

Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Influenza-A-Virus infizierten Zellen

Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt

von

Walter Wurzer

aus Braunau am Inn

Würzburg 2003

Eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission

Vorsitzender:

Prof. Dr. R. Hedrich

Gutachter:

Prof. Dr. S. Ludwig

Gutachter:

Prof. Dr. M. Heisenberg

Tag des Prüfungskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Stephan Ludwig ganz herzlich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die „zweite Chance“ für meine Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Heisenberg danke ich für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. U.R. Rapp danke ich für die Aufnahme an seinem Institut

Dank gilt natürlich allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe. Danke an Dr. Bruce Jordan, Dr. Dragomir Dinev, Dr. Christina Ehrhardt und Mag. Martin Giner für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Vielen Dank an Dr. Andris Avots für die zahlreichen interessanten Diskussionen.

Ganz herzlich danke ich Dr. Beate Hess für die mühevollen Korrektur und Durchsicht dieser Arbeit.

Mag. Martin Giner danke ich vielmals für das Formatieren dieser Arbeit und seine Unterstützung im Wochenendbetrieb.

Meiner Freundin Theresa danke ich für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Der größte Dank gilt allerdings meinen Eltern, die mich mein ganzes Leben lang unterstützt, immer zu mir gehalten und mir das Studium erst ermöglicht haben.

Diese Arbeit widme ich meinem Vater, der immer gesagt hat
„Bua schau, dass d´ Dein Doktor mochst.“
und der diesen Tag leider nicht mehr erleben durfte.

Inhaltsangabe

<u>1. Einleitung</u>	<u>6</u>
1.1. Das Influenza-A-Virus	6
1.2. Wirtsspektrum	8
1.3. Morphologie und Vermehrung	8
1.4. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	13
1.5. Die Rolle von NF- κ B in der Apoptoseregulation	15
1.6. Apoptose	19
1.7. Die Rolle von Typ I Interferonen (IFN) in der Apoptoseinduktion	21
1.8. Todesrezeptoren und der "TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL)"	22
1.9. Zielsetzung der Arbeit	25
<u>2. Material</u>	<u>27</u>
2.1 Geräte	27
2.2 Chemikalien und Reagenzien	28
2.3 Zellkulturmaterial	30
2.4 Antikörper und Antiseren	31
2.5 Virus-Stämme	31
2.6 Proteine	31
2.7 Reagenzienansätze (Kits)	32
2.8 Plasmide	32
2.9 Zellen	32
<u>3. Molekularbiologische Standardmethoden</u>	<u>33</u>
3.1. Zellkultur	33
3.2. Molekularbiologische Methoden – Proteine	39
<u>4. Ergebnisse</u>	<u>48</u>
4.1. Herstellung und Charakterisierung retroviral transduzierter Zelllinien zur Untersuchung des NF- κ B-Signalweges	48
4.2. Replikation von Influenza-A-Viren in den verschiedenen Linien	52
4.3. Influenza-A-Viren-induziert Apoptose in verschiedenen Zelllinien unabhängig von Typ-I-Interferonen	54
4.4. Inhibition von Kaspase-3 führt zu geringeren Virustitern	56

4.5. Die Verwendung eines Breitband-Kaspaseinhibitors (Z-VAD-FMK) zeigt im Vergleich zu Z-DEVD-FMK keine verstärkte Inhibition der Virusvermehrung	58
4.6. Einfluß von pro- und antiapoptotischen Proteinen auf die FPV Replikation	60
4.7. Komplementation von MCF-7-Zellen mit Prokaspase-3 führt zu einem massiven Virustiteranstieg	63
4.8. Aktive Kaspase-3 spielt in der späten Phase der Replikation eine wichtige Rolle	64
4.9. Kein Ribonukleoprotein- (RNP) Export ohne aktive Kaspase-3	65
4.10. Das virale NP diffundiert nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin aus dem Kern	67
4.11. Der Raf/Mek/Erk-Weg und der Kaspase-3-Effekt beeinflussen sich nicht gegenseitig	68
4.12. Unterschiedlich starke PARP-Spaltung in den A549-Linien	69
4.13. Das proapoptotische Protein TRAIL wird nach Infektion NF- κ B-abhängig reguliert	70
4.14. TRAIL-Rezeptor 1 und 2 werden unabhängig von NF- κ B auf A549-Zellen exprimiert	71
4.15. Die TRAIL-Rezeptorexpression wird durch Influenza Virusinfektion nicht verändert	73
4.16. NF- κ B reguliert die virusinduzierte Expression von TRAIL	74
4.17. Titerrückgang durch Zugabe von löslichem TRAIL-R2 ins Infektionsmedium	75
4.18. Zugabe von rekombinantem TRAIL führt zu erhöhten Titern in A549-Zellen und kompensiert die NF- κ B-Defizienz	77
<u>5. Diskussion</u>	<u>78</u>
<u>6. Zusammenfassung.....</u>	<u>86</u>
<u>7. Summary</u>	<u>87</u>
<u>8. Literaturverzeichnis</u>	<u>88</u>
<u>9. Abkürzungen.....</u>	<u>101</u>
<u>10. Erklärung.....</u>	<u>105</u>
<u>11. Lebenslauf.....</u>	<u>106</u>

1.Einleitung

1.1. Das Influenza-A-Virus

Influenza-A-Viren sind weltweit verbreitete Pathogene für Mensch und Tier mit erheblicher klinischer Relevanz. Influenzaausbrüche sind durch plötzliches Auftreten und rasches Verschwinden gekennzeichnet, so dass sich ihr Vorkommen bis in die Antike zurückverfolgen lässt. Schon 412 v. Chr. beschrieb *Hipokrates* derartige Grippeepidemien. Die wohl bekannteste und bisher verheerendste Grippepandemie – die „Spanische Grippe“ – ereignete sich 1918/19. Während Europa noch in Trümmern lag, raffte sie über 40 Millionen Menschen weltweit dahin (Webster R.G. und Granoff A., 1994). Zwischen den ersten Symptomen und dem Tod lagen oft nur Stunden.

In späteren Jahrzehnten kam es immer wieder zu Influenza-Epidemien pandemischen Ausmaßes wie etwa 1957 die Hong Kong Grippe, 1965 die Russische Grippe oder 1977 die Asiatische Grippe. Wie man bereits vom Namen her ableiten kann, haben all diese Grippewellen ihren Ursprung im asiatischen Raum genommen. Dort, wo Mensch und Tier, im tropischen und subtropischen Klima auf engstem Raum zusammenleben, herrschen ideale Bedingungen für das Entstehen neuer Influenzastämme vor. Da das Influenza Virus ein segmentiertes RNA-Genom (Fig.1) besitzt, (Modrow S. et al., 1997) ist es durchaus möglich, dass ganze Genomsegmente ausgetauscht werden. Dieser Austausch wird als „antigenic shift“ bezeichnet und erzeugt wahrscheinlich bei einer Infektion eines Wirtes mit zwei verschiedenen Stämmen aus verschiedenen Spezies. Als Wirtsorganismus, der hier sozusagen als „Mischgefäß“ dienen kann, wurden Schweine identifiziert. Bei Infektion von Schweinen mit einem humanen und einem aviären Stamm kann es zum Austausch von Genomsegmenten und damit zur Entstehung neuer Virusstämme mit pandemischem Potential kommen. Die alljährlichen Influenza Wellen lassen sich wiederum durch den „antigenic drift“, eine Anzahl von Punktmutationen in antigenen Proteinbereichen, erklären (Webster RG. et al., 1992).

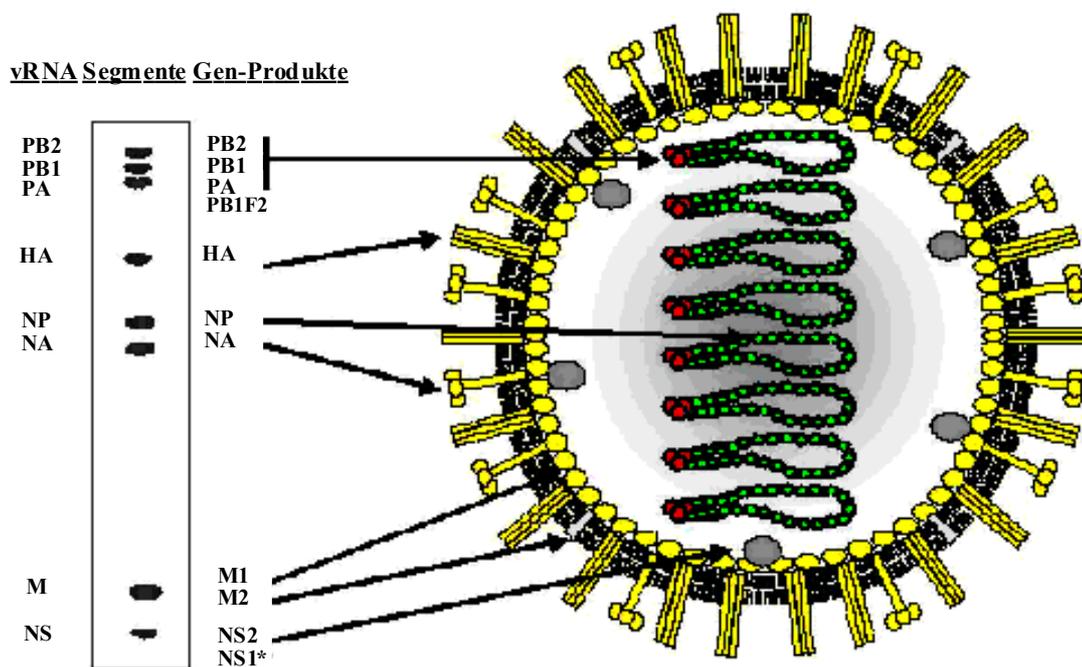


Abb.1.: (A) Schematische Darstellung des Influenza Virus Partikels. Das PB1-F2 ist noch nicht berücksichtigt.

(B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Influenza Viren. Die Oberflächenproteine sind dabei gut als Spikes erkennbar.



Klinische, epidemiologische und serologische Untersuchungen führten zur Einteilung in Influenza A, B und C Viren. Viren vom Typ A sind am stärksten pathogen, während Influenza-C-Virus Infektionen nur selten zu Klinikaufenthalten führen (Webster R.G. et al., 1992).

1.2. Wirtsspektrum

Von pathologischer Bedeutung sind Influenza-A-Viren beim Menschen, bei Schweinen und bei Pferden. Man geht davon aus, dass Influenza Viren ursprünglich aviäre Viren waren, wobei wild-lebende Wasservögel als Hauptreservoir dienen. In diesen Wirten sind Influenza Viren apathogen und vermehren sich nur in deren Intestinaltrakt. Influenza-B-Viren kommen nur bei Menschen vor. Für Influenza-C-Viren sind Menschen und Schweine als Wirte bekannt (Webster R.G. und Granoff A., 1994). Die Spezifität der aviären Influenza-Hämagglutinin-Proteine für α 2,3 gebundene Sialinsäure als Rezeptordeterminante, führt zum engen Wirtstropismus, so dass aviäre Stämme kaum Menschen, in deren Respirationstrakt α 2,6 gebundene Sialinsäure vorherrscht, infizieren können (Ito T und Kawaoka Y., 2000; Connor R.J. et al., 1994). Humane Influenzastämme hingegen erkennen und binden α 2,6 gebundene Sialinsäure auf den Epithelzellen des Respirationstraktes.

1.3. Morphologie und Vermehrung

Influenza-A-Viren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Ihr segmentiertes, negatvsinniges RNA-Genom umfasst 8 Segmente mit einer Gesamtlänge von etwa 13 Kilobasen. Das Genom kodiert für 11 Proteine, von denen 9 als strukturelle Proteine gemeinsam mit einer Lipidhülle und der viralen RNA das Virion bilden.

Die kleinste infektiöse virale Einheit ist der Ribonukleoprotein-Komplex (RNP), der aus der viralen RNA, den drei RNA-Polymerase-Untereinheiten PB1, PB2 und PA sowie dem Nukleokapsidprotein (NP) gebildet wird. Kodiert werden diese Proteine

von den vRNA-Segmenten 1, 2, 3 und 5. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass das vRNA Segment 2 in einem, um ein Nukleotid verschobenen Leserahmen für ein kleines Protein – PB1-F2 – kodiert, welches mit dem Auslösen von apoptotischem Zelltod in monozytären Zellen in Zusammenhang gebracht wurde. Interessanterweise besitzen Influenzastämme von Schweinen diesen zweiten Leserahmen nicht (Chen W. et al., 2001).

vRNA-Segmente 4 und 6 kodieren für die beiden glykosilierten Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA). 15 verschiedene HA- und 9 verschiedene NA-Subtypen sind derzeit bekannt. Diese Rezeptormoleküle bestimmen den Wirtstropismus der Viren, wobei Viren mit HA-Typ 1, 2 und 3 sowie NA-Typ 1 und 2 humanpathogen sind (Ito T. und Kawaoka Y., 2000; Rott R., 1992).

Das NP ist Hauptbestandteil des vRNP-Komplexes. Nach seiner Synthese wird es aufgrund von Kernlokalisierungssignalen in den Kern transportiert, wo es an vRNA-Segmente bindet (Shapiro G.I. und Krug R.M., 1988; Webster R.G. et al., 1992).

Das Matrixprotein M1 und das M2-Protein werden vom vRNA-Segment 7 kodiert. Das Matrixprotein M1 bindet an die vRNPs im Zellkern, wird mit dem RNP-Komplex exportiert und bildet nach Bindung an die Lipiddoppelmembran das Innere der Virushülle. M2 ist neben HA und NA das dritte Transmembranprotein und wirkt als pH-abhängiger Ionenkanal.

Das vRNA-Segment 8 kodiert für das nicht-strukturelle Protein NS1 und das Kernexportprotein NS2/Nukleäre Export Protein (NEP) (Shapiro G.I. und Krug R.M., 1988; Webster R.G. et al., 1992; Ludwig S. et al., 1999).

Eingeleitet wird der Replikationszyklus von Influenzaviren mit der Bindung des HA-Proteins und die zellulären Rezeptordeterminante, die Sialinsäure, die als terminaler Zucker der Seitenketten von Oberflächenproteinen vorkommt (Stegmann T. et al., 1990).

Auf die Bindung erfolgt die Rezeptor-vermittelte Endozytose des Viruspartikels. In den endosomalen Vesikeln erfolgt nun eine Ansäuerung, die zu einer Konformationsänderung des HA-Proteins führt. Diese Konformationsänderung führt dazu, dass das Protein seine hydrophobe, fusogene Region am Aminoterminus in direkte Nähe zur Endosomenmembran bringt und es zur Fusion der viralen mit der

endosomalen Membran kommt (Webster RG. et al., 1992; Garten W. und Klenk HD., 1999). Wie bereits angesprochen, fungieren die M2 Proteine als Ionenkanäle, durch die der Protonenfluss und somit die Ansäuerung im Inneren des Virions gewährleistet ist (Veit M. et al., 1991). Das Absinken des pH-Wertes führt zum Ablösen des vRNPs vom M1 Protein und in der Folge zum sogenannten „uncoating“, der Freisetzung des viralen Genoms ins Zytoplasma der Wirtszelle, von wo es über die Kernporen in den Zellkern transportiert wird (Martin K. und Helenius A., 1991; Bui M. et al., 1996).

Das Ansäuern der Endosomen und danach der Virionen ist der essentielle Schritt in der Infektion, da sowohl die Virus-Zellfusion, als auch die RNP-Freisetzung davon abhängen. Aus diesem Grund wurde dieser Schritt auch als Ziel für eine Influenzatherapie ausgewählt. Die Substanz Amantadin (1-Aminoadamantan-Hydrochlorid) ist ein Inhibitor für den M2-Ionenkanal und verhindert die Ansäuerung im Virion und damit die Freisetzung der vRNPs ins Zytoplasma (Bui M. et al., 2000).

Liegt das vRNP nun im Zellkern vor, beginnt die primäre Transkription und die Replikation des Virusgenoms. Die vRNA ist sowohl mRNA für die Proteinsynthese als auch cRNA als Vorlage für die Bildung neuer vRNA (Webster RG. et al., 1992). Das primäre Transkript wird translatiert, und die neu synthetisierten Proteine PB1, PB2, PA, NP, NS1 und NS2 shuttle in den Kern (Webster RG. et al., 1992). Der virale Polymerasekomplex sorgt nun für die Transkription der sekundären vRNAs in mRNAs, die für die späten viralen Proteine HA, NA und M1 kodieren.

Komplementäre 13 und 12 Basenpaar lange Nukleotidsequenzen an den 5' und 3' Enden der vRNA ermöglichen die Ausbildung von doppelsträngigen Promotorstrukturen, die die Bindung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase und in der Folge die Replikation der vRNA ermöglichen (Luo G. und Palese P., 1992; Flick R. et al., 1996).

Eine Besonderheit der Transkriptionsinitiation ist das „cap stealing“. Dabei bindet das PB2 an 5'-cap-Gruppen zellulärer mRNA und bildet durch Nukleaseaktivität freie 3'-OH-Gruppen, die als Primer für die folgenden Polymerisationsschritte dienen. Dieses „cap stealing“ ist deshalb von Bedeutung, da es ermöglicht, dass die zelluläre Polymerase II virale mRNA erkennt und transkribiert (Shapiro GI. und Krug RM., 1988; Webster RG. et al., 1992). Die Transkriptions- und Replikationsrate, sind zunächst bei Infektionsbeginn hoch. Während die Transkriptionsrate stetig abnimmt,

bleibt die Replikationsrate hingegen konstant (Shapiro GI. et al., 1987). Das NP und das M1-Protein bestimmen den Wechsel von der Transkription hin zur Replikation (Shapiro GI. und Krug RM., 1988; Hankins RW. et al., 1989; Ye ZP. et al., 1987; Perez DR. und Donis RO., 1998)

In der späten Phase der Replikation werden neu gebildete RNPs über die Kernporen aus dem Kern zur Zellmembran transportiert. Bei diesem Kernexport spielen das M1 und das NS2/NEP eine wichtige Rolle, da sie im Kern an RNPs binden, diese exportieren und den Re-Import in den Kern verhindern (Avalos RT. et al., 1997; Bui M. et al., 1996).

Das Verhindern des Re-Imports lässt sich einerseits auf ein Maskieren der Kernlokalisierungssignale der NPs durch Bindung der M1 Proteine, andererseits durch Bindung der NPs ihrerseits an Aktin-Streß-Fibrillen erklären (Bui M. et al., 1996; Digard P. et al., 1999).

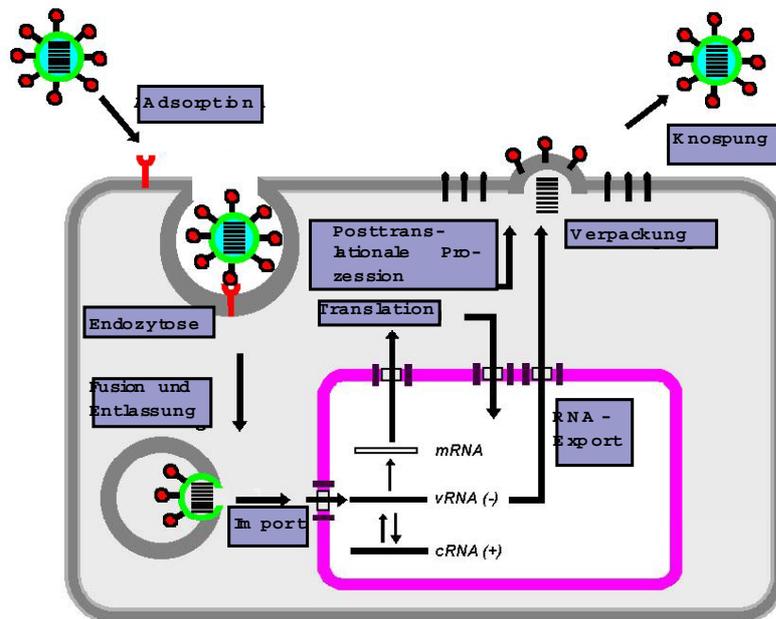


Abb. 2: Der Vermehrungszyklus von Influenza Viren.

Das Virus wird durch Bindung an die Rezeptordeterminante endozytotisch aufgenommen. Nach der Membranfusion wird das RNP freigesetzt und wandert in den Nukleus. Dort kommt er zur Transkription und Replikation. mRNA wird ins Zytoplasma transportiert und translatiert. Die Glykoproteine werden zur Oberfläche transportiert, wo sie in die Plasmamembran integriert werden. In der späten Infektionsphase werden die RNPs aus dem Kern exportiert und in neue Virionen verpackt, die durch Knospung von der Zelloberfläche freigesetzt werden (Ludwig S. et al., 1999).

Dem NS1-Protein wird eine Vielzahl von Funktionen zugeschrieben. Diese reichen von der Unterdrückung einer antiviralen Antwort der Zelle, über die Regulation der zellulären Genexpression bis hin zur Apoptoseregulation (Krug R.M., 1989; Zhirnow OP. et al., 2002; Schultz-Cherry S. et al., 2001; Garcis-Sastre A., 2001). Der „host cell shut off“, das Ausschalten der zellulären Proteinsynthese, der etwa fünf Stunden nach Infektion stattfindet, wird unter Mithilfe des NS1-Proteins durchgeführt. Mechanistisch wird das Splicen und die Polyadenylierung von zellulären pre-mRNAs inhibiert und zelluläre mRNAs im Kern zurückgehalten (Chen Z. und Krug RM., 2000). Zusätzlich verstärken NS1-Proteine die Translation von mRNAs mit viralen 5'-Sequenzen und verhindern durch Bindung an doppelsträngige RNA (dsRNA) die

Aktivierung der dsRNA-aktivierten Kinase PKR (Enami K. et al., 1994). Eine Aktivierung der PKR würde zu einer Phosphorylierung des Translations-Elongationsfaktors 2 (eIF-2 α) führen, was ein Abbrechen der Proteinsynthese zur Folge hätte und somit als antivirale Reaktion der Zelle zu verstehen ist (Garcia-Sastre A. et al., 1998). Darüber hinaus wirkt das NS1-Protein negativ auf die Aktivierung verschiedener zellulärer Signalwege, die die Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, AP-1, c-Jun, IRF-3) aktivieren und somit auf die Typ I Interferon-Induktion (Garcia-Sastre A. et al., 2001; Ludwig S. et al., 2001).

Die Proteine NA, M2 und HA durchlaufen posttranslationale Modifikationen auf ihrem Weg vom rER über cis- und trans-Golginetzwerk zur Plasmamembran der Zelle. Dort werden NA und M2 als Tetramere, HA als Trimer eingebaut. Während HA und NA hoch glykosiliert sind, ist das M2 ein unglykosiliertes Transmembranprotein (Lamb, 1996). Der aus dem Zellkern exportierte M1-NEP-RNP-Komplex bindet über das M1 Protein an den zytoplasmatischen Teil der Glykoproteine. Letztendlich werden die reifen Vesikel abgeschnürt (Knospung) und die neuen Virionen dadurch freigesetzt (Webster RG. et al., 1992).

1.4. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ist eine generelle zelluläre Reaktion auf Virusinfektionen (Hiscott J. et al., 2001). Im Rahmen einer Virus-Infektion hat NF- κ B eine Schlüsselfunktion bei der Expression von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und Enzymen, die ihrerseits proinflammatorische Faktoren aktivieren (Baeuerle PA. et al., 1994; Barnes P.J. und Karin M., 1997). Die Herstellung von Mausmodellen, welche Defekte im NF- κ B Signalweg an verschiedenen Punkten aufweisen, zeigte eine Rolle von NF- κ B in der angeborenen und erworbenen Immunabwehr, der Entzündungsregulation, der Entwicklung lymphoider Organe und der Inhibition des apoptotischen Zelltodes. (Sha W.C. et al., 1995; Alcamo E. et al., 2001; Senftleben U. et al., 2001).

Hinter dem Oberbegriff NF- κ B verbirgt sich eine Familie dimerer Transkriptionsfaktoren, die zur Rel-Familie gehören (Ghosh S., 1998). Säuger

exprimieren fünf Rel (NF- κ B) Proteine, die man in zwei Klassen unterteilt. Die erste Klasse umfasst Rel A, c-Rel und Rel B und ist dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine als fertige Produkte gebildet werden, die nicht mehr proteolytisch gespalten werden müssen. Die zweite Gruppe wird durch die Gene *NF κ B1* und *NF κ B2* in Form von Vorläuferproteinen kodiert. Diese 105 und 100 kDa großen Proteine müssen in „reife“ 50 bzw. 52 kDa große NF- κ B Proteine gespalten werden. NF- κ B-Dimere, die Rel A oder c-Rel enthalten, werden durch eine spezifische Interaktion mit Inhibitoren (I κ Bs) im Zytoplasma zurückgehalten. Erfolgt durch einen beliebigen Stimulus eine Aktivierung des I κ B-Kinasekomplexes (IKK), führt dieser zur Phosphorylierung und in der Folge zum Ubiquitin-abhängigen Abbau der I κ Bs (Karin M. und Ben-Neriah Y., 2000).

Der I κ B-Kinasekomplex besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten, IKK α und IKK β , welche I κ B α direkt phosphorylieren können, und einer regulatorischen Untereinheit IKK γ (NEMO), deren Anwesenheit für die Aktivierung des Signalweges notwendig ist (Fig.3).

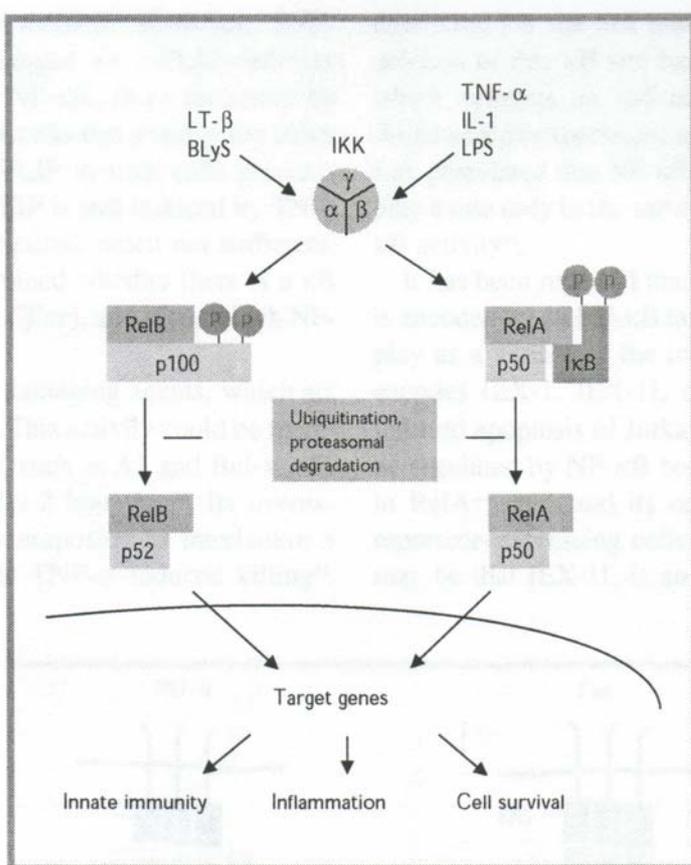


Abb.3.: IKK kann NF- κ B über zwei verschiedene Wege aktivieren.

Der erste Weg verläuft über TNF- α , IL-1 und IKK β zur Degradation von I κ B α . Der zweite Weg wird durch wenige Stimuli, wie Lymphotoxin b und IKK α aktiviert und führt zur phosphorylierungsabhängigen Prozessierung von p100.

(aus M.Karin und A.Lin, 2002)

Während die IKK α -vermittelte Aktivierung des Rel B-p52-Komplexes eine wichtige Rolle in der Entwicklung der lymphoiden Organe und der erworbenen Immunität spielt (Senftleben U. et al., 2001), reguliert IKK β einen direkten, I κ B α -abhängigen Weg, der in der angeborenen Immunität eine zentrale Rolle einnimmt (Senftleben U. et al., 2001).

Sobald der transkriptionell aktive NF- κ B-Komplex im Kern ist, erfolgt eine weitere Regulation hauptsächlich durch Phosphorylierung der Rel-Proteine (Schmitz ML. et al., 2001), die für eine vollständige Induktion der NF- κ B-regulierten Zielgene notwendig sind (Zhong H. et al., 1997; Sizemore N. et al., 1999). Es wird vermutet, dass verschiedene Signalwege, die den Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase (PI3K)-Akt-Signalweg aktivieren, an diesem Prozess beteiligt sind. (Madrid LV. et al., 2000).

1.5. Die Rolle von NF- κ B in der Apoptoseregulation

1.5.1 NF- κ B als antiapoptotischer Regulationsfaktor

Erstmals wurde eine Rolle von NF- κ B in der Unterdrückung von Apoptose in Rel -/- Mäusen festgestellt. Die Tiere starben am Tag 15 der Embryonalentwicklung an massiver Leberapoptose (Beg A.A. und Baltimore D., 1996). Spätere Untersuchungen ergaben, dass Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α), welcher normalerweise ein schwacher Apoptose-induzierender Faktor ist, für die massiven Effekten in den Rel-/- Mäusen in Abwesenheit von NF- κ B verantwortlich ist.

In einem völlig anderen Umfeld, nämlich in Tumoren lymphoiden und epithelialen Ursprungs, ist konstitutiv aktives NF- κ B vermutlich für die Resistenz gegenüber Apoptose-induzierenden/DNA-schädigenden Chemotherapeutika verantwortlich (Baldwin A.S., 2001) und steht somit einer erfolgreichen Tumorthherapie im Weg.

1.5.2. Wege der Apoptoseinhibition durch NF- κ B

Die antiapoptotische Aktivität von NF- κ B beruht auf der NF- κ B-abhängigen Expression einer Reihe von Genen, deren Produkte Apoptose verhindern können (Liu Z.G. et al., 1996). Unter diesen inhibitorischen Proteinen befinden sich die cIAPs (cellular inhibitor of apoptosis), Caspase-8-c-FLIP (Flice inhibitory protein), A1 (Bfl1) und TNF-Rezeptor assoziierter Faktoren 1 und 2 (TRAF). Die cIAPs sind die am besten untersuchten antiapoptotischen Proteine. Sie blockieren durch direkte Bindung an Effektorkaspasen wie Kaspase 3 und 7 deren Aktivität und in Folge die Aktivierung von Prokaspase 6 und 9 (Deveraux Q.L. et al., 1998). Aus diesem Grund können cIAPs sowohl rezeptorvermittelte als auch mitochondriale Apoptose verhindern.

Ein weiteres NF- κ B reguliertes cIAP Protein ist ein X-chromosomal gekoppeltes IAP, das sogenannte XIAP oder hILP (Liston P. et al., 1996). XIAP blockiert Kaspase 3 und Kaspase 7 mittels seiner zweiten Baculoviralen IAP Repeat (BIR) Domäne und seiner NH₂-terminalen Prokaspase 9 durch seine dritte BIR-Domäne BIR3 (Deveraux Q.L. et al., 1999). Strukturanalysen ergaben eine direkte Blockade der katalytischen Spalten von Kaspase 3 und 7 durch den NH₂-terminalen Linker, während die BIR2-Region die Bindung an die Kaspase erleichtert (Chai J. et al., 2001; Huang Y. et al., 2001; Riedl S.J. et al., 2001).

1.5.3. Proapoptotische Stimuli und NF- κ B-Aktivierung

NF- κ B-abhängige Genexpression gilt als wichtiger Bestandteil bei der Inhibition der Apoptose, daher müssen proapoptotische Stimuli Wege finden, diese Blockade zu umgehen. Dies trifft in so weit zu, als verschiedene Komponenten des NF- κ B Aktivierungsweges Substrate für Kaspasen darstellen. Die Spaltung dieser Komponenten führt zur Beendigung der antiapoptotischen Aktivität von NF- κ B.

TRAF1 stellt ein Substrat für Kaspase 8 dar und wird im Rahmen der Fas oder TNF-Rezeptor 1- induzierten Apoptose in zwei Teile gespalten (Leo E. et al., 2001; Schwenzer R. et al., 1999). Das COOH-terminale Fragment enthält die TRAF-Domäne und verhindert möglicherweise den Kontakt zwischen TRAF1 und 2, sowie

clAP1 und 2 (Deveraux Q.L. et al., 1999), worin letztendlich die Unterbrechung der antiapoptotischen Wirkung durch NF- κ B-induzierte Gene besteht.

IKK β selbst ist ein Substrat für Kaspase 3-verwandte Kaspasen und wird während TNF- α oder Fas-induzierter Apoptose proteolytisch gespalten (Tang G. et al., 2001). Die Spaltung führt zur Zerstörung der enzymatischen Aktivität. Die Überexpression einer Kaspase-resistenten Form von IKK β kann TNF α -induzierte Apoptose verhindern (Tang G. et al., 2001). Die Proteolyse von IKK β scheint für die Zelle daher eine Weiche zwischen Leben und Tod zu sein.

Der Abbau von I κ B α durch das 26S Proteosom nach Ubiquitinierung ist ein wichtiger Schritt in der NF- κ B Aktivierung (Karin M. und Ben-Neriah Y., 2000). Kaspase 3-vermittelte Spaltung kann die Degradierung von I κ B α durch Trennung der NH₂-terminalen Domäne, welche die IKK-Phosphorylierungsstellen enthält, vom Rest des Inhibitors verhindern. Dies führt zur Bildung eines Super-Repressor-ähnlichen Moleküls, das resistent gegenüber TNF α -induzierter Phosphorylierung und Degradation ist (Reuther J.Y. und Baldwin A.S., 1999). Zusammenfassend scheint I κ B α ein weiterer Meilenstein auf dem Weg zwischen Überleben einer Zelle und deren Tod zu sein.

NF- κ B-Faktoren sind auch Substrate für Kaspasen. Rel A wird während der Apoptose, die durch Entzug von Wachstumsfaktoren ausgelöst wird, durch Kaspasen gespalten (Levkau B. et al., 1999). Das Spaltprodukt mit einer verkürzten COOH-Domäne kann zwar DNA binden, ist allerdings nicht in der Lage, die Transkription zu aktivieren (Levkau B. et al., 1999).

Um nun den durch den IKK-NF- κ B-Weg vermittelten Schutz vor Apoptose zu umgehen, verwenden apoptotische Zellen Kaspasen zur Spaltung von NF- κ B-abhängigen antiapoptotischen Proteinen. CIAP1 wird von Kaspase 3-verwandten Kaspasen gespalten, wobei die Überexpression des Spaltprodukts Apoptose induziert (Clem R.J. et al., 2001). Ähnlich verhält sich XIAP, dessen Spaltprodukte nur eine schwach inhibierende Wirkung auf Kaspase 3 und 7 haben, während das COOH-terminale Fragment im Gegenzug die Fas-induzierte Apoptose stark erhöht (Deveraux Q.L. et al., 1999).

Das antiapoptotische Protein Bcl-xL wird durch Kaspasen während der Apoptose, unter anderem ausgelöst durch Virusinfektionen, gespalten (Clem R.J. et al., 1998). Die proteolytische Spaltung führt zur Bildung zweier proapoptotischer Produkte. Obwohl die überragende Mehrheit an Veröffentlichungen die antiapoptotische Funktion von NF- κ B belegt, gibt es dennoch einige wenige Ausnahmen, bei denen NF- κ B zur Induktion proapoptotischer Moleküle beiträgt und somit eine proapoptotische Funktion hat. Bei diesen proapoptotischen Proteinen handelt es sich um den Todesrezeptor (death receptor DR) 6, ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie (Kasof G.M. et al., 2001), DR4 und DR5 (Ravi R. et al., 2001) sowie Fas (Zheng Y. et al., 2001).

1.6. Apoptose

Die Apoptose wurde ursprünglich aufgrund spezifischer, morphologischer Veränderungen in der sterbenden Zelle definiert (Kerr J.F.R. et al., 1972): Abgrenzen von benachbarten Zellen im Gewebeverband, Kondensation des Zytoplasmas, Kondensation des Chromatins an der Kernmembran und Zellfragmentierung in apoptotische Körperchen. In stark kondensierten toten Zellen und Zellfragmenten sind die Organellen immer noch intakt, die Zellmembranen sind gut erhalten, und der Zellinhalt wurde nicht ausgeschüttet. Ein wichtiges Charakteristikum der Apoptose ist, dass die Lysosomen (autophagische Vakuolen) keine bestimmte Rolle zu früheren Zeitpunkten spielen, allerdings zu späteren Zeitpunkten an der „heterophagischen“ Degradierung von apoptotischen Körperchen beteiligt sind (Kerr J.F.R. et al., 1972; Wyllie A.H. et al., 1980; Schulte-Hermann R. et al., 1997).

Schweichel und Merker (Schweichel J.U. und Merker H.J., 1973) und Clark (Clark P.G.H., 1990) beschreiben morphologisch unterschiedliche Formen des Zelltodes im sich entwickelnden Embryo. Typ 1 entspricht weitestgehend der Apoptose, für Typ 2 ist eine starke Bildung von autophagischen Vesikeln („autophagischer Zelltod“) charakteristisch. Typ 3 ist gekennzeichnet durch Desintegration der Zellen in Fragmente ohne Beteiligung des lysosomalen Systems und ohne ausgeprägte Kondensation (Clark P.G.H., 1990).

Apoptose spielt eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von Erkrankungen einschließlich viraler Infektionen (Ravzi und Welsh, 1995). Der apoptotische Zelltod wird vor allem als Verteidigung der Wirtszelle gegen die Virusinfektion angesehen, da viele Viren antiapoptotische Proteine exprimieren, um diese zelluläre Antwort zu verhindern. Der zentrale Bestandteil der Apoptosemaschinerie ist ein proteolytisches System, bestehend aus Zysteinyloproteasen, den sogenannten Kaspasen (Cohen GM. et al., 1997; Thornberry NA. und Lazebnik Y., 1998). Man unterscheidet zwei Gruppen von Kaspasen: Initiator-kaspasen, wie Kaspase 8 und 9, die andere Kaspasen spalten und dadurch aktivieren, und Effektor-kaspasen einschließlich Kaspase 3 und 6, die eine Vielzahl zellulärer Substrate spalten und somit zelluläre Strukturen zerstören oder Enzyme aktivieren (Thornberry NA. und Lazebnik Y., 1998).

Kaspasen werden in Zellen konstitutiv exprimiert und liegen als inaktive einzelne Pro-Enzyme vor. Nach Aktivierung durch eine spezifische proteolytische Spaltung bilden sie Tetramere aus (Green DR. und Reed JC., 1998). Kaspasen haben die Fähigkeit, sich gegenseitig zu aktivieren und arbeiten in einer intrazellulären Kaskade zusammen, die zu einer Aktivierung der Effektor-kaspasen 3, 6 und 7 führt. Die Aktivierung dieser Effektor-kaspasen ist ein Schlüsselereignis das dazu führt, dass wichtige zelluläre Proteine gespalten werden, was charakteristische morphologische Veränderungen und den Abbau der chromosomalen DNA zur Folge hat (Enari M. et al., 1998). Es sind zwei Apoptosewege bekannt, die beide letztlich zur Aktivierung von Kaspase 3 führen. Die Wege wurden früher als voneinander unabhängig erachtet, jedoch konnte gezeigt werden, dass sie zellspezifisch miteinander interagieren (Liu X. et al., 1998).

Der erste der beiden Wege wird über die Mitochondrien reguliert, die eine zentrale Regulierungsstelle im Zelltod bilden (Green DR. und Reed JC., 2000). Der zweite Weg beginnt mit der Aktivierung der Kaspasen 8 und 10 durch Oberflächenproteine, Mitglieder der „Death Receptor Family“. Aktivierte Kaspase 8 spaltet und aktiviert Kaspase 3 was direkt zur Einleitung der Apoptose führt (Ashkenazi A. und Dixit VM., 1998).

Eine Vielzahl von Zellen (Zelltypen) reagiert mit programmiertem Zelltod auf eine virale Infektion. Aus diesem Grund ist es wenig überraschend, dass Viren verschiedene Mechanismen entwickelt haben, um die Wirtszellapoptose zu beeinflussen. Virale Genprodukte sind in der Lage, entweder Effektormechanismen der Apoptose oder die darüber liegenden Regulationsmechanismen zu beeinflussen. Dem gegenüber bringen Viren auch Proteine zur Expression, die die Wirtszelle direkt in die Apoptose treiben oder aber zelluläre Todesprogramme auf verschiedenen Wegen aktivieren. Diese verschiedenen Mechanismen der Apoptoseregulation müssen einen evolutionären Überlebensvorteil entweder für das Virus oder die Wirtszelle mit sich bringen und auf zwei Arten wirken: (1) das Verhindern eines vorzeitigen Todes der Wirtszelle während einer lytischen Infektion, die zur erhöhten Freisetzung von Viruspartikeln führt und (2) das mit anderen Virusproteinen gemeinsame Vorantreiben einer Transformation und das Überleben einer Wirtszelle bei der Ausbildung einer latenten Infektion. Es ist unumgänglich für Viren, die die

Wirtszelle zur Proliferation treiben, einen apoptotischen Zelltod durch abnormes Wachstum zu verhindern. Einige Daten weisen jedoch daraufhin, dass Viren Apoptose induzieren und die entstehenden Zelltrümmer als Vehikel benutzen, um die Virusverbreitung voranzutreiben und die Aktivierung des Immunsystems zu umgehen (Thomson B.J., 2001).

1.7. Die Rolle von Typ I Interferonen (IFN) in der Apoptoseinduktion

Die Interferone lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Typ I Interferone ($IFN_{\alpha/\beta}$) und Typ II Interferon γ (IFN_{γ}) (Stark G.R. et al., 1998).

Typ I-Interferone werden von den meisten Zelltypen exprimiert. Typ II-Interferon allerdings wird hauptsächlich von Th1-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen gebildet. Interferone können durch eine Vielzahl von Stimuli induziert werden, einschließlich Viren und doppelsträngiger RNA (dsRNA), und zwar über einen Mechanismus der die Aktivierung des Interferon Regulatorischen Faktors 3 (IRF3), NF- κ B und möglicherweise eine dsRNA-abhängige Proteinkinase (PKR) und den JNK2-Signalweg beinhaltet (Chu W.M. et al., 1999; Balachandran S. et al., 2000).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass IFN Zellen gegenüber Apoptoseinduktion über den FADD/Caspase 8 Weg empfindlich macht (Balachandran S. et al., 2000; Balachandran S. et al., 1998). Ein Modell zur Interferon-induzierten antiviralen Wirkung besagt, dass eine virusinfizierte Zelle, die IFN produziert, stets in Apoptose geht (Tanaka N. et al., 1998). In diesem Modell hat IFN eine autokrine Wirkung, während auch eine parakrine Wirkung, nämlich die Induktion des antiviralen Status in uninfizierten Zellen, bekannt ist. Dieser antivirale Status führt dazu, dass sowohl die Virusreplikation als auch die virusinduzierte Apoptose verhindert werden.

Zu den IFN-induzierten Proteinen gehören u.a. PKR, die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase und die RNase L, die beide mit der Replikation viraler RNA interferieren (Kerr M., 1987; Zhou A. et al., 1993). TRAIL, ein proapoptotisches Protein wird ebenfalls über Typ I Interferone in Thymozyten und über Typ II Interferone in Fibroblasten induziert und führt spezifisch zum Tod von virusinfizierten Zellen (Sedger L.M. et al., 1999).

1.8. Todesrezeptoren und der “TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL)“

TRAIL ist ein Mitglied der TNF Liganden Familie. Es ist ein Typ II Membranprotein, ohne Leadersequenz mit einer internen Transmembrandomäne. Wie auch andere TNF-Familie Liganden besitzt TRAIL eine N-terminale, zytoplasmatische Domäne und eine C-terminale extrazelluläre Domäne. TRAIL bildet, ebenso wie TNF, oligomere Strukturen aus, die notwendig sind, um die Rezeptoren quer zu vernetzen und dadurch ein Signal an die Zielzelle zu übertragen. TRAIL induziert Apoptose, charakterisiert durch „membrane blebbing“, Zerstörung des Zytoskeletts und DNA-Fragmentierung (Wiley SR. et al., 1995).

Ein signifikanter Unterschied zwischen TRAIL und Fas Ligand (FasL) besteht in der jeweiligen Verteilung im Organismus. Während FasL vor allem auf stimulierten T-Zellen vorkommt (Suda et al., 1993) wird TRAIL in vielen verschiedenen Geweben exprimiert und muss aus diesem Grund in vivo nicht unbedingt zytotoxisch wirken. TRAIL kommt jedoch nicht in der Leber vor, wo FasL exprimiert wird, während FasL im Thymus fehlt, wo TRAIL aber vorhanden ist (Wiley SR. et al., 1995). TRAIL induziert auch keine Apoptose in primären Thymozyten, B oder T Zellen, sondern lediglich in verschiedenen, transformierten Zelllinien (Wiley SR. et al., 1995).

FasL und TNF binden an Rezeptoren, die zur TNF-Rezeptor (TNFR) Superfamilie gehören (Smith C.A. et al., 1994). Die Rezeptoren dieser Familie besitzen zysteinreiche Domänen (CRDs) am aminoterminalen Ende. Anhand der zytoplasmatischen Sequenzen wird die TNFR-Superfamilie in zwei Gruppen unterteilt, die sich durch Anwesenheit bzw. dem Fehlen einer sogenannten Todesdomäne („death domain“, DD) unterscheiden (Tartaglia L.A. et al., 1993; Itoh N. et al., 1993). Die Rezeptoren mit einer Todesdomäne – die Todesrezeptoren („death receptors“, DR) – umfassen TNFR 1, Fas, DR3 (Chinnaiyan A.M. et al., 1996; Marsters S. et al., 1996; Bodmer J.L. et al., 1997; Screaton G. et al., 1997), DR4 (Pan G. et al., 1997), DR5 (Screaton G.R. et al., 1997; Pan G. und Dixit V.M., 1997;

Sheridan J.P. et al., 1997) und DR6 (Screaton G.R. et al., 1997, Pan G. und Dixit V.M., 1997; Sheridan J.P. et al., 1997; Wu G.S. et al., 1997).

Die Todesdomänen verbinden jeden Rezeptor mit der Kaspasekaskade, die Apoptose auslöst, oder mit Kinasekaskaden, die die Genexpression über NF- κ B und AP-1 induzieren. Eine weitere Untergruppe der TNFR-homologen Moleküle besteht aus sogenannten „Decoy Rezeptoren (DcRs)“, die als Inhibitoren der Signaltransduktion fungieren. Diese Gruppe umfasst die Oberflächenproteine DcR1 (Pan G. et al., 1997; Sheridan J.P. et al., 1997; Schneider P. et al., 1997; Degli-Esposti M.A. et al., 1997) und DcR2 (Marsters M.A. et al., 1997; Pan G. et al., 1998; Degli-Esposti M.A. et al., 1997) sowie Osteoprotegrin (Simonet W.S. et al., 1997) und DcR3 (Pitti R. et al., 1998), beide lösliche, sezernierte Proteine.

Vier strukturell verwandte Rezeptoren binden TRAIL (Apo2L): DR4, DR5, DcR1 und DcR2 (Ashkenazi A. und Dixit V.M., 1998). Alle vier Moleküle besitzen zwei extrazelluläre CDRs. DR4 und DR5 haben eine zytoplasmatische Todesdomäne. DcR1 umfasst keine zytoplasmatische Domäne und ist über einen Glykophospholipidanker auf der Zelloberfläche verhaftet. DcR2 hat eine zytoplasmatische Todesdomäne, die jedoch zwei Drittel kürzer ist als eine übliche Todesdomäne und kein Apoptosesignal weiterleitet.

Die extrazellulären Domänen von DcR1 und DcR2 konkurrieren mit DR4 und DR5 um die Ligandenbindung. Transfektion von Zellen mit DcR1 oder DcR2 verhindert die Induktion von Apoptose über TRAIL; im Gegenzug sensibilisiert die enzymatische Spaltung von DcR1 von der Zelloberfläche die Zelle gegenüber TRAIL. DcR1 und DcR2 können somit TRAIL an der Apoptoseinduktion über DR4 und DR5 hindern.

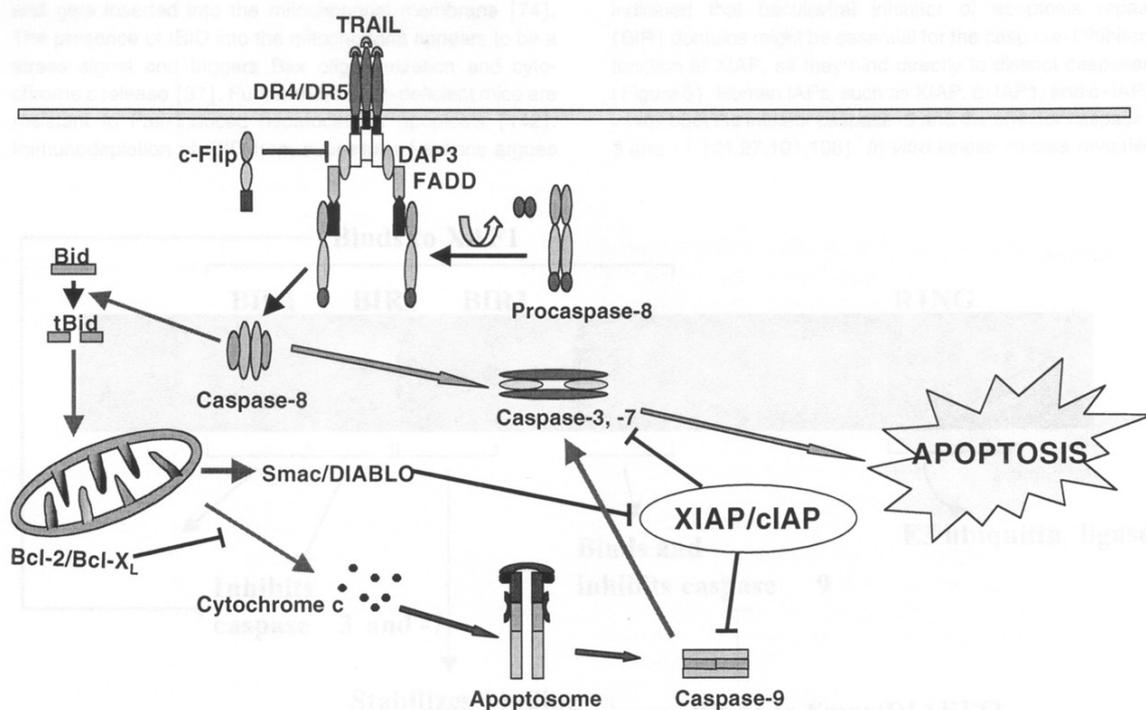


Abb.4.: Intrazellulärer Mechanismus der Trail-induzierten Apoptose.

Die Bindung des Liganden an den Rezeptor führt zur Bildung der „DISC“, die zur Aktivierung von zwei Wegen führt: (1) der Aktivierung der Caspase-8-abhängigen Apoptose und (2) der Spaltung von Bid, das die mitochondrialen Funktionen in der Apoptose reguliert. (aus Srivastava RK., 2001)

In vivo wirkt TRAIL kaum zytotoxisch, während *in vitro* Apoptose in einem breiten Spektrum von Tumorzellen induziert wird, wobei auch hier normale, nicht transformierte Zellen unbeschadet bleiben. *In vivo* TRAIL-Behandlung von Thymuslosen Nackt-Mäusen, die humane Tumoren tragen, hemmt das Anwachsen der Tumore signifikant (Ashkenazi A. et al., 1999). Ein Mechanismus, der zur selektiven Sensibilisierung von Tumorgewebe gegenüber TRAIL beiträgt, ist die verschieden starke Expression der DRs und DcRs (Ashkenazi A und Dixit V.M., 1998). Andere Mechanismen betreffen möglicherweise die Apoptosesignale unterhalb von DR4 und DR5.

Zusammenfassend scheint TRAIL, im Gegensatz zu TNF und Fas, die auch gesundes Gewebe schädigen, ein möglicher, selektiver Tumorkiller zu sein (Ashkenazi A. und Dixit VM., 1999).

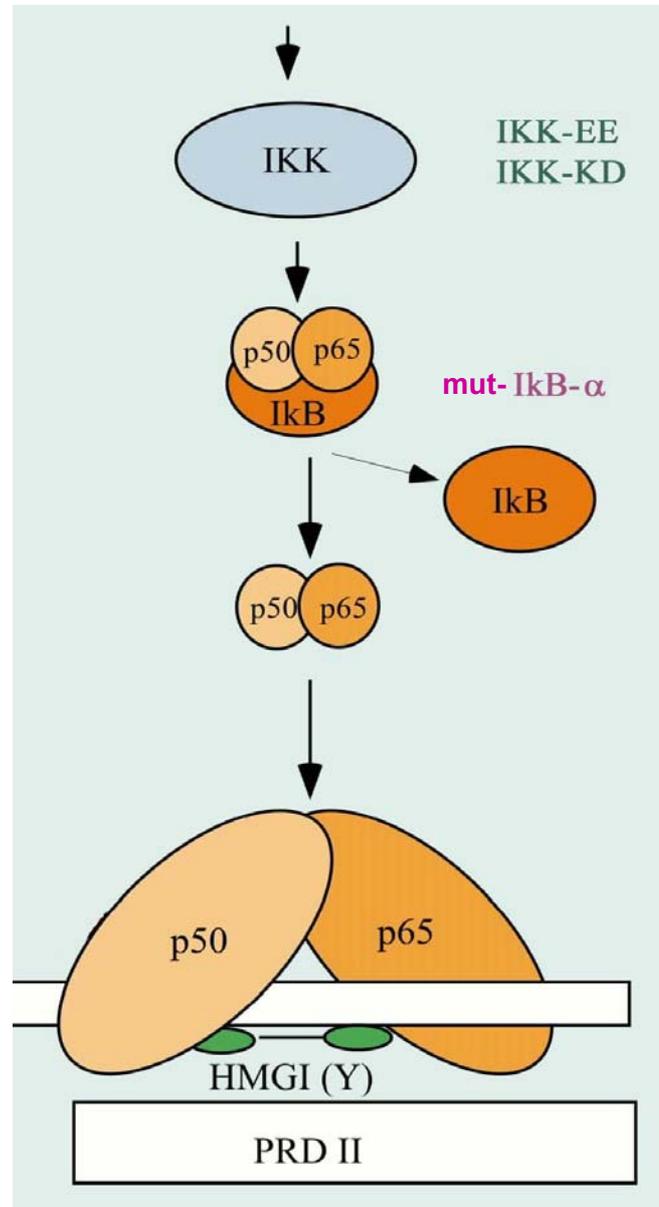
1.9. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle des IKK-NF- κ B-Signalweges im Kontext einer Influenza-A-Virusinfektion. Die Aktivierung von NF- κ B ist ein Charakteristikum viraler Infektionen, einschließlich der Infektion durch Influenza Viren (Hiscott J. et al., 2001). Im Rahmen einer Virus-Infektion hat NF- κ B eine Schlüsselfunktion bei der Expression von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und Enzymen, die ihrerseits proinflammatorische Faktoren aktivieren (Baeuerle et al., 1994; Barnes P.J. und Karin M., 1997). Darüber hinaus entscheidet NF- κ B über das Überleben und Sterben von Zellen, durch Expression pro- und antiapoptotischer Proteine (Karin M. und Lin A., 2002). Wie erst kürzlich gezeigt wurde, sind einzelne Influenzaproteine in der Lage, NF- κ B zu aktivieren (Flory E. et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun durch gezielte Beeinflussung des IKK-NF- κ B-Signalweg dessen genaue Funktion in der virusinfizierten Zelle geklärt werden. Zu diesem Zweck sollten MDCK- und A549-Zellen mit Retroviren, die das Gen für eine konstitutiv-aktive Form der IKK (IKK-EE), eine dominant-negative Form der IKK (IKK-KD) und eine nicht-abbaubare Form des I κ B α in ihrem Genom tragen, transduziert werden. Zusätzlich sollten Vero-Zellen, die kein intaktes Typ-I-Interferonsystem besitzen ebenfalls mit diesen Retroviren transduziert werden. Dies sollte die Möglichkeit eröffnen die Rolle von NF- κ B in An- und Abwesenheit vom Typ-I-Interferonsystem zu untersuchen, da dieses eines der bedeutendsten, antiviralen Zytokine ist und von NF- κ B reguliert wird (Baeuerle et al., 1994).

Zur Erfüllung dieses Forschungsvorhabens sollten folgende Punkte beantwortet werden:

- Welche Auswirkungen hat eine Dysregulation des IKK-NF- κ B-Signalweges auf die Influenza-A-Virusvermehrung ?
- Welche Rolle spielen die NF- κ B-regulierten antiviralen Zytokine in diesem Zusammenhang (z.B. IFN α / β)
- Welchen Einfluss hat die Apoptose in diesem Zusammenhang ? Ist sie durch Dysregulation von NF- κ B beeinflusst ? Wenn ja, welche Auswirkungen

ergeben sich für das Influenza-A-Virus ? Sind möglicherweise NF- κ B-regulierte pro- oder antiapoptotische Proteine beteiligt ?



Schematische Darstellung des IKK-NF- κ B-Signalweges. Die transdominant interferierenden Mutanten sind neben ihren Angriffspunkten eingezeichnet.

Dieser Ansatz sollte die Möglichkeit eröffnen, die Rolle von NF- κ B im Kontext einer Influenza-A-Infektion näher zu beleuchten und mögliche, andere regulierte Faktoren zu identifizieren.

2. Material

2.1 Geräte

Brutschränke, Inkubatoren	Heraeus (Hanau)
EMSA-Gel Apparatur	MSZ (Würzburg)
Geltrockner	BioRad (München)
Minizentrifugen	
Eppendorf Zentrifuge 5417C und R (kühlbar)	Eppendorf (Hamburg)
Megazentrifugen	
Sorvall Zentrifuge RC5B	Du Pont (Bad Homburg)
Megafuge 1.0R	Heraeus (Hanau)
Protein-Gel Apparatur, Blotting Apparatur	BioRad (München)
Spektral-Photometer Hitachi U2000	Jouan GmbH (Unterhaching)
Phosphoimager Fujix Bas-2000 II	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH (Staubenhardt)
Vortex-Gerät	Scientific Industries Inc.(USA)
Mikroskope : Leitz DM RB (Fluoreszenz)	Leitz (Wetzlar)
Leitz DM IL (Zellkultur-Routine)	Leitz (Wetzlar)
Sterilbank Lamin Air HB2448	Heraeus (Hanau)
Szintillationszähler Wallac 1410	Amersham (Little Chalfont)
FACSCalibur	Becton Dickinson (San Jose)
Microlumat LB96P	Berthold-Technologies GmbH (Bad Wildbad)

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid (30%), Bisacrylamid (0,8%)	Roth (Karlsruhe)
Adenosin-5´Triphosphat (ATP)	Sigma (St. Louis)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	AGS (Heidelberg)
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Aprotinin	Roth (Karlsruhe)
BioRad Protein Assay-Stammlösung	BioRad (München)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Dianova (San Diego)
Bromphenolblau	Sigma (St. Louis)
Dimethylsulfat (DMSO)	Sigma (St. Louis)
Dithiotreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma (St. Louis)
Gluthation Sepharose B4	Sigma (St. Louis)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Harnstoff	Roth (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Roth (Karlsruhe)
Leupeptin	Serva (Heidelberg)
D-Luziferin	Appllichem (Darmstadt)
Magnesiumacetat	Sigma (St. Louis)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Natriumorthovanadat	Sigma (St. Louis)
Natriumpyrophosphat	Sigma (St. Louis)
Nitrozellulose	Schleicher & Schüll (Dassel)
10x Phosphat gepufferte Lösung (PBS)	Gibco BRL (Paisley)

Pefablock	Roth (Karlsruhe)
Poly (d(I-C))	Boehringer (Mannheim)
Protein A-Agarose	Boehringer (Mannheim)
Protein A-Peroxidase (-POD)	Amersham (Little Chalfont)
Protein – Längenmarker (vorgefärbt, SDS-7B)	Sigma (St. Louis)
Röntgenfilme	Amersham (Little Chalfont)
Radiochemikalien	Amersham (Little Chalfont)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
TEMED	Calbiochem (Bad Soden)
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma (St. Louis)
Whatman 3 MM Papier	Schleicher & Schüll (Dassel)
Allgemeine Labor-Chemikalien	Merck (Darmstadt)
	Roth (Karlsruhe)
	SERVA (Heidelberg)

2.3 Zellkulturmaterial

Agar	Oxoid GmbH (Wesel)
Dulbecco´s modified eagle medium (DMEM)	Gibco BRL (Paisley)
Fötales Rinderserum (FBS)	PAA (Linz)
L-Glutamin	Gibco BRL (Paisley)
10x MEM	Gibco BRL (Paisley)
7,5% NaHCO ₃	Gibco BRL (Paisley)
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL (Paisley)
HAM´s F12	Biochrom (Berlin)
RPMI 1650	Gibco BRL (Paisley)
Trypsin-EDTA	Gibco BRL (Paisley)
Trypanblau	Gibco BRL (Paisley)
Zellkulturschalen und -flaschen	Sarstedt (Nümbrecht)
TPA-Phorbolester	Sigma (St. Louis)
MEK-Inhibitor U0126	Promega
<u>Kaspaseinhibitoren:</u>	
Z-DEVD-FMK	Alexis Biochemicals
Z-VAD-FMK	Alexis Biochemicals
Lab-Tek II Chamber Slide System	Nalge Nunc Int.

2.4 Antikörper und Antiseren

<u>Antikörper/Antiseren</u>	<u>Antigen</u>	<u>Referenz/Herkunft</u>
anti-ERK-2 (C-14)	ERK-2	Santa Cruz (Heidelberg)
anti-NP	NP	Webster, R. (Memphis)
anti-PARP	PARP	Transduction Laboratories
anti-TRAIL(sc-8440)	TRAIL	Santa Cruz Biotech.
anti-TRAIL-R1 und 2	DR4/5	Abt.für Apoptoseregulation DKFZ (Heidelberg)
anti Ziege gekoppeltes Texas Red		Dianova (Hamburg)
anti Maus gekoppelte Peroxidase (POD)		Amersham (Little Chalfont)
Protein-A gekoppelte Agarose-Kügelchen		Roche, Molecular Biochemicals (Mannheim)
Protein-G gekoppelte Agarose-Kügelchen		Roche, Molecular Biochemicals (Mannheim)
Substratproteine „myelin basic protein“		Sigma (St. Louis)

2.5 Virus-Stämme

Humaner Influenza Virus A/Asia/57 (H2N2) (Asia)	Pleschka S. (Giessen)
Aviärer Influenza Virus A/Bratislava/79(H7N7) (FPV)	Pleschka S. (Giessen)
Humaner Influenza Virus A/Puerto-Rico/8/34 (PR8)	Wolff T. (Berlin)
Humane Influenza Virus Mutante deINS1	Wolff T. (Berlin)

2.6 Proteine

rek. humanes TRAIL	Abteilung für
löslicher TRAIL-Rezeptor 2 - Fc	Apoptoseregulation
löslicher TNF-Rezeptor 2 - Fc	DKFZ (Heidelberg)

2.7 Reagenzienansätze (Kits)

ECL Western blotting detection reagents	Amersham (Little Chalfont)
Nucleobond PC 500 Kit	Machery und Nagel
G-25 Sephadex Quickspin Säulen	Roche (Molecular Biochemical, Mannheim)
NucleoSpin Extract - Kit	Machery und Nagel (Feucht)
Abi Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer (Netherlands)

2.8 Plasmide

3xNF- κ B Reporter Plasmid	Flory E. et al., 2000
IFN β -luc	Hiscott, J. (Montreal), Leblanc et al., 1990
pCDNA	Invitrogen (Karlsruhe)
pGreenLantern	Life Technologies (Karlsruhe)
pHMG NP	Pleschka, S. (Giessen), Pleschka et al., 1996
pcDNA3.1/YAMA	Tewari et al., 1995
pEBG-XIAP	Jordan et al., 2001

2.9 Zellen

- MDCK Zellen (Madin-Darby canine kidney)
- HEK293 Zellen (human embryonic kidney)
- A549 Zellen (human alevolar epithelial cells)
- Vero Zellen (african green monkey kidney)

3. Molekularbiologische Standardmethoden

Allgemeine molekularbiologische Standardmethoden wurden nach Sambrook (Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

3.1. Zellkultur

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Heraeus, Laminair, Sicherheitsstufe 2) mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, sterilen Kunststoffmaterialien oder autoklavierten Glaswaren und unter Verwendung steriler Nährmedien durchgeführt. Sämtliche Zelllinien wurden bei 37°C, 6% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit gehalten. Zentrifugation der Zellen fand bei Raumtemperatur und 1000 rpm (Heraeus, Megafuge) statt.

3.1.1. Kultivierung von adhärenenten Zellen (HEK293)

HEK293 Zellen wurden in Dulbecco's MEM supplementiert mit 10% FBS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin kultiviert. DMEM ist Phenolrot beigemischt, das bei starker Ansäuerung durch zu viele Zellen den pH-Wert durch eine Gelbfärbung anzeigt.

Diese adhärenenten Zellen wurden bei einem Konfluenzgrad von etwa 70-90% in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:6 passagiert. HEK293 Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und durch 3- bis 5-minütige Inkubation mit 1x Trypsin/EDTA aus der Kulturflasche gelöst. Nach Ablösung der Zellen erfolgte die Aufnahme der Zellen in frischem Medium und Aussaat in neue Kulturflaschen.

3.1.2. Kultivierung von adhärenenten Zellen (MDCK, A549)

Die adhärenenten MDCK / A549 Zellen wuchsen in Kultur in 1x MEM bzw. Ham's F12 supplementiert mit 10% FBS, 10% Penicillin/Streptomycin und 0,2% NaHCO₃. Nach 3-5 Tagen erfolgte bei einem Konfluenzgrad von etwa 80-90% die Passagierung der

MDCK Zellen in einem Verhältnis von 1:8 bis 1:15. Diese adhären Zellen stellen ihr Wachstum aufgrund von Kontaktinhibition bei einem Konfluenzgrad von 90-100% ein. MDCK Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und durch 10- bis 15-minütige Inkubation im CO₂-Brutschrank (37°C) mit 1x Trypsin/EDTA (0.05%/0.02%) aus der Kulturflasche gelöst. Nach Ablösung der Zellen erfolgte die Aufnahme der Zellen in frischem Medium und Aussaat in neue Kulturflaschen.

3.1.3. Einfrieren, Lagerung und Rekultivierung von eukaryotischen Zellen

Es besteht die Möglichkeit eukaryotische Zellen über lange Zeiträume in Anwesenheit von 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff tief zu frieren. Hierbei gilt die Faustregel: Zellen langsam einfrieren und schnell auftauen.

Zum Wegfrieren wurden adhären Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) von den Kulturflaschen gelöst und daraufhin mit einer äquivalenten Menge 10%igem PBS/FBS versetzt. Sowohl adhären, als auch Suspensionszellen wurden abzentrifugiert und in 1 ml Einfriermedium bestehend aus 10% DMSO, 10% FBS und 80% des jeweiligen Kulturmediums aufgenommen. Es wurden 2×10^6 – 1×10^7 Zellen eingefroren, damit nach dem Auftauen ausreichend Zellen für eine T75-Flasche zur Verfügung standen. Zunächst erfolgte die Lagerung der Zellen über Nacht in einer Styroporbox bei –70°C. Zur endgültigen Lagerung wurden die Aliquots am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung der Zellen wurden diese so schnell, wie möglich in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und direkt in 15 ml vorgewärmtem Medium verdünnt, abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und auf Kulturflaschen verteilt. Handelte es sich um adhären Zellen wurden diese, um alle toten Zellen zu entfernen, am darauffolgenden Tag einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versehen.

3.1.4. Transiente Transfektion von HEK293 Zellen mit CaCl₂

Um Vektor-DNA in HEK293 Zellen einzuschleusen, wurde die Calcium-Präzipitationsmethode durchgeführt, die darauf basiert, dass die DNA als Kopräzipitat mit Calciumphosphat von den Zellen aufgenommen wird.

Zunächst wurden 5 µg DNA mit 450 µl H₂O (Sigma) in einem Transfektionsröhrchen vermischt. Daraufhin fügte man 50 µl 2,5 M CaCl₂ der DNA zu und 500 µl 2x BBS (50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄ x H₂O) wurden unter Vortexen zugegeben.

Die Bildung der Präzipitate erfolgte während der Inkubationszeit von circa 20 Minuten und war durch eine leichte Trübung der Lösung sichtbar. Bevor je 1 ml Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben wurde, musste die Lösung erneut gemischt werden. Nach Inkubation bei 37°C im CO₂-Brutschrank für 6-14 h wurden die Zellen 2x mit je 5 ml warmen PBS gewaschen und mit neuem DMEM mit 0,3% FBS versehen. Die Zellen wurden für weitere 24-48 h im CO₂-Brutschrank inkubiert.

3.1.5. Transiente Transfektion von MDCK und A549 Zellen mit Lipofektamin 2000

In den mittels CaCl₂-Reagenz durchgeführten transienten Transfektions-Experimenten wurden Transfektionseffizienzen von nicht mehr als 10-30% erreicht. Allerdings sind für einige Experimente hohe, konstante, Transfektionsraten notwendig, um reproduzierbare, aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Aus diesem Grund wurde das kommerziell erhältliche Lipofektamin 2000 (L2000, Gibco) eingesetzt. Das Protokoll vom Hersteller wurde zur Transfektion von MDCK und A549 Zellen optimiert, indem verschiedene DNA- und L2000-Mengen, wie auch unterschiedliche Zellzahlen in ersten Transfektionsreihen getestet wurden. Die Besonderheit dieses Protokolls bestand darin, dass eine hohe Anzahl von adhärennten Zellen in Suspension, in Abwesenheit von Antibiotika durchgeführt wurde. Zur Transfektion eines einzigen 6-Well wurden 10 µl des Transfektionsreagenz L2000 unter Vortexen in 250 µl OPTI-MEM gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 2-3 µg DNA in 50 µl OPTI-MEM aufgenommen und das L2000/OPTI-MEM Gemisch wurde ebenfalls

unter Vortexen beigefügt. Während der 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Zellen nach Spülung mit PBS mittels Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) von der Platte gelöst, abzentrifugiert, auf $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml Medium (ohne Antibiotika) eingestellt und in ein 6-Well gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe des DNA-Transfektionsgemisches zu den Zellen und anschließende Inkubation im Brutschrank für circa 24 h bis zur Weiterverarbeitung. Zur Transfektion eines 24-Wells wurden sämtliche Mengenangaben durch 4 geteilt und zur Transfektion einer 10 cm Schale mit 8 multipliziert.

Die Untersuchung der Transfektionsrate konnte nach Verwendung eines Vektors, der ein grün-fluoreszierendes Protein (GFP) kodiert, wahlweise im FACS bzw. Fluoreszenzmikroskop erfolgen. In MDCK-Zellen wurden mittels L2000 Transfektionsraten von mehr als 60% erzielt.

3.1.6. Anzucht von Influenza Viren in embryonalen Hühnereiern

Influenza Viren lassen sich in embryonalen Hühnereiern relativ gut vermehren. Abhängig vom eingesetzten Virus-Stamm verwendet man 10-14 Tage alte, bakterienfreie Hühnerembryonen, die nach Beimpfung noch weitere 3-4 Tage wachsen. Bei Vervielfältigung des Stammes delNS1 dürfen die Hühnerembryonen nicht älter als 4-5 Tage alt sein und die Viren sollten nicht länger als Tag 8 in diesen heranwachsen. Dem Influenza Virus-Stamm delNS1 fehlt die kodierende Sequenz für das NS1 Protein, welches dem Interferonsystem der Hühnerembryonen und somit der antiviralen Antwort entgegenwirken würde. Ist das Interferonsystem schließlich vollständig in den Hühnerembryonen ausgebildet (Tag 8-9), kann es diese Influenzaviren sofort vernichten, so dass diese Viren bereits geerntet sein müssen, bevor dieser Fall eintritt.

Die Beimpfung der Hühnereier musste so steril, wie möglich erfolgen. Aus diesem Grund wurden die Hühnereier zunächst mittels 70%igem Ethanol desinfiziert und alle zu verwendeten Geräte (z.B. Eieröffner) mittels 70%igem Ethanol und Flamme gereinigt. Auf der Unterseite der Hühnereier wurde vorsichtig, mittels Eieröffner ein kleines Loch durch die Kalkschale gebohrt. Mit einer sterilen Kanüle (0,6 x 30 mm) wurden 100 µl der in PBS-BA-Lösung (1 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂, 100 Units/ml

Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,2% Bovines Serum Albumin (BA)) aufgenommenen Influenzaviren (1×10^{-4} - 1×10^{-5} Plaque Forming Units) durch die Kalkschale in die Allantoishöhle injiziert. Es war bei diesem Vorgang darauf zu achten, nicht den Embryo zu treffen und zu töten. Dies konnte durch Kontrolle der Lage der Hühnerembryonen unter einer starken Lichtquelle erfolgen. Letztlich wurde das Loch in der Kalkschale mit Holzleim (Ponal) verschlossen und die Eier für 3-4 Tage im Inkubator (37°C, 70% Luftfeuchte) gelagert.

Sobald sich die Embryonen nicht mehr bewegten (unter einer starken Lichtquelle sichtbar) bzw. nach 4 Tagen Virusinkubation und Tötung der Embryonen durch Haltung der Eier bei 4°C über Nacht, erfolgte die Virusernte. Auch diese musste so steril, wie möglich durchgeführt werden. Mittels Löffel und Pinzette wurde die Kalkschale auf der Unterseite des Eies geöffnet und die Hülle der Allantoishöhle entfernt. Die Allantoisflüssigkeit wurde mit einer sterilen 10 ml-Pipette abgenommen, in sterile Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Die Bestimmung der Viruspartikel erfolgte mittels Plaque-Assay. Die Influenza Viren wurden bis zur Verwendung bei –70°C gelagert.

3.1.7. Virusinfektion von Zellen

Bevor Zellen infiziert werden konnten, bereits transfiziert oder nicht, mussten diese 1-2x mit PBS gewaschen werden, um das Serum zu entfernen, das die Infektion behindert hätte. Die Viruslösung, die immer auf Eis zu halten war, wurde in PBS-BA-Lösung (1 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,2% Bovines Serum Albumin (BA)) verdünnt. Normalerweise wurde 1 MOI (multiplicity of infection) eingesetzt. Die Infektionslösung wurde auf die Zellen gegeben und für 30 Minuten bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Zeit entfernte man die Infektionslösung und fügte Medium-BA-Lösung (serumfreies Medium mit 0,2% BA und Antibiotika), dem Ursprungsvolumen entsprechend, hinzu. Daraufhin erfolgte die weitere Inkubation im CO₂-Brutschrank bis zur Zellernte.

Zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Inhibitoren (MEK-Inhibitor U0126; Kaspase-3-Inhibitor Z-DEVD-FMK; Pan-Kaspaseinhibitor Z-VAD-FMK) wurden diese, für 30 Minuten vor der Infektion und nach Infektion dem Infektionsmedium für den

gesamten Infektionszeitraum beigegeben (Abänderungen sind im Begleittext zu den Abbildungen angeführt).

3.1.8. Plaque-Assay

Zur Bestimmung der infektiösen Partikelanzahl in Viruslösungen wurden Plaque-Assays auf MDCK Zellen durchgeführt. Die Infektion erfolgte unter Verwendung einer logarithmisch in PBS-BA Lösung verdünnten Reihe der zu testenden Viruslösung, wie oben beschrieben. Nach der 30-minütigen Inkubation im CO₂-Brutschrank und Entfernung der Viruslösung wurde ein Medium-Agar-Gemisch (8,5 ml ddH₂O, 25 ml 2x MEM, 150 µl Bovines Albumin, 0,5 ml 1% DEAE Dextran, 15 ml 2% Oxoid Agar) zu den Zellen gegeben, bis zur Erstarrung bei Raumtemperatur gehalten und je nach Virusstamm (2-4 Tage) im CO₂-Brutschrank inkubiert.

Die Färbung der Plaques erfolgte mit einer Neutral-Rot-PBS-Lösung. 1-2 ml dieser Lösung wurden auf den Agar getropft und bis zur deutlichen Sichtbarkeit der Plaques für 1-2 h weiterhin im CO₂-Brutschrank inkubiert.

3.1.9. Immunfärbung

Zur Untersuchung der Verteilung des viralen Nukleoproteins in der Zelle wurden MDCK-Zellen in „chamber slide“-Kammer ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und mit FPV (MOI=5) infiziert. Nach 60-minütiger Inkubation wurde das Inoculum abgesaugt und durch Infektionsmedium, welches mit DMSO (Kontrolle) oder spezifischen Inhibitoren supplementiert worden war, ersetzt. 5 Stunden nach Infektion wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und mit 3,7% Paraformaldehyd für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Fixieren wurde 3x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit -20°C kaltem Azeton (30%ig, 60%ig und 100%ig) gewaschen und dadurch permeabilisiert. Im Anschluss daran wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit einer 20%igen FCS-Lösung für 20 Minuten bei 37°C blockiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen mit dem ersten Antikörper, einem polyklonalen Ziegenserum gegen das virale Nukleoprotein inkubiert. Der Antikörper wurde zuvor

1:200 in PBS + BA verdünnt. Auf die 45-minütige Inkubation bei 37°C folgten drei Waschgänge in PBS und ein weiterer Blockierschritt mit 20%igem FCS. In Anschluss daran wurden die Zellen mit 1:200 verdünntem, sekundärem Antikörper gegen Ziegen-IgG inkubiert (45 Minuten, 37°C). Nach diesem abschließenden Färbeschritt wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Zur Vorbereitung auf die DAPI-Kernfärbung wurden die Zellen 1x mit 0,1M KCl-Lösung gewaschen. Das DAPI-Reagenz wurde in PBS 1:1000 verdünnt und für 20 Minuten zu den Zellen gegeben. Nach der Kernfärbung wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen und mit Mowiol eingedeckt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

3.2. Molekularbiologische Methoden – Proteine

3.2.1. Luziferase-Assay

Reportergene, z.B. Luziferase (*luc*) aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* oder die Chloramphenicoltransferase (CAT) werden verwendet, um die Transkription bestimmter Gene zu quantifizieren. Die regulatorische Sequenz des zu untersuchenden Gens wird dafür vor die cDNA des Reportergens in einen promotorlosen Vektor kloniert. Das Genprodukt dieses Konstruktes kann in einer zytologischen Färbung oder einem Enzym-Assay (z.B. Luziferase-Assay) detektiert werden.

Der Luziferase-Aktivitätstest basiert darauf, dass Luziferase das Substrat Luziferin unter Lumineszenzabgabe umsetzt, was quantitativ im Luminometer messbar ist. Dabei ist die Lumineszenz direkt proportional zur Menge der Luziferase-Aktivität.

Zellen, die mit einem Promotor-Luziferase-Reporterkonstrukt und einer Kinase bzw. dem Leervektor transfiziert waren, wurden nach 24-48 h geerntet und in 1,5 ml Röhrchen überführt. Sämtliche Arbeitsschritte waren auf Eis durchzuführen, damit die in Wärme sehr instabile Luziferase nicht inaktiviert werden konnte. Die Zellen wurden abzentrifugiert (7000 rpm, 4°C, 5 Minuten) und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Den Überstand saugte man ab und das Pellet wurde in 100 µl Harvesting-Puffer (50 mM NaMES pH 7.8, 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM DTT 2% Triton X-100 125) resuspendiert. Das Detergenz Triton brach durch Bindung an Membranproteine die Zellmembranen auf. Nach 30-minütiger Lyse auf Eis erfolgte

ein weiterer Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 4°C, 5 min), um verbliebene Zelltrümmer zu sedimentieren. Man pipettierte 50 µl des Überstandes zusammen mit 50 µl Assay-Puffer (125 mM NaMES pH 7.8, 125 mM Tris-HCl pH 7.8, 25 mM MgAc, 2 mg/ml ATP) in eine Vertiefung der 96-Well-Platte. Im Luminometer wurden 50 µl des Substrates Luziferin automatisch auf die Vertiefungen verteilt und gleich darauf die Lumineszenz gemessen (Angabe in Relative Light Units = RLU)

Um eventuellen Fehlern durch Verlust von Zellen bei der Transfektion oder beim Luziferase-Assay vorzubeugen, wurde der Proteingehalt gleicher Mengen an Zelllysaten der verschiedenen Ansätze im BioRad Protein-Assay miteinander verglichen und die RLU auf diese Daten standardisiert.

3.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration im Photometer (BioRad-Protein-Assay)

Proteinkonzentrationen unbekannter proteinhaltiger Lösungen wurden mittels eines BioRad- Assays im Photometer bestimmt.

Die absolute Proteinkonzentration einer unbekanntes Lösung erhält man, wenn man eine Messreihe mit einem Protein bekannter Konzentration durchführt. Der BioRad Protein-Assay basiert auf der Beobachtung, dass das Absorptionsmaximum für eine saure Lösung von Coomassie Brilliant Blue G-250 nach Bindung an ein Protein von 465 nm (braun) nach 595 nm (blau) verschoben wird. Die Amplitude der Absorption bei 595 nm ist der Menge an Protein in einem großen Bereich direkt proportional.

1 ml verdünnte BioRad Lösung (1:5 Stammlösung:H₂O) wurde mit der zu messenden Menge an Proteinlösung gemischt und nach 5 Minuten in Plastikkuvetten im Photometer bei 595 nm gemessen. Die Mischung war für 60 Minuten stabil.

3.2.3. Immunpräzipitation

Die zu erntenden Zellen wurden in PBS gewaschen, mittels Triton-Lysis Puffer (TLB) (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 137 mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 50 mM Natrium Glycerophosphat, 20 mM Natrium Pyrophosphat, 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 1 mM Natrium Vanadat, 5 mM Benzamidin) lysiert, mindestens 20 Minuten auf Eis inkubiert und schließlich zentrifugiert (14000 rpm, 10 min, 4°C). Daraufhin überführte man den Überstand in ein neues Eppendorf Röhrchen, bestimmte photometrisch die Proteinkonzentration und stellte die Ansätze auf eine bestimmte Gesamtproteinmenge ein. Jedem Ansatz wurden 25 µl Protein A-Agarose (bei Maus- und Kaninchen-Antikörpern) bzw. G-Agarose (bei Ziegen-Antikörpern) und 1-5 µl Antikörper gegen das zu untersuchende Protein zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 4°C auf dem Rotationsschüttler wurden die entstandenen Immunkomplexe durch Zentrifugation (1-3 min, 14000 rpm, 4°C) pelletiert, der Überstand abgenommen und die Pellets 2x mit hochkonzentriertem, salzhaltigem TLB (TLB mit (73 µl/ml) 5 M NaCl) gewaschen.

3.2.4. Kinase-Assay

Es ist möglich, die Kinaseaktivität *in vitro* durch Zugabe von ^{32}P - γ ATP und einem geeigneten Substrat zu messen, da die Kinasen die Fähigkeit besitzen γ -Phosphatgruppen von ATP auf ein Substrat zu übertragen.

Hierzu wurden die Kinasen, wie oben beschrieben, mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert, 2x mit TLB gewaschen und anschließend zwei weiteren Waschschritten mit Kinasepuffer (10 mM MgCl_2 , 25 mM β -Glycerophosphat, 25 mM HEPES pH 7.5, 5 mM Benzamidin, 0,5 mM Dithiothreitol (DTT) und 1 mM Natrium Vanadat) unterzogen. Daraufhin setzte man einen Reaktionsmix an, der für jede Probe 100 µM ATP, 1 µg geeignetes Substrat, 20 µl Kinasepuffer und 5 µCi ^{32}P - γ ATP enthielt. 20 µl des Reaktionsmixes wurden jeder Probe zugegeben und anschließend 15 Minuten bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Zugabe von 6 µl 5x SDS-Probenpuffer (155 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% SDS, 50% Glycerin, 25% β -Mercaptoethanol) beendete die Reaktion und die darauffolgende Inkubation für 5 Minuten bei 100°C denaturierte die Proben. Nach einem kurzen

Zentrifugationsschritt, der die Agarospartikel sedimentieren sollte, wurde der Überstand auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen.

3.2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist es möglich, denaturierte Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse in einem elektrischen Feld aufzutrennen.

Zunächst wurde den Proben 8 µl 5x SDS Probenpuffer (155 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% SDS, 50% Glycerin, 25% β-Mercaptoethanol) zugegeben und circa 90 sek. bei 90°C inkubiert.

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein Detergenz, das nichtkovalente Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört und β-Mercaptoethanol enthält, das mögliche Disulfidbrücken reduziert. Die SDS-Moleküle binden sich an die Hauptketten, wobei die stark negative Ladung des Komplexes ungefähr der Masse des Komplexes proportional ist. Demzufolge wandern die Proteine in einem elektrischen Feld in Richtung der positiven Elektrode, wobei größere Proteine stärker im Gel zurückgehalten werden.

Die verwendeten Gele bestanden aus einem Sammelgel, das die Proteine einer Probe konzentrierte und einem Trenngel, in dem die Auftrennung entsprechend der Masse erfolgte. 10%ige Trenngele bestanden aus einer 30%igen Acrylamidstammlösung mit 0,8% quervernetzendem Bisacrylamid, Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 9.0, 0,4% TEMED, 0,4% SDS) und H₂O. Das 3,9%ige Sammelgel setzte sich aus einer 30%igen Acrylamidstammlösung mit 0,8% quervernetzendem Bisacrylamid und Sammelgelpuffer (140 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0,11% TEMED, 0,11% SDS) zusammen. Die Polymerisation wurde durch Zugabe des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat (10% w/v APS) erreicht. Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch Abstandhalter getrennt waren, und das Trenngel überschichtete man bis zur vollständigen Polymerisation mit 70% EtOH, um eine gleichmäßige Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel zu bekommen. Das 70% EtOH wurde entfernt, das Sammelgel gegossen und ein Kamm blasenfrei eingesetzt. Nach der Polymerisation wurden die Gele in die beiden mit 1x SDS-PAGE-Puffer (25 mM Tris-HCl pH 6.8, 50 mM Glycin, 0,1% SDS) gefüllten

Puffertanks der Gelapparatur (BioRad) gesetzt und die denaturierten Proteine in die Taschen gefüllt. Die Proteingele wurden unter konstantem Stromfluss (30-45 mA) angeschlossen.

3.2.6. Western-Blot

Mit Hilfe eines elektrischen Feldes werden im Western-Blot Proteine aus einer Gelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, auf der man die immobilisierten Proteine durch Bindung spezifischer Antikörper und geeigneter Detektionssysteme sichtbar machen kann.

3.2.6.1. Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Eine Nass-Elektroblotkammer (BioRad) wurde mit Blotting Puffer (pH 8.2; 39 mM Glycin, 48 mM Tris-HCl, 0,037% SDS, 20% Methanol (frisch zugegeben)) gefüllt. Das Gel wurde der Lauf-Apparatur entnommen, man entfernte die beiden Glasplatten und legte das Gel auf mehrere zugeschnittene, in Blotting-Puffer getränkte Whatmanpapierstreifen. Auf das Gel wurde eine Nitrozellulosemembran luftblasenfrei gelegt, gefolgt von mehreren Lagen feuchten Whatmanpapiers. Dieser Stapel wurde mit einem Saugschwamm und einem Kunststoffgehäuse umgeben in die Blotting-Kammer eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte unter konstantem Stromfluss, bei 200 mA für 45-120 Minuten.

3.2.6.2. Immundetektion von Proteinen

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen, die ein störendes Hintergrundsignal verursacht hätten, durch Inkubation mit dem Blockierungs-Reagenz (5% Milchpulver in 1x TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween)) auf einem Schwenker für mindestens 1 h abgedeckt. Das Blockierungs-Reagenz wurde verworfen, der primäre Antikörper, gelöst in Blockierungs-Reagenz, zugegeben und für 2-3 h (Raumtemperatur) oder über Nacht (4°C) inkubiert. Daraufhin wurde die Membran 3x für jeweils 10 Minuten mit 1x TBST unter Schwenken gewaschen, um überschüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit einem zweiten Antikörper, gelöst in 1x TBS für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Die Membran wurde wie zuvor gewaschen und einer ECL (Enhanced Chemoluminescence)-Reaktion unterworfen.

Die ECL-Lösungen enthalten Luminol, welches ein Substrat für die, an den zweiten Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase ist und nach Oxidation in einen angeregten Zustand übergeht und Licht emittiert.

Es wurden jeweils 2 ml der beiden ECL-Lösungen in ein ebenes Gefäß gegeben und die Membran wurde für 1 Minute unter Schwenken inkubiert. Danach wurde die Membran getrocknet, in eine ECL-Detektionskassette zwischen zwei durchsichtige Folien gelegt und die nun sichtbaren Banden durch Auflegen eines Röntgenfilmes dokumentiert.

3.2.7. Herstellung von Kern-Protein-Extrakten

Die Herstellung der Proteinextrakte fand bei 4°C statt. Für die Präparation von Kernextrakten im Minimaßstab wurden 1×10^7 Zellen bei 1000 rpm, 5 Minuten abzentrifugiert, mit 10 ml PBS gewaschen, in 1 ml PBS aufgenommen und in Mikroreaktionsgefäße überführt. Nach 30 Sekunden Zentrifugation bei 5000 rpm wurde das Pellet vorsichtig in 500 µl Puffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM Pefablock) resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Mehrmaliges Aufziehen der Suspension in einer gekühlten 26G Nadel sollte die Zellmembranen der geschwollenen Zellen aufbrechen, wobei die Zellkerne größtenteils intakt blieben. Diese trennte man durch Zentrifugation (5 Minuten, 5500 rpm, 4°C) vom zytoplasmatischen Überstand. Nach zweimaligem Waschen der

Zellkerne mit Puffer A wurden diese in 50 µl Puffer C (20 mM HEPES pH 7.9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Pefablock) resuspendiert und die salzlöslichen Kernproteine durch 15-minütiges kräftiges Schütteln bei 4°C extrahiert. Hochmolekulare Bestandteile wurden 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert, bevor der proteinhaltige Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. 5 µl des Überstandes verwendete man zur Proteinbestimmung.

3.2.8. DNA-Protein-Bindungsassay

3.2.8.1. Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde

Das Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I kann 3' Enden von DNA-Fragmenten auffüllen, indem es die 5' Überhänge als Matrize nutzt.

Der Reaktionsansatz wird 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, über eine G-25 Sephadex-Säule gereinigt, und die Aktivität der markierten Probe im Szintillationszähler bestimmt.

3.2.8.2. „Elektrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)

Die sequenzspezifische Bindung von Proteinen an doppelsträngige DNA kann ermittelt werden, indem man Proteine mit radioaktiv markierten DNA-Sequenzmotiven inkubiert und die entstehenden Komplexe in einem nativen Polyacrylamidgel auftrennt. DNA-Fragmente, an die ein Protein gebunden ist, wandern im Gel langsamer und können dadurch von ungebundener DNA getrennt werden. Synthetische Kompetitoren wie Poly dl/dC oder Poly dG/dC verhindern eine unspezifische DNA-Bindung durch Proteine an die Bindeprobe, indem sie als 2000-10000 facher Überschuss (der Bindeprobe) dem Versuchsansatz hinzugefügt werden. Der Nachweis einer spezifischen DNA-Protein-Wechselwirkung erfolgt durch Konkurrenz mit einem Überschuss des entsprechenden nichtmarkierten Oligonukleotides.

Zu 5 µg Kernextrakt, auf 12 µl eingestellt, wurden 6 µl Puffermix (1x Poly dl/dC, 1x BSA, 5x Bindungspuffer (60 mM HEPES pH 7.9, 3 mM EDTA, 150 mM KCl, 12% Ficoll) hinzugegeben, 5 Minuten auf Eis inkubiert und mit 2 µl radioaktiv markierter DNA-Probe (60000 cpm) gemischt. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur

wurden die Ansätze parallel zu einem Farbmarker (5% Ficoll in 1x Bindungspuffer) auf ein 5%iges Polyacrylamidgel (5% Polyacrylamid, 7 µl/ml 10% APS, 0,7 µl/ml TEMED, 0,5x TBE), das circa 2 h vorgelaufen war, aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 180 Volt für circa 2,5 h in 0,4%igem TBE. Das Gel wurde auf Whatman Papier bei 80°C auf dem Gelrockner getrocknet (circa 50 Minuten). Die Exposition mit Verstärkerfolien erfolgte meist für 1-3 Tage bei -70°C.

3.2.9. Präparation der Zell-Lysate.

Die zu untersuchenden Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und in 200–300 µl Lyse-Puffer (50 mM Tris pH 7.4, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 10 mM MgCl₂, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin, 25 µg/ml Pefablock) aufgenommen. Wenn es sich um adhärenente Zellen handelte, wurde ein Zellschaber zum Lösen der Zellen von der Platte verwendet. Nach einer Inkubationszeit von circa 30 Minuten wurden die Lysate 10 Minuten zentrifugiert, daraufhin die Proteinkonzentration bestimmt und auf circa 300–500 µg/Probe eingestellt.

3.2.10. RNA-Isolierung und RNase Protection Assay

Diese Methode verwendet man, um die Regulation von Genen auf RNA-Ebene zu untersuchen. A549-Zellen wurden ausgesät, mit FPV (MOI=1) infiziert und für 24 h inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit TRIZOL-Reagenz lysiert, um anschließend eine RNA-Isolierung durchzuführen. Diese wurde nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt. Kurz: Die Zellen wurden mit TRIZOL lysiert. Das Lysat wurde in Eppendorf-Tubes überführt. Mit einer 26G Kanüle und einer 2 ml Spritze wurde das Lysat mehrmals auf Eis auf- und abpipettiert, um die DNA auf diese Weise zu scheren. Nach Zugabe von Chloroform (160 µl/ml Lysat) wurden die Eppendorf-Gefäße 30 Sekunden gevortext und anschließend 5 Minuten bei max. Drehzahl in der gekühlten Zentrifuge abzentrifugiert. Dabei bildeten sich 2 Phasen aus, von denen die obere, wässrige Phase die RNA enthielt und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt wurde. Zu dieser wässrigen Phase wurde ein Volumen eiskaltes 2-Propanol zum Ausfällen der RNA zugegeben, gefolgt von einer 1-stündigen Inkubation bei -20°C. Die RNA wurde anschließend durch Zentrifugation für 15 Minuten bei maximaler Drehzahl in der gekühlten Zentrifuge pelletiert. Nach

einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol wurde das Pellet etwa 5 Minuten getrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser aufgelöst. Die Konzentration der RNA wurde auf 2µg/µl eingestellt.

In dieser Arbeit wurde der RiboQuant-Kit der Firma BD-Bioscience verwendet. In einem ersten Schritt wurden Primer-Templates mit einer T7-Polymerase-Bindestelle mit einem Ribonukleotidtriphosphat-Mix, der ³²P-markiertes UTP enthält, vermischt und mit T7-Polymerase inkubiert. Dadurch wurden radioaktiv markierte „anti-sense“ Oligonukleotide hergestellt, die komplementär zu Sequenzen der zu untersuchenden Gene sind. Die markierten Oligos wurden mit der RNA aus den infizierten A549 Zellen vermischt, damit sich die komplementären Stränge aneinander lagern konnten. Die dabei gebildete Doppelstrang-RNA wurde anschließend mit RNase verdaut, wodurch nur die Doppelstränge, die aufgrund der gebundenen Oligos eine definierte Länge aufwiesen, übrig blieben. Der verdaute Mix wurde anschließend auf ein spezielles Acrylamidgel geladen und aufgetrennt. Im Anschluss daran wurde das Gel getrocknet und mit einem Film exponiert. Nach verschiedenen Expositionslängen (1-2 Tage) wurden die Filme entwickelt.

4. Ergebnisse

4.1. Herstellung und Charakterisierung retroviral transduzierter Zelllinien zur Untersuchung des NF- κ B-Signalweges

Die Infektion von Zellen mit Influenza-A-Viren führt zur Aktivierung einer Vielzahl antiviraler Mechanismen wie z.B. der Expression antiviraler Zytokine (Julkunen I. et al., 2001). Die Typ-I-Interferone α/β spielen in der Abwehr des Virus gewissermaßen die Hauptrolle. Sie wirken sowohl autokrin als auch parakrin und führen zur Induktion eines antiviralen Zustandes in den Nachbarzellen (Haller O. et al., 1998). Der Induktion der Zytokine geht eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren voraus. Die Bindesequenzen für NF- κ B sind in einer Vielzahl von Zytokinpromotorsequenzen vorhanden (Karin M. und Delhase M., 2000; Pahl HL., 1999), wodurch NF- κ B eine besonders wichtige Rolle in der Virus-induzierten Zellantwort einnimmt. Die Aktivierung von NF- κ B nach Influenza-A-Virus Infektion oder Expression einzelner viraler Proteine ist umfangreich beschrieben worden (Pahl HL. und Baeuerle PA., 1995; Bussfeld D. et al., 1997; Flory E. et al., 2000; Uetani K. et al., 2000). Offen blieb bisher allerdings die Frage, welche Rolle von NF- κ B in der Virusreplikation spielt und welche Auswirkungen eine Beeinflussung des NF- κ B-Signalweges auf die Replikation hat.

Um diese Fragen zu beantworten, wurden humane Alveolarepithelzellen (A549), Hundenierenzellen (MDCK) und Affennierenzellen (Vero) mit Retroviren stabil transduziert. Mittels dieser Retroviren wurden ein Leervektor, eine konstitutiv aktive Form der I κ B-Kinase β (IKK-EE), eine dominant-negative Form der IKK β (IKK-KD) und eine nicht-degradierbare Form der I κ B α (I κ B- α -mut), ein sogenannter Super-Repressor, in die Zellen gebracht (Denk A. et al., 2001). Nach 2 Infektionsrunden (siehe Methoden) wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 auf T-75 Flaschen ausgesät und mit Zeozin (400 μ g/ml) für ein bis zwei Wochen selektioniert. Da neben dem jeweiligen Transgen auch das Gen für das Grün-fluoreszierende Protein (*Green Fluorescence Protein*, GFP) vom Virus in die Zellen eingebracht wurde, konnte in der Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorter*, FACS) laufend überprüft werden, wie viele Zellen das jeweilige Konstrukt stabil exprimieren (Abbildung 5).

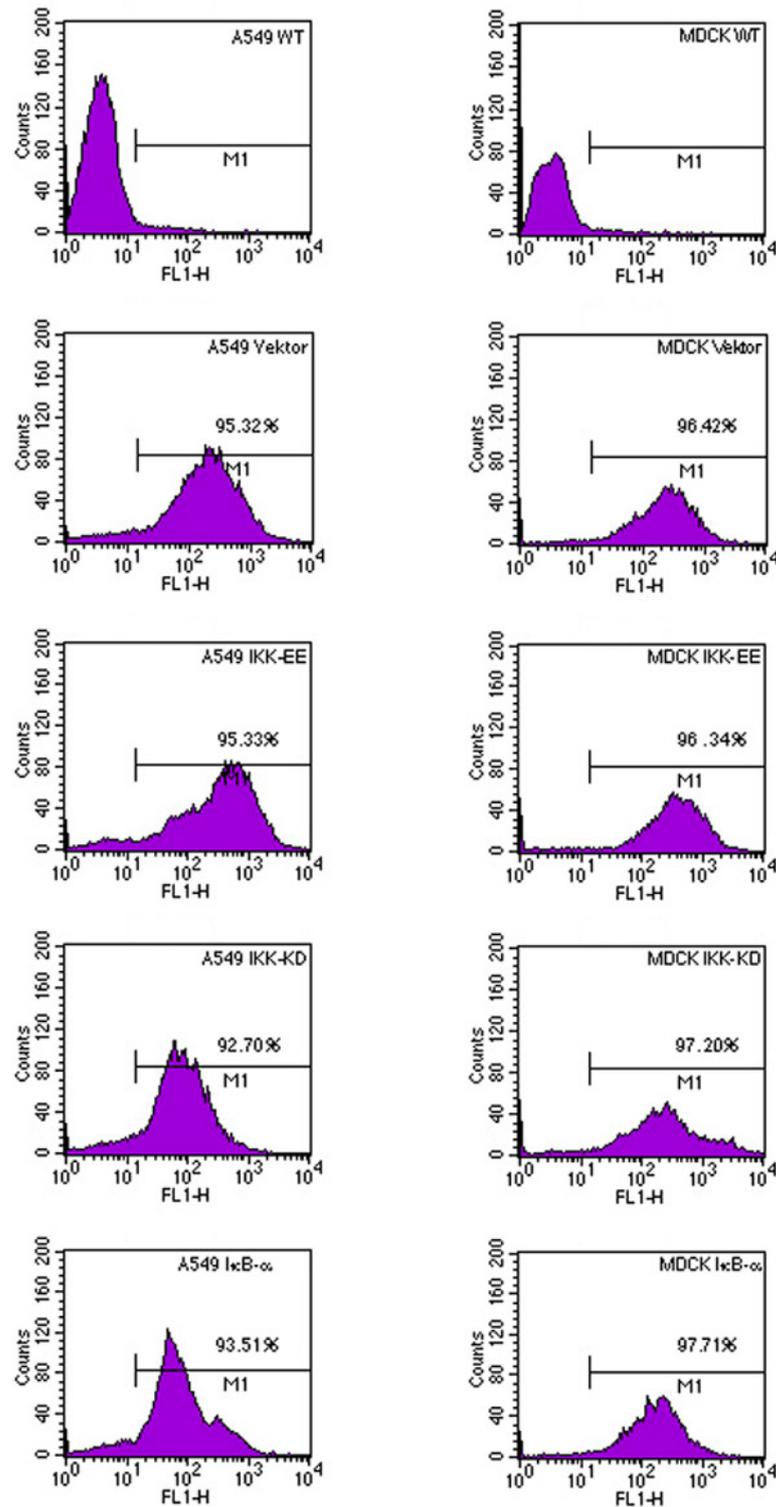


Abb.5.: FACS-Analyse der stabil transduzierten A549- und MDCK Zelllinien.

MDCK- und A549-Zellen wurden in der Durchflusszytometrie untersucht. Aufgrund des GFP-Genes im retroviralen Vektorconstruct lässt sich der Anteil transduzierter Zellen leicht ermitteln. Wie man sieht, liegen nach der Zeozin-Selektion sehr homogene, transduzierte Populationen vor.

Als Test für die Funktionalität der Konstrukte wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Die A549 Zellen wurden mit TNF- α (20ng/ml) stimuliert, zu verschiedenen Zeiten nach der Stimulation lysiert und schließlich im Western Blot analysiert. Dabei wurde der induzierte Abbau von I κ B α bestimmt. TNF- α -Stimulation führt zu einer sehr raschen Aktivierung des IKK-NF- κ B-Signalweges. Die Beeinflussungen des Signalweges durch die Expression der verschiedenen Konstrukte sollte so, ebenfalls nach Stimulation, sichtbar werden. Wie man in der Abbildung 6 erkennen kann, ist zum Zeitpunkt 0 min bei allen Linien eine bestimmte Menge von I κ B- α vorhanden. In der Spur der I κ B- α -mut-überexprimierenden Zellen ist eine massive Bande zu sehen, die etwas größer als die Wildtyp-Bande ist und die die nicht-degradierbare Form von I κ B- α darstellt. Im Zeitverlauf (10 min, 30 min und 45 min) kann man die Degradierung, also den Abbau der Bande bei den Vektor-Zellen und deren Abbau und Resynthese bei den IKK-EE-Zellen gut erkennen, während hingegen im Falle der IKK-KD-Zellen kaum ein Abbau erkennbar ist. In den I κ B- α -Zellen sieht man das Verschwinden der Wildtyp-Bande, das nicht-degradierbare I κ B- α -mut-Protein bleibt jedoch unbeeinflusst.

Das Verhalten der einzelnen Linien spiegelt die Erwartungen weitestgehend wider. Interessanterweise kommt es im Fall der IKK-EE-Linie zu einer schnellen Resynthese, was eher unerwartet ist, da man ein länger anhaltendes Signal erwarten würde. Dieser Effekt lässt sich allerdings leicht erklären, wenn man bedenkt, dass I κ B- α selbst ein NF- κ B-reguliertes Gen ist.

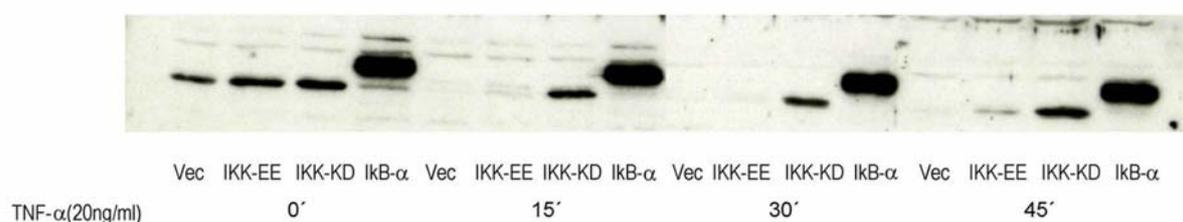


Abb.6.: TNF- α -induzierte I κ B- α -Degradation in A549-Zelllinien.

A549-Zellen wurden mit 20ng/ml TNF- α inkubiert und nach verschiedenen Inkubationszeiten lysiert. I κ B- α wird durch die TNF- α -induzierte Signalkaskade von IKK phosphoryliert und degradiert. Je nach Beeinflussung des NF- κ B-Signalweges kommt es zu einem mehr (Vec und IKK-EE) oder weniger (IKK-KD und I κ B- α) starken Abbau und einer Resynthese von I κ B- α .

Die MDCK-Linien wurden mittels eines Luziferase-Reporter-Assays auf ihre korrekte Funktion hin überprüft. Zu diesem Zweck wurde ein Plasmid, das drei Kopien einer NF- κ B-Bindesequenz in der Promotorregion besitzt, verwandt (Flory E. et al., J2000). Hinter dem Promotorbereich sitzt der Leserahmen für das Luziferase-Reportergen. Die Luziferase ist ein Enzym, welches Luziferin enzymatisch spaltet und aktiviert. Diese Aktivierung ist eine messbare luminometrische Reaktion, die die Menge an gebildetem Enzym und somit die Promotoraktivität widerspiegelt. Wird nun in diesem Fall der IKK-NF- κ B-Signalweg durch einen Stimulus aktiviert, führt dies zur Bildung von Luziferase.

Wie man in Abbildung 7 erkennen kann, wird die Grundmenge an Luziferase in diesen Zellen vom Transgen bereits unterschiedlich reguliert. Poly(I)-Poly(C), eine synthetische doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA), wurde als Analogon für replizierende virale RNA verwandt. Dabei sieht man eine starke Aktivierung von NF- κ B in den Vektor- und IKK-EE-Zellen, während die IKK-KD-Zellen weitaus weniger Aktivierung zeigen. In den κ B- α -Zellen ist, wie erwartet, die geringste Aktivierung zu beobachten. Um der für diese Arbeit relevanten Situation etwas näher zu kommen, wurden die Zellen auch mit Influenza-A-Virus (FPV) infiziert. Bei einer Virusinfektion wird die dsRNA durch das NS1-Protein komplexiert und bleibt der Zelle dadurch weitestgehend verborgen (Wang X. et al., 2001). Darüber hinaus führen jedoch auch die neu gebildeten viralen Proteine, wie das Nukleoprotein, das Matrixprotein oder das Haemagglutinin, zur Aktivierung von IKK und NF- κ B (Flory E. et al., 2001). Im Fall der Infektion kann man ebenfalls eine mehr oder weniger starke Stimulation des NF- κ B-Promotors, je nach Wirkung des Transgens in den Linien sehen (Abbildung 7). Diese fällt allerdings aus genannten Gründen etwas geringer aus als bei der dsRNA.

Ein weitaus aussagekräftigerer Test der Zelllinien im Kontext einer Influenza-Infektion ist der Einfluss der Konstrukte auf den Promotor eines Virus-induzierten Enzyms, IFN- β . Zu diesem Zweck wurden die MDCK-Linien mit einem Luziferase-Reportergenkonstrukt, das die IFN β -Promotorsequenz vor dem Luziferase-Gen enthält, transfiziert und infiziert oder stimuliert. Die resultierende Rezeptorgenaktivität war wiederum wie erwartet. Die dsRNA führt zu einer Stimulation, während diesmal die Virusinfektion eine stärkere Aktivierung zur Folge hat (Abbildung 7).

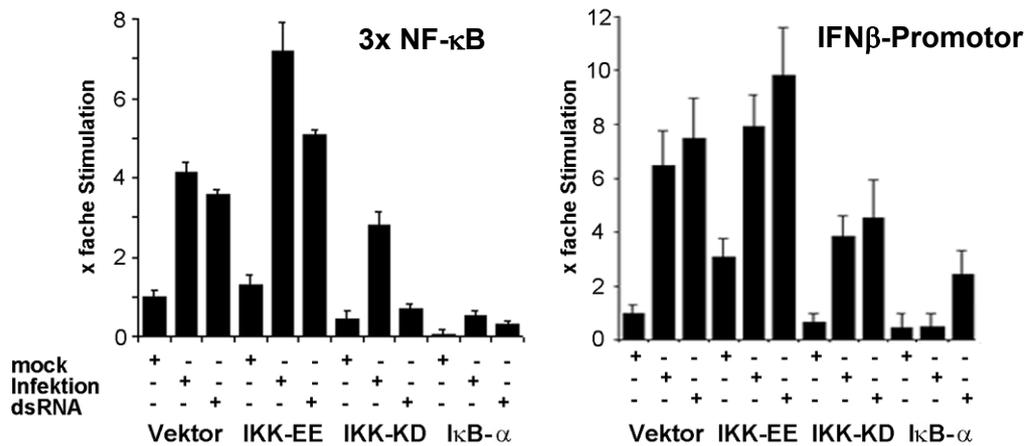


Abb.7.: Luziferase-Reporter-Assay in MDCK-Zelllinien.

Transduzierte MDCK-Linien wurden entweder mit einem 3x-NF-κB-Promotor-Plasmid oder einem IFNβ-Promotor-Plasmid transfiziert und stimuliert. Im Luziferase-Assay zeigt sich in beiden Fällen eine Aktivierung des jeweiligen Reporters. Je nach Linie ist die Antwort auf dsRNA und Virusinfektion verschieden stark. Während Vector und IKK-EE eine gute Aktivierbarkeit von NF-κB zeigen, kommt es bei IKK-KD und IκB-α zu einer sehr geringen Expression des Reporters.

Die Erklärung dafür dürfte in der Ko-Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und IRF-3 liegen, die ebenfalls in der Promotorregion binden und auch für die Aktivierung des Promotor benötigt werden und den Effekt verstärken.

4.2. Replikation von Influenza-A-Viren in den verschiedenen Linien

Um nun den Einfluss von NF-κB auf die Influenza-Replikation zu untersuchen, wurden die verschiedenen Linien mit FPV infiziert und die Titer der neu gebildeten Viren bestimmt. Wenn man sich, wie eingangs beschrieben, die verschiedenen Funktionen von NF-κB vor Augen hält, würde man erwarten, dass im Falle der IKK-EE-Zellen ein geringerer Virustiter zu erwarten ist, da es in diesen Zellen zu einer stärkeren antiviralen Antwort kommen sollte. In den IKK-KD- und den IκB-α-Zellen ist durch eine verminderte antivirale Antwort der Zellen mit einem höheren Virustiter zu rechnen. Wie man nun in Abbildung 8 sieht, ist das genaue Gegenteil der Fall. Das Virus kann am besten replizieren, wenn der NF-κB-Signalweg verstärkt aktiviert ist, während bei einer Unterbrechung des Signalweges negative Auswirkungen auf die

Vermehrung auftreten. Dieser Effekt ist am stärksten in den humanen A549-Lungenepithelzelllinien ausgeprägt (Abbildung 8a), die auch *in vivo* im Menschen das erste Ziel einer Influenzavirus-Infektion sind. Diese Zellen besitzen ein intaktes Interferonsystem und antworten mit allen klassischen antiviralen Mechanismen auf die Infektion (Ronni T. et al., 1997).

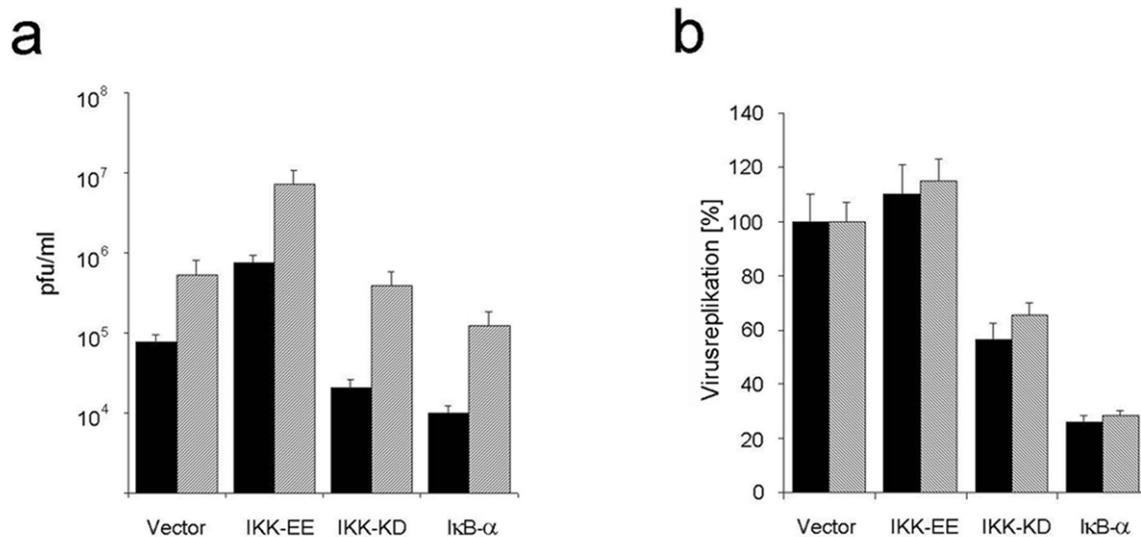


Abb.8.: Replikation von FPV in A549-, MDCK- und Vero-Zelllinien.

(a) A549 Zellen wurden mit FPV (MOI=1) für 9 h (schwarz) oder 24 h (grau) infiziert. Virustiter in den Überständen wurden mittels Plaque-Titration bestimmt. Die „plaque forming units“ (pfu/ml) sind logarithmisch dargestellt. (b) MDCK- und Vero-Zellen wurden mit FPV (MOI=1) infiziert. 24 h nach Infektion wurden die Überstände abgenommen und die Titer bestimmt. Die Titer sind als %-Replikation angegeben, wobei der Titer der Vektorzellen als 100%-Basis verwandt wurde.

In den MDCK-Linien (Abbildung 8b) ist das Bild vergleichbar mit den A549 Zellen, allerdings sind die Titerunterschiede nicht so groß. Die Vero-Zellen wurden in die Untersuchungen mit einbezogen, da sie die Entkoppelung des NF-κB-Effektes von der Typ-I-Interferon-Antwort ermöglichen. Vero-Zellen besitzen kein Typ-I-Interferonsystem, da sie eine Deletion im Interferon-Gen besitzen (Diaz MO. et al., 1988). Interessanterweise unterscheidet sich das Replikationsverhalten in An- und Abwesenheit von Typ-I-Interferonen nicht, was den Schluss zulässt, dass der Einfluss des IKK-NF-κB-Signalweges unabhängig von der Typ-I-Interferon-Antwort ist. Dieser Befund ist überraschend und steht im Gegensatz zur bisherigen Meinung, dass NF-κB antivirale Zytokine reguliert, wobei Interferone α/β eine Schlüsselrolle besitzen (Ronni T. et al., 1997; Wang X. et al., 2000).

In der Folge wurde auch noch ein möglicher Einfluss von Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), einem zweiten wichtigen antiviralen Zytokin untersucht. Allerdings ergaben ELISA-Assays, dass die Menge an virusinduziertem TNF- α in allen Linien unter der Nachweisgrenze lagen und dies somit wohl keine Erklärung für die beobachteten Effekte sein dürfte.

Wie soll man sich nun die Rolle von NF- κ B im Kontext einer Influenza-A-Virusinfektion erklären? Die naheliegendste Vermutung, dass der Effekt durch eine unterschiedliche Expression antiviraler Zytokine wie IFN α/β oder TNF- α zu erklären sei, erwies sich als nicht zutreffend. Eine weitere Möglichkeit ist nun, dass die Funktion von NF- κ B als Regulator der Apoptose eine Rolle spielt. Viele Arbeiten beschäftigten sich mit Influenza-induzierter Apoptose in verschiedenen Zelltypen wie Neuronen (Mori I. et al., 2002), Epithelzellen (Mohsin MA. et al., 2002; Lin C. et al., 2001), Lymphozyten (Nichols JE. et al., 2001; Tumpey TM et al., 2000) und Monozyten/Makrophagen (Lehmann C. et al., 1996).

4.3. Influenza-A-Viren-induziert Apoptose in verschiedenen Zelllinien unabhängig von Typ-I-Interferonen

Die Annexin-V-Färbung wurde in dieser Arbeit als erste Nachweismethode der Apoptoseinduktion nach Influenzainfektion ausgewählt. Dabei wird ein sehr frühes Charakteristikum der Apoptose nachgewiesen, nämlich das Erscheinen von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche (Schlegel RA. und Williamson P., 2001). In Abbildung 9 sieht man eine Infektionskinetik von A549, MDCK und Vero-Zellen, die mit Influenza-A-Virus (FPV und PR8) infiziert wurden und nach den angegebenen Zeiten „*post infectionem*“ auf dieses frühe Apoptoseanzeichen hin überprüft wurden. Wie man gut erkennen kann, verläuft die Zunahme an apoptotischen Zellen in allen Zelltypen gleichmäßig und in einem vergleichbaren Umfang. Im Zusammenhang mit der Influenza-induzierten Apoptose wurde auch die Rolle von Typ-I-Interferonen als Verstärker des apoptotischen Zelltodes beschrieben (Balachandran S. et al., 2000). Wie die Untersuchungen mit Vero-Zellen in der Folge ergaben, ist auch hier kein prominenter Effekt von IFN α/β nachweisbar (Abbildung 9).

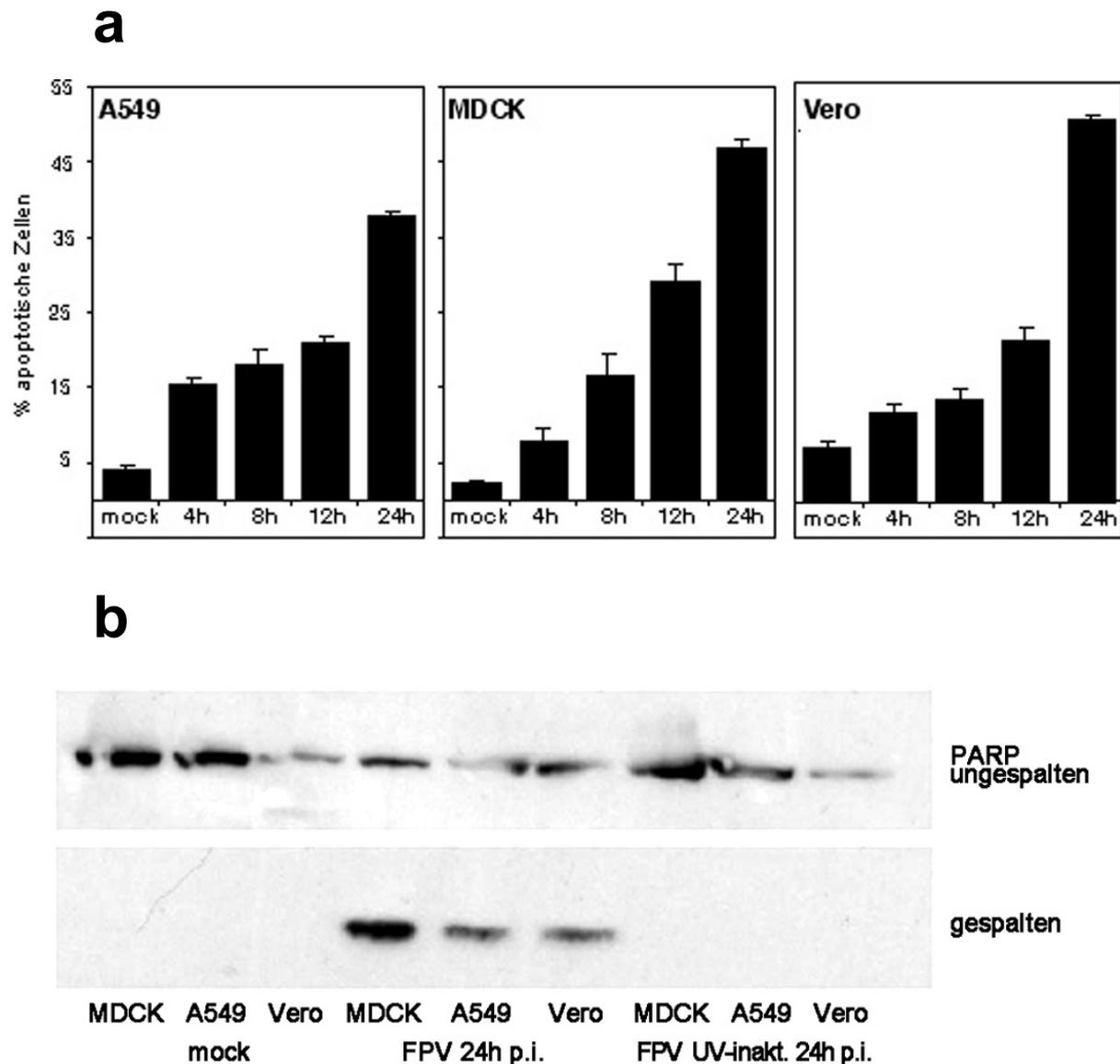


Abb.9.: FPV induziert Apoptose in verschiedenen Wirtszellen unabhängig von Typ-I-Interferon.

(a) A549-, MDCK-, und Vero-Zellen wurden mit FPV (MOI=3) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen abgelöst und mit Annexin-V-Alexa 568 gefärbt und im FACS ausgewertet. (b) Parallel dazu wurden Zellen nach 24 h lysiert und im Western Blot analysiert. PARP-Spaltung dient als Marker für Kaspase-abhängige Apoptose in den Zellen.

Die Annexin-V-Nachweismethode für Apoptose ist zwar anerkannt, allerdings kann man falsch-positive Ergebnisse nicht ausschließen. Im Fall einer Virusinfektion könnten die Zellen auch nur aufbrechen, ohne geordnet in die Apoptose einzutreten. Dabei würde der Farbstoff in die Zelle aufgenommen werden und könnte dort an die Phosphatidylserin-Reste binden und ein Signal geben. Um nun diesen Fall

ausschließen zu können, wurden A549-, MDCK- und Vero-Zellen mit Virus oder mock infiziert und nach 24 h lysiert. Im Western Blot wurde die Spaltung von Poly (ADP Ribose) Polymerase (PARP) untersucht. PARP ist ein Substrat für verschiedene Kaspasen, wie Kaspase 3, 7 und 8 (Germain et al., 1999; Benchoua et al., 2002). PARP wird in der frühen Phase der Apoptose gespalten und ist ein Zeichen für Apoptose, da diese Spaltung einen *point of no return* darstellt. Wie man in Abbildung 9b sehen kann, wird PARP in allen drei Zelllinien nach Virusinfektion gespalten, während die Inkubation der Zellen mit inaktiviertem Virus keinen Effekt zeigt.

In einem nächsten Schritt war es nun interessant, welcher der beiden Gegenspieler, Virus oder Wirtszelle den Vorteil aus der Apoptoseinduktion zieht. Mit anderen Worten: Nützt die Apoptose der Zelle bei ihrem Kampf gegen das Pathogen oder benützt das Virus diesen Mechanismus für die eigene Vermehrung ?

4.4. Inhibition von Kaspase-3 führt zu geringeren Virustitern

Es gibt eine Reihe von Kaspaseinhibitoren auf Peptidbasis, die mehr oder weniger spezifisch eine Reihe von Kaspasen hemmen. Der Inhibitor Z-DEVD-FMK ist als Inhibitor der Kaspase-3 beschrieben. Im folgenden Experiment wurden verschiedene Verdünnungen des Kaspase-3-Inhibitors angesetzt und nach der Infektion der Zellen mit FPV dem Medium zugegeben. Im Western Blot wurde die Spaltung von PARP als Maß für den Grad der Kaspaseinhibition untersucht. Wie man in Abbildung 11 sehen kann, nimmt die Menge an gespaltenem PARP mit steigender Konzentration des Inhibitors ab. Im gleichen Umfang nimmt überraschenderweise auch die Virusreplikation ab (Abbildung 10).

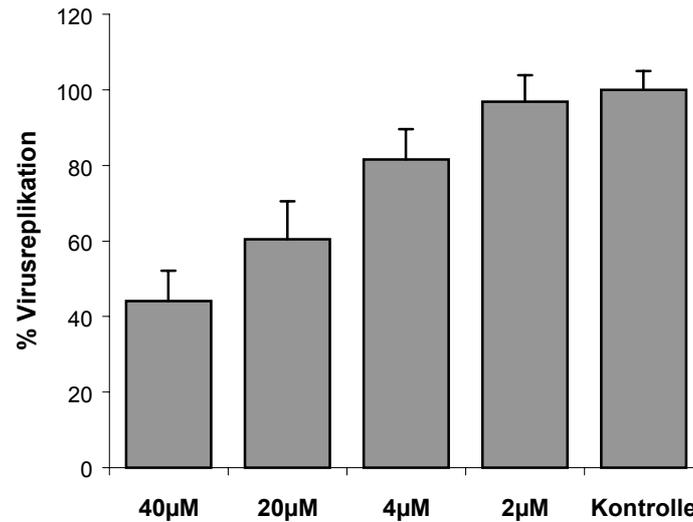


Abb.10.: Kaspase-3-Inhibitor-abhängiger Rückgang der Influenzareplikation.

MDCK-Zellen wurden mit FPV (MOI=1) infiziert. Das Infektionsmedium wurde mit verschiedenen Konzentrationen vom Kaspase-3-Inhibitor Z-DEVD-FMK (μM) supplementiert. 24 h p.i. wurden die Überstände gesammelt und Plaque-titriert.

Dies ist ein guter Hinweis auf eine mögliche Funktion der Apoptose für effektive Replikation von Influenza-A-Viren. Die Frage stellt sich nun, ob eine Beeinflussung der viralen Proteinsynthese für diese Abnahme des Virustiters verantwortlich sein könnte. Es stellte sich im Laufe der Experimente jedoch heraus, dass im Western Blot keine Abnahme von frühen Proteinen wie dem NP-Protein oder dem NS1-Protein und dem späten Protein M1 zu sehen war (Abbildung 11).

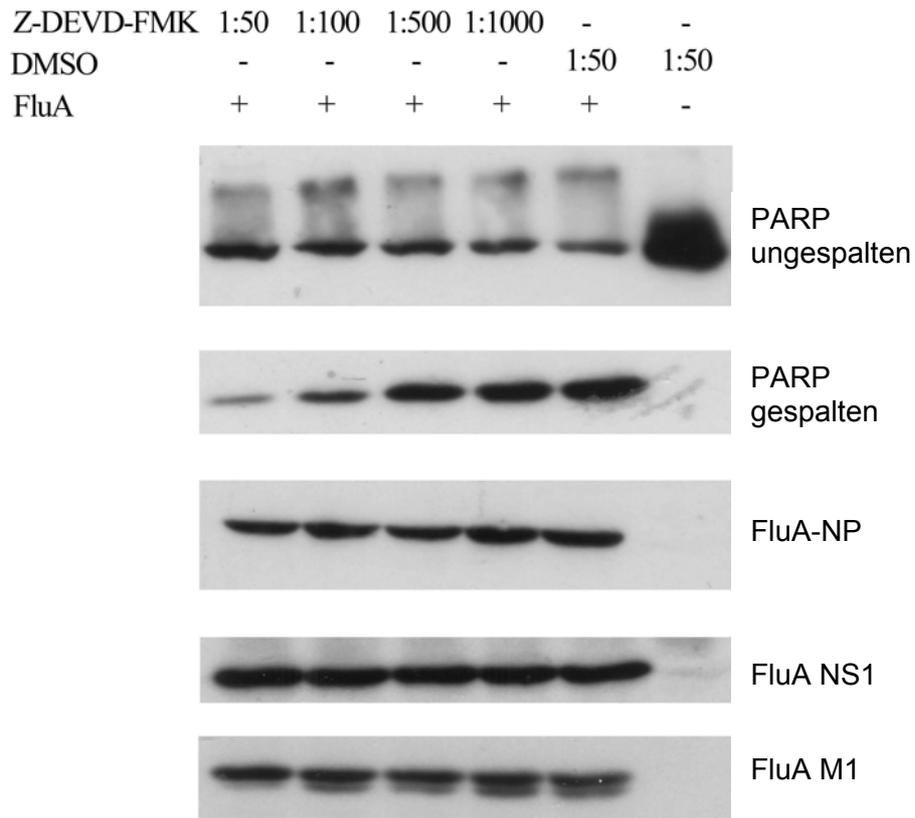


Abb.11.: Kaspase-3-Inhibitor-bedingter Rückgang der PARP-Spaltung.

MDCK-Zellen wurden mit FPV (MOI=1) oder mock infiziert. Dem Infektionsmedium wurden verschiedene Konzentrationen von Kaspase-3-Inhibitor oder DMSO (Lösungsmittelkontrolle) zugesetzt. 24 h p.i. wurden die Zellen lysiert. Im Western Blot wurde die Spaltung von PARP und die Proteinmengen von NP, NS1 und M1 ermittelt.

4.5. Die Verwendung eines Breitband-Kaspaseinhibitors (Z-VAD-FMK) zeigt im Vergleich zu Z-DEVD-FMK keine verstärkte Inhibition der Virusvermehrung

In einem weiteren Experiment sollte nun getestet werden, ob der Inhibitor Z-VAD-FMK, welcher gleichzeitig mehrere Kaspasen hemmt, im Vergleich zum Kaspase-3-Inhibitor einen stärkeren Effekt auf die Replikationsinhibition zeigt, als der spezifische Kaspase-3-Inhibitor. Dies könnte dann als eine direkte Beteiligung mehrerer Kaspasen an diesem Effekt gedeutet werden. Der Abbildung 12 kann man entnehmen, dass es zu keiner Verstärkung der Kaspase-abhängigen Effekte durch

die Verwendung eines Breitbandinhibitors kommt, sondern, dass die Inhibition der Replikation im Bereich der Effekte aus dem Kaspase-3-Inhibitor Experiment liegt. Wie auch aus Abbildung 9 (Annexin-V) ersichtlich, ist dieser Kaspase-vermittelte Effekt unabhängig von etwaigen Einflüssen des Typ-I-Interferon-Systems. Vero-Zellen zeigen dieselben Effekte wie die Interferon-kompetenten A549-Zellen, was eine IFN-Beteiligung hier wiederum weitestgehend ausschließt.

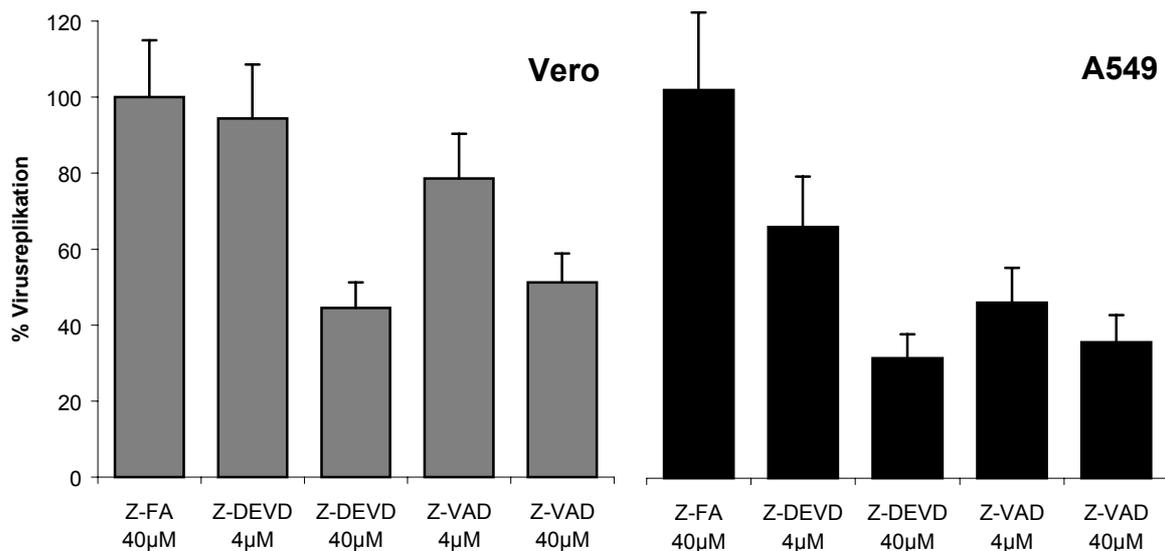


Abb.12.: Breitband- und Kaspase-3-spezifischer Inhibitor zeigen vergleichbare Effekte. Vero- und A549-Zellen wurden mit FPV (MOI=1) infiziert. Zum Infektionsmedium wurden verschiedene Konzentrationen Kaspase-3-Inhibitor (Z-DEVD), Breitband-Kaspaseinhibitor (Z-VAD) oder inaktives Kontrollpeptid (Z-FA) zugegeben. 24 h p.i. wurde die Überstände gesammelt und titriert.

Weiterhin war es interessant zu untersuchen, ob die Wirkung der Inhibitoren auf die Kaspasen wirklich der entscheidende Mechanismus hinter dem Effekt auf die Replikation ist oder ob sie möglicherweise andere Wege beeinflusst, die solche Effekte auslösen. Um diese Frage besser adressieren zu können, sollten pro- und antiapoptotische Proteine in MDCK-Zellen überexprimiert werden.

4.6. Einfluß von pro- und antiapoptotischen Proteinen auf die FPV

Replikation

In einer früheren Arbeit von Hinshaw et al. (1994) konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 zur Unterdrückung der Apoptose führt. In dieser Arbeit wurden jedoch keine näheren Angaben zu den Effekten auf die Replikation gemacht. Diese Arbeit sollte als Vorlage dienen, den Effekt des antiapoptotischen Proteins XIAP in diesem Zusammenhang näher zu untersuchen. XIAP ist ein direkter Inhibitor der Kaspasen 3, 7 und 9 (Deveraux QL. et al., 1999; Deveraux QL. et al., 1997). Zudem hat XIAP den Vorteil gegenüber den synthetischen Kaspaseinhibitoren, dass es ausschließlich und spezifisch die angegebenen Kaspasen hemmt (Deveraux et al., 1999).

Im Gegenzug sollte auch der Effekt einer erhöhten Apoptoserate auf die Replikation untersucht werden. Mit Hilfe eines Plasmids, das für Prokaspase-3 kodiert (Tewari M. et al., 1995), wurde eine erhöhte Grundexpression von Kaspase-3 in den Zellen erreicht. Sollte nun die Hypothese stimmen, dass Kaspase-vermittelte Apoptose benefitär für die Virusreplikation ist, dann würde man einen Anstieg der Virustiter in diesen Zellen erwarten.

In Abbildung 13 kann man im Western Blot eine erhöhte Rate an PARP-Spaltung in den Prokaspase-3 transfizierten Zellen erkennen, welches auf die Funktionalität des Proteins und eine erhöhte Apoptoserate schließen lässt. Nach Infektion mit Influenza-A-Virus kann man die verstärkte Kaspaseaktivität anhand der PARP-Spaltung in Prokaspase-3-transfizierten Zellen sehen, während die Überexpression von XIAP eine reduzierte PARP-Spaltung im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen zur Folge hat.

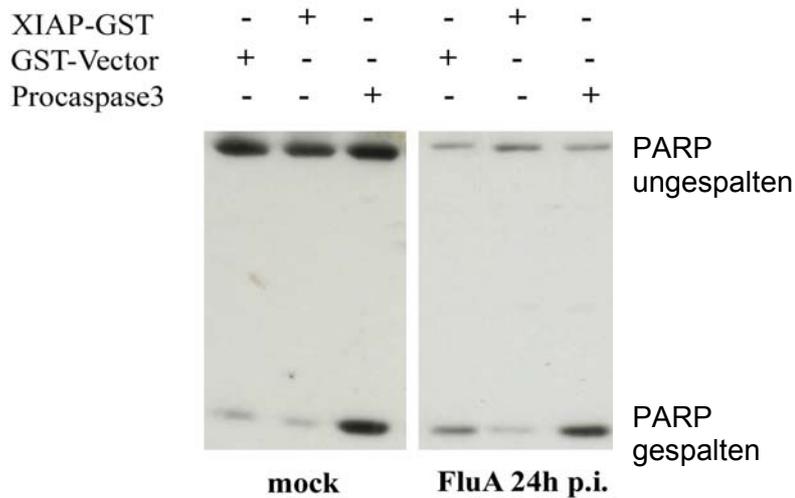


Abb.13.: Überexpression von XIAP und Prokaspase-3.

MDCK-Zellen wurden mit Plasmiden, die für XIAP oder Prokaspase-3 kodieren, transfiziert, über Nacht inkubiert und FPV (MOI=1) oder mock infiziert. 24 h p.i. wurde die Zellen lysiert und die PARP-Spaltung im Western Blot untersucht. Die Überstände wurden Plaque titriert.

Eine densitometrische Analyse des Autoradiogramms anhand der Bandenintensität ergab eine errechnete Zu-/Abnahme der PARP-Spaltbande von 70% bzw. 100%, wie in Abbildung 14a aufgeführt ist. In Abbildung 14b wurde die Virusvermehrung in diesen transfizierten Zellen graphisch dargestellt. Wie man erkennen kann, entspricht der Anstieg beziehungsweise die Abnahme des Virustiters im Verhältnis zur Zu-/Abnahme der Bandenstärke der jeweiligen PARP-Spaltbande.

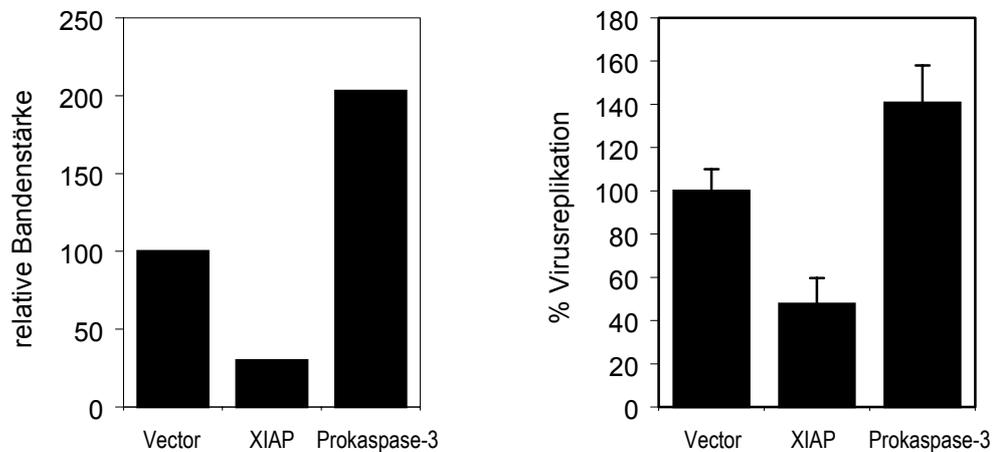


Abb.14.: Wirkung von XIAP und Prokaspase-3.

(a) Densitometrische Auswertung der PARP-Spaltbanden aus Abb.13. Die relative Bandenstärke wurde auf den Vektorwert (100) berechnet. (b) Virusreplikation in den XIAP- und Prokaspase-3-transfizierten MDCK-Zellen.

Die Ergebnisse unterstreichen somit die Inhibitor-daten, die besagen, dass die Inhibition der Apoptose eine Reduktion der neugebildeten Viruspartikel zur Folge hat und umgekehrt, dass vermehrte Apoptose zugleich eine höhere Zahl an neuen Virionen bedeutet. Darüberhinaus engt sich der „Kreis der Verdächtigen“ auf die Kaspasen 3, 7 und 9 ein, die von XIAP inhibiert werden, wobei Kaspase-3 im Blickpunkt steht, da sich bei deren Überexpression ein verstärkender Effekt auf die Replikation ergibt und Kaspase-3 in der Lage ist Kaspase-9 zu aktivieren, die wiederum erst nach eigener Aktivierung Kaspase-7 anschaltet (Faleiro L. et al., 2000; Slee EA. et al., 2001).

Um die Frage zu beantworten, welcher Kaspase nun die Schlüsselrolle für die beobachteten Effekte zukommt, besteht Bedarf an einem Kaspase-3-defizienten Zellsystem.

4.7. Komplementation von MCF-7-Zellen mit Prokaspase-3 führt zu einem massiven Virustiteranstieg

Für die humane Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 wurde gezeigt, dass sie aufgrund einer Deletion im Kaspase-3-Gen keine funktionelle Kaspase-3 besitzt (Kurokawa H. et al., 1999). Diese Zellen stellen für die Fragestellung der Rolle der Kaspase-3 ein ideales Werkzeug dar. Sollte die Kaspase-3 wirklich eine Schlüsselrolle in der Influenza-A-Virus Replikation einnehmen, so sollte die Virusvermehrung in diesen Zellen schlechte Ergebnisse liefern, während im Falle einer Komplementation des Defektes durch Transfektion der Zellen mit dem Prokaspase-3-Plasmid eine Erhöhung der Virustiter zu erwarten wäre.

Abbildung 15 zeigt einen Western Blot, bei dem Lysate aus Vektor und Prokaspase-3-transfizierten Zellen vor und nach Infektion mit FPV aufgetragen wurden. Wie man erkennen kann, wird PARP nur in Anwesenheit von Kaspase-3 gespalten, was die funktionelle Expression des Proteins in diesen Zellen und somit die Kompensierung des Defektes zeigt.

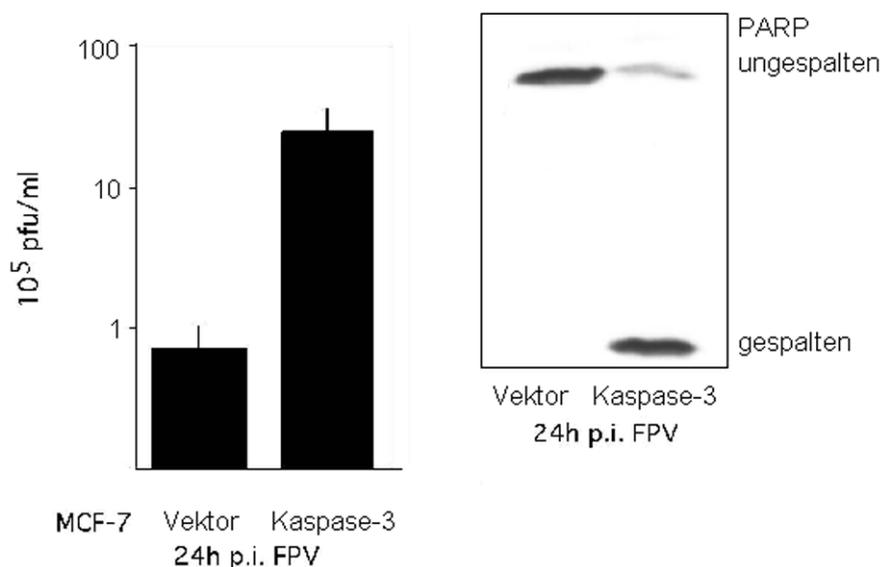


Abb.15.: Kompensation der Kaspase-3-Defizienz in MCF-7-Zellen.

MCF-7-Zellen wurden mit einem Kontrollplasmid oder einem Prokaspase-3-Plasmid transfiziert und am nächsten Tag mit FPV (MOI=1) infiziert. 24 h p.i. wurden die Überstände abgenommen und Plaque titriert, sowie die Zellen lysiert. Spaltung von PARP wurde im Western Blot als Marker für Kaspaseaktivität verwendet.

Die Auswertung der Titer nach Infektion dieser MCF-7 +/- Kaspase-3 Zellen bestätigte die Vermutung einer entscheidenden Rolle von Kaspase-3 für die effiziente Influenza-A-Virusreplikation. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, steigt die Replikation in Anwesenheit von Kaspase-3 um ein 30-faches im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen an. Dies ist ein signifikantes Ergebnis, das zugleich eine weitgehende Eingrenzung auf Kaspase-3-vermittelte Effekte zulässt.

Um die bisher erhobenen Daten zusammenzufassen, scheint die Kaspase-3-vermittelte Apoptose eine provirale Wirkung zu haben und somit vom Virus gewollt zu sein, beziehungsweise sogar aktiv ausgelöst zu werden. Es bleibt zu klären, in welchem Schritt des Replikationszyklus Apoptose nun positiv eingreift ?

4.8. Aktive Kaspase-3 spielt in der späten Phase der Replikation eine wichtige Rolle

Die Frage, die sich nun aufdrängte, war, ob ein früher Kaspase-vermittelter Effekt oder eine späte Aktivierung von Kaspasen zur Unterstützung der Virusfreisetzung für das bisher dargestellte Bild verantwortlich sind. Um diese Frage zu klären, wurden MDCK-Zellen mit FPV infiziert und Kaspase-3-Inhibitor für verschiedene Zeitintervalle dem Medium zugegeben. Nach 24 h wurden die Virustiter bestimmt. Diese Experimente ergaben, dass eine Inhibitor der Kaspase-3 speziell in der späteren Phase des Infektionszykluses starke Auswirkungen auf die Replikation zu haben scheint (Abbildung 16).

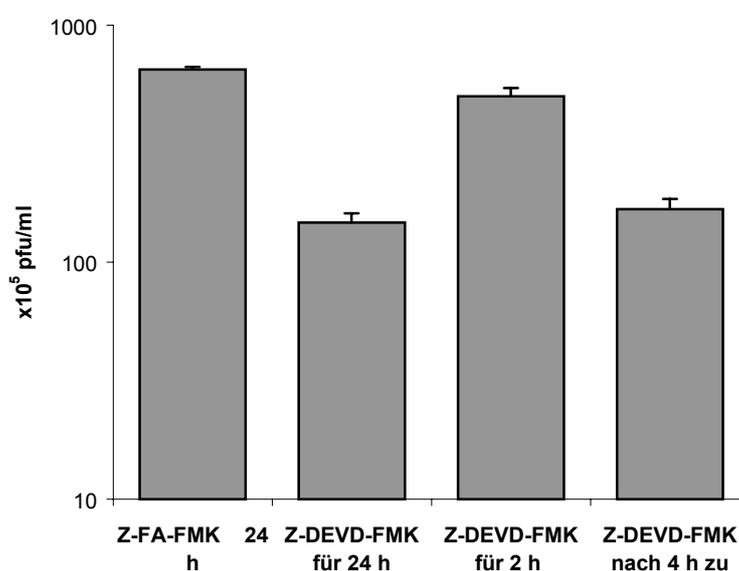


Abb.16.: Zeitabhängiger Einfluss der Kaspase-3-Aktivität auf die FPV-Replikation.

MDCK-Zellen wurden mit FPV (MOI=1) infiziert. Dem Infektionsmedium wurde verschieden lange Kaspase-3-Inhibitor Z-DEVD-FMK oder inaktives Kontrollpeptid Z-FA-FMK (beide 40µM) zugegeben. 24h p.i. wurden die Überstände abgenommen und titriert.

Ein in der späten Phase des Replikationszyklus wichtiges Ereignis ist der Export des viralen Ribonukleoprotein-Komplexes aus dem Zellkern, an die Zellmembran um dort in die sich formenden Virionen verpackt zu werden. Es liegt nahe, dass möglicherweise ein Schritt auf dem Weg der RNPs vom Kern zur Zellmembran Kaspase-3-abhängig sein dürfte.

4.9. Kein Ribonukleoprotein- (RNP) Export ohne aktive Kaspase-3

Der Export des RNP-Komplexes aus dem Zellkern ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu funktionellen, infektiösen Virionen. Der aktive Export der RNPs benützt die Kerntransportmaschinerie. Dabei vermittelt das NS2/NEP den aktiven Export. Kürzlich wurde auch eine Beteiligung des Raf/Mek/Erk-Signalweges am RNP-Export beschrieben. Dabei wurde gezeigt, dass Inhibition von MEK mittels eines spezifischen Inhibitors den RNP-Export aus dem Kern verhindert (Pleschka S. et al., 2001). Der Einfluss von Kaspasen in diesem Zusammenhang wurde bisher jedoch noch nicht untersucht. Man weiß allerdings, dass das Nukleoprotein humaner Influenza-A-Viren am aminoterminalen Ende eine Spaltstelle für Kaspase-3 enthält. Das gespaltene NP wurde allerdings nicht im reifen Viruspartikel gefunden, was den Schluss eines antiviralen Mechanismus nahe legt (Zhirnov O. et al., 1999).

Zur Klärung der Rolle von Kaspase-3-vermittelten Effekten wurden MDCK-Zellen mit FPV infiziert und mit Kaspase-3-Inhibitor im Medium inkubiert. Nach 5 h wurde mittels Immunfärbung gegen den RNP-Komplexbestandteil, das virale Nukleoprotein, die Verteilung der RNPs innerhalb der Zelle untersucht. Überraschenderweise verhielt sich die RNP-Verteilung bei Kaspase-3-Inhibitor-behandelten und MEK-Inhibitor-behandelten Zellen gleich, das heißt, der RNPs lag prädominant im Zellkern vor, während in DMSO- oder Kontrollpeptid-behandelten Zellen ein normaler Kernexport und eine zytoplasmatische Verteilung des NP-Proteins zu sehen war (Abbildung 17).

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Faleiro et al. (2000) wurde diesbezüglich eine interessante Hypothese aufgestellt: Die Kaspasen 3 und 9 werden aktiviert, spalten und aktivieren sich gegenseitig weiter, so dass letztendlich Substrate aus dem Kernporenkomplex von den Kaspasen gespalten und dadurch abgebaut werden. Dies führt laut Faleiro et al. (2000) zu einer Vergrößerung der Kernporen

und erlaubt freie Diffusion größerer Moleküle, welche ansonsten nur über aktiven Transport aus dem Zellkern gelangen. Dies würde bedeuten, dass die RNP-Komplexe frei aus dem Kern ins Zytoplasma diffundieren könnten.

Um nun diese Hypothese zu untermauern, sollte die mögliche freie Diffusion des NP in apoptotischen Zellen untersucht werden.

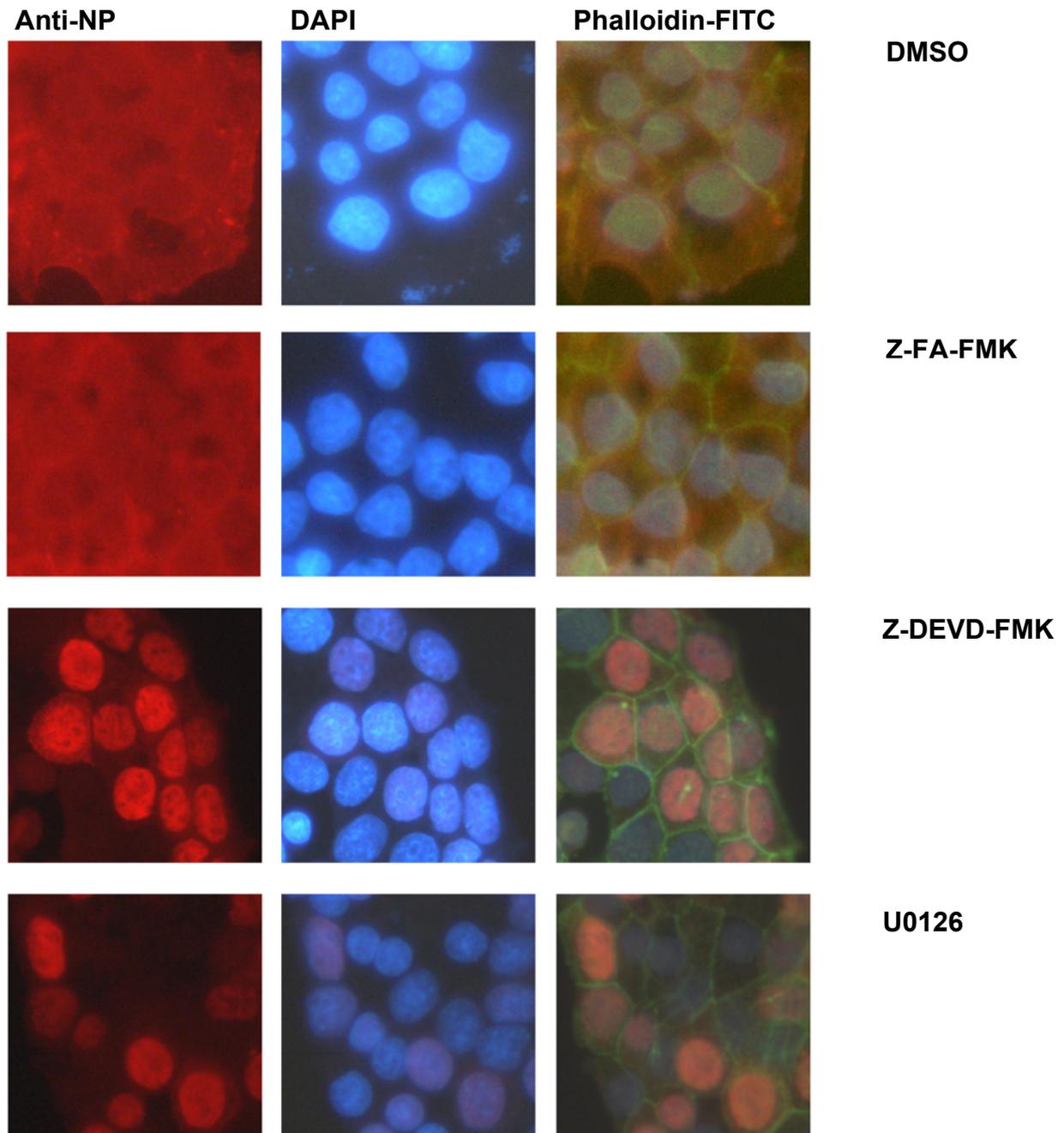


Abb.17.: Inhibition der Kaspase-3-Aktivität verhindert den vRNP-Export.

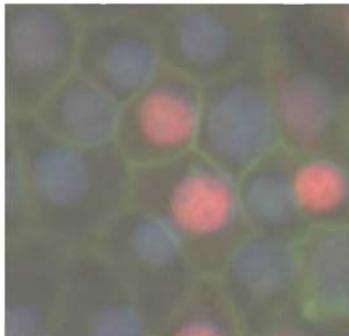
MDCK-Zellen wurden über Nacht auf „chamber slides“ kultiviert und mit FPV (MOI=5) infiziert. Das Infektionsmedium wurde mit DMSO (2%), dem Kontrollpeptid Z-FA-FMK (40µM), dem Kaspase-3-Inhibitor Z-DEVD-FMK (40µM) oder dem MEK-Inhibitor U0126 (40µM) als Positivkontrolle supplementiert. Nach 5 h wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit Azeton permeabilisiert und gegen virales Nukleoprotein, dem Hauptbestandteil der RNPs gefärbt.

4.10. Das virale NP diffundiert nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin aus dem Kern

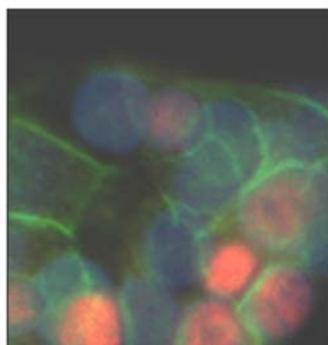
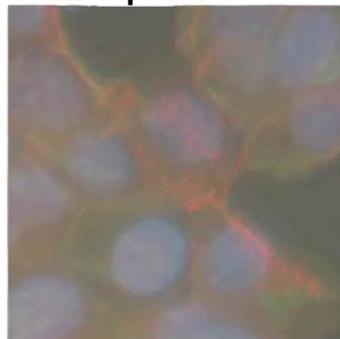
Das NP liegt, bedingt durch sein Kernlokalisierungssignal (NLS) prädominant im Zellkern vor (Davey J. et al., 1985). Erst im RNP-Komplex wird dieses NLS maskiert und der Export aus dem Kern ermöglicht (Neumann G. et al., 1997).

MDCK Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, das für das FPV-NP kodiert. Das NP akkumuliert nach 24 h im Zellkern (Abbildung 18). Nach Induktion von Apoptose durch Zugabe von Staurosporin kann man eine Verteilung des NPs über den Kern hinaus ins Zytoplasma feststellen. Diese Umverteilung ist jedoch durch Zugabe von Kaspase-3-Inhibitor blockierbar, so dass die wichtige Funktion von Kaspase-3 untermauert wird. Zudem wurden die Zellen mit Staurosporin und Leptomycin B, einem Hemmer des aktiven Transportes, inkubiert (Watanabe K. et al., 2001). Die Gabe von Leptomycin B hatte keine Auswirkung auf die Umverteilung des NP aus dem Kern ins Zytoplasma, was die Hypothese einer freien Diffusion unabhängig vom aktiven Transport, ausgelöst durch Abbau von Kernporenproteinen und folglich Vergrößerung der Poren, unterstützt (Abbildung 18).

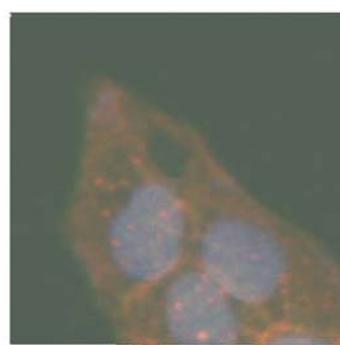
DMSO



Staurosporin



**Staurosporin +
Z-DEVD-FMK**



**Staurosporin +
Leptomycin B**

Abb.18.: Kaspase-abhängige Diffusion des NP aus dem Kern. MDCK-Zellen wurden mit einem NP-Plasmid transfiziert und in Medium mit DMSO (Kontrolle), Staurosporin als Apoptoseinduktor, Staurosporin und Kaspase-3-Inhibitor oder Staurosporin und Leptomycin B inkubiert. Nach 6 h wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit Azeton permeabilisiert und gegen virales NP gefärbt.

Im Hinblick auf frühere Daten zum regulierten RNP-Export (Pleschka S. et al., 2001) drängt sich die Frage auf, ob der Raf/Mek/Erk-Signalweg und der Kaspase-3-abhängige Weg miteinander interferieren ?

4.11. Der Raf/Mek/Erk-Weg und der Kaspase-3-Effekt beeinflussen sich nicht gegenseitig

Um sicher zu sein, dass die Inhibition von MEK und die Inhibition von Kaspase-3, sowie die Inhibitoren, keine Auswirkungen auf den jeweils anderen Signalprozess haben, wurden einerseits ein Western Blot zur Kontrolle der PARP-Spaltung, andererseits ein Kinase-Assay zur Überprüfung der ERK-Aktivierung gemacht. Wie man in Abbildung 19 sehen kann, hat der MEK-Inhibitor U0126 keinerlei Einfluss auf die Aktivierung von Kaspasen und die damit verbundene Spaltung von PARP. Zudem zeigt der Kaspase-3-Inhibitor Z-DEVD-FMK keinerlei Effekte auf die Aktivität von ERK im Kinase-Assay, was den Schluss zulässt, dass es sich um zwei voneinander unabhängige Signalprozesse handelt, die für das Virus das gleiche Ziel, nämlich den Export des viralen RNPs aus dem Kern, haben.

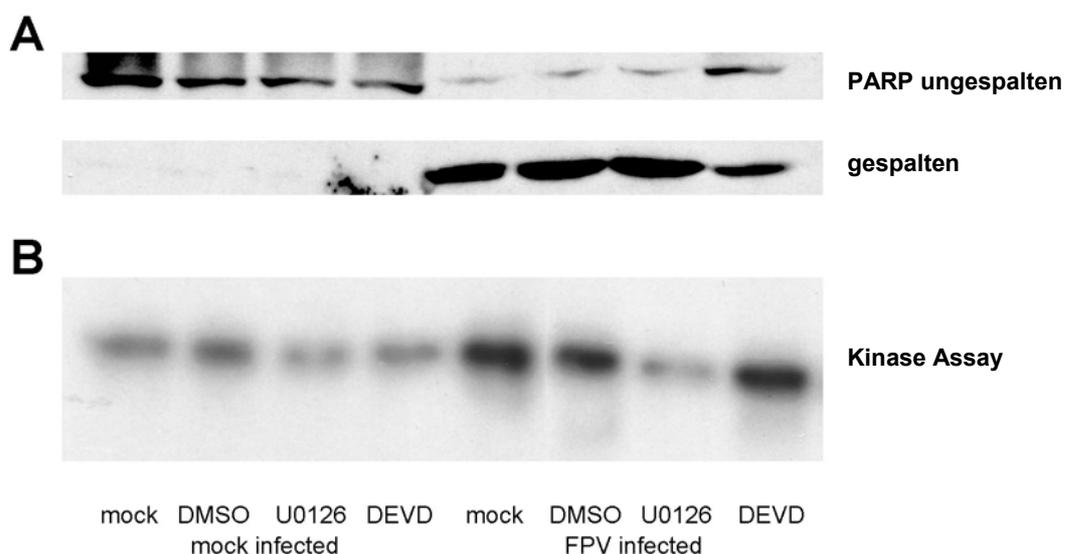


Abb.19.: Keine gegenseitige Beeinflussung von ERK und Kaspase-3.

MDCK-Zellen wurden mock oder mit Inhibitoren für 30 min vorbehandelt, für 60 min mit FPV (MOI=1) infiziert und nach 24 h Inkubation in Infektionsmedium mit Inhibitoren lysiert. Das Lysat wurde im Western Blot auf PARP-Spaltung (A) und im Kinase Assay auf ERK-Aktivität untersucht (B).

Zusammenfassend kann man nun schließen, dass Apoptoseinduktion proviral wirkt, indem Kaspase-3-vermittelte Effekte den aktiven Export durch passive Diffusion unterstützen.

Worin besteht nun die Rolle von NF- κ B in diesem Szenario ?

4.12. Unterschiedlich starke PARP-Spaltung in den A549-Linien

Der NF- κ B-Signalweg wurde wie eingangs beschrieben bisher allgemein als antiapoptotischer Weg angesehen, der nur in einigen wenigen Zusammenhängen proapoptotische Wirkung hat (Barkett M. und Gilmore TD., 1999). Würde dies nun im Umfeld einer Virusinfektion auch zutreffen, so sollte die Apoptoserate in Zellen mit einem intaktem NF- κ B-Signalweg geringer sein als jene in Zellen mit einem negativ regulierten Weg. Wie man nun in Abbildung 20 sehen kann, ist die Grundapoptoserate in allen Linien etwa gleich hoch; es kommt allerdings nach Infektion mit Influenza-A-Viren zu drastischen Unterschieden. In Zellen mit intaktem oder hoch-reguliertem NF- κ B kommt es zu stärkerer PARP-Spaltung und somit vermehrter Apoptose. In den IKK-KD und I κ B- α -Linien hingegen, in denen man eine erhöhte Rate erwarten würde, erkennt man kaum eine vermehrte PARP-Spaltung.

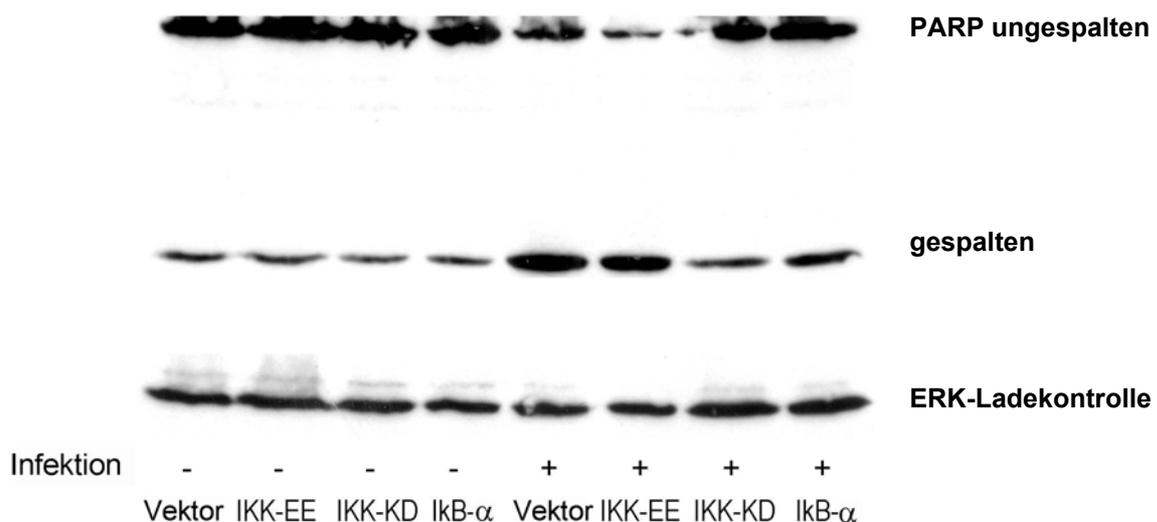


Abb.20.: Unterschiedliche PARP-Spaltung in A549-Zelllinien.

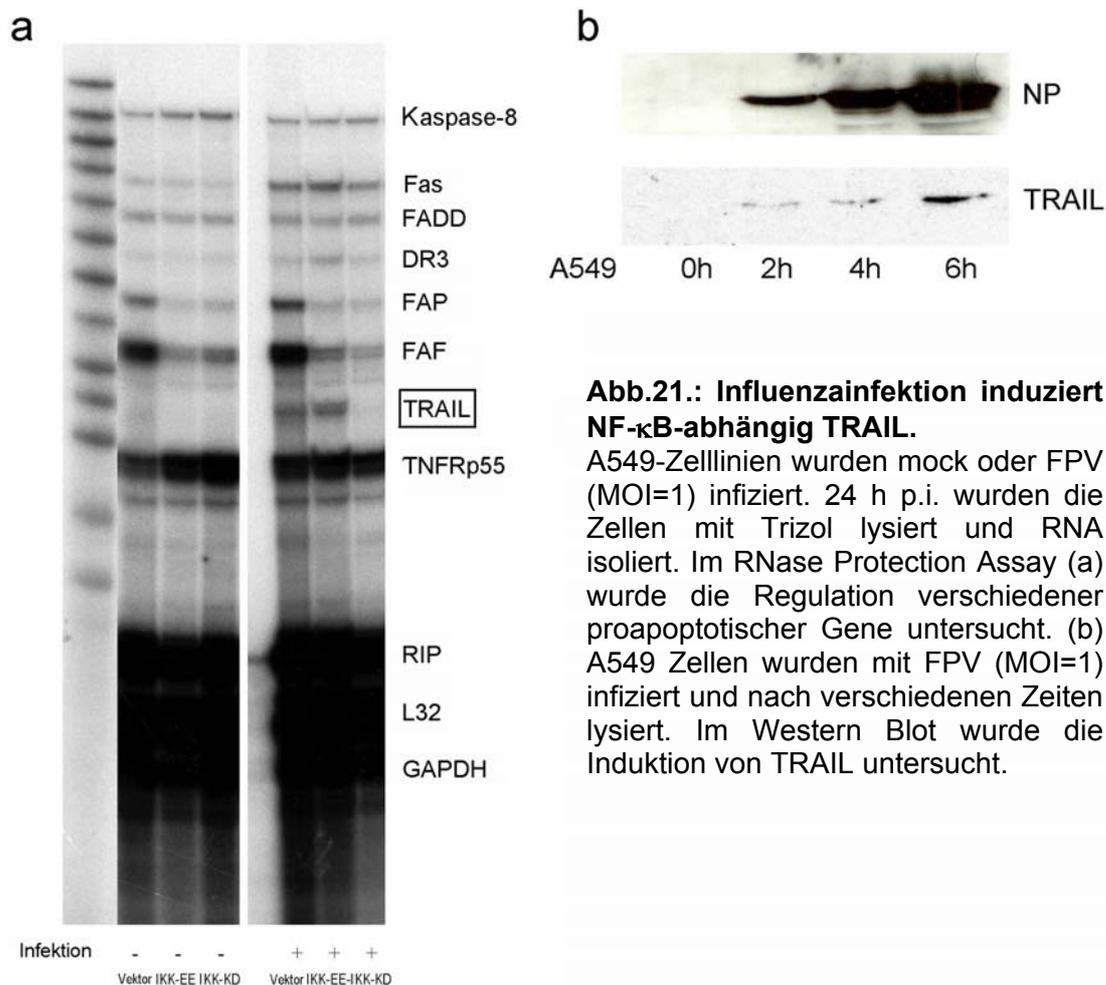
A549-Zelllinien wurden mock oder mit FPV (MOI=1) infiziert. 24 h p.i. wurden die Zellen lysiert und im Western Blot auf PARP-Spaltung untersucht.

Die höhere bzw. reduzierte Apoptoserate läuft gleichsinnig mit dem Anstieg bzw. Abfall der Virustiter in verschiedenen, stabilen Zelllinien mit defektem NF- κ B-Signalweg. Sieht man nun die Befunde hinsichtlich des RNP-Exports in Zusammenhang mit Kaspase-3-Aktivierung, so ergibt sich folgendes Bild:

NF- κ B wirkt proapoptotisch bei Infektion mit Influenzaviren. Apoptoseinduktion verbessert die Replikation durch erhöhte RNP-Export-Rate, was zu höheren Titern führt. Offen bleibt nun die Frage welche(r) Faktor(en) für die proapoptotische Funktion von NF- κ B verantwortlich sind.

4.13. Das proapoptotische Protein TRAIL wird nach Infektion NF- κ B-abhängig reguliert

Zur Identifikation möglicher Proteine, die an der Apoptoseregulation beteiligt sind und durch eine Influenza Infektion dereguliert werden, wurden RNase-Protection-Assays durchgeführt. Mit dieser Methode lässt sich die induzierte Transkription verschiedener Gene auf mRNA-Ebene analysieren. Die Auswertung eines Assays, mit dem die Expression von insgesamt 8 verschiedenen apoptoseregulierenden Genen analysiert wird, ergab, dass nur ein einziges Gen eine eindeutige Regulierung nach Infektion in Abhängigkeit von NF- κ B zu erkennen lies (Abbildung 21a). Bei diesem Protein handelt es sich um das proapoptotische Protein „TNF-ähnlicher Apoptose-induzierender Ligand“ (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL), das nach Bindung an seinen Rezeptor ähnlich dem Fas/FasL-System rezeptorvermittelte Apoptose induziert (Wiley SR. et al., 1995). Im Western Blot in Abbildung 21b sieht man, dass TRAIL auch auf Proteinebene nach Infektion induziert wird. Mittels intrazellulärer FACS-Färbung lässt sich die TRAIL-Induktion nach 8 h ebenfalls deutlich nachweisen. Dies trifft neben FPV auch für den Influenzastamm PR8 und das rekombinante Influenzavirus Δ NS1 zu.



4.14. TRAIL-Rezeptor 1 und 2 werden unabhängig von NF-κB auf A549-Zellen exprimiert

Eine Grundvoraussetzung für eine mögliche Rolle des Faktors TRAIL in der Apoptoseinduktion ist das Vorhandensein der entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 bilden Heterodimere aus, die über eine *death domain* oder „Todesdomäne“ das Todessignal in der Zelle nach Ligandenbindung weiterleiten (zur Übersicht: Srivastava RK., 2001). Wie man aus den FACS-Profilen in Abbildung 22 ersehen kann, sind beide Rezeptoren auf A549-Zellen und den etablierten Linien vorhanden. Ihre Expression variiert zwar leicht, was allerdings ohne erkennbaren Einfluß auf die TRAIL-induzierten Effekte zu sein scheint.

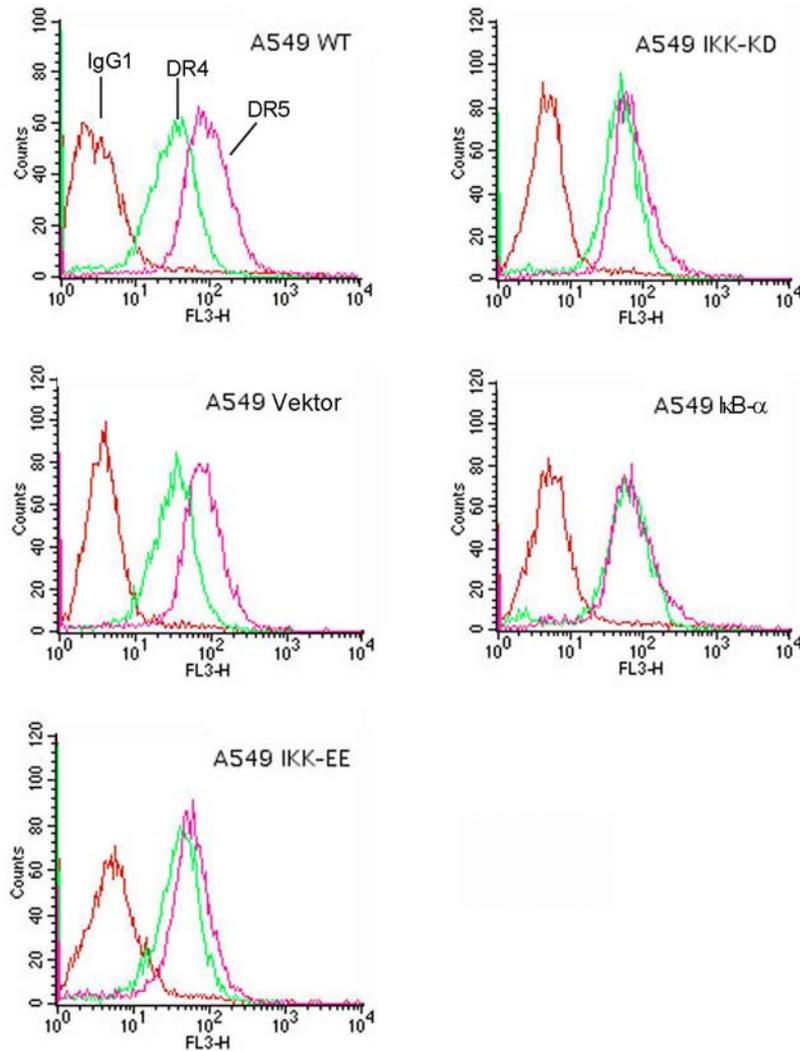


Abb.22.: Die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 sind auf allen A549-Zellen und verschiedenen stabil transduzierten Zelllinien exprimiert.

A549-Zelllinien wurden mit Antikörpern gegen DR4 und DR5 gefärbt. Im FACS wurde die Oberflächenexpression der Rezeptoren überprüft.

4.15. Die TRAIL-Rezeptorexpression wird durch Influenza Virusinfektion nicht verändert

Der Einfluss einer Infektion auf die Expression von Oberflächenrezeptoren wurde für eine Reihe von Viren gezeigt. Das Masernvirus beispielsweise reguliert seine Rezeptoren CD46 und SLAM nach Infektion sehr rasch herunter (Erlenhoefer et al., 2002). Oberflächenrezeptoren wie der *Epidermal Growth Factor* Rezeptor wird nach Bindung an den Liganden internalisiert und später wieder an die Oberfläche zurücktransportiert (Lai WH. et al., 1989).

Ob ein derartiger Regulationsmechanismus für TRAIL-Rezeptoren während einer Influenzainfektion zutrifft, sollte mittels FACS-Färbung untersucht werden. Wie in Abbildung 23 beispielhaft am DR4-Rezeptor zu sehen ist, kommt es über einen Zeitraum von 6 h zu keiner erkennbaren Verschiebung im FACS-Profil, was den Schluss zulässt, dass die Infektion wohl zu keiner Änderung in der Rezeptorexpression führt.

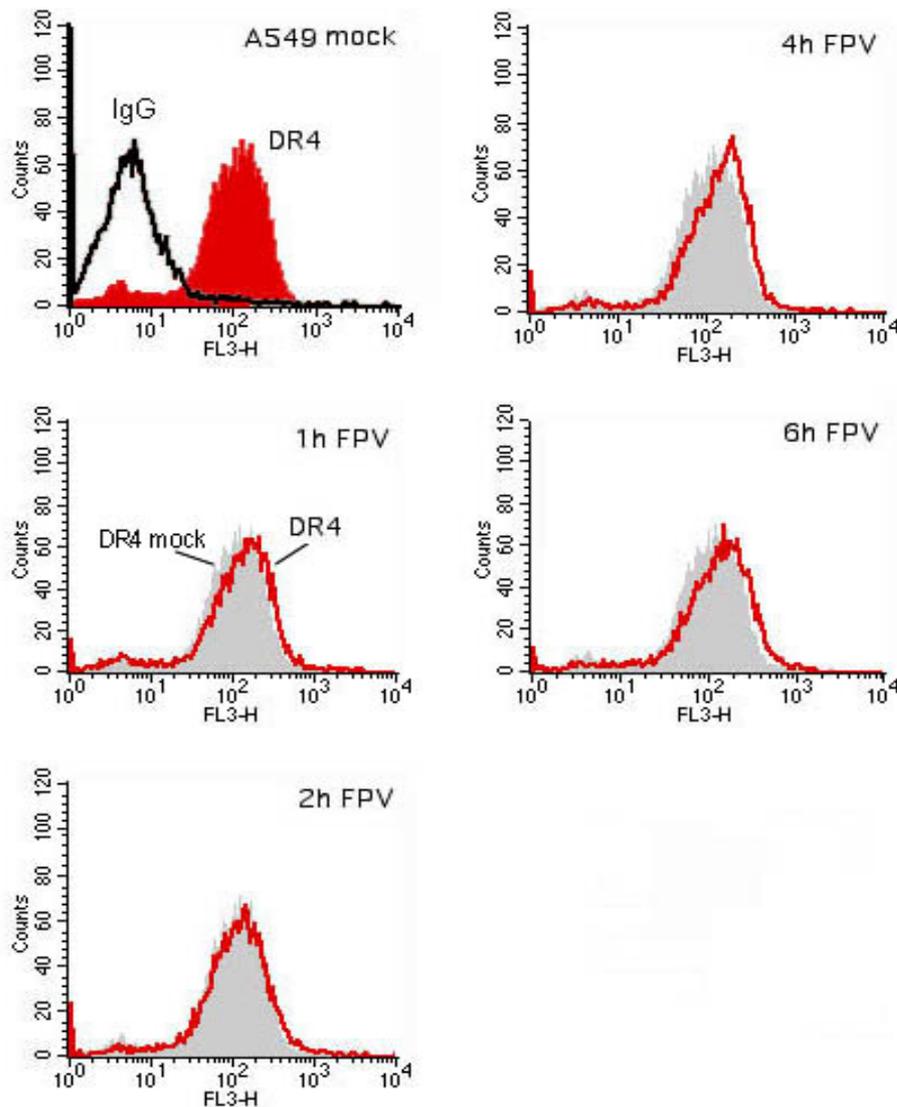


Abb.23.: Expression von TRAIL-Rezeptor 1 (DR4) wird durch Infektion nicht reguliert. A549-Zellen wurden mit FPV (MOI=5) infiziert und inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden die Zellen trypsinisiert und gegen DR4 gefärbt. Im FACS wurden die Färbungen anschließend ausgewertet.

4.16. NF- κ B reguliert die virusinduzierte Expression von TRAIL

Sollte die TRAIL-vermittelte Apoptose nun wirklich eine Rolle spielen, müsste die TRAIL-Expression in den Zellen nach Infektion auch entsprechend unterschiedlich hoch sein.

Eine intrazelluläre FACS-Färbung ergab, dass 8 h nach Infektion die TRAIL-Expression sowohl in den A549-Vektor-Zellen als auch in den IKK-EE Zellen hochreguliert wird, während in den IKK-KD und mut-I κ B- α -Zellen keinerlei Induktion von TRAIL nachweisbar ist (Abbildung 24). Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse

des RNase-Protection-Assays und zeigt eine NF- κ B-abhängige Induktion von TRAIL nach Virusinfektion auf Proteinebene.

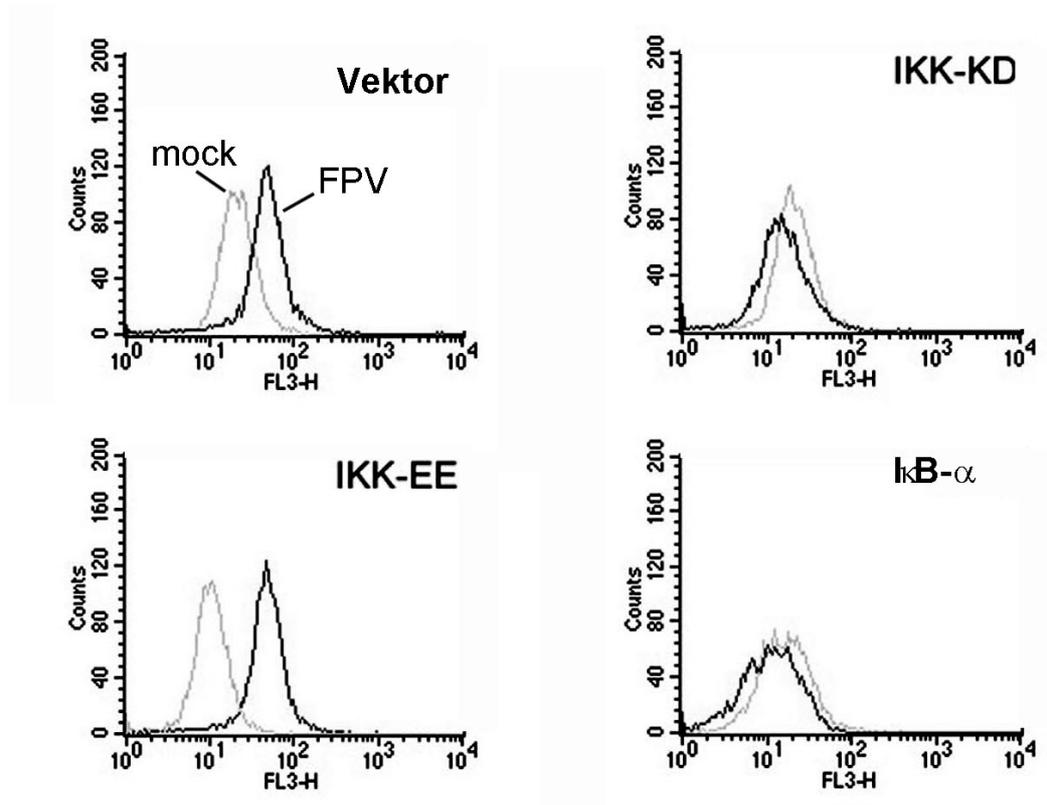


Abb.24.: NF- κ B reguliert die TRAIL-Induktion.

A549-Zelllinien wurden mit FPV (MOI=1) infiziert. Nach 8 h wurde die Expression von TRAIL durch intrazelluläre Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen TRAIL nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte im FACS.

4.17. Titerrückgang durch Zugabe von löslichem TRAIL-R2 ins Infektionsmedium

Der proapoptotische Stimulus, der durch Influenza-induzierte TRAIL-Expression und Sekretion in den Zellen ausgelöst wird, sollte nun mittels Gabe von löslichem rekombinantem TRAIL-R2-Fc (*soluble death receptor 5* (sDR5)) verhindert werden. Handelt es sich bei den Virustiter-Anstiegen um einen TRAIL-induzierten Effekt sollte das mit diesem Ansatz eindeutig auf TRAIL zurückzuführen sein.

In Abbildung 25 sieht man, dass die Replikation nach 9 h und 24 h p.i. durch die Gabe von löslichem TRAIL-R2-Fc gehemmt wird, während der lösliche TNFR2-Fc (sTNFR2), der als Negativkontrolle verwandt wurde, nur minimalen Effekt auf die Virusreplikation zeigt. TNFR2 wurde als Kontrolle ausgewählt, da TNF- α wie TRAIL apoptoseinduzierend wirkt und virusinduziert exprimiert wird. Dieses Ergebnis legt einen direkten Zusammenhang zwischen einer effizienten Virusreplikation und TRAIL-induzierter Apoptose nahe.

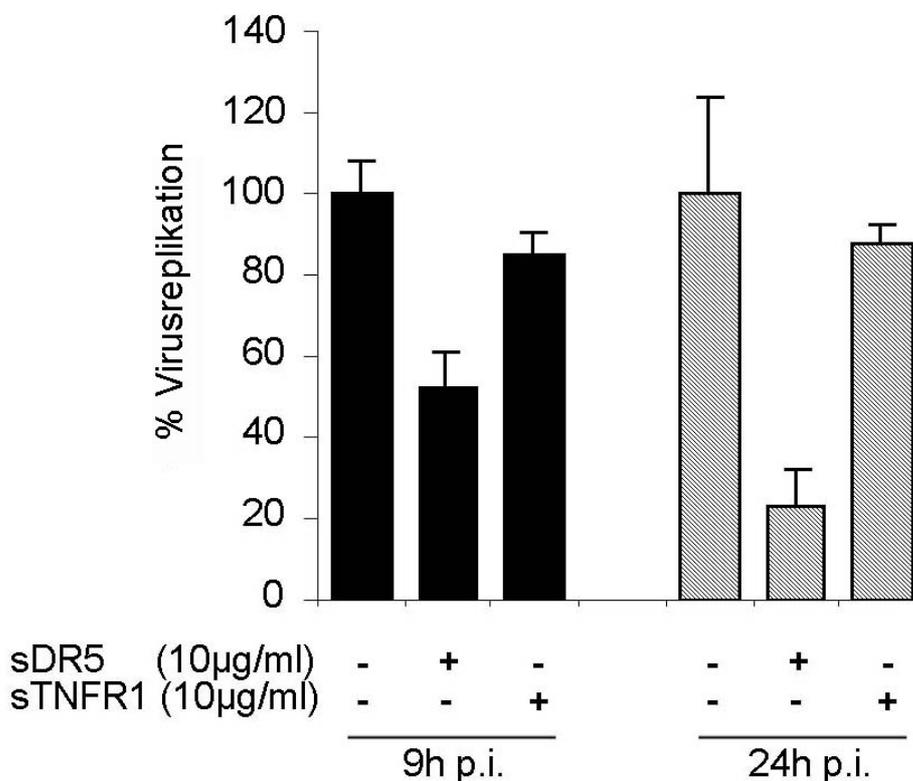


Abb.25.: Zugabe von sDR5 zu Influenza virusinfizierten Zellen führt zum Rückgang der Titer neugebildeter Viren.

A549-Zellen wurden mit FPV (MOI=1) infiziert. Zum Infektionsmedium wurde PBS, sDR5 (10µg/ml) oder sTNFR2 (10µg/ml) zugegeben. Die Überstände wurden 9 h oder 24 h p.i. abgenommen und die Virustiter mittels Plaquetitration auf MDCK-Zellen bestimmt.

4.18. Zugabe von rekombinantem TRAIL führt zu erhöhten Titern in A549-Zellen und kompensiert die NF- κ B-Defizienz

Als zusätzlicher Beleg für eine Rolle von TRAIL in der Influenza-A-Virusvermehrung dient die Zugabe von rekombinantem, humanem TRAIL zum Infektionsmedium bei Infektion der A549-Zelllinien. Ist ein TRAIL-induzierter Apoptoseweg für die unterschiedlich effiziente Virusreplikation in den verschiedenen A549-Zelllinien verantwortlich, so sollte es in Abhängigkeit der zugegebenen TRAIL-Menge zu einem Angleichen der Virustiter kommen.

In Abbildung 26 sieht man klar einen Einfluss der TRAIL-Gabe auf den Virustiter. Während sehr hohe Konzentrationen an TRAIL im Medium zu einem zu raschen Absterben der Zellen und damit zu ineffizienter Virusreplikation in allen Linien führt, zeigt sich bei der Gabe von 10ng/ml zu Vektor, IKK-KD und $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ bzw. 50ng/ml TRAIL zu IKK-EE-Zellen ein Angleichen der Virustiter auf ein annähernd gleiches Niveau. Dies erhärtet die Hypothese, dass TRAIL-induzierte Kaspase-3-vermittelte Apoptose eine wichtige Rolle für eine effiziente Influenza-A-Virusvermehrung spielt.

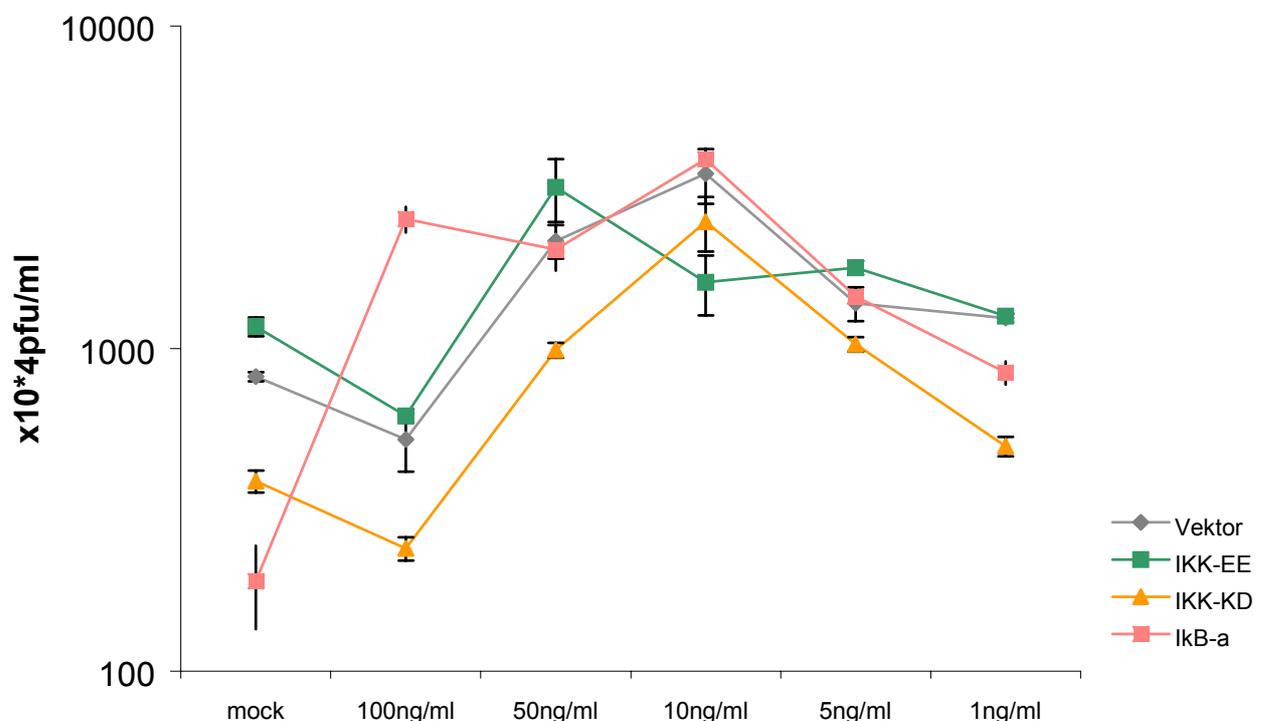


Abb.26.: Zugabe von TRAIL führt zum Angleichen der Titer neugebildeter Viren in infizierten A549-Zellen.

A549-Zelllinien wurden mit FPV (MOI=1) infiziert. 6 h p.i. wurden verschiedene Konzentrationen rekombinantes TRAIL zugegeben. 9 h p.i. (3 h nach TRAIL-Gabe) wurden die Überstände abgenommen und titriert.

5. Diskussion

Die Untersuchung von Virus-induzierten Signalwegen zum besseren Verständnis der Zellantwort und der daraus resultierenden Virusabwehr ist in den letzten Jahren immer mehr in den Blickpunkt der Forschung gerückt. Für das Influenza-A-Virus wurde gezeigt, dass es den JNK-Signalweg aktiviert (Ludwig S. et al., 2001) und dass diese Aktivierung antiviral wirkt. Als Gegenstrategie des Virus wird während der Infektion das NS1-Protein exprimiert, welches die Aktivierung von JNK reprimiert (Ludwig S. et al., 2002). Infektion mit Influenza-A-Viren führt auch zur Aktivierung des Raf/MEK/ERK-Signalweges (Pleschka S. et al., 2001). Dieser Signalweg ist im Gegensatz zum antiviral wirkenden JNK-Signalweg essentiell für die Virusreplikation, da eine Inaktivierung von Erk zum Erliegen des viralen RNP-Exportes aus dem Zellkern führt und somit eine effiziente Bildung von Viruspartikeln verhindert (Pleschka S. et al., 2001). Der Interferon-Regulatorische-Faktor 3 (IRF-3) wird durch Influenza-A-Viren über Aktivierung der GTPase Rho induziert und wirkt antiviral (Ehrhardt C., Doktorarbeit 2002).

In dieser Arbeit wurde nun ein weiterer virusinduzierter Signalweg, der IKK-NF- κ B-Signalweg, auf seine Funktion in der Zelle untersucht. NF- κ B reguliert im Zusammenhang mit einer Virusinfektion einerseits die Expression von Zytokinen (Pahl H.L., 1999; Knobil K. et al., 1998), andererseits die Aktivierung des apoptotischen Zelltodes (Baichwal V.R. und Baeuerle P.A., 1997; Barkett und Gilmore, 1999). Die Aktivierung von NF- κ B während einer Influenzavirus Infektion wurde bereits hinreichend dokumentiert (Pahl H.L. und Baeuerle P.A., 1995; Flory E. et al., 2000; Knobil K. et al., 1998). Die Funktion des Faktors in der infizierten Zelle ist dagegen weitgehend unklar.

Um diese Frage zu adressieren wurden verschiedene Zelllinien mittels Retroviren hergestellt, die Konstrukte tragen, welche entweder positiv oder negativ mit dem NF- κ B-Signalweg interferieren. Die Kontrollexperimente (Luciferase-Reporter-Assay und κ B- α -Degradation) bestätigten die funktionelle Expression dieser Transgene. Die Infektion der verschiedenen Zelllinien mit Influenza-A-Viren ergab einen überraschenden Befund. Eine höhere NF- κ B-Aktivierung in den IKK-EE-Zellen aller Linien (A549, MDCK und Vero) und somit eine höhere Expression an antiviralen

Zytokinen, besonders IFN β , sollte zu einem geringeren Virustiter als in Kontrollzellen führen, während in den negativ regulierten Zellen (IKK-KD und I κ B- α) ein Titeranstieg der neugebildeten Viren zu erwarten gewesen wäre. Die Replikationskurven allerdings zeigten genau das Gegenteil. Man beobachtete höhere Titer in IKK-EE-Zellen, und signifikant niedrigere Titer in IKK-KD- und I κ B- α -Zellen. Aufgrund der Befunde aus Vero-Zellen, die kein intaktes Typ-I-Interferonsystem besitzen (Diaz M.O. et al., 1988) kann man eine Beteiligung eines der wichtigsten NF- κ B-regulierten antiviralen Zytokine, IFN β an den beobachteten Effekten ausschließen. Eine Untersuchung der Kulturüberstände auf Expression von TNF- α blieb erfolglos, was den Einfluss dieses weiteren antiviralen wirkenden Zytokins ausschließt (Lehmann C. et al., 1996). Zusammenfassend bleibt an dieser Stelle festzustellen, dass ein NF- κ B-abhängiger, Zytokin-unabhängiger Effekt für den Einfluss auf die Virusreplikation verantwortlich ist.

Neben dem Einfluss auf die Zytokinexpression reguliert NF- κ B, wie bereits oben erwähnt, die Apoptose. Die Induktion der Apoptose während einer Influenza-A-Virusinfektion war bereits Gegenstand vieler Untersuchungen (Chen W. et al., 2001; Lin C. et al., 2001; Nichols JE. et al., 2001). Es war also wenig überraschend, auch in dem in dieser Arbeit genutztem System Induktion von Apoptose festzustellen (Abb. 9). Auch hier konnte aufgrund der Befunde mit Vero-Zellen kein Einfluss von Typ-I-Interferon festgestellt werden. In einer früheren Arbeit von Balachandran et al. (Balachandran S. et al., 2000) wurde gezeigt, dass Typ-I-Interferone die Influenza-A-Virus-vermittelte Apoptose in Mausfibroblasten verstärken. Diese Verstärkung sollte über den FADD/Kaspase-8-Signalweg vermittelt werden. In den hier verwendeten Zelllinien, die alle epithelialen Ursprungs sind, konnten diese Befunde allerdings nicht bestätigt werden. Die Tatsache, dass für diese Arbeit Zellen aus drei verschiedenen Spezies (Mensch, Hund und Meerkatze) verwendet wurden, darunter eine natürliche Typ-I-IFN-knock-out Linie (Vero), zusammen mit dem Befund, dass im RNase-Protection-Assay keine erhöhte Expression von Kaspase-8 nach Infektion zu erkennen war, unterstützen die hier erhobenen Daten, die keine prominente Beteiligung des IFN-Signalweges erkennen lassen. Darüber hinaus sollte erwähnt werden, dass Mausfibroblasten keine idealen Wirtszellen für das Influenza-A-Virus darstellen.

Apoptose wurde bisher immer als eine Wirtsabwehrreaktion auf die Infektion mit dem Influenza-A-Virus gewertet (Watanabe Y. et al., 2002; Mori I. et al., 2002), die eine Verbreitung des Virus verhindern sollte. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Unterdrückung der Apoptose durch Gabe eines spezifischen Kaspase-3-Inhibitors und eines weiteren relativ unspezifischen Kaspaseinhibitors zum Infektionsmedium in einer dosisabhängigen Reduktion des Virustiters führte, was eine wichtige Funktion der Apoptose für eine effiziente Virusreplikation zeigt. Wie das Virus allerdings Apoptose induziert, ist nicht eindeutig zuzuordnen, da es viele verschiedene mögliche Ansätze dafür gibt. Von Schultz-Cherry et al. wurde gezeigt, dass das NS1-Protein in der späten Phase der Infektion proapoptotisch wirkt (Schultz-Cherry S. et al., 2001), während eine andere Arbeit dem Protein antiapoptotische Wirkung zuschreibt (Zhirnov O.P. et al., 2002). Lin C. et al. sehen wiederum in der Aktivierung des JNK-Signalweges den fraglichen Apoptoseauslöser (Lin C. et al., 2001). In weiteren Arbeiten von Morris S.J. et al. wird die Neuraminidase für die Apoptoseinduktion verantwortlich gemacht (Morris S.J. et al., 1999). Zusammenfassend kann man sagen, dass all diese Arbeiten zeigen, dass Apoptose induziert wird. Das „wie“ und „warum“ jedoch ist sehr breit gefasst. In der vorliegenden Arbeit wurde nun gezeigt, dass die Überexpression des proapoptotischen Proteins Prokaspase-3 und des antiapoptotischen Proteins XIAP die Virusproduktion positiv bzw. negativ beeinflussen (Abb.14) und dadurch die Ergebnisse mit den Kaspaseinhibitoren untermauern. All diese Befunde engen auch die Schlüsselfunktion in der Influenza-vermittelten Apoptose auf Kaspase-3 ein, da XIAP hauptsächlich Kaspase-3 inhibiert (Deveraux Q.L. et al., 1997). Breitbandinhibition hingegen, verglichen mit der Inhibition von Kaspase-3, keine stärkeren Effekte (Abb.13). Die Überexpression von Prokaspase-3 in MCF-7-Zellen, die eine natürliche Kaspase-3-Defizienz aufweisen, hat eine 30-fache Erhöhung der Virustiter zur Folge (Abb.15). Durch Gabe von Kaspase-3-Inhibitor zu verschiedenen Zeiten nach Infektion konnte gezeigt werden, dass Kaspase-3 eine wichtige Rolle in der späten Phase der Infektion (ab 5h) zu spielen scheint. Dies wird durch neuere Erkenntnisse unterstützt, die zeigen, dass das proapoptotische PB-1F2-Protein (Chen W. et al., 2001) erst in der späten Phase der Infektion gebildet wird. Von anderen wurde gezeigt, dass die Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2, die Virusreplikation unterdrückt (Olsen CW. et al., 1996). Interessanterweise fanden die Autoren heraus, dass nach Überexpression von Bcl-2 die viralen RNPs im

Kern der Zellen zurückgehalten werden und nicht exportiert werden können (Hinshaw VS. et al., 1994). Dies konnte nach Inhibition der Apoptoseinduktion auf verschiedene Weisen von uns ebenfalls beobachtet werden (Abb.17). Die Inhibition von Kaspase-3 führt zu einer Unterdrückung des RNP-Exports aus dem Zellkern, ähnlich der Effekte, die man bei Inhibition des Raf/MEK/ERK-Signalweges beobachtet (Abb.17; Pleschka S. et al., 2001). Wird das NP alleine in Zellen exprimiert, so liegt es ausschließlich im Zellkern vor (Abb.18.; Neumann G. et al., 1997). Die Induktion von Apoptose durch Zugabe von Staurosporin führte dazu, dass das NP auch im Zytoplasma der Zelle zu finden war. Dabei handelte es sich um einen Kaspase-abhängigen Prozess, der durch Zugabe eines Kaspase-3-Inhibitors verhindert werden konnte. Darüber hinaus scheint dieser Export einem aktiven Transportprozess zu unterliegen, da die Zugabe von Leptomycin B, einem Inhibitor der Kernexportmaschinerie (Kai M. et al., 2001) auf die Staurosporin-induzierte NP-Verteilung keinen Effekt zeigte. In einer Arbeit von Faleiro und Lazebnik wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Kaspasen zu einem Abbau von Proteinen führt, die am Aufbau des Kernporenkomplexes beteiligt sind, und deren Spaltung eine Vergrößerung der Kernporen und damit verbunden eine erhöhte freie Diffusion von Proteinen aus dem Zellkern zur Folge hat (Faleiro L. und Lazebnik Y., 2000).

Dies könnte im Kontext einer Influenza-A-Replikation ebenfalls der Fall sein. Das Virus infiziert die Zelle. Die Zelle reagiert mit einer apoptotischen Antwort. Das Virus nützt diesen zellulären Abwehrmechanismus um seine Vermehrung zu optimieren. Es scheint hier zu einem strukturierten Mechanismus zu kommen. Zuerst wird der Raf/MEK/ERK-Signalweg für einen optimalen aktiven RNP-Export verwendet. Sobald die Zelle das Apoptoseprogramm gestartet und die Kaspasen aktiviert hat, führt die Kaspase-induzierte Vergrößerung der Kernporen und damit die freie Diffusion der RNPs aus dem Kern zu einer höchst möglichen Virusproduktionsrate.

Es liegt sehr nahe, dass ein NF- κ B-abhängiges, proapoptotisches Protein für diese beobachteten „Effekte“ verantwortlich sein muss und dieses Protein ist TRAIL. Wie schon für andere Viren gezeigt wurde (Mundt B. et al., 2003) werden TRAIL und der TRAIL-Rezeptor während der Infektion hochreguliert. Dabei wurde vermutet, dass es sich um einen antiviralen Mechanismus handelt, um infizierte Zellen, oder Zellen des Immunsystems selektiv abzutöten. Aus den RNase-Protection-Assays, dem Protein-Blot und den intrazellulären FACS-Färbungen ergeben sich eindeutige Beweise für die TRAIL-Induktion in Influenzavirus-infizierten Zellen (Abb.21 und Abb.24). Eine

Regulation der Rezeptoren während der Infektion konnte hingegen nicht festgestellt werden (Abb.23), was jedoch kaum von Belangen sein dürfte, da beide Rezeptoren in jedem Fall auf allen A549-Zelllinien vorhanden sind (Abb.22).

Durch Zugabe von löslichem TRAIL-R2 konnte gezeigt werden, dass die neu gebildeten Viren abnehmen, was beweist, dass TRAIL Einfluss auf die Virusvermehrung hat, während die Gabe eines löslichen TNF-R als Kontrolle lediglich minimale Effekte zeigte (Abb.25). Die Wiederherstellung der phänotypischen Verhaltens der Virusreplikation in A549-Zellen mit negativ reguliertem NF- κ B-Signalweg durch Zugabe von rekombinantem TRAIL bringt den endgültigen Beweis einer Beteiligung von TRAIL an den Einflüssen auf die Virusvermehrung in den verschiedenen Zelllinien. Die Zugabe von TRAIL, ein sehr potenter Apoptoseauslöser, führt wahrscheinlich zum Angleichen der Apoptoseraten in NF- κ B hoch- und herunterregulierten A549-Zelllinien und damit zu einer Angleichung der Effizienz der Virionenproduktion in den infizierten Zellen.

All diese Befunde ergeben eine interessante Hypothese, die eine neue Replikationsstrategie eines Virus aufzeigt. Das Influenza-A-Virus nutzt zelluläre Abwehrreaktionen für die Optimierung der eigenen Replikation aus.

Das Virus infiziert die Zelle und beginnt mit der Replikation des viralen Genoms und der Bildung viraler Proteine. Die Bindung des NS1-Proteins an dsRNA sorgt dafür, dass zelluläre „Überwachungsproteine“ die dsRNA nicht erkennen und somit keine antiviralen Schritte einleiten können. Trotzdem kann es sein, dass dsRNA in geringen Mengen nicht ausreichend von NS1-Protein gebunden wird und es so zur Aktivierung der RNA-abhängigen Proteinkinase PKR kommt bzw. virale Proteine Mechanismen induzieren. Diese Virusprotein-induzierten Mechanismen bewirken eine Aktivierung, sowohl des antiapoptotischen Raf/MEK/ERK-Signalweges, als auch des NF- κ B-Signalweges, der in diesem Zusammenhang wohl eine proapoptotische Funktion hat. Die NF- κ B-abhängige Induktion von TRAIL führt zum Auslösen eines Todessignals, gefolgt von einer Aktivierung der Kaspasen. Diese Kaspasen, allen voran Kaspase-3, führen zum Abbau von Kernporenproteinen und damit zu einer Vergrößerung der Kernporen. Diese Kernporen lassen nun die freie, vom aktiven Transport unabhängige Diffusion der viralen RNPs zu. Mit beginnender Kaspaseaktivität kommt möglicherweise die Wirkung des Raf/MEK/ERK-Signalweges und des damit zusammenhängenden aktiven Transportes zum

Erliegen, so dass ein Ausweichen auf einen unabhängigen, passiven Mechanismus die beste Strategie für eine effiziente Virusausbeute zu sein scheint.

In der frühen Phase der Replikation ist der aktive Transport unter Beteiligung des Raf/MEK/ERK-Signalweges die beste Lösung, da frühe Apoptoseinduktion eher kontraproduktiv wäre. In der späten Phase allerdings, wenn die Zelle bereits schwer geschädigt ist, und der Zelltod kurz bevor steht, sichert die passive Diffusion eine bestmögliche Virusausbeute, sodass man von einem fließenden Übergang der Mechanismen ausgehen kann.

Abschließend kann man sagen, dass NF- κ B im Falle einer Influenza-A-Virus Infektion proviral und proapoptotisch wirkt und, dass die Apoptose bzw. die Kaspaseaktivität für einen effizienten RNP-Export aus dem Kern und hohe Virusproduktionsraten von großer Bedeutung ist.

Die Aufklärung dieses, für das Virus essentiellen Mechanismus, gibt auch begründete Hoffnung zu neuen antiviralen Behandlungsmöglichkeiten. Erste Tierversuche mit Kaspase-3-Inhibitor, die im Labor von Oliver Planz an der BFAV in Tübingen durchgeführt wurden, blieben leider ohne signifikantes Ergebnis. Dies lässt sich dadurch erklären, dass der Kaspase-3-Inhibitor nur in DMSO löslich ist und die erwarteten Effekte durch die toxische Wirkung von DMSO auf die Mäuse überlagert wurden. Somit konnte nicht genau unterschieden werden, ob DMSO oder der Kaspase-3-Inhibitor die Virusreplikation nachhaltig beeinflusst haben.

Ein weitaus vielversprechender Ansatz ist die Verwendung von L-Acetylsalicylsäure (ASS), bekannt als Aspirin (Fa. Bayer). In einer früheren Arbeit von Huang und Dietsch wurde bereits ein sehr eindrucksvoller Effekt von Aspirin auf die Influenza-A-Virusreplikation in Zellkultur gezeigt (Huang RT. und Dietsch E., 1988), allerdings wurden diese Daten weder im Tiermodell weiteruntersucht noch mechanistisch in anderen Publikationen näher ausgeführt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Aspirin zum Infektionsmedium die Virustiter um mehr als 99% reduziert, wobei sich eine Konzentration von 5mM Aspirin im Medium als optimal gezeigt hat. Damals konnte man allerdings den Effekt von Aspirin nicht mechanistisch erklären. Heute ist bekannt, dass Aspirin ein sehr spezifischer Inhibitor der I κ B-Kinase 2 (IKK β) ist (Yin MJ. et al., 1998). Die Inhibition von IKK2 und des NF- κ B-Signalweges wurde in dieser Arbeit, wie beschrieben auf andere Weise durchgeführt und ergibt interessanterweise eben diese Effekte auf die Replikation

von Influenza-A-Viren. In eigenen Experimenten, die hier nicht erwähnt sind, wurden die Aspirin-Experimente von Huang und Dietsch wiederholt und die Effekte bestätigt. Dies führte zu einer Serie von Tierexperimenten, gemeinsam mit und im Labor von Oliver Planz. Für diese Experimente wurden Mäusen in Gruppen verschieden hohe Dosen Aspirin appliziert. Die ersten Ergebnisse sind sehr vielversprechend. Alle Mäuse der Kontrollgruppe starben innerhalb der Versuchsdauer von 10 Tagen, während die Überlebensrate nach Aspirinbehandlung, je nach verabreichter Aspirindosis, 40 bis 60% beträgt. Diese Befunde geben Anlass zur Hoffnung, dass ein gut etabliertes, weltweit zugelassenes Medikament, von dem man weiß, dass es kaum unerwünschte Nebenwirkungen hat ohne Bedenken auch an Kinder verabreicht werden kann, ein gut wirksames anti-Influenza-Präparat sein könnte. Interessanterweise findet sich im Beipackzettel von Aspirin der Vermerk: "Nicht bei schwerer Virusgrippe verwenden". Auf eine Anfrage via E-Mail kam es seitens der Fa.Bayer zu keinerlei Stellungnahme.

Die Tierexperimente mit Aspirin sollen in Zukunft weiter ausgeweitet werden, so dass die genaue Wirkungsweise von Aspirin auch im Tiermodell geklärt wird. Es soll dabei die inhibierende Wirkung von Aspirin auf den NF- κ B-Signalweg im Lungengewebe von Mäusen nach Gabe von Aspirin mittels eines Beatmungsgerätes (gen. Nebulizer; O.Planz, BFAV Tübingen) untersucht werden. Dies würde die Rolle des NF- κ B-Signalweges für eine Influenza-A-Virusinfektion *in vivo* zeigen und dadurch, den in dieser Arbeit erhobenen Daten und der Hypothese über den zugrundeliegenden Mechanismus, weiteres Gewicht verleihen.

Zusammenfassend bildet diese Arbeit eine überaus wichtige Grundlage, sowohl für die Entwicklung neuer antiviraler Strategien (Aspirin), die das Virus vernichtend treffen, ohne dem Organismus zu großen Schaden zuzufügen, als auch für das Verständnis der molekularen Mechanismen, die diesen Behandlungsmöglichkeiten zugrunde liegen:

- (1) Die Rolle der Apoptose für das Virus auf molekularer Ebene, deren Funktion als pro- oder antiviral lange umstritten war, wurde geklärt.
- (2) Mit der Rolle von TRAIL in diesem Zusammenhang wurde ein völlig neuer Spieler in diesem Tauziehen zwischen Wirt und Virus identifiziert.
- (3) Die Identifizierung einer proviralen, proapoptotischen Funktion von NF- κ B war ebenfalls überaus überraschend und bildet durch das Vorhandensein des selektiven

Inhibitors Aspirin die Grundlage einer neuen Behandlungsmöglichkeit bei Influenza-A-Virusinfektionen.

6. Zusammenfassung

Die Aktivierung von Transkriptionsfaktors NF- κ B ist ein Charakteristikum viraler Infektionen, einschließlich der Infektion durch Influenza-A-Viren (Hiscott J. et al., 2001). Da die Expression vieler proinflammatorischer und antiviraler Zytokine, wie IFN β oder TNF- α durch NF- κ B kontrolliert wird, hat sich ein Konzept entwickelt, welches besagt, dass NF- κ B und sein übergeordneter Aktivator IKK wichtige Bestandteile der angeborenen, antiviralen Immunität im Kontext einer Infektion mit RNA-Viren sind (Chu WM. Et al., 1999). Im Gegensatz zu dieser weithin akzeptierten Ansicht, wurde in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Aktivierung von NF- κ B für eine effiziente Influenzareplikation von großer Wichtigkeit ist. Auf einer molekularen Ebene wurde dies durch die NF- κ B-abhängige virale Aktivierung des proapoptotischen Faktors TRAIL gezeigt, welcher die Virusvermehrung sowohl auto- als auch parakrin erhöht. Somit kann man sagen, dass NF- κ B im Kontext einer Influenza-A-Virusinfektion sowohl proapoptotisch als auch proviral wirkt.

Die Induktion der Apoptose ist ein weiteres, charakteristisches Merkmal, das man im Zusammenhang mit Virusinfektionen beobachten kann. Da die Rolle der Apoptose während einer Influenza-A-Virusinfektion noch unklar war, wurde diese Frage adressiert. Dabei wurde versucht mit einem wichtigen, virus-induzierten Apoptose-Effektor, nämlich Kaspase-3 zu interferieren. Überraschenderweise wurde die Influenzavermehrung in Anwesenheit eines Kaspase-3-Inhibitors stark negativ beeinflusst. Im Einklang mit diesem Befund konnte gezeigt werden, dass die Virustiter in Zellen, in denen XIAP überexprimiert wurde, rückläufig waren. Gegengleich führte Überexpression von Prokaspase-3 zu einem Titeranstieg. Mechanistisch scheint der Blockade der Virusvermehrung eine Retention der viralen RNP-Komplexe im Zellkern zu Grunde zu liegen, die die Bildung von reifen Viruspartikel verhindert. Die Erklärung dürfte in der Aktivität von Kaspase-3 zu finden sein, die an dem Abbau von Kernporenkomplexproteinen in apoptotischen Zellen beteiligt ist und was in Folge die freie Diffusion viraler RNPs ermöglichen dürfte.

Abschließend entwickelte sich aufgrund der vorliegenden Arbeit eine neue Hypothese über die Rolle des IKK-NF- κ B-Signalweges, seinen Einfluss auf die Apoptoseregulation in Influenza-infizierten Zellen und der Auswirkung auf das Virus.

7. Summary

Activation of the transcription factor NF- κ B is a hallmark of infections by viral pathogens including influenza-A-viruses (Hiscott J. et al., 2001). Since gene expression of many proinflammatory and antiviral cytokines, such as IFN β or TNF- α is controlled by NF- κ B the concept emerged that NF- κ B and its upstream regulator IKK are essential components of the innate antiviral immune response to infections with RNA viruses (Chu WM. et al., 1999). In contrast to this common view this work presents data that for efficient influenza virus production NF- κ B activity is required. On a molecular level this is due to NF- κ B-dependent viral induction of the proapoptotic factor TRAIL which enhances virus propagation in an auto- and paracrine fashion. Thus, NF- κ B acts both proapoptotic and proviral in the context of an influenza virus infection.

Induction of apoptosis is a hallmark observed upon infection with many viral pathogens, including influenza-A-virus. Since the consequences of apoptosis induction for the outcome of an influenza virus infection are not clear, we have addressed this issue by interfering with the function of a major virus-induced apoptosis effector, caspase-3. Surprisingly, influenza virus propagation was strongly impaired in the presence of a caspase-3 inhibitor in cultures cells. Consistent with these findings, virus yields are reduced in cells expressing XIAP and enhanced when procaspase-3 is overexpressed. Mechanistically, the block in virus propagation appears to be due to retention of the viral RNP complexes in the nucleus preventing formation of progeny virus particles. An explanation might given by an effect of caspase-3, which is involved in cleavage of protein of the nuclear pore complex in cells undergoing apoptosis, which results in fusion of the pores and might thus allow free diffusion of viral RNA complexes.

Finally, this work presented here led to a new hypothesis concerning the role of the IKK-NF- κ B-pathway, its influence on the regulation of apoptosis in influenza infected cells and the outcome for the virus.

8. Literaturverzeichnis

- Alcamo, E., Mizgerd, J.P., Horwitz, B.H., Bronson, R., Beg, A.A., Scott, M., Doerschuk, C.M., Hynes, R.O. and Baltimore, D. (2001) Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappa B in leukocyte recruitment. *J Immunol*, **167**, 1592-1600.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281**, 1305-1308.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 255-260.
- Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I.L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokh, Z. and Schwall, R.H. (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*, **104**, 155-162.
- Avalos, R.T., Yu, Z. and Nayak, D.P. (1997) Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *J Virol*, **71**, 2947-2958.
- Baeuerle, P.A. and Henkel, T. (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, **12**, 141-179.
- Baichwal, V.R. and Baeuerle, P.A. (1997) Activate NF-kappa B or die? *Curr Biol*, **7**, R94-96.
- Balachandran, S., Kim, C.N., Yeh, W.C., Mak, T.W., Bhalla, K. and Barber, G.N. (1998) Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *Embo J*, **17**, 6888-6902.
- Balachandran, S., Roberts, P.C., Brown, L.E., Truong, H., Pattnaik, A.K., Archer, D.R. and Barber, G.N. (2000) Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity*, **13**, 129-141.
- Balachandran, S., Roberts, P.C., Kipperman, T., Bhalla, K.N., Compans, R.W., Archer, D.R. and Barber, G.N. (2000) Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *J Virol*, **74**, 1513-1523.
- Baldwin, A.S. (2001) Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest*, **107**, 241-246.
- Barkett, M. and Gilmore, T.D. (1999) Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, **18**, 6910-6924.
- Barnes, P.J. and Karin, M. (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription

- factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*, **336**, 1066-1071.
- Beg, A.A. and Baltimore, D. (1996) An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*, **274**, 782-784.
- Benchoua, A., Couriaud, C., Guegan, C., Tartier, L., Couvert, P., Friocourt, G., Chelly, J., Menissier-de Murcia, J. and Onteniente, B. (2002) Active caspase-8 translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactivate poly(ADP-ribose) polymerase-2. *J Biol Chem*, **277**, 34217-34222.
- Bodmer, J.L., Burns, K., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Thome, M., Bornand, T., Hahne, M., Schroter, M., Becker, K., Wilson, A., French, L.E., Browning, J.L., MacDonald, H.R. and Tschopp, J. (1997) TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity*, **6**, 79-88.
- Bui, M., Whittaker, G. and Helenius, A. (1996) Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol*, **70**, 8391-8401.
- Bui, M., Wills, E.G., Helenius, A. and Whittaker, G.R. (2000) Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J Virol*, **74**, 1781-1786.
- Bussfeld, D., Bacher, M., Moritz, A., Gemsa, D. and Sprenger, H. (1997) Expression of transcription factor genes after influenza A virus infection. *Immunobiology*, **198**, 291-298.
- Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E.S., Shi, Y. and Dataa, P. (2001) Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell*, **104**, 769-780.
- Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R. and Yewdell, J.W. (2001) A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, **7**, 1306-1312.
- Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R. and Yewdell, J.W. (2001) A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, **7**, 1306-1312.
- Chen, Z. and Krug, R.M. (2000) Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells. *Trends Microbiol*, **8**, 376-383.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Yu, G.L., Lyons, R.H., Garg, M., Duan, D.R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J. and Dixit, V.M. (1996) Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science*, **274**, 990-992.
- Chu, W.M., Ostertag, D., Li, Z.W., Chang, L., Chen, Y., Hu, Y., Williams, B., Perrault,

- J. and Karin, M. (1999) JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity*, **11**, 721-731.
- Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veluona, M.A. and Hardwick, J.M. (1998) Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 554-559.
- Clem, R.J., Sheu, T.T., Richter, B.W., He, W.W., Thornberry, N.A., Duckett, C.S. and Hardwick, J.M. (2001) c-IAP1 is cleaved by caspases to produce a proapoptotic C-terminal fragment. *J Biol Chem*, **276**, 7602-7608.
- Cohen, G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, **326** (Pt 1), 1-16.
- Connor, R.J., Kawaoka, Y., Webster, R.G. and Paulson, J.C. (1994) Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*, **205**, 17-23.
- Davey, J., Dimmock, N.J. and Colman, A. (1985) Identification of the sequence responsible for the nuclear accumulation of the influenza virus nucleoprotein in *Xenopus* oocytes. *Cell*, **40**, 667-675.
- Degli-Esposti, M.A., Dougall, W.C., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Smith, C.A. and Goodwin, R.G. (1997) The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*, **7**, 813-820.
- Degli-Esposti, M.A., Smolak, P.J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C.P., DuBose, R.F., Goodwin, R.G. and Smith, C.A. (1997) Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med*, **186**, 1165-1170.
- Denk, A., Goebeler, M., Schmid, S., Berberich, I., Ritz, O., Lindemann, D., Ludwig, S. and Wirth, T. (2001) Activation of NF-kappa B via the Ikappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells. *J Biol Chem*, **276**, 28451-28458.
- Deveraux, Q.L., Leo, E., Stennicke, H.R., Welsh, K., Salvesen, G.S. and Reed, J.C. (1999) Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Embo J*, **18**, 5242-5251.
- Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S. and Reed, J.C. (1998) IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J*, **17**, 2215-2223.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. and Reed, J.C. (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, **388**, 300-304.
- Diaz, M.O., Zieminska, S., Le Beau, M.M., Pitha, P., Smith, S.D., Chilcote, R.R. and

- Rowley, J.D. (1988) Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5259-5263.
- Digard, P., Elton, D., Bishop, K., Medcalf, E., Weeds, A. and Pope, B. (1999) Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J Virol*, **73**, 2222-2231.
- Enami, K., Sato, T.A., Nakada, S. and Enami, M. (1994) Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol*, **68**, 1432-1437.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, **391**, 43-50.
- Erlenhoef, C., Wurzer, W.J., Loffler, S., Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. (2001) CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol*, **75**, 4499-4505.
- Faleiro, L. and Lazebnik, Y. (2000) Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J Cell Biol*, **151**, 951-959.
- Flick, R., Neumann, G., Hoffmann, E., Neumeier, E. and Hobom, G. (1996) Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *Rna*, **2**, 1046-1057.
- Flory, E., Kunz, M., Scheller, C., Jassoy, C., Stauber, R., Rapp, U.R. and Ludwig, S. (2000) Influenza virus-induced NF-kappaB-dependent gene expression is mediated by overexpression of viral proteins and involves oxidative radicals and activation of IkappaB kinase. *J Biol Chem*, **275**, 8307-8314.
- Garcia-Sastre, A. (2001) Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology*, **279**, 375-384.
- Garcia-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D.E., Durbin, J.E., Palese, P. and Muster, T. (1998) Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*, **252**, 324-330.
- Garten, W. and Klenk, H.D. (1999) Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends Microbiol*, **7**, 99-100.
- Germain, M., Affar, E.B., D'Amours, D., Dixit, V.M., Salvesen, G.S. and Poirier, G.G. (1999) Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem*, **274**, 28379-28384.
- Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, **16**, 225-260.
- Green, D.R. and Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-

1312.

- Haller, O., Frese, M. and Kochs, G. (1998) Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Tech*, **17**, 220-230.
- Hankins, R.W., Nagata, K., Bucher, D.J., Popple, S. and Ishihama, A. (1989) Monoclonal antibody analysis of influenza virus matrix protein epitopes involved in transcription inhibition. *Virus Genes*, **3**, 111-126.
- Hinshaw, V.S., Olsen, C.W., Dybdahl-Sissoko, N. and Evans, D. (1994) Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J Virol*, **68**, 3667-3673.
- Hiscott, J., Kwon, H. and Genin, P. (2001) Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest*, **107**, 143-151.
- Huang, R.T. and Dietsch, E. (1988) Anti-influenza viral activity of aspirin in cell culture. *N Engl J Med*, **319**, 797.
- Huang, Y., Park, Y.C., Rich, R.L., Segal, D., Myszka, D.G. and Wu, H. (2001) Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell*, **104**, 781-790.
- Itoh, N. and Nagata, S. (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*, **268**, 10932-10937.
- Julkunen, I., Melen, K., Nyqvist, M., Pirhonen, J., Sareneva, T. and Matikainen, S. (2000) Inflammatory responses in influenza A virus infection. *Vaccine*, **19**, S32-37.
- Julkunen, I., Sareneva, T., Pirhonen, J., Ronni, T., Melen, K. and Matikainen, S. (2001) Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev*, **12**, 171-180.
- Kai, H., Matsumoto, H., Hattori, N., Takase, A., Fujiwara, T. and Sugimoto, H. (2001) Anti-influenza virus activities of 2-alkoxyimino-n-(2-isoxazolin-3-ylmethyl)acetamides. *Bioorg Med Chem Lett*, **11**, 1997-2000.
- Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*, **18**, 621-663.
- Karin, M. and Delhase, M. (2000) The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol*, **12**, 85-98.
- Karin, M. and Lin, A. (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, **3**, 221-227.

- Kasof, G.M., Lu, J.J., Liu, D., Speer, B., Mongan, K.N., Gomes, B.C. and Lorenzi, M.V. (2001) Tumor necrosis factor-alpha induces the expression of DR6, a member of the TNF receptor family, through activation of NF-kappaB. *Oncogene*, **20**, 7965-7975.
- Kaufmann, A., Salentin, R., Meyer, R.G., Bussfeld, D., Pauligk, C., Fesq, H., Hofmann, P., Nain, M., Gemsa, D. and Sprenger, H. (2001) Defense against influenza A virus infection: essential role of the chemokine system. *Immunobiology*, **204**, 603-613.
- Kerr, I.M. (1987) The 2-5A system: a personal view. *J Interferon Res*, **7**, 505-510.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257.
- Knobil, K., Choi, A.M., Weigand, G.W. and Jacoby, D.B. (1998) Role of oxidants in influenza virus-induced gene expression. *Am J Physiol*, **274**, L134-142.
- Kurokawa, H., Nishio, K., Fukumoto, H., Tomonari, A., Suzuki, T. and Saijo, N. (1999) Alteration of caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in wild-type MCF-7, breast cancer cells. *Oncol Rep*, **6**, 33-37.
- Lai, W.H., Cameron, P.H., Wada, I., Doherty, J.J., 2nd, Kay, D.G., Posner, B.I. and Bergeron, J.J. (1989) Ligand-mediated internalization, recycling, and downregulation of the epidermal growth factor receptor in vivo. *J Cell Biol*, **109**, 2741-2749.
- Lehmann, C., Sprenger, H., Nain, M., Bacher, M. and Gemsa, D. (1996) Infection of macrophages by influenza A virus: characteristics of tumour necrosis factor-alpha (TNF alpha) gene expression. *Res Virol*, **147**, 123-130.
- Lehmann, C., Sprenger, H., Nain, M., Bacher, M. and Gemsa, D. (1996) Infection of macrophages by influenza A virus: characteristics of tumour necrosis factor-alpha (TNF alpha) gene expression. *Res Virol*, **147**, 123-130.
- Leo, E., Deveraux, Q.L., Buchholtz, C., Welsh, K., Matsuzawa, S., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. and Reed, J.C. (2001) TRAF1 is a substrate of caspases activated during tumor necrosis factor receptor-alpha-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **276**, 8087-8093.
- Levkau, B., Scatena, M., Giachelli, C.M., Ross, R. and Raines, E.W. (1999) Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF-kappa B loop. *Nat Cell Biol*, **1**, 227-233.
- Lin, C., Holland, R.E., Jr., Donofrio, J.C., McCoy, M.H., Tudor, L.R. and Chambers, T.M. (2002) Caspase activation in equine influenza virus induced apoptotic cell death. *Vet Microbiol*, **84**, 357-365.

- Lin, C., Holland, R.E., Jr., Donofrio, J.C., McCoy, M.H., Tudor, L.R. and Chambers, T.M. (2002) Caspase activation in equine influenza virus induced apoptotic cell death. *Vet Microbiol*, **84**, 357-365.
- Lin, C., Holland, R.E., Jr., Williams, N.M. and Chambers, T.M. (2001) Cultures of equine respiratory epithelial cells and organ explants as tools for the study of equine influenza virus infection. *Arch Virol*, **146**, 2239-2247.
- Lin, C., Zimmer, S.G., Lu, Z., Holland, R.E., Jr., Dong, Q. and Chambers, T.M. (2001) The involvement of a stress-activated pathway in equine influenza virus-mediated apoptosis. *Virology*, **287**, 202-213.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J.E., MacKenzie, A. and Korneluk, R.G. (1996) Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*, **379**, 349-353.
- Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T. and Wang, X. (1998) The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8461-8466.
- Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V. and Karin, M. (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, **87**, 565-576.
- Ludwig, S., Ehrhardt, C., Neumeier, E.R., Kracht, M., Rapp, U.R. and Pleschka, S. (2001) Influenza virus-induced AP-1-dependent gene expression requires activation of the JNK signaling pathway. *J Biol Chem*, **276**, 10990-10998.
- Ludwig, S., Pleschka, S. and Wolff, T. (1999) A fatal relationship--influenza virus interactions with the host cell. *Viral Immunol*, **12**, 175-196.
- Ludwig, S., Wang, X., Ehrhardt, C., Zheng, H., Donelan, N., Planz, O., Pleschka, S., Garcia-Sastre, A., Heins, G. and Wolff, T. (2002) The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol*, **76**, 11166-11171.
- Luo, G. and Palese, P. (1992) Genetic analysis of influenza virus. *Curr Opin Genet Dev*, **2**, 77-81.
- Madrid, L.V., Wang, C.Y., Guttridge, D.C., Schottelius, A.J., Baldwin, A.S., Jr. and Mayo, M.W. (2000) Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol*, **20**, 1626-1638.
- Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Donahue, C.J., Pitti, R.M., Gray, C.L., Goddard, A.D., Bauer, K.D. and Ashkenazi, A. (1996) Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr Biol*, **6**, 1669-1676.

- Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Pitti, R.M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A.D., Godowski, P. and Ashkenazi, A. (1997) A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol*, **7**, 1003-1006.
- Martin, K. and Helenius, A. (1991) Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell*, **67**, 117-130.
- Matrosovich, M.N., Gambaryan, A.S., Teneberg, S., Piskarev, V.E., Yamnikova, S.S., Lvov, D.K., Robertson, J.S. and Karlsson, K.A. (1997) Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology*, **233**, 224-234.
- Mohsin, M.A., Morris, S.J., Smith, H. and Sweet, C. (2002) Correlation between levels of apoptosis, levels of infection and haemagglutinin receptor binding interaction of various subtypes of influenza virus: does the viral neuraminidase have a role in these associations. *Virus Res*, **85**, 123-131.
- Mori, I., Goshima, F., Imai, Y., Kohsaka, S., Sugiyama, T., Yoshida, T., Yokochi, T., Nishiyama, Y. and Kimura, Y. (2002) Olfactory receptor neurons prevent dissemination of neurovirulent influenza A virus into the brain by undergoing virus-induced apoptosis. *J Gen Virol*, **83**, 2109-2116.
- Morris, S.J., Price, G.E., Barnett, J.M., Hiscox, S.A., Smith, H. and Sweet, C. (1999) Role of neuraminidase in influenza virus-induced apoptosis. *J Gen Virol*, **80** (Pt 1), 137-146.
- Mundt, B., Kuhnel, F., Zender, L., Paul, Y., Tillmann, H., Trautwein, C., Manns, M.P. and Kubicka, S. (2003) Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *Faseb J*, **17**, 94-96.
- Neumann, G., Castrucci, M.R. and Kawaoka, Y. (1997) Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol*, **71**, 9690-9700.
- Neumann, G., Castrucci, M.R. and Kawaoka, Y. (1997) Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol*, **71**, 9690-9700.
- Nichols, J.E., Niles, J.A. and Roberts, N.J., Jr. (2001) Human lymphocyte apoptosis after exposure to influenza A virus. *J Virol*, **75**, 5921-5929.
- Nichols, J.E., Niles, J.A. and Roberts, N.J., Jr. (2001) Human lymphocyte apoptosis after exposure to influenza A virus. *J Virol*, **75**, 5921-5929.
- Olsen, C.W., Kehren, J.C., Dybdahl-Sissoko, N.R. and Hinshaw, V.S. (1996) bcl-2 alters influenza virus yield, spread, and hemagglutinin glycosylation. *J Virol*, **70**, 663-666.
- Pahl, H.L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, **18**, 6853-6866.

- Pahl, H.L. and Baeuerle, P.A. (1995) Expression of influenza virus hemagglutinin activates transcription factor NF-kappa B. *J Virol*, **69**, 1480-1484.
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y.F., Yu, G., Gentz, R. and Dixit, V.M. (1997) An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, **277**, 815-818.
- Pan, G., Ni, J., Yu, G., Wei, Y.F. and Dixit, V.M. (1998) TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett*, **424**, 41-45.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J. and Dixit, V.M. (1997) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, **276**, 111-113.
- Pitti, R.M., Marsters, S.A., Lawrence, D.A., Roy, M., Kischkel, F.C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C.J., Sherwood, S.W., Baldwin, D.T., Godowski, P.J., Wood, W.I., Gurney, A.L., Hillan, K.J., Cohen, R.L., Goddard, A.D., Botstein, D. and Ashkenazi, A. (1998) Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*, **396**, 699-703.
- Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U.R. and Ludwig, S. (2001) Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol*, **3**, 301-305.
- Ravi, R., Bedi, G.C., Engstrom, L.W., Zeng, Q., Mookerjee, B., Gelinas, C., Fuchs, E.J. and Bedi, A. (2001) Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol*, **3**, 409-416.
- Razvi, E.S. and Welsh, R.M. (1995) Apoptosis in viral infections. *Adv Virus Res*, **45**, 1-60.
- Reuther, J.Y. and Baldwin, A.S., Jr. (1999) Apoptosis promotes a caspase-induced amino-terminal truncation of I kappa B alpha that functions as a stable inhibitor of NF-kappaB. *J Biol Chem*, **274**, 20664-20670.
- Riedl, S.J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S.W., Liddington, R.C. and Salvesen, G.S. (2001) Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell*, **104**, 791-800.
- Ronni, T., Matikainen, S., Sareneva, T., Melen, K., Pirhonen, J., Keskinen, P. and Julkunen, I. (1997) Regulation of IFN-alpha/beta, MxA, 2',5'-oligoadenylate synthetase, and HLA gene expression in influenza A-infected human lung epithelial cells. *J Immunol*, **158**, 2363-2374.
- Rott, R. (1992) The pathogenic determinant of influenza virus. *Vet Microbiol*, **33**, 303-310.
- Schlegel, R.A. and Williamson, P. (2001) Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ*, **8**, 551-563.

- Schmitz, M.L., Bacher, S. and Kracht, M. (2001) I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci*, **26**, 186-190.
- Schneider, P., Bodmer, J.L., Thome, M., Hofmann, K., Holler, N. and Tschopp, J. (1997) Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett*, **416**, 329-334.
- Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Grasl-Kraupp, B., Marian, B., Torok, L., Kahl-Rainer, P. and Ellinger, A. (1997) Concepts of cell death and application to carcinogenesis. *Toxicol Pathol*, **25**, 89-93.
- Schultz-Cherry, S., Dybdahl-Sissoko, N., Neumann, G., Kawaoka, Y. and Hinshaw, V.S. (2001) Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J Virol*, **75**, 7875-7881.
- Schweichel, J.U. and Merker, H.J. (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, **7**, 253-266.
- Schwenzer, R., Siemienski, K., Liptay, S., Schubert, G., Peters, N., Scheurich, P., Schmid, R.M. and Wajant, H. (1999) The human tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*, **274**, 19368-19374.
- Screaton, G.R., Mongkolsapaya, J., Xu, X.N., Cowper, A.E., McMichael, A.J. and Bell, J.I. (1997) TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol*, **7**, 693-696.
- Screaton, G.R., Xu, X.N., Olsen, A.L., Cowper, A.E., Tan, R., McMichael, A.J. and Bell, J.I. (1997) LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4615-4619.
- Sedger, L.M., Shows, D.M., Blanton, R.A., Peschon, J.J., Goodwin, R.G., Cosman, D. and Wiley, S.R. (1999) IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol*, **163**, 920-926.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C. and Karin, M. (2001) Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science*, **293**, 1495-1499.
- Senftleben, U., Li, Z.W., Baud, V. and Karin, M. (2001) IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis. *Immunity*, **14**, 217-230.
- Sha, W.C., Liou, H.C., Tuomanen, E.I. and Baltimore, D. (1995) Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell*, **80**, 321-330.

- Shapiro, G.I., Gurney, T., Jr. and Krug, R.M. (1987) Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol*, **61**, 764-773.
- Shapiro, G.I. and Krug, R.M. (1988) Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J Virol*, **62**, 2285-2290.
- Sheridan, J.P., Marsters, S.A., Pitti, R.M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C.L., Baker, K., Wood, W.I., Goddard, A.D., Godowski, P. and Ashkenazi, A. (1997) Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*, **277**, 818-821.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Boyle, W.J. and et al. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, **89**, 309-319.
- Sizemore, N., Leung, S. and Stark, G.R. (1999) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit. *Mol Cell Biol*, **19**, 4798-4805.
- Slee, E.A., Adrain, C. and Martin, S.J. (2001) Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, **276**, 7320-7326.
- Smith, C.A., Farrah, T. and Goodwin, R.G. (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, **76**, 959-962.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264.
- Stegmann, T., White, J.M. and Helenius, A. (1990) Intermediates in influenza induced membrane fusion. *Embo J*, **9**, 4231-4241.
- Stray, S.J. and Air, G.M. (2001) Apoptosis by influenza viruses correlates with efficiency of viral mRNA synthesis. *Virus Res*, **77**, 3-17.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. and Nagata, S. (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, **75**, 1169-1178.
- Tanaka, N., Sato, M., Lamphier, M.S., Nozawa, H., Oda, E., Noguchi, S., Schreiber, R.D., Tsujimoto, Y. and Taniguchi, T. (1998) Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. *Genes Cells*, **3**, 29-37.
- Tang, G., Yang, J., Minemoto, Y. and Lin, A. (2001) Blocking caspase-3-mediated proteolysis of IKKbeta suppresses TNF-alpha-induced apoptosis. *Mol Cell*, **8**, 1005-1016.

- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H. and Goeddel, D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, **74**, 845-853.
- Thomson, B.J. (2001) Viruses and apoptosis. *Int J Exp Pathol*, **82**, 65-76.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, **281**, 1312-1316.
- Tumpey, T.M., Lu, X., Morken, T., Zaki, S.R. and Katz, J.M. (2000) Depletion of lymphocytes and diminished cytokine production in mice infected with a highly virulent influenza A (H5N1) virus isolated from humans. *J Virol*, **74**, 6105-6116.
- Uetani, K., Der, S.D., Zamanian-Daryoush, M., de La Motte, C., Lieberman, B.Y., Williams, B.R. and Erzurum, S.C. (2000) Central role of double-stranded RNA-activated protein kinase in microbial induction of nitric oxide synthase. *J Immunol*, **165**, 988-996.
- Veit, M., Klenk, H.D., Kendal, A. and Rott, R. (1991) The M2 protein of influenza A virus is acylated. *J Gen Virol*, **72 (Pt 6)**, 1461-1465.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., Goodwin, R.G. and Rauch, C.T. (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J*, **16**, 5386-5397.
- Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A.A. and Garcia-Sastre, A. (2000) Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J Virol*, **74**, 11566-11573.
- Watanabe, K., Takizawa, N., Katoh, M., Hoshida, K., Kobayashi, N. and Nagata, K. (2001) Inhibition of nuclear export of ribonucleoprotein complexes of influenza virus by leptomycin B. *Virus Res*, **77**, 31-42.
- Watanabe, Y., Shiratsuchi, A., Shimizu, K., Takizawa, T. and Nakanishi, Y. (2002) Role of phosphatidylserine exposure and sugar chain desialylation at the surface of influenza virus-infected cells in efficient phagocytosis by macrophages. *J Biol Chem*, **277**, 18222-18228.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M. and Kawaoka, Y. (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, **56**, 152-179.
- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A. and et al. (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, **3**, 673-682.

- Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G. and el-Deiry, W.S. (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet*, **17**, 141-143.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, **68**, 251-306.
- Ye, Z.P., Pal, R., Fox, J.W. and Wagner, R.R. (1987) Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus. *J Virol*, **61**, 239-246.
- Yin, M.J., Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B. (1998) The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature*, **396**, 77-80.
- Zheng, Y., Ouaz, F., Bruzzo, P., Singh, V., Gerondakis, S. and Beg, A.A. (2001) NF-kappa B RelA (p65) is essential for TNF-alpha-induced fas expression but dispensable for both TCR-induced expression and activation-induced cell death. *J Immunol*, **166**, 4949-4957.
- Zhirnov, O.P., Konakova, T.E., Garten, W. and Klenk, H. (1999) Caspase-dependent N-terminal cleavage of influenza virus nucleocapsid protein in infected cells. *J Virol*, **73**, 10158-10163.
- Zhirnov, O.P., Konakova, T.E., Wolff, T. and Klenk, H.D. (2002) NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J Virol*, **76**, 1617-1625.
- Zhong, H., SuYang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Ghosh, S. (1997) The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell*, **89**, 413-424.
- Zhou, A., Hassel, B.A. and Silverman, R.H. (1993) Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell*, **72**, 753-765.

9. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	<i>activated transcription factor</i>
ATP	Adenosintriophosphat
BA	<i>bovine albumin</i>
BBS	<i>BES buffered saline</i>
BES	<i>(N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonic acid)</i>
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celcius
Ca	Calcium
cAMP	<i>cyclic Adenosine Monophosphat</i>
C-terminal	carboxyterminal
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
cDNA	<i>Copy DNA</i>
CIAP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CTP	Cytidintriophosphat
cRNA	<i>Copy RNA</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant negativ
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOC	Desoxycholsäure Natriumsalz
DTT	Dithiothreitol
dsRNA	doppelsträngige RNA
ECL	<i>Enhanced chemoluminiscence</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGF	Epidermal growth factor

EMSA	electrophoretic mobility shift assay
ERK	extracellular signal regulated kinase
FBS	fötales Rinderserum
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GDP	Guanidindiphosphat
GEF	Guanine nucleotid exchange factor
h	Stunden
HA	Hämagglutinin-Epitop
HAc	Essigsäure
IFN	Interferon
I κ B	Inhibitor of κ B
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IRF	Interferon Regulatorischer Faktor
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KAc	Kaliumacetat
kDa	Kilodalton
kb	Kilo Basen
l	Liter
LiAc	Lithium Acetat
M	Matrixprotein
M	mol/l
m	milli
μ	mikro
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MEM	minimal essential medium
MEK	MAPK/ERK Kinase
MEKK	MEK Kinase
min	Minute
MKK	MAPK Kinase
ml	Milliliter
MOI	multiplicity of infection

mRNA	messenger RNA
mut	Mutante
n	nano
NA	Neuraminidase
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal
NP	Nukleoproteine
NS	Nichtstrukturproteine
OD	Optische Dichte
PA	Proteine des Polymerasekomplexes
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PKR	von dsRNA aktivierte Proteinkinase
pmol	Pikomol
Poly IC	Polydeoxyinosinic-Polydeoxycytidylic acid
Raf	Rap(p)idly accelerated fibrosarcoma
RDRP	RNA-Polymerasekomplex
RNA	Ribonucleinsäure
RLU	Relative light units
rpm	Umdrehungen in der Minute
SAPK	Stress activated protein kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
u.a.	unter anderem
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	tris borate buffer
TBS	tris buffered saline
TBST	TBS mit Triton
TEMED	N', N', N', N',- tetramethylenediamine
TGF	tumor growth factor
TLB	Triton Lyse Puffer
TNF	Tumor Necrose Faktor
TPA	12-o-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat

TRE	TPA responsive element
Tris	tris(hydroxymethyl)methyl-amine hydrochloride
U	units
UV	ultra violett
v	Volumen
V	Volt
vRNA	virale RNA
w	Gewicht
WT	Wildtyp

10. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorgelegte Arbeit noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegen hat.

Außer den in dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden habe ich keine weiteren Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Mag. Walter Wurzer

11.Lebenslauf

Name: Walter Jürgen Wurzer

Adresse: Salzburgerstr.52
A-5280 Braunau am Inn

Geburtsdatum: 28.08.1976

Geburtsort: Braunau am Inn

Staatsbürgerschaft: Österreich

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1982-1986 Volksschule
1986-1995 Gymnasium Braunau
1995 Matura

Universität: Studium der Int. Wirtschaftswissenschaften in Innsbruck von
Oktober 1995 bis März 1996

Studium der Biologie / Zweig Genetik in Salzburg
März 1996 – April 2000

Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie der
Österreichischen Akademie der Wissenschaften in Salzburg
Abteilung Biochemie (Prof. G. Kreil)

Diplomprüfung April 2000; Mag.rer.nat.

Mai 2000 – Juni 2001 Institut für Virologie Universität Würzburg

Seit Juni 2001 Institut für Medizinische Strahlenkunde und
Zellforschung Universität Würzburg

Kongressteilnahmen: Posterpräsentation im Rahmen der Jahrestagung der ÖBG und
ÖGGGT in Graz, Sept. 1999

Teilnahme am Sialinsäure-Workshop an der
Universität Kiel, Okt. 1999

Posterpräsentation im Rahmen der Jahrestagung der
Gesellschaft für Virologie, 26.-29. April 2000, Wien

Posterpräsentation im Rahmen der Jahrestagung der ÖBG und
ÖGGGT 25.-27. September 2000, Innsbruck

Posterpräsentation im Rahmen der Jahrestagung der
Gesellschaft für Virologie
14.-17. März 2001, Dresden

Vortrag im Rahmen des Life Sciences Meetings 2001 in Wien,
24.-27.9.2001

Posterpräsentation im Rahmen der Tagung „Cell signalling as a
therapeutic agent“ in Luxemburg, 30.1.-2.2.2002

Vortrag bei der Tagung der Virologischen Gesellschaft in
Erlangen 8.4-11.4.2002

Posterpräsentation im Rahmen des Weltvirologenkongresses
26.7.02-1.08.02 in Paris

Vortrag und Poster am Life-Science-Meeting 2002 von 16.9.-
18.9.2002 in Salzburg

Auszeichnungen:

Zuerkennung eines Leistungsstipendiums für überdurch-
schnittlichen Studienerfolg. Uni Salzburg 2000

„Best Talk Award“ für den besten Kurzvortrag in Rahmen des
Life Sciences Meeting in Salzburg 2002

Publikationen

Erlenhoefer C, Wurzer WJ, Loffler S, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J.

CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition.

J Virol. 2001 May;75(10):4499-505.

Wurzer WJ, Obojes K, Vlasak R.

The sialate-4-O-acetylsterases of coronaviruses related to mouse hepatitis virus: a proposal to reorganize group 2 Coronaviridae.

J Gen Virol. 2002 Feb;83(Pt 2):395-402.

Obojes, K., Wurzer WJ. Bauer HC. and Vlasak R.

Manuscript in preparation

Wurzer WJ., Planz O., Ehrhardt C., Giner M., Silberzahn T., Pleschka S., and Ludwig S.

Caspase-3 activation is essential for efficient influenza virus propagation

EMBO J., in revision

Ehrhardt C, Kardinal C, Wurzer WJ., Planz O., Pleschka S. and Ludwig S.

Rac1 controls activation of interferon regulatory factor-3 in the type I interferon response to viral infections

Manuscript submitted

Wurzer WJ, Ehrhardt C., Pleschka S., Berberich-Siebelt F., Walczak H., Planz O. and Ludwig S.

NF-kB dependent induction of TRAIL is crucial for efficient influenza virus propagation

Manuscript submitted

Silberzahn T., Pleschka S., Wurzer WJ., Stitz L., Ludwig S. and Planz O.

Local delivery of antiviral drugs into the respiratory system of influenza A virus infected mice

Manuscript submitted