den Positionen 6, 14 und 15, die ansonsten keine Homologie zur minimalen Konsensussequenz klassischer NLS-Sequenzen („K [K/R] X K/R“) aufweist und in der X für die Aminosäuren Arg, Lys, Pro, Val oder Ala steht (Chelsky et al., 1989).

In den GST-Ko-Präzipitationsexperimenten wurden neben den basischen auch neutrale AS als wichtige Determinanten für die Imp α -Bindung identifiziert, da deren Mutation zu Alanin die Interaktion von p10 mit Imp α signifikant beeinträchtigt. Die Röntgenkristall-Strukturanalyse eines Komplexes der murinen Importin α 2-Isoform und Peptiden, die ein klassisches NLS enthielten, trugen maßgeblich zum Verständnis der NLS-Bindung auf atomarer Ebene bei (Fontes et al., 2000). So gelang es Bindungstaschen zu identifizieren, die mit definierten Aminosäureseitenketten der NLS-Sequenz interagieren (siehe Abb. 4.1).

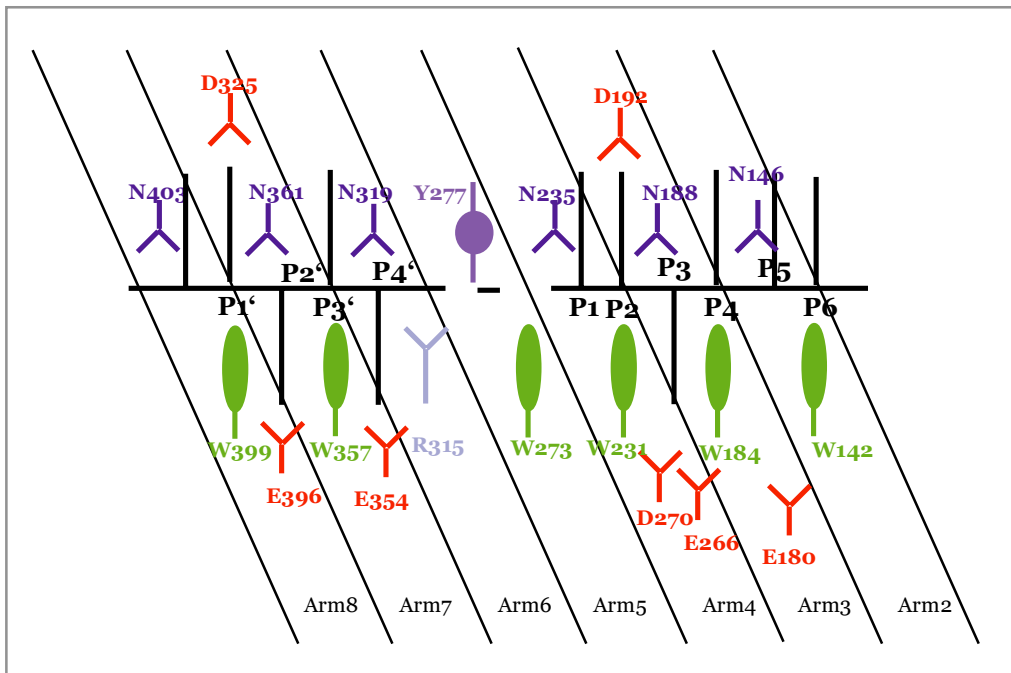


Abb. 4.1: Schematisches Diagramm der Interaktion eines NLS-Peptides mit Imp α .

Das NLS „backbone“ ist als schwarze Linie dargestellt, von der die AS Seitenketten als senkrechte Linien abzweigen. Die schräg verlaufenden Linien grenzen die einzelnen „Arm repeats“ ab. Einige Importin α Seitenketten, die mit dem NLS-Peptid interagieren, sind farbig dargestellt: Die nicht variablen Asparagin-Reste in violett, die Tryptophan-Seitenketten in grün und einige negativ geladene AS-Reste in rot. Y277 und R315 unterbrechen das regelmäßige Trp-Muster und sind ebenfalls gezeigt (Fontes et al., 2000).

Die regelmäßig angeordneten Asparagin-Reste interagieren mit den Carbonylgruppen des Peptid - „Backbones“ und die Tryptophan-Seitenketten bilden hydrophobe Vertiefungen, in die sich lang gestreckte AS-Seitenketten einlagern können. Entscheidend für die Bindung basischer Aminosäuren innerhalb des NLS sind vor allem die Aspartat-Reste an den Positionen 192 und 270, die die Bindungstaschen P2 und P3 innerhalb der „major binding site“ formen. Monopartite NLS-Peptide können alternativ auch an die „minor binding site“ binden, wogegen bipartite NLS-Peptide mit beiden Bindungsstellen

gleichzeitig interagieren. Aus diesen Informationen und den Daten der Mutationsanalyse des p10 Proteins kann postuliert werden, dass die Arginin-Reste in den Positionen 14 und 15 möglicherweise die beschriebenen Bindungstaschen für die Interaktion mit Imp α benutzen, so dass die AS 13 - 18 (VRRLNG) innerhalb der „major binding site“ (P1 - P6) binden könnten. Dabei scheinen auch die nicht-basischen AS essentiell für die Stabilisierung der Interaktion zu sein, da einzelne Mutationen in diesem Bereich zu einer mindestens fünffach schlechteren Imp α -Bindung führten. In *in vitro* Importexperimenten wurden diese Ergebnisse auch auf funktionaler Ebene untermauert. Während die Mutante p10 A10/11 in den Zellkern importiert wurde, blieb die Translokation von p10 A6/7 aus. Wie kann man aber die Tatsache erklären, dass auch Mutationen an den Positionen 6 - 9 nicht toleriert werden, obwohl diese gemäß des vorgeschlagenen Modells außerhalb der eigentlichen NLS-Bindungsstelle mit Imp α interagieren (vgl. Abb. 4.2)?

	<u>P₁</u>	<u>P₂</u>	<u>P₃</u>	<u>P₄</u>	<u>P₅</u>	<u>P₆</u>
SV40 T-Antigen	P	K	K	K	R	K V
c-Myc	P	A	A	K	R	V K L D
BDV p10 (6-19)	R	L	T	L	L	E L V R R L N G N

Abb. 4.2: Vergleich der Aminosäuren 6 - 19 des BDV-p10 Proteins mit oligobasischen NLS-Sequenzen.

Die NLS-Sequenzen des SV40 T-Antigens und des c-myc Proteins wurden den entsprechenden Bindungstaschen zugeordnet. Diese wurden anhand von Röntgenkristallstrukturen des Imp α s aus Hefe bzw. Maus definiert (Conti et al., 1998, Fontes et al., 2000). Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wurden die AS 6 - 19 des p10 Proteins in das abgebildete Raster eingeordnet. Die AS-Positionen von p10, deren Mutation zu einer Reduktion der Imp α -Bindung auf unter 10 % führte, sind in Fettdruck dargestellt.

Für bipartite NLS-Sequenzen wurde gezeigt, dass die Linkerregion zwischen den basischen Clustern spezifische Kontakte mit dem Adapterprotein Imp α eingeht (Fontes et al., 2003). Dies deutet darauf hin, dass die AS-Sequenz dieser Region nicht beliebig variabel sein darf. Berücksichtigt man diese Erkenntnis, kann spekuliert werden, dass die AS 6 - 9 durch spezifische Interaktionen mit der Linkerregion die NLS-Bindung stabilisieren. Des Weiteren wurde am Beispiel des SV40 T-Ag NLS demonstriert, dass die Signalsequenz flankierenden AS die Bindungsspezifität und -affinität an Imp α beeinflussen, so dass z.B. das NLS-Peptid des T-Ag andere Bindungseigenschaften als das vollständige T-Ag aufwies (Melen et al., 2003). Am Beispiel des ungewöhnlichen NLS des hCMV Proteins UL84 wurde in ähnlicher Weise deutlich, dass ein oligobasischer Bereich, der theoretisch einem

klassischen NLS entspricht, nicht ausreichend war, um Kernimport zu vermitteln, und dass außerdem zwei Leuzin-reiche Sequenzelemente benötigt wurden (Lischka et al., 2003). Eine ähnliche Rolle scheinen auch die Leuzinreste innerhalb des N-terminalen Bereiches von p10 zu spielen, die sich in der Mutationsanalyse als wichtige Determinante für die Imp α Bindung erwiesen.

Mutationsanalysen der Importin $\alpha 3$ -Isoform zeigten, dass der Importrezeptor für klassische und nicht-klassische NLS-Sequenzen unterschiedliche Bindedomänen nutzen kann. So wird das unkonventionelle NLS des Influenza A-Virus Nukleoproteins bevorzugt von der C-terminalen „minor binding site“ gebunden. Dementsprechend vermochte ein Imp α -Molekül zugleich mit einem klassischen (SV40 T-Ag) und einem nicht-klassischen (Nukleoprotein des Influenza A-Virus) NLS zu interagieren (Melen et al., 2003). Mit Blick auf diese Befunde wäre es von Interesse, die p10-Interaktionsdomäne innerhalb von Importin α zu kartieren.

4.2.3 Die Funktion von nukleärem p10 im Kontext einer BDV-Infektion

Das p10 Protein wurde kürzlich in Minireplikonexperimenten als negativer Regulator der viralen Polymerase identifiziert (Schneider et al., 2003). Deren biosynthetische Aktivität ist stark von dem molaren Verhältnis zwischen dem Nukleoprotein (N) und dem Phosphoprotein (P) beeinflusst. p10 interagiert mit P und wurde in Komplexen mit P und N detektiert. Es könnte daher in der Lage sein, das P:N Verhältnis durch Interaktion mit P dosisabhängig zu deregulieren. Weiterhin inhibieren p10-Mutanten, die nicht mit P interagieren, die Polymeraseaktivität nicht (Poensch et al., 2004). Das NLS von p10 könnte demzufolge wichtig sein, um seinen nukleären Import unabhängig von anderen viralen Proteinen zu steuern. Interessanterweise überlappt die p10-Bindedomäne von P mit einer Phosphorylierungsstelle von P an Position Ser86 und könnte dadurch dessen Funktion als Kofaktor der viralen Polymerase beeinträchtigen. Dafür spricht u.a., dass P-Mutanten ohne Phosphorylierungsstellen nicht mehr mit der viralen Polymerase interagieren (Walker et al., 2000).

Kobayashi und Mitarbeiter beobachteten die zytoplasmatische Retention von P durch Interaktion mit p10 im Zytoplasma und diskutieren diese als Ursache für das inhibitorische

Potenzial von p10. Da die P-Bindedomäne und das NLS von p10 überlappen, vermittelt letzteres keinen Import des Komplexes. Weshalb das NLS von P nicht kompensierend wirkt ist fraglich und spricht für ein Modell, in dem der p10/P-Komplex durch einen noch nicht bekannten zytoplasmatischen Faktor im Zytosol zurückgehalten wird (Kobayashi et al., 2003). Möglicherweise übt p10 jedoch auch weitere bisher unbekannte Funktionen im Nukleus aus. Die Generierung rekombinanter Viren mit einem p10 Protein ohne funktionales NLS wäre ein geeignetes Werkzeug, um diese Frage zu beantworten.

Die gezeigten Ergebnisse charakterisieren p10 als eines der ersten Beispiele dafür, dass auch Proteine ohne klassisches NLS Imp α/β abhängig in den Zellkern importiert werden. Demnach sind die Determinanten für die Interaktion zwischen Importsubstraten und ihren Rezeptoren offenbar variabler als allgemein angenommen. Die Vorhersage topogener Sequenzen wird dadurch erschwert, dass allein oligobasische Sequenzbereiche kein ausreichendes Kriterium für den karyophilen Charakter eines Proteins sind.

4.3 Identifizierung und Charakterisierung des BDV-P Proteins als Typ I Interferon-Antagonist

Zellen höherer Eukaryonten verfügen über verschiedene Abwehrmechanismen gegen eindringende Pathogene. Das Typ I Interferon (IFN)-System gilt als äußerst potent und wird als unmittelbare Antwort auf Virusinfektionen mit dem Ziel aktiviert, die Virusausbreitung lokal einzugrenzen. Im Zuge der Koevolution mit ihrem Wirt haben viele Viren ihrerseits Strategien entwickelt, um die zellulären Abwehrmechanismen zu unterlaufen oder sie gezielt zu antagonisieren. Ein derartiger Mechanismus war für das Bornavirus vor Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.

4.3.1 Das BDV-P Protein inhibiert die virale Aktivierung von IRF3 und die Induktion des IFN- β Gens

In einem initialen Reportergenexperiment wurde der Einfluss verschiedener BDV-Proteine auf die Virus induzierte IFN- β Promotoraktivierung analysiert. Die Aktivierung des IFN- β Gens erfolgte durch Infektion mit der Influenza A Δ NS1-Virusmutante, die aufgrund einer Deletion im NS1-Leserahmen ein starker IFN-Induktor ist, oder durch Infektion mit dem Sendaivirus. Dabei wurde das P Protein als einziges der untersuchten BDV-Proteine als

Inhibitor der Virus induzierten IFN- β Promotoraktivierung identifiziert. Verglichen mit dem Interferon-Antagonisten des Ebolavirus VP35 (Basler et al., 2000) erwies sich P in diesen Experimenten zwar als weniger effizient, jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Stimulierung des IFN- β Promotors durch die Infektion mit heterologen Viren herbeigeführt wurde. Verglichen mit Influenza- oder Ebolaviren replizieren Bornaviren wesentlich langsamer. Es kann daher vermutet werden, dass die Bildung von dsRNA als Auslöser der zellulären antiviralen Abwehr im Zuge der BDV-Transkription und Replikation weniger stark erfolgt, und dass das P Protein den Anforderungen als viraler IFN-Antagonist im Kontext einer BDV-Infektion vollends genügt. Dies wird auch durch Beobachtungen früherer Experimente bestätigt. Mittels RT-PCR wurde demonstriert, dass IFN- α (Typ I IFN) Transkripte im Großhirn akut BDV infizierter Ratten nicht induziert wurden (Shankar et al., 1992). Weiterhin zeigte sich in IFN- α Rezeptor „knock out“ Mäusen (IFNAR^{-/-}), dass die Virusausbreitung im Vergleich zu Kontrolltieren unverändert war (Allmang et al., 2001). In den vorliegenden Experimenten zeigte P die Fähigkeit, die Induktion des IFN- β Promotors zu inhibieren. Jedoch war es nicht in der Lage, die Stimulierung eines ISRE-Promotors durch exogen appliziertes IFN zu beeinträchtigen. Dies bedeutet, dass P im Gegensatz zu anderen viralen IFN-Antagonisten das „IFN-Signaling“ nicht negativ reguliert.

Die Durchführung analoger Reporterexperimente in persistent BDV infizierten Zellen erwies sich als problematisch. Unseren Beobachtungen zufolge war die absolute Aktivierung des Reportergens in verschiedenen Experimenten relativ variabel und u.a. abhängig von der Zelllinie, -passage und von der für die Stimulierung eingesetzten Viruspräparation. Dementsprechend gestaltete es sich schwierig, eine Bezugsgröße für persistent BDV infizierte Zellen zu definieren. Die Relevanz des P Proteins als IFN-Antagonist im Kontext einer BDV-Infektion wurde in anderen Experimenten gezeigt (Abb. 3.18 und 3.28) und wird an anderer Stelle diskutiert (S. 69, 81).

Der Fokus der folgenden Experimente war darauf gerichtet, die molekularen Ursachen der durch P vermittelten IFN- β Antagonisierung zu charakterisieren. Im Hinblick auf die zentrale Bedeutung des Transkriptionsfaktors IRF3 für die IFN- β Promotorinduktion wurde zunächst der Einfluss von P auf dessen Aktivierung analysiert. Nach derzeitiger Kenntnis wird diese durch eine Signalkaskade ausgelöst, an deren Beginn die Erkennung intrazellulärer dsRNA durch die Helikasen RIG-I bzw. mda-5 steht (Andrejeva et al.,

2004, Yoneyama et al., 2004). Diese interagieren mit dem kürzlich identifizierten Protein „Interferon- β promoter stimulator 1“ (IPS-1) (Kawai et al., 2005). IPS-1 wurde zeitgleich in drei weiteren Publikationen als MAVS, VISA bzw. Cardif beschrieben (Meylan et al., 2005, Seth et al., 2005, Xu et al., 2005). Übereinstimmend zeigen alle Autoren, dass IPS-1 den Kontakt zwischen den dsRNA-Sensoren RIG-I bzw. mda-5 und den IRF3-Kinasen TBK1 bzw. IKK ϵ und deren Substrat vermittelt (siehe Abb. 1.11 der Einleitung). Dabei erfolgt die Interaktion zwischen IPS-1 und TBK1 nicht direkt, sondern über die Adapterproteine, TANK bzw. NAP1 (Pomerantz & Baltimore, 1999, Sasai et al., 2005). Die Erkennung extrazellulärer dsRNA erfolgt TRIF abhängig durch TLR3. Beide Signalwege konvergieren auf Höhe der IRF3 Kinasen TBK1 und IKK ϵ . Diese Tatsache unterstreicht die wichtige Rolle von IRF3 für zelluläre antivirale Reaktionen und prädestiniert es als Angriffsziel vieler viraler IFN-Antagonisten. Das Rotavirus NSP1 Protein induziert z.B. die Degradation von IRF3 (Barro & Patton, 2005) und N^{pro} des Schweinepestvirus verhindert die Transkription von *irf3* (La Rocca et al., 2005). Es ist weiterhin bekannt, dass auch andere virale Proteine mit der Aktivierung von IRF3 interferieren (ML Protein des Thogotovirus, VP35 Protein des Ebolavirus), jedoch sind die Mechanismen derzeit noch nicht genau verstanden.

Dass das BDV-P Protein ähnlich inhibitorisch auf die IRF3-Aktivierung wirkt, wurde in einem Experiment gezeigt, in dem die Virus induzierte Aktivierung eines IRF3 responsiven Promotors analysiert wurde. P erwies sich auch hier als Inhibitor dieser Aktivierung. Innerhalb der *Mononegavirales* ist P somit nicht nur als Kofaktor der viralen Polymerase, sondern auch als Inhibitor der IRF3-Aktivierung ein Funktionsanalogon des Ebola VP35 Proteins und des P Proteins des Tollwutvirus (Basler et al., 2003, Brzozka et al., 2005).

In der inaktiven Form liegt IRF3 im Zytoplasma vor und seine nukleäre Akkumulation ist ein Hinweis auf dessen Aktivierung. Die in dieser Arbeit nachgewiesene zytoplasmatische Lokalisierung des Transkriptionsfaktors mittels Immunhistochemie in Gehirnschnitten von akut BDV infizierten Ratten, bzw. durch Immunfluoreszenz persistent infizierter MDCKII Zellen deutet demnach darauf hin, dass eine BDV-Infektion nicht zur Aktivierung von IRF3 führt bzw. diese unterdrückt. In dieser Hinsicht unterscheidet sich das Bornavirus von anderen Vertretern der *Mononegavirales*, wie z.B. dem Masernvirus und VSV (Servant et al., 2001). Die Funktion des P Proteins als Inhibitor der IRF3-Aktivierung wurde aufgrund dieser Beobachtung auch im Kontext einer BDV-Infektion bestätigt. In Übereinstimmung

damit wurde in einer anderen Arbeit mittels eines EMSA-Experimentes gezeigt, dass in akut BDV infizierten CRL Zellen die Aktivierung von IRF3/7 ausbleibt (Bourteele et al., 2005).

4.3.2 BDV-P inhibiert TBK1 vermittelte IRF3-Aktivierung

IRF3 wird in einem mehrstufigen Prozess aktiviert: I. Phosphorylierung durch TBK1/IKK ϵ (Fitzgerald et al., 2003, Sharma et al., 2003), II. Dimerisierung, III. nukleäre Translokation (durch einen noch nicht charakterisierten Importmechanismus) und IV. Bildung eines transkriptionsaktiven Komplexes mit CBP. Im Kontext einer Virusinfektion ist es aufgrund der Komplexität der potenziell aktivierten Signalwege schwierig, die Rolle einzelner Signalproteine bei der IRF3-Aktivierung zu untersuchen und daher den Angriffspunkt des viralen IFN-Antagonisten auf molekularer Basis zu identifizieren. In dieser Arbeit wurde deshalb eine Strategie gewählt, IRF3 durch Überexpression definierter Signalmoleküle zu aktivieren und den Einfluss von koexprimiertem P auf diesen Prozess zu analysieren. Der initiale Schritt der IRF3-Aktivierung ist seine Phosphorylierung durch TBK1. Es stellte sich daher die Frage, ob das P Protein diesen TBK1 induzierten Prozess negativ beeinflussen kann.

Zum Zeitpunkt als in Experimenten eine mögliche Inhibition der TBK1 abhängigen IRF3 Aktivierung durch das P Protein untersucht wurde, war über die Signaltransduktion oberhalb von TBK1, besonders was die Erkennung intrazellulärer dsRNA angeht, nur wenig bekannt. Das Adapterprotein TRIF wurde als wichtiges Signalmolekül der TLR3-Signalkaskade, welche durch exogene dsRNA ausgelöst wird, beschrieben (Yamamoto et al., 2003). Es interagiert mit TBK1 bzw. IKK ϵ und seine Überexpression bewirkt die Aktivierung von IRF3 durch TBK1, da die Koexpression einer dominant negativen TBK1-Kinasemutante die Inhibition dieses Prozesses zur Folge hat (Fitzgerald et al., 2003, Jiang et al., 2004). Dementsprechend stimulierten in den hier gezeigten Experimenten sowohl TRIF als auch TBK1 die Induktion von IRF3 responsiven Promotoren (PRDI/III, ISG56 und ISRE Promotoren). In beiden experimentellen Ansätzen zeigte das P Protein die Fähigkeit, die IRF3-Aktivierung sehr effizient dosisabhängig zu inhibieren. Diese Ergebnisse zeigten, dass P entweder auf TBK1 oder innerhalb der Signalkaskade unter der Kinase, in keinem Fall jedoch darüber, inhibitorisch wirkt. Damit unterscheidet es sich z.B. vom Hepatitis C Virus (HCV), einem RNA-Virus mit einzelsträngigem RNA-Genom in

Plusstrangorientierung, dessen Protease NS3/4A sowohl TRIF degradiert als auch RIG-I abhängige Signalwege oberhalb von TBK1/IKK ϵ blockiert (Breiman et al., 2005, Li et al., 2005). Ein ähnlicher Mechanismus zeichnet sich auch für das Hepatitis A Virus (HAV) ab, das durch ein nicht benanntes virales Genprodukt den Signalweg zwischen TRIF und TBK1 inhibiert (Fensterl et al., 2005). Ergänzend soll darauf hingewiesen werden, dass BDV-P auch IKK ϵ induzierte IRF3-Aktivierung inhibiert (Daten nicht gezeigt). Es kann daher spekuliert werden, dass das Bornavirus nicht nur die frühe Phase der Typ I IFN-Induktion sondern auch die spätere Amplifikation durch IKK ϵ /IRF7 inhibiert. Allerdings wurde IKK ϵ im Zuge der folgenden Experimente nicht weitergehend untersucht.

Basierend auf dem Befund, dass IRF3 in BDV infizierten Zellen nicht aktiviert wird, wurde in einem Ko-Präzipitationsexperiment überprüft, ob P einen Einfluss auf die Bildung von IRF3/CBP-Komplexen besitzt. Aktivierte IRF3-Homodimere formen im Nukleus mit dem Ko-Aktivator CBP einen transkriptionsaktiven Holokomplex, der Voraussetzung für die Bindung an IRF3 responsive Promotorelemente ist (Suhara et al., 2002, Yoneyama et al., 1998). In der Tat zeigte sich, dass steigende Mengen des exprimierten P Proteins die Bildung der durch TBK1 induzierten IRF3/CBP-Komplexe signifikant verringern konnte. Es ist bekannt, dass die C-terminale Phosphorylierung von IRF3 Voraussetzung für die IRF3/CBP-Interaktion ist. Daher wurde spekuliert, ob P diese posttranslationale Modifikation von IRF3 inhibieren kann.

IRF3 besitzt im C-terminalen Bereich zwei Cluster potenzieller Phosphorylierungsstellen, die entscheidend für seine Aktivierung sind. Verschiedene Arbeiten haben die Positionen Ser386 und Ser396 als Phosphorylierungsstellen der IRF3-Kinasen TBK1 und IKK ϵ identifiziert, wobei Ser396 bevorzugt phosphoryliert zu werden scheint (McWhirter et al., 2004, Mori et al., 2004, Sharma et al., 2003). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von P auf TBK1 vermittelte IRF3-Phosphorylierung durch die Verwendung eines phosphospezifischen Antikörpers für Ser396 analysiert. Eine Virusinfektion induziert hyperphosphorylierte IRF3-Formen, die im SDS-Gel durch ein verlangsamtes Laufverhalten sichtbar werden. Auch die Expression von TBK1 führte zu einem solchen „Shift“, in dessen Folge vier IRF3-Banden detektiert wurden. Interessanterweise bewirkten steigende Mengen koexprimierten P Proteins, dass beide höher laufende Formen nicht mehr detektiert wurden, was auf eine Inhibition der Phosphorylierung in Gegenwart von P hinweist. Dieser Befund wurde durch den phosphospezifischen Antikörper bestätigt. Wird

TBK1 exprimiert, erscheinen zwei langsamer laufende phosphoSer396-spezifische Banden, die wie zuvor beschrieben durch P dosisabhängig an Intensität verlieren. Das Auftreten von zwei spezifischen Banden zeigt eine zusätzliche Modifikation, möglicherweise an der bereits erwähnten Position Ser386, an. P verhindert demnach die durch TBK1 vermittelte IRF3-Phosphorylierung und somit dessen Aktivierung. Das bereits erwähnte P Protein des Tollwutvirus bewirkte in ähnlichen Experimenten ebenfalls die Inhibition der IRF3-Phosphorylierung durch TBK1. Die zugrunde liegenden Mechanismen bleiben in dieser Publikation jedoch spekulativ (Brzozka et al., 2005).

Auf der Suche nach möglichen Ursachen für die Inhibition der IRF3-Phosphorylierung durch P konnte in Immunokomplex-Kinaseassays demonstriert werden, dass das virale Phosphoprotein die TBK1-Kinaseaktivität, gemessen an der Phosphorylierung eines natürlichen Substrates, deutlich inhibiert. Die Quantifizierung unter Berücksichtigung der tatsächlich im Experiment eingesetzten Menge an TBK1 zeigt, dass die Kinaseaktivität bei einem 2:1 Verhältnis von transfiziertem TBK1- zu P-Plasmiden bereits auf neun Prozent reduziert ist. Auch in BDV infizierten Zellen wird TBK1 signifikant inhibiert und zeigt eine Aktivität von lediglich 15 %, verglichen mit nicht infizierten Zellen. Diese Tatsache führt zu der wichtigen Erkenntnis, dass P auch im Kontext der Virusinfektion einen sehr potenten Inhibitor der IRF3-Aktivierung darstellt.

4.3.3 BDV-P ist ein Bindungspartner und ein Substrat von TBK1

Die Inhibition der TBK1-Aktivität durch P impliziert eine mögliche Interaktion beider Proteine. Ein Ko-IP Experiment zeigte eindeutig, dass P in Lysaten von TBK1-flag und P exprimierenden Zellen einen Komplex mit TBK1 bildet. Diese Kopräzipitation erfolgte, wenngleich weniger effizient, auch in Lysaten BDV infizierter Zellen. Dabei ist zu bedenken, dass P in infizierten Zellen auch mit anderen viralen Proteinen interagiert, die eine Bindung an TBK1 mindern könnten. Der Versuch, in einem analogen Experiment endogenes TBK1 zu präzipitieren, scheiterte an der ungenügenden Spezifität des zur Verfügung stehenden TBK1 spezifischen Antikörpers. Kürzlich erschienene Publikationen beschreiben ebenfalls eine Interaktion viraler Proteine mit TBK1. Dazu gehört das HCV NS3 Protein, welches TBK1 und IKK ϵ bindet. Diese Interaktion wirkt sich inhibitorisch auf die Bindung zwischen TBK1 und dem authentischen Substrat IRF3 aus. Es wurde vorgeschlagen, dass dies die Ursache für die Inhibition TBK1 vermittelter IFN- β

Promotoraktivierung durch das NS3 Protein ist (Otsuka et al., 2005). Das N1L Protein des Vacciniavirus (*Poxviridae*) ist ebenso in der Lage, mit TBK1 zu interagieren und ist ein Beispiel dafür, dass die Kinase auch Angriffspunkt von DNA-Viren sein kann (DiPerna et al., 2004).

Interessanterweise wurde P in Gegenwart koexprimierter TBK1 als Doppelbande im Western Blot detektiert, die in den Präzipitaten angereichert war. Da eine Phosphatasebehandlung zur starken Reduktion der langsamer laufenden Bande führt, scheint es sich dabei um eine phosphorylierte P Form zu handeln. Schließlich konnte in einem weiteren *in vitro* Kinaseassay demonstriert werden, dass P ein TBK1-Substrat ist und genauso effizient phosphoryliert wird wie das authentische Substrat $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Das Konsensus-Phosphorylierungsmotiv der endogenen TBK1/IKK ϵ -Substrate $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und IRF3 wurde als *SerXXXSer* beschrieben (Shimada et al., 1999, tenOever et al., 2004). Es ist bemerkenswert, dass auch das BDV-P Protein in seinem N-Terminus ein solches Motiv enthält: ³SSLVDSL⁹, das in verschiedenen BDV-Stämmen konserviert ist. Des Weiteren zeigten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und P Sequenzhomologien innerhalb der flankierenden Bereiche (vgl. Abb. 3.32, S. 84). Ob die Zielsequenz für TBK1-Phosphorylierung tatsächlich in diesem Motiv liegt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, aber erste Experimente legen diesen Schluss nahe. Eine N-terminal trunkierte P-Mutante (AS 88-201) war nicht mehr in der Lage, TBK1 induzierte IFN- β Promotoraktivierung zu inhibieren, wogegen sich die C-terminal trunkierten Mutanten 1-133 und 1-183 wie der Wildtyp verhielten (Daten in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt) (Unterstab et al., 2005). Zusammenfassend kann daher postuliert werden, dass die Bindung an und die Phosphorylierung durch die Kinase TBK1 Grund für die Inhibition der IRF3-Aktivierung ist. P könnte als Pseudosubstrat die IRF3-Phosphorylierung kompetitiv inhibieren (vgl. Abb. 4.3). Ein prominentes Beispiel für die Inhibition zellulärer Kinasen durch virale Pseudosubstrate stellt die IFN induzierbare Proteinkinase R dar. Durch Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α inhibiert sie die Translation zellulärer und viraler Proteine und inhibiert somit die Virusreplikation. Sowohl das Vacciniavirus als auch HCV kodieren für Proteine, die mit eIF2 α um die Bindung an PKR konkurrieren (Kawagishi-Kobayashi et al., 1997, Taylor et al., 1999).

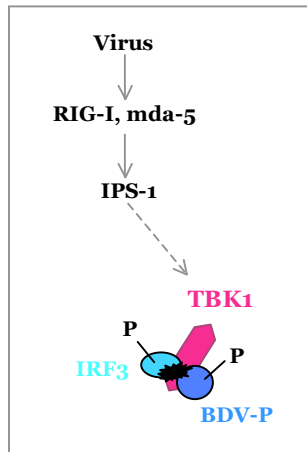


Abb. 4.3: Modell eines kompetitiven Inhibitionsmechanismus.

Die Detektion von dsRNA viralen Ursprungs bewirkt die Aktivierung der IRF3-Kinase TBK1. Das BDV-P Protein kann ebenso wie das endogene Substrat sowohl mit TBK1 interagieren und auch durch TBK1 phosphoryliert werden. Vermutlich führt diese Tatsache zu einer Konkurrenz zwischen IRF3 und BDV-P um Bindung an und Phosphorylierung durch TBK1 und ist ursächlich für die Inhibition der IRF3-Aktivierung.

Wenn das Modell der kompetitiven Inhibition der TBK1/IRF3 Interaktion durch P zutreffend ist, müsste man erwarten, dass diese Komplexbildung durch koexprimiertes P beeinträchtigt wird. Eine Komplexbildung von TBK1 und IRF3 konnte mittels Ko-IP nicht detektiert werden, wogegen dies für TBK1/P unter denselben Bedingungen gelang. Dies spricht für eine stabilere Bindung zwischen der Kinase und dem viralen Protein im Vergleich zum endogenen Substrat. Steigende Mengen an koexprimiertem IRF3 führten dazu, dass die TBK/P-Interaktion dosisabhängig schwächer wurde. Dies ist gleichbedeutend mit einer Konkurrenz zwischen P und IRF3 um Bindung an TBK1. Außerdem wurde auch die P spezifische Doppelbande im Gesamtzelllysat in Anwesenheit von IRF3 nicht mehr detektiert. IRF3 scheint daher unmittelbar mit der TBK1 abhängigen Phosphorylierung von P zu interferieren. Dieses Experiment ist ein weiteres Indiz für eine kompetitive Inhibition von IRF3 durch P.

4.3.4 Die IFN antagonistische Aktivität des BDV-P Proteins führt zu einer verstärkten Replikation eines IFN sensitiven Virus

Für das Bornavirus wurde die Bedeutung von BDV-P als IFN-Antagonist in einem IFN-Bioassay demonstriert, in dem die Replikation eines IFN sensitiven Virus als Maß für biologisch aktives IFN bestimmt wurde. Mittels RT-PCR wurde zunächst gezeigt, dass TBK1-Expression die transkriptionelle Induktion des endogenen IFN- β Gens bewirkt und diese dosisabhängig durch P inhibiert wird. Übereinstimmend zeigt ein IFN- β ELISA, dass das Zytokin in den Überstand TBK transfizierter 293T Zellen sekretiert wird und seine Konzentration durch koexprimiertes P bis auf Hintergrundniveau abnimmt. Für das IFN-Bioassay wurden die Überstände von 293T Zellen (siehe ELISA) auf A549 Zellen transferiert, um durch die IFN induzierte Signalkaskade in diesen Zellen einen antiviralen

Status zu etablieren und anschließend das Viruswachstum des IFN sensitiven Virus VSV zu bestimmen. Dieser Weg wurde gewählt, weil 293T Zellen relativ wenig IFN produzieren und aufgrund der Expression des adenoviralen E1A Proteins nur schwer einen antiviralen Status etablieren können (Look et al., 1998). In A549 Zellen, die mit Überständen TBK1 transfizierter 293T Zellen präkonditioniert worden waren, zeigt VSV als Folge der antiviralen Wirkung des induzierten Interferons eine relativ langsame Replikationskinetik. Dienten 293T Zellen, die P koexprimierten, als „IFN-Donor“, so resultierte dies in einer deutlich schnelleren VSV-Wachstumskinetik und in ca. zwei Log-Stufen höheren Virustitern. Somit ist die IFN antagonistische Aktivität von P Ursache für die verstärkte Replikation eines IFN sensitiven Virus.

Vermutlich kodieren alle Viren für Genprodukte mit IFN antagonistischer Aktivität, um trotz der zellulären Immunabwehr effizient replizieren zu können. Deshalb sind Virusmutanten, denen der IFN-Antagonist fehlt, stark attenuiert und oft nur unter Laborbedingungen zu Replikation fähig. Erst vor wenigen Monaten gelang es, rekombinante Wildtyp-Bornaviren zu generieren. Die Herstellung von P defizienten BD-Viren stellt ein Problem dar, da P der Kofaktor der viralen RNA-Polymerase und deshalb für die Virusreplikation unentbehrlich ist. Wenn es gelänge, diese Funktion von seiner Funktion als IFN-Antagonist zu trennen, wäre die Möglichkeit gegeben, rekombinante Bornaviren zu generieren, die nicht mehr in der Lage sein sollten, die IFN-Induktion zu inhibieren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das BDV-P Protein ein potenter Antagonist des Typ I-IFN Systems ist. Es wurde als erstes virales Genprodukt charakterisiert, welches in der Lage ist, die Aktivität der IRF3-Kinase TBK1 zu inhibieren. Weiterhin interagiert P mit TBK1 und wird von der zellulären Kinase phosphoryliert. Auf der Basis dieser Befunde lässt sich ein Mechanismus der kompetitiven Inhibition der IRF3-Aktivierung durch P postulieren. TBK1 nimmt eine Schlüsselfunktion bei der IFN-Induktion ein, denn sowohl die TLR3/4 abhängigen Signalwege als Antwort auf extrazelluläre Stimuli (dsRNA bzw. LPS), als auch durch intrazelluläre dsRNA induzierte Signalkaskaden konvergieren hier. Ferner ist bekannt, dass IFN die adaptive Immunantwort moduliert, so dass seine Inhibition weit reichende Konsequenzen für die zelluläre Immunantwort zur Folge haben kann. Unter diesem Aspekt ist die Strategie der IFN-Antagonisierung durch das Bornavirus von großer Bedeutung.

4.4 Ausblick

Das Bornavirus ist ein vergleichsweise „junges“, relativ unerforschtes Virus. Erste Sequenzen des gesamten Genoms wurden erst 1994 publiziert (Briese et al., 1994) und kürzlich wurden die ersten rekombinanten BD-Viren generiert. Daher sind eine Fülle von grundsätzlichen Fragen zur Molekularbiologie und Pathogenese des Virus noch weitgehend unverstanden.

Die Identifizierung von p10 als karyophiles Proteins ist ein Hinweis darauf, dass es eine wichtige Funktion im Zellkern innehat. Es wurde als negativer Regulator der viralen Polymerase (L) beschrieben, jedoch ist der Mechanismus dieser Inhibition noch nicht ausreichend verstanden. Es wird derzeit ein Modell favorisiert, in dem die nukleäre Interaktion von p10 mit P, dem Kofaktor der viralen Polymerase (L), eine regulatorische Rolle spielt. Die Herstellung rekombinanter Virusmutanten ohne funktionales p10-NLS bzw. mit einem p10 Protein, das nicht mehr in der Lage ist, an P zu binden, könnte Aufschluss über den Mechanismus der Regulation der viralen Polymerase durch p10 geben. Außerdem sind Mutanten mit einem veränderten Phänotyp auch geeignet, um eventuelle weitere Funktionen von p10 im Zellkern abzuleiten. Aus zellbiologischer Sicht ist es von Interesse, die Region innerhalb von Imp α zu identifizieren, an die das NLS von p10 bindet. Wie zuvor erörtert, muss es sich dabei nicht zwingend um die „major binding site“ handeln. Es könnte auch sein, dass unkonventionelle NLS-Sequenzen auch mit Regionen von Importin α interagieren, die bisher nicht mit der Bindung karyophiler Proteine in Zusammenhang gebracht worden sind. Eine weitere unbeantwortete Frage ist, ob es außer Imp α noch weitere zelluläre Interaktionspartner von p10 gibt. Die fibrilläre Verteilung von solitär exprimiertem p10 im Zytoplasma weist auf die Interaktion mit einem zytoplasmatischen Protein hin. Dessen Identifizierung könnte Hinweise auf weitere Funktionen von p10 geben.

Die Mechanismen, die dem Bornavirus die Etablierung persistenter Infektionen erlauben, sind derzeit noch nicht gut verstanden. In der Literatur wurden verschiedene Szenarien diskutiert. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Interferon antagonistische Aktivität des BDV-P Proteins maßgeblich zur Persistenz beiträgt. So stellt sich weiterhin die Frage, welche Bereiche bzw. Aminosäuren innerhalb von P für die Interaktion mit und Phosphorylierung durch TBK1 kritisch sind. Auf der Basis solcher Erkenntnisse könnten

rekombinante Viren mit veränderten Phosphoproteinen generiert werden, anhand derer die Bedeutung des IFN-Antagonisten im Kontext einer BDV-Infektion studiert werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Inhibition der IRF3-Kinase TBK1 als virale Strategie beschrieben, durch die die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 blockiert wird. Möglicherweise verfolgen auch andere Viren diesen Weg, so dass die weitere Charakterisierung dieser Inhibition von allgemeinem Interesse ist.

5 Zusammenfassung

Das Borna Disease Virus (BDV, Bornavirus) besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom negativer Polarität und ist innerhalb der Ordnung *Mononegavirales* der Prototyp einer eigenen Virusfamilie, die der *Bornaviridae*. Eine außergewöhnliche Eigenschaft des Virus ist seine nukleäre Transkription und Replikation, eine weitere besteht in seiner Fähigkeit, als neurotropes Virus sowohl *in vivo* als auch *in vitro* persistente Infektionen zu etablieren. Die zugrunde liegenden Mechanismen sowohl der Replikation als auch der Persistenz sind derzeit noch unzureichend verstanden, auch deshalb, weil das Virus noch relativ „jung“ ist: Erste komplette Sequenzen des RNA-Genoms wurden 1994 publiziert und erst vor einigen Monaten gelang die Generierung rekombinanter Viren auf der Basis klonierter cDNA. Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen das p10 Protein und das Phosphoprotein (P), die von der gemeinsamen Transkriptionseinheit II in überlappenden Leserahmen kodiert werden.

Als im Kern der Wirtszelle replizierendes Virus ist das Bornavirus auf zelluläre Importmechanismen angewiesen, um den Kernimport aller an der Replikation beteiligten viralen Proteine zu gewährleisten. Das p10 Protein ist ein negativer Regulator der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (L). *In vitro* Importexperimente zeigten, dass p10 über den klassischen Importin α/β abhängigen Kernimportweg in den Nukleus transportiert wird. Dies war unerwartet, da p10 kein vorhersagbares klassisches Kernlokalisierungssignal (NLS) besitzt und weist darauf hin, dass der zelluläre Importapparat offensichtlich flexibler ist als allgemein angenommen. Die ersten 20 N-terminalen AS vermitteln sowohl Kernimport als auch die Bindung an den Importrezeptor Importin α . Durch Di-Alanin-Austauschmutagenese wurden die für diesen Transportprozess essentiellen AS identifiziert und die Bedeutung hydrophober und polarer AS-Reste demonstriert.

Die Fähigkeit des Bornavirus, persistente Infektionen zu etablieren, wirft die Frage auf, wie das Virus die zellulären antiviralen Abwehrmechanismen, insbesondere das Typ I Interferon (IFN)-System, unterwandert. Das virale P Protein wurde in dieser Arbeit als potenter Antagonist der IFN-Induktion charakterisiert. Es verhindert die Phosphorylierung des zentralen Transkriptionsfaktors IRF3 durch die zelluläre Kinase TBK1 und somit dessen Aktivierung. Der Befund, dass P mit TBK1 Komplexe bildet und zudem auch als Substrat für die zelluläre Kinase fungiert, erlaubt es, erstmalig einen Mechanismus zu postulieren, in dem ein virales Protein (BDV-P) als putatives TBK1-Pseudosubstrat die IRF3-Aktivierung kompetitiv hemmt.

Literaturverzeichnis

- Akira, S. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Adv Immunol* **78**, 1-56.
- Alcami, A., Symons, J. A. & Smith, G. L. (2000). The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN. *J Virol* **74**, 11230-9.
- Allmang, U., Hofer, M., Herzog, S., Bechter, K. & Staeheli, P. (2001). Low avidity of human serum antibodies for Borna disease virus antigens questions their diagnostic value. *Mol Psychiatry* **6**, 329-33.
- Andrade, M. A. & Bork, P. (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* **11**, 115-6.
- Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S. & Randall, R. E. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17264-9.
- Baeuerle, P. A. & Henkel, T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* **12**, 141-79.
- Bajramovic, J. J., Munter, S., Syan, S., Nehrbass, U., Brahic, M. & Gonzalez-Dunia, D. (2003). Borna disease virus glycoprotein is required for viral dissemination in neurons. *J Virol* **77**, 12222-31.
- Barro, M. & Patton, J. T. (2005). Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4114-9.
- Basler, C. F., Mikulasova, A., Martinez-Sobrido, L., Paragas, J., Muhlberger, E., Bray, M., Klenk, H. D., Palese, P. & Garcia-Sastre, A. (2003). The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **77**, 7945-56.
- Basler, C. F., Wang, X., Muhlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H.-D., Garcia-Sastre, A. & Palese, P. (2000a). The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *PNAS* **97**, 12289-12294.
- Basler, C. F., Wang, X., Muhlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H. D., Garcia-Sastre, A. & Palese, P. (2000b). The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12289-94.
- Beck, M., Forster, F., Ecke, M., Plitzko, J. M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W. & Medalia, O. (2004). Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* **306**, 1387-90.
- Berg, M., Ehrenborg, C., Blomberg, J., Pipkorn, R. & Berg, A. L. (1998). Two domains of the Borna disease virus p40 protein are required for interaction with the p23 protein. *J Gen Virol* **79** (Pt 12), 2957-63.
- Billich, C., Sauder, C., Frank, R., Herzog, S., Bechter, K., Takahashi, K., Peters, H., Staeheli, P. & Schwemmle, M. (2002). High-avidity human serum antibodies recognizing linear epitopes of Borna disease virus proteins. *Biol Psychiatry* **51**, 979-87.
- Biron, C. A. (2001). Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity* **14**, 661-4.
- Bode, L., Reckwald, P., Severus, W. E., Stoyloff, R., Ferszt, R., Dietrich, D. E. & Ludwig, H. (2001). Borna disease virus-specific circulating immune complexes, antigenemia, and free antibodies--the key marker triplet determining infection and prevailing in severe mood disorders. *Mol Psychiatry* **6**, 481-91.
- Bode, L., Stoyloff, R. & Ludwig, H. (2000). Human bornaviruses and laboratory strains. *The Lancet* **355**, 1462.
-

- Bode, L., Zimmermann, W., Ferszt, R., Steinbach, F. & Ludwig, H. (1995). Borna disease virus genome transcribed and expressed in psychiatric patients. *Nat Med* **1**, 232-6.
- Bogerd, H. P., Benson, R. E., Truant, R., Herold, A., Phingbodhipakkiya, M. & Cullen, B. R. (1999). Definition of a consensus transportin-specific nucleocytoplasmic transport signal. *J Biol Chem* **274**, 9771-7.
- Bourteele, S., Oesterle, K., Pleschka, S., Unterstab, G., Ehrhardt, C., Wolff, T., Ludwig, S. & Planz, O. (2005). Constitutive activation of the transcription factor NF-kappaB results in impaired borna disease virus replication. *J Virol* **79**, 6043-51.
- Breiman, A., Grandvaux, N., Lin, R., Ottone, C., Akira, S., Yoneyama, M., Fujita, T., Hiscott, J. & Meurs, E. F. (2005). Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. *J Virol* **79**, 3969-78.
- Briese, T., de la Torre, J. C., Lewis, A., Ludwig, H. & Lipkin, W. I. (1992). Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11486-9.
- Briese, T., Schneemann, A., Lewis, A. J., Park, Y. S., Kim, S., Ludwig, H. & Lipkin, W. I. (1994). Genomic organization of Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4362-6.
- Brzozka, K., Finke, S. & Conzelmann, K. K. (2005). Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **79**, 7673-81.
- Chalmers, R. M., Thomas, D. R. & Salmon, R. L. (2005). Borna disease virus and the evidence for human pathogenicity: a systematic review. *Qjm* **98**, 255-74.
- Chelsky, D., Ralph, R. & Jonak, G. (1989). Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Mol Cell Biol* **9**, 2487-92.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. & Muller, C. W. (1999). Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* **399**, 221-9.
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. & Kuriyan, J. (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* **94**, 193-204.
- Cros, J. F. & Palese, P. (2003). Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res* **95**, 3-12.
- Cubitt, B., Oldstone, C., Valcarcel, J. & Carlos de la Torre, J. (1994). RNA splicing contributes to the generation of mature mRNAs of Borna disease virus, a non-segmented negative strand RNA virus. *Virus Res* **34**, 69-79.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. & Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-21.
- Dauber, B., Heins, G. & Wolff, T. (2004). The influenza B virus nonstructural NS1 protein is essential for efficient viral growth and antagonizes beta interferon induction. *J Virol* **78**, 1865-72.
- de la Torre, J. C. (1994). Molecular biology of borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *J Virol* **68**, 7669-75.
- Deonarain, R., Verma, A., Porter, A. C., Gewert, D. R., Plataniias, L. C. & Fish, E. N. (2003). Critical roles for IFN-beta in lymphoid development, myelopoiesis, and tumor development: links to tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13453-8.
- Didcock, L., Young, D. F., Goodbourn, S. & Randall, R. E. (1999). The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. *J Virol* **73**, 9928-33.

- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-31.
- DiPerna, G., Stack, J., Bowie, A. G., Boyd, A., Kotwal, G., Zhang, Z., Arvikar, S., Latz, E., Fitzgerald, K. A. & Marshall, W. L. (2004). Poxvirus protein N1L targets the I-kappaB kinase complex, inhibits signaling to NF-kappaB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors. *J Biol Chem* **279**, 36570-8.
- Donelan, N. R., Dauber, B., Wang, X., Basler, C. F., Wolff, T. & Garcia-Sastre, A. (2004). The N- and C-terminal domains of the NS1 protein of influenza B virus can independently inhibit IRF-3 and beta interferon promoter activation. *J Virol* **78**, 11574-82.
- Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I. Z., Al-Jumaah, S., Yang, K., Chappier, A., Eidenschenk, C., Eid, P., Al Ghonaium, A., Tufenkeji, H., Frayha, H., Al-Gazlan, S., Al-Rayes, H., Schreiber, R. D., Gresser, I. & Casanova, J. L. (2003). Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet* **33**, 388-91.
- Ehrhardt, C., Kardinal, C., Wurzer, W. J., Wolff, T., von Eichel-Streiber, C., Pleschka, S., Planz, O. & Ludwig, S. (2004b). Rac1 and PAK1 are upstream of IKK-epsilon and TBK-1 in the viral activation of interferon regulatory factor-3. *FEBS Lett* **567**, 230-8.
- Fagerlund, R., Kinnunen, L., Kohler, M., Julkunen, I. & Melen, K. (2005). NF- κ B is transported into the nucleus by importin α 3 and importin α 4. *J Biol Chem* **280**, 15942-51.
- Fagerlund, R., Melen, K., Kinnunen, L. & Julkunen, I. (2002). Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5. *J Biol Chem* **277**, 30072-8.
- Fahrenkrog, B., Koser, J. & Aebi, U. (2004). The nuclear pore complex: a jack of all trades? *Trends Biochem Sci* **29**, 175-82.
- Fensterl, V., Grotheer, D., Berk, I., Schlemminger, S., Vallbracht, A. & Dotzauer, A. (2005). Hepatitis A Virus Suppresses RIG-I-Mediated IRF-3 Activation To Block Induction of Beta Interferon. *J. Virol.* **79**, 10968-10977.
- Finke, S. & Conzelmann, K. K. (2005). Replication strategies of rabies virus. *Virus Res* **111**, 120-31.
- Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M. & Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4**, 491-6.
- Fodor, E., Devenish, L., Engelhardt, O. G., Palese, P., Brownlee, G. G. & Garcia-Sastre, A. (1999). Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol* **73**, 9679-82.
- Fontes, M. R., Teh, T., Jans, D., Brinkworth, R. I. & Kobe, B. (2003). Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha. *J Biol Chem* **278**, 27981-7.
- Fontes, M. R., Teh, T. & Kobe, B. (2000). Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J Mol Biol* **297**, 1183-94.
- Frese, M., Kochs, G., Feldmann, H., Hertkorn, C. & Haller, O. (1996). Inhibition of bunyav
- Fukuda, K., Takahashi, K., Iwata, Y., Mori, N., Gonda, K., Ogawa, T., Osonoe, K., Sato, M., Ogata, S., Horimoto, T., Sawada, T., Tashiro, M., Yamaguchi, K., Niwa, S. &

- Shigeta, S. (2001). Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors in Japan. *J Clin Microbiol* **39**, 419-29.
- Garcia-Sastre, A. (2002). Mechanisms of inhibition of the host interferon alpha/beta-mediated antiviral responses by viruses. *Microbes Infect* **4**, 647-55.
- Garcia-Sastre, A. (2004). Identification and characterization of viral antagonists of type I interferon in negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **283**, 249-80.
- Garcia-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D. E., Durbin, J. E., Palese, P. & Muster, T. (1998). Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* **252**, 324-30.
- Giarre, M., Torok, I., Schmitt, R., Gorjanacz, M., Kiss, I. & Mechler, B. M. (2002). Patterns of importin-alpha expression during Drosophila spermatogenesis. *J Struct Biol* **140**, 279-90.
- Giesen, K., Radsak, K. & Bogner, E. (2000). The potential terminase subunit of human cytomegalovirus, pUL56, is translocated into the nucleus by its own nuclear localization signal and interacts with importin alpha. *J Gen Virol* **81**, 2231-44.
- Goldfarb, D. S., Corbett, A. H., Mason, D. A., Harreman, M. T. & Adam, S. A. (2004). Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol* **14**, 505-14.
- Gonzalez-Dunia, D., Cubitt, B., Grasser, F. A. & de la Torre, J. C. (1997). Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry. *J Virol* **71**, 3208-18.
- Gorlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A. & Hartmann, E. (1996). A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus. *Embo J* **15**, 1810-7.
- Gosztonyi, G. & Ludwig, H. (1995). Borna disease--neuropathology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **190**, 39-73.
- Grandvaux, N., Servant, M. J., tenOever, B., Sen, G. C., Balachandran, S., Barber, G. N., Lin, R. & Hiscott, J. (2002). Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol* **76**, 5532-9.
- Haas, B., Becht, H. & Rott, R. (1986). Purification and properties of an intranuclear virus-specific antigen from tissue infected with Borna disease virus. *J Gen Virol* **67** (Pt 2), 235-41.
- Hallensleben, W., Schwemmle, M., Hausmann, J., Stitz, L., Volk, B., Pagenstecher, A. & Staeheli, P. (1998). Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonates results in immunopathology. *J Virol* **72**, 4379-86.
- Harel, A. & Forbes, D. J. (2004). Importin beta: conducting a much larger cellular symphony. *Mol Cell* **16**, 319-30.
- Hatalski, C. G., Hickey, W. F. & Lipkin, W. I. (1998a). Evolution of the immune response in the central nervous system following infection with Borna disease virus. *Journal of Neuroimmunology* **90**, 137.
- Hatalski, C. G., Kliche, S., Stitz, L. & Lipkin, W. I. (1995). Neutralizing antibodies in Borna disease virus-infected rats. *J. Virol.* **69**, 741-747.
- Hausmann, J., Hallensleben, W., de la Torre, J. C., Pagenstecher, A., Zimmermann, C., Pircher, H. & Staeheli, P. (1999). T cell ignorance in mice to Borna disease virus can be overcome by peripheral expression of the viral nucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9769-74.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. & Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-5.

- Her, L. S., Lund, E. & Dahlberg, J. E. (1997). Inhibition of Ran guanosine triphosphatase-dependent nuclear transport by the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Science* **276**, 1845-8.
- Hickey, W. F. (1999). Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol* **11**, 125-37.
- Hickey, W. F. (2001). Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* **36**, 118-24.
- Hitoshi, N., Ken-ichi, Y. & Jun-ichi, M. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193.
- Hoffmann, E., Mahmood, K., Yang, C. F., Webster, R. G., Greenberg, H. B. & Kemble, G. (2002). Rescue of influenza B virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11411-6.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N. & Taniguchi, T. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772-7.
- Izaurrealde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I. W. & Gorlich, D. (1997). The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *Embo J* **16**, 6535-47.
- Jennings, S., Martinez-Sobrido, L., Garcia-Sastre, A., Weber, F. & Kochs, G. (2005). Thogoto virus ML protein suppresses IRF3 function. *Virology* **331**, 63-72.
- Jiang, Z., Mak, T. W., Sen, G. & Li, X. (2004). Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3533-8.
- Joest, E. & Degen, K. (1909). Über eigentümliche Kerneinschlüsse der Ganglienzellen bei der enzootischen Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde. *Z Inf Krkh Haustiere* **9**, 348-356.
- Jordan, I. & Lipkin, W. I. (2001). Borna disease virus. *Rev Med Virol* **11**, 37-57.
- Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. & Smith, A. E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311**, 33-8.
- Kamitani, W., Shoya, Y., Kobayashi, T., Watanabe, M., Lee, B. J., Zhang, G., Tomonaga, K. & Ikuta, K. (2001). Borna disease virus phosphoprotein binds a neurite outgrowth factor, amphoterin/HMG-1. *J Virol* **75**, 8742-51.
- Karin, M., Liu, Z. & Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 240-6.
- Kawagishi-Kobayashi, M., Silverman, J. B., Ung, T. L. & Dever, T. E. (1997). Regulation of the protein kinase PKR by the vaccinia virus pseudosubstrate inhibitor K3L is dependent on residues conserved between the K3L protein and the PKR substrate eIF2alpha. *Mol Cell Biol* **17**, 4146-58.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O. & Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**, 981-8.
- Kiermayer, S., Kraus, I., Richt, J. A., Garten, W. & Eickmann, M. (2002). Identification of the am
- Kim, T., Kim, T. Y., Lee, W. G., Yim, J. & Kim, T. K. (2000). Signaling pathways to the assembly of an interferon-beta enhanceosome. Chemical genetic studies with a small molecule. *J Biol Chem* **275**, 16910-7.
- Kim, T. K. & Maniatis, T. (1997). The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome. *Mol Cell* **1**, 119-29.
-

- Kobayashi, T., Kamitani, W., Zhang, G., Watanabe, M., Tomonaga, K. & Ikuta, K. (2001). Borna disease virus nucleoprotein requires both nuclear localization and export activities for viral nucleocytoplasmic shuttling. *J Virol* **75**, 3404-12.
- Kobayashi, T., Shoya, Y., Koda, T., Takashima, I., Lai, P. K., Ikuta, K., Kakinuma, M. & Kishi, M. (1998). Nuclear targeting activity associated with the amino terminal region of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology* **243**, 188-97.
- Kobe, B. (1999). Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol* **6**, 388-97.
- Kohler, M., Ansieau, S., Prehn, S., Leutz, A., Haller, H. & Hartmann, E. (1997). Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. *FEBS Lett* **417**, 104-8.
- Kohler, M., Gorlich, D., Hartmann, E. & Franke, J. (2001). Adenoviral E1A protein nuclear import is preferentially mediated by importin alpha3 in vitro. *Virology* **289**, 186-91.
- Kohler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F. R., Prehn, S., Haller, H., Gorlich, D. & Hartmann, E. (1999). Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Mol Cell Biol* **19**, 7782-91.
- Kohno, T., Goto, T., Takasaki, T., Morita, C., Nakaya, T., Ikuta, K., Kurane, I., Sano, K. & Nakai, M. (1999). Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol* **73**, 760-6.
- Kolodziejek, J., Durrwald, R., Herzog, S., Ehrensperger, F., Lussy, H. & Nowotny, N. (2005). Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin. *J Gen Virol* **86**, 385-98.
- Kraus, I., Bogner, E., Lilie, H., Eickmann, M. & Garten, W. (2005). Oligomerization and assembly of the matrix protein of Borna disease virus. *FEBS Lett* **579**, 2686-92.
- Kraus, I., Eickmann, M., Kiermayer, S., Scheffczik, H., Fluess, M., Richt, J. A. & Garten, W. (2001). Open reading frame III of borna disease virus encodes a nonglycosylated matrix protein. *J Virol* **75**, 12098-104.
- Kraus, I., Rudolph, M., Bogner, E., Dickmanns, A., Eickmann, M., Kiermayer, S., Ficner, R. & Garten, W. (2003). Structural characterization and functional prerequisites of the nucleoprotein of Borna Disease Virus. In *XII International Conference on Negative Strand Viruses*. Pisa, Italy.
- Krey, H., Ludwig, H. & Rott, R. (1979). Spread of infectious virus along the optic nerve into the retina in Borna disease virus-infected rabbits. *Arch Virol* **61**, 283-8.
- La Rocca, S. A., Herbert, R. J., Crooke, H., Drew, T. W., Wileman, T. E. & Powell, P. P. (2005). Loss of interferon regulatory factor 3 in cells infected with classical swine fever virus involves the N-terminal protease, Npro. *J Virol* **79**, 7239-47.
- Le Bon, A. & Tough, D. F. (2002). Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* **14**, 432-6.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C., Ikeda, M., Ray, S. C., Gale, M., Jr. & Lemon, S. M. (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2992-7.
- Li, M., Lee, H., Guo, J., Neipel, F., Fleckenstein, B., Ozato, K. & Jung, J. U. (1998). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor. *J Virol* **72**, 5433-40.
- Lieb, K., Hallensleben, W., Czygan, M., Stitz, L. & Staeheli, P. (1997). No Borna disease virus-specific RNA detected in blood from psychiatric patients in different regions of Germany. *The Lancet* **350**, 1002.

- Lieb, K. & Staeheli, P. (2001). Borna disease virus--does it infect humans and cause psychiatric disorders? *J Clin Virol* **21**, 119-27.
- Lischka, P., Sorg, G., Kann, M., Winkler, M. & Stamminger, T. (2003). A nonconventional nuclear localization signal within the UL84 protein of human cytomegalovirus mediates nuclear import via the importin alpha/beta pathway. *J Virol* **77**, 3734-48.
- Look, D. C., Roswit, W. T., Frick, A. G., Gris-Alevy, Y., Dickhaus, D. M., Walter, M. J. & Holtzman, M. J. (1998). Direct suppression of Stat1 function during adenoviral infection. *Immunity* **9**, 871-80.
- Ludwig, H., Furuya, K., Bode, L., Klein, N., Durrwald, R. & Lee, D. S. (1993). Biology and neurobiology of Borna disease viruses (BDV), defined by antibodies, neutralizability and their pathogenic potential. *Arch Virol Suppl* **7**, 111-33.
- Luft, T., Pang, K. C., Thomas, E., Hertzog, P., Hart, D. N., Trapani, J. & Cebon, J. (1998). Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol* **161**, 1947-53.
- Malik, H. S., Eickbush, T. H. & Goldfarb, D. S. (1997). Evolutionary specialization of the nuclear targeting apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13738-42.
- McWhirter, S. M., Fitzgerald, K. A., Rosains, J., Rowe, D. C., Golenbock, D. T. & Maniatis, T. (2004). IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 233-8.
- Melen, K., Fagerlund, R., Franke, J., Kohler, M., Kinnunen, L. & Julkunen, I. (2003). Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J Biol Chem* **278**, 28193-200.
- Mercurio, F. & Manning, A. M. (1999). Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 226-32.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. & Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*.
- Miettinen, M., Sareneva, T., Julkunen, I. & Matikainen, S. (2001). IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun* **2**, 349-55.
- Morales, J. A., Herzog, S., Kompter, C., Frese, K. & Rott, R. (1988). Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **177**, 51-68.
- Mori, M., Yoneyama, M., Ito, T., Takahashi, K., Inagaki, F. & Fujita, T. (2004). Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem* **279**, 9698-702.
- Narayan, O., Herzog, S., Frese, K., Scheefers, H. & Rott, R. (1983). Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent borna virus in the brain. *Science* **220**, 1401-3.
- Nelson, N., Marks, M. S., Driggers, P. H. & Ozato, K. (1993). Interferon consensus sequence-binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription. *Mol Cell Biol* **13**, 588-99.
- Nowotny, N., Kolodziejek, J., Jehle, C. O., Suchy, A., Staeheli, P. & Schwemmle, M. (2000). Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J Virol* **74**, 5655-8.
- Otsuka, M., Kato, N., Moriyama, M., Taniguchi, H., Wang, Y., Dharel, N., Kawabe, T. & Omata, M. (2005). Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology* **41**, 1004-12.
-

- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-66.
- Peifer, M., Berg, S. & Reynolds, A. B. (1994). A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* **76**, 789.
- Perez, M., Sanchez, A., Cubitt, B., Rosario, D. & de la Torre, J. C. (2003). A reverse genetics system for Borna disease virus. *J Gen Virol* **84**, 3099-104.
- Perez, M., Watanabe, M., Whitt, M. A. & de la Torre, J. C. (2001). N-terminal domain of Borna disease virus G (p56) protein is sufficient for virus receptor recognition and cell entry. *J Virol* **75**, 7078-85.
- Planz, O., Rentzsch, C., Batra, A., Rziha, H.-J. & Stitz, L. (1998). Persistence of Borna disease virus-specific nucleic acid in blood of psychiatric patient. *The Lancet* **352**, 623.
- Planz, O., Rentzsch, C., Batra, A., Winkler, T., Buttner, M., Rziha, H. J. & Stitz, L. (1999). Pathogenesis of borna disease virus: granulocyte fractions of psychiatric patients harbor infectious virus in the absence of antiviral antibodies. *J Virol* **73**, 6251-6.
- Planz, O., Rziha, H.-J. & Stitz, L. (2000). Bornavirus isolates of human origin. *The Lancet* **355**, 656.
- Pleschka, S., Stacheli, P., Kolodziejek, J., Richt, J. A., Nowotny, N. & Schwemmler, M. (2001). Conservation of coding potential and terminal sequences in four different isolates of Borna disease virus. *J Gen Virol* **82**, 2681-90.
- Poenisch, M., Unterstab, G., Wolff, T., Stacheli, P. & Schneider, U. (2004). The X protein of Borna disease virus regulates viral polymerase activity through interaction with the P protein. *J Gen Virol* **85**, 1895-8.
- Pomerantz, J. L. & Baltimore, D. (1999). NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *Embo J* **18**, 6694-704.
- Quensel, C., Friedrich, B., Sommer, T., Hartmann, E. & Kohler, M. (2004). In vivo analysis of importin alpha proteins reveals cellular proliferation inhibition and substrate specificity. *Mol Cell Biol* **24**, 10246-55.
- Rabut, G., Doye, V. & Ellenberg, J. (2004). Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nat Cell Biol* **6**, 1114-21.
- Radecke, F. & Billeter, M. A. (1995). Appendix: measles virus antigenome and protein consensus sequences. *Curr Top Microbiol Immunol* **191**, 181-92.
- Richt, J. A., Furbringer, T., Koch, A., Pfeuffer, I., Herden, C., Bause-Niedrig, I. & Garten, W. (1998). Processing of the Borna disease virus glycoprotein gp94 by the subtilisin-like endoprotease furin. *J Virol* **72**, 4528-33.
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. & Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**, 615-23.
- Rott, R. & Becht, H. (1995). Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr Top Microbiol Immunol* **190**, 17-30.
- Rott, R., Herzog, S., Fleischer, B., Winokur, A., Amsterdam, J., Dyson, W. & Koprowski, H. (1985). Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science* **228**, 755-6.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Magnasco, M. O. & Chait, B. T. (2003). Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends Cell Biol* **13**, 622-8.
- Rudolph, M. G., Kraus, I., Dickmanns, A., Eickmann, M., Garten, W. & Ficner, R. (2003). Crystal structure of the borna disease virus nucleoprotein. *Structure (Camb)* **11**, 1219-26.
-

- Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**, 778-809, table of contents.
- Sasai, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Inoue, N., Fujita, F., Nakanishi, M. & Seya, T. (2005). Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol* **174**, 27-30.
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N. & Taniguchi, T. (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* **13**, 539-48.
- Schamel, K., Staeheli, P. & Hausmann, J. (2001). Identification of the immunodominant H-2K(k)-restricted cytotoxic T-cell epitope in the Borna disease virus nucleoprotein. *J Virol* **75**, 8579-88.
- Schneider, P. A., Hatalski, C. G., Lewis, A. J. & Lipkin, W. I. (1997). Biochemical and functional analysis of the Borna disease virus G protein. *J Virol* **71**, 331-6.
- Schneider, U., Blechschmidt, K., Schwemmler, M. & Staeheli, P. (2004). Overlap of interaction domains indicates a central role of the P protein in assembly and regulation of the Borna disease virus polymerase complex. *J Biol Chem* **279**, 55290-6.
- Schneider, U., Naegele, M., Staeheli, P. & Schwemmler, M. (2003). Active borna disease virus polymerase complex requires a distinct nucleoprotein-to-phosphoprotein ratio but no viral X protein. *J Virol* **77**, 11781-9.
- Schneider, U., Schwemmler, M. & Staeheli, P. (2005). Genome trimming: a unique strategy for replication control employed by Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3441-6.
- Schnell, M. J., Mebatsion, T. & Conzelmann, K. K. (1994). Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *Embo J* **13**, 4195-203.
- Schwemmler, M. (2001). Borna disease virus infection in psychiatric patients: are we on the right track? *Lancet Infect Dis* **1**, 46-52.
- Schwemmler, M., De, B., Shi, L., Banerjee, A. & Lipkin, W. I. (1997). Borna disease virus P-protein is phosphorylated by protein kinase Cepsilon and casein kinase II. *J Biol Chem* **272**, 21818-23.
- Schwemmler, M., Jehle, C., Formella, S. & Staeheli, P. (1999a). Sequence similarities between human bornavirus isolates and laboratory strains question human origin. *Lancet* **354**, 1973-4.
- Schwemmler, M., Jehle, C., Shoemaker, T. & Lipkin, W. I. (1999b). Characterization of the major nuclear localization signal of the Borna disease virus phosphoprotein. *J Gen Virol* **80** (Pt 1), 97-100.
- Schwemmler, M., Salvatore, M., Shi, L., Richt, J., Lee, C. H. & Lipkin, W. I. (1998). Interactions of the borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *J Biol Chem* **273**, 9007-12.
- Servant, M. J., ten Oever, B., LePage, C., Conti, L., Gessani, S., Julkunen, I., Lin, R. & Hiscott, J. (2001). Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Biol Chem* **276**, 355-63.
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K. & Chen, Z. J. (2005). Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF-kappaB and IRF3. *Cell* **122**, 669-82.
- Shankar, V., Kao, M., Hamir, A. N., Sheng, H., Koprowski, H. & Dietzschold, B. (1992). Kinetics of virus spread and changes in levels of several cytokine mRNAs in the brain after intranasal infection of rats with Borna disease virus. *J Virol* **66**, 992-8.
-

- Sharma, S., tenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R. & Hiscott, J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**, 1148-51.
- Shaw, M. L., Cardenas, W. B., Zamarin, D., Palese, P. & Basler, C. F. (2005). Nuclear localization of the Nipah virus W protein allows for inhibition of both virus- and toll-like receptor 3-triggered signaling pathways. *J Virol* **79**, 6078-88.
- Shimada, T., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Inoue, J., Tatsumi, Y., Kanamaru, A. & Akira, S. (1999). IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *Int Immunol* **11**, 1357-62.
- Shoya, Y., Kobayashi, T., Koda, T., Ikuta, K., Kakinuma, M. & Kishi, M. (1998). Two proline-rich nuclear localization signals in the amino- and carboxyl-terminal regions of the Borna disease virus phosphoprotein. *J Virol* **72**, 9755-62.
- Stacheli, P., Sauder, C., Hausmann, J., Ehrensperger, F. & Schwemmler, M. (2000). Epidemiology of Borna disease virus. *J Gen Virol* **81**, 2123-35.
- Stitz, L., Noske, K., Planz, O., Furrer, E., Lipkin, W. I. & Bilzer, T. (1998). A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: influence on virus tropism outside the central nervous system. *J Virol* **72**, 8884-92.
- Stoyloff, R., Strecker, A., Bode, L., Franke, P., Ludwig, H. & Hucho, F. (1997). The glycosylated matrix protein of Borna disease virus is a tetrameric membrane-bound viral component essential for infection. *Eur J Biochem* **246**, 252-7.
- Strom, A. C. & Weis, K. (2001). Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3008.
- Suhara, W., Yoneyama, M., Kitabayashi, I. & Fujita, T. (2002). Direct involvement of CREB-binding protein/p300 in sequence-specific DNA binding of virus-activated interferon regulatory factor-3 holocomplex. *J Biol Chem* **277**, 22304-13.
- Talon, J., Horvath, C. M., Polley, R., Basler, C. F., Muster, T., Palese, P. & Garcia-Sastre, A. (2000). Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **74**, 7989-96.
- Tanaka, N., Kawakami, T. & Taniguchi, T. (1993). Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol Cell Biol* **13**, 4531-8.
- Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N. & Lai, M. M. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* **285**, 107-10.
- tenOever, B. R., Servant, M. J., Grandvaux, N., Lin, R. & Hiscott, J. (2002). Recognition of the Measles Virus Nucleocapsid as a Mechanism of IRF-3 Activation. *J. Virol.* **76**, 3659-3669.
- tenOever, B. R., Sharma, S., Zou, W., Sun, Q., Grandvaux, N., Julkunen, I., Hemmi, H., Yamamoto, M., Akira, S., Yeh, W. C., Lin, R. & Hiscott, J. (2004). Activation of TBK1 and IKKvarepsilon kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity. *J Virol* **78**, 10636-49.
- Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M. & Nakanishi, M. (2000). NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* **404**, 778-82.
- Tomonaga, K., Kobayashi, T. & Ikuta, K. (2002). Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect* **4**, 491-500.
- Unterstab, G., Ludwig, S., Anton, A., Planz, O., Dauber, B., Krappmann, D., Heins, G., Ehrhardt, C. & Wolff, T. (2005). Viral targeting of the interferon- β -inducing

- Traf family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13640-5.
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Muhlberger, E., Kolesnikova, L. V., Weik, M., Dolnik, O. & Klenk, H. D. (2001). Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science* **291**, 1965-9.
- von Rheinbaben, F., Stütz, L. & Rott, R. (1985). Influence of interferon on persistent infection caused by Borna disease virus in vitro. *J Gen Virol* **66 (Pt 12)**, 2777-80.
- von Sprockhoff, H., Rohde, G. & Meyer, G. (1975). [Demonstration of antigen and production of interferon in rabbits infected with borna virus (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol [Orig A]* **232**, 549-53.
- Walker, M. P., Jordan, I., Briese, T., Fischer, N. & Lipkin, W. I. (2000). Expression and characterization of the Borna disease virus polymerase. *J Virol* **74**, 4425-8.
- Walther, F. (1899). Gehirn-Rückenmarksentzündung bei Pferden und Schafen in der Amtshauptmannschaft Borna. *Mitteilungen aus den Berichten der bezirksthierärzte auf das Jahr 1899. Ber. Veterinärwesen Königr. Sachsen*, 44:80.
- Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A. A. & Garcia-Sastre, A. (2000). Influenza A Virus NS1 Protein Prevents Activation of NF-kappa B and Induction of Alpha/Beta Interferon. *J. Virol.* **74**, 11566-11573.
- Weber, F., Bridgen, A., Fazakerley, J. K., Streitenfeld, H., Kessler, N., Randall, R. E. & Elliott, R. M. (2002). Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs counteracts the induction of alpha/beta interferon. *J Virol* **76**, 7949-55.
- Wehner, T., Ruppert, A., Herden, C., Frese, K., Becht, H. & Richt, J. A. (1997). Detection of a novel Borna disease virus-encoded 10 kDa protein in infected cells and tissues. *J Gen Virol* **78 (Pt 10)**, 2459-66.
- Weis, K., Mattaj, I. W. & Lamond, A. I. (1995). Identification of hSRP1 alpha as a functional receptor for nuclear localization sequences. *Science* **268**, 1049-53.
- Weis, K., Ryder, U. & Lamond, A. I. (1996). The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import. *Embo J* **15**, 1818-25.
- Weston, C. R. & Davis, R. J. (2002). The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 14-21.
- Whittaker, G. R. (2003). Virus nuclear import. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 733-47.
- Whittaker, G. R. & Helenius, A. (1998). Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology* **246**, 1-23.
- Wolff, T., Pfleger, R., Wehner, T., Reinhardt, J. & Richt, J. A. (2000). A short leucine-rich sequence in the Borna disease virus p10 protein mediates association with the viral phospho- and nucleoproteins. *J Gen Virol* **81**, 939-47.
- Wolff, T., Unterstab, G., Heins, G., Richt, J. A. & Kann, M. (2002). Characterization of an unusual importin alpha binding motif in the borna disease virus p10 protein that directs nuclear import. *J Biol Chem* **277**, 12151-7.
- Xu, L. G., Wang, Y. Y., Han, K. J., Li, L. Y., Zhai, Z. & Shu, H. B. (2005). VISA Is an Adapter Protein Required for Virus-Triggered IFN-beta Signaling. *Mol Cell*.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. & Akira, S. (2003a). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-3.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K. & Akira, S. (2003b). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* **4**, 1144-50.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. & Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential

- function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730-7.
- Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E. & Fujita, T. (1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *Embo J* **17**, 1087-95.
- Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Sato, M., Ozato, K. & Fujita, T. (1996). Autocrine amplification of type I interferon gene expression mediated by interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3). *J Biochem (Tokyo)* **120**, 160-9.
- Zhang, G., Kobayashi, T., Kamitani, W., Komoto, S., Yamashita, M., Baba, S., Yanai, H., Ikuta, K. & Tomonaga, K. (2003). Borna disease virus phosphoprotein represses p53-mediated transcriptional activity by interference with HMGB1. *J Virol* **77**, 12243-51.
- Zimmermann, A., Trilling, M., Wagner, M., Wilborn, M., Bubic, I., Jonjic, S., Koszinowski, U. & Hengel, H. (2005). A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- γ signaling and antiviral responses. *J Exp Med* **201**, 1543-53.
- Zwick, W. (1939). Bornasche Krankheit und Enzephalomyelitis der Tiere. In: *Gildemeister E, Haagen E, Waldmann O (eds) Handbch der Viruskrankheiten, vol. 2 Gustav Fischer, Jena*, 254-356.
-

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

- Unterstab, G., Ludwig, S., Anton, A., Planz, O., Dauber, B., Krappmann, D., Heins, G., Ehrhardt, C. & Wolff, T. (2005). Viral targeting of the interferon- β -inducing Traf family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13640-5.
- Bourteele, S., Oesterle, K., Pleschka, S., Unterstab, G., Ehrhardt, C., Wolff, T., Ludwig, S. & Planz, O. (2005). Constitutive activation of the transcription factor NF-kappaB results in impaired borna disease virus replication. *J Virol* **79**, 6043-51.
- Poenisch, M., Unterstab, G., Wolff, T., Staeheli, P. & Schneider, U. (2004). The X protein of Borna disease virus regulates viral polymerase activity through interaction with the P protein. *J Gen Virol* **85**, 1895-8.
- Wolff, T., Unterstab, G., Heins, G., Richt, J. A. & Kann, M. (2002). Characterization of an unusual importin alpha binding motif in the borna disease virus p10 protein that directs nuclear import. *J Biol Chem* **277**, 12151-7.

Beiträge auf Konferenzen:

- G. Unterstab, S. Ludwig, Aline Anton, Oliver Planz, Gudrun Heins, T. Wolff
Viral targeting of the interferon- β inducing TANK-binding kinase (TBK)-1
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 2005, Hannover
- G. Unterstab, Aline Anton, Gudrun Heins, T. Wolff
The Borna Disease Virus P Protein interferes with TBK1-mediated IRF3 activation
Society for Virology, Study group „Immunobiology of Viral Infections“, 3rd Workshop 2004, Schloss Zeilitzheim
- G. Unterstab, T. Wolff
Evidence for an interferon-antagonistic function of the Borna Disease Virus phosphoprotein (P)
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 2003, Berlin
- G. Unterstab, Gudrun Heins, T. Wolff
The phosphoprotein of Borna disease virus inhibits interferon- β promoter activation
Society for Virology, Study group „Immunobiology of Viral Infections“, 1st Workshop 2002, Schloss Zeilitzheim
-

Lebenslauf

Persönliche Daten

Gunhild Unterstab
geb. 19.10.1973 in Stralsund
ledig

Schulbildung

1980 - 1990 allgemein bildende polytechnische Oberschule
 „Erich-Weinert“, Stralsund
1990 - 1992 „Hansa-Gymnasium“, Stralsund
1992 Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung

10/1994 - 02/2000 Studium der Biochemie an der Universität Potsdam
1999 Diplomprüfungen: Biochemie, Analytische Chemie,
 Pflanzenphysiologie, molekulare Pflanzenphysiologie
1999-2000 Anfertigung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe
 von Herrn Prof. Dr. Steup zum Thema:
 „Analyse der räumlichen und zeitlichen Expression
 des zytosolischen Phosphorylase-Isozyms in höheren
 Pflanzen“

2000-2005 Anfertigung der Dissertation in der Arbeitsgruppe von
 Herrn PD Dr. Wolff am Robert Koch-Institut zum
 Thema: „ Charakterisierung der viralen Genprodukte
 p10 und P des Borna Disease Virus“

Mein herzlicher Dank geht an:

Herrn Professor Burkhard Micheel für die Bereitschaft, diese Arbeit von Seiten der Universität Potsdam zu betreuen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Thorsten Wolff, der mir überaus interessante Forschungsthemen in seinem Labor überlassen hat! Deine konstruktiven, erfolgsorientierten Anregungen und Diskussionen empfand ich als sehr motivierend und hilfreich. Ich weiß deine Unterstützung und Zuversicht zu allen Zeiten zu schätzen.

Stephan Ludwig für die Kinaseassays, die so wichtige Erkenntnisse lieferten und Oliver Planz für ebenso essentielle Daten aus Infektionsexperimenten und für immunhistologische Aufnahmen. Michael Kann für beeindruckende Importassays und Matthias Köhler für die gereinigten Importin-Isoformen samt Antikörpern!

Alle im Labor: Aline, Andrea, Bianca, Gudrun, Jana und Karsten! Es war bestimmt nicht immer einfach mit mir... Ich habe mich sehr wohl mit euch gefühlt!

Gudrun! Du hast mir so oft geholfen und mich großartig unterstützt. Dein persönliches Interesse an Dingen diesseits und jenseits des Labors habe ich als große Wohltat empfunden!

Aline für den gemeinsamen erfolgreichen Endspurt!

Die Mädels aus 114 - Bianca und Jana - für die vielen fachlichen Diskussionen und Gedankenexperimente und für eine Menge Spaß... Ein besonderes Dankeschön an Jana für überaus eifriges, kreatives Korrekturlesen und besonders für die zahlreichen „Nachspiele“ abends im Schöneberger Kiez, die mir das Abschalten so leicht gemacht haben!

Anne für die intensive Freundschaft!

Meinen alten, treuen Freunden Grit, Netti und Thomas dafür, dass sie immer noch da sind.

Meinen Eltern für ihre grenzenlose Unterstützung, ihren Glauben an mich und vor allem für ihr Interesse an allen Dingen in meinem Leben.

Long

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit wurde bisher noch nicht anderweitig als Dissertation eingereicht oder veröffentlicht.

Berlin, den 10.10.2005

Gunhild Unterstab
