

# **Etablierung von Testsystemen zur Charakterisierung der Apoptose-Induktion in Mumpsvirus-infizierten Zellen**

Bachelorarbeit

von

Elisa Schwarz

(Matr.-nr.: 325123)

angefertigt in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Annette Mankertz  
am Robert Koch-Institut, FG 12

eingereicht am Fachgebiet Angewandte und Molekulare Mikrobiologie des Instituts für  
Biotechnologie, Technische Universität Berlin

Berlin, Mai 2013

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Vera Meyer und PD Dr. Udo Schmidt

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung .....	5
2. Abkürzungsverzeichnis .....	6
3. Einleitung.....	8
3.1 Das Mumpsvirus .....	8
3.3 Die Apoptose.....	12
4. Zielstellung .....	18
5. Arbeitsschema .....	19
6. Material.....	20
6.1 Chemikalien .....	20
6.2 Enzyme.....	20
6.3 Antikörper .....	21
6.4 Medium für eukaryotische Zellen .....	21
6.5 Zellen.....	21
6.6 Viren.....	21
6.7 Puffer und Lösungen .....	22
6.8 Marker .....	23
6.9 Verbrauchsmaterialien .....	23
6.10 Geräte .....	23
6.11 Kits .....	24
6.12 Software und Webseiten.....	24
7. Methoden.....	25
7.1 Auftauen von Zelllinien .....	25
7.2 Kultivierung der Zelllinien.....	25
7.3 Virusanzucht.....	25
7.4 Immuncolorimetrischer Assay (ICA).....	26
7.5 Virusinfektion der Zellen .....	27

7.6 Fotodokumentation der Virusinfektion .....	28
7.7 MTS –Viabilitätstest .....	28
7.8 Methoden zum Nachweis der Apoptose-Induktion.....	29
7.8.1 Immunfluoreszenz-Analyse .....	29
7.8.2 Markierung mit fluorophorgekoppeltem Primärantikörper.....	29
7.8.3 Markierung mit Fab-Fragment gekoppelten Antikörpern .....	30
7.8.4 TUNEL-Assay.....	30
7.8.5 Fluoreszenzmikroskopie.....	31
7.8.6 SDS-PAGE und Western Blot.....	32
8. Ergebnisse.....	36
8.1 Etablierung einer Positivkontrolle für Apoptose-Induktion in Vero-Zellen .....	36
8.2 Nachweis von Apoptose durch TUNEL-Assay.....	37
8.3 Nachweis von Apoptose durch M30-Antikörper .....	38
8.4 Nachweis von Apoptose-Induktion mithilfe von PARP-Antikörpern im Western Blot .....	39
8.5 Morphologische Untersuchung von Vero-Zellen nach Apoptose-Induktion.....	40
8.6 Nachweis von Apoptose-Induktion in MuV-infizierten Zellen .....	42
8.6.1 Apoptose-Nachweis bei Infektion mit MuV-Impfstamm Jeryl-Lynn.....	42
8.6.2 Vergleich einer Mumpsvirus-Infektion mit dem MuV-Impfstamm Jeryl-Lynn einem Wildtyp-Isolat des Mumpsvirus .....	43
9. Diskussion .....	51
9.1 Etablierung einer Positivkontrolle für Apoptose-Induktion in Vero-Zellen .....	51
9.2 Nachweis von Apoptose durch TUNEL-Assay.....	52
9.3 Nachweis von Apoptose durch M30-Antikörper .....	52
9.4 Nachweis der Poly(ADP-ribose)-Polymerase als Apoptose-Indikator im Western Blot .....	53
9.4.1 Nachweis der PARP in mit MuV-Impfstamm Jeryl-Lynn-infizierten Zellen.....	53
9.4.2 Vergleich einer Infektion mit MuV-Impfstamm Jeryl-Lynn und einem MuV- Wildtyp-Isolat.....	54

9.4.3 Vergleich des Infektionsverlaufs rekombinanter MuV-Stämme mit und ohne exprimiertes SH-Protein.....	55
10. Ausblick.....	57
11. Literaturverzeichnis .....	58
12. Eidesstattliche Erklärung.....	63
13. Danksagung .....	64

# 1. Zusammenfassung

Das Mumpsvirus, welches zur Familie der Paramyxoviren gehört, kodiert für ein kleines hydrophobes Protein (SH-Protein), welchem antiapoptotische Eigenschaften zugeschrieben werden (Wilson *et al.*, 2006). In Zellkulturüberständen einer Infektion mit einer SH-defizienten Rekombinante vom Parainfluenzavirus 5, welcher zur gleichen Familie wie das Mumpsvirus gehört, konnte eine erhöhte Konzentration des Zytokins Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), welches zu den Hauptauslösern des programmierten Zelltods zählt, festgestellt werden. Auch eine verstärkte Aktivierung von NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*), einem Transkriptionsfaktor für TNF $\alpha$ , konnte bereits detektiert werden (Lin *et al.*, 2003). Somit liegt die Vermutung nahe, dass das SH-Protein den TNF $\alpha$ -induzierten Apoptoseweg inhibiert und somit die Induktion der Apoptose der infizierten Zellen hinauszögert, was dem Mumpsvirus einen längeren Zeitraum für die Replikation verschafft (Wilson *et al.*, 2006).

Die Induktion des programmierten Zelltodes durch TNF $\alpha$  wurde bereits mittels plasmid-exprimiertem SH-Proteins in HEK293-Zellen untersucht. In diesem transienten System konnte jedoch keine antiapoptotische Wirkung des SH-Proteins detektiert werden, was vermutlich Weise darauf zurückzuführen ist, dass virale Faktoren eine essentielle Rolle spielen und deshalb wurden die folgenden Versuche in der vorliegenden Arbeit im Viruskontext durchgeführt (Wiegand, 2010).

Als erstes konnte eine geeignete Positivkontrolle für die Induktion von Apoptose in Vero-Zellen mittels Stimulation mit Cycloheximid (CHX) und TNF $\alpha$  etabliert werden. Unter Verwendung dieser Kontrolle war es möglich das TUNEL-Assay und den Apoptose-Nachweis mittels M30-Antikörper als Analysemethoden hierfür auszuschließen. Es konnte jedoch auch ein geeignetes Nachweissystems für die Induktion der Apoptose in Mumpsvirus-infizierten Vero-Zellen etabliert werden, wobei es sich hier um den Nachweis des DNA-Reparaturenzyms Poly(ADP-ribose)-Polymerase und dessen Spaltprodukt mittels spezifischen Antikörpern im Western Blot handelt (Li *et al.*, 2000). Somit konnten einerseits ein Impfstamm mit einem Wildtypstamm von Mumps und andererseits eine SH-defiziente Rekombinante mit einer Rekombinante mit intaktem SH-Protein bzgl. der Apoptose-Induktion während des Infektionsverlaufs vergleichend untersucht werden. Dadurch war es möglich die antiapoptotischen Eigenschaften des SH-Proteins während einer Mumpsvirus-Infektion zu belegen und zur Aufklärung bzw. Charakterisierung der Proteinfunktion beizutragen.

## 2. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AK	Antikörper
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
AS	Aminosäure
BP	Blockpuffer
CPE	zytopathischer Effekt
DD	<i>death domain</i>
DG	Deckglas
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FasL	Fas Ligand
F-Protein	Fusionsprotein
HEK293-Zellen	<i>human embryonic kidney 293 Zellen</i>
HN-Protein	Hämagglutinin-Neuroaminidase-Protein
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ICA-Assay	Immunocolorimetrischer Assay
IKK	I $\kappa$ B Kinase Komplexe
I $\kappa$ B	NF- $\kappa$ B Inhibitor
JL	Jeryl-Lynn
kLSM	konfokales Laserscanning Mikroskop
L-Protein	<i>large-Protein</i>
MDA-5	<i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MEKK1	MAPK Kinase 1
MMR	Masern Mumps Röteln
MOI	<i>multiplicity of infection</i>

M-Protein	Matrix-Protein
MuV	Mumpsvirus
NIK	NF- $\kappa$ B Inhibitor Kinase
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	phosphatgepufferter Salzlösung
pfu	<i>plaque forming units</i>
POD	Peroxidase
P-Protein	Phospho-Protein
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
RIG-1	<i>retinoic acid-inducible gene 1</i>
RIP1	<i>receptor interacting protein</i>
RT	Raumtemperatur
SH-Protein	<i>small hydrophobic protein</i>
TRADD	TNF-R1-associated death domain
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
ü. N.	über Nacht

## **3. Einleitung**

### **3.1 Das Mumpsvirus**

#### **3.1.1 Epidemiologie und Pathogenese**

Die Krankheit Mumps wurde bereits im 5. Jahrhundert durch den griechischen Arzt Hippokrates beschrieben. Sie wird durch das Mumpsvirus (MuV) hervorgerufen und bricht circa zwei bis drei Wochen nach Kontakt mit dem Erreger aus. Das Virus verbreitet sich durch Tröpfcheninfektion über die Schleimhaut des Hals-, Nasen- und Rachenraumes, proliferiert in den Epithelzellen und infiziert die dort lokalisierten Lymphozyten. Diese translozieren nun in die Lymphknoten und sind dann in der Lage über die Blutbahn andere Organe zu erreichen. Dadurch reichern sich die Viren z. B. in Pankreas, Speicheldrüsen, Ovarien, Testes und anderen Drüsen an, was zu einer Entzündungsreaktion und schließlich zu einer systematischen Infektion führt (Modrow *et al.*, 2010). Bei einem Drittel der infizierten Personen verläuft die Krankheit asymptomatisch. Bei dem Großteil der symptomatischen Infektionen kommt es vor allem zu einer Entzündung und Schwellung der Ohrspeicheldrüsen (Parotitis), was das typische Erscheinungsbild erkrankter Personen ausmacht.

Zu den Spätfolgen einer Infektion gehört beispielsweise die Schwerhörigkeit durch die Infektion des Innenohrs und Diabetes mellitus nach einer Pankreatitis. Außerdem ist das Virus während einer Virämie in der Lage in die Gehirn- und Rückenmarkshäute einzudringen und in den dortigen Zellen zu replizieren. Dadurch kann es zu einer Meningoenzephalitis oder Meningitis kommen (Modrow *et al.*, 2010).

Eine Mumpsinfektion tritt am häufigsten im Kindesalter von circa 5 Jahren auf und resultiert in einer lebenslangen Immunität, da die 13 verschiedenen Genotypen serologisch monotypisch sind (Hviid *et al.*, 2008, Santos *et al.*, 2008, Jin *et al.*, 2005). Somit bietet die Impfung mit einem Impfstamm ausreichenden Schutz gegen alle anderen Mumpsstämme. Seit den 1970-iger Jahren erfolgt diese mit einem attenuierten Virusstamm, d. h. es handelt sich hierbei um abgeschwächte Viren. In Deutschland wird überwiegend der Mumpsvirus-Stamm Jeryl-Lynn als Impfstamm verwendet.

#### **3.1.2 Virusaufbau**

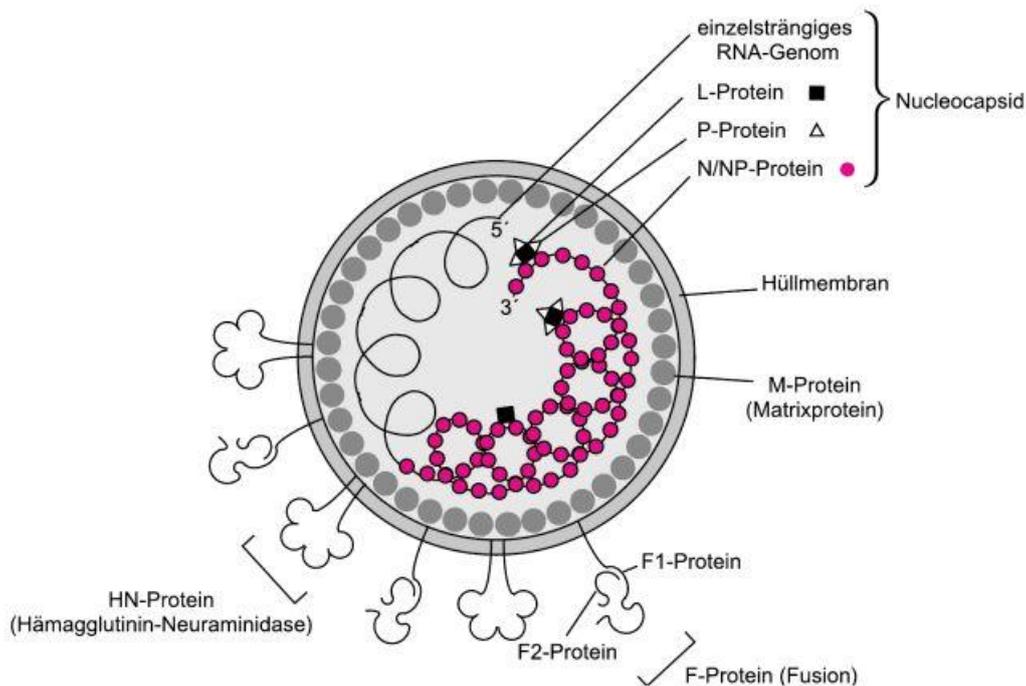
Das MuV gehört zur Familie der Paramyxoviridae und ist dem Genus der Rubulaviren zugeordnet. Es ist ein lipidumhülltes überwiegend sphärisches Virus mit einem Durchmesser von 150-250 nm. Es besitzt ein nichtsegmentiertes Genom aus einzelstängiger RNA in Negativstrangorientierung, welches für neun Proteine in sieben Transkriptionseinheiten

kodiert (Elango *et al.*, 1988). Es weist eine Länge von 15384 Basenpaaren (bp) auf, wirkt nicht als mRNA und ist alleine nicht infektiös.

In Abbildung 1 ist das Mumpsvirus schematisch dargestellt. Das RNA-Genom bildet als Komplex mit dem Nucleocapsid- (N), Phospho- (P) und *large*-Protein (L) das Nucleocapsid, die infektiöse Einheit des Virus. Das Nucleocapsid hat die Form einer linksgängigen Helix von 14 -17 nm Durchmesser, wobei je ein N-Protein mit genau 6 Nukleotiden (nt) der RNA assoziiert ist („*rule of six*“) (Modrow *et al.*, 2010, Kolakofsky *et al.*, 1998). Diese hohe Beladung mit Proteinen bietet der RNA zum einen effektiven Schutz vor Nukleasen und zum anderen ist diese rigide Struktur für die Replikation unerlässlich. Das L-Protein, dessen Proteinsequenz bei allen Paramyxoviren konserviert ist, besitzt die enzymatische Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Um diese Funktion zu erfüllen, benötigt es jedoch das P-Protein und das N-Protein, mit denen es nichtkovalent wechselwirkt.

Das Nucleocapsid ist von einer Lipidmembran umgeben, welche einen Durchmesser von 150-250 nm aufweist. Das M-Protein (Matrixprotein) kleidet die Hüllmembran von innen aus und interagiert mit den N-Proteinen und somit mit dem Nucleocapsid. Die HN-(Hämagglutinin-Neuroaminidase) sind Membranproteine des Typs II, welche in der Hüllemembran verschiedener Paramyxoviren vorkommen und eine spezifische Adsorption der Viruspartikel an der Zelloberfläche der Wirtszelle ermöglichen. Das ebenfalls in die Virusmembran eingelagerte F-Protein (Fusionsprotein) induziert zusammen mit HN die Fusion der viralen mit der zellulären Membran (Modrow *et al.*, 2010).

Zudem kodiert MuV für die Nicht-Strukturproteine V und I (Takeuchi *et al.*, 1990, Xu *et al.*, 2012) und das SH-Protein (*small hydrophobic*-Protein), welches ein kurzes hydrophobes Peptid von 6 kDa ist (Takeuchi *et al.*, 1996).



**Abbildung 1: Aufbau des Paramyxoviruspartikels (Modrow *et al.*, 2010).** Das einzelsträngige negativstrangorientierte RNA-Genom bildet zusammen mit den L-, P- und N-Proteinen das Nucleocapsid. Das Nucleocapsid ist von einer Hüllmembran umgeben, deren Innenseite mit den Matrixproteinen ausgekleidet ist, und in die die beiden Glykoproteine F und HN eingelagert sind.

### 3.1.3 Replikation

Bei einer Infektion mit dem MuV kommt es als erstes zur Adsorption des Virions über das HN-Protein an N-Acetylneuraminsäurereste auf Oberflächenproteinen der Zielzelle. Dadurch nähert sich zum einen die Hüllmembran des Virus der Zytoplasmamembran der Wirtszelle an, zum anderen induziert das HN-Protein eine Konformationsänderung des F-Proteins, sodass der hydrophobe, N-terminale Bereich des F-Proteins (F<sub>1</sub>-Kette) in der Lage ist mit der Plasmamembran zu interagieren und so die pH-unabhängigen Fusion der Membranen einzuleiten, was die Freisetzung des Nucleocapsids ins das Zytoplasma ermöglicht (White, 1990).

Im darauf folgenden Schritt startet das Nucleocapsid-assoziierte L-Protein zusammen mit P- und N-Protein die mRNA-Synthese. Die Transkription beginnt am 3'-Ende des RNA-Genoms (Kingsbury & Masters, 1970). Zwischen den Genabschnitten befinden sich sogenannte Kontrollsequenzen, die einen Transkriptionsstopp nach jedem Gen bewirken. Dadurch überspringt die RNA-Polymerase die intergenischen Bereiche und beginnt mit der Transkription des darauf folgenden Gens (Reinitiation). Jedoch entsteht die mRNA der verschiedenen Gene nicht in äquimolarer Quantität, da Gene, die dem Promotor am nächsten sind, mit der höchsten Frequenz transkribiert werden. Das lässt sich darauf zurück führen,

dass die Reinitiation der Transkription an jeder Gengrenze nicht immer stattfindet (Whelan *et al.*, 2004). Die synthetisierte mRNA wird in Proteine translatiert. Sind genügend N-Proteine gebildet, schaltet die mRNA-Synthese um zur Replikation. Die neue virale RNA bildet dann zusammen mit den synthetisierten N-, P-, und L-Proteinen die neuen Nucleocapside. Nach der Modifikation der HN- und F-Proteine im Golgi-Apparat, werden diese in die Plasmamembran der Wirtszelle integriert. Das M-Protein wiederum ist in der Lage mit den zytoplasmatischen Bereichen des HN- und F-Proteins und mit den N-Proteinen des Nucleocapsids zu interagieren (Li *et al.*, 2009). Infolgedessen lagern sich die Nucleocapside an der Innenseite der Plasmamembran an, die Membran stülpt sich aus und die neu synthetisierten Viruspartikel werden durch Abknospung freigesetzt (Takimoto & Portner, 2004, Schmitt *et al.*, 2002).

### **3.2 Das SH-Protein**

Dieses 57 Aminosäuren große Protein ist ein Typ II Transmembranprotein, bei denen sich der N-Terminus auf der extrazellulären Seite befindet (Bergmann, 2011, Elango, 1989). Das kodierende Gen wurde 1988 im Genom des Mumpsvirus zwischen den Genen für das F- und HN-Protein entdeckt (Elango *et al.*, 1988). Auch andere Paramyxoviren, wie das Parainfluenzavirus 5 (PIV5) und das respiratorische Synzytialvirus (RSV) besitzen Gene, die für ein SH-Protein kodieren, welche aber untereinander keine Sequenzhomologien aufweisen. Das SH-Gen ist der variabelste Teil des Mumps-Genoms, weshalb es zur Genotypisierung der verschiedenen Mumpsstämme, also zur Einteilung in die 13 unterschiedliche Genotypen (A bis M), genutzt wird (Santos *et al.*, 2008, Jin *et al.*, 2005). Bisher konnte das Mumps-SH-Protein weder als Bestandteil der Virionen nachgewiesen, noch an der Zelloberfläche detektiert werden. In transfizierten eukaryotischen Zellen wurde eine Lokalisierung des Proteins im Endoplasmatischen Retikulum (ER) festgestellt (Woznik, 2012). Für die Replikation in Zellkultur scheint das SH-Protein nicht essentiell zu sein, jedoch ist über die Notwendigkeit für die Replikation im Tiermodell noch wenig bekannt (Takeuchi *et al.*, 1996). Es besteht die Vermutung, dass das SH-Protein antiapoptotische Eigenschaften in infizierten Zellen besitzt. Hierzu wurde in Zellkultur ein rekombinantes Parainfluenza Virus 5, dem das SH-Gen fehlt (PIV5 $\Delta$ SH), mit dem Wildtypvirus verglichen. Das PIV5 $\Delta$ SH wies einen erhöhten zytopathischen Effekt (CPE) auf, wobei eine zusätzliche Expression des PIV5-SH-Proteins eine Erhöhung des CPEs in PIV5 $\Delta$ SH infizierten Zellen unterdrückt (Lin *et al.*, 2003, He *et al.*, 2001). Ähnliches wurde auch für das MuV-SH-Protein beobachtet (Wilson *et al.*, 2006). Da eine gesteigerte Apoptose-Rate den CPE erhöht, lässt sich daraus schlussfolgern,

dass die bei SH-Expression verminderte Induktion des CPEs auf eine Inhibition der Apoptose durch das SH-Protein zurückzuführen ist. Die dadurch entstehende Verzögerung des Absterbens der Wirtszelle könnte sich als wesentlicher Vorteil für das Virus herausstellen, da es mehr Zeit hat um in der infizierten Zelle zu replizieren.

### **3.3 Die Apoptose**

Der Begriff der Apoptose definiert den genetischen Zelltod durch den Zellen gezielt abgebaut und entsorgt werden (Lockshin & Williams, 1964). Nach Induktion der Apoptose kommt es in einem ersten Schritt zu Veränderungen der Zellmembran: die Zelle schrumpft und es werden bläschenförmige, membranumhüllte apoptotische Körperchen (apoptotic bodies) abgeschnürt. Dann beginnt das Chromatin zu kondensieren und schließlich zerfällt die DNA in Fragmente (Saraste & Pulkki, 2000). Phagozytierende Zellen wie Makrophagen erkennen die apoptotischen Zellen und nehmen diese auf, um sie zu verdauen. Hierbei kommt es zu keiner Entzündungserscheinung.

An dieser Stelle muss eine eindeutige Abgrenzung zur Nekrose, einer anderen Form des Zelltods, erfolgen, bei der es durch physikalisch oder chemisch bedingte Schädigung zum Anschwellen und Platzen der Zelle kommt. Dadurch wird der Zellinhalt unkontrolliert in Umgebung abgegeben, was zu einer Entzündungsreaktion und zur Schädigung des umliegenden Gewebes führt (Van Cruchten & Van Den Broeck, 2002).

Durch den apoptotischen Zelltod erfolgt die Kontrolle der Zellanzahl in einem Gewebe. Ein Beispiel dafür stellt der Abbau der Interdigitalhäute zwischen Fingern und Zehen während der Entwicklung von vielzelligen Organismen dar (Zuzarte-Luis & Hurlé, 2002). Auch entartete Zellen, wie Tumorzellen, virusinfizierte Zellen oder Zellen mit irreparabel geschädigter DNA werden so unschädlich gemacht (Rahmann & McFadden, 2006). Defekte im Apoptoseprozess sind somit Auslöser schwerer Erkrankungen, wie z.B. von Tumoren oder auch des Diabetes mellitus Typ I, bei dem autoreaktive T-Lymphozyten  $\beta$ -Zellen des Pankreas, welche das benötigte Insulin produzieren, durch Apoptose zerstören (Masharani & Becker, 2010).

#### **3.3.1 Molekulare Mechanismen der Apoptose**

Die Initiation des programmierten Zelltods kann sowohl durch extrazelluläre als auch intrazelluläre Signale erfolgen.

Zu den extrazellulären gehören Zytokine der TNF (Tumornekrosefaktor)-Superfamilie, wie TNF $\alpha$ , FasL (Fas Ligand) und TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*), die jeweils an ihre spezifischen sogenannten Todesrezeptoren (TNF-Rezeptor, Fas-Rezeptor (CD95) und DR4-Rezeptor) auf der Zelloberfläche binden (Ashkenazi, 2002) und so über den extrinsischen Weg die Apoptose initiieren (Typ I Apoptose). Im Gegensatz dazu wird der intrinsische Weg (Typ II Apoptose) durch intrazelluläre Signale, wie zum Beispiel irreparable Schäden an der DNA, oxidativen Stress oder Toxine in Gang gesetzt (Wang, 2001).

Beide Wege führen zur Aktivierung von speziellen Proteasen, den sogenannten Caspasen, die im aktiven Zentrum ein Cystein besitzen und in der Lage sind Substrate nach einem Aspartatrest zu spalten. Caspasen liegen im Zytosol als inaktive Zymogene (Procaspasen) vor und werden erst durch proteolytische Spaltung aktiviert. Es werden zwei verschiedene Klassen unterschieden: Initiator- und Effektorcaspasen. Die Caspasen 2, 8, 9 und 10 sind den Initiatorcaspasen zuzuordnen, die mit den Todesrezeptoren oder Proteinen des intrinsischen Weges interagieren. Diese aktivieren die Effektorcaspasen 3, 6 und 7, die zum einen in der Lage sind, selbst Zellstrukturen, wie Lamin oder Aktin abzubauen, zum anderen aktivieren sie ihrerseits Caspase-abhängige DNasen, die die Kern-DNA fragmentieren, was letztendlich zum Zelltod führt (Creagh & Martin, 2001).

### **3.3.2 TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose**

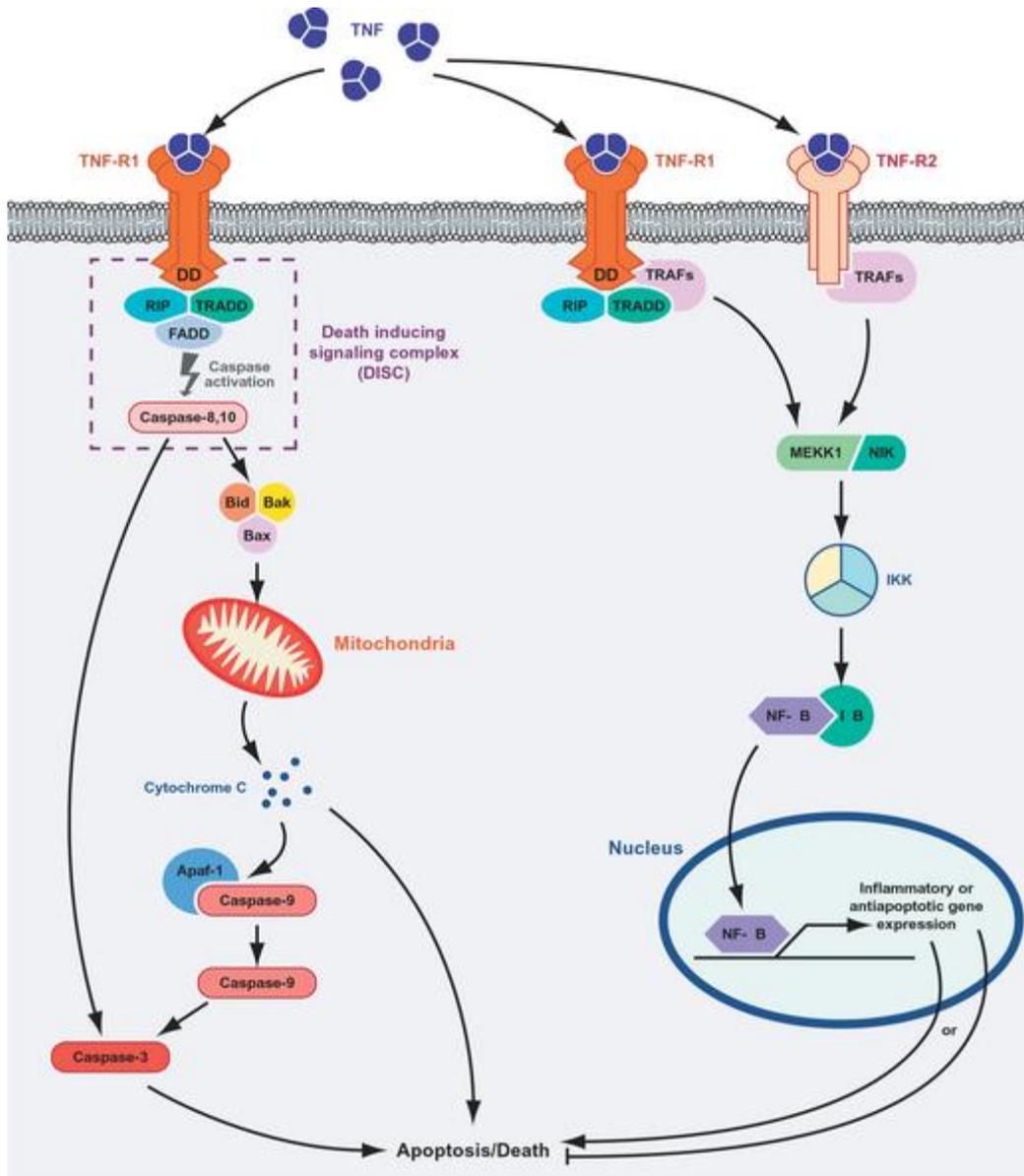
Das Zytokin TNF $\alpha$ , das von Makrophagen, Lymphozyten und Epithelzellen produziert wird, ist in der Lage Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose auszulösen und zählt zu den Apoptose-Induktoren bei der körpereigenen Abwehr gegen Tumore (Modrow *et al.*, 2010, Aggerwald, 2003). Da der TNF $\alpha$ -induzierte Zelltod im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle für eine erfolgreich induzierte Apoptose verwendet wurde und dieser Signalweg gut charakterisiert ist, dient er im Folgenden als exemplarisches Beispiel zur Darstellung des extrinsischen Apoptosewegs.

Als erstes erfolgt die Bindung des TNF $\alpha$ -Homotrimers an den TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1), siehe Abbildung 2. Die daraus folgende Konformationsänderung des Rezeptors ermöglicht die Anlagerung des TNF-R1-associated death domain (TRADD)-Proteins an die death domain (DD) des Rezeptors. Das TRADD-Protein wiederum rekrutiert über seine eigene DD das Protein RIP1 (*receptor interacting protein*) und das FADD-Protein (Fas-associated death domain). So wird der sogenannte death inducing signaling complex (DISC) gebildet, welcher

nun Caspase-8 durch autokatalytische Prozessierung aktiviert (Micheau & Tschopp, 2003). Infolgedessen wird die Effektorcaspase-3 aktiviert und die Apoptose eingeleitet. Caspase-8 aktiviert außerdem das Bid-Protein (ein Mitglied der Bcl-2 Familie), welches mit den proapoptotischen Proteinen Bax und Bak einen Komplex bildet, der die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran bewirkt, wodurch Cytochrom c in das Zytosol freigesetzt wird (Luo *et al.*, 1998). Dieser Prozess entspricht dem intrinsischen Signalweg und wird daher auch mitochondriale Apoptose genannt. Das freigesetzte Cytochrom c interagiert im Zytosol mit dATP (2'-Deoxyadenosintriphosphat) und dem *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1). Das entstandene Heptamer rekrutiert Procaspase-9, die durch autokatalytische Spaltung aktiviert wird. Cytochrom c, dATP, Apaf-1 und Caspase-9 bilden zusammen das sogenannte Apoptosom und aktivieren die Effektorcaspase-3, was wiederum den Zelltod initiiert.

Neben diesen Varianten der Apoptose-Induktion, aktiviert TNF $\alpha$  auch den NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*)-Signalweg (siehe Abbildung 2). Hierfür interagiert TNFR1, nachdem TNF $\alpha$  gebunden hat, zusätzlich zu TRADD und RIP1 mit dem TNF *receptor associated factor 2* (TRAF2)-Protein, was zur Aktivierung der NF- $\kappa$ B Inhibitor Kinase (NIK) und der MAPK Kinase 1 (MEKK1) führt, welche zusammen I $\kappa$ B Kinase Komplexe (IKK) aktivieren. Diese phosphorylieren wiederum den Inhibitor von NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), welcher anschließend ubiquitiniert und abgebaut wird (Rahman & McFadden, 2006, Karin *et al.*, 2000). Das freigesetzte NF- $\kappa$ B transloziert in den Zellkern und induziert dort die Transkription einer Vielzahl von antiapoptotischen sowie proinflammatorischen Genen, wie beispielsweise von TNF $\alpha$ , was zur Amplifizierung des Signals führt (Coward *et al.*, 2002).

Eine Bindung von TNF $\alpha$  an TNF-R2 verstärkt das von TNF-R1 ausgehende Signal durch zum Beispiel eine zusätzliche Aktivierung von MEKK1 und NIK, wie in Abbildung 2 gezeigt (Rahman & McFadden, 2006).

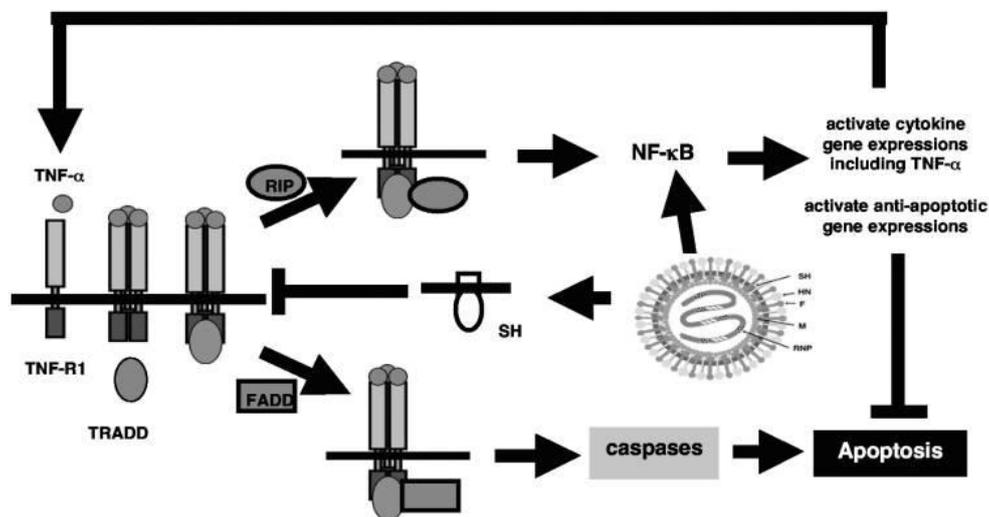


**Abbildung 2: TNF $\alpha$ -vermittelte Signalwege (Rahmann & McFadden, 2006).** Der Prozess der Apoptose wird über die Bindung von TNF $\alpha$  als Ligand an den TNF-Rezeptor 1 eingeleitet und als Signal über den gebildeten DISC-Komplex weitergeleitet. Durch die dadurch aktivierten Caspasen-8 und 10 erfolgt entweder die direkte Aktivierung der Effektorcaspase-3, was zum Zelltod führt oder die Aktivierung von Proteinen der Bcl-2-Familie (Bid, Bak, Bax), was wiederum die Freisetzung von Cytochrom c aus der Mitochondrienmembran auslöst. Über die folgende Signalkaskade, wird das Apoptosom aus Cytochrom c, Apaf-1 und Caspase-9 gebildet, wodurch ebenfalls die Effektorcaspase-3 aktiviert wird, was letztendlich zum Zelltod führt.

Die Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 bilden außerdem den Startpunkt des NF- $\kappa$ B-Signalwegs, welcher durch die Bindung von TRAF Proteinen an die Rezeptoren eingeleitet wird. Dies führt über die Aktivierung von NIK und MEKK und IKK zur Phosphorylierung und Degradierung des Inhibitors von NF- $\kappa$ B I $\kappa$ B, wodurch NF- $\kappa$ B freigesetzt wird, welches nun in den Zellkern transloziert und dort die Transkription von antiapoptotischen und proinflammatorischen Genen wie TNF $\alpha$  führt.

### 3.3.3 Einfluss des SH-Proteins auf TNF $\alpha$ -induzierte Signalwege

Dem SH-Protein des Mumpsvirus werden antiapoptotische Eigenschaften zugeschrieben, da es anscheinend in der Lage ist TNF $\alpha$ -induzierte Signalwege zu hemmen und somit eine Erhöhung der Konzentration an TNF $\alpha$  zu unterbinden (Abbildung 3), jedoch ist der genaue Inhibitionsmechanismus noch nicht bekannt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das SH-Protein die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B verhindert, indem es die Translokation der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 in den Nukleus inhibiert, wodurch die Genexpression der NF- $\kappa$ B kontrollierten Gene nicht induziert wird (Fuentes *et al.*, 2007, Wilson *et al.*, 2006, Lin *et al.*, 2003). Mittels eines transienten Expressionssystems konnte in unserer Arbeitsgruppe der Inhibitionsmechanismus weiter aufgeklärt werden. Es wurde nachgewiesen, dass das SH-Protein die Phosphorylierung des Kinase-Komplexes IKK $\alpha/\beta$ , der den Abbau des Inhibitors von NF- $\kappa$ B vermittelt, verhindert (Woznik, 2012). Dadurch entfallen der Abbau von I $\kappa$ B und die Freisetzung des Transkriptionsfaktors, wodurch dieser nicht in den Zellkern translozieren kann. Zu den NF- $\kappa$ B kontrollierten Genen gehört auch TNF $\alpha$  (siehe Abbildung 3), das in der Lage ist NF- $\kappa$ B im Rahmen einer positiven Rückkopplung zu aktivieren, was zu einer verstärkten Produktion des Zytokins führt.



**Abbildung 3: Funktionsweise des SH-Proteins (Wilson *et al.*, 2006).** Bei einer Virusinfektion wird der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert, was zur Expression des Zytokins TNF $\alpha$  führt. Ein erhöhter Gehalt an TNF $\alpha$  initiiert die Apoptose. Das SH-Protein inhibiert die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und somit die dafür benötigte Amplifikation der Zytokinexpression, sodass vermutlich keine für die Auslösung des Zelltods ausreichende Zytokinmenge exprimiert wird. Bei Abwesenheit des SH-Proteins ist dieser Signalweg nicht unterbrochen und das sich anreichernde Zytokin löst den Zelltod aus.

Bisher konnte das SH-Protein nur in transfizierten Zellen, in der Membran von Golgi-Apparat und ER lokalisiert werden (Takeuchi *et al.*, 1996). Dort ließ sich eine Interaktion zwischen TNFR1, welcher am gleichen Ort detektiert wurde, und dem Protein nachweisen, wobei noch geklärt werden muss, ob die luminale, C-terminale Domäne des SH-Proteins hier die entscheidende Rolle spielt, sowie bereits vermutet wurde (Bergmann, 2011, Wilson *et al.*, 2006).

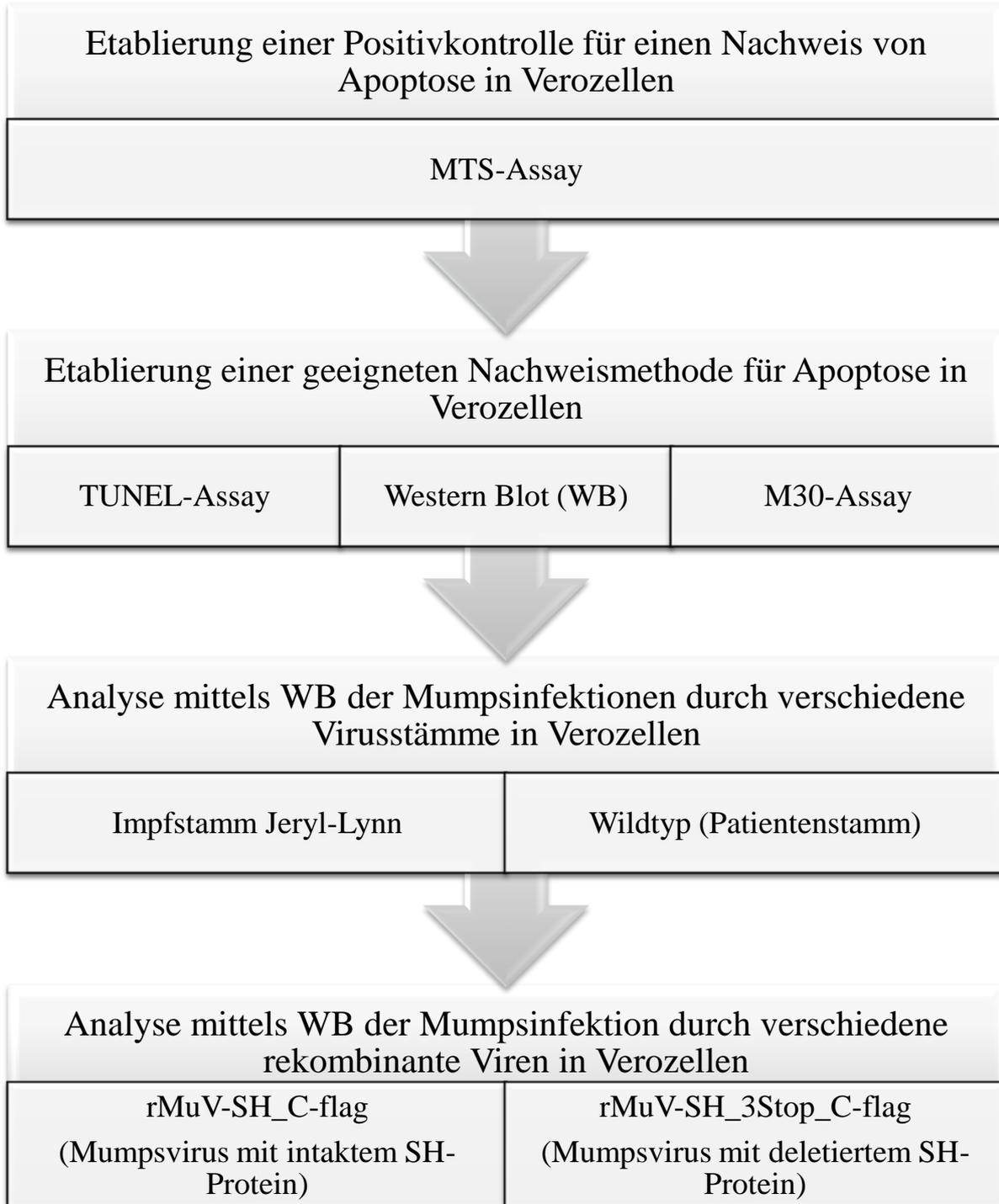
## 4. Zielstellung

Einige Paramyxoviren, wie auch Mumps, besitzen Gene, die für kleines hydrophobes Protein (SH-Protein) kodieren, welches zu den Transmembranproteinen Typ II gezählt wird (Bergmann, 2011). Es scheint für die Replikation nicht essentiell zu sein, aber einen Einfluss auf die Apoptose in virusinfizierten Zellen zu haben, denn bisherige Publikationen zu diesem Thema beschäftigten sich mit der Vermutung, ob das SH-Protein antiapoptotische Eigenschaften besitzt in dem es in die TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose-Induktion als Inhibitor eingreift. Denn bei Infektionen mit rekombinanten Viren, denen das SH-Gen fehlt, konnte im Überstand der Zellkultur eine erhöhte Menge an TNF $\alpha$  und eine zusätzliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B detektiert werden (Wilson *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu kam es bei der Infektion mit dem Wildtypstamm zu keiner Steigerung des Gehalts an TNF $\alpha$  bzw. zu einer verstärkten Aktivierung von Nf- $\kappa$ B, was darauf schließen lässt, dass es hier zu einer Blockierung der TNF $\alpha$ -vermittelten Signalwege gekommen ist.

Um den Einfluss des SH-Proteins auf Zellen, bei denen die Apoptose durch TNF $\alpha$  induziert wurde, zu untersuchen, erfolgte im Fachgebiet 12 des Robert Koch-Instituts die Entwicklung eines transienten Systems, in welchem durch die Kombination aus TNF $\alpha$  und CHX der programmierte Zelltod von HEK293-Zellen eingeleitet und mittels der Transfektion eines SH-Gen-tragenden Plasmids das Protein exprimiert wurde. Allerdings konnte eine antiapoptotische Wirkung des SH-Proteins in diesem System bislang nicht beobachtet werden, was vermuten ließ, dass der Viruskontext in diesem Mechanismus essentiell ist (Wiegand, 2010).

Daher ergab sich für die vorliegende Bachelorarbeit folgendes Ziel: Ein geeignetes Testsystem zum Nachweis der Apoptose von Mumpsvirus-infizierten Zellen in Zellkultur zu etablieren. Hierzu musste zunächst eine Positivkontrolle für die Induktion der Apoptose ermittelt werden, mithilfe derer es möglich war eine geeignete Nachweismethode zu finden. Anschließend sollte mithilfe des etablierten Testsystems zunächst das Apoptose-Verhalten von Zellen, die mit Mumpsviren eines Impf- und Wildtypstamms infiziert wurden, untersucht und somit die Eignung des Systems zum Apoptose-Nachweis in infizierten Zellen bestätigt werden. Abschließend galt es die Apoptose-Induktion von rekombinanten Mumpsviren mit und ohne SH-Protein miteinander zu vergleichen, um zu überprüfen, ob das SH-Protein in infizierten Zellen tatsächlich das Apoptose-Verhalten beeinflusst. Die Ergebnisse sollen zur Erweiterung des Grundverständnisses der Funktionsweise des MuV-SH-Proteins und dessen Bedeutung in Bezug auf den programmierten Zelltod der infizierten Zellen beitragen.

## 5. Arbeitsschema



## 6. Material

### 6.1 Chemikalien

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roth, Karlsruhe / D
Acrylamid-Bisacrylamid 37,5 : 1	Roth, Karlsruhe / D
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Saint Louis / USA
Bidestilliertes Wasser (H <sub>2</sub> O)	Fluka, Basel / CH
bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe / D
Carboxymethylcellulose (CMC)	Sigma-Aldrich, Saint Louis / USA
Cycloheximid	Sigma, Saint Louis / USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt / D
Ethanol	Merck, Darmstadt / D
FKS (fötales Kälberserum)	Gibco <sup>TM</sup> , Paisley / UK
Glutamin	Gibco <sup>TM</sup> , Paisley / UK
Humanes TNF $\alpha$	PromoCell, Heidelberg / D
Isopropanol	Merck, Darmstadt / D
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg / D
Methanol	Merck, Darmstadt / D
Mowiol Einbettungsmedium	Calbiochem, San Diego / USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Saint Louis / USA
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe / D
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco <sup>TM</sup> , Paisley / USA
Restore <sup>TM</sup> Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific / USA
RotiLoad I	Roth, Karlsruhe / D
TEMED (N, N, N', N'- Tetramethylethyldiamin)	Roth, Karlsruhe / D
Trihydroxymethylendiamin (Tris)	Sigma-Aldrich, Saint Louis / USA
Triton X-100	Merck, Darmstadt / D
Tween 20	Roth, Karlsruhe / D

### 6.2 Enzyme

Benzonase	Merck, Darmstadt / D
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe / D

### 6.3 Antikörper

anti-F (MAB 846) (monoklonal aus der Maus)	Merck, Darmstadt / D
anti-Maus Fab Cy3-konjugiert	Dianova, Hamburg / D
anti-Maus IgG HRP-konjugiert (polyklonal aus Ziege)	Merck, Darmstadt / D
anti-Maus IgG POD-konjugiert (polyklonal aus Ziege)	Sigma-Aldrich, Saint Louis / USA Santa Cruz Biotechnology, Dallas / USA
anti-N-Protein (monoklonal aus der Maus)	Cell Signaling Technology, Danvers / USA
anti-PARP (monoklonal aus Kaninchen)	USA
anti-β-Aktin (monoklonal aus Maus)	Sigma-Aldrich, Saint Louis / USA
Maus IgGs (zum Blocken)	Dianova, Hamburg / D

### 6.4 Medium für eukaryotische Zellen

Medium	Komponenten	Hersteller
DMEM	37 g NaHCO <sub>3</sub> für 10 l DMEM-Pulver ad 10 l mit H <sub>2</sub> O pH 7,2 (HCl) sterilfiltrieren	Gibco™, Paisley / UK

### 6.5 Zellen

Zelllinie	Zelltyp	Medium
Hek293	humane, embryonale Nierenzellen	DMEM mit 10 % FKS, 1x Glutamin, 1x PenStrep
Vero	Nierenzellen der Grünen Meerkatze	DMEM mit 10 % FKS, 1x Glutamin, 1x PenStrep

### 6.6 Viren

MuV-JL	Paul-Ehrlich-Institut, Langen / D
MuV-05_063	Robert Koch-Institut, Berlin / D
rMuV-SH_3Stop_C-flag	Robert Koch-Institut, Berlin / D
rMuV-SH_C-flag	Robert Koch-Institut, Berlin / D

## 6.7 Puffer und Lösungen

<b>Puffer oder Lösung</b>	<b>Komponenten</b>
Blockpuffer I	5 % FKS 0,6 % BSA 0,1 % Tween 20 in PBS
Blockpuffer II	1 % BSA in PBS/0,05 % Tween 20
Blockpuffer III	5 % Milchpulver in PBS/0,05 % Tween 20
Blockpuffer IV	5 % Milchpulver 0,1 % Tween 20 in 1x TBS
CMC-Overlay	6 ml 10x MEM 3 ml FKS 2,2 ml NaHCO <sub>3</sub> 1 ml Penicillin/Streptomycin 50 ml CMC ad EMEM 100 ml
PBS	140 mM NaCl 2 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,2 in H <sub>2</sub> O
PBS/0,05 % Tween 20	0,05 % Tween 20 in PBS
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	1 M Tris in H <sub>2</sub> O pH 6,8 (HCl)
SDS-Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,25 M Tris 2 M Glycin 1 % SDS in H <sub>2</sub> O
TBS (5x)	250 mM Tris, pH 7,5 (HCl) 750 mM NaCl in H <sub>2</sub> O
Transferpuffer (Western Blot)	3 Teile Laufpuffer 5 Teile H <sub>2</sub> O 1 Teil Methanol
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M Tris, pH 8,8 (HCl) in H <sub>2</sub> O

## 6.8 Marker

Hyperladder I	Bioline, Randolph / USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific / USA

## 6.9 Verbrauchsmaterialien

Kryogefäße	Nunc, Roskilde / DK
Deckgläschen 12 mm	Thermo Scientific / USA
Einweg-Zellkulturgefäße	Eppendorf, Hamburg / D; TPP, Trasadingen / CH; Nunc, Roskilde / DK
Filterpapier	Biorad, München / D
Glaspipetten	Brand, Wertheim / D; Hirschmann, Eberstadt / D
Glaswaren	Schott, Mainz / D
Handschuhe	Roth, Karlsruhe / D
Immobilon®-P PVDF Transfer Membrane	Merck, Darmstadt / D
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	Roche, Grenzach-Wyhlen / D
Objektträger	Roth, Karlsruhe / D
Parafilm	SPI Supplies, West Chester / USA
Pipettenspitzen	Thermo Scientific / USA

## 6.10 Geräte

Absaugpumpe Vacusafecomfort	IntegraBioscience, Zizers / D
AGFA Curix 60 Entwicklungsmaschine	AGFA Healthcare, Greenville / USA
Blotapparatur	Biorad, München / D
Brutschränke	Binder, Tuttlingen / D
Durchlichtmikroskop	Nikon, Tokio / J; Zeiss, Jena / D
Feinwaage	Kern und Sohn, Balingen / D
FLUOstar Omega (Photometer)	BMG Labtech, Offenburg / D
Gefrierschränke	AEG, Nürnberg / D; Bosch, Stuttgart / D; Sanyo, Osaka / J; Thermo Scientific, / USA
Gelelektrophoresekammer (SDS-PAGE)	GE Healthcare, Buckinghamshire / UK
Horizontalschüttler	Biometra, Göttingen / D; Roth, Karlsruhe / D
Kamera für Durchlichtmikroskop	Nikon, Tokio / J
konfokales Laserscanmikroskop LSM 780	Zeiss, Jena / D

Kühlschränke	Liebherr, Biberach an der Riss / D; Bosch, Stuttgart / D
Laborzentrifuge	Thermo Scientific / USA
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach / D
Photodokumentationssystem	Biometra, Göttingen / D
Pipetboy	IntegraBioscience, Fernwald / D; Hirschmann, Eberstadt / D; Brand, Wertheim / D
Pipetten	Gilson, Middleton / USA; Eppendorf, Hamburg / D; Thermo Scientific / USA; Mettler-Toledo, Gießen / D
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen / D
Sterilbank	Thermo Scientific / USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg / D
Tischzentrifuge	Thermo Scientific / USA; Eppendorf, Hamburg, / D
Vortexer	IKA, Staufen / D
Wasserbad	Haake, Karlsruhe / D; GLF, Burgwedel / D

### 6.11 Kits

CellTiter 96 <sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Madison / USA
M30 CytoDEATH*, Fluorescein	Roche, Grenzach-Wyhlen / D
DNA Fragmentation Imaging Kit (TUNEL)	Roche, Grenzach-Wyhlen / D
Luminata <sup>™</sup> Forte Western HRP Substrate Kit	Merck, Darmstadt / D

### 6.12 Software und Webseiten

Mendeley	<a href="http://www.mendeley.com/">http://www.mendeley.com/</a>
Microsoft Excel	Microsoft / USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft / USA
Microsoft Word	Microsoft / USA
NCBI-Homepage	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Photoshop	Adobe Systems Inc. / USA
Zen2010	Zeiss / D

## **7. Methoden**

### **7.1 Auftauen von Zelllinien**

Die Zellen der Stammsammlung werden in Kryoröhrchen bei  $-150^{\circ}\text{C}$  gelagert. Der Auftauprozess der eingefrorenen Zellsuspensionen erfolgte schnell mithilfe eines  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbades. Währenddessen wurden 4 ml DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und die komplette Zellsuspension darin aufgenommen. Danach erfolgte die Abtrennung der Zellen vom Frostschutzmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) durch die 5 min-Zentrifugation bei 1200 rpm mit der Laborzentrifuge. Das Pellet wurde in 7 ml Medium resuspendiert, in eine T25 Kulturflasche überführt und im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  kultiviert. Nachdem der Zellrasen eine Konfluenz von 90 % aufwies, wurden alle Zellen in eine T75 Zellkulturflasche umgesetzt.

### **7.2 Kultivierung der Zelllinien**

Die Kultivierung der adhärenenten Vero- und HEK293-Zellen erfolgte in T75 Zellkulturgefäßen in Feuchtbrutschränken bei  $37^{\circ}\text{C}$  und einem  $\text{CO}_2$ -Gehalt von 5 %, wobei beide Zelllinien alle drei bis vier Tage umgesetzt wurden. Dazu wurde als erstes das alte DMEM entfernt und die Zellen zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, um tote Zellen und Reste des alten Mediums zu entfernen. Anschließend wurde der Zellrasen mit je 1 ml Trypsinlösung pro Zellkulturflasche benetzt und mehrere Minuten im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach vollständiger Ablösung wurden die Zellen in neuem Kulturmedium, welches zuvor auf  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad erwärmt wurde, im Verhältnis 1:10 verdünnt und in neue T75 Zellkulturgefäße umgesetzt.

### **7.3 Virusanzucht**

Zur Vermehrung der benötigten Viren wurden Vero-Zellen nach Erreichung des konfluenten Zellwachstumsstadiums mittels Trypsin abgelöst und in 5 ml Medium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1200 rpm mit der Laborzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Virussuspension durch Schütteln resuspendiert. Danach folgte eine einstündige Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$ , wobei der Ansatz durch Schütteln alle 10 min homogenisiert wurde. Darauffolgend wurde diese Zellmischung in 5 ml Kulturmedium suspendiert, in

T75 Zellkulturgefäße überführt, in denen je 13 ml DMEM vorgelegt waren. Die anschließende Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C.

Das Virus wurde geerntet, wenn sich Synzytien gebildet, sich diese jedoch noch nicht vom Flaschenboden abgelöst hatten. Dieser Zeitpunkt konnte mithilfe des Lichtmikroskops festgestellt werden. Als Synzytien werden mehrkernige Zellen bezeichnet, die durch Zellfusion während der Virusinfektion mit dem Mumpsvirus entstehen. Zuerst wurden alle Zellen mithilfe eines Zellschabers ins Medium abgeschabt und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Nach der anschließenden 5 min-Zentrifugation bei 1200 rpm mit der Laborzentrifuge wurde der Überstand in 1 ml Kryoröhrchen aliquotiert, mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Alle neuen Virusproben wurden in der digitalen Virusliste dokumentiert.

#### **7.4 Immuncolorimetrischer Assay (ICA)**

Um den Virustiter zu bestimmen wurde ein Immuncolorimetrischer Assay durchgeführt, der auf der Substratumsetzung durch ein, an den Sekundärantikörper gekoppeltes, Enzym basiert. Hierzu wurde der virusspezifische monoklonale Antikörper gegen das F-Protein (Primärantikörper) des Mumpsvirus und ein gegen den Primärantikörper gerichteter HRP (*horseradish peroxidase*)-konjugierter Sekundärantikörper verwendet. Die HRP katalysiert die Umsetzung eines farblosen Substrats zu einem blauen Farbstoff, der am Ort der Umsetzung ausfällt. Der Farbumschlag ermöglichte die Lokalisierung des markierten Proteins, wobei eine blau angefärbte Plaque einem infektiösen Viruspartikel entsprach.

Zur Durchführung des Assays wurden Vero-Zellen in eine 48-Lochplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C im Brutschrank bis zur Erreichung eines Konfluenzgrads von 80 % inkubiert. Nach Entfernung des alten Mediums wurden je 900 µl serumfreies Kulturmediums pro Vertiefung vorgelegt. Anschließend erfolgte die Überführung von je 100 µl des Virus aus dem Virus-haltigem Aliquot in die Vertiefungen der ersten Verdünnungsstufe ( $10^{-1}$ ). Aus diesen Suspensionen wurden wiederum je 100 µl in die nächste Reihe der  $10^{-2}$ -Verdünnungen pipettiert. Dieses Arbeitsschema wurde bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-9}$  so weitergeführt. Dadurch entstanden Virussuspensionen in den Verdünnungen  $10^{-1}$  bis  $10^{-9}$ . Abschließend erfolgte die Inkubation der 48-Lochplatte für 1 h bei 37 °C im Brutschrank. Als nächstes wurden je 500 µl CMC (Carboxymethylcellulose )-*Overlay* pro Vertiefung hinzugegeben, damit sich die Infektion nur auf die Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft ausbreiten konnte und so sichergestellt war, dass ein Plaque durch die Infektion mit einem infektiösen Viruspartikel entstand. Nach fünf Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit

kaltem PBS gewaschen und mit 200 µl Paraformaldehyd (2 %) pro Vertiefung für 20 min bei 4°C fixiert. Danach erfolgte ein erneuter Waschschrift mit kaltem PBS und anschließend die Behandlung der Zellen mit 200 µl Methanol (100 %, -20°C) pro Vertiefung bei -20°C für 10 min. Nach erneutem Waschen mit PBS (RT) wurden die Zellen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen des Primärantikörpers mit je 200 µl BSA-haltigem Blockpuffer I (BP I) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde der spezifische monoklonale Primärantikörper aus der Maus (MAB 846), welcher an das virale F-Protein bindet, 1:1000 in BP I verdünnt. Die Vero-Zellen wurden nach Zugabe von 100 µl Antikörperverdünnung pro Vertiefung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 500 µl Blockpuffer I pro Vertiefung und die Zugabe des Sekundärantikörpers Ziege- $\alpha$ -Maus-HRP, welcher im Verhältnis 1:1000 in BP I verdünnt wurde. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min bei Raumtemperatur folgte zweimaliges Waschen mit jeweils 500 µl BP I, um unspezifisch gebundene Moleküle und ungebundenen Antikörper zu entfernen, bevor zu jeder Vertiefung 100 µl *BM Blue* POD-Substrat zugegeben wurde. Nach 10 min-Inkubation mit diesem Substrat bei Raumtemperatur war eine blaue Färbung der gebildeten Plaques, bedingt durch die Umsetzung des Substrats Tetramethylbenzidin, katalysiert durch das Enzyms Peroxidase, zu erkennen. Abschließend wurde die 48-Lochplatte mit destilliertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Um den Virustiter zu bestimmen wurden die Plaques in einer geeigneten Verdünnung ausgezählt. Wenn sich zum Beispiel der gemittelte Wert von 20 Plaques bei einer  $10^{-4}$  Verdünnung ergab, entsprach dies einem Virustiter von  $2 \cdot 10^5$  pfu (*plaque forming units*)/ml.

### **7.5 Virusinfektion der Zellen**

Hierfür wurden Vero-Zellen in einer 24-Lochplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C im Brutschrank bis zum Erreichen einer Konfluenz von 80 % inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und jeweils 200 µl Virussuspension pro Vertiefung zu den Zellen gegeben. Das Virus-haltige Aliquot wurde zuvor je nach gewünschter MOI (*multiplicity of infection*), welche das Mengenverhältnis zwischen Viruspartikeln und deren Wirtszellen beschreibt, mit serumfreiem Medium verdünnt. Nach der Inkubation für 1 h bei 37°C folgten zwei Waschschriffe mit PBS und die Zugabe von je 1 ml DMEM pro Vertiefung zu den Zellen, die anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 37 °C kultiviert wurden.

## 7.6 Fotodokumentation der Virusinfektion

Um die morphologischen Veränderungen und somit den zunehmenden zytopathischen Effekt der Mumpsvirus-infizierten Zellen visuell zu dokumentieren, wurden die Vero-Zellen aller 24 h nach Infektion (siehe Punkt 7.5 Virusinfektion der Zellen) am Durchlichtmikroskop mit einer Digitalkamera fotografiert. Unter Gebrauch eines 10-fach Objektivs wurden ebenfalls Fotoaufnahmen von nicht-infizierten Zellen mit und ohne Stimulation mit CHX und TNF $\alpha$  gemacht.

## 7.7 MTS –Viabilitätstest

Zur Einleitung des programmierten Zelltodes wurden zwei Stimulatoren ausgewählt: Einerseits TNF $\alpha$ , das zu den Apoptose-induzierenden Zytokinen gehört und andererseits das Antibiotikum Cycloheximid (CHX), welches die Translation in Eukaryoten, durch die Bindung an die ribosomale 60S-Untereinheit hemmt und somit ebenfalls zum Absterben der Zellen führt. Zur Bestimmung einer geeigneten Konzentration dieser beiden Komponenten zur Behandlung von Vero-Zellen bzgl. einer Positivkontrolle für induzierte Apoptose wurde ein MTS-Assay verwendet. Der „CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ von *Promega* basiert auf dem enzymatischen Abbau von Tetrazolium (MTS) durch lebende Zellen zu einem farbigen Formazan-Produkt, welches mittels photometrischer Messung der Absorption bei 490 nm detektierbar ist. Die im Kit enthaltene Reagenz Phenazin–Ethosulfat agiert hier als Elektronenakzeptor.

Für die Durchführung des Assays wurden die Vero- und HEK293-Zellen in einer 96-Lochplatte ausgesät und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nachdem eine Konfluenz von 80 % erreicht war, erfolgte die Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Stimulatoren in Doppelbestimmung. Dazu wurden Vero-Zellen einzeln mit TNF $\alpha$  in Konzentrationen von 20-200 pg/ $\mu$ l und mit unterschiedlichen Mengen von CHX (25-250 fg/ $\mu$ l) oder mit Kombinationen aus beiden Komponenten stimuliert. Einen Vergleichswert lieferte der bereits in der Arbeitsgruppe Mankertz etablierte Apoptose-Nachweis mittels HEK293-Zellen, die für eine Zeitdauer von 18 h mit 25 fg/ $\mu$ l CHX und 50 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  stimuliert wurden. Nach 18 bzw. 48 Stunden wurde jede zu analysierende Vertiefung auf der 96-Lochplatte mit 20  $\mu$ l MTS-Reagenz versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 490 nm erfolgte daraufhin mithilfe eines Photometers, wobei die somit

nachgewiesene Menge gebildeten Formazans zu der Anzahl lebender Zellen direkt proportional ist.

## **7.8 Methoden zum Nachweis der Apoptose-Induktion**

### **7.8.1 Immunfluoreszenz-Analyse**

Für eine Immunfluoreszenz-Analyse wurden Vero-Zellen auf Deckgläsern in einer 24-Lochplatte ausgesät. Bei Erreichung einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen entweder mit TNF $\alpha$  und CHX behandelt oder mit Virus infiziert. Nach drei Tagen erfolgte die Fixierung der Zellen durch 20 min-Inkubation von je 300  $\mu$ l Paraformaldehyd (2 %) je Deckglas. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit frischem PBS gewaschen und darin bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit Triton X-100 (0,1 % in PBS) für 10 min bei Raumtemperatur (RT), danach wurden die Zellen zweimal mit PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen.

### **7.8.2 Markierung mit fluorophorgekoppeltem Primärantikörper**

Der monoklonale fluorophorgekoppelte aus der Maus stammende Antikörper M30 CytoDEATH von *Roche* erkennt und bindet das Caspase-Spaltprodukt Zytokeratin 18. Diese Caspasen, welche den zelleigenen Cysteinproteasen angehören, sind ausschließlich während der Apoptose aktiv und führen zum Abbau bestimmter Proteine. Eine Detektion von Zytokeratin 18 diente somit dem Nachweis von Apoptose in Zellen.

Zur Absättigung freier, unspezifischer Bindungsstellen wurden 150  $\mu$ l Blockpuffer II pro Deckglas auf die Zellen (siehe Punkt 7.8.1 Immunfluoreszenz-Analyse) gegeben und für 1 h bei RT auf dem Schüttler stehend inkubiert. Anschließend folgte die Verdünnung des M30-Antikörpers 1:100 zusammen mit dem Farbstoff DAPI 1:500 in Blockpuffer II, wobei letzteres der Visualisierung der Zellkerne diente. Jeweils 20  $\mu$ l dieser Mischung wurden pro Deckglas auf Parafilm pipettiert. Die Deckgläser mit den fixierten Zellen wurden mit den Zellen zum Parafilm hin gerichtet auf die Antikörperlösung gelegt und im Dunkeln bei 4°C für einen Zeitraum von einer Stunde inkubiert. Als letztes wurden die Deckgläser mithilfe von 4  $\mu$ l Mowiol pro Gläschen auf Objektträgern in Position und Färbung fixiert. Die Proben konnten so mittels eines konfokalen Laserscanning Mikroskops LSM 780 von *Zeiss* betrachtet und bzgl. ihrer Färbungen ausgewertet werden (siehe Punkt 7.8.5 Fluoreszenzmikroskopie).

### **7.8.3 Markierung mit Fab-Fragment gekoppelten Antikörpern**

Primärantikörper lassen sich direkt über ein Fab-Fragment an ein ausgewähltes Fluorophor koppeln. Für einen Antikörperansatz wurden 20 µl PBS in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt und der spezifische Primärantikörper, der gegen das virale F-Protein gerichtet ist, sowie das mit Cy3-gekoppelte Fab-Fragment hinzugegeben. Diese Mischung wurde für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, bevor der murine wirtsspezifische IgG-Antikörper hinzugegeben wurde, um die überschüssigen Fab-Fragmente zu blockieren. Dieser Kopplungsansatz wurde nochmals für 20 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend mit einer geeigneten Menge an Blockpuffer II versetzt. Je nach Anzahl der Proben wurde die Menge der einzelnen Komponenten variiert.

Je 150 µl dieser Antikörperlösung wurden pro Vertiefung direkt auf die Zellen in der 24-Lochplatte (siehe Punkt 7.8.1 Immunfluoreszenz-Analyse) gegeben, die anschließend lichtgeschützt bei Raumtemperatur eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Proben dreimal mit PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen und danach zur Visualisierung der Zellkerne mit DAPI gefärbt. Hierfür wurde das Färbereagenz in Blockpuffer II im Verhältnis 1:500 verdünnt, bevor die Zellen mit 150 µl pro Vertiefung für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert wurden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,05 % Tween 20, zweimal mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser wurden die Präparate mit je 4 µl Mowiol eingedeckelt und über Nacht bei 4°C im Dunkeln getrocknet. Die Auswertung der Proben erfolgte mithilfe des konfokalen Laserscanning Mikroskops LSM 780 von Zeiss (siehe Punkt 7.8.5 Fluoreszenzmikroskopie).

### **7.8.4 TUNEL-Assay**

Mit dem TUNEL-Assay lässt sich die DNA-Fragmentierung detektieren, die aufgrund apoptotischer Signalkaskaden eingeleitet wird. Dabei katalysiert die terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) das Anhängen von fluoreszenzmarkierten dUTPs (2'-Deoxyuridin, 5'-Triphosphat) an die freien 3'-OH-Gruppen der DNA-Fragmente. Dadurch kann die beschädigte DNA anschließend mittels Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 494 nm visualisiert werden.

Für die Durchführung des Assays wurde das DNA Fragmentation Imaging Kit von Roche verwendet, welches eine *Enzym Solution* und eine *Label Solution* enthält, die zunächst in einem Verhältnis von 1:10 miteinander gemischt wurden. Jeweils 20 µl der entstandenen

*Reaction Solution* (RS) wurden auf Parafilm pipettiert. Die auf den Deckgläsern fixierten und permeabilisierten Vero-Zellen (siehe Punkt 7.8.1 Immunfluoreszenz-Analyse) wurden mit PBS gewaschen, auf die vorbereitete *Reaction Solution* überführt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 150 µl je DG der im Kit enthaltene *Nuclei Dye Solution*, welche vorher 1:1000 in PBS verdünnt wurde, zu den Zellen gegeben und diese für 5 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach einem abschließenden Waschvorgang mit PBS erfolgte die Fixierung der Zellen auf Objektträgern analog zu Punkt 7.8.2 und 7.8.3. Die Analyse der Präparate wurde anschließend mithilfe des konfokalen Laserscanning Mikroskops LSM 780 von *Zeiss* durchgeführt (siehe Punkt 7.8.5 Fluoreszenzmikroskopie).

### **7.8.5 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Form der Lichtmikroskopie und ermöglicht es mithilfe von Fluorophoren, die zum Beispiel an Proteine gekoppelt werden können, diese bzgl. ihrer Lage in der Zelle zu detektieren. Dabei wird das Prinzip der Fluoreszenz genutzt, bei der fluoreszierende Stoffe durch Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt werden und ein detektierbares Lichtsignal einer anderen Wellenlänge emittieren.

Anders als in der konventionellen Lichtmikroskopie rastert bei einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (kLSM) ein vom Objekt fokussierter Laserstrahl das Präparat ab, indem sich das angeregte Laserlicht kontinuierlich über das Präparat bewegt. Dieses Licht einer bestimmten Wellenlänge wird absorbiert, indem Elektronen die Energie der Photonen aufnehmen. Dadurch erreichen die Elektronen ein höheres Energieniveau, jedoch fallen sie sofort auf ihr ursprüngliches Energielevel zurück, was dazu führt, dass die aufgenommene Energie durch eine spontane Emission von Fluoreszenzlicht freigesetzt wird. Das emittierte Licht ist etwas energieärmer und langwelliger als das Anregungslicht, was als Stokes-Verschiebung bezeichnet wird.

Das entstandene Fluoreszenzlicht wird zurück über die sich im Strahlengang befindlichen Scanner geleitet und auf die Lochblende fokussiert, welche nur Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene des Objektivs durchlässt und Licht aus anderen Ebenen des Präparats blockiert. Hinter dieser Blende befindet sich ein Sperrfilter, der das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht trennt, bevor es fortlaufend vom Lichtdetektor gemessen werden kann. Die so erhaltenen Messwerte werden per PC Software ZEN2010 von *Zeiss* zu einem elektronischen Gesamtbild zusammengesetzt. Somit ergeben sich optische Bilder von einzelnen Ebenen der Probe mit hohem Kontrast.

## 7.8.6 SDS-PAGE und Western Blot

### Probenpräparation für SDS-PAGE

Die auf einer 24-Lochplatte ausplattierten und infizierten Zellen wurden mithilfe eines Zellschabers ins Medium abgekratzt und in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 10 min-Zentrifugation bei 1200 rpm mit der Laborzentrifuge wurde der Überstand verworfen und das Pellet unter Verwendung von je 50  $\mu$ l Lysepuffer 2x Roti-Load 1 von *Roth* resuspendiert und in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Rotiload 1 enthält unter anderem  $\beta$ -Mercaptoethanol, welches die Disulfidbrücken der Proteine zerstört, SDS (Sodiumdodecylsulfat) als weiteres denaturierendes Reagenz und diente gleichzeitig als Probenpuffer für die darauffolgende SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese). Nach der Zellyse erfolgten die Zugabe von 0,5  $\mu$ l Benzonase zu jeder Probe, welches als Endonuklease DNA abbaut, und die Lagerung auf Eis für 20 Minuten. Danach wurden alle Eppendorfgefäße für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend mittels Tischzentrifuge 5 min zentrifugiert.

### SDS-PAGE

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese dient der Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld. Als Trägermaterial werden SDS-Polyacrylamidgele verwendet, welche durch die Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid entstehen, wobei Ammoniumperoxodisulfat (APS) als auslösendes Reagenz der Polymerisationsreaktion und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator der Bindung der so entstandenen Radikale fungiert.

Das anionische Sodiumdodecylsulfat (SDS) bildet mit den Proteinen mizellartige Komplexe und überdeckt deren Eigenladung dabei mit einer konstanten einheitlichen negativen Ladung. Somit wandern die Proteine im elektrischen Feld in Richtung der Anode, wobei die Molekularsiebeigenschaften des Gels dazu führen, dass die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der relativen Molekularmasse  $M_r$  ist. Mithilfe eines Markers, der verschiedene Peptidketten mit bekannter Masse enthält, war es möglich die  $M_r$  der unbekanntenen Proteine abzuschätzen.

Für diese Methode wurde ein zweiteiliges Gelsystem verwendet: Ein Trenngel, in dem die Auftrennung der Proteinproben erfolgte, wurde mit einem kleineren Sammelgel überschichtet, welches größere Poren und einen geringeren pH-Wert aufwies. Zur Auftrennung der Proteine

aus den lysierten Zellen per SDS-PAGE in einer Gelelektrophoresekammer der Firma *GE Healthcare* wurden 10 % Polyacrylamidgele aus folgenden Komponenten hergestellt:

Tabelle 1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

für 2 Trenngele (10 %)		für 2 Sammelgele (5 %)	
3,75 ml	Trenngelpuffer	1,25 ml	Sammelgelpuffer
5,00 ml	Acrylamid (30 %)	1,65 ml	Acrylamid (30 %)
6,20 ml	dH <sub>2</sub> O	6,85 ml	dH <sub>2</sub> O
0,15 ml	SDS (10 %)	0,10 ml	SDS (10 %)
75,00 µl	APS (10 %)	0,06 ml	APS (10 %)
20,00 µl	TEMED	0,02 ml	TEMED

Für die Herstellung des SDS-Polyacrylamidgels wurde zunächst das Trenngel zwischen eine Glas und eine Keramikplatte, getrennt durch zwei Platzhalter, gegossen und mit Isopropanol überschichtet um eine gerade Gelkante zu erhalten. Nach einem Spülvorgang mit destilliertem Wasser wurde dieses mithilfe von Filterpapier restlos aufgesogen und das ausgehärtete Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Zur Herstellung der Probestaschen wurde ein entsprechender Elektrophoresekamm in die flüssige Lösung eingesetzt. Nach der vollständigen Polymerisation konnte das Gel bis zum Zeitpunkt der weiteren Verwendung in mit destilliertem Wasser anfeuchteten Papiertüchern in einer Plastiktüte bei 4°C gelagert werden.

Vor der Beladung der Geltaschen wurden die Proben für 5 min auf 95°C erhitzt und mittels Tischzentrifuge für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Vom Molekulargewichtsmarker *PageRuler Plus Protein Ladder Prestained* wurden 4 µl und in alle anderen Geltaschen jeweils 20 µl des lysierten Zellextrakts aufgetragen, bevor die elektrophoretische Auftrennung in der Gelelektrophoresekammer durch Anlegen einer konstanten elektrischen Spannung von zuerst 100 Volt zum Einlaufen der Proben in das Gel und danach von 120 Volt erfolgte.

### **Western Blot**

Das Prinzip des Western Blots basiert auf dem Transfer der durch die Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Membran, durch das Anlegen eines elektrischen Feldes konstanter Stromstärke. Die hier verwendete Membran besteht aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) und bindet die Peptidketten durch hydrophobe und ionische Wechselwirkungen.

Als erstes wurde die auf die Größe des Gels zugeschnittene Membran durch eine 15 s-Inkubation mit Methanol aktiviert und anschließend mit destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) gespült,

bevor sie zusammen mit dem ebenfalls größenangepassten Filterpapier und dem Gel für 5 min in Transferpuffer bei Raumtemperatur eingeweicht wurde. Daraufhin folgte die Schichtung der einzelnen Komponenten zwischen der negativen und positiven Elektrode der Blotkammer in folgender Reihenfolge: Filterpapier, Membran, Gel und Filterpapier. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Membranfläche für 1,5 h wanderten die Proteine in Richtung der Anode aus dem Gel auf die PVDF-Membran. Anschließend wurde die Membran getrocknet und mit Methanol aktiviert, bevor sie für eine Stunde mit Blockpuffer III (jeweils 50 ml pro Membran), welcher zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen der Membran dient, auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubierte. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit PBS/0,05 % Tween 20 für jeweils 5 min, bevor der spezifische Primärantikörper und ein Antikörper gegen Aktin als Ladungskontrolle, welche im selben Blockpuffer gelöst wurden (siehe Tabelle 2), über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C inkubierten.

Nachdem die Membran dreimal mit PBS/0,05 % Tween 20 für jeweils 5 min gewaschen wurde, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen, erfolgte die Inkubation mit, in Blockpuffer verdünnten, spezifischen Sekundärantikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur (siehe Tabelle 2). Abschließend wurde die PVDF-Membran dreimal mit PBS/0,05 % Tween 20 und einmal mit PBS für jeweils 5-10 min gewaschen.

Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem Luminata<sup>TM</sup> Forte Western HRP Substrate Kit von *Merck* über Chemolumineszenz. Das Enzym Peroxidase, welches an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, katalysiert die Oxidation des im Kit enthaltenen Substrats Luminol, wodurch es zur Entstehung eines Lichtsignal kommt, welches durch die Exposition eines Films nachgewiesen werden konnte. Die Zeitdauer für die Filmexposition betrug je nach Signalintensität zwischen 5-15 min und 16 h.

Um die PVDF-Membran nacheinander mit verschiedenen Antikörpern anzufärben wurden die bereits detektierten Antikörper mithilfe des Restore<sup>TM</sup> Western Blot Stripping Buffer von *Thermo Scientific* durch eine 15 min-Inkubation bei Raumtemperatur mit je 10 ml pro Membran abgelöst. Im Anschluss folgte ein dreimaliger Waschvorgang mit PBS/0,05 % Tween 20 für je 5 Minuten, bevor die Membran, wie zuvor beschrieben, geblockt und mit dem gewünschten Antikörper inkubiert wurde.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper und deren Verdünnungen

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>Primärantikörper</b>	Kaninchen- $\alpha$ -PARP	(1:1000) in BP IV
	Maus- $\alpha$ -Aktin	(1:2000) in BP IV
	Maus- $\alpha$ -MuV-NP	(1:200) in BP IV
<b>Sekundärantikörper</b>	Ziege- $\alpha$ -Maus-POD	(1:20000) in BP III
	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-POD	(1:2000) in BP III

## 8. Ergebnisse

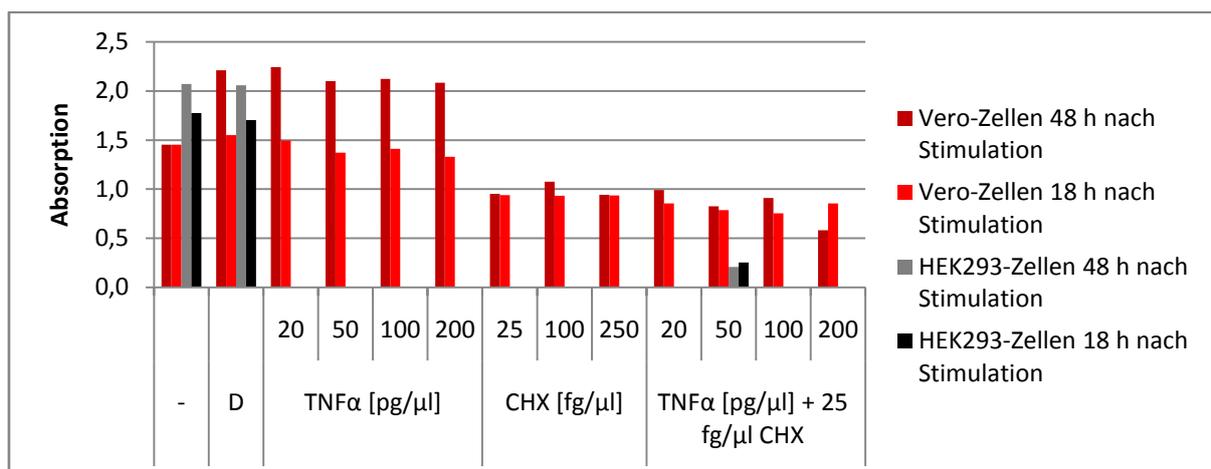
Für das SH-Protein einiger Paramyxoviren wurden bereits antiapoptotische Eigenschaften beobachtet, jedoch ist der zugrundeliegende Mechanismus noch weitgehend ungeklärt (Wilson *et al.*, 2006, Lin *et al.*, 2003). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zunächst eine geeignete Methode zum Nachweis von Apoptose in Mumpsvirus-infizierten Vero-Zellen zu etablieren und anschließend die Apoptose-Induktion in Zellen, die einerseits mit einem Impfo- oder einem ausgewählten Wildtypstamm und andererseits mit rekombinanten Viren mit intaktem bzw. deletiertem SH-Protein infiziert wurden, vergleichend zu untersuchen.

In vorangegangenen Versuchen dieser Arbeitsgruppe wurde das antiapoptotische Potenzial von plasmid-exprimiertem SH-Protein in HEK293-Zellen untersucht. Jedoch ließ sich mithilfe dieses transienten Systems kein Effekt auf die Zellen feststellen, was zur Annahme führte, dass verschiedene virale Faktoren eine entscheidende Rolle spielten (Wiegand, 2010). Daher galt es nun einen möglichen antiapoptotischen Effekt im Viruskontext zu untersuchen. Hierfür wurden die folgenden Versuche in Vero-Zellen durchgeführt, da sich diese im Gegensatz zu HEK293-Zellen mit dem Mumpsvirus infizieren lassen. Zunächst sollte auf der Grundlage der Arbeit von Mascha Wiegand (Wiegand, 2010) eine Positivkontrolle für die Apoptose-Induktion in Vero-Zellen etabliert werden.

### 8.1 Etablierung einer Positivkontrolle für Apoptose-Induktion in Vero-Zellen

Hierzu wurden Vero-Zellen, zu etwa 40 % konfluent, in eine 96-Lochplatte ausgesät und am darauf folgenden Tag mit verschiedenen Konzentrationen von TNF $\alpha$ , CHX oder beidem für 18 h oder 48 h stimuliert (siehe Abbildung 4). Als Positivkontrolle wurden parallel dazu HEK293-Zellen ausgesät und mit 25 fg/ $\mu$ l CHX und 50 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  ebenfalls für 18 h und 48 h behandelt (Wiegand, 2010). Als Negativkontrolle dienten unstimulierte und als Lösungsmittelkontrolle mit DMSO (Dimethylsulfoxid) behandelte Zellen.

Die Zellviabilität wurde mithilfe eines MTS-Assays detektiert, bei dem lebende Zellen MTS zu Formazan verstoffwechselten (siehe Punkt 7.7 MTS-Viabilitätstest). Hierfür wurde zu jeder Vertiefung 20  $\mu$ l der Reaktionslösung hinzu gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert, bevor der Gehalt an Formazan photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt wurde. Eine geringere Formazankonzentration ist also ein Maß für einen höheren Anteil toter Zellen.



**Abb. 4: Analyse der Zellviabilität nach Behandlung mit TNF $\alpha$  und CHX im MTS-Assay:** Vero-Zellen wurden für 18 h bzw. 48 h mit TNF $\alpha$  in Konzentrationen von 20, 50, 100 oder 200 pg/ $\mu$ l; mit 25, 100 oder 250 fg/ $\mu$ l CHX und mit einer Mischung aus 25 fg/ $\mu$ l CHX und 20, 50, 100 oder 200 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  behandelt. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte (-) und als Lösungsmittelkontrolle mit DMSO (D) behandelte Zellen. Als Positivkontrolle wurden HEK293-Zellen, stimuliert mit 25 fg/ $\mu$ l CHX und 50 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$ , mitgeführt. Nach Zugabe der Reaktionslösung und Inkubation für 1 h bei 37°C wurde die Absorption von Formazan bei 490 nm mithilfe eines Photometers bestimmt.

Wie in Abbildung 4 zu erkennen, konnte durch die Behandlung mit TNF $\alpha$  alleine keine Apoptose in Vero-Zellen induziert werden. Im Gegensatz dazu verminderte die Behandlung der Zellen mit CHX in allen Fällen die Viabilität der Zellen. Eine gleichzeitige Zugabe von TNF $\alpha$  zeigte erst ab einer Konzentration von 200 pg/ $\mu$ l und einer Behandlungszeit von 48 h einen deutlichen zusätzlichen Effekt auf die Viabilität der Zellen.

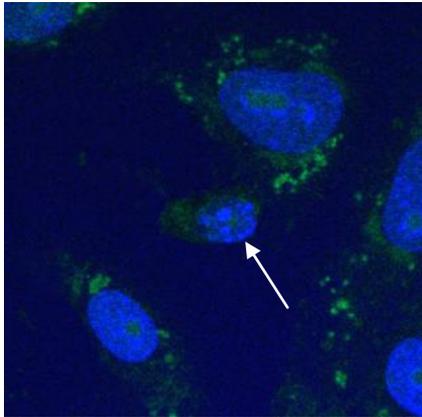
Als Positivkontrolle für alle weiteren Versuche wurden daher Vero-Zellen für 48 h bzw. zur weiteren Verstärkung des Effekts für 72 h mit einer Kombination aus 200 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  und 25 fg/ $\mu$ l CHX behandelt.

## 8.2 Nachweis von Apoptose durch TUNEL-Assay

Im Verlauf der Apoptose wird die DNA der Zelle fragmentiert und die so entstandenen Bruchstücke weisen am 3'-Ende eine OH-Gruppe auf. Diese OH-Gruppen können durch das DNA Fragmentation Imaging Kit von Roche fluoreszenzmarkiert und mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden.

Hierfür wurden Vero-Zellen mit 200 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  und 25 fg/ $\mu$ l CHX über einen Zeitraum von 48 h stimuliert, anschließend fixiert und permeabilisiert und durch Anwendung des Kits

markiert. Zusätzlich wurde die DNA der Zellkerne mit DAPI angefärbt (siehe Punkt 7.8.4 TUNEL-Assay).

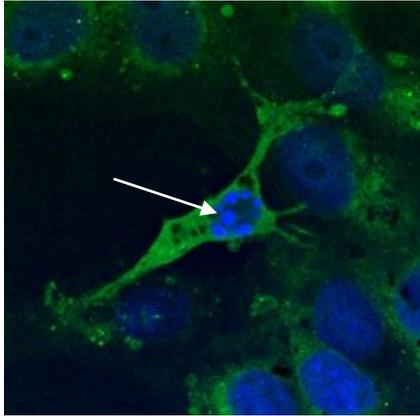


**Abb. 5: Apoptose-Nachweis in Vero-Zellen mittels TUNEL-Assay.** Vero-Zellen wurden 48 h mit 25 fg/ $\mu$ l CHX und 200 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  behandelt. Nach Fixierung und Permeabilisierung erfolgten mittels des DNA Fragmentation Imaging Kits von *Roche* die Markierung der fragmentierten DNA (grün) und die Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Die Analyse erfolgte mit einem konfokalem Laserscanning Mikroskop LSM 780 von *Zeiss*, Objektiv 63x.

Mithilfe der DAPI-Färbung ließen sich die Zellkerne apoptotischer Zellen von den Kernen gesunder Zellen unterscheiden, da die DNA hier im Gegensatz zu gesunden Zellen fragmentiert vorlag. In Abb. 5 ist anhand dieser Färbung eine apoptotische Zelle zu erkennen (weißer Pfeil). Das grüne Signal dieser Zelle unterscheidet sich jedoch nicht von den umliegenden nicht apoptotischen Zellen. Da es zudem im Zytoplasma und nicht im Zellkern lokalisiert war, ist es als unspezifisch einzuordnen. Somit ist diese Methode zum Nachweis von Apoptose in Vero-Zellen nicht geeignet.

### 8.3 Nachweis von Apoptose durch M30-Antikörper

Im Verlauf der Apoptose werden verschiedene Caspasen aktiviert, die am Abbau der einzelnen Zellbestandteile beteiligt sind. Der fluoreszenzmarkierte M30-Antikörper aus dem CytoDEATH Kit von *Roche* bindet an das Caspase-Spaltprodukt von Zytokeratin 18, das beim Abbau des Zytoskeletts entsteht und macht dessen Anwesenheit im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Hierfür wurden Vero-Zellen mit 200 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  und 25 fg/ $\mu$ l CHX über einen Zeitraum von 48 h stimuliert, anschließend fixiert, permeabilisiert und mit dem M30-Antikörper markiert. Die DNA der Zellkerne wurde zusätzlich mit DAPI angefärbt (siehe Punkt 7.8.2 Markierung mit fluorophorgekoppeltem Primärantikörper).



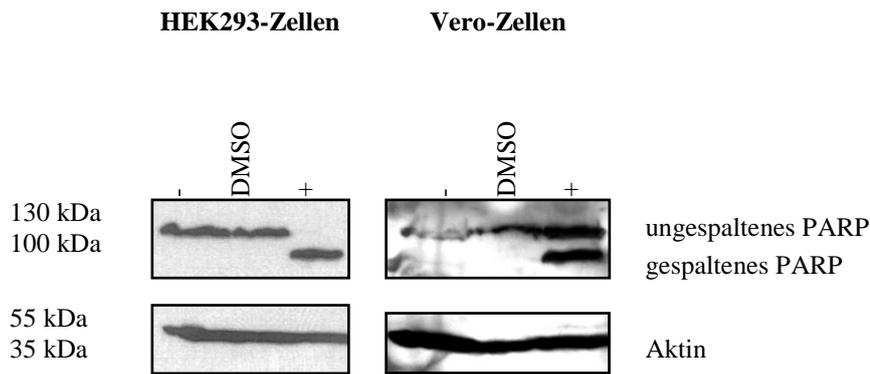
**Abb. 6: Apoptose-Nachweis in Vero-Zellen mittels M30-AK-Färbung.** Die Stimulation der Zellen erfolgte für 48 h mit 200 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  und 25 fg/ $\mu$ l CHX. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und gespaltenes Zytokeratin 18 mithilfe des M30 CytoDEATH Kits von Roche gefärbt (grün) und die DNA der Zellkerne mit DAPI (blau). Die Analyse erfolgte mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop LSM 780 von Zeiss unter Verwendung des 63x Objektivs.

Das Zytoplasma der in Abb. 6 dargestellte apoptotische Zelle mit fragmentiertem Zellkern (weißer Pfeil) erscheint intensiv grün gefärbt. Jedoch weist auch das Zytoplasma umliegender gesunder Zellen eine nur geringfügig schwächere Färbung auf. Aufgrund dieser starken Hintergrundfärbung wurde auch diese Methode als Nachweismöglichkeit für induzierte Apoptose in Vero-Zellen verworfen.

#### **8.4 Nachweis von Apoptose-Induktion mithilfe von PARP-Antikörpern im Western Blot**

Das DNA-Reparaturenzym Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) wird während der Apoptose durch Caspase-3 proteolytisch gespalten. Somit kann der programmierte Zelltod durch den Nachweis der Spaltprodukte detektiert werden (Li *et al.*, 2000). Hierfür wurden Vero-Zellen mit 200 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  und 25 fg/ $\mu$ l CHX für 72 h behandelt und als Positivkontrolle HEK293-Zellen mit 50 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  und 25 fg/ $\mu$ l CHX für 6 h (Wiegand, 2010). Als Negativkontrolle dienten unbehandelte und als Lösungsmittelkontrolle mit DMSO behandelte Zellen.

Die Zellen wurden lysiert, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe Punkt 7.8.6 SDS-PAGE und Western Blot). Das Enzym PARP und auch dessen Spaltprodukt wurden mithilfe desselben spezifischen Antikörpers detektiert. Zusätzlich wurde als Gelbeladungskontrolle mit einem  $\alpha$ -Aktin-Antikörper gefärbt.

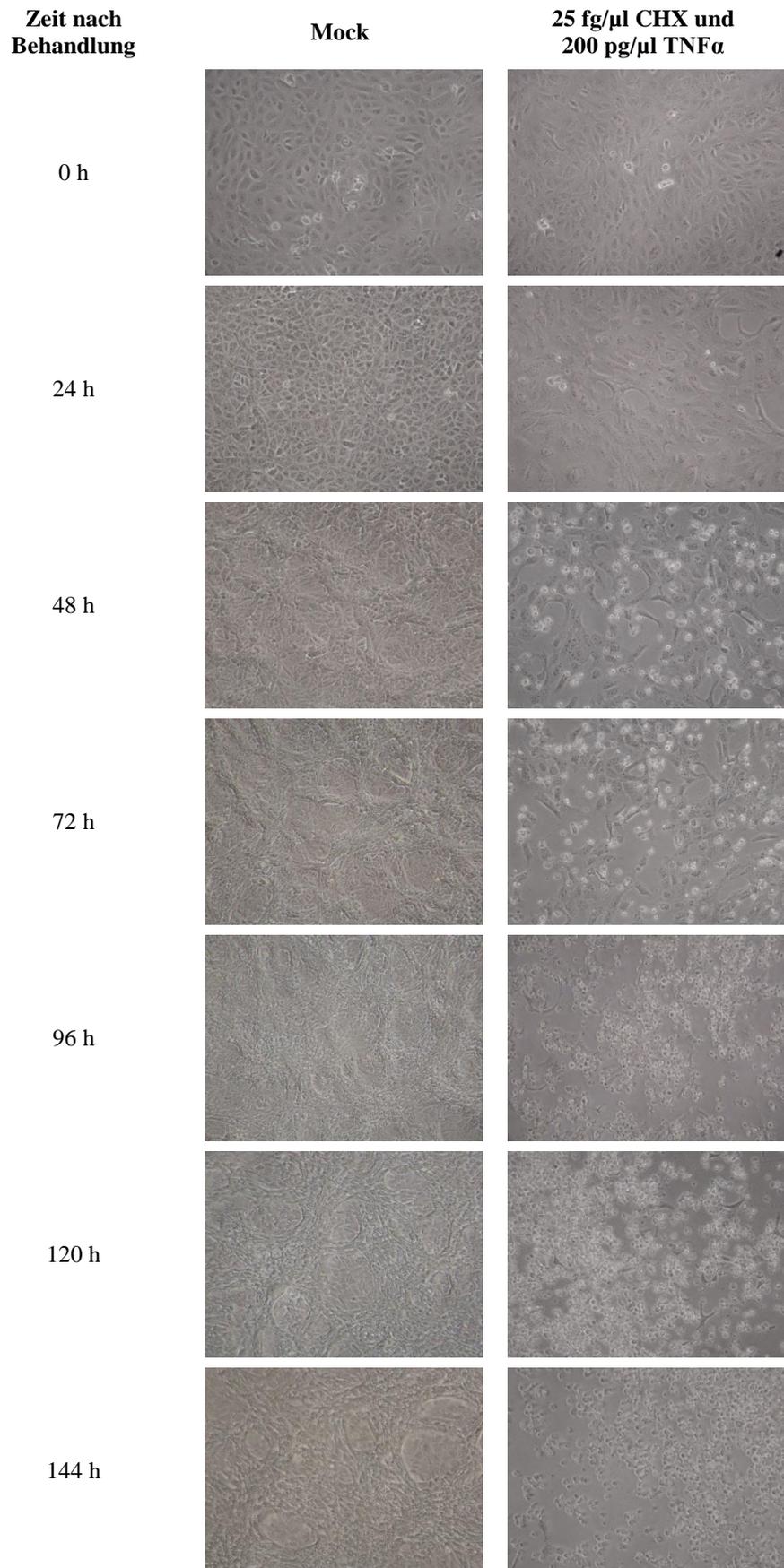


**Abb. 7: Apoptose-Nachweis im Western Blot.** HEK293-Zellen wurden für 6 h mit 50 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  und 25 fg/ $\mu$ l CHX und Vero-Zellen für 72 h mit 200 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  und 25 fg/ $\mu$ l CHX behandelt (+). DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle, unbehandelte Zellen als Negativkontrolle (-). Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. PARP (116 kDa), dessen Spaltprodukt (89 kDa) und Aktin (42 kDa) wurden mit spezifischen Primärantikörpern markiert und mit POD-gekoppeltem Sekundärantikörper und Chemolumineszenz detektiert.

In allen Ansätzen erschien bei 42 kDa eine Bande für Aktin in etwa gleicher Intensität, d. h. von allen Zelllysaten wurde circa gleich viel Zellmaterial aufgetragen. In den Proben der unstimulierten oder mit DMSO behandelten Zellen war bei 116 kDa die Bande der ungespaltenen PARP vorhanden, nur bei gleichzeitig mit TNF $\alpha$  und CHX behandelten Zellen zeigte sich außerdem eine zusätzliche Bande bei 89 kDa für gesplattene PARP. Hierbei ist anzumerken, dass in HEK293-Zellen das Reparaturenzym vollständig gesplattet wurde, wohingegen in Vero-Zellen auch noch ungesplattene PARP nachweisbar war. Unter den hier gewählten Behandlungsbedingungen sind also noch nicht alle Vero-Zellen in die Apoptose eingetreten. Apoptotische und nicht apoptotische Zellen konnten jedoch klar unterschieden werden, was zur Schlussfolgerung führt, dass diese Methode zum Nachweis von Apoptose in Vero-Zellen geeignet ist.

### 8.5 Morphologische Untersuchung von Vero-Zellen nach Apoptose-Induktion

Hierfür wurden Vero-Zellen mit 200 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  und 25 fg/ $\mu$ l CHX behandelt und anschließend direkt nach Stimulation und danach alle 24 h auf morphologische Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Mock), die als Negativkontrolle dienten, untersucht.



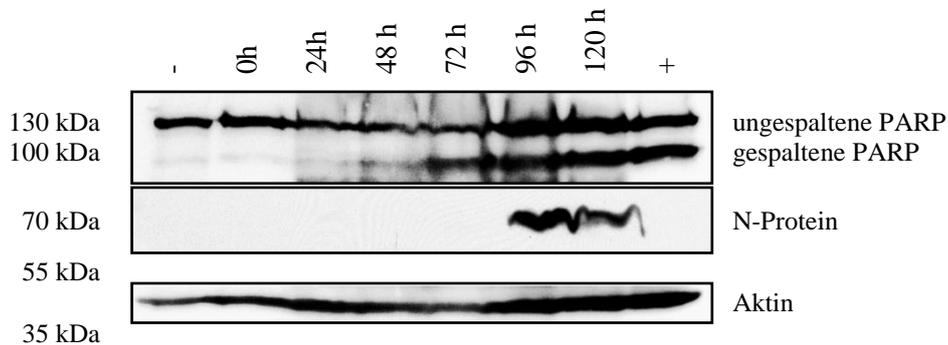
**Abb. 8: CPE-Induktion in unbehandelten und mit TNF $\alpha$  und CHX behandelten Vero-Zellen.** Die Zellen wurden entweder nicht behandelt (Mock) oder mit 200 pg/ $\mu$ l TNF und 25 fg/ $\mu$ l CHX inkubiert und nach 0, 24, 48, 72, 96, 120 oder 144 h mit einem Lichtmikroskop betrachtet und mithilfe einer Digitalkamera von *Nikon* dokumentiert, Objektiv 10 $\times$ 1

In Abb. 8 ist zu erkennen, dass die mit TNF $\alpha$  und CHX stimulierten Zellen verglichen mit den Mock-Zellen langsamer wuchsen. Außerdem begannen die behandelten Zellen ab 48 h abzusterben und zum Zeitpunkt von 144 h nach Behandlung ließen sich keine lebenden Zellen mehr ausfindig machen. Diese lichtmikroskopischen Aufnahmen stimmen also mit den Ergebnissen des MTS-Assays und des Western Blots überein. Durch eine Behandlung mit 200 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  und 25 fg/ $\mu$ l CHX wird ab 48 h Apoptose in Vero-Zellen induziert.

## **8.6 Nachweis von Apoptose-Induktion in MuV-infizierten Zellen**

### **8.6.1 Apoptose-Nachweis bei Infektion mit MuV-Impfstamm Jeryl-Lynn**

Nach Etablierung einer Positivkontrolle und deren Nachweis im Western Blot sollte nun überprüft werden, ob dieses Testsystem auch geeignet ist, um Apoptose in Mumps-infizierten Zellen zu untersuchen. Dazu wurden Vero-Zellen in 24-Lochplatten ausgesät und am darauf folgenden Tag mit dem Impfstamm Jeryl-Lynn (JL) mit MOI 3 infiziert (siehe Punkt 7.5 Virusinfektion der Zellen). Zum Zeitpunkt der Infektion und anschließend alle 24 h wurden jeweils aus zwei Vertiefungen die Zellen entnommen und zusammengeführt. Zusätzlich dienten unbehandelte Zellen als Negativkontrolle und Vero-Zellen, die für 72 h mit 200 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  und 25 fg/ $\mu$ l CHX behandelt wurden, als Positivkontrolle. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe Punkt 7.8.6 SDS-PAGE und Western Blot). Die Proben wurden mit folgenden Antikörpern gefärbt:  $\alpha$ -PARP zum Nachweis der Apoptose-Induktion,  $\alpha$ -Aktin als Gelbeladungskontrolle und ein Antikörper gegen das Nukleokapsidprotein des Mumpsvirus ( $\alpha$ -MuV-NP) als Nachweis der MuV-Infektion.



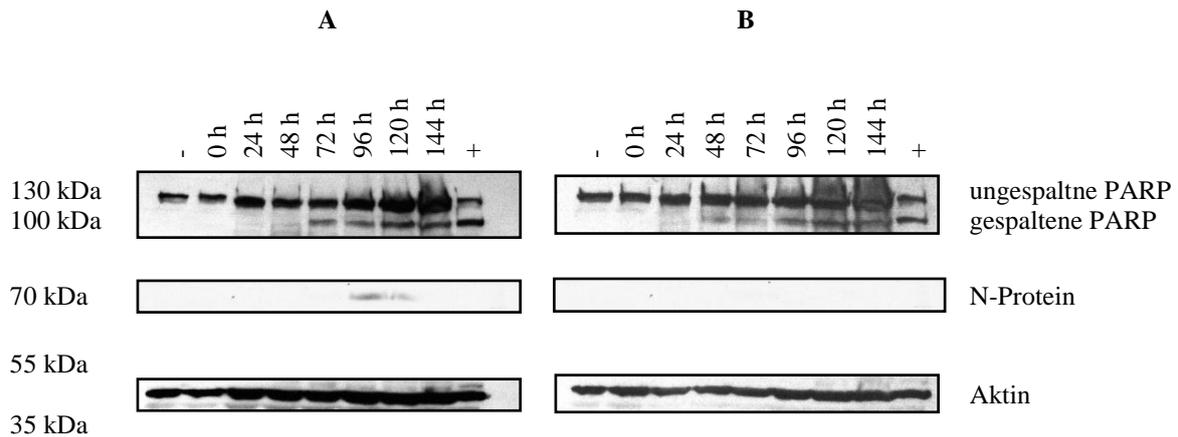
**Abb. 9: Apoptose-Induktion in mit Mumps (JL)-infizierten Vero-Zellen.** Die Zellen wurden durch JL mit MOI 3 infiziert und 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h oder 120 h nach Infektion lysiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte (-) oder mit 200 pg/ $\mu$ l TNF und 25 fg/ $\mu$ l CHX für 72 h behandelte Vero-Zellen (+). Die Proteine der Zelllysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt per Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit spezifischen Primärantikörpern wurden PARP (116 kDa), dessen Spaltprodukt (89 kDa) und Aktin (42 kDa) als Gelbeladungskontrolle markiert und mithilfe POD-gekoppelter Sekundärantikörper und Chemolumineszenz detektiert.

Die Anwesenheit von ungespaltener PARP war in allen Proben zu erkennen und ab 72 h nach Infektion zeigte sich, wie in der Positivkontrolle, eine deutliche Bande für das Spaltprodukt von PARP, deren Intensität bis 120 h nach Infektion deutlich zunahm. Das virale N-Protein, als Nachweis für eine Mumpsvirus-Infektion, war nach 96 h detektierbar.

Der Nachweis des gespaltenen PARP-Proteins im Western Blot ist somit eine geeignete Nachweismöglichkeit für die Apoptose-Induktion in Mumpsvirus-infizierten Zellen und erfolgte mit dieser Methode erstmals in unserer Arbeitsgruppe.

### 8.6.2 Vergleich einer Mumpsvirus-Infektion mit dem MuV-Impfstamm Jeryl-Lynn einem Wildtyp-Isolat des Mumpsvirus

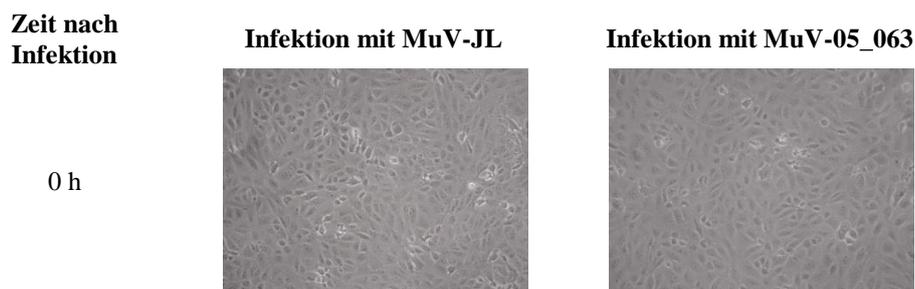
Unterschiede in der Apoptose-Induktion könnten ein Grund für die unterschiedliche Pathogenität von MuV-Impf- und Wildtypstämmen sein und um dies zu untersuchen wurden Vero-Zellen parallel mit dem Impfstamm Jeryl-Lynn und einem Wildtyp-Isolat aus Patientenmaterial (MuV-05\_063) infiziert (siehe Punkt 7.5 Virusinfektion der Zellen). Zur Vergleichbarkeit der beiden Ansätze wurden diese mit MOI 0,01 infiziert, die bedingt ist durch den niedrigen Titer des Wildtypstammes. Die Proben wurden analog zu Punkt 7.8.6 SDS-PAGE und Western Blot behandelt.

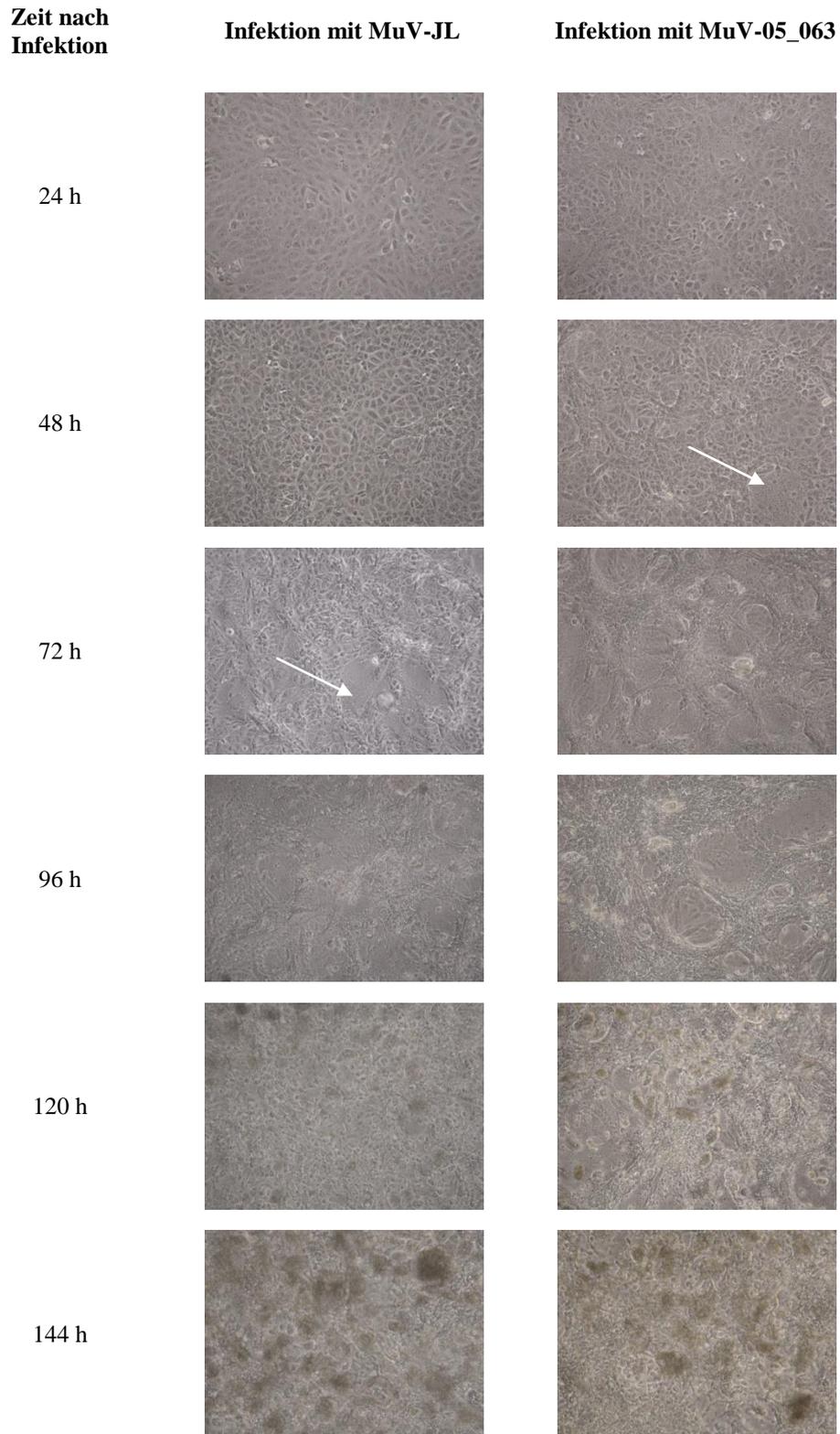


**Abb. 10: WB der Infektionen der Vero-Zellen mit Impf-(A) bzw. Wildtypstamm (B).** Die Zellen wurden durch MuV-JL und MuV-05\_063 mit MOI 0,01 infiziert und 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h oder 120 h nach Infektion lysiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Negativkontrollen (-) dienten uninfizierte Zellen, für die Positivkontrollen (+) wurden die Vero-Zellen mit 25 fg/ $\mu$ l CHX und 200 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  für einen Zeitraum von 72 h stimuliert. Die Anfärbung von PARP (116 kDa), dessen Spaltprodukt (89 kDa), Aktin (42 kDa) als Gelbeladungskontrolle und des viralen N-Proteins (70 kDa) erfolgte durch spezifische Primärantikörper und POD-gekoppelter Sekundärantikörper per Chemolumineszenz.

Es zeigte sich, dass das PARP-Spaltprodukt bei der Infektion mit dem Impfstamm 72 h, beim Patientenstamm 48 h nach der Infektion erscheint (Abb. 10). Das Wildtyp-Virus scheint somit schneller Apoptose in infizierten Zellen einzuleiten als das Impfvirus. Das virale N-Protein ist bei der Infektion mit dem Stamm Jeryl-Lynn nur bei 96 und 120 h nachweisbar. Im Gegensatz dazu ließ es sich bei der Infektion mit MuV-05\_063 zu keinem Zeitpunkt detektieren. Dies ist jedoch kein Ausschluss für eine Infektion, da das N-Protein des Wildtyps möglicherweise nicht von dem verwendeten Antikörper erkannt wurde.

### Morphologischer Vergleich einer Infektion mit Impfstamm und Wildtypvirus



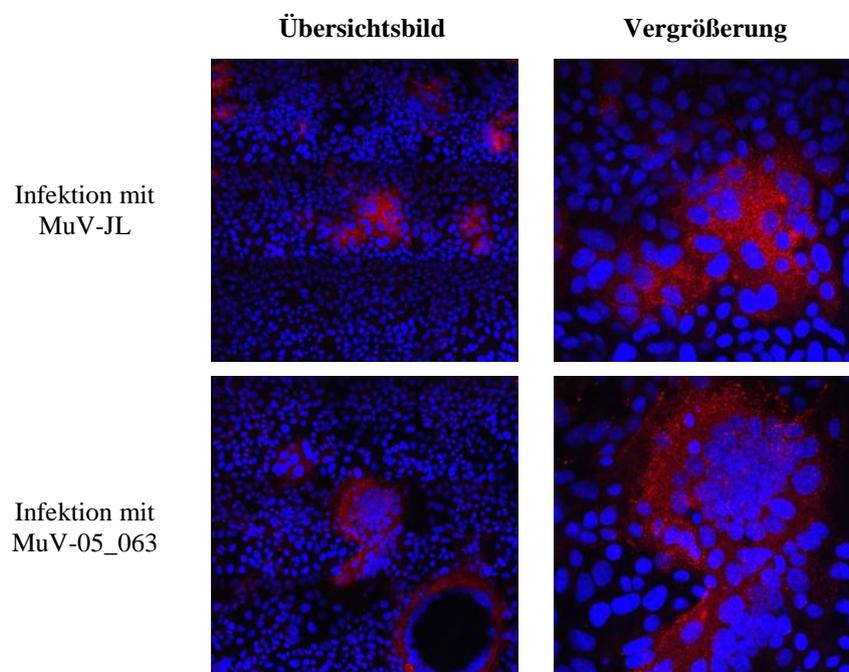


**Abb. 11: Infektion von Vero-Zellen mit Impf- und Wildtypstamm.** Die Zellen wurden einerseits mit MuV-JL und andererseits mit MuV-05\_063 (beides MOI 0,01) infiziert. Nach 0, 24, 48, 72, 96, 120 oder 144 h wurden die Proben mit einem Lichtmikroskop betrachtet und mithilfe einer Digitalkamera (*Nikon*) dokumentiert, Objektiv 10x. Weiße Pfeile kennzeichnen entstandene Synzytien.

Zum weiteren Vergleich der Apoptose-Induktion durch MuV-Impf- und Wildtypviren wurde der CPE in Vero-Zellen, die mit MuV-JL oder MuV-05\_063 infiziert wurden, beobachtet. Bei der Infektion mit dem Wildtypvirus war nach 48 h bereits ein Synzytium erkennbar (weißer Pfeil in Abbildung 11). Im Gegensatz dazu konnte diese Fusion der Zellkerne bei der Infektion mit dem Impfstamm erst nach 72 h beobachtet werden. Es ist jedoch erkennbar, dass die Synzytienbildung während des weiteren Infektionsverlaufes bei beiden Virusstämmen etwa gleich stark voranschritt bis sich schließlich die Zellen ablösten. Morphologisch ließ sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Virusstämmen feststellen.

### Immunfluoreszenztest

Zur spezifischen Detektion von MuV-infizierten Zellen wurde ein Immunfluoreszenztest mit einem Antikörper gegen das Fusionsprotein des Mumpsvirus ( $\alpha$ -MuV-F-Protein) durchgeführt, was einen Vergleich zwischen beiden Infektionen ermöglichte (siehe Punkt 7.8.3 Markierung mit Fab-Fragment gekoppeltem Antikörper).

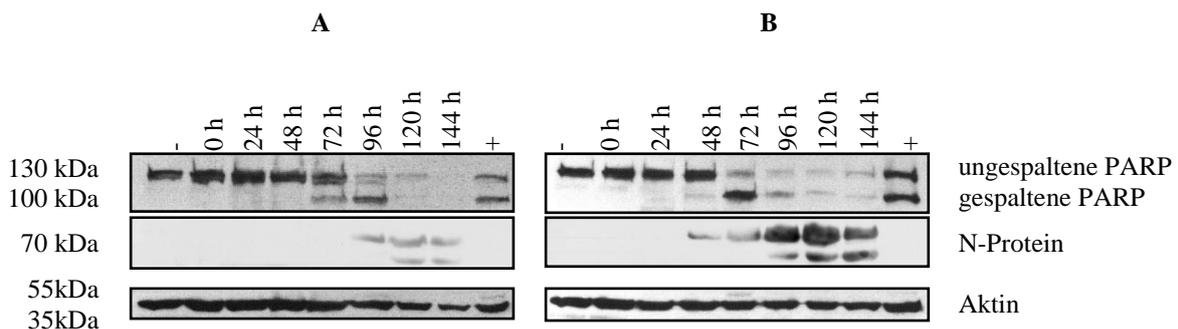


**Abb. 12: Immunfluoreszenzbilder 48 h nach Mumpsvirus-Infektion.** Vero-Zellen wurden entweder mit dem Impfstamm Jery-Lynn (MuV-JL) oder mit dem Wildtypstamm (MuV-05\_063) mit MOI 0,01 infiziert. Die Zellkerne wurden mittels DAPI blau angefärbt und das virale F-Protein durch einen spezifischen fluorophorgekoppelten Antikörper rot. Die Bildaufnahmen wurden mittels einem konfokalen Laserscanning Mikroskop LSM 780 von Zeiss (63x Objektiv) gemacht.

Beide Virusstämme zeigten eine ähnliche Expressionsrate für das F-Protein sowie eine annähernd gleiche Infektionsrate, was sich durch die Anzahl der Synzytien darstellt. Allerdings schienen hier die Synzytien in Vero-Zellen, die mit dem Wildtypvirus infiziert wurden etwas größer zu sein (48 Zellkerne im Synzytium) als in mit Impfvirus infizierten Zellen (29 Zellkerne im Synzytium). Das bestätigt die Beobachtung, dass die Infektion mit dem Wildtypvirus etwas schneller verläuft als die Impfvirus-Infektion.

### 8.6.3 Vergleich von Mumpsvirus-Infektionen mit rekombinanten Virusstämmen

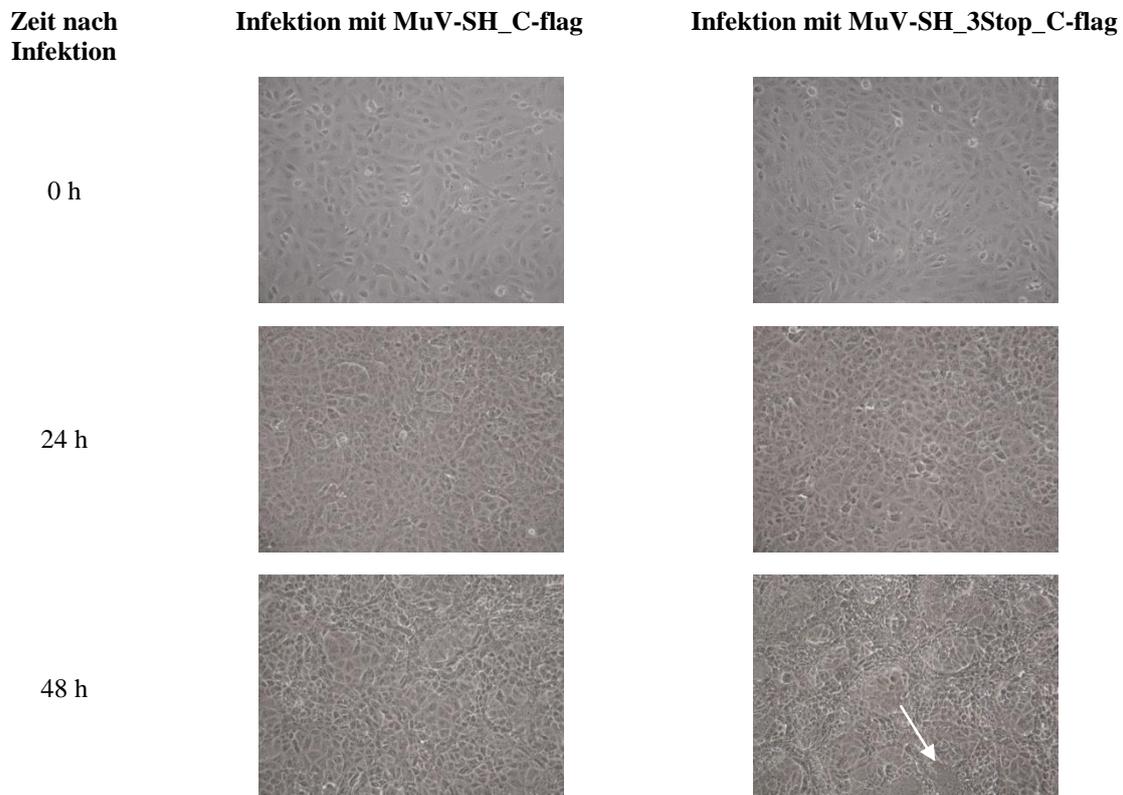
In der Arbeitsgruppe von Annette Mankertz wurden bereits ein, auf dem Impfstamm Jeryl-Lynn basierendes, rekombinantes Mumpsvirus mit einem Flag-Tag am C-Terminus des SH-Proteins (rMuV-SH\_C-flag) und eines mit deletiertem SH-Protein durch Einbau von drei Stopcodons innerhalb der Sequenz (rMuV-SH\_3Stop\_C-flag) konstruiert (Franz, 2012). Ein Vergleich des Infektionsverhaltens der beiden Stämme ermöglichte die Untersuchung des Einflusses des SH-Proteins auf den Apoptose-Prozess der Wirtszellen. Hierfür wurden Vero-Zellen mit rMuV-SH\_C-flag und rMuV-3Stop\_C-flag infiziert und direkt nach Infektion so wie anschließend alle 24 h geerntet. Die Proteine der Zelllysate wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot hinsichtlich der PARP-Spaltung untersucht (siehe Punkt 7.8.6 SDS-PAGE und Western Blot).

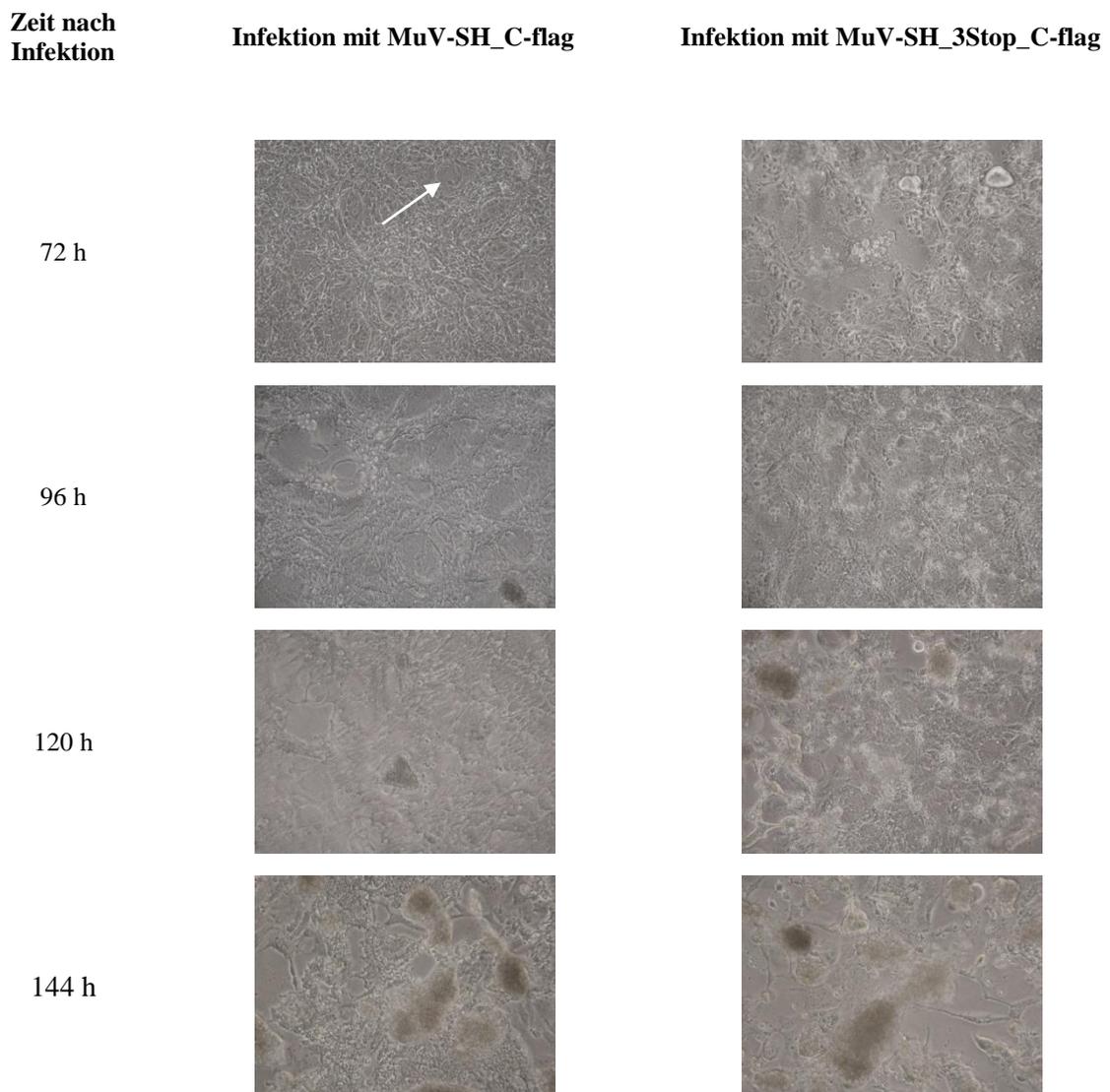


**Abb. 13: WB der Infektionen der Vero-Zellen mit rMuV-SH\_C-flag (A) bzw. rMuV-SH\_3Stop\_C-flag (B).** Die Zellen wurden durch rMuV-SH\_C-flag und rMuV-SH\_3Stop\_C-flag mit MOI 0,001 infiziert und 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h oder 120 h nach Infektion lysiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE und deren Transfer auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot. Als Negativkontrollen (-) wurden uninfizierte Zellen, für die Positivkontrollen (+) Vero-Zellen mit 25 fg/ $\mu$ l CHX und 200 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  für 72 h inkubiert wurden, mitgeführt. PARP (116 kDa), dessen Spaltprodukt (89 kDa), Aktin (42 kDa) als Gelbeladungskontrolle und das virale N-Protein (70 kDa) wurden mit spezifischen Primärantikörpern markiert und mit POD-gekoppeltem Sekundärantikörper und Chemolumineszenz detektiert.

Bei der Infektion mit rMuV-SH\_C-flag nahm die Bande für ungespaltene PARP nach 72 h stark ab, gleichzeitig erschien das PARP-Spaltprodukt. Bei einem Zeitpunkt von 120 h waren beide Formen von PARP kaum noch nachweisbar. Das virale N-Protein zeigte sich erstmals bei 96 h. Die zweite, kleinere Bande, die bei 120 h detektierbar war, wurde bereits früher beobachtet und lässt sich auf den vermutlich teilweisen Abbau des N-Proteins während der Zellyse für die SDS-PAGE zurückführen (Slibinskas *et al.*, 2002). Bei der Infektion mit rMuV-SH\_3Stop\_C-flag begann die Spaltung von PARP bereits nach 48 h und ab 96 h nahm die Signalintensität beider Formen von PARP stark ab. Bei der Rekombinante mit deletiertem SH-Protein trat also die Spaltung von PARP 24 h früher auf als bei dem rekombinanten Virus mit intaktem Protein und die Infektion war durch Detektion des viralen N-Proteins 48 h früher nachweisbar. Die fehlende Anwesenheit des SH-Proteins scheint somit nicht nur die Induktion der Apoptose sondern auch die Infektion an sich zu beschleunigen.

### Morphologischer Vergleich einer Infektion mit rekombinanten Viren



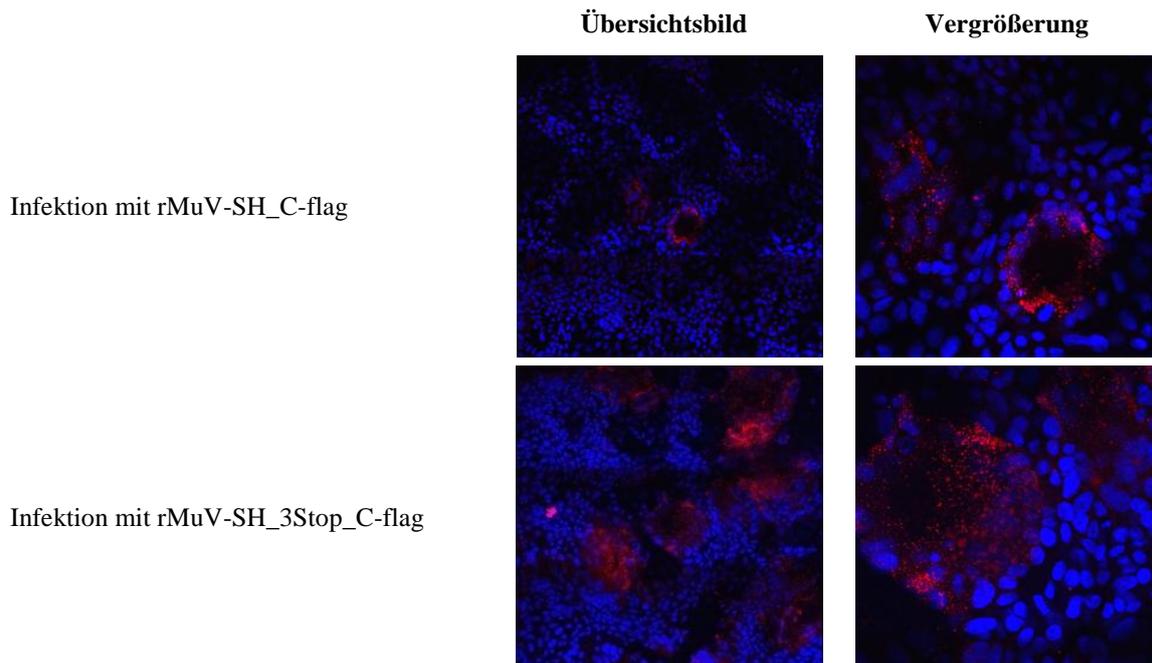


**Abb. 14: Infektion von Vero-Zellen mit rekombinanten Viren.** Die Zellen wurden einerseits mit rMuV-SH\_C-flag und andererseits mit rMuV-SH\_3Stop\_C-flag (beides MOI 0,001) infiziert. Nach 0, 24, 48, 72, 96, 120 oder 144 h wurden die Proben mit einem Lichtmikroskop betrachtet und mithilfe einer Digitalkamera (*Nikon*) dokumentiert, Objektiv 10x. Weiße Pfeile kennzeichnen entstandene Synzytien.

Bei Infektionen mit rMuV-SH\_C-flag bzw. rMuV-SH\_3Stop\_C-flag mit MOI 0,001 konnte über die Gesamtdauer des Versuches eine Steigerung des zytopathischen Effekts festgestellt werden (Abb. 14). Allerdings waren bei den Vero-Zellen, die mit dem Virus infiziert wurden, das kein SH-Protein exprimiert, schon 48 h nach Infektion die ersten Synzytien zu beobachten (weißer Pfeil), was mit der Spaltung von PARP korrelierte. Nach 72 h fingen die infizierten Zellen an sich vom Lochplattenboden zu lösen. Verglichen damit traten die ersten Synzytien in den Zellen, die mit dem Virus mit intaktem SH-Protein infiziert wurden, erst nach 72 h auf

(weißer Pfeil) und diese Zellen lösten sich erst ab 96 h nach der Infektion mit rMuV-SH\_C-flag ab. Diese Beobachtung bestätigte die Annahme, dass Viren ohne SH-Protein etwa 24 h früher einen CPE induzieren.

### Immunfluoreszenztest



**Abb. 15: Immunfluoreszenzbilder 48 h nach rMuV-Infektion.** Vero-Zellen wurden entweder mit dem rekombinanten rMuV-SH\_C-flag oder mit rMuV-SH\_3Stop\_C-flag mit MOI 0,001 infiziert. Die Zellkerne wurden mittels DAPI blau angefärbt und das virale F-Protein durch einen spezifischen fluorophorgekoppelten Antikörper rot. Die Analyse erfolgte mittels konfokalem Laserscanning Mikroskop LSM 780 von Zeiss, 63x Objektiv.

Zur Untersuchung der Synzytienbildung wurde auch eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (siehe Punkt 7.8.3 Markierung mit Fab-Fragment gekoppeltem Antikörper). Hierfür wurden Vero-Zellen entweder mit rMuV-SH\_C-flag oder rMuV-SH\_3Stop\_C-flag mit MOI 0,001 infiziert und 48 h danach erfolgte die Färbung des viralen F-Proteins mit einem spezifischen Antikörper. Zusätzlich wurden die Zellkerne durch DAPI blau angefärbt. Die mikroskopischen Aufnahmen in Abb. 15 bestätigten somit, dass ein Fehlen des SH-Proteins eine deutlich stärkere Verbreitung der Infektion als bei Anwesenheit dieses Proteins hervorruft, denn sowohl die Anzahl als auch die Größe der Synzytien war erheblich erhöht.

## 9. Diskussion

Verschiedene Paramyxoviren, wie das Parainfluenza Virus 5 (PIV5) und auch das Mumpsvirus kodieren für ein kleines hydrophobes Protein, das *small hydrophobic protein* (SH), für das antiapoptotische Eigenschaften beschrieben wurden (Fuentes *et al.*, 2007, Wilson *et al.*, 2006, Lin *et al.*, 2003). In Kulturüberständen von Zellen, die mit einer SH-defizienten Rekombinante vom PIV5 (rPIV5 $\Delta$ SH) infiziert wurden, konnte eine erhöhte Konzentration des Zytokins TNF $\alpha$ , welches einer der wichtigsten Auslöser des programmierten Zelltods darstellt, detektiert werden. Ebenfalls konnte die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, einem Transkriptionsfaktor für TNF $\alpha$ , bereits gezeigt werden (Lin *et al.*, 2003). Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass das SH-Protein in den TNF $\alpha$ -induzierten Apoptoseweg eingreift.

In der Arbeitsgruppe von Annette Mankertz am Robert Koch-Institut wurde der Einfluss dieses Proteins auf die durch TNF $\alpha$  und CHX induzierte Apoptose bereits anhand von plasmid-exprimiertem SH-Protein in HEK293-Zellen untersucht. In diesem System konnte jedoch keine antiapoptotische Wirkung des Proteins beobachtet werden, was vermuten lässt, dass noch weitere Faktoren an der Ausbildung des antiapoptotischen Effekts des SH-Proteins beteiligt sind. Dieser sollte nun in der vorliegenden Bachelorarbeit im Viruskontext untersucht werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Etablierung eines geeigneten Nachweissystems der Apoptose-Induktion in Mumps-infizierten Zellen und anschließend die vergleichende Untersuchung verschiedener Mumpsvirusstämme bzgl. der Induktion des programmierten Zelltods in den entsprechenden Wirtszellen. Es sollten in diesem Zusammenhang einerseits ein MuV-Impfstamm und ein Wildtypstamm miteinander verglichen werden und andererseits eine SH-defiziente MuV-Rekombinante mit einer Rekombinante mit intaktem SH-Protein. Da sich die für die bisherigen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe verwendeten HEK293-Zellen nicht mit Mumps infizieren ließen, wurden die Versuche in Vero-Zellen durchgeführt und an diese angepasst.

### 9.1 Etablierung einer Positivkontrolle für Apoptose-Induktion in Vero-Zellen

Zunächst sollte eine geeignete Positivkontrolle für die Induktion von Apoptose in Vero-Zellen entwickelt werden. Dazu wurden Zellen mit verschiedenen Konzentrationen TNF $\alpha$  und CHX einzeln und in Kombination über 18 h und 48 h behandelt (Wiegand, 2010). Eine alleinige Stimulation nur mit TNF $\alpha$  hatte zu keinem der beiden Zeitpunkte eine erkennbare Auswirkung auf die Viabilität der Zellen. Im Gegensatz dazu erzielte CHX alleine einen

negativen Effekt auf die Zellviabilität, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass es sich hier um ein Antibiotikum handelt, welches die Translation in Eukaryoten hemmt. Ein deutlicher Einfluss auf die Viabilität der Zellen ließ sich erstmals bei der Kombination aus 200 pg/ $\mu$ l TNF $\alpha$  und 25 fg/ $\mu$ l CHX bei einer Behandlungszeit von 48 h beobachten. Um den Effekt noch zu verstärken wurde deshalb für alle weiteren Versuche eine längere Inkubationszeit von 72 h gewählt, sodass solch eine Behandlung der Zellen als Positivkontrolle zur Austestung verschiedener Methoden zum Nachweis von Apoptose verwendet werden konnte.

### **9.2 Nachweis von Apoptose durch TUNEL-Assay**

Mithilfe des TUNEL-Assays lässt sich Apoptose in Zellen anhand des Nachweises fragmentierter DNA detektieren. Dafür werden an die freien 3'OH-Gruppen der Fragmente fluoreszenzmarkierte Nukleotide durch die terminale Desoxyribonukleotidyltransferase angehängt (Gavrieli *et al.*, 1992).

Die entstandene Färbung im TUNEL-Assay zeigte keinen Unterschied zwischen nichtapoptotischen und apoptotischen Zellen, letztere erkennbar an der Fragmentierung der DNA im Zellkern, sichtbar gemacht durch DAPI-Färbung. Das Signal war also unspezifisch und somit ist dieses Verfahren nicht geeignet für die Identifikation von induzierter Apoptose in Vero-Zellen. Es ist schwierig eine genaue Ursache hierfür zu definieren, aber vermutlich waren die Bedingungen für die Versuchsdurchführung nicht optimal z. B. die Art und Weise der Permeabilisierung oder die Dauer der Inkubation bei 37°C. Eine weitere Fehlerquelle könnte die Funktionalität des Enzyms aus dem verwendeten Kit sein.

### **9.3 Nachweis von Apoptose durch M30-Antikörper**

Der M30-Antikörper bindet spezifisch an das während der Apoptose gebildete Caspase-Spaltprodukt von Zytokeratin 18, welches einer der Hauptbestandteile des Zytoskeletts ist (Caulín *et al.*, 1997) und kann daher genauso wie das TUNEL-Assay zur Detektion von apoptotischen Zellen verwendet werden.

Die Fluoreszenzfärbung durch den M30-Antikörper lieferte zwar ein vermutlich spezifisches Signal, jedoch war durch die sehr starke Hintergrundfärbung eine verlässliche Auswertung nicht möglich, was diese Methode bzgl. des Nachweises von Apoptose in Vero-Zellen als ungeeignet deklariert.

#### **9.4 Nachweis der Poly(ADP-ribose)-Polymerase als Apoptose-Indikator im Western Blot**

Zum Prozess der Apoptose gehört unter anderem auch der Abbau von DNA-Reparaturenzymen, zu denen auch die Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) gehört. Demzufolge stellt der Nachweis des gespaltenen Proteins einen zuverlässigen Apoptose-Indikator dar (Li *et al.*, 2000).

In Vero-Zellen, die für 72 h mit 200 pg/μl TNFα und 25 fg/μl CHX stimuliert wurden, um den programmierten Zelltod einzuleiten, konnte mittels Western Blot die Spaltung der PARP eindeutig nachgewiesen werden, während in unbehandelten Kontrollzellen lediglich die Bande des intakten, ungespaltenen PARP detektiert wurde. Diese Methode unterschied also klar zwischen apoptotischen und nichtapoptotischen Zellen und erwies sich somit für weitere Anwendungen als geeignet.

##### **9.4.1 Nachweis der PARP in mit MuV-Impfstamm Jeryl-Lynn-infizierten Zellen**

Diese Methode wurde nun zum Nachweis von durch eine MuV-Infektion induzierte Apoptose eingesetzt. Drei Tage nach der Virusinfektion mit dem Mumpsvirus-Impfstamm, mit MOI 3, erschien das Spaltprodukt der PARP im Western Blot, wobei die Menge dieses Fragments mit voranschreitender Zeit immer weiter zunahm. Jedoch ließ sich während der gesamten Versuchszeit auch die Bande für ungespaltene PARP nachweisen, was darauf hinwies, dass nicht in allen Zellen Apoptose induziert wurde. Interessanterweise war das virale N-Protein erst 24 h nach Anwesenheit der gespaltenen PARP, was 96 h nach Infektion entspricht, nachweisbar. Dies lässt vermuten, dass schon frühe Replikationsvorgänge des Virus die Apoptose in infizierten Zellen induzieren.

Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel Makrophagen besitzen neben Rezeptoren, die die spezifischen viralen Oberflächenproteine erkennen auch RIG-I-like Rezeptoren, wie RIG-1 (*retinoic acid-inducible gene 1*) und MDA-5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*), die als Helicasen fungieren. Sie werden den PRRs (*pattern recognition receptor*) zugeordnet, da sie zum einen die ssRNA des Mumpsvirus, aber auch dsRNA, als virales Replikationszwischenprodukt, erkennen können (Yoneyama *et al.*, 2004). Dadurch wird NF-κB aktiviert, welches als Transkriptionsfaktor die Expression von u. a. TNFα induziert und schließlich den Apoptose-Prozess der virusinfizierten Zelle einleitet um diese zu eliminieren, bevor sich die Virus-Infektion weiter ausbreiten kann (Coward *et al.*, 2002).

Die Komponente CHX ist ein Antibiotikum, das die Translation von Eukaryoten hemmt, indem es an die 60 S-Untereinheit der Ribosomen bindet und somit die Proteinsynthese

unterdrückt, was schlussendlich zum Zelltod führt. Außerdem sensibilisiert CHX die Zellen für eine TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose, jedoch ist bisher nicht bekannt an welcher Stelle genau dieses Antibiotikum in den Mechanismus der Apoptose eingreift (Bai *et al.*, 2006, Fulda *et al.*, 2000).

#### **9.4.2 Vergleich einer Infektion mit MuV-Impfstamm Jeryl-Lynn und einem MuV-Wildtyp-Isolat**

Bei dem MuV-Wildtyp-Isolat handelte es sich um ein aus einem an Mumps erkrankten Patienten stammendes Virus (MuV-05\_063). Die Vero-Zellen wurden zum einen mit dem MuV-Impfstamm Jeryl-Lynn und zum anderen mit dem Wildtyp mit einer MOI von 0,001 infiziert und in regelmäßigen Zeitabständen analysiert. Bei Betrachtung der Morphologie ließen sich bei der Infektion mit MuV-05\_063 schon nach 48 h Synzytien beobachten, wohingegen dies bei der Mumpsvirus-Infektion mit dem Impfstamm erst nach 72 h möglich war. Im Immunfluoreszenztest mit spezifischer Färbung des MuV-F-Proteins erschienen die Synzytien des Wildtypvirus im Vergleich zum MuV-JL größer zu sein und mehr Zellkerne zu beinhalten. Somit verläuft die Infektion der Vero-Zellen mit dem Patientenisolat etwas schneller. Vergleicht man die beiden Virusinfektionen jedoch anhand der Färbung der PARP im Western Blot, so erschien in den Wildtyp-infizierten Zellen gespaltene PARP schon deutlich bei 48 h, während in Impfstamm-infizierten zu diesem Zeitpunkt nur eine sehr schwache Bande erkennbar wurde. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass der Prozess der Apoptose in MuV-05\_063-infizierten Vero-Zellen schon etwas eher einsetzt. Diese Erkenntnis würde gegen eine postexpositionelle Prophylaxe durch den Impfstamm als Therapie bei einer akuten Mumpsvirus-Infektion sprechen, bei der unmittelbar nach Exposition mit dem Virus der Impfstamm injiziert wird, um den eigentlichen Krankheitsausbruch zu unterdrücken. Bei Kontakt mit Masernviren ist dies eine gängige Behandlungsmethode, jedoch wurde diese Maßnahme bei einer Infektion mit Mumpsviren schon als nicht effektiv deklariert (Levine *et al.*, 2011, RKI STIKO, 2001).

Das virale N-Protein konnte nur 96 h und 120 h nach der Infektion mit dem Impfstamm detektiert werden. Im Gegensatz dazu war dieses Protein bei Infektion mit dem Wildtypstamm zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. Die Tatsache, dass das N-Protein bei der Infektion mit dem Patientenisolat nicht detektiert werden konnte, erklärt sich möglicherweise dadurch, dass sich dessen N-Protein von dem des Impfstammes so weit unterscheidet, dass der spezifische Antikörper nur noch unzureichend daran binden kann. Obwohl das virale N-Protein des Wildtypstammes nicht per Western Blot nachweisbar war, konnte von einer

Infektion ausgegangen werden, denn die Erhöhung des zytopathischen Effekts und die Synzytienbildung, die für Mumps charakteristisch ist (Scheiner, 2002), waren auf Bildaufnahmen (siehe Abbildung 11 unter Punkt 8.6.2) eindeutig erkennbar.

Die erfolgten Versuche gaben Hinweise auf eine möglicherweise geringfügig schnellere Replikation des Wildtypvirus im Vergleich zum Impfstamm, jedoch konnten die Ergebnisse dies nicht eindeutig belegen.

#### **9.4.3 Vergleich des Infektionsverlaufs rekombinanter MuV-Stämme mit und ohne exprimiertes SH-Protein**

Es wurde beschrieben, dass das MuV-SH-Protein die Apoptose in infizierten Zellen hemmt. Diese Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen von Viren mit komplett deletiertem SH-Gen (Wilson *et al.*, 2006). Diese Veränderung in der Genomstruktur des Mumpsvirus könnte jedoch die Replikation und damit die Apoptose-Induktion beeinflussen, ohne dass der Effekt auf das Fehlen des SH-Proteins an sich zurückzuführen ist. So zeigten vorangegangene Versuche, dass der Deletionsstamm im Vergleich zum Wildtypstamm und zum Mumpsvirusstamm mit SH-Gen, welches drei Stopcodons enthält, eine wesentlich geringere Pathogenität und eine verminderte Replikationsaktivität aufweist (Malik *et al.*, 2011).

Daher wurde in der Arbeitsgruppe Mankertz ein rekombinantes MuV (rMuV-SH\_3Stop\_C-flag) hergestellt, in dessen SH-Gensequenz drei Stopcodons eingefügt wurden, sodass das SH-Protein bei erhaltener Genomstruktur nicht translatiert wird (Franz, 2012). Beim Vergleich dieses rMuV mit einem Virus, bei dem das SH-Protein unverändert ist (rMuV-SH\_C-flag) ließ sich feststellen, dass die Apoptose-Induktion bei einer Infektion der Vero-Zellen mit dem SH-defizienten Virus 24 h eher erfolgte als bei dem rMuV mit exprimiertem SH-Protein. Gleichzeitig zeigte das Virus mit deletiertem SH-Protein ein deutlich höheres CPE, sowohl im Western Blot, bei dem die Bande für das virale N-Protein im Vergleich zum Virus mit intaktem SH-Protein 48 h früher nachweisbar war, als auch in der morphologischen Betrachtung mit 24 h früher detektierbaren und größeren Synzytien. Auch im Immunfluoreszenztest konnte bei einer Infektion mit rMuV-SH\_3Stop\_C-flag zum gleichen Zeitpunkt deutlich mehr MuV-F-Protein detektiert werden als bei der Virusinfektion mit vorhandenem SH-Protein. Das Abschwächen des Signals für PARP und deren Spaltprodukt ist mit dem starken Zellsterben zu begründen, was man auch an der parallel dazu abnehmenden Aktinbande erkennt. Die Proteine wurden wahrscheinlich weiter abgebaut bis sie nicht mehr detektiert werden konnten und somit die Nachweisgrenze erreicht war. Es

erfolgte keine erneute Proteinsynthese, da alle Zellen in den Prozess der Apoptose eingetreten waren. Die zweite, kleinere Bande des N-Proteins, die bei 96 h bzw. 120 h erscheint, wurde bereits früher beobachtet und ist vermutlich auf den teilweisen Abbau des Proteins während der Zellyse für den SDS-PAGE zurückzuführen (Slibinskas *et al.*, 2002).

Vorangegangene Versuche zeigten, dass das SH-Protein für die Replikation nicht essentiell zu sein scheint und somit auch keinen Einfluss auf die Wachstumsrate hat. Vielmehr wurde vermutet, dass dieses Transmembranprotein den TNF $\alpha$ -Signalweg beeinflussen kann und somit die Induktion der Apoptose der Zielzellen hinauszögert, was dem Virus einen längeren Zeitraum für die Replikation während des Infektionsverlaufs verschafft (Wilson *et al.*, 2006). Diese Auffassung wurde durch frühere Untersuchungen bestätigt, die zeigten, dass bei einer Infektion mit einem SH-Deletionsstamm wie PIV5 $\Delta$ SH zusätzlich exprimiertes PIV5-SH-Protein in der Lage war, den zytopathischen Effekt abzuschwächen (Lin *et al.*, 2003, He *et al.*, 2001). Der gleiche Effekt trat bei Verwendung des MuV-SH-Proteins auf (Wilson *et al.*, 2006). Da aber wie beschrieben die gesamte Virusreplikation in Zellen, die mit SH-defizientem Virus infiziert wurden, schneller stattzufinden scheint, muss durch spätere Untersuchungen noch geklärt werden, ob das SH-Protein in den Apoptoseprozess an sich, beispielsweise über die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und damit der Hemmung der Freisetzung von TNF $\alpha$ , eingreift oder ob dies nur eine Art Nebeneffekt der schnelleren Virusreplikation ist. Die in dieser Arbeit etablierte Methode kann zur Klärung dieser Frage beitragen und konnte einen Effekt nun auch für MuV-SH im Kontext einer Mumpsvirus-Infektion bestätigen und die antiapoptischen Eigenschaften des Proteins in diesem Zusammenhang zeigen.

## 10. Ausblick

Paramyxoviren, wie das Mumpsvirus, kodieren für das kleine hydrophobe SH-Protein, welchem antiapoptische Eigenschaften zugesprochen werden (Wilson et al., 2006).

Bisher konnten mit dem in unserer Forschungsgruppe entwickelten transienten System, welches auf der Transfektion eines SH-Gen-tragenden Plasmids in HEK29-Zellen basiert, keine antiapoptische Wirkung des Proteins festgestellt werden. Es wurde vermutet, dass der Viruskontext hierfür eine essentielle Rolle spielt. Das führte zum Ziel der vorliegenden Bachelorarbeit: Ein geeignetes Nachweissystem für die Induktion von Mumpsvirus-infizierten Zellen zu etablieren. Dafür wurde zunächst eine Positivkontrolle bzgl. Apoptose-Induktion mittels Stimulation der Zellen mit einer Kombination aus CHX und TNF $\alpha$  entwickelt (Wiegand, 2010). Anschließend konnte mithilfe dieser verschiedene Nachweismethoden auf ihre Funktionalität ausgetestet werden, was zur Schlussfolgerung führte, dass der Proteinnachweis der Poly(ADP-ribose)-Polymerase per Western Blot die geeignetste Methode war um den programmierten Zelltod, ausgelöst durch die Virusinfektion, nachzuweisen. Das ermöglichte einen Vergleich des Infektionsverlaufes verschiedener Mumpsvirus-Stämme miteinander: Zum einen von Wildtyp und Impfstamm und zum anderen zweier rekombinanter Stämme, wobei es sich hier um einen Virusstamm mit funktionstüchtigem und einem mit deletiertem SH-Protein handelte. Durch die so erhaltenen Ergebnisse konnten die antiapoptische Eigenschaften dieses Proteins während des Infektionsverlaufs in Mumpsvirus-infizierten Vero-Zellen belegt werden.

Diese Nachweismethode kann zur Klärung der Frage beitragen, ob das SH-Protein nur in den TNF $\alpha$ -induzierten Apoptose-Weg eingreift oder ob es auch im NF- $\kappa$ B-Signalweg eine Rolle spielt. Außerdem werden die so gewonnenen Erkenntnisse inwieweit das SH-Protein den Apoptose-Prozess beeinflusst und somit dem Virus einen Vorteil bzgl. dessen Replikation verschafft, im Hinblick auf eine Verbesserung der derzeit verwendeten Impfstoffe interessant, denn es kommt immer öfter zu Krankheitsausbrüchen durch eine Mumpsvirus-Infektion, obwohl die betroffenen Personen eine MMR (Masern, Mumps, Röteln)-Impfung erhalten hatten (Cortese et al. 2011). Es wäre auch denkbar, dass durch eine verbesserte Aufklärung der Funktionsweise dieses Proteins wirksame Therapien bei einer Mumpsinfektion entwickelt werden könnten, da sich eine sogenannte Riegelimpfung (postexpositionelle Prophylaxe), wie sie bei einer akuten Maserninfektion angewendet wird, nicht zur Behandlung von mit Mumpsviren infizierten Menschen geeignet ist ((Levine et al., 2011, RKI STIKO, 2001).

## 11. Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B. B. (2003).** Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology*, 3(9), 745–56. doi:10.1038/nri1184
- Ashkenazi, A. (2002).** Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature reviews. Cancer*, 2(6), 420–30. doi:10.1038/nrc821
- Bai, J., & Cederbaum, A. I. (2006).** Cycloheximide protects HepG2 cells from serum withdrawal-induced apoptosis by decreasing p53 and phosphorylated p53 levels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 319(3), 1435–43. doi:10.1124/jpet.106.110007
- Bergmann, T. (2011).** Analyse der Interaktion des kleinen , hydrophoben Proteins ( SH - Protein ) des Mumpsvirus mit dem Rezeptor für TNF $\alpha$ .
- Caulín, C., Salvesen, G. S., & Oshima, R. G. (1997).** Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *The Journal of cell biology*, 138(6), 1379–94. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2132555&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Cortese, M. M., Barskey, A. E., Tegtmeier, G. E., Zhang, C., Ngo, L., Kyaw, M. H., Baughman, A. L., et al. (2011).** Mumps antibody levels among students before a mumps outbreak: in search of a correlate of immunity. *The Journal of infectious diseases*, 204(9), 1413–22. doi:10.1093/infdis/jir526
- Coward, W. R., Okayama, Y., Sagara, H., Wilson, S. J., Holgate, S. T., & Church, M. K. (2002).** NF-kappa B and TNF-alpha: a positive autocrine loop in human lung mast cells? *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(9), 5287–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12391248>
- Creagh, E. M., & Martin, S. J. (2001).** Caspases: cellular demolition experts. *Biochemical Society transactions*, 29(Pt 6), 696–702. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709057>
- Elango, N. (1989).** Complete nucleotide sequence of the matrix protein mRNA of mumps virus. *Virology*, 168(2), 426–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2789521>
- Elango, N., Varsanyi, T. M., Kövamees, J., & Norrby, E. (1988).** Molecular cloning and characterization of six genes, determination of gene order and intergenic sequences and leader sequence of mumps virus. *The Journal of general virology*, 69 ( Pt 11, 2893–900. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3183630>
- Franz, S. (2012).** Analyse der Funktion des SH-Proteins des Mumpsvirus durch Erzeugung rekombinanter Viren.

- Fuentes, S., Tran, K. C., Luthra, P., Teng, M. N., & He, B. (2007).** Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *Journal of virology*, *81*(15), 8361–6. doi:10.1128/JVI.02717-06
- Fulda, S., Meyer, E., & Debatin, K.-M. (2000).** Metabolic Inhibitors Sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced Apoptosis by Down-Regulating Fas-associated Death Domain-like Interleukin 1-Converting Enzyme Inhibitory Protein Expression. *Cancer Res.*, *60*(14), 3947–3956. Retrieved from [http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/14/3947.abstract?ijkey=6697a9fe663dfa665bf16b0a8c4a1a1b47de6e5e&keytype2=tf\\_ipsecsha](http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/14/3947.abstract?ijkey=6697a9fe663dfa665bf16b0a8c4a1a1b47de6e5e&keytype2=tf_ipsecsha)
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. (1992).** Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology*, *119*(3), 493–501. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2289665&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- He, B., Lin, G. Y., Durbin, J. E., Durbin, R. K., & Lamb, R. A. (2001).** The SH integral membrane protein of the paramyxovirus simian virus 5 is required to block apoptosis in MDBK cells. *Journal of virology*, *75*(9), 4068–79. doi:10.1128/JVI.75.9.4068-4079.2001
- Hviid, A., Rubin, S., & Mühlemann, K. (2008).** Mumps. *Lancet*, *371*(9616), 932–44. doi:10.1016/S0140-6736(08)60419-5
- Jin, L., Rima, B., Brown, D., Orvell, C., Teclé, T., Afzal, M., Uchida, K., et al. (2005).** Proposal for genetic characterisation of wild-type mumps strains: preliminary standardisation of the nomenclature. *Archives of virology*, *150*(9), 1903–9. doi:10.1007/s00705-005-0563-4
- Karin, M., & Ben-Neriah, Y. (2000).** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annual review of immunology*, *18*, 621–63. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.621
- Kingsbury, N., & Masters, C. J. (1970).** On the determination of component molecular weights in complex protein mixtures by means of disc electrophoresis. *Analytical biochemistry*, *36*(1), 144–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4991633>
- Kolakofsky, D., Pelet, T., Garcin, D., Hausmann, S., Curran, J., & Roux, L. (1998).** Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *Journal of virology*, *72*(2), 891–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=124558&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Levine, H., Rishpon, S., Huerta-Hartal, M., & Davidovitch, N. (2011).** Preventing mumps outbreaks in confined settings: comprehensive ring vaccination as a containment strategy. *Human vaccines*, *7*(12), 1389–93. doi:10.4161/hv.7.12.18111

- Li, M., Schmitt, P. T., Li, Z., McCrory, T. S., He, B., & Schmitt, A. P. (2009).** Mumps virus matrix, fusion, and nucleocapsid proteins cooperate for efficient production of virus-like particles. *Journal of virology*, 83(14), 7261–72. doi:10.1128/JVI.00421-09
- Li, X., & Darzynkiewicz, Z. (2000).** Cleavage of Poly(ADP-ribose) polymerase measured in situ in individual cells: relationship to DNA fragmentation and cell cycle position during apoptosis. *Experimental cell research*, 255(1), 125–32. doi:10.1006/excr.1999.4796
- Lin, Y., Bright, A. C., Rothermel, T. A., & He, B. (2003).** Induction of apoptosis by paramyxovirus simian virus 5 lacking a small hydrophobic gene. *Journal of virology*, 77(6), 3371–83. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=149502&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lockshin, R. A., & Williams, C. M. (1964).** Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of Insect Physiology*, 10(4), 643–649. doi:10.1016/0022-1910(64)90034-4
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1998).** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94(4), 481–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727491>
- Malik, T., Shegogue, C. W., Werner, K., Ngo, L., Sauder, C., Zhang, C., Duprex, W. P., et al. (2011).** Discrimination of mumps virus small hydrophobic gene deletion effects from gene translation effects on virus virulence. *Journal of virology*, 85(12), 6082–5. doi:10.1128/JVI.02686-10
- Masharani, U. B., & Becker, J. (2010).** Teplizumab therapy for type 1 diabetes. *Expert opinion on biological therapy*, 10(3), 459–65. doi:10.1517/14712591003598843
- Micheau, O., & Tschopp, J. (2003).** Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114(2), 181–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887920>
- Modrow, S., Falke, D., Schatzl, H., & Truyen, U. (2010).** *Molekulare Virologie* (p. 730). Springer DE. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=SHl6AMUu8vEC&pgis=1>
- Rahman, M. M., & McFadden, G. (2006).** Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS pathogens*, 2(2), e4. doi:10.1371/journal.ppat.0020004
- Rimantas Slibinskasa, Aurelija Zvirblienea, Alma Gedvilaitea, & Kestutis Sasnauskas. (2002).** Synthesis of human mumps virus nucleocapsid protein in yeast *Pichia pastoris*. *Biologija*. biologija. doi:10.6001/biologija.vi3.399
- RKI. (2011).** STIKO zur Riegelungsimpfung mit MMR-Impfstoff. Retrieved March 31, 2013, from [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2001/29\\_01-ausschnitte/29\\_01-21\\_STIKO\\_MMR-Riegelungsimpfg.html](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2001/29_01-ausschnitte/29_01-21_STIKO_MMR-Riegelungsimpfg.html)

- Santos, C. L. S., Ishida, M. A., Foster, P. G., Sallum, M. A. M., Benega, M. A., Borges, D. B., Corrêa, K. O., et al. (2008).** Detection of a new mumps virus genotype during parotitis epidemic of 2006-2007 in the state of São Paulo, Brazil. *Journal of medical virology*, 80(2), 323–9. doi:10.1002/jmv.21068
- Saraste, A., & Pulkki, K. (2000).** Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular research*, 45(3), 528–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10728374>
- Scheiner, O. (2002).** *Vademecum Pathophysiologie viraler Infektionskrankheiten*. (p. 169). Wien: Facultas.
- Schmitt, A. P., Leser, G. P., Waning, D. L., & Lamb, R. A. (2002).** Requirements for budding of paramyxovirus simian virus 5 virus-like particles. *Journal of virology*, 76(8), 3952–64. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=136107&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 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(1), 156–62. doi:10.1006/viro.1996.0583
- Takeuchi, K., Tanabayashi, K., Hishiyama, M., Yamada, Y. K., Yamada, A., & Sugiura, A. (1990).** Detection and characterization of mumps virus V protein. *Virology*, 178(1), 247–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2389552>
- Takimoto, T., & Portner, A. (2004).** Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus research*, 106(2), 133–45. doi:10.1016/j.virusres.2004.08.010
- Van Cruchten, S., & Van Den Broeck, W. (2002).** Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, histologia, embryologia*, 31(4), 214–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12196263>
- Wang, X. (2001).** The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 15(22), 2922–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11711427>
- Whelan, S. P. J., Barr, J. N., & Wertz, G. W. (2004).** Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Current topics in microbiology and immunology*, 283, 61–119. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15298168>
- White, J. M. (1990).** Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annual review of physiology*, 52, 675–97. doi:10.1146/annurev.ph.52.030190.003331
- Wiegand, M. (2010).** Die Rolle des SH-Proteins des Mumpsvirus als antiapoptotischer Faktor : Etablierung eines Apoptose-Testsystems in Zellkultur.
- Wilson, R. L., Fuentes, S. M., Wang, P., Taddeo, E. C., Klatt, A., Henderson, A. J., & He, B. (2006).** Function of small hydrophobic proteins of paramyxovirus. *Journal of virology*, 80(4), 1700–9. doi:10.1128/JVI.80.4.1700-1709.2006

- Woznik, M. (2012).** Analyse der Funktion des SH-Proteins als Virulenzfaktor des Mumpsvirus.
- Xu, P., Luthra, P., Li, Z., Fuentes, S., D'Andrea, J. A., Wu, J., Rubin, S., et al. (2012).** The V protein of mumps virus plays a critical role in pathogenesis. *Journal of virology*, *86*(3), 1768–76. doi:10.1128/JVI.06019-11
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., et al. (2004).** The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology*, *5*(7), 730–7. doi:10.1038/ni1087
- Zuzarte-Luís, V., & Hurlé, J. M. (2002).** Programmed cell death in the developing limb. *The International journal of developmental biology*, *46*(7), 871–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12455623>

## **12. Eidesstattliche Erklärung**

„Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass ich die von mir eingereichte Bachelorarbeit selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.“

Berlin, den 14.05.13

---

Elisa Schwarz

### **13. Danksagung**

Als erstes möchte ich PD Dr. Annette Mankertz für die Möglichkeit meine Bachelorarbeit am Robert Koch-Institut in der FG 12 „Maser, Mumps, Röteln und Viren bei Abwehrschwäche“ anzufertigen und für die zahlreichen hilfreichen Diskussionsrunden und die sehr guten Arbeitsbedingungen danken.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr.-Ingenieur Vera Meyer für die Möglichkeit, meine Bachelorarbeit im ausgewählten Fachgebiet anfertigen zu können und Herrn PD Dr. Udo Schmidt danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Nicole Friedrich für das vielseitige und interessante Thema, sowie die kontinuierliche Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung aller experimenteller Arbeiten und beim Verfassen meiner Bachelorarbeit. Ich bin froh dich als Betreuerin gehabt zu haben, denn du hattest immer ein offenes Ohr für alles und hast so viel deiner knappen Zeit in mich investiert.

Bei Stefanie Franz, Anne Wolbert und Paul Rennert möchte ich mich für die Unterstützung im Laboralltag mit vielen praktischen Tipps und unermüdliches Fragen beantworten bedanken, sowie für das sehr ausführliche und zeitraubende Korrekturlesen.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem gesamten FG 12 und allen benachbarten Arbeitsgruppen für das sehr angenehme Arbeitsklima bedanken.

Ganz besonders möchte ich Franz, Paddy und Micha danken, denn ohne euch wäre ich nicht da wo ich jetzt bin. Danke für die vielen Stunden voll philosophieren, diskutieren, erklären und jede Menge Spaß. Ohne eure Unterstützung hätte ich dieses Studium nie durchgestanden.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir finanziell dieses Studium ermöglichen und ganz besonders meiner Mama, die mir in allen guten wie auch schlechten Lebenslagen zur Seite steht.