

**Das SH-Protein des Mumpsvirus inhibiert die
Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durch die
Interaktion mit den TNFR1-, IL-1R1- und TLR3-
Rezeptorkomplexen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachgebiet Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Stephanie Franz
aus Berlin

2017

Die in dieser Dissertation beschriebenen Experimente wurden vom Mai 2013 bis April 2017 am Robert Koch-Institut unter der Betreuung von Prof. Dr. Annette Mankertz durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Annette Mankertz
2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Wahl

Disputation am 12.12.2017

Inhaltsverzeichnis

<i>Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>VI</i>
1 Einleitung	1
1.1 Das Mumpsvirus	1
1.1.1 Viruspartikel und Genomaufbau	1
1.1.2 Pathogenese und Krankheitsbild	2
1.1.3 Epidemiologie	3
1.1.4 Molekularbiologie	6
1.1.5 Das SH-Protein.....	8
1.2 Pathogenerkennung durch das angeborene Immunsystem	10
1.3 Der NF-κB-Signalweg	12
1.3.1 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	12
1.3.2 Aktivierung von NF- κ B	13
1.3.3 NF- κ B-regulierte Genexpression.....	17
1.4 Problemstellung und Zielsetzung	22
2 Material	24
2.1 Chemikalien und Reagenzien	24
2.2 Antikörper	26
2.3 Nukleinsäuren	27
2.3.1 Plasmide	27
2.3.2 Oligonukleotide (Primer)	27
2.3.3 siRNA	28
2.4 Medien	28
2.4.1 Medien für eukaryotische Zellen.....	28
2.4.2 Medien für Bakterien	28
2.5 Zellen	29
2.5.1 Eukaryotische Zelllinien.....	29
2.5.2 Bakterienstämme	29
2.6 Viren	29
2.7 Puffer	29
2.7.1 Fertige Puffer.....	29

Inhaltsverzeichnis

2.7.2	Angesetzte Puffer	30
2.8	Verbrauchsmaterialien.....	31
2.9	Geräte.....	32
2.10	Kits	33
2.11	Software und Webseiten	34
3	Methoden	35
3.1	Molekularbiologische Methoden	35
3.1.1	Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente <i>E. coli</i>	35
3.1.2	Präparation von Plasmid-DNA	35
3.1.3	Sequenzierung von DNA.....	37
3.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
3.1.5	Quantitative Real-Time-PCR.....	38
3.2	Zellbiologische Methoden.....	42
3.2.1	Kultivierung von Zelllinien.....	42
3.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	43
3.2.3	Transfektion von eukaryotischen Zelllinien	44
3.2.4	Anzucht von Viren.....	45
3.2.5	Infektion eukaryotischer Zelllinien.....	45
3.3	Methoden zur Analyse von Proteinen	46
3.3.1	Immuncolorimetrischer Assay	46
3.3.2	SDS-PAGE	48
3.3.3	Western Blot.....	49
3.3.4	Immunfluoreszenz Assay.....	51
3.3.5	Durchflusszytometrie.....	53
3.3.6	Co-Immunpräzipitation	54
3.3.7	ELISA.....	55
3.4	Methoden zur Analyse von Signalwegen	56
3.4.1	Luciferase Reportergenassay.....	56
4	Ergebnisse	58
4.1	Charakterisierung der rMuV.....	59
4.1.1	Charakterisierung des Wachstums.....	59
4.1.2	Analyse des CPE und der Expression viraler Proteine	60
4.1.3	Analyse der Membranorientierung des SH-Proteins	65
4.2	Charakterisierung des Einflusses des SH-Proteins auf die NF-κB-Aktivierung ..	66

4.2.1	Einfluss des SH-Proteins auf Komponenten des NF- κ B-Signalwegs	66
4.2.2	Einfluss des SH-Proteins auf die NF- κ B-regulierte Genexpression	71
4.2.3	Interaktion des SH-Proteins mit Komponenten der TNFR1-, IL-1R1- und TLR3-Rezeptorkomplexe	76
4.2.4	Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf das Wachstum der rMuV.....	78
4.3	Charakterisierung des Einflusses des SH-Proteins auf die durch NF-κB regulierte Zytokin-Produktion.....	82
4.3.1	Charakterisierung der rMuV-Infektion in THP-1 Zellen	82
4.3.2	Einfluss des SH-Proteins auf die Phosphorylierung von p65	86
4.3.3	Einfluss des SH-Proteins auf die Genexpression von TNF α , IL-1 β und IL-18	88
4.3.4	Einfluss des SH-Proteins auf die Expression von pro-IL-1 β	90
4.3.5	Einfluss des SH-Proteins auf die Freisetzung von TNF α , IL-1 β und IL-18.....	91
5	Diskussion.....	93
5.1	Herstellung rekombinanter MuV zu Analyse der Funktion des SH-Proteins.....	93
5.2	Bedeutung des SH-Proteins für die Virusinfektion	93
5.2.1	Einfluss des SH-Proteins auf die Replikation von MuV	93
5.2.2	Einfluss des SH-Proteins auf die Expression viraler Proteine.....	96
5.2.3	Membranorientierung des SH-Proteins	98
5.3	Einfluss des MuV SH-Proteins auf den NF-κB-Signalweg.....	99
5.3.1	Beeinflussung der NF- κ B-Aktivierung	99
5.3.2	Beeinflussung von Komponenten des NF- κ B-Signalwegs.....	101
5.4	Bedeutung der Interaktion des MuV SH-Proteins mit zellulären Proteinen für die Regulation der NF-κB-Aktivierung.....	103
5.5	Bedeutung des MuV SH-Proteins für die Genexpression und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine	105
5.6	Eingriff des SH-Proteins in weitere zelluläre Prozesse.....	109
5.7	Modell der Beeinflussung der NF-κB-Aktivierung durch das MuV SH-Protein.	111
6	Zusammenfassung.....	113
7	Summary.....	115
8	Literaturverzeichnis.....	117
	Liste eigener Veröffentlichungen.....	132
	Lebenslauf.....	133
	Danksagung.....	134

Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1 Aufbau des Mumpsvirus
- Abb. 2 Replikationszyklus des Mumpsvirus
- Abb. 3 NF- κ B-Aktivierung durch verschiedene Rezeptoren und deren Liganden
- Abb. 4 Aktivierung von NF- κ B über den TNFR1
- Abb. 5 Aktivierung von NF- κ B über den IL-1R1
- Abb. 6 Aktivierung von NF- κ B über den TLR3
- Abb. 7 Synthese und Freisetzung der Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-18
- Abb. 8 Relative Quantifizierung mittels der $\Delta\Delta$ Ct-Methode
- Abb. 9 Schematische Darstellung der veränderten Genombereiche der hergestellten rMuV
- Abb. 10 Wachstumskinetik der erzeugten rMuV
- Abb. 11 Nach rMuV-Infektion induzierter CPE in A549 und Vero76 Zellen
- Abb. 12 Expressionskinetik des N-Proteins in rMuV-infizierten A549 und Vero76 Zellen
- Abb. 13 Expressionskinetik des SH-Proteins in rMuV-infizierten A549 und Vero76 Zellen
- Abb. 14 Analyse der Membranorientierung des SH-Proteins in rMuV-infizierten A549 Zellen
- Abb. 15 Einfluss des SH-Proteins auf die Phosphorylierung von IKK β , I κ B α und p65
- Abb. 16 Einfluss des SH-Proteins auf die Translokation von p65 in den Zellkern
- Abb. 17 Einfluss des SH-Proteins auf die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit TNF α , poly(I:C) und IL-1 β in transfizierten Zellen
- Abb. 18 Einfluss des SH-Proteins auf die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit TNF α und IL-1 β in infizierten Zellen
- Abb. 19 Analyse der Expression von TLR3 in 293G Zellen
- Abb. 20 Einfluss unterschiedlicher Epitope und deren Position auf die Funktion des SH-Proteins
- Abb. 21 Analyse der Position, an der das SH-Protein die Aktivierung von NF- κ B beeinflusst
- Abb. 22 Interaktion des SH-Proteins mit Komponenten der TNFR1-, IL-1R1- und TLR3-Rezeptorkomplexe in transfizierten Zellen
- Abb. 23 Interaktion des SH-Proteins mit Komponenten der TNFR1-, IL-1R1- und TLR3-Rezeptorkomplexe in infizierten Zellen
- Abb. 24 Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf das Wachstum der rMuV

Abb. 25	Nach rMuV-Infektion induzierter CPE in A549 Zellen in der An- und Abwesenheit des NF- κ B-Inhibitors SC75741
Abb. 26	Expressionskinetik des N-Proteins in rMuV-infizierten THP-1 Zellen
Abb. 27	Expressionskinetik des SH-Proteins in rMuV-infizierten THP-1 Zellen
Abb. 28	Nach rMuV-Infektion induzierter CPE in THP-1 Makrophagen
Abb. 29	Analyse der NF- κ B p65-Phosphorylierung in infizierten THP-1 Zellen
Abb. 30	Analyse der pro-TNF α -, pro-IL-1 β - und pro-IL-18-mRNA in infizierten THP-1 Zellen
Abb. 31	Analyse der pro-IL-1 β -Expression in infizierten THP-1 Zellen
Abb. 32	Analyse der TNF α - und der IL-1 β -Freisetzung aus infizierten THP-1 Zellen
Abb. 33	Modell der Beeinflussung der NF- κ B-Aktivierung durch das MuV SH-Protein
Tab. 1	Reaktionsansatz der Sequenzierungsreaktion
Tab. 2	Programm der Sequenzierungsreaktion
Tab. 3	Reaktionsansatz für die Inkubation von RNA und Primer
Tab. 4	Reaktionsansatz für den Mastermix für die cDNA-Synthese
Tab. 5	Reaktionsansatz für die quantitative Real-Time-PCR
Tab. 6	Programm der quantitativen Real-Time-PCR
Tab. 7	Reaktionsansätze bei der Transfektion mit <i>X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent</i>
Tab. 8	Reaktionsansätze bei der Infektion mit rMuV
Tab. 9	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel bei der SDS-PAGE
Tab. 10	Antikörperverdünnungen für die Proteinmarkierung im Western Blot
Tab. 11	Bedingungen bei der Markierung mit Antikörpern im Immunfluoreszenz Assay
Tab. 12	Antikörperverdünnungen für die Proteinmarkierung in der Durchflusszytometrie

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Österreich
A	Ampere
A1Up	<i>Ataxin-1 interacting ubiquitin-like protein</i>
Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivator-Protein-1
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ASC	<i>apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BeV	Beilongvirus
BGH	Bovine growth hormone
BMG	Bundesministerium für Gesundheit
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
C	Kohlenstoff
C	Cytosin
c	Centi
Ca	Calcium
ca.	circa
CCL5	<i>C-C motif chemokine ligand 5</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGAS	GMP-AMP Synthase
CH	Schweiz
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis</i>
Cl	Chlor
CLRs	C-Typ-Lektin-Rezeptoren
cLSM	konfokales Laserscanmikroskop
CMC	Carboxymethylcellulose
CMV	Zytomegalievirus
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPE	zytotoxischer Effekt
CSF	Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit (<i>cerebrospinal fluid</i>)
Ct	<i>cycle threshold</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
Cu	Kupfer
Cy	Cyanin
D	Deutschland
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	dendritische Zelle
ddNTPs	2',3'-Dideoxyribonukleotide
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF-2	<i>eukaryotic initiation factor 2</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
FKS	fötales Kälberserum
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FL	Volllänge
for	<i>forward</i>
F-Protein	Fusionsprotein
G	Guanin
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPR125	G-Protein gekoppelter Rezeptor 125
H	Wasserstoff
h	Stunde
h	human
HA-Epitop	Hämagglutinin-Epitop
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus 1
HN-Protein	Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ICA	Immuncolorimetrischer Assay
IAV	Influenza A Virus
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
I κ B	<i>inhibitor of NF-κB</i>
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IL-1R1	Interleukin-1 Rezeptor 1
IL-1RAcP	IL-1-Rezeptor-akzessorisches Protein
IRAK	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	Interferonregulationsfaktoren
J	Japan
JAK	<i>Janus kinase</i>
JL	Jeryl Lynn
JPV	J Paramyxovirus
K	Kalium
K	Lysin
k	Kilo
Kap.	Kapitel
KSHV	Kaposi-Sarkom-Herpesvirus
l	Liter
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> -Medium
L-Protein	<i>large protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	<i>long terminal repeat</i>

Abkürzungsverzeichnis

LV	Lettland
M	Molar
m	Meter
m	Milli
m	murin
μ	Mikro
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
M-Protein	Matrixprotein
MPV	Metapneumovirus
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
MuV	Mumpsvirus
MV	Masernvirus
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
n	Nano
Na	Natrium
ncbi	<i>national center for biotechnology information</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NL	Niederlande
NLR	<i>nucleotide binding oligomerization domain-like receptors</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing protein 3</i>
NLS	Kernlokalisierungssequenz (<i>nuclear localization signal</i>)
NOD	<i>nucleotide binding oligomerization domain</i>
N-Protein	Nukleocapsidprotein
N-Terminus	Aminoterminus
NZ	Neuseeland
O	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
ORI	<i>origin of replication</i>
P	Phosphor
P	Phosphorylierung
p	pico
p	<i>probability</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
Pat	Patient
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphat buffered saline mit Tween</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>plaque forming units</i>
PGE2	Prostaglandin E2
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
p.i.	<i>post infection</i>
PIV5	Parainfluenza Virus Typ 5
PKR	Proteinkinase R

Abkürzungsverzeichnis

PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POD	Peroxidase
poly(I:C)	Polyriboinosinic:Polyribocytidylic Säure
P-Protein	Phosphoprotein
PRRs	Mustererkennungsrezeptoren (<i>pattern recognition receptors</i>)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	<i>reverse</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene 1</i>
RIP1	<i>receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
RKI	Robert Koch-Institut
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RLRs	<i>retinoic acid-inducible gene 1 like receptors</i>
rMuV	rekombinantes Mumpsvirus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
RT	Raumtemperatur
S	Serin
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SH-Protein	<i>small hydrophobic protein</i>
siRNA	<i>small interfering</i> Ribonukleinsäure
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
STIKO	Ständige Impfkommision
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
T	Tymin
TAB	<i>TGF-beta-activated kinase 1-binding protein</i>
TACE	<i>TNFα converting enzyme</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAK1	<i>TGF-beta-activated kinase 1</i>
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>
TBS-T	<i>TRIS-buffered saline</i> mit Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th	T Helfer
TIR-Domäne	Toll-IL-1R-Domäne
TLRs	Toll-like Rezeptoren
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor Alpha
TNFR1	Tumornekrosefaktor Rezeptor 1
Tollip	<i>toll interacting protein</i>
TRADD	<i>TNFR1 associated death domain protein</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter protein inducing interferon beta</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Uracil
U	Unit

Abkürzungsverzeichnis

Ub	Ubiquitin
Ubc	<i>ubiquitin-conjugating enzyme</i>
UK	Großbritannien
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
VACV	Vacciniavirus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	zentrale Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Das Mumpsvirus

1.1.1 Viruspartikel und Genomaufbau

Das Mumpsvirus (MuV) gehört dem Genus Rubulavirus in der Familie Paramyxoviridae an. Es besitzt eine Hüllmembran und ein einzelsträngiges, nicht-segmentiertes RNA-Genom in negativer Orientierung. Dieses weist eine Länge von 15.384 Nukleotiden auf und kodiert für sieben Transkriptionseinheiten, von denen ausgehend neun Proteine synthetisiert werden. Die Viruspartikel haben eine sphärische oder pleiomorphe Form mit einem Durchmesser von etwa 200 nm (Hviid *et al.*, 2008). Das Genom bildet zusammen mit den Proteinen N (Nukleocapsidprotein), P (Phosphoprotein) und L (*large protein*) das Nukleocapsid, welches die infektiöse Einheit des Virus darstellt. In die umgebende Hüllmembran, eine Lipiddoppelschicht, sind die Glykoproteine F (Fusionsprotein) und HN (Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein) eingelagert. Die Membran wird vom M-Protein (Matrixprotein) ausgekleidet. Das SH-Protein (*small hydrophobic protein*) sowie das V- und das I-Protein gehören zu den Nicht-Strukturproteinen (Modrow *et al.*, 2010; Xu & Shu, 2002).

Am 3'- sowie am 5'-Ende des Genoms befinden sich nicht-kodierende Bereiche, wobei erstere als Leader-Sequenz bezeichnet wird und 55 Nukleotide umfasst (Elango *et al.*, 1988), während der hintere Trailer genannt wird. In diesen Bereichen liegen cis-aktive Signale, die für den Start der Genomreplikation und die Verpackung der Nukleocapside zu fertigen Viruspartikeln notwendig sind (Modrow *et al.*, 2010). Auch zwischen den einzelnen Genen liegen kurze, nicht-transkribierte Sequenzen, die bis zu sieben Basen umfassen und als intergenische Nukleotide bezeichnet werden. Wichtig für einen effizienten Ablauf der Transkription sind die konservierten Sequenzfolgen, die an den Start- und Endpunkten der Gene liegen (S- bzw. E-Konsensussequenzen) und die intergenischen Bereiche flankieren. Die Gene sind in der Reihenfolge 3'-N-P-M-F-SH-HN-L-5' auf dem Genom angeordnet (Elango *et al.*, 1988). Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau des Virions und die Anordnung der Gene auf dem Genom.

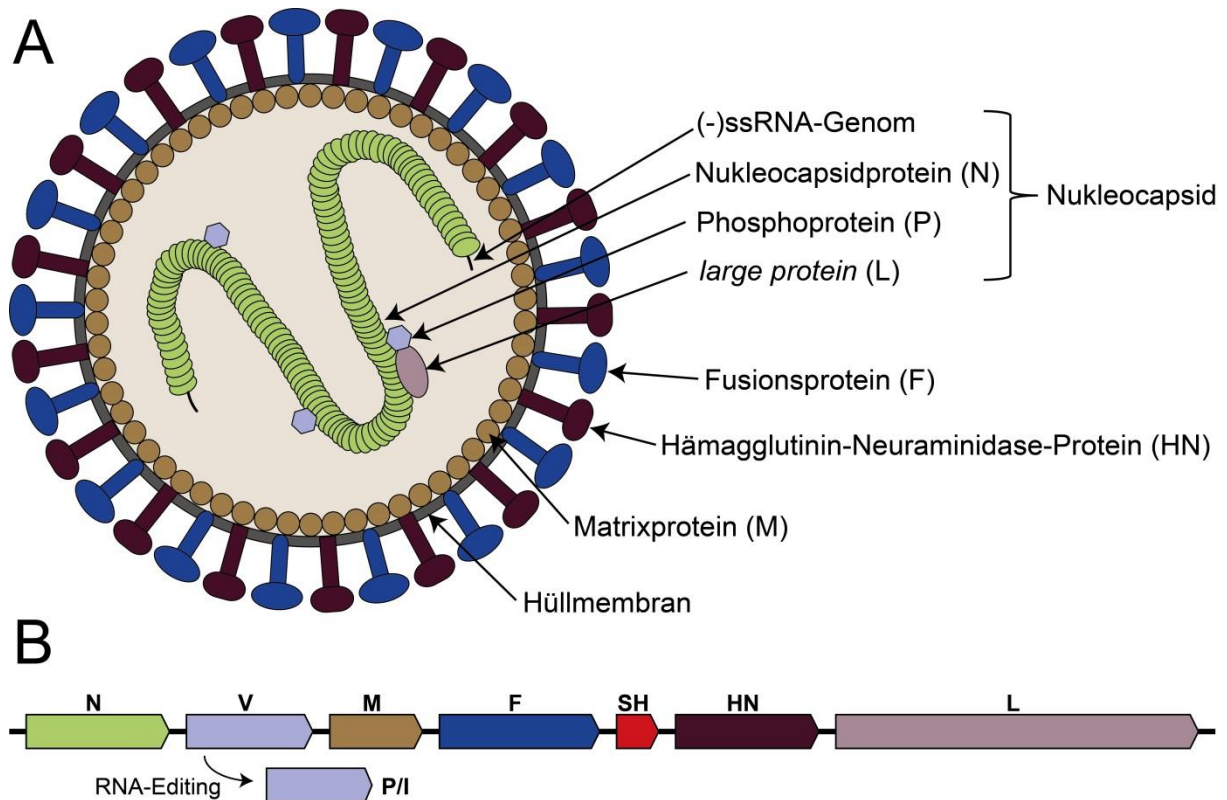


Abbildung 1: Aufbau des Mumpsvirus.

Schematische Darstellung des Virions (1A) und des Genomaufbaus (1B).

1.1.2 Pathogenese und Krankheitsbild

Die durch das MuV ausgelöste Krankheit wurde bereits im 5. Jahrhundert vor Christus von Hippokrates beschrieben (Muhlemann, 2004). Der Erforschung der Ursachen wird aber erst seit den 1930er Jahren nachgegangen, angefangen mit der experimentellen Übertragung der Krankheit auf Rhesusaffen (Johnson & Goodpasture, 1934). MuV wird auf der respiratorischen Route durch Tröpfcheninfektion oder direkten Kontakt übertragen, wobei Menschen die einzigen natürlichen Wirte sind. Basierend auf Studien zu anderen respiratorischen Viren wird auch für MuV angenommen, dass es nach der Exposition zur Infektion des oberen respiratorischen Trakts kommt. Diese Annahme konnte bisher aber nicht bewiesen werden. Des Weiteren wird angenommen, dass MuV nach der Infektion der Schleimhaut des oberen respiratorischen Trakts lokale Lymphknoten infiziert und es zu einer Virämie während der ersten akuten Phase der Infektion kommt (Rubin *et al.*, 2015). Nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von 16 bis 18 Tagen beginnt der Krankheitsverlauf mit dem Auftreten von unspezifischen Symptomen wie Kopf- und Muskelschmerzen, einem generellen Unwohlsein sowie niedrigem Fieber (WHO, 2007). Bei etwa einem Drittel bis zur Hälfte der Fälle bleibt es bei diesen unspezifischen Symptomen oder die Infektion verläuft asymptomatisch (Rubin *et al.*, 2015). Bei der systemischen Ausprägung der Krankheit ist der Hauptbefund eine schmerzhaft

Entzündung der Ohrspeicheldrüsen, eine Parotitis, die durch Schwellung der Drüsen gekennzeichnet ist (Hviid *et al.*, 2008). Auch eine Vielzahl anderer Organe können von einer MuV-Infektion betroffen sein. Entzündungen der Hoden bei 10 - 20 % der infizierten erwachsenen Männer sind nach der Parotitis die häufigste Ausprägung der Krankheit. Ebenso sind Entzündungen der Eierstöcke, des Herzmuskels, der Bauchspeicheldrüse sowie der Nieren bekannt (Rubin *et al.*, 2015). Neben der Affinität für Drüsengewebe ist MuV hoch neurotrop: So ist das zentrale Nervensystem (ZNS) in der Hälfte aller Infektionen betroffen und es kann, ohne dass es zur Ausprägung von Symptomen kommt, eine erhöhte Anzahl an Lymphozyten in der Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit (*cerebrospinal fluid*, CSF) nachgewiesen werden (Bruyn *et al.*, 1957; Rubin *et al.*, 2015; WHO, 2007). Symptomatische ZNS-Infektionen sind seltener; bei 5-10 % der Infektion kommt es zum Auftreten einer Meningitis und in unter 0,5 % der Fälle zu einer Enzephalitis (Rubin *et al.*, 2015). Trotz dieses geringen Anteils trägt Mumps in ungeimpften Populationen insgesamt zu einem hohen Anteil der viralen Enzephalitiden bei (Mallewa *et al.*, 2013; Ponka & Pettersson, 1982). Taubheit tritt zu 4 % nach MuV-Infektionen auf, ist meist vorübergehend, kann aber auch permanent sein (Bitnun *et al.*, 1986; Hall & Richards, 1987; Hashimoto *et al.*, 2009; Okamoto *et al.*, 1994). Als Ursache wird sowohl die Infektion der CSF als auch die endolymphatische Infektion des Innenohrs angesehen (Mizushima & Murakami, 1986; Westmore *et al.*, 1979). Generell wird die Erkrankung Mumps mit einer Sterblichkeitsrate von einer Person auf 10.000 Erkrankte als eine milde, selbstlimitierende Krankheit angesehen (WHO, 2007). Es gibt keine antivirale Therapie, nur die auftretenden Schmerzen können behandelt werden (Hviid *et al.*, 2008). Einen wirksamen Schutz vor einer MuV-Infektion stellt aber die zweifache Gabe eines Lebendimpfstamms dar.

1.1.3 Epidemiologie

Mumps ist eine Krankheit, die sich in Gruppen mit hohem Infektionsdruck durch engen Kontakt ausbreitet. Sie wurde als typische Kinderkrankheit bekannt, die in Intervallen von vier bis fünf Jahren mit einem Höhepunkt vor allem im Frühling und Winter auftrat. Dabei war bei Kindern zwischen fünf bis sieben Jahren die stärkste Infektionsrate festzustellen (Hviid *et al.*, 2008; WHO, 2007). Vor der Einführung weltweiter Impfprogramme zeigten 14 bis 15jährige eine Seroprävalenz von Mumps-spezifischen Antikörpern von 90 %. Dies deutet darauf hin, dass in einer ungeimpften Bevölkerung letztlich fast jedes Individuum mit MuV infiziert wird (Galazka *et al.*, 1999; Hviid *et al.*, 2008).

Die Entwicklung von Impfstoffen begann in den USA im Jahr 1948 mit einem Totimpfstoff, der zwischen 1950 und 1978 verabreicht wurde, aber nur eine kurze Immunität und einen geringen Schutz gewährleistete. Die heute verfügbaren Lebendimpfstoffe bieten dagegen einen wirksamen Schutz vor einer Infektion und bewirken eine Serokonversionsrate von etwa 90 %

nach Gabe einer Impfdosis (WHO, 2007). Serokonversion beschreibt die Entwicklung von spezifischen Antikörpern sowie den Wechsel der Antikörperklasse von IgM zu IgG. Weltweit werden mindestens 11 verschiedene Impfstämme verwendet, die unterschiedlichen Genotypen zuzuordnen sind und teilweise aus mehr als einem attenuierten Virusklon bestehen. Der Jeryl Lynn- sowie der Urabe Am9-Impfstamm werden am häufigsten eingesetzt (Hviid *et al.*, 2008; WHO, 2007) und meist in der Kombination mit Impfstoffen gegen Masern und Röteln verabreicht. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfiehlt eine Routineimmunisierung mit zwei Impfdosen. Die Ständige Impfkommission (STIKO) in Deutschland empfiehlt ebenfalls die Gabe von zwei Impfdosen, wobei die erste im Alter von 11 bis 14 Monaten und die zweite im Alter von 15 bis 23 Monaten erfolgen sollte (STIKO, 2016).

Die Einführung weltweiter Impfprogramme hat zu einem erheblichen Rückgang der Inzidenz von Mumps geführt (Davidkin *et al.*, 2010; Galazka *et al.*, 1999). So ist in den USA die Inzidenz im Jahr 2001 um 99,9 % im Vergleich zur Prä-Impf-Ära zurückgegangen (Rubin *et al.*, 2015). Trotz dieser Erfolge häufen sich weltweit seit den 2000er Jahren die Berichte über Mumps-Ausbrüche innerhalb geimpfter Populationen (Bangor-Jones *et al.*, 2009; Eriksen *et al.*, 2013; Mankertz *et al.*, 2015; Okajima *et al.*, 2013). Besonders häufig sind dabei Jugendliche und junge Erwachsene betroffen (Otto *et al.*, 2010; Watson-Creed *et al.*, 2006). Die Gründe für diese Beobachtung sind nicht abschließend geklärt. Spekuliert wird über einen Antigenwandel neu auftretender Genotypen, die von dem durch Impfung erzeugten Schutz nicht abgedeckt werden (Greenland *et al.*, 2012; Rubin *et al.*, 2012). Auch wird ein verstärkt auftretendes primäres Impfversagen, bei dem keine Serokonversion stattfand (Hviid *et al.*, 2008), sowie die zeitliche Abnahme der Immunität nach der Impfung (sekundäres Impfversagen) in Betracht gezogen (Brockhoff *et al.*, 2010). Darüber hinaus haben Sicherheitsbedenken in Bezug auf die Verknüpfung des Auftretens von Meningitis mit einigen Impfstämmen dazu geführt, dass zum Beispiel in Japan die Impfung gegen Mumps aus dem nationalen Immunisierungsprogramm ausgeschlossen wurde. Japan hat zurzeit die höchste Rate an Mumpsfällen in entwickelten Ländern (Nagai *et al.*, 2007; Rubin *et al.*, 2015), wobei es alle vier bis fünf Jahre zu großen Ausbrüchen kommt (Kuba *et al.*, 2016). Für die Jahre 2000 bis 2015 wurden jährlich 40.000 bis 250.000 Fälle in Japan gemeldet, wohingegen in Deutschland für die Jahre 2013 bis 2016 durchschnittlich 714 Fälle jährlich gemeldet wurden (RKI, 2017; WHO, 2017). Die Zahl der gemeldeten Fälle stellt aber aufgrund der schwierigen klinischen Diagnostik eine stark fehlerbehaftete Erfassung der tatsächlichen Anzahl an Mumpsfällen dar. Von einer Untererfassung ist auszugehen.

Alle MuV-Stämme sind einem Serotyp zuzuordnen, es werden aber 12 verschiedene Genotypen A bis N (mit dem Ausschluss von E und M) unterschieden. Für die Bestimmung der Genotypen wird das Gen, welches für das SH-Protein kodiert, herangezogen. Dieses weist innerhalb der unterschiedlichen Genotypen eine Varianz von 5 bis 21 % auf und zeigt damit die höchste

Variabilität innerhalb des MuV-Genoms. Die verschiedenen Genotypen sind geografisch unterschiedlich verteilt, so findet man die Genotypen C, D, G, H, J und K in der westlichen Hemisphäre, während die Genotypen B, F, G, I und L in asiatischen Ländern nachgewiesen werden (Jin *et al.*, 2015; WHO, 2012). Verschiedene Genotypen können in einer Region gleichzeitig zirkulieren, auch kann sich die Verteilung der Genotypen im zeitlichen Verlauf verändern (Jin *et al.*, 2015; Muhlemann, 2004). Virusstämme, die dem Genotyp G zuzuordnen sind, wurden weltweit bei sehr vielen, der in den letzten Jahren unter Geimpften auftretenden Ausbrüche, nachgewiesen (Brockhoff *et al.*, 2010; Greenland *et al.*, 2012; Rubin *et al.*, 2012), während die verwendeten Impfviren zu verschiedenen Genotypen gehören (Muhlemann, 2004). Darüber hinaus weisen Virusstämme verschiedener Genotypen eine unterschiedliche Neurovirulenz auf, so führt die Infektion mit Viren der Genotypen C und D in einem höheren Anteil zum Auftreten einer Meningitis, als die Infektion mit Viren des Genotyps A (Tecele *et al.*, 1998). Welche Ursachen diesen Unterschieden in der Neurovirulenz zugrunde liegen, ist Gegenstand aktueller Forschung. Dabei wird die Methode der Reversen Genetik zur Erzeugung rekombinanter Viren (Clarke *et al.*, 2000) sowie ein Tiermodell herangezogen, bei dem MuV intrazerebral in das Gehirn neugeborener Ratten injiziert wird (Rubin *et al.*, 1998).

Deutschland hatte sich dem Ziel der Elimination von Masern und Röteln in Europa, welches von der WHO beschlossen wurde, mit dem „Interventionsprogramm Masern, Mumps, Röteln“ angeschlossen, das auch den verbesserten Schutz vor einer Mumpsinfektion zum Ziel hat (RKI, 1999). Im Jahr 2010 wurde die Elimination von Masern und Röteln bis zum Jahr 2015 als Ziel formuliert, konnte jedoch in den einzelnen Ländern, so auch in Deutschland, nicht umgesetzt werden (WHO, 2010). Um dennoch eine Elimination zu erreichen, wurde der „Nationale Aktionsplan 2015-2020 zur Elimination der Masern und Röteln in Deutschland“ formuliert, welcher die Elimination als oberstes Ziel festgelegt hat. Im Zuge dessen soll die Bevölkerung über Masern und Masernimpfung aufgeklärt sowie die Impfquoten erhöht werden. Auch wenn sich der Aktionsplan in erster Linie auf Masern und Röteln fokussiert, ist eine Senkung der Inzidenz der Mumpsinfektionen ebenfalls Ziel der Maßnahmen (BMG, 2015). Generell ist eine Elimination dieser Viren möglich, da sie den Menschen als einzigen natürlichen Wirt infizieren, die Infektionen nicht persistieren und Impfstoffe, die einen wirksamen Schutz induzieren, zur Verfügung stehen. Die weltweite Ausrottung der Viren, die Eradikation, ist Ziel dieser Maßnahmen.

1.1.4 Molekularbiologie

Mit der Adsorption des Viruspartikels an zelluläre Oberflächenstrukturen beginnt der Replikationszyklus von MuV. Nach der Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran, wird das Nukleocapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt. Dort katalysieren virale Proteine die Transkription und Replikation des Genoms, während die zelluläre Translationsmaschinerie neue virale Proteine synthetisiert. An der Zellmembran werden die neuen Nukleocapside zusammen mit den viralen Proteinen verpackt und als infektiöse Partikel durch Abknospung freigesetzt. In Abbildung 2 ist der Replikationszyklus schematisch dargestellt.

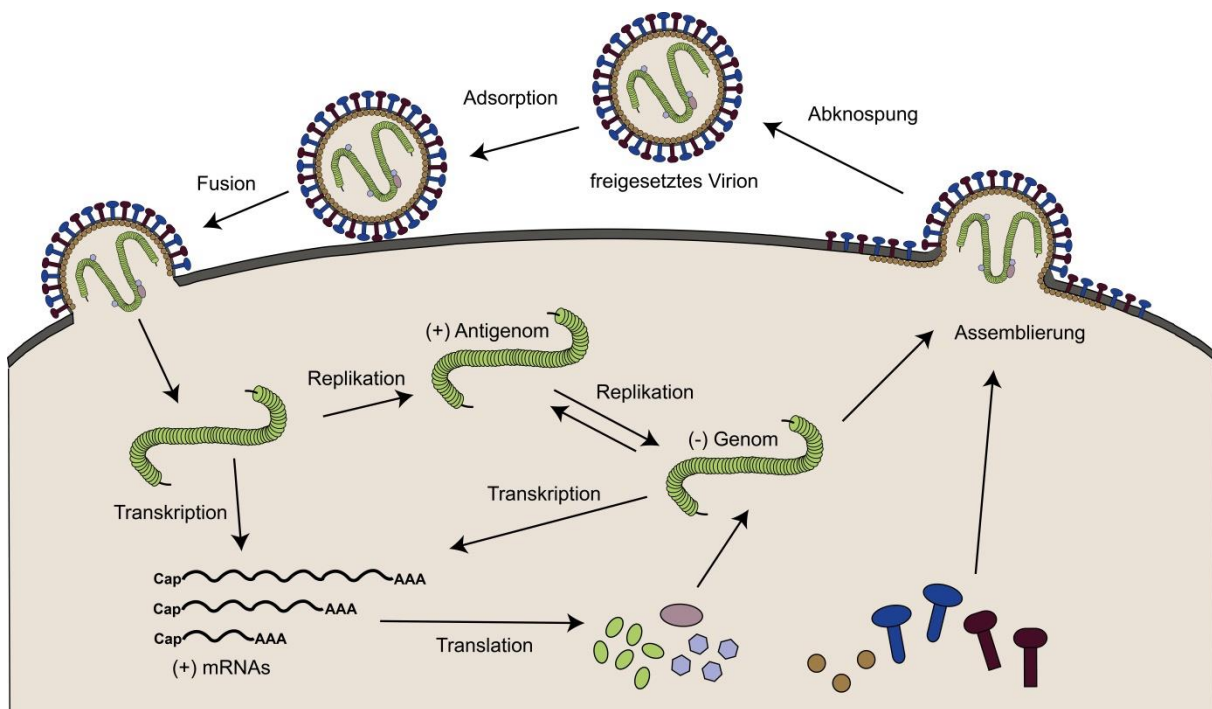


Abbildung 2: Replikationszyklus des Mumpsvirus.

Schematische Darstellung des Replikationszyklus (nach Harrison *et al.*, 2010). Nach der HN-Protein-vermittelten Adsorption des Virions an Sialylsäuren kommt es zur F-Protein-vermittelten Fusion der Virushüllmembran mit der Zellmembran und das Nukleocapsid wird ins Zytoplasma freigesetzt. Hier finden die Transkription und Replikation unter Erzeugung eines Antigenoms positiver Orientierung statt, katalysiert durch virale Proteine. Neue virale Proteine werden von der zellulären Translationsmaschinerie synthetisiert und zusammen mit dem Genom an der Zellmembran zu neuen Virionen verpackt, die mittels Abknospung freigesetzt werden.

Das HN-Protein, ein Typ-II-Membranprotein, vermittelt die Adsorption an Sialylsäuren (N-Acetyl-Neuraminsäuren), die als endständige Zuckereinheiten von Oligosaccharidketten bei Glykolipiden und Glykoproteinen vorkommen. Zusätzlich hat das HN-Protein eine Neuraminidaseaktivität und kann Sialylsäuren abspalten, um z.B. eine effektive Freisetzung der neuen Viruspartikel zu bewirken (Modrow *et al.*, 2010). Im Verlauf der Adsorption kommt es zu einer Konformationsänderung des F-Proteins, einem ebenfalls in der Virusmembran befindlichen Typ-I-Membranprotein. Dieses wird als Vorläuferpolypeptid F0 synthetisiert und

während des Reifeprozesses von einer zellulären Protease prozessiert. Die Untereinheiten F1 und F2 bleiben durch eine Disulfidbrücke verbunden. Durch die Proteolyse wird in der Untereinheit F1 ein N-terminaler hydrophober Bereich exponiert, der als fusogene Domäne bezeichnet wird. Aufgrund der Konformationsänderung gelangt dieser in die Nähe der Zellmembran, in die er sich mittels hydrophober Wechselwirkungen einlagert. Dies führt zu einem Verschmelzen der Hüllmembran des Viruspartikels mit der Zellmembran und das Nukleocapsid gelangt in das Zytoplasma (Lamb & Jardetzky, 2007; Modrow *et al.*, 2010).

Die Synthese der viralen Proteine sowie die Replikation des Genoms werden von den viralen Proteinen des Nukleocapsids katalysiert. Das L-Protein übt dabei die Funktion einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase aus, dessen Funktion von der Interaktion mit dem P- und dem N-Protein abhängig ist. Die Transkription beginnt bei der Leader-Sequenz am 3'-Ende des Genoms mit der Synthese einer kurzen RNA, die vermutlich eine regulatorische Funktion ausübt, und bricht vor dem N-Gen ab (Castaneda & Wong, 1990). Der Polymerase-Komplex bleibt mit dem Genom assoziiert und beginnt bei der S-Konsensussequenz des N-Gens mit der Synthese einer zum N-Gen komplementären mRNA. Die Reaktion wird am Ende des Gens im Bereich der E-Konsensussequenz gestoppt und beginnt nach dem Überspringen der intergenischen Nukleotide erneut bei der S-Konsensussequenz des P-Gens. Diese Vorgänge wiederholen sich für alle weiteren Genbereiche, so dass am Ende der Synthese sieben verschiedene mRNA-Spezies vorliegen (Conzelmann, 1998). Das L-Protein katalysiert auch die Polyadenylierung am 3'-Ende sowie das Hinzufügen von Cap-Gruppen am 5'-Ende der synthetisierten mRNAs, wobei besonders der C-Terminus des L-Proteins eine entscheidende Funktion ausübt (Nishio *et al.*, 2011). Da der Transkriptionsmechanismus nicht immer erfolgreich ist und der Polymerase-Komplex manchmal beim Überspringen der intergenischen Nukleotide vom Genom abfällt, bildet sich während der Transkription ein Gradient der synthetisierten mRNA-Spezies in Transkriptionsrichtung aus. Der Anordnung der Gene auf dem Genom entsprechend, liegen für das N-Protein die meisten und für das L-Protein die wenigsten mRNA-Moleküle vor. Diese Mengenverteilung spiegelt sich auch im Verhältnis der von der zellulären Translationsmaschinerie synthetisierten viralen Proteine wider (Conzelmann, 1998).

Mittels des Mechanismus des RNA-Editings werden während der Transkription von dem Gen des P-Proteins drei verschiedene mRNA-Transkripte gebildet und in drei unterschiedliche Proteine übersetzt. Wird die mRNA kolinear zum P-Gen gebildet, wird das V-Protein synthetisiert. Durch das Einfügen von zwei oder vier Guanodin-Resten wird die Synthese der Proteine P bzw. I ermöglicht (Paterson & Lamb, 1990). Dabei rückt die Polymerase beim Erreichen einer Erkennungssequenz auf dem Template-Strang zurück und ermöglicht so die Insertion unter Ausnutzung der nicht-destabilisierenden Guanin-Uracil-Basenpaarung (Kolakofsky *et al.*, 2005). Für das V-Protein wurde ein Einfluss auf die Virulenz von MuV durch

die Hemmung des Interferon (IFN)- sowie des IL-6 (Interleukin 6)-Signalwegs gezeigt (Xu *et al.*, 2012), dagegen ist die Funktion des I-Proteins bisher noch nicht bekannt.

Die Replikation des Genoms ist von der Synthese eines durchgängigen RNA-Transkripts in positiver Orientierung abhängig. Die Menge der synthetisierten N-Proteine ist dabei für das Umschalten der Transkription zur Replikation entscheidend. Liegen sie in ausreichender Anzahl vor, binden sie an die Leader-RNA und führen zu einem Überlesen der E-Konsensussequenzen, wodurch der Stopp der Transkription unterbunden wird. Bei diesem als Antitermination bezeichneten Vorgang wird ein durchgängiges RNA-Molekül positiver Orientierung (Antigenom) gebildet, welches über seine gesamte Länge mit N-Proteinen komplexiert ist (Modrow *et al.*, 2010). Ein N-Protein bindet dabei jeweils an sechs Nukleotide. Für den effizienten Ablauf der Replikation ist es daher notwendig, dass das Genom ein Vielfaches von sechs aufweist und damit der „*rule of six*“ entspricht (Kolakofsky *et al.*, 1998). Das Antigenom wird vom Polymerase-Komplex als Template für die Synthese neuer negativ-Strang RNA-Genome verwendet, die ebenfalls mit N-Proteinen komplexiert werden (Modrow *et al.*, 2010).

Gleichzeitig zur Replikation werden die anderen viralen Proteine synthetisiert, wobei das HN- und das F-Protein im Golgi-Apparat modifiziert werden und sich in Lipid Raft-Bereichen in der Zellmembran anlagern. Mit ihnen interagieren M-Proteine, die eine Matrixproteinschicht an der Zellmembran bilden und gleichzeitig mit den neu synthetisierten Nukleocapsiden wechselwirken. Damit spielt das M-Protein eine wichtige Rolle bei der Virus-Assemblierung. Neue Viruspartikel werden schließlich durch Ausstülpung der Zellmembran freigesetzt (Harrison *et al.*, 2010).

1.1.5 Das SH-Protein

MuV besitzt, wie einige andere Paramyxoviren, zwischen den Genen *F* und *HN* ein Gen, welches für ein kleines, hydrophobes Protein kodiert. Dieses *small hydrophobic* (SH)-Protein umfasst 57 Aminosäuren (AS) und ist als Typ-I-Membranprotein beschrieben, das in der Membran transfizierter Zellen exprimiert wird (Takeuchi *et al.*, 1996). Ein für das SH-Protein kodierendes Gen wurde erstmals 1985 für das Parainfluenza Virus Typ 5 (PIV5) beschrieben (Hiebert *et al.*, 1985). Für MuV wurde das *SH*-Gen 1988 das erste Mal nachgewiesen (Elango *et al.*, 1988). Auch das Respiratorische Synzytialvirus (RSV), das humane Metapneumovirus (hMPV) sowie das J Paramyxovirus (JPV) und das Beilongvirus (BeV) kodieren für SH-Proteine (Bukreyev *et al.*, 1997; Jack *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2005; van den Hoogen *et al.*, 2002). Die SH-Proteine verschiedener Paramyxoviren weisen keine Sequenzhomologien auf, sind aber auf dem Genom in der gleichen Position lokalisiert und besitzen eine hydrophobe Transmembrandomäne. Sie unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer Größe, wobei PIV5 mit einer Länge von 44 AS für das kleinste und hMPV mit einer Länge von 183 AS für das größte SH-Protein kodiert. Ebenso wie

für MuV ist auch das JPV SH-Protein als Typ-I-Membranprotein beschrieben, während PIV5, RSV und hMPV für SH-Proteine kodieren, die Typ-II-Membranproteinen zugeordnet werden (Biacchesi *et al.*, 2004; Hiebert *et al.*, 1988; Li *et al.*, 2011; Olmsted & Collins, 1989) und damit eine andere Orientierung in der Membran aufweisen. Das MuV SH-Protein wurde bisher nicht als Bestandteil des Virions identifiziert, wohingegen die SH-Proteine von PIV5, RSV und hMPV in aufgereinigten Virionen nachgewiesen wurden (Collins *et al.*, 1990; de Graaf *et al.*, 2013; He *et al.*, 1998).

Für das SH-Protein von RSV wurde die Bildung von Kanalstrukturen beobachtet, bei denen sich das SH-Protein zu Pentameren zusammenlagert. Es wurde gezeigt, dass diese Kanäle Ionen pH-abhängig transportieren können. Das RSV SH-Protein wird daher als Viroporin beschrieben (Carter *et al.*, 2010; Gan *et al.*, 2012). Auch für das SH-Protein von hMPV wurde die Bildung von Oligomeren und die Beeinflussung der Membranpermeabilität gezeigt (Masante *et al.*, 2014). Für MuV wurden bisher keine Studien hinsichtlich der Oligomerisierung des SH-Proteins veröffentlicht.

Um die Funktion des SH-Proteins zu untersuchen, wurden rekombinante Viren hergestellt, die über eine Deletion des *SH*-Gens verfügen (Δ SH). Da diese Viren in Zellkultursystemen angezüchtet werden können, ist das SH-Protein nicht essentiell für die Virusreplikation in Zellkultur. Widersprüchliche Ergebnisse wurden hinsichtlich der Replikation und der Ausprägung des zytopathischen Effekts (CPE) von Δ SH-Paramyxoviren im Vergleich zu den Wildtyp-Viren veröffentlicht. Dabei reichen die Ergebnisse von einem verlangsamten (Jin *et al.*, 2000; Malik *et al.*, 2011), über ein gleichbleibendes (de Graaf *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2011) bis zu einem schnelleren Wachstum der Δ SH-Viren (Bukreyev *et al.*, 1997; He *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2003; Techaarpornkul *et al.*, 2001). Alle veröffentlichten Studien zeigen dagegen, dass das SH-Protein die Tumornekrosefaktor Alpha (TNF α)-vermittelte Immunantwort beeinflusst. Für die SH-Proteine von MuV, RSV, PIV5 und JPV ist die Reduktion der TNF α -Freisetzung sowie die Hemmung der Translokation der Untereinheit p65 des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) im Infektionskontext beschrieben. Für transient exprimiertes SH-Protein wurde zudem die Reduktion der TNF α -vermittelten Aktivierung von NF- κ B gezeigt (Fuentes *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2014; Wilson *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2011). Dabei ist der genaue Mechanismus dieser SH-vermittelten NF- κ B-Inhibition nicht aufgeklärt. Aufgrund des Eingreifens in die Immunantwort des Wirts wird für das SH-Protein die Funktion eines Virulenzfaktors vermutet. Eine verzögerte Immunantwort kann einen Vorteil bei der Virusreplikation darstellen und dem Virus mehr Zeit für die Replikation und die Ausbreitung im Organismus ermöglichen. Diese Vermutung wird durch *in vivo*-Studien unterstützt: So wurde für RSV, PIV5 und JPV eine Attenuierung des Δ SH-Virus gegenüber dem Wildtypvirus in

unterschiedlichen Tiermodellen, wie Mäusen, Baumwollratten sowie Affen festgestellt (Bukreyev *et al.*, 1997; He *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2015; Schickli *et al.*, 2012; Whitehead *et al.*, 1999). Für MuV existiert bis heute kein geeignetes Tiermodell, so dass *in vivo*-Studien schwierig durchzuführen sind und Ergebnisse älterer Studien vor allem wegen der unnatürlichen Eintrittsrouten fraglich erscheinen. Beim Vergleich von Mäusen, Frettchen und Rhesusaffen entwickelten auf natürlichem Weg über Aerosole infizierte Rhesusaffen als einzige Tierart Krankheitssymptome (Xu *et al.*, 2013). Das Ratten-Neurovirulenz-Modell kann aber Aufschluss über das Neurovirulenzpotential verschiedener MuV geben und wurde verwendet, um Δ SH-Viren mit Wildtypviren zu vergleichen. Hierbei zeigten die untersuchten Δ SH-Viren eine geringere Neurovirulenz im Vergleich zu den Wildtypviren, so dass eine Attenuierung aufgrund der Deletion des *SH*-Gens vermutet wird (Malik *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011). Bei fast allen Studien zur Untersuchung der Funktion des SH-Proteins von Paramyxoviren wurden rekombinante Viren verwendet, bei denen das komplette *SH*-Gen deletiert wurde. Dies stellt jedoch einen gravierenden Eingriff in die Struktur des Genoms dar, der sich in Abweichungen bezüglich des während der Replikation gebildeten mRNA-Gradienten äußert. Damit können strukturelle Änderungen des Genoms einen starken Einfluss auf die Virulenz und Pathogenität des Virus haben. Eine andere Möglichkeit rekombinante Viren zu erzeugen, bei denen die Expression des SH-Proteins unterbunden ist, besteht in dem Einfügen von Stoppkodons in das *SH*-Gen, wodurch die Translation eines funktionalen Proteins verhindert wird, die Genomstruktur aber unbeeinflusst bleibt. Die einzige Studie, bei der die Expression des SH-Proteins auf diese Weise unterbunden wurde, zeigt zwar für das Δ SH-Virus mit komplett deletiertem *SH*-Gen, nicht aber für das Virus mit den eingefügten Stoppkodons (SHstop) eine Attenuierung im Ratten-Neurovirulenz-Modell (Malik *et al.*, 2011). Bei der Bewertung der Ergebnisse aller Studien betreffend der Funktion des SH-Proteins müssen diese Aspekte daher mit einbezogen werden.

1.2 Pathogenerkennung durch das angeborene Immunsystem

Als erste Antwort auf mikrobielle Infektionen unterscheidet das angeborene Immunsystem zwischen eigenen und nicht-eigenen Komponenten. Dabei spielen Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs), die intrazellulär sowie in der Zellmembran von Immunzellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs), aber auch von Nicht-Immunzellen exprimiert werden, eine entscheidende Rolle. PRRs vermitteln die erste Erkennung von Strukturen, die bei mikrobiellen Organismen konserviert sind und als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) bezeichnet werden. Auch körpereigene Moleküle von beschädigten Zellen (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) werden von PRRs erkannt. Die Erkennung dieser Strukturen führt über

Signalkaskaden zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, zu denen neben NF- κ B auch IFN-Regulationsfaktoren (IRFs) und das Aktivator-Protein-1 (AP-1) gehören. Die Hochregulation der Transkription von Genen, die an Entzündungsantworten beteiligt sind, wird auf diese Weise induziert. Bei einer Fehlregulation oder übermäßig aktivierten angeborenen Immunantwort kann es zu krankhaften Entzündungen und zum Auftreten von inflammatorischen und Autoimmunerkrankungen sowie zur Entstehung von Krebs kommen (Liu & Cao, 2016; Takeuchi & Akira, 2010).

Es werden verschiedene Klassen von PRRs unterschieden. Zu den Transmembranproteinen gehören Toll-like Rezeptoren (TLRs), die eindringende Pathogene außerhalb der Zelle und in intrazellulären Endosomen und Lysosomen erkennen. Abhängig vom Rezeptor werden Strukturen bakteriellen oder viralen Ursprungs erkannt (Akira *et al.*, 2006). Die Aktivierung von TLRs führt zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie zur Aktivierung der Phagozytose zum Abtöten intrazellulärer Pathogene (Geng *et al.*, 2015; Liu & Cao, 2016). C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLRs) bilden eine weitere Familie von Transmembranrezeptoren, die Kohlenhydrate an Bakterien, Viren oder Pilzen erkennen. Sie können entweder die TLR-vermittelte Signalweitergabe modulieren oder ebenfalls zur Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen führen (Geijtenbeek & Gringhuis, 2009). Zu den zytoplasmatischen Rezeptoren zählen RIG-I-ähnliche Proteine (*retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors*, RLRs). Bei diesen handelt es sich um Helikasen, die doppelsträngige RNA (dsRNA)-Moleküle erkennen, welche von dsRNA-Virus-Genomen oder von Zwischenprodukten der Replikation von ssRNA-Viren stammen. Daher sind RLRs essentiell für die Erkennung von Viren durch die angeborene Immunantwort und damit für die Kontrolle der viralen Replikation und Verbreitung von Viren. Ihre Aktivierung führt vor allem zur Produktion von Typ-I-IFN (Liu & Cao, 2016; Takeuchi & Akira, 2010). Neben RLRs sind auch verschiedene zytosolische DNA-Sensoren, wie die zyklische GMP-AMP Synthase (cGAS) an der Induktion der anti-viralen Immunantwort beteiligt (Liu & Cao, 2016). Die Abwehr intrazellulärer Bakterien wird auch über die Erkennung von Bestandteilen bakterieller Zellwände durch NOD-ähnliche Rezeptoren (*nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*, NLRs) eingeleitet. Diese führen zusammen mit TLRs, von denen einige Vertreter ebenfalls Bestandteile bakterieller Zellwände detektieren, zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (Takeuchi & Akira, 2010). Ebenso kann der Mechanismus der Autophagozytose zur Eliminierung der eindringenden Bakterien induziert werden (Travassos *et al.*, 2010).

Um die Aktivierung oder das Abschalten spezifischer Gene zu regulieren, wird die angeborene Immunantwort auf verschiedenen Ebenen reguliert, die auch untereinander verknüpft sind. Bei der Regulation der Transkription spezifischer Gene spielen epigenetische Mechanismen, wie DNA-Methylierungen, Histonmodifikationen und nicht-kodierende RNAs eine wichtige Rolle, die

den Chromatinstatus sowie die Genexpression kontrollieren (Liu & Cao, 2016). Auch posttranslationale Modifikationen tragen zur Regulation bei, indem sie die Funktion und Aktivität bereits existierender Signalmoleküle auf positive oder negative Weise verändern können. Fast alle kritischen Komponenten der Signalweitergabe über PRRs, wie Rezeptoren, Adaptoren, Enzyme und Transkriptionsfaktoren, können auf diese Weise reguliert werden. Dabei finden sowohl konventionelle Modifikationen wie Ubiquitinierungen und Phosphorylierungen sowie unkonventionelle Modifikationen, zu denen Methylierungen, Acetylierungen und SUMOylierungen gehören, statt (Liu *et al.*, 2016). Synergetische und antagonistische Interaktionen zwischen TLRs, RLRs und NLRs tragen darüber hinaus zu einer starken Vernetzung der Signalweitergabe über PRRs als Antwort auf die große Vielfalt an PAMPs bei (Liu & Cao, 2016).

1.3 Der NF- κ B-Signalweg

1.3.1 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

NF- κ B ist die Bezeichnung für eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die die Expression einer Vielzahl von Genen regulieren. Diese sind sowohl an der Immun- und Inflammationsantwort beteiligt, aber auch für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Zellen entscheidend. NF- κ B-Transkriptionsfaktoren werden durch eine große Anzahl verschiedener Stimuli aktiviert, zu denen Zytokine, Infektionserreger oder Verletzungen der Zelle zählen und die eine schnelle Umprogrammierung der Genexpression erfordern. In Säugetierzellen kommen fünf verschiedene NF- κ B-Proteine vor, die Homo- oder Heterodimere bilden: RelA (p65), RelB, c-Rel, p105 (NF- κ B1) und p100 (NF- κ B2) (Verstrepen *et al.*, 2008). Ihnen gemeinsam ist eine hochkonservierte N-terminale Rel-Homologie-Domäne (RHD), die ihre Dimerisierung, die Translokation in den Nukleus sowie die DNA-Bindung vermittelt. Bei den Proteinen p105 und p100 handelt es sich um Vorläuferproteine, die durch Proteolyse in die DNA-bindenden Proteine p50 und p52 gespalten werden. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Familie weisen diese keine C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) auf, welche die Genexpression aktiviert. Sie bilden durch ihre Interaktion mit p65, RelB oder C-Rel funktionale NF- κ B-Dimere (Liu & Chen, 2011). Im kanonischen Signalweg besteht NF- κ B meist aus den Untereinheiten p65 und p50 (Verstrepen *et al.*, 2008).

1.3.2 Aktivierung von NF- κ B

In nicht-stimulierten Zellen wird NF- κ B durch die Bindung an inhibitorische Proteine der κ B-Familie (I κ B), I κ B α , I κ B β oder I κ B ϵ in einem inaktiven Zustand im Zytoplasma gehalten. Diese Interaktion wird durch die RHD-Domäne von NF- κ B und die Ankyrin-Wiederholungen von I κ B vermittelt (Verstrepen *et al.*, 2008). Die Aktivierung von NF- κ B über die meisten Signalwege führt zu einer Degradation von I κ B α und wird als der kanonische Signalweg bezeichnet (Liu & Chen, 2011). Hierbei führt die Stimulation zur Aktivierung des I κ B Kinasekomplexes (IKK), der aus den beiden katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β besteht sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ , die auch als NEMO (*NF- κ B essential modulator*) bezeichnet wird. Die Aktivierung des IKK-Komplexes bewirkt die Phosphorylierung von I κ B α an zwei Serinresten (Ser32 und Ser36), katalysiert von IKK β . Dies führt zur K48-Polyubiquitinierung von I κ B α durch einen Ubiquitin-Ligase-Komplex und zur anschließenden Degradation durch das 26S Proteasom (Verstrepen *et al.*, 2008). Durch die Ablösung von I κ B α wird die Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization signal*, NLS) von NF- κ B zugänglich (Gilmore, 2006) und die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern sowie dessen Bindung an Promotoren von Genen mit spezifischen NF- κ B-Bindesequenzen erfolgt (Karin & Ben-Neriah, 2000). Die optimale Aktivierung von NF- κ B ist darüber hinaus von der Phosphorylierung der NF- κ B-Untereinheiten abhängig. p65 kann an mehreren Serinresten phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung an Ser536 wird von verschiedenen Kinasen, beispielsweise von IKK β nach TNF α -Stimulation, katalysiert und führt meistens zu einer Erhöhung des Transaktivationspotenzials von p65 (Sakurai *et al.*, 1999; Viatour *et al.*, 2005).

In B-Lymphozyten kann NF- κ B auch mittels des nicht-kanonischen Signalwegs aktiviert werden. Bei diesem wird p100, das ebenfalls Ankyrin-Wiederholungen aufweist und den Transkriptionsfaktor im inaktiven Zustand hält, durch das Proteasom nur teilweise abgebaut, so dass der DNA-bindende N-Terminus (p52) intakt bleibt. Zusammen mit einer TAD-aufweisenden NF- κ B-Untereinheit erfolgt anschließend die Translokation von p52 in den Zellkern. Der Abbau wird durch die Phosphorylierung von p100, katalysiert durch IKK α , und die darauffolgende K48-Polyubiquitinierung ausgelöst (Liu & Chen, 2011).

Über welche Proteine die Aktivierung des IKK-Komplexes erfolgt, ist abhängig von Stimulus und Rezeptor. So bindet das Zytokin TNF α an den Tumornekrosefaktor Rezeptor 1 (TNFR1) (Tartaglia & Goeddel, 1992) und das Zytokin IL-1 β an den Interleukin-1 Rezeptor 1 (IL-1R1) (Dinarello, 1996). Auch die Aktivierung von TLRs führt zur NF- κ B-regulierten Genexpression. Dabei werden bakterielle Produkte wie triacetylierte Lipoproteine von TLR2 in Kombination mit TLR1 erkannt (Doyle & O'Neill, 2006) und Lipopolysaccharide (LPS) von TLR4 (Hoshino *et al.*, 1999). Der zumeist intrazellulär exprimierte TLR3 erkennt dagegen dsRNA-Moleküle (Alexopoulou *et al.*, 2001). Die Bindung des Stimulus resultiert bei allen aufgeführten

Rezeptoren in der Rekrutierung von Adapterproteinen zum aktivierten Rezeptor, wobei der IKK-Komplex jeweils über unterschiedliche Proteine und Modifikationen aktiviert wird. In Abbildung 3 sind die beschriebenen Rezeptoren zusammen mit ihren Liganden schematisch dargestellt.

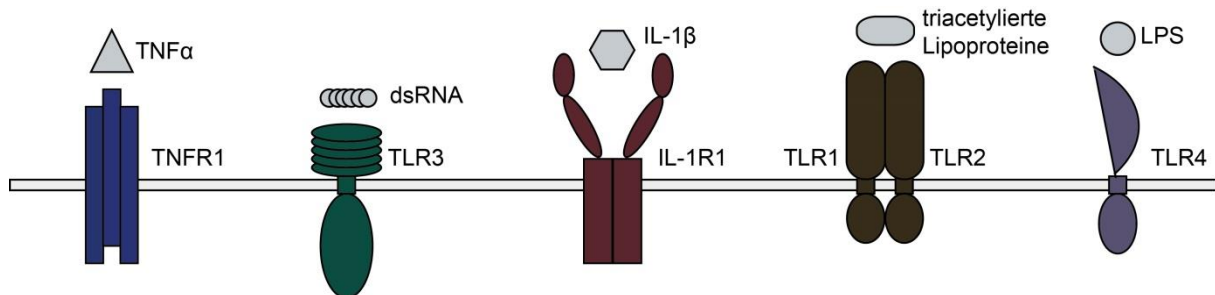


Abbildung 3: NF-κB-Aktivierung durch verschiedene Rezeptoren und deren Liganden.

Beispielhafte Darstellung verschiedener Rezeptoren, deren Aktivierung durch die dargestellten Liganden zur Aktivierung von NF-κB führt.

1.3.2.1 TNFR1

Die Aktivierung des in der Zellmembran lokalisierten TNFR1 führt, wie schematisch in Abbildung 4 gezeigt, zu dessen Trimerisierung. Mittels der Todesdomäne des aktivierten Rezeptors kommt es zur Rekrutierung des Adapterproteins TRADD (*TNFR1 associated death domain protein*), welches ebenfalls eine solche Domäne aufweist. Dies ermöglicht die Bindung von RIP1 (*receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*) sowie der Proteine TRAF2 und TRAF5 (*TNF receptor-associated factor 2 and 5*) an den Rezeptorkomplex (Hsu *et al.*, 1996a; Hsu *et al.*, 1996b; Tada *et al.*, 2001). Die Rekrutierung von TRAF2 führt außerdem zur Bindung der Proteine cIAP1 und cIAP2 (*cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2*) an den Komplex. Diese fungieren zusammen mit dem Protein Ubc5 (*ubiquitin-conjugating enzyme 5*) als Ubiquitin-Ligasen und katalysieren die K63-Polyubiquitinierung von RIP1 (Liu & Chen, 2011; Mahoney *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009). An die Polyubiquitinketten binden die Proteine TAB2 und TAB3 (*transforming growth factor (TGF)-beta-activated kinase 1-binding protein 2 and 3*) und induzieren dadurch die Bindung sowie die Aktivierung von TAK1 (*TGF-beta-activated kinase 1*) über Autophosphorylierung (Kanayama *et al.*, 2004). Ebenso wird der IKK-Komplex über die Bindung von IKK γ an die Polyubiquitinketten von RIP1 rekrutiert (Ea *et al.*, 2006). TAK1 besitzt eine Kinaseaktivität und aktiviert den IKK-Komplex über die Phosphorylierung von IKK β an zwei Serinresten (Ser177 und Ser181) (Wang *et al.*, 2001a).

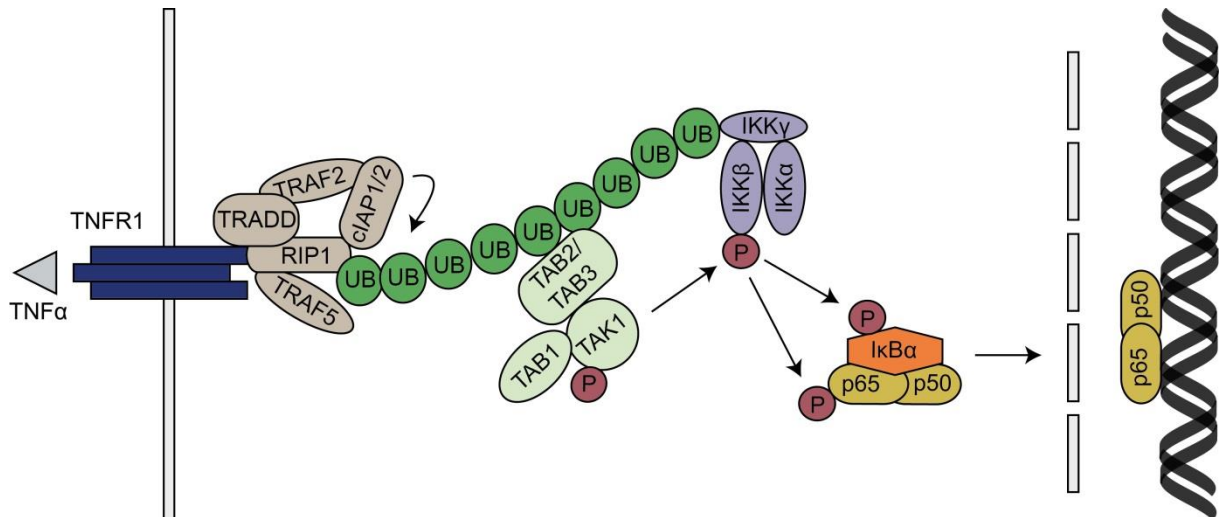


Abbildung 4: Aktivierung von NF-κB über den TNFR1.

Die Bindung von TNF α an den TNFR1 führt zu dessen Trimerisierung und der Rekrutierung von TRADD, RIP1, TRAF2, TRAF5, cIAP1 und cIAP2 zum aktivierten Rezeptor. cIAP1 und cIAP2 katalysieren die Polyubiquitinierung von RIP1. An die Polyubiquitinketten binden TAB2 und TAB3, dies induziert die Autophosphorylierung von TAK1. Durch die Bindung von IKK γ an die Polyubiquitinketten wird der IKK-Komplex rekrutiert. TAK1 aktiviert diesen durch die Phosphorylierung von IKK β . IKK β katalysiert die Phosphorylierung von I κ B α und bewirkt so dessen Polyubiquitinierung und den nachfolgenden Abbau durch das Proteasom. IKK β katalysiert auch die Phosphorylierung der NF- κ B-Untereinheit p65. Durch den Abbau seines Inhibitors wird die Translokation von NF- κ B (dargestellt sind die Untereinheiten p65 und p50) in den Zellkern ermöglicht, wo der Transkriptionsfaktor an die Promotoren von Genen mit NF- κ B-Bindesequenzen binden kann.

1.3.2.2 IL-1R1

IL-1R1 gehört wie auch die TLRs zur IL-1R/TLR-Superfamilie, deren Vertreter durch das Vorhandensein einer intrazellulären Toll-IL-1R-Domäne (TIR) charakterisiert sind. Durch die Bindung von IL-1 β an IL-1R1 assoziiert dieser mit dem IL-1-Rezeptor-akzessorischen Protein (IL-1RAcP), um einen funktionalen Rezeptorkomplex zu bilden (Abb. 5) (Huang *et al.*, 1997). Daraufhin wird das TIR-Domäne enthaltene Protein MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) an den Komplex rekrutiert, welches für die Bindung von IRAK1 und IRAK4 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 1 and 4*) zusammen mit den Adapterproteinen Tollip (*toll interacting protein*) und TRAF6 sorgt (Burns *et al.*, 2000; Wesche *et al.*, 1997). IRAK4 wird autophosphoryliert. Dies führt zur Phosphorylierung von IRAK1, welches dadurch zusammen mit TRAF6 vom Rezeptorkomplex dissoziiert, aber weiterhin an der Zellmembran lokalisiert bleibt (Verstrepen *et al.*, 2008). An den Komplex aus IRAK1 und TRAF6 binden anschließend die Proteine TAK1, TAB1 sowie TAB2 und TAB3 (Jiang *et al.*, 2002). Zusammen mit diesen löst sich TRAF6 von der Membran und interagiert im Zytoplasma mit Ubc13. Diese Interaktion führt zur von TRAF6 und Ubc13 katalysierten K63-Polyubiquitinierung von TRAF6 (Verstrepen *et al.*, 2008). Durch Bindung von TAB2 und TAB3 an die Polyubiquitinketten wird, wie auch bei der Signalweitergabe über den TNFR1, die Aktivierung von TAK1 und die darauffolgende

Phosphorylierung von IKK β induziert. In Abbildung 5 ist die Aktivierung von NF- κ B über den IL-1R1 schematisch gezeigt.

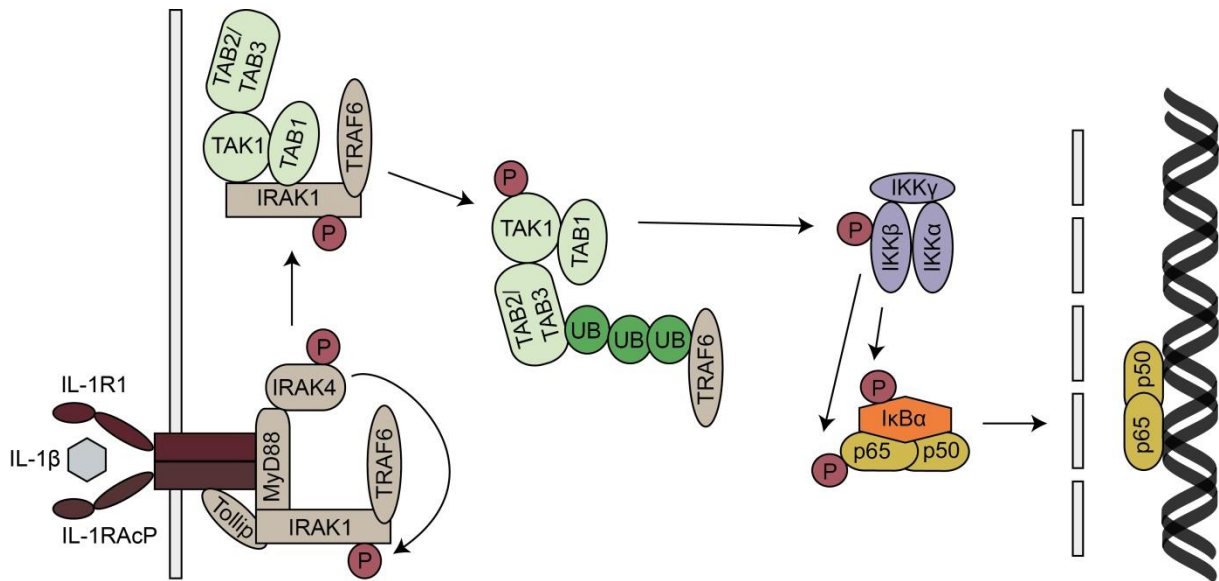


Abbildung 5: Aktivierung von NF- κ B über den IL-1R1.

Durch die Bindung von IL-1 β an IL-1R1 assoziiert dieser mit IL-1RAcP. Dadurch werden die Proteine MyD88, IRAK1, IRAK4, Tollip und TRAF6 an den Komplex rekrutiert. Die Autophosphorylierung von IRAK4 führt zur Phosphorylierung von IRAK1, welches zusammen mit TRAF6 den Rezeptorkomplex verlässt, aber membranassoziiert bleibt. An diese beiden Proteine binden TAK1, TAB1, TAB2 und TAB3. Daraufhin verlässt TRAF6 zusammen mit TAK1, TAB1, TAB2 und TAB3 die Membran. Im Zytoplasma wird TRAF6 durch die Interaktion mit Ubc13 polyubiquitiniert und über die Bindung von TAB2 und TAB3 an die Polyubiquitinketten wird TAK1 aktiviert. Dies führt wie in Abb. 3 beschrieben zur Aktivierung des IKK-Komplexes durch die Phosphorylierung von IKK β .

1.3.2.3 TLR3

TLR3 stellt eine Ausnahme aller bisher bekannten TLRs dar, da die Signalweitergabe über diesen Rezeptor unabhängig von MyD88 stattfindet. Stattdessen wird durch die Rezeptoraktivierung das ebenfalls eine TIR-Domäne aufweisende Adapterprotein TRIF (*TIR domain-containing adapter protein inducing interferon beta*) rekrutiert (Abb. 6) (Yamamoto *et al.*, 2003). Dieses besitzt in seinem N-Terminus ein TRAF6-Bindemotiv sowie in seinem C-Terminus ein Interaktionsmotiv für die Bindung an RIP1. Über diese beiden Proteine wird NF- κ B auf unabhängigen Wegen aktiviert, wobei dennoch das Zusammenwirken beider Proteine angenommen wird. Die Bindung von RIP1 an TRIF und vermutlich auch die Rekrutierung von TRAF6 lösen die K63-Polyubiquitinierung von RIP1 aus. Diese führt zur Bindung von TAB2 sowie TAB3 an die Polyubiquitinketten und induziert darüber die Aktivierung von TAK1 über Autophosphorylierung. Die aktivierte Kinase TAK1 phosphoryliert und aktiviert anschließend IKK β (Cusson-Hermance *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2003; Kawai & Akira, 2007; Vercammen *et al.*, 2008). Die Rezeptoraktivierung resultiert nicht nur in der Bindung von TRIF direkt an TLR3, sondern auch in der direkten Bindung von IRAK2. Die Interaktion von IRAK2 und TRAF6 löst die

Polyubiquitinierung von TRAF6 aus, die wahrscheinlich wie auch im IL-1R1-Signalweg von Ubc13 und TRAF6 selbst katalysiert wird. Auch an die Polyubiquitinketten von TRAF6 binden TAB2 und TAB1 und führen zur Aktivierung von TAK1 (Keating *et al.*, 2007). Abbildung 6 zeigt schematisch die Aktivierung von NF- κ B über den TLR3.

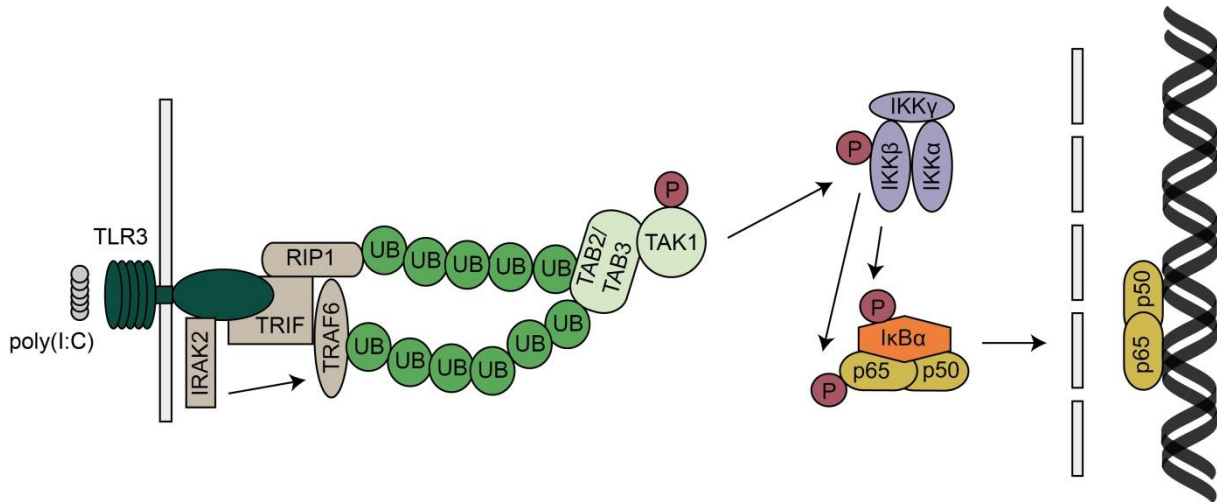


Abbildung 6: Aktivierung von NF- κ B über den TLR3.

Durch die Bindung von dsRNA wie dem synthetischen Analogon poly(I:C) (Polyriboinosinic:Polyribocytidylic Säure) an TLR3 werden die Adapterproteine TRIF und IRAK2 an den Rezeptor rekrutiert. TRIF führt zur Bindung von TRAF6 und RIP1, die NF- κ B auf unabhängigen Wegen aktivieren können. Durch die Rezeptoraktivierung werden sowohl TRAF6, wofür auch die Interaktion mit IRAK2 entscheidend ist, als auch RIP1 polyubiquitiniert und rekrutieren über ihre Polyubiquitinketten TAB1, TAB2 und TAB3. Dies führt zur Autophosphorylierung und dadurch zur Aktivierung von TAK1 und resultiert wie in Abb. 4 beschrieben in der Aktivierung des IKK-Komplexes durch die Phosphorylierung von IKK β .

1.3.3 NF- κ B-regulierte Genexpression

Die Vielzahl an Genen, die durch NF- κ B reguliert werden, macht die Bedeutung dieser Familie von Transkriptionsfaktoren als zentraler Mediator in der Immunantwort deutlich. Unter den zahlreichen Zytokinen und Chemokinen, deren Expression von NF- κ B abhängig ist und die eine pro-inflammatorische Funktion ausüben, gehören, neben TNF α und IL-1 β , die wie beschrieben ebenfalls zu den NF- κ B-Aktivatoren zählen, auch IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 und CCL5 (*C-C motif chemokine ligand 5*). Aber auch Zytokine, für die eine anti-inflammatorische Funktion beschrieben ist wie IL-10, IL-11 und IL-13, werden von NF- κ B-Zielgenen kodiert (Hinz *et al.*, 2002; Nakanishi *et al.*, 2001; Pahl, 1999; Wickremasinghe *et al.*, 2004; Xu & Shu, 2002). Auch reguliert NF- κ B die Genexpression von Rezeptoren, die für die Immunerkennung verantwortlich sind wie MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse 1-Moleküle oder Chemokin-Rezeptoren sowie TLR2 (Pahl, 1999; Wang *et al.*, 2001b). Ebenso wird die Genexpression von Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmolekülen oder Proteinen, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind, durch NF- κ B reguliert. Darüber hinaus besitzen viele Viren, die NF- κ B

aktivieren, auch NF- κ B-Bindeelemente in ihren viralen Promotoren, wie das Humane Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) oder das humane Zytomegalievirus (hCMV). Hier könnte eine geringe NF- κ B-Aktivierung zum Aufrechterhalten der chronischen Infektion beitragen (Nabel & Baltimore, 1987; Pahl, 1999; Sambucetti *et al.*, 1989).

1.3.3.1 TNF α

TNF α wurde ursprünglich als Faktor identifiziert, der zu einer rapiden Nekrose von transplantierbaren Tumoren in Mäusen führte (Carswell *et al.*, 1975). Heute wird TNF α als pro-inflammatorisches Zytokin beschrieben, das als einer der Hauptregulatoren der angeborenen Immunantwort vielfältige Funktionen hat. Es induziert eine erhöhte Expression von anderen pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-8, IFNs, TGF α und β , sowie koloniestimulierenden Faktoren, Adhäsionsmolekülen und Zytokinrezeptoren. Die Proliferation von Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen wird durch TNF α gesteigert. TNF α fördert außerdem die Expression von MHC-Antigenen, aktiviert die Phagozytose und das Einwandern von Leukozyten und übt so eine wichtige Funktion in der Abwehr gegen Bakterien und Parasiten aus. Auch an der Abwehr gegenüber Viren ist TNF α unter anderem durch die Induktion der Apoptose Virus-infizierter Zellen beteiligt. Für viele seiner Funktionen ist ein Zusammenwirken von TNF α mit anderen Mediatoren der Immunantwort entscheidend (Camussi *et al.*, 1991). Auch im ZNS ist das Zytokin in regulatorische Prozesse involviert und an der synaptischen Plastizität sowie an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt. Verschiedene rheumatische Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis sowie neurologische, kardiovaskuläre, entzündliche und respiratorische Erkrankungen sind mit einer übermäßig gesteigerten Produktion von TNF α assoziiert (Bradley, 2008; Olmos & Llado, 2014). Hauptsächlich produzieren aktivierte Makrophagen und T-Zellen TNF α , aber auch B-Zellen, NK-Zellen (natürliche Killerzellen), Endothelzellen und Fibroblasten können TNF α freisetzen. Dabei wird das Zytokin zunächst als membranständige Proform synthetisiert, von der Matrixmetalloproteinase TACE (*TNF α converting enzyme*) geschnitten und als lösliche Form sezerniert. Sowohl die membranständige als auch die lösliche Form von TNF α sind biologisch als Homotrimer aktiv (Bradley, 2008; Olmos & Llado, 2014). Die NF- κ B-regulierte Genexpression von TNF α stellt eine positive Rückkopplung für dessen Synthese dar, da die Bindung von TNF α an seinen Rezeptor die Aktivierung von NF- κ B bewirkt.

1.3.3.2 IL-1 β und IL-18

Während die Produktion vieler Zytokine wie TNF α hauptsächlich auf Transkriptionsebene reguliert wird, ist für die Freisetzung der biologisch aktiven Zytokine IL-1 β und IL-18 ein zusätzlicher proteolytischer Schritt nötig. Durch die Aktivierung von PRRs oder Zytokinrezeptoren wird die Genexpression und die nachfolgende Synthese der inaktiven Proformen von IL-1 β und IL-18, pro-IL-1 β bzw. pro-IL-18, induziert. Auch die Genexpression von Komponenten eines Multiproteinkomplexes, dem Inflammasom, wird auf diese Weise aktiviert. Dieses besteht aus mehreren Einheiten eines NLRs, wobei NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing protein 3*) den am besten charakterisierten Rezeptor darstellt, des Adapterproteins ASC (*apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain*) und Caspase-1 (Shrivastava *et al.*, 2016). Die Aktivierung des Inflammasoms führt anschließend zur proteolytischen Spaltung von pro-IL-1 β und pro-IL-18 sowie zur Freisetzung der biologisch aktiven Zytokine (Martinon *et al.*, 2002). Abhängig ist dieser zweite Schritt von unterschiedlichen Stimuli, die eine Antwort auf eine Infektion oder verschiedene Stresssignale sein können und zu einer Änderung der intrazellulären Konzentration von Kalium (K⁺)- und Calciumionen (Ca²⁺) führen. Beispielsweise kann eine hohe Konzentration an extrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) zu einem Ausströmen von K⁺ führen. Auch porenformende Toxine oder Viroporine können die Ionenkonzentration der Zelle verändern und das Inflammasom aktivieren (He *et al.*, 2016; Martinon *et al.*, 2009; Shrivastava *et al.*, 2016). Diese Aktivierung führt zunächst zur autoproteolytischen Spaltung der als inaktives Zymogen synthetisierten pro-Caspase-1 in die aktive Caspase-1, die anschließend die Proteolyse von pro-IL-1 β sowie pro-IL-18 zu den aktiven Zytokinen katalysiert (Chen & Ichinohe, 2015). Über welchen Mechanismus diese anschließend sezerniert werden, ist noch nicht geklärt. Studien zeigen, dass Pyroptose, eine Form des inflammatorischen Zelltods, welche auch durch die Aktivierung des Inflammasoms induziert werden kann, mit der Sekretion von IL-1 β über Caspase-1-abhängige Poren in der Zellmembran verknüpft ist (Bergsbaken *et al.*, 2009; Daniels & Brough, 2017). Auch über Exosomen und durch den Mechanismus der Autophagozytose kann IL-1 β sekretiert werden (Dupont *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2007). In Abbildung 7 sind die Synthese sowie die Freisetzung der Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-18 schematisch dargestellt.

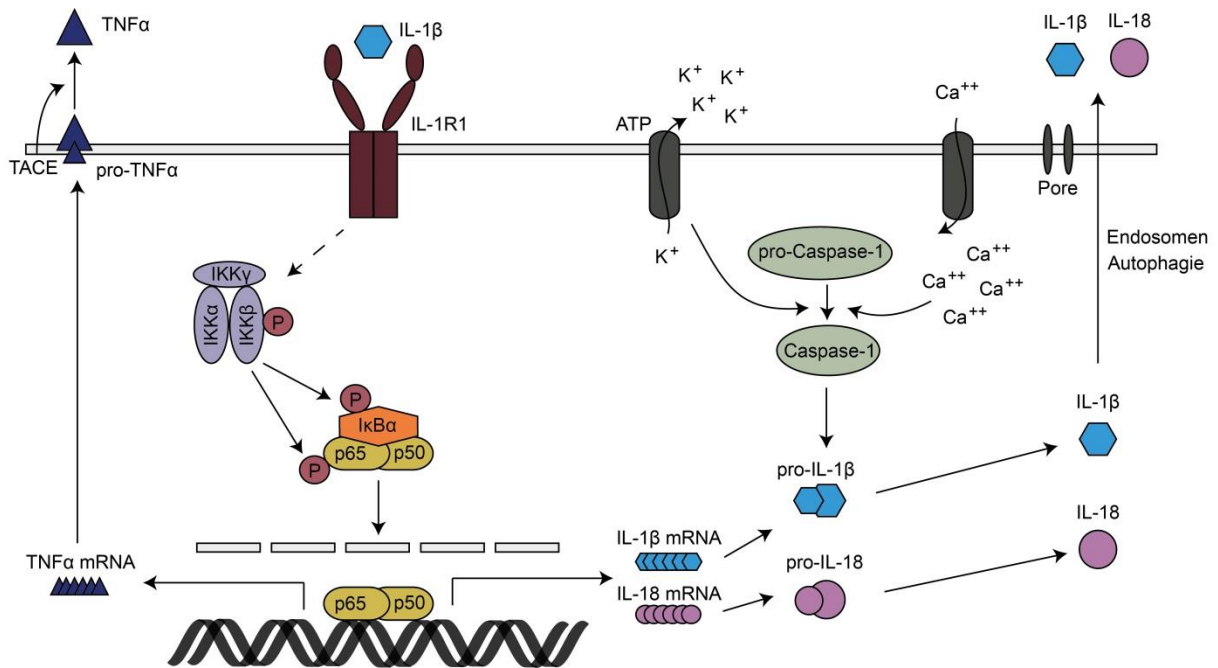


Abbildung 7: Synthese und Freisetzung der Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-18.

Die Bindung von IL-1 β an den IL-1R1 führt zur Aktivierung von NF- κ B, wie in Abb. 5 beschrieben. Der aktivierte Transkriptionsfaktor induziert die Genexpression der Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-18. Während die Produktion von TNF α hauptsächlich auf Transkriptionsebene reguliert wird und die zunächst synthetisierte membranständige Proform von TACE in die lösliche, sezernierte Form gespalten wird, ist die Freisetzung von IL-1 β und IL-18 von einem weiteren Regulationsschritt abhängig. Dabei führen das Ausströmen von K⁺ sowie der Einstrom von Ca²⁺ zur Aktivierung des Inflammasoms. Dieses besteht unter anderem aus dem Enzyme Caspase-1, welches nach seiner Aktivierung die funktionell inaktiven Proformen pro-IL-1 β und pro-IL-18 in die aktiven Zytokine spaltet. Diese können über Exosomen, Autophagozytose oder durch Poren in der Zellmembran, die durch Pyroptose gebildet werden, freigesetzt werden.

Während die Synthese und Freisetzung von IL-1 β und IL-18 durch gleichartige Prozesse bestimmt wird, ist die ausgeübte Funktion der Zytokine sehr unterschiedlich. Für IL-18 wird beschrieben, dass es die angeborene Immunantwort mit der Produktion von IFN- γ verbindet. Dieses Zytokin gehört zu den T-Helfer-(Th)-Klasse 1-Zytokinen und wird von NK-Zellen, aber auch von antigenpräsentierenden Zellen als Antwort auf Infektionen produziert. Es induziert inflammatorische Prozesse wie die Phagozytose und die intrazelluläre Beseitigung von Pathogenen wie Bakterien und Pilzen. Dies wird unter anderem durch die Hochregulation der Antigenpräsentation mittels MHC-Klasse I- und -Klasse II-Komplexen erreicht. Ebenso ist IFN- γ an der Etablierung eines antiviralen Status durch die Induktion antiviraler Enzyme wie der Proteinkinase R (PKR) entscheidend beteiligt. Diese Serin/Threonin-Kinase, die durch dsRNA aktiviert wird, phosphoryliert den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor eIF-2 (*eukaryotic initiation factor 2*) und inhibiert dadurch sowohl die virale, als auch die zelluläre Proteinsynthese. Darüber hinaus ist die PKR auch an der Aktivierung von NF- κ B unter Beteiligung des IKK-Komplexes als Antwort auf dsRNA involviert (Schroder *et al.*, 2004; Slaats *et al.*, 2016; Zamanian-Daryoush *et al.*, 2000). Studien zeigen, dass eine Stimulation von NK-Zellen

mit IL-18 in Kombination mit IL-12 zur Produktion von IFN- γ führt, während die Stimulation mit IL-18 zusammen mit IL-2 in NK-Zellen die Produktion von Th2-Zytokinen wie IL-13 induziert (Fujibayashi *et al.*, 2007). Im Unterschied zu Th1-Zytokinen sind Th2-Zytokine an anti-inflammatorischen und allergischen Prozessen sowie der Abwehr gegen parasitische Pathogene beteiligt. Th1-Zytokin-exprimierende Zellen werden als Th1-Zellen, Th2-Zytokin-exprimierende Zellen entsprechend als Th2-Zellen bezeichnet. IL-18 ist daher für die Regulation der Festlegung auf eine Th1- oder eine Th2-Immunantwort entscheidend (Chaix *et al.*, 2008; Fujibayashi *et al.*, 2007; Nakanishi *et al.*, 2001). Als Rezeptor für IL-18 ist IL-18R beschrieben, dessen Aktivierung auf analoge Weise zu IL-1R zur Aktivierung von NF- κ B führt (Kojima *et al.*, 1999; Nakanishi *et al.*, 2001). Wie auch für TNF α ist somit für IL-18 und IL-1 β eine positive Rückkopplung der Zytokinfreisetzung möglich. Für eine Vielzahl von Zelltypen ist die Produktion von IL-18 beschrieben. Darunter sind sowohl Immunzellen wie Makrophagen und DCs als auch Immunzellen des ZNS wie Mikroglia. Aber auch Nicht-Immunzellen wie Epithelzellen des Darms und der Atemwege oder Zellen der Nebennierenrinde setzen IL-18 frei (Nakanishi *et al.*, 2001). Auch IL-1 β kann sowohl von Makrophagen und Mikroglia sowie von Keratinozyten, Fibroblasten oder Endothelzellen produziert werden. Ebenso sind Synoviozyten, die in der Gelenkinnenhaut vorkommen und eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der rheumatoiden Arthritis spielen, in der Lage IL-1 β zu produzieren (Ren & Torres, 2009). Für IL-1 β ist eine Vielzahl von pro-inflammatorischen Funktionen beschrieben, die es zum Teil mit TNF α gemeinsam hat und die zur Bekämpfung von Mikroorganismen wie Viren entscheidend beitragen. Es führt zu einer Hochregulation von vielen anderen pro-inflammatorisch wirkenden Zytokinen und koloniestimulierenden Faktoren wie IL-2, IL-6, IL-12, aber auch von Adhäsionsmolekülen, Akut-Phase-Proteinen oder Zytokinrezeptoren. Außerdem erhöht IL-1 β die Produktion von Antikörpern und reduziert die Toleranz gegenüber Antigenen. Die Proliferation von verschiedenen Zellen wie Fibroblasten oder glatten Muskelzellen wird durch IL-1 β verstärkt (Dinarello, 1996). Im Unterschied zu IL-18 induziert IL-1 β eine Reduktion der IFN- γ Produktion, indem es die Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) induziert, die für die Prostaglandin-E₂ (PGE₂)-Synthese entscheidend ist (Slaats *et al.*, 2016). Für PGE₂ wurde die Reduktion der IFN- γ Produktion in T-Zellen sowie die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th17-Zellen gezeigt (Napolitani *et al.*, 2009). Auch über die Hochregulierung des Zytokins IL-6 führt IL-1 β zur Induktion der Differenzierung zu Th17-Zellen (Bettelli *et al.*, 2006). Neben Th1- und Th2-Zellen stellen Th17-Zellen eine weitere Spezies von Th-Zellen dar, zu denen naive T-Zellen differenzieren können. Th17-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Produktion des Zytokins IL-17 aus, das wichtig für die Rekrutierung von neutrophilen Zellen sowie die Abwehr gegen extrazelluläre Bakterien oder Pilze ist (van de Veerdonk *et al.*, 2009). Th17-Antworten sind aber auch mit chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose

oder der rheumatoiden Arthritis verknüpft (Ouyang *et al.*, 2008). Zudem können Th17-Antworten die Apoptose von virusinfizierten Zellen unterdrücken und zu einer Persistenz des Virus beitragen. Auch für parasitische Infektionen wurde eine Beteiligung von Th17-Antworten an persistenten Entzündungen gezeigt. Für eine effiziente Beseitigung von intrazellulären Pathogenen wie Viren oder parasitischen Infektionen scheinen daher eher eine starke Th1- bzw. Th2-Antwort entscheidend zu sein (van de Veerdonk *et al.*, 2009).

1.4 Problemstellung und Zielsetzung

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist einer der Hauptregulatoren der angeborenen Immunantwort und für die Expression und Regulation von zahlreichen anti-viral wirkenden Faktoren verantwortlich. Daher haben viele Viren Strategien entwickelt, um die Aktivierung von NF- κ B zu inhibieren und durch eine verzögerte Immunantwort ihre Replikation und Verbreitung im Organismus zu fördern. Auch für das SH-Protein von MuV, einem kleinen Protein mit hydrophober Transmembrandomäne, ist die Reduktion der NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit TNF α beschrieben. Alle bisherigen Studien zur Untersuchung der Funktion des SH-Proteins von MuV und anderer verwandter Paramyxoviren wurden mit rekombinanten Viren, bei denen die SH-Expression durch Deletion des *SH*-Gens verhindert ist, durchgeführt. Da aber die effiziente Replikation von Paramyxoviren von einer intakten Stöchiometrie des Virusgenoms, einem ausgeglichenen Gradienten der viralen mRNAs und der unbeeinflussten Expression der viralen Gene abhängt, kann die Deletion eines kompletten Gens schwerwiegende Folgen für die Replikation und damit eine veränderte Virulenz und Pathogenität des Virus zur Folge haben. Die Frage nach der Funktion des SH-Proteins als Virulenzfaktor steht damit im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. In der vorangegangenen Diplomarbeit wurden rMuV mit der geringstmöglichen Genomveränderung erzeugt, bei denen entweder die SH-Expression aufgrund des Einfügens von drei Stoppkodons in das *SH*-Gen unterdrückt ist oder die Expression des SH-Proteins durch Anfügen eines FLAG-Epitops in infizierten Zellen nachgewiesen werden kann. Mithilfe dieser Viren sollte nun in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des SH-Proteins auf die NF- κ B-Aktivierung im Detail untersucht und die Frage geklärt werden, ob das SH-Protein tatsächlich als Virulenzfaktor fungiert. Die hergestellten Viren sollten zunächst hinsichtlich ihres Wachstums, des ausgelösten CPEs und der Expression viraler Proteine untersucht werden. Außerdem sollte die Orientierung des SH-Proteins in der Membran infizierter Zellen bestimmt werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Phosphorylierung der NF- κ B-Signalwegskomponenten IKK β und I κ B α ebenso wie die Phosphorylierung der NF- κ B-Untereinheit p65 sowie dessen Translokation in den Zellkern als Maß für die NF- κ B-Aktivierung hinsichtlich der Expression des SH-Proteins in rMuV-infizierten Zellen analysiert werden. Zudem sollte die Bedeutung der NF- κ B-Aktivierung für das Wachstum der rMuV analysiert

werden. Bisher ist noch nicht bekannt, durch welchen Mechanismus und an welcher Position das SH-Protein in den Signalweg eingreift. Daher sollte zunächst der Einfluss des SH-Proteins auf die durch unterschiedliche Stimuli induzierte NF- κ B-Aktivierung mittels eines Reporterassays untersucht werden und die Angriffsposition durch die Aktivierung von NF- κ B mittels Überexpression von Proteinen des Signalwegs näher charakterisiert werden. Eine mögliche Interaktion des SH-Proteins mit Proteinen des Signalwegs sollte anschließend mittels Co-Immunpräzipitation analysiert werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte die Bedeutung des SH-Proteins für die Modulation der Immunantwort durch MuV näher untersucht werden. Dazu sollte die Expression des Zytokins TNF α sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in rMuV-infizierten Zellen untersucht werden. In vorangegangenen Arbeiten wurde nach rMuV-Infektion eine starke Hochregulation der Caspase-1-mRNA-Expression gezeigt. Deshalb sollte die Expression der durch NF- κ B induzierten Zytokine IL-1 β und IL-18, deren Freisetzung von der Spaltung durch Caspase-1 abhängig ist, nach rMuV-Infektion sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene hinsichtlich des generellen Einflusses der rMuV-Infektion sowie den des SH-Proteins analysiert werden.

Die Befunde dieser Arbeit sollen dazu beitragen, den Mechanismus und die Auswirkung der SH-vermittelten NF- κ B-Inhibition auf die Virusreplikation sowie den infizierten Wirt besser zu verstehen und damit die nötigen Vorarbeiten leisten, um ein verbessertes attenuiertes Impfvirus herstellen zu können.

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid (30 %; 37,5:1)	Roth (D)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (USA)
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich (USA)
Benzonase (Nuklease)	Merck Millipore (D)
Blasticidin	Invitrogen (USA)
BSA (bovines Serumalbumin) fest	Roth (D)
BSA (bovines Serumalbumin) flüssig (30 %)	Pan Biotech (D)
CMC (Carboxymethylcellulose)	Sigma-Aldrich (USA)
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Roth (D)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Amresco (USA)
dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	Thermo Scientific (USA)
Ethanol	Roth (D)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth (D)
FKS (Fötale Kälberserum)	Pan Biotech (D)
Glycerin	Roth (D)
Glycin	Roth (D)
IL-1 β (Interleukin-1 β)	InvivoGen (USA)
Invitrogen™ Ambion™ TURBO™ DNase	Thermo Scientific (USA)
Isopropanol	Roth (D)
Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent	Thermo Scientific (USA)
L-Glutamin	Lonza (CH)
LPS-EK Ultrapure <i>E.coli</i> strain K12	InvivoGen (USA)
Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Substrate	Sigma-Aldrich (USA)
Lysoform	Lysoform Dr. Hans Rosemann GmbH (D)
Magermilchpulver	Sucofin (D)
MEM (10x, minimum essential medium)	Sigma-Aldrich (USA)
Methanol	Roth (D)
Mowiol	Calbiochem (USA)
Natriumazid	Merck (D)
Natriumcarbonat	Promega (USA)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (D)

Material

Natriumhydroxid	Merck (D)
nProtein A Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare (UK)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (USA)
Pam3CSK4	InvivoGen (USA)
Penicillin/Streptomycin	Thermo Scientific (USA)
PFA (Paraformaldehyd)	Alfa Aesar, Thermo Scientific (UK)
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma-Aldrich (USA)
poly(I:C) (Polyriboinosinic:Polyribocytidylic Säure)	InvivoGen (USA)
Protease Inhibitor Cocktail (Kat. Nr. P8340)	Sigma-Aldrich (USA)
RevertAid Reverse Transcriptase	Thermo Scientific (USA)
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/μL)	Thermo Scientific (USA)
Salzsäure	Roth (D)
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich (USA)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth (D)
Terralin	Schülke & Mayr (D)
TNFα (Tumornekrosefaktor α)	PromoKine (D)
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	Mikrogen Diagnostik (D)
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth (D)
Triton X-100	Calbiochem (USA)
Trypsin 0,05 %/EDTA 0,02 %	Pan Biotech (D)
Tween 20	Roth (D)
X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent	Sigma-Aldrich (USA)

2.2 Antikörper

anti- β -Aktin (# 4970)	Cell Signaling Technology (USA)
anti-FLAG M2 Affinity Gel (# A2220)	Sigma-Aldrich (USA)
anti-FLAG-APC (# 637307)	BioLegend (USA)
anti-FLAG M2 (# F1804)	Sigma-Aldrich (USA)
anti-Mumps-F (# Mab846)	Merck Millipore (USA)
anti-GAPDH (# 5174)	Cell Signaling Technology (USA)
anti-I κ B α (# 4814)	Cell Signaling Technology (USA)
anti-IKK β (# 2684)	Cell Signaling Technology (USA)
anti-IL-1 β (Propeptid) (# 12703)	Cell Signaling Technology (USA)
anti-IL-18 (Propeptid) (# MAB646)	R&D Systems (USA)
anti-IRAK1 (# 4504)	Cell Signaling Technology (USA)
anti-Kaninchen IgG-HRP (# 7074)	Cell Signaling Technology (USA)
anti-Mumps NP (# sc-57919)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA)
anti-MyD88 (# 4283)	Cell Signaling Technology (USA)
anti-Maus IgG-HRP (# 7076)	Cell Signaling Technology (USA)
anti-NF- κ B p65 (# 8242)	Cell Signaling Technology (USA)
anti-Phospho-I κ B α (Ser32) (# 2859)	Cell Signaling Technology (USA)
anti-Phospho-IKK α / β (Ser176/180) (# 2697)	Cell Signaling Technology (USA)
anti-Phospho-NF- κ B p65 (Ser536) (# 3033)	Cell Signaling Technology (USA)
anti-RIP1 (# 3493)	Cell Signaling Technology (USA)
anti-TLR3 (# 6961)	Cell Signaling Technology (USA)
anti-TNFR1 (# 3736)	Cell Signaling Technology (USA)
Kaninchen IgG (unspezifisch) (# 011-000-002)	Dianova (D)
Maus IgG (unspezifisch) (# 015-000-002)	Dianova (D)
Ziege Fab anti-Maus IgG (H+L)-Alexa Fluor 488 (# 115-547-003)	Dianova (D)
Ziege Fab anti-Kaninchen IgG (H+L)-Cy3 (# 111-167-003)	Dianova (D)

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 Plasmide

pcDNA3-IKK β	Expression von IKK β (S. Goodbourn, UK)
pcDNA-SH _{JL} -C-HA	Expression von SH von MuV (Stamm Jeryl Lynn) mit C-terminalem HA-Epitop (M. Woznik, D)
pcDNA-SH _{PAT} -C-HA	Expression von SH von MuV (Patientenisolat, Genotyp G) mit C-terminalem HA-Epitop (M. Woznik, D)
pCMV- β Gal	Expression der β -Galactosidase, (S. Goodbourn, UK)
pCMV-HA	Clontech (USA)
pCMV-N-flag-SH _{JL}	Expression von SH von MuV (Stamm Jeryl Lynn) mit N-terminalem FLAG-Epitop (Bergmann, 2011)
pCMV-N-HA-SH _{JL}	Expression von SH von MuV (Stamm Jeryl Lynn) mit N-terminalem HA-Epitop (Rödner, 2011)
pCMV-N-HA-SH _{Pat}	Expression von SH von MuV (Patientenisolat, Genotyp G) mit N-terminalem HA-Epitop (C. Rödner, 2011)
pCMV-TAK1	Expression von TAK1 (K. Matsumoto, J)
pFLAG-CMV2-TRAF2	Expression von TRAF2 (W. Brune, D)
pME18SFLAG-TRAF6	Expression von TRAF6 (W. Brune, D)
p(PRDII)5tk Δ (-39)lucifer	Expression der Luciferase des Leuchtkäfers <i>Photinus pyralis</i> unter der Kontrolle von NF- κ B Bindeelementen des IFN- β Promotors (S. Goodbourn, UK)
pUNO.MyD88	Expression von MyD88 (Invivogen, USA)

2.3.2 Oligonukleotide (Primer)

Die Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion (D) im kleinstmöglichen Maßstab bestellt.

Primer für die quantitative Real-Time-PCR:

Oligo(dT)18 Primer		cdNA Synthese, Thermo Scientific (USA)
3427	MuVN687-F	5'-GTATGACAGCGTACGACCAACCT-3'
3428	MuVN668-R	5'-GCGACCTTGCTGCTGGTATT-3'
3506	GAPDH_fwd	5'-TCTTCCAGGAGCGAGATCCC-3'
3507	GAPDH_rev	5'-AGGGGGCAGAGATGATGAC-3'
3776	IL-1beta_fwd	5'-CAGCTACGAATCTCCGACCAC-3'
3777	IL-1beta_rev	5'-GGCAGGAACCAGCATCTTC-3'
3778	IL-18_fwd	5'-TGTCGCAGGAATAAAGATGGCT-3'

Material

3779	IL-18_rev	5'-CCTTGGTCAATGAAGAGAACTTGGT-3'
3781	TNF α _fwd (181)	5'-GAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTC-3'
3785	TNF α _rev (274)	5'-CATGGGCTACAGGCTTGTCAC-3'

Sequenzierungsprimer:

1219 (pCMV, sense)	5'-GGATGTTGCCTTTACTTCTAG-3'
1270 (pCMV, antisense)	5'-ATAAAGCATTTTTTTCCTGCATTC-3'
T7 (T7 Promotor, sense)	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
BGH (Bovine growth hormone terminator, antisense)	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

2.3.3 siRNA

FlexiTube GeneSolution GS7098 for TLR3	Qiagen (D)
AllStars Negative Control siRNA	Qiagen (D)

2.4 Medien

2.4.1 Medien für eukaryotische Zellen

Medium	Komponenten
DMEM	3,7 g NaHCO ₃ 13,3 g DMEM-Pulver (Thermo Scientific, USA) für 1 l, ad. H ₂ O, pH 7,2 (HCl), sterilfiltrieren
RPMI 1640	2 g NaHCO ₃ 10,43 g RPMI 1640-Pulver (Thermo Scientific, USA) für 1 l, ad. H ₂ O, pH 7,2 (HCl), sterilfiltrieren
Opti-MEM® I, GlutaMAX™	Thermo Scientific, USA

2.4.2 Medien für Bakterien

Medium	Komponenten
LB-Flüssigmedium	10 g/l Bacto Trypton (BD GmbH, D) 5 g/l Bacto Yeast Extract (BD GmbH, D) 10 g/l NaCl pH 7,5 (NaOH)
LB-Festmedium	15 g/l Agar No. 1 (Oxoid, UK) in LB-Flüssigmedium

2.5 Zellen

2.5.1 Eukaryotische Zelllinien

Den verwendeten Medien wurden zusätzlich 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt.

Zelllinie	Organismus	Organ	Medium
A549	Mensch	Lunge	DMEM, 5 % FKS
HEK293G	Mensch	Niere	DMEM, 5 % FKS
THP-1	Mensch	Blut	RPMI 1640, 10 % FKS
Vero76	grüne Meerkatze	Niere	DMEM, 5 % FKS

2.5.2 Bakterienstämme

One Shot® TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen (USA)
---	------------------

2.6 Viren

Die verwendeten Viren basieren auf dem Genom des MuV Stamms Jeryl Lynn.

rMuV-SH	(Franz, 2012)
rMuV-SHstop	(Franz, 2012)
rMuV-SH-C	(Franz, 2012)
rMuV-SHstop-C	(Franz, 2012)
rMuV-FL	(Grützke, 2011)

2.7 Puffer

2.7.1 Fertige Puffer

5x Reaction Buffer (für RevertAid Reverse Transcriptase)	Thermo Scientific (USA)
10x Reaction Buffer (für TURBO DNase)	Thermo Scientific (USA)
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific (USA)
RIPA (<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>) Puffer	Sigma-Aldrich (USA)
Roti-Load 1	Roth (D)

2.7.2 Angesetzte Puffer

Blockpuffer I (Western Blot)	5 % Magermilchpulver in PBS-T _{0,1}
Blockpuffer II (Western Blot)	5 % BSA in TBS-T _{0,1}
Blockpuffer III (Western Blot)	3 % Magermilchpulver in TBS-T _{0,1}
Blockpuffer IV (Western Blot)	5 % Magermilchpulver in TBS-T _{0,1}
Blockpuffer V (Immunfluoreszenz Assay)	1 % BSA in PBS-T _{0,05}
Blockpuffer VI (Immuncolorimetrischer Assay)	5 % FKS 0,6 % BSA 0,1 % Tween 20 in PBS
CMC-Overlay (Immuncolorimetrischer Assay)	6 ml 10x MEM 3 ml FKS 2,2 ml Natriumhydrogencarbonat (7,5 %) 1 ml Penicillin/Streptomycin 50 ml CMC (1 %) ad DMEM 100 ml
FACS-PBS	2,5 % FKS 0,05 % Natriumazid ad PBS 500 ml
Lysispuffer Co-IP (Co-Immunpräzipitation)	50 mM TRIS pH 7,4 (HCl) 150 mM NaCl oder 250 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Triton X-100 Protease Inhibitor Cocktail 1/100
PBS	137 mM NaCl 6,46 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 2,68 mM KCl in H ₂ O, pH 7,2
PBS-T _{0,05}	0,05 % Tween 20 in PBS
PBS-T _{0,1}	0,1 % Tween 20 in PBS
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	1 M TRIS pH 6,8 (HCl) in H ₂ O

Material

10x SDS-Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,25 M TRIS 2 M Glycin 1 % SDS in H ₂ O
TBS	50 mM TRIS pH 7,4 (HCl) 150 mM NaCl in H ₂ O
TBS-T _{0,1}	0,1 % Tween 20 in TBS
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M TRIS pH 8,8 (HCl) in H ₂ O
Transferpuffer (Western-Blot)	3 Teile 1x SDS-Laufpuffer 5 Teile H ₂ O 1 Teil Methanol

2.8 Verbrauchsmaterialien

Combitips advanced	Eppendorf (D)
Deckgläschen	Sarstedt (D)
Einweg-Reaktionsgefäße	Eppendorf (D), SLG (D), TPP (CH), Thermo Scientific (USA), Sarstedt (D)
Filterpapier extra dick	Biorad (USA), GE Healthcare (UK)
Filterpapier dünn	VWR (USA)
Glaspipetten	Brand (D), Hirschmann (D)
Glaswaren	Schott (D)
Handschuhe	Kimberly-Clark (USA), Ansell (USA)
Kanülen	Braun (D)
Kryoröhrchen	Thermo Scientific (USA)
LUNA Zählkammer	Logos Biosystems (USA)
Objektträger	Roth (D)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (USA)
Petrischalen	Greiner (D)
Pipettenspitzen	Thermo Scientific (USA), Eppendorf (D)
PVDF Western Blotting Membran	Sigma-Aldrich (USA)
Sterilfilter	Sartorius (D)
Vivaspin 20 (300.000 Dalton)	Sartorius (D)
Zellkulturgefäße (Flaschen, Platten, Schalen)	Thermo Scientific (USA), Sarstedt (D)

2.9 Geräte

ABI PRISM Genetic Analyzer	Applied Biosystems (USA)
ABI PRISM 377 DNA Sequencer	Applied Biosystems (USA)
Absaugpumpe Vacusafe comfort	Integra Bioscience (D)
Advanced Fluoreszenz Imager	Intas Science Imaging (D)
Blotapparatur	Biorad (USA)
Brutschrank (CO ₂ -Inkubator)	Binder (D)
Durchlichtmikroskop	Nikon (J), Zeiss (D)
Einfrierbox	neoLab (D)
Durchflusszytometer „BD FACSCalibur“	BD Biosciences (USA)
Feinwaage	Kern und Sohn (D), Mettler-Toledo (D), Sartorius (D)
Gefrierschränke (-20 °C, -80 °C, -150 °C)	AEG (D), Bosch (D), Sanyo (J), Heraeus Sepatech (D), Liebherr (D)
Gelelektrophoresekammer (SDS-PAGE)	GE Healthcare (UK)
Heizblock	Biosan (LV)
Horizontalschüttler	Biometra (D), Bibby Scientific Limited (UK), Scientific Industries (USA)
Kamera für Durchlichtmikroskop	Nikon (J)
konfokales Laserscanmikroskop LSM 780	Zeiss (D)
Kühlschränke (4 °C)	Liebherr (D), Bosch (D)
Laborzentrifuge	Thermo Scientific (USA), Heraeus Sepatech (D), Labnet (USA)
LightCycler 480 Instrument II	Roche (D)
LUNA Automated Cell Counter	Logos Biosystems (USA)
Magnetrührer	IKA (D)
Nanodrop ND-8000	PEQLAB (D)
pH-Messgerät	Sartorius (D)
Photometer „FLUOstar“	BMG Labtech (D)
Pipetboy	Integra Bioscience (D)
Pipetten	Gilson (USA), Eppendorf (D)
Schüttel-Inkubator	GFL (D)
Spannungsgeräte	Biometra (D)
Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific (USA)
Thermocycler TPersonal/T3000	Biometra (D)

Material

Thermomixer comfort	Eppendorf (D)
Tischzentrifuge	Thermo Scientific (USA), Eppendorf (D)
Vortexer	IKA (D), Bibby Scientific Limited (UK), Heidolph (D), Labinco (NL), Scientific Industries (USA)
Wärmeschrank	EUROTHERM by Schneider Electric Systems (D)
Wasserbad	Haake (D)

2.10 Kits

ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems (USA)
β -Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer	Promega (USA)
Human IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems (USA)
Human IL-18 ELISA Kit	MBL (J)
Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit	R&D Systems (USA)
NucleoBond Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel (D)
ONE-Glo™ Luciferase Assay System	Promega (USA)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (USA)
RNeasy Mini Ki	Qiagen (D)
SYBR® Green PCR Master Mix	Thermo Scientific (USA)

2.11 Software und Webseiten

ABI PRISM™ DNA Sequencing Analysis	Applied Biosystems (USA)
Adobe Illustrator CS6	Adobe Systems Inc. (USA)
Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems Inc. (USA)
Cell Quest Pro 6.0	BD Biosciences (USA)
EndNote X7	Thomson Reuters (USA)
FileMaker Pro	FileMaker Inc. (D)
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc. (USA)
Geneious Pro 5.4.3	Biomatters Ltd. (NZ)
Intas Chemostar Professional	Intas Science Imaging (D)
LabImage 1D	Kapelan Bio-Imaging (D)
Nanodrop 8000 V2.2.1	PEQLAB (D)
NCBI-Homepage	www.ncbi.nlm.nih.gov/
Microsoft Excel (2010)	Microsoft (USA)
Microsoft PowerPoint (2010)	Microsoft (USA)
Microsoft Word (2010)	Microsoft (USA)
Omega-Control 3.00 R3	BMG Labtech (D)
Omega MARS-Data Analysis 3.01 R2	BMG Labtech (D)
Zen2010	Zeiss (D)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli*

Plasmide sind zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle bakteriellen Ursprungs. Durch das Vorhandensein eines Replikationsursprungs (*origin of replication*, ORI) können sie sich autonom replizieren. Plasmide, die als Werkzeug in der Molekularbiologie eingesetzt werden, weisen als Selektionsmarker ein Antibiotikaresistenzgen sowie eine multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS) auf. Über die MCS kann Fremd-DNA in das Plasmid integriert werden.

Viele Bakterien können aus ihrer Umgebung genetisches Material aufnehmen, allerdings nur mit einer geringen Effizienz. Diese kann durch verschiedene Methoden erhöht werden, man spricht von der Erzeugung einer künstlichen Kompetenz, wobei zwischen chemischen und elektrokompetenten Bakterien unterschieden wird. Während die chemische Kompetenz zum Beispiel durch die Behandlung mit Calciumchlorid erzeugt wird, lässt sich Fremd-DNA in elektrokompetente Bakterien über Elektroporation einschleusen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Transformationen wurden die chemisch kompetenten *One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli* verwendet. Diese wurden auf Eis aufgetaut, bevor 0,5 – 2,5 µl Plasmid-DNA zu 25 µl Bakteriensuspension gegeben wurden. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert, dann erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s und darauf eine erneute Inkubation auf Eis für 3 min. Nach dieser wurden 200 µl vorgewärmtes, antibiotikafreies SOC-Medium zum Ansatz gegeben. Der Ansatz wurde kurz inkubiert und die Bakterien danach auf antibiotikahaltige LB-Platten (70 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Das verwendete Antibiotikum ist hierbei vom im transformierten Plasmid enthaltenen Resistenzgen abhängig. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

3.1.2.1 Anlegen von bakteriellen Flüssigkulturen

Um die transformierten Plasmide zu vermehren, wurde eine einzelne Bakterienkolonie von einer LB-Platte gepickt und in 5 ml LB-Flüssigmedium (70 µg/ml Ampicillin) überführt. Die Kultur wurde über Nacht (12 – 16 h) bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden 200 µl der Über-Nacht-Kultur in 200 ml frisches, antibiotikahaltiges LB-Flüssigmedium überführt. Diese größere Kultur wurde ebenfalls zur Vermehrung der Bakterien über Nacht (12 – 16 h) bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 7100 rpm bei 4 °C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden für die Plasmid-Isolation verwendet.

3.1.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Lyse der transformierten und über Nacht vermehrten Bakterien wurde basierend auf der NaOH/SDS (Natriumdodecylsulfat)-Lysemethode nach Birnboim und Doly durchgeführt (Birnboim & Doly, 1979). Hierbei wird SDS verwendet, um die Zellmembran aufzulösen und die Proteine zu denaturieren, während NaOH die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA Basen auflöst und doppelsträngige zu einzelsträngiger DNA denaturiert. Bei der anschließenden Neutralisation wird Kaliumacetat verwendet, um den pH-Wert der Suspension zu reduzieren, so dass sich die Wasserstoffbrückenbindungen wieder ausbilden können. Da sich die Doppelstränge der genomischen DNA aufgrund ihrer Größe nicht mehr richtig zurückbilden können, dies bei den wesentlich kleineren Plasmiden aber möglich ist, erfolgt in diesem Schritt die Trennung der Plasmid- von der genomischen DNA. Letztere fällt zusammen mit den denaturierten Proteinen als weißes Präzipitat aus und kann abgetrennt werden. Die Reinigung und Konzentrierung der Plasmid-DNA erfolgte über eine Anionenaustauschersäule, bei der die negativen Phosphatgruppen der DNA an positiv geladene Siliciumbeads des Säulenmaterials binden. Zur Aufreinigung wurde das *NucleoBond Xtra Maxi Kit* verwendet.

Das Bakterienpellet wurde dabei zunächst in 12 ml Puffer *RES* resuspendiert, der RNase A zur Degradation von RNA enthält. Die Lyse und Denaturierung erfolgte durch die Zugabe von 12 ml Puffer *LYS*, anschließendem Mischen und einer Inkubation des Ansatzes für 5 min bei RT. Zur Neutralisation wurden 12 ml Puffer *NEU* hinzugegeben und der Ansatz erneut gemischt. Die *NucleoBond Xtra*-Säule wurde mit 25 ml Puffer *EQU* equilibriert, bevor der Ansatz über einen Filter auf die Säule überführt wurde. Der Filter dient zur Trennung des Präzipitats, so dass nur der flüssige Anteil des Ansatzes mit der Plasmid-DNA auf die Säule gelangt. Anschließend wurden Filter und Säule mit 15 ml Puffer *EQU* gewaschen, wonach der Filter entfernt und die Säule mit 25 ml Puffer *WASH* gewaschen wurde. Die Elution der gebundenen Plasmid-DNA erfolgte über die Zugabe von 15 ml Puffer *ELU*, die anschließende Entsalzung und Fällung der Plasmid-DNA durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol zum Eluat. Nach Mischen des Ansatzes und einer Inkubation für 2 min, wurde dieser unter Zuhilfenahme einer Spritze durch den *NucleoBond Finalizer Large* gedrückt, wobei die Plasmid-DNA an der Membran gebunden wurde. Anschließend wurden 5 ml Ethanol (70 %) ebenfalls durch den *Finalizer Large* gedrückt. Nach dem Trocknen der Membran wurde die gebundene Plasmid-DNA mit 500 µl TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)-Puffer eluiert und ihre Konzentration mittels Nanodrop bestimmt (Kap. 3.1.4).

3.1.2.3 Einbringen von Bakterienklonen in die Stammsammlung

Für die dauerhafte Lagerung von Plasmiden wurden diese nach der Bestätigung der Sequenzen (Kap. 3.1.3) als Bakterienkultur in der Stammsammlung archiviert. Hierzu wurden 500 µl einer Über-Nacht-Kultur (Kap. 3.1.2.1) mit 500 µl Glycerin (30 %) in einem Kryoröhrchen gemischt und nach kurzer Inkubationszeit in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Röhrchen erfolgte bei -80 °C, wobei für jedes Plasmid drei Röhrchen archiviert wurden.

3.1.3 Sequenzierung von DNA

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Sequenz der verwendeten Plasmide wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) angewandt. Bei dieser wird einer der komplementären DNA-Stränge ausgehend von einem Primer durch eine DNA-Polymerase verlängert. Zusätzlich zu Desoxyribonukleotiden (dNTPs) enthält der Reaktionsansatz auch Fluoreszenz-markierte-2',3'-Dideoxyribonukleotide (ddNTPs), die keine 3'OH-Gruppe am Ribosering besitzen und dadurch zu einem vorzeitigen Ende des Einbaus an Nukleotiden führen. Aufgrund der statistisch verteilten Kettenabbrüche entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die anschließend über Kapillarelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und analysiert werden.

Die Sequenzierungen wurden mit dem *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* durchgeführt. Dieses enthält die ddNTPs zusammen mit einer DNA-Polymerase in einem geeigneten Puffersystem (Big Dye 3.1-Premix). Die vier Basen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Der in Tabelle 1 angegebene Reaktionsansatz wurde für die Durchführung der Sequenzierungsreaktion hergestellt. Anschließend wurde die Sequenzierungsreaktion mit den in Tabelle 2 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die erzeugten Fragmente wurden nachfolgend mittels Kapillarelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei die Farbstoffmoleküle durch einen Laser angeregt und die detektierten Signale durch einen Photomultiplier verstärkt wurden. Mittels einer Software wurde die entsprechende Nukleotidsequenz generiert.

Tabelle 1: Reaktionsansatz der Sequenzierungsreaktion

Reagenz	eingesetzte Menge/Konzentration
DNA	150 – 350 ng
Primer	0,5 µM
Big Dye 3.1-Premix	2 µl
H ₂ O	ad 10 µl

Tabelle 2: Programm der Sequenzierungsreaktion

	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
	96 °C	60 s	
Denaturierung	96 °C	15 s	
Annealing	50 °C	15 s	25x
Elongation	60 °C	240 s	
	4 °C	∞	

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA oder RNA wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels des NanoDrop 8000 Spektrometers (PEQLAB) bestimmt. Eine OD_{260} von 1,0 entspricht hierbei einer Konzentration von 50 µg/ml DNA oder 40 µg/ml RNA. Zusätzlich wurde die OD bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt, um den Grad der Verunreinigung durch Proteine anzuzeigen, da aromatische Aminosäuren bei 280 nm ein Absorptionsmaximum haben. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} beträgt für reine DNA 1,8 und für reine RNA 2,0. Um den Grad der Verunreinigung durch Zuckermoleküle oder schwefelhaltige Verbindungen anzuzeigen, wurde des Weiteren die OD bei einer Wellenlänge von 230 nm bestimmt, da diese Verbindungen bei dieser Wellenlänge absorbieren. Für reine DNA oder RNA liegt der Quotient OD_{260}/OD_{230} zwischen 2,0 und 2,2. Vor der Messung der Probe wurde das Gerät mit dest. H₂O initialisiert und mit dem Puffer, in dem die Nukleinsäuren gelöst wurden, kalibriert. Anschließend wurden 2 µl Probe vermessen und die Konzentration der Nukleinsäuren in ng/µl sowie die beschriebenen Quotienten durch die zugehörige Software berechnet.

3.1.5 Quantitative Real-Time-PCR

Wie eine herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) dient die quantitative Real-Time-PCR der Vervielfältigung von kurzen DNA-Bereichen, bei der im Unterschied zur herkömmlichen PCR die Menge an Produkten während der exponentiellen Phase in Echtzeit bestimmt werden kann. So ist es möglich, Unterschiede in der Expression verschiedener Gene zu untersuchen und zu quantifizieren. Für die Untersuchung der Genexpression wurde in dieser Arbeit zunächst die RNA aus den zu untersuchenden Zellen extrahiert, in cDNA umgeschrieben und diese als Template für die nachfolgende quantitative Real-Time-PCR eingesetzt, bei der die Menge der Produkte mittels des in die DNA interkalierenden Farbstoffs SYBR Green I bestimmt wurde.

3.1.5.1 Extraktion von RNA

Die Extraktion von RNA wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* durchgeführt, wobei die Aufreinigung der RNA auf der spezifischen Bindung an einer Siliziummembran beruht. Für die Durchführung wurden zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen (Kap. 3.2.1) nach der dem Versuch entsprechenden Behandlung zweimal mit PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und durch die Zugabe von 600 µl des denaturierenden, Guanidiniumthiocyanat-haltigen RLT-Puffers lysiert. Durch Zugabe des Puffers werden RNasen sofort inaktiviert, um die Aufreinigung von intakter RNA sicherzustellen. Nach der Homogenisierung des Lysats durch Zentrifugation im *QIAshredder* bei 13.000 rpm für 2 min, wurde dem Durchfluss 600 µl Ethanol (70 %) zugefügt, um optimale Bedingungen für die Bindung zu schaffen. Die Probe wurde anschließend auf ein *RNeasy Spin*-Röhrchen überführt, an dessen Siliziummembran die RNA bindet, wozu eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 s erfolgte. Kontaminationen wurden durch Zugabe von 350 µl RW1-Puffer und einer Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 s entfernt. Zur Sicherstellung, dass keine DNA mit aufgereinigt wird, wurde ein DNase-Verdau für 20 min bei 37 °C durchgeführt. Nach diesem erfolgte erneut ein Waschschrift mit RW1-Puffer, bevor die Membran zweimal mit jeweils 500 µl Ethanol-haltigem RPE-Puffer gewaschen wurde. Für die Elution wurden 20 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert und die RNA durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Dieser Elutionsschritt wurde einmal wiederholt. Das Kit ermöglicht eine Anreicherung von mRNA, da nur RNA-Moleküle, die mindestens 200 Nukleotide lang sind, aufgereinigt und rRNA (ribosomale RNA) und tRNA (Transfer-RNA) daher ausgeschlossen werden. Die Konzentration der eluierten RNA wurde wie in Kap. 3.1.4 beschrieben bestimmt.

3.1.5.2 cDNA-Synthese

Bevor die PCR-Reaktion durchgeführt werden kann, muss die extrahierte RNA zunächst in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben werden. Hierzu wurde die *RevertAid Reverse Transcriptase* eingesetzt, eine rekombinante Reverse Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus, die eine RNA-abhängige und DNA-abhängige Polymeraseaktivität besitzt. Sie synthetisiert komplementär zur RNA ein einzelsträngiges cDNA-Molekül. Für die Synthese wurden zunächst, wie in Tabelle 3 angegeben, 1000 ng RNA mit einem synthetischen einzelsträngigen 18-mer Oligonukleotid, das als Primer dient, für 5 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 8 µl des in Tabelle 4 angegebenen Mastermixes, welcher die Reverse Transkriptase enthält, zu der Probe pipettiert und diese für 1 h bei 44 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Probe abschließend für 5 min bei 70 °C erhitzt. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Wurden bei der quantitativen Real-Time-PCR Primer verwendet, die nicht Exon-übergreifend sind, musste auch ein Ansatz, bei dem Wasser

anstatt der Reversen Transkriptase zugegeben wurde, mitgeführt werden. Mittels dieser Kontrolle kann eine Kontamination der untersuchten Proben durch genomische DNA ausgeschlossen werden.

Tabelle 3: Reaktionsansatz für die Inkubation von RNA und Primer

Reagenz	eingesetzte Menge/Konzentration
RNA	1000 ng
Oligo(dT) ₁₈ -Primer (100 pmol)	1 µl
H ₂ O	ad 12 µl

Tabelle 4: Reaktionsansatz für den Mastermix für die cDNA-Synthese

Reagenz	eingesetzte Menge/Konzentration
5x Reaktionspuffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor	40 U
dNTP mix (10 mM)	2 µl
Reverse Transkriptase	200 U

3.1.5.3 Quantitative Real-Time-PCR

Wie die herkömmliche PCR läuft auch die quantitative Real-Time-PCR in drei Schritten ab, die zyklisch wiederholt werden. Bei jedem Zyklus kommt es zu einer Verdopplung der gewünschten DNA-Bereiche. Wird von z Template-Molekülen ausgegangen, liegen nach n Zyklen $z \times 2^n$ gewünschte DNA-Fragmente vor, es kommt zu einer exponentiellen Vervielfältigung. Die drei Schritte eines Zyklus bestehen aus der Denaturierung der DNA, der Anlagerung (Annealing) von Primern und der Kettenverlängerung (Elongation). In dieser Arbeit wurde der *SYBR Green PCR Master Mix* verwendet, der eine AmpliTaq Gold DNA Polymerase in einem geeigneten Puffersystem enthält, dem bereits dNTPs zugesetzt wurden. Zur Aktivierung der Polymerase ist es nötig vor dem ersten Zyklus die Probe für 10 min auf 95 °C zu erhitzen. Ein Zyklus beginnt anschließend ebenfalls mit dem Erhitzen der Probe auf 95 °C, dies führt zum Lösen der Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Strängen. Um im zweiten Schritt die Anlagerung der Primer an komplementäre Template-Bereiche zu ermöglichen, wird die Temperatur auf 60 °C abgesenkt. Die angelagerten Primer besitzen eine freie 3'OH-Gruppe am Ribosering, die der Polymerase als Startpunkt für die Elongation dient. In diesem letzten Schritt des Zyklus verlängert sie über Einfügen von bereitgestellten dNTPs den Primer komplementär zur DNA-Matrize. Da eine Temperatur von 60 °C im optimalen Bereich für die Aktivität der verwendeten Polymerase liegt, muss die Temperatur für die Elongation nicht geändert werden. Nach der Elongation wird die Temperatur erneut auf 95 °C erhöht und ein neuer Zyklus kann beginnen,

bei dem sich zunächst die neugebildeten Doppelstränge wieder voneinander lösen. Im Unterschied zur herkömmlichen PCR enthält der verwendete Mastermix den Farbstoff SYBR Green I, bei dem es sich um einen Cyanin-Farbstoff handelt, der an doppelsträngige DNA bindet. Durch die Anregung mit einem Laser emittiert der gebildete DNA-Farbstoff-Komplex grünes Licht, die Messung dieser Fluoreszenz wird in jedem Zyklus am Ende des Elongationsschritts durchgeführt. Im Verlauf der Reaktion, in dem die Menge an Produkten exponentiell zunimmt, nimmt auch die Menge des Fluoreszenzsignals exponentiell zu und ermöglicht es auf diese Weise die Zunahme des PCR-Produkts in Echtzeit zu beobachten.

Für die Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR wurde der in Tabelle 5 angegebene Reaktionsansatz pipettiert. In Tabelle 6 sind die Bedingungen der Reaktion angegeben, die im LightCycler 480 II (Roche) durchgeführt wurde.

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die quantitative Real-Time-PCR

Reagenz	eingesetzte Menge/Konzentration
SYBR Green PCR Master Mix	12,5 µl
Primer Mix (je 10 µM Fwd. und Rev. Primer)	0,5 µl
H ₂ O	7 µl
Template (cDNA, 1/25 mit H ₂ O verdünnt)	5 µl

Tabelle 6: Programm der quantitativen Real-Time-PCR

	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	15 s	45x
Annealing/ Elongation	60 °C	60 s	

Die relative Quantifizierung der Expression der untersuchten Gene erfolgte mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Beim Ct-Wert (*cycle threshold*) handelt es sich um den Zyklus der Reaktion, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über dem Hintergrund-Fluoreszenzsignal liegt und damit den Anfang der exponentiellen Phase markiert. Je geringer der Ct-Wert ist, desto größer ist die Menge an Template in der untersuchten Probe. Für die Berechnung wird eine interne Kontrolle benötigt, dessen Signal verwendet wird, um Unterschiede in der Ausgangsmenge der zu untersuchenden cDNA auszugleichen. In dieser Arbeit wurde als interne Kontrolle das Haushaltsgen *GAPDH* verwendet. Im ersten Schritt der Berechnung wurde für jede Probe der Ct-Wert für *GAPDH* vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert, wobei der ΔC_t -Wert erhalten wurde. Im zweiten Schritt wurde der $\Delta\Delta C_t$ -Wert gebildet, indem die Differenz der ΔC_t -Werte zweier miteinander zu vergleichenden Gruppen gebildet wurde. Die unterschiedliche

Expression des untersuchten Gens wurde schließlich als Verhältnis (Ratio) angegeben, indem der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert in die Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt wurde. Für den Vergleich von rMuV-SH- mit rMuV-SHstop-infizierten Zellen wurde zusätzlich zur Normierung auf *GAPDH* auch eine Normierung auf das virale *N*-Gen durchgeführt, um Unterschiede der eingesetzten Menge an Viruspartikeln bei der Infektion ausgleichen zu können. Dazu wurde für das *N*-Gen wie für das zu untersuchende Gen beschrieben die Ratio berechnet und abschließend die Ratio für das zu untersuchende Gen durch die Ratio für das *N*-Gen dividiert. Beim Vergleich der infizierten Zellen mit den nicht-infizierten Zellen wurde nur auf *GAPDH* normiert. Abbildung 8 zeigt beispielhaft die Berechnung des Unterschieds in der Genexpression von *IL-1 β* von rMuV-SH- im Vergleich zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen. Liegt der Wert für die Ratio unter 1, ist die Expression in rMuV-SH- im Vergleich zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen herabreguliert. Entsprechend ist die Expression in rMuV-SH- im Vergleich zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen hochreguliert, wenn der Wert für die Ratio über 1 liegt.

$$1. \quad \Delta\text{Ct}_{\text{rMuV-SH}_{\text{IL-1}\beta}} = \text{Ct}_{\text{IL-1}\beta} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{IL-1}\beta} = \Delta\text{Ct}_{\text{rMuV-SH}_{\text{IL-1}\beta}} - \Delta\text{Ct}_{\text{rMuV-SHstop}_{\text{IL-1}\beta}}$$

$$\text{Ratio}_{\text{IL-1}\beta} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{IL-1}\beta}}$$

$$2. \quad \Delta\text{Ct}_{\text{rMuV-SH}_N} = \text{Ct}_N - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct}_N = \Delta\text{Ct}_{\text{rMuV-SH}_N} - \Delta\text{Ct}_{\text{rMuV-SHstop}_N}$$

$$\text{Ratio}_N = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}_N}$$

$$3. \quad \text{Ratio} = \frac{\text{Ratio}_{\text{IL-1}\beta}}{\text{Ratio}_N}$$

Abbildung 8: Relative Quantifizierung mittels der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Die adhärent wachsenden eukaryotischen Zelllinien 293G, Vero76 und A549 wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) mit dem Zusatz von 5 % FKS (fötales Kälberserum), 2 mM L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin sowie 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin in 75 cm^2 -Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO_2 in Brutschränken kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen vereinzelt und entsprechend der Dichte ihres Zellrasens in einer 1/10- oder 1/15-Verdünnung passagiert. Dazu wurde das verbrauchte Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen wurden

zweimal mit PBS gewaschen, um Mediumreste und abgestorbene Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml einer Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Lösung benetzt und für ca. 5 min im Brutschrank inkubiert, wonach sie in frischem, auf 37 °C temperiertem Zellkulturmedium aufgenommen wurden. Für die Durchführung von Versuchen wurde die Zellzahl mittels des automatischen Zellzählgeräts *Luna* bestimmt oder die Zellen wurden in geeigneten, empirisch bestimmten Verdünnungen ohne Ermittlung der Zellzahl in Zellkulturgefäße ausgesät.

Die in Suspension wachsende Zelllinie THP-1 wurde in RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640-Zellkulturmedium mit dem Zusatz von 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin in 75 cm²-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ in Brutschränken kultiviert. Alle drei bis vier Tage, bei Erreichen einer Zellzahl von 5 - 10 × 10⁵ Zellen pro ml, wurde die Zellsuspension in Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 400 × g für 5 min pelletiert, in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und in einer 1/10-Verdünnung zur weiteren Kultivierung in eine Zellkulturflasche überführt. Um für die Durchführung von Versuchen die monozytisch wachsenden THP-1 Zellen zu Makrophagen zu differenzieren, wurden 5 × 10⁵ Zellen pro ml in mit 100 nM PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) versetztem RPMI 1640-Zellkulturmedium in Zellkulturgefäße ausgesät und für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die behandelten Zellen direkt für Infektionsversuche eingesetzt.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zur dauerhaften Archivierung von Zelllinien wurden diese bei -150 °C gelagert. Dazu wurden sie in vier 75 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens wie in Kap. 3.2.1 beschrieben vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen bei 400 × g für 5 min pelletiert, in 10 ml geeignetem Einfriermedium (293G, Vero76 und A549 Zellen: 90 % FKS, 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid), THP-1 Zellen: RPMI 1640 versetzt mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 5 % DMSO) resuspendiert und in 700 µl Aliquots in Kryoröhrchen verteilt. Zunächst wurden die Röhrchen in Einfrierboxen mit einer Geschwindigkeit von 1 °C pro min auf -80 °C gekühlt, bevor sie bei -150 °C gelagert wurden.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurde ein bei -150 °C gelagertes Aliquot entnommen, schnell auf RT erwärmt und in 5 ml auf 37 °C temperiertem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden bei 400 × g für 5 min pelletiert, um das Einfriermedium zu entfernen und anschließend in 8 ml frischem Medium aufgenommen und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens oder bei THP-1 Zellen einer Zelldichte von 5 - 10 × 10⁵ Zellen pro ml wurden die Zellen in 75 cm²-Zellkulturflaschen umgesetzt und wie in Kap. 3.2.1 beschrieben kultiviert.

3.2.3 Transfektion von eukaryotischen Zelllinien

Transfektion bezeichnet das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Mittels dieser Methode lassen sich gezielt Proteine in großer Menge synthetisieren, die auf Expressionsplasmiden kodiert sind und deren offene Leserahmen unter der Kontrolle eines Promotors stehen, welcher von der zellulären Synthese-Maschinerie erkannt wird. Das Einbringen der Expressionsplasmide kann durch physikalische Methoden wie der Elektroporation oder durch chemische Verfahren mittels verschiedener Reagenzien durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden eukaryotische Zellen mit dem Reagenz *X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent* transfiziert. Dieses setzt sich aus verschiedenen nicht-liposomalen Komponenten zusammen, die einen Komplex mit der DNA bilden und von den Zellen über Endozytose aufgenommen werden. Die Zellen wurden dazu 24 h vor der Transfektion in geeigneter Anzahl in die gewünschten Zellkulturgefäße ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 70 – 80 % Konfluenz aufwiesen. Je nach Format und Zelllinie wurde dann eine entsprechende Menge Plasmid-DNA in einem geeigneten Volumen an serumfreiem Zellkulturmedium verdünnt, die entsprechende Menge an Reagenz hinzugefügt und der Ansatz für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Ein Mediumwechsel vor oder nach der Zugabe des Transfektionsansatzes war aufgrund der geringen Toxizität nicht nötig. In Tabelle 7 sind die verschiedenen Zelllinien, Formate und Mengen der einzelnen Komponenten aufgeführt.

Tabelle 7: Reaktionsansätze bei der Transfektion mit *X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent*

Zelllinie und Format	Zellzahl/ Verdünnung	Medium (ad µl)	DNA (µg)	Reagenz (µl)	Medium auf den Zellen (µl)
293G: 12-Loch	1/4	100	1	1	1000
293G: 6-Loch	1/4	200	2	2	2000
A549: 12-Loch	1,5 × 10 ⁵ Zellen/ml	200	2	2	1000
A549: 6-Loch	3 × 10 ⁵ Zellen/ml	400	4	4	2000

Neben DNA kann auch siRNA (*small interfering RNA*) in eukaryotische Zellen transfiziert werden, um spezifisch die Synthese von Proteinen durch RNA-Interferenz zu unterdrücken. Für die Transfektion von siRNA wurde das Reagenz *Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent* verwendet, welches auf einer siRNA-spezifischen kationischen Lipidzusammensetzung beruht. 293G Zellen wurden 24 h vor Transfektion im 12-Loch Format entsprechend der Bedingung für die Transfektion von DNA ausgesät und kultiviert. Die dem Versuch entsprechende Menge an

siRNA wurde mit Opti-MEM (*minimum essential medium*) auf 50 µl aufgefüllt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 5 µl Reagenz mit 45 µl Opti-MEM gemischt. Anschließend wurden beide Ansätze vereinigt und für 5 min bei RT inkubiert. 100 µl dieses Transfektionsansatzes wurden tröpfchenweise auf die Zellen gegeben, wobei auch hier ein Mediumwechsel nicht nötig war.

3.2.4 Anzucht von Viren

Um rMuV anzuziehen, wurden Vero76 Zellen in 175 cm²-Zellkulturflaschen oder 150 mm-Zellkulturschalen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank für 24 h kultiviert. Bei Erreichen von 90 – 100 % Konfluenz wurde das verbrauchte Zellkulturmedium abgenommen und durch 15 ml frisches DMEM mit 2 % FKS ersetzt. Die Zellen wurden anschließend mit dem jeweiligen rMuV mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 0,003 infiziert und für weitere drei Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die MOI beschreibt das Verhältnis von Viruspartikeln zu den zu infizierenden Zellen. Bei einer MOI von 1 werden für die Infektion entsprechend so viele Viruspartikel eingesetzt wie zu infizierende Zellen vorhanden sind. Sobald 90 – 100 % der Zellen einen CPE zeigten, wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zelltrümmer bei 3000 × g für 10 min bei 4 °C pelletiert. Sollten Virusstocks als Grundlage für die weitere Anzucht hergestellt werden, wurde der Zellkulturüberstand direkt in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen verteilt und bei -80 °C gelagert. Für die Durchführung von Infektionsexperimenten wurden rMuV-Stocks mit Titern ab 10⁷ pfu (*plaque forming units*)/ml benötigt. Deshalb wurden 20 ml des virushaltigen Zellkulturüberstands nach Entfernen der Zelltrümmer in Vivaspin 20-Röhrchen überführt und mittels Zentrifugation bei 3000 × g bei 4 °C eingengt. Die im Überstand enthaltenen Viruspartikel wurden auf diese Weise angereichert. War das Volumen im Röhrchen auf etwa 10 ml eingengt worden, wurden die Röhrchen mit dem restlichen Zellkulturüberstand aufgefüllt, bis dieses komplett in die Röhrchen überführt war. Betrug das Konzentrat eines Vivaspin 20-Röhrchens zwischen 1 – 2 ml, wurden die Ansätze gleicher Viren vereinigt und gevortext. Nicht lösliche Komponenten wurden durch Zentrifugation bei 2000 × g für 5 min entfernt. Der rMuV-haltige Überstand wurde erneut gevortext, in 100 µl Aliquots in Kryoröhrchen verteilt und bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte mittels des Immuncolorimetrischen Assays (Kap. 3.3.1).

3.2.5 Infektion eukaryotischer Zelllinien

Adhärenz wachsende Zellen wurden am Tag vor der Infektion in geeigneter Zellzahl und geeignetem Format ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Bei Erreichen von 60 – 70 % Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem dem Format entsprechenden Volumen an Virussuspension inkubiert (Tabelle 8). Der für die Infektion verwendete Virus-haltige Überstand wurde dazu entsprechend der gewünschten MOI mit dem für die jeweilige Zelllinie passenden serumfreien Zellkulturmedium verdünnt. Um

die Infektion der Zellen zu ermöglichen, wurden diese mit der Virussuspension für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Virus-haltige Überstand abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit einem dem Format entsprechenden Volumen an frischem, serumhaltigen Zellkulturmedium bis zur Versuchsdurchführung bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Tabelle 8: Reaktionsansätze bei der Infektion mit rMuV

Format	Virussuspension (µl)	Medium zum Auffüllen (µl)
24-Loch	250	500
12-Loch	400	1000
6-Loch	1000	2000

Um in Suspension wachsende Zellen zu infizieren, wurden die Zellen in der dem jeweiligen Versuch entsprechenden Anzahl in Röhrchen überführt und bei 400 × g für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in der Virussuspension resuspendiert, wobei jeweils 2 × 10⁵ Zellen in 40 µl Virussuspension aufgenommen wurden. Entsprechend der gewünschten MOI, wurde der für die Infektion verwendete Virus-haltige Überstand dazu mit serumfreiem Zellkulturmedium verdünnt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert und währenddessen alle 10 – 15 min durch Schütteln gemischt. Anschließend wurden die Zellen bei 400 × g für 5 min pelletiert und dreimal gewaschen, wofür das Zellpellet jeweils in PBS resuspendiert und die Zellen anschließend erneut pelletiert wurden. Für die Kultivierung bis zur Versuchsdurchführung wurden die infizierten Zellen in serumhaltigem Zellkulturmedium aufgenommen und in einer Konzentration von 2 × 10⁵ Zellen/ml in Zellkulturgefäße überführt.

3.3 Methoden zur Analyse von Proteinen

3.3.1 Immuncolorimetrischer Assay

Die Bestimmung von Virustitern erfolgte mithilfe eines Immuncolorimetrischen Assays (ICA). Hierbei wird die Auszählung der durch die MuV-Infektion entstandenen Plaques durch die Detektion unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen das MuV F-Protein und einer anschließenden enzymatisch katalysierten Farbreaktion ermöglicht.

Für die Durchführung des Tests wurden Vero76 Zellen am Tag vor der Infektion in geeigneter Verdünnung in 48-Loch Platten ausgesät und bis zum Erreichen von 90 – 100 % Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Von den zu untersuchenden Virus-haltigen Zellkulturüberständen wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt. Dazu wurden in eine neue 48-Loch Platte jeweils 450 µl serumfreies Zellkulturmedium pro Vertiefung vorgelegt. Anschließend wurden 50 µl der zu untersuchenden Virussuspension in die erste Vertiefung einer Reihe

pipettiert, sodass eine Verdünnung von 10^{-1} hergestellt wurde. Durch Überführen von jeweils 50 μl in die nächste Vertiefung einer Reihe wurde die Virussuspension in 10er Schritten bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-6} weiterverdünnt. Für die Infektion wurde das verbrauchte Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen, diese durch Zugabe von jeweils 100 μl Virusverdünnung pro Vertiefung infiziert und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Um die Ausbreitung der Infektion über das Zellkulturmedium zu verhindern, wurden die Zellen anschließend mit 500 μl CMC (Carboxymethylcellulose)-Overlay pro Vertiefung überschichtet. Nach der Inkubation für sechs Tage bei 37 °C und 5 % CO_2 wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie durch die Zugabe von 200 μl Paraformaldehyd (PFA, 2 %) pro Vertiefung für 30 min bei RT fixiert wurden. Vor und nach der Permeabilisierung für 10 min mit 200 μl Methanol (100 %) bei -20 °C wurden die Zellen erneut einmal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindestellen des Primärantikörpers abzusättigen, wurden die Zellen für mindestens 30 min in 300 μl BSA (bovines Serumalbumin)-haltigem Blockpuffer VI inkubiert. Zur Visualisierung der virusinduzierten Plaques wurde das MuV F-Protein mittels eines spezifischen, monoklonalen Antikörpers aus der Maus (MAB 846) detektiert. Der Antikörper wurde dazu 1/2000 in Blockpuffer VI verdünnt und die Zellen wurden mit 100 μl dieser Verdünnung für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS-T_{0,1} gewaschen. Der an die Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelte, gegen Maus-IgG gerichtete Sekundärantikörper aus der Ziege wurde 1/1000 in Blockpuffer VI verdünnt. Die Zellen wurden mit 100 μl der Antikörperverdünnung für 30 min inkubiert, bevor sie erneut zweimal mit PBS-T_{0,1} gewaschen wurden. Durch die Zugabe von 100 μl TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)-Substrat erfolgte eine enzymatische Reaktion, bei der die HRP die Reduktion von Peroxiden katalysiert. Die dabei freiwerdenden Protonen führen zur Oxidation von TMB und das zuvor farblose Substrat wird zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Da dieser am Ort seiner Umsetzung präzipitiert, wird die Position des MuV F-Proteins markiert und ermöglicht das Auszählen der Plaques. Die Inkubation mit dem TMB-Substrat erfolgte so lange, bis die Plaques hinreichend gut zu erkennen waren. Danach wurden die Platten mit dest. Wasser gespült. Aufgrund der Überschichtung mit dem zähflüssigen CMC-Overlay ist eine Ausbreitung der Infektion nicht über das Zellkulturmedium, sondern nur über direkten Zell-Zell-Kontakt möglich. Daher entspricht die Anzahl der Plaques einer Vertiefung der Anzahl der infektiösen Viruspartikel, die in der zur Infektion verwendeten Virusverdünnung enthalten waren. Unter Einbeziehung der hergestellten Verdünnungen und des bei der Infektion eingesetzten Volumens lässt sich der Virustiter pro ml berechnen und in der Einheit pfu/ml angeben.

3.3.2 SDS-PAGE

Mittels einer SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) können Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Hierbei dient ein Polyacrylamidgel als Trägermedium, welches durch die radikalische Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt wird. Die Reaktion wird durch die Zugabe von APS (Ammoniumperoxosulfat) gestartet und von TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin) katalysiert. Durch Aufkochen in einem SDS-haltigen Puffer werden die Proteine vor der Auftrennung denaturiert. Bei SDS handelt es sich um ein anionisches Detergenz, das mit den Proteinen micellenartige Komplexe bildet, sodass die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Diese weisen dadurch eine zu ihrer Masse proportionale, negative Ladung auf und wandern im Polyacrylamidgel bei Anlegen einer elektrischen Spannung in Richtung der Anode. Sekundär-, Tertiär- sowie Quartärstrukturen der Proteine können durch die Reduktion von Disulfidbrückenbindungen durch Zugabe von β -Mercaptoethanol gelöst werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine ist aufgrund des Molekularsieb-Effekts der Gelporen umgekehrt proportional zur Molekülgröße. Diese kann durch den Vergleich mit im Gel ebenfalls aufgetrennten Markerbanden bekannter Größe bestimmt werden. Es wurden vertikale Gele nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese verwendet. Die Proteine laufen dabei zuerst durch ein großporiges Sammelgel (pH 6,8) und werden unabhängig von ihrer Größe an der Lauffront ankonzentriert. Erst dann erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe im kleinporigen Trenngel (pH 8,8). Auf diese Weise werden sehr scharfe Proteinbanden erhalten. Zur Herstellung der Gele wurde zunächst das Trenngel zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen, wobei eine gerade Trennlinie durch Überschichtung mit Isopropanol erzeugt wurde. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol durch Waschen mit destilliertem Wasser entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Das Einsetzen eines geeigneten Elektrophoresekamms ermöglichte dabei die Erzeugung von Taschen zur Probenbeladung.

Zur Herstellung der Zellysate wurden adhärent wachsende Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit RIPA (*Radioimmunoprecipitation Assay*) Puffer, dem ein Protease-Inhibitor-Cocktail in der Verdünnung 1/100 zugesetzt wurde, lysiert. Für eine Vertiefung im 12-Loch Format wurden dabei 80 μ l und für eine Vertiefung im 6-Loch Format 150 μ l RIPA Puffer eingesetzt. Nach kurzer Inkubation bei RT wurden die Zellen abgeschabt, in Reaktionsgefäße überführt und Nukleinsäuren durch die Zugabe von 0,125 U/ μ l Benzonase-Nuklease und Inkubation für 5 min bei RT abgebaut. Um das Auftragen einer konstanten Proteinmenge bei allen Proben zu gewährleisten, wurde die Proteinkonzentration mittels BCA (Bicinchoninsäure)-Assay unter Verwendung des *Pierce™ BCA Protein Assay Kits* bestimmt. Diese Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} durch die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tyrosin und

Tryptophan sowie den Peptidbindungen in alkalischer Umgebung. Das reduzierte Cu⁺ bildet mit der Bicinchoninsäure anschließend einen Farbkomplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm mittels Photometer bestimmt werden kann. Der Assay wurde im 96-Loch Format durchgeführt. Es wurde zunächst eine Standardreihe mit Verdünnungen des Proteins BSA bekannter Konzentration hergestellt. Die zu untersuchenden Zellysate wurden in zwei verschiedenen Verhältnissen mit PBS verdünnt und in einer Dreifachbestimmung vermessen. Nach Mischen der BSA-haltigen mit der Cu²⁺-haltigen Komponente wurden 100 µl dieses Ansatzes zu 10 µl der vorbereiteten Proben gegeben und für 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 562 nm am Photometer. 50 – 60 µg Protein wurden anschließend mit 4× *RotiLoad 1*-Probenpuffer versetzt, sodass eine Probe mit 1-fach konzentriertem Probenpuffer erhalten wurde. Der Ansatz wurde für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und in eine Geltasche aufgetragen. Vom Proteinmarker *PageRuler Prestained Protein Ladder* wurden 4 µl aufgetragen und die Elektrophorese durch Anlegen einer Spannung von 80 V gestartet. Nach dem Einlaufen der Proteine in das Trenngel wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Trenn- und Sammelgel wurden nach der Zusammensetzung in Tabelle 9 hergestellt.

Tabelle 9: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel bei der SDS-PAGE

Reagenz	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)	Trenngel (15 %)	Sammelgel (5 %)
Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	1,25 ml
Acrylamid (30 %)	5 ml	6 ml	7,5 ml	1,65 ml
dH ₂ O	6,2 ml	5,1 ml	3,6 ml	6,85 ml
SDS (10 %)	150 µl	150 µl	150 µl	100 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
APS (10 %)	75 µl	75 µl	75 µl	60 µl

3.3.3 Western Blot

Die mittels SDS-PAGE (Kap. 3.3.2) aufgetrennten Proteine können durch das Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Acrylamidgel auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen werden. Aufgrund ihrer negativen Ladung durch die Komplexbildung mit SDS, wandern die Proteine in Richtung der Anode und werden mittels hydrophober und ionischer Wechselwirkungen auf der Membran festgehalten. Mit spezifischen Primärantikörpern können die Proteine anschließend selektiv markiert werden. Die Detektion erfolgt durch die Bindung eines spezifischen POD (Peroxidase)-gekoppelten Sekundärantikörpers an den Fc (*fragment crystallisable*)-Teil des Primärantikörpers. Nach Zugabe des Detektionsreagenzes katalysiert die POD die Reduktion der darin enthaltenen Peroxide. Die dabei freiwerdenden Protonen oxidieren

das Substrat Luminol, was zur Entwicklung von Chemilumineszenz führt. Die freigesetzte Lichtmenge ist proportional zur Menge an Antikörpern und damit auch an Antigen und kann mittels eines Chemilumineszenz-Imagers detektiert werden.

Der Transfer der Proteine wurde mit der *Semidry-Blot*-Methode durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde zunächst durch Inkubation in Methanol für 15 s und nachfolgendem Spülen in dest. H₂O aktiviert. Anschließend wurden Membran, Filterpapiere und Gel kurz im Transferpuffer inkubiert. Die untere Elektrodenplatte dient während des Transfers als Anode, daher wurde der Transferstapel in folgender Reihenfolge von unten nach oben zusammengesetzt: Filterpapier, PVDF-Membran, Gel, Filterpapier. Für den Transfer der Proteine wurde eine Stromdichte von 0,8 mA pro cm² für 60 min angelegt. Für den Transfer des SH-Proteins wurde die Zeit auf 30 min reduziert. Um unspezifische Bindungsstellen der verwendeten Antikörper zu verringern und abzusättigen, wurde die Membran anschließend kurz bei RT getrocknet und nach einer erneuten Aktivierung in Methanol für mindestens 1 h bei RT in Blockpuffer I inkubiert. Die gewünschten Proteine wurden nachfolgend mit einem spezifischen Primärantikörper markiert, der wie in Tabelle 10 angegeben im jeweiligen Blockpuffer verdünnt über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert wurde. Unspezifisch gebundene Primärantikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran für jeweils 5 min in PBS-T_{0,1} entfernt. Spezifisch gebundene Primärantikörper wurden mittels HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper in der wie in Tabelle 10 angegebenen Verdünnung durch die Inkubation der Membran für 1 h bei RT detektiert. Nachdem die Membran dreimal für 5 min in PBS-T_{0,1} und einmal in PBS gewaschen wurde, erfolgte die Visualisierung der Antikörperbindung durch Zugabe des Substrates *Lumi-LightPLUS*. Hierfür wurden die *Luminol/Enhancer*- und die *Stable Peroxide Solution* zu gleichen Teilen gemischt, für 5 min mit der Membran inkubiert und die freigesetzte Chemilumineszenz mittels *Advanced Fluoreszenz Imagers* detektiert. Die Expositionszeit wurde je nach Stärke der zu messenden Signale gewählt. Um die gleiche Membran nacheinander mit Antikörpern zu markieren, wurde diese nach der Detektion zunächst kurz mit PBS gewaschen und dann für 5 - 15 min in *Restore™ Western Blot Stripping Buffer* inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T_{0,1} für jeweils 5 min wurde die Membran wie beschrieben geblockt und mit Antikörpern inkubiert.

Tabelle 10: Antikörperverdünnungen für die Proteinmarkierung im Western Blot

Antikörper	Wirtsspezies	Primär/ Sekundär	Verdünnung	Puffer
anti-Phospho-IKK α / β (Ser176/180)	Kaninchen	P	1/1000	Blockpuffer II
anti-IKK β	Kaninchen	P	1/1000	Blockpuffer II
anti-Phospho-NF- κ B p65 (Ser536)	Kaninchen	P	1/1000	Blockpuffer II
anti-NF- κ B p65	Kaninchen	P	1/1000	Blockpuffer II
anti-Phospho-I κ B α (Ser32)	Kaninchen	P	1/1000	Blockpuffer II
anti-I κ B α	Maus	P	1/1000	Blockpuffer IV
anti-IL-1 β (Proform)	Kaninchen	P	1/1000	Blockpuffer II
anti-IL-18 (Proform)	Maus	P	1/1000	Blockpuffer I
anti- β -Aktin	Kaninchen	P	1/5000	Blockpuffer IV
anti-GAPDH	Kaninchen	P	1/7000	Blockpuffer I
anti-TNFR1	Kaninchen	P	1/1000	Blockpuffer II
anti-TLR3	Kaninchen	P	1/1000	Blockpuffer II
anti-RIP1	Kaninchen	P	1/1000	Blockpuffer II
anti-IRAK1	Kaninchen	P	1/1000	Blockpuffer II
anti-MyD88	Kaninchen	P	1/1000	Blockpuffer II
anti-Mumps NP	Maus	P	1/200	Blockpuffer I
anti-FLAG M2	Maus	P	1/1000	Blockpuffer III
anti-Kaninchen IgG-HRP	Ziege	S	1/3000	Blockpuffer IV
anti-Maus IgG-HRP	Pferd	S	1/3000	Blockpuffer IV

3.3.4 Immunfluoreszenz Assay

Proteine können in fixierten Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden, wodurch ihre Lokalisation in der Zelle bestimmt werden kann. Dazu werden die nachzuweisenden Proteine mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern markiert. Das Prinzip der Detektion beruht auf der spezifischen Anregung von Fluorophoren mit Licht, dessen Wellenlänge dem Absorptionsmaximum des Fluorophors entspricht. Durch die Absorption werden Elektronen von einem niedrigeren Energieniveau in ein höheres angehoben und verweilen kurz im angeregten Zustand. Fallen die Elektronen in den Grundzustand zurück, kommt es zur Emission von längerwelligerem Licht. Dieses wird detektiert und auf die Position der Fluorophore und damit die Lokalisation der Proteine in der Zelle kann geschlossen werden. Im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie wird am konfokalen Laserscannmikroskop (cLSM) eine Probe punktweise durch einen Laser bestrahlt und die emittierte Fluoreszenz ebenfalls punktweise detektiert. Zusätzlich ist eine Lochblende konfokal zur Fokusebene angeordnet, sodass emittiertes Licht, welches nicht aus der betrachteten Ebene stammt, auch

nicht vom Detektor erfasst werden kann. Auf diese Weise ist es möglich ein kontrastreiches und hochaufgelöstes Abbild der Probe zu erhalten.

Für die Durchführung des Assays wurden adhärent wachsenden Zellen auf Glasplättchen im 24-Loch Format ausgesät. Nach der dem Versuch entsprechenden Behandlung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit 300 µl PFA (4 %) pro Vertiefung für 20 min bei RT fixiert. Vor und nach der Permeabilisierung für 10 min mit 300 µl Triton X-100 (0,1 %) in PBS bei RT wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Absättigung von freien, unspezifischen Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation in BSA-haltigem Blockpuffer V für mindestens 1 h. Währenddessen wurde der spezifische, gegen das nachzuweisende Protein gerichtete Primärantikörper mit einem Fluorophor-markierten Fab (*fragment antigen binding*)-Fragment konjugiert. Dazu wurden zunächst 20 µl PBS in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und die benötigten Mengen an Primärantikörper und Fab-Fragment entsprechend der Tabelle 11 zu entnehmenden Verdünnungen zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert, bevor zum Abfangen der ungebundenen Fab-Fragmente unspezifisches IgG entsprechend der Spezies des Primärantikörpers in der Verdünnung 1/200 zugegeben wurde und eine weitere Inkubation für 20 min bei RT im Dunkeln erfolgte. Anschließend wurden die Ansätze mit Blockpuffer V aufgefüllt und die separat hergestellten Ansätze verschiedener Primärantikörper vereinigt. Die Zellen wurden mit 150 µl des Antikörperansatzes für 1 h bei RT im Dunkeln unter Schütteln inkubiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS-T_{0,05} mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt. Eine DAPI-Stammlösung (5 mg/ml) wurde dazu 1/20.000 in Blockpuffer V verdünnt und mit den Zellen (150 µl pro Vertiefung) für 10 min bei RT im Dunkeln unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS-T_{0,05} und zweimal mit PBS gewaschen, kurz mit dH₂O gespült und mit jeweils 6 µl Mowiol pro Glasplättchen auf Objektträgern fixiert. Anschließend wurden die Präparate am cLSM780 analysiert und die gemessenen Daten mit der Software Zen2010 ausgewertet und graphisch als Bild dargestellt.

Tabelle 11: Bedingungen bei der Markierung mit Antikörpern im Immunfluoreszenz Assay

Primärantikörper (Verdünnung)	Fab-Fragment (Verdünnung)
anti-Mumps NP (1/500)	Ziege Fab anti-Maus IgG (H+L)-Alexa Fluor 488 (1/200)
anti-NF-κB p65 (1/200)	Ziege Fab anti-Kaninchen IgG (H+L)-Cy3 (1/200)

3.3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine weitere Methode dar, um Proteine mittels Fluorophor-markierten Antikörpern zu detektieren, wobei eine quantitative Bestimmung auf Zellebene erfolgt. Während der Messung wird eine Einzelzellsuspension durch eine Kapillare gesaugt, sodass in einer Durchflusszelle jede Zelle separat durch einen fokussierten Laserstrahl angeregt wird. Die Menge des dabei erzeugten Streulichts korreliert mit der Größe und der Granularität der untersuchten Zelle. Darüber hinaus können spezifisch an zelluläre Proteine gekoppelte Fluorophor-markierte Antikörper durch die gezielte Anregung über verschiedenfarbige Laser detektiert werden. Die Grundlagen der Emission von absorbiertem Licht sind in Kap. 3.3.4 beschrieben. Nach der Auswertung der Messergebnisse lässt sich für jede gemessene Zelle die Höhe der Signale angeben und damit, ob sie für das untersuchte Protein positiv oder negativ ist. Eine quantitative Aussage bezogen auf die gesamte gemessene Probe ist mit dieser Methode möglich.

Adhärent wachsende Zellen wurden nach der dem Versuch entsprechenden Behandlung zweimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von einer dem jeweiligen Format angepassten Menge an Trypsin-EDTA-Lösung sowie kurzer Inkubation bei 37 °C vom Zellkulturgefäß abgelöst. Die vereinzelt Zellen wurden in insgesamt 1 ml FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)-PBS aufgenommen, welches FKS zur Inhibierung des Trypsins enthält, und bei 600 × g für 5 min bei RT pelletiert. In Suspension wachsende Zellen wurden direkt mit dem Zellkulturmedium in Reaktionsgefäße überführt und durch Zentrifugation bei 600 × g für 5 min bei RT pelletiert. Nachdem adhärenente Zellen sowie Suspensionszellen zum Waschen einmal in 1 ml PBS resuspendiert wurden, erfolgte die Fixierung der Zellen durch Zugabe von 400 µl PFA (2 %) in PBS und Inkubation für 20 min bei RT. Anschließend wurde das PFA durch Zugabe von 1 ml FACS-PBS inaktiviert, die Zellen wurden bei 600 × g für 5 min bei RT pelletiert und in frischem FACS-PBS aufgenommen. Für die Markierung mit spezifischen Antikörpern wurden die Zellen erneut pelletiert und zur Permeabilisierung in 200 µl 0,5 % Saponin in FACS-PBS aufgenommen und auf eine 96-Loch Platte überführt. Je Vertiefung wurden die Zellen mit 50 µl der jeweiligen, in 0,5 % Saponin in FACS-PBS angesetzten Antikörperverdünnung inkubiert und anschließend zweimal mit 150 µl 0,5 % Saponin in FACS-PBS gewaschen. Zwischen Antikörpermarkierung und Waschsritten wurden die Zellen jeweils durch Zentrifugation bei 400 × g für 5 min bei 4 °C pelletiert. Die verwendeten Antikörper sind in der eingesetzten Reihenfolge sowie ihrer Verdünnung und Inkubationszeit in Tabelle 12 aufgeführt. Nach der Markierung mit Antikörpern wurden die Zellen in 200 µl FACS-PBS aufgenommen und am FACSCalibur Durchflusszytometer vermessen. Die Messdaten wurden mittels der Software *Cell Quest Pro* ausgewertet.

Tabelle 12: Antikörperverdünnungen für die Proteinmarkierung in der Durchflusszytometrie

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit
anti-Mumps NP	1/200	20 min
Ziege Fab anti-Maus IgG (H+L)-Alexa Fluor 488	1/100	15 min
anti-FLAG-APC	1/800	20 min

3.3.6 Co-Immunpräzipitation

Interaktionen von Proteinen lassen sich mittels der Co-Immunpräzipitation (Co-IP) untersuchen. Hierbei erfolgt die Präzipitation eines Zielproteins über die Bindung an einen Antikörper, der an *Beads* gekoppelt ist. Diese können durch Zentrifugation oder aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften gefällt werden. Nachdem durch das Waschen mit geeigneten Puffern ungebundene Proteine entfernt wurden, können in einer nachfolgenden SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot die präzipitierten Proteine analysiert werden. Auf diese Weise lassen sich Proteine identifizieren, die direkt oder indirekt im Komplex mit weiteren Proteinen an das Zielprotein gebunden haben.

Zur Durchführung des Assays wurden adhärent wachsende Zellen im 6-Loch Format ausgesät. Nach der dem Versuch entsprechenden Behandlung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, bevor 500 µl Lysispuffer Co-IP pro Vertiefung zugegeben und die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert wurden. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Zelllysate bei $12.000 \times g$ für 10 min und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden ebenfalls auf Eis durchgeführt. Für eine Expressionskontrolle wurden pro Ansatz 50 µl direkt abgenommen und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Zelllysate wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 3 bis 6 h mit Protein A gekoppelten Sepharose-*Beads* unter Schütteln inkubiert, bevor sie über Nacht mit Agarose-*Beads* inkubiert wurden, an die kovalent ein anti-FLAG-Antikörper gebunden ist. Dabei wurden für Zelllysate transfizierter Zellen 20 µl *Bead*-Suspension und für Zelllysate infizierter Zellen 40 µl *Bead*-Suspension eingesetzt. Alle *Beads* wurden vor der Verwendung zweimal mit TBS gewaschen, wobei die *Beads* jeweils durch Zentrifugation bei $7000 \times g$ für 1 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gefällt wurden. Die anti-FLAG-gekoppelten *Beads* wurden vor der Inkubation mit dem Zelllysat mit BSA (1 %) zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 3 bis 6 h unter Schütteln inkubiert und nach der Über-Nacht-Inkubation mit dem Lysat dreimal mit Lysispuffer gewaschen. Die an die *Beads* gebundenen Proteine wurden durch die Zugabe von 20 µl 2× RotiLoad 1 und dem Aufkochen bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ für 3 min eluiert. Nach dem Entfernen der *Beads* durch Zentrifugation bei $7000 \times g$ für 1 min bei RT wurden die gefällten Proteine sowie 15 µl der Expressionskontrolle (plus 5 µl 4× RotiLoad 1) wie in Kap. 3.3.2 und 3.3.3 beschrieben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot detektiert.

3.3.7 ELISA

Die quantitative Bestimmung von Proteinen in einer Probe kann mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) durchgeführt werden. Bei der Variante des Sandwich-ELISA wird dazu ein gegen das nachzuweisende Antigen gerichteter Antikörper auf eine Mikrotiterplatte gebunden. Die in der zu untersuchenden Probe enthaltenen Antigene binden an die immobilisierten Antikörper und können anschließend durch die Zugabe eines Enzym-gekoppelten Antigen-spezifischen Antikörpers markiert werden. Die Detektion erfolgt durch Zugabe eines spezifischen Substrats, dessen Umsetzung einen Farbumschlag bewirkt, der proportional zu der Menge des in der Probe enthaltenen Antigens ist.

In dieser Arbeit wurde die Freisetzung der Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-18 nach Infektion mit rMuV untersucht. Hierzu wurden zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen (Kap. 3.2.1) mit rMuV infiziert. Nach der dem Versuch entsprechenden Kultivierungszeit wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, bei 2000 g für 5 min zentrifugiert und bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Die Freisetzung der verschiedenen Zytokine wurde mit spezifischen Assays nachgewiesen, wobei für den Nachweis von TNF α das *Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit*, für den Nachweis von IL-1 β das *Human IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit* und für den Nachweis von IL-18 das *Human IL-18 ELISA Kit* verwendet wurden. Bei allen Assays wurden die zu untersuchenden Proben (100 – 200 μ l pro Vertiefung je nach Assay) auf Mikrotiterplatten pipettiert, auf denen bereits die gegen die jeweiligen Zytokine gerichteten Antikörper immobilisiert sind. Nach der dem Assay entsprechenden Inkubationszeit von einer bis zwei Stunden bei RT wurden die Proben abgenommen und die Platten zur Entfernung von ungebundenen Proteinen drei bis vier Mal je nach Assay mit 400 μ l spezifischem Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen. Anschließend wurde jeweils eine Verdünnung eines Enzym-gekoppelten, Antigen-spezifischen Antikörpers (100 – 200 μ l pro Vertiefung je nach Assay) auf die Platten gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach weiterem drei bis viermaligen Waschen erfolgte die Zugabe der das Substrat TMB enthaltenden Entwicklungslösung (100 – 200 μ l pro Vertiefung je nach Assay). Nach einer 20 – 30 minütigen Inkubation der Platten im Dunklen wurde die Farbreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (50 – 100 μ l pro Vertiefung je nach Assay) abgestoppt und die OD einer jeden Vertiefung innerhalb von 30 min bei 450 nm am Photometer gemessen. Zusätzlich erfolgte die Messung auch bei einer Wellenlänge von 540 nm. Letztere Messwerte wurden zur Korrektur der optischen Mangelhaftigkeiten der Mikrotiterplatten von den Messwerten bei 450 nm abgezogen. Für die quantitative Berechnung der Menge an freigesetzten Zytokinen wurde bei jedem durchgeführten Assay ein spezifischer Standard in verschiedenen Konzentrationen mitgeführt. Mittels der erstellten Standardkurve wurde die Konzentration der Zytokine in den einzelnen Proben bestimmt.

3.4 Methoden zur Analyse von Signalwegen

3.4.1 Luciferase Reporterassay

Die Aktivität eines Transkriptionsfaktors lässt sich über einen Reporterassay ermitteln. Hierbei steht ein auf einem Plasmid kodiertes Reportergen unter der Kontrolle eines Promotors, der Bindeelemente des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors enthält. Bindet dieser an den Promotor, wird das Reportergen transkribiert und das Reporterprotein synthetisiert. Bei diesem Protein handelt es sich um ein Enzym, dessen Menge durch die Zugabe eines spezifischen Substrats bestimmt werden kann. Der durch das Enzym katalysierte Umsatz des Substrats, der zum Beispiel colorimetrisch oder über die Detektion der freigesetzten Lumineszenz gemessen werden kann, entspricht daher der Aktivität des Transkriptionsfaktors. Mit dieser Methode lassen sich nicht nur Transkriptionsfaktoren untersuchen, sondern sie kann auch zur Charakterisierung von genregulatorischen DNA-Sequenzen eingesetzt werden.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Untersuchung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde ein Reporterplasmid verwendet, welches das Gen der Firefly-Luciferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* unter der Kontrolle von NF- κ B-Bindeelementen des IFN- β -Promotors enthält (Visvanathan & Goodbourn, 1989). Das Reporterplasmid wurde zusammen mit einem Plasmid, welches für das Enzym β -Galactosidase kodiert in 293G oder A549 Zellen wie in Kap. 3.2.3 beschrieben transfiziert. Das Gen der β -Galactosidase steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors, der konstitutiv in allen Zellen aktiv ist, sodass die Synthese und Aktivität dieses Enzyms als Maß für die Transfektionseffizienz verwendet werden kann. Um den Einfluss des MuV SH-Proteins auf die NF- κ B-Aktivierung zu analysieren, wurden die Zellen außerdem mit einem Plasmid für die Expression des SH-Proteins oder als Kontrolle mit einem Leervektor transfiziert. Entsprechend der Versuchsbedingung wurden zusätzlich Plasmide, die für Proteine des NF- κ B-Signalwegs kodieren, transfiziert. Die Zellen wurden im 12-Loch Format kultiviert. Nach der dem Versuch entsprechenden weiteren Behandlung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 200 μ l *Reporter Lysis Buffer* pro Vertiefung und Inkubation für 15 min bei RT unter regelmäßigem Schütteln lysiert. Die Zellen wurden von der Zellkulturplatte abgeschabt und die Lysate in Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden für 15 s gevortext und die festen Bestandteile bei 13.000 rpm für 2 min bei RT abzentrifugiert. Zur Bestimmung der Aktivität der Luciferase wurde das *ONE-Glo™ Luciferase Assay System* verwendet. Dazu wurden 50 μ l Lysat in eine weiße 96-Loch Platte vorgelegt und die Enzymreaktion durch Zugabe von jeweils 50 μ l Substratpuffer (*ONE-Glo Buffer*) gestartet. Der Puffer enthält das Substrat 5'-Fluoroluciferin, das von der Luciferase zu Oxyfluoroluciferin umgesetzt wird. Die Messung der bei dieser Reaktion freigesetzten Lumineszenz erfolgte sofort nach Zugabe des Puffers am Photometer, wobei jede

Vertiefung für 1 s vermessen wurde. Die Aktivität der β -Galactosidase wurde unter Verwendung des *β -Galactosidase Enzyme Assay Systems with Reporter Lysis Buffer* bestimmt. Hierzu wurden 50 μ l Lysat in eine durchsichtige 96-Loch Platte überführt und die Enzymreaktion durch Zugabe von jeweils 50 μ l Substratpuffer (*Assay 2x Buffer*) gestartet. Vor dieser Messung wurde die Platte für 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 150 μ l Natriumkarbonatlösung (1 M) gestoppt. Die Umsetzung des farblosen Substrats o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) in das farbige Produkt o-Nitrophenyl wurde durch Messung der Absorption bei 420 nm mittels Photometer quantifiziert. Zur Normalisierung der Lumineszenzmesswerte wurden diese durch die entsprechenden Absorptionmesswerte dividiert. Die n-fache Aktivierung von NF- κ B wurde berechnet, indem der normalisierte Wert für einen stimulierten Ansatz durch den normalisierten Wert des unstimulierten Ansatzes dividiert wurde. Um beispielsweise die n-fache Aktivierung von rMuV-SH-infizierten Zellen mit der von rMuV-SHstop-infizierten Zellen zu vergleichen, wurde der Wert für die rMuV-SH- durch den Wert für die rMuV-SHstop-infizierten Zellen dividiert.

4 Ergebnisse

Um die Funktion des SH-Proteins im Kontext einer Virusinfektion untersuchen und charakterisieren zu können, wurden mittels des Systems der Reversen Genetik rekombinante MuV hergestellt (Franz, 2012). Dabei wurden vier rMuV erzeugt, wobei zwei Varianten das SH-Protein exprimieren, bei den anderen zwei Viren ist die Expression eines funktionellen SH-Proteins durch das Einfügen von drei Stoppkodons in das *SH*-Gen unterdrückt. Da zu Beginn der Arbeiten kein gegen das SH-Protein gerichteter Antikörper zur Verfügung stand, um die Detektion des Proteins mit immunologischen Methoden zu ermöglichen, wurde ein FLAG-Epitop an den N-Terminus oder den C-Terminus des SH-Proteins angefügt. rMuV-SH kodiert für ein SH-Protein mit N-terminalem FLAG-Epitop, während rMuV-SHstop neben dem N-terminalen FLAG-Epitop drei Stoppkodons im *SH*-Gen aufweist. Demzufolge kodiert rMuV-SH-C für ein SH-Protein mit C-terminal angefügtem FLAG-Epitop und rMuV-SHstop-C für ein *SH*-Gen mit eingefügten Stoppkodons und C-terminalem FLAG-Epitop. Die gewünschten Mutationen im *SH*-Gen wurden für alle hergestellten rMuV mittels Sequenzierung bestätigt. Ebenso wurde bereits gezeigt, dass das SH-Protein nur in mit rMuV-SH- oder rMuV-SH-C-infizierten Zellen zu detektieren ist. Dagegen sind die Viren mit den eingefügten Stoppkodons defizient für die Expression des SH-Proteins (Franz, 2012). Abbildung 9 zeigt eine schematische Darstellung des MuV-Genoms, wobei für jedes Virus die eingeführten Änderungen in das *SH*-Gen gekennzeichnet sind.

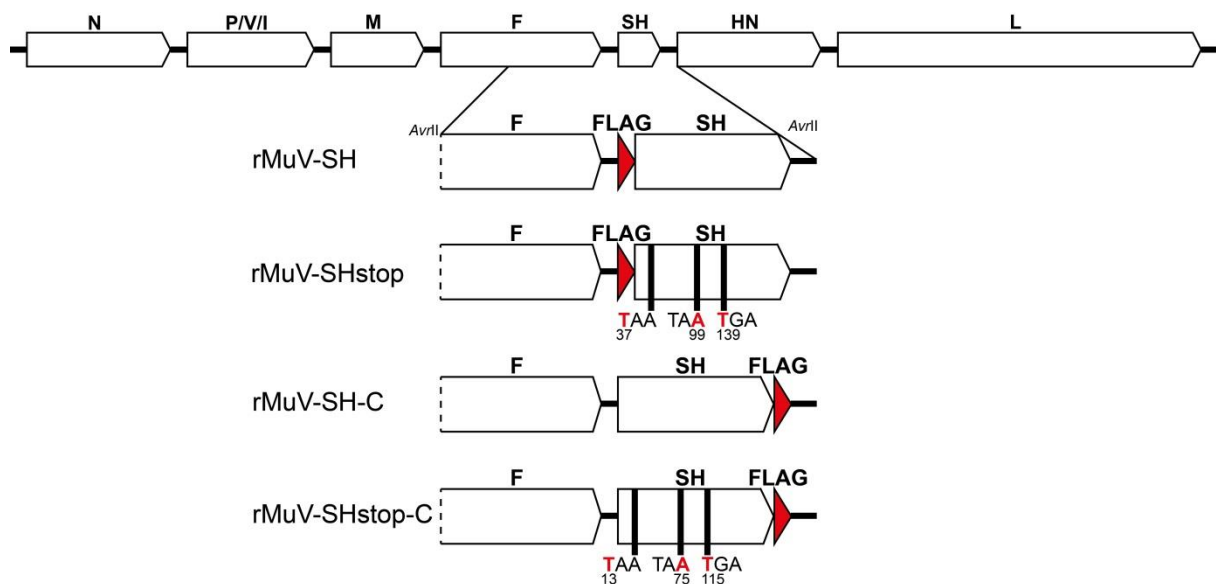


Abbildung 9: Schematische Darstellung der veränderten Genombereiche der hergestellten rMuV.

Für jedes erzeugte Virus ist der während der Herstellung veränderte Genombereich vergrößert dargestellt. Dabei sind die Position des eingefügten FLAG-Epitops sowie die der Stoppkodons gekennzeichnet. Bei rMuV-SHstop beginnt die Nummerierung der mutierten Basen mit dem Startkodon der Sequenz des FLAG-Epitops und bei rMuV-SHstop-C mit dem Startkodon des *SH*-Gens. Die mutierten Basen und das FLAG-Epitop sind in rot hervorgehoben.

4.1 Charakterisierung der rMuV

4.1.1 Charakterisierung des Wachstums

Zunächst wurde untersucht, ob die Unterdrückung der Expression des SH-Proteins einen Einfluss auf das Wachstum der rMuV hat. Dazu wurden Vero76 Zellen mit den vier rMuV mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 0,01 infiziert und die extrazellulären Virustiter mittels ICA analysiert. Die Zelllinie wurde gewählt, da Vero76 Zellen für die routinemäßige Virusanzucht eingesetzt werden. Wie Abbildung 10A zeigt, replizierten alle rMuV zu ähnlichen Titern. Dabei lagen die in den Zellkulturüberstand freigesetzten Viruspartikel an Tag 1 nach Infektion unterhalb der Nachweisgrenze und erreichten am dritten Tag nach Infektion den höchsten Wert, wonach die Titer wieder absanken. Um eine vergleichbare Infektion der Zellen mit den verschiedenen Viren sicherzustellen, wurden die Titer der zur Infektion eingesetzten Virusverdünnungen ermittelt. Diese Anfangstiter sind in Abbildung 9A auf der y-Achse dargestellt und zeigen für alle Viren einen sehr ähnlichen Wert. Die Expression des SH-Proteins bzw. die verhinderte Expression hat daher keinen Einfluss auf die Virusreplikation im Zellkultursystem.

Da auch das Einfügen des FLAG-Epitops eine Veränderung der Genomstruktur darstellt, wurde untersucht, ob sich das Wachstum von rMuV-SH von dem eines rMuV mit unverändertem Genom (rMuV-FL) unterscheidet. Vero76 Zellen wurden hierzu ebenfalls mit diesen beiden rMuV mit einer MOI von 0,01 infiziert. Die Analyse der extrazellulären Virustiter zeigt für rMuV-FL für Tag 1 und 2 nach der Infektion ein im Vergleich zu rMuV-SH leicht erhöhtes Wachstum (Abbildung 10B). Zu den späteren Zeitpunkten zeigte dagegen rMuV-SH eine leicht erhöhte Virusfreisetzung. An den letzten analysierten Zeitpunkten war dagegen kein Unterschied zwischen den Viren zu erkennen. Beide Viren erreichten am 4. Tag nach Infektion den höchsten Wert. Eine vergleichbare initiale Infektion ist durch die Analyse der Anfangstiter, die auf der y-Achse dargestellt sind, bestätigt. Es ist daher anzunehmen, dass das Einfügen des FLAG-Epitops keinen ausgeprägten Effekt auf die Virusreplikation hat.

Der Vergleich der Graphen in Abbildung 10A und B zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf der Virusreplikation, auch wenn eine unterschiedliche Höhe der Titer erreicht wird. Dies kann auch auf Unterschiede in Bezug auf die verwendeten Zellen für die Durchführung der Kinetik und die Analyse der Titer zurückzuführen sein, da die Ergebnisse jeweils nur aus einer in unabhängiger Mehrfachbestimmung durchgeführten Infektion stammen.

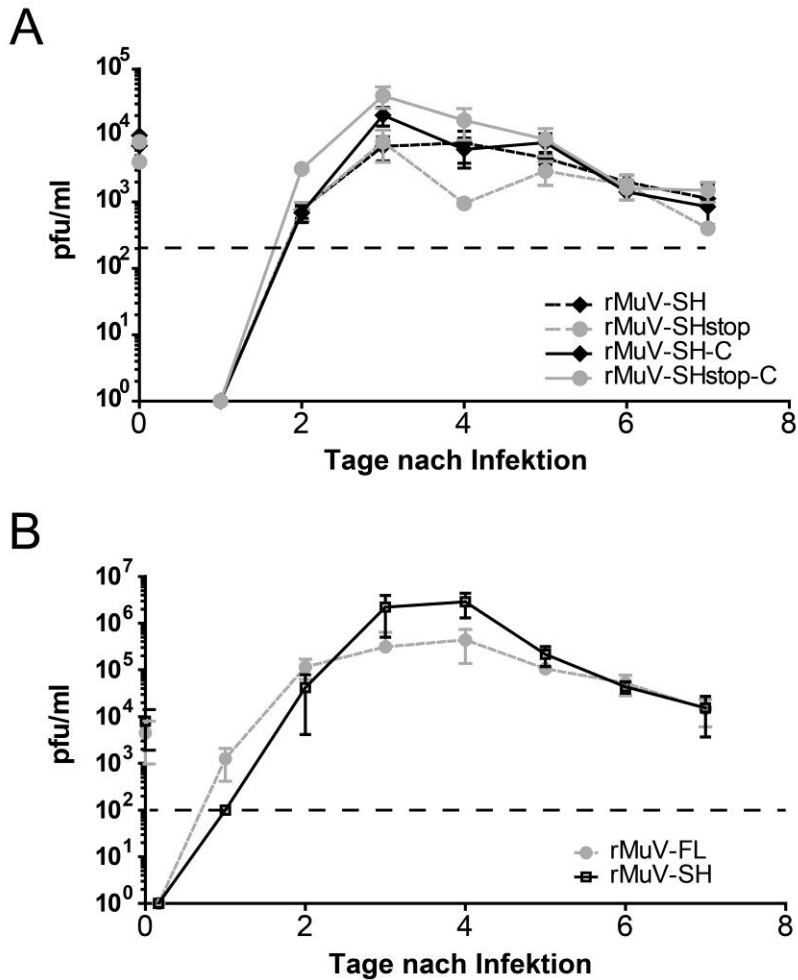


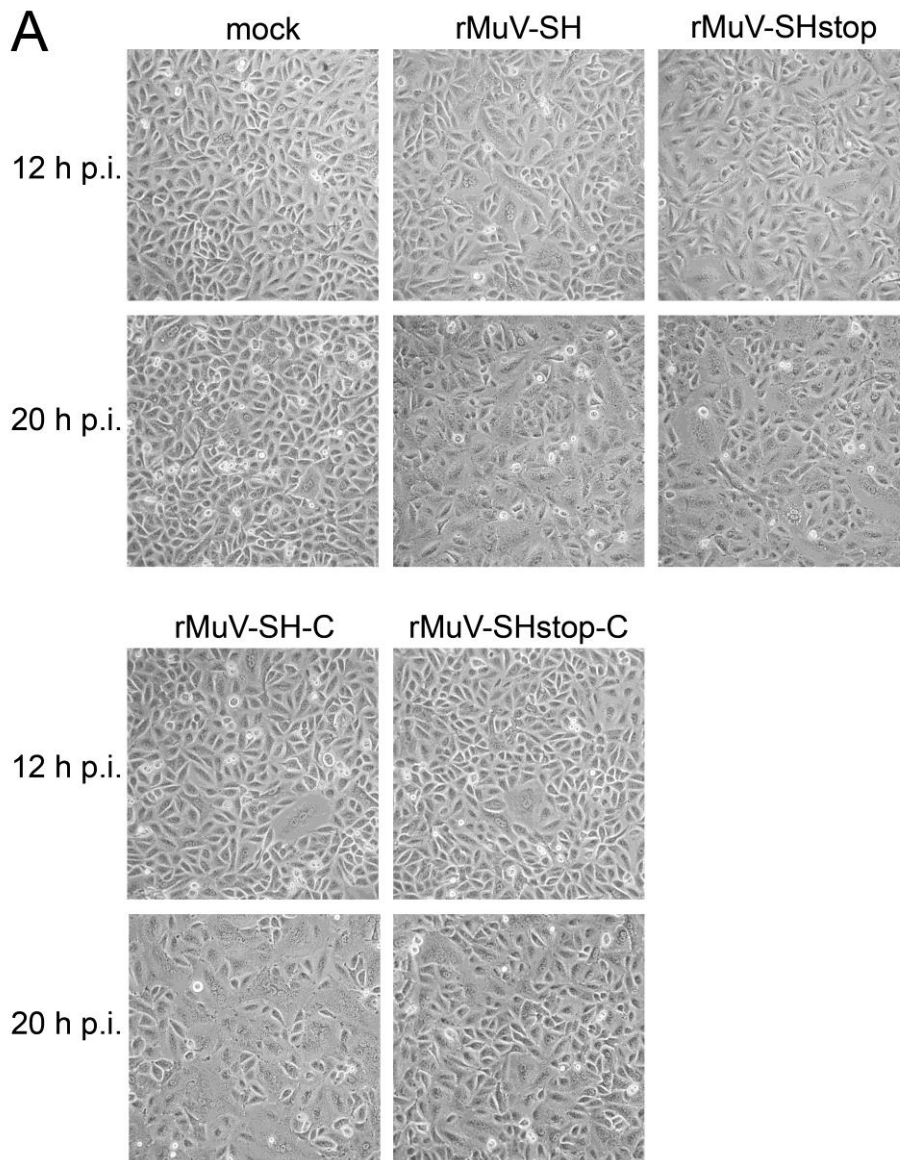
Abbildung 10: Wachstumskinetik der erzeugten rMuV.

Vero76 Zellen wurden mit (A) rMuV-SH, rMuV-SHstop, rMuV-SH-C oder rMuV-SHstop-C und (B) rMuV-FL oder rMuV-SH mit einer MOI von 0,01 infiziert. Dabei wurden pro Virus drei voneinander unabhängige Infektionen zum selben Zeitpunkt durchgeführt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Zellkulturüberstand abgenommen und durch das gleiche Volumen an frischem Medium ersetzt. Mittels ICA auf Vero76 Zellen wurden die Virustiter der Zellkulturüberstände analysiert. Um die Anfangstiter zu bestimmen, wurden die zur Infektion eingesetzten Virusverdünnungen ebenfalls auf Vero76 Zellen titriert. Die Anfangstiter sind auf der y-Achse dargestellt. Das Detektionslimit liegt aufgrund des Analyseverfahrens bei 10^2 (gestrichelte Linie). Die Graphen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung (SD).

4.1.2 Analyse des CPE und der Expression viraler Proteine

Die Kinetik der Expression viraler Proteine in rMuV-infizierten Zellen sowie der durch die rMuV-Infektion induzierte CPE wurden in Vero76 sowie in A549 Zellen analysiert. Letztere Zelllinie wurde gewählt, da Epithelzellen als primäre Zielzellen für eine MuV Infektion *in vivo* beschrieben sind (Rubin *et al.*, 2015) und es sich bei A549 Zellen um eine Zelllinie humanen Ursprungs handelt. Beide Zelllinien wurden mit den verschiedenen rMuV mit einer MOI von 5 infiziert. Abbildung 11 zeigt beispielhaft den auftretenden CPE 12 und 20 h nach Infektion. Bereits 12 h nach Infektion war die Fusion einzelner Zellen zu Synzytien zu erkennen. Aufgrund der morphologischen Unterschiede der beiden Zelllinien waren Synzytien zu diesem Zeitpunkt

bei den A549 Zellen (Abb. 11A) eindeutiger zu beobachten als bei den Vero76 Zellen (Abb. 11B). Unterschiede hinsichtlich der Anzahl und Größe der Synzytien zwischen den Viren waren nicht zu erkennen. 20 h nach Infektion hatte sich der CPE über den gesamten Zellrasen ausgebreitet. Die A549 Zellen zeigten generell kleinere Synzytien als die Vero76 Zellen, bei denen nur noch vereinzelt intakte Zellen zu erkennen waren. In dem in Abb. 11 gezeigten Experiment führte die Infektion mit rMuV-SH im Vergleich zur Infektion mit rMuV-SHstop in A549 Zellen zu einem stärkeren CPE, während in Vero76 Zellen das Gegenteil zu beobachten war. Die rMuV-SH-C-infizierten Zellen beider Zelllinien zeigten einen stärkeren CPE als die rMuV-SHstop-C-infizierten Zellen. Bei Berücksichtigung aller durchgeführten Experimente war jedoch kein Hinweis auf einen stärkeren CPE nach Infektion mit SH-exprimierenden oder SH-defizienten Viren zu erkennen.



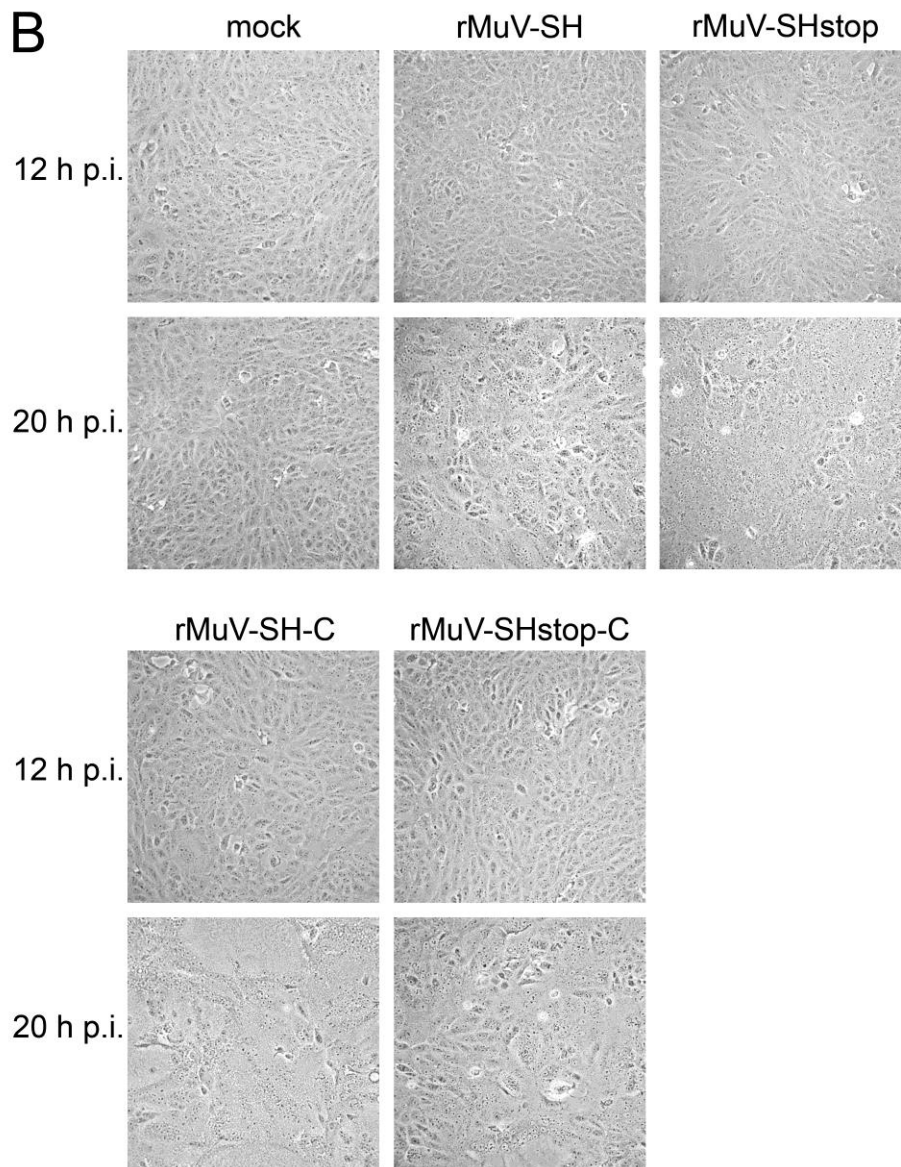


Abbildung 11: Nach rMuV-Infektion induzierter CPE in A549 und Vero76 Zellen.

(A) A549 und (B) Vero76 Zellen wurden mit rMuV-SH, rMuV-SHstop, rMuV-SH-C oder rMuV-SHstop-C mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen am Lichtmikroskop in 100-facher Vergrößerung fotografiert. Nicht-infizierte Zellen (mock) wurden zum Vergleich fotografiert.

Die Analyse der Zellen, die für das virale N- sowie das SH-Protein positiv sind, wurde über einen Zeitraum von 8 bis 20 h nach Infektion mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Wie Abbildung 12 zeigt, nahm die Anzahl der Zellen, die für die Expression des N-Proteins positiv sind, im Verlauf der Infektion zu und erreichte 20 h nach Infektion ein Maximum von ca. 80 % positiver A549 und 60 % positiver Vero76 Zellen. Unabhängig von der Expression des SH-Proteins oder der Position des FLAG-Epitops zeigten alle rMuV eine sehr ähnliche Expression des N-Proteins zu allen Zeitpunkten. Statistische Analysen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier zur Infektion eingesetzten Viren. Die Veränderung des *SH*-Gens und verhinderte Expression des SH-Proteins führt also nicht zu einer veränderten Expression

des N-Proteins. Auffällig war ein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien: Dabei war im Vergleich zu den Vero76 Zellen bei der Infektion mit den N-terminal markierten Viren zu jedem Zeitpunkt ein signifikant höherer Prozentsatz der A549 Zellen positiv für das N-Protein. Für die mit einem C-terminalen Epitop markierten Viren sind die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien statistisch jedoch nicht signifikant (Daten dieser Signifikanzanalyse nicht gezeigt). Auch wenn Vero76 Zellen standardmäßig für die MuV-Anzucht eingesetzt werden und eine sehr gute Freisetzung an Viruspartikeln zeigen (Afzal *et al.*, 2005) sowie 20 h nach Infektionen einen stärkeren CPE als A549 Zellen aufweisen (vergleiche Abb. 11), ist der Prozentsatz infizierter A549 Zellen, vor allem für die N-terminal markierten Viren, dennoch höher. Eine MuV-Infektion scheint daher in A549 Zellen nicht notwendigerweise zum Auftreten eines erkennbaren CPE in allen Zellen zu führen.

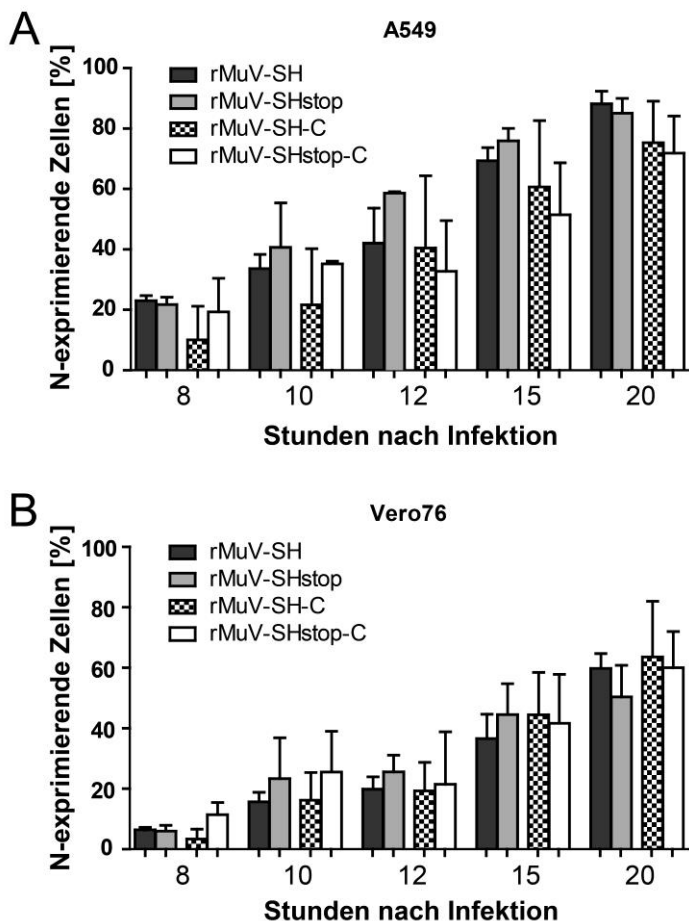


Abbildung 12: Expressionskinetik des N-Proteins in rMuV-infizierten A549 und Vero76 Zellen.

(A) A549 und (B) Vero76 Zellen wurden mit rMuV-SH, rMuV-SHstop, rMuV-SH-C oder rMuV-SHstop-C mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert. Das N-Protein wurde mit einem N-spezifischen Primärantikörper und einem Alexa 488-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Die Proben wurden im Durchflusszytometer gemessen. Die Werte für nicht-infizierte Zellen (mock) wurden von denen für rMuV-infizierte Zellen abgezogen. Die Graphen zeigen den Mittelwert und die SD für drei unabhängige Experimente. Die statistische Analyse wurde mittels eines ungepaarten t-Tests mit einem zweiseitigen p-Wert durchgeführt.

Wie in Abbildung 13A zu erkennen ist, zeigte die Analyse mittels Durchflusszytometrie eine signifikant schnellere Expression des SH-Proteins in rMuV-SH-infizierten A549 Zellen im Vergleich zu rMuV-SH-C-infizierten Zellen 10 und 12 h nach Infektion. Zu den späteren Zeitpunkten war dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Viren zu beobachten, dabei waren 20 h nach Infektion etwa 60 % der A549 Zellen positiv für das SH-Protein. rMuV-SH- und rMuV-SH-C-infizierte Vero76 Zellen zeigten wie auch die infizierten A549 Zellen eine Zunahme der Anzahl der für das SH-Protein positiven Zellen im Verlauf der Infektion, wobei zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Viren festzustellen waren (Abb. 13B). 20 h nach Infektion waren etwa 50 % der Vero76 Zellen positiv für die Expression des SH-Proteins. Der Vergleich der beiden Zelllinien untereinander zeigte nur für rMuV-SH-infizierte Zellen zum Zeitpunkt 12 h nach Infektion eine signifikant höhere Anzahl SH-positiver Zellen für die Zelllinie A549 (Daten dieser Signifikanzanalyse nicht gezeigt). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass für funktionelle Untersuchungen des SH-Proteins der Zeitraum ab 15 h nach Infektion geeignet ist, da ab diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede in der Expression nachweisbar waren.

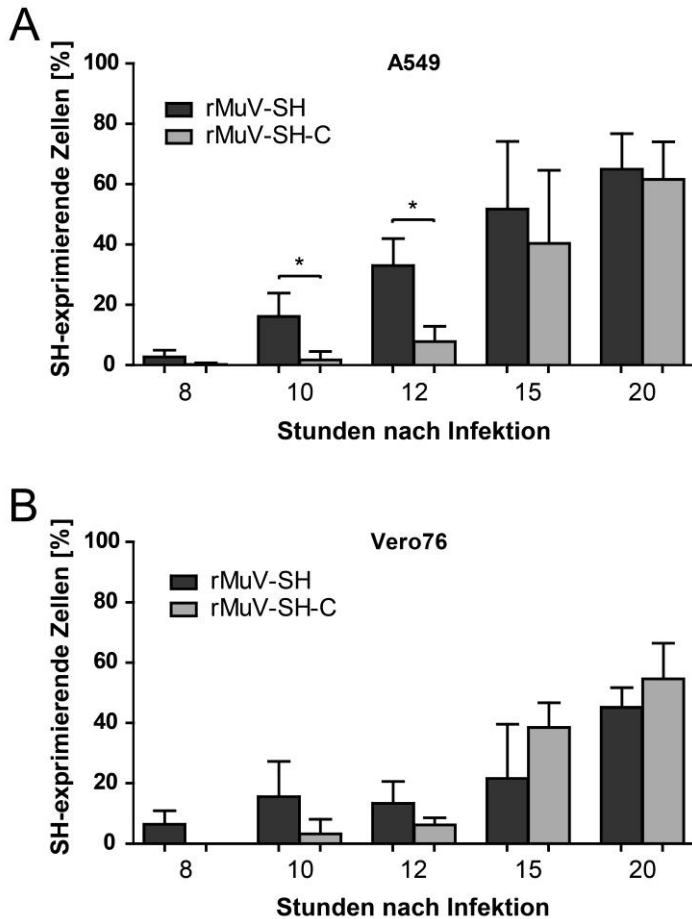


Abbildung 13: Expressionskinetik des SH-Proteins in rMuV-infizierten A549 und Vero76 Zellen.

(A) A549 Zellen und (B) Vero76 Zellen wurden mit rMuV-SH, rMuV-SHstop, rMuV-SH-C oder rMuV-SHstop-C mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert. Das SH-Protein wurde mit einem APC-gekoppelten FLAG-spezifischen Antikörper markiert. Die Proben wurden im Durchflusszytometer gemessen. Die Werte für rMuV-SHstop oder rMuV-SHstop-C wurden von denen für rMuV-SH bzw. rMuV-SH-C abgezogen. Die Graphen zeigen den Mittelwert und die SD für drei unabhängige Experimente. *, $p < 0,05$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test mit einem zweiseitigen p-Wert berechnet.

4.1.3 Analyse der Membranorientierung des SH-Proteins

Nach Expression in transfizierten Zellen wurde das SH-Protein als Membranprotein beschrieben, dessen N-Terminus in den extrazellulären Raum und dessen C-Terminus ins Zytoplasma gerichtet ist (Takeuchi *et al.*, 1996). Um diesen Befund im Kontext einer Virusinfektion zu bestätigen, wurden A549 Zellen mit den verschiedenen rMuV mit einer MOI von 5 infiziert und 20 h nach Infektion auf die Expression des SH-Proteins mittels Durchflusszytometrie hin untersucht. Dabei wurden die Zellen vor der Antikörpermarkierung entweder für die intra- und extrazelluläre Detektion des SH-Proteins mit Saponin permeabilisiert oder für die ausschließlich extrazelluläre Detektion ohne Zugabe von Saponin behandelt. In Abbildung 14 ist zu erkennen, dass nach der Permeabilisierung das SH-Protein in

rMuV-SH- sowie in rMuV-SH-C-infizierten Zellen nachgewiesen werden konnte. Dagegen war es in nicht-permeabilisierten Zellen nur nach der Infektion mit rMuV-SH aber nicht mit rMuV-SH-C zu detektieren. Dies bestätigt, dass der N-Terminus von SH in den extrazellulären Raum gerichtet ist, da nur das N-terminal mit dem FLAG-Epitop fusionierte SH-Protein ohne Permeabilisierung für die Antikörpermarkierung mit einem FLAG-spezifischen Antikörper zugänglich war. Dieses Ergebnis bestätigt den mittels Transfektion erhaltenen Befund im Kontext einer Virusinfektion. Es ist daher zu vermuten, dass die C-terminale Domäne des SH-Proteins für die Beeinflussung zellulärer Signalwege verantwortlich ist und dass diese Funktion durch das C-terminale FLAG-Epitop beeinträchtigt werden kann. Daher wurden alle weiteren Experimente mit den N-terminal markierten Viren rMuV-SH und rMuV-SHstop durchgeführt.

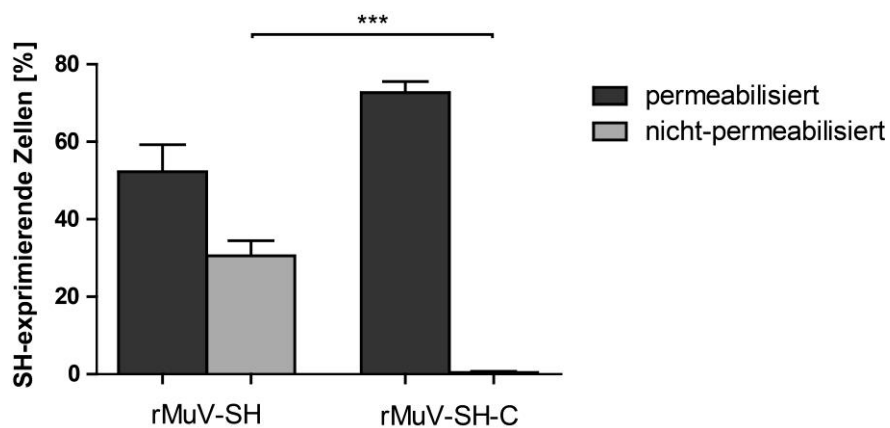


Abbildung 14: Analyse der Membranorientierung des SH-Proteins in rMuV-infizierten A549 Zellen.

A549 Zellen wurden mit rMuV-SH, rMuV-SHstop, rMuV-SH-C oder rMuV-SHstop-C mit einer MOI von 5 infiziert und 20 h nach Infektion fixiert. Für eine intra- und extrazelluläre Detektion des SH-Proteins wurden die Zellen mit 0,5 % Saponin behandelt (permeabilisiert) oder für die extrazelluläre Detektion ohne Zugabe von Saponin verwendet (nicht-permeabilisiert). Das SH-Protein wurde mit einem APC-gekoppelten FLAG-spezifischen Antikörper markiert. Die Proben wurden im Durchflusszytometer gemessen. Die Werte für rMuV-SHstop oder rMuV-SHstop-C wurden von denen für rMuV-SH bzw. rMuV-SH-C abgezogen. Die Graphen zeigen den Mittelwert und die SD für drei unabhängige Experimente. ***, $p < 0,001$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test mit einem zweiseitigen p-Wert berechnet.

4.2 Charakterisierung des Einflusses des SH-Proteins auf die NF- κ B-Aktivierung

4.2.1 Einfluss des SH-Proteins auf Komponenten des NF- κ B-Signalwegs

Es wurde bereits gezeigt, dass transient exprimiertes SH-Protein zu einer Reduktion der Phosphorylierung von IKK β sowie von p65 in mit TNF α -stimulierten Zellen führt und dies in einer Reduktion der Aktivierung von NF- κ B resultiert (Woznik, 2012). Um nun zu untersuchen, ob das SH-Protein auch im Kontext einer Virusinfektion die NF- κ B-Aktivierung beeinflusst, wurde zunächst die Phosphorylierung von IKK β sowie von dessen Substraten I κ B α und p65

mittels Western Blot analysiert. A549 Zellen wurden dazu mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 infiziert und zu drei Zeitpunkten nach Infektion (1, 15 und 20 h) lysiert. Die Lysate wurden hinsichtlich des Gesamtproteingehalts von IKK β , I κ B α und p65 sowie des Gehalts der entsprechenden phosphorylierten Formen untersucht. Der Nachweis des viralen N- sowie des SH-Proteins diente zur Kontrolle einer erfolgreichen Infektion mit den gewünschten Viren. Nicht-infizierte Zellen, die entweder mit TNF α stimuliert wurden oder unbehandelt blieben, dienten als Kontrolle für die NF- κ B-Aktivierung. Wie in Abbildung 15A zu erkennen, war IKK β eine Stunde nach Infektion zu einem vergleichbaren Ausmaß an den Positionen Ser177 und Ser181 phosphoryliert, wie in den stimulierten Kontrollzellen. Dagegen war die Stärke der Phosphorylierung zu den späteren Zeitpunkten nach Infektion jeweils in den infizierten Zellen deutlich geringer. Die hohe Menge an Serumkomponenten, die aufgrund der Aufkonzentrierung bei der Virusanzucht angereichert wurden, ist möglicherweise eine Ursache für die vergleichsweise starke Phosphorylierung eine Stunde nach Infektion. Auch die große Menge an Viruspartikeln, die für die Infektion eingesetzt wurden, könnte zu dieser Beobachtung beigetragen haben. Nach Entfernen der Virussuspension ist die Aktivierung von NF- κ B dagegen von den Viruspartikeln abhängig, die bis zu dem untersuchten Zeitpunkt synthetisiert wurden. Das Ausmaß der IKK β -Phosphorylierung nahm im Verlauf der Infektion zu. Die Phosphorylierung von IKK β war sowohl 15 als auch 20 h nach Infektion in der Gegenwart des SH-Proteins in rMuV-SH- im Vergleich zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen deutlich reduziert. Da der Gesamtgehalt an IKK β durch das SH-Protein dagegen nicht beeinflusst war, zeigt dieses Ergebnis, dass SH nicht die Expression von IKK β , sondern dessen Phosphorylierung reduziert. Auch die Phosphorylierung von IKK α an den Positionen Ser176 und Ser180 war in rMuV-SH- im Vergleich zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen reduziert. Die Analyse der Phosphorylierung von I κ B α an Ser32 zeigte eine Stunde nach Infektion im Vergleich zu den späteren Zeitpunkten ein sehr starkes Signal (Abb. 15B). Auch hier lag die Ursache vermutlich in der hohen Konzentration an Serumkomponenten bzw. der großen Anzahl der zur Infektion eingesetzten Viruspartikel im aufkonzentrierten Medium. Zu den späteren Zeitpunkten, als das SH-Protein in den rMuV-SH-infizierten Zellen detektiert werden konnte, war das Ausmaß der I κ B α -Phosphorylierung in rMuV-SH- im Vergleich zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen reduziert. Dagegen war eine geringe Reduktion des Gesamtgehalts an I κ B α in der Abwesenheit des SH-Proteins zu erkennen. Dies kann mit dem reduzierten Abbau von I κ B α durch die geringere Phosphorylierungsrate in rMuV-SH-infizierten Zellen erklärt werden. Auch die Phosphorylierung von p65 an Ser536 war in rMuV-SH- im Vergleich zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen reduziert, während der Gesamtgehalt an p65 durch das SH-Protein nicht beeinflusst wurde (Abb. 15C). Das SH-Protein reduziert demnach auch die I κ B α - sowie die p65-Phosphorylierung im Kontext einer Virusinfektion. Die für das SH-Protein detektierten Banden weisen eine zum N-Protein vergleichbare oder höhere

Intensität auf, obwohl die Analyse der Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie eine größere Anzahl an N-positiven als SH-positiven Zellen für alle Zeitpunkte gezeigt hat (siehe Abb. 12 und 13). Dies liegt an der verwendeten Belichtungszeit, die für das SH-Protein deutlich länger als für das N-Protein war.

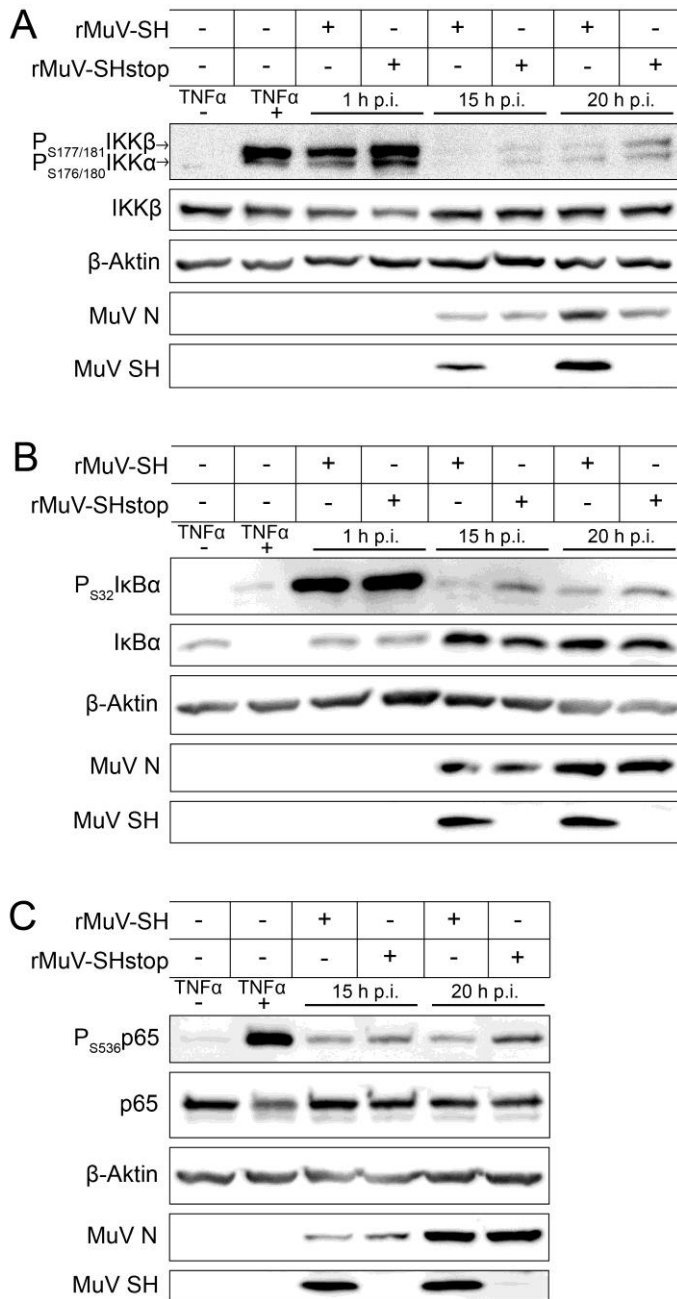


Abbildung 15: Einfluss des SH-Proteins auf die Phosphorylierung von IKK β , I κ B α und p65.

A549 Zellen wurden mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 infiziert. Als Positivkontrolle (TNF α +) wurden A549 Zellen mit TNF α (100 ng/ml) für 15 min stimuliert. Nicht-stimulierte Zellen (TNF α -) dienten als Negativkontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot auf die Phosphorylierung von (A) IKK β an Ser177/181, (B) I κ B α an Ser32 und (C) p65 an Ser536 mit phosphospezifischen Antikörpern hin analysiert. Die Detektion des Gesamtgehalts an IKK β , I κ B α , p65, β -Aktin, MuV N und MuV SH diente als Kontrolle. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Reduktion der Phosphorylierung von IKK β , I κ B α und p65 in der Gegenwart des SH-Proteins ließ vermuten, dass auch die Translokation von p65 in den Zellkern durch das SH-Protein in infizierten Zellen reduziert war. Um diese Annahme zu untersuchen, wurden rMuV-infizierte A549 Zellen 15 und 20 h nach Infektion fixiert und mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Laserscanmikroskopie hinsichtlich der Lokalisierung von p65 analysiert. Der Nachweis des N-Proteins diente zum Beleg einer vergleichbaren Infektionsrate. Wie in Abbildung 16A und B zu erkennen, war das N-Protein zu beiden Zeitpunkten in fast allen Zellen zu detektieren, wobei kein Unterschied bezüglich der Infektionsrate der rMuV-SH- und der rMuV-SHstop-infizierten Zellen bestand. Ebenso war zu beiden Zeitpunkten die Ausbildung von Synzytien ohne Unterschiede zwischen den beiden Viren festzustellen (vergleiche Abb. 11A). Im Gegensatz dazu war die Anzahl der Zellen, welche die Translokation von p65 in den Zellkern zeigten, in den rMuV-SH- im Vergleich zu den rMuV-SHstop-infizierten Zellen zu beiden Zeitpunkten reduziert. Eine Quantifizierung ergab, dass 15 h nach Infektion bei 1,4 % der rMuV-SH- sowie bei 9,8 % der rMuV-SHstop-infizierten Zellen p65 im Zellkern zu detektieren war, während 20 h nach Infektion 4,8 % bzw. 28,2 % der infizierten Zellen die Translokation zeigten. Somit war zu beiden Zeitpunkten die Translokation in Anwesenheit des SH-Proteins signifikant um etwa 84 % reduziert (Abb. 16C). Die Vergrößerung repräsentativer Synzytien 20 h nach Infektion verdeutlicht, dass p65 in rMuV-SH-infizierten Zellen hauptsächlich im Zytoplasma verteilt war, während das Protein in rMuV-SHstop-infizierten Zellen zu einem signifikant höheren Anteil im Zellkern lokalisiert war (Abb. 16B). Diese Ergebnisse bestätigen daher die Vermutung, dass das SH-Protein die Translokation von p65 in den Zellkern im Kontext einer Virusinfektion reduziert. Trotz der Verwendung von unterschiedlichen FLAG-spezifischen Antikörpern und Fixierungsvarianten konnte das SH-Protein in infizierten A549 Zellen nicht nachgewiesen werden, obwohl ein Nachweis in transfizierten Zellen erfolgreich war. Dies ist vermutlich auf die relativ geringe Menge des während der Infektion exprimierten SH-Proteins zurückzuführen.

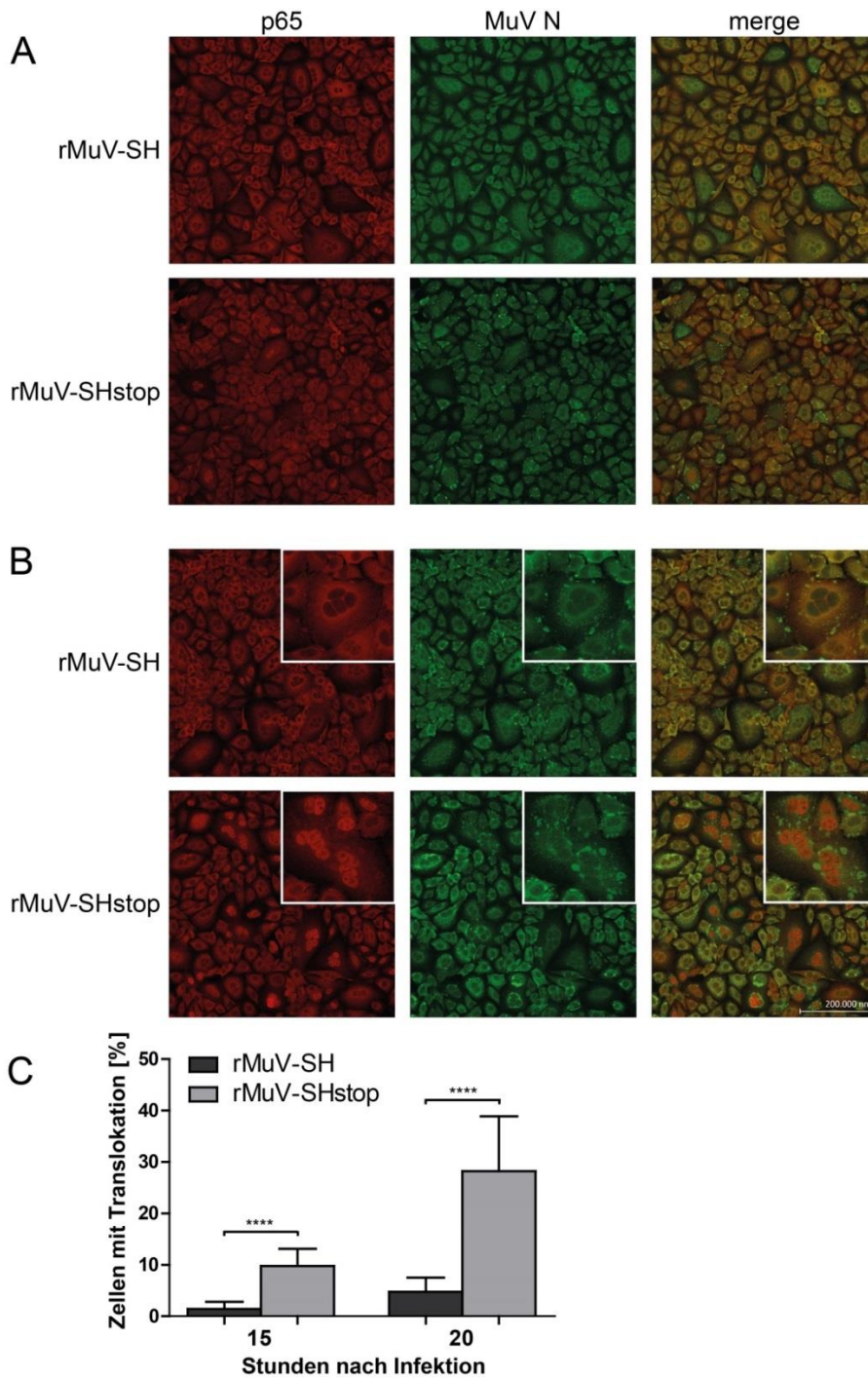


Abbildung 16: Einfluss des SH-Proteins auf die Translokation von p65 in den Zellkern.

A549 Zellen wurden mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 infiziert. (A) 15 Stunden oder (B) 20 Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert. p65 wurde mit einem spezifischen Cy3-gekoppelten Antikörper markiert und das N-Protein mit einem spezifischen Alexa488-gekoppelten Antikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (nicht gezeigt). (B) Repräsentative Synzytien sind vergrößert gezeigt. (C) Für die Quantifizierung wurden $1,6 \times 10^4$ Zellen von drei unabhängigen Experimenten hinsichtlich der p65 Translokation analysiert. Dazu wurden für jedes Experiment drei bis vier Bilder pro Zeitpunkt und Virus, die jeweils 200 bis 500 Zellen enthielten, untersucht. Jede Zelle wurde auf die Expression des N-Proteins hin ausgewertet. Außerdem wurde für jede Zelle bestimmt, ob p65 im Zytoplasma verteilt oder im Zellkern lokalisiert war. Der Prozentsatz an N-positiven Zellen, welche die Translokation von p65 in den Zellkern zeigten, wurde für jeden Zeitpunkt und beide Viren berechnet. Der Graph zeigt den Mittelwert und die SD. ****, $p < 0,0001$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test mit einem zweiseitigen p-Wert berechnet.

4.2.2 Einfluss des SH-Proteins auf die NF- κ B-regulierte Genexpression

Für das MuV SH-Protein wurde beschrieben, dass es in transfizierten Zellen die TNF α -vermittelte NF- κ B-Aktivierung reduziert (Wilson *et al.*, 2006; Woznik, 2012; Xu *et al.*, 2011). Studien zeigten auch, dass die durch das dsRNA-Analogon poly(I:C)-vermittelte Aktivierung von NF- κ B durch transfiziertes SH-Protein reduziert wird (Woznik, 2012). Über den Einfluss des SH-Proteins auf die NF- κ B-Aktivierung durch weitere Stimuli liegen dagegen noch keine Untersuchungen vor. Daher wurde für eine Reihe von verschiedenen Stimuli, die an unterschiedliche Rezeptoren binden, der Einfluss des SH-Proteins auf die NF- κ B-Aktivierung mittels eines Luciferase Reporterassays untersucht. 293G und A549 Zellen wurden dazu mit dem Luciferasereporterplasmid und einem Plasmid, welches für das SH-Protein kodiert, oder einem Leervektor als Kontrolle transfiziert. Die Aktivierung von NF- κ B wurde durch die Behandlung mit TNF α (Ligand von TNFR1), poly(I:C) (Ligand von TLR3), IL-1 β (Ligand von IL-1R1), dem synthetischen triacetylierten Lipoprotein Pam3CSK4 (Ligand von TLR1/2) oder LPS (Ligand von TLR4) stimuliert. Wie in Abbildung 17A zu erkennen ist, induzierte die Stimulation mit TNF α und poly(I:C) in den mit dem Leervektor (pCMV-HA) transfizierten 293G Zellen eine 15- bzw. 20-fache Aktivierung von NF- κ B. Die Behandlung mit IL-1 β , Pam3CSK4 oder LPS resultierte dagegen nur in einer geringfügigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors. In den mit dem SH-kodierenden Plasmid (pCMV-N-HA-SH_{HL}) transfizierten 293G Zellen war die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit TNF α und poly(I:C) signifikant um etwa 60 % reduziert. Aufgrund der geringen Höhe der Aktivierung nach der Behandlung mit IL-1 β , Pam3CSK4 oder LPS, wurde der Einfluss des SH-Proteins auf die NF- κ B-Aktivierung nach der Behandlung mit diesen Stimuli nicht untersucht. Die Stimulation mit TNF α und IL-1 β induzierte in A549 Zellen eine 140- bzw. 130-fache Aktivierung von NF- κ B, die in der Gegenwart des SH-Proteins signifikant um etwa 60 % reduziert war (Abb. 17B). Die Behandlung mit Pam3CSK4, LPS und poly(I:C) resultierte dagegen in einer etwa 20-, 6- bzw. 2-fachen NF- κ B-Aktivierung. Diese war in der Anwesenheit des SH-Proteins in Pam3CSK4-stimulierten Zellen um 60 % und in LPS-stimulierten Zellen um 30 % reduziert, allerdings sind die Unterschiede zwischen Leervektor und SH-kodierendem Plasmid statistisch nicht signifikant. Die mögliche Reduktion durch das SH-Protein nach der Behandlung mit poly(I:C) wurde aufgrund der geringen Höhe der NF- κ B-Aktivierung nicht untersucht. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass das SH-Protein nicht nur die Aktivierung von NF- κ B über die TNFR1-vermittelte Signalweitergabe, sondern auch über die IL-1R1- sowie die TLR3-vermittelte Signalweitergabe behindert.

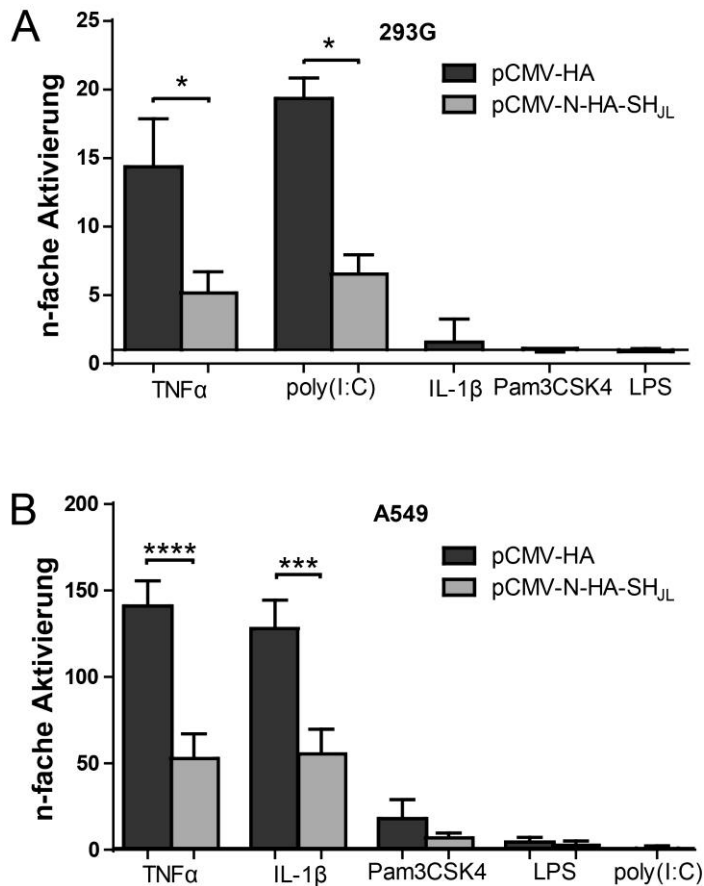


Abbildung 17: Einfluss des SH-Proteins auf die NF-κB-Aktivierung nach Stimulation mit TNFα, poly(I:C) und IL-1β in transfizierten Zellen.

(A) 293G Zellen und (B) A549 Zellen wurden mit p(PRDI1)5tkΔ(-39)lucifer (293G: 240 ng, A549: 480 ng), pCMV-βGal (293G: 35 ng, A549: 70 ng) und pCMV-N-HA-SH_{JL} oder pCMV-HA (293G: 725 ng, A549: 1450 ng) transfiziert. 24 h (293G, A549) oder 38 h (A549) nach der Transfektion wurden die Zellen für 4 h mit 100 ng/ml TNFα, 20 μg/ml poly(I:C), 10 ng/ml IL-1β, 5 μg/ml Pam3CSK4 oder 1 μg/ml LPS stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und hinsichtlich der Aktivität der Luciferase sowie der β-Galactosidase analysiert. Die Graphen zeigen den Mittelwert und die SD für zwei (A) oder drei (B) unabhängige Experimente. *, p<0,05; ***, p<0,001; ****, p<0,0001; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test mit einem zweiseitigen p-Wert berechnet.

Die Ergebnisse nach Expression des SH-Proteins in transfizierten Zellen sollten im Kontext einer Virusinfektion überprüft werden. Dazu wurde der Reporterassay mit rMuV-SH- oder rMuV-SHstop-infizierten A549 Zellen durchgeführt. Da bei dieser Zelllinie NF-κB durch TNFα und IL-1β aktiviert werden konnte und das SH-Protein jeweils zu einer signifikanten Reduktion dieser Aktivierung im Transfektionskontext führte, wurde auch in infizierten Zellen der Einfluss des SH-Proteins auf die NF-κB-Aktivierung mittels dieser Stimuli untersucht. Abbildung 18 zeigt, dass die NF-κB-Aktivierung nach TNFα- und IL-1β-Stimulation in rMuV-SH-infizierten Zellen im Vergleich zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen signifikant etwa 60 % reduziert war. Damit bestätigt dieser Befund auch in infizierten Zellen das Eingreifen des SH-Proteins in die TNFR1- und IL-1R1-vermittelte Aktivierung von NF-κB.

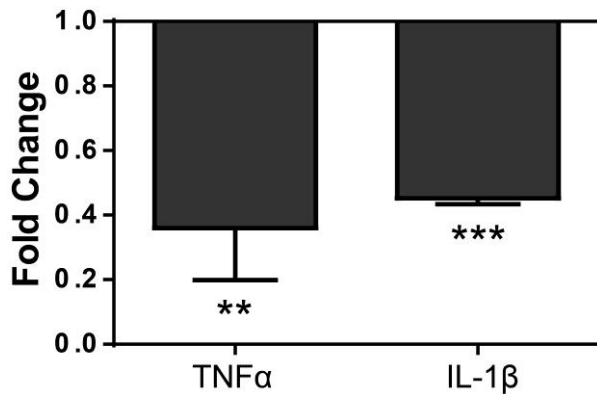


Abbildung 18: Einfluss des SH-Proteins auf die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit TNF α und IL-1 β in infizierten Zellen.

A549 Zellen wurden mit p(PRDI1)5tk Δ (-39)lucifer (480 ng), pCMV- β Gal (70 ng) und pCMV-HA (1450 ng) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 0,5 infiziert. 16 h nach Infektion wurden die Zellen für 4 h mit 100 ng/ml TNF α oder 10 ng/ml IL-1 β stimuliert, anschließend lysiert und hinsichtlich der Aktivität der Luciferase sowie der β -Galactosidase analysiert. Die NF- κ B-Aktivierung der mit rMuV-SH-infizierten Zellen wurde relativ zur Aktivierung der mit rMuV-SHstop-infizierten Zellen berechnet und als *Fold Change* (n-fache Änderung) angegeben. Die Graphen zeigen den Mittelwert und die SD für mindestens drei unabhängige Experimente. **, p < 0,01; ***, p < 0,001; die Statistik wurde mit einem Einstichproben-t-Test mit einem zweiseitigen p-Wert berechnet.

Für 293 Zellen wurde in älteren Studien festgestellt, dass sie den TLR3 nicht exprimieren. Dagegen zeigen neuere Studien, dass 293 Zellen die mRNA für TLR3 exprimieren und TLR3 intrazellulär nachgewiesen wird (Rudd *et al.*, 2005; Schonbeck *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2012). Um die TLR3-Expression in der verwendeten Zelllinie 293G zu untersuchen und zu bestätigen, dass die Aktivierung von NF- κ B nach Stimulation mit poly(I:C) über TLR3 erfolgt, wurden 293G Zellen mit siRNA gegen TLR3 transfiziert und die Expression von TLR3 mittels Western Blot analysiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert. Abbildung 19 zeigt, dass zwei Banden in der für TLR3 erwarteten Höhe detektiert wurden. Die Stärke der unteren Bande ist in den mit TLR3-siRNA transfizierten Proben im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Proben deutlich verringert. Dies lässt darauf schließen, dass die verwendete 293G Zelllinie TLR3 exprimiert und die untere Bande spezifisch für diesen Rezeptor ist. Die obere Bande ist vermutlich auf eine unspezifische Bindung des verwendeten Antikörpers zurückzuführen. Da die NF- κ B-Aktivierung durch die alleinige Zugabe von poly(I:C) ins Zellkulturmedium induziert wurde, ohne dass eine Transfektion nötig war, ist zu vermuten, dass TLR3 in 293G Zellen auch in der Zellmembran exprimiert wird.

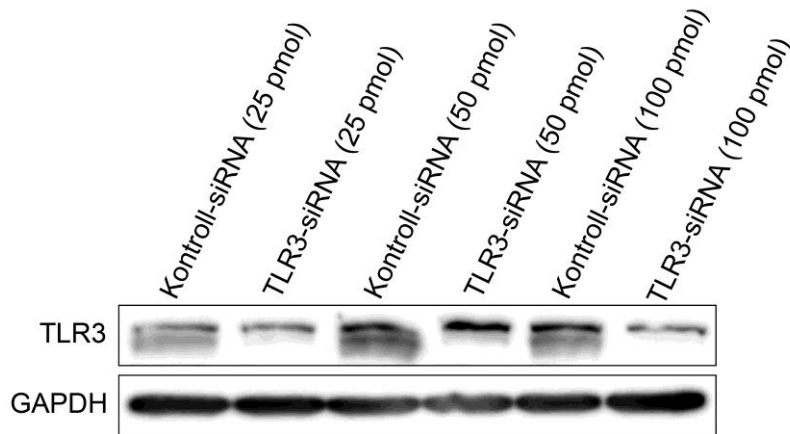


Abbildung 19: Analyse der Expression von TLR3 in 293G Zellen.

293G Zellen wurden mit TLR3 spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert. Dabei wurden jeweils 25, 50 oder 100 pmol eingesetzt. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot mit einem spezifischen Antikörper auf die Expression von TLR3 hin analysiert. Die Detektion von GAPDH diente als Ladekontrolle.

Der Einfluss unterschiedlicher Epitope, die für den Nachweis des SH-Proteins angefügt wurden, und deren Positionen sowie der Einfluss des MuV-Genotyps auf die Fähigkeit des SH-Proteins die NF- κ B-Aktivierung zu reduzieren, wurden ebenfalls mittels Luciferase Reporterassay untersucht. 293G Zellen wurden mit dem Luciferasereporterplasmid und einem Plasmid, welches für die jeweils zu untersuchende Variante des SH-Proteins kodiert, oder einem Leervektor als Kontrolle transfiziert. Die Aktivierung von NF- κ B wurde durch die Behandlung mit poly(I:C) stimuliert. Wie in Abbildung 20 zu erkennen ist, war die NF- κ B-Aktivierung in den Zellen, die mit einem Plasmid, welches für ein N-terminal markiertes SH-Protein kodiert (pCMV-N-flag-SH_{JL}, pCMV-N-HA-SH_{JL} und pCMV-N-HA-SH_{pat}), transfiziert wurden, im Vergleich zu den mit dem Leervektor transfizierten Zellen signifikant um etwa 50 % reduziert. Dagegen zeigten die Zellen, die mit einem Plasmid, das für ein C-terminal markiertes SH-Protein kodiert (pcDNA-SH_{JL}-C-HA und pcDNA-SH_{PAT}-C-HA), transfiziert wurden, keine signifikant unterschiedliche Aktivierung von NF- κ B relativ zum Leervektor. Es war kein Unterschied zwischen dem FLAG- oder dem HA-markierten SH-Protein festzustellen. Ebenso war kein Unterschied zwischen dem SH-Protein des Impfstammes Jeryl Lynn (JL), der dem Genotyp A zuzuordnen ist, und dem SH-Protein eines Patientenisolats, welches dem Genotyp G angehört, zu erkennen. Der Vergleich der HA-markierten SH-Proteine der unterschiedlichen Genotypen hinsichtlich der NF- κ B-Aktivierung relativ zum Leervektor zeigte signifikante Unterschiede im Hinblick auf die Position des Epitops. Dabei war eine Reduktion der NF- κ B-Aktivierung nur bei Transfektion der N-terminal, nicht aber der C-terminal markierten SH-Proteine zu erkennen. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass der C-Terminus des SH-Proteins, der ins Zytoplasma orientiert ist, für dessen Funktion verantwortlich ist und das Anfügen eines Epitops an dieser Position die Funktion des SH-Proteins beeinträchtigt.

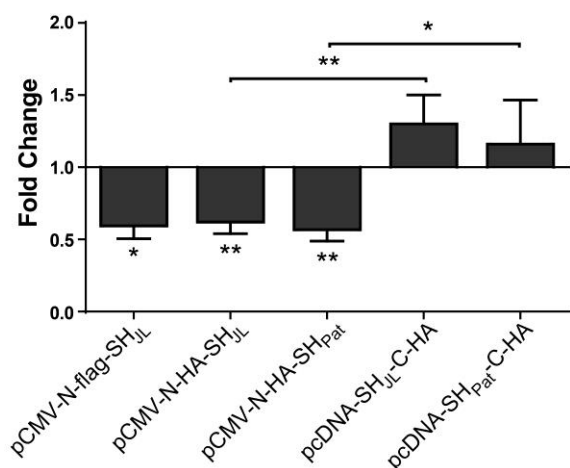


Abbildung 20: Einfluss unterschiedlicher Epitope und deren Position auf die Funktion des SH-Proteins.

293G Zellen wurden mit p(PRDI1)5tkΔ(-39)lucifer (240 ng), pCMV-βGal (35 ng) und pCMV-N-flag-SH_{JL}, pCMV-N-HA-SH_{JL}, pCMV-N-HA-SH_{Pat}, pcDNA-SH_{JL}-C-HA, pcDNA-SH_{PAT}-C-HA oder pCMV-HA (725 ng) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 4 h mit 20 μg/ml poly(I:C) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und hinsichtlich der Aktivität der Luciferase sowie der β-Galactosidase analysiert. Die NF-κB-Aktivierung der mit SH-kodierenden Plasmiden transfizierten Zellen wurde relativ zur Aktivierung der mit pCMV-HA-transfizierten Zellen berechnet. Der Graph zeigt den Mittelwert und die SD für drei unabhängige Experimente. *, p<0,05; **, p<0,01; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test sowie mit einem Einstichproben-t-Test jeweils mit einem zweiseitigen p-Wert berechnet.

Anschließend sollte die Ebene eingegrenzt werden, auf der das SH-Protein in den jeweiligen Signalwegen die Aktivierung von NF-κB behindert. Dazu wurden 293G Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für die Expression von Proteinen kodieren, welche an unterschiedlichen Positionen der Signalwege an der NF-κB-Aktivierung beteiligt sind. Die Überexpression dieser Proteine induziert die Aktivierung des NF-κB-Signalwegs auf der Ebene des jeweiligen Proteins. Zusätzlich zu dem Luciferasereporterplasmid und dem SH-Protein kodierenden Plasmid oder dem Leervektor wurden die Zellen mit einem Plasmid für die Expression von MyD88, TRAF2, TRAF6, TAK1 oder IKKβ transfiziert und mittels Luciferase Reporterassay analysiert. Wie in Abbildung 21 gezeigt, reduzierte das SH-Protein in MyD88 transfizierten Zellen die NF-κB-Aktivierung signifikant um etwa 60 %. Dagegen war die durch Überexpression von TRAF2, TRAF6, TAK1 oder IKKβ induzierte Aktivierung von NF-κB durch die Gegenwart des SH-Proteins nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass das SH-Protein den NF-κB-Signalweg unterhalb oder auf der gleichen Ebene von MyD88, aber oberhalb von TRAF2, TRAF6, TAK1 oder IKKβ im jeweiligen Signalweg beeinflusst. Von den untersuchten Proteinen ist MyD88 das erste nach der Rezeptoraktivierung rekrutierte Protein. TRAF2 und TRAF6 sind ebenfalls Komponenten verschiedener Rezeptorkomplexe, werden aber erst im späteren Verlauf des Signalwegs rekrutiert, während TAK1 und IKKβ die finalen Komponenten zur Aktivierung von NF-κB darstellen. Daher ist zu vermuten, dass das SH-Protein mit Komponenten der initialen TNFR1-, IL-1R1- und TLR3-Rezeptorkomplexe interagiert.

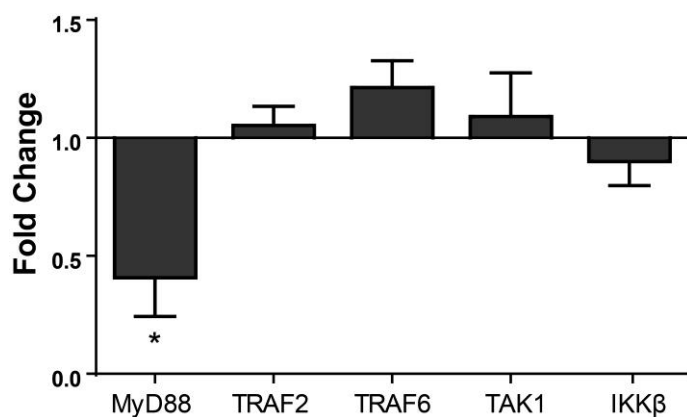


Abbildung 21: Analyse der Signalwegposition, an der das SH-Protein die Aktivierung von NF- κ B beeinflusst.

293G Zellen wurden mit p(PRDI1)5tkΔ(-39)lucifer (240 ng), pCMV- β Gal (30 ng) und pCMV-N-HA-SH_{JL} oder pCMV-HA (365 ng) transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit pUNO.MyD88, pFLAG-CMV2-TRAF2, pME18SFLAG-TRAF6, pCMV-TAK1 oder pcDNA3-IKK β (365 ng) transfiziert. 28 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und hinsichtlich der Aktivität der Luciferase sowie der β -Galactosidase analysiert. Die NF- κ B-Aktivierung der mit pCMV-N-HA-SH_{JL}-transfizierten Zellen wurde relativ zur Aktivierung der mit pCMV-HA-transfizierten Zellen berechnet. Der Graph zeigt den Mittelwert und die SD für drei unabhängige Experimente. *, $p < 0,05$; die Statistik wurde mit einem Einstichproben-t-Test mit einem zweiseitigen p-Wert berechnet.

4.2.3 Interaktion des SH-Proteins mit Komponenten der TNFR1-, IL-1R1- und TLR3-Rezeptorkomplexe

Zur Überprüfung der vermuteten Interaktion des SH-Proteins mit Komponenten der Rezeptorkomplexe von TNFR1, IL-1R1 und TLR3 wurden Co-Immunpräzitationsanalysen durchgeführt. Dabei wurde die Interaktion von SH mit TNFR1, TLR3, RIP1, IRAK1 und MyD88 betrachtet. Als Kontrolle wurde mit IKK β ein Protein, das deutlich unterhalb der Rezeptorkomplexe agiert, miteinbezogen. 293G und A549 Zellen wurden hierzu mit einem Plasmid, das für ein N-terminal FLAG-markiertes SH-Protein kodiert oder einem Leervektor als Kontrolle transfiziert. Die Proteine der Zelllysate wurden mittels *Beads*, an die ein FLAG-spezifischer Antikörper gekoppelt ist, präzipitiert und per Western Blot analysiert. Abbildung 22 zeigt, dass das SH-Protein nur in den Zelllysaten und Präzipitaten (IP) der mit pCMV-N-flag-SH_{JL}-transfizierten Zellen detektiert wurde. Die endogene Expression der Proteine TNFR1, TLR3, RIP1, IRAK1, MyD88 und IKK β war dagegen unabhängig von der Expression des SH-Proteins in den Zelllysaten aller Proben ähnlich stark. Die Co-Immunpräzitation von TNFR1, TLR3, RIP1 und IRAK1 durch das SH-Protein wurde in den pCMV-N-flag-SH_{JL}-transfizierten Zellen beobachtet, während die entsprechenden Banden dieser Proteine in den Leervektor-transfizierten Zellen nicht detektiert werden konnten. Eine Präzitation der Proteine MyD88 und IKK β war dagegen in keiner der analysierten Proben zu beobachten.

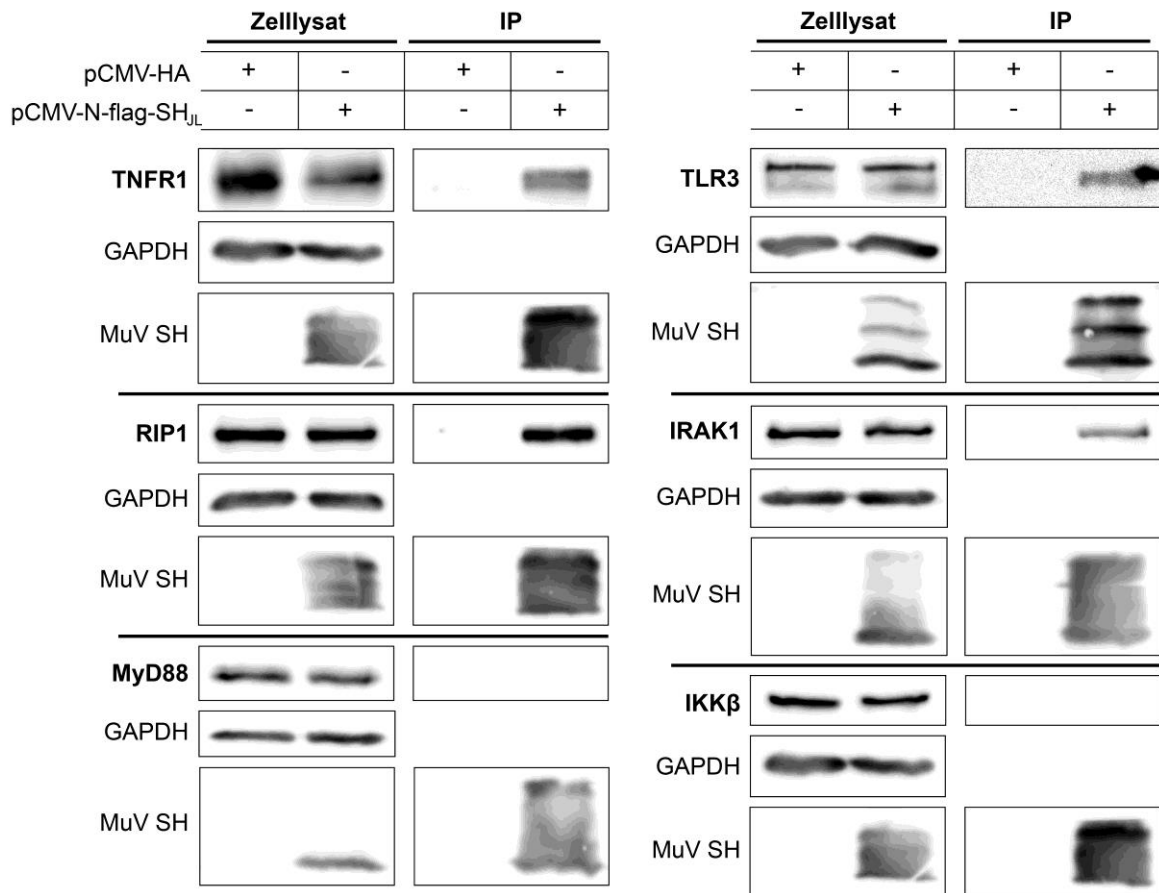


Abbildung 22: Interaktion des SH-Proteins mit Komponenten der TNFR1-, IL-1R1- und TLR3-Rezeptorkomplexe in transfizierten Zellen.

293G und A549 Zellen wurden mit pCMV-N-flag-SH_{JL} oder pCMV-HA transfiziert, wobei die Zelllinie A549 nur für die Analyse von MyD88 herangezogen wurde. 20 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und über Nacht mit Agarose-Beads inkubiert, an die FLAG-spezifische Antikörper kovalent gebunden waren. Anschließend wurden die gebundenen Proteine eluiert, mittels SDS-PAGE separiert und per Western Blot unter Verwendung eines FLAG-spezifischen Antikörpers und spezifischer Antikörper gegen TNFR1, TLR3, RIP1, IRAK1, MyD88 und IKKβ analysiert. Die Detektion von GAPDH diente als Ladekontrolle. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Um die in transfizierten Zellen erhaltenen Ergebnisse im Kontext einer Virusinfektion zu bestätigen, wurden A549 und 293G Zellen mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop infiziert. Die Zelllysate wurden mittels Co-Immunpräzipitation und Western Blot analysiert. Das SH-Protein wurde in den Präzipitaten der rMuV-SH-infizierten Zellen detektiert, nicht aber in den der rMuV-SHstop-infizierten Zellen (Abb. 23). Dagegen wurde es nicht in allen Zelllysaten der rMuV-SH-infizierten Zellen detektiert. Dies ist vermutlich auf das geringe Expressionslevel des SH-Proteins in infizierten Zellen und die geringe Menge des aufgetragenen Zelllysats zurückzuführen. Die endogene Expression der Proteine TNFR1, RIP1, IRAK1 und MyD88 wurde in allen Zelllysaten unabhängig von der Expression des SH-Proteins in gleicher Stärke beobachtet. Wie auch mit dem transfizierten SH-Protein wurden TNFR1, RIP1 und IRAK1 mit dem aufgrund der Virusinfektion exprimierten SH-Protein präzipitiert, während für MyD88 keine Präzipitation beobachtet wurde. In den mit rMuV-SHstop-infizierten Zellen wurde für

keines dieser Proteine die entsprechende Bande in vergleichbarer Stärke zu den rMuV-SH-infizierten Zellen beobachtet. Da die zusammen mit dem SH-Protein präzipitierten Proteine entweder Rezeptoren sind oder zu den frühen zum jeweiligen Rezeptor rekrutierten Adapterproteinen gehören, bestätigen diese Befunde die Annahme, dass das SH-Protein mit Komponenten der initialen TNFR1-, IL-1R1- und TLR3-Rezeptorkomplexe interagiert.

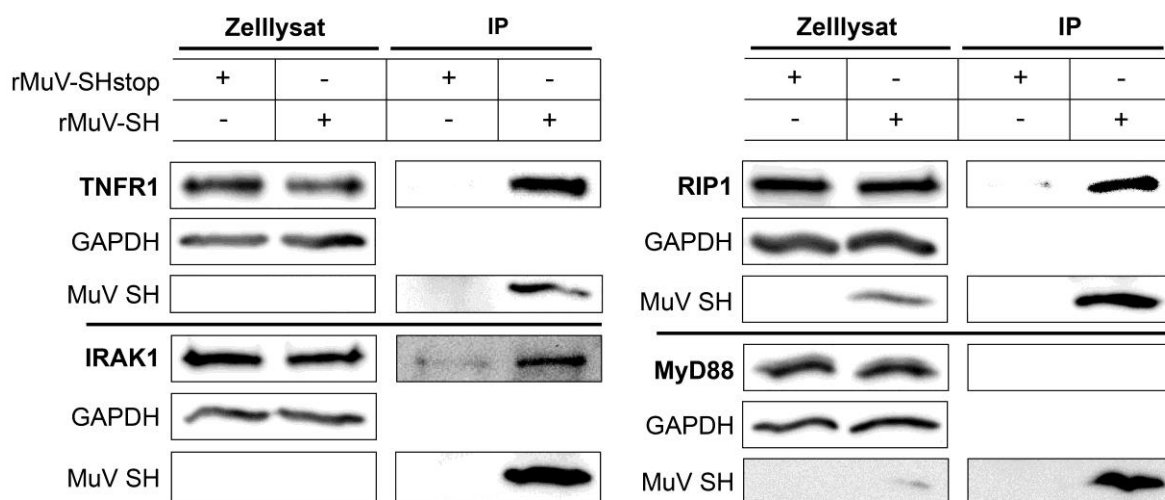


Abbildung 23: Interaktion des SH-Proteins mit Komponenten der TNFR1-, IL-1R1- und TLR3-Rezeptorkomplexe in infizierten Zellen.

A549 und 293G Zellen wurden mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 bzw. 10 infiziert, wobei die Zelllinie 293G nur für die Analyse von RIP1 herangezogen wurde. 20 h nach Infektion wurden die Zellen lysiert und über Nacht mit Agarose-Beads inkubiert, an die FLAG-spezifische Antikörper kovalent gebunden waren. Anschließend wurden die gebundenen Proteine eluiert, mittels SDS-PAGE separiert und per Western Blot unter Verwendung eines FLAG-spezifischen Antikörpers und spezifischer Antikörper gegen TNFR1, RIP1, IRAK1 und MyD88 analysiert. Die Detektion von GAPDH diente als Ladekontrolle. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.2.4 Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf das Wachstum der rMuV

Der Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf das Wachstum der rMuV wurde in infizierten A549 Zellen untersucht. In der Arbeitsgruppe Mankertz wurde bereits gezeigt, dass die Inkubation mit 5 μ M SC75741 über einen Zeitraum von 4 Tagen die Viabilität von A549 Zellen nicht beeinflusst (Maletzki, 2016). Ebenso wurde die Aktivierung von NF- κ B nach Infektion von A549 Zellen mit rMuV-SHstop in Anwesenheit von SC75741 über einen Zeitraum von 3 Tagen untersucht, wobei konstant eine Inhibition von 40 % beobachtet wurde (Maletzki, 2016). Zur Analyse des Wachstums der rMuV in Anwesenheit von SC75741 wurden die Zellen nach der Infektion entweder mit SC75741 oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Der Zellkulturüberstand wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen hinsichtlich der extrazellulären Virustiter mittels ICA analysiert. Abbildung 24 zeigt, dass die Zugabe von SC75741 sowohl für rMuV-SH als auch für rMuV-SHstop die Menge der detektierten Viruspartikel im Zellkulturüberstand zu jedem untersuchten Zeitpunkt im Vergleich zu DMSO

reduziert hat. Für beide Viren wurden zwei Tage nach Infektion sowohl für die SC75741- als auch für die DMSO-behandelten Ansätze die höchsten Titer erreicht. Diese sanken zu den späteren Zeitpunkten wieder ab. Der Unterschied im Titer zwischen den SC75741- und den DMSO-behandelten Ansätzen war bei rMuV-SH im Verlauf der Infektion gleichbleibend, während bei rMuV-SHstop dieser Unterschied zu Beginn weniger stark ausgeprägt war als zu den späten Zeitpunkten. Da der Anfangstiter von rMuV-SH vom Anfangstiter von rMuV-SHstop abwich, bedingt durch die Schwierigkeiten bei der Anzucht der Viren und der Bestimmung der Titer (siehe Kap. 5.2.2), ist ein direkter Vergleich der Viren nur bedingt möglich.

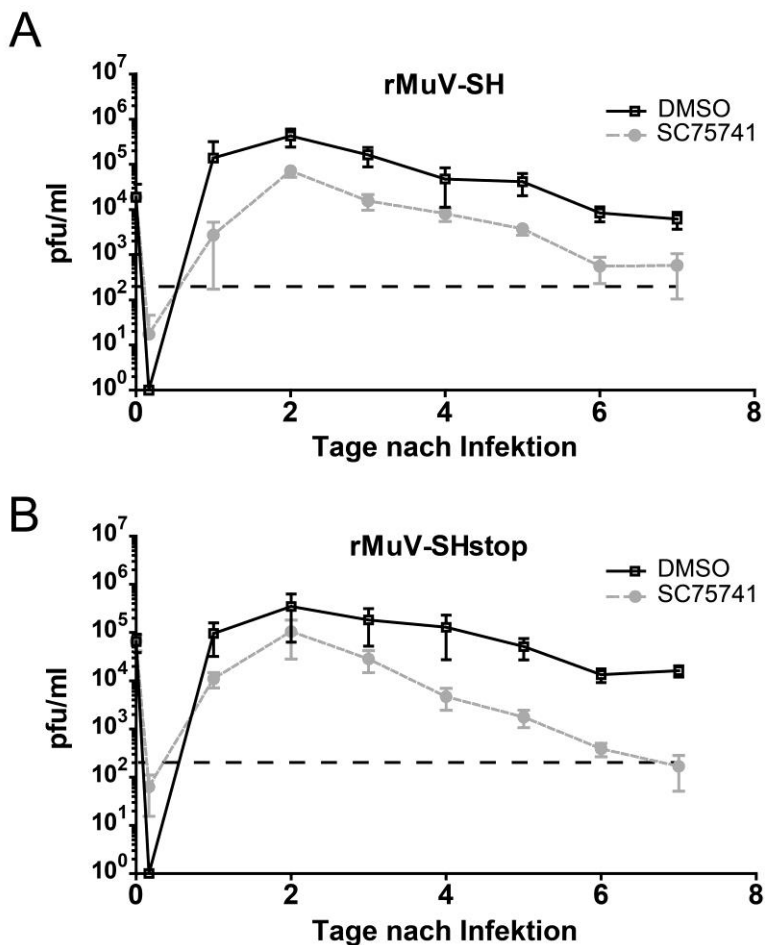


Abbildung 24: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf das Wachstum der rMuV.

A549 Zellen wurden mit (A) rMuV-SH und (B) rMuV-SHstop mit einer MOI von 0,5 infiziert. Dabei wurden pro Virus drei voneinander unabhängige Infektionen zum selben Zeitpunkt durchgeführt. Nach der einstündigen Inkubation der Virussuspension auf den Zellen wurde dieses abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und neues Zellkulturmedium, welches mit 5 μ M SC75741 oder dem entsprechenden Volumen an DMSO versetzt war, zugegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Zellkulturüberstand abgenommen und durch das gleiche Volumen an SC75741- oder DMSO-haltigem Medium ersetzt. Mittels ICA auf Vero76 Zellen wurden die Virustiter der Zellkulturüberstände analysiert. Um die Anfangstiter zu bestimmen, wurden die zur Infektion eingesetzten Virusverdünnungen ebenfalls auf Vero76 Zellen titriert. Die Anfangstiter sind auf der y-Achse dargestellt. Das Detektionslimit liegt aufgrund des Analyseverfahrens bei 10² (gestrichelte Linie). Die Graphen zeigen den Mittelwert und die SD.

Um den Einfluss von SC75741 auf die Ausbildung von Synzytien und die generelle Morphologie der Zellen zu dokumentieren, sind in Abbildung 25 charakteristische mikroskopische Aufnahmen der infizierten Zellen gezeigt. Die rMuV-SH-infizierten Zellen zeigten an Tag 1 nach der Infektion keinen Unterschied zwischen SC75741- oder DMSO-behandelten Zellen und nur wenige, kleine Synzytien. Dagegen traten bei den rMuV-SHstop-infizierten Zellen deutlich mehr und größere Synzytien auf, wobei die SC75741-behandelten Zellen einen stärkeren CPE als die DMSO-behandelten Zellen zeigten. Im Verlauf der Infektion nahm bei allen Ansätzen der CPE zu. Bei den rMuV-SH-infizierten Zellen wurde kein Unterschied hinsichtlich des CPE zwischen SC75741- und DMSO-Behandlung festgestellt, die Zelldichte war in der Anwesenheit des Inhibitors jedoch zu den späteren Zeitpunkten erkennbar höher. Die rMuV-SHstop-infizierten Zellen zeigten an Tag 3 nach Infektion einen geringeren CPE in den SC75741-behandelten Zellen als in den DMSO-behandelten. Auffällig waren hier ab dem 5. Tag nach Infektion die nur noch vereinzelt zu erkennenden Zellen in den Inhibitor-behandelten Ansätzen, während die DMSO-behandelten Ansätze noch einen zusammenhängenden Zellrasen aufwiesen. Die Behandlung mit SC75741 hat daher nicht nur eine Auswirkung auf das Wachstum der Viren, sondern auch auf den CPE und die Morphologie der Zellen, wobei sich die Effekte bei den beiden untersuchten Viren unterscheiden.

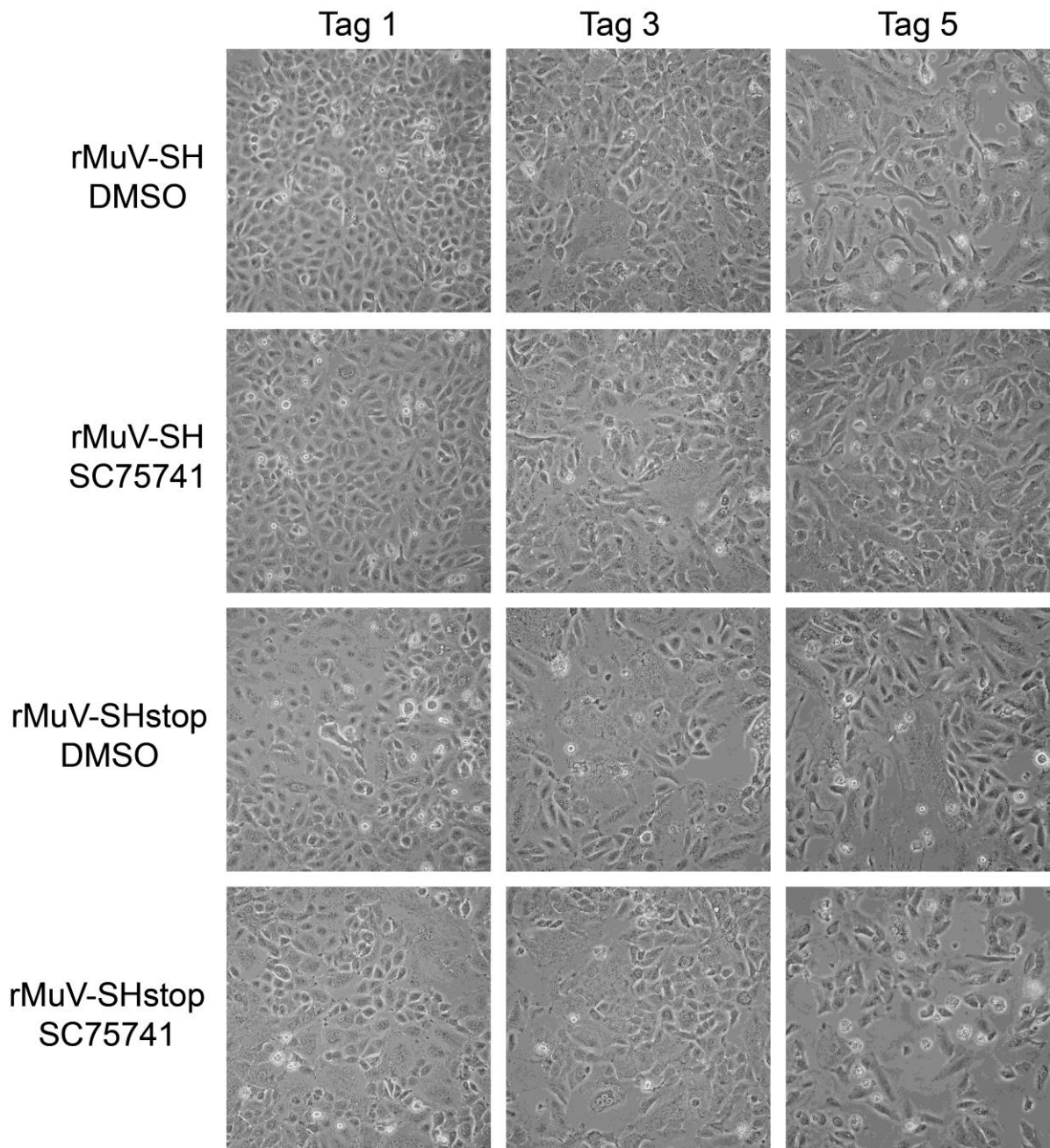


Abbildung 25: Nach rMuV-Infektion induzierter CPE in A549 Zellen in der An- und Abwesenheit des NF- κ B-Inhibitors SC75741.

A549 Zellen wurden mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 0,5 infiziert. Nach der einstündigen Inkubation der Virussuspension auf den Zellen wurde diese abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und neues Zellkulturmedium, welches mit 5 μ M SC75741 oder dem entsprechenden Volumen an DMSO versetzt war, zugegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen am Lichtmikroskop in 100-facher Vergrößerung fotografiert.

4.3 Charakterisierung des Einflusses des SH-Proteins auf die durch NF- κ B regulierte Zytokin-Produktion

Studien an rMuV, bei denen das gesamte *SH*-Gen deletiert wurde (Δ SH), zeigen eine im Vergleich zu Wildtypviren verstärkte Expression von TNF α (Xu *et al.*, 2011). Die einzige Studie, die wie in der vorliegenden Arbeit, SH-defiziente Viren über das Einfügen von Stoppkodons in das *SH*-Gen hergestellt hat (SHstop), zeigt, dass nur das Δ SH-Virus und nicht das SHstop-Virus zu einer Attenuierung im Ratten-Neurovirulenz-Modell führt (Malik *et al.*, 2011). Dieser Befund führt zu der Frage, ob das SH-Protein *per se* oder die Deletion des gesamten *SH*-Gens und die damit einhergehende Störung der Genomstruktur die Virulenz des Virus verändern. Um die Funktion des SH-Proteins als Virulenzfaktor weiter zu untersuchen, wurde die Produktion von TNF α in rMuV-SH- und rMuV-SHstop-infizierten Zellen analysiert. In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Mankertz wurde gezeigt, dass die Infektion mit rMuV in A549 Zellen zu einer Hochregulierung der Caspase-1 mRNA-Expression führt (Thrun, 2013). Daher wurde vermutet, dass eine rMuV-Infektion ebenso in einer Hochregulierung der Freisetzung von IL-1 β sowie IL-18 resultiert. Die Genexpression dieser Zytokine ist, wie auch die von TNF α , von NF- κ B abhängig. Der Einfluss des SH-Proteins wurde daher auch auf die Produktion von IL-1 β sowie IL-18 untersucht.

4.3.1 Charakterisierung der rMuV-Infektion in THP-1 Zellen

Zunächst wurde die Freisetzung von TNF α nach rMuV-Infektion in A549 Zellen untersucht. Da mittels ELISA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion keine TNF α -Freisetzung aus dieser Zelllinie detektiert werden konnte, sollten THP-1 Zellen für die Analysen verwendet werden. Die humane monozytische Leukämie-Zelllinie THP-1 wird als *in vitro* Modell für Untersuchungen zur Immunmodulation verwendet (Chanput *et al.*, 2014). Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass THP-1 Zellen mit MuV infiziert werden können (Kato *et al.*, 2016). Um die Kinetik der Expression viraler Proteine zu untersuchen, wurden monozytische THP-1 Zellen sowie mittels PMA zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 infiziert. Innerhalb von 48 h nach Infektion wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und die Expression des N- sowie des SH-Proteins mittels Durchflusszytometrie analysiert. Wie in Abbildung 26 zu erkennen, lassen sich sowohl Monozyten als auch Makrophagen mit den rMuV infizieren. In beiden Zelltypen nahm der Prozentsatz der N-positiven Zellen im Verlauf der Infektion zu, dabei war kein signifikanter Unterschied zwischen den rMuV-SH- und den rMuV-SHstop-infizierten Zellen festzustellen. Der Vergleich der beiden Zelltypen zeigt, dass zu Beginn der Infektion deutlich mehr Monozyten als Makrophagen infiziert waren. So waren 8 Stunden nach Infektion etwa 40 % der Monozyten positiv für das N-Protein, aber nur etwa 10 % der Makrophagen. Dennoch wurden zum

spätesten analysierten Zeitpunkt sehr ähnliche Werte von etwa 80 % N-positiver Monozyten und etwa 70 % N-positiver Makrophagen beobachtet, wobei jedoch weiterhin ein signifikanter Unterschied zwischen Monozyten und Makrophagen bestand (Daten dieser Signifikanzanalyse nicht gezeigt).

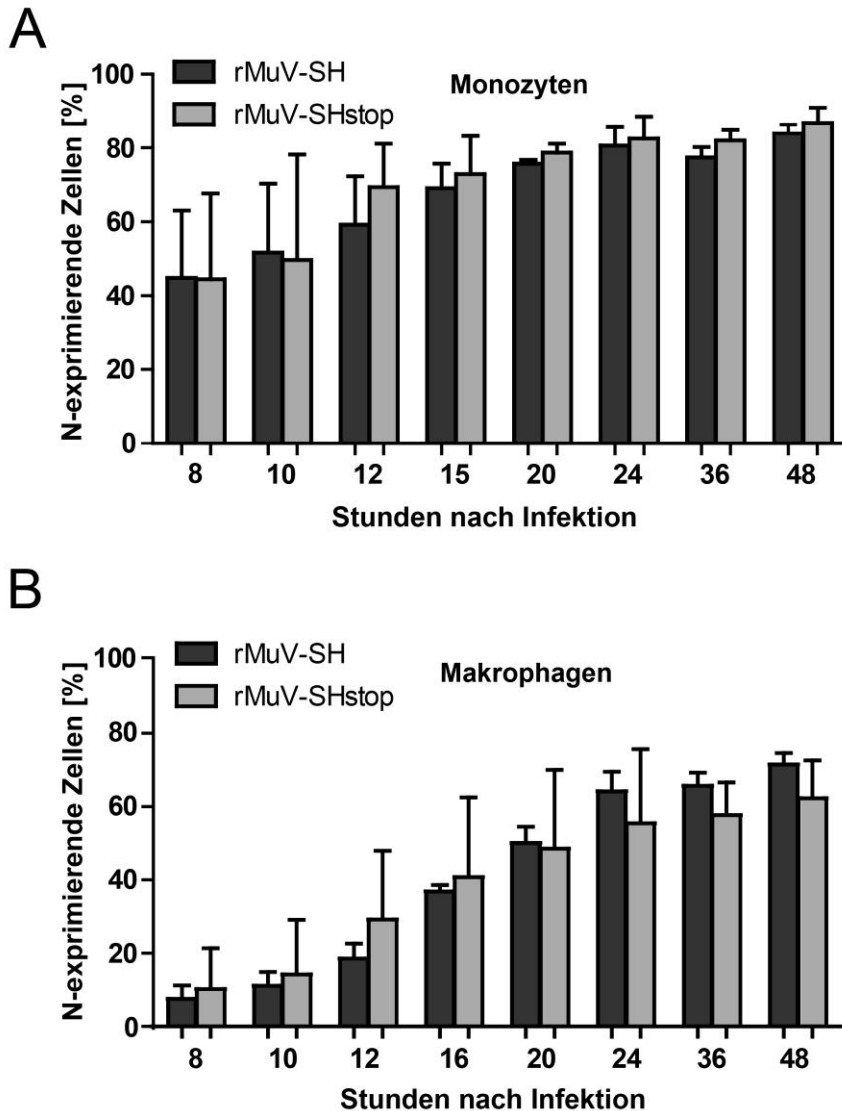


Abbildung 26: Expressionskinetik des N-Proteins in rMuV-infizierten THP-1 Zellen.

(A) THP-1 Monozyten und (B) mittels PMA zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen wurden mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert. Das N-Protein wurde mit einem N-spezifischen Primärantikörper und einem Alexa 488-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Die Proben wurden im Durchflusszytometer gemessen. Die Werte für nicht-infizierte Zellen (mock) wurden von denen für rMuV-infizierte Zellen abgezogen. Die Graphen zeigen den Mittelwert und die SD für vier unabhängige Experimente. Die statistische Analyse mittels ungepaarten t-Tests mit einem zweiseitigen p-Wert zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den rMuV.

Die Expressionskinetik des SH-Proteins ist in THP-1 Monozyten und Makrophagen sehr ähnlich, wie Abbildung 27 zeigt. In beiden Varianten der Zelllinie stieg die Expression zu Beginn der Infektion sehr schnell an und erreichte 24 h nach Infektion mit etwa 80 % SH-positiver Zellen ein Maximum, wonach die Anzahl SH-positiver Zellen zu den späteren Zeitpunkten wieder leicht abnahm.

Die beiden untersuchten Varianten der Zelllinie THP-1 sind diesen Analysen zufolge geeignet, um den Einfluss des SH-Proteins im Kontext einer Virusinfektion zu untersuchen. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass der Zeitraum von 12 bis 48 h nach Infektion für die Analyse des Einflusses der rMuV-Infektion auf die Zytokin-Produktion geeignet ist.

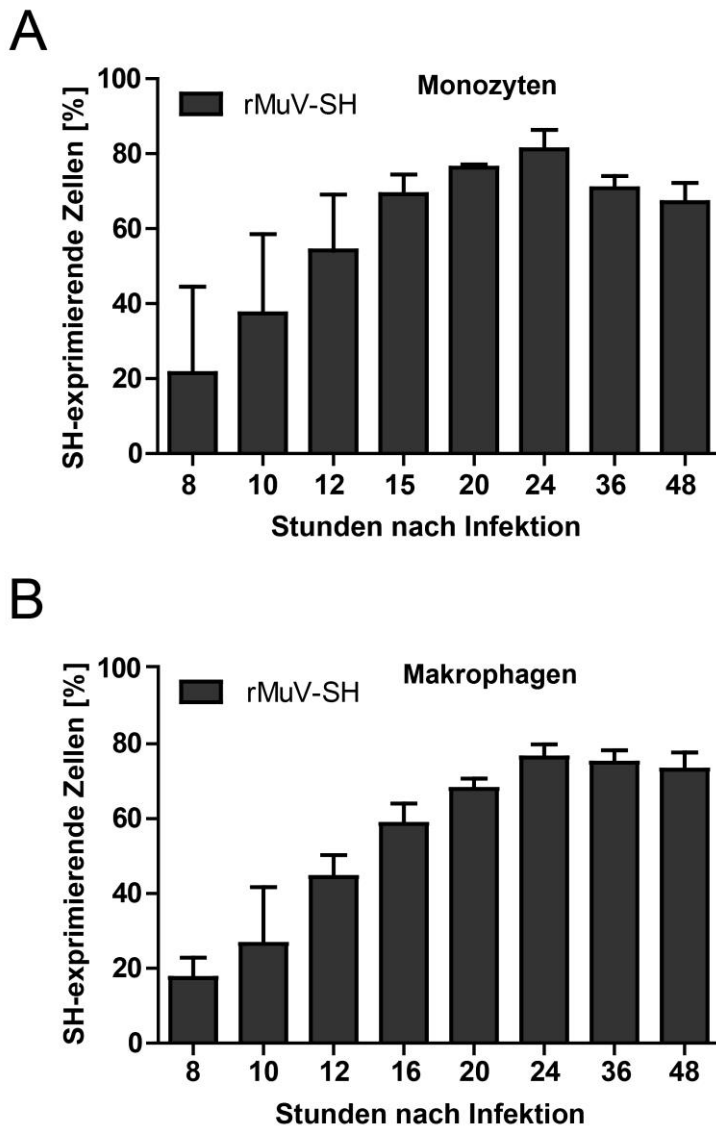


Abbildung 27: Expressionskinetik des SH-Proteins in rMuV-infizierten THP-1 Zellen.

(A) THP-1 Monozyten und (B) mittels PMA zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen wurden mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert. Das SH-Protein wurde mit einem APC-gekoppelten FLAG-spezifischen Antikörper markiert. Die Proben wurden im Durchflusszytometer gemessen. Die Werte für rMuV-SHstop wurden von denen für rMuV-SH abgezogen. Die Graphen zeigen den Mittelwert und die SD für vier unabhängige Experimente.

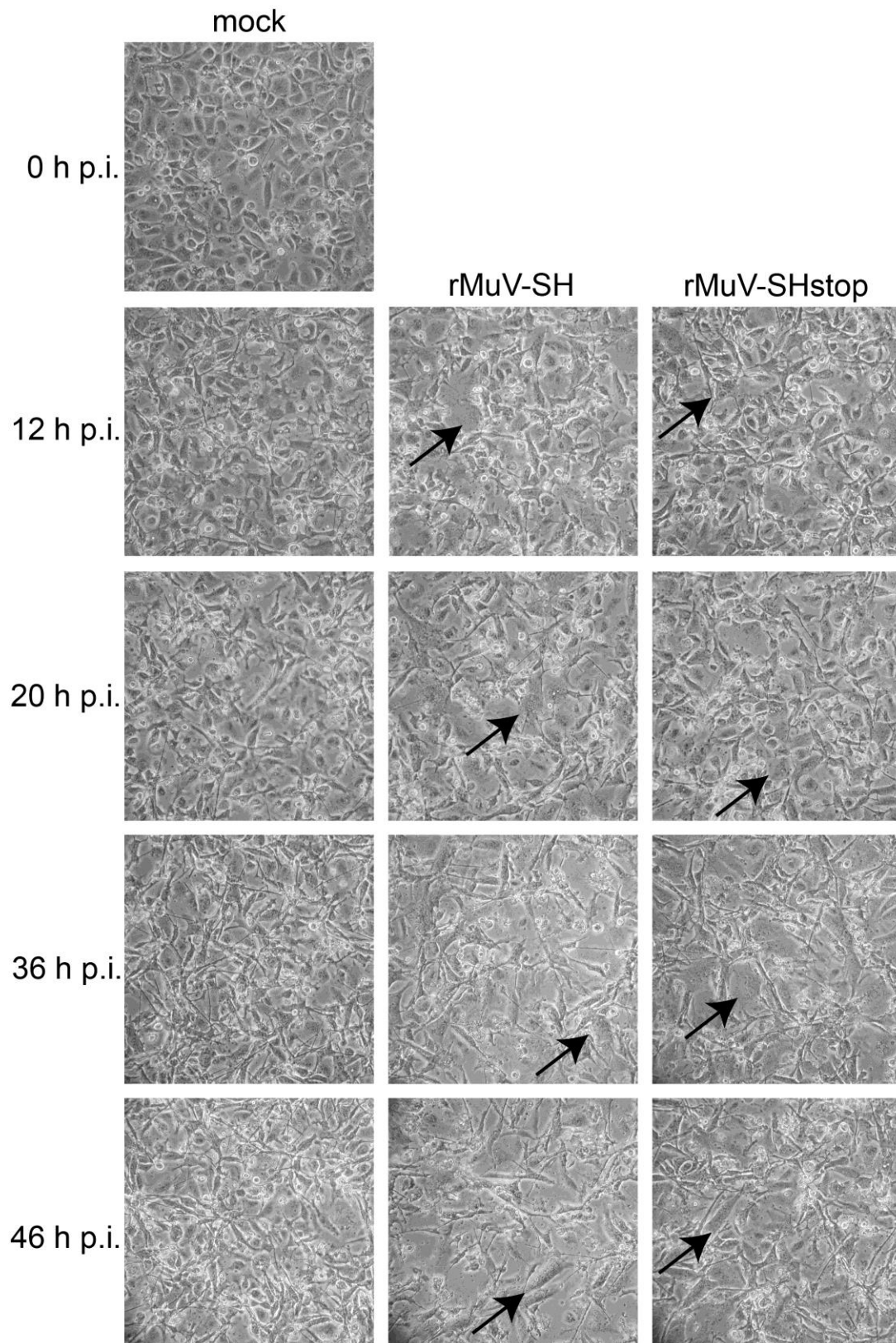


Abbildung 28: Nach rMuV-Infektion induzierter CPE in THP-1 Makrophagen.

Mittels PMA zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen wurden 72 Stunden nach der PMA-Behandlung mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen am Lichtmikroskop in 100-facher Vergrößerung fotografiert. Nicht-infizierte Zellen (mock) wurden zum Vergleich fotografiert.

Die THP-1 Monozyten zeigten nach der Infektion mit rMuV keine morphologischen Veränderungen, während bei den THP-1 Makrophagen ein deutlicher CPE mit der Bildung von Synzytien zu erkennen war (Abb. 28). Auch nicht-infizierte Makrophagen zeigten im Verlauf der Beobachtung morphologische Veränderungen, wobei die zum Zeitpunkt der Infektion überwiegend runden Zellen schließlich einen langgestreckten Phänotyp aufwiesen. Die rMuV-infizierten Zellen zeigten ebenfalls diese Veränderung und bereits 12 h nach der Infektion die Ausbildung von Synzytien. Im Verlauf der Infektion breitete sich der CPE weiter im Zellrasen aus. Unterschiede zwischen dem SH-exprimierenden und dem SH-defizienten Virus wurden bei dem in Abbildung 28 exemplarisch gezeigten Experiment wie auch in weiteren Experimenten nicht festgestellt.

Für die Untersuchung, ob THP-1 Monozyten oder Makrophagen besser für die Analyse der Zytokin-Freisetzung geeignet sind, wurden beide Zelltypen mit LPS stimuliert bzw. mit rMuV-SHstop infiziert. Während für Makrophagen die Freisetzung von IL-1 β mittels ELISA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion und Stimulation detektiert werden konnte, zeigten die Monozyten weder nach Stimulation noch nach Infektion eine Zytokin-Freisetzung (Daten nicht gezeigt). Für die weiteren Versuche wurden daher lediglich zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen verwendet.

4.3.2 Einfluss des SH-Proteins auf die Phosphorylierung von p65

Um auch in THP-1 Zellen den Einfluss der rMuV-Infektion generell sowie den des SH-Proteins auf die NF- κ B-Aktivierung zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung von p65 im Western Blot analysiert. Hierzu wurden zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten bis 46 h nach Infektion wurden die Zellen lysiert und hinsichtlich des Gesamtproteingehalts von p65 sowie des Anteils der an Ser536-phosphorylierten Form von p65 untersucht. Die Färbung des viralen N- sowie des SH-Proteins diente der Kontrolle der erfolgreichen Infektion mit den gewünschten Viren. Wie Abbildung 29 zeigt, stieg die Phosphorylierung von p65 im Verlauf der Infektion in rMuV-infizierten Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen an. Dabei war in der frühen Phase der Infektion (20 h nach Infektion) eine stärkere Phosphorylierung in rMuV-SHstop- im Vergleich zu rMuV-SH-infizierten Zellen zu beobachten. Zu den späteren Zeitpunkten waren dagegen keine Unterschiede zwischen den beiden Viren zu erkennen. Dass die Bande, die dem Gesamtproteingehalt von p65 entspricht, besonders zum Zeitpunkt 46 h nach Infektion in infizierten Zellen deutlich schwächer ist als die Bande in nicht-infizierten Zellen, liegt an der Reihenfolge der durchgeführten Färbungen. Bei dem gezeigten Blot wurde zunächst die phosphorylierte Form von p65 gefärbt und erst im Anschluss ein Antikörper verwendet, der p65 unabhängig von seiner Phosphorylierung erkennt. Wurde der letztgenannte Antikörper zuerst

eingesetzt, zeigten alle untersuchten Proben eine Bande von der gleichen Stärke und damit einen gleichen Gesamtproteingehalt an p65 (Daten nicht gezeigt). Die Quantifizierung der p65-Phosphorylierung von rMuV-SH- relativ zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen zeigt im Trend, dass zu den früheren Zeitpunkten nach Infektion die p65-Phosphorylierung in der Anwesenheit des SH-Proteins stärker heabreguliert war als zu den späteren Zeitpunkten (Abb. 29B). Da für die Quantifizierung neben GAPDH auch auf die Expression des N-Proteins normiert wurde und für dieses 12 h nach Infektion nur sehr schwache Banden detektiert werden konnten, wurde für diesen Zeitpunkt keine Quantifizierung durchgeführt. Die Induktion der Phosphorylierung von p65 durch die Infektion mit rMuV lässt auch auf die Aktivierung von NF-κB im Kontext einer MuV-Infektion in THP-1 Zellen schließen. Da in der Gegenwart des SH-Proteins die p65-Phosphorylierung im frühen Verlauf der Infektion reduziert ist, kann auch eine reduzierte NF-κB-Aktivierung in der Anwesenheit des SH-Proteins vermutet werden.

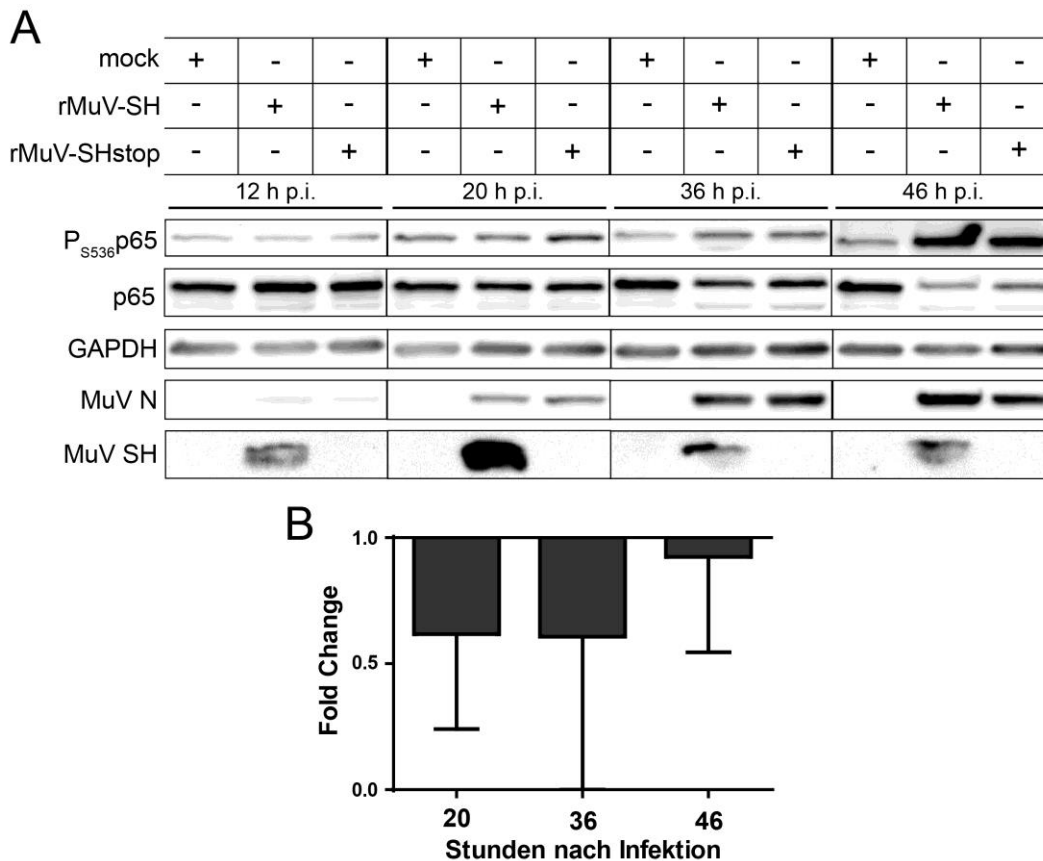


Abbildung 29: Analyse der NF-κB p65-Phosphorylierung in infizierten THP-1 Zellen.

(A) Zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen wurden mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot auf die Phosphorylierung von p65 mit einem phosphospezifischen Antikörper hin untersucht. Die Detektion des Gesamtgehalts an p65, GAPDH, MuV N und MuV SH diente als Kontrolle. Nicht-infizierte Zellen (mock) wurden als Kontrolle verwendet. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (B) Die p65-Phosphorylierung wurde für rMuV-SH- relativ zu rMuV-SHstop-infizierte Zellen quantifiziert. GAPDH und MuV N wurden zur Normalisierung verwendet. Der Graph zeigt die mittlere *Fold Change* und die SD für drei unabhängige Experimente.

4.3.3 Einfluss des SH-Proteins auf die Genexpression von TNF α , IL-1 β und IL-18

Um den Einfluss der rMuV-Infektion generell sowie den des SH-Proteins auf die Produktion der Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-18 zu charakterisieren, wurde zunächst die Genexpression von pro-TNF α , pro-IL-1 β und pro-IL-18 in rMuV-infizierten THP-1 Makrophagen analysiert. Diese wurden dazu mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten bis 46 h nach Infektion wurde die RNA extrahiert und die Expression der mRNA der Zytokine im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen mittels quantitativer Real-Time-PCR zur Analyse des Einflusses der rMuV-Infektion quantifiziert. Abbildung 30A zeigt, dass die Genexpression von pro-TNF α im Infektionsverlauf in rMuV-infizierten Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen anstieg. Dabei wurde eine stärkere Hochregulation in rMuV-SHstop- im Vergleich zu rMuV-SH-infizierten Zellen für die Zeitpunkte 12, 20 und 36 h nach Infektion beobachtet. Zum spätesten analysierten Zeitpunkt, 46 h nach Infektion, war die Hochregulation jedoch in rMuV-SH- im Vergleich zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen größer. Die Quantifizierung der Expression der TNF α -mRNA in rMuV-SH- relativ zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen, bei der zusätzlich zu *GAPDH* auch eine Normalisierung auf das *N*-Gen durchgeführt wurde, zeigt für jeden Zeitpunkt eine Herabregulation in rMuV-SH-infizierten Zellen, wobei diese für die Zeitpunkte 36 und 46 h nach Infektion signifikant war. (Abb. 30B). Das Ausmaß der Regulation stieg bis 36 h nach Infektion an, 46 h nach Infektion war der Unterschied zwischen den beiden Viren dagegen wieder weniger stark ausgeprägt. Auch die Expression der IL-1 β -mRNA stieg in rMuV-infizierten im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen im Infektionsverlauf an, wie Abbildung 30C zeigt. Im Vergleich zur Hochregulation der TNF α -Genexpression nach Infektion, war diese für IL-1 β jedoch deutlich geringer. Es ist aber auch für IL-1 β ein stärkerer Anstieg in rMuV-SHstop- als in rMuV-SH-infizierten Zellen zu erkennen, wobei bei ersteren zu jedem Zeitpunkt eine Hochregulation relativ zu nicht-infizierten Zellen zu erkennen ist, bei letzteren nur zu den beiden späteren Zeitpunkten. Die Genexpression von pro-IL-1 β in rMuV-SH- relativ zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen war zu jedem betrachteten Zeitpunkt herabreguliert, 36 und 46 h nach Infektion signifikant, wobei die Stärke der Regulation im Infektionsverlauf anstieg (Abb. 30D). Im Gegensatz dazu war die Genexpression von pro-IL-18 in rMuV-infizierten relativ zu nicht-infizierten Zellen nicht reguliert (Abb. 30E). Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl TNF α als auch IL-1 β während der Infektion mit rMuV auf mRNA-Ebene hochreguliert wurden, wobei das Vorhandensein des SH-Proteins die Genexpression jeweils reduzierte. Dagegen wurde die Expression von IL-18 auf mRNA-Ebene während der rMuV-Infektion nicht beeinflusst.

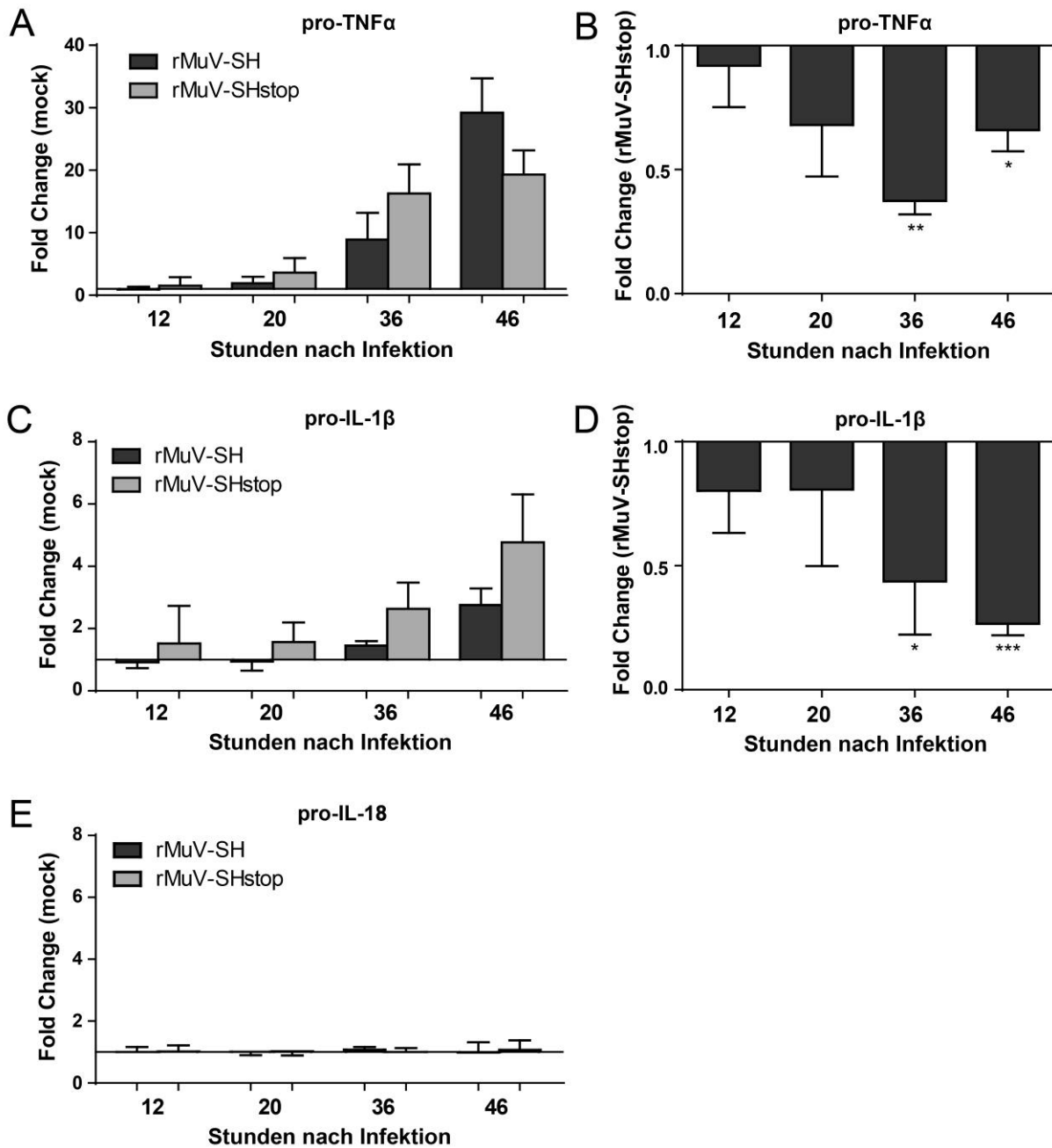


Abbildung 30: Analyse der pro-TNF α -, pro-IL-1 β - und pro-IL-18-mRNA in infizierten THP-1 Zellen.

Zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen wurden mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und die RNA extrahiert. (A) Die TNF α -, (C) IL-1 β - und (E) IL-18-Genexpression wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR relativ zu nicht-infizierten Zellen quantifiziert. *GAPDH* wurde zur Normalisierung verwendet. Dargestellt ist die *Fold Change* (mock), die mit der $\Delta\Delta CT$ Methode berechnet wurde. (B) Die TNF α - und (D) die IL-1 β -Genexpression wurde in rMuV-SH- relativ zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen quantifiziert. *GAPDH* und *MuV N* wurden zur Normalisierung verwendet. Dargestellt ist die *Fold Change* (rMuV-SHstop), die mit der $\Delta\Delta CT$ Methode berechnet wurde. Die Graphen zeigen den Mittelwert und die SD für drei unabhängige Experimente. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; die Statistik wurde mit einem Einstichproben-t-Test mit einem zweiseitigen p-Wert berechnet.

4.3.4 Einfluss des SH-Proteins auf die Expression von pro-IL-1 β

Auch auf Proteinebene wurde die Expression von pro-IL-1 β mittels Western Blot untersucht. Hierzu wurden zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten bis 46 h nach Infektion wurden die Zellen lysiert und hinsichtlich der Expression von pro-IL-1 β untersucht. Die Färbung des viralen N- sowie des SH-Proteins diente der Kontrolle bezüglich der erfolgreichen Infektion mit den gewünschten Viren. Die Expression von pro-IL-1 β zeigte zu den frühen Zeitpunkten, 12 und 20 h nach Infektion, in infizierten Zellen keine Unterschiede zu nicht-infizierten Zellen (Abb. 31A). Dagegen war 36 h nach Infektion eine deutlich erhöhte Expression in rMuV-SHstop- im Vergleich zu rMuV-SH- sowie zu nicht-infizierten Zellen zu beobachten. 46 h nach Infektion war für beide rMuV die pro-IL-1 β -Expression im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen erhöht, wobei auch hier in rMuV-SH-infizierten Zellen die Expression im Vergleich zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen deutlich reduziert war. Die Quantifizierung der pro-IL-1 β -Expression von rMuV-SH- relativ zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen zeigt im Trend, dass diese zu den späteren Zeitpunkten nach Infektion stärker herabreguliert war als zu den früheren Zeitpunkten (Abb. 31B). Wie auch für die Quantifizierung der p65-Phosphorylierung (Abb. 29B) wurde die Expression von pro-IL-1 β auf die Expression von GAPDH und die des N-Proteins normiert. Daher wurde aus den gleichen Gründen für den Zeitpunkt 12 h nach Infektion keine Quantifizierung durchgeführt. Nach diesen Ergebnissen zu schließen, induziert die rMuV-Infektion die Expression von pro-IL-1 β , dessen Genexpression von NF- κ B abhängig ist, erst im späteren Verlauf der Infektion. In der Gegenwart des SH-Proteins ist die Expression von pro-IL-1 β deutlich reduziert.

Der Einfluss der rMuV-Infektion generell sowie der des SH-Proteins auf die Expression von pro-IL-18 als weiteres Zytokin, dessen Genexpression von NF- κ B und dessen Freisetzung von Caspase-1 abhängig ist, sollte ebenfalls auf Proteinebene untersucht werden. Allerdings zeigte der verwendete Antikörper gegen pro-IL-18 in den verschiedenen durchgeführten Experimenten ein variierendes Bandenmuster auf unterschiedlicher Höhe. Da schon auf mRNA-Ebene keine Hochregulation dieses Zytokins nach rMuV-Infektion festgestellt werden konnte (Abb. 30E), wurde auf eine weitere Analyse von pro-IL-18 auf Proteinebene verzichtet.

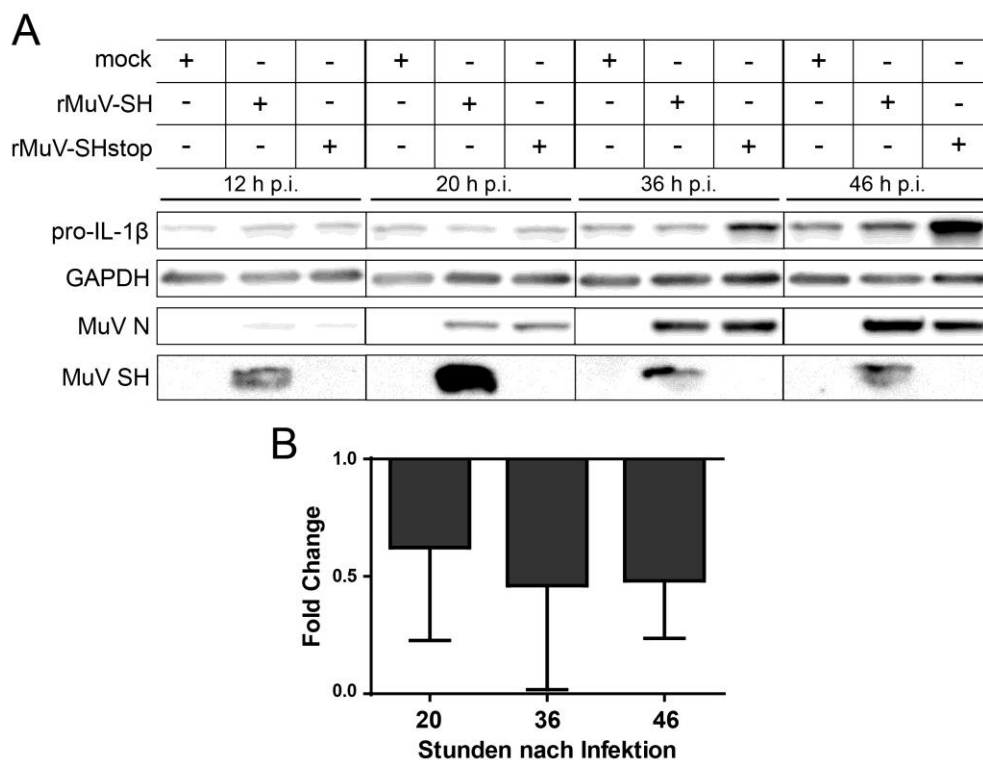


Abbildung 31: Analyse der pro-IL-1 β -Expression in infizierten THP-1 Zellen.

(A) Zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen wurden mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot auf die Expression von pro-IL-1 β mit einem spezifischen Antikörper hin untersucht. Die Detektion des Gesamtgehalts an GAPDH, MuV N und MuV SH diente als Kontrolle. Nicht-infizierte Zellen (mock) wurden als Kontrolle verwendet. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (B) Die pro-IL-1 β -Expression wurde für rMuV-SH- relativ zu rMuV-SHstop-infizierte Zellen quantifiziert. GAPDH und MuV N wurden zur Normalisierung verwendet. Der Graph zeigt die mittlere *Fold Change* und die SD für drei unabhängige Experimente.

4.3.5 Einfluss des SH-Proteins auf die Freisetzung von TNF α , IL-1 β und IL-18

Der Einfluss der rMuV-Infektion und der des SH-Proteins auf die Freisetzung von TNF α , IL-1 β und IL-18 wurden mittels spezifischer ELISA-Assays untersucht. THP-1 Makrophagen wurden mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 infiziert. Innerhalb von 46 h nach Infektion wurden die Zellkulturüberstände der infizierten Zellen abgenommen und der Gehalt der verschiedenen Zytokine analysiert. Wie Abbildung 32A zeigt, stieg die Freisetzung von TNF α im Verlauf der Infektion an. Für nicht-infizierte Zellen wurde zu jedem Zeitpunkt eine deutlich geringere TNF α -Freisetzung als für infizierte Zellen detektiert. Die rMuV-SHstop- zeigten im Vergleich zu rMuV-SH-infizierten Zellen ab 20 h nach Infektion eine signifikant höhere Freisetzung. Die Quantifizierung des freigesetzten TNF α von rMuV-SH- relativ zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen zeigt für jeden Zeitpunkt eine Herabregulation in rMuV-SH-infizierten Zellen um etwa 50 % (Abb. 32B), die zu den Zeitpunkten 20, 36 und 46 h nach Infektion als signifikant getestet wurde. Auch die Freisetzung von IL-1 β stieg bei rMuV-SHstop-infizierten Zellen im Verlauf der Infektion an, während sie bei rMuV-SH-infizierten Zellen über den Infektionsverlauf

unverändert blieb (Abb. 32C). Nicht-infizierte Zellen zeigten zu jedem Zeitpunkt eine geringere Freisetzung von IL-1 β als infizierte Zellen. Da generell die Menge an freigesetztem IL-1 β im Vergleich zu TNF α deutlich geringer war, war der Unterschied zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen für IL-1 β weniger stark als für TNF α . Relativ zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen war die IL-1 β -Freisetzung von rMuV-SH-infizierten Zellen 12 h nach Infektion hochreguliert, zu den späteren Zeitpunkten nach Infektion aber um 20 – 30 % herabreguliert (Abb. 32D). IL-18 wurde zu keinem untersuchten Zeitpunkt in den Zellkulturüberständen infizierter oder nicht-infizierter Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die rMuV-Infektion die Freisetzung von TNF α und IL-1 β hochreguliert wird, wobei für TNF α eine deutlich stärkere Regulation als für IL-1 β beobachtet wurde. Damit spiegelt sich der Unterschied in der Regulation der Genexpression zwischen diesen beiden Zytokinen (Abb. 30) auch in der Zytokin-Freisetzung wider. Wie die Genexpression von IL-18 wird auch die Freisetzung dieses Zytokins durch die Infektion mit rMuV in THP-1 Makrophagen nicht reguliert. Das SH-Protein reduziert sowohl die Freisetzung von TNF α , als auch in geringerem Maße die von IL-1 β .

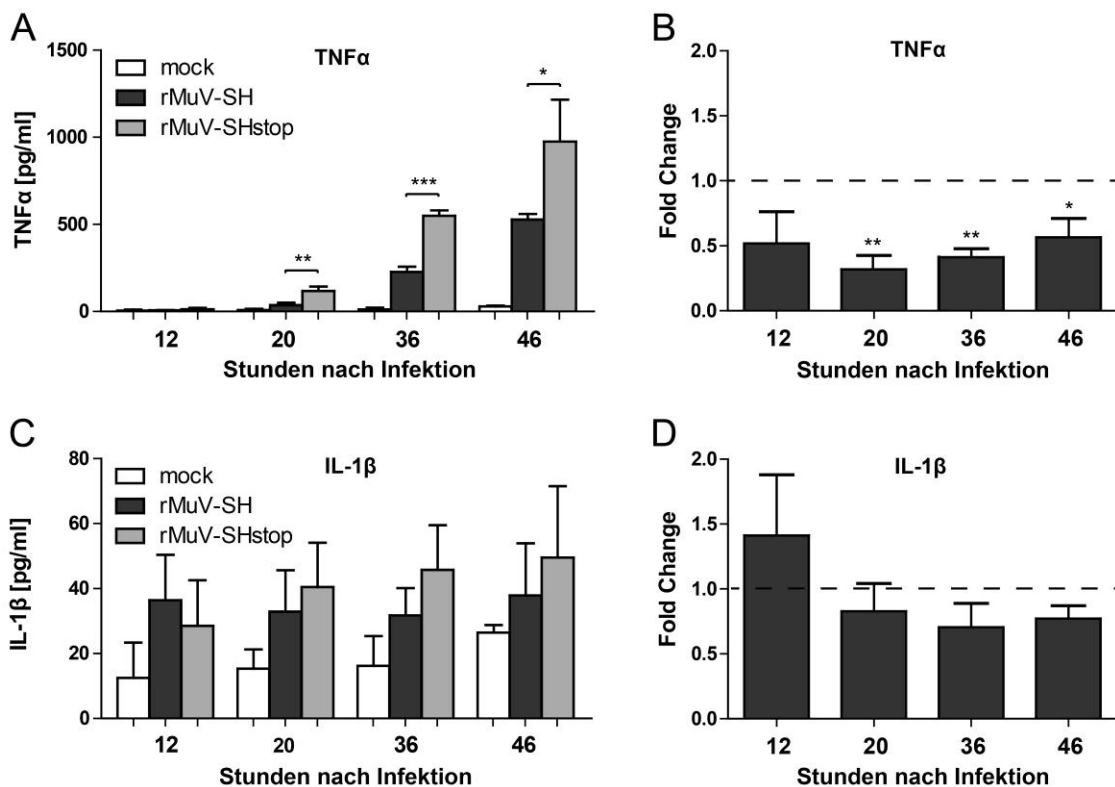


Abbildung 32: Analyse der TNF α - und der IL-1 β -Freisetzung aus infizierten THP-1 Zellen.

Mittels PMA zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen wurden mit rMuV-SH oder rMuV-SHstop mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und auf die Menge an (A) TNF α und (C) IL-1 β mittels spezifischer ELISA-Assays analysiert. Nicht-infizierte Zellen (mock) dienten als Kontrolle. (B) Die TNF α - und (D) die IL-1 β -Freisetzung aus rMuV-SH-infizierten Zellen wurden relativ zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen quantifiziert. Die Graphen zeigen den Mittelwert und die SD für drei unabhängige Experimente. *, p<0,05; **, p<0,01;***, p<0,001; (A) die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test mit einem zweiseitigen p-Wert oder (B) einem Einstichproben-t-Test mit einem zweiseitigen p-Wert berechnet.

5 Diskussion

5.1 Herstellung rekombinanter MuV zu Analyse der Funktion des SH-Proteins

Die bisherigen Studien zur Untersuchung der Funktion des MuV SH-Proteins und der SH-Proteine von verwandten Paramyxoviren wurden mit rekombinanten Viren durchgeführt, bei denen zur Verhinderung der SH-Expression das gesamte *SH*-Gen deletiert wurde. Die Virulenz und Pathogenität von Paramyxoviren kann aber durch Veränderungen der Genomstruktur negativ beeinflusst werden, da die Genomstruktur für den Gradienten der viralen mRNAs und somit auch für eine effiziente Virusreplikation entscheidend ist. Daher konnte durch diese Studien nicht geklärt werden, ob das Fehlen des SH-Proteins oder die mit der Deletion verbundene Störung der Genomstruktur für die gefundenen Effekte verantwortlich ist. Malik *et al.* verglichen zum ersten Mal ein rMuV mit deletiertem *SH*-Gen, rMuV Δ SH, und ein rMuV-SHstop, bei dem die SH-Expression durch das Einfügen von drei Stoppkodons in das *SH*-Gen unterdrückt ist. Sie stellten die Vermutung auf, dass nicht das MuV SH-Protein *per se* als Virulenzfaktor in dem von ihnen untersuchten Modell fungiert, sondern dass die gefundenen Effekte auf die Veränderung der Genomstruktur zurückzuführen sind, da nur rMuV Δ SH ein reduziertes Wachstum in Vero Zellen und eine Attenuierung im Ratten-Neurovirulenz-Modell zeigte. Weitere Untersuchungen zur Funktion des SH-Proteins unter Verwendung der beiden SH-defizienten Virusvarianten wurden jedoch nicht durchgeführt (Malik *et al.*, 2011).

Um den Einfluss des MuV SH-Proteins auf die NF- κ B-Aktivierung untersuchen zu können, wurden daher in Vorarbeiten zu der vorliegenden Arbeit in Analogie zu Malik *et al.* rMuV erzeugt, die aufgrund des Einfügens von drei Stoppkodons in das *SH*-Gen defizient für die Expression des SH-Proteins sind (rMuV-SHstop und rMuV-SHstop-C). Im Gegensatz zu den erzeugten rMuV-SHstop führen die Viren rMuV-SH und rMuV-SH-C zu der Expression eines SH-Proteins, das aufgrund der Fusion mit einem FLAG-Epitop am N- bzw. C-Terminus mittels immunologischer Methoden detektiert werden kann (Franz, 2012).

5.2 Bedeutung des SH-Proteins für die Virusinfektion

5.2.1 Einfluss des SH-Proteins auf die Replikation von MuV

Auswirkungen der verhinderten Expression eines viralen Proteins auf die Virusreplikation können mittels Analyse des Wachstums in Zellkultur untersucht werden. Der Vergleich des Wachstums in Vero76 Zellen der vier in der vorliegenden Arbeit untersuchten rMuV (rMuV-SH, rMuV-SHstop, rMuV-SH-C und rMuV-SHstop-C) zeigte keinen Unterschied (Abb. 10A). Auch die Studie von Malik *et al.* zeigt diesen Befund (Malik *et al.*, 2011). Das Einfügen des FLAG-Epitops

vor das *SH*-Gen, was für den Nachweis des SH-Proteins nötig war, führte ebenfalls zu keiner ausgeprägten Änderung im Viruswachstum in Vero76 Zellen, wie der Vergleich von rMuV-SH und einem nicht modifizierten rMuV (rMuV-FL) zeigt (Abb. 10B). Demnach haben die 24 eingefügten Nukleotide, die der „*rule of six*“ folgen, keinen Einfluss auf die Virusreplikation. Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede des induzierten CPEs aufgrund der verhinderten Expression des SH-Proteins zwischen den rMuV in Vero76, A549 und THP-1 Zellen beobachtet werden (Abb. 11 und 28). Die Replikation von MuV wird demzufolge *in vitro* nicht durch das Fehlen des SH-Proteins beeinflusst. Ein Einfluss des SH-Proteins auf die Virusreplikation *in vivo* ist jedoch nicht auszuschließen. Dass in früheren Studien widersprüchliche Ergebnisse für den Vergleich von Wildtyp-Viren und Viren mit deletiertem *SH*-Gen für MuV, PIV5 und RSV erhalten wurden, ist vermutlich auf die bereits erwähnte Störung der Genomstruktur zurückzuführen (siehe Kap. 5.1) (Bukreyev *et al.*, 1997; He *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2003; Malik *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2014; Techaarpornkul *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2011). Die Deletion des N1L- sowie des C4-Proteins des Vaccinia Virus (VACV), für welche die Funktion als NF- κ B-Inhibitoren bekannt ist, beeinträchtigt die Virusreplikation in Zellkultur nicht, führt *in vivo* aber zu einer Attenuierung (Bartlett *et al.*, 2002; Ember *et al.*, 2012; Sumner *et al.*, 2016). Studien zu RSV, PIV5 und JPV zeigen, dass auch die Deletion des *SH*-Gens in einer Attenuierung *in vivo* resultiert (Bukreyev *et al.*, 1997; He *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2015; Schickli *et al.*, 2012; Whitehead *et al.*, 1999). Aufgrund des Fehlens eines geeigneten Tiermodells für MuV, das eine Analyse des Virus nach Infektion über den respiratorischen Trakt unter Entwicklung von klinischen Symptomen erlaubt, gibt bislang nur die Analyse der Neurovirulenz im Ratten-Modell einen Hinweis auf eine mögliche Attenuierung von MuV *in vivo* (Elderfield *et al.*, 2015; Parker *et al.*, 2013; Rubin *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2013). Bei diesem Modell wird das Virus in das Gehirn von neugeborenen Ratten injiziert. Die an der Immunantwort beteiligten Zellen im Blut unterschieden sich von denen im ZNS, wobei im ZNS vor allem Mikrogliazellen und Astrozyten hauptverantwortlich sind. Nur nach Verletzung der Blut-Hirn-Schranke oder wenn aufgrund einer krankheitsbedingten, initialen Aktivierung der ZNS-Immunzellen die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöht ist, kommt es zu einem Eindringen von Immunzellen des Bluts ins Gehirn (Abbott *et al.*, 2006; Farina *et al.*, 2007; Hanisch & Kettenmann, 2007). Auswirkungen des SH-Proteins auf den NF- κ B-Signalweg *in vivo* sind daher mit diesem Modell möglicherweise nicht nachweisbar. Dies könnte erklären, weshalb für ein rMuV mit unterdrückter SH-Expression aufgrund eingefügter Stoppkodons keine Attenuierung im Ratten-Neurovirulenz-Modell beobachtet wurde (Malik *et al.*, 2011), obwohl *in vitro* Studien die Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung durch das SH-Protein zeigen (Abb. 18).

Die weltweit auftretenden Ausbrüche von MuV in durchgeimpften Bevölkerungen zeigen die Notwendigkeit der Entwicklung eines verbesserten Impfstoffs, der bei möglichst wenigen Nebenwirkungen eine verbesserte Immunogenität hat. Dabei könnte die Deletion des *SH*-Gens zur Attenuierung der möglichen Impfviren herangezogen werden, wie es bereits für RSV mit einem entsprechend manipulierten Virus bei der Immunisierung von Kleinkindern getestet wurde (Karron *et al.*, 2005; Schickli *et al.*, 2012). Die in dieser Arbeit analysierten Viren basieren auf dem Genom des Impfstamms Jeryl Lynn. Für Untersuchungen *in vivo* kann es jedoch auch notwendig werden rekombinante Viren zu erzeugen, die auf einem Wildtypstamm basieren. In einer ersten *in vivo* Studie zu MuV wurden Mäuse, die jedoch nur ein bedingt geeignetes Tiermodell für MuV sind (Xu *et al.*, 2013), intranasal mit einem rMuV Δ SH, einem rMuV mit deletiertem *V*-Gen (rMuV Δ V) oder einem rMuV mit der Deletion des *SH*- sowie des *V*-Gens (rMuV Δ SH Δ V) infiziert. Alle Viren induzierten eine zelluläre Immunantwort und die Bildung neutralisierender Antikörper, wobei rMuV Δ SH und rMuV Δ SH Δ V zu einem höheren Antikörpertiter führten als rMuV Δ V und daher für die Deletion des *SH*-Gens die Induktionen einer besseren Antigenpräsentation als für die Deletion des *V*-Gens vermuten lassen (Xu *et al.*, 2014). Vergleichbare Ergebnisse zeigte auch eine Studie zu PIV5 (Li *et al.*, 2013).

Die Behandlung mit einem spezifischen NF- κ B-Inhibitor, SC75741, der die Bindung von p65 an die DNA verhindert (Ehrhardt *et al.*, 2013), resultierte in einer reduzierten Replikation von rMuV-SH und rMuV-SHstop in A549 Zellen (Abb. 24). Dieses Ergebnis überrascht, da aufgrund der Hemmung der angeborenen Immunantwort eine erhöhte Virusreplikation erwartet wurde. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete NF- κ B-Inhibitor führte jedoch auch für Influenza A Viren (IAV) zu einer Reduktion des Wachstums in Zellkultur (Ehrhardt *et al.*, 2013). Interessanterweise wurde für IAV, die mit dem NS1-Protein ebenfalls über ein Protein verfügen, das die NF- κ B-Aktivierung unterdrückt (Wang *et al.*, 2000), gezeigt, dass sie die Aktivität von NF- κ B für eine effiziente Replikation benötigen (Mazur *et al.*, 2007; Nimmerjahn *et al.*, 2004; Wurzer *et al.*, 2004). Gleiches gilt für das Masernvirus (MV) (Vijayan *et al.*, 2014), für das mit der Expression der Proteine P, V und C gleich drei virale Gegenspieler des NF- κ B-Signalwegs bekannt sind (Jiang *et al.*, 2016). Möglich ist, wie Vijayan *et al.* vermuten, dass die MV-induzierte Aktivierung von NF- κ B für die Synthese neuer viraler Proteine notwendig ist und anschließend die anti-virale Funktion von NF- κ B durch die neu synthetisierten viralen Proteine unterdrückt wird. Vijayan *et al.* spekulieren weiter, dass MV den NF- κ B-Signalweg abhängig vom Zeitpunkt oder dem Ausmaß der NF- κ B-Aktivierung unterschiedlich reguliert (Vijayan *et al.*, 2014). Eine in den verschiedenen Phasen des viralen Lebenszyklus unterschiedliche Regulation von NF- κ B zeigen auch onkogene Viren wie die beiden Herpesviren Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV) und Epstein-Barr-Virus (EBV). Sie aktivieren NF- κ B sehr schnell nach der Infektion und induzieren darüber die Expression viraler Proteine, die zu einer konstitutiven Aktivierung von

NF- κ B führen. Diese trägt zur Latenz in infizierten Zellen unter Ausnutzung der das Zellüberleben fördernden Funktion von NF- κ B bei. Die persistente Aktivierung von NF- κ B kann dadurch auch zur onkogenen Zelltransformation führen. Die lytische Replikation der Viren ist dagegen durch eine Herabregulation der NF- κ B-Aktivierung gekennzeichnet, an der auch die während dieser Phase gesteigerte Expression der viralen Proteine RTA von KSHV und ZTA von EBV mitwirkt (de Oliveira *et al.*, 2010; Sun & Cesarman, 2011). Eventuell ist auch für MuV die Replikation vor allem im frühen Verlauf der Infektion, wenn das SH-Protein noch in sehr geringer Menge vorhanden ist, von einer unbehinderten NF- κ B-Aktivität abhängig. Diese wurde aber bei den durchgeführten Experimenten aufgrund der Zugabe des Inhibitors eine Stunde nach Infektion gestört. Im späteren Verlauf der Infektion trägt das neu synthetisierte SH-Protein durch die Reduktion der NF- κ B-Aktivierung zur Unterdrückung der pro-inflammatorischen und anti-viralen Funktion von NF- κ B bei und damit möglicherweise auch zur Aufrechterhaltung eines für die MuV-Replikation förderlichen Ausmaßes an NF- κ B-Aktivität. Studien für IAV zeigen, dass auch *in vivo* die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung die Virusreplikation verringert und darüber hinaus zu einer Reduktion der Ausschüttung von virusinduzierten Zytokinen führt (Mazur *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2011). Da der Vergleich von *in vitro* und *in vivo* Systemen Unterschiede in der virusinduzierten Freisetzung von Zytokinen sowie in der Inhibitorvermittelten Reduktion der Zytokine beinhaltet, dürfen spezifische Befunde jedoch nicht generalisiert werden, sondern müssen auf das jeweils untersuchte Modell bezogen betrachtet werden (Pinto *et al.*, 2011). Das Zellkulturmodell ist nicht in der Lage, die vollständige Immunantwort eines Wirtsorganismus wiederzugeben und stellt so nur ein eingeschränkteres Modell zur Untersuchung von Effekten der NF- κ B-Inhibition auf die Immunantwort und den damit verbundenen Einfluss auf die Virusreplikation dar. Bisher liegen jedoch keine Studien vor, die den Zusammenhang der NF- κ B-Aktivierung und einer MV- oder MuV-Infektion *in vivo* untersucht haben.

5.2.2 Einfluss des SH-Proteins auf die Expression viraler Proteine

Zur Charakterisierung der hergestellten rMuV und des Infektionsverlaufs wurde die Expression des viralen N- sowie des SH-Proteins analysiert. Die dafür gewählte Methode der Durchflusszytometrie ermöglicht die Detektion der für die untersuchten Proteine positiven Zellen auf Einzelzellbasis. Damit konnten infizierte von nicht-infizierten Zellen unterschieden werden, was einen Vorteil gegenüber dem Western Blot darstellt. Die fehlende Expression des SH-Proteins hatte keinen Einfluss auf die Expression des N-Proteins in Vero76, A549 und monozytischen sowie zu Makrophagen differenzierten THP-1 Zellen (Abb. 12 und 26). Auch mittels Immunfluoreszenz wurde in A549 Zellen kein Unterschied zwischen SH-exprimierenden und SH-defizienten Zellen bezüglich der N-Expression beobachtet (Abb. 16). Dieser Befund

wurde für Vero Zellen aufgrund der vergleichbaren Replikation der untersuchten rMuV in dieser Zelllinie erwartet (Abb. 10A) und zeigt nun auch für A549 und THP-1 Zellen die gleiche Effizienz der Replikation der verschiedenen rMuV. Einige Studien, welche die Expression viraler Proteine in MuV- und PIV5-infizierten Zellen auf mRNA- und Proteinlevel analysiert haben, zeigen, dass auch die Deletion des *SH*-Gens die Proteinexpression nicht beeinflusst (He *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2011). Einen Einfluss der veränderten Genomstruktur auf die Proteinsynthese beobachteten dagegen Fuentes *et al.*, da die Infektion mit PIV5 Δ SH oder mit einem PIV5, welches statt des eigenen für das RSV SH-Protein kodiert, zu einer höheren Expression des HN- sowie des F-Proteins führte (Fuentes *et al.*, 2007).

Bei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden teilweise hohe Abweichungen in der Expression des N-Proteins nach Infektion mit demselben rMuV beobachtet. Dies könnte auf unterschiedliche Virusmengen, die für die Infektion eingesetzt wurden, zurückzuführen sein. Tatsächlich trat häufig eine Varianz der gemessenen Virustiter innerhalb verschiedener Aliquots der gleichen Virusanzucht auf, so dass möglicherweise mit einer von der gewünschten MOI abweichenden Menge an Viruspartikeln infiziert wurde. Eine Erklärung hierfür kann die Zusammenlagerung von Viruspartikeln im virushaltigen Zellkulturüberstand aufgrund der durchgeführten Aufkonzentrierung sein, die für den Erhalt ausreichend hoher Virustiter notwendig war (siehe Kap. 3.2.4.). Trotz größter Sorgfalt und Arbeiten zur Optimierung der Virusanzucht (Meier, 2015) war die Zusammenlagerung der Viruspartikel nicht zu beeinflussen. Eine solche Aggregation einzelner Viruspartikel kann zum Beispiel dazu geführt haben, dass bei der Bestimmung der Virustiter ein Plaque nicht nur durch einen Viruspartikel, sondern durch mehrere, aggregierte Partikel verursacht wurde und dadurch ein zu geringer Titer bestimmt wurde. Wenn in den für den Versuch verwendeten Aliquots die Viruspartikel nicht zusammengelagert waren, wurde entsprechend mit einer zu hohen MOI infiziert. Genauso kann mit einer zu geringen MOI infiziert worden sein, wenn die Viruspartikel in dem für den Versuch eingesetzten Aliquot zusammengelagert waren, in dem für die Titerbestimmung verwendeten aber nicht. Ebenso ist möglich, dass die Zusammenlagerung von Viruspartikeln ihre Infektiosität negativ beeinflusst hat. Aus diesem Grund wurde die Expression des N-Proteins als eine Kontrolle der tatsächlichen Höhe der Viruslast zum Zeitpunkt der Infektion herangezogen und sichergestellt, dass die beobachteten Unterschiede tatsächlich auf die unterbundene Expression des SH-Proteins zurückzuführen sind.

5.2.3 Membranorientierung des SH-Proteins

Die geringe Größe der außerhalb der Transmembrandomäne liegenden Bereiche von 8 und 26 AS des N-bzw. des C-Terminus (Artimo *et al.*, 2012; Kyte & Doolittle, 1982) lässt vermuten, dass das Anfügen eines 8 AS-langen Epitops die Funktion des SH-Proteins beeinflussen könnte. Um für die funktionellen Untersuchungen des SH-Proteins zu ermitteln, ob die N- oder die C-terminal markierten rMuV besser geeignet sind, wurde die Orientierung des SH-Proteins in der Membran infizierter A549 Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurde das SH-Protein als Typ-I-Membranprotein klassifiziert (Abb. 14). Die bisher einzige frühere Studie zur Analyse der Membranorientierung des MuV SH-Proteins zeigt ebenfalls, aber lediglich unter Verwendung transfizierter Zellen, dass der C-Terminus ins Zytoplasma orientiert ist (Takeuchi *et al.*, 1996). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind daher die erste Bestätigung der Orientierung im Sinne eines Typ-I-Membranproteins im Kontext einer Virusinfektion. Es ist anzunehmen, dass für die Manipulation zellulärer Signalwege vor allem die intrazelluläre Domäne des SH-Proteins verantwortlich ist, die durch ein C-terminales, intrazelluläres FLAG-Epitop gestört werden könnte. Diese Vermutung wird durch den Befund bestätigt, dass in transfizierten 293G Zellen SH-Konstrukte mit C-terminal angefügtem HA-Epitop im Gegensatz zu SH-Konstrukten mit N-terminal angefügtem HA-Epitop nicht zu einer Reduktion der NF- κ B-Aktivierung nach poly(I:C)-Stimulation relativ zum Leervektor führten (Abb. 20). Die weiteren Analysen wurden daher mit den N-terminal markierten Viren rMuV-SH und rMuV-SHstop durchgeführt.

Die 8 AS des N-Terminus des MuV SH-Proteins sind innerhalb unterschiedlicher MuV-Stämme stark konserviert. Dagegen ist der 26 AS-lange C-Terminus hoch variabel, enthält aber mehrere polare und geladene AS, einschließlich eines konservierten Threonins und Serins. Da auch die ins Zytoplasma gerichtete N-terminale Domäne von RSV konservierte Threonin- und Serinreste aufweist und bisher vergleichbare Befunde hinsichtlich des Einflusses auf die NF- κ B-Aktivierung durch das MuV und das RSV SH-Protein vorliegen, kann die Beteiligung dieser AS an der Funktion des SH-Proteins vermutet werden und sollte in weiterführenden Studien, z.B. durch Luciferase Assay mit Alanin-Mutanten, untersucht werden.

Bisher ist noch nicht bekannt, ob das MuV SH-Protein ein Bestandteil des Virions ist. Da es aber in der Plasmamembran infizierter Zellen nachgewiesen werden kann und diese die Virushülle bei der Freisetzung neuer Viruspartikel bildet, ist zu vermuten, dass auch das SH-Protein neben den anderen Membranproteinen von MuV ein Bestandteil des Virions ist. Um diese Vermutung näher zu untersuchen, können beispielsweise mittels mehrerer Ultrazentrifugationen unter Verwendung eines Iodixanol-Dichtegradienten aufgereinigte Viruspartikel (Gias *et al.*, 2008) im Western Blot auf das Vorhandensein des SH-Proteins hin analysiert werden.

5.3 Einfluss des MuV SH-Proteins auf den NF- κ B-Signalweg

5.3.1 Beeinflussung der NF- κ B-Aktivierung

Um der angeborenen Immunantwort des Wirtsorganismus zu entkommen, haben Viren unterschiedlichste Strategien entwickelt. Ein entscheidender Angriffspunkt ist häufig die Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, dessen Aktivierung einen der ersten Schritte der angeborenen Immunantwort darstellt und der für die Transkription von zahlreichen antiviral wirkenden Genprodukten verantwortlich ist. Dabei kann der Eingriff der viralen Proteine auf verschiedenen Ebenen innerhalb des Signalwegs stattfinden: Zytokine, zelluläre Rezeptoren, Adapterproteine, regulatorische Enzyme und auch die Untereinheiten von NF- κ B stellen mögliche Angriffspositionen dar. Besonders für Pockenviren, die ein sehr großes DNA-Genom besitzen und für sehr viele virale Proteine kodieren, sind verschiedene NF- κ B-Inhibitoren bekannt. Beispielsweise wurde bereits 1991 das Protein T2 der Kaninchen infizierenden Myxoma- und Fibromviren als erster viraler Zytokinrezeptor beschrieben. T2 ist ein lösliches, sekretiertes Glykoprotein, das spezifisch an TNF α sowie TNF β bindet, diese absättigt und dadurch die Bindung dieser Zytokine an den zellulären TNF-Rezeptor verhindert (Smith *et al.*, 1991; Upton *et al.*, 1991). Aber auch für kleinere Viren wie das Hepatitis-C-Virus (HCV), das für eine deutlich geringere Anzahl an viralen Proteinen kodiert, ist das Eingreifen in die Aktivierung von NF- κ B beschrieben. So spaltet die virale Serinprotease NS3/4A das Adapterprotein TRIF und inhibiert darüber die poly(I:C)-induzierte und TLR3-vermittelte NF- κ B-Aktivierung (Li *et al.*, 2005). Für Paramyxoviren ist mit dem V-Protein ebenfalls ein Virulenzfaktor beschrieben. Für dieses Nichtstrukturprotein ist für verschiedene Mitglieder dieser Virusfamilie die Interaktion mit MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*), das wie RIG-I zu den RLRs gehört, gezeigt. In Zellen, die MDA5 überexprimieren, war die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF-3 sowie die IFN-Expression durch die gleichzeitige Überexpression des V-Proteins inhibiert (Andrejeva *et al.*, 2004). Das SH-Protein ist ein weiteres von Paramyxoviren kodiertes Protein, für das ein Eingreifen in die angeborene Immunantwort bekannt ist. Mittels eines Reporterassays wurde für das SH-Protein von MuV sowie das von PIV5, RSV und JPV die Reduktion der TNF α -vermittelten NF- κ B-Aktivierung in SH-transfizierten Zellen gezeigt (Fuentes *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2006; Woznik, 2012; Xu *et al.*, 2011). Dass das MuV SH-Protein nicht nur die durch den TNFR1-vermittelte Aktivierung von NF- κ B inhibiert, sondern auch in die poly(I:C)-, einem synthetischen dsRNA-Analogen, induzierte Aktivierung eingreift, zeigten Untersuchungen in SH-transfizierten 293G Zellen (Woznik, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde nun aufgrund dieser Befunde der Einfluss des MuV SH-Proteins auf die TNF α -, IL-1 β -, poly(I:C)-, Pam3CSK4 (ein synthetisches Lipoprotein)-, und LPS-vermittelte NF- κ B-Aktivierung mittels eines Luciferase Reporterassays näher untersucht. NF- κ B ließ

sich in den verwendeten Zelllinien 293G und A549 nicht durch die Stimulation mit allen Reagenzien aktivieren. So zeigten 293G Zellen eine Aktivierung von NF- κ B lediglich nach Behandlung mit TNF α und poly(I:C), während A549 Zellen nur auf die Stimulation mit TNF α oder IL-1 β und verglichen mit diesen Zytokinen in sehr geringem Ausmaß auf Pam3CSK4 reagierten. Für alle Stimuli, die in der jeweiligen Zelllinie zur NF- κ B-Aktivierung führten, konnte für das transfizierte SH-Protein eine Reduktion der Aktivierung des Transkriptionsfaktors um etwa 60 % detektiert werden, wobei diese mit Ausnahme von Pam3CSK4 signifikant war (Abb. 17). Damit bestätigen die Befunde dieser Arbeit zum einen den Einfluss des SH-Proteins auf die TNFR1- und TLR3-vermittelte NF- κ B-Aktivierung. Darüber hinaus wird der bisherige Kenntnisstand an Signalwegen, die vom SH-Protein beeinflusst werden, erweitert, indem gezeigt wurde, dass auch die IL-1R1-vermittelte Aktivierung durch das SH-Protein reduziert wird. Die Beobachtung, dass das SH-Protein die Aktivierung mittels dieser Rezeptoren jeweils um den gleichen Faktor inhibiert, lässt auf einen ähnlichen Mechanismus der SH-vermittelten NF- κ B-Unterdrückung schließen. Da keine Unterschiede hinsichtlich der Reduktion der NF- κ B-Aktivierung nach poly(I:C)-Stimulation zwischen dem SH-Protein des Impfstamms Jeryl Lynn, der dem Genotyp A zuzuordnen ist, und dem SH-Protein eines Patientenisolats des Genotyps G bestanden (Abb. 20), ist eine vom Genotyp abhängige Regulation nicht zu vermuten.

Dass sich unterschiedliche Zelllinien in ihrer Antwort auf verschiedene Stimuli unterscheiden können, zeigen auch andere Studien (Barbour *et al.*, 1998; Schuerer-Maly *et al.*, 1994; Schulz *et al.*, 2002). Diese Varianz kann aus spezifischen Defekten in den verschiedenen Signalwegen sowie aus Unterschieden in der Expression zellulärer Rezeptoren resultieren. Für 293 Zellen muss die zusätzliche Bereitstellung durch Transfektion von IL-1R1, TLR2 und TLR4 für die effiziente Antwort auf IL-1 β , bakterielle Lipoproteine bzw. LPS erfolgen (Aliprantis *et al.*, 1999; Chow *et al.*, 1999; Croston *et al.*, 1995). Ebenso zeigten A549 Zellen in einer Studie keine Aktivierung nach der alleinigen Zugabe von poly(I:C) zum Zellkulturmedium (Tanabe *et al.*, 2003). Auch unterschiedliche Stämme der gleichen Zelllinie können sich aufgrund von Variationen bei der Expression von Rezeptoren in ihrer Fähigkeit auf bestimmte Stimuli zu reagieren unterscheiden (Chow *et al.*, 1999). So wurden 293G Zellen in älteren Studien als defizient für die Expression von TLR3 beschrieben, wogegen neuere Publikationen zeigen, dass diese Zelllinie TLR3-spezifische mRNA exprimiert und positiv für die intrazelluläre Detektion dieses Rezeptors ist (Rudd *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2012). Bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Klon der Zelllinie 293G wurde mittels Western Blot die Expression von TLR3 bestätigt (Abb. 19). Da außerdem die alleinige Zugabe von poly(I:C) zum Zellkulturmedium ausreichend war, um NF- κ B zu aktivieren, ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit verwendeten 293G Zellen TLR3 auf der Zelloberfläche exprimieren. Abgesehen von TLR3 bindet und aktiviert poly(I:C) auch MDA5 (Takeuchi & Akira, 2010). Da diese Helikase aber

ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert ist, ist nicht davon auszugehen, dass die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Stimulation mit poly(I:C) zur NF- κ B-Aktivierung mittels MDA5 geführt hat. Ob das SH-Protein auch in die TLR1/2- und die TLR4-vermittelte Aktivierung von NF- κ B eingreift, muss in weiterführenden Untersuchungen mit dafür geeigneten Zelllinien analysiert werden. Zumindest für den TLR1/2-Signalweg kann ein Einfluss vermutet werden, da auch in Pam3CSK4-stimulierten Zellen eine, wenn auch nicht statistisch signifikante, ca. 60 %-ige Reduktion der NF- κ B-Aktivierung beobachtet wurde.

Alle bisher veröffentlichten Studien haben den Einfluss des SH-Proteins auf die Aktivierung von NF- κ B in Zellen untersucht, in denen das SH-Protein durch Transfektion überexprimiert wurde. Um zu analysieren, ob der beobachtete Effekt auch in MuV-infizierten Zellen auftritt, in denen die Expression des SH-Proteins abhängig von der Replikation des Virus ist und das Protein in einem geringeren Maß als in transfizierten Zellen exprimiert wird, wurden A549 Zellen mit rMuV-SH und rMuV-SHstop infiziert. Da die NF- κ B-Aktivierung in rMuV-SH- im Vergleich zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen um etwa 60 % reduziert war (Abb. 18), wurde mittels dieses Versuchs zum ersten Mal auch im Kontext einer Virusinfektion gezeigt, dass aufgrund des Vorhandenseins des SH-Proteins die Aktivierung von NF- κ B nach Stimulation mit TNF α oder IL-1 β reduziert wurde.

5.3.2 Beeinflussung von Komponenten des NF- κ B-Signalwegs

Der Einfluss des SH-Proteins auf den NF- κ B-Signalweg lässt sich nicht nur mittels der Analyse der Aktivierung des Transkriptionsfaktors untersuchen, sondern auch durch die Analyse von Modifikationen der NF- κ B-Untereinheiten sowie weiterer Proteine, die an der Aktivierung beteiligt sind. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in 293G Zellen solitär exprimiertes SH-Protein die Phosphorylierung der Kinasen IKK α an Ser176/180 und IKK β an Ser177/181 sowie der NF- κ B-Untereinheit p65 an Ser536 reduziert (Woznik, 2012). Im kanonischen Signalweg katalysiert IKK β die Phosphorylierung von I κ B α an Ser32, induziert dadurch den Abbau dieses Inhibitors und ermöglicht die Translokation von p65 in den Zellkern (Verstrepen *et al.*, 2008). Die Phosphorylierung von p65 an Ser536 wird ebenso von IKK β katalysiert (Viatour *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde in rMuV-infizierten A549 und THP-1 Zellen im Verlauf der Infektion eine Zunahme der IKK β (Ser177/181)-, I κ B α (Ser32)- und p65(Ser536)-Phosphorylierung beobachtet (Abb. 15 und 29), was auf die Aktivierung von NF- κ B schließen lässt. Zudem wurde der in transfizierten Zellen erhaltene Befund in rMuV-infizierten Zellen bestätigt, da auch hier das Vorhandensein des SH-Proteins in einer Reduktion der IKK β (Ser177/181)- und p65(Ser536)-Phosphorylierung resultierte (Abb. 15A und C und Abb. 29). Die p65(Ser536)-Phosphorylierung wurde zum Zeitpunkt 20 h nach Infektion sowohl in A549 als auch in THP-1 Zellen untersucht, wobei sich bei beiden Zelllinien eine vergleichbare

Reduktion aufgrund des Vorhandenseins des SH-Proteins beobachten ließ. Dies lässt eine ähnliche Kinetik der Beeinflussung der NF- κ B-Aktivierung in diesen Zelllinien vermuten. Auch die Phosphorylierung von I κ B α an Ser32 wurde durch das während der Infektion exprimierte SH-Protein reduziert (Abb. 15B). Für andere Paramyxoviren wie RSV wurde ebenfalls die virusinduzierte Aktivierung von NF- κ B in A549 Zellen mittels der Hochregulation der I κ B α (Ser32)- und p65(Ser536)-Phosphorylierung gezeigt (Fink *et al.*, 2008; Yoboua *et al.*, 2010). Vergleichbar mit den Befunden dieser Arbeit wurde auch für das hMPV SH-Protein die Reduktion der p65(Ser536)-Phosphorylierung in infizierten A549 Zellen beobachtet (Bao *et al.*, 2008). In Bezug auf die Auswirkung der p65(Ser536)-Phosphorylierung für die NF- κ B regulierte Genexpression liegen widersprüchliche Befunde vor. Dass die Phosphorylierung an der Position Ser536 die NF- κ B-regulierte Genexpression *in vitro* erhöht, zeigen mehrere Studien (O'Mahony *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2003). Dagegen zeigten Pradere *et al.*, dass *in vivo* die Phosphorylierung von p65 zu einer Reduktion der Expression von NF- κ B-abhängigen Genen führt (Pradere *et al.*, 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte als Folge der rMuV-induzierten p65(Ser536)-Phosphorylierung (Abb. 15C und 29) und damit der Aktivierung von NF- κ B (Abb. 18) ein Anstieg der Expression von NF- κ B-regulierten Zytokinen (Abb. 30 und 32) beobachtet werden. Daher ist *in vitro* für die MuV-induzierte p65(Ser536)-Phosphorylierung die Erhöhung des Transaktivierungspotenzials von p65 anzunehmen. Ob diese Vermutung auch *in vivo* bestätigt werden kann, müssen entsprechende Untersuchungen zeigen, die aber in Ermangelung eines geeigneten Tiermodells ausstehen.

Neben der Phosphorylierung von Komponenten des NF- κ B-Signalwegs kann auch die Translokation von p65 in den Zellkern zur Analyse der NF- κ B-Aktivierung herangezogen werden, wie es unter anderem für die Proteine vIFR3 von KSHV und C4 von VACV beschrieben ist (Ember *et al.*, 2012; Seo *et al.*, 2004). In transfizierten 293G Zellen führte das MuV SH-Protein zur Reduktion der p65 Translokation (Woznik, 2012). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen nun, dass auch in rMuV-infizierten A549 Zellen die Translokation von p65 in der Gegenwart des SH-Proteins reduziert wurde. Eine Quantifizierung zeigte erstmals die signifikante Reduktion der p65 Translokation durch das SH-Protein um 84 % (Abb. 16). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den bisherigen Studien zur Analyse des Einflusses des Paramyxovirus SH-Proteins auf die p65 Translokation (Fuentes *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2011). Diese Untersuchungen wurden jedoch mit einem rekombinanten Virus, bei dem das gesamte SH-Gen deletiert wurde, durchgeführt. Daher kann durch die Befunde dieser Studien nicht geklärt werden, ob das Fehlen des SH-Proteins oder das des gesamten SH-Gens für die Reduktion der p65 Translokation verantwortlich ist. Die Verwendung von rMuV-SHstop in der vorliegenden Arbeit ermöglicht dagegen die Aussage, dass tatsächlich die verhinderte Expression des SH-Proteins und nicht die veränderte Genomstruktur

für die Reduktion der p65 Translokation (Abb. 16), der IKK β (Ser177/181)-, I κ B α (Ser32)- und p65(Ser536)-Phosphorylierung (Abb. 15), der NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit TNF α oder IL-1 β (Abb. 18) sowie der Expression dieser Zytokine (Abb. 30 und 32) verantwortlich ist. Aufgrund dieser Befunde kann für das untersuchte *in vitro* Modell die Funktion des MuV SH-Proteins als Virulenzfaktor angekommen werden.

5.4 Bedeutung der Interaktion des MuV SH-Proteins mit zellulären Proteinen für die Regulation der NF- κ B-Aktivierung

Die Position im Signalweg, an der das SH-Protein eingreift, wurde in früheren Studien bisher nicht untersucht. Diese zu bestimmen und damit den Mechanismus der Inhibierung näher zu charakterisieren, war daher ein Ziel der vorliegenden Arbeit. Der Befund, dass nicht nur die Aktivierung mittels des TNFR1-, sondern auch des IL-1R1- und des TLR3-Signalwegs in gleichem Maße beeinträchtigt ist (Abb. 17 und 18), kann dadurch zustande kommen, dass das SH-Protein entweder ein in allen Signalwegen beteiligtes Protein angreift oder an unterschiedlichen Stellen gleichermaßen eingreifen kann. Für andere Viren wurde bereits gezeigt, dass mittels der Überexpression verschiedener, an der Aktivierung von NF- κ B beteiligter Proteine, die Angriffsposition viraler Proteine eingegrenzt werden kann (DiPerna *et al.*, 2004; Ember *et al.*, 2012). Da in dieser Arbeit im Reporterassay nur die NF- κ B-Aktivierung durch MyD88 aber nicht durch TRAF2, TRAF6, TAK1 und IKK β durch das SH-Protein beeinflusst wurde (Abb. 21), kann die Position auf unterhalb oder auf gleicher Höhe von MyD88 aber oberhalb von TRAF2, TRAF6, TAK1 und IKK β eingegrenzt werden. Somit handelt es sich nicht um ein gemeinsames, in allen Signalwegen auftretendes Protein. Von den untersuchten Proteinen wird MyD88 nach Rezeptoraktivierung als erstes an den Rezeptor rekrutiert. TRAF2 und TRAF6 folgen später, sind aber ebenfalls Teil des jeweiligen Rezeptor-Adapterproteinkomplexes, während TAK1 und IKK β zu den final aktivierten Komponenten vor der eigentlichen Aktivierung des Transkriptionsfaktors gehören. Das Eingreifen des SH-Proteins auf der Höhe der initialen Rezeptorkomplexe von TNFR1, IL-1R1 und TLR3 ist aufgrund dieser Daten zu vermuten.

Viele Proteine, die als Inhibitoren von NF- κ B fungieren, sind physikalisch mit der Komponente assoziiert, die sie inhibieren, (Akira *et al.*, 2001; DiPerna *et al.*, 2004; Takeuchi & Akira, 2002). Das MuV SH-Protein interagiert mit den endogen exprimierten Proteinen TNFR1, TLR3, RIP1 und IRAK1, wie die Analyse mittels Co-Immünpräzipitation in SH-transfizierten sowie rMuV-infizierten Zellen zeigt (Abb. 22 und 23). Die Fällung von TLR3 durch das SH-Protein konnte nur in transfizierten Zellen gezeigt werden (Abb. 22). Die Bande für den mittels des überexprimierten SH-Proteins präzipitierten TLR3 war nur nach langer Belichtungszeit zu detektieren. Daher ist anzunehmen, dass die Proteinmenge des während der Infektion

exprimierten SH-Proteins nicht ausreichend war, um eine im Western Blot nachweisbare Bande für den TLR3 zu erzeugen. Der Befund, dass das SH-Protein mit dem TNFR1 interagiert, bestätigt ein früheres, im Transfektionskontext erhaltenes Ergebnis der Arbeitsgruppe Mankertz (Bergmann, 2011). Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse zum ersten Mal die Interaktion mit den Proteinen TLR3, RIP1 und IRAK1 und bestätigen die gefundenen Interaktionen auch im Kontext einer Infektion. RIP1 fungiert als wichtiges regulatorisches Adapterprotein, unter anderem in der TNFR1- und TLR3-vermittelten NF- κ B-Aktivierung, das zu den aktivierten Rezeptoren rekrutiert wird (Ofengeim & Yuan, 2013), während IRAK1 als früh rekrutiertes Adapterprotein zum aktivierten IL-1R1 sowie weiteren Rezeptoren rekrutiert wird (Cao *et al.*, 1996). Ob TNFR1, TLR3, RIP1 und IRAK1 direkt an das SH-Protein binden oder ob die gemeinsame Präzipitation mit dem SH-Protein aufgrund der Interaktion des SH-Proteins mit anderen Proteinen des Rezeptorkomplexes erfolgte, kann aus den Daten der vorliegenden Arbeit nicht geschlossen werden. Aufgrund der Beeinflussung der TNF α -, poly(I:C)- und IL-1 β -induzierten NF- κ B-Aktivierung ist eine Interaktion des SH-Proteins mit den Rezeptorkomplexen von TNFR1, TLR3 und IL-1R1 in der Plasmamembran anzunehmen, die zur Inhibierung der nachgeschalteten Signalübertragung und NF- κ B-Aktivierung führt. Die Detektion des SH-Proteins in der Membran infizierten Zellen unterstützt diese Vermutung (Abb. 14).

Um eine direkte Bindung zwischen dem SH-Protein und einem weiteren Protein zu untersuchen, müsste man beide Proteine außerhalb des zellulären Kontexts betrachten. Möglich wäre die Verwendung des *Yeast two-hybrid*-Systems (Fields & Song, 1989) oder der Oberflächenplasmonresonanz mit anschließender Massenspektrometrie (Madeira *et al.*, 2011). Mittels des *Yeast two-hybrid*-Systems wurden bereits in der Arbeitsgruppe Mankertz Interaktionspartner des SH-Proteins identifiziert (Woznik *et al.*, 2010). Die Überprüfung der direkten Bindung des SH-Proteins mit TNFR1, TLR3, RIP1 und IRAK1 unter Verwendung dieses Systems konnte aus zeitlichen Gründen in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden.

Zelluläre Rezeptoren oder frühe Adapterproteine werden auch von Proteinen anderer Viren gebunden, um die NF- κ B-Aktivierung zu unterdrücken. Die von Adenoviren kodierte Membranproteine RID α und RID β bilden einen Komplex in der Plasmamembran, wodurch sie die Rekrutierung der Adapterproteine zum TNFR1 und damit die Zusammenlagerung des TNFR1-Signalkomplexes inhibieren. (Chin & Horwitz, 2006; Fessler *et al.*, 2004). Die Fähigkeit die NF- κ B-Aktivierung mittels des Adressierens von verschiedenen PRRs zu unterdrücken, zeigt auch das Protein M45 des murinen CMV (mCMV), das ebenfalls mit RIP1 interagiert (Mack *et al.*, 2008). Auch das Protein A46R von VACV bindet mittels seiner TIR-Domäne an die TIR-Domäne enthaltenen Adapterproteine MyD88, Mal, TRIF und TRAM und inhibiert darüber die Interaktionen dieser Proteine mit verschiedenen TLRs (Stack *et al.*, 2005). Ob es auch für das MuV SH-Protein ein generelles Erkennungsmotiv für die Interaktion mit den TNFR1-, TLR3- und

IL-1R1-Rezeptorkomplexen gibt und welche Bereiche und AS des SH-Proteins für die Bindung verantwortlich sind, müssen weiterführende Untersuchungen zeigen.

5.5 Bedeutung des MuV SH-Proteins für die Genexpression und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine

Die Inhibierung der Signalwege, die zur Aktivierung von NF- κ B führen, stellt wie bereits beschrieben eine Abwehrstrategie dar, mittels derer Viren der Immunantwort des Wirts entgegen wirken. Die unterdrückte Expression von NF- κ B-regulierten, antiviral wirkenden Zytokinen und Chemokinen ermöglicht vermutlich den Viren länger im infizierten Organismus zu verbleiben und verschafft ihnen mehr Zeit zum Replizieren. Beispielsweise führt die Expression der Proteine E3 von VACV, ICP27 des Herpes simplex-Virus 1 sowie NS1 von IAV aufgrund der Inhibition der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und IRF-3 zu einer Herabregulierung von TNF α , IFNs und ILs auf mRNA- und Proteinebene (Ferko *et al.*, 2004; Hale *et al.*, 2010; Melchjorsen *et al.*, 2006; Myskiw *et al.*, 2009). Daneben gibt es aber auch Viren, welche die Aktivierung von NF- κ B induzieren, um ihre eigene Genexpression zu steigern und dadurch die Infektion des Wirtsorganismus zu fördern. Aufgrund der Aufnahme von NF- κ B-DNA-Bindestellen in die Promotoren von Viren, zum Beispiel in das LTR (*long terminal repeat*) von HIV-1, führt die Aktivierung von NF- κ B in HIV-1-infizierten T-Zellen zu einer Steigerung der Transkription viraler Gene (Hiscott *et al.*, 2006). Auch können Viren NF- κ B während verschiedener Phasen des viralen Lebenszyklus je nach Bedarf sowohl aktivieren als auch unterdrücken, was besonders für onkogene Viren beschrieben ist (de Oliveira *et al.*, 2010; Sun & Cesarman, 2011).

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen für MuV die virusinduzierte Hochregulation der Expression von TNF α und IL-1 β auf mRNA- und Proteinebene in THP-1 Makrophagen ab 20 h nach Infektion. Dabei fällt auf, dass die mRNA-Expression und die Freisetzung von TNF α durch die Virusinfektion deutlich stärker hochreguliert sind als die von IL-1 β (Abb. 30 und 32). Zudem zeigt die IL-1 β -Freisetzung im Infektionsverlauf nur eine sehr geringe Steigerung. Die einzelnen Experimente zeigten allerdings große Unterschiede in der Höhe der gemessenen Signale sowie der Zunahme des Unterschieds zu nicht-infizierten Zellen, was in einer großen Standardabweichung resultierte (Abb. 32C). Im Verlauf der Infektion kommt es zunächst zu einer Aktivierung der p65(Ser536)-Phosphorylierung, die der Aktivierung von NF- κ B vorausgeht, während die Expression der IL-1 β -Proform erst zu einem späteren Zeitpunkt beobachtet wurde (Abb. 29 und 31), was der erwarteten zeitliche Abfolge entspricht. Insbesondere zeigen die Daten dieser Arbeit die Auswirkung der SH-vermittelten Reduktion der NF- κ B-Aktivierung auf die Immunantwort, da die Expression von TNF α und IL-1 β sowohl auf

mRNA- als auch auf Proteinebene in infizierten THP-1 Makrophagen durch das Vorhandensein des SH-Proteins reduziert wird (Abb. 30 und 32). Dabei ist das Maß der Reduktion auf mRNA-Ebene für beide Zytokine ähnlich und erreicht 36 h nach Infektion mit ca. 60 % das Maximum der Reduktion (Abb. 30B und D). Die Höhe der Reduktion liegt damit in einem ähnlichen Bereich wie die Reduktion der mittels Reporterassays analysierten NF- κ B-Aktivierung in A549 und 293G Zellen (Abb. 17 und 18). Die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs erfolgt wie nach den Ergebnissen dieser Arbeit zu vermuten durch die Interaktion des SH-Proteins mit Rezeptorkomplexen an der Plasmamembran (Abb. 22 und 23). Deshalb ist anzunehmen, dass die Aktivierung von NF- κ B, die Expression der mRNA der Zytokin-Proformen sowie die Freisetzung der maturierten Zytokine durch das SH-Protein jeweils um den gleichen Faktor reduziert sind, was für TNF α auch zutrifft. Interessanterweise ist dagegen die Freisetzung von IL-1 β 36 h nach Infektion lediglich um ca. 30 % reduziert, während die Expression der mRNA und der Proform auf Proteinebene zum gleichen Zeitpunkt um ca. 60 % reduziert wird (Abb. 30D, 31B und 32D). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass zwar die Genexpression der beiden Zytokine durch den gleichen, NF- κ B-vermittelten Mechanismus reguliert ist (Pahl, 1999), die effektive Freisetzung des maturierten IL-1 β im Gegensatz zu TNF α jedoch zusätzlich die Aktivierung des Inflammasoms und der Caspase-1 erfordert. Tatsächlich konnte in einem Caspase-1-Aktivitätsassay keine eindeutige Caspase-1-Aktivierung in MuV-infizierten THP-1 Zellen nachgewiesen werden (Schwenke, 2017), was auch einen Defekt in der Caspase-1-regulierten Proteolyse der Proform in die maturierte Form von IL-1 β vermuten lässt. Dieser Befund war unerwartet, da die Analyse von MuV-infizierten A549 Zellen eine deutliche Hochregulation der Caspase-1-mRNA zeigte (Thrun, 2013) und die Aktivierung von Caspase-1 nach MuV-Infektion auch für die Zelllinie THP-1 vermuten ließ. THP-1 Zellen werden häufig für Studien zur Immunmodulation verwendet (Chanput *et al.*, 2014), auch der Nachweis der Inflammasom-Aktivierung nach Infektion dieser Zellen mit MV oder HCV wurde bereits erbracht (Komune *et al.*, 2011; Negash *et al.*, 2013; Shrivastava *et al.*, 2013). Auch lassen sich THP-1 Makrophagen ähnlich gut wie die Zelllinie A549 mit MuV infizieren (Abb. 12A, 13A, 26B und 27B). Ein Defekt in der Aktivierung des Inflammasoms in den verwendeten THP-1 Zellen könnte eine Erklärung für die ineffektive IL-1 β -Freisetzung sein. Dennoch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit die eindeutige Reduktion der IL-1 β -Freisetzung in der Anwesenheit des SH-Proteins. Verschiedene Studien zeigen für IL-1 β auch eine von Caspase-1 unabhängige proteolytische Spaltung durch andere Caspasen, Serinproteasen oder Matrix-Metalloproteasen (Guma *et al.*, 2009; Miwa *et al.*, 1998; Netea *et al.*, 2010; Schonbeck *et al.*, 1998). Ein solcher Caspase-1-unabhängiger Mechanismus kann auch in den untersuchten Zellen zur Freisetzung von IL-1 β beigetragen haben. Eine mögliche Beeinflussung dieses alternativen Mechanismus durch das SH-Protein auf bisher unbekannte Weise ist nicht auszuschließen, auch da 12 h nach Infektion die IL-1 β -

Freisetzung in rMuV-SH- im Vergleich zu rMuV-SHstop-infizierten Zellen hochreguliert war. Ein möglicher Einfluss des SH-Proteins auf die Inflammasom- und Caspase-1-Aktivierung sollte in weiterführenden Experimenten in geeigneten Zellen untersucht werden.

Aufgrund des sehr ähnlichen Regulationsmechanismus von IL-1 β und IL-18 wurde auch für IL-18 eine vermehrte Expression und Freisetzung nach MuV-Infektion von THP-1 Makrophagen erwartet. Allerdings konnte in rMuV-infizierten Zellen weder auf mRNA-Ebene eine hochregulierte Genexpression beobachtet werden (Abb. 30E), noch wurde die Freisetzung dieses Zytokins im Zellkulturüberstand rMuV-infizierter Zellen detektiert (Kap. 4.3.5). Dass eine Virus-induzierte Freisetzung von IL-1 β häufig mit einer Freisetzung von IL-18 einhergeht, zeigt die Infektion mit IAV, dem Sendai-Virus oder dem Japanischen-Enzephalitis-Virus (Ichinohe *et al.*, 2010; Kaushik *et al.*, 2012; Pirhonen *et al.*, 2001; Sareneva *et al.*, 1998). Allerdings lassen einige Studien darauf schließen, dass die Genexpression von IL-1 β und IL-18 trotz der gemeinsamen Abhängigkeit der Transkription von NF- κ B auch unterschiedlich reguliert sein kann. Während IL-1 β nach Virusinfektion oder Stimulation mit LPS auf mRNA-Ebene und Ebene der Proteinproform hochreguliert ist, zeigt IL-18 keine Regulation, wird aber bereits in unbehandelten Zellen konstitutiv exprimiert (Kaushik *et al.*, 2012; Pirhonen *et al.*, 2001; Puren *et al.*, 1999). Dennoch kann eine Virusinfektion auch zusätzlich zur Hochregulation der IL-18-mRNA führen (McGuinness *et al.*, 2000). Die Vermutung, dass IL-1 β und IL-18 unterschiedlich reguliert werden, wird auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt, da im Gegensatz zu IL-1 β die Genexpression von IL-18 in rMuV-infizierten THP-1 Zellen genauso wie in nicht-infizierten Zellen reguliert war (Abb. 30C und E). Die Frage, ob eine konstitutive Expression der IL-18-mRNA auch in den untersuchten THP-1 Makrophagen vorliegt, kann auf der Grundlage der durchgeführten Experimente nicht beantwortet werden, auch da der verwendete Antikörper zur Analyse der IL-18-Proform mittels Western Blot keine eindeutig zuzuordnenden Signale zeigte. Aufgrund des vermuteten Defekts der verwendeten THP-1 Zellen bezüglich der Aktivierung des Inflammasoms, der auch für das Ausbleiben einer möglichen Freisetzung von IL-18 nach MuV-Infektion verantwortlich sein könnte, müssen die gefundenen Unterschiede bei der Regulation der Zytokine nach MuV-Infektion in weiterführenden Studien überprüft werden, z. B. mit einem anderen Klon der Zelllinie, mit bestätigter Caspase-1-Aktivierung oder einer anderen, geeigneten Zelllinie. Der Einfluss des SH-Proteins auf die Freisetzung von IL-18 wurde bisher in früheren Studien noch nicht untersucht. Auch allgemein ist über die Freisetzung dieses Zytokins nach Paramyxovirus-Infektion nur wenig bekannt. Lediglich für die RSV-induzierte Bronchiolitis bei Kleinkindern wurde die erhöhte Detektion von IL-18-positiven Zellen beobachtet (van Benten *et al.*, 2003). Der Einfluss des SH-Proteins auf die Freisetzung von IL-1 β ist dagegen besser untersucht. So wurde für das RSV SH-Protein beobachtet, dass es die Freisetzung von IL-1 β *in vitro* und *in vivo* reduziert (Russell *et al.*, 2015;

Taylor *et al.*, 2014). Die in diesen Studien beobachteten Effekte sind aber aufgrund der Verwendung von Viren mit einer Deletion des *SH*-Gens nicht eindeutig auf das Fehlen des SH-Proteins zurückzuführen (siehe Kap. 5.1). Dass das SH-Protein von RSV statt zu einer Reduktion zu einer erhöhten IL-1 β -Freisetzung führt, wird dagegen von Triantafilou *et al.* postuliert, die jedoch nur einen Zeitpunkt untersucht haben (Triantafilou *et al.*, 2013). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen dagegen mittels unterschiedlicher Methoden und zu verschiedenen Zeitpunkten zum ersten Mal eine eindeutige Reduktion der IL-1 β -Expression durch das MuV SH-Protein (Abb. 30D, 31 und 32D).

Die erhöhte Freisetzung von TNF α nach Infektion mit einem SH-defizienten Virus im Vergleich zur Infektion mit dem Wildtypvirus wurde neben MuV bereits für die Paramyxoviren RSV, PIV5, hMPV und JPV *in vitro* und *in vivo* gezeigt (Bao *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2011), allerdings wieder unter Verwendung von Viren mit Deletion des *SH*-Gens. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen nun eindeutig, dass die verhinderte Expression des MuV SH-Proteins in einer erhöhten Freisetzung von TNF α resultiert und daher tatsächlich das MuV SH-Protein die TNF α -Freisetzung reduziert (Abb. 32A und B).

Neben der Analyse der Zytokinfreisetzung wurde in mehreren Studien auch die Analyse der Apoptose herangezogen, um die Auswirkung der durch das SH-Protein reduzierten NF- κ B-Aktivierung zu untersuchen. NF- κ B ist entscheidend daran beteiligt, ob in Zellen Apoptose ausgelöst wird. Die Aktivierung von NF- κ B kann dabei je nach Zelllinie, Stimulus und zahlreichen weiteren regulatorischen Mechanismen zu einer Förderung oder Inhibierung der Apoptose führen (Barkett & Gilmore, 1999; Karin & Lin, 2002; Van Antwerp *et al.*, 1998). Studien zu MuV, RSV, PIV5 und JPV zeigen eine erhöhte Induktion der Apoptose nach Infektion mit einem SH-defizienten Virus im Vergleich zum Wildtypvirus (He *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2011). Aber auch hier muss beachtet werden, dass die Studien unter Verwendung eines Virus mit Deletion des *SH*-Gens durchgeführt wurden. Um den beobachteten Effekt eindeutig auf die unterdrückte Expression des SH-Proteins zurückführen zu können, kann die Apoptose nach Infektion mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Viren analysiert werden. Eine durch das SH-Protein reduzierte Apoptose infizierter Zellen erscheint vorteilhaft für die Dauer der Virusreplikation in der infizierten Zelle und der Ausbreitung der Infektion im Organismus. Da unterschiedliche Studien für verschiedene *SH*-kodierende Paramyxoviren vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der durch SH-gehemmten Zytokinfreisetzung sowie der Apoptoseinduktion zeigen, wird die Vermutung bekräftigt, dass das SH-Protein generell das Überleben von Paramyxoviren in infizierten Zellen aufgrund eines ähnlichen Mechanismus fördert.

5.6 Eingriff des SH-Proteins in weitere zelluläre Prozesse

RNA-Viren sind in ihrer Genomgröße beschränkt und kodieren daher häufig für virale Proteine, die mehrere Funktionen ausüben können, wie beispielsweise das NS1-Protein von IAV. Neben der Interaktion mit RIG-I und PKR, durch welche die Immunantwort des Wirts aufgrund der Inhibierung des IFN-Signalwegs angegriffen wird, interagiert NS1 mit verschiedenen weiteren Proteinen, um etwa die Translation viraler mRNAs zu fördern, die Prozessierung zellulärer mRNAs jedoch zu hemmen (Hale *et al.*, 2008; Marc, 2014).

Neben den in dieser Arbeit untersuchten Interaktionen des MuV SH-Proteins mit den TNFR1-, IL-1R1- und TLR3-Rezeptorkomplexen, sind auch für das SH-Protein weitere Interaktionspartner bekannt, die zusätzliche Funktionen dieses Proteins vermuten lassen.

So bindet das MuV SH-Protein auch an das zelluläre Protein A1Up (*ataxin-1 ubiquitin-like interacting protein*), das zur Familie der Ubiquiline gehört (Woznik *et al.*, 2010). Diese sind in den Abbau von Proteinen involviert, da sie mittels ihrer UBL-Domäne (*ubiquitin-like region*) mit dem 19S-Proteasom interagieren, während ihre UBA-Domäne (*ubiquitin-associated domain*) für die Interaktion mit polyubiquitinierten Proteinen verantwortlich ist (Lee & Brown, 2012; Riley *et al.*, 2004). Für das SH-Protein wurde in der Arbeitsgruppe Mankertz die Bindung an die STI1-Domäne (*stress-inducible heat shock chaperonin-binding motif*) von A1Up gezeigt (Woznik *et al.*, 2010). Auch andere Ubiquiline besitzen eine STI1-Domäne, mit der sie mit Transmembrandomänen von Membranproteinen interagieren können, wie es für Ubiquilin-1 gezeigt ist (Kurlawala *et al.*, 2017). Da durch das Ubiquitinierungsmuster von Proteinen sowohl ihre Aktivierung als auch ihr Abbau reguliert werden können, kommt der Modifikation der Ubiquitinierung eine sehr wichtige Funktion in der Regulation der NF- κ B-Aktivierung zu (Liu & Chen, 2011; Ofengeim & Yuan, 2013). Durch die Interaktion des SH-Proteins mit der STI1-Domäne von A1Up und möglicherweise weiterer Ubiquiline kann das SH-Protein eventuell in Ubiquitinierungsprozesse und die Degradation von Proteinen eingreifen. Dies könnte auch zu einer Herabregulation des NF- κ B-Signalwegs führen.

Ein *Yeast two-hybrid*-Screen hat für das SH-Protein außerdem die Interaktion mit dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPR) 125 gezeigt (Woznik *et al.*, 2010). Dieser Rezeptor wird im Plexus choroideus exprimiert, wobei eine Verletzung des Gehirns zur Hochregulation der GPR125-Expression führt (Pickering *et al.*, 2008). Der Plexus choroideus ist ein verzweigtes Adergeflecht innerhalb der Hirnventrikel, das die Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit bildet. Die Epithelzellen des Plexus choroideus dienen darüber hinaus auch als Barriere zwischen ZNS und Blut, die als Blut-Liquor-Schranke bezeichnet wird und als Eintrittsstelle für Pathogene beschrieben ist. Die durch eindringende Mikroorganismen ausgelösten Infektionen können letztlich zur Entstehung einer Meningitis oder Meningoenzephalitis führen (Schwerk *et al.*, 2015). Dass die Infektion des ZNS mittels des Plexus choroideus erfolgt, wird bereits für

Paramyxoviren wie dem Masernvirus und dem Carninen Staupevirus vermutet (Esolen *et al.*, 1995; Rudd *et al.*, 2006). Aufgrund der Detektion von Virusantigenen im Plexus choroideus in MuV-infizierten Marmosetten, kann auch für MuV, für das das Auftreten von aseptischer Meningitis als eine der häufigsten Komplikationen bekannt ist, die Infektion des ZNS mittels dieser Infektionsroute spekuliert werden (Rubin *et al.*, 2015; Saika *et al.*, 2002). Gemeinsam lassen diese Befunde vermuten, dass die Interaktion des in der Plasmamembran infizierter Zellen nachgewiesenen SH-Proteins mit GPR125 in den Eintritt von MuV ins Gehirn über die Blut-Liquor-Schranke involviert ist und an der Ausbildung von Meningitiden beteiligt sein könnte. Manche Virusstämme, die verschiedenen Genotypen zuzuordnen sind, weisen im Vergleich zu anderen ein sehr hohes Neurovirulenzpotential auf (Saito *et al.*, 1996; Teclé *et al.*, 1998). Verschiedene Studien stellen die erhöhte Neurovirulenz mit Aminosäurevariationen unter anderem im SH- und HN-Gen in Zusammenhang (Kovamees *et al.*, 1990; Rafiefard *et al.*, 2005; Rubin *et al.*, 2003; Teclé *et al.*, 2002). Zwar konnte eine Analyse klinischer Isolate das Auftreten neurologischer Symptome nicht auf die Mutation von einzelnen AS an den prognostizierten Positionen zurückführen (Cui *et al.*, 2013), dennoch könnte das Zusammenspiel mehrerer Mutationen die Neurovirulenz beeinflussen. Die molekularen Ursachen auch bezüglich der Beteiligung des SH-Gens für das Auftreten erhöhter Neurovirulenz sind demnach noch nicht abschließend geklärt.

Viele Viren kodieren für Proteine, die durch Einlagerung in zelluläre Membranen als Viroporine fungieren und zu einer Aktivierung des Inflammasoms führen oder hilfreich für die Ausschleusung neuer Virionen sein können (Hout *et al.*, 2005; Hsu *et al.*, 2010; Ichinohe *et al.*, 2010). Auch für das SH-Protein von RSV ist die Ausbildung von kanalartigen Strukturen durch die Zusammenlagerung zu Pentameren beschrieben (Gan *et al.*, 2008; Gan *et al.*, 2012), welche die Ionenpermeabilität von Membranen erhöhen und die Funktion des RSV SH-Proteins als Viroporin vermuten ließen (Carter *et al.*, 2010). Aufgrund der Co-Lokalisation des SH-Proteins und Inflammasom-Komponenten wurde die Funktion als Viroporin mit der Einflussnahme auf die Immunantwort des Wirts in Zusammenhang gestellt (Triantafilou *et al.*, 2013). Da aber keine direkte Interaktion gezeigt wurde und widersprüchliche Befunde bezüglich des Einflusses des RSV SH-Proteins auf die IL-1 β -Freisetzung vorliegen, sind weitere Studien nötig, um tatsächlich einen direkten Einfluss des SH-Proteins auf die Inflammasom-Aktivierung zu zeigen. Für das MuV SH-Protein wurde eine Funktion als Viroporin bisher noch nicht untersucht. Neben der Expression von Proteinen, die zu einer Aktivierung des Inflammasoms beitragen, können Viren auch gleichzeitig für Proteine kodieren, welche das Inflammasom inhibieren (Cheong *et al.*, 2015; Ichinohe *et al.*, 2010; Stasakova *et al.*, 2005). Dies verdeutlicht, wie komplex die Regulation der Immunantwort durch Viren beeinflusst wird und zeigt, dass sowohl eine Aktivierung des Inflammasoms genauso wie eine Inhibierung vorteilhaft für eine Virusinfektion

sein kann. Zum einen ist die durch die Inflammasomaktivierung ausgelöste Pyroptose und die darauffolgende Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine nötig für die Beseitigung von Pathogenen. Zum anderen kann diese jedoch zu krankhaften Entzündungen führen, welche schädlich für den Wirt, aber förderlich für die Lyse der Zellen und somit der Freisetzung der Pathogene nach erfolgreicher Vermehrung sind (Lupfer & Kanneganti, 2012).

5.7 Modell der Beeinflussung der NF- κ B-Aktivierung durch das MuV SH-Protein

In Abbildung 33 werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammengefasst dargestellt. Es wurde bestätigt, dass die Expression des SH-Proteins zu einer Reduktion der MuV-induzierten Phosphorylierung von IKK β , I κ B α und p65 sowie der Translokation von p65 in den Zellkern führt (rote Pfeile). Dies resultiert in einer reduzierten Genexpression der NF- κ B-kontrollierten Gene von TNF α und IL-1 β , einer verringerten Expression von pro-IL-1 β sowie der verminderten Freisetzung der maturierten Zytokine TNF α und IL-1 β (rote Pfeile). Luciferase Reporterassays zeigten, dass das SH-Protein (rot) die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit TNF α , poly(I:C) und IL-1 β reduziert und diese unterhalb oder auf der Ebene von MyD88 (orange), aber oberhalb von TRAF2, TRAF6, TAK1 und IKK β (blau) in den jeweiligen Signalwegen beeinflusst. Da für das SH-Protein die Interaktion mit TNFR1, TLR3, RIP1 und IRAK1 (grün) gezeigt wurde, lässt sich die Vermutung aufstellen, dass das SH-Protein die NF- κ B-Aktivierung aufgrund der Interaktion mit den TNFR1-, TLR3- und IL-1R1-Rezeptorkomplexen in der Plasmamembran infizierter Zellen inhibiert. Damit wurde die bisherige Kenntnis über die vom SH-Protein beeinflussten Rezeptoren der NF- κ B-Aktivierung um IL-1R1 und TLR3 erweitert. Die Reduktion der Genexpression und Freisetzung der Zytokine TNF α und IL-1 β in der Gegenwart des SH-Proteins zeigt zudem eine direkte Auswirkung der Expression des SH-Proteins auf die angeborene Immunantwort. Dies bekräftigt die Vermutung, dass das SH-Protein die Zeitspanne, die dem Virus für die Replikation und die Verbreitung im infizierten Wirt zur Verfügung steht, durch die Modulation des NF- κ B-Signalwegs verlängern kann und damit als Virulenzfaktor dient.

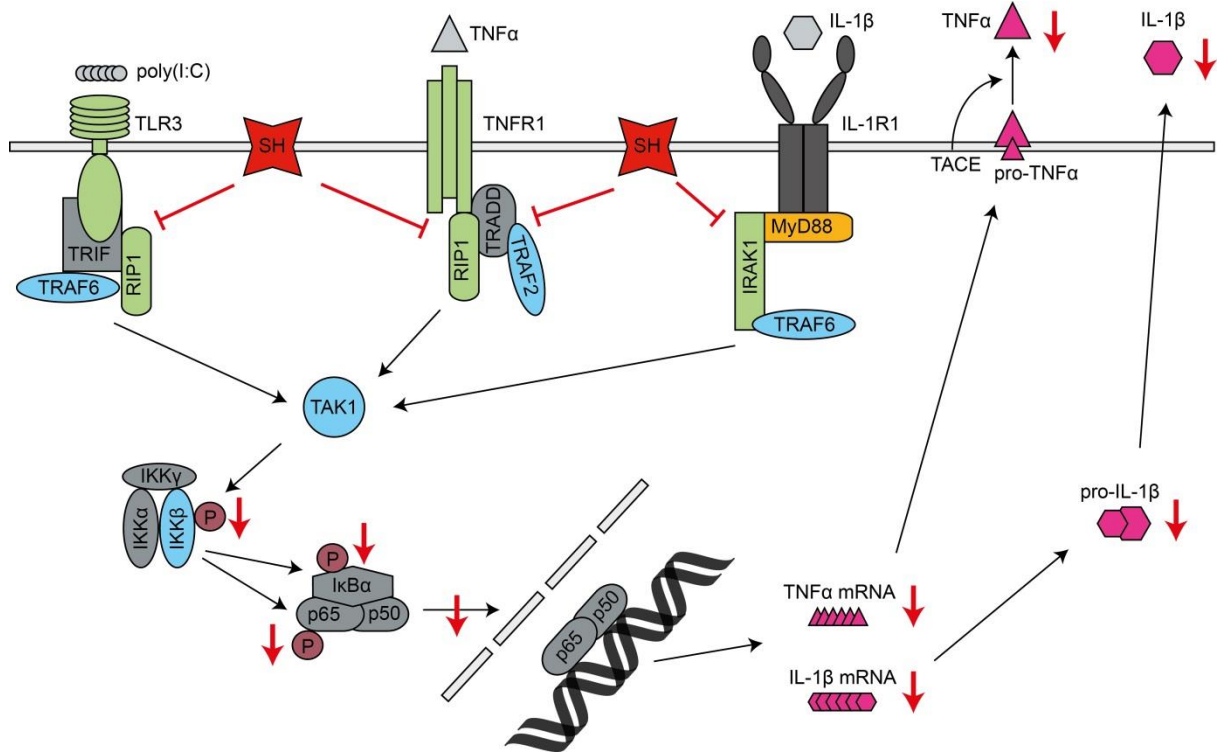


Abbildung 33: Modell der Beeinflussung der NF-κB-Aktivierung durch das MuV SH-Protein.

Das MuV SH-Protein interagiert mit den TNFR1-, TLR3- und IL-1R1-Rezeptorkomplexen. Dies führt zur Reduktion der IKKβ-, IκBα- und p50-Phosphorylierung, der Translokation von p50 in den Zellkern sowie der Expression und Freisetzung der Zytokine TNFα und IL-1β.

6 Zusammenfassung

Wie einige andere Paramyxoviren kodiert auch das Mumpsvirus für ein SH-Protein, dessen Einfluss auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in dieser Arbeit untersucht wurde. Da NF- κ B ein Hauptregulator der angeborenen Immunantwort ist, haben zahlreiche Viren Strategien entwickelt, um die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors zu behindern und damit die Zeit, die ihnen für die Replikation im Wirtsorganismus zur Verfügung steht, zu verlängern. Mit Hilfe rekombinanter Viren kann die Auswirkung eines einzelnen Proteins im Kontext einer Infektion analysiert werden. Allerdings sind bisher alle Studien, welche die Funktion des SH-Proteins beschreiben, auf Grundlage von Viren durchgeführt worden, bei denen das komplette *SH*-Gen deletiert wurde. Da die effiziente Replikation von Paramyxoviren vom Gradienten der viralen mRNAs abhängt, der von der Anzahl und der Reihenfolge der Gene beeinflusst wird, ist eine Auswirkung auf die Virulenz und Pathogenität durch die Deletion eines Gens nicht auszuschließen. In dieser Arbeit wurden daher rMuV untersucht, bei denen die Expression des SH-Proteins durch das Einfügen von drei Stoppkodons in das *SH*-Gen unterdrückt ist oder das SH-Protein durch ein eingefügtes FLAG-Epitop in infizierten Zellen nachgewiesen werden kann. Diese rekombinanten Viren zeigen unabhängig von der Expression des SH-Proteins eine vergleichbare Replikation sowie einen ähnlichen CPE in der Zellkultur. Auch die Expression des N-Proteins wird durch die verhinderte SH-Expression nicht beeinflusst. Zum ersten Mal konnte für das SH-Protein die Orientierung in der Plasmamembran infizierter Zellen als die eines Typ-I-Membranproteins bestimmt werden. Die durch das SH-Protein reduzierte Phosphorylierung von IKK β , I κ B α und p65 in rMuV-infizierten Zellen zeigt, dass für die Hochregulation der NF- κ B-Aktivierung nicht die Veränderung der Genomstruktur, sondern die verhinderte Expression des SH-Proteins verantwortlich ist. Die Analyse der Phosphorylierung der untersuchten Komponenten dient als Indikator für die Aktivierung von NF- κ B, wie auch die Translokation der NF- κ B-Untereinheit p65 in den Zellkern, die ebenso in der Gegenwart des SH-Proteins reduziert ist. Ein entscheidender Schritt für die Aufklärung des Mechanismus dieser Reduktion ist der Befund, dass nicht nur die bereits bekannte TNF α -, sondern auch die poly(I:C)- und IL-1 β -vermittelte NF- κ B-Aktivierung durch die Expression des SH-Proteins um den gleichen Faktor reduziert sind und daher die NF- κ B-Aktivierung durch das SH-Protein nicht nur mittels der Signalübertragung eines einzigen zellulären Rezeptors inhibiert wird. Die Ebene, auf der die Beeinflussung vermittelt wird, wurde in weiteren Experimenten auf die der Rezeptorkomplexe eingeschränkt. Darüber hinaus konnte die Interaktion des SH-Proteins mit den Rezeptoren TNFR1 und TLR3 sowie den früh rekrutierten Adapterproteinen RIP1 und IRAK1 gezeigt werden. Zusammen führen diese Ergebnisse zu der Vermutung, dass das SH-Protein mit den TNFR1-, TLR3- und IL-1R1-Rezeptorkomplexen in der Plasmamembran infizierter Zellen

interagiert und diese Interaktion in der Reduktion der NF- κ B-Aktivierung resultiert. Interessanterweise führt die Unterdrückung der Aktivierung von NF- κ B in dem untersuchten *in vitro* Modell zu einer schlechteren Replikation der rMuV, unabhängig von der Expression des SH-Proteins. Eine direkte Auswirkung der reduzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors auf die Induktion der Immunantwort wurde durch die Reduktion der Genexpression sowie der Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β durch das Vorhandensein des SH-Proteins in rMuV-infizierten Makrophagen gezeigt. Im Gegensatz zu diesen Zytokinen wird weder die Genexpression noch die Freisetzung von IL-18 durch die Infektion mit MuV in der untersuchten Zelllinie induziert.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass dem SH-Protein von MuV die Funktion eines Virulenzfaktors zugesprochen werden kann, der durch die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung für eine verzögerte Immunantwort und damit für eine ausreichende Zeitspanne zur Vervielfältigung der MuV Partikel sorgt.

7 Summary

Similar to several other paramyxoviruses, the mumps virus also encodes for a SH protein. In this work, the impact of SH on the activation of the transcription factor NF- κ B was analyzed. Since NF- κ B is a major regulator of the innate immune response, numerous viruses have developed strategies to interfere with the activation of this transcription factor, thereby prolonging the timespan for replication in the host organism. Using recombinant viruses, the impact of a single protein on this interference can be analyzed in the context of an infection. However, all studies describing the function of the SH protein so far were performed with viruses in which the complete *SH* gene was deleted. Since the efficient replication of paramyxoviruses depends on the gradient of viral mRNAs, which is determined by the number and order of the viral genes, the deletion of a complete gene may affect virulence and pathogenicity. Therefore, in this work rMuVs were analyzed, in which the expression of the SH protein is suppressed by the insertion of three stop codons into the *SH* gene or the SH protein can be detected in infected cells due to an inserted FLAG-epitope. These recombinant viruses exhibit a comparable replication and a similar CPE in tissue culture independent of the expression of SH. The expression of the N protein is also not influenced by the suppressed expression of SH. For the first time, the orientation of the SH protein in the plasma membrane of infected cells was determined as that of a type I membrane protein. SH reduces the phosphorylation of IKK β , I κ B α , and p65 in rMuV-infected cells, showing that not the modification of the genomic structure but the prevented expression of SH is responsible for the upregulation of the NF- κ B pathway. The analysis of the phosphorylation of the examined pathway components serves as an indicator for NF- κ B activation. Likewise the analysis of the translocation of the NF- κ B subunit p65 into the nucleus does, which is as well reduced in the presence of SH. A crucial step in the elucidation of the underlying mechanism is the finding that not only the already known TNF α -, but also the poly(I:C)- and IL-1 β -mediated NF- κ B activation is reduced by the same magnitude due to the expression of SH. Therefore, the activation of NF- κ B by the SH protein is not inhibited via signal transduction of a single but via several cellular receptors. In further experiments, the level at which SH impedes NF- κ B signaling was restricted to the level of the receptor complexes. Moreover, the interaction of SH with the receptors TNFR1 and TLR3, as well as with the early recruited adaptor proteins RIP1 and IRAK1, was shown. Together, these results suggest that the SH protein interacts with the receptor complexes of TNFR1, TLR3, and IL-1R1 in the plasma membrane of infected cells and that this interaction leads to the reduction of the NF- κ B activation. Interestingly, in the analyzed *in vitro* model the repression of the NF- κ B activation results in a weaker replication of rMuVs independent of the expression of SH. A direct impact of the reduced activation of NF- κ B on the induction of immune responses was shown by the

reduction of gene expression and release of the pro-inflammatory cytokines TNF α and IL-1 β in the presence of SH in rMuV-infected macrophages. In contrast, neither the gene expression nor the release of IL-18 is induced due to infection with MuV in the analyzed cell line.

Taken together, the results of this work show that the MuV SH protein functions as a virulence factor, by delaying innate immune response and thereby providing time for the replication of MuV particles via the inhibition of the NF- κ B activation.

8 Literaturverzeichnis

- Abbott, N. J., Ronnback, L. & Hansson, E. (2006).** Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews Neuroscience* **7**, 41-53.
- Afzal, M. A., Dussupt, V., Minor, P. D., Pipkin, P. A., Fleck, R., Hockley, D. J. & Stacey, G. N. (2005).** Assessment of mumps virus growth on various continuous cell lines by virological, immunological, molecular and morphological investigations. *Journal of virological methods* **126**, 149-156.
- Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. (2001).** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology* **2**, 675-680.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006).** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. (2001).** Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738.
- Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P. & Zychlinsky, A. (1999).** Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science (New York, NY)* **285**, 736-739.
- Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S. & Randall, R. E. (2004).** The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17264-17269.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I. & Stockinger, H. (2012).** ExpASY: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research* **40**, W597-603.
- Bangor-Jones, R. D., Dowse, G. K., Giele, C. M., van Buynder, P. G., Hodge, M. M. & Whitty, M. M. (2009).** A prolonged mumps outbreak among highly vaccinated Aboriginal people in the Kimberley region of Western Australia. *The Medical journal of Australia* **191**, 398-401.
- Bao, X., Kolli, D., Liu, T., Shan, Y., Garofalo, R. P. & Casola, A. (2008).** Human metapneumovirus small hydrophobic protein inhibits NF-kappaB transcriptional activity. *Journal of virology* **82**, 8224-8229.
- Barbour, S. E., Wong, C., Rabah, D., Kapur, A. & Carter, A. D. (1998).** Mature macrophage cell lines exhibit variable responses to LPS. *Molecular immunology* **35**, 977-987.
- Barkett, M. & Gilmore, T. D. (1999).** Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6910-6924.
- Bartlett, N., Symons, J. A., Tschärke, D. C. & Smith, G. L. (2002).** The vaccinia virus N1L protein is an intracellular homodimer that promotes virulence. *The Journal of general virology* **83**, 1965-1976.
- Bergmann, T. (2011).** Analyse der Interaktion des kleinen, hydrophoben Proteins (SH-Protein) des Mumpsvirus mit dem Rezeptor für TNF α . *Diplomarbeit, Freie Universität Berlin*.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L. & Cookson, B. T. (2009).** Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews Microbiology* **7**, 99-109.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L. & Kuchroo, V. K. (2006).** Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-238.
- Biacchesi, S., Skiadopoulos, M. H., Yang, L., Lamirande, E. W., Tran, K. C., Murphy, B. R., Collins, P. L. & Buchholz, U. J. (2004).** Recombinant human Metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate. *Journal of virology* **78**, 12877-12887.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* **7**, 1513-1523.

- Bitnun, S., Rakover, Y. & Rosen, G. (1986).** Acute bilateral total deafness complicating mumps. *The Journal of laryngology and otology* **100**, 943-945.
- BMG (2015).** Nationaler Aktionsplan 20 15–2020 zur Elimination der Masern und Röteln in Deutschland.
- Bradley, J. R. (2008).** TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* **214**, 149-160.
- Brockhoff, H. J., Mollema, L., Sonder, G. J., Postema, C. A., van Binnendijk, R. S., Kohl, R. H., de Melker, H. E. & Hahne, S. J. (2010).** Mumps outbreak in a highly vaccinated student population, The Netherlands, 2004. *Vaccine* **28**, 2932-2936.
- Bruyn, H. B., Sexton, H. M. & Brainerd, H. D. (1957).** Mumps meningoencephalitis; a clinical review of 119 cases with one death. *California medicine* **86**, 153-160.
- Bukreyev, A., Whitehead, S. S., Murphy, B. R. & Collins, P. L. (1997).** Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *Journal of virology* **71**, 8973-8982.
- Burns, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., Lewis, A., Ray, K., Tschopp, J. & Volpe, F. (2000).** Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nature cell biology* **2**, 346-351.
- Camussi, G., Albano, E., Tetta, C. & Bussolino, F. (1991).** The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *European journal of biochemistry* **202**, 3-14.
- Cao, Z., Henzel, W. J. & Gao, X. (1996).** IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science (New York, NY)* **271**, 1128-1131.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. & Williamson, B. (1975).** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 3666-3670.
- Carter, S. D., Dent, K. C., Atkins, E., Foster, T. L., Verow, M., Gorny, P., Harris, M., Hiscox, J. A., Ranson, N. A., Griffin, S. & Barr, J. N. (2010).** Direct visualization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus reveals the structural basis for membrane permeability. *FEBS letters* **584**, 2786-2790.
- Castaneda, S. J. & Wong, T. C. (1990).** Leader sequence distinguishes between translatable and encapsidated measles virus RNAs. *Journal of virology* **64**, 222-230.
- Chaix, J., Tessmer, M. S., Hoebe, K., Fuseri, N., Ryffel, B., Dalod, M., Alexopoulou, L., Beutler, B., Brossay, L., Vivier, E. & Walzer, T. (2008).** Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **181**, 1627-1631.
- Chanput, W., Mes, J. J. & Wichers, H. J. (2014).** THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International immunopharmacology* **23**, 37-45.
- Chen, I. Y. & Ichinohe, T. (2015).** Response of host inflammasomes to viral infection. *Trends in microbiology* **23**, 55-63.
- Cheong, W. C., Kang, H. R., Yoon, H., Kang, S. J., Ting, J. P. & Song, M. J. (2015).** Influenza A Virus NS1 Protein Inhibits the NLRP3 Inflammasome. *PloS one* **10**, e0126456.
- Chin, Y. R. & Horwitz, M. S. (2006).** Adenovirus RID complex enhances degradation of internalized tumour necrosis factor receptor 1 without affecting its rate of endocytosis. *The Journal of general virology* **87**, 3161-3167.
- Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J. & Gusovsky, F. (1999).** Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *The Journal of biological chemistry* **274**, 10689-10692.
- Clarke, D. K., Sidhu, M. S., Johnson, J. E. & Udem, S. A. (2000).** Rescue of mumps virus from cDNA. *Journal of virology* **74**, 4831-4838.
- Collins, P. L., Olmsted, R. A. & Johnson, P. R. (1990).** The small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus: comparison between antigenic subgroups A and B. *The Journal of general virology* **71 (Pt 7)**, 1571-1576.
- Conzelmann, K. K. (1998).** Nonsegmented negative-strand RNA viruses: genetics and manipulation of viral genomes. *Annual review of genetics* **32**, 123-162.

- Croston, G. E., Cao, Z. & Goeddel, D. V. (1995).** NF-kappa B activation by interleukin-1 (IL-1) requires an IL-1 receptor-associated protein kinase activity. *The Journal of biological chemistry* **270**, 16514-16517.
- Cui, A., Brown, D. W., Xu, W. & Jin, L. (2013).** Genetic variation in the HN and SH genes of mumps viruses: a comparison of strains from mumps cases with and without neurological symptoms. *PLoS one* **8**, e61791.
- Cusson-Hermance, N., Khurana, S., Lee, T. H., Fitzgerald, K. A. & Kelliher, M. A. (2005).** Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- κ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *The Journal of biological chemistry* **280**, 36560-36566.
- Daniels, M. J. & Brough, D. (2017).** Unconventional Pathways of Secretion Contribute to Inflammation. *International journal of molecular sciences* **18**.
- Davidkin, I., Kontio, M., Paunio, M. & Peltola, H. (2010).** MMR vaccination and disease elimination: the Finnish experience. *Expert Rev Vaccines* **9**, 1045-1053.
- de Graaf, M., Herfst, S., Aarbiou, J., Burgers, P. C., Zaaraoui-Boutahar, F., Bijl, M., van Ijcken, W., Schrauwen, E. J., Osterhaus, A. D., Luider, T. M., Scholte, B. J., Fouchier, R. A. & Andeweg, A. C. (2013).** Small hydrophobic protein of human metapneumovirus does not affect virus replication and host gene expression in vitro. *PLoS one* **8**, e58572.
- de Oliveira, D. E., Ballon, G. & Cesarman, E. (2010).** NF-kappaB signaling modulation by EBV and KSHV. *Trends in microbiology* **18**, 248-257.
- Dinareello, C. A. (1996).** Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**, 2095-2147.
- DiPerna, G., Stack, J., Bowie, A. G., Boyd, A., Kotwal, G., Zhang, Z., Arvikar, S., Latz, E., Fitzgerald, K. A. & Marshall, W. L. (2004).** Poxvirus protein N1L targets the I-kappaB kinase complex, inhibits signaling to NF-kappaB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors. *The Journal of biological chemistry* **279**, 36570-36578.
- Doyle, S. L. & O'Neill, L. A. (2006).** Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochemical pharmacology* **72**, 1102-1113.
- Dupont, N., Jiang, S., Pilli, M., Ornatowski, W., Bhattacharya, D. & Deretic, V. (2011).** Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1beta. *The EMBO journal* **30**, 4701-4711.
- Ea, C. K., Deng, L., Xia, Z. P., Pineda, G. & Chen, Z. J. (2006).** Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Molecular cell* **22**, 245-257.
- Ehrhardt, C., Ruckle, A., Hrinčius, E. R., Haasbach, E., Anhlan, D., Ahmann, K., Banning, C., Reiling, S. J., Kuhn, J., Strobl, S., Vitt, D., Leban, J., Planz, O. & Ludwig, S. (2013).** The NF-kappaB inhibitor SC75741 efficiently blocks influenza virus propagation and confers a high barrier for development of viral resistance. *Cellular microbiology* **15**, 1198-1211.
- Elango, N., Varsanyi, T. M., Kovamees, J. & Norrby, E. (1988).** Molecular cloning and characterization of six genes, determination of gene order and intergenic sequences and leader sequence of mumps virus. *The Journal of general virology* **69 (Pt 11)**, 2893-2900.
- Elderfield, R. A., Parker, L., Stilwell, P., Roberts, K. L., Schepelmann, S. & Barclay, W. S. (2015).** Ferret airway epithelial cell cultures support efficient replication of influenza B virus but not mumps virus. *The Journal of general virology* **96**, 2092-2098.
- Ember, S. W., Ren, H., Ferguson, B. J. & Smith, G. L. (2012).** Vaccinia virus protein C4 inhibits NF-kappaB activation and promotes virus virulence. *The Journal of general virology* **93**, 2098-2108.
- Eriksen, J., Davidkin, I., Kafatos, G., Andrews, N., Barbara, C., Cohen, D., Duks, A., Giskevicius, A., Johansen, K., Bartha, K., Kriz, B., Mitis, G., Mossong, J., Nardone, A., O'Flanagan, D., F. D. E. O., Pistol, A., Theeten, H., Prose, K., Slacikova, M. & Pebody, R. (2013).** Seroepidemiology

- of mumps in Europe (1996-2008): why do outbreaks occur in highly vaccinated populations? *Epidemiology and infection* **141**, 651-666.
- Esolen, L. M., Takahashi, K., Johnson, R. T., Vaisberg, A., Moench, T. R., Wesselingh, S. L. & Griffin, D. E. (1995).** Brain endothelial cell infection in children with acute fatal measles. *The Journal of clinical investigation* **96**, 2478-2481.
- Farina, C., Aloisi, F. & Meinl, E. (2007).** Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in immunology* **28**, 138-145.
- Ferko, B., Stasakova, J., Romanova, J., Kittel, C., Sereinig, S., Katinger, H. & Egorov, A. (2004).** Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. *Journal of virology* **78**, 13037-13045.
- Fessler, S. P., Chin, Y. R. & Horwitz, M. S. (2004).** Inhibition of tumor necrosis factor (TNF) signal transduction by the adenovirus group C RID complex involves downregulation of surface levels of TNF receptor 1. *Journal of virology* **78**, 13113-13121.
- Fields, S. & Song, O. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fink, K., Duval, A., Martel, A., Soucy-Faulkner, A. & Grandvaux, N. (2008).** Dual role of NOX2 in respiratory syncytial virus- and sendai virus-induced activation of NF-kappaB in airway epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **180**, 6911-6922.
- Franz, S. (2012).** Analyse der Funktion des SH-Proteins des Mumpsvirus durch Erzeugung rekombinanter Viren. *Diplomarbeit, Freie Universität Berlin*.
- Fuentes, S., Tran, K. C., Luthra, P., Teng, M. N. & He, B. (2007).** Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *Journal of virology* **81**, 8361-8366.
- Fujibayashi, Y., Fujimori, Y., Kasumoto, I., Kai, S., Hara, H., Okamura, H., Tsutsui, H., Ogawa, H. & Nakanishi, K. (2007).** Interleukin-18 regulates T helper 1 or 2 immune responses of human cord blood CD4+ V alpha 24+V beta 11+ natural killer T cells. *International journal of molecular medicine* **20**, 241-245.
- Galazka, A. M., Robertson, S. E. & Kraigher, A. (1999).** Mumps and mumps vaccine: a global review. *Bulletin of the World Health Organization* **77**, 3-14.
- Gan, S. W., Ng, L., Lin, X., Gong, X. & Torres, J. (2008).** Structure and ion channel activity of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein transmembrane domain. *Protein science : a publication of the Protein Society* **17**, 813-820.
- Gan, S. W., Tan, E., Lin, X., Yu, D., Wang, J., Tan, G. M., Vararattanavech, A., Yeo, C. Y., Soon, C. H., Soong, T. W., Pervushin, K. & Torres, J. (2012).** The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *The Journal of biological chemistry* **287**, 24671-24689.
- Geijtenbeek, T. B. & Gringhuis, S. I. (2009).** Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature reviews Immunology* **9**, 465-479.
- Geng, J., Sun, X., Wang, P., Zhang, S., Wang, X., Wu, H., Hong, L., Xie, C., Li, X., Zhao, H., Liu, Q., Jiang, M., Chen, Q., Zhang, J., Li, Y., Song, S., Wang, H. R., Zhou, R., Johnson, R. L., Chien, K. Y., Lin, S. C., Han, J., Avruch, J., Chen, L. & Zhou, D. (2015).** Kinases Mst1 and Mst2 positively regulate phagocytic induction of reactive oxygen species and bactericidal activity. *Nature immunology* **16**, 1142-1152.
- Gias, E., Nielsen, S. U., Morgan, L. A. & Toms, G. L. (2008).** Purification of human respiratory syncytial virus by ultracentrifugation in iodixanol density gradient. *Journal of virological methods* **147**, 328-332.
- Gilmore, T. D. (2006).** Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-6684.
- Greenland, K., Whelan, J., Fanoy, E., Borgert, M., Hulshof, K., Yap, K. B., Swaan, C., Donker, T., van Binnendijk, R., de Melker, H. & Hahne, S. (2012).** Mumps outbreak among vaccinated university students associated with a large party, the Netherlands, 2010. *Vaccine* **30**, 4676-4680.

- Grützke, J. (2011).** Konstruktion rekombinanter Mumpsviren zur Funktionsanalyse des SH-Proteins. *Diplomarbeit, Freie Universität Berlin.*
- Guma, M., Ronacher, L., Liu-Bryan, R., Takai, S., Karin, M. & Corr, M. (2009).** Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis and rheumatism* **60**, 3642-3650.
- Hale, B. G., Albrecht, R. A. & Garcia-Sastre, A. (2010).** Innate immune evasion strategies of influenza viruses. *Future microbiology* **5**, 23-41.
- Hale, B. G., Randall, R. E., Ortin, J. & Jackson, D. (2008).** The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *The Journal of general virology* **89**, 2359-2376.
- Hall, R. & Richards, H. (1987).** Hearing loss due to mumps. *Archives of disease in childhood* **62**, 189-191.
- Hanisch, U. K. & Kettenmann, H. (2007).** Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience* **10**, 1387-1394.
- Harrison, M. S., Sakaguchi, T. & Schmitt, A. P. (2010).** Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**, 1416-1429.
- Hashimoto, H., Fujioka, M. & Kinumaki, H. (2009).** An office-based prospective study of deafness in mumps. *The Pediatric infectious disease journal* **28**, 173-175.
- He, B., Leser, G. P., Paterson, R. G. & Lamb, R. A. (1998).** The paramyxovirus SV5 small hydrophobic (SH) protein is not essential for virus growth in tissue culture cells. *Virology* **250**, 30-40.
- He, B., Lin, G. Y., Durbin, J. E., Durbin, R. K. & Lamb, R. A. (2001).** The SH integral membrane protein of the paramyxovirus simian virus 5 is required to block apoptosis in MDBK cells. *Journal of virology* **75**, 4068-4079.
- He, Y., Hara, H. & Nunez, G. (2016).** Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends in biochemical sciences* **41**, 1012-1021.
- Hiebert, S. W., Paterson, R. G. & Lamb, R. A. (1985).** Identification and predicted sequence of a previously unrecognized small hydrophobic protein, SH, of the paramyxovirus simian virus 5. *Journal of virology* **55**, 744-751.
- Hiebert, S. W., Richardson, C. D. & Lamb, R. A. (1988).** Cell surface expression and orientation in membranes of the 44-amino-acid SH protein of simian virus 5. *Journal of virology* **62**, 2347-2357.
- Hinz, M., Lemke, P., Anagnostopoulos, I., Hacker, C., Krappmann, D., Mathas, S., Dorken, B., Zenke, M., Stein, H. & Scheidereit, C. (2002).** Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *The Journal of experimental medicine* **196**, 605-617.
- Hiscott, J., Nguyen, T. L., Arguello, M., Nakhaei, P. & Paz, S. (2006).** Manipulation of the nuclear factor-kappaB pathway and the innate immune response by viruses. *Oncogene* **25**, 6844-6867.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. & Akira, S. (1999).** Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **162**, 3749-3752.
- Hout, D. R., Gomez, M. L., Pacyniak, E., Gomez, L. M., Inbody, S. H., Mulcahy, E. R., Culley, N., Pinson, D. M., Powers, M. F., Wong, S. W. & Stephens, E. B. (2005).** Scrambling of the amino acids within the transmembrane domain of Vpu results in a simian-human immunodeficiency virus (SHIVTM) that is less pathogenic for pig-tailed macaques. *Virology* **339**, 56-69.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V. & Goeddel, D. V. (1996a).** TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**, 387-396.
- Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G. & Goeddel, D. V. (1996b).** TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**, 299-308.

- Hsu, K., Han, J., Shinlapawittayatorn, K., Deschenes, I. & Marban, E. (2010). Membrane potential depolarization as a triggering mechanism for Vpu-mediated HIV-1 release. *Biophysical journal* **99**, 1718-1725.
- Huang, J., Gao, X., Li, S. & Cao, Z. (1997). Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 12829-12832.
- Hviid, A., Rubin, S. & Muhlemann, K. (2008). Mumps. *Lancet* **371**, 932-944.
- Ichinohe, T., Pang, I. K. & Iwasaki, A. (2010). Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nature immunology* **11**, 404-410.
- Jack, P. J., Anderson, D. E., Bossart, K. N., Marsh, G. A., Yu, M. & Wang, L. F. (2008). Expression of novel genes encoded by the paramyxovirus J virus. *The Journal of general virology* **89**, 1434-1441.
- Jiang, Y., Qin, Y. & Chen, M. (2016). Host-Pathogen Interactions in Measles Virus Replication and Anti-Viral Immunity. *Viruses* **8**.
- Jiang, Z., Ninomiya-Tsuji, J., Qian, Y., Matsumoto, K. & Li, X. (2002). Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Molecular and cellular biology* **22**, 7158-7167.
- Jiang, Z., Zamanian-Daryoush, M., Nie, H., Silva, A. M., Williams, B. R. & Li, X. (2003). Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *The Journal of biological chemistry* **278**, 16713-16719.
- Jin, H., Zhou, H., Cheng, X., Tang, R., Munoz, M. & Nguyen, N. (2000). Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo. *Virology* **273**, 210-218.
- Jin, L., Orvell, C., Myers, R., Rota, P. A., Nakayama, T., Forcic, D., Hiebert, J. & Brown, K. E. (2015). Genomic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes. *Reviews in medical virology* **25**, 85-101.
- Johnson, C. D. & Goodpasture, E. W. (1934). AN INVESTIGATION OF THE ETIOLOGY OF MUMPS. *The Journal of experimental medicine* **59**, 1-19.
- Kanayama, A., Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y. H., Deng, L. & Chen, Z. J. (2004). TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Molecular cell* **15**, 535-548.
- Karin, M. & Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annual review of immunology* **18**, 621-663.
- Karin, M. & Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature immunology* **3**, 221-227.
- Karron, R. A., Wright, P. F., Belshe, R. B., Thumar, B., Casey, R., Newman, F., Polack, F. P., Randolph, V. B., Deatly, A., Hackell, J., Gruber, W., Murphy, B. R. & Collins, P. L. (2005). Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *The Journal of infectious diseases* **191**, 1093-1104.
- Katoh, H., Kubota, T., Ihara, T., Maeda, K., Takeda, M. & Kidokoro, M. (2016). Cross-Neutralization between Human and African Bat Mumps Viruses. *Emerging infectious diseases* **22**, 703-706.
- Kaushik, D. K., Gupta, M., Kumawat, K. L. & Basu, A. (2012). NLRP3 inflammasome: key mediator of neuroinflammation in murine Japanese encephalitis. *PLoS one* **7**, e32270.
- Kawai, T. & Akira, S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine* **13**, 460-469.
- Keating, S. E., Maloney, G. M., Moran, E. M. & Bowie, A. G. (2007). IRAK-2 participates in multiple toll-like receptor signaling pathways to NFkappaB via activation of TRAF6 ubiquitination. *The Journal of biological chemistry* **282**, 33435-33443.

- Kojima, H., Aizawa, Y., Yanai, Y., Nagaoka, K., Takeuchi, M., Ohta, T., Ikegami, H., Ikeda, M. & Kurimoto, M. (1999). An essential role for NF-kappa B in IL-18-induced IFN-gamma expression in KG-1 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **162**, 5063-5069.
- Kolakofsky, D., Pelet, T., Garcin, D., Hausmann, S., Curran, J. & Roux, L. (1998). Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *Journal of virology* **72**, 891-899.
- Kolakofsky, D., Roux, L., Garcin, D. & Ruigrok, R. W. (2005). Paramyxovirus mRNA editing, the "rule of six" and error catastrophe: a hypothesis. *The Journal of general virology* **86**, 1869-1877.
- Komune, N., Ichinohe, T., Ito, M. & Yanagi, Y. (2011). Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1beta secretion. *Journal of virology* **85**, 13019-13026.
- Kovamees, J., Rydbeck, R., Orvell, C. & Norrby, E. (1990). Hemagglutinin-neuraminidase (HN) amino acid alterations in neutralization escape mutants of Kilham mumps virus. *Virus research* **17**, 119-129.
- Kuba, Y., Kyan, H., Arakaki, E., Takara, T., Kato, T., Okano, S., Oshiro, Y., Kudaka, J. & Kidokoro, M. (2016). Molecular epidemiological study of mumps epidemics of 2015 in Okinawa, Japan. *Japanese journal of infectious diseases*.
- Kurlawala, Z., Shah, P. P., Shah, C. & Beverly, L. J. (2017). The ST1 and UBA Domains of UBQLN1 Are Critical Determinants of Substrate Interaction and Proteostasis. *Journal of cellular biochemistry* **118**, 2261-2270.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology* **157**, 105-132.
- Lamb, R. A. & Jardetzky, T. S. (2007). Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. *Current opinion in structural biology* **17**, 427-436.
- Lee, D. Y. & Brown, E. J. (2012). Ubiquitins in the crosstalk among proteolytic pathways. *Biological chemistry* **393**, 441-447.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C., Ikeda, M., Ray, S. C., Gale, M., Jr. & Lemon, S. M. (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2992-2997.
- Li, Z., Gabbard, J. D., Mooney, A., Chen, Z., Tompkins, S. M. & He, B. (2013). Efficacy of parainfluenza virus 5 mutants expressing hemagglutinin from H5N1 influenza A virus in mice. *Journal of virology* **87**, 9604-9609.
- Li, Z., Xu, J., Patel, J., Fuentes, S., Lin, Y., Anderson, D., Sakamoto, K., Wang, L. F. & He, B. (2011). Function of the small hydrophobic protein of J paramyxovirus. *Journal of virology* **85**, 32-42.
- Lin, Y., Bright, A. C., Rothermel, T. A. & He, B. (2003). Induction of apoptosis by paramyxovirus simian virus 5 lacking a small hydrophobic gene. *Journal of virology* **77**, 3371-3383.
- Liu, J. & Cao, X. (2016). Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses. *Cellular & molecular immunology* **13**, 711-721.
- Liu, J., Qian, C. & Cao, X. (2016). Post-Translational Modification Control of Innate Immunity. *Immunity* **45**, 15-30.
- Liu, S. & Chen, Z. J. (2011). Expanding role of ubiquitination in NF-kappaB signaling. *Cell research* **21**, 6-21.
- Lupfer, C. R. & Kanneganti, T. D. (2012). The role of inflammasome modulation in virulence. *Virulence* **3**, 262-270.
- Mack, C., Sickmann, A., Lembo, D. & Brune, W. (2008). Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 3094-3099.
- Madeira, A., Vikeved, E., Nilsson, A., Sjogren, B., Andren, P. E. & Svenningsson, P. (2011). Identification of protein-protein interactions by surface plasmon resonance followed by mass spectrometry. *Current protocols in protein science* **Chapter 19**, Unit19.21.
- Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Mrad, R. L., Plenchette, S., Simard, C., Enwere, E., Arora, V., Mak, T. W., Lacasse, E. C., Waring, J. & Korneluk, R. G. (2008). Both cIAP1 and cIAP2 regulate

- TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 11778-11783.
- Maletzki, L. (2016)**. Analysis of the influence of the small hydrophobic protein of mumps virus on the JNK signalling pathway. *Masterarbeit, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald*.
- Malik, T., Shegogue, C. W., Werner, K., Ngo, L., Sauder, C., Zhang, C., Duprex, W. P. & Rubin, S. (2011)**. Discrimination of mumps virus small hydrophobic gene deletion effects from gene translation effects on virus virulence. *Journal of virology* **85**, 6082-6085.
- Mallewa, M., Vallely, P., Faragher, B., Banda, D., Klapper, P., Mukaka, M., Khofi, H., Pensulo, P., Taylor, T., Molyneux, M. & Solomon, T. (2013)**. Viral CNS infections in children from a malaria-endemic area of Malawi: a prospective cohort study. *The Lancet Global health* **1**, e153-160.
- Mankertz, A., Beutel, U., Schmidt, F. J., Borgmann, S., Wenzel, J. J., Ziegler, P., Weissbrich, B. & Santibanez, S. (2015)**. Laboratory-based investigation of suspected mumps cases submitted to the German National Reference Centre for Measles, Mumps, and Rubella, 2008 to 2013. *International journal of medical microbiology : IJMM* **305**, 619-626.
- Marc, D. (2014)**. Influenza virus non-structural protein NS1: interferon antagonism and beyond. *The Journal of general virology* **95**, 2594-2611.
- Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. (2002)**. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* **10**, 417-426.
- Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. (2009)**. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology* **27**, 229-265.
- Masante, C., El Najjar, F., Chang, A., Jones, A., Moncman, C. L. & Dutch, R. E. (2014)**. The human metapneumovirus small hydrophobic protein has properties consistent with those of a viroporin and can modulate viral fusogenic activity. *Journal of virology* **88**, 6423-6433.
- Mazur, I., Wurzer, W. J., Ehrhardt, C., Pleschka, S., Puthavathana, P., Silberzahn, T., Wolff, T., Planz, O. & Ludwig, S. (2007)**. Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity. *Cellular microbiology* **9**, 1683-1694.
- McGuinness, P. H., Painter, D., Davies, S. & McCaughan, G. W. (2000)**. Increases in intrahepatic CD68 positive cells, MAC387 positive cells, and proinflammatory cytokines (particularly interleukin 18) in chronic hepatitis C infection. *Gut* **46**, 260-269.
- Meier, A. (2015)**. Plaque Purification, Enrichment and Characterization of Recombinant Mumps Viruses. *Masterarbeit, Technische Universität Dresden*.
- Melchjorsen, J., Siren, J., Julkunen, I., Paludan, S. R. & Matikainen, S. (2006)**. Induction of cytokine expression by herpes simplex virus in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells is dependent on virus replication and is counteracted by ICP27 targeting NF-kappaB and IRF-3. *The Journal of general virology* **87**, 1099-1108.
- Miwa, K., Asano, M., Horai, R., Iwakura, Y., Nagata, S. & Suda, T. (1998)**. Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nature medicine* **4**, 1287-1292.
- Mizushima, N. & Murakami, Y. (1986)**. Deafness following mumps: the possible pathogenesis and incidence of deafness. *Auris, nasus, larynx* **13 Suppl 1**, S55-57.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. & Schätzl, H. (2010)**. *Molekulare Virologie: Spektrum Akademischer Verlag*.
- Muhlemann, K. (2004)**. The molecular epidemiology of mumps virus. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **4**, 215-219.
- Myskiw, C., Arsenio, J., van Bruggen, R., Deschambault, Y. & Cao, J. (2009)**. Vaccinia virus E3 suppresses expression of diverse cytokines through inhibition of the PKR, NF-kappaB, and IRF3 pathways. *Journal of virology* **83**, 6757-6768.
- Nabel, G. & Baltimore, D. (1987)**. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* **326**, 711-713.

- Nagai, T., Okafuji, T., Miyazaki, C., Ito, Y., Kamada, M., Kumagai, T., Yuri, K., Sakiyama, H., Miyata, A., Ihara, T., Ochiai, H., Shimomura, K., Suzuki, E., Torigoe, S., Igarashi, M., Kase, T., Okuno, Y. & Nakayama, T. (2007). A comparative study of the incidence of aseptic meningitis in symptomatic natural mumps patients and monovalent mumps vaccine recipients in Japan. *Vaccine* **25**, 2742-2747.
- Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H. & Okamura, H. (2001). Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annual review of immunology* **19**, 423-474.
- Napolitani, G., Acosta-Rodriguez, E. V., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. (2009). Prostaglandin E2 enhances Th17 responses via modulation of IL-17 and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *European journal of immunology* **39**, 1301-1312.
- Negash, A. A., Ramos, H. J., Crochet, N., Lau, D. T., Doehle, B., Papic, N., Delker, D. A., Jo, J., Bertoletti, A., Hagedorn, C. H. & Gale, M., Jr. (2013). IL-1beta production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS pathogens* **9**, e1003330.
- Netea, M. G., Simon, A., van de Veerdonk, F., Kullberg, B. J., Van der Meer, J. W. & Joosten, L. A. (2010). IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS pathogens* **6**, e1000661.
- Nimmerjahn, F., Dudziak, D., Dirmeier, U., Hobom, G., Riedel, A., Schlee, M., Staudt, L. M., Rosenwald, A., Behrends, U., Bornkamm, G. W. & Mautner, J. (2004). Active NF-kappaB signalling is a prerequisite for influenza virus infection. *The Journal of general virology* **85**, 2347-2356.
- Nishio, M., Tsurudome, M., Garcin, D., Komada, H., Ito, M., Le Mercier, P., Nosaka, T. & Kolakofsky, D. (2011). Human parainfluenza virus type 2 L protein regions required for interaction with other viral proteins and mRNA capping. *Journal of virology* **85**, 725-732.
- O'Mahony, A. M., Montano, M., Van Beneden, K., Chen, L. F. & Greene, W. C. (2004). Human T-cell lymphotropic virus type 1 tax induction of biologically Active NF-kappaB requires IkkappaB kinase-1-mediated phosphorylation of RelA/p65. *The Journal of biological chemistry* **279**, 18137-18145.
- Ofengeim, D. & Yuan, J. (2013). Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nature reviews Molecular cell biology* **14**, 727-736.
- Okajima, K., Iseki, K., Koyano, S., Kato, A. & Azuma, H. (2013). Virological analysis of a regional mumps outbreak in the northern island of Japan-mumps virus genotyping and clinical description. *Japanese journal of infectious diseases* **66**, 561-563.
- Okamoto, M., Shitara, T., Nakayama, M., Takamiya, H., Nishiyama, K., Ono, Y. & Sano, H. (1994). Sudden deafness accompanied by asymptomatic mumps. *Acta oto-laryngologica Supplementum* **514**, 45-48.
- Olmos, G. & Llado, J. (2014). Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of inflammation* **2014**, 861231.
- Olmsted, R. A. & Collins, P. L. (1989). The 1A protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species. *Journal of virology* **63**, 2019-2029.
- Otto, W., Mankertz, A., Santibanez, S., Saygili, H., Wenzel, J., Jilg, W., Wieland, W. & Borgmann, S. (2010). Ongoing outbreak of mumps affecting adolescents and young adults in Bavaria, Germany, August to October 2010. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **15**.
- Ouyang, W., Kolls, J. K. & Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* **28**, 454-467.
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-6866.
- Parker, L., Gilliland, S. M., Minor, P. & Schepelmann, S. (2013). Assessment of the ferret as an in vivo model for mumps virus infection. *The Journal of general virology* **94**, 1200-1205.

- Paterson, R. G. & Lamb, R. A. (1990).** RNA editing by G-nucleotide insertion in mumps virus P-gene mRNA transcripts. *Journal of virology* **64**, 4137-4145.
- Pickering, C., Hagglund, M., Szmydynger-Chodobska, J., Marques, F., Palha, J. A., Waller, L., Chodobski, A., Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C. & Schioth, H. B. (2008).** The Adhesion GPCR GPR125 is specifically expressed in the choroid plexus and is upregulated following brain injury. *BMC neuroscience* **9**, 97.
- Pinto, R., Herold, S., Cakarova, L., Hoegner, K., Lohmeyer, J., Planz, O. & Pleschka, S. (2011).** Inhibition of influenza virus-induced NF-kappaB and Raf/MEK/ERK activation can reduce both virus titers and cytokine expression simultaneously in vitro and in vivo. *Antiviral research* **92**, 45-56.
- Pirhonen, J., Sareneva, T., Julkunen, I. & Matikainen, S. (2001).** Virus infection induces proteolytic processing of IL-18 in human macrophages via caspase-1 and caspase-3 activation. *European journal of immunology* **31**, 726-733.
- Ponka, A. & Pettersson, T. (1982).** The incidence and aetiology of central nervous system infections in Helsinki in 1980. *Acta neurologica Scandinavica* **66**, 529-535.
- Pradere, J. P., Hernandez, C., Koppe, C., Friedman, R. A., Luedde, T. & Schwabe, R. F. (2016).** Negative regulation of NF-kappaB p65 activity by serine 536 phosphorylation. *Science signaling* **9**, ra85.
- Puren, A. J., Fantuzzi, G. & Dinarello, C. A. (1999).** Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 2256-2261.
- Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G. & Dubyak, G. R. (2007).** Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **179**, 1913-1925.
- Rafiefard, F., Johansson, B., Teclé, T. & Orvell, C. (2005).** Characterization of mumps virus strains with varying neurovirulence. *Scandinavian journal of infectious diseases* **37**, 330-337.
- Ren, K. & Torres, R. (2009).** Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain research reviews* **60**, 57-64.
- Riley, B. E., Xu, Y., Zoghbi, H. Y. & Orr, H. T. (2004).** The effects of the polyglutamine repeat protein ataxin-1 on the UbL-UBA protein A1Up. *The Journal of biological chemistry* **279**, 42290-42301.
- RKI (1999).** Interventionsprogramm »Masern, Mumps, Röteln (MMR). *Epidemiologisches Bulletin* **45**.
- RKI (2017).** SurvStat@RKI 2.0, Web-basierte Abfrage der Meldedaten gemäß Infektionsschutzgesetz (IfSG); Stand 29.05.2017, Webseite: <https://survstat.rki.de/>.
- Rödner, C. (2011).** Molekulare Untersuchungen des SH Proteins des Mumpsvirus und der attenuierten Vakzine. *Doktorarbeit, Technische Universität Berlin*.
- Rubin, S., Eckhaus, M., Rennick, L. J., Bamford, C. G. & Duprex, W. P. (2015).** Molecular biology, pathogenesis and pathology of mumps virus. *J Pathol* **235**, 242-252.
- Rubin, S. A., Amexis, G., Pletnikov, M., Li, Z., Vanderzanden, J., Mauldin, J., Sauder, C., Malik, T., Chumakov, K. & Carbone, K. M. (2003).** Changes in mumps virus gene sequence associated with variability in neurovirulent phenotype. *Journal of virology* **77**, 11616-11624.
- Rubin, S. A., Link, M. A., Sauder, C. J., Zhang, C., Ngo, L., Rima, B. K. & Duprex, W. P. (2012).** Recent mumps outbreaks in vaccinated populations: no evidence of immune escape. *Journal of virology* **86**, 615-620.
- Rubin, S. A., Pletnikov, M. & Carbone, K. M. (1998).** Comparison of the neurovirulence of a vaccine and a wild-type mumps virus strain in the developing rat brain. *Journal of virology* **72**, 8037-8042.
- Rudd, B. D., Burstein, E., Duckett, C. S., Li, X. & Lukacs, N. W. (2005).** Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression. *Journal of virology* **79**, 3350-3357.

- Rudd, P. A., Cattaneo, R. & von Messling, V. (2006). Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *Journal of virology* **80**, 9361-9370.
- Russell, R. F., McDonald, J. U., Ivanova, M., Zhong, Z., Bukreyev, A. & Tregoning, J. S. (2015). Partial Attenuation of Respiratory Syncytial Virus with a Deletion of a Small Hydrophobic Gene Is Associated with Elevated Interleukin-1beta Responses. *Journal of virology* **89**, 8974-8981.
- Saika, S., Kidokoro, M., Ohkawa, T., Aoki, A. & Suzuki, K. (2002). Pathogenicity of mumps virus in the marmoset. *Journal of medical virology* **66**, 115-122.
- Saito, H., Takahashi, Y., Harata, S., Tanaka, K., Sano, T., Suto, T., Yamada, A., Yamazaki, S. & Morita, M. (1996). Isolation and characterization of mumps virus strains in a mumps outbreak with a high incidence of aseptic meningitis. *Microbiology and immunology* **40**, 271-275.
- Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T. & Toriumi, W. (1999). IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *The Journal of biological chemistry* **274**, 30353-30356.
- Sambucetti, L. C., Cherrington, J. M., Wilkinson, G. W. & Mocarski, E. S. (1989). NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *The EMBO journal* **8**, 4251-4258.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- Sareneva, T., Matikainen, S., Kurimoto, M. & Julkunen, I. (1998). Influenza A virus-induced IFN-alpha/beta and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma gene expression in human T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **160**, 6032-6038.
- Sarkar, S. N., Smith, H. L., Rowe, T. M. & Sen, G. C. (2003). Double-stranded RNA signaling by Toll-like receptor 3 requires specific tyrosine residues in its cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry* **278**, 4393-4396.
- Sasaki, C. Y., Barberi, T. J., Ghosh, P. & Longo, D. L. (2005). Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I{kappa}B{alpha}-independent NF-{kappa}B pathway. *The Journal of biological chemistry* **280**, 34538-34547.
- Schickli, J. H., Kaur, J. & Tang, R. S. (2012). Nonclinical phenotypic and genotypic analyses of a Phase 1 pediatric respiratory syncytial virus vaccine candidate MEDI-559 (rA2cp248/404/1030DeltaSH) at permissive and non-permissive temperatures. *Virus research* **169**, 38-47.
- Schonbeck, U., Mach, F. & Libby, P. (1998). Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **161**, 3340-3346.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. & Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* **75**, 163-189.
- Schuerer-Maly, C. C., Eckmann, L., Kagnoff, M. F., Falco, M. T. & Maly, F. E. (1994). Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology* **81**, 85-91.
- Schulz, C., Farkas, L., Wolf, K., Kratzel, K., Eissner, G. & Pfeifer, M. (2002). Differences in LPS-induced activation of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and type II-like pneumocytes (A-549). *Scandinavian journal of immunology* **56**, 294-302.
- Schwenke, K. (2017). Influence of the Mumps virus on Caspase-1 activation. *Masterarbeit, Technische Universität Berlin*.
- Schwerk, C., Tenenbaum, T., Kim, K. S. & Schroten, H. (2015). The choroid plexus-a multi-role player during infectious diseases of the CNS. *Frontiers in cellular neuroscience* **9**, 80.
- Seo, T., Park, J., Lim, C. & Choe, J. (2004). Inhibition of nuclear factor kappaB activity by viral interferon regulatory factor 3 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Oncogene* **23**, 6146-6155.

- Shrivastava, G., Leon-Juarez, M., Garcia-Cordero, J., Meza-Sanchez, D. E. & Cedillo-Barron, L. (2016). Inflammasomes and its importance in viral infections. *Immunologic research* **64**, 1101-1117.
- Shrivastava, S., Mukherjee, A., Ray, R. & Ray, R. B. (2013). Hepatitis C virus induces interleukin-1beta (IL-1beta)/IL-18 in circulatory and resident liver macrophages. *Journal of virology* **87**, 12284-12290.
- Slaats, J., Ten Oever, J., van de Veerdonk, F. L. & Netea, M. G. (2016). IL-1beta/IL-6/CRP and IL-18/ferritin: Distinct Inflammatory Programs in Infections. *PLoS pathogens* **12**, e1005973.
- Smith, C. A., Davis, T., Wignall, J. M., Din, W. S., Farrah, T., Upton, C., McFadden, G. & Goodwin, R. G. (1991). T2 open reading frame from the Shope fibroma virus encodes a soluble form of the TNF receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **176**, 335-342.
- Stack, J., Haga, I. R., Schroder, M., Bartlett, N. W., Maloney, G., Reading, P. C., Fitzgerald, K. A., Smith, G. L. & Bowie, A. G. (2005). Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *The Journal of experimental medicine* **201**, 1007-1018.
- Stasakova, J., Ferko, B., Kittel, C., Sereinig, S., Romanova, J., Katinger, H. & Egorov, A. (2005). Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *The Journal of general virology* **86**, 185-195.
- STIKO (2016). Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut – 2016/2017. *Epidemiologisches Bulletin* **34**.
- Sumner, R. P., Ren, H., Ferguson, B. J. & Smith, G. L. (2016). Increased attenuation but decreased immunogenicity by deletion of multiple vaccinia virus immunomodulators. *Vaccine* **34**, 4827-4834.
- Sun, S. C. & Cesarman, E. (2011). NF-kappaB as a target for oncogenic viruses. *Current topics in microbiology and immunology* **349**, 197-244.
- Tada, K., Okazaki, T., Sakon, S., Kobayashi, T., Kurosawa, K., Yamaoka, S., Hashimoto, H., Mak, T. W., Yagita, H., Okumura, K., Yeh, W. C. & Nakano, H. (2001). Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *The Journal of biological chemistry* **276**, 36530-36534.
- Takeuchi, K., Tanabayashi, K., Hishiyama, M. & Yamada, A. (1996). The mumps virus SH protein is a membrane protein and not essential for virus growth. *Virology* **225**, 156-162.
- Takeuchi, O. & Akira, S. (2002). Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. *Microbes and infection* **4**, 887-895.
- Takeuchi, O. & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820.
- Tanabe, M., Kurita-Taniguchi, M., Takeuchi, K., Takeda, M., Ayata, M., Ogura, H., Matsumoto, M. & Seya, T. (2003). Mechanism of up-regulation of human Toll-like receptor 3 secondary to infection of measles virus-attenuated strains. *Biochemical and biophysical research communications* **311**, 39-48.
- Tartaglia, L. A. & Goeddel, D. V. (1992). Two TNF receptors. *Immunology today* **13**, 151-153.
- Taylor, G., Wyld, S., Valarcher, J. F., Guzman, E., Thom, M., Widdison, S. & Buchholz, U. J. (2014). Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletion of the SH gene induces increased apoptosis and pro-inflammatory cytokines in vitro, and is attenuated and induces protective immunity in calves. *The Journal of general virology* **95**, 1244-1254.
- Techarpornkul, S., Barretto, N. & Peeples, M. E. (2001). Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *Journal of virology* **75**, 6825-6834.
- Teclé, T., Johansson, B., Jelicic, A., Forsgren, M. & Orvell, C. (1998). Characterization of three co-circulating genotypes of the small hydrophobic protein gene of mumps virus. *The Journal of general virology* **79** (Pt 12), 2929-2937.

- Teclé, T., Mickiene, A., Johansson, B., Lindquist, L. & Orvell, C. (2002).** Molecular characterisation of two mumps virus genotypes circulating during an epidemic in Lithuania from 1998 to 2000. *Archives of virology* **147**, 243-253.
- Thrun, A. (2013).** Charakterisierung der Funktion des SH-Proteins bei der Apoptose-Induktion in Mumpsvirus-infizierten Zellen. *Bachelorarbeit, Freie Universität Berlin*.
- Travassos, L. H., Carneiro, L. A., Girardin, S. & Philpott, D. J. (2010).** Nod proteins link bacterial sensing and autophagy. *Autophagy* **6**, 409-411.
- Triantafilou, K., Kar, S., Vakakis, E., Kotecha, S. & Triantafilou, M. (2013).** Human respiratory syncytial virus viroporin SH: a viral recognition pathway used by the host to signal inflammasome activation. *Thorax* **68**, 66-75.
- Upton, C., Macen, J. L., Schreiber, M. & McFadden, G. (1991).** Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology* **184**, 370-382.
- Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Verma, I. M. & Green, D. R. (1998).** Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. *Trends in cell biology* **8**, 107-111.
- van Benten, I. J., van Drunen, C. M., Koopman, L. P., KleinJan, A., van Middelkoop, B. C., de Waal, L., Osterhaus, A. D., Neijens, H. J. & Fokkens, W. J. (2003).** RSV-induced bronchiolitis but not upper respiratory tract infection is accompanied by an increased nasal IL-18 response. *Journal of medical virology* **71**, 290-297.
- van de Veerdonk, F. L., Gresnigt, M. S., Kullberg, B. J., van der Meer, J. W., Joosten, L. A. & Netea, M. G. (2009).** Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB reports* **42**, 776-787.
- van den Hoogen, B. G., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. & Fouchier, R. A. (2002).** Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* **295**, 119-132.
- Vercammen, E., Staal, J. & Beyaert, R. (2008).** Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clinical microbiology reviews* **21**, 13-25.
- Verstrepen, L., Bekaert, T., Chau, T. L., Tavernier, J., Chariot, A. & Beyaert, R. (2008).** TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**, 2964-2978.
- Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V. & Chariot, A. (2005).** Phosphorylation of NF-kappaB and I-kappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends in biochemical sciences* **30**, 43-52.
- Vijayan, M., Seo, Y. J., Pritzl, C. J., Squires, S. A., Alexander, S. & Hahm, B. (2014).** Sphingosine kinase 1 regulates measles virus replication. *Virology* **450-451**, 55-63.
- Visvanathan, K. V. & Goodbourn, S. (1989).** Double-stranded RNA activates binding of NF-kappa B to an inducible element in the human beta-interferon promoter. *The EMBO journal* **8**, 1129-1138.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J. & Chen, Z. J. (2001a).** TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346-351.
- Wang, T., Lafuse, W. P. & Zwillig, B. S. (2001b).** NFkappaB and Sp1 elements are necessary for maximal transcription of toll-like receptor 2 induced by Mycobacterium avium. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **167**, 6924-6932.
- Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A. A. & Garcia-Sastre, A. (2000).** Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *Journal of virology* **74**, 11566-11573.
- Watson-Creed, G., Saunders, A., Scott, J., Lowe, L., Pettipas, J. & Hatchette, T. F. (2006).** Two successive outbreaks of mumps in Nova Scotia among vaccinated adolescents and young adults. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **175**, 483-488.
- Weber, C., Müller, C., Podszuweit, A., Montino, C., Vollmer, J. & Forsbach, A. (2012).** Toll-like receptor (TLR) 3 immune modulation by unformulated small interfering RNA or DNA and the role of CD14 (in TLR-mediated effects). *Immunology* **136**, 64-77.

- Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S. & Cao, Z. (1997).** MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* **7**, 837-847.
- Westmore, G. A., Pickard, B. H. & Stern, H. (1979).** Isolation of mumps virus from the inner ear after sudden deafness. *British medical journal* **1**, 14-15.
- Whitehead, S. S., Bukreyev, A., Teng, M. N., Firestone, C. Y., St Claire, M., Elkins, W. R., Collins, P. L. & Murphy, B. R. (1999).** Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. *Journal of virology* **73**, 3438-3442.
- WHO (2007).** Mumps virus vaccines. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* **82**, 51-60.
- WHO (2010).** Erneuerung des Engagements für die Eliminierung von Masern und Röteln und die Prävention der Rötelnembryopathie in der Europäischen Region der WHO bis zum Jahr 2015, Dokument EUR/RC60/15.
- WHO (2012).** Mumps virus nomenclature update: 2012. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* **87**, 217-224.
- WHO (2017).** Mumps reported cases, Stand 03.03.2017, Website: http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tsincidencemumps.html.
- Wickremasinghe, M. I., Thomas, L. H., O'Kane, C. M., Uddin, J. & Friedland, J. S. (2004).** Transcriptional mechanisms regulating alveolar epithelial cell-specific CCL5 secretion in pulmonary tuberculosis. *The Journal of biological chemistry* **279**, 27199-27210.
- Wilson, R. L., Fuentes, S. M., Wang, P., Taddeo, E. C., Klatt, A., Henderson, A. J. & He, B. (2006).** Function of small hydrophobic proteins of paramyxovirus. *Journal of virology* **80**, 1700-1709.
- Woznik, M. (2012).** Analyse der Funktion des SH-Proteins als Virulenzfaktor des Mumpsvirus. *Doktorarbeit, Freie Universität Berlin*.
- Woznik, M., Rodner, C., Lemon, K., Rima, B., Mankertz, A. & Finsterbusch, T. (2010).** Mumps virus small hydrophobic protein targets ataxin-1 ubiquitin-like interacting protein (ubiquilin 4). *The Journal of general virology* **91**, 2773-2781.
- Wurzer, W. J., Ehrhardt, C., Pleschka, S., Berberich-Siebelt, F., Wolff, T., Walczak, H., Planz, O. & Ludwig, S. (2004).** NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *The Journal of biological chemistry* **279**, 30931-30937.
- Xu, L. G. & Shu, H. B. (2002).** TNFR-associated factor-3 is associated with BAFF-R and negatively regulates BAFF-R-mediated NF-kappa B activation and IL-10 production. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **169**, 6883-6889.
- Xu, M., Skaug, B., Zeng, W. & Chen, Z. J. (2009).** A ubiquitin replacement strategy in human cells reveals distinct mechanisms of IKK activation by TNFalpha and IL-1beta. *Molecular cell* **36**, 302-314.
- Xu, P., Chen, Z., Phan, S., Pickar, A. & He, B. (2014).** Immunogenicity of novel mumps vaccine candidates generated by genetic modification. *Journal of virology* **88**, 2600-2610.
- Xu, P., Huang, Z., Gao, X., Michel, F. J., Hirsch, G., Hogan, R. J., Sakamoto, K., Ho, W., Wu, J. & He, B. (2013).** Infection of mice, ferrets, and rhesus macaques with a clinical mumps virus isolate. *Journal of virology* **87**, 8158-8168.
- Xu, P., Li, Z., Sun, D., Lin, Y., Wu, J., Rota, P. A. & He, B. (2011).** Rescue of wild-type mumps virus from a strain associated with recent outbreaks helps to define the role of the SH ORF in the pathogenesis of mumps virus. *Virology* **417**, 126-136.
- Xu, P., Luthra, P., Li, Z., Fuentes, S., D'Andrea, J. A., Wu, J., Rubin, S., Rota, P. A. & He, B. (2012).** The V protein of mumps virus plays a critical role in pathogenesis. *Journal of virology* **86**, 1768-1776.

- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. & Akira, S. (2003).** Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science (New York, NY)* **301**, 640-643.
- Yang, F., Tang, E., Guan, K. & Wang, C. Y. (2003).** IKK beta plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **170**, 5630-5635.
- Yoboua, F., Martel, A., Duval, A., Mukawera, E. & Grandvaux, N. (2010).** Respiratory syncytial virus-mediated NF-kappa B p65 phosphorylation at serine 536 is dependent on RIG-I, TRAF6, and IKK beta. *Journal of virology* **84**, 7267-7277.
- Zamanian-Daryoush, M., Mogensen, T. H., DiDonato, J. A. & Williams, B. R. (2000).** NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. *Molecular and cellular biology* **20**, 1278-1290.

Liste eigener Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Franz S., Rennert P., Woznik M., Grützke J., Lüdde A., Arriero Pais E.M., Finsterbusch T., Geyer H., Mankertz A., Friedrich N. (2017) Mumps Virus SH protein inhibits NF- κ B activation by interacting with TNFR1, IL-1R1, and TLR3 complexes.
J. Virol.: Epub Jun 28. doi: 10.1128/JVI.01037-17.

Konferenzen

Franz S., Friedrich N., Geyer H., Mankertz A. (2016) The mumps virus small hydrophobic protein decreases phosphorylation of p65, IKK β and I κ B α in the context of a virus infection.
Posterpräsentation auf der *Jahrestagung der GfV* in Münster, Deutschland

Mankertz A., Geyer H., Richter E., Rennert P., Franz S., Friedrich N. (2015) The small hydrophobic protein of mumps virus influences NF- κ B and MAPK ERK signaling pathways.
Posterpräsentation (Co-Autor) auf der *International Conference on Negative Strand Viruses* in Siena, Italien

Franz S., Friedrich N., Geyer H., Mankertz A. (2015) The mumps virus small hydrophobic protein decreases NF- κ B activation following stimulation of different cellular receptors.
Posterpräsentation auf der *Jahrestagung der GfV* in Bochum, Deutschland

Geyer H., Rennert P., Franz S., Dartscht M., Thrun A., Friedrich N., Mankertz A. (2014) Mumps virus small hydrophobic protein interferes with the MAPK signaling pathway.
Posterpräsentation (Co-Autor) auf der *Jahrestagung der GfV* in Alpbach, Österreich

Friedrich N., Franz S., Woznik M., Schwarz E., Mankertz A. (2013) The mumps virus small hydrophobic protein interferes with NF κ B signaling and apoptosis induction in infected cells.
Vortrag (Co-Autor) auf der *Jahrestagung der GfV* in Kiel, Deutschland

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Danksagung

Zuallererst geht mein Dank an Prof. Dr. Lothar Wieler und PD Dr. Lars Schaade für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen am Robert Koch-Institut. Bei Prof. Dr. Markus Wahl möchte ich mich ganz herzlich für die erneute Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Bei der Sonnenfeld-Stiftung und der BLUMENTHAL-STIFTUNG möchte ich mich für die Finanzierung meines Projektes bedanken, die es mir ermöglicht hat, die Arbeit an meiner Promotion fokussiert durchführen und abschließen zu können.

Für die Möglichkeit nach meiner Diplomarbeit in ihrer Arbeitsgruppe weiter an einem so spannenden und liebgewonnenen Thema forschen zu können, möchte ich mich bei Prof. Dr. Annette Mankertz sehr herzlich bedanken. Vielen Dank für die stete wissenschaftliche Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Besonders Dr. Nicole Friedrich gebührt mein tiefempfundener Dank für all ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht während der letzten Jahre. Du bist immer für mich da gewesen, hast mir mit Rat und Tat bei allen Fragen und Problemen zur Seite gestanden und mich davon überzeugen können, dass am Ende alles gut wird, wenn nach einem langen Arbeitstag im Labor mal wieder nichts herausgekommen ist. Auch bei Dr. Henriette Geyer bedanke ich mich ganz herzlich, die mir mit ihrer spritzigen Art gezeigt hat, was man alles schaffen kann und mit deren Unterstützung ich immer rechnen konnte. Dr. Kazimierz Madela möchte ich für seine engagierte Hilfe beim Mikroskopieren meiner Proben danken.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern von FG12 danke ich für das tolle Arbeitsklima, das sehr dazu beigetragen hat, mich immer wohl und niemals alleine zu fühlen. Insbesondere möchte ich Paul für unsere unzähligen langen Gespräche mit neuen Denkanstößen nicht nur für die Forschung und für seine ausgeglichene, verlässliche Art in unserer Zusammenarbeit danken, die ich schmerzlich vermissen werde. Anne danke ich für ihr offenes Ohr und Interesse für alle Themen und ihre umgehende Hilfe bei jeglichen Problemen. Jenny und Eva möchte ich für ihre unbezahlbare Mithilfe im Labor danken. Bei Agnieszka, Enrico und Julia bedanke ich mich für das Wissen immer Weggefährten zu haben, mit denen ich gemeinsam eine Lösung für einfach alles finden kann. Auch Petra, Christine, Heidrun, Karla, Lisa, Amy, Anna, Caro, Juliane, den Michas, Renate, Evi, Gudrun und Sandra danke ich für all ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Ein sehr persönliches Dankeschön geht an meine Familie und Freunde besonders für ihr Verständnis und alle aufmunternden Worte. Vor allem meine Eltern waren mir immer eine große Stütze, genau wie mein Bruder und natürlich Jan, den ich wie in den letzten Jahren auch in Zukunft nicht an meiner Seite missen möchte.