

Charakterisierung der Funktion des SH- Proteins bei der Apoptose-Induktion in Mumpsvirus-infizierten Zellen

Bachelorarbeit

von

Anna Friederike Thrun

angefertigt am Robert Koch-Institut, FG 12 „Virale Infektionen“

Arbeitsgruppe von PD Dr. Annette Mankertz

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie Pharmazie

der Freien Universität Berlin

August 2013

**Die Bachelorarbeit wurde in der Zeit vom 17. Juni 2013 bis 12. August 2013 am
Robert Koch-Institut angefertigt.**

1. Gutachter: PD Dr. Annette Mankertz, Robert Koch-Institut Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Wahl, Freie Universität Berlin

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, d. 12.08.2013

Anna Friederike Thrun

Danksagung

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Reinhard Burger und Prof. Dr. Lars Schaade für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Robert Koch-Institut während der Anfertigung meiner Bachelorarbeit danken. Des Weiteren gilt mein herzlicher Dank Prof. Dr. Markus Wahl für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank geht an PD Dr. Annette Mankertz für das vielschichtige und interessante Thema sowie die kontinuierliche Unterstützung bei der Besprechung und Auswertung der experimentellen Arbeiten. Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Dr. Nicole Friedrich, die stets ein offenes Ohr für mich hatte und mir trotz ihrer knappen Zeit mit ihrem umfangreichen Wissen geduldig zur Seite stand. Vielen Dank für deine tolle Betreuung, Nicole!

Auch bei allen anderen Mitarbeitern des NRZ MMR möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima und die unterhaltsamen Gespräche in den Mittagspausen bedanken. Ganz besonders danke ich Anne für ihre unermüdliche qPCR-Begleitung, Caro für unsere verschwörerischen Lachanfänge, Micha für seine tollen Übersetzungen, Paul für seine bedingungslose Hilfsbereitschaft und sein ausgeglichenes und humorvolles Gemüt, Petra für ihr super Zauberöl und Steffi für ihre stets geduldige und ruhige Art beim Erklären. Ohne euch, die vielen lustigen Momente (Bürsten jeglicher Art...) und die ausgelassene und entspannte Atmosphäre hätte das Arbeiten nur halb so viel Spaß gemacht!!

Bei Dr. J. Jacob, Antje Finke und Prof. Dr. M. Mielke möchte ich mich für die reibungslose Kooperation und die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung des Apoptose-Microarrays bedanken.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Mama, ohne die dieses Studium nicht möglich gewesen wäre und die mich in jeglichen Lebenslagen mit Rat und Tat unterstützt hat.

Meinen Freunden danke ich für ihr offenes Ohr, ihrer Neugierde an meinem Studium und ihre motivierenden Worte am Ende einer Laborwoche.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary	2
3. Einleitung	4
3.1 Mumps – Krankheitsbild und Epidemiologie.....	4
3.1.1 Das Mumpsvirus	5
3.1.1.2 Replikationsmechanismen des Mumpsvirus.....	7
3.1.1.3 Das SH Protein des Mumpsvirus	8
3.2 Apoptose	9
3.2.1 Extrinsischer Signalweg.....	10
3.2.2 Intrinsischer Signalweg	11
4. Zielsetzung	13
5. Material	14
5.1 Chemikalien.....	14
5.2 Enzyme.....	15
5.3 Antikörper	15
5.4 Oligonukleotide (Primer) zur Amplifikation der huRNase P	15
5.5 Marker	16
5.6 Puffer.....	16
5.6.1 Fertige Puffer	16
5.6.2 Angesetzte Puffer	16
5.7 Medium zur Kultivierung eukaryotischer Zellen	17
5.8 Eukaryotische Zelllinien	17
5.9 Viren.....	17

Inhaltsverzeichnis

5.10 Kits	17
5.11 Verbrauchsmaterialien	18
5.12 Geräte.....	18
6. Methoden.....	20
6.1 Zellbiologische Methoden	20
6.1.1 Auftauen von Zelllinien.....	20
6.1.2 Kultivierung von Zelllinien	20
6.1.3 Infektion von eukaryotischen Zelllinien.....	20
6.1.4 Apoptoseinduktion mittels TNF- α und CHX.....	21
6.2 Analyse von Proteinen	21
6.2.1 SDS-PAGE	21
6.2.2 Western Blot	23
6.2.3 Immunfluoreszenzanalyse	25
6.3 Analyse von Nukleinsäuren.....	26
6.3.1 Isolation von RNA	26
6.3.1.1 RNA-Quantifizierung und Qualitätskontrollen	27
6.3.2 Synthese von cDNA.....	27
6.3.3 Polymerase-Kettenreaktion.....	28
6.3.4 Agarosegel-Elektrophorese von DNA.....	29
6.3.5 Quantitatives RT-PCR-Array.....	30
6.3.5.1 Aufbau und Durchführung des RT ² Profiler PCR Array.....	30
6.3.5.2 Datenanalyse mittels komparativer $\Delta\Delta C_T$ -Methode.....	32
6.3.5.3 Qualitätskontrollen des RT ² Profiler PCR Array	33
7. Ergebnisse	35
7.1 Vergleich der Apoptose-Induktion in rMuV-infizierten Vero Zellen.....	35
7.2 Vergleich der Apoptose-Induktion in rMuV-infizierten A549 Zellen.....	37

Inhaltsverzeichnis

7.3 Untersuchung der Genexpression rMuV-SH-C-flag-infizierter A549 Zellen im Vergleich zu uninfizierten A549 Zellen	41
8. Diskussion	46
Abkürzungsverzeichnis.....	52
Anhang	57
Literatur	58

1. Zusammenfassung

Eine Infektion mit der weltweit verbreiteten Kinderkrankheit Mumps kann bei Jugendlichen und Erwachsenen zu schwerwiegenden Komplikationen wie Orchitiden, Meningitiden und Enzephalitiden führen. Der Erreger, das ubiquitär vorkommende Mumpsvirus (MuV), gehört zur Familie der Paramyxoviridae und kodiert unter anderem für ein kleines, hydrophobes Protein (SH-Protein, *small hydrophobic protein*), dessen Funktion bislang nicht genau geklärt ist. Die Expression des Proteins scheint zwar für das Wachstum des Virus *in vitro* nicht essentiell zu sein, allerdings interagiert das SH-Protein mit dem TNF- α -Rezeptor und hemmt die TNF- α -induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B, wodurch eine entscheidende Bedeutung für die Replikation *in vivo* nicht ausgeschlossen ist.

Aufgrund der bisherigen Forschungsergebnisse wird eine anti-apoptotische Eigenschaft des SH-Proteins in Mumpsvirus-infizierten Zellen vermutet, welche in dieser Arbeit weiter untersucht werden sollte. In der Arbeitsgruppe Mankertz wurden bereits die rekombinanten Mumpsviren rMuV-SH-C-flag und rMuV-SH-3stop-C-flag erzeugt, wobei durch Einfügen mehrerer Stopp-Kodons in das SH-Gen bei zuletzt genanntem kein SH-Protein mehr exprimiert wird. Vero und A549 Zellen wurden mit den Viren rMuV-SH-C-flag bzw. rMuV-SH-3stop-C-flag infiziert und mittels Western-Blot-Analysen wurde eine Apoptose-Kinetik anhand der für Apoptose charakteristischen PARP-Spaltung erstellt. Um den Einfluss des Mumpsvirus auf die zellulären Signalwege bei der Apoptose-Induktion infizierter Zellen ermitteln zu können, wurde zusätzlich ein *RT² Profiling PCR Array* durchgeführt, welches die Genexpression während der Apoptose-Induktion quantifiziert.

Western Blot Analysen zeigten in Vero und A549 Zellen eine verzögerte Spaltung des Apoptose-Markers PARP bei rMuV-SH-C-flag-Infektion im Vergleich zu rMuV-SH-3stop-C-flag-infizierten Zellen. Die Apoptose-Induktion Mumps-infizierter Zellen wird folglich durch das SH-Protein inhibiert, was die bereits beschriebene anti-apoptotische Funktion des SH-Proteins weiter unterstützt. Des Weiteren lieferte die Untersuchung der Genexpression rMuV-SH-C-flag-infizierter A549 Zellen eine Hochregulation der Kaspasen-1, -7 und -4, sowie TNF-verwandter Faktoren (TNFSF10, TNFRSF1B, TNF) und BIRC3. Die Hochregulation proapoptotischer Gene in Mumpsvirus-infizierten Zellen belegt somit die Apoptose-induzierenden Eigenschaften des rekombinanten Mumpsvirus und lässt vermuten, dass diese TNF- oder Kaspase-1-vermittelt induziert wird.

Um das Verständnis des Mumpsvirus zu erweitern und neue therapeutische Ansätze entwickeln zu können, ist die Untersuchung der genauen Mechanismen während einer

Infektion essentiell. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei und stellen eine Grundlage für weitere Untersuchungen zur Analyse der Funktion des SH-Proteins bei der Apoptose-Induktion in infizierten Zellen dar.

2. Summary

An infection of the widespread childhood disease mumps can cause serious complications such as orchitis, meningitis, or encephalitis among adolescents and adults. Mumps virus (MuV), the ubiquitous agent of mumps, belongs to the family of Paramyxoviridae and encodes among other proteins a small, hydrophobic protein (SH protein) the function of which is not fully understood. Expression of the SH protein does not appear to be required for virus growth *in vitro*; however, it interacts with the TNF- α receptor and inhibits the TNF- α induced activation of the transcription factor NF κ B. Therefore, the SH protein might have a crucial relevance for the replication *in vivo*.

Due to previous research results an anti-apoptotic characteristic of SH protein in mumps virus infected cells is assumed. In the laboratory of PD Dr. Annette Mankertz two recombinant mumps viruses, rMuV-SH-C-flag and rMuV-SH-3stop-C-flag, were created. By inserting three stop codons in the SH gene, the latter virus cannot express the SH protein. In order to confirm the assumption of an anti-apoptotic feature of the SH protein, different cell lines (Vero and A549) were infected with rMuV-SH-C-flag or rMuV-SH-3stop-C-flag. By applying western blot analyses, apoptosis-kinetics based on the apoptosis specific cleavage of PARP were performed. To analyze the mumps virus' influence on cellular signaling of infected cells an RT² Profiling PCR Array was performed which is used to quantify the gene expression during the induction of apoptosis.

Western blot analyses of rMuV-SH-C-flag infected Vero and A549 cells showed a delayed cleavage of the apoptotic marker protein PARP compared to Vero and A549 cells infected with rMuV-SH-3stop-C-flag. Thus, SH protein inhibits the induction of apoptosis in mumps virus infected cells, which is further evidence for the anti-apoptotic functions of SH that have been reported previously. In addition, gene expression analyses of rMuV-SH-C-flag infected A549 cells delivered an upregulation of caspases-1, -7, and -4, as well as TNF-related factors (TNFSF10, TNFRSF1B, and TNF), and BIRC3. The regulation of apoptosis-related genes in mumps virus infected cells proves the apoptosis inducing features of the recombinant mumps virus and indicates a caspase-1 or TNF linked induction of apoptosis.

Zusammenfassung - Summary

To extend the understanding of the mumps virus and to develop new therapeutic approaches, studying the exact mechanism during an infection is essential. The results of this thesis constitute a basis on which further analyses of the SH protein during the induction of apoptosis in infected cells can be built on.

3. Einleitung

3.1 Mumps – Krankheitsbild und Epidemiologie

Mumps, umgangssprachlich Ziegenpeter genannt, ist eine weltweit verbreitete, typische Kinderkrankheit, die durch das Mumpsvirus verursacht wird. Das durch direkten Kontakt, Tröpfcheninfektion oder durch kontaminierte Infektionsträger übertragene Virus hat eine 15- bis 24-tägige Inkubationszeit [1,2]. Die Erreger infizierter Personen werden bis zu sieben Tage vor und neun Tage nach Ausbruch der Krankheit über Speichel, Samenflüssigkeit und Urin ausgeschieden und können innerhalb der ersten Woche durch isolierte Virus RNA mithilfe einer RT-PCR oder serologisch über die Bestimmung der IgM-Konzentration analysiert werden [1,3].

Obwohl Mumps bei Kindern zwischen fünf und neun Jahren als mild verlaufende und sich selbst begrenzende Krankheit gilt, kann eine Infektion bei Jugendlichen und Erwachsenen zu schwerwiegenden Komplikationen führen [4]. Während ein Drittel aller Fälle asymptomatisch verläuft, tritt bei 95 % der Patienten mit klinischen Symptomen eine schmerzhafte Parotitis auf [5]. Die starke Schwellung der Ohrspeicheldrüsen und die Erhöhung der Körpertemperatur halten ungefähr eine Woche an, wobei das Fieber bei Abklingen der Symptome zurückgeht. Als Folgeerscheinung sind Komplikationen wie Taubheit bekannt [1]. Neben der für Mumps charakteristischen Ohrspeicheldrüsenentzündung erkranken 20 % symptomatischer, postpubertärer Männer an einer uni- oder bilateralen Hodenentzündung (Orchitis) [4]. Die Oophoritis bei weiblichen Patienten (Entzündung der Ovarien) ist hingegen mit einer Wahrscheinlichkeit von 5 % relativ selten [6]. Während der ersten zwölf Wochen einer Schwangerschaft wurde ein um 25 % erhöhtes Risiko für Spontanaborte beobachtet, allerdings konnten fetale Missbildungen bisher nicht mit einer Mumpsinfektion in Verbindung gebracht werden.

Während der systemischen Mumpsinfektion sind die Patienten virämisch. Daher kann das Mumpsvirus in die Gehirn- und Rückenmarkshäute gelangen [7], sodass es in 15 % aller Fälle zu einer aseptischen Meningitis (Entzündung der Hirnhäute) kommt. Bei 4 % der symptomatischen Patienten wurde eine Pankreatitis festgestellt, ein Zusammenhang zwischen der durch Mumps ausgelösten Entzündung der Bauchspeicheldrüse und Diabetes mellitus ist bislang jedoch ungeklärt. Vor Einführung des Impfstoffes galt Mumps als häufigste Ursache für die zu 0,02 – 3 % auftretende Enzephalitis (Hirnentzündung) [6,8].

Eine antivirale Therapie für Mumps gibt es bislang nicht, die auftretenden Schmerzen können allerdings mit Analgetika behandelt werden und einer Infektion kann mit einer Impfung vorgebeugt werden [1].

Mumps erregte erstmals Aufsehen im Militär und in dichtbevölkertem Milieu und galt vor Einführung der kommerziell erhältlichen Impfung im Jahr 1960 mit jährlich 100 bis 1.000 Fällen auf 100.000 Individuen als gängige Infektionskrankheit. In Intervallen von zwei bis fünf Jahren bricht in vielen Ländern eine Mumpsepidemie aus, wobei die Krankheit in gemäßigten Klimazonen vorwiegend im Winter und Frühling auftritt, während sie in Ländern mit heißem Klima dauerhaft vorkommt [1,9].

Der in den USA hergestellte, zwischen 1950 und 1978 gebräuchliche Totimpfstoff mit niedrigem Schutz und kurzzeitiger Immunität wurde durch die Entwicklung verschiedener attenuierter Mumpsvirus-Stämme ersetzt [9]. Weltweit existieren elf Lebendimpfstämme, von denen Jeryl Lynn und Urabe Am9 am häufigsten eingesetzt werden [1]. Der Rubini-Stamm wird aufgrund mangelhaften Impfschutzes auf Empfehlung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) nicht mehr für Routineimpfungen verwendet [10], Leningrad-Zagreb, Leningrad-3 und Urabe wurden in einigen Fällen mit einer aseptischen Meningitis nach Impfung in Verbindung gebracht und sind daher als kontrovers zu betrachten [11-13]. Der Jeryl Lynn-Impfstamm wurde bislang nicht mit aseptischen Meningitiden assoziiert und bietet laut einer amerikanischen Studie einen 95-prozentigen Schutz vor Infektionen [14,15]. Obwohl sich die im Jahr 1971 eingeführte Masern-, Mumps- und Rötelnimpfung (MMR) als sehr effektiv erwiesen hat und in den meisten Industrieländern verwendet wird, kam es in den letzten Jahren vermehrt zu Ausbrüchen in geimpften Populationen [16]. Vor allem im Jahr 2005 in Großbritannien und im Jahr 2006 in den USA sind große Epidemien zu verzeichnen, die nun erneut die Aufmerksamkeit auf die Mumpsforschung ziehen [1].

3.1.1 Das Mumpsvirus

Das Mumpsvirus (MuV) ist der beim Menschen ubiquitär vorkommende Erreger der Krankheit Mumps und gehört zum Genus Rubulavirus der Familie der Paramyxoviridae [7]. Es enthält ein einzelsträngiges, nicht-segmentiertes RNA-Genom aus 15.384 Nukleotiden in Negativstrangorientierung [17], welches für neun Proteine in sieben Transkriptionseinheiten kodiert [18]. Die infektiösen, überwiegend sphärischen, gelegentlich pleiomorphen Virionen haben einen Durchmesser von rund 200 nm [1].

Das Nukleokapsid besteht aus N-Proteinen (Nukleokapsidproteinen), P-Proteinen (Phosphoproteinen), und L-Proteinen (*large*-Proteinen), welche mit dem RNA-Genom

Einleitung

komplexiert und innerhalb des Virions lokalisiert sind. Dieses wird von einer mit dem M-Protein (Matrixprotein) assoziierten Lipiddoppelschicht umgeben, in der die beiden Glykoproteine F (Fusionsprotein) und HN (Hämagglutinin-Neuramidase) eingelagert sind [7]. Die SH- (*small hydrophobic*-Proteine), V- und I-Proteine erfüllen keine strukturellen Aufgaben [18].

Die Gene des Mumpsvirus sind in der Reihenfolge 3'-N-V/P/I-M-F-SH-HN-L-5' angeordnet [19,20], wobei am 3'-Ende eine nicht-kodierende *Leader*-Sequenz transkribiert wird. Am 5' Ende befindet sich eine nicht-transkribierte *Trailer*-Sequenz, welche cis-aktive Initiationssignale zum Start der Polymerasereaktion und zur Verpackung der Nukleokapside in die Viruspartikel beinhaltet. Zwischen den Genen gibt es ein bis sieben Basen lange, nicht-transkribierte Sequenzfolgen. An den Start- und Endpunkten der Gene befindliche konservierte S- und E-Consensus-Sequenzen steigern die Effizienz der Transkription [7]. Abbildung 1 und 2 zeigen die schematische Genomorganisation des Mumpsvirus sowie den Aufbau eines Paramyxoviruspartikels. Zur Charakterisierung der Mumpsviren wurden die unterschiedlichen Stämme anhand der Nukleotidsequenz des SH-Proteins genotypisiert, welches die höchste Variabilität im Genom aufweist [21]. Weltweit sind 12 verschiedene Genotypen (A bis N, ausgeschlossen sind E und M) bekannt [4], die sich zu mindestens 6 % voneinander unterscheiden [22]. Während sich in der westlichen Hemisphäre die Genotypen C, D, E, G und H durchsetzen, dominieren in asiatischen Ländern die Genotypen B, F, I und L [4]. Verschiedene Genotypen können gleichzeitig in einer Region auftreten und die geografische Verteilung ist sehr variabel [23].

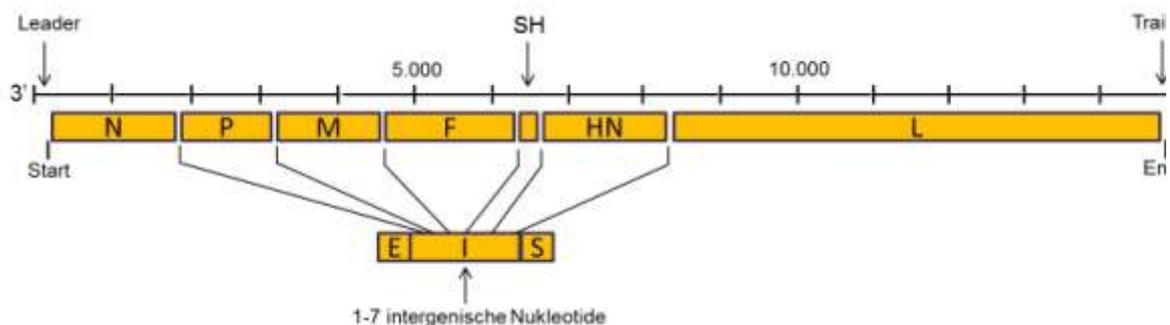


Abb. 1: Schematische Genomorganisation des Mumpsvirus (modifiziert nach [7]).

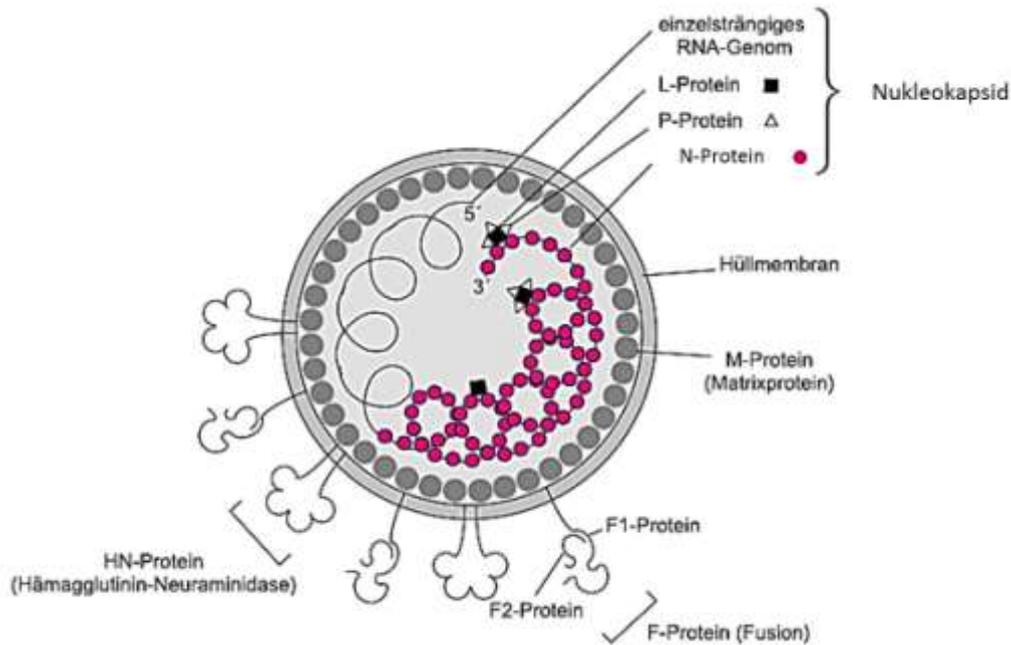


Abb. 2: Aufbau eines Paramyxoviruspartikels (modifiziert nach [7]).

3.1.1.2 Replikationsmechanismen des Mumpsvirus

Durch Tröpfcheninfektion gelangt das Mumpsvirus in die Schleimhäute des Hals-, Nasen- und Rachenraums [7]. Die endständige Sialylsäuren (N-Acetyl-Neuraminsäuren) der dort befindlichen Epithelzell- und Lymphozyten-Membran werden von der Hämagglutinin-Neuramidase HN gebunden, sodass die Viruspartikel an die Wirtszelle adsorbiert werden können [24]. Mithilfe des Fusionsproteins verschmelzen anschließend die Virion- und Zytoplasmamembran, sodass das Nukleokapsid in das Innere der nun infizierten Zelle gelangen kann.

Die Transkription und Translation viraler Proteine findet anschließend im Zytoplasma der Wirtszelle statt. Die Nukleokapsid- und Phosphoproteine N und P sind für die Transkription und Replikation des Virus essentiell. Zu Beginn der mRNA-Synthese bindet das L-Protein als RNA-abhängige RNA-Polymerase an die *Leader*-Sequenz am 3'-Ende. Nachdem eine zur *Leader*-Sequenz komplementäre RNA gebildet ist, wird die Transkription unterbrochen. Die Polymerase bleibt jedoch weiterhin mit dem Genom assoziiert, überspringt nicht-kodierende Nukleotide und transkribiert das erste Gen von der S- bis zur E-Consensusregion. Dieser Vorgang wiederholt sich für jedes der folgenden Gene. Die sieben mRNA-Transkripte werden am 5'-Ende mithilfe der Nukleokapsidproteine gecappt und am 3'-Ende polyadenyliert. Da die Polymerase beim Überspringen der intergenischen Nukleotide gelegentlich abfällt, bildet sich entlang der Transkriptionsrichtung ein mRNA-Gradient aus, wodurch das

Nukleokapsidprotein mit der höchsten und das L-Protein mit der geringsten Konzentration vorliegen.

Die Nichtstrukturproteine V und I können durch RNA-Editing aus der für das P-Protein kodierenden Region transkribiert bzw. translatiert werden.

Für die Bildung eines neuen Virusgenoms muss weiterhin ein durchgängiges, positiv-orientiertes RNA-Molekül synthetisiert werden, welches als Matrize des Virusgenoms dienen kann. Bei ausreichender Menge an N-Proteinen im Zytoplasma bricht die RNA-Polymerase die Transkription an den E- und S-Consensussequenzen nicht ab, sondern liest den Strang kontinuierlich ab. Das gebildete Antigenom ist über seine gesamte Länge mit N-Proteinen assoziiert, welche durch die Interaktion mit der *Leader*-RNA den Transkriptionsstopp an den E-Consensusregionen verhindern. Ein N-Protein bindet an etwa sechs Basen der entstandenen cDNA, das Genom weist also ein Vielfaches von sechs Nukleotiden auf (*rule of six*).

Die simultan translatierten Membranproteine HN und F werden im ER und Golgi-Apparat modifiziert und lagern sich nach dem Transport zur Zelloberfläche in Lipid Rafts in der Zytoplasmamembran ein. Durch Wechselwirkung mit den an der Membraninnenseite befindlichen nicht-glykolysierten Matrixproteinen, die mit dem Nukleokapsid interagieren, stülpt sich die Membran aus. Die Viruspartikel werden abgeschnürt und schließlich durch die Sialinsäuren entfernende Neuramidase-Aktivität des HN-Proteins freigesetzt.

Das Mumpsvirus kann sich über die Lymphknoten hinaus durch das Blut im Organismus verteilen und auf diese Weise auch andere Organe infizieren [7].

3.1.1.3 Das SH Protein des Mumpsvirus

Das SH-Protein ist ein 57 Aminosäuren langes, hydrophobes Typ II Transmembranprotein mit einer Molmasse von ca. 6,5 kDa, dessen Gen zwischen dem F- und dem HN-Gen lokalisiert ist [19,25,26]. Mithilfe von Immunfluoreszenzanalysen konnte das SH-Protein in der ER- und Golgi-Membran MuV-infizierter Zellen detektiert werden, in Virionen war allerdings noch kein Nachweis möglich. Die Funktion des SH-Proteins ist bislang nicht vollständig geklärt, allerdings scheint die Expression des Gens für das Wachstum des Virus nicht essentiell zu sein [27].

Zur Charakterisierung der Eigenschaften des MuV SH-Proteins wurden Vergleiche zu dem verwandten Parainfluenza Virus 5 (PIV5) (ehemals Simian Virus 5, SV5) gezogen. Dieses weist eine identische Reihenfolge der Gene auf und kodiert ebenfalls für ein 44

Aminosäuren langes SH-Protein. Zellen, die mit einem rekombinanten, SH-deletierten Parainfluenza Virus 5 (rPIV5 Δ SH) infiziert wurden, zeigten eine gesteigerte Apoptose-Induktion sowie einen verstärkten zytopathischen Effekt im Vergleich zum Wildtyp [25,28,29]. Durch die Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen TNF- α und den TNF- α -Rezeptor 1 konnte eine durch PIV5 Δ SH induzierte Apoptose verhindert werden, welches einen Einfluss des SH-Proteins auf die TNF- α -vermittelte Apoptose vermuten lässt [30].

Die Fähigkeit Apoptose in infizierten Zellen zu inhibieren ist vorteilhaft für das Virus, da so die Zeit, die zur Replikation genutzt werden kann, verlängert wird. Der genaue Vorgang ist bislang jedoch nicht geklärt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass das MuV SH-Protein mit dem TNF- α -Rezeptor 1 interagiert [26] und sowohl PIV5 SH- als auch MuV SH-Proteine die TNF- α -induzierte Aktivierung von NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) hemmen. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der durch TNF- α aktiviert werden kann, welches als autokrines Zytokin seine eigene Expression beeinflusst. Sobald ein kritischer Wert überschritten ist, wird in Folge die TNF- α -abhängige Apoptose ausgelöst. Das SH-Protein reduziert die Phosphorylierung von NF- κ B an Ser536 und verzögert die Translokation der NF- κ B Untereinheit p65 in den Nukleus, wodurch die Expression NF- κ B-abhängiger Gene wie dem TNF- α -Gen herabreguliert wird [25,31]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MuV SH die Aktivierung der Kinasen IKK α / β hemmt, welche an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt sind [31].

3.2 Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde erstmals 1972 von Kerr, Wyllie und Currie als eine sich morphologisch deutlich abzeichnende Form des Zelltodes beschrieben. Die organisierte, Energie-verbrauchende Eliminierung von Zellen tritt während der Entwicklung, der Alterung und als Abwehrmechanismus des Immunsystems auf, um die zelluläre Homöostase zu erhalten und durch Krankheitserreger oder giftige Agenzien geschädigte Zellen auszuschalten [32,33]. Morphologisch ist die Apoptose durch das Schrumpfen der gesamten Zelle und des Zellkerns (Pyknose), die Kondensation des Chromatins und die Fragmentierung des Nukleus charakterisiert. Die Plasmamembran bleibt bis zu einem späten Stadium der Apoptose erhalten [34]. Im Unterschied zur Nekrose werden die entstehenden Zellfragmente und Bruchstücke nicht in das umgebende Gewebe abgegeben, sondern in sogenannte Apoptosekörperchen verpackt. Diese werden von einer intakten Membran

umschlossen und beinhalten das Zytoplasma sowie dicht gepackte Organellen. Die Asymmetrie der Lipidverteilung in der Membran wird schrittweise aufgehoben, sodass die Phosphatidylserin-Konzentration auf der äußeren Membranoberfläche steigt [35]. Dieses Signal wird von Fresszellen, z.B. Makrophagen, erkannt, die die Apoptosekörperchen schlussendlich phagozytieren [32].

Der koordinierte Prozess des Zelltodes involviert die Aktivierung einer Gruppe von Cystein-Proteasen (Kaspasen), welche eine komplexe, molekulare Kaskade initiieren. Kaspasen (*cysteiny-l-aspartate specific protease*) sind weitgehend als inaktive Proenzyme (Zymogene) exprimiert und werden in drei Klassen eingeteilt: die Initiator-Kaspasen (2, 8, 9, 10), die Effektor-Kaspasen (3, 6, 7) und die inflammatorischen Kaspasen (1, 4, 5, 12) [36]. Nach Aktivierung können sie mithilfe ihrer proteolytischen Aktivität Proteine an Asparaginsäure-Resten schneiden [37]. Apoptose kann über drei Signalwege ausgelöst werden (extrinsisch, intrinsisch und Perforin/Granzym-vermittelt), die jeweils mit der Aktivierung der Effektor-Kaspase-3 enden (*execution phase*). Dadurch werden die chromosomale DNA fragmentiert, das Zytoskelett und nukleäre Proteine degradiert und Liganden für Phagozytose-Rezeptoren exprimiert [32].

Als Nachweis der Apoptose dient unter anderem die Spaltung des nukleären Proteins Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), welches an der DNA-Reparatur, -Replikation und der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist [38]. Während der Apoptose wird das 113 kDa große Molekül durch die Kaspase-3 proteolytisch in ein 89 kDa- und ein 24 kDa-Fragment gespalten [39]. Diese Fragmente verbleiben nach Initiation des Signalweges für einige Tage in der apoptotischen Zelle und werden dort nicht weiter proteolytisch prozessiert [40].

3.2.1 Extrinsischer Signalweg

Der extrinsische Signalweg wird durch spezielle Immunzellen, z.B. Natürliche Killerzellen (NK), induziert und tritt hauptsächlich zur Eliminierung infizierter oder beschädigter Zellen auf. Natürliche Killerzellen produzieren diverse zytotoxische Faktoren der Tumornekrose (TNF)-Superfamilie, die auf ihrer Zelloberfläche exprimiert oder extrazellulär freigesetzt werden. Diese können anschließend an eine Cystein-reiche Domäne der Todesrezeptoren in der Membran der Zielzellen binden und somit die Signalkaskade aktivieren [34]. Die Bindung der homologen Liganden bewirkt eine Trimerisierung der Rezeptoren, an deren intrazellulärer Todesdomäne zytoplasmatische Adapterproteine binden können.

Zu den am besten charakterisierten pro-apoptotischen Liganden und den entsprechenden Todesrezeptoren gehören der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und der Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) sowie der Fas (*Fatty acid synthetase*) Ligand (FasL) und der Fas Rezeptor (FasR). Bei Bindung des FasL an den FasR wird das Adapterprotein FADD (*Fas-associated death domain*) rekrutiert, wohingegen TNF- α die Bindung des Adapterproteins TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) mit anschließender Assoziation von FADD und RIP (*receptor-interacting protein*) initiiert [41,42]. Durch die Dimerisierung der Todeseffektor-Domäne kann FADD an die Prokaspase-8 binden, wodurch der gebildete Komplex DISC (*death-inducing signaling complex*) die autokatalytische Aktivierung der Prokaspase-8 bewirkt [43]. Die Initiator-Kaspase-8 kann schließlich durch proteolytische Spaltung die Effektor-Kaspase-3 anregen [34]. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung des extrinsischen Signalweges.

3.2.2 Intrinsischer Signalweg

Der intrinsische Signalweg involviert eine Reihe nicht-Rezeptor-vermittelter Stimuli (u.a. Toxine, oxidativer Stress, DNA-Schäden) [44], welche intrazelluläre Signale produzieren, die zur Veränderung der inneren Mitochondrien-Membran führen. Dadurch gelangen pro-apoptotische Proteine wie Cytochrom c vom Intermembranraum des Mitochondriums in das Zytosol [45]. Cytochrom c bildet anschließend das sogenannte Apoptosom mit dem Adaptermolekül Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*), dATP und der Prokaspase-9, welche durch die Komplexierung aktiviert wird und die Effektor-Kaspase-3 zur autokatalytischen Proteolyse anregt [46]. Abbildung 3 zeigt eine schematische Übersicht des intrinsischen Signalweges.

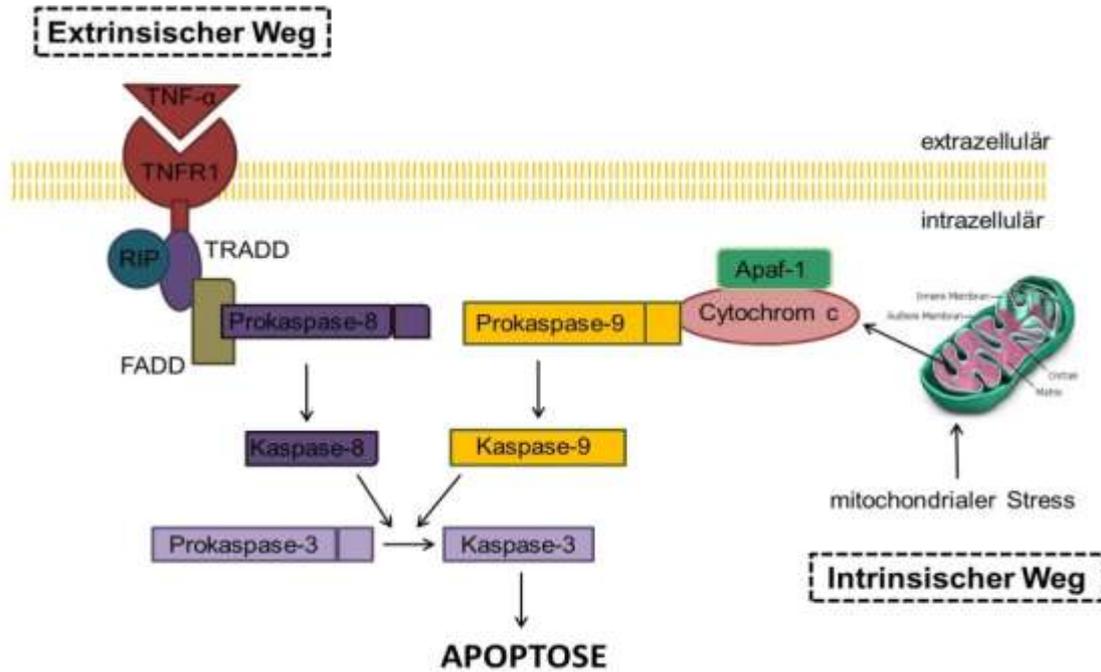


Abb. 3: Schematische Übersicht der Signalkaskade des extrinsischen Weges am Beispiel von TNF- α und intrinsischen Weges zur Induktion von Apoptose.

Extrinsischer Signalweg: Die Bindung von TNF- α führt zur Trimerisierung des TNFR 1, wodurch an dessen Todesdomäne das Adapterprotein TRADD assoziiert werden kann. Die rekrutierten Proteine RIP, FADD und Prokaspase-8 bewirken die autokatalytische Prozessierung der Prokaspase-8. Intrinsischer Signalweg: Mitochondrialer Stress führt u.a. zur Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol. Durch Assoziation von Apaf-1, der Prokaspase-9 und dATP wird Prokaspase-9 aktiviert. Die Initiator-Kapsasen-8 oder -9 bewirken die Prozessierung der Effektor-Kaspase-3.

4. Zielsetzung

Das von Mumpsviren exprimierte SH-Protein ist ein 6,5 kDa großes, hydrophobes Transmembranprotein, dessen Funktion während der Apoptose-Induktion MuV-infizierter Zellen nicht vollständig geklärt ist. Aufgrund der Wechselwirkung von einzeln exprimiertem SH-Protein mit dem TNF- α -Rezeptor 1 und der Hemmung der TNF- α -induzierten Aktivierung von NF- κ B wird angenommen, dass das SH-Protein in die TNF- α -vermittelte Apoptose eingreift und die Induktion des Zelltodes in MuV-infizierten Zellen verzögert [26,31].

Wird Apoptose in infizierten Zellen durch ein Virus inhibiert, verlängert sich die Zeit, in der die Replikation des Virus stattfinden kann. Um den Einfluss des SH-Proteins bei einer Infektion besser untersuchen zu können, wurden in der Arbeitsgruppe Mankertz die rekombinanten Mumpsviren rMuV-SH-C-flag und rMuV-SH-3stop-C-flag kloniert [47]. Durch Einfügen mehrerer Stopp-Kodons in das SH-Gen wird bei zuletzt genanntem die Expression des SH-Proteins verhindert. Zur Analyse einer potentiell anti-apoptotischen Eigenschaft des SH-Proteins während einer Infektion sollten Vero Zellen, die routinemäßig zur Untersuchung von MuV-Infektionen verwendet werden, mit den rekombinanten Viren infiziert werden. Mittels Western Blot sollte anschließend der zeitliche Verlauf der Apoptose durch Analyse der PARP-Spaltung untersucht werden.

Um weitere Informationen auf den Einflusspunkt des SH-Proteins auf den Apoptose-Signalweg zu erhalten, sollte zusätzlich die mRNA-Expression Apoptose-relevanter Gene mithilfe eines *RT²-Profiling PCR Array* (Qiagen) untersucht werden. Da diese Platten nur für bestimmte Spezies zur Verfügung stehen, sollte die Apoptose-Kinetik mittels PARP-Spaltung zusätzlich in den humanen A549 Zellen durchgeführt werden. Anhand dieser Ergebnisse sollte der bestmögliche Zeitpunkt der RNA-Isolation bestimmt werden. Es sollte zunächst der allgemeine Einfluss des Mumpsvirus auf die Mechanismen rMuV-infizierter Zellen analysiert werden, sodass in folgenden Untersuchungen der genaue Einflusspunkt des SH-Proteins spezifiziert werden kann. Mithilfe des Apoptose-Microarrays sollte dafür in dieser Arbeit die Genexpression nicht-infizierter und rMuV-SH-C-flag-infizierter A549 Zellen verglichen werden.

5. Material

5.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	Sigma-Aldrich (USA)
Agarose	Invitrogen (Invitrogen)
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich (USA)
Albumin Fraktion V, proteasefrei	Roth (D)
Bidestilliertes Wasser	Fluka, Basel (CH)
Cycloheximid (CHX)	Sigma, Saint-Louis (USA)
Ethanol	Pan Biotech (D)
FKS (Fetales Kälberserum)	Pan Biotech (D)
GelRed	Biotium (USA)
Glycin	Roth (D)
Humanes TNF- α (Tumornekrosefaktor α)	PromoCell (D)
Isopropanol	Roth (D)
L- Glutamin	Invitrogen (USA)
Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Substrate	Roche (D)
Luminata Forte Western HRP Substrate	Merck Millipore (USA)
Magermilchpulver	SUCOFiN (D)
Methanol	Roth (D)
Paraformaldehyd (PFA)	Electron Microscopy Sciences (USA)
Penicillin/Streptomycin	Gibco life technologies (D)
ProLong® Gold Antifade	Invitrogen (USA)
Restore TM Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific (USA)
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich (USA)
TEMED (N,N,N',N Tetramethylethylendiamin)	Roth (D)
TRIS (Trihydroxymethylendiamin)	Roth (D)
TritonX-100	Merck (D)

5.2 Enzyme

Benzonase Nuclease	Novagen (USA)
DNase (RNase-frei)	Qiagen (D)
HotStart DNA <i>Taq Polymerase</i>	Qiagen (D)
RT-PCR Enzym-Mix	Qiagen (D)
Trypsin EDTA	PAA (A)

5.3 Antikörper

anti - β Aktin (monoklonal aus der Maus)	Sigma-Aldrich (USA)
anti - Flag (monoklonal aus der Maus)	Sigma-Aldrich (USA)
anti - Kaninchen IgG POD-konjugiert (polyklonal aus der Ziege)	Dianova (D)
anti – Maus Cy2-konjugiert	Dianova (D)
anti - Maus IgG POD-konjugiert (aus dem Kaninchen)	Dianova (D)
anti - N (monoklonal aus der Maus)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA)
anti - PARP (monoklonal aus dem Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Inc. (USA)
Maus IgG	Dianova (D)

5.4 Oligonukleotide (Primer) zur Amplifikation der huRNase P

3434 (for)	5' AGATTTGGACCTGCGAGCG 3'
3435 (rev)	5' GAGCGGCTGTCTCCACAAGT 3'

5.5 Marker

Hyper Ladder II	Bioline (UK)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (USA)

5.6 Puffer

5.6.1 Fertige Puffer

Gel Pilot DANN Loading Dye (5x)	Qiagen (D)
Roti Load I	Roth (D)
TAE (50x)	Roth (D)

5.6.2 Angesetzte Puffer

Blockpuffer I (Western Blot)	5 % Magermilchpulver in PBS-T _{0,05}
Blockpuffer II (Western Blot)	5 % BSA in PBS-T _{0,01}
Blockpuffer III (Western Blot)	0,5 % Magermilchpulver in PBS-T _{0,05}
Blockpuffer IV (IFA)	1 % BSA in PBS-T _{0,05}
PBS	140 mM NaCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 2 mM KH ₂ PO ₄ ; 2 mM KCl in H ₂ O; pH 7,2
PBS-Tween (0,05%)	0,05 % Tween 20 in PBS
Sammelgelpuffer (SDS PAGE)	1 M Tris pH 6,8 (HCl) in H ₂ O 0,25 M Tris
SDS-Laufpuffer (SDS PAGE)	2 M Glycin 1 % SDS in H ₂ O
Trenngelpuffer(SDS PAGE)	1,5 M Tris pH 8,8 (HCl) in H ₂ O
Transferpuffer (Western Blot)	3 Teile Laufpuffer, 5 Teile H ₂ O, 1 Teil Methanol

5.7 Medium zur Kultivierung eukaryotischer Zellen

Medium	Komponenten	Zusätze
DMEM	37 g NaHCO ₃ , DMEM Pulver (Gibco™, UK) für 10 l; ad H ₂ O; pH 7,2 (HCl)	10 % FKS 1 % (v/v) Glutamin 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin Lösung (entspricht 0,1 U/ml Penicillin und 0,1 µg/ml Streptomycin)

5.8 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Organ	Medium
VERO	Grüne Meerkatze	Niere	DMEM
A549	Mensch	Lunge	DMEM

5.9 Viren

rMuV-SH-C-flag	hergestellt durch Stephanie Franz
rMuV-SH-3stop-C-flag	hergestellt durch Stephanie Franz

5.10 Kits

RNase-freies DNase Set	Qiagen (D)
RNeasy Mini Kit (total RNA)	Qiagen (D)
RT ² First Strand Kit	Qiagen (D)
RT ² Profiler™ PCR Array	Qiagen (D)

5.11 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Thermo Scientific (USA)
Einweg-Reaktionsgefäße (15 ml und 50 ml)	TPP (CH)
Einweg-Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Nunc (DK)
Gel-Blotting Paper	Whatman™
Glaspipetten	Brand (D), Hirschmann (D)
Glaswaren	Schott (D)
Handschuhe	Roth (D)
Immobilon®-P PVDF Transfer Membrane	Merck Millipore (USA)
Kanülen	Braun (D)
Lumi-Film Chemoluminescent Detection Film	Roche (D)
Objektträger	Roth (D)
Pipettenspitzen	Thermo Scientific (USA)
Platten (6-Loch, 24-Loch, 48-Loch und 96-Loch)	Costar (USA), TPP (CH)

5.12 Geräte

ABI 7500 (Thermocycler)	ABI
AGFA Curix 60 Entwicklungsmaschine	AGFA (D)
Blottapparatur (Trans-Blot Semi Dry)	Bio-Rad (USA)
Brutschrank (CO ₂ Inkubator)	Binder (D)
Durchlichtmikroskop	Nikon (J), Zeiss (D)
Einfrierbox	neoLab (D)
Eismaschine	Scotsman
Feinwaage	Sartorius (D)
Gefrierschränke	AEG (D), Liebherr (D), Bosch (D)
Gelelektrophoresekammer (Agarosegel)	Biometra (D)

Material

Gelelektrophoresekammer (SDS-PAGE)	GE Healthcare (UK)
Horizontalschüttler	Roth (D)
konfokales Laserscanmikroskop LSM 780	Zeiss (D)
Kühlschränke	Bosch (D)
Magnetrührer	Heidolph (D)
Nanodrop ND-8000	PEQLAB (D)
Pipetboy	Integra Bioscience (D)
Spannungsgeräte	Biometra (D)
Sterilbank	Thermo Scientific (USA)
Stoppuhr	Roth (D)
Thermoblock	Eppendorf (D)
Thermocycler TPersonal	Biometra (D)
Tischzentrifugen	Eppendorf (D)
Vakuumpumpe Vacusafe comfort	Integra Bioscience (D)
Vortexer Genius 3	IKA (D)
Wasserbad	Haake

6. Methoden

6.1 Zellbiologische Methoden

6.1.1 Auftauen von Zelllinien

Um bei -150°C gelagerte Zellen in Kultur zu bringen, wurde ein eingefrorenes Aliquot aufgetaut und in ein Greiner-Röhrchen überführt, in dem 4 ml 37°C -temperiertes Medium vorlagen. Die Zellen wurden anschließend fünf Minuten bei 1.200 rpm und RT zentrifugiert, sodass der Überstand mit dem Einfriermedium verworfen und das Zellpellet in 7 ml frischem Medium aufgenommen werden konnte. Die resuspendierten Zellen wurden in eine 75 cm^2 -Zellflasche überführt und bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank der Firma Binder inkubiert bis die adhärenen Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten.

6.1.2 Kultivierung von Zelllinien

Sobald eine vollständige Konfluenz des Zellrasens erreicht wurde, wurden die Zellen vereinzelt und umgesetzt. Nach Abnahme des Kulturmediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um Trypsin-inaktivierende Mediumreste und tote Zellen zu entfernen und anschließend mit 0,5 - 1 ml Trypsin/ EDTA bei 37°C inkubiert. Die sich nach fünf bis zehn Minuten vom Boden der Zellkultur-Flasche lösenden Zellen wurden in 9,5 ml frischem Medium resuspendiert. Vero und A549 Zellen wurden zweimal pro Woche mit einer Verdünnung von 1:10 bis 1:15 passagiert.

Für die Durchführung der Versuche wurden die Zellen in entsprechenden Verdünnungen in verschiedene Zellkulturgefäße ausgesät.

6.1.3 Infektion von eukaryotischen Zelllinien

Zur Untersuchung des Einflusses viraler Proteine bei einer Infektion können Zellen mit rekombinanten Mumpsviren infiziert werden. Für die Durchführung der Infektion wurden Vero und A549 Zellen in einer entsprechenden Verdünnung in einer 24- oder 6-Lochplatte ausgesät, sodass mit einer Konfluenz von 60 – 65 % gearbeitet werden konnte. Um im überstehenden Medium enthaltene tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Zellen direkt vor der Infektion zweimal mit PBS gewaschen. Zur

Herstellung der Viruslösung wurden die bei -80 °C gelagerten Aliquots (rMuV-SH-C-flag und rMuV-SH-3stop-C-flag) aufgetaut und entsprechend der erforderlichen MOI mit serumfreiem Medium verdünnt. Die MOI, *multiplicity of infection*, bezeichnet das zahlenmäßige Verhältnis der Viruspartikel zu den Zielzellen und wurde in Abhängigkeit der zu infizierenden Zelllinie und des Versuchziels variiert. Eine MOI von 1 bedeutet, dass ein Virus auf eine Zelle eingesetzt wird. Für Vero und A549 Zellen wurde eine MOI von 0,01 gewählt, das heißt ein Virus auf 100 Zellen. Zellen in einer 24-Lochplatte bzw. 6-Lochplatte wurden mit jeweils 200 µl bzw. 1000 µl der hergestellten Viruslösung für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, wobei die Platte alle 10 bis 20 Minuten geschwenkt wurde, um eine gleichmäßig über den Zellrasen verteilte Infektion zu erzielen. Anschließend wurde die Viruslösung abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 bzw. 2 ml serumhaltigem Kulturmedium überdeckt. Bis zur Probenahme wurden die Zellen im 37 °C-temperierten Brutschrank inkubiert. Die Proben wurden entsprechend Abschnitt 6.2.1 für das SDS-Gel lysiert.

6.1.4 Apoptoseinduktion mittels TNF- α und CHX

Zur Untersuchung des zeitlichen Apoptoseverlaufs mittels PARP-Abbau in infizierten Zellen wurden nicht-infizierte Zellen als Positivkontrolle mit Apoptosestimuli behandelt. Der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) ist ein multifunktionales Cytokin des Immunsystems, welches Apoptose auslösen kann. Cycloheximid (CHX) wirkt zusätzlich als Translationshemmer und inhibiert folglich die Proteinbiosynthese. Indem humanes TNF- α in einer Konzentration von 200 pg/ μ l und CHX in einer Konzentration von 25 fg/ μ l eingesetzt werden, kann Apoptose ausgelöst werden [48]. Die Proben wurden entsprechend Kapitel 6.2.1 in Abhängigkeit der Zelllinie nach 24 h bis 72 h nach Stimulation genommen [49].

6.2 Analyse von Proteinen

6.2.1 SDS-PAGE

Mithilfe der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) können Proteingemische in einem elektrischen Feld anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Als Trägermaterial wird Polyacrylamid verwendet, welches durch eine radikalische Reaktion von Acrylamid und N, N'-Methylenbisacrylamid entsteht. Die Polymerisation wird durch APS (Ammoniumperoxosulfat) gestartet und mittels TEMED

(N, N, N', N'- Tetramethyldiamin) katalysiert. Die zu analysierenden Proben werden in einem SDS- und Reduktionsmittel-haltigen Puffer für fünf Minuten bei 95 °C aufgeköcht, was zum Aufspalten der Wasserstoffbrückenbindungen und Disulfidbrücken führt. Das Detergens SDS lagert sich als Micelle um die denaturierten Proteine, wobei die umgebende negative Ladung proportional zur Molekülgröße ist. Durch den Verlust ihrer Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur können die Proteine anhand der Kettenlänge aufgetrennt werden. Die einheitlich negativ geladenen Proteine wandern bei Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode, wobei die kleinen Moleküle das engmaschige Netz schnell passieren, während große Proteine aufgrund der Reptationstheorie und des Ogston Siebeffekts in den Poren zurückgehalten werden. Durch den Einsatz eines Markers bekannter Größe können nach der Auftrennung die apparenten Massen der Proteine bestimmt werden.

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli mit einem 12%igen diskontinuierlichen Gel durchgeführt, wobei die Zusammensetzung Tabelle 1 entnommen werden kann. Um die Banden zu schärfen, wurde für die Elektrophorese ein Gel bestehend aus einem Trenn- und einem Sammelgel verwendet. Nach einer Aufkonzentrierung der Proteine im oberen grobmaschigen Sammelgel (pH 6,8) werden sie bei Erreichen des kleinporigen Trenngels (pH 8,8) nach ihrer Größe getrennt.

Die Trenngel-Lösung wurde zwischen zwei durch Abstandshalter getrennte abgedichtete Glasplatten pipettiert und zur Vermeidung einer uneinheitlichen Trennschicht mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol mithilfe von Filterpapier entfernt und mit der Sammelgel-Lösung überschichtet. Die zur Probenauftragung notwendigen Taschen wurden durch Einsetzen eines geeigneten Elektrophoresekamms geschaffen.

Die infizierten Zellen und Kontrollen wurden mithilfe einer 1000 µl Pipettenspitze in das überstehende Medium einer 24-Lochplatte abgekratzt und in ein Greiner-Röhrchen überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1.200 rpm und RT konnte der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl SDS- und Mercaptoethanol-haltigem 1x *RotiLoad1* (Roth) resuspendiert werden. Nach Zugabe von 12,5 U der Nuklease Benzonase zum Abbau der Nukleinsäuren (DNA und RNA) wurden die Zelllysate für fünf Minuten bei 95 °C aufgeköcht und anschließend zentrifugiert.

Zur Taschenbeladung wurden jeweils 20 µl der Lysate und 4 µl des Proteinmarkers *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas) eingesetzt. Freibleibende Taschen wurden mit 1x *RotiLoad1* befüllt. Die Gelelektrophorese wurde durch das Anlegen einer Spannung von 90 V gestartet, welche mit Eintritt der Proteine in das Trenngel auf 120 V erhöht wurde. Sobald die Lauffront das Ende des Polyacrylamidgels erreichte, wurde der Gellauf beendet.

Tab.1: Zusammensetzung für zwei Ansätze von Trenn- und Sammelgel.

Reagenz	Trenngel (12 %)	Sammelgel (5%)
Trenngelpuffer	3,75 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
Bidestilliertes Wasser	5,1 ml	6,85 ml
Acrylamid (30 %)	6 ml	1,65 ml
SDS (10 %)	150 µl	100 µl
TEMED	20 µl	20 µl
APS (10 %)	75 µl	60 µl

6.2.2 Western Blot

Die mithilfe der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können mittels eines Western Blots für weitere Analysen zugänglich gemacht werden. Der Western Blot bezeichnet den Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran durch ein senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichtetes elektrisches Feld. Die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe wandern in Richtung der Anode, wobei die Proteine aufgrund hydrophober und ionischer Wechselwirkungen auf der Membran haften bleiben, während die SDS Moleküle hinausdiffundieren. Auf diese Weise können die Proteine selektiv durch die Bindung Epitop-spezifischer Primärantikörper detektiert werden. An den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet ein Sekundärantikörper, der mit dem Reporterenzym Peroxidase (POD) gekoppelt ist, welche die Reduktion von Peroxiden in der Detektionslösung katalysiert. Das Substrat Luminol reagiert anschließend mit den dabei freigesetzten Protonen unter Entwicklung von Chemolumineszenz, welche durch unterschiedlich langes Auflegen eines Röntgenfilms erfasst werden kann.

Für die Versuche dieser Arbeit wurde der Proteintransfer mithilfe eines *Semidry-Blot-Systems* durchgeführt. Die Trägermembran Polyvinylidenfluorid (PVDF) wurde durch eine 15-sekündige Inkubation in Methanol aktiviert und anschließend mit bidestilliertem Wasser gespült. Die Membran, die zwei Filterpapiere und das Trenngel des Polyacrylamidgels wurden fünf Minuten in Transferpuffer equilibriert und anschließend wie folgt von unten nach oben geschichtet: Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier. Zur Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Membran wurde für 35 Minuten ein elektrisches Feld von 1 mA pro cm² angelegt. Um die Bindung hydrophober Proteine zu verstärken, wurde die Membran nach dem Blotten kurz an der Luft getrocknet und anschließend erneut 15 Sekunden in Methanol inkubiert und mit dH₂O gespült.

Methoden

Zur Gewährleistung einer spezifischen Detektion wurden nach dem Transfer der Proteine für eine Stunde und RT mittels Blockpuffer I freie und unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Die Proteine wurden nach dem Blocken mit in Blockpuffer II oder III verdünnten Primärantikörpern aus der Maus oder dem Kaninchen markiert, wobei die Membran bei 4 °C über Nacht oder für ein bis drei Stunden bei RT inkubiert wurde. Die entsprechenden Verdünnungen sind Tabelle 2 zu entnehmen. Zur Entfernung überschüssiger Primärantikörper wurde die Membran dreimal fünf Minuten mit PBS-T_{0.05} oder PBS-T_{0.1} gewaschen und anschließend für eine Stunde bei RT mit in Blockpuffer III verdünntem, POD-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:5000) aus dem Kaninchen oder der Ziege inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T_{0.05} oder PBS-T_{0.1} und zweimaligem Waschen mit PBS für fünf Minuten erfolgte die Detektion mittels *Lumi-Light^{PLUS}* (Roche) oder bei schwächeren Signalen mithilfe von *Luminata Forte Western HRP Substrate* (Millipore). Bei Verwendung von *Lumi-Light^{PLUS}* wurden jeweils 500 µl der *Luminol/Enhancer*- und *Stable Peroxide Solution* gemischt und die Membran für eine Minute mit der Lösung benetzt. Die Inkubation mit dem gebrauchsfertigen Detektionsreagenz *Luminata Forte Western HRP Substrate* erfolgte für fünf Minuten.

Zur Aufnahme des Chemolumineszenz-Signals wurden *Lumi-Film Chemoluminescent*-Detektionsfilme (Roche) verwendet, welche in Abhängigkeit der Stärke des Signals zwischen 10 Sekunden und mehreren Tagen aufgelegt wurden. Die anschließende Entwicklung erfolgte mithilfe einer AGFA Curix 60 Entwicklungsmaschine.

Um eine Membran mit weiteren Antikörpern zu färben, wurde nach der Detektion die Membran dreimal für fünf Minuten in PBS-T_{0.05} gewaschen und mit 10 ml *RestoreTM Western Blot Stripping Buffer* (Thermo Scientific) für 20-30 Minuten inkubiert. Nach Wiederholung des Waschschriffs wurde die Membran erneut geblockt und wie beschrieben mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert.

Tab. 2: Zusammenstellung der Verdünnungen und Inkubationszeiten der Primärantikörper.

Primärantikörper	Verdünnung	Inkubationszeit
anti - β Aktin	1:5000 in Blockpuffer III	ÜN bei 4 °C
anti - flag	1:1000 in Blockpuffer III	3 h bei RT
anti - PARP	1:1000 in Blockpuffer II	ÜN bei 4 °C
anti - NP	1:200 in Blockpuffer III	2 h bei RT

6.2.3 Immunfluoreszenzanalyse

Zum Nachweis von Proteinen kann neben dem Western Blot die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden. Das Prinzip beruht auf einer spezifischen Färbung mittels Antikörpern, deren gekoppelte Fluorophore mit einer ihrem Absorptionsmaximum entsprechenden Wellenlänge angeregt werden. Das emittierte Licht kann anschließend im konfokalen Laserscanmikroskop (cLSM) detektiert werden, was eine Lokalisation der Proteine ermöglicht.

Für die Immunfluoreszenzanalyse (IFA) wurden Zellen auf Deckgläschen in einer 24-Lochplatte ausgesät und entsprechend Abschnitt 6.1.3 mit rMuV infiziert. 48 Stunden nach Infektion wurde das überstehende Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Durch eine 20-minütige Inkubation mit 300 µl 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) je Vertiefung wurden die Zellen fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 300 µl TritonX-100 in PBS (0,1 %) pro Vertiefung permeabilisiert und anschließend mit PBS-T_{0,05} gewaschen. Um freie und unspezifische Bindungen abzusättigen wurden die Zellen für eine Stunde mit BSA-haltigem Blockpuffer IV inkubiert.

Zur Färbung des viralen Proteins NP wurde der spezifische Primärantikörper aus der Maus (anti-NP) mit Fluorophor-gekoppelten Fab-Fragmenten konjugiert. Pro Vertiefung wurden 150 µl Antikörper-Lösung angesetzt. Dafür wurden 20 µl PBS in einem Eppendorf-Gefäß vorgelegt und für jeden Ansatz mit 3 µl Cy2-markierten Fab-Fragmenten gemischt und der Primärantikörper (anti-NP) so hinzugegeben, dass die Endkonzentration im fertigen Ansatz 1:200 betrug. Bei einem Antikörperansatz für 8 Vertiefungen bedeutet dies, dass zu 20 µl PBS 24 µl Cy2-markiertes Fab-Fragment und 6 µl des Primärantikörpers pipettiert werden. Dieser Ansatz wurde 20 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend zum Abfangen ungebundener Fab-Fragmente mit 1,5 µl unspezifischem Maus-IgG pro Vertiefung versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubation im Dunkeln wurden je Vertiefung 150 µl Blockpuffer IV, für 8 Vertiefungen 1200 µl, hinzugefügt. Die Zellen wurden für eine Stunde im Dunkeln mit 150 µl des Antikörper-Ansatzes inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T_{0,05} wurden die Deckgläschen mit 5 µl *ProLong® Gold Antifade* (Invitrogen) auf einem Objektträger fixiert. Dieses enthält zur Visualisierung der Zellkerne den Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI).

Die Präparate wurden am cLSM 780 (Zeiss) analysiert und mittels der Software Zen2010 ausgewertet und graphisch dargestellt.

6.3 Analyse von Nukleinsäuren

6.3.1 Isolation von RNA

Um den Vorgang der Apoptose und die während einer Infektion transkribierte RNA genauer untersuchen zu können, wurde mithilfe des *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) die gesamte RNA rMuV-SH-C-flag-infizierter und unbehandelter A549 Zellen isoliert. Das Prinzip der Extraktion beruht auf der selektiven Bindung von RNA-Molekülen größer als 200 bp an eine Silicamembran.

Dafür wurden A549 Zellen in eine 6-Lochplatte ausgesät und bei einer Konfluenz von 70 % entsprechend Kapitel 6.1.3 mit einer MOI von 0,01 infiziert bzw. nicht behandelt (mock). 48 Stunden nach Infektion wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen in 350 µl β-Mercaptoethanol-haltigem RLT-Puffer (10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml RLT-Puffer) Vertiefung aufgenommen. Das Mercaptoethanol soll die RNA nach Zellyse vor dem Abbau zu schützen. Die Lysate wurden anschließend in Lysis Matrix M Röhrchen überführt und in einem *Fastprep*-Gerät (Mpbio) bei Stärke 6 für 40 Sekunden homogenisiert. Die sich dabei bildende schaumige Phase wurde mithilfe einer Pipettenspitze entfernt und die verbleibende Flüssigkeit mit der gleichen Menge 70 %igem Ethanol (340 µl) durchmischt. Anschließend wurde die gesamte Flüssigkeit auf eine *RNeasy* Säule mit einem 2 ml Sammelgefäß aufgetragen und für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit im Sammelgefäß verworfen. Zur Beseitigung von Verunreinigungen wurden 350 µl eines Ethanol- und Guanidinthiocyanat-haltigen RW1-Puffers auf die Säule pipettiert und erneut 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen.

Um Verunreinigungen durch genomische DNA zu eliminieren, wurde das *RNase-free DNase Set* der Firma Qiagen verwendet. Dafür wurden im nächsten Schritt 80 µl eines DNase-Präparates, welches sich aus 10 µl der DNase-Stammlösung und 70 µl RDD-Puffer zusammensetzt, direkt auf die Säule pipettiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert; der Überstand wurde verworfen.

Anschließend wurden 350 µl eines Guanidinhydrochlorid-haltigen RPE-Puffers auf die Säule pipettiert und 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit einer verlängerten Zentrifugationszeit von 2 Minuten wiederholt und der Durchfluss jeweils verworfen. Im nächsten Schritt wurde das alte Sammelgefäß vorsichtig durch ein neues ersetzt und zur Entfernung sämtlicher Flüssigkeitsreste bei 8000 g für eine Minute zentrifugiert. Die Elution der RNA erfolgte durch Zentrifugation bei 8000 g mit

50 µl RNase-freiem Wasser in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß, welches sofort auf Eis gelagert wurde.

6.3.1.1 RNA-Quantifizierung und Qualitätskontrollen

Die Konzentration isolierter RNA kann mittels photometrischer Messung an einem *Nanodrop*-Spektrometer (PEQLAB) bestimmt werden. Dabei wird die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen, wobei eine OD_{260} von 1,0 einer Konzentration von 40 µg/ml RNA entspricht.

Aufgrund des Absorptionsmaximums aromatischer Aminosäuren bei 280 nm wird zur Analyse von Protein-Verunreinigungen der Quotient OD_{260}/OD_{280} berechnet. Dieser Wert sollte für reine RNA 1,8 betragen. Zuckerverbindungen und schwefelhaltige Moleküle absorbieren bei 230 nm, weshalb zusätzlich der Ration OD_{260}/OD_{230} bestimmt wurde. Für reine RNA nimmt der Quotient einen Wert von 2,2 an.

Für die Bestimmung der Konzentration wurde das Spektrometer mit 2 µl bidestilliertem Wasser kalibriert und anschließend wurden 2 µl der Probe vermessen. Die entsprechende Software berechnet die RNA-Konzentration sowie die beschriebenen Ratio-Werte.

6.3.2 Synthese von cDNA

Da die zelluläre Genexpression genau geregelt ist und die mRNA demzufolge ständig neu gebildet und wieder abgebaut werden muss, ist das Molekül vergleichsweise instabil. Aus diesem Grund erfolgte direkt nach der Isolation der RNA unter Verwendung des *RT² First Strand Kits* (Qiagen) die Umschreibung in cDNA (*complementary DNA*), welche durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) synthetisiert wird. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase kann mithilfe von *random*-Hexamer-Primern, die aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden bestehen, einen komplementären cDNA-Strang erzeugen. Auf diese Weise wird nicht ein gezieltes Transkript umgeschrieben, sondern die gesamte RNA.

Für diesen Vorgang wurde zunächst mithilfe des *NanoDrop*-Gerätes die Konzentration der RNA bestimmt, um für die folgende Synthese eine definierte Menge von 0,5 µg einsetzen zu können. Die Werte können Tabelle 3 entnommen werden.

Um sicherzustellen, dass die genomische DNA (gDNA) nicht mit der gewünschten RNA interferiert, wurde ein weiterer DNA-Eliminierungs-Schritt durchgeführt. Dafür wurden 2 µl Puffer GE (*5x gDNA Elimination Buffer*) mit 0,5 µg RNA und RNase-freiem

Wasser auf 10 µl aufgefüllt und nach einer 5-minütigen Inkubation bei 42 °C sofort für zwei Minuten auf Eis gestellt. Während dieser Zeit wurde der cDNA-Synthese Mastermix (RT-Mastermix) entsprechend Tabelle 3 zusammen pipettiert. Die umzuschreibenden Proben wurden anschließend mit 10 µl des RT-Mastermixes versetzt und für 15 Minuten bei 42 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde die Temperatur sofort auf 95 °C erhöht und die Proben für weitere 5 Minuten inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde schließlich mit 91 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und für weitere Analysen bei -20 °C eingefroren.

Tab. 3: Zusammensetzung des cDNA-Synthese Mastermixes.

Komponente	Volumen für eine Reaktionen
5x Puffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 Reverse Transkriptase Mix	2 µl
RNase-freies Wasser	3 µl

6.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Zum Nachweis von kurzen DNA-Bereichen (*Templates*) können diese in einer Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert werden. Dafür wird eine DNA-abhängige DNA-Polymerase eingesetzt, welche mithilfe spezifischer, kurzer Oligonukleotide (Primer) die DNA exponentiell vervielfältigt. Die drei Schritte eines PCR-Zyklus bestehen aus der Denaturierung der DNA, der Anlagerung der Primer (*Annealing*) und der Kettenverlängerung (Elongation). Indem die Probe im ersten Schritt auf eine Temperatur von 95 °C erhitzt wird, lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen auf und die Stränge trennen sich voneinander. Für die Anlagerung der Primer wird die Temperatur im Folgenden so weit abgesenkt, dass es zu einer Bindung der Oligonukleotide an komplementäre DNA-Bereiche kommt, die entweder vor oder hinter dem zu amplifizierenden Fragment liegen. In Abhängigkeit des GC-Gehaltes und der Länge der Primer wird die Annealing-Temperatur T_m in der Regel zwischen 55 und 65 °C gewählt. An den freien OH-Gruppen der 3'-Primer-Enden werden im letzten Schritt mithilfe der Polymerase zum Template komplementäre dNTPs eingebaut. Für die optimale Aktivität des hitzestabilen Enzyms wird die Temperatur auf 68 – 72 °C gebracht.

Zur Überprüfung der erfolgreichen cDNA-Synthese (Kapitel 6.3.3) wurde das konstitutiv-exprimierte Gen (*housekeeping gene*) der humanen RNase P (huRNase P), welches unabhängig vom Zellstadium und äußeren Einflüssen vorliegt, amplifiziert. Die PCR wurde im Thermocycler TPersonal (Biometra) durchgeführt und es wurde der *HotStarTaq Mastermix* verwendet. Tabelle 4 ist der Reaktionsansatz, Tabelle 5 das PCR-Programm zu entnehmen.

Tab. 4: Reaktionsansatz für die Amplifikation von DNA-Fragmenten.

Reagenz	Volumen für einen Ansatz
Wasser	3 µl
Primer A (10 pMol/µl)	0,5 µl
Primer B (10 pMol/µl)	0,5 µl
HotStarTaq Mastermix	5 µl
cDNA	1 µl

Tab. 5: PCR-Programm für die Amplifikation von DNA-Fragmenten.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
	95 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 sek	
Annealing	52 °C	30 sek	30 x
Elongation	72 °C	1 min	
	72 °C	10 min	

6.3.4 Agarosegel-Elektrophorese von DNA

Um amplifizierte DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wird eine Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt. Dabei bewegt sich die DNA aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen in Richtung der Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vieler Faktoren, z.B. der Größe und Konformation der DNA, variiert. Über einen Vergleich mit dem Marker *HyperLadderII* (Bioline), welcher aus verschiedenen DNA-Fragmenten bekannter Länge besteht, kann die Molekülgröße ermittelt werden. Es wurde ein 1 %iges Agarosegel in 1 x TAE-Puffer in eine Horizontal-Gel-Kammer gegossen. Zur Detektion der DNA wurden vor dem Auspolymerisieren des Gels 2 µl *GelRed* (Biotium) zugesetzt. Der Farbstoff kann in

doppelsträngige DNA interkalieren und durch UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Proben wurden unter Zusatz von 1 x *Gel Pilot DNA-Loading Dye* (Qiagen) aufgetragen und unter Anlegen einer Spannung von 80 V laufen gelassen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel unter UV-Licht (354 nm) mit einer Digitalkamera fotografiert.

6.3.5 Quantitatives RT-PCR-Array

Zur Untersuchung der Genexpression und zum Nachweis spezifischer mRNA-Moleküle, die während einer rMuV-Infektion-induzierten Apoptose transkribiert werden, eignet sich eine quantitative *real-time*-PCR (Echtzeit-PCR). Hierfür wurde ein *RT² Profiler PCR Array* (Qiagen) eingesetzt, welches die Möglichkeit bietet die Expression vieler verschiedener Gene gleichzeitig während der Amplifizierung zu verfolgen und zu quantifizieren.

6.3.5.1 Aufbau und Durchführung des RT² Profiler PCR Array

Das *RT² Profiler PCR Array* wird u.a. als 96-Lochplatte angeboten, welche mit spezifischen Primern für 84 Apoptose-Gene sowie 5 konstitutiv-exprimierte Gene beschichtet ist. Zur Qualitätssicherung enthält die Platte weiterhin eine genomische DNA-Kontrolle (HGDC, *human genomic DNA control*), 3 Reverse Transkription-Kontrollen (RTC, *reverse transcription control*) und 3 Kontrollen für eine positive PCR (PPC, *positive PCR control*). Tabelle 6 zeigt die Anordnung des Microarrays, wobei die Vertiefungen für die Kontrollen in grün und für die *Housekeeping*-Gene in violett gekennzeichnet sind.

Zur Durchführung des *RT² Profiler PCR Arrays* wurde die cDNA entsprechend Tabelle 7 mit einem Mastermix, der einen Fluoreszenzfarbstoff (*SYBR Green Dye*), sowie eine *HotStart Taq Polymerase*, PCR-Puffer, einen dNTP-Mix und einen passiven Referenz-Farbstoff (*ROX*) beinhaltet, und RNase-freiem Wasser gemischt. Mithilfe einer Multi-Kanal-Pipette wurden aus einem Reservoir je Vertiefung 25 µl des Mastermixes auf die 96-Lochplatte pipettiert. Um mit den Messergebnissen interferierende Luftblasen zu vermeiden, wurde die mittels *Thin-Wall-Cap-Strips* verschlossene Platte für mehrere Minuten bei 1000 g zentrifugiert und anschließend in den Cycler *ABI 7500* gestellt. Das PCR-Programm ist Tabelle 8 zu entnehmen.

Tab. 6: Anordnung der 96-Lochplatte des RT² Profiler PCR Arrays.

Jede Vertiefung enthält spezifische Primer zur Amplifizierung der Zielsequenzen, wobei die Primer der Vertiefungen A1-G12 die Vervielfältigung ausgewählter Apoptose-Gene zulässt und H1-H5 die Housekeeping-Gene umfasst. Zur Qualitätssicherung beinhaltet H6 eine genomische DNA-Kontrolle. Die Vertiefungen H7-H12 enthalten definierte synthetische Substrate um die Qualität der Reversen Transkription (H7-H9) und die Effizienz der PCR (H10-H12) zu überprüfen. Die Kontrollen sind in grün, die Housekeeping-Gene in violett markiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ABL1	AIFM1	AKT1	APAF1	BAD	BAG1	BAG3	BAK1	BAX	BCL10	BCL2	BCL2A1
B	BCL2L1	BCL2L10	BCL2L11	BCL2L2	BFAR	BID	BIK	BIRC2	BIRC3	BIRC5	BIRC6	BNIP2
C	BNIP3	BNIP3L	BRAF	CASP1	CASP10	CASP14	CASP2	CASP3	CASP4	CASP5	CASP6	CASP7
D	CASP8	CASP9	CD27	CD40	CD40LG	CD70	CFLAR	CIDEA	CIDEB	CRADD	CYCS	DAPK1
E	DFFA	DIABLO	FADD	FAS	FASLG	GADD45A	HRK	IGF1R	IL10	LTA	LTBR	MCL1
F	NAIP	NFKB1	NOD1	NOL3	PYCARD	RIPK2	TNF	TNFRSF10A	TNFRSF10B	TNFRSF11B	TNFRSF1A	TNFRSF1B
G	TNFRSF21	TNFRSF25	TNFRSF9	TNFSF10	TNFSF8	TP53	TP53BP2	TP73	TRADD	TRAF2	TRAF3	XIAP
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Tab. 7: Zusammensetzung PCR-Ansatzes.

Reagenz	Volumen
verdünnte cDNA	102 µl
2 x RT ² SYBR Green ROX qPCR Mastermix	1350 µl
RNase-freies Wasser	1248 µl

Tab. 8: PCR-Programm für das RT² Profiler PCR Array.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	10 min	1 x
95 °C	15 sek	40 x
60 °C	1 min	

6.3.5.2 Datenanalyse mittels komparativer $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Um die Amplifizierung der DNA während einer Echtzeit-PCR verfolgen zu können, wird der Farbstoff *SYBR Green* eingesetzt. Dieser interkaliert in die kleine Furche doppelsträngiger DNA und liefert ein Fluoreszenzsignal, welches proportional mit steigender Menge an vervielfältigter DNA zunimmt. Eine typische Amplifikationskurve, bei der die Farbstofffluoreszenz (ΔR_n , *normalized reporter*) über der Zykluszahl aufgetragen ist, ist in Abbildung 4 dargestellt.

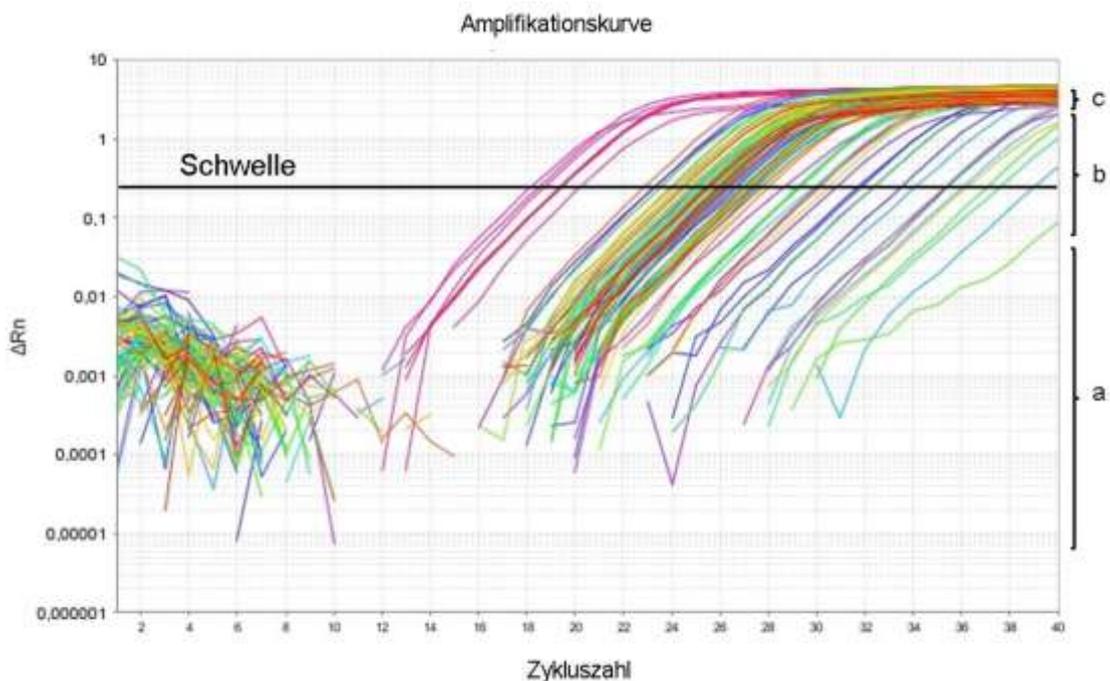


Abb. 4: Logarithmische Darstellung einer typischen Amplifikationskurve ΔR_n (Farbstofffluoreszenz, *normalized reporter*) über der Zykluszahl.

Dargestellt ist der Kurvenverlauf der exponentiellen Verfielfältigung der cDNA in logarithmischer Ansicht. Die Schwelle definiert hierbei die Zykluszahl, ab der eine statistisch signifikante Erhöhung der Amplifikationsprodukte aus cDNA detektiert werden kann. Der Verlauf der Amplifikation wird in mehrere Phasen eingeteilt: a. Hintergrundsignal, b. lineare Phase, c. Plateauphase.

Mithilfe der Cycler-Software wird anhand der Farbstoff-Fluoreszenz für jedes untersuchte Gen ein Schwellenzyklus C_T (*threshold cycle*) berechnet. Dieser Wert definiert den Punkt, an dem die Amplifikationskurve einen Schwellenwert übertritt und somit eine statistisch signifikante Erhöhung der Amplifikationsprodukte detektiert wird. Die in Abbildung 4 gekennzeichnete Schwelle wird manuell definiert, indem in der logarithmischen Ansicht ein Wert gewählt wird, welcher sich über dem

Hintergrundsignal und im unteren Drittel bzw. in der unteren Hälfte der linearen Phase der Amplifikation befindet. Zur Vergleichbarkeit der Ansätze sollte die Schwelle in jeder durchgeführten PCR den gleichen Wert annehmen. Je kleiner der C_T -Wert ist, umso früher werden die entsprechenden Gene amplifiziert und desto größer ist die Menge an vorhandener RNA. Werte, die zwischen 35 und 40 liegen, zeigen eine unzureichende Detektion an und werden zur Vermeidung falscher Quantifizierungen auf 35 gesetzt. Um die Amplifikation der eingesetzten DNA quantifizieren zu können, wird eine Normalisierung der Expressionsgene vorgenommen. Dabei wird mittels der folgenden Formel (1) die Expression des zu untersuchenden Apoptose-Gens (GOI, *gene of interest*) auf den Durchschnittswert der konstitutionell-exprimierten Gene (AVG HKG, *average HKG*) bezogen. Auf diese Weise werden Variationen in der eingesetzten Ausgangsmenge an cDNA ausgeglichen.

$$(1) \Delta C_T = C_T^{GOI} - C_T^{AVG\ HKG}$$

Anhand der errechneten ΔC_T -Werte wird zum Vergleich der Genexpression verschiedener Gruppen entsprechend Formel (2) ein $\Delta\Delta C_T$ -Wert bestimmt. Gruppe 1 entspricht hierbei der Kontrollgruppe (z.B. unbehandelt, mock) und Gruppe 2 der experimentellen Probe (z.B. rMuV-SH-C-flag-infiziert).

$$(2) \Delta\Delta C_T = \Delta C_T^{Gruppe\ 2} - \Delta C_T^{Gruppe\ 1}$$

Zur relativen Quantifizierung der Ergebnisse wird die Formel (3) $2^{-\Delta\Delta C_T}$ eingesetzt. Hierbei wird eine n-fache Abweichung der zu untersuchenden Gruppe von einer Kontrollgruppe bestimmt (*fold change*). Ist der Wert größer als 1 wird von einer Hochregulation gesprochen, ist der Wert kleiner als 1 von einer Herunterregulation.

6.3.5.3 Qualitätskontrollen des RT² Profiler PCR Array

Die Eliminierung genomischer DNA ist essentiell, um korrekte Genexpressions-Ergebnisse zu erhalten. Die *human genomic DNA*-Kontrolle untersucht daher gDNA-Kontaminationen in jeder zu analysierenden Probe. C_T -Werte für den Nachweis genomischer DNA sollten über 35 liegen, um die Ergebnisse der Genexpression nicht zu beeinflussen.

Methoden

Um die Effizienz der PCR bewerten zu können, wird der Durchschnitt der C_T^{PPC} -Werte berechnet. Dieser sollte bei 20 ± 2 liegen, um die Anwesenheit von PCR-Amplifikations-Inhibitoren auszuschließen.

Zur Kontrolle der Reversen Transkription wird anhand Formel (4) die Differenz der C_T^{RTC} - und C_T^{PPC} -Durchschnittswerte bestimmt.

$$(4) \Delta C_T = AVG C_T^{RTC} - AVG C_T^{PPC}$$

Ist die Differenz größer als 5 liegen möglicherweise Verunreinigungen vor, die die Reverse Transkription inhibieren könnten.

7. Ergebnisse

7.1 Vergleich der Apoptose-Induktion in rMuV-infizierten Vero Zellen

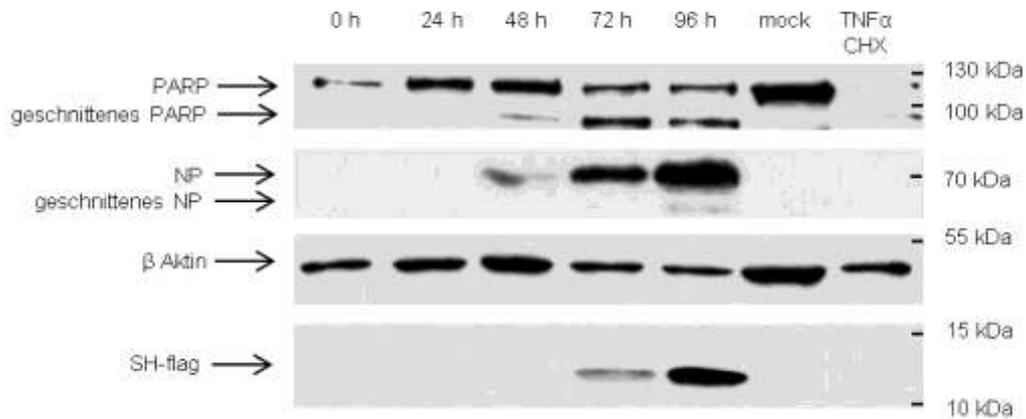
Das von Mumpsviren exprimierte SH-Protein ist ein 6,5 kDa großes, hydrophobes Transmembranprotein, dessen Funktion bislang nicht genau geklärt ist. Aufgrund der Wechselwirkung des SH-Proteins mit dem TNF- α -Rezeptor 1 und der Hemmung der TNF α -induzierten Aktivierung von NF- κ B [26,31] wird angenommen, dass das SH-Protein die Apoptose-Induktion in MuV-infizierten Zellen verzögert.

Zur Charakterisierung des Einflusses des SH-Proteins auf Apoptose-Induktion während einer Infektion wurden in der Arbeitsgruppe von Annette Mankertz rekombinante Mumpsviren (rMuV), die auf dem Impfstamm Jeryl Lynn basieren, hergestellt [47]. Das Genom des Virus rMuV-SH-C-flag kodiert für ein SH-Protein, dessen C-Terminus mit einem flag-Epitop fusioniert ist. Im Virus rMuV-SH-3stop-C-flag hingegen wird die Expression des SH-Proteins, dessen Gen am C-Terminus ebenfalls ein flag-Epitop trägt, durch den Einbau von drei Stopp-Kodons verhindert.

Zum zeitlichen Vergleich der Apoptose-Induktion wurden die für Mumpsvirus-Infektionen geeigneten Vero Zellen mit einer MOI von 0,01 mit rMuV-SH-C-flag oder rMuV-SH-3stop-C-flag entsprechend Abschnitt 6.1.3 infiziert. Die Zellen wurden direkt nach der Infektion sowie im Abstand von 24 Stunden lysiert. Die Proteine wurden mithilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot zur Analyse der PARP-Spaltung und zum Nachweis der viralen Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert (Abschnitt 6.2.1 und 6.2.2). Als Positivkontrolle wurden Vero Zellen zur Induktion von Apoptose mit TNF- α und CHX entsprechend Abschnitt 6.1.4 stimuliert, als Negativkontrolle (mock) wurden uninfizierte Vero Zellen eingesetzt. Die Lyse der Kontrollen erfolgte nach 72 h. Abbildung 5 zeigt den Western Blot der rMuV-infizierten Vero Zellen.

Ergebnisse

A. rMuV-SH-C-flag



B. rMuV-SH-3stop-C-flag

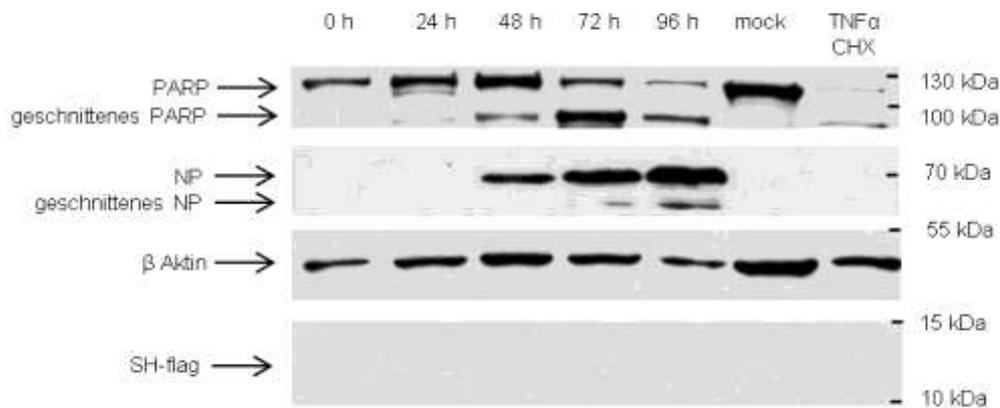


Abb. 5: Nachweis der Apoptose-Induktion in Vero Zellen mittels Western Blot.

Vero Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 mit rMuV-SH-C-flag (A) oder rMuV-3stop-C-flag (B) infiziert und direkt nach der Infektion (0 h) sowie nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h lysiert. Als Negativkontrolle (mock) wurden uninfizierte Vero Zellen eingesetzt, als Positivkontrolle wurden Vero Zellen zur Induktion von Apoptose mit 200 pg/ μ l TNF- α und 25 fg/ μ l CHX stimuliert. Die Lyse der Kontrollen erfolgte nach 72 h. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über ein Semidry-Blot-System auf eine PVDF Membran übertragen. Anschließend wurden mittels monoklonaler Primärantikörper aus dem Kaninchen bzw. der Maus PARP (113 kDa), dessen Spaltprodukt (89 kDa), Aktin (42 kDa) und SH-flag (zwischen 10 und 15 kDa) angefärbt. Zur Detektion des viralen N-Proteins wurde die Membran in Strippingpuffer inkubiert und durch die Markierung mit einem primären Antikörper aus der Maus gefärbt. Der Nachweis der Proteine erfolgte anhand des Chemolumineszenzsignals eines polyklonalen, POD-gekoppelten Sekundäranantikörpers gegen Maus bzw. Kaninchen.

Ergebnisse

Anhand der PARP-Spaltung lässt sich der zeitliche Verlauf der Apoptose beurteilen. In rMuV-SH-C-flag-infizierten Vero Zellen konnte erstmals nach 48 h das 89 kDa-Fragment (geschnittenes PARP) detektiert werden, wohingegen in den rMuV-SH-3stop-C-flag-infizierten Proben bereits 24 Stunden nach Infektion, also 24 Stunden früher, eine Spaltung von PARP zu beobachten war.

Die erfolgreiche Infektion wurde anhand der Detektion des viralen Proteins NP belegt. Hierbei wurde außerdem ersichtlich, dass die Expression und anschließende Spaltung des Nukleoproteins in rMuV-SH-3stop-C-flag-infizierten Vero Zellen schneller als in rMuV-SH-C-flag-infizierten Vero Zellen erfolgte. Während Abbildung 4 B bereits nach 72 h eine anfängliche Spaltung des Nukleoproteins zeigt, können in Abbildung 4 A erst 96 h p.i. Spaltprodukte beobachtet werden.

Als weitere Infektionskontrolle diente der erfolgreiche Nachweis von SH-flag in rMuV-SH-C-flag-infizierten Zellen, welches 24 Stunden später als NP detektierbar war. In rMuV-SH-3stop-C-flag infizierten Zellen ist kein SH-flag nachweisbar, da das SH-Protein durch das Einfügen der Stopp-Kodons nicht exprimiert wird.

Die Färbung von Aktin dient als Beladungskontrolle des SDS-Gels. Anhand der Intensität der Banden kann außerdem der Zustand der Zellen während der Infektion beurteilt werden. Die anfängliche Zunahme der Banden bis 48 h p.i. deutet auf das natürliche Wachstum der Zellen hin, während die Banden 72 Stunden nach Infektion mit zunehmender NP-Konzentration und PARP-Spaltung schwächer werden. Die abnehmende Intensität der Aktin-Bande könnte auf den Abbau des Zytoskeletts während der fortschreitenden Apoptose zurückzuführen sein.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass in rMuV-SH-3stop-C-flag-infizierten Vero Zellen 24 Stunden früher Apoptose induziert wird als in rMuV-SH-C-flag-infizierten Vero Zellen und somit das SH-Protein die Apoptose-Induktion in infizierten Zellen hinauszuzögern scheint.

7.2 Vergleich der Apoptose-Induktion in rMuV-infizierten A549 Zellen

Zur genauen Analyse der MuV-bedingten Apoptose-Induktion sollte die mRNA Apoptose-relevanter Gene in infizierten Zellen mittels quantitativer PCR analysiert werden. Dazu sollte ein RT² Profiler Array (Qiagen) verwendet werden, welches für humane, aber nicht für Vero Zellen erhältlich ist. Aus vorangegangenen Versuchen ist bekannt, dass sich die humane Lungenkarzinom-Zelllinie A549 mit MuV infizieren lässt. Daher wurde der zeitliche Verlauf der rMuV-Infektion-bedingten Apoptose-Induktion zusätzlich in A549 Zellen untersucht. Die Zellen wurden entsprechend Kapitel 6.1.3 mit

Ergebnisse

den Viren rMuV-SH-C-flag bzw. rMuV-SH-3stop-C-flag infiziert. Da aus den vorhergehenden Untersuchungen in der Arbeitsgruppe bekannt ist, dass sich A549 Zellen schlechter als Vero Zellen infizieren lassen, wurde eine höhere MOI (0,1) gewählt. Die rMuV-SH-C-flag- bzw. rMuV-SH-3stop-C-flag-infizierten Zellen wurden direkt nach der Infektion (0 h) sowie im Abstand von 24 h lysiert. Mittels SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt und anhand eines Western Blots auf eine PVDF Membran übertragen. Zur Untersuchung der Apoptose-Induktion durch Infektion wurden PARP, NP, Aktin und SH-flag angefärbt. Als Kontrolle dienten unbehandelte (mock) sowie mit TNF- α und CHX stimulierte A549 Zellen (Abschnitt 6.1.4, 6.2.1, 6.2.2).

Abbildung 6 zeigt den zeitlichen Verlauf der Apoptose in rMuV-infizierten A549 Zellen anhand der PARP-Spaltung. Hierbei wird ersichtlich, dass sowohl rMuV-SH-C-flag-infizierte als auch rMuV-SH-3stop-C-flag-infizierte A549 Zellen 48 h nach Infektion Apoptose induzieren. Trotz Stimulation mit TNF- α und CHX konnten für die Positivkontrolle keine Banden für PARP und dessen Spaltprodukt detektiert werden, da die Lyse der Zellen erst 72 h p.i. erfolgte und somit vermutlich zu einem zu späten Zeitpunkt.

Da sich kein Unterschied hinsichtlich der zeitlichen Apoptose-Induktion feststellen ließ, sollte untersucht werden, ob sich durch eine Infektion mit geringerer MOI und damit anfänglich geringerer Replikationsrate des Virus zeitliche Unterschiede detektieren lassen. Daher wurde der Versuchsaufbau mit einer MOI von 0,01 wiederholt und zusätzlich wurden die mit TNF- α und CHX stimulierten Zellen bereits nach 24 h lysiert. Aufgrund vorhergehender Ergebnisse ist anzunehmen, dass ein im Western Blot detektierbarer Effekt durch das SH-Protein zwischen 24 h und 48 h p.i. zu erwarten ist. Aus diesem Grund wurde die PARP-Spaltung lediglich 0, 24 und 48 h nach Infektion analysiert. Dies bietet u.a. den Vorteil, dass die Proben zur besseren Vergleichbarkeit in nur einem SDS-Gel aufgetragen werden können. Abbildung 7 A zeigt eine stärkere PARP-Spaltbande zum Zeitpunkt 48 h p.i. rMuV-SH-3stop-C-flag-infizierter Zellen im Vergleich zu rMuV-SH-C-flag-infizierten Zellen. Die Aktin-Bande beweist sowohl in Abb. 6 als auch in Abb. 7 A eine gleichmäßige Beladung der SDS-Gels.

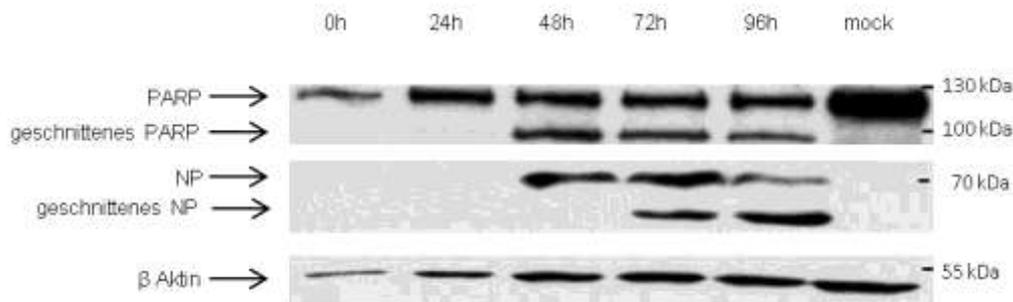
Eine Detektion von NP und SH-flag war bei einer MOI von 0,01 vermutlich aufgrund zu geringer Protein-Konzentration nicht möglich. Eine erfolgreiche Infektion ließ sich jedoch mittels fotografischer Aufnahmen der infizierten Zellen belegen. Abbildung 7 B zeigt, dass in rMuV-SH-C-flag- und rMuV-SH-3stop-C-flag-infizierten A549 Zellen sowohl 24 h p.i. (c bzw. e) als auch 48 h p.i. (d bzw. f) die für eine MuV-Infektion typische Synzytien-Bildung (s. Pfeil) auftrat. Weiterhin ist erkennbar, dass die rMuV-

Ergebnisse

SH-3stop-C-flag-Infektion größere Synzytien induziert und somit einen stärkeren CPE hervorruft als das rMuV-SH-C-flag-Virus.

Diese Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass bei einer MOI von 0,01 zum Zeitpunkt 48 h p.i. auch in rMuV-SH-3stop-C-flag-infizierten A549 Zellen stärker Apoptose induziert wird als in rMuV-SH-C-flag-infizierten A549 Zellen und somit das SH-Protein die Apoptose-Induktion auch in infizierten A549 Zellen zu hemmen scheint.

A. rMuV-SH-C-flag (MOI 0,1)



B. rMuV-SH-3stop-C-flag (MOI 0,1)

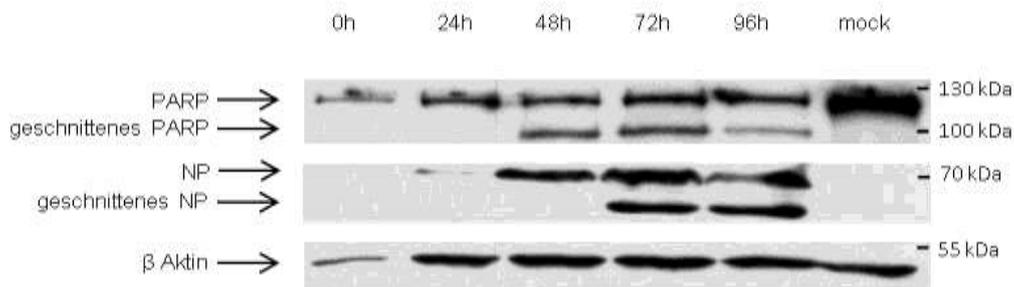
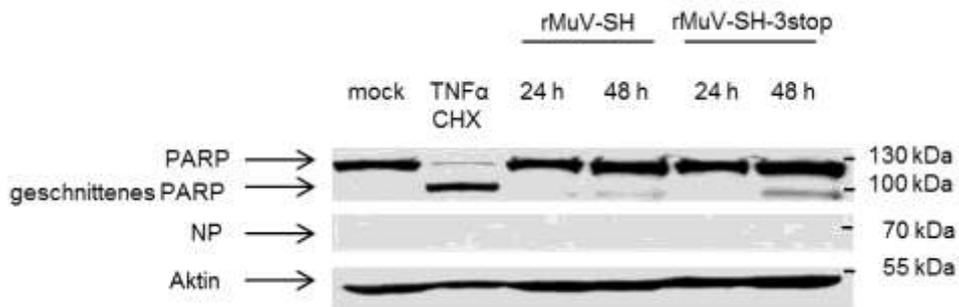


Abb. 6: Nachweis der Apoptose-Induktion in A549 Zellen mittels Western Blot (MOI 0,1).

A549 Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 mit rMuV-SH-C-flag (A) oder rMuV-3stop-C-flag (B) infiziert und direkt nach der Infektion (0 h) sowie nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h lysiert. Als Negativkontrolle (mock) wurden uninfizierte A549 Zellen eingesetzt, die Lyse erfolgte nach 48 h. Eine Positivkontrolle konnte nicht detektiert werden, da die stimulierten Zellen erst 72 h p.i. lysiert wurden. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, über ein Semidry-Blot-System auf eine PVDF Membran übertragen und wie in Abb. 5 beschrieben markiert und detektiert.

Ergebnisse

A. Apoptose-Kinetik in A549 Zellen (MOI 0,01)



B. Fotografische Aufnahmen des CPEs rMuV-infizierter A549 Zellen

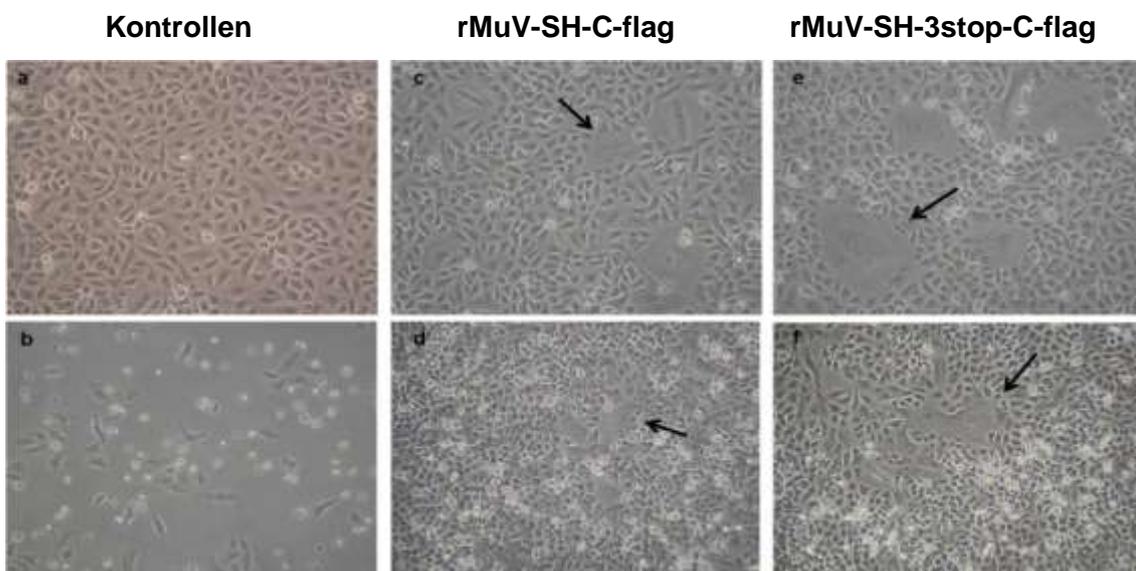


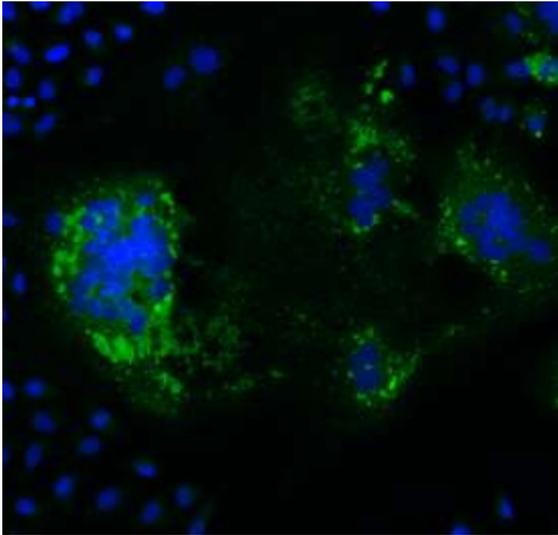
Abb. 7: Nachweis der Apoptose-Induktion in A549 Zellen mittels Western Blot sowie Infektionsnachweis anhand fotografischer Aufnahmen (MOI 0,01).

A549 Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 mit rMuV-SH-C-flag oder rMuV-3stop-C-flag infiziert und direkt nach der Infektion (0 h) sowie nach 24 h und 48 h lysiert. Als Negativkontrolle (mock) wurden uninferzierte A549 Zellen eingesetzt, als Positivkontrolle wurden A549 Zellen zur Induktion von Apoptose mit 200 pg/ μ l TNF- α und 25 fg/ μ l CHX stimuliert. Die Lyse der Kontrollen erfolgte nach 24 h (Positivkontrolle) bzw. nach 48 h (Negativkontrolle). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, über ein Semidry-Blot-System auf eine PVDF Membran übertragen und wie in Abb. 5 beschrieben nachgewiesen (A). Vor der Lyse der Zellen erfolgten fotografische Aufnahmen (B) der Negativkontrolle (a), Positivkontrolle (b), der rMuV-SH-C-flag-infizierten Zellen 24 h p.i. (c) bzw. 48 h p.i. (d) und der rMuV-SH-3stop-C-flag infizierten Zellen 24 h p.i. (e) bzw. 48 h p.i. (f). Die Pfeile markieren Synzytien.

7.3 Untersuchung der Genexpression rMuV-SH-C-flag-infizierter A549 Zellen im Vergleich zu uninfizierten A549 Zellen

Zur Untersuchung der Genexpression und zum Nachweis spezifischer mRNA-Moleküle, die während einer rMuV-Infektion-induzierten Apoptose transkribiert werden, wurde entsprechend Abschnitt 6.3.5 ein *RT² Profiler PCR Array* (Qiagen) in A549 Zellen durchgeführt. Dieser bietet die Möglichkeit die Expression vieler verschiedener Apoptose-Gene gleichzeitig zu quantifizieren, um so die Vorgänge während einer MuV-Infektion besser verstehen zu können. Anhand der Apoptose-Kinetik mit humanen, rMuV-infizierten A549 Zellen (Abschnitt 7.2) wurde ersichtlich, dass die RNA 48 h nach Infektion isoliert werden sollte. Zu diesem Zeitpunkt haben die Zellen bereits Apoptose induziert und der Einfluss des SH-Proteins scheint am deutlichsten erkennbar zu sein. Um die Genexpression rMuV-SH-C-flag-infizierter Zellen im Vergleich zu uninfizierten Zellen untersuchen zu können, wurden A549 Zellen entsprechend Abschnitt 6.1.3 mit rMuV-SH-C-flag infiziert (MOI 0,01) bzw. nicht behandelt (mock). Um sicherzugehen, dass die für den Apoptose-Assay verwendeten Zellen tatsächlich infiziert waren, wurde in einem Teil der Zellen wie in Abschnitt 6.2.3 beschrieben das N-Protein mittels Immunfluoreszenzanalysen nachgewiesen. Abbildung 8 zeigt diese Infektionskontrolle. Im Gegensatz zu den nicht-infizierten Zellen (mock) (B) konnte eine spezifische Grünfärbung des N-Proteins in rMuV-SH-C-flag-infizierten Zellen (A) innerhalb von Synzytien, die durch Anhäufung der DAPI-gefärbten Zellkerne sichtbar sind, nachgewiesen werden. Die Zellen waren somit infiziert. Die Kontrolle der Apoptose-Induktion in infizierten Zellen wurde wie in Abschnitt 7.2 beschrieben im Western Blot mittels PARP-Spaltung rMuV-SH-C-flag-infizierter Zellen nach 48 h nachgewiesen (Vgl. Abb. 7 A).

A. rMuV-SH-C-flag



B. mock

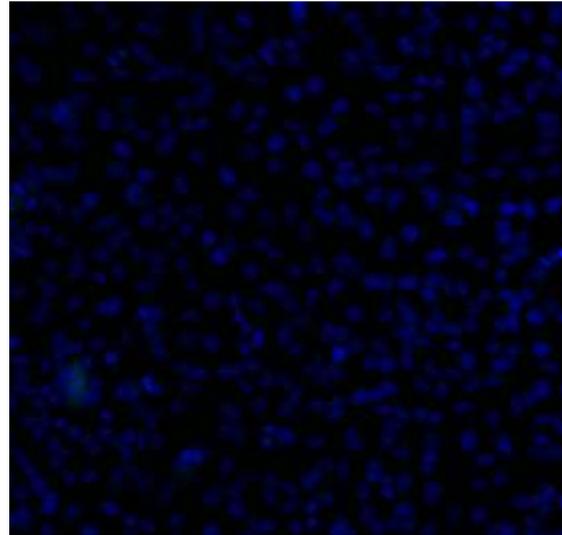


Abb. 8: Infektionskontrolle mittels Nachweis des viralen Proteins NP in der Immunfluoreszenz.

A549 Zellen wurden mit rMuV-SH-C-flag infiziert (MOI 0,01) (A) oder nicht behandelt (mock) (B) und 48 h später fixiert und permeabilisiert. Das virale Protein NP wurde mit einem spezifischen Antikörper markiert, der anschließend durch einen Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper (grün) detektiert wurde. Anschließend wurden die Proben mit ProLong® Gold Antifade auf Objektträgern fixiert, das zur Färbung der Zellkerne DAPI (blau) enthielt. Die Expression wurde am cLSM780 in 20facher Vergrößerung detektiert und dokumentiert.

Gleichzeitig wurde die RNA rMuV-SH-C-flag-infizierter und unbehandelter A549 Zellen 48 h p.i. isoliert (Abschnitt 6.3.1). Um die Quantität und Qualität der isolierten RNA kontrollieren zu können, wurden die Proben entsprechend Abschnitt 6.3.1.1 an einem Nanodrop-Spektrometer vermessen. Tabelle 10 enthält die dazugehörigen Werte.

Tab. 10: Quantitäts- und Qualitätsanalyse der isolierten RNA

	rMuV-SH-C-flag infiziert	mock
Konzentration	425,4 $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$	280,9 $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$
OD₂₆₀/OD₂₈₀	2,09	2,10
OD₂₆₀/OD₂₃₀	2,06	1,95

Aufgrund der ermittelten Ratio-Werte lässt sich die isolierte RNA als ausreichend rein für weitere Untersuchungen beurteilen (Abschnitt 6.3.1.1). Für die Analyse der Genexpression einer RT² Profiler PCR-Lochplatte wurden 0,5 µg der isolierten RNA

Ergebnisse

entsprechend Abschnitt 6.3.2 in cDNA umgeschrieben. Zur Überprüfung des RT-Schrittes wurde anschließend eine PCR durchgeführt, die das Gen für die humane RNase P amplifiziert (Kapitel 6.3.3). Die entsprechenden Primer binden dabei so, dass ein 65 bp-langes Fragment entsteht. Das in Abbildung 9 dargestellte Agarose-Gel (Kapitel 6.3.4) zeigt in Spur 2 und 3 im Gegensatz zur Negativkontrolle in Spur 4 auf Höhe der 100 bp Marker-Bande das Amplifikat der huRNase P. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die isolierte RNA des infizierten und uninfizierten Ansatzes erfolgreich in cDNA umgeschrieben wurde.

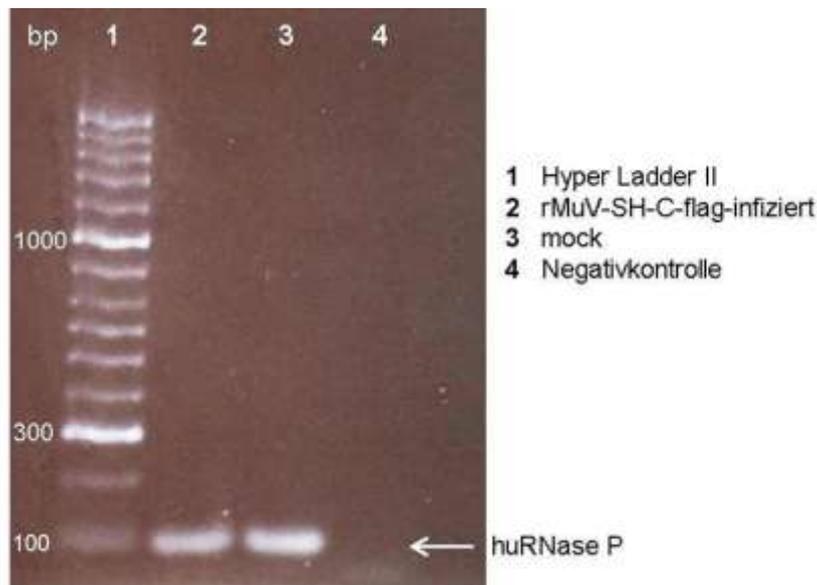


Abb. 9: Kontrolle der Umschreibung in cDNA mittels Agarosegel-Elektrophorese. Die 48 h p.i. isolierte RNA wurde mittels RT² First Strand Kit in cDNA umgeschrieben. Zur Überprüfung dieser Reversen Transkription wurde anschließend eine PCR durchgeführt, die das Gen für die humane RNase P amplifiziert. Die PCR-Amplifikate wurden im 1%igen TAE Agarosegel aufgetrennt und mithilfe eines DNA-interkalierenden Farbstoffes und UV-Licht angefärbt. Die Proben wurden in folgender Reihenfolge aufgetragen: Hyper Ladder II (Spur 1), Amplifikate des rMuV-SH-C-flag-infizierten Ansatzes (Spur 2), Amplifikate des unbehandelten Ansatzes (Spur 3), Negativkontrolle (Spur 4). Die Banden des amplifizierten huRNase P-Fragmentes laufen bei 100 bp.

Ergebnisse

Zur Durchführung des *RT² Profiler PCR Arrays* wurde die erfolgreich umgeschriebene cDNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff (*SYBR Green Dye*)-enthaltenden Mastermix gemischt und mithilfe einer Multi-Kanal-Pipette auf die 96-Lochplatte pipettiert. Diese wurde anschließend verschlossen, zentrifugiert und im *Cycler ABI 7500* vermessen (Kapitel 6.3.5.1). Mithilfe der *Cycler*-Software wurde anhand der Farbstoff-Fluoreszenz für jedes untersuchte Gen ein Schwellenzyklus C_T (threshold cycle) berechnet. Dieser Wert definiert den Punkt, an dem die Amplifikationskurve einen Schwellenwert übertritt und somit eine statistisch signifikante Erhöhung der Amplifikationsprodukte detektiert wird (Abschnitt 6.3.5.2).

Zur Überprüfung der Qualität des Versuches enthielt das *RT² Profiler PCR Array* weitere Kontrollen (Kapitel 6.3.5.3). Um eine Kontamination mit genomischer DNA ausschließen zu können, wurden die C_T -Werte der HGDC (genomische DNA-Kontrolle) für beide Ansätze, infiziert und unbehandelt, bestimmt. Da diese über 35 lagen, ist eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen. Die Effizienz der PCR wurde durch die Ermittlung des C_T^{PPC} -Durchschnittswertes bestimmt, der für beide Ansätze bei 19,8 bzw. 19,2 lag. Die PCR wurde somit als effizient bewertet. Die Kontrolle der Reversen Transkription anhand Formel (4) $\Delta C_T = AVG C_T^{RTC} - AVG C_T^{PPC}$ ergab für beide Platten einen Wert von 7 bzw. 6. Da der Wert nach Herstellerangaben kleiner gleich 5 sein soll, lagen möglicherweise Verunreinigungen vor, die den RT-Schritt inhibiert haben könnten. Da allerdings zwischen den Ansätzen „infiziert“ und „mock“ kein Unterschied festgestellt werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Effizienz des RT-Schrittes der mock- bzw. rMuV-SH-C-flag-infizierten Zellen vergleichbar war. Somit wurde angenommen, dass der Vergleich der Genexpression zwischen den Ansätzen aussagekräftig ist.

Entsprechend Abschnitt 6.3.5.2 wurden die Daten des *RT² Profiler PCR Arrays* mittels komparativer $\Delta\Delta C_T$ -Methode analysiert. Dafür wurde eine n-fache Abweichung der normalisierten Schwellenwerte ΔC_T des rMuV-infizierten Ansatzes von der unbehandelten Kontrollgruppe (mock) bestimmt (*fold change*), welche in Abbildung 10 als Balkendiagramm dargestellt ist (C_T -Rohdaten siehe Anhang I und II). Um Artefakte auszuschließen, wurde definiert, dass bei *fold-change*-Werten größer als 1,5 von einer Hochregulation des Gens zu sprechen ist. Eine Herunterregulation wurde in dieser Arbeit nicht betrachtet.

Ergebnisse

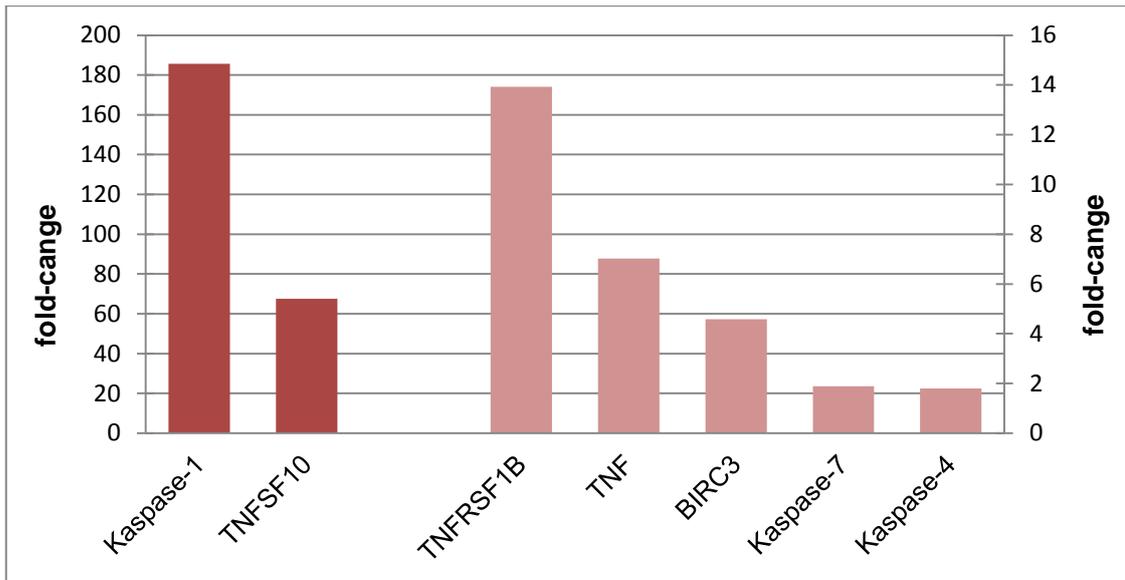


Abb. 10: Darstellung der hochregulierten Apoptose-Gene rMuV-SH-C-flag-infizierter A549 Zellen.

Zum Vergleich der Genexpression infizierter und unbehandelter A549 Zellen wurden die Ergebnisse des RT² Profiler Arrays mittels komparativer Datenanalyse ausgewertet. Abbildung 11 zeigt die errechneten fold-change Werte, also die n-fache Abweichung der normalisierten Schwellenwerte ΔC_T des rMuV-SH-C-flag infizierten Ansatzes von der unbehandelten Kontrolle (mock). Die in dunkelrot dargestellten Balken (Kaspase-1, TNFSF10) beziehen sich auf die Primärachse (0-200), die hellroten Balken (TNFRSF1B, TNF, BIRC3, Kaspase-7 und Kaspase-4) auf die Sekundärachse (0-16).

In abnehmender Intensität wurden folgende Gene hochreguliert: Kaspase-1, TNFSF10 (*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10*), TNFRSF1B (*tumor necrosis factor receptor super family, member 1b*), TNF (*tumor necrosis factor*), BIRC3 (*baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis protein) repeat-containing protein 3*), Kaspase-7 und Kaspase-4. Auffällig ist hierbei die starke Hochregulation der Kaspase-1 sowie TNF-verwandter Faktoren wie TNFSF10. Die Regulation Apoptose-relevanter Gene in MuV-infizierten Zellen belegt somit die Apoptose-induzierenden Eigenschaften des rekombinanten Mumpsvirus.

8. Diskussion

Das Mumpsvirus kodiert wie andere Paramyxoviren für ein kleines, hydrophobes Transmembranprotein (SH-Protein, *small hydrophobic*-Protein) über dessen Funktion bislang wenig bekannt ist. Vorhergehenden Untersuchungen zeigten, dass das SH-Protein für das Wachstum des Virus in Zellkultur nicht essentiell ist, aber eine inhibierende Wirkung auf die TNF- α -induzierte Apoptose und den NF- κ B-Signalweg ausübt [25,27,30,31]. Außerdem konnte bereits etabliert werden, dass rMuV Δ SH-infizierte Zellen verstärkt an TNF- α -induzierter Apoptose sterben. Ein weiterer Vertreter der Paramyxoviridae ist das Simian Virus 5 (SV5), welches ebenfalls für ein SH-Protein kodiert. In rSV5 Δ SH-infizierten Zellen wurde die CPE-Induktion durch das Fehlen des SH-Proteins verhindert [25,29]. Um die Funktion des SH-Proteins bewerten zu können, wurden in der Arbeitsgruppe Mankertz rekombinante Mumpsviren hergestellt, die entweder das SH-Protein exprimieren (rMuV-SH-C-flag) oder dessen Expression durch den Einbau von drei Stopp-Kodons verhindert wird (rMuV-SH-3stop-C-flag) [47]. Diese Viren bieten gegenüber den obengenannten den Vorteil, dass deren Genomstruktur im Vergleich zu den SH-deletierten rMuV Δ SH- und rSV5 Δ SH-Viren unverändert vorliegt. Dies ist wichtig, da Variationen in der Genomstruktur von Paramyxoviren aufgrund ihrer Transkriptionsstrategie in einem veränderten mRNA-Gradienten der viralen Proteine resultieren und somit die Eigenschaften des Virus alleine dadurch geändert werden können. Durch den Vergleich der in unserer Arbeitsgruppe hergestellten Viren ist es möglich, den Einfluss des SH-Proteins auf zelluläre Signalwege im Rahmen einer Virus-Infektion ohne diesen Effekt zu analysieren. In der vorgelegten Arbeit sollte die potentiell anti-apoptotische Eigenschaft des SH-Proteins untersucht werden.

Mittels Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass in Vero und A549 Zellen bei SH-defizienter Virus-Infektion früher Apoptose induziert wird. Weiterhin auffällig war die Beobachtung des verstärkten zytopathischen Effekts rMuV-SH-3stop-C-flag-infizierter A549 Zellen im Gegensatz zu A549 Zellen, die mit rMuV-SH-C-flag infiziert wurden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das SH-Protein die rMuV-bedingte Apoptose-Induktion hemmt.

Es war dennoch ersichtlich, dass der anti-apoptotische Einfluss des SH-Proteins in Vero Zellen stärker zur Geltung kommt als in A549 Zellen. Eine mögliche Ursache dieser Tatsache wird im Folgenden anhand der unterschiedlichen Funktionalität der zellulären Signalwege in den verwendeten Zelllinien erläutert. A549 Zellen, eine humane Zelllinie aus einem alveolaren Karzinom [50], induzierten generell schneller Apoptose als Vero Zellen: Stimulation mit TNF- α und CHX zeigte, dass bereits nach

Diskussion

48 h kein Nachweis des Apoptose-Markers PARP mehr möglich war; die Positivkontrolle musste hier schon nach 24 h genommen werden. Im Gegensatz dazu war in Vero Zellen bis 72 h nach Stimulation das nukleäre Protein mit seinen Spaltprodukten im Western Blot detektierbar. Vero Zellen, immortalisierte Nierenzellen aus der Grünen Meerkatze, werden häufig in der Virologie eingesetzt. Ihre gute Infizierbarkeit ist bedingt durch eine mangelnde Interferon-1-Produktion, wodurch das Virus verspätet von der Zelle erkannt und beseitigt wird [51]. In A549 Zellen hingegen wird die Replikation des Virus durch die intakte Interferon-Antwort der Zelle eingeschränkt. Interferone gehören zu einer Klasse von Proteinen bzw. Glykoproteinen, die eine immunstimulierende und antivirale Wirkung besitzen. Bei Erkennung viraler oder bakterieller Nukleinsäuren werden von der infizierten Zelle Interferone gebildet, welche durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor eine Signalkaskade auslösen (angeborene Immunantwort). Dadurch wird die Genexpression bestimmter Interferon-abhängiger Gene aktiviert, wodurch u.a. Apoptose induziert werden kann. Aufgrund dessen liegt der Zellrasen in A549 Zellen im Gegensatz zu Vero Zellen bereits 48 h nach Stimulation mit TNF- α und CHX vollständig abgebaut vor, wodurch zu diesem Zeitpunkt kein Nachweis von PARP mehr möglich ist. In Vero Zellen wird dieser Effekt durch das fehlende IFN verzögert. Dass sich die Defizienz in den IFN-Genen positiv auf die Virusreplikation sowie Apoptose-unterdrückend auswirkt, zeigt sich auch bei der mikroskopischen Betrachtung des zytopathischen Effekts. Während Vero Zellen bis zu 5 Tage p.i. Synzytien bilden, zeigen A549 Zellen zum gleichen Zeitpunkt eine apoptotische Morphologie: Synzytien sind in A549 Zellen lediglich bis 48 h nach Infektion erkennbar, danach scheint die Infektion sich nicht fortzusetzen; die Synzytien wachsen nicht mehr und die Zellen beginnen sich verstärkt abzukugeln.

Ein Nachweis der viralen Proteine SH-flag und NP in A549 Zellen (MOI 0,01) war vermutlich ebenfalls aus dem bereits angeführten Grund nicht möglich: A549 Zellen vermitteln zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion eine verstärkte Interferon-Produktion, welche die Replikation des Virus verhindert. Dadurch wird das Virus abgebaut, bevor eine ausreichende Konzentration der viralen Proteine vorliegt, um im Western Blot detektierbar zu sein.

Da infizierte Vero Zellen aufgrund der Interferon-Defizienz später als A549 Zellen Apoptose induzieren und eine bessere bzw. längere Replikation des Virus möglich ist, kann der Einfluss des SH-Proteins auf eine rMuV-bedingte Apoptose-Induktion in Vero Zellen besser untersucht werden. Um das SH-bedingte Hinauszögern der Apoptose in A549 Zellen näher zu charakterisieren, hätten zwischen 24 h und 48 h p.i. weitere Zeitpunkte für eine Probenentnahme eingeführt werden können.

Trotz der geringeren zeitlichen Verzögerung der Apoptose durch das SH-Protein in A549 Zellen, lassen die Apoptose-Kinetiken eine anti-apoptotische Eigenschaft des SH-Proteins in beiden Zelllinien, Vero und A549 Zellen, annehmen. Interessanterweise löst das rMuV-SH-3stop-C-flag Virus eine vermehrte Synzytien-Bildung und somit einen verstärkten zytopathischen Effekt aus. Gleichzeitig wird das N-Protein früher als in rMuV-SH-C-flag-infizierten Zellen exprimiert. Beides spricht für eine schnellere Replikation des SH-defizienten Virus. Das SH-Protein könnte durch Eingreifen in die zellulären Signalwege, eventuell auch andere als Apoptose-induzierende Kaskaden, die Virusreplikation verlangsamen, sodass die Zellen verspätet sterben, beispielsweise durch Apoptose. So könnte die Zeit, die zur Replikation genutzt werden kann, verlängert werden. Auch in vorhergehenden Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass das rMuV-SH-C-flag-Virus in einem infizierten Zellrasen mehr Plaques als das rMuV-SH-3stop-C-flag-Virus bildet und somit einen höheren Virus-Titer aufweist als das SH-defiziente Virus, was für eine länger andauernde Replikation spricht [47]. Der genaue Mechanismus und ob das SH-Protein nur in Apoptose-induzierende, NF- κ B-verknüpfte oder auch in weitere Signalwege eingreift, bleibt zu klären.

Eine sensitive Methode zur Untersuchung des Einflusses des SH-Proteins auf die Apoptose-Induktion in MuV-infizierten Zellen ist das *RT² Profiler PCR Array* (Qiagen). Diese Methode basiert auf einer Echtzeit-PCR, die die Expression von 84 Apoptose-relevanten Genen quantifiziert. In dieser Arbeit sollte zuvor der allgemeine Einfluss des Mumpsvirus auf die zellulären Signalwege während der Apoptose-Induktion analysiert werden, um in anschließenden Arbeiten den genauen Einflusspunkt des SH-Proteins bestimmen zu können. Daher wurde zunächst die Genexpression rMuV-SH-C-flag-infizierter A549 Zellen und unbehandelter A549 Zellen verglichen. Als sehr interessant erwies sich die starke Hochregulation der inflammatorischen Kaspase-1. Diese kann eine Form des programmierten Zelltodes (Pyroptose) induzieren, welcher morphologisch die Charakteristika einer Nekrose aufweist (Membranruptur, Abgabe der zytosolischen Bestandteile in den extrazellulären Raum etc.). Werden invasive Pathogene anhand von PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) spezifisch durch Nod (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-ähnliche Rezeptoren erkannt, kommt es zur Bildung eines - dem Apoptosom entsprechend - Inflammasoms/Pyroptosoms. Die genaue Zusammensetzung des Inflammasoms ist abhängig von dem Aktivator, der die Zusammenlagerung initiiert. Dieses Protein-Oligomer bindet über eine CARD-Domäne (*caspase activation and recruitment domain*) an Pro-Kaspase-1, welche dadurch aktiviert wird und diverse Prozesse als Antwort auf das inflammatorische Signal induzieren kann. Kaspase-1 bewirkt

beispielsweise die Prozessierung von pro-IL-1 β und pro-IL-18 [36], wobei die Freisetzung von IL-1 β und IL-18 zu einer inflammatorischen Reaktion führt, bei der allerdings im Gegensatz zur Apoptose typische Zielproteine wie PARP1 oder ICAD nicht prozessiert werden [52,53]. Es kommt zur DNA-Fragmentierung und durch die Öffnung von Poren in der Membran werden die Zellen lysiert.

Obwohl Pyroptose hauptsächlich mit bakteriellen Infektionen in Verbindung gebracht wird, induzieren auch manche Viren diese Form des Zelltodes. Beispielsweise konnte für das Nicht-Strukturprotein PB1-F2 des Influenza A Virus (IAV) gezeigt werden, dass es die Sekretion des pyrogenetischen Zytokins IL-1 β induziert, indem das NLRP3-Inflammasom aktiviert wird. Dieser Vorgang ist Kaspase-1 abhängig und trägt zur IAV- ausgelösten Inflammation bei. PB1-F2 scheint ein Gefahren-Signal für die Zelle darzustellen, welches vom angeborenen Immunsystem erkannt wird. Das NLRP3-Inflammasom war in diesen Untersuchungen außerdem für die Produktion des NF- κ B-abhängigen, inflammatorischen Zytokins TNF- α nötig [54], welches auch in MuV-infizierten Zellen hochreguliert wird.

Apoptose findet üblicherweise in Abwesenheit von Kaspase-1 statt, es besteht jedoch die Möglichkeit, dass es zu einer Kreuz-Aktivierung apoptotischer Kaspasen durch Kaspase-1 kommt. Massenspektrometrische Analysen haben die Effektor-Kaspase-7 als Substrat von Kaspase-1 identifiziert. Interessanterweise war Kaspase-7 in rMuV-SH-C-flag-infizierten A549 Zellen 1,9-fach hochreguliert. Diese Kaspase wird nicht zur Induktion von Pyroptose benötigt, spielt aber während der Apoptose eine wichtige Rolle [55]. Zellen, die Kaspase-1 exprimieren, aber keine Pyroptose induzieren, könnten über eine Aktivierung der Kaspase-7 durch Kaspase-1 Apoptose induzieren [36]. Die Beobachtungen, dass neben der hochregulierten Genexpression der inflammatorischen Kaspasen-1 und -4 auch die Effektor-Kaspase-7 deutlich erhöht und im Gegensatz zur Pyroptose eine Apoptose-spezifische PARP-Spaltung detektierbar war, sprechen dafür, dass auch in A549 Zellen eine Mumpsvirus-bedingte Apoptose durch Kreuzaktivierung der Kaspasen jedoch keine Pyroptose induziert wird. Über die Funktion der um den Faktor 1,8 hochregulierten inflammatorischen Kaspase-4 ist bislang wenig bekannt [36], allerdings konnte in UVB-bestrahlten Keratinozyten gezeigt werden, dass die Expression von Kaspase-4 für die Aktivierung von Kaspase-1 essentiell ist und Kaspase-1 somit ein Substrat der Kaspase-4 darstellt [56]. Die Vermutung, dass eine MuV-bedingte Apoptose-Induktion durch Kreuzaktivierung der Kaspasen eingeleitet und ob in A549 Zellen tatsächlich Pyroptose induziert oder umgangen wird, muss jedoch in weiteren Arbeiten und mithilfe zusätzlicher Assays, z.B. FACS-Analysen (*fluorescence activated cell sorting*), verifiziert werden. Da sich während der Pyroptose im Gegensatz zur Apoptose Poren in der Membran öffnen,

können Farbstoffe wie Propidiumiodid (PI) in die Zelle gelangen, sich zwischen den Basen der Nukleinsäuren einlagern und auf diese Weise die Zellen anfärben. Der Nukleinsäureinkalator kann jedoch nicht die intakte Membran lebender oder apoptotischer Zellen durchdringen, welches sich in der Durchflusszytometrie zur Diskriminierung der Zellviabilität oder zur Unterscheidung pyroptotischer von apoptotischen Zellen zunutze gemacht wird [36]. Die Wahl eines geeigneten Zeitpunktes für das Anfärben der Zellen ist bei diesem Assay entscheidend.

Weiterhin zeigte das *RT² Profiler PCR Array* eine Hochregulation TNF-verwandter Gene (TNF, TNFRSF1B und TNFSF10). TNF- α ist ein multifunktionales Zytokin, welches u.a. an der Immunantwort, Inflammation und Apoptose beteiligt ist. Die biologischen Effekte von TNF- α werden hauptsächlich durch den TNF-Rezeptor 1 vermittelt. Ein vielfach untersuchter Signalweg, der durch die Bindung von TNF- α an seinen Rezeptor angeregt wird, ist die Stimulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B. TNF- α kann weiterhin als autokrines Zytokin seine eigene Expression beeinflussen und bei Überschreiten eines kritischen Wertes die TNF- α -abhängige Apoptose auslösen. Weiterhin ist bekannt, dass eine Stimulation von A549 Zellen mit TNF- α zu einem erhöhten mRNA- und Proteinlevel an Kaspase-1 führt. Das Zytokin kann folglich die Genexpression von Kaspase-1 induzieren, der genaue Mechanismus ist allerdings nicht bekannt [57]. Die in dieser Arbeit ermittelte Hochregulation der Gene für TNF und TNFRSF1B lässt eine TNF- α -induzierte Apoptose in MuV-infizierten Zellen vermuten, die mit der Regulation und Expression der Kaspase-1 verknüpft ist.

Interessant war weiterhin die 68-fache Hochregulation des Liganden TNFSF10 (TRAIL, *TNF related apoptosis-inducing ligand*), welcher in den meisten normalen Geweben in einer signifikanten Menge produziert wird, diese Zellen aber nicht zu töten scheint. Im Gegensatz dazu induziert TNFSF10 vorzugsweise in Tumor-Zellen Apoptose [58]. TNFSF10 fungiert u.a. als Ziel-Gen des Tumorsuppressor-Proteins p53 und könnte so eine zentrale Rolle während der p53-vermittelten Apoptose-Induktion spielen. Um die Proliferation einer entarteten Zelle zu verhindern, wird p53 durch DNA-schädigende Reize mittels ATM-Kinase phosphoryliert und somit aktiviert. Um das Wachstum der Zelle zu unterdrücken, wird der Zellzyklus arretiert und die DNA-Schädigung behoben. Erweist sich diese jedoch als irreparabel, kommt zur Induktion des programmierten Zelltodes [59]. Es wäre also denkbar, dass eine Schädigung der Zelle durch MuV-Infektion ein Signal für die Regulation von p53 darstellt, welches wiederum die Expression von TNFSF10 hochreguliert. Bindung von TNFSF10 an seinen Rezeptor kann die Aktivierung der MAP-Kinase8/JNK, Kaspase-8 und Kaspase-3 induzieren und somit Apoptose auslösen [58].

Diskussion

Interessanterweise wurde in vorhergehenden Arbeiten bereits gezeigt, dass das SH-Protein mit dem TNFR1 interagiert [26] und die NF- κ B-Aktivierung und somit die Sekretion von TNF- α hemmt [31]. Abschließend kann also gesagt werden, dass das SH-Protein Protein spezifisch in die durch MuV induzierten, TNF-vermittelten Apoptose-Mechanismen eingreift und somit die MuV-bedingte Apoptose-Induktion verzögert, welches einhergehend mit den anfänglich beschriebenen Ergebnissen ist. Die Fähigkeit einer Wirtszelle eine Infektion zu erkennen, ist entscheidend für die Vernichtung des Virus. Die bei einer Mumpsvirus-Infektion ablaufenden zellulären Mechanismen sind sehr komplexe Vorgänge, für deren Verständnis es weiterer Forschung bedarf. So kann zum Beispiel die Hochregulation des Apoptose-inhibierenden Faktors BIRC3 im Zusammenhang mit einer MuV-Infektion in A549 Zellen bislang nicht erklärt werden [60]. Um dieses Ergebnis in den Kontext MuV-bedingter Veränderungen der zellulären Signalwege zu bringen, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Zum Ausschluss anderer Zelllinien-spezifischer Gegebenheiten, könnte im Folgenden eine quantitative PCR mit ausgewählten Apoptose-Genen (Kaspase-1, TNF, TNFSF10 etc.) für eine weitere Zelllinie, z.B. Vero Zellen, durchgeführt werden. Interessant wäre weiterhin ein Vergleich der Genexpression rMuV-SH-C-flag- und rMuV-SH-3stop-C-flag-infizierter Zellen, um die anti-apoptotische Eigenschaft des SH-Proteins auch im Microarray zu verifizieren und den daran beteiligten Mechanismus aufzuklären. Hierbei könnte spezifisch die Expression von TNF untersucht werden, da aufgrund der anti-apoptotischen Eigenschaften des SH-Proteins eine Herunterregulation auf mRNA-Ebene zu vermuten wäre.

Abkürzungsverzeichnis

ABL1	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ACTB	<i>Actin beta</i>
AIFM1	<i>apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1</i>
AKT1	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AVG	<i>average</i>
B2M	<i>beta-2-microglobulin</i>
BAD	<i>BCL2-associated agonist of cell death</i>
BAG1	<i>BCL2-associated athanogene</i>
BAG3	<i>BCL2-associated athanogene 3</i>
BAK1	<i>BCL2-antagonist/killer 1</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL10	<i>B-cell CLL/lymphoma 10</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BCL2A1	<i>BCL2-related protein A1</i>
BCL2L1	<i>BCL2-like 1</i>
BCL2L10	<i>BCL2-like 10</i>
BCL2L11	<i>BCL2-like 11</i>
BCL2L2	<i>BCL2-like 2</i>
BFAR	<i>bifunctional apoptosis regulator</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIK	<i>BCL2-interacting killer</i>
BIRC2	<i>baculoviral IAP repeat containing 2</i>
BIRC3	<i>baculoviral IAP repeat containing 3</i>
BIRC5	<i>baculoviral IAP repeat containing 5</i>
BIRC6	<i>baculoviral IAP repeat containing 6</i>
BNIP2	<i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2</i>
BNIP3	<i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>
BNIP3L	<i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like</i>
bp	Basenpaare
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise

Abkürzungsverzeichnis

CARD	caspase-associated recruitment domain
CASP	Kaspase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFLAR	<i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i>
CH	Schweiz
CHX	Cycloheximid
CIDEA	<i>cell death-inducing DFFA-like effector a</i>
CIDEB	<i>cell death-inducing DFFA-like effector b</i>
cLSM	konfokales Laserscanmikroskop
cm ²	Quadratcentimeter
CPE	zytopathischer Effekt
CRADD	<i>CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain</i>
CYCS	<i>Cytochrome c, somatic</i>
D	Deutschland
DAPI	4',6'-Diamidin-2-phenylindol
DAPK1	<i>death-associated protein kinase 1</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DD	<i>death domain</i>
DFFA	<i>DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide</i>
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIABLO	<i>Diablo, IAP-binding mitochondrial protein</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
etc.	et cetera
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
Fas	<i>Fatty acid synthetase</i>
FasLG	Fas Ligand
FasR	Fas Rezeptor
FKS	fetales Kälberserum
for	forward
F-Protein	Fusionsprotein
g	Gramm
GADD45A	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>

Abkürzungsverzeichnis

GOI	<i>gene of interest</i>
h	Stunde
HGDC	<i>human genomic DNA control</i>
HKG	<i>housekeeping gene</i>
HN-Protein	Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein
HPRT1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
HRK	<i>Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)</i>
HRP	horseradish peroxidase
huRNase P	humane RNase P
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
IAV	Influenza A Virus
ICAD	<i>inhibitor of caspase activated DNase or DNA fragmentation factor</i>
IFA	Immunfluoreszenz Assay
IFN	Interferon
IGF1R	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IgG	Immunglobulin G
IKK α/β	I κ B (inhibitor of NF κ B) Kinase
IL	Interleukin
JL	Jeryl Lynn
l	Liter
L-Protein	<i>large-Protein</i>
LTA	<i>lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)</i>
LTBR	<i>lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)</i>
m	milli
mA	milli Ampere
MCL1	<i>myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)</i>
μ	mikro
MMR	Masern, Mumps, Röteln
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
M-Protein	Matrix-Protein
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
MuV	Mumpsvirus
n	nano
NAIP	<i>NLR family, apoptosis inhibitory protein</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NOD1	<i>nucleotide-binding oligomerization domain containing 1</i>

Abkürzungsverzeichnis

NOL3	<i>nucleolar protein 3</i>
N-Protein	Nukleokapsid-Protein
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline</i> mit Tween
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	post infectionem (nach einer Infektion)
PI	Propidiumiodid
PIV5	Parainfluenzavirus Typ 5
POD	Peroxidase
PPC	<i>positive PCR control</i>
P-Protein	Phosphoprotein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PYCARD	<i>PYD and CARD domain containing</i>
rev	<i>reverse</i>
RIP	<i>receptor-interacting protein</i>
RIPK2, RIP2	<i>receptor-interacting serine-threonine kinase 2</i> , entspricht CARD3
rMuV	rekombinantes Mumpsvirus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPLP0	<i>ribosomal protein, large, P0</i>
rSV5	rekombinantes Simian Virus 5
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT	<i>real time</i>
RTC	<i>reverse transcription control</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH-Protein	<i>small hydrophobic</i> Protein
SV5	Simian Virus 5
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TP53	Tumorprotein 53

Abkürzungsverzeichnis

TP73	Tumorprotein 73
TP53BP2	<i>Tumor protein p53 binding protein, 2</i>
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TRADD	<i>TNF receptor 1A-associated death domain</i>
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
TRAF3	<i>TNF receptor-associated factor 3</i>
TRAIL	<i>TNF related apoptosis-inducing ligand</i>
TRIS	Trihydroxymethylendiamin
U	unit
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UK	Großbritannien
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	ultraviolett
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>

Anhang

Tab. I: Übersicht der C_T- und fold-change Werte der hochregulierten Gene

Gen	Versuch 1			Versuch 2			Ø
	C _T (infiziert)	C _T (mock)	fold- change	C _T (infiziert)	C _T (mock)	fold- change	
BIRC3	24,75341	27,1120	3,11386	22,92546	25,5289	6,06161	4,587738
CASP-4	26,44620	27,9653	1,74009	24,67401	25,5623	1,84625	1,793175
CASP-7	25,71928	27,2030	1,69791	24,08175	25,1383	2,07456	1,886239
TNF	32,14882	36,3929	4,38084	31,72214	35	9,67379	7,027324
TNFRSF1B	31,95479	36,2395	5,01148	29,35274	33,8703	22,8451	13,92829
TNFSF10	25,81668	31,9369	42,2317	24,42746	30,9682	92,8619	67,54686
CASP-1	27,57086	36,8298	104,631	25,9582	34,0200	266,508	185,5699

Tab. II: Übersicht der C_T-Werte der HKG und Kontrollen

Gen	Versuch 1		Versuch 2	
	C _T (infiziert)	C _T (mock)	C _T (infiziert)	C _T (mock)
ACTB	18,57181549	18,93834877	17,58622169	17,13244629
B2M	20,53974152	23,57517624	18,3900032	21,32160759
GAPDH	19,07387352	19,36730385	17,88810158	17,3783989
HPRT1	25,23941422	25,35545158	23,70378304	23,39483452
RPLP0	18,89974976	18,68814659	18,44576263	16,80543709
HDGC	35,72277451	37,55689621	38,01682663	Undetermined
RTC	27,22880936	26,95895195	26,0074482	25,90418053
RTC	27,47087479	27,03393936	26,110672	26,28629875
RTC	27,35290909	27,1774292	26,11133957	26,33559799
PPC	19,80970955	19,81377792	19,25395966	19,13638306
PPC	19,75493431	19,75618553	19,16663742	19,1388092
PPC	19,84222794	19,79684448	19,27910805	19,00620651
ØPPC	19,8	19,8	19,2	19,1

Literatur

1. **Hviid A, Rubin S, Muhlemann K.** 2008. Mumps. *Lancet* **371**:932-44.
2. **Richardson M, Elliman D, Maguire H, Simpson J, Nicoll A.** 2001. Evidence base of incubation periods, periods of infectiousness and exclusion policies for the control of communicable diseases in schools and preschools. *Pediatr Infect Dis J* **20**:380-91.
3. **Ennis FA, Jackson D.** 1968. Isolation of virus during the incubation period of mumps infection. *J Pediatr* **72**:536-7.
4. **WHO.** 2012. Weekly epidemiological record. **87**.
5. **Philip RN, Reinhard KR, Lackman DB.** 1959. Observations on a mumps epidemic in a virgin population. *Am J Hyg* **69**:91-111.
6. **Morrison JC, Givens JR, Wiser WL, Fish SA.** 1975. Mumps oophoritis: a cause of premature menopause. *Fertil Steril* **26**:655-9.
7. **Modrow SF, Dietrich; Truyen, Uwe; Schätzl, Hermann.** 2010. Molekulare Virologie: Spektrum Akademischer Verlag.
8. **Watson JC, Hadler SC, Dykewicz CA, Reef S, Phillips L.** 1998. Measles, mumps, and rubella--vaccine use and strategies for elimination of measles, rubella, and congenital rubella syndrome and control of mumps: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* **47**:1-57.
9. **WHO.** 2007. Weekly epidemiological record.51-4.
10. **Ong G, Goh KT, Ma S, Chew SK.** 2005. Comparative efficacy of Rubini, Jeryl-Lynn and Urabe mumps vaccine in an Asian population. *J Infect* **51**:294-8.
11. **Sugiura A, Yamada A.** 1991. Aseptic meningitis as a complication of mumps vaccination. *Pediatr Infect Dis J* **10**:209-13.
12. **Cizman M, Mozetic M, Radescek-Rakar R, Pleterski-Rigler D, Susec-Michieli M.** 1989. Aseptic meningitis after vaccination against measles and mumps. *Pediatr Infect Dis J* **8**:302-8.
13. **da Cunha SS, Rodrigues LC, Barreto ML, Dourado I.** 2002. Outbreak of aseptic meningitis and mumps after mass vaccination with MMR vaccine using the Leningrad-Zagreb mumps strain. *Vaccine* **20**:1106-12.
14. **Sugg WC, Finger JA, Levine RH, Pagano JS.** 1968. Field evaluation of live virus mumps vaccine. *J Pediatr* **72**:461-6.
15. **Miller E, Andrews N, Stowe J, Grant A, Waight P and others.** 2007. Risks of convulsion and aseptic meningitis following measles-mumps-rubella vaccination in the United Kingdom. *Am J Epidemiol* **165**:704-9.
16. **Amexis G, Rubin S, Chizhikov V, Pelloquin F, Carbone K and others.** 2002. Sequence diversity of Jeryl Lynn strain of mumps virus: quantitative mutant analysis for vaccine quality control. *Virology* **300**:171-9.
17. **Okazaki K, Tanabayashi K, Takeuchi K, Hishiyama M, Okazaki K and others.** 1992. Molecular cloning and sequence analysis of the mumps virus gene encoding the L protein and the trailer sequence. *Virology* **188**:926-30.
18. **Rubin SA, Link MA, Sauder CJ, Zhang C, Ngo L and others.** 2012. Recent mumps outbreaks in vaccinated populations: no evidence of immune escape. *Journal of virology* **86**:615-20.
19. **Elango N, Varsanyi TM, Kovamees J, Norrby E.** 1988. Molecular cloning and characterization of six genes, determination of gene order and intergenic sequences and leader sequence of mumps virus. *J Gen Virol* **69 (Pt 11)**:2893-900.
20. **Elliott GD, Yeo RP, Afzal MA, Simpson EJ, Curran JA and others.** 1990. Strain-variable editing during transcription of the P gene of mumps virus may lead to the generation of non-structural proteins NS1 (V) and NS2. *J Gen Virol* **71 (Pt 7)**:1555-60.

21. **Orvell C, Teclé T, Johansson B, Saito H, Samuelson A.** 2002. Antigenic relationships between six genotypes of the small hydrophobic protein gene of mumps virus. *J Gen Virol* **83**:2489-96.
22. **Johansson B, Teclé T, Orvell C.** 2002. Proposed criteria for classification of new genotypes of mumps virus. *Scand J Infect Dis* **34**:355-7.
23. **Muhlemann K.** 2004. The molecular epidemiology of mumps virus. *Infect Genet Evol* **4**:215-9.
24. **Lamb RAK, D.** 2001. Paramyxoviridae: The viruses and their replication: Fields Virology.
25. **Wilson RL, Fuentes SM, Wang P, Taddeo EC, Klatt A and others.** 2006. Function of small hydrophobic proteins of paramyxovirus. *Journal of virology* **80**:1700-9.
26. **Bergmann T.** 2011. Analyse der Interaktion des kleinen, hydrophoben Proteins (SH-Protein) des Mumpsvirus mit dem Rezeptor für TNF- α . Robert Koch-Institut: Freie Universität Berlin.
27. **Takeuchi K, Tanabayashi K, Hishiyama M, Yamada A.** 1996. The mumps virus SH protein is a membrane protein and not essential for virus growth. *Virology* **225**:156-62.
28. **He B, Lin GY, Durbin JE, Durbin RK, Lamb RA.** 2001. The SH integral membrane protein of the paramyxovirus simian virus 5 is required to block apoptosis in MDBK cells. *Journal of virology* **75**:4068-79.
29. **Xu P, Li Z, Sun D, Lin Y, Wu J and others.** 2011. Rescue of wild-type mumps virus from a strain associated with recent outbreaks helps to define the role of the SH ORF in the pathogenesis of mumps virus. *Virology* **417**:126-36.
30. **Lin Y, Bright AC, Rothermel TA, He B.** 2003. Induction of apoptosis by paramyxovirus simian virus 5 lacking a small hydrophobic gene. *Journal of virology* **77**:3371-83.
31. **Woznik M.** 2012. Analyse der Funktion des SH-Proteins als Virulenzfaktor des Mumpsvirus [Doktorarbeit]. Robert Koch-Institut: Freie Universität Berlin.
32. **Elmore S.** 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**:495-516.
33. **Norbury CJ, Hickson ID.** 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**:367-401.
34. **MacFarlane M.** 2009. Cell death pathways--potential therapeutic targets. *Xenobiotica* **39**:616-24.
35. **Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA and others.** 1997. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *The Journal of biological chemistry* **272**:26159-65.
36. **Miao EA, Rajan JV, Aderem A.** 2011. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological reviews* **243**:206-14.
37. **Denault JB, Salvesen GS.** 2002. Caspases. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.] Chapter 21*:Unit 21 8.
38. **Smulson ME, Pang D, Jung M, Dimtchev A, Chasovskikh S and others.** 1998. Irreversible binding of poly(ADP)ribose polymerase cleavage product to DNA ends revealed by atomic force microscopy: possible role in apoptosis. *Cancer Res* **58**:3495-8.
39. **Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG.** 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* **53**:3976-85.
40. **Rosenthal DS, Ding R, Simbulan-Rosenthal CM, Vaillancourt JP, Nicholson DW and others.** 1997. Intact cell evidence for the early synthesis, and subsequent late apoptosis-mediated suppression, of poly(ADP-ribose) during apoptosis. *Exp Cell Res* **232**:313-21.
41. **Hsu H, Xiong J, Goeddel DV.** 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**:495-504.
42. **Wajant H.** 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* **296**:1635-6.

Literatur

43. **Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M and others.** 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **14**:5579-88.
44. **Wang X.** 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development* **15**:2922-33.
45. **Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G and others.** 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **23**:2861-74.
46. **Chinnaiyan AM.** 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* **1**:5-15.
47. **Franz S.** 2012. Analyse der Funktion des SH-Proteins des Mumpsvirus durch Erzeugung rekombinanter Viren: Freie Universität Berlin.
48. **Wiegand M.** 2010. Die Rolle des SH-Proteins des Mumpsvirus als antiapoptotischer Faktor: Etablierung eines Apoptose-Testsystems in Zellkultur. Robert Koch-Institut: Freie Universität Berlin.
49. **Schwarz E.** 2013. Etablierung von Testsystemen zur Charakterisierung der Apoptose-Induktion in Mumpsvirus-infizierten Zellen: Technische Universität Berlin.
50. **Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G.** 1976. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **17**:62-70.
51. **Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE.** 1968. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *Journal of virology* **2**:955-61.
52. **Brennan MA, Cookson BT.** 2000. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Molecular microbiology* **38**:31-40.
53. **Fink SL, Cookson BT.** 2006. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cellular microbiology* **8**:1812-25.
54. **McAuley JL, Tate MD, Mackenzie-Kludas CJ, Pinar A, Zeng W and others.** 2013. Activation of the NLRP3 Inflammasome by IAV Virulence Protein PB1-F2 Contributes to Severe Pathophysiology and Disease. *PLoS pathogens* **9**:e1003392.
55. **Lamkanfi M, Kanneganti TD, Van Damme P, Vanden Berghe T, Vanoverberghe I and others.** 2008. Targeted peptidecentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **7**:2350-63.
56. **Sollberger G, Strittmatter GE, Kistowska M, French LE, Beer HD.** 2012. Caspase-4 is required for activation of inflammasomes. *J Immunol* **188**:1992-2000.
57. **Jain N, Sudhakar C, Swarup G.** 2007. Tumor necrosis factor-alpha-induced caspase-1 gene expression. Role of p73. *The FEBS journal* **274**:4396-407.
58. **NCBI.** TNFSF10 tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 [Homo sapiens (human)]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8743>.
59. **Kuribayashi K, Krigsfeld G, Wang W, Xu J, Mayes PA and others.** 2008. TNFSF10 (TRAIL), a p53 target gene that mediates p53-dependent cell death. *Cancer biology & therapy* **7**:2034-8.
60. **NCBI.** BIRC3 baculoviral IAP repeat containing 3 [Homo sapiens (human)]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/330>.