

**Rolle und Regulation der intrazellulären Caspaseaktivität
für die Influenzavirus-Replikation**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Dzieciolowski, Julia

aus Halle/Saale

Gießen 2014

Aus dem Institut für Medizinische Virologie,

Fachbereich Medizin,

Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. John Ziebuhr

Betreuer: Prof. Dr. Pleschka

Gutachter: Prof. Dr. Renz

Tag der Disputation: 21.05.2015

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Das Influenzavirus.....	1
1.1.1 Die Struktur des Influenza-A-Virus	2
1.1.2 Die Struktur des Influenza-B-Virus	3
1.1.3 Die Struktur des Influenza-C-Virus	4
1.1.4 Der Replikationszyklus.....	5
1.1.5 Nukleärer Export der Ribonukleoproteinkomplexe	7
1.2 Signalmechanismen in der Influenzavirus-infizierten Zelle.....	9
1.2.1 Der Apoptosesignalweg	11
1.2.1.1 Der extrinsische Apoptosesignalweg	12
1.2.1.2 Der intrinsische Apoptosesignalweg	13
1.2.2. Apoptose in der Influenzavirus-infizierten Zelle	15
1.2.3 Zusammenhang zwischen ERK und der Apoptose	16
1.3 Zielsetzung.....	18
2. MATERIALIEN UND METHODEN	20
2.1 Materialien	20
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	20
2.1.2 Medien und Medienbestandteile	21
2.1.3 Antibiotika	21
2.1.4 Geräte und Zubehör.....	22
2.1.5 Zelllinien.....	23
2.1.6 Virusstämme	24
2.1.7 Zellkulturmedien.....	25
2.1.8 Puffer und Lösungen.....	27
2.1.9 Aktivatoren, Inhibitoren	28
2.1.10 Kits.....	29
2.1.11 Plasmide	29

2.2 Methoden	30
2.2.1 Zellkultur	30
2.2.1.1 Passagieren von Zellen	30
2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen	30
2.2.1.3 Infektion von Zellen	30
2.2.2 Herstellung eines Virusstocks	31
2.2.2.1 Herstellung eines Influenza-A-Virusstocks.....	31
2.2.2.2 Herstellung eines Influenza-B-Virusstocks.....	31
2.2.2.3 Herstellung eines Influenza-C-Virusstocks.....	31
2.2.3 Bestimmung des Virustiters.....	32
2.2.3.1 Hämagglutinationsassay (HA-Assay).....	32
2.2.3.2. Titration mittels Immunhistochemie.....	32
2.2.4 Immunfluoreszenz und Konfokale <i>Laserscanning</i> -Mikroskopie	33
2.2.5 Transfektion	34
2.2.6 Caspase-Aktivitätsassay	35
2.2.6.1 Fluorometrischer Caspase 3-Aktivitätsassay	35
2.2.6.2 Colorimetrischer Caspase 3-Aktivitätsassay	35
2.2.6.3 Colorimetrischer Caspase 9-Aktivitätsassay	36
2.2.7 In-Cell-Western Blot (ICW).....	37
2.2.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	38
2.2.9 Statistik	39
3. ERGEBNISSE.....	40
3.1 Die Rolle der intrazellulären Caspaseaktivität für den RNP-Export und die Influenzavirus-Replikation.....	40
3.1.1 Die Caspaseabhängigkeit des nukleo-zytoplasmatischen RNP-Exports	40
3.1.2 Untersuchung der Diffusionslimits der Kernporenkomplexe	43
3.1.3 Analyse des Crm-1-abhängigen und caspaseabhängigen RNP-Exports.....	47
3.2 Regulation der Caspaseaktivität in der Influenza-A-Virus-infizierten Zelle ...	52
3.2.1 Analyse der TRAIL-Menge von IV-infizierten MDCK-II-Zellen und deren Einfluss auf die Caspase 3-Aktivität und den Virustiter	53
3.2.2 Untersuchung des Anteils von extrinsischem und intrinsischem Apoptosesignalweg auf die Caspaseaktivität und die Virusreplikation.....	57
3.2.3 Untersuchung des Zusammenhangs der ERK-Aktivität und der Apoptosesignalkaskade	61

4. DISKUSSION	69
4.1 Die Caspaseabhängigkeit des nukleo-zytoplasmatischen RNP-Exports gilt für verschiedene Influenzaviren und in verschiedenen Zelllinien	69
4.2 Die Caspaseaktivität führt zur Erhöhung der Diffusionslimits im Kernporenkomplex.....	70
4.3 Der RNP-Export wechselt vom Crm-1-abhängigen zum caspaseabhängigen Transport	71
4.4 TRAIL spielt eine untergeordnete Rolle bei der Caspase 3-Aktivierung und der Virusreplikation.....	72
4.5 Der intrinsische Apoptosesignalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Virusreplikation	73
4.6 Aktives ERK wirkt über den intrinsischen Signalweg auf die Caspase 3-Aktivität.....	75
5. ZUSAMMENFASSUNG	79
6. SUMMARY	80
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	81
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	84
9. TABELLENVERZEICHNIS	86
10. LITERATURVERZEICHNIS	87
11. ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION.....	96
DANKSAGUNG	97

1. Einleitung

1.1 Das Influenzavirus

Das Influenzavirus (IV) gehört zu der Familie der *Orthomyxoviridae* und besitzt, wie alle Mitglieder der Familie, ein einzelsträngiges, segmentiertes RNA-Genom mit negativer Polarität. Die Viruspartikel haben eine sphärische oder ellipsoide, zum Teil aber auch filamentöse Form mit einem Durchmesser von ca. 80-120nm. Eine Besonderheit innerhalb der RNA-Viren ist, dass das IV im Kern der Wirtszelle repliziert (Shaw, 2013). Das IV wird in die Genera A, B und C unterteilt, wobei nur die Genera A und B klinisch relevant sind. Die Influenza-A-Viren (IAV) werden nach ihren Oberflächenproteinen, Neuraminidase (NA) und Hämagglutinin (HA) subtypisiert. Influenza-A- und B-Viren verursachen Infektionen der oberen Atemwege mit Fieber bis hin zur schweren Pneumonie und sind durch Aerosole oder Tröpfchen übertragbar. Infektionen mit dem Influenza-C-Virus (ICV) dagegen äußern sich meist in milden Erkältungen. Die meisten IV-Infektionen treten in den Wintermonaten auf. Nach einer Inkubationszeit von bis zu 4 Tagen kommt es zu Symptomen wie Fieber, Husten, Kopf- und Gliederschmerzen (Eccles, 2005). Je nach physischer Verfassung und Immunstatus des Patienten können die Infektionen schwere Verläufe haben. So mussten beispielsweise in der Grippe-Saison 2012/2013 ca. 32000 Patienten in Deutschland hospitalisiert werden (www.rki.de; Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2012/13).

Alle humanen IV sind aviären Ursprungs. So gelten wildlebende Wasservögel als das Reservoir für IV (Webster et al., 1992). Durch die hohe Replikationsfehlerrate der viralen Polymerase kommt es häufig zu Punktmutationen im Genom des Virus. Kommt es durch diese hohe Mutationsfrequenz zu Veränderungen der Oberflächenantigene (HA, NA), nennt man dies *antigenic drift*. Weiterhin kann es durch die Segmentierung des Genoms zu Neugruppierungen der RNA-Segmente kommen, wenn zwei unterschiedliche Viruspartikel eine Zelle infizieren (*antigenic shift*). Dadurch können neue Virussubtypen mit veränderter Wirtsspezifität und Pathogenität entstehen, was unter anderem zu Pandemien führen kann. Im 20. Jahrhundert kam es durch den *antigenic shift* zu vier großen Pandemien: die Spanische Grippe (1918/1919), die asiatische Grippe (1957/1958), die Hong Kong Grippe (1968/1969) und die russische Grippe (1977). Durch die veränderte Wirtsspezifität kommt es zu Zoonosen. So wurden Influenzaviren von Wildvögeln auf Geflügel, marine Säuger, Schweine, Pferde und

Menschen übertragen. Zudem kann es auch eine Übertragung der Viren von Schweinen zu Menschen und von Geflügel zu Menschen geben (Wright, 2013).

1.1.1 Die Struktur des Influenza-A-Virus

Das umhüllte Influenza-A-Virus (IAV) besitzt acht RNA-Segmente, die für mindestens 10 virale Proteine codieren. Auf der von der Wirtszelle stammenden Lipidmembran des IAV gibt es drei Oberflächenproteine: HA, NA, M2. Das Hämagglutinin (HA) ist wichtig für das Binden des Virus an der Wirtszelloberfläche und für die Membranfusion mit der Wirtszellmembran (Skehel and Wiley, 2000). Die Neuraminidase (NA) spielt durch die enzymatische Funktion bei der Spaltung von Sialinsäuren eine wichtige Funktion beim Ablösen neu gebildeter Virionen von der Wirtszelle. Das Matrixprotein M2 ist ein Ionenkanal und wichtig für das Freilassen der Ribonukleoproteinkomplexe (RNP) in den Kern der Wirtszelle (Pinto et al., 1992). Das Matrixprotein M1 liegt direkt unter der Membranhülle und dient als strukturgebendes Protein. Das virale Genom (vRNA), die drei Untereinheiten (PB1, PB2 und PA) der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) und das Nukleoprotein (NP) formen den sogenannten Ribonukleoproteinkomplex (RNP) (Braam et al., 1983). Jeweils 24 Nukleotide der RNA sind an ein NP gebunden (Ortega et al., 2000). Das *nuclear export protein/nonstructural protein 2* (NEP/NS2) ist ein Spliceprodukt des NS-Gens und wichtig für den Export der RNPs aus dem Kern ins Zytoplasma der Wirtszelle. Das *nonstructural protein 1* (NS1) findet man nicht im Virion, sondern nur in infizierten Zellen. Dort dient es zur Unterdrückung der Wirtszellimmunantwort (Shaw, 2013).

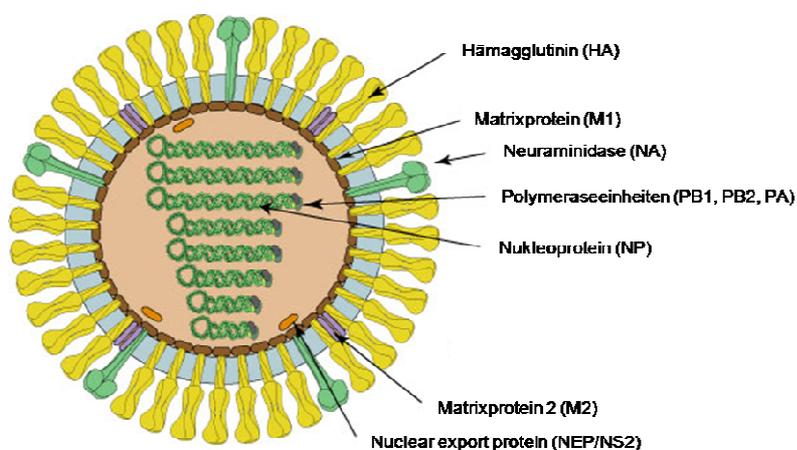


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Influenza-A-Virions

Das Influenza-A-Virus enthält 8 einzelsträngige RNA-Segmente mit negativer Polarität, die für mindestens 10 Proteine codieren: Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), Matrixprotein 1 (M1), Matrixprotein 2 (M2), *nuclear export protein* (NEP/NS2), *nonstructural protein 1* (NS1). Die Polymeraseeinheiten PA, PB1 und PB2 bilden mit dem Nukleoprotein (NP) und der RNA die sogenannten Ribonukleoproteinkomplexe (RNP). Die Abbildung ist modifiziert aus der Quelle: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/6.html, 6.8.2014.

1.1.2 Die Struktur des Influenza-B-Virus

Das Influenza-B-Virus (IBV) ist strukturell ähnlich aufgebaut wie das IAV. In der Lipidhülle sind 3 Proteine eingebettet: HA, NA und BM2. Wie beim IAV befinden sich das M1 Protein, NEP/NS2 und die RNPs im Inneren des Partikels (Shaw, 2013). Das BM2 ist, wie das M2 beim IAV, ein Ionenkanal und spielt eine wichtige Rolle im Replikationszyklus des IBV (Odagiri et al., 1999; Pinto and Lamb, 2006). Zudem wird in der Literatur ein weiteres Membranprotein, das NB, als Ionenkanal beschrieben (Betakova et al., 1996). Wie das IAV besitzt das IBV ebenfalls acht RNA-Segmente (Racaniello and Palese, 1979).

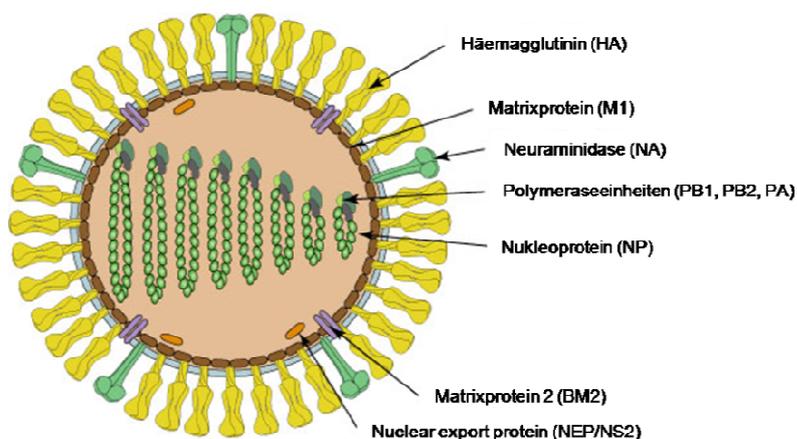


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Influenza-B-Virions

Das Influenza-B-Virus enthält 8 einzelsträngige RNA-Segmente mit negativer Polarität, die für 10 Proteine codieren: Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), Matrixprotein 1 (M1), Matrixprotein 2 (BM2), *nuclear export protein* (NEP/NS2), *nonstructural protein 1* (NS1). Die Polymeraseeinheiten PA, PB1 und PB2 bilden mit dem Nukleoprotein (NP) und der RNA die sogenannten Ribonukleoproteinkomplexe (RNP). Die Abbildung ist modifiziert aus der Quelle: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/80.html, 6.8.2014.

1.1.3 Die Struktur des Influenza-C-Virus

Das Influenza-C-Virus (ICV) besitzt eine netzartige Struktur und bildet auf der Oberfläche infizierter Zellen mit ca. 500µm ungewöhnlich lange kordelähnliche Strukturen (Muraki et al., 2004). Wie IAV und IBV besitzt es RNPs bestehend aus 3 Polymeraseeinheiten (PB1, PB2 und P3) und dem NP, wobei nur PB1 und PB2 homolog zu den Polymeraseeinheiten von IAV und IBV sind (Yamashita et al., 1989). Das M1 dient auch hier als Strukturprotein und das NEP/NS2-Protein spielt eine wichtige Rolle bei dem Export der RNPs aus dem Kern. Allerdings besitzt das ICV nur 7 RNA-Segmente. Im Gegensatz zu IAV und IBV werden beim ICV die Funktionen des HA und der NA in dem Glykoprotein *Hemagglutinin-esterase-fusion* (HEF) vereint (Herrler et al., 1988; Nakada et al., 1984). Das CM2 Glykoprotein ist ebenfalls ein Membranprotein und strukturell analog zum M2 des IAV und BM2 des IBV (Pekosz and Lamb, 1997).

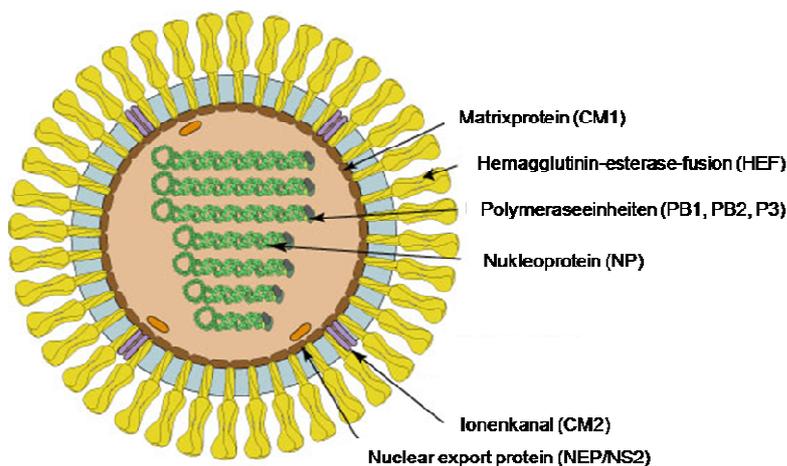


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Influenza-C-Virions

Das Influenza-C-Virus enthält 7 einzelsträngige RNA-Segmente mit negativer Polarität, die für 9 Proteine codieren: *Hemagglutinin-esterase-fusion* (HEF), Matrixproteine CM1 und CM2, *nuclear export protein* (NEP/NS2), *nonstructural protein 1* (NS1). Die Polymeraseeinheiten P3, PB1 und PB2 bilden mit dem Nukleoprotein (NP) und der RNA die sogenannten Ribonukleoproteinkomplexe (RNP). Die Abbildung ist modifiziert aus der Quelle: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/81.html; 6.8.2014.

1.1.4 Der Replikationszyklus

Das IV bindet mittels der Rezeptordomäne des HA an Glykoproteine bzw. Glykolipide auf der Wirtszelloberfläche, die Sialinsäuren enthalten, wobei verschiedene HAs eine Spezifität für verschiedene Verknüpfungen der Sialinsäuren aufweisen. So binden humane IV bevorzugt an Sialinsäuren, die über eine α 2,6-Bindung mit der Galaktose (SA- α 2,6Gal) verknüpft sind. Dagegen binden aviäre IV bevorzugt an Sialinsäuren, die über eine α 2,3-Bindung mit der Galaktose (SA- α 2,3Gal) verknüpft sind (Connor et al., 1994). Das HEF des ICV bindet an 9-O-acetylierte Neuraminsäurederivate (Herrler et al., 1985). Die Aufnahme des Virus geschieht durch Clathrin-vermittelte Endozytose (Matlin et al., 1981). Durch die Herabsetzung des pH-Wertes im Endosom kommt es durch strukturelle Änderungen des HA zur Fusion der Virionenmembran mit der Endosomenmembran und zur Freisetzung der RNPs (Matlin et al., 1981; Stegmann, 2000). Die freigesetzten viralen RNPs werden anschließend aktiv in den Kern transportiert (Martin and Helenius, 1991). Der Import der RNPs in den Kern der Wirtszelle ist hauptsächlich abhängig vom Kernlokalisierungssignal (NLS) des NP (Neumann et al., 1997). Der energieabhängige Import erfolgt mittels Bindung des NLS des NP an Karyopherin α und Karyopherin β als trimärer Komplex (O'Neill et al., 1995; Shaw, 2013) (siehe auch Abbildung 5).

Im Kern wird die virale RNA (vRNA) in *messenger* RNA (mRNA) transkribiert. Dafür ist zunächst die Bindung des PB2 an die Cap-Struktur der mRNA der Wirtszelle (*cap snatching*) und die Endonukleasefunktion des PA wichtig (Dias et al., 2009; Krug, 1981). Die Elongation der RNA wird durch die Polymerasefunktion des PB1 katalysiert (Kolpashchikov et al., 2004). Am 5'-Ende befindet sich eine Abfolge von Uridin-Resten, die für die Polyadenylierung der mRNA durch PB1 wichtig ist (Li and Palese, 1994). Die Segmente 7 und 8 von IAV, das Segment 8 von IBV und die Segmente 6 und 7 von ICV werden zudem gespleißt, da sie für mehr als ein Protein codieren (Briedis and Lamb, 1982; Lamb and Lai, 1980; Lamb et al., 1981; Nakada et al., 1986; Yamashita et al., 1988).

Die Replikation erfolgt über zwei Schritte. Zunächst wird eine komplementäre RNA (cRNA) mit positiver Polarität synthetisiert. Diese dient dann als Matrize für die Bildung neuer vRNAs (Shaw, 2013). Die neugebildeten RNPs werden mit Hilfe von M1 und NEP/NS2 aus dem Kern transportiert (Cros and Palese, 2003). Auf den nukleären Export der RNPs wird in Kapitel 1.1.5 näher eingegangen. Auch bei IBV und ICV spielen die NEP/NS2-Proteine eine wichtige Rolle bei dem Export der RNPs aus dem Kern (Paragas et al., 2001). Die Membranproteine HA, NA und M2 werden über das Endoplasmatische Retikulum bzw. den Golgi-Apparat zur Plasmamembran

transportiert. M1 spielt durch seine Verbindung der Oberflächenproteine mit den RNPs ebenfalls eine wichtige Rolle beim Knospungsprozess neuer Virione (Gomez-Puertas et al., 2000). Die Abspaltung der neugebildeten Virione erfolgt mit Hilfe der enzymatischen Funktion der NA bzw. des HEF von der apikalen Plasmamembran von polarisierten Zellen (Ghate and Air, 1999; Palese and Compans, 1976; Schmitt and Lamb, 2005; Vlasak et al., 1989).

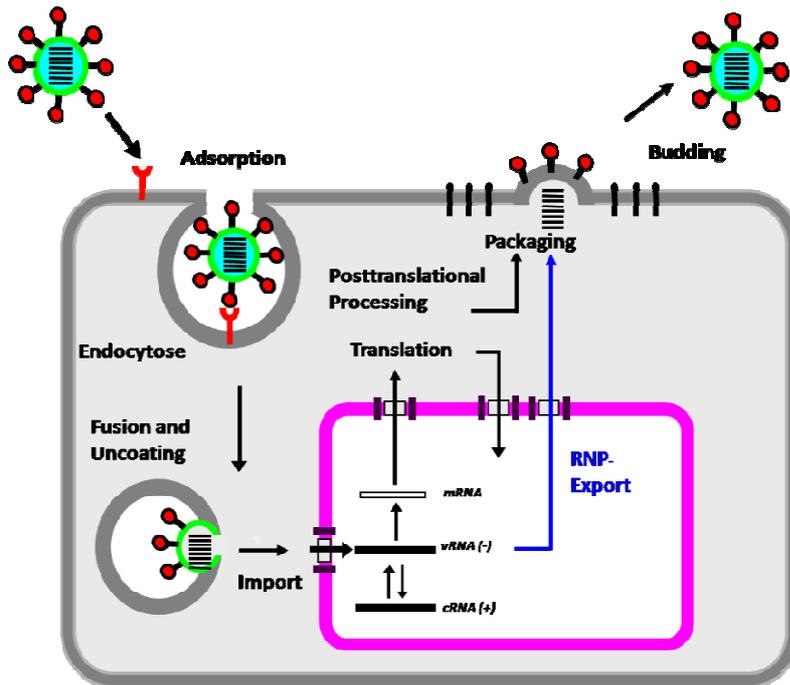


Abbildung 4: Der Replikationszyklus des Influenzavirus

Nach Adsorption des Virus mittels HA an den Wirtszellrezeptor erfolgt die Aufnahme durch rezeptorvermittelte Endozytose. Mit Hilfe des Ionenkanals M2 wird der pH-Wert im Endosom herab gesetzt und es kommt zur Verschmelzung der Virusmembran mit der Endosomenmembran. Die freigesetzten RNPs werden in den Kern transportiert. Dort findet zum einen die Replikation über cRNA in vRNA und die Transkription in mRNA statt. Im Zytoplasma wird die mRNA translatiert und die Proteine posttranslational modifiziert. Die neugebildeten RNPs werden aus dem Kern transportiert, damit sie an der Zellmembran verpackt werden. Neue Virione werden mit Hilfe der NA von der Wirtszelloberfläche abgespalten. Abbildung wurde von S. Pleschka erstellt.

1.1.5 Nukleärer Export der Ribonukleoproteinkomplexe

Auf Grund dessen, dass die Replikation bzw. Transkription des viralen Genoms im Kern der Wirtszellen, aber die Translation und Verpackung der RNPs in neue Virione im Zytoplasma stattfinden, unterliegen die RNPs einem ständigen bidirektionalem Transport über die Kernmembran. Gerade der Export der RNPs aus dem Kern stellt ein sogenanntes Nadelöhr bei der IV-Replikation dar.

Es ist bekannt, dass M1 mit dem NEP/NS2 und den RNPs im Kern assoziiert (Akarsu et al., 2003; Huang et al., 2001). NEP/NS2 interagiert zwar nicht direkt mit den RNPs, ist aber, durch die Interaktion mit dem zellulären Exportrezeptor *Chromosomal Maintenance-1* (Crm-1) und verschiedenen Nukleoporinen (Nup) der Kernporen, ein wichtiges Adaptermolekül zwischen dem M1-RNP-Komplex und des Exportmechanismus (Neumann et al., 2000; O'Neill et al., 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch NP mit dem Exportrezeptor Crm-1 interagiert und damit eine wichtige Rolle sowohl beim Import als auch beim Export der RNPs spielt (Elton et al., 2001).

Crm-1 (*Chromosomal Maintenance-1*), auch Exportin 1 genannt, ist ein Mitglied der Importin- β -Familie. Es ist zuständig für den Transport zahlreicher Proteine und RNA in beiden Richtungen durch die Kernporen (Mattaj and Englmeier, 1998). Crm-1 bindet direkt an Methionin/Leucin-reiche, nukleäre Exportsignale (NES) der Cargoproteine und formt zusammen mit *Ras-related nuclear protein*-GTP (RanGTP) einen trimären Komplex. Der Komplex transloziert schrittweise durch die Kernpore ins Zytoplasma, wo das Cargoprotein dissoziiert (Nguyen et al., 2012). Durch die Lokalisation des Ran-GTPase-aktivierenden Proteins (RanGAP) im Zytoplasma ist das meiste zytoplasmatische Ran in der GDP-gebundenen Form (Wente and Rout, 2010). Durch die hohe Konzentration an *Ras-related nuclear protein*-GDP (RanGDP) im Zytoplasma assoziieren Importin- α/β mit Cargoproteinen, die ein NLS enthalten und transportieren diese in den Kern (Kodiha and Stochaj, 2012). Der Guaninnukleotid-Austauschfaktor (RCC1) im Kern bewirkt, dass das nukleäre Ran meist in GTP-gebundener Form vorliegt (Ohtsubo et al., 1989). Ran-GTP führt zum einen zur Dissoziation der Cargoproteine von dem Importrezeptor und zum anderen zur Assoziation der Cargoproteine mit dem Exportrezeptor (Rexach and Blobel, 1995). Auf Grund der Lokalisation verschiedener Ran-Modulatoren im Kern und im Zytoplasma kommt es zu einem Gradienten von RanGTP und RanGDP. Dies ist die treibende Kraft für den Kernimport und Kernexport (Kodiha and Stochaj, 2012).

Zudem ist bekannt, dass Crm-1 mit verschiedenen Kernporenbestandteilen wie Nup153 und Nup214 interagiert, welche zudem Caspasesubstrate sind (Fischer et al., 2003; Fornerod et al., 1997). Der aktive, Crm-1-abhängige Transport lässt sich mit Hilfe von Leptomycin B (LepB) inhibieren (Watanabe et al., 2001).

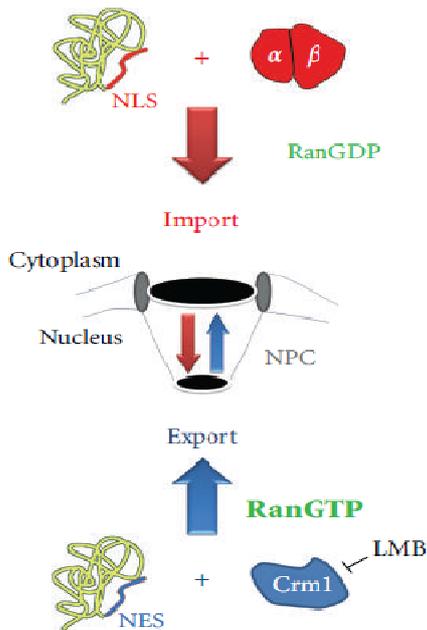


Abbildung 5: Übersicht über den Kernimport- und Kernexportmechanismus

Der Kernimport erfolgt mit Hilfe des Carrierproteins Importin- β und des Adapterproteins Importin- α . Durch die hohe Konzentration an *Ras-related nuclear protein*-GDP (RanGDP) im Zytoplasma assoziieren Importin- α/β mit Cargoproteinen, die ein NLS enthalten und transportieren diese in den Kern. Durch die hohe Konzentration von *Ras-related nuclear protein*-GTP (RanGTP) im Kern dissoziiert das Cargo vom Importin- α/β -Komplex. Wiederum ist RanGTP im Kern wichtig für die Bildung des Exportkomplexes, bestehend aus Crm-1 und dem NES-enhaltenen Cargoprotein. Abbildung aus (Kodiha and Stochaj, 2012).

1.2 Signalmechanismen in der Influenzavirus-infizierten Zelle

In der IV-infizierten Zelle werden eine Vielzahl von Signalkaskaden ausgelöst, um den Eindringling zu bekämpfen. Auf der anderen Seite versucht das Virus die Wirtszelle so zu manipulieren bzw. die antiviralen Mechanismen so auszunutzen, dass die eigene Replikation vorangetrieben wird. In diesem Kapitel soll zunächst ein Überblick über die wichtigsten, in der IV-infizierten Zelle ausgelösten Signalmechanismen gegeben werden. In den Unterkapiteln wird dann auf die für diese Arbeit relevanten Signalwege näher eingegangen.

Durch die IV-Infektion wird der Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Signalweg (MAPK) ausgelöst, der für die Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Zellaktivierung und die Immunantwort wichtig ist (Dong et al., 2002; Ludwig et al., 2006). Vier verschiedene Mitglieder der MAPK-Familie sind bekannt: ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*Jun-N-terminal kinase*), p38 und BMK-1 (*Big MAP kinase*) (Pearson et al., 2001). Alle MAPK-Mitglieder werden durch die Phosphorylierung an einem Threonin- und einem Tyrosinrest aktiviert.

ERK1 und ERK2 werden durch die Kinasen MEK1 und MEK2 aktiviert, die wiederum durch die Serin-Threonin-Kinase Raf kontrolliert werden. p38 wird durch MKK3/6 aktiviert und reguliert die Expression sowohl von Chemokinen, die für die Anlockung von Eosinophilen und Neutrophilen im infizierten Gewebe wichtig sind als auch die Expression vom Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Kujime et al., 2000; Lee et al., 2005). Proinflammatorische Zytokine und Umweltstressbedingungen aktivieren den JNK-Mitogensignalweg, wobei JNK durch MKK4/7 phosphoryliert wird. Dieser Signalweg reguliert die Expression eines wichtigen antiviralen Zytokines, Interferon- β (IFN- β) (Samuel, 2001). BMK-1, auch ERK5 genannt, wird durch MEK5 aktiviert. Dieser Signalweg wird sowohl durch Mitogene als auch verschiedene Stressfaktoren ausgelöst (Ludwig et al., 2006).

Weiterhin spielt die Proteinkinase C (PKC) nicht nur eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Raf-MEK-ERK-Signalkaskade, sondern auch durch eine Vielzahl von Effektoren bei der Aufnahme des Virus in die Zelle und bei der Replikation (Kolch et al., 1993; Marjuki et al., 2006; Sieczkarski et al., 2003; Toker, 1998).

Ein weiterer wichtiger Signalweg, der durch eine Vielzahl von Virusinfektionen, auch IV-Infektionen, ausgelöst wird, ist die I κ B-Kinase/NF- κ B-Signalkaskade (Hiscott et al., 2001; Ludwig et al., 1999). Durch die Aktivierung der I κ B-Kinase (IKK) wird der Inhibitor

I κ B phosphoryliert und degradiert, was zur Aktivierung und Migration der NF- κ B-Faktoren (p65 und p50) in den Kern führt (Ghosh, 1999; Karin and Ben-Neriah, 2000). NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von über 150 verschiedenen Genen, die z.B. für Zytokine, Chemokine, Adhensionsmoleküle oder anti- und proapoptotische Proteine codieren, reguliert (Pahl, 1999). Gerade die Regulation der Expression von proinflammatorischen oder antiviralen Proteinen, wie I κ B- β oder TNF- α , macht NF- κ B zu einer wichtigen Komponente der frühen Immunantwort bei viralen Infektionen (Chu et al., 1999). Allerdings haben IKK und NF- κ B nicht nur antivirale Funktionen. Wurzer *et al.* konnten zeigen, dass die NF- κ B-Aktivität die effiziente IV Replikation fördert. Die provirale Funktion geht auf die NF- κ B-abhängige Expression von proapoptotischen Faktoren, wie *tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) oder Fas Ligand (FasL), zurück. Die Inhibition dieser Faktoren führt zu einer verminderten Virusvermehrung in der Zellkultur (Wurzer et al., 2004). Den Zusammenhang zwischen NF- κ B und IV-induzierter Apoptose zeigten auch Högner *et al.* in *ex vivo* und *in vivo* Modellen durch die Proteinkinase R (PKR)- und NF- κ B-abhängige Expression von I κ B- β in Alveolarmakrophagen. Die autokrine Aktivierung von Interferonrezeptoren führt zur Expression und Sezernierung von TRAIL aus den Makrophagen. TRAIL wiederum führt zur Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalweges in Alveolarepithelzellen (AEC) und trägt damit zur Ausbildung eines akuten, Influenzavirus-induzierten Lungenschadens, wie dem *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) bei (Hogner et al., 2013). Auf den Apoptosesignalweg wird in 1.2.1 näher eingegangen.

Eine weitere durch Interferon induzierte Kinase ist die Doppelstrang-RNA-abhängige Proteinkinase R (PKR). Durch Bindung an doppelsträngige RNA wird die PKR aktiviert, was zur Phosphorylierung des Translationsfaktors eIF2 α führt. Der phosphorylierte Transkriptionsfaktor inhibiert die Translation sowohl zellulärer als auch viraler mRNA. PKR kann ebenfalls zur Induktion des Apoptosesignalweges führen (Garcia et al., 2007).

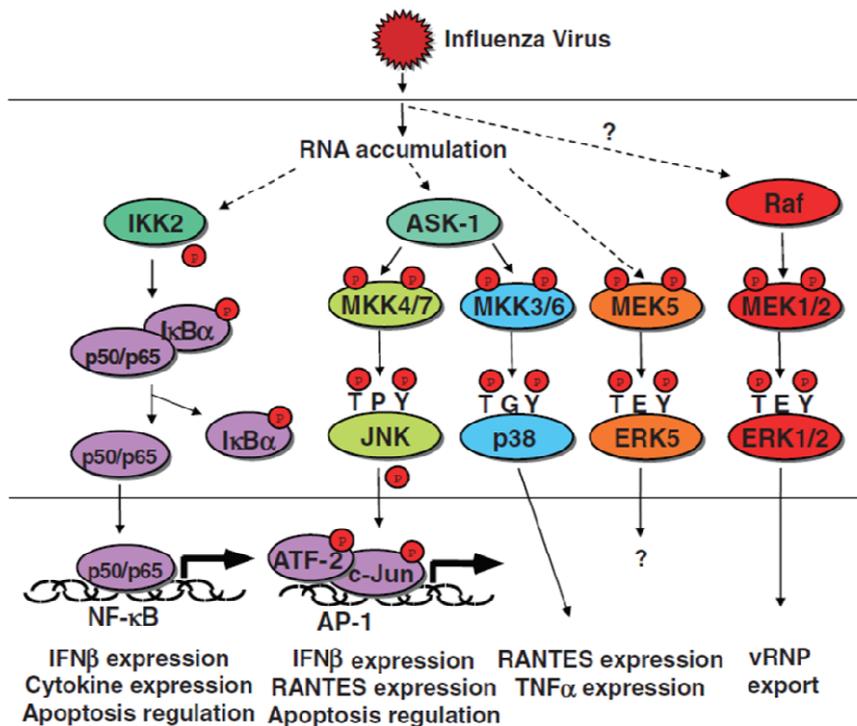


Abbildung 6: Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen und NF-κB in einer Influenzavirus-infizierten Zelle

In der IV-infizierten Zelle werden die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2, ERK5, p38 und JNK aktiviert. Alle Signalwege spielen eine Rolle bei der Regulierung der Expression von antiviralen Faktoren, wie IFN-β, TNF-α und Apoptose. Die Aktivierung von NF-κB durch die Phosphorylierung und Degradierung des Inhibitors IκB hat sowohl antivirale als auch provirale Funktionen. Abbildung modifiziert aus (Ludwig et al., 2006)

1.2.1 Der Apoptosesignalweg

Die Apoptose ist eine wichtige zelluläre, signalbasierende und definierte Form des Zelltodes, die in einer Vielzahl von virusinfizierten (z.B. Flaviviren, Coronaviren, Influenzaviren) Zellen auftritt (Fung and Liu, 2014; Ghosh Roy et al., 2014; Kerr et al., 1972). Zudem spielt sie eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Homöostase von mehrzelligen Organismen (Falschlehner et al., 2007). Während der Apoptose kommt es zu typischen morphologischen Merkmalen, wie Schrumpfung des Zytoplasmas, Bläschenbildung der Plasmamembran, DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation. Die Zellfragmente, auch apoptotische Körperchen genannt, werden dann von phagozytierenden Zellen entfernt (Iwai et al., 2013).

Eine zentrale Rolle in dem Apoptosesignalweg spielen Proteine der Familie der Cystein-abhängigen, Aspartat-spezifischen Proteasen, die sogenannten Caspasen. Caspasen werden zunächst als inaktives Protein mit einer pro-Domäne exprimiert (Falschlehner et al., 2007). Man unterteilt zwei Gruppen von Caspasen, die Initiatorcaspasen, wie z.B. Caspase 8, 9, 10, die durch Spaltung andere Caspasen aktivieren und die Effektorcaspasen, wie z.B. Caspase 3 und 7, die eine Vielzahl von Proteinen spalten oder Enzyme inaktivieren und dadurch zur Auflösung zellulärer Strukturen führen (Thornberry and Lazebnik, 1998).

Zwei wichtige Apoptosesignalwege wurden bisher beschrieben, der extrinsische (rezeptorvermittelt) und der intrinsische (mitochondriale) Signalweg.

1.2.1.1 Der extrinsische Apoptosesignalweg

In IAV-infizierten Zellen, z.B. in humanen Alveolzellen oder alveolaren Makrophagen, werden proinflammatorische und proapoptotische Mediatoren bzw. Zytokine wie *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) und Fas Ligand (FasL) exprimiert und sezerniert (Herold et al., 2008). Diese Mediatoren binden an ihren korrespondierenden Rezeptor, TRAILR1/2 oder Fas, auf der Zelloberfläche. Die Bindung von TRAIL oder FasL führt zur Trimerisierung der Rezeptoren und zur Bildung des sogenannten *death-inducing signaling complex* (DISC) (Walczak and Haas, 2008). Das Adaptermolekül, *Fas-associated death domain* (FADD), bindet im DISC an die zytoplasmatische Rezeptordomäne und rekrutiert die pro-Caspasen 8 und 10. In diesem Komplex werden diese beiden pro-Caspasen autokatalytisch gespalten und aktiviert. Die aktiven Initiatorcaspasen 8 und 10 wiederum spalten die pro-Caspase 3 zur aktiven Effektorcaspase 3 und Bid zu tBid. Die Spaltung von Bid verlinkt den rezeptorvermittelten/extrinsischen Signalweg mit dem intrinsischen/mitochondrialen, oder auch Bcl-2-kontrollierten, Apoptosesignalweg. Die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 führen zur Spaltung von Proteinen, DNA-Fragmentierung und letztendlich zum Zelltod (Falschlehner et al., 2007).

1.2.1.2 Der intrinsische Apoptosesignalweg

Nicht nur die Caspasen 8 und 10, sondern auch eine Vielzahl rezeptorunabhängiger Stimuli wie Chemotherapeutika, radioaktive Strahlung, Tumorsuppressorgene oder zellulärer Stress führen zur Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges (Kroemer, 2003). Proteine der Bcl-2-Familie spielen dabei eine bedeutende Rolle. Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 oder Bcl-X_L sind mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert und stabilisieren deren Integrität. Die Gegenspieler, die proapoptotischen Proteine wie Bak und Bax assoziieren ebenfalls mit der äußeren Mitochondrienmembran, erhöhen aber deren Durchlässigkeit für apoptoseinduzierende Faktoren. Das, durch die Caspase 8-abhängige Spaltung von Bid, entstandene tBid aktiviert Bak und Bax (Falschlehner et al., 2007). Die Destabilisierung der Mitochondrienmembran führt zur Freisetzung von Cytochrom C (CytC) und *apoptosis protease-activating factor-1* (Apaf-1) (Waterhouse et al., 2002). Beide Proteine binden an die pro-Caspase 9 und bilden das Apoptosom (Chowdhury et al., 2006). Dabei wird die pro-Caspase 9 gespalten und die aktive Caspase 9 aktiviert die Effektorcaspase 3. Die Aktivierung der Caspasen 3 und 9 kann durch das *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) gehemmt werden. Allerdings werden weitere Proteine wie *second mitochondria derived activator of caspases* (Smac) und *direct IAP binding protein with low pI* (DIABLO) aus dem Mitochondrien freigesetzt, die wiederum die Aktivität des Inhibitorproteins XIAP blockieren und somit eine vollständige Aktivierung der Effektorcaspasen ermöglichen (Falschlehner et al., 2009; Shi, 2004).

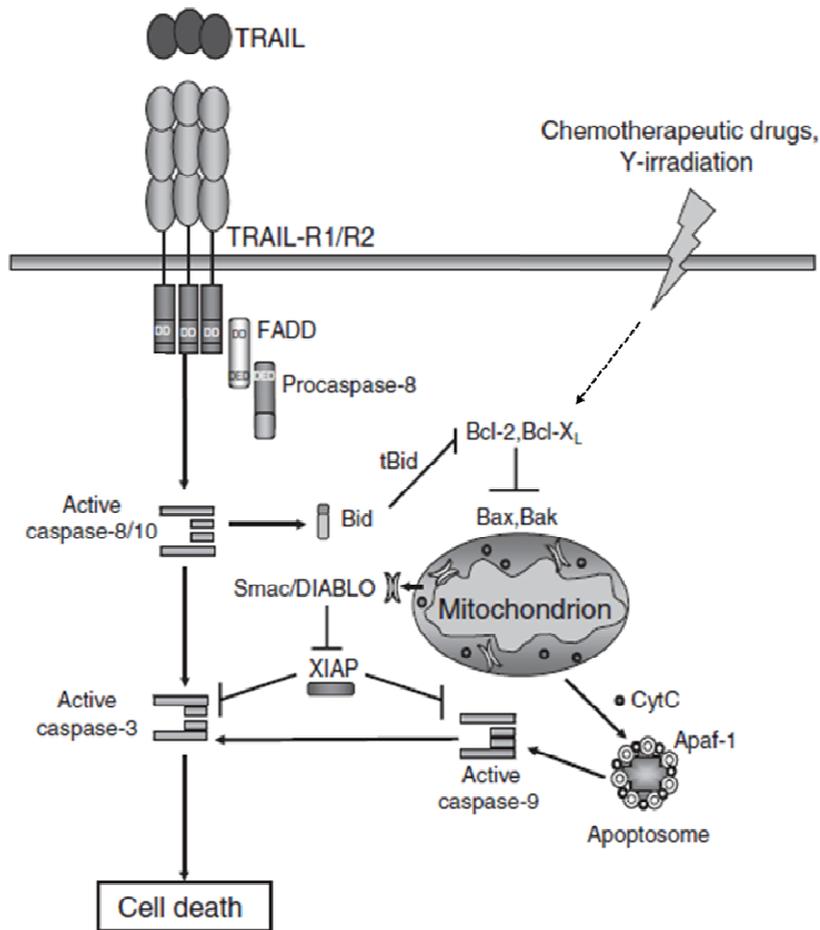


Abbildung 7: Schematische Übersicht über den extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweg

Die Bindung von TRAIL an den Rezeptor (TRAIL-R1/R2) führt zur Bildung des *death-inducing signaling complex* (DISC). Sowohl das Protein *Fas-associated death domain* (FADD) als auch die pro-Caspase 8 und 10 werden in den DISC rekrutiert. Die autokatalytische Aktivierung der Caspasen 8 und 10 führen zur Aktivierung der Caspase 3. Weiterhin wird durch die Caspase 8 Bid zu tBid gespalten und führt zur Aktivierung des intrinsischen, mitochondrialen Signalweges. Zudem kann der intrinsische Signalweg über Faktoren wie Chemotherapeutika oder Strahlung ausgelöst werden. Die proapoptotischen Proteine Bax und Bak erhöhen die Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrienmembran für Proteine. Cytochrom C (CytC), *second mitochondria derived activator of caspases* (Smac) und *direct IAP binding protein with low pI* (DIABLO) werden aus den Mitochondrien freigesetzt. Cytochrom C bildet zusammen mit dem *apoptotic protease activating factor* (Apaf-1) das Apoptosom und aktiviert die pro-Caspase 9 zur Caspase 9. Smac/DIABLO inhibieren das *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) und führen damit zur vollständigen Aktivierung von Caspase 3 und 9. Abbildung modifiziert aus (Falschlehner et al., 2009).

1.2.2. Apoptose in der Influenzavirus-infizierten Zelle

Es ist bekannt, dass die IV-Infektion in kultivierten Epithelzellen und Leukozyten, aber auch in murinen und humanen Lungenzellen den programmierten Zelltod auslöst. Für eine lange Zeit wurde die Apoptose für einen Wirtszellverteidigungsmechanismus gehalten, da viele Viren Proteine (z.B. NS1, PB1-F2 und M2 für IAV) exprimieren, um diese Zellantwort zu manipulieren. So z.B. unterdrückt das NS1 die zelluläre Interferonantwort und die zelluläre Translation, was wiederum die virale Genexpression fördert (Hale et al., 2008; Opitz et al., 2007). Weiterhin wird angenommen, dass durch die Unterdrückung der antiviralen, zellzerstörenden Mechanismen und damit verbundenen Verlängerung des Überlebens der Zelle, die virale Replikation unterstützt wird (Zhirnov et al., 2002). Durch die Inhibierung der PKR-Aktivität durch NS1 wird die Aktivierung der Apoptose durch PKR verhindert. Ein weiteres Nichtstrukturprotein, welches in einigen IAV-Stämmen exprimiert wird, ist das PB1-F2. Dieses Protein wird in der Literatur als mitochondriales Protein beschrieben, das die Aktivität der viralen Polymerase reguliert und *in vitro* die Virusreplikation unterstützt (Chen et al., 2010; Mazur et al., 2008). Das M2 spielt ebenfalls durch die Inhibierung der Makroautophagie eine wichtige Rolle für das Überleben der infizierten Zelle (Gannage et al., 2009).

Neuere Ergebnisse zeigten allerdings, dass auch das Virus einen Vorteil aus der Apoptosesignalkaskade zieht, um die Effizienz der viralen Replikation zu erhöhen (Herold et al., 2012). Dazu wurde z.B. gezeigt, dass die Vermehrung des IAV durch die Inhibition von Caspase 3 verringert werden kann. Mechanistisch führt die Inhibierung der Caspaseaktivität zu einer Retention der RNPs im Kern und somit zu einer Verringerung der Entstehung neuer, infektiöser Viruspartikel (Wurzer et al., 2003). Hinzu kommt, dass durch NF- κ B-abhängige Expression von TRAIL die Caspase 3 über den extrinsischen Apoptosesignalweg aktiviert werden kann. Die Retention der RNPs wurde nicht nur durch Inhibition von TRAIL, von Caspase, sondern auch von NF- κ B beobachtet (Wurzer et al., 2004). Weiterhin konnten Hinshaw und Kollegen zeigen, dass die Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 des intrinsischen Signalweges ebenfalls zur Reduktion des Virustiters führte (Olsen et al., 1996).

1.2.3 Zusammenhang zwischen ERK und der Apoptose

Die Raf-MEK-ERK-Signalkaskade wird in IV-infizierten Zellen aktiviert. Sie spielt nicht nur bei der Zytokinproduktion und der Entstehung von Entzündungen eine wichtige Rolle, sondern auch bei der effizienten IV-Replikation (Mizumura et al., 2003; Pleschka et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Inhibition dieses Signalweges zu einer Verminderung des Viruswachstums führt, sowohl bei IAV als auch bei IBV (Ludwig et al., 2004; Pleschka et al., 2001). In Zellkultur- und in *in vivo*-infizierten Maus-Alveolarepithelzellen, die konstitutiv die Raf-Kinase exprimieren, konnte eine verbesserte Virusreplikation gezeigt werden (Olschlager et al., 2004). Die Inhibierung des Signalweges hatte keinen Effekt auf die Synthese viraler RNA oder Proteine (Pleschka et al., 2001). Vielmehr wurde beobachtet, dass die Inhibierung des Raf-MEK-ERK-Signalweges, wie auch die unter 1.2.1.3 beschriebene Inhibition der Caspase 3, zur Retention der RNPs im Kern führt (Pinto et al., 2011).

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Raf-MEK-ERK-Signalkaskade und dem Apoptosesignalweg in der IV-infizierten Zelle wurde bisher wenig untersucht. Allerdings wurden in anderen Zellsystemen teilweise auch kontroverse Entdeckungen in diesem Zusammenhang gemacht: In Astrocytomazellen konnte im Zusammenhang mit der Expression der Matrix-Metalloprotease-9 gezeigt werden, dass TRAIL hier die ERK-Aktivierung induziert (Kim et al., 2008). In CaoV-3 Ovarialkarzinomzellen wurde nachgewiesen, dass die TRAIL-induzierte ERK-Aktivität bedeutsam für die induzierte Apoptosesensitivität ist (Li et al., 2006). Weiterhin zeigten Liu *et al.*, dass in Fibrosarkomzellen U937 aktives ERK *upstream* der Caspase 8 und durch Induzierung der Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien die Fas/FasL-induzierte Apoptose verstärkt (Liu et al., 2006). Kontrovers dazu zeigten Söderström *et al.*, dass in Jurkat-T-Zellen aktives ERK die TRAIL-induzierte Apoptose an verschiedenen Stellen des extrinsischen und intrinsischen Signalweges inhibiert. Sie fanden heraus, dass die mitochondriale Depolarisation und die Freisetzung von Cytochrom C sowie die Caspase 8-abhängige Spaltung von Bid und die Spaltung von pro-Caspase 8 zu aktiver Caspase 8 im extrinsischen Weg inhibiert werden (Soderstrom et al., 2002). Auch Tran *et al.* konnten zeigen, dass in HeLa-Zellen die Aktivierung des Fas- bzw. TRAIL-Rezeptors zur ERK-Aktivierung führt. Allerdings zeigten sie auch, dass die ERK-Inhibierung nötig für die Apoptoseaktivierung ist, denn die ERK-induzierte Überlebensstrategie ist dominant gegenüber der Fas- bzw. TRAIL-Rezeptor-induzierten Apoptose (Tran et al., 2001). In anderen Ovarialkarzinomzellen und einer Brustkrebszelllinie wurde gezeigt, dass aktives ERK die TRAIL-induzierte Apoptose durch Phosphorylierung der pro-Caspase 8 inhibiert (Mandal et al., 2014). Weiterhin ist

bekannt, dass ein Substrat von ERK die *90 kDa ribosomal S6 kinase* (RSK) ist, die durch Phosphorylierung aktiviert wird (Frodin and Gammeltoft, 1999). RSK wiederum phosphoryliert das proapoptotische Protein Bad, welches dadurch inhibiert wird (Shimamura et al., 2000). Inhibiertes Bad kann in Folge dessen nicht an antiapoptotische Faktoren der Bcl-2-Familie binden und der intrinsische Apoptosesignalweg wird damit blockiert. Der Zusammenhang zwischen ERK und dem Apoptosesignalweg variiert offensichtlich in verschiedenen Zellsystemen.

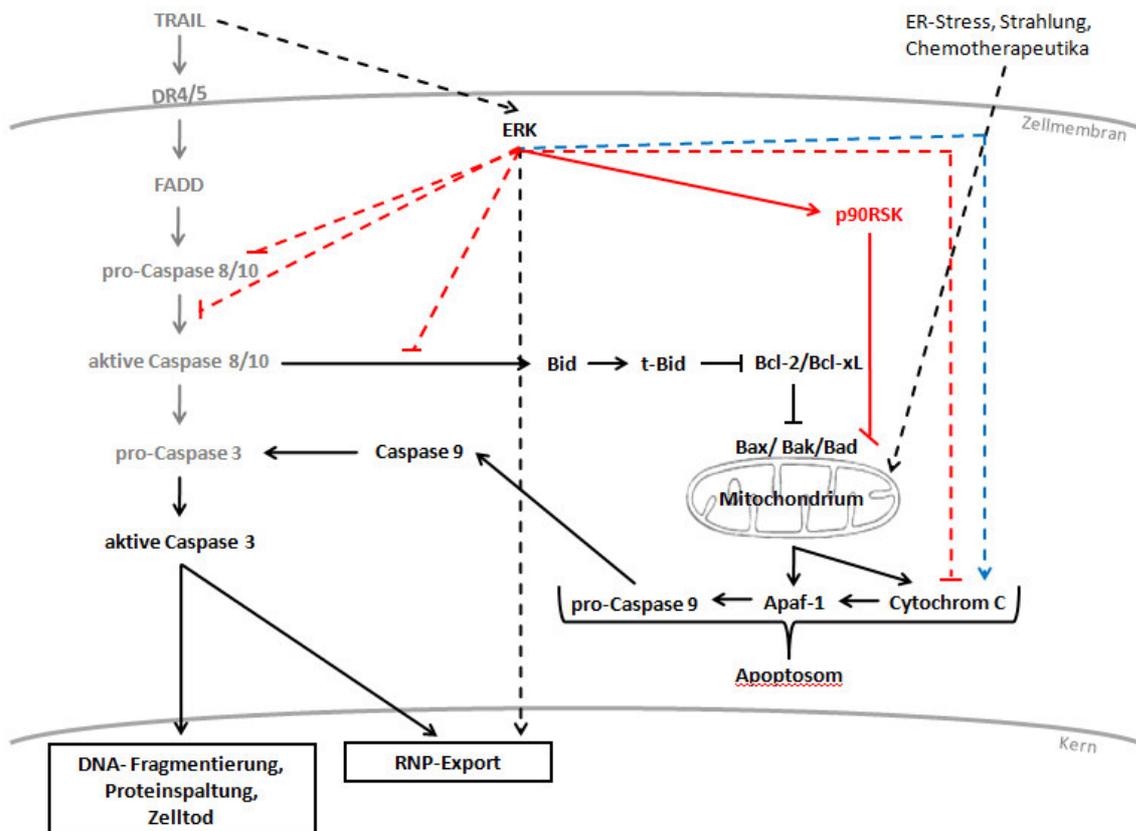


Abbildung 8: Übersicht über mögliche Interaktionen von ERK mit dem Apoptosesignalweg

In der Literatur sind in verschiedenen Zellsystemen unterschiedliche Interaktionen von ERK mit dem Apoptosesignalweg beschrieben. Der blaue Pfeil stellt eine aktivierende Wirkung von ERK sowohl auf den extrinsischen als auch auf den intrinsischen Apoptosesignalweg dar. Die roten Linien zeigen die Inhibition des Apoptosesignalweges durch ERK an verschiedenen Stellen des extrinsischen und intrinsischen Signalweges.

1.3 Zielsetzung

Das Influenzavirus (IV) stellt jedes Jahr eine Bedrohung vieler Menschen dar. Die Infektionen mit dem Virus führt zu Entzündungen der oberen Atemwege mit Fieber, bis hin zur schweren Pneumonie und teilweise auch zum Tod. Ziel der Influenza-Forschung ist die Entwicklung neuer antiviraler Medikamente und die effiziente Herstellung von Impfstoffen. Dazu ist es besonders wichtig, die grundlegenden Mechanismen in der IV-infizierten Zelle sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu kennen.

In der IV-infizierten Zelle werden nicht nur eine Vielzahl von Signalkaskaden ausgelöst, um den Eindringling zu bekämpfen, sondern das Virus weiß auch die Wirtszelle so zu manipulieren bzw. die antiviralen Mechanismen so auszunutzen, dass die eigene Replikation vorangetrieben wird (Herold et al., 2012). Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht der Effekt der Apoptosesignalkaskade auf den RNP-Export bzw. auf die Replikation des IV und deren Regulation in der IV-infizierten sekundären Zellkultur.

Obwohl bereits gezeigt wurde, dass die Inhibition von Caspase 3 zu einer Retention der RNPs im Kern führt (Wurzer et al., 2003), sollte mit Hilfe von Immunfluoreszenz die Zell- bzw. Virusspezifität der Abhängigkeit der RNP-Lokalisation von der Caspase 3-Aktivität untersucht werden. Wie bereits erwähnt wurde auch gezeigt, dass der nukleäre RNP-Export von Crm-1 abhängig ist, was auf einen aktiven Transportmechanismus der RNPs schließen lässt (Nguyen et al., 2012). Um diesen scheinbaren Widerspruch zu klären, sollte in dieser Arbeit der Zusammenhang und die Zeitabhängigkeit von dem aktiven, Crm-1-abhängigen Transport der RNPs und dem caspaseabhängigen RNP-Export in der IV-infizierten Zelle erforscht werden. Caspasen haben eine Vielzahl an Substraten. Hierbei ist die Degradierung von Kernporenproteinen und die Auflösung des inneren Kernkanals hervorzuheben (Faleiro and Lazebnik, 2000), was zu einer Erhöhung des Diffusionslimits und damit möglicherweise zu einem vereinfachten RNP-Export führt (Wisskirchen, 2007). Aufbauend auf die Diplomarbeit von C. Wisskirchen (AG Pleschka, 2007) sollte in IV-infizierten und Actinomycin D-behandelten Zellen gezeigt werden, dass die Aktivierung der Caspase und die damit verbundene Erhöhung des Diffusionslimits kein IV-spezifisches Phänomen ist, sondern dass das IV zelluläre Signalmechanismen für den verbesserten RNP-Export ausnutzt.

Ex vivo und *in vivo* wurde bereits gezeigt, dass die TRAIL-Expression in Makrophagen die Apoptose in AEC über den extrinsischen Apoptosesignalweg auslöst (Hogner et al., 2013). Da in der sekundären Zellkultur keine Makrophagen vorhanden sind, sollte untersucht werden, ob in der infizierten Zellkultur auch TRAIL exprimiert und sezerniert wird und ob hier das TRAIL einen Anteil an der Caspaseaktivierung hat. Desweiteren sollte der Anteil des intrinsischen Apoptosesignalweges an der Caspase 3-Aktivierung analysiert werden.

Frühere Arbeiten zeigten, dass sowohl die Inhibierung von ERK als auch die Caspase 3-Inhibierung den gleichen Phänotyp aufweisen, nämlich die Retention der RNPs im Kern und einen verringerten Virustiter (Pleschka et al., 2001; Wurzer et al., 2003). Aus diesem Grund sollte ein Zusammenhang zwischen dem ERK-Signalweg und der Apoptosesignalkaskade hergestellt werden und mögliche Interaktionspunkte untersucht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

<u>Chemikalien</u>	<u>Firma</u>
Accutase	PAA
3-Amino-9-ethyl-carbazol (AEC)	Sigma Aldrich
Ammoniumacetat	Merck
Bradfordreagenz	BioRad
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	Roth
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
CHAPS	Roth
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Merck
4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Roth
Dimethylformamid	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Fibronectin	Sigma Aldrich
Formaldehydlösung 37%	Roth
Glycerin	Merck
HEPES	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth
Bovines Kollagen Typ I	Sigma Aldrich
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Mowiol	Sigma Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich
Tris(2-chlorethyl)phosphat (TCEP)	Sigma Aldrich
Tris-HCl	Roth

2. Materialien und Methoden

Triton X-100	Roth
Trypsin-EDTA	Life Technologies
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Fluka

2.1.2 Medien und Medienbestandteile

<u>Medium/ Mediumbestandteil</u>	<u>Firma</u>
Avicell	FMC Bio Polymer
Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM) (BulletKit)	Lonza
Bovines Serumalbumin 30% (BSA)	Life Technologies
DEAE-Dextran	Pharmacia Biotech
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (+ Glucose, + Pyruvat)	Life Technologies
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA
L- Glutamin	Invitrogen
HAM's-F10 (- L-Glutamin)	c-c-pro
Hühnerserum	Sigma Aldrich
Minimum Essential Medium (MEM) (+ Earle's Salzen, - L-Glutamin)	c-c-pro
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
TPCK-Trypsin	Sigma Aldrich
Tryptose Phosphat Broth	Sigma Aldrich
Roswell Park Memorial Institute Kulturmedium (RPMI 1640) (+ L-Glutamin)	Life Technologies

2.1.3 Antibiotika

<u>Antibiotikum</u>	<u>Firma</u>
Penicillin	PAN
Streptomycin	PAN

2.1.4 Geräte und Zubehör

<u>Gerät</u>	<u>Firma</u>
Brutschrank für Vogeleier	HEKA
ELISA-Reader EL808	BioTek
Heizblock	Eppendorf
Inkubator	Panasonic
Magnetrührer JKAMAG RCT	Janke & Kunkel
Mikrotiterplatte 96-well (U-/V-förmiger Boden)	Greiner Bio-One
Kanüle (Sterican)	Roth
Konfokales <i>Laserscanning</i> -Mikroskop, TCS SP5	Leica
Kryogefäß	Sarstedt
8-Kammer-Objektträger	Lab-Tek
Odyssey Infrarot Imaging System	Licor
pH-Meter	Metrohm
Pipetten 2µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Gilson
Spritze (Injekt-F)	Braun
Sterilbank	Thermo Scientific
Tischzentrifuge	VWR
Transferpette (12-Kanal)	Brand
Untertischzentrifuge (Megafuge 1.0R)	Heraeus
Vortex	Janke & Kunkel
Waage PM460	Mettler
Wippschüttler	GFL
Zellkulturflaschen T-75	Greiner Bio-One
Zellkulturmikroskop	Olympus
Zellkulturplatte 24-well	BD Falcon
Zellkulturplatte 96-well	Greiner Bio-One
Zellkulturplatte 96-well, schwarz	BD Falcon
Zellkulturschale 6cm	BD Falcon
Zellschaber	Sarstedt

2.1.5 Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Bedeutung, Spezies, Morphologie, Gewebe</u>	<u>Quelle</u>
A549	humane Lungenkarzinomepithelzellen	Zelliniensammlung, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig- Universität Gießen
hAEC	primäre humane Alveolarepithelzellen	AG Herold, Klinik für Innere Medizin, Zentrum für Infektionskrankheiten, Justus-Liebig-Universität Gießen
BEAS-2B	humane Bronchialepithelzellen	Zelliniensammlung, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig- Universität Gießen
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i> , humane Brustadenokarzinomepithelzellen	Zelliniensammlung, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig- Universität Gießen
MDCK-I, -II	<i>Madin Darby canine kidney cells</i> , canine Nierenkarzinomepithelzellen	Zelliniensammlung, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig- Universität Gießen
QT6	Wachtelfibroblasten	Zelliniensammlung, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig- Universität Gießen

2.1.6 Virusstämme

<u>Virus</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Quelle</u>
A/FPV/Bratislava/79 (H7N7)	FPV	Virusstammsammlung, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen
A/FPV/Bratislava-LP/2014 (H7N7)	FPV-LP	Virusstammsammlung, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen
A/Hamburg/01/09 (H1N1)	H1N1pdm09	Virusstammsammlung, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen
B/Lee/40	B/Lee	Virusstammsammlung, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen
C/Johannesburg/1/66	C/JHB/1/66	Virusstammsammlung, Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

2.1.7 Zellkulturmedien

A549 und MDCK-II Medium

10%	FCS
100U/ml	Penicillin
0,1mg/ml	Streptomycin
	in DMEM

BEAS-2B Medium

10%	FCS
100U/ml	Penicillin
0,1mg/ml	Streptomycin
	in BEGM

MCF-7 Medium

10%	FCS
100U/ml	Penicillin
0,1mg/ml	Streptomycin
	in RPMI 1640

MDCK-I Medium

10%	FCS
100U/ml	Penicillin
0,1mg/ml	Streptomycin
2mM	L-Glutamin
	in MEM

QT6 Medium

10%	FCS
100U/ml	Penicillin
0,1mg/ml	Streptomycin
2mM	L-Glutamin
1%	Hühnerserum
2%	Tryptose Phosphat Broth in HAM's-F10

Infektionsmedium

0,2%	BSA
100U/ml	Penicillin
0,1mg/ml	Streptomycin
-/+ 1µg/µl	TPCK-Trypsin

in jeweiligem Medium (DMEM/ BEGM/ RPMI 1640/ MEM/ HAM's-F10)

Avicell-Medium

100U/ml	Penicillin
0,1mg/ml	Streptomycin
0,36%	BSA
1,25%	Avicell
0,01%	DEAE-Dextran
0,3%	Natriumhydrogencarbonat in MEM

2.1.8 Puffer und Lösungen

Acetatpuffer pH 5,0

50mM Ammoniumacetat
8mM H₂O₂
 in ddH₂O

20x AEC-Substrat

1% (w/v) 3-Amino-9-ethyl-carbazol (AEC)
 in Dimethylformamid

Assay Puffer

0,4mM TCEP
0,2% (v/v) Triton X-100
 in 2x Caspase 3 Assay Puffer

2x Caspase 3 Assay Puffer

200mM HEPES (pH 7,5)
2mM EDTA
0,2% (w/v) CHAPS
20% (v/v) Glycerin
 in ddH₂O

Fibronectin-Kollagen-Lösung

0,01mg/ml Fibronectin
0,03mg/ml Bovines Kollagen Typ I
0,01mg/ml BSA
 in BEAS-2B Medium

PBS pH 7,4

137mM	NaCl
2,7mM	KCl
10mM	Na ₂ HPO ₄
2mM	KH ₂ PO ₄
	in ddH ₂ O

PBS⁺⁺

0,9mM	CaCl ₂
1mM	MgCl ₂
	in PBS

PBS⁺⁺/P/S/BA

0,2%	BSA
100U/ml	Penicillin
0,1mg/ml	Streptomycin
	in PBS ⁺⁺

2.1.9 Aktivatoren, Inhibitoren

Substanz

Actinomycin D (ActD)
Caspase 3 Inhibitor (Z-DEVD-FMK)
Caspase 8 Inhibitor (Z-IETD-FMK)
Caspase 9 Inhibitor (Z-LEHD-FMK)
Leptomycin B (LepB)
Staurosporin
Tetradecanoylphorbol-acetat (TPA)
1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis
(2-aminophenylthio)butadien (U0126)

Firma

Sigma Aldrich
R&D Systems
R&D Systems
R&D Systems
Sigma Aldrich
Sigma Aldrich
Sigma Aldrich
Calbiochem

2.1.10 Kits

<u>Kit</u>	<u>Firma</u>
canineTRAIL ELISA Kit	Wuxi Donglin Sci & Tech Development
Caspase-3/CPP32 Colorimetric Protease Assay Kit	R&D Systems
Caspase-9/Mch6/Apaf-3 Colorimetric Protease Assay Kit	R&D Systems
IRDye 800CW/QC-1 CSP-3 Kit	Licor

2.1.11 Plasmide

<u>Plasmid</u>	<u>Quelle</u>
p3xEGFP-NLS	P. V. Litsky, Moskau, Russland
pEGFP-GFP5x	Y. Lazebnik, Cold Spring Harbour, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Passagieren von Zellen

A549-, BEAS-2B-, MCF-7-, MDCK-I-, MDCK-II- und QT6-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 100% in T-75 Zellkulturflaschen jeweils in den unter 2.1.7 angegebenen Medium bei 37°C, 95% Humidität und 5% CO₂ kultiviert und jeden zweiten Tag passagiert. Dazu wurde der Zellrasen zunächst mit 5ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit 5ml Trypsin-EDTA bei 37°C, 95% Humidität und 5% CO₂ inkubiert. Die 5ml Trypsin-EDTA wurden danach mit 5ml des jeweiligen Mediums neutralisiert und die gewünschte Verdünnung in einem Gesamtvolumen von 20ml eingestellt.

Für die jeweiligen Experimente wurde in dem entsprechendem Medium die gewünschte Verdünnung der Zellen eingestellt und in entsprechende Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Lagerung der Zellen über einen langen Zeitraum wurden diese kryokonserviert. Dazu wurden die 90-100% konfluenten Zellen mit 5ml PBS gewaschen und anschließend mit 5ml Trypsin versetzt und bei 37°C, 95% Humidität und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit 5ml des jeweiligen Mediums versetzt und 10min bei 1200rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1ml 10% DMSO in Medium resuspendiert und in ein Kryogefäß überführt. Zunächst wurden die Zellen über Nacht bei -80°C langsam eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.3 Infektion von Zellen

Für die Infektion von Zellen wurde zunächst das jeweilige Virus entsprechend der *multiplicity of infection* (MOI) in PBS⁺⁺/P/S/BSA verdünnt. Die zu 90% konfluenten Zellen wurden einmal mit PBS⁺⁺ gewaschen und 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln mit der Virusverdünnung inkubiert. Anschließend wurde das Inoculum abgesaugt und die Zellen mit Infektionsmedium bei 37°C, 95% Humidität und 5% CO₂ die angegebene Zeit inkubiert.

2.2.2 Herstellung eines Virusstocks

2.2.2.1 Herstellung eines Influenza-A-Virusstocks

Influenza-A-Viren wurden auf MDCK-II-Zellen angezogen. Dazu wurden die zu 80% konfluenten Zellen in einer T-75 Zellkulturflasche mit 5ml Virusverdünnung der MOI von 0,01 für H1N1pdm09 bzw. mit einer MOI von 0,001 für FPV und FPV-LP infiziert (siehe 2.2.1.3). Das Inoculum wurde nicht abgesaugt und mit 5ml Infektionsmedium/1µg/ml TPCK-Trypsin (für FPV nur Infektionsmedium) versetzt und bei 37°C, 95% Humidität und 5% CO₂ inkubiert. 24h p.i. wurden 3ml Überstand entnommen und durch frisches Infektionsmedium (-/+ TPCK-Trypsin) ersetzt. Nach 48h wurde der Überstand abgenommen, 5min bei 1200rpm und 4°C zentrifugiert und der Virustiter bestimmt. Die Lagerung der Virusstocks erfolgte bei -80°C.

2.2.2.2 Herstellung eines Influenza-B-Virusstocks

Das Influenzavirus B/Lee/40 wurde auf MDCK-II-Zellen angezogen. Dazu wurden die zu 80% konfluenten Zellen in einer T-75 Zellkulturflasche mit 1ml Virusverdünnung der MOI von 0,01 infiziert (siehe 2.2.1.3). Das Inoculum wurde abgesaugt und die Zellen mit 15ml Infektionsmedium/1µg/ml TPCK-Trypsin bei 33°C, 95% Humidität und 5% CO₂ inkubiert. 72h p.i. wurde der Überstand abgenommen, 5min bei 1200rpm und 4°C zentrifugiert und der Virustiter bestimmt. Die Lagerung des Virusstocks erfolgte bei -80°C.

2.2.2.3 Herstellung eines Influenza-C-Virusstocks

Das Influenzavirus C/Johannesburg/1/66 wurde in 11 Tage alten befruchteten, bebrüteten Hühnereiern angezogen. Dazu wurden jeweils 200µl einer 1:1000-verdünnten Virussuspension in den Luftsackbereich injiziert und die Eier bei 33°C und 80% Humidität inkubiert. 72h p.i. wurden die Alantoisflüssigkeit abgesaugt und der Virustiter bestimmt. Die Lagerung des Virusstocks erfolgte bei -80°C.

2.2.3 Bestimmung des Virustiters

2.2.3.1 Hämagglutinationsassay (HA-Assay)

Zur Bestimmung der relativen Anzahl der Viruspartikel wurde zunächst ein Hämagglutinationsassay durchgeführt. Dieser beruht auf der agglutinierenden Eigenschaft von Influenzaviren durch das Oberflächenprotein Hämagglutinin.

Zunächst wurden die Erythrozyten aus Blut von pathogenfreien Hühnern gereinigt. Dazu wurde das Blut 1min bei 5000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, bestehend aus den Erythrozyten, in 1x PBS gewaschen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis ein klarer Überstand erhalten wurde. Für den Hämagglutinationsassay wurden 0,5% gereinigte Erythrozyten in PBS verwendet.

Zur Bestimmung des HA-Titers wurden zunächst 50µl 1x PBS in einer 96-well Mikrotiterplatte mit V-förmigem Boden vorgelegt. In dem ersten Well wurden nur 100µl Virussuspension vorgelegt und durch Überführen und vorsichtigem Mischen von 50µl von Well zu Well die Virussuspension jeweils 1:2 verdünnt. Anschließend wurde zu jedem Well 50µl der Erythrozytenverdünnung zugegeben und 45min bei 4°C inkubiert. Die Bestimmung der hämagglutinierenden Einheiten erfolgte durch den Vergleich der Blutpräzipitation (Knöpfchenbildung) in jeden Well im Vergleich zur Positiv (Virus mit bekanntem HA-Titer)- bzw. Negativkontrolle (PBS).

2.2.3.2. Titration mittels Immunhistochemie

Zur Bestimmung der Anzahl der infektiösen Viruspartikel wurde der Foci Assay durchgeführt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe des Virus von 10^{-1} bis 10^{-8} in jeweils 180µl PBS⁺⁺/P/S/BA in einer 96-well Mikrotiterplatte mit U-förmigem Boden erstellt.

MDCK-II Zellen wurden in 96-well Zellkulturplatten ausgesät. Für die Titration des C/Johannesburg wurden MDCK-I Zellen verwendet. Die Infektion erfolgte mit 50µl Virusverdünnung wie unter 2.2.1.3 beschrieben. Das Inoculum wurde abgesaugt und die Zellen mit 150µl Avicell-Medium 20-24h inkubiert. Anschließend wurde das Avicell-Medium mit PBS⁺⁺ weg gewaschen und die Zellen 1h bei Raumtemperatur mit 3,7% Formaldehydlösung/1% Triton X-100 in PBS fixiert und permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,05% Tween 20 in PBS erfolgte die Inkubation mit 50µl Primärantikörper (siehe Tabelle 1) in 3% BSA in PBS 1h bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden erneut dreimal mit 0,05% Tween 20 in PBS gewaschen und 1h bei Raumtemperatur mit 50µl Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus IgG HRP; 1:1000; Santa Cruz) in 3% BSA in PBS inkubiert. Die immunhistochemische Färbung erfolgte

mittels 1x AEC-Substrats in Acetatpuffer für 30min bei 37°C. Die Farbreaktion wurde mittels dreimaligen Waschens mit Wasser gestoppt und die Platten getrocknet. Zum Zählen der Foci wurden die Platten eingescannt und der Virustiter wie folgt bestimmt:

$$\text{Virustiter} \left[\frac{\text{FFU}}{\text{ml}} \right] = \text{Anzahl der Foci} * \text{Volumenfaktor} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Tabelle 1: Primärantikörper für die Titration mittels Immunhistochemie

<u>Primärantikörper</u>	<u>Firma</u>	<u>Verdünnung</u>
Maus anti-IAV NP	S. Ludwig, Münster	1:100
Maus anti-IBV NP mAb	Thermo Scientific	1:100
Maus anti-ICV NP, Klon F17	M. Marschall, Erlangen	1:5000

2.2.4 Immunfluoreszenz und Konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie

Für die Konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie wurden die Zellen in 8-Kammer-Objektträger ausgesät. Vor dem Aussäen der BEAS-2B Zellen wurden die Objektträger 3h mit einer Fibronectin-Kollagen-Lösung beschichtet und anschließend getrocknet. Nach Infektion (siehe 2.2.1.3), Behandlung und Inkubation der Zellen wurden diese mit PBS⁺⁺ gewaschen und 1h bei Raumtemperatur in 3,7% Formaldehydlösung in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen 45min in 1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen in PBS erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper (siehe Tabelle 2) in 3% BSA in PBS 1h bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden erneut dreimal in PBS gewaschen und 1h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3) in 3% BSA in PBS inkubiert. Die Färbung der DNA erfolgte nach dreimaligem Waschen mit PBS für 10min mit DAPI (1:400) in 3% BSA in PBS. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS und einmal mit Wasser gewaschen und in Mowiol-DABCO-Lösung eingebettet. Die Analyse der Präparate erfolgte an einem Konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop.

Tabelle 2: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz

<u>Primärantikörper</u>	<u>Firma</u>	<u>Verdünnung</u>
Maus anti-IAV NP (FPV) mAb, Klon 1331	Biodesign	1:1000
Maus anti-IBV NP mAb	Thermo Scientific	1:100
Maus anti-ICV NP, Klon F17	M. Marschall, Erlangen	1:5000

Tabelle 3: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

<u>Sekundärantikörper</u>	<u>Firma</u>	<u>Verdünnung</u>
Ziege anti-Maus Alexa Fluor 594-gekoppeltes F(ab') ₂ Fragment	Molecular Probes	1:200

Zur Herstellung der Mowiol-Dabco-Lösung wurden zunächst 2,4g Mowiol, 6g Glycerin und 6ml ddH₂O über Nacht gemischt. Dazu wurden 12ml 0,2mM Tris/HCl-Lösung pH 8,5 zugegeben und 30min bei 50°C gemischt. Anschließend wurde die Lösung 15min bei 500rpm zentrifugiert, mit 2,5% (w/v) DABCO versetzt und gut gemischt. Die Mowiol-DABCO-Lösung wurde in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5 Transfektion

Die Transfektion der MDCK-II Zellen mit den Plasmiden p3xEGFP-NLS (3xGFP-NLS) bzw. pEGFP-GFP5x (5xGFP) erfolgte mittels Suspensionstransfektion und dem jetPRIME Polyplus Transfection Kit.

Die konfluenten Zellen in der T-75 Zellkulturflasche wurden nach einmaligem Waschen mit 1x PBS mit 5ml Accutase 15min bei 37°C inkubiert. Zu den abgelösten Zellen wurden 5ml DMEM/Penicillin/Streptomycin/FCS zugegeben und die Zellsuspension 5min bei 1000rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10ml DMEM/Penicillin/Streptomycin/FCS resuspendiert und eine 1:20-Verdünnung der Zellen vorbereitet.

Parallel dazu wurden nach Anleitung des jetPRIME Polyplus Transfection Kit Protokolls 2µg Plasmid-DNA mit 200µl jetPRIME Puffer und 4µl jetPRIME Reagenz gut gemischt und 10min bei Raumtemperatur inkubiert.

Jeweils 100µl des Transfektionsmixes und 500µl Zellsuspension wurden gemischt und in 8-Kammer-Objektträger ausgesät. 36h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit FPV infiziert (siehe 2.2.1.3) oder mit 2µg/ml Actinomycin D behandelt. Die Fixierung, Permeabilisierung und die Immunfärbung erfolgte wie unter 2.2.4 beschrieben.

2.2.6 Caspase-Aktivitätsassay

2.2.6.1 Fluorometrischer Caspase 3-Aktivitätsassay

Der fluorometrische Caspase 3-Aktivitätsassay wurde mit Hilfe des IRDye 800CW/QC-1 CSP-3 Kits durchgeführt. Das Substrat dieses Assays besteht aus dem Fluorophor IRDye 800CW, welches über ein Peptid (Sequenz: GDEVDGAK) an einen Quencher (IRDye QC-1) gekoppelt ist. Wenn das Peptid durch die aktive Caspase 3 gespalten, dann wird der Quencher vom Fluorophor abgelöst und die Fluoreszenz ist im nahen Infrarotbereich ($820\text{nm} \pm 10\text{nm}$) messbar. Dieses Kit kann direkt auf lebenden Zellen angewendet werden.

Dazu wurden die Zellen in schwarze 96-well Zellkulturplatten ausgesät. Die Infektion der zu 90% konfluenten Zellen erfolgte wie in 2.2.1.3 beschrieben. Die Zellen wurden in jeweils $50\mu\text{l}$ /Well Medium mit verschiedenen Inhibitoren bzw. Aktivatoren inkubiert.

Zur Durchführung des Assays wurden der 2x Caspase 3 Assay Puffer, der Assay Puffer und die Substratlösung nach Angaben des Herstellerprotokolls hergestellt. Jeweils $50\mu\text{l}$ der Substratlösung wurden zu jedem Well hinzugegeben und 1h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Das Messen der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels Odyssey Infrarot Imaging System bei einer Anregungswellenlänge von 780nm und folgenden Einstellungen: Fokusversatz: $3,0\text{mm}$; Auflösung: $200\mu\text{m}$; Intensität Kanal 800: 5.

2.2.6.2 Colorimetrischer Caspase 3-Aktivitätsassay

Der colorimetrische Caspase 3-Aktivitätsassay wurde mit Hilfe des Caspase-3/CPP32 Colorimetric Protease Assay Kits durchgeführt. Das Substrat dieses Assays besteht aus dem Chromophor p-Nitroanilin (pNA), welches an ein spezifisches Peptid (Sequenz: DEVD) gekoppelt ist. Wird durch die aktive Caspase 3 das Chromophor vom Peptid abgespalten, kann die Lichtabsorption des freien p-Nitroanilin gemessen werden. Dieses Kit kann nur in Zelllysaten angewendet werden.

Dazu wurden die Zellen in 6cm-Zellkulturschalen ausgesät. Die Infektion der zu 90% konfluenten Zellen erfolgte wie in 2.2.1.3 beschrieben. Die Zellen wurden in jeweils 2ml Medium mit verschiedenen Inhibitoren bzw. Aktivatoren inkubiert.

Zur Herstellung der Zelllysate wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturschalen abgeschabt, 1min bei 13000rpm zentrifugiert und in 50µl Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation der Zellen auf Eis für 10min erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 10000rpm für 1min. Der Überstand wurde bei -80°C aufbewahrt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradfordreagenz. Dazu wurde das Bradfordreagenz 1:5 in Wasser verdünnt. Jede Probe wurde 1:200 in der Bradfordlösung verdünnt, die Absorption bei 630nm gemessen und mittels einer BSA-Standardkurve die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

Der colorimetrische Caspase 3-Aktivitätsassay wurde, wie im Herstellerprotokoll angegeben, durchgeführt. Jeweils 150µg Protein wurden in insgesamt 50µl Lysepuffer verdünnt und mit 50µl 2x Reaktionspuffer versetzt. Anschließend wurden 5µl DEVD-pNA Substrat zugegeben und die Absorption nach einer Inkubation von 2h bei 37°C, bei 405nm gemessen.

2.2.6.3 Colorimetrischer Caspase 9-Aktivitätsassay

Der colorimetrische Caspase 9-Aktivitätsassay wurde mit Hilfe des Caspase-9/Mch6/Apaf-3 Colorimetric Protease Assay Kits durchgeführt. Das Substrat dieses Assays besteht aus dem Chromophor p-Nitroanilin, welches an ein spezifisches Peptid (Sequenz: LEHD) gekoppelt ist. Wird durch die aktive Caspase 9 das Chromophor vom Peptid abgespalten, kann die Lichtabsorption des freien p-Nitroanilin (pNA) gemessen werden. Dieses Kit kann nur in Zelllysaten angewendet werden.

Die Herstellung der Zelllysate sowie die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden wie unter 2.2.6.2 beschrieben durchgeführt.

Der colorimetrische Caspase 9-Aktivitätsassay wurde, wie im Herstellerprotokoll angegeben, durchgeführt. Jeweils 150µg Protein wurden in insgesamt 50µl Lysepuffer verdünnt und mit 50µl 2x Reaktionspuffer versetzt. Anschließend wurden 5µl LEHD-pNA Substrat zugegeben und die Absorption nach einer Inkubation von 2h bei 37°C, bei 405nm gemessen.

2.2.7 In-Cell-Western Blot (ICW)

Für den ICW wurden die Zellen in schwarze 96-well Zellkulturplatten ausgesät. Die Infektion erfolgte wie unter 2.2.1.3 beschrieben mit 50µl Virusverdünnung. Anschließend wurden das Inoculum abgesaugt und die Zellen in 100µl des entsprechenden Infektionsmediums inkubiert.

Nicht infizierte Zellen wurden direkt nach dem Waschen mit den entsprechenden Aktivatoren bzw. Inhibitoren, gelöst in Infektionsmedium, inkubiert.

Nach der Infektion bzw. Behandlung der Zellen wurden der Überstand abgesaugt und die Zellen 1h bei Raumtemperatur in 3,7% Formaldehydlösung in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal 5min und einmal 10min mit 200µl 1% Triton X-100 in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindestellen abzusättigen, wurden die Zellen 2h bei Raumtemperatur in PBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver inkubiert. Die Inkubation der Zellen mit dem primären Antikörper (Konzentrationen siehe Tabelle 4) in PBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver erfolgte 2h bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen zweimal 5min und einmal 10min mit 200µl 1% Tween 20 in PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (Konzentrationen siehe Tabelle 5) in 0,2% Tween 20 in PBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver 1h bei Raumtemperatur, lichtgeschützt, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal 10min mit 200µl 1% Tween 20 in PBS und einmal 10min in PBS gewaschen und die Zellen getrocknet. Die Detektion der fluoreszenzmarkierten Proteine erfolgte am Odyssey Infrarot Imaging System bei einer Anregungswellenlänge von 680 und 780nm und folgenden Einstellungen: Fokusversatz: 3,0mm; Auflösung: 200µm; Intensität Kanal 700 und 800: 5.

Tabelle 4: Primärantikörper für den ICW

<u>Primärantikörper</u>	<u>Firma</u>	<u>Verdünnung</u>
Kaninchen anti-ERK	Santa Cruz	1:100
Maus anti-P-ERK	Santa Cruz	1:100

Tabelle 5: Sekundärantikörper für den ICW

<u>Sekundärantikörper</u>	<u>Firma</u>	<u>Verdünnung</u>
Ziege anti-Kaninchen IRDye 680	Licor	1:1000
Ziege anti-Maus IRDye 800CW	Licor	1:1000

2.2.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA wurde mit Hilfe des canineTRAIL ELISA Kits durchgeführt. Das Prinzip des ELISAs beruht auf der adsorptiven Bindung von caninem TRAIL an eine Mikrotiterplatte mittels biotinylierter anti-canineTRAIL Antikörper. Nach Zugabe von Streptavidin-konjugierter HRP und dem 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substrat (TMB) findet nur in den Wells eine Farbreaktion statt, die sowohl TRAIL als auch den biotinylierten Antikörper und das Streptavidin-konjugierte Enzym enthalten. Die Farbreaktion wird mittels Schwefelsäure abgestoppt und bei 450nm spektrophotometrisch gemessen.

Für die Bestimmung der TRAIL-Konzentration wurden sowohl Zellkulturüberstände als auch Zelllysate gemessen.

Für die Proben der Zellkulturüberstände wurden die Zellen in 24-well Zellkulturplatten ausgesät. Die Infektion der Zellen erfolgte wie in 2.2.1.3 beschrieben. Die Zellen wurden in jeweils 300µl Medium/Well inkubiert. 8h, 24h, und 48h p.i. wurde der Überstand abgenommen, 1min bei 13000rpm zentrifugiert und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Herstellung der Zelllysate wurden die Zellen in 6cm-Zellkulturschalen ausgesät. Die Infektion der Zellen erfolgte wie in 2.2.1.3 beschrieben. Die Zellen wurden in jeweils 2ml Medium inkubiert. 8h, 24h und 48h p.i. wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst, 1min bei 13000rpm zentrifugiert, drei mal mit 1x PBS gewaschen und in 150µl 1xPBS resuspendiert. Nach drei Gefrier-Tau-Zyklen wurden die Zellen erneut bei 4000rpm für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradfordreagenz. Dazu wurde das Bradfordreagenz 1:5 in Wasser verdünnt. Jede Probe wurde 1:200 in der Bradfordlösung verdünnt und die Absorption bei 630nm gemessen.

Der ELISA wurde, wie im Herstellerprotokoll angegeben, durchgeführt. Jeweils 100µl Standard bzw. Probe wurden über Nacht bei 4°C in der präparierten Mikrotiterplatte inkubiert. Der Überstand wurde dekantiert und jeweils 100µl Detektionsreagenz A zugegeben und 1h bei 37°C inkubiert. Nach drei Waschsritten wurden jeweils 100µl Detektionsreagenz B zugegeben und 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend folgten erneut 5 Waschsritte. Danach wurden 90µl Substratlösung zugegeben und 20min bei 37°C inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 50µl Stopplösung abgestoppt und bei 450nm spektrophotometrisch gemessen.

2.2.9 Statistik

Für die Berechnung der Signifikanzen wurde das Programm SigmaStat 3.5 verwendet. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung des t-Tests oder des Rangsummentests (Mann-Whitney-U-Test) analysiert. Alle Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung präsentiert und ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Die Rolle der intrazellulären Caspaseaktivität für den RNP-Export und die Influenzavirus-Replikation

3.1.1 Die Caspaseabhängigkeit des nukleo-zytoplasmatischen RNP-Exports

Wie bereits durch Wurzer et. al. gezeigt, ist der Ribonukleoproteinkomplex (RNP)-Export in Zellen, die mit dem Influenzavirus A/FPV/Bratislava/79 (H7N7, FPV) infiziert sind, auch von der Aktivität von Caspase abhängig (Wurzer et al., 2003). Um zu testen, ob die Caspaseabhängigkeit des RNP-Exports für Influenzaviren (IV) aller drei Genera gilt, wurden MDCK-II-Zellen mit humanem Influenzavirus A/Hamburg/01/09 (H1N1pdm09), aviärem Influenzavirus A/FPV/Bratislava/79 (H7N7, FPV) oder humanem Influenzavirus B/Lee/40 (B/Lee) infiziert (MOI=1). Zudem wurden MDCK-I-Zellen mit dem humanen Influenzavirus C/Johannesburg/1/66 (C/JHB/1/66) infiziert (MOI=1). Dafür musste zunächst das Herstellen der Virusstocks und die Bestimmung des Virustiters für das Influenzavirus B/Lee/40 und das Influenzavirus C/JHB/1/66 in dem Labor etabliert und optimiert werden. MDCK-I-Zellen haben Rezeptoren mit N-Acetyl-9-O-acetylneuraminsäureresten, welche ein entscheidender Faktor für die Infektion mit Influenza-C-Viren sind (Herrler and Klenk, 1987). MDCK-II-Zellen enthalten keine Rezeptoren mit N-Acetyl-9-O-acetylneuraminsäureresten und sind daher resistent gegenüber Influenza-C-Virus-Infektionen. Die Zellen wurden direkt nach der Infektion ohne bzw. mit 40µM Caspase 3/7-Inhibitor (CI) behandelt. Der Caspase-Inhibitor (Z-DEVD-FMK) ist ein häufig genutzter, zellgängiger, irreversibler Inhibitor ohne zytotoxische Effekte in den verwendeten Konzentrationen (Angabe von R&D Systems). Das Tetrapeptid DEVD ist die optimale Erkennungssequenz für die Caspase 3/7 und inhibiert dadurch mit hoher Spezifität (Garcia-Calvo et al., 1998). Basierend auf der Literatur, in der gezeigt wurde, dass die Caspase 3-Aktivität erst in der späten Replikationsphase von FPV-infizierten Zellen ansteigt (Wurzer et al., 2003), wurden zunächst in Vorexperimenten die Zeitpunkte p.i. ermittelt, zu denen in Influenza-A-Viren (IAV)-, Influenza-B-Viren (IBV)- und Influenza-C-Viren (ICV)-infizierten Zellen der RNP-Export am besten detektierbar ist. Weiterhin wurde die unter 2.2.4 beschriebene Methode von mir in diesem Labor etabliert. Da das Nukleoprotein (NP) das häufigste Protein der RNPs ist, wurde deren intrazelluläre Lokalisation mittels anti-NP Antikörper bestimmt. Dafür mussten zunächst aus einer Vielzahl von anti-IBV-

NP und anti-ICV-NP Antikörpern für die Immunfluoreszenz geeignete Antikörper gefunden und getestet werden. IAV-infizierte Zellen wurden 8h p.i., IBV-infizierte Zellen wurden 14h p.i. und ICV-infizierte Zellen wurden 18h p.i. fixiert und das NP des jeweiligen Virus mittels eines spezifischen anti-NP Antikörpers gefärbt. Zur Unterscheidung der Kern- bzw. Zytoplasmalokalisation der RNPs wurde gleichzeitig die DNA mit DAPI angefärbt. Die RNP-Lokalisation wurde mit Hilfe der Konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie analysiert. Wie in Abbildung 9 zu erkennen, sind in IAV-infizierten Zellen ohne CI-Behandlung die RNPs hauptsächlich im Zytoplasma zu finden, wobei in IBV- und ICV-infizierten Zellen die RNPs sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert sind. Bei Zugabe des Caspase 3/7-Inhibitors direkt nach der Infektion ist im Zytoplasma kein grünes Signal detektierbar, dafür sind die RNPs ausschließlich im Kern lokalisiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass der RNP-Export sowohl in IAV- als auch in IBV- und ICV-infizierten Zellen Caspase 3-abhängig ist.

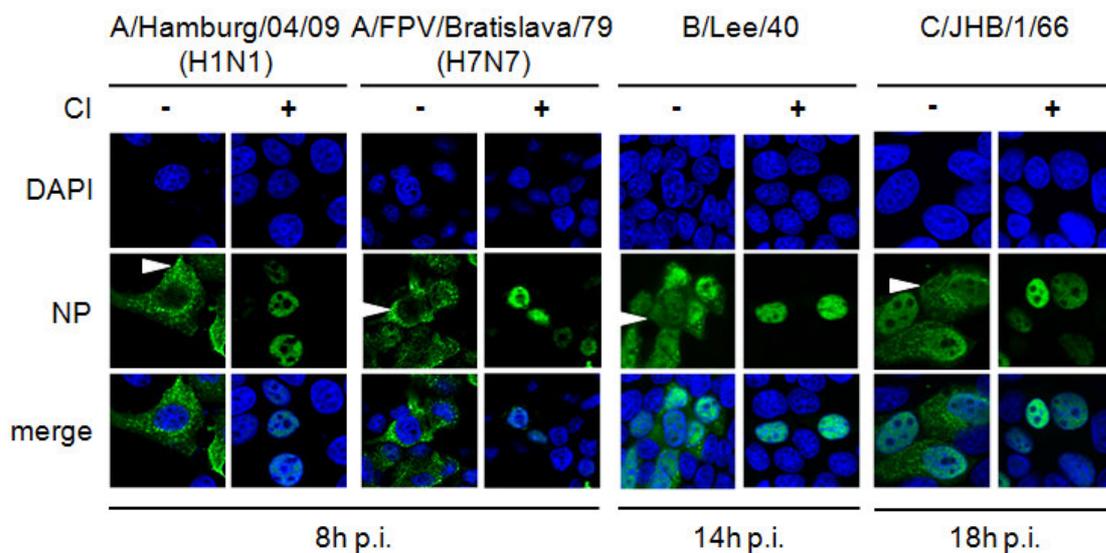


Abbildung 9: RNP-Lokalisation in Influenza-A-, B-, C-Virus-infizierten Zellen ohne bzw. mit Caspase 3/7-Inhibitor-Behandlung

MDCK-II-Zellen wurden mit den angegebenen Influenza-A- und B-Viren bzw. MDCK-I-Zellen mit dem angegebenen Influenza-C-Virus infiziert (MOI=1) und ohne bzw. mit 40 μ M Caspase 3/7-Inhibitor (CI) behandelt. Die intrazelluläre RNP-Lokalisation wurde mit Hilfe eines spezifischen anti-NP Antikörpers (grün) zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. mittels Konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie analysiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Die untere Reihe (merge) zeigt die Überlagerung der DNA- und NP-Färbung. Die Pfeile zeigen die RNP-Lokalisation im Zytoplasma in Zellen, die nicht mit dem Caspase 3/7-Inhibitor behandelt wurden. n=2

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Abhängigkeit des RNP-Exports von der Caspase 3-Aktivität auch in verschiedenen Zelllinien gilt. Dazu wurden außer MDCK-II-Zellen auch humane Lungenkarzinomepithelzellen (A549), Bronchialepithelzellen (BEAS-2B), Brustadenokarzinomzellen (MCF-7) und als aviäre Zelllinie Wachtelfibroblasten (QT6) mit FPV infiziert (MOI=1). Als primäre Zelllinie wurden humane Alveolarepithelzellen (hAEC) mit dem niedrigpathogenen Virus H1N1pdm09 infiziert (MOI=0,5), da hAEC, die mit verschiedenen MOIs des hochpathogenen FPV infiziert wurden, sich 8h p.i. vollständig vom Objektträger ablösten. Die Zellen wurden 8h p.i. fixiert und die NPs mittels eines anti-NP Antikörpers gefärbt. Zur Unterscheidung der Kern- bzw. Zytoplasmalokalisation des RNP wurde auch hier die DNA mit DAPI angefärbt. Die RNP-Lokalisation wurde mit Hilfe der Konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie analysiert. In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass in IAV-infizierten MDCK-II-, A549-, BEAS- und QT6-Zellen ohne CI-Behandlung 8h p.i. die RNPs im Zytoplasma zu finden sind. Auch in den infizierten/unbehandelten hAEC sind 8h p.i. die RNPs im Zytoplasma lokalisiert. Bei Zugabe des Caspaseinhibitors direkt nach der Infektion ist in allen Zelllinien im Zytoplasma kein grünes Signal detektierbar, sondern die RNPs sind im Kern lokalisiert. In den Caspase 3-defizienten MCF-7-Zellen ist kein signifikanter Unterschied in der RNP-Lokalisation zwischen CI-unbehandelten und CI-behandelten Zellen erkennbar. Die unbehandelten Zellen zeigen ein verstärktes RNP-Signal an der inneren Kernmembran.

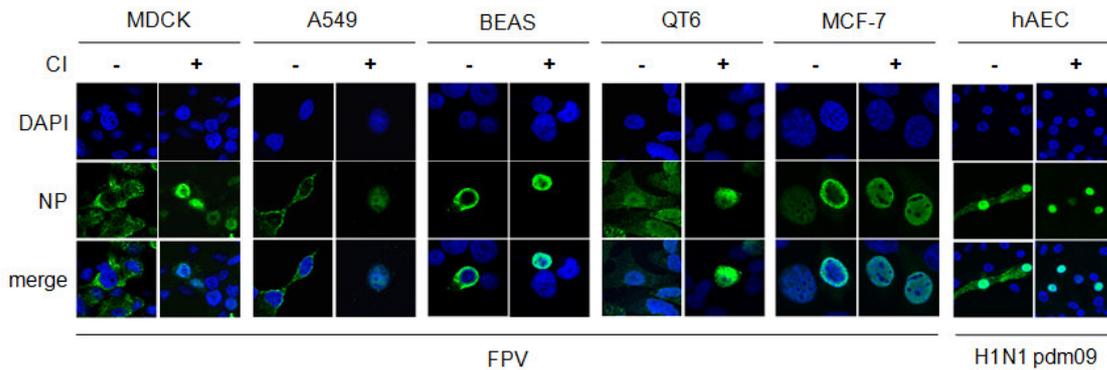


Abbildung 10: RNP-Lokalisation in verschiedenen Influenza-A-Virus-infizierten Zellen ohne bzw. mit Caspase 3/7-Inhibitor-Behandlung

Verschiedene sekundäre Zelllinien (MDCK-II, A549, BEAS, QT6, MCF-7) wurden mit FPV infiziert (MOI=1). Die primäre Zelllinie (hAEC) wurde mit H1N1pdm09 infiziert (MOI=0,5). Die verschiedenen Zelllinien wurden ohne bzw. mit 40 μ M Caspase 3/7-Inhibitor (CI) behandelt. Die intrazelluläre RNP-Lokalisation wurde mit Hilfe eines spezifischen anti-NP Antikörpers (grün) 8h p.i. mittels Konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie analysiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Die untere Reihe (merge) zeigt die Überlagerung der DNA- und NP-Färbung. n=2

Daraus lässt sich schließen, dass die Abhängigkeit des RNP-Exports von der Caspase 3-Aktivität auch in verschiedenen IAV-infizierten sekundären Zelllinien und einer primären Zelllinie gilt.

3.1.2 Untersuchung der Diffusionslimits der Kernporenkomplexe

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Caspasen die nukleo-zytoplasmatische Barriere der Kernporenkomplexe zerstören (Faleiro and Lazebnik, 2000). Die dadurch vermutete Erhöhung des Diffusionslimits der Kernporen wurde bereits 4h, 6h und 8h p.i. in einer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe untersucht (Wisskirchen, 2007). In Erweiterung der Diplomarbeit wurden MDCK-II-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP)-Trimer mit Kernlokalisierungssignal (3xGFP-NLS) und ein GFP-Pentamer ohne Kernlokalisierungssignal (5xGFP) codieren. 36h nach der Transfektion wurden die Zellen mit FPV infiziert (MOI=5) und ohne bzw. mit CI behandelt. 10h p.i. wurden die Zellen fixiert und mit einem anti-NP Antikörper und DAPI gefärbt. Die GFP-Lokalisation wurde mit Hilfe der Konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie analysiert.

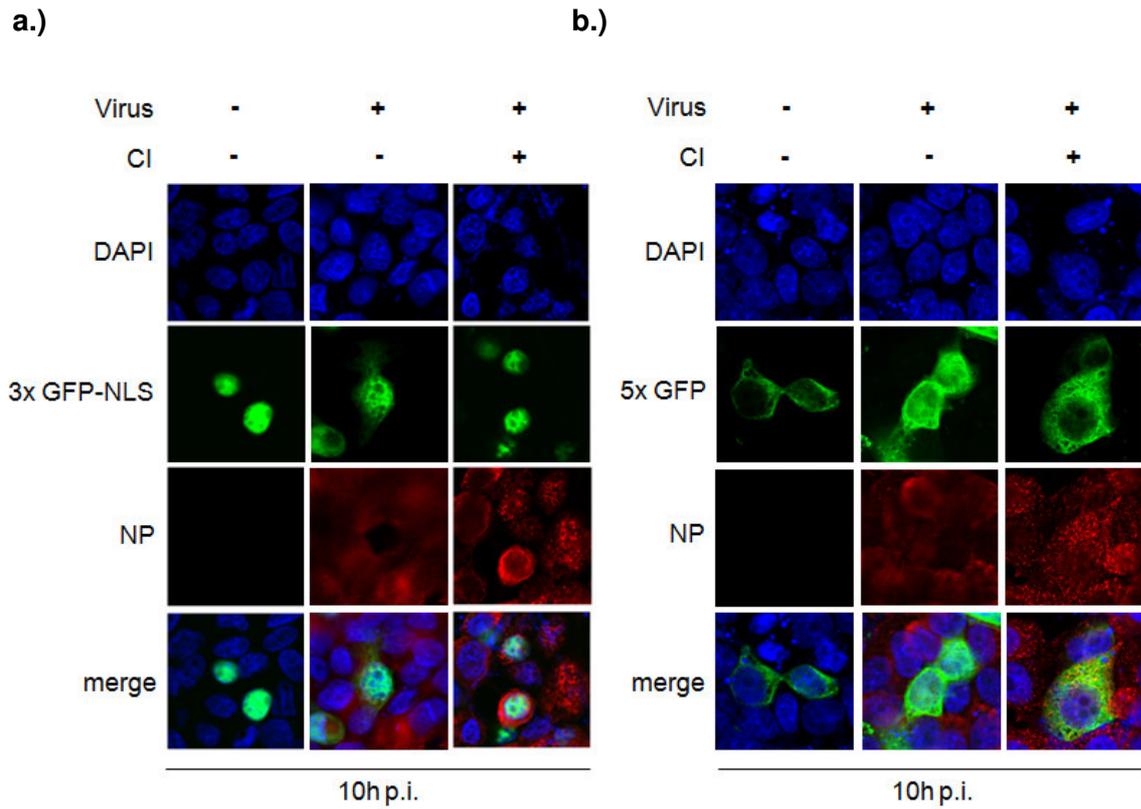
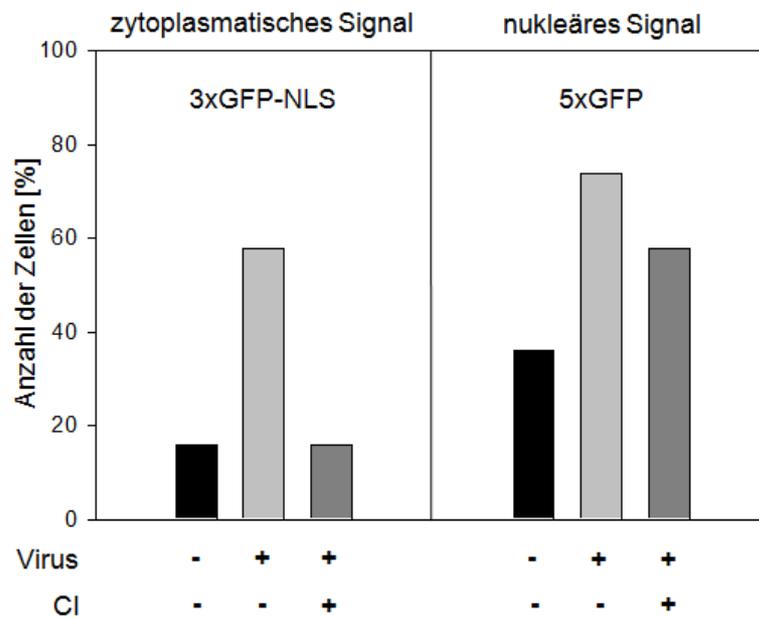
**c.)**

Abbildung 11: Intrazelluläre Lokalisation von GFP-Multimeren in Influenzavirus-infizierten Zellen ohne bzw. mit Caspase 3/7-Inhibitor-Behandlung

3. Ergebnisse

a,b.) MDCK-II-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für ein (a.) GFP-Trimer mit Kernlokalisierungssignal (3xGFP-NLS) und ein (b.) GFP-Pentamer ohne Kernlokalisierungssignal (5xGFP) codieren. 36h nach der Transfektion wurden die Zellen mit FPV infiziert (MOI=5) und ohne bzw. mit 40µM Caspase 3/7-Inhibitor (CI) behandelt. 10h p.i. wurden die Zellen fixiert, mit einem anti-NP Antikörper (rot) und DAPI (blau) gefärbt und die GFP-Lokalisation (grün) mit Hilfe der Konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie analysiert. Die untere Reihe (merge) zeigt die Überlagerung der drei Kanäle. n=2

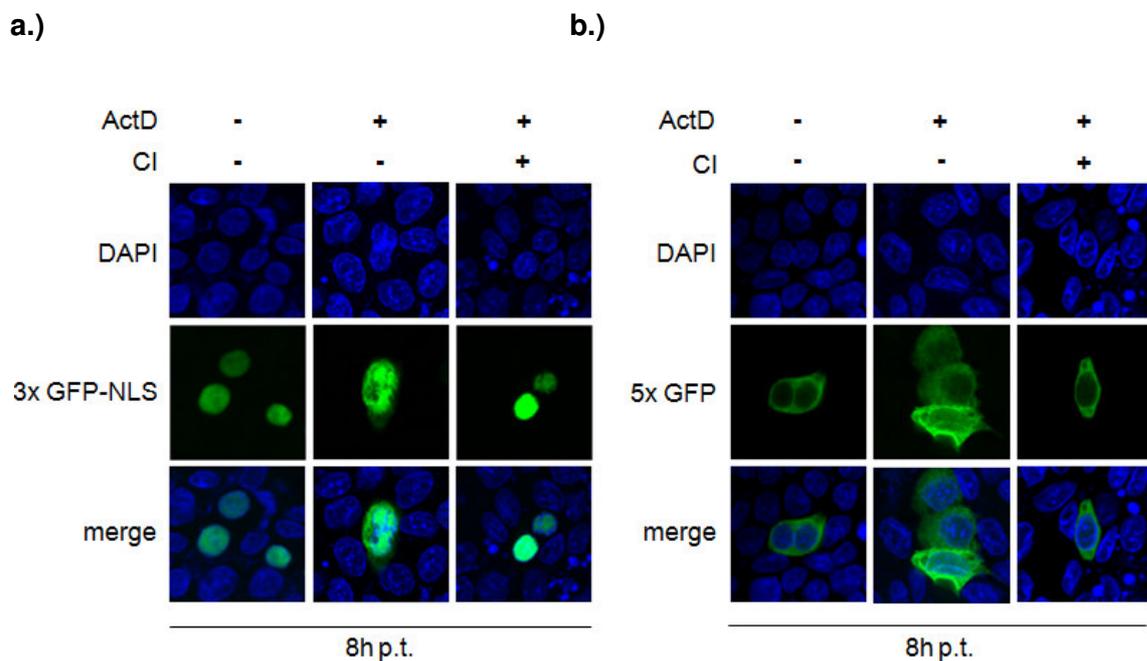
c.) Insgesamt 50 transfizierte und infizierte Zellen pro Ansatz wurden ausgezählt und die GFP-Lokalisation analysiert. Für 3xGFP-NLS ist die Anzahl der Zellen in % angegeben, die ein zytoplasmatisches GFP-Signal zeigten. Für 5xGFP ist die Anzahl der Zellen in % angegeben, die ein nukleäres GFP-Signal zeigten.

Wie in Abbildung 11a zu sehen, ist das 75kDa große 3xGFP-NLS durch sein Kernlokalisierungssignal in nichtinfizierten Zellen im Nukleus lokalisiert. 10h p.i. ist 3xGFP-NLS sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma detektierbar. Durch die Behandlung mit CI kann dieser Effekt inhibiert werden. Weiterhin deutet die Lokalisation des 3xGFP im Zytoplasma in infizierten Zellen darauf hin, dass der Reimport auf Grund des NLS nicht mehr funktioniert. Das 125kDa große GFP-Pentamer (5xGFP) ist in nichtinfizierten Zellen im Zytoplasma lokalisiert und kann durch seine Größe auch nicht in den Kern diffundieren (Abbildung 11b). In FPV-infizierten Zellen ist 10h p.i. sowohl im Zytoplasma als auch im Kern das 5xGFP zu finden. Durch die Behandlung mit CI kann auch dieser Effekt inhibiert werden. Für eine quantitative Analyse wurden insgesamt 50 transfizierte und infizierte Zellen pro Ansatz ausgezählt und die GFP-Lokalisation analysiert (Abbildung 11c). Von den 3xGFP-transfizierten/nichtinfizierten (Kontrolle) und transfizierten/infizierten/CI-behandelten Zellen zeigen weniger als 20% ein GFP-Signal im Zytoplasma. Dagegen haben 60% der transfizierten/infizierten Zellen ohne CI-Behandlung ein zytoplasmatisches GFP-Signal. In 5xGFP-transfizierten/infizierten Zellen ohne CI-Behandlung steigt die Anzahl der Zellen mit nukleärem GFP-Signal um ca. 40% gegenüber den transfizierten/nichtinfizierten Zellen (Kontrolle) an. Durch CI-Behandlung ist dieser Anstieg um ca. 20% geringer.

Zusätzlich wurde das gleiche Transfektionsexperiment mit einem Apoptoseinduktor durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen 36h nach der Transfektion mit 2µg/ml Actinomycin D (ActD) und ohne bzw. mit CI behandelt. Actinomycin D ist ein Zytostatikum und hemmt durch die Bindung an die DNA die RNA-Synthese und führt dadurch zur Aktivierung des Apoptosesignalweges in verschiedenen Zelllinien (Kleeff et al., 2000). 8h p.t. wurden die Zellen fixiert und mit DAPI gefärbt. Die GFP-Lokalisation wurde mit Hilfe der Konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie analysiert. Analog zu dem vorhergehenden Experiment zeigen in Abbildung 12a die 3xGFP-

transfizierten/unbehandelten und die transfizierten/ActD- und CI-behandelten Zellen eine GFP-Lokalisation im Kern. Die 5xGFP-transfizierten/unbehandelten und die transfizierten/ActD- und CI-behandelten Zellen zeigen überwiegend eine GFP-Lokalisation im Zytoplasma (Abbildung 12b). In den ActD-behandelten Zellen ohne CI sind in 3xGFP- und 5xGFP-transfizierten Zellen die GFP-Multimere sowohl im Kern als auch im Zytoplasma detektierbar. Auch die quantitative Analyse (Abbildung 12c) bestätigt, dass ca. 60% mehr Zellen eine 3xGFP-Lokalisation im Zytoplasma bzw. ca. 30% mehr Zellen eine 5xGFP-Lokalisation im Kern zeigen, wenn die Zellen mit ActD behandelt sind. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit CI reduziert die Anzahl der Zellen mit zytoplasmatischem 3xGFP-Signal auf ca. 20% und auf ca. 60% der Zellen mit nukleärem 5xGFP-Signal.

Insgesamt kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass die Aktivierung der Caspase 3, unabhängig davon ob virusinduziert oder durch einen Apoptoseinduktor, zur Erhöhung der Diffusionslimits der Kernporen von ca. 40kDa auf mind. 125kDa, der Masse des 5xGFP, führt.



c.)

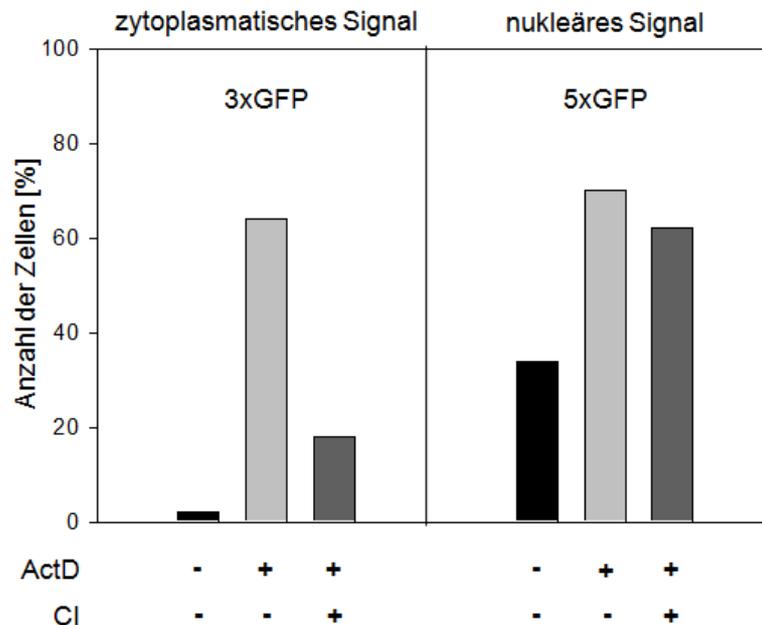


Abbildung 12: Intrazelluläre Lokalisation von GFP-Multimeren in Actinomycin D-behandelten Zellen ohne bzw. mit Caspase 3/7-Inhibitor-Behandlung

a, b.) MDCK-II-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für ein (a.) GFP-Trimer mit Kernlokalisierungssignal (3xGFP-NLS) und ein (b.) GFP-Pentamer ohne Kernlokalisierungssignal (5xGFP) kodieren. 36h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 2µg/ml Actinomycin D (ActD) und ohne bzw. mit 40µM Caspase 3/7-Inhibitor (CI) behandelt. 8h p.t. wurden die Zellen fixiert, mit DAPI (blau) gefärbt und die GFP-Lokalisation (grün) mit Hilfe der Konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie analysiert. Die untere Reihe (merge) zeigt die Überlagerung der drei Kanäle. n=2

c.) Insgesamt 50 transfizierte Zellen pro Ansatz wurden ausgezählt und die GFP-Lokalisation analysiert. Für 3xGPF-NLS ist die Anzahl der Zellen in % angegeben, die ein zytoplasmatisches GFP-Signal zeigten. Für 5xGPF ist die Anzahl der Zellen in % angegeben, die ein nukleäres GFP-Signal zeigten.

3.1.3 Analyse des Crm-1-abhängigen und caspaseabhängigen RNP-Exports

Die unter 3.1.1 und 3.1.2 gezeigten Ergebnisse weisen zusätzlich neben der vorhandenen Literatur nicht nur auf eine Caspaseabhängigkeit des RNP-Exports hin (Wurzer et al., 2003), sondern zeigen auch, dass dies ein genereller Effekt ist, unabhängig vom Influenzavirustyp oder der Zelllinie. Allerdings ist auch aus der Literatur bekannt, dass der RNP-Kernexport *Chromosomal Maintenance-1* (Crm-1)-abhängig ist (Elton et al., 2001). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass der aktive, Crm-1-abhängige RNP-Export eher in der frühen Phase des Replikationszyklus relevant ist und in der späten Phase des Replikationszyklus, wenn die Caspase 3-Aktivität ansteigt und die nukleo-zytoplasmatische Barriere zerstört wird, durch den

passiven, caspaseabhängigen Export ergänzt wird. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden zunächst MDCK-II-Zellen mit H1N1pdm09 infiziert (MOI=1) und 0, 2, 4, 6 und 8h p.i. mit dem Crm-1-Inhibitor, Leptomycin B (LepB), behandelt. LepB ist ein spezifischer Crm-1-Inhibitor, von dem auch gezeigt wurde, dass er verschiedene Kernimportmechanismen und den CAS-abhängigen Exportmechanismus, sowie den mRNA-Export nicht beeinflusst (Elton et al., 2001; Kudo et al., 1998; Kutay et al., 1997; Ribbeck et al., 1998). 10h p.i. wurden dann die Virustiter der Überstände bestimmt. In Abbildung 13 ist zu sehen, dass die direkte Zugabe bzw. die Zugabe von LepB bis zu 4h p.i. den Virustiter um ca. eine log-Stufe reduziert. Im Gegensatz dazu zeigt der Virustiter, wenn LepB 6h oder 8h p.i. zugegeben wird, keinen Unterschied zu dem Titer von unbehandelten Zellen (10h-Wert).

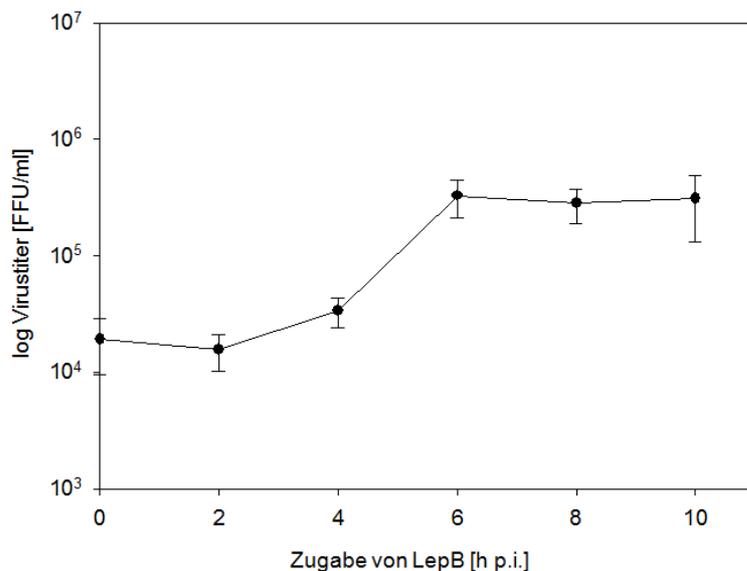


Abbildung 13: Abhängigkeit des Virustiters von der Zugabe von Leptomycin B

MDCK-II-Zellen wurden mit H1N1pdm09 infiziert (MOI=1) und zu verschiedenen Zeitpunkten (0-8h) p.i. mit 2ng/ml Leptomycin B (LepB) behandelt. 10h p.i. wurde der Virustiter in den Überständen bestimmt. n=3

Um zu zeigen, dass die Effekte auf den Virustiter nicht lediglich dadurch entstanden sind, dass das LepB unterschiedlich lange auf die Zellen wirkte, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Da alle Experimente mit dem Influenzavirus A/FPV/Bratislava/79 (H7N7, FPV) unter S3-Bedingungen durchgeführt werden müssen, wurde zur Erleichterung der Arbeiten von A. Elsayed in der Arbeitsgruppe das Virus so verändert, dass es zwar gleiche Replikationseigenschaften besitzt, aber die

Experimente mit dem neuen Influenzavirus A/FPV/Bratislava-LP/2014 (H7N7, FPV-LP) unter S2-Bedingungen durchgeführt werden konnten. Hierfür wurde die multibasische Schnittstelle im FPV-HA zu einer monobasischen Schnittstelle mutiert. Dies führt dazu, dass das resultierende Virus nun für die Aktivierung der Fusionsaktivität seines HAS auf Trypsin im Zellmedium angewiesen ist und damit zu den niedrigpathogenen Influenzaviren zu zählen ist, welche in die Sicherheitsstufe 2 eingruppiert werden. MDCK-II-Zellen wurden mit FPV-LP infiziert (MOI=1) und LepB entweder 0-5h (frühe IV-Replikationsphase) oder 5-10h p.i. (späte IV-Replikationsphase) allein oder jeweils mit CI (0-10h p.i.) zugegeben. Zudem wurde das Experiment *vice versa* durchgeführt, in dem CI entweder 0-5h oder 5-10h p.i. allein oder jeweils mit LepB (0-10h p.i.) zugegeben wurde. Anschließend wurde 10h p.i. der Virustiter bestimmt und mit dem Titer der unbehandelten Kontrolle (100%) verglichen.

Wie in Abbildung 14 zu sehen, führt die Zugabe von LepB 0-5h p.i. ohne und mit CI zu einer signifikanten Verringerung des Virustiters gegenüber der Zugabe 5-10h p.i. (schwarze Balken). Umgekehrt ist der Virustiter bei Zugabe von CI 5-10h p.i. ohne und mit LepB im Vergleich zur Zugabe 0-5h p.i. signifikant reduziert (graue Balken).

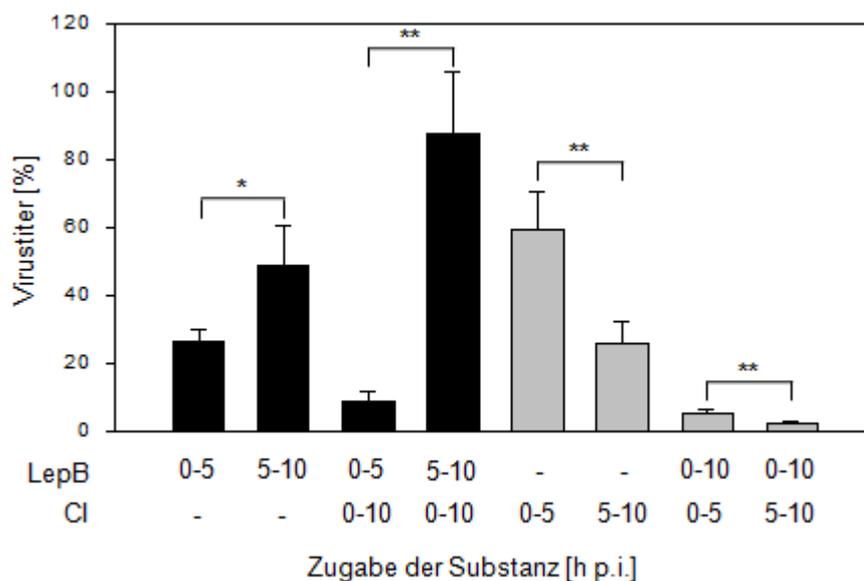


Abbildung 14: Einfluss der Zugabe von Leptomycin B und Caspase 3/7-Inhibitor zu unterschiedlichen Zeiten p.i. auf den Virustiter

3. Ergebnisse

MDCK-II-Zellen wurden mit FPV-LP infiziert (MOI=1). 2ng/ml Leptomycin B (LepB) wurden entweder 0-5h oder 5-10h p.i. allein oder mit 40 μ M Caspase 3/7-Inhibitor (CI) (0-10h p.i.) zugegeben (schwarze Balken). Zudem wurden 40 μ M CI entweder 0-5h oder 5-10h p.i. allein oder mit 2ng/ml LepB (0-10h p.i.) zugegeben (graue Balken). 10h p.i. wurde der Virustiter bestimmt. Der Virustiter von infizierten/unbehandelten Zellen wurde gleich 100% gesetzt. n=3; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Um nicht nur die Bedeutung des Crm-1-abhängigen RNP-Kernexports für die Virusvermehrung zu untersuchen, sondern auch für den intrazellulären RNP-Transport, wurde zusätzlich die RNP-Lokalisation in LepB-behandelten Zellen zu frühen und späten Zeitpunkten des Replikationszyklus analysiert. Dazu wurden MDCK-II-Zellen mit FPV-LP infiziert (MOI=0,5) und entweder 0-5h oder 5-10h p.i. mit 2ng/ml LepB behandelt. Die Zellen wurden 2,5h, 5h, 7,5h und 10h p.i. fixiert und mit einem anti-NP Antikörper und mit DAPI gefärbt. Die RNP-Lokalisation wurde mit Hilfe der Konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie analysiert.

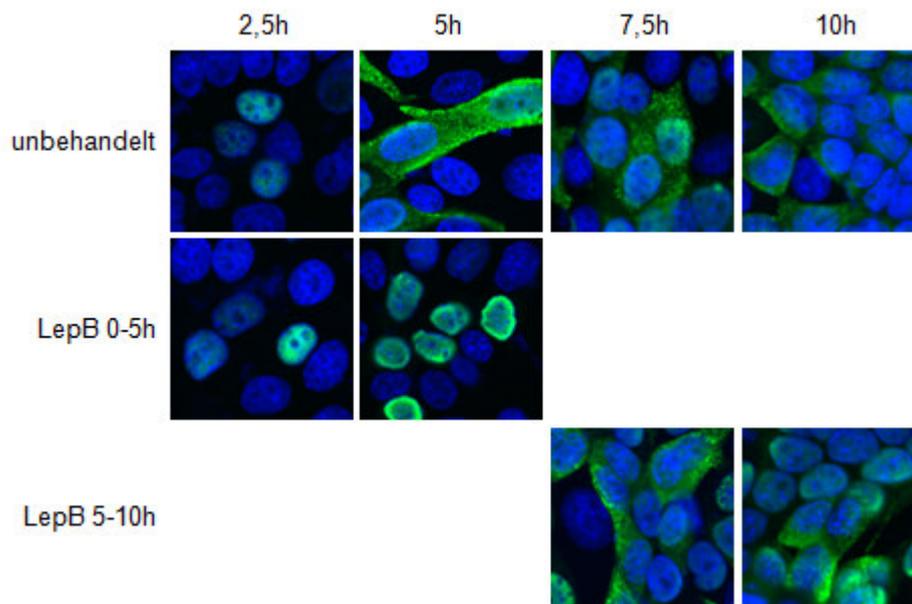


Abbildung 15: RNP-Lokalisation in Influenzavirus-infizierten Zellen mit Leptomycin B-Behandlung zu unterschiedlichen Zeitpunkten

MDCK-II-Zellen wurden mit FPV-LP infiziert (MOI=0,5) und entweder 0-5h oder 5-10h p.i. mit 2ng/ml Leptomycin B (LepB) behandelt. Die Zellen wurden 2,5h, 5h, 7,5h und 10h p.i. fixiert und mit einem anti-NP Antikörper (grün) gefärbt. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Die RNP-Lokalisation wurde mit Hilfe der Konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie analysiert. n=2

In Abbildung 15 sieht man bei unbehandelten Zellen, dass zu späten Zeitpunkten der Influenzavirus-Replikation (ab 5h p.i.) die RNPs im Zytoplasma lokalisiert sind. Wird jedoch LepB von 0-5h p.i. zugegeben, ist 5h p.i. kein RNP-Signal im Zytoplasma detektierbar, die RNPs verbleiben im Kern (mittlere Reihe). Gibt man dagegen LepB zu späten Zeitpunkten des Replikationszyklus (5-10h p.i.) dazu (untere Reihe), sind die RNPs wie bei den unbehandelten Zellen im Zytoplasma lokalisiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass der RNP-Kernexport und auch die Virusvermehrung in der frühen Replikationsphase (0-5h p.i.) Crm-1-abhängig, jedoch in der späten Replikationsphase (5-10h p.i.) eher Caspase 3-abhängig ist.

Die unter 3.1 aufgeführten Ergebnisse werden in Zusammenarbeit mit D. Mühlbauer, der in der Arbeitsgruppe die Effekte der Caspase 3-Aktivität auf die Kernporenkomplexe in IAV-infizierten Zellen untersucht hat, zur Veröffentlichung eingereicht.

3.2 Regulation der Caspaseaktivität in der Influenza-A-Virus-infizierten Zelle

Nachdem ich zeigen konnte, dass:

(i) die Caspase 3-Aktivität eine generelle Bedeutung für die Vermehrung von IV hat, da sie nicht nur für den RNP-Kernexport von aviären IAV, sondern auch von humanen IAV, IBV und ICV notwendig ist (Abbildung 9) und dies unabhängig von der verwendeten, permissiven Zelllinie ist (Abbildung 10),

(ii) die IV-induzierte Caspase 3-Aktivität zur einer Erhöhung des Diffusionslimits von ca. 40kDa zu mindestens 125kDa (5xGFP) führt (Abbildung 11), wobei auch der geregelte Reimport von NLS-tragenden Proteinen (3xGFP-NLS) in den Kern gestört ist (Abbildung 11a) und diese Ergebnisse mit einem Apoptoseinduktor (ActD) bestätigt werden konnten (Abbildung 12),

(iii) Crm-1 nur in einer frühen IV-Vermehrungsphase (0-5h p.i.) effektiv zum RNP-Kernexport beiträgt und in der späten IV-Vermehrungsphase (5-10h p.i.) von der, durch die Caspase 3 ausgelöste, passive Diffusion ergänzt wird,

sollte nun die Regulation der virusinduzierten Caspase 3-Aktivität analysiert werden. Dafür wurde zuerst untersucht, welche Bedeutung der proapoptische Faktor *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) in der infizierten sekundären Zellkultur für die virusinduzierte Caspase 3-Aktivierung hat. Weiterhin sollte der Anteil des intrinsischen Apoptosesignalweges an der IV-induzierten Caspase 3-Aktivierung analysiert werden und damit sowohl die Bedeutung der beiden zellulären Arme für die Caspase 3-Aktivierung als auch für die IV-Vermehrung eingegrenzt werden. Da die Literatur darauf hinweist, dass (i) *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) eine regulative Rolle in der Apoptose spielt (Kim et al., 2008; Li et al., 2006; Liu et al., 2006; Mandal et al., 2014; Soderstrom et al., 2002; Tran et al., 2001) und (ii) sowohl die Inhibierung von ERK als auch von Caspase 3 zur Retention der RNPs im Kern und zu einem verringerten Virustiter führen (Pinto et al., 2011; Wurzer et al., 2003), sollte ein Zusammenhang zwischen dem ERK-Signalweg und der Apoptosesignalkaskade in der IV-infizierten Zelle hergestellt und mögliche Interaktionspunkte untersucht werden.

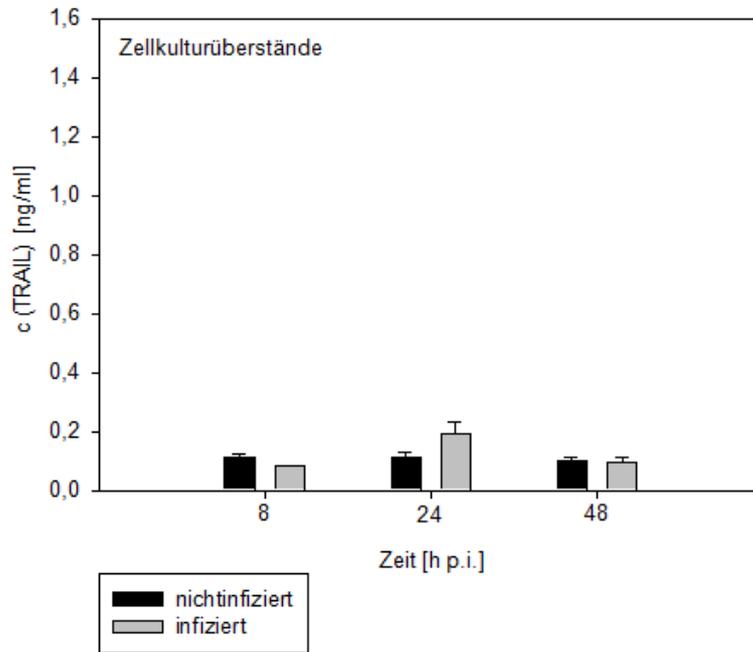
Da MDCK-II-Zellen eine geeignete und häufig genutzte Zelllinie zur Vermehrung von IV sind und innerhalb eines Replikationszyklus die Caspase 3-Aktivität mit den von mir etablierten Methoden detektierbar war, wurde diese Zelllinie für alle weiteren Experimente genutzt.

3.2.1 Analyse der TRAIL-Menge von IV-infizierten MDCK-II-Zellen und deren Einfluss auf die Caspase 3-Aktivität und den Virustiter

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression TRAIL in IV-infizierten residenten und rekrutierten Alveolarmakrophagen für die Induktion der Apoptose in den Alveolarepithelzellen (AEC) verantwortlich ist. *Ex vivo* wurden in IAV-infizierten Alveolarmakrophagen ca. 0,07ng/ml lösliches TRAIL und *in vivo* ca. 0,3ng/ml lösliches TRAIL in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit IAV-infizierter Mäuse gemessen (Hogner et al., 2013). In der für diese Arbeit verwendeten MDCK-II-Zellkultur sind keine Makrophagen vorhanden bzw. können diese auch nicht rekrutiert werden. Deswegen sollte zunächst untersucht werden, in welchem Maß IV-infizierte MDCK-II-Zellen TRAIL exprimieren und ob das Zytokin ins Medium sezerniert wird, um so parakrin bzw. autokrin zu wirken. Dazu wurden MDCK-II-Zellen mit FPV-LP infiziert (MOI=0,001) und nach 8h, 24h und 48h mit Hilfe des canineTRAIL ELISA Kits die Konzentration des TRAIL in den Überständen und Zelllysaten analysiert. In Abbildung 16 sind die TRAIL-Konzentration von nichtinfizierten und infizierten Zellen gegenübergestellt. In den Zellkulturüberständen (Abbildung 16a) unterscheiden sich die TRAIL-Konzentrationen in dem Messbereich von 0,08ng/ml bis 0,1ng/ml zwischen nichtinfizierten und infizierten Zellen in dem gemessenen Zeitraum kaum. Die maximale detektierte TRAIL-Konzentration von 0,2ng/ml wurde 24h p.i. in den Überständen von infizierten Zellen gemessen. Damit liegen die gemessenen TRAIL-Konzentrationen in dem Bereich der in der Literatur angegebenen Konzentrationen von löslichem TRAIL in IAV-infizierten Alveolarmakrophagen und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit IAV-infizierter Mäuse. In den Zelllysaten (Abbildung 16b) wurden mit Konzentrationen von 0,4ng/ml bis 1,2ng/ml mehr TRAIL nachgewiesen als in den Überständen. 8h und 48h p.i. wurden in den infizierten Zellen weniger TRAIL detektiert als in den nichtinfizierten Zellen. 24h p.i. dagegen war eine höhere TRAIL-Konzentration in den infizierten Zellen zu finden. Dies konnte auch bei den TRAIL-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen beobachtet werden. Da die gemessenen TRAIL-Werte im Überstand der infizierten Zellen denen aus IAV-infizierten Alveolarmakrophagen bzw. aus Lungen infizierter Mäuse entsprechen, ist zu vermuten, dass auch ohne Alveolarmakrophagen in der infizierten

MDCK-II-Zellkultur evtl. genügend TRAIL für eine para- und autokrine Induktion des extrinsischen Apoptoseweges produziert werden könnte.

a.)



b.)

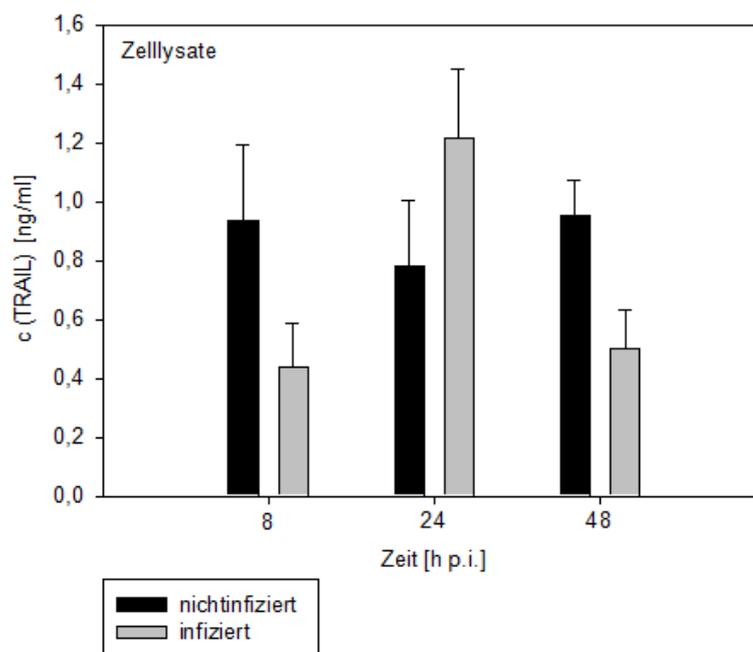


Abbildung 16: TRAIL-Konzentration in den Überständen und Zelllysaten von infizierten MDCK-II-Zellen

3. Ergebnisse

a., b.) MDCK-II-Zellen wurden mit FPV-LP infiziert (MOI=0,001). 8h, 24h und 48h p.i. wurden die Überstände abgenommen und Zelllysate hergestellt. Mit Hilfe des canineTRAIL ELISA Kits wurde die Konzentration an TRAIL in den Überständen (a.) und in den Zelllysaten (b.) bestimmt. n=3

Aus dem Modell der Apoptosesignalkaskade (Abbildung 7) geht hervor, dass die Bindung von TRAIL an den Rezeptor sowohl den extrinsischen Weg als auch den intrinsischen Caspasesignalweg auslösen kann. Da die Aktivierung der Caspase 3 und die damit verbundene Aktivierung der Apoptose wichtig für den RNP-Export und die damit zusammenhängende Virusreplikation ist, sollte weiterhin untersucht werden, ob die von MDCK-II-Zellen sezernierte Menge von TRAIL ausreicht, die Caspase 3 zu aktivieren und ob die Zugabe von externem TRAIL einen Einfluss auf die Virusreplikation hat. Dazu wurde ein Konzentrationsbereich gewählt, der sowohl die gemessenen TRAIL-Konzentrationen in den MDCK-II-Zellkulturüberständen und Lysaten als auch die in der Literatur angegebenen Konzentrationen in Alveolarmakrophagen und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit beinhaltet. MDCK-II-Zellen wurden deshalb mit rekombinantem caninem TRAIL von 1pg/ml bis 10ng/ml behandelt und 8h p.t. die Caspase 3-Aktivität gemessen. Als Kontrolle der Caspase 3-Aktivierung diente 1µM Staurosporin. Staurosporin ist ein Alkaloid, welches aus *Streptomyces staurospores* isoliert wurde. Es verhindert die Bindung von ATP in Proteinkinasen. Durch die hohe Affinität, aber geringe Selektivität bindet Staurosporin an eine Vielzahl von Proteinkinasen, z.B. Proteinkinase C (PKC). Staurosporin inhibiert nicht nur den Zellzyklusverlauf in verschiedenen Zelllinien, sondern induziert auch Apoptose (Chae et al., 2000).

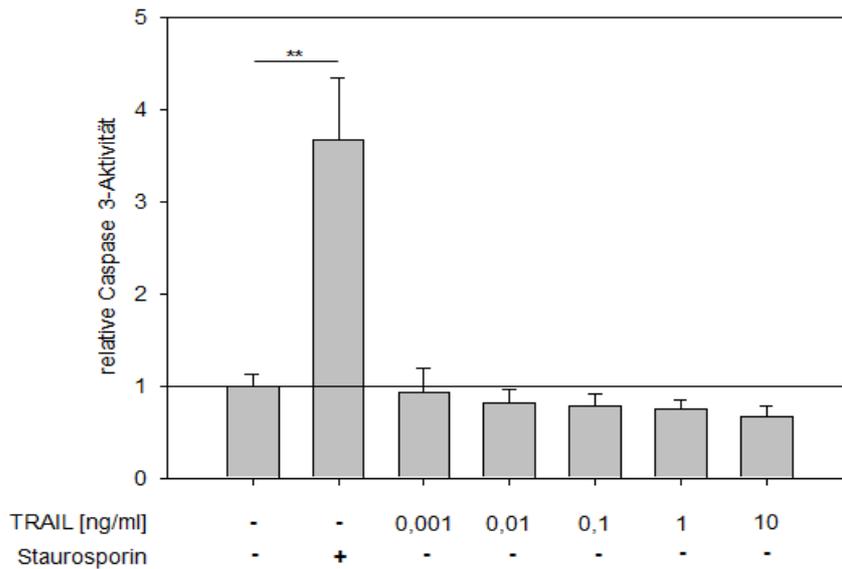


Abbildung 17: Relative Caspase 3-Aktivität in MDCK-II-Zellen nach Behandlung mit rekombinatem caninem TRAIL unterschiedlicher Konzentrationen

MDCK-II-Zellen wurden mit 1pg/ml, 10pg/ml, 100pg/ml, 1ng/ml und 10ng/ml rekombinatem caninem TRAIL behandelt und 8h p.t. die Caspase 3-Aktivität gemessen. Als Kontrolle der Caspase 3-Aktivierung diente 1µM Staurosporin. Die Caspase 3-Aktivität der unbehandelten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. n=3; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

In Abbildung 17 ist die relative Caspase 3-Aktivität graphisch dargestellt. In dem Konzentrationsbereich von 1pg/ml bis 10ng/ml TRAIL ist keine Caspase 3-Aktivierung in den MDCK-II-Zellen detektierbar. Dagegen zeigt die Positivkontrolle Staurosporin eine signifikante Erhöhung der Caspase 3-Aktivität.

Um den Einfluss der Zugabe von externem TRAIL auf die Virusvermehrung zu analysieren, wurden MDCK-II-Zellen mit FPV-LP infiziert (MOI=3) und ohne bzw. mit 10ng/ml rekombinatem caninem TRAIL behandelt. Diese Konzentration wurde gewählt, da sie ca. 100-fach über den gemessenen Konzentrationen von löslichem TRAIL in IV-infizierten MDCK-II-Zellen liegt und die höchst mögliche Konzentration war, die mittels der käuflich erworbenen Stocklösung eingesetzt werden konnte. 8h p.i. wurde der Virustiter in den Überständen bestimmt.

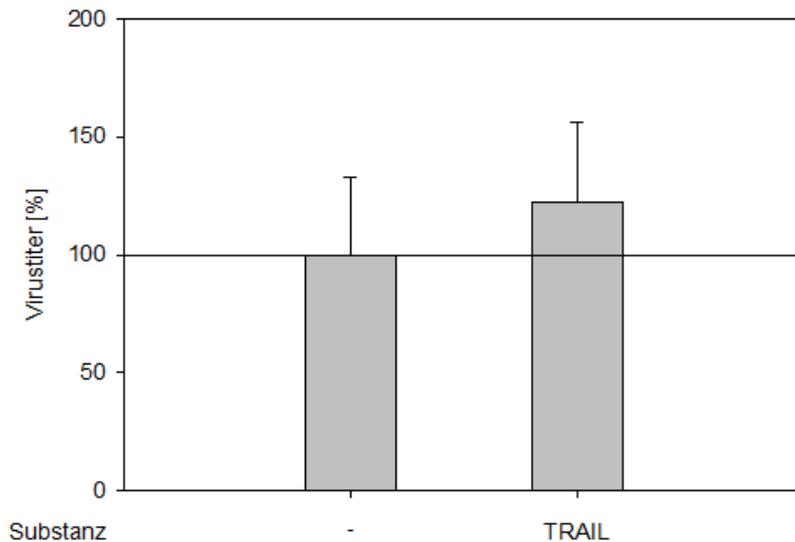


Abbildung 18: Einfluss von rekombinantem caninem TRAIL auf den Virustiter in infizierten MDCK-II-Zellen

MDCK-II-Zellen wurden mit FPV-LP infiziert (MOI=3) und direkt nach der Infektion ohne bzw. mit 10ng/ml rekombinantem caninem TRAIL behandelt. 8h p.i. wurde der Virustiter in den Überständen bestimmt. Der Virustiter von unbehandelten Zellen wurde gleich 100% gesetzt. n=3

In Abbildung 18 ist sind die Virustiter in Relation zu infizierten/unbehandelten Zellen (=100%) graphisch dargestellt. Die mit TRAIL-behandelten Zellen zeigen eine Erhöhung des Virustiters um 22%, welche aber nicht signifikant ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass zwar ähnliche Konzentrationen von löslichem TRAIL in IV-infizierten MDCK-II-Zellen gemessen wurden im Vergleich zu den Konzentrationen von löslichem TRAIL in IV-infizierten Alveolarmakrophagen, die in AEC Apoptose auslösen, diese aber in MDCK-II-Zellen nicht zur Aktivierung der Caspase 3 und nur zu einer geringen, nicht signifikanten Erhöhung des Virustiters führen.

3.2.2 Untersuchung des Anteils von extrinsischem und intrinsischem Apoptosesignalweg auf die Caspaseaktivität und die Virusreplikation

Da die Caspase 3-Aktivität eine wichtige Rolle in der Virusvermehrung spielt, aber die von MDCK-II-Zellen exprimierte und auch sezernierte Menge an TRAIL nicht ausreicht, um die Caspase 3-Aktivität detektierbar zu erhöhen, stellte sich nun die Frage, welchen Anteil der extrinsische, TRAIL/Caspase 8-vermittelte und der intrinsische, Caspase 9-abhängige Weg an der Caspase 3-Aktivierung und damit an der Virusvermehrung hat.

Dazu wurden MDCK-II-Zellen mit FPV-LP infiziert (MOI=3) und ohne bzw. mit jeweils 40µM Caspase 3-Inhibitor (Z-DEVD-FMK), Caspase 8-Inhibitor (Z-IETD-FMK) oder Caspase 9-Inhibitor (Z-LEHD-FMK) behandelt. 8h p.i. wurde die Caspase 3-Aktivität in den Zellen gemessen. Wie bereits für den Caspase 3-Inhibitor beschrieben, sind die Caspase 8- und Caspase 9-Inhibitoren häufig genutzte, zellgängige, irreversible Inhibitoren ohne zytotoxische Effekte, die ein Tetrapeptid als optimale Erkennungssequenz für die jeweilige Caspase besitzen (Garcia-Calvo et al., 1998). Als Kontrolle der Caspase 3-Aktivierung diente 1µM Staurosporin.

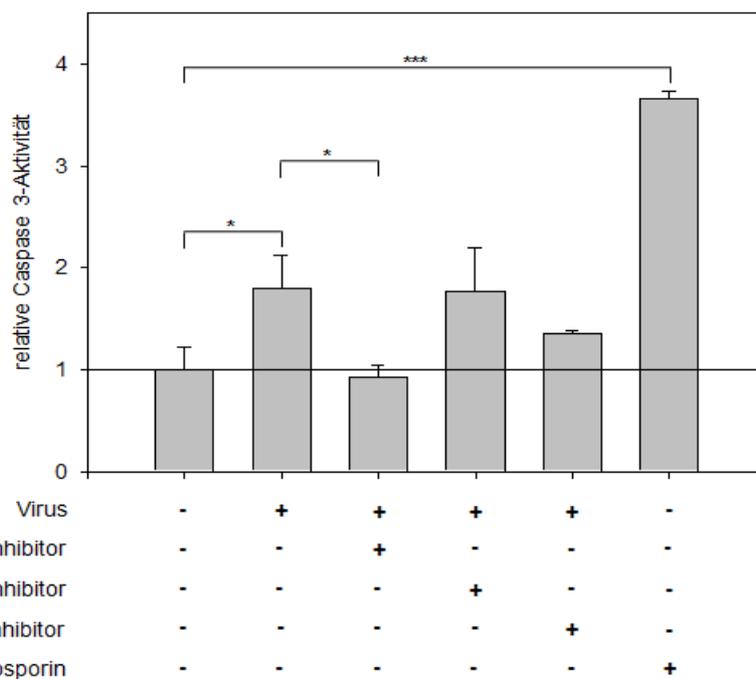


Abbildung 19: Einfluss von Caspase 3, 8, 9-Inhibitoren auf die Caspase 3-Aktivität in infizierten MDCK-II-Zellen

MDCK-II-Zellen wurden mit FPV-LP infiziert (MOI=3) und direkt nach der Infektion ohne bzw. mit jeweils 40µM Caspase 3-Inhibitor (C3I, Z-DEVD-FMK), Caspase 8-Inhibitor (C8I, Z-IETD-FMK) oder Caspase 9-Inhibitor (C9I, Z-LEHD-FMK) behandelt. 8h p.i. wurde die Caspase 3-Aktivität in den Zellen gemessen. Als Kontrolle der Caspase 3-Aktivierung diente 1µM Staurosporin (Stauro.). Die Caspase 3-Aktivität von nichtinfizierten/unbehandelten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. n=3; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Wie in Abbildung 19 zu sehen, steigt die Caspase 3-Aktivität in infizierten/unbehandelten MDCK-II-Zellen um etwa das Doppelte an. In Caspase 3-inhibierten Zellen entspricht die Caspase 3-Aktivität der von nichtinfizierten/unbehandelten Zellen. Auch die Inhibierung der Caspase 9 senkt die

Caspase 3-Aktivität um ca. 50% im Vergleich zu den infizierten/unbehandelten Zellen. Dagegen unterscheiden sich die Caspase 3-Aktivitäten von infizierten/unbehandelten und infizierten/Caspase 8-inhibierten Zellen nicht.

Da die Caspase 3- und 9-Inhibitoren eine Reduktion der Caspase 3-Aktivität zeigen, aber der Caspase 8-Inhibitor scheinbar keinen Einfluss auf die Caspase 3-Aktivität hat, sollte in einem weiteren Experiment der Einfluss der Caspaseinhibitoren allein und in Kombination auf den Virustiter untersucht werden. Dazu wurden MDCK-II-Zellen mit FPV-LP infiziert (MOI=3) und direkt nach der Infektion ohne bzw. mit jeweils 40µM Caspase 3-Inhibitor und/oder Caspase 8-Inhibitor und/oder Caspase 9-Inhibitor behandelt. 8h p.i. wurde der Virustiter in den Überständen bestimmt.

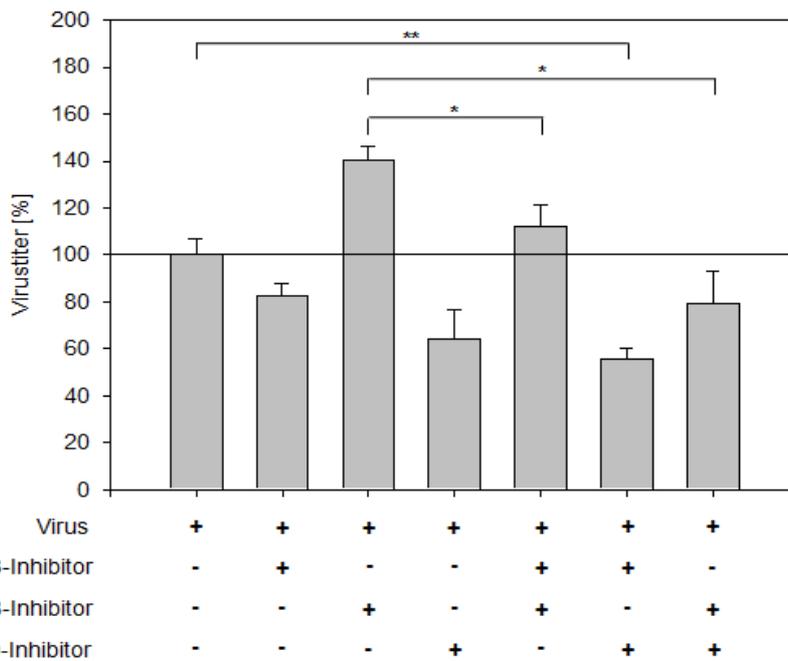


Abbildung 20: Einfluss von Caspase 3, 8, 9-Inhibitoren auf den Virustiter in infizierten MDCK-II-Zellen

MDCK-II-Zellen wurden mit FPV-LP infiziert (MOI=3) und direkt nach der Infektion ohne bzw. mit jeweils 40µM Caspase 3-Inhibitor (Z-DEVD-FMK) und/oder Caspase 8-Inhibitor (Z-IETD-FMK) und/oder Caspase 9-Inhibitor (Z-LEHD-FMK) behandelt. 8h p.i. wurde der Virustiter in den Überständen bestimmt. Der Virustiter von infizierten/unbehandelten Zellen wurde gleich 100% gesetzt. n=3; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

In Abbildung 20 sind die Virustiter im Vergleich zu infizierten/unbehandelten Zellen (=100%) graphisch dargestellt. Die Behandlung der Zellen mit Caspase 3-Inhibitor senkt den Titer um ca. 20% und mit Caspase 9-Inhibitor um ca. 35%. In Caspase 8-inhibierten Zellen steigt der Virustiter um 40%. Bei der Behandlung der Zellen mit der Kombination aus Caspase 3- und Caspase 8-Inhibitor wird jedoch der erhöhte Virustiter signifikant um 28% gesenkt. Zellen, die mit Caspase 3- und Caspase 9-Inhibitor behandelt wurden zeigen mit einer Reduktion um 45% den niedrigsten Virustiter. Caspase 8- und Caspase 9-inhibierte Zellen haben einen Virustiter von 80% im Vergleich zu den infizierten/unbehandelten Zellen. Sowohl der Virustiter als auch die Caspase 3-Aktivität zeigen in den Zellen, die mit den einzelnen CI behandelt wurden, gleiche Verläufe.

Da die Caspase 3 die letzte Effektorcaspase sowohl im extrinsischen als auch im intrinsischen Weg ist, wurde zur weiteren Betrachtung des intrinsischen Apoptosesignalweges die Caspase 9 gewählt, da diese im extrinsischen Weg keine Rolle spielt. Für die Untersuchung des Einflusses von Caspase 8- und Caspase 9-Inhibitoren auf die Caspase 9-Aktivität in infizierten MDCK-II-Zellen wurden diese mit FPV-LP infiziert (MOI=3) und ohne bzw. mit jeweils 40 μ M Caspase 8-Inhibitor oder Caspase 9-Inhibitor behandelt. 8h p.i. wurde die Caspase 9-Aktivität in den Zellen gemessen. Als Kontrolle der Caspase 9-Aktivierung diente 1 μ M Staurosporin.

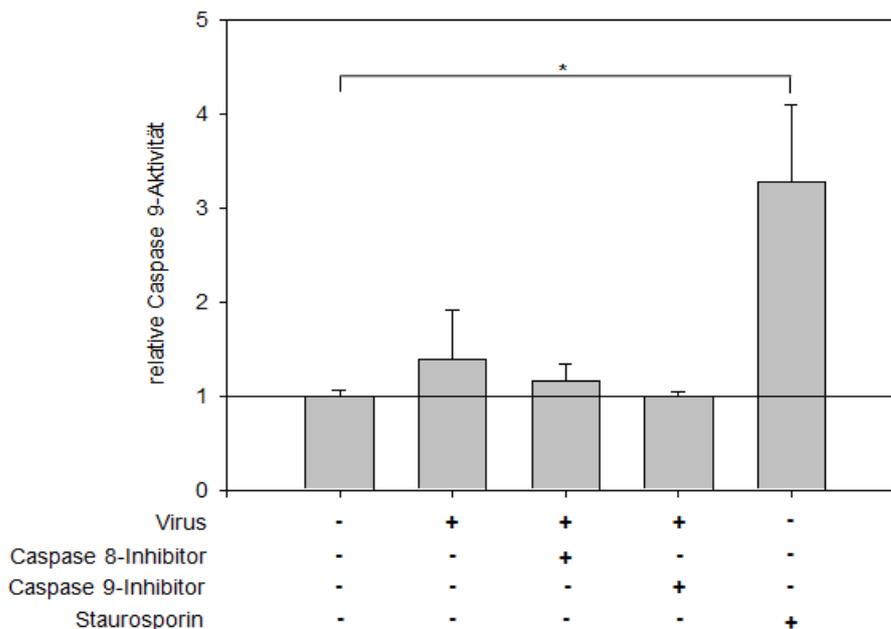


Abbildung 21: Einfluss von Caspase 8- und Caspase 9-Inhibitoren auf die Caspase 9-Aktivität in infizierten MDCK-II-Zellen

MDCK-II-Zellen wurden mit FPV-LP infiziert (MOI=3) und direkt nach der Infektion ohne bzw. mit jeweils 40µM Caspase 8-Inhibitor (Z-IETD-FMK) oder Caspase 9-Inhibitor (Z-LEHD-FMK) behandelt. 8h p.i. wurde die Caspase 9-Aktivität in den Zellen gemessen. Als Kontrolle der Caspase 9-Aktivierung diente 1µM Staurosporin (Stauro.). Die Caspase 9-Aktivität von nichtinfizierten/unbehandelten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. n=3; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

In Abbildung 21 ist die relative Caspase 9-Aktivität graphisch dargestellt. In infizierten Zellen ist die Caspase 9-Aktivität im Vergleich zu nichtinfizierten/unbehandelten Zellen um ca. 40% erhöht. Die Aktivierung der Caspase 9 kann durch die Behandlung mit Caspase 9-Inhibitor vollständig aufgehoben werden. Der Caspase 8-Inhibitor führt zu einer Reduktion der Caspase 9-Aktivität in infizierten Zellen um 25%. Die Behandlung nichtinfizierter Zellen mit Staurosporin zeigt eine signifikante Erhöhung der Caspase 9-Aktivität.

Einige Studien zeigten bereits, dass verschiedene Proteine der Bcl-2-Familie, die eine wichtige regulatorische Funktion im intrinsischen Apoptosesignalweg haben, in der IV-induzierten Apoptose involviert sind (McLean et al., 2009; Nencioni et al., 2009; Tran et al., 2013). Da meine Ergebnisse deutlich zeigen, dass die Caspase 8 keinen bzw. kaum Einfluss auf Caspase 3 und 9 hat, aber die Caspase 9-Aktivität sowohl die Caspase 3-Aktivität als auch den Virustiter beeinflusst, ist aus diesen Ergebnissen zu schließen, dass der intrinsische Apoptosesignalweg eine bedeutende Rolle in IV-infizierten MDCK-II-Zellen spielt.

3.2.3 Untersuchung des Zusammenhangs der ERK-Aktivität und der Apoptosesignalkaskade

Im Kapitel 1.2.1.4 wurde bereits beschrieben, dass sowohl die Inhibierung von ERK als auch die Caspase 3-Inhibierung den gleichen Phänotyp aufweisen, nämlich die Retention der RNPs im Kern und einen verringerten Virustiter (Pleschka et al., 2001; Wurzer et al., 2003). Weiterhin wurden bereits verschiedene Zusammenhänge von ERK und der Apoptosesignalkaskade in verschiedenen Zellsystemen untersucht (siehe 1.2.1.4). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem ERK-Signalweg und der Apoptosesignalkaskade in der IV-infizierten Zellkultur herstellen zu können und mögliche Interaktionspunkte zu untersuchen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob die Inhibierung der ERK-Aktivierung zu einer Erhöhung oder Reduktion der virusinduzierten Caspase 3-Aktivität führt (siehe Abbildung 8). Dazu wurden MDCK-II-Zellen mit FPV-LP infiziert (MOI=3)

und ohne bzw. mit 50µM des MEK-Inhibitors U0126 behandelt. 8h p.i. wurde die Caspase 3-Aktivität in den Zellen gemessen. Als Kontrolle der Caspase 3-Aktivierung diente 1µM Staurosporin.

Wie in Abbildung 22 zu sehen, steigt die Caspase 3-Aktivität sowohl in infizierten/unbehandelten als auch in infizierten/U0126-behandelten MDCK-II-Zellen signifikant an. Auch die Positivkontrolle zeigt eine Erhöhung der Caspase 3-Aktivität. Die Caspase 3-Aktivität in infizierten/U0126-behandelten Zellen ist um 27% höher als die Caspase 3-Aktivität in infizierten, unbehandelten Zellen. Bezogen auf das in Abbildung 8 gezeigte Modell würde dieses Ergebnis dafür sprechen, dass aktives ERK einen inhibitorischen Effekt auf die Caspase 3-Aktivität hat, indem es im extrinsischen Signalweg die Aktivierung der Caspase 8 hemmt oder im intrinsischen Signalweg die Aktivierung von Bid und Bad hemmt.

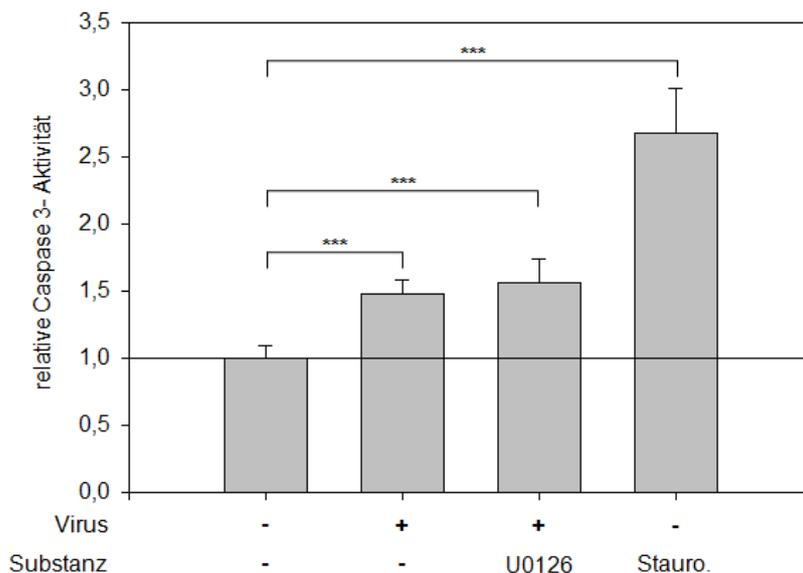


Abbildung 22: Einfluss der ERK-Aktivität auf die Caspase 3-Aktivität

MDCK-II-Zellen wurden mit FPV-LP infiziert (MOI=3) und direkt nach der Infektion ohne bzw. mit 50µM U0126 behandelt. 8h p.i. wurde die Caspase 3-Aktivität in den Zellen gemessen. Als Kontrolle der Caspase 3-Aktivierung diente 1µM Staurosporin (Stauro.). Die Caspase 3-Aktivität von nichtinfizierten/unbehandelten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. n=3; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Um den Einfluss der ERK-Aktivität auf den intrinsischen Apoptosesignalweg zu untersuchen, wurden MDCK-II-Zellen mit FPV-LP infiziert (MOI=3), die ohne bzw. mit 50µM U0126 behandelt wurden und 8h p.i. die Caspase 9-Aktivität in den Zellen

gemessen. Um die ERK-Aktivierung zu induzieren, wurden die Zellen 20min mit 200ng/ml Tetradeconoylphorbol-acetat (TPA) behandelt. TPA gehört zur Gruppe der Phorbolster und wird hauptsächlich zur Aktivierung der Proteinkinase C genutzt (Castagna et al., 1982). Zudem kann auch der ERK-Signalweg durch Phorbolster aktiviert werden (Munshi and Ramesh, 2013). Als Positivkontrolle der Caspase 9-Aktivität diente 1µM Staurosporin.

In Abbildung 23 ist die relative Caspase 9-Aktivität graphisch dargestellt. In infizierten/unbehandelten Zellen ist, im Vergleich zu nichtinfizierten/unbehandelten Zellen, die Caspase 9-Aktivität um 39% erhöht. Dagegen ist die Caspase 9-Aktivität in infizierten/U0126-behandelten Zellen nur um 6% erhöht. In TPA-behandelten Zellen liegt die Caspase 9-Aktivität unter der von nichtinfizierten/unbehandelten Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass ERK wahrscheinlich den intrinsischen Apoptosesignalweg reguliert und einen inhibitorischen Effekt auf den intrinsischen Apoptosesignalweg hat.

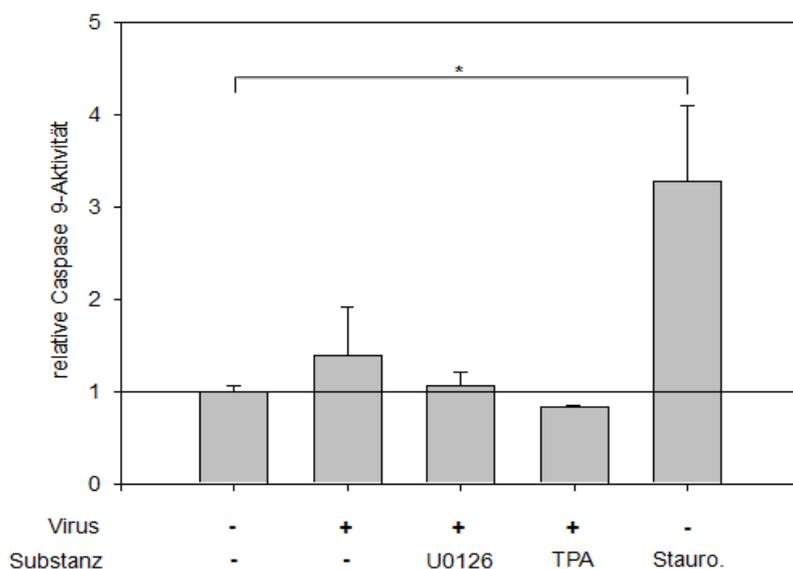


Abbildung 23: Einfluss der ERK-Aktivität auf die Caspase 9-Aktivität

MDCK-II-Zellen wurden mit FPV-LP infiziert (MOI=3) und direkt nach der Infektion ohne bzw. mit 50µM U0126 oder für 20min mit 200ng/ml TPA behandelt. 8h p.i. wurde die Caspase 9-Aktivität in den Zellen gemessen. Als Kontrolle der Caspase 9-Aktivierung diente 1µM Staurosporin (Stauro.). Die Caspase 9-Aktivität von nichtinfizierten/unbehandelten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. n=3; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Da bisher untersucht wurde, ob die virusinduzierte ERK-Aktivität einen regulativen Einfluss auf die virusinduzierte Caspase 3- bzw. Caspase 9-Aktivität hat, sollte nun, *vice versa*, der Einfluss der Aktivierung bzw. Inhibierung des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweges auf die ERK-Aktivität untersucht werden. In der Literatur wurde bereits für verschiedene Zellsysteme gezeigt, dass TRAIL die ERK-Aktivierung induziert (Kim et al., 2008; Li et al., 2006). Deswegen wurde zunächst getestet, ob auch in MDCK-II-Zellen die Zugabe von externem, caninem TRAIL zu einer Aktivierung von ERK führt. Dazu wurden MDCK-II-Zellen ohne bzw. mit 1ng/ml rekombinanten caninem TRAIL behandelt. Da rekombinantes canines TRAIL nicht mehr kommerziell verfügbar war, weil die Produktion eingestellt wurde, konnte mit dem im Labor vorhandenen Rest nur die 10-fach geringere Menge als in den Experimenten in Abbildung 17 und Abbildung 18 eingesetzt werden. Weiterhin wurden TRAIL-behandelte Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126 behandelt. 4h, 6h und 8h p.t. wurde die ERK-Aktivität mittels In-Cell-Western Blots (ICW) gemessen. Die Methode des ICW wurde von E. Lenz in der Arbeitsgruppe Pleschka etabliert und von M. Sauerwald und mir optimiert. Als Kontrolle der ERK-Aktivierung wurden die Zellen 20min mit TPA stimuliert. In Abbildung 24 ist die relative ERK-Aktivität graphisch dargestellt. Die ERK-Aktivität ist in TRAIL-behandelten MDCK-II-Zellen 4h p.t. signifikant erhöht und steigt bis 6h p.t. an. 8h p.t. ist die ERK-Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen auch erhöht, aber ca. 38% niedriger als 6h p.t.. Die Positivkontrolle TPA zeigt ebenfalls einen Anstieg der ERK-Aktivität um 23%. Durch die Behandlung der Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126 kann die TRAIL-induzierte ERK-Aktivität vollständig inhibiert werden. Das bedeutet, dass canines TRAIL in MDCK-II-Zellen zu einer Aktivierung von ERK über den MAPK-Signalweg führt.

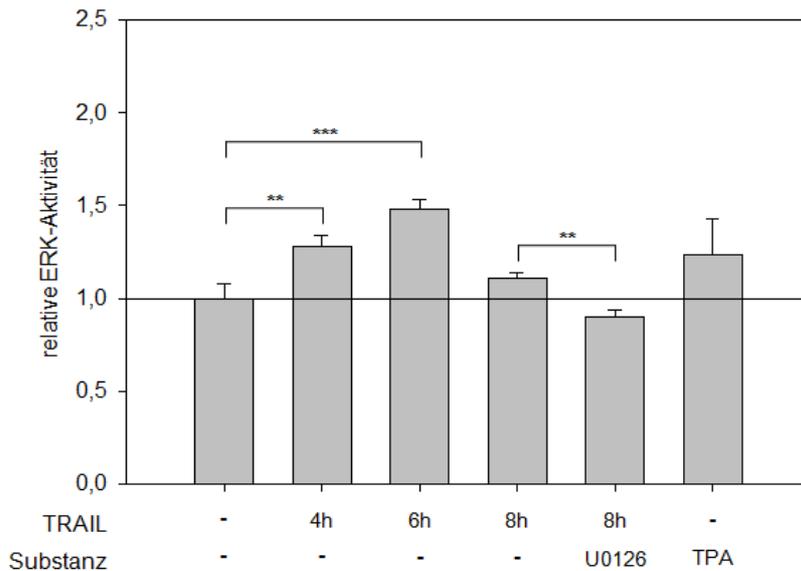


Abbildung 24: Einfluss von caninem TRAIL auf die ERK-Aktivität

MDCK-II-Zellen wurden ohne bzw. mit 1ng/ml rekombinatem caninem TRAIL behandelt und 4h, 6h und 8h p.t. wurde die ERK-Aktivität mittels ICW gemessen. Weiterhin wurden TRAIL-behandelte Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126 behandelt. Als Kontrolle der ERK-Aktivierung wurden die Zellen 20min mit TPA stimuliert. Die ERK-Aktivität von unbehandelten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. n=3; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Weiterhin sollte analysiert werden, ob Caspase 3, 8 und 9 einen regulativen Einfluss auf die ERK-Aktivierung haben. Nach dem Modell in Abbildung 8 sollte dies nicht der Fall sein. Für diese Untersuchungen wurden MDCK-II-Zellen mit FPV-LP infiziert (MOI=1) und ohne bzw. mit 50µM U0126 oder jeweils 40µM Caspase 3-, 8-, 9-Inhibitor behandelt. Die Behandlung mit 1µM Staurosporin oder 200ng/ml TPA für 20min erfolgte jeweils in nichtinfizierten und infizierten Zellen. 8h p.i. wurde die ERK-Aktivität mittels ICW bestimmt. In Abbildung 25 ist die relative ERK-Aktivität graphisch dargestellt. Die Infektion von MDCK-II-Zellen führt zu einer signifikanten Erhöhung der ERK-Aktivität, die sich durch die Behandlung mit dem MEK-Inhibitor U0126 fast vollständig inhibieren lässt. Die Inhibierung der Caspase 3-, 8- oder 9-Aktivität zeigt im Vergleich zu infizierten/unbehandelten Zellen keinen Einfluss auf die ERK-Aktivität. Sowohl in nichtinfizierten als auch in infizierten Zellen bewirkt die Staurosporinbehandlung eine Inhibierung der ERK-Aktivität. Die Behandlung der Zellen mit TPA führt zur Aktivierung von ERK in nichtinfizierten und infizierten Zellen. Die relative ERK-Aktivität in nichtinfizierten/TPA-behandelten Zellen entspricht der relativen ERK-Aktivität im vorherigen Experiment (Abbildung 24). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inhibierungen der Caspasen 3, 8 und 9 zwar keinen Effekt auf die ERK-Aktivität

haben, aber Staurosporin, wahrscheinlich durch die inhibitorische Wirkung auf die PKC, welche in der IV-infizierten Zelle an der Aktivierung von ERK beteiligt ist (Marjuki et al., 2006), zur Hemmung der ERK-Aktivität führt.

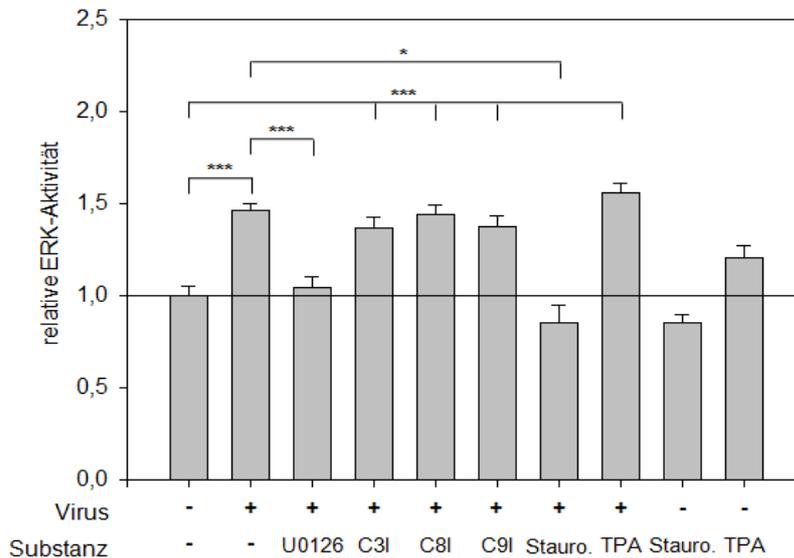


Abbildung 25: Einfluss von U0126, Caspase 3-, 8-, 9-Inhibitor, Staurosporin und TPA auf die ERK-Aktivität

MDCK-II-Zellen wurden mit FPV-LP infiziert (MOI=1) und ohne bzw. mit 50µM U0126 oder jeweils 40µM Caspase 3-, 8-, 9-Inhibitor (C3I, C8I, C9I) inkubiert. Die Behandlung mit 1µM Staurosporin (Stauro.) oder 200ng/ml TPA für 20min erfolgte jeweils in nichtinfizierten und infizierten Zellen. 8h p.i. wurde die ERK-Aktivität bestimmt. Die ERK-Aktivität von nichtinfizierten/unbehandelten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. n = 4; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Wie in der Literatur bereits gezeigt, führt die Inhibierung der ERK-Aktivität durch U0126 zu einer Reduktion des Virustiters um ca. 80% (Pleschka et al., 2001). Da die Behandlung von MDCK-II-Zellen mit Staurosporin auch zu einer Reduktion der ERK-Aktivität führt, zudem aber die Caspase 3- und 9-Aktivität erhöht, die eine wichtige Rolle bei der Influenzavirusvermehrung spielen, stellte sich die Frage, wie sich die Behandlung der Zellen mit Staurosporin auf den Virustiter auswirkt. Dazu wurden MDCK-II-Zellen mit FPV-LP infiziert (MOI=3) und mit 1µM Staurosporin oder 50µM U0126 behandelt. 8h p.i. wurde der Virustiter in den Überständen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 graphisch dargestellt.

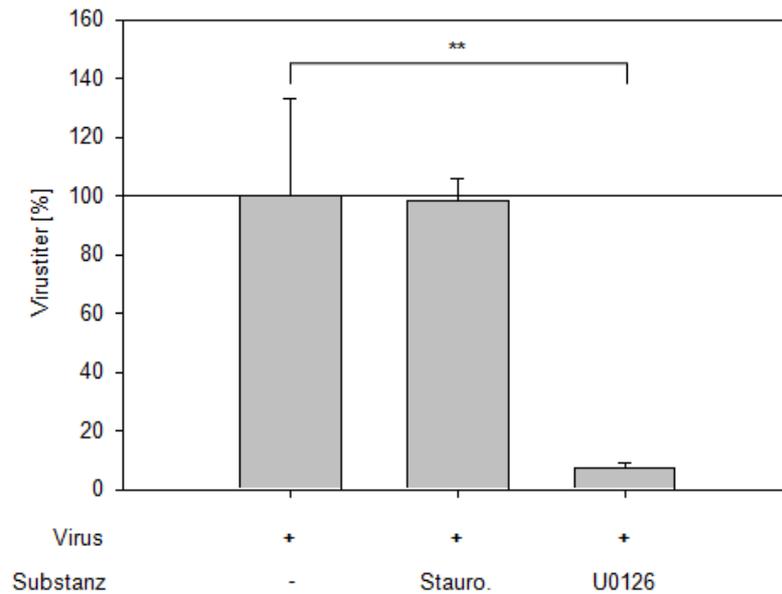


Abbildung 26: Einfluss von Staurosporin und U0126 auf den Virustiter

MDCK-II-Zellen wurden mit FPV-LP infiziert (MOI=3) und mit 1 μ M Staurosporin (Stauro.) oder 50 μ M U0126 behandelt. 8h p.i. wurde der Virustiter in den Überständen bestimmt. Der Virustiter von infizierten/unbehandelten Zellen wurde gleich 100% gesetzt. n=3; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Die Reduktion des Virustiters durch U0126 um ca. 93% bestätigt den Einfluss der ERK-Aktivität auf die Virusvermehrung. Der Virustiter in staurosporinbehandelten Zellen zeigt nahezu keinen Unterschied zu dem Virustiter in infizierten/unbehandelten Zellen. Die aktivierende Wirkung von Staurosporin auf die Caspase 3- und 9-Aktivität, die zu einer Erhöhung des Virustiters führen würde, gleicht vermutlich die inhibierende Wirkung des Staurosporin auf die ERK-Aktivität, die zu einer Reduktion des Virustiters führen würde, aus.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse erstmalig, dass die Effekte der Caspase 3-Aktivität auf den RNP-Export nicht nur für verschiedene Virustypen, sondern auch für verschiedene permissive Zelllinien gilt. Durch die Erhöhung der Diffusionslimits der Kernporen in Caspase 3-aktivierten Zellen wird der aktive, Crm-1-abhängige RNP-Kernexport, der in der frühen Replikationsphase stattfindet, durch den passiven, Caspase 3-abhängigen Transport in der späten Replikationsphase des IV abgelöst bzw. ergänzt. Weiterhin lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass der TRAIL-vermittelte extrinsische Apoptosesignalweg in der IAV-infizierten MDCK-II-Zellkultur bei der Caspase 3-Aktivierung und der Virusvermehrung eine untergeordnete Rolle spielen. Dagegen ist die Caspase 9-Aktivität im intrinsischen Apoptosesignalweg wichtig für die Caspase 3-Aktivierung und damit für die Virusvermehrung. Zudem spielt auch die ERK-Aktivität eine große Rolle für die IV-Replikation, sie hat aber in IAV-infizierten MDCK-II-Zellen eine inhibierende Wirkung über den intrinsischen Apoptosesignalweg auf die Caspase 3-Aktivität. Die Anpassung des Modells (Abbildung 8) in Bezug auf den Apoptosesignalweg und die Interaktionspunkte von ERK mit dem Apoptosesignalweg auf Grund der erzielten Ergebnisse ist in Abbildung 27 dargestellt und wird unter anderem im folgenden diskutiert werden.

4. Diskussion

Apoptose ist ein in der Influenzavirus (IV)-infizierten Zelle induzierter Wirtszellmechanismus, um die Verbreitung des Virus zu verhindern. Das IV hat allerdings Strategien entwickelt, um diese antivirale Zellantwort zum eigenen Vorteil zu nutzen. Für die Replikation des Virus ist es wichtig, dass einerseits das virale Genom in den Kern für die Replikation transportiert wird, andererseits die Ribonukleoproteinkomplexe (RNPs) effizient aus dem Kern transportiert werden, um an der Wirtszellmembran in neue, infektiöse Viruspartikel verpackt zu werden. Die genutzten Wirtszellmechanismen zum RNP-Export und die Regulation der Apoptosesignalkaskade durch das IV sind bis heute nicht vollständig untersucht.

4.1 Die Caspaseabhängigkeit des nukleo-zytoplasmatischen RNP-Exports gilt für verschiedene Influenzaviren und in verschiedenen Zelllinien

Frühere Arbeiten zeigen, dass bei einer IV-Infektion durch die virusinduzierte, NF- κ B-abhängige Expression von *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) die Caspase 3 über den extrinsischen Apoptosesignalweg aktiviert wird. Somit steigt in *fowl plague virus* (FPV)-infizierten Zellen die Caspaseaktivität an. Es wurde beobachtet, dass es durch die Inhibition von TRAIL, Caspase 3, aber auch von NF- κ B zur Retention der RNPs im Kern und dadurch zur verminderten Virusreplikation kommt (Wurzer et al., 2004; Wurzer et al., 2003). Die Retention der RNPs in FPV-infizierten MDCK-II-Zellen mit Caspase 3/7-Inhibitorbehandlung (CI) kann bestätigt werden (Abbildung 9). Zudem wird die Hypothese erweitert und die Frage gestellt, ob die Caspaseabhängigkeit des RNP-Exports für alle Influenzavirus-Genera gilt. Wie in Abbildung 9 zu sehen, ist in Influenza-A-Virus (IAV)-, Influenza-B-Virus (IBV)- und Influenza-C-Virus (ICV)-infizierten, CI-behandelten Zellen trotz des möglichen *Chromosomal Maintenance-1* (Crm-1)-abhängigen Exports kein Nukleoprotein (NP) im Zytoplasma detektierbar. Daraus kann man schließen, dass der RNP-Export in der späten Phase der Virusvermehrung, ca. 8h, 14h und 18h für IAV, IBV und ICV, Caspase 3-abhängig ist. Dies gilt nicht nur für MDCK-II-Zellen, die gewöhnlich zur IV-Vermehrung genutzt werden. Die Caspase 3-Abhängigkeit des RNP-Exports gilt auch für verschiedene sekundäre, humane und aviäre Zelllinien sowie für primäre hAEC

(Abbildung 10). Die wichtige Funktion der Caspase 3 wird auch durch MCF-7-Zellen, die Caspase 3-defizient sind, bestätigt. Trotz aktiver Caspase 7 sind in den infizierten/unbehandelten MCF-7-Zellen keine RNPs im Zytoplasma detektierbar. Wahrscheinlich ist wegen des aktiven Crm-1-abhängigen Exports ein Virustiter messbar, der allerdings im Vergleich zu A549-Zellen (Wurzer et al., 2003) oder MDCK-II-Zellen (Daten nicht gezeigt) viel niedriger ist. Zusammenfassend kann man daraus schlussfolgern, dass die Caspase 3-Aktivität für den RNP-Export eine wichtige Rolle spielt und diese Abhängigkeit für verschiedene Influenzavirus-Genera und in verschiedenen Zelllinien gilt.

4.2 Die Caspaseaktivität führt zur Erhöhung der Diffusionslimits im Kernporenkomplex

Der Kernexport der RNPs erfolgt mit Hilfe zellulärer Exportmechanismen durch die Kernporen (Cros and Palese, 2003). Dies ist ein komplexer Prozess, der durch die Interaktion von viralen Proteinen mit Wirtszellproteinen der Kernporen ermöglicht wird (siehe 1.1.5). Allerdings sind verschiedene Kernporenbestandteile (z.B. Nup153 oder Nup214), die für den Exportmechanismus wichtig sind, Substrate der aktiven Caspase 3 (Fischer et al., 2003; Fornerod et al., 1997). So wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass die Aktivierung der Caspasen zur Zerstörung der nukleozytoplasmatischen Barriere führt (Faleiro and Lazebnik, 2000). Auch C. Wisskirchen hat in seiner Diplomarbeit gezeigt, dass es in FPV-infizierten MDCK-II-Zellen 6h bzw. 8h p.i. zu einer Erhöhung des Diffusionslimits der Kernporen kommt (Wisskirchen, 2007). Dieses Ergebnis konnte nicht nur mittels Immunfluoreszenz 10h p.i. in FPV-infizierten Zellen bestätigt (Abbildung 11), sondern auch quantitativ belegt werden (Abbildung 11c). In Erweiterung der genannten Diplomarbeit wurden zudem in 3xGFP-NLS- und 5xGFP-transfizierten Zellen die Apoptose durch die Behandlung mit Actinomycin D (ActD) ausgelöst und damit die Caspase 3 aktiviert. Wie in infizierten Zellen konnte das 3xGFP in ActD-behandelten Zellen ins Zytoplasma diffundieren. Ein vollständiger, aktiver Reimport des 3xGFP auf Grund des Kernlokalisationssignals wurde sowohl in infizierten als auch in ActD-behandelten Zellen nicht beobachtet, was auf eine Zerstörung der aktiven zellulären Importmechanismen durch aktive Caspase 3 hindeutet. Das 5xGFP dagegen, das in unbehandelten Zellen im Zytoplasma lokalisiert ist, konnte in infizierten und auch in ActD-behandelten Zellen in den Kern diffundieren. Diese Effekte sind durch die Zugabe des CI inhibierbar (Abbildung 11, Abbildung 12).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Erhöhung des Diffusionslimits der Kernporen abhängig von der Caspase 3-Aktivität ist, aber unabhängig davon, wodurch die Caspase aktiviert wird (Virusinfektion, ActD). Das IV kann die Zerstörung der nukleozytoplasmatischen Barriere und die damit einhergehende Erhöhung des Diffusionslimits von ca. 40kDa auf ca. 125kDa (Masse des 5xGFP) für den erleichterten RNP-Export und die dadurch schnellere Replikation nutzen. Hinzu kommen Ergebnisse, die D. Mühlbauer im Rahmen seiner Dissertation in der AG Pleschka erarbeitete, die zeigen, dass es durch die aktive Caspase 3 zu einer Vergrößerung der Kernporen um ca. 20nm kommt. Die RNPs besitzen mit ca. 5,6MDa zwar eine große Masse, aber durch ihre Struktur (30-120nm lang und 10-15nm breit) ist eine Diffusion durch die Kernporen entlang der Longitudinalachse möglich (Noda et al., 2006).

Mit noch größeren GFP-Multimeren könnte in Zukunft untersucht werden, ob die Erhöhung des Diffusionslimits der Kernporen bis zur vollständigen Auflösung der Kernmembran in der späten Phase der Apoptose beliebig ansteigt oder begrenzt ist.

4.3 Der RNP-Export wechselt vom Crm-1-abhängigen zum caspaseabhängigen Transport

Im Gegensatz zu den gezeigten Ergebnissen des caspaseabhängigen RNP-Exports, steht der in der Literatur beschriebene Crm-1-abhängige RNP-Export. Es wurde gezeigt, dass sowohl das *nuclear export protein/ nonstructural protein 2* (NEP/NS2) als auch das NP mit dem zellulären Exportrezeptor Crm-1 interagieren und dadurch die RNPs aus dem Kern transportiert werden (Elton et al., 2001; Neumann et al., 2000; O'Neill et al., 1998). Weiterhin konnten Elton et. al. zeigen, dass der Crm-1-Inhibitor Leptomycin B (LepB) den RNP-Export in IAV-infizierten immortalisierten Fibroblasten hemmt (Elton et al., 2001). Zur Klärung der Frage nach der Relevanz der beiden unterschiedlichen Mechanismen für den RNP-Kernexport wird in der hier vorliegenden Arbeit zum ersten Mal der zeitliche Zusammenhang zwischen dem aktiven Crm-1-abhängigen RNP-Export und dem passiven Caspase 3-abhängigen RNP-Exports für die Virusreplikation untersucht. Zunächst konnte gezeigt werden, je später die Zugabe von LepB während des Replikationszyklus erfolgt, desto geringer ist die Reduktion des Virustiters (Abbildung 13). Lässt man jedoch die Zeitspanne der Crm-1- und Caspase 3/7-Inhibitorzugabe konstant und unterscheidet nur nach der Zugabe in der frühen (0-

5h p.i.) oder der späten Phase (5-10h p.i.) des IAV-Replikationszyklus, ist in Abbildung 14 zu erkennen, dass die LepB-Zugabe zu frühen (0-5h) und die CI-Zugabe zu späten (5-10h) Zeitpunkten des Replikationszyklus zu einer signifikanten Titerreduktion führen. Dies konnte auch in der intrazellulären RNP-Lokalisation bestätigt werden (Abbildung 15). Die Caspase 3 wird zu späten Zeitpunkten des Replikationszyklus (5-10h p.i.) aktiviert und trotz Zugabe von LepB sind die RNPs im Zytoplasma detektierbar. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass der aktive Kernexport der RNPs zur Bildung neuer Virionen zu späten Zeitpunkten des viralen Replikationszyklus entbehrlich wird und der aktive Crm-1-abhängige RNP-Export durch einen passiven, caspaseabhängigen Mechanismus abgelöst bzw. ergänzt wird. Mechanistisch ist das damit zu erklären, dass Kernporenbestandteile, wie z.B. Nup153 und Nup214, mit denen Crm-1 interagiert, als Substrate der Caspase 3 degradiert werden und somit ein aktiver Crm-1-abhängiger Transport nicht mehr möglich ist (Fischer et al., 2003; Fornerod et al., 1997).

4.4 TRAIL spielt eine untergeordnete Rolle bei der Caspase 3-Aktivierung und der Virusreplikation

Wie bereits erwähnt, wurde im *ex vivo*- und *in vivo*-Modell gezeigt, dass die TRAIL-Expression in Makrophagen die Apoptose in Alveolarepithelzellen (AEC) über den extrinsischen Apoptosesignalweg auslöst (Hogner et al., 2013). Auch eine Hochregulierung von TRAIL-mRNA in IAV (H5N1)-infizierten Makrophagen und die TRAIL-induzierte Apoptose in Jurkat T-Zellen konnte bereits nachgewiesen werden (Zhou et al., 2006). Wurzer et. *al.* zeigten die NF- κ B-abhängige TRAIL-Expression in FPV-infizierten A549-Zelllysaten bis zu 6h p.i. mittels Western Blot (Wurzer et al., 2004). Die exprimierte und sezernierte Menge an TRAIL in der für diese Arbeit verwendeten MDCK-II-Zellkultur wurde mittels ELISA gemessen. In den Überständen der nichtinfizierten und auch der infizierten Zellen wurden TRAIL-Konzentrationen im Bereich der Detektionsgrenze (0,156ng/ml) gemessen (Abbildung 16a). In den Zelllysaten hingegen wurden TRAIL-Konzentrationen von 0,4ng/ml bis 1,2ng/ml gemessen (Abbildung 16 b). Dies weist darauf hin, dass ein Großteil des TRAILs nicht sezerniert wird. Der Verlauf der detektierten TRAIL-Konzentration lässt vermuten, dass die Expression von TRAIL erst 24h p.i. ansteigt und dann wieder abfällt. Vergleicht man die TRAIL-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Patienten mit einem durch IAV-induzierten *Acute Respiratory Distress Syndrome*

(ARDS) von ca. 0,15ng/ml bzw. die in IAV-infizierten Alveolarmakrophagen gemessene Konzentration an löslichem TRAIL von ca. 0,07ng/ml (Hogner et al., 2013), wird in IAV-infizierten MDCK-II-Zellen ungefähr die gleiche Menge an TRAIL sezerniert. Dennoch reicht weder die sezernierte Menge (ca. 0,1ng/ml) noch die 10-fache Menge des TRAIL in Zelllysaten (10ng/ml) aus, um einen Anstieg der Caspase 3-Aktivität in MDCK-II-Zellen zu detektieren (Abbildung 17). Die Zugabe von 10ng/ml rekombinantem TRAIL direkt nach der Infektion erhöhte den Virustiter nicht signifikant um 22% (Abbildung 18). Wurzer et. al. dagegen zeigten eine Erhöhung des Virustiters um eine halbe log-Stufe bei Zugabe von 10ng/ml rekombinantem TRAIL 6h p.i. zu FPV-infizierten A549-Zellen (Wurzer et al., 2004). Für eine genauere Analyse der Wirkung von extern zugegebenem TRAIL auf die Virusreplikation könnte das TRAIL zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion zugegeben werden. Diese Ergebnisse sind trotzdem ein Hinweis darauf, dass TRAIL und der extrinsische Apoptosesignalweg bei der Caspase 3-Aktivierung und der Virusreplikation in MDCK-II-Zellen, wenn überhaupt, eine untergeordnete Rolle spielen. Da aber in diesen Zellen IV erfolgreich vermehrt werden können und diese Vermehrung wiederum caspaseabhängig ist, kann man annehmen, dass hierbei der intrinsische Apoptosesignalweg wichtig ist.

4.5 Der intrinsische Apoptosesignalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Virusreplikation

Da das exprimierte bzw. sezernierte TRAIL in MDCK-II-Zellen eine untergeordnete Rolle bei der Caspase 3-Aktivierung bzw. bei der Virusreplikation spielt, wurde untersucht, welchen Einfluss der intrinsische, Caspase 9-abhängige Apoptosesignalweg auf die Aktivierung der Caspase 3 und die IV-Replikation in MDCK-II-Zellen hat. Die durch IV-Infektion induzierte Caspase 3-Aktivität lässt sich durch den Caspase 3-Inhibitor vollständig und durch den Caspase 9-Inhibitor um ca. 50% reduzieren (Abbildung 19). Dies deutet darauf hin, dass der intrinsische Apoptosesignalweg zur Hälfte zu der Aktivierung der Caspase 3 beiträgt. Allerdings zeigte in diesem Experiment der Caspase 8-Inhibitor keinen Effekt auf die Reduktion der Caspase 3-Aktivität (Abbildung 19), was darauf hinweist, dass der extrinsische Signalweg in der IV-infizierten MDCK-II-Zellkultur keine wesentliche Rolle spielt. Zudem scheint die Caspase 8-Inhibition die Virusvermehrung zu fördern (Abbildung 20). Der Caspase 8-Inhibitor wurde zwar in der Konzentration eingesetzt wie die anderen Inhibitoren und auch in dem von der Firma angegebenen Konzentrationsbereich,

aber um eine optimale Wirkung des Inhibitors zu erhalten und um vollständig ausschließen zu können, dass Caspase 8-Aktivität nicht an der Aktivierung der Caspase 3 beteiligt ist, hätte man verschiedene Caspase 8-Inhibitor-Konzentrationen testen müssen. Die Kombination des Caspase 8-Inhibitors mit dem Caspase 3- bzw. Caspase 9-Inhibitor führt zwar zu einer Reduktion der Caspase 8-Inhibitor-induzierten Titererhöhung, aber diese Reduktion ist nicht so stark wie bei der Verwendung des Caspase 9-Inhibitors allein. Weiterhin lässt sich der Virustiter mit Hilfe des Caspase 3-Inhibitors um 20% und mit Hilfe des Caspase 9-Inhibitor um ca. 40% reduzieren. Eine Kombination aus beiden Inhibitoren führt zu einer Reduktion des Virustiters um ca. 45% (Abbildung 20). Da die Caspase 9-Inhibierung die stärksten Effekte auf die Reduktion des Virustiters zeigt, lässt sich daraus schließen, dass die Caspase 9-Aktivität und damit der intrinsische Apoptosesignalweg wichtig für Virusreplikation in MDCK-II-Zellen ist. Dazu passt, dass die IAV-Infektion in MDCK-II-Zellen zu einer Erhöhung der Caspase 9-Aktivität führt (Abbildung 21). Da der Caspase 8-Inhibitor die Caspase 9-Aktivität um 25% reduziert, kann angenommen werden, dass in IV-infizierter MDCK-II-Zellkultur der intrinsische Apoptosesignalweg auch durch den extrinsischen Signalweg aktiviert wird (siehe Modell in Abbildung 7). Staurosporin erhöht nicht nur die Caspase 3-Aktivität (Abbildung 17, Abbildung 19), sondern auch die Caspase 9-Aktivität (Abbildung 21). Dieses Ergebnis könnte damit erklärt werden, dass Staurosporin die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) inhibiert, die wiederum Translokation und Aktivierung des proapoptotischen Faktors Bax verhindert und damit den Apoptosesignalweg hemmen kann. Die Inhibierung von PKC durch Staurosporin führt damit zur Apoptose über den intrinsischen Signalweg (Gillespie et al., 2005).

Da die IAV-Infektion in MDCK-II-Zellen zu einer Caspase 9-Aktivierung führt und die Inhibition der Caspase 9 sowohl die Caspase 3-Aktivität als auch den Virustiter reduziert, lässt sich daraus schließen, dass der intrinsische Apoptosesignalweg eine wichtige Rolle bei der IV-Replikation in sekundärer MDCK-II-Zellkultur spielt. Diese Hypothese wird zudem durch Ergebnisse von Olsen et. al. bestätigt. Sie konnten zeigen, dass die Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2, welches im intrinsischen Apoptosesignalweg eine wichtige Rolle für die Regulation spielt (siehe 1.2.1.2), die IV-induzierte Apoptose in MDCK-Zellen blockiert und auch den Virustiter reduziert (Olsen et al., 1996). Auch einige andere Studien zeigten bereits, dass Bad, Bak und Bax, Proteine der Bcl-2-Familie, in der IV-induzierten Apoptose involviert sind und deren Knockout die virusinduzierte Apoptose inhibiert (McLean et al., 2009; Nencioni et al., 2009; Tran et al., 2013). Choi et. al. nutzte die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in Schweinenierenzellen als Marker, um zu

zeigen, dass in der IV-induzierten Apoptose der intrinsische Signalweg aktiviert wird (Choi et al., 2006).

4.6 Aktives ERK wirkt über den intrinsischen Signalweg auf die Caspase 3-Aktivität

Wie bereits unter 1.2.1.4 beschrieben, führt die Inhibition der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)-Aktivität nicht nur zur Reduktion des Virustiters, sondern auch zur Retention der RNPs im Kern (Pinto et al., 2011; Pleschka et al., 2001). Diese Ergebnisse können in eigenen Experimenten bestätigt werden (Abbildung 26). Da aber auch die Inhibition der Caspase 3-Aktivität zur Reduktion des Virustiters (Abbildung 20) und zur Retention der RNPs im Kern (Abbildung 9, Abbildung 10) führt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Inhibition der ERK-Aktivität zur Reduktion der Caspase 3-Aktivität führt und es dadurch zu den gleichen Effekten auf die Virusreplikation und den RNP-Export kommt. Allerdings kann diese Hypothese nicht bestätigt werden, da die Ergebnisse in Abbildung 22 zeigen, dass die Inhibierung der ERK-Aktivität durch U0126 die Caspase 3-Aktivität nicht reduziert, sondern sogar eine geringe Erhöhung der Caspase 3-Aktivität im Vergleich zu infizierten/unbehandelten Zellen detektiert wird. Weiterhin ist in ERK-inhibierten Zellen, im Vergleich zu nichtinfizierten/unbehandelten Zellen, die Caspase 9-Aktivität geringfügig erhöht. Dagegen reduziert die Stimulierung der ERK-Aktivität durch Tetradekanoylphorbolacetat (TPA) die Caspase 9-Aktivität (Abbildung 23). Dieses Ergebnis könnte damit erklärt werden, dass TPA ERK über die PKC aktiviert und, wie unter 4.5 beschrieben, PKC den intrinsischen Apoptosesignalweg inhibieren kann bzw. aktives ERK p90RSK aktiviert, welche wiederum dazu führt, dass der intrinsische Apoptosesignalweg gehemmt wird (siehe Modell in Abbildung 8) (Frodin and Gammeltoft, 1999; Gillespie et al., 2005; Shimamura et al., 2000). Da sich die Inhibierung der ERK-Aktivierung durch U0126 positiv auf die Caspaseaktivität auswirkt, sind die Ergebnisse insgesamt ein Hinweis darauf, dass die virusinduzierte ERK-Aktivität in IAV-infizierten MDCK-II-Zellen die Caspase 3-Aktivität über den intrinsischen Apoptosesignalweg negativ reguliert.

Zudem wurde umgekehrt der Einfluss verschiedener Faktoren des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweges auf die ERK-Aktivität untersucht. So induzieren sowohl extern zugegebenes, rekombinantes TRAIL als auch die IAV-Infektion die ERK-Aktivität in MDCK-II-Zellen vermutlich über die PKC (Gillespie et al., 2005; Marjuki et al., 2006). Diese ERK-Aktivität lässt sich in beiden Fällen durch den MEK-Inhibitor

U0126 inhibieren (Abbildung 24, Abbildung 25). Da die ERK-Inhibition eine induzierende Wirkung auf die Caspase 3- und 9-Aktivität hat (Abbildung 22, Abbildung 23), aber die Caspase 3-, 8-, 9-Inhibitoren keine Inhibition der ERK-Aktivität in infizierten Zellen zeigen (Abbildung 25), lässt sich daraus schließen, dass ERK im Signalweg oberhalb der Caspasen wirken muss. Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist, dass Staurosporin die Caspase 3 und 9 aktiviert (Abbildung 19, Abbildung 21), aber ERK-Aktivierung inhibiert (Abbildung 25), was den nahezu gleichen Virustiter im Vergleich zu infizierten/unbehandelten Zellen erklären könnte (Abbildung 26). Da in ERK-inhibierten MDCK-II-Zellen die Caspase 3 und 9 trotzdem aktiv sind, weist das auf einen möglichen Rückkopplungsmechanismus hin, in dem der aktive intrinsische Apoptosesignalweg ERK inhibiert, um die eigene Aktivität aufrecht zu erhalten. In Jurkat T-Zellen und IAV-infizierten Hühnermakrophagen dagegen hat aktiviertes ERK eine inhibierende Wirkung auf den extrinsischen, TRAIL-induzierten Apoptosesignalweg (Soderstrom et al., 2002; Xing et al., 2010).

Durch die Untersuchung des Anteils des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweges an der Caspase 3- Aktivität und der Virusreplikation, sowie die Analyse möglicher Interaktionspunkte der ERK-Signalkaskade mit den Caspasesignalwegen kann nun das Modell aus Abbildung 8 angepasst und überarbeitet werden (Abbildung 27). TRAIL und der extrinsische Apoptosesignalweg spielen bei der Caspase 3-Aktivierung und der Virusreplikation in MDCK-II-Zellen eine untergeordnete Rolle. Der intrinsische Apoptosesignalweg soll etwas hervorgehoben werden, da er einen Einfluss auf IV-Replikation in sekundärer MDCK-II-Zellkultur hat. Die Inhibition von ERK führt zu einer erhöhten Caspase 3 und 9-Aktivität. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass aktives ERK an verschiedenen Punkten mit dem Caspasesignalweg interagiert, um den extrinsischen und intrinsischen Signalweg zu inhibieren. Somit kann eine durch aktives ERK induzierte Apoptose, wie es in der Literatur beschrieben wird, ausgeschlossen werden (Li et al., 2006; Liu et al., 2006). Vielmehr sind folgende Interaktionen von aktivem ERK möglich, die zur Inhibition des intrinsischen Signalweges, aber auch zur Inhibition der Caspase 3 über den extrinsischen Weg führen können: (i) die Aktivierung von p90RSK, was wiederum zur Phosphorylierung und Inhibition von Bad führt (Shimamura et al., 2000), (ii) die Cytochrom C- Ausschüttung wird inhibiert, (iii) Inhibition der Spaltung von pro-Caspase 8 und damit verbundene Inhibition der Spaltung von Bid durch Caspase 8 (Soderstrom et al., 2002), (iiii) Phosphorylierung der pro-Caspase 8 und damit die Inhibition der Aktivierung von Caspase 8 (Mandal et al., 2014). Zur weiteren Eingrenzung der Interaktionsmöglichkeiten von aktiviertem oder auch inhibiertem ERK in MDCK-II-

Zellen könnten, wie es beispielsweise in der Literatur gezeigt wird, die p90RSK-Aktivierung mittels spezifischer Antikörper gegen phosphoryliertes RSK, die Cytochrom C-Ausschüttung durch Konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie oder die Spaltung von pro-Caspase 8 und Bid im Western Blot analysiert werden (Meng et al., 2013; Soderstrom et al., 2002).

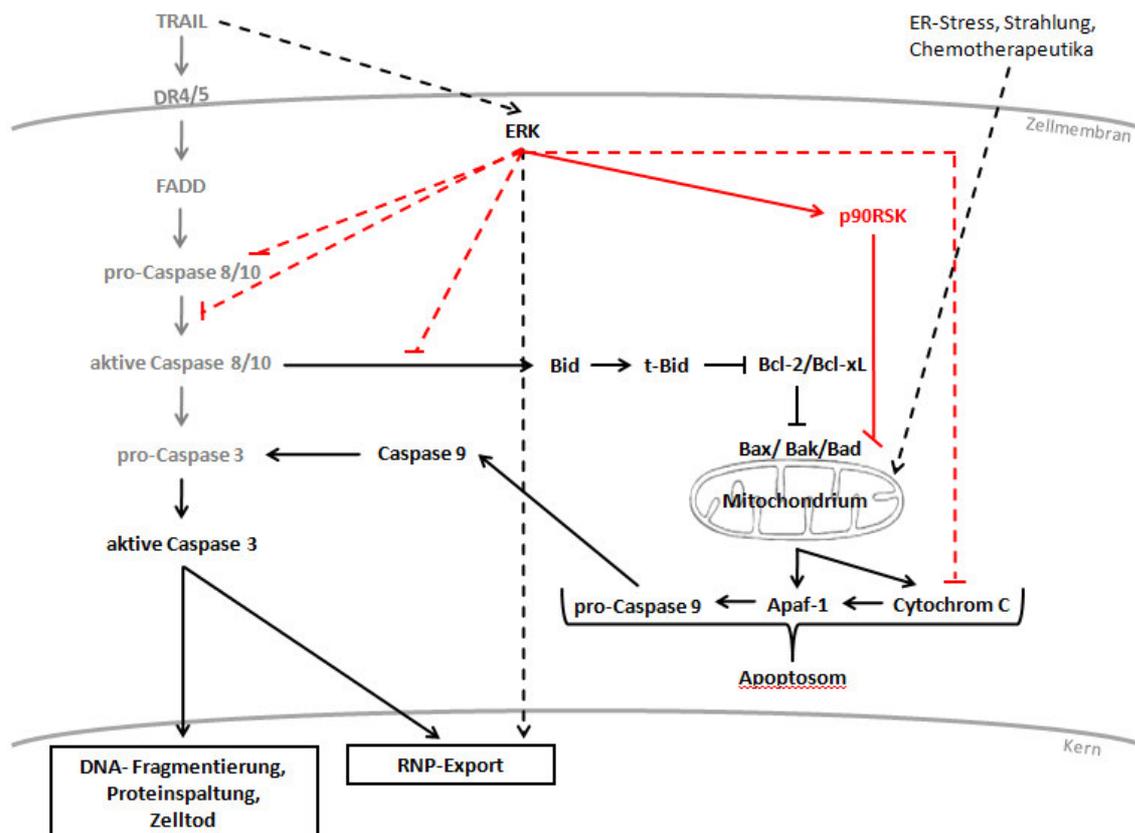


Abbildung 27: Übersicht über den Anteil des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweges und möglichen Interaktionen von ERK mit dem Apoptosesignalweg in IV-infizierten MDCK-II-Zellen

Auf Grundlage der Ergebnisse stellt dieses Model mögliche Signalkaskaden und Interaktionen im Apoptosesignalweg in IV-infizierten MDCK-II-Zellen dar. Der TRAIL-induzierte extrinsische Signalweg spielt eine untergeordnete Rolle bei der Caspase 3-Aktivierung und ist deshalb in grau dargestellt. Die roten Linien zeigen mögliche Interaktionspunkte von ERK zur Inhibition des extrinsischen und intrinsischen Signalweges. Durchgezogene Linien stellen eine direkte, gestrichelte Linien stellen eine indirekte Interaktion dar.

Die Regulation sowohl der extrinsischen als auch intrinsischen Apoptosesignalkaskade unterscheidet sich in verschiedenen IV-infizierten Zelllinien (Herold et al., 2012; Iwai et al., 2013). So kommt es beispielsweise in Makrophagen zur Interferon- β (INF- β)-induzierten Expression von TRAIL, welches wiederum zur Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalweges in primären Alveolarepithelzellen führt (Hogner et al., 2013). Auch in A549-Zellen wurde gezeigt, dass die NF- κ B-abhängige Expression von TRAIL wichtig für die effiziente Virusreplikation ist (Wurzer et al., 2004). Zudem spielt in A549-Zellen auch der intrinsische Apoptoseweg eine wichtige Rolle bei der Virusreplikation (Tran et al., 2013; Wang et al., 2014). Auch in MDCK-II-Zellen ist das komplexe Zusammenspiel vom ERK-Signalweg und der Apoptosesignalkaskade wichtig für den RNP-Export und die Virusreplikation. Die IV-Infektion erhöht die Caspase 3- und 9-Aktivität, aber auch die ERK-Aktivität. Aktives ERK dagegen inhibiert die Caspase 3-Aktivität. Dieser scheinbare Widerspruch zeigt, wie komplex die Signaltransduktion in IV-infizierten Zellen ist, aber auch wie wichtig die Feinregulation zwischen Zelltod und Überleben der Zellen für die effiziente Replikation des IV ist. Daher ist es von großer Bedeutung, weitere Zwischenschritte der Signaltransduktion in der IV-infizierten Zelle zu untersuchen und aufzuklären. Allerdings steht am Ende des extrinsischen und auch des intrinsischen Signalweges die aktive Caspase 3, deren Aktivität zusätzlich von ERK beeinflusst wird. Diese Effektorcaspase spielt eine wichtige Rolle für den verbesserten RNP-Export und eine effiziente Virusreplikation in verschiedenen Zelllinien und für alle drei Influenzavirus-Genera. Damit wäre die Caspase 3 ein mögliches Ziel für antivirale Behandlungen, weil die Inhibierung der Caspase 3 nicht nur in MDCK-II-Zellen zur Reduktion des Virustiters führt, sondern auch die apoptoseinduzierte Schädigung der Lungenzellen verringert werden könnte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die hier vorliegenden Arbeiten zum weiteren Verständnis der IAV-Vermehrung in Zellkulturen beigetragen haben und aufzeigen, wie intensiv und gezielt das Virus zelluläre Mechanismen und Faktoren erfolgreich für seine eigene Vermehrung nutzt. Die Arbeiten erweitern damit unser Bild über die komplexe Interaktion zwischen Zelle und Virus, bei der das Virus primär antivirale Mechanismen und Faktoren reguliert und für seine eigene Reproduktion nutzt. Da hierbei Abhängigkeiten des Virus von diesen zellulären Faktoren und Mechanismen entstanden sind, sind diese auch interessante Ziele für innovative antivirale Therapieansätze. Die weitere Erforschung dieser Zusammenhänge kann, aufbauend auf diesen Ergebnissen, neue strategische Angriffspunkte definieren.

5. Zusammenfassung

Influenza-A-Viren (IAV) stellen jedes Jahr eine Bedrohung für die Gesundheit vieler Menschen dar. In der IAV-infizierten Zelle werden nicht nur eine Vielzahl von Signalkaskaden ausgelöst, um den Eindringling zu bekämpfen, sondern das Virus weiß auch die Wirtszelle so zu manipulieren bzw. die antiviralen Mechanismen so auszunutzen, dass die eigene Replikation vorangetrieben wird. Für die Entwicklung von antiviralen Strategien ist es daher wichtig, das komplexe Zusammenspiel der Virusreplikation mit den in der Wirtszelle ausgelösten Signalwege zu verstehen. Da IAV das segmentierte Genom im Kern der Wirtszelle replizieren, ist es für die Bildung neuer infektiöser Virionen an der Zellmembran unabdingbar, dass das virale Genom in Form von Ribonukleoproteinkomplexen (RNPs) aus dem Kern transportiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Apoptosesignalkaskade für den RNP-Kernexport bzw. für die Replikation des IAV und deren Regulation in der IAV-infizierten sekundären Zellkultur untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass der RNP-Kernexport (i) für Influenzaviren aller drei Genera (A, B, C) und (ii) in verschiedenen sekundären Zelllinien und primären Zellen Caspase 3-abhängig ist. Hierfür mussten spezielle Immunfluoreszenzmethoden und Infektionsprotokolle etabliert werden. Weiterhin wurde durch nichtvirale Induktion der Apoptose und qualitative bzw. quantitative Analyse bestätigt, dass die Erhöhung des Kernporendiffusionslimits, die während der IAV-Infektion beobachtet wird, Caspase 3-abhängig ist. Außerdem konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass der aktive, Crm-1-abhängige RNP-Transport zu späten Zeitpunkten des viralen Replikationszyklus von dem passiven, Caspase 3-abhängigen Export ersetzt bzw. ergänzt wird. Diese Ergebnisse sind Teil einer zur Publikation eingereichten Arbeit über die Bedeutung der influenzavirusinduzierten, caspaseabhängigen Vergrößerung der Kernporen für den RNP-Kernexport. Weitere Ergebnisse zur Untersuchung der Regulation der Apoptosesignalwege in einer für die IAV-Vermehrung genutzten permanenten Zellkultur zeigen, dass (i) in IAV-infizierten MDCK-II-Zellen die TRAIL-abhängige Caspase 3-Aktivierung über den extrinsischen Weg eher eine untergeordnete Rolle spielt und dafür (ii) der intrinsische Weg für die IAV-induzierte Caspase 3-Aktivierung und damit für die Virusreplikation essentiell ist. Ebenfalls wurden (iii) konträre Modelle zur regulativen Funktion von ERK für die Apoptosesignalkaskaden überprüft. Dabei wurde erstmals für IAV-infizierte MDCK-II-Zellen gezeigt, dass aktives ERK den intrinsischen Apoptosesignalweg und somit die Caspase 3-Aktivität negativ reguliert.

6. Summary

Influenza A virus (IAV) poses a major threat to human health every year. In the IAV-infected cell a multitude of signaling pathways are induced to fight the invader, but the virus has evolved strategies to modulate or counteract these antiviral cellular responses to enhance the own replication. In order to develop antiviral strategies, it is important to understand the complex interplay between the viral replication and the cellular-induced signaling pathways. IAV replicates its genome in the nucleus of the host cell and for the production of progeny infectious virions at the cell membrane it is therefore important, that the viral genome, packaged in ribonucleoprotein complexes (RNP), is efficiently exported from the nucleus. In this thesis I analyzed the role as well as the regulation of the apoptosis signaling cascade for the RNP-export and IAV replication in secondary cell culture. The results demonstrate, that the RNP-export (i) for all three influenza virus genera (A, B, C) and (ii) in different secondary cell lines and in primary cells is caspase 3-dependent. For this, special immunofluorescence methods and infection protocols had to be established. By non-viral induction of the apoptosis and quantitative and qualitative analysis it was furthermore confirmed, that the increase of nuclear pore diffusion limits, which is observed in IAV-infected cells, is caspase 3-dependent. Moreover, I demonstrate here for the first time, that the active, Crm-1-dependent RNP-export switches to a passive, caspase 3-dependent export late in the virus life cycle. These results are part of a publication about IAV-induced caspase-dependent enlargement of nuclear pores, promoting nuclear RNP-export. Further work on the regulation of the apoptotic signaling pathway in a permanent cell culture, that is commonly used for IAV-replication, indicates that (i) in IAV-infected MDCK-II-cells the TRAIL-dependent activation of caspase 3 via the extrinsic pathway plays a minor role, but (ii) the intrinsic pathway instead is important for IAV-induced caspase 3-activity and thereby for efficient virus replication. Furthermore, (iii) the regulative role of ERK on the apoptotic signal pathway was investigated. Here I could show for the first time, that in IAV-infected MDCK-II-cells ERK negatively regulates the intrinsic pathway and thereby the caspase 3-activity.

7. Abkürzungsverzeichnis

A (Aminosäure)	Alanin
ActD	Actinomycin D
AEC	Alveolarepithelzellen
Apaf-1	<i>apoptosis protease-activating factor-1</i>
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
BMK-1	<i>Big MAP kinase</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CI	Caspaseinhibitor
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Crm-1	<i>Chromosomal Maintenance-1</i>
cRNA	komplementäre RNA
CytC	Cytochrom C
D (Aminosäure)	Asparaginsäure
Da	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DIABLO	<i>direct IAP binding protein with low pI</i>
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E (Aminosäure)	Glutaminsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FasL	Fas Ligand
FCS	fötales Kälberserum
FFU	<i>foci forming units</i>
FMK	Fluoromethylketon
FPV	<i>fowl plague virus</i>
g	Gramm
G (Aminosäure)	Glycin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde

H (Aminosäure)	Histidin
HA	Hämagglutinin
HEF	<i>Hemagglutinin-esterase-fusion</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
I (Aminosäure)	Isoleucin
IAV	Influenza-A-Virus
IBV	Influenza-B-Virus
ICV	Influenza-C-Virus
ICW	In-Cell-Western Blot
IFN- β	Interferon- β
IgG	Immunglobulin G
IKK	I κ B-Kinase
IV	Influenzavirus
JNK	<i>Jun-N-terminal kinase</i>
K (Aminosäure)	Lysin
L (Aminosäure)	Leucin
LepB	Leptomycin B
mAb	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEM	Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NA	Neuraminidase
NEP/NS2	<i>nuclear export protein/ nonstructural protein 2</i>
NES	nukleäres Exportsignal
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisationsignal

7. Abkürzungsverzeichnis

nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NS1	<i>nonstructural protein 1</i>
Nup	Nukleoporin
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pg	Picogramm
p.i.	<i>post infection</i>
PKC	Proteinkinase C
PKR	Proteinkinase R
pNA	p-Nitroanilin
p.t.	<i>post treatment</i>
Ran	<i>Ras-related nuclear protein</i>
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoproteinkomplexe
rpm	<i>rounds per minute</i>
RSK	<i>90 kDa ribosomal S6 kinase</i>
Smac	<i>second mitochondria derived activator of caspases</i>
T (Aminosäure)	Threonin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TPA	Tetradecanoylphorbol-acetat
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
U0126	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminophenylthio)butadien
V (Aminosäure)	Valin
vRNA	virale Ribonukleinsäure
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
Z	Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Influenza-A-Virions.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Influenza-B-Virions.....	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Influenza-C-Virions.....	4
Abbildung 4: Der Replikationszyklus des Influenzavirus	6
Abbildung 5: Übersicht über den Kernimport- und Kernexportmechanismus	8
Abbildung 6: Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen und NF- κ B in einer Influenzavirus-infizierten Zelle	11
Abbildung 7: Schematische Übersicht über den extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweg	14
Abbildung 8: Übersicht über mögliche Interaktionen von ERK mit dem Apoptosesignalweg	17
Abbildung 9: RNP-Lokalisation in Influenza-A-, B-, C-Virus-infizierten Zellen ohne bzw. mit Caspase 3/7-Inhibitor-Behandlung.....	41
Abbildung 10: RNP-Lokalisation in verschiedenen Influenza-A-Virus-infizierten Zellen ohne bzw. mit Caspase 3/7-Inhibitor-Behandlung.....	43
Abbildung 11: Intrazelluläre Lokalisation von GFP-Multimeren in Influenzavirus- infizierten Zellen ohne bzw. mit Caspase 3/7-Inhibitor-Behandlung.....	44
Abbildung 12: Intrazelluläre Lokalisation von GFP-Multimeren in Actinomycin D- behandelten Zellen ohne bzw. mit Caspase 3/7-Inhibitor-Behandlung.....	47
Abbildung 13: Abhängigkeit des Virustiters von der Zugabe von Leptomycin B.....	48
Abbildung 14: Einfluss der Zugabe von Leptomycin B und Caspase 3/7-Inhibitor zu unterschiedlichen Zeiten p.i. auf den Virustiter	49
Abbildung 15: RNP-Lokalisation in Influenzavirus-infizierten Zellen mit Leptomycin B- Behandlung zu unterschiedlichen Zeitpunkten	50
Abbildung 16: TRAIL-Konzentration in den Überständen und Zelllysaten von infizierten MDCK-II-Zellen	54
Abbildung 17: Relative Caspase 3-Aktivität in MDCK-II-Zellen nach Behandlung mit rekombinatem caninem TRAIL unterschiedlicher Konzentrationen.....	56
Abbildung 18: Einfluss von rekombinatem caninem TRAIL auf den Virustiter in infizierten MDCK-II-Zellen	57

Abbildung 19: Einfluss von Caspase 3, 8, 9-Inhibitoren auf die Caspase 3-Aktivität in infizierten MDCK-II-Zellen	58
Abbildung 20: Einfluss von Caspase 3, 8, 9-Inhibitoren auf den Virustiter in infizierten MDCK-II-Zellen	59
Abbildung 21: Einfluss von Caspase 8- und Caspase 9-Inhibitoren auf die Caspase 9-Aktivität in infizierten MDCK-II-Zellen	60
Abbildung 22: Einfluss der ERK-Aktivität auf die Caspase 3-Aktivität	62
Abbildung 23: Einfluss der ERK-Aktivität auf die Caspase 9-Aktivität	63
Abbildung 24: Einfluss von caninem TRAIL auf die ERK-Aktivität.....	65
Abbildung 25: Einfluss von U0126, Caspase 3-, 8-, 9-Inhibitor, Staurosporin und TPA auf die ERK-Aktivität	66
Abbildung 26: Einfluss von Staurosporin und U0126 auf den Virustiter	67
Abbildung 27: Übersicht über den Anteil des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweges und möglichen Interaktionen von ERK mit dem Apoptosesignalweg in IV-infizierten MDCK-II-Zellen.....	77

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primärantikörper für die Titration mittels Immunhistochemie	33
Tabelle 2: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz.....	33
Tabelle 3: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz	34
Tabelle 4: Primärantikörper für den ICW	37
Tabelle 5: Sekundärantikörper für den ICW.....	37

10. Literaturverzeichnis

- Akarsu, H., Burmeister, W.P., Petosa, C., Petit, I., Muller, C.W., Ruigrok, R.W., and Baudin, F. (2003). Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *The EMBO journal* 22, 4646-4655.
- Betakova, T., Nermut, M.V., and Hay, A.J. (1996). The NB protein is an integral component of the membrane of influenza B virus. *The Journal of general virology* 77 (Pt 11), 2689-2694.
- Braam, J., Ulmanen, I., and Krug, R.M. (1983). Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell* 34, 609-618.
- Briedis, D.J., and Lamb, R.A. (1982). Influenza B virus genome: sequences and structural organization of RNA segment 8 and the mRNAs coding for the NS1 and NS2 proteins. *Journal of virology* 42, 186-193.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of biological chemistry* 257, 7847-7851.
- Chae, H.J., Kang, J.S., Byun, J.O., Han, K.S., Kim, D.U., Oh, S.M., Kim, H.M., Chae, S.W., and Kim, H.R. (2000). Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 42, 373-381.
- Chen, C.J., Chen, G.W., Wang, C.H., Huang, C.H., Wang, Y.C., and Shih, S.R. (2010). Differential localization and function of PB1-F2 derived from different strains of influenza A virus. *Journal of virology* 84, 10051-10062.
- Choi, Y.K., Kim, T.K., Kim, C.J., Lee, J.S., Oh, S.Y., Joo, H.S., Foster, D.N., Hong, K.C., You, S., and Kim, H. (2006). Activation of the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway in swine influenza virus-mediated cell death. *Experimental & molecular medicine* 38, 11-17.
- Chowdhury, I., Tharakan, B., and Bhat, G.K. (2006). Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cellular & molecular biology letters* 11, 506-525.
- Chu, W.M., Ostertag, D., Li, Z.W., Chang, L., Chen, Y., Hu, Y., Williams, B., Perrault, J., and Karin, M. (1999). JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* 11, 721-731.
- Connor, R.J., Kawaoka, Y., Webster, R.G., and Paulson, J.C. (1994). Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 205, 17-23.
- Cros, J.F., and Palese, P. (2003). Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus research* 95, 3-12.

- Dias, A., Bouvier, D., Crepin, T., McCarthy, A.A., Hart, D.J., Baudin, F., Cusack, S., and Ruigrok, R.W. (2009). The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458, 914-918.
- Dong, C., Davis, R.J., and Flavell, R.A. (2002). MAP kinases in the immune response. *Annual review of immunology* 20, 55-72.
- Eccles, R. (2005). Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *The Lancet infectious diseases* 5, 718-725.
- Elton, D., Simpson-Holley, M., Archer, K., Medcalf, L., Hallam, R., McCauley, J., and Digard, P. (2001). Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *Journal of virology* 75, 408-419.
- Faleiro, L., and Lazebnik, Y. (2000). Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *The Journal of cell biology* 151, 951-959.
- Falschlehner, C., Emmerich, C.H., Gerlach, B., and Walczak, H. (2007). TRAIL signalling: decisions between life and death. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 1462-1475.
- Falschlehner, C., Schaefer, U., and Walczak, H. (2009). Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology* 127, 145-154.
- Fischer, U., Janicke, R.U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10, 76-100.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I.W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051-1060.
- Frodin, M., and Gammeltoft, S. (1999). Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Molecular and cellular endocrinology* 151, 65-77.
- Fung, T.S., and Liu, D.X. (2014). Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity. *Frontiers in microbiology* 5, 296.
- Gannage, M., Dormann, D., Albrecht, R., Dengjel, J., Torossi, T., Ramer, P.C., Lee, M., Strowig, T., Arrey, F., Conenello, G., *et al.* (2009). Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell host & microbe* 6, 367-380.
- Garcia-Calvo, M., Peterson, E.P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D.W., and Thornberry, N.A. (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 273, 32608-32613.
- Garcia, M.A., Meurs, E.F., and Esteban, M. (2007). The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* 89, 799-811.
- Ghate, A.A., and Air, G.M. (1999). Influenza type B neuraminidase can replace the function of type A neuraminidase. *Virology* 264, 265-277.
- Ghosh Roy, S., Sadigh, B., Datan, E., Lockshin, R.A., and Zakeri, Z. (2014). Regulation of cell survival and death during Flavivirus infections. *World journal of biological chemistry* 5, 93-105.

- Ghosh, S. (1999). Regulation of inducible gene expression by the transcription factor NF-kappaB. *Immunologic research* 19, 183-189.
- Gillespie, S., Zhang, X.D., and Hersey, P. (2005). Variable expression of protein kinase C epsilon in human melanoma cells regulates sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *Molecular cancer therapeutics* 4, 668-676.
- Gomez-Puertas, P., Albo, C., Perez-Pastrana, E., Vivo, A., and Portela, A. (2000). Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *Journal of virology* 74, 11538-11547.
- Hale, B.G., Randall, R.E., Ortin, J., and Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *The Journal of general virology* 89, 2359-2376.
- Herold, S., Ludwig, S., Pleschka, S., and Wolff, T. (2012). Apoptosis signaling in influenza virus propagation, innate host defense, and lung injury. *J Leukoc Biol.*
- Herold, S., Steinmueller, M., von Wulffen, W., Cakarova, L., Pinto, R., Pleschka, S., Mack, M., Kuziel, W.A., Corazza, N., Brunner, T., *et al.* (2008). Lung epithelial apoptosis in influenza virus pneumonia: the role of macrophage-expressed TNF-related apoptosis-inducing ligand. *The Journal of experimental medicine* 205, 3065-3077.
- Herrler, G., Durkop, I., Becht, H., and Klenk, H.D. (1988). The glycoprotein of influenza C virus is the haemagglutinin, esterase and fusion factor. *The Journal of general virology* 69 (Pt 4), 839-846.
- Herrler, G., and Klenk, H.D. (1987). The surface receptor is a major determinant of the cell tropism of influenza C virus. *Virology* 159, 102-108.
- Herrler, G., Rott, R., Klenk, H.D., Muller, H.P., Shukla, A.K., and Schauer, R. (1985). The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is neuraminidase-O-acetyltransferase. *The EMBO journal* 4, 1503-1506.
- Hiscott, J., Kwon, H., and Genin, P. (2001). Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *The Journal of clinical investigation* 107, 143-151.
- Hogner, K., Wolff, T., Pleschka, S., Plog, S., Gruber, A.D., Kalinke, U., Walmrath, H.D., Bodner, J., Gattenlohner, S., Lewe-Schlosser, P., *et al.* (2013). Macrophage-expressed IFN-beta contributes to apoptotic alveolar epithelial cell injury in severe influenza virus pneumonia. *PLoS pathogens* 9, e1003188.
- Huang, X., Liu, T., Muller, J., Levandowski, R.A., and Ye, Z. (2001). Effect of influenza virus matrix protein and viral RNA on ribonucleoprotein formation and nuclear export. *Virology* 287, 405-416.
- Iwai, A., Shiozaki, T., and Miyazaki, T. (2013). Relevance of signaling molecules for apoptosis induction on influenza A virus replication. *Biochemical and biophysical research communications* 441, 531-537.
- Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annual review of immunology* 18, 621-663.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.

- Kim, J.H., Choi, C., Benveniste, E.N., and Kwon, D. (2008). TRAIL induces MMP-9 expression via ERK activation in human astrocytoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* 377, 195-199.
- Kleeff, J., Kornmann, M., Sawhney, H., and Korc, M. (2000). Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 86, 399-407.
- Kodiha, M., and Stochaj, U. (2012). Nuclear transport: a switch for the oxidative stress-signaling circuit? *Journal of signal transduction* 2012, 208650.
- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., and Rapp, U.R. (1993). Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364, 249-252.
- Kolpashchikov, D.M., Honda, A., and Ishihama, A. (2004). Structure-function relationship of the influenza virus RNA polymerase: primer-binding site on the PB1 subunit. *Biochemistry* 43, 5882-5887.
- Kroemer, G. (2003). Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochemical and biophysical research communications* 304, 433-435.
- Krug, R.M. (1981). Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. *Current topics in microbiology and immunology* 93, 125-149.
- Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E.P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (1998). Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Experimental cell research* 242, 540-547.
- Kujime, K., Hashimoto, S., Gon, Y., Shimizu, K., and Horie, T. (2000). p38 mitogen-activated protein kinase and c-jun-NH2-terminal kinase regulate RANTES production by influenza virus-infected human bronchial epithelial cells. *J Immunol* 164, 3222-3228.
- Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R., and Gorlich, D. (1997). Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 90, 1061-1071.
- Lamb, R.A., and Lai, C.J. (1980). Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* 21, 475-485.
- Lamb, R.A., Lai, C.J., and Choppin, P.W. (1981). Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 4170-4174.
- Lee, D.C., Cheung, C.Y., Law, A.H., Mok, C.K., Peiris, M., and Lau, A.S. (2005). p38 mitogen-activated protein kinase-dependent hyperinduction of tumor necrosis factor alpha expression in response to avian influenza virus H5N1. *Journal of virology* 79, 10147-10154.
- Li, P., Wang, X., Li, N., Kong, H., Guo, Z., Liu, S., and Cao, X. (2006). Anti-apoptotic hPEBP4 silencing promotes TRAIL-induced apoptosis of human ovarian cancer cells by activating ERK and JNK pathways. *International journal of molecular medicine* 18, 505-510.

- Li, X., and Palese, P. (1994). Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *Journal of virology* *68*, 1245-1249.
- Liu, Y.Q., Mu, Z.Q., You, S., Tashiro, S., Onodera, S., and Ikejima, T. (2006). Fas/FasL signaling allows extracellular-signal regulated kinase to regulate cytochrome c release in oridonin-induced apoptotic U937 cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* *29*, 1873-1879.
- Ludwig, S., Pleschka, S., Planz, O., and Wolff, T. (2006). Ringing the alarm bells: signalling and apoptosis in influenza virus infected cells. *Cellular microbiology* *8*, 375-386.
- Ludwig, S., Pleschka, S., and Wolff, T. (1999). A fatal relationship--influenza virus interactions with the host cell. *Viral immunology* *12*, 175-196.
- Ludwig, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Wurzer, W.J., Reinhardt, J., Planz, O., and Pleschka, S. (2004). MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants. *FEBS letters* *561*, 37-43.
- Mandal, R., Raab, M., Matthes, Y., Becker, S., Knecht, R., and Strebhardt, K. (2014). pERK 1/2 inhibit Caspase-8 induced apoptosis in cancer cells by phosphorylating it in a cell cycle specific manner. *Molecular oncology* *8*, 232-249.
- Marjuki, H., Alam, M.I., Ehrhardt, C., Wagner, R., Planz, O., Klenk, H.D., Ludwig, S., and Pleschka, S. (2006). Membrane accumulation of influenza A virus hemagglutinin triggers nuclear export of the viral genome via protein kinase C α -mediated activation of ERK signaling. *The Journal of biological chemistry* *281*, 16707-16715.
- Martin, K., and Helenius, A. (1991). Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *Journal of virology* *65*, 232-244.
- Matlin, K.S., Reggio, H., Helenius, A., and Simons, K. (1981). Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *The Journal of cell biology* *91*, 601-613.
- Mattaj, I.W., and Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annual review of biochemistry* *67*, 265-306.
- Mazur, I., Anhlan, D., Mitzner, D., Wixler, L., Schubert, U., and Ludwig, S. (2008). The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cellular microbiology* *10*, 1140-1152.
- McLean, J.E., Datan, E., Matassov, D., and Zakeri, Z.F. (2009). Lack of Bax prevents influenza A virus-induced apoptosis and causes diminished viral replication. *Journal of virology* *83*, 8233-8246.
- Meng, X.B., Sun, G.B., Wang, M., Sun, J., Qin, M., and Sun, X.B. (2013). P90RSK and Nrf2 Activation via MEK1/2-ERK1/2 Pathways Mediated by Notoginsenoside R2 to Prevent 6-Hydroxydopamine-Induced Apoptotic Death in SH-SY5Y Cells. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* *2013*, 971712.
- Mizumura, K., Hashimoto, S., Maruoka, S., Gon, Y., Kitamura, N., Matsumoto, K., Hayashi, S., Shimizu, K., and Horie, T. (2003). Role of mitogen-activated protein kinases in influenza virus induction of prostaglandin E2 from arachidonic acid in bronchial epithelial cells. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* *33*, 1244-1251.

- Munshi, A., and Ramesh, R. (2013). Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response. *Genes & cancer* 4, 401-408.
- Muraki, Y., Washioka, H., Sugawara, K., Matsuzaki, Y., Takashita, E., and Hongo, S. (2004). Identification of an amino acid residue on influenza C virus M1 protein responsible for formation of the cord-like structures of the virus. *The Journal of general virology* 85, 1885-1893.
- Nakada, S., Creager, R.S., Krystal, M., Aaronson, R.P., and Palese, P. (1984). Influenza C virus hemagglutinin: comparison with influenza A and B virus hemagglutinins. *Journal of virology* 50, 118-124.
- Nakada, S., Graves, P.N., and Palese, P. (1986). The influenza C virus NS gene: evidence for a spliced mRNA and a second NS gene product (NS2 protein). *Virus research* 4, 263-273.
- Nencioni, L., De Chiara, G., Sgarbanti, R., Amatore, D., Aquilano, K., Marcocci, M.E., Serafino, A., Torcia, M., Cozzolino, F., Ciriolo, M.R., *et al.* (2009). Bcl-2 expression and p38MAPK activity in cells infected with influenza A virus: impact on virally induced apoptosis and viral replication. *The Journal of biological chemistry* 284, 16004-16015.
- Neumann, G., Castrucci, M.R., and Kawaoka, Y. (1997). Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *Journal of virology* 71, 9690-9700.
- Neumann, G., Hughes, M.T., and Kawaoka, Y. (2000). Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *The EMBO journal* 19, 6751-6758.
- Nguyen, K.T., Holloway, M.P., and Altura, R.A. (2012). The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *International journal of biochemistry and molecular biology* 3, 137-151.
- Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R.H., and Kawaoka, Y. (2006). Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* 439, 490-492.
- O'Neill, R.E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P., and Moroianu, J. (1995). Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *The Journal of biological chemistry* 270, 22701-22704.
- O'Neill, R.E., Talon, J., and Palese, P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO journal* 17, 288-296.
- Odagiri, T., Hong, J., and Ohara, Y. (1999). The BM2 protein of influenza B virus is synthesized in the late phase of infection and incorporated into virions as a subviral component. *The Journal of general virology* 80 (Pt 10), 2573-2581.
- Ohtsubo, M., Okazaki, H., and Nishimoto, T. (1989). The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *The Journal of cell biology* 109, 1389-1397.

- Olschlager, V., Pleschka, S., Fischer, T., Rziha, H.J., Wurzer, W., Stitz, L., Rapp, U.R., Ludwig, S., and Planz, O. (2004). Lung-specific expression of active Raf kinase results in increased mortality of influenza A virus-infected mice. *Oncogene* 23, 6639-6646.
- Olsen, C.W., Kehren, J.C., Dybdahl-Sissoko, N.R., and Hinshaw, V.S. (1996). bcl-2 alters influenza virus yield, spread, and hemagglutinin glycosylation. *Journal of virology* 70, 663-666.
- Opitz, B., Rejaibi, A., Dauber, B., Eckhard, J., Vinzing, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Suttorp, N., and Wolff, T. (2007). IFN β induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cellular microbiology* 9, 930-938.
- Ortega, J., Martin-Benito, J., Zurcher, T., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L., and Ortin, J. (2000). Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *Journal of virology* 74, 156-163.
- Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.
- Palese, P., and Compans, R.W. (1976). Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *The Journal of general virology* 33, 159-163.
- Paragas, J., Talon, J., O'Neill, R.E., Anderson, D.K., Garcia-Sastre, A., and Palese, P. (2001). Influenza B and C virus NEP (NS2) proteins possess nuclear export activities. *Journal of virology* 75, 7375-7383.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 22, 153-183.
- Pekosz, A., and Lamb, R.A. (1997). The CM2 protein of influenza C virus is an oligomeric integral membrane glycoprotein structurally analogous to influenza A virus M2 and influenza B virus NB proteins. *Virology* 237, 439-451.
- Pinto, L.H., Holsinger, L.J., and Lamb, R.A. (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69, 517-528.
- Pinto, L.H., and Lamb, R.A. (2006). The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *The Journal of biological chemistry* 281, 8997-9000.
- Pinto, R., Herold, S., Cakarova, L., Hoegner, K., Lohmeyer, J., Planz, O., and Pleschka, S. (2011). Inhibition of influenza virus-induced NF-kappaB and Raf/MEK/ERK activation can reduce both virus titers and cytokine expression simultaneously in vitro and in vivo. *Antiviral research* 92, 45-56.
- Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U.R., and Ludwig, S. (2001). Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nature cell biology* 3, 301-305.
- Racaniello, V.R., and Palese, P. (1979). Influenza B virus genome: assignment of viral polypeptides to RNA segments. *Journal of virology* 29, 361-373.

- Rexach, M., and Blobel, G. (1995). Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* 83, 683-692.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H.M., Stewart, M., and Gorlich, D. (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran. *The EMBO journal* 17, 6587-6598.
- Samuel, C.E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clinical microbiology reviews* 14, 778-809, table of contents.
- Schmitt, A.P., and Lamb, R.A. (2005). Influenza virus assembly and budding at the viral budzone. *Advances in virus research* 64, 383-416.
- Shaw, M.L., Palese, P. (2013). Orthomyxoviridae. In *Fields Virology*, J. Goolsby, ed. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 1151-1185.
- Shi, Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein science : a publication of the Protein Society* 13, 1979-1987.
- Shimamura, A., Ballif, B.A., Richards, S.A., and Blenis, J. (2000). Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. *Current biology : CB* 10, 127-135.
- Sieczkarski, S.B., Brown, H.A., and Whittaker, G.R. (2003). Role of protein kinase C beta1 in influenza virus entry via late endosomes. *Journal of virology* 77, 460-469.
- Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual review of biochemistry* 69, 531-569.
- Soderstrom, T.S., Poukkula, M., Holmstrom, T.H., Heiskanen, K.M., and Eriksson, J.E. (2002). Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in activated T cells abrogates TRAIL-induced apoptosis upstream of the mitochondrial amplification loop and caspase-8. *J Immunol* 169, 2851-2860.
- Stegmann, T. (2000). Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic* 1, 598-604.
- Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Toker, A. (1998). Signaling through protein kinase C. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 3, D1134-1147.
- Tran, A.T., Cortens, J.P., Du, Q., Wilkins, J.A., and Coombs, K.M. (2013). Influenza virus induces apoptosis via BAD-mediated mitochondrial dysregulation. *Journal of virology* 87, 1049-1060.
- Tran, S.E., Holmstrom, T.H., Ahonen, M., Kahari, V.M., and Eriksson, J.E. (2001). MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *The Journal of biological chemistry* 276, 16484-16490.
- Vlasak, R., Muster, T., Lauro, A.M., Powers, J.C., and Palese, P. (1989). Influenza C virus esterase: analysis of catalytic site, inhibition, and possible function. *Journal of virology* 63, 2056-2062.

- Walczak, H., and Haas, T.L. (2008). Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex. *Methods Mol Biol* 414, 221-239.
- Wang, X., Tan, J., Zoueva, O., Zhao, J., Ye, Z., and Hewlett, I. (2014). Novel pandemic influenza A (H1N1) virus infection modulates apoptotic pathways that impact its replication in A549 cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 16, 178-186.
- Watanabe, K., Takizawa, N., Katoh, M., Hoshida, K., Kobayashi, N., and Nagata, K. (2001). Inhibition of nuclear export of ribonucleoprotein complexes of influenza virus by leptomycin B. *Virus research* 77, 31-42.
- Waterhouse, N.J., Ricci, J.E., and Green, D.R. (2002). And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie* 84, 113-121.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., and Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological reviews* 56, 152-179.
- Wente, S.R., and Rout, M.P. (2010). The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000562.
- Wisskirchen, C. (2007). Die Rolle der virusinduzierten Caspase3 bei der Desintegration des Kernporenkomplexes in Influenza A Virus infizierten Zellen. In *Fachbereich Biologie (Philipps-Universität Marburg)*, pp. 95.
- Wright, P.F., Neumann, G., Kawaoka, Y. (2013). Orthomyxoviruses. In *Fields Virology*, J. Goolsby, ed. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 1186-1243.
- Wurzer, W.J., Ehrhardt, C., Pleschka, S., Berberich-Siebelt, F., Wolff, T., Walczak, H., Planz, O., and Ludwig, S. (2004). NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *The Journal of biological chemistry* 279, 30931-30937.
- Wurzer, W.J., Planz, O., Ehrhardt, C., Giner, M., Silberzahn, T., Pleschka, S., and Ludwig, S. (2003). Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *The EMBO journal* 22, 2717-2728.
- Xing, Z., Cardona, C.J., Anunciacion, J., Adams, S., and Dao, N. (2010). Roles of the ERK MAPK in the regulation of proinflammatory and apoptotic responses in chicken macrophages infected with H9N2 avian influenza virus. *The Journal of general virology* 91, 343-351.
- Yamashita, M., Krystal, M., and Palese, P. (1988). Evidence that the matrix protein of influenza C virus is coded for by a spliced mRNA. *Journal of virology* 62, 3348-3355.
- Yamashita, M., Krystal, M., and Palese, P. (1989). Comparison of the three large polymerase proteins of influenza A, B, and C viruses. *Virology* 171, 458-466.
- Zhirnov, O.P., Konakova, T.E., Wolff, T., and Klenk, H.D. (2002). NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *Journal of virology* 76, 1617-1625.
- Zhou, J., Law, H.K., Cheung, C.Y., Ng, I.H., Peiris, J.S., and Lau, Y.L. (2006). Functional tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand production by avian influenza virus-infected macrophages. *The Journal of infectious diseases* 193, 945-953.

11. Erklärung zur Dissertation

„ Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehen spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden“

Gießen,

Julia Dzieciolowski

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Stephan Pleschka, bedanke ich mich für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung meiner Doktorarbeit sowie die anregenden Diskussionen und die Begutachtung dieser Arbeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfe im Labor.

Ich bedanke mich bei Dr. Martin Hardt und meinen Kooperationspartnern des SFB TR 84, Herrn PD. Dr. Thorsten Wolff, Frau Kristina Schierhorn, Herrn Dr. Andreas Hocke und Frau PD Dr. Susanne Herold für die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung. Ein großes Dankeschön geht auch an die Arbeitsgruppe Herold besonders Julia, Christin, Jenny und Katrin für die Bereitstellung der hAEC und für die unterhaltsame Zeit auch außerhalb des Labors und auf Konferenzen.

Vielen Dank an meine Kollegen und Freunde für die schöne Zeit und fröhlichen Stunden zusammen.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern, meinen Großeltern, meiner Familie, aber auch Franziska Pfeiffer, Familie Pietschmann und Caroline Roehl für die jahrelangen Unterstützungen und den Beistand in allen Lebenssituationen. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen!