

Aus der Medizinischen Klinik
mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Rolle der mitochondrialen (Dys-)funktion im Apoptoseprozess humaner
Alveolarepithelzellen während der Infektion mit Influenza-A-Viren

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Eva Pappe
aus Erfurt

Datum der Promotion: 18.12.2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung	9
Abstract	10
1. Einleitung	11
1.1 Ambulant erworbene Pneumonie	11
1.2 Influenza-A-Virus Infektion	11
1.2.1 Klinik	12
1.2.2 Therapie und Prävention	13
1.3 Pathogenese der Influenza-A-Virus Infektion	15
1.3.1 Aufbau und Replikation von Influenza-A-Viren	15
1.3.2 Pulmonale Folgen einer schweren Influenza-A-Viruspneumonie	18
1.4 Mitochondrien	20
1.4.1 Aufbau und Funktion von Mitochondrien	20
1.4.2 Rolle von Mitochondrien bei der angeborenen Immunantwort	21
1.5 Apoptose	24
1.5.1 Extrinsischer Apoptoseweg	24
1.5.2 Intrinsischer Apoptoseweg	25
1.5.3 Zelluläre Apoptoseinhibitoren	26
1.6 Apoptoseprozesse während der Influenza-A-Virus Infektion	27
1.7 Fragestellung	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Material	32
2.1.1 Zelllinien	32
2.1.2 Pathogene	32
2.1.3 Stimulanzen	32
2.1.4 Enzyme	32
2.1.5 Plasmide	32
2.1.6 Zell- und Gewebekulturmedien mit Zusätzen	33

Inhaltsverzeichnis

2.1.7 Chemikalien und Reagenzien	34
2.1.8 Puffer und Lösungen	36
2.1.9 Antikörper	39
2.1.10 Kits und Assays	40
2.1.11 Verbrauchsmaterialien	40
2.1.12 Geräte	41
2.1.13 Software	42
2.2 Methoden	43
2.2.1 Zell- und Gewebekultur	43
2.2.2 Influenza-A-Virus Infektion von Zellkulturen und humanem Lungengewebe	45
2.2.3 Biochemische Methoden	47
2.2.4 Immunhistochemie	49
2.2.5 Lebendzell- und gewebsmikroskopie	50
2.2.6 Spektrale Konfokalmikroskopie	52
2.2.7 Hochauflösende Mikroskopie	53
2.2.8 Bildanalyse	53
2.2.9 Statistische Auswertung	54
3 Ergebnisse	55
3.1 Influenza-A-Virus induziert mitochondriale Alterationen und Zelltod im humanen Lungengewebe	55
3.2 Infektion und Replikation von Influenza-A-Viren in A549-Zellen.....	57
3.3 Influenza-A-Virus induziert ex- und intrinsische Apoptose	59
3.4 Caspasen-3/7-Aktivierung und Alteration des mitochondrialen Membranpotentials während der Influenza-A-Virus Infektion	60
3.5 Auswirkungen der Influenza-A-Virus Infektion auf die intrazelluläre ATP- Konzentration.....	61
3.6 Auswirkung der Influenza-A-Virus Infektion auf die mitochondriale Motilität	64
3.7 Einzelzellanalysen mitochondrialer Alterationen und Apoptoseinduktion während der Influenza-A-Virus Infektion	65
3.8 Influenza-A-Virus induziert Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, BAX-Translokation und Aktivierung von Caspasen 3/7 in der humanen Lunge	69

Inhaltsverzeichnis

4 Diskussion	73
4.1 Zusammenfassung der zentralen Ergebnisse	73
4.2 Bedeutung von Apoptoseprozessen für die Pathogenese der Influenza-A- Virus Infektion	74
4.3 Auswirkungen der Influenza-A-Virus Infektion auf mitochondriale Funktionen	81
4.3.1 Mitochondriales Membranpotential	81
4.3.2 Mitochondriale ATP-Produktion.....	83
4.3.3 Mitochondriale Motilität.....	85
4.4 Techniken der Lebendzellmikroskopie zur Untersuchung der Virus-Wirt- Interaktion während der Influenza-A-Virus Infektion	86
4.5 Humane Lungenmodelle zur Untersuchung der Pathogenese von Influenza-A-Virus Infektionen	87
4.6 Ausblick: Virus-Wirt-Interaktion als Grundlage für die Entwicklung neuer antiviraler Therapien	90
Literaturverzeichnis	93
Eidesstattliche Versicherung	112
Lebenslauf	113
Publikationen	115
Danksagung	116

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Influenza-A-Virus.	15
Abbildung 2: Schematische Struktur eines Mitochondriums	20
Abbildung 3: Antivirale Immunantwort an Mitochondrien.	23
Abbildung 4: Mitochondrial vermittelter intrinsischer Apoptoseweg.	26
Abbildung 5: Spektrale, konfokale Lebendgewebemikroskopie von Influenza-A-Virus infiziertem humanen Lungengewebe.	56
Abbildung 6: Replikation von Pan/99(H3N2) im humanen Lungengewebe.....	57
Abbildung 7: Etablierung eines Influenza-A-Virus Infektionsmodells in A549-Zellen. ...	58
Abbildung 8: Nachweis aktivierter Caspasen 8, 9 und 3 in Zelllysaten von virusinfizierten A549-Zellen.	59
Abbildung 9: Echtzeitmessung von Caspasen-3/7-Aktivierung und mitochondrialem Membranpotential in virusinfizierten A549-Zellen mittels konfokaler Lebendzellmikroskopie.....	61
Abbildung 10: Charakterisierung von FRET-basierten intrazellulären ATP-Sensoren. .	62
Abbildung 11: Intrazelluläre ATP-Konzentration in A549-Zellen während der Influenza- A-Virus Infektion.	64
Abbildung 12: Influenza-A-Virus beeinflusst mitochondriale Motilität in A549-Zellen....	65
Abbildung 13: Caspasen-3/7-Aktivierung unabhängig von mitochondrialer Dysfunktion in virusinfizierten A549-Zellen.	67
Abbildung 14: Mitochondriale Alteration mit <i>cytochrom C</i> Freisetzung und BAX- Aktivierung induziert Apoptose in A549-Zellen während der Influenza-A-Virus Infektion.....	68
Abbildung 15: Lokalisation von BAX an den Mitochondrien von virusinfizierten A549- Zellen.....	69
Abbildung 16: Verlust von mitochondrialem Membranpotential induziert Apoptose in virusinfizierten Zellen des humanen Lungengewebes während der Influenza-A- Virus Infektion.....	70
Abbildung 17: Influenza-A-Virus induziert Translokation von BAX zu den Mitochondrien im humanen Lungengewebe.	72
Abbildung 18: Modell der Zelltodprozesse und Rolle von Mitochondrien während der Influenza-A-Virus Infektion.	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Influenza-A-Virus Proteine und ihre Funktion	16
Tabelle 2: Influenza-A-Virus Proteine und ihre Bedeutung bei der Apoptose.	28
Tabelle 3: Zelllinien.....	32
Tabelle 4: Pathogene	32
Tabelle 5: Stimulanzen	32
Tabelle 6: Enzyme	32
Tabelle 7: Plasmide	32
Tabelle 8: Medien und Zusätze für A549-Zellen.....	33
Tabelle 9: Medien und Zusätze MDCK-Zellen.....	34
Tabelle 10: Medien und Zusätze für humanes Lungengewebe.....	34
Tabelle 11: Chemikalien und Reagenzien.....	36
Tabelle 12: Puffer und Lösungen	38
Tabelle 13: Primärantikörper für Western Blot	39
Tabelle 14: Sekundärantikörper für Western Blot.....	39
Tabelle 15: Primärantikörper für Immunfluoreszenz.....	40
Tabelle 16: Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz	40
Tabelle 17: Kits und Assays	40
Tabelle 18: Verbrauchsmaterialien	41
Tabelle 19: Geräte	42
Tabelle 20: Software.....	42

Abkürzungsverzeichnis

AEC	Alveolarepithelzellen
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
ATEAM	<i>adenosine 5'-triphosphate indicator based on epsilon subunit for analytical measurements</i>
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAK	<i>BCL-2 antagonist killer</i>
BAX	<i>BCL-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BIR	<i>baculovirus IAP repeat domain</i>
CAP	<i>community acquired pneumonia</i>
CARD	<i>caspase activation and recruitment</i>
CFP	cyanfluoreszierende Protein
cRNA	<i>complementary RNA</i>
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DAPI	6-Diamidin-2-phenylindol
DD	<i>death domain</i>
DIC	Differentialinterferenzkontrast
Drp1	<i>dynammin-related protein 1</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fas-L	Fas-Ligand
FRET	Förster-Resonanzenergie-Transfer
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HA	Hämagglutinin
IAPs	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i>
IAV	Influenza A-Viren
IBV	Influenza B-Viren
IFN	Interferone
IL-1	<i>interleukine-1</i>
IL-1 β	<i>macrophage inflammatory protein 1-beta</i>
IRF	<i>interferon reguatory factor</i>
JNK	<i>jun-n-terminal kinase</i>

Abkürzungsverzeichnis

M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinasen</i>
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signalling protein</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	messenger RNA
mtDNA	mitochondriale DNA
m $\Delta\Psi$	mitochondriales Membranpotential
NA	Neuraminidase
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NLRP3	<i>nod-like receptor family pyrin domain-containing 3</i>
PB1	Polymeraseprotein 1
PB2	Polymeraseprotein 2
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehydlösung
pfu	<i>plaque forming unit</i>
PI3K	<i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PKB	<i>akt/protein kinase B</i>
PLK	<i>polo-like kinase</i>
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-Inducible Gene I</i>
RING	<i>really interesting new gene</i>
RLRs	<i>retinoic acid-inducible gene I-like receptor</i>
ROI	<i>region of interest</i>
SIM	<i>structured illumination microscopy</i>
STING	<i>stimulator of interferon genes</i>
TFN	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie
TMRE	Tetramethylrhodamin Ethyl Ester
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
vRNP	virales Ribonukleoprotein

Zusammenfassung

Die ambulant erworbene Pneumonie ist eine akute Infektion des Lungengewebes und führt weltweit zu einer hohen Morbidität und Mortalität. Neben bakteriellen Erregern zählen Influenza-A-Viren (IAV) zu den häufigsten isolierten Erregern. Schwere Verläufe einer IAV-Infektion können zu einem akuten Lungenversagen führen. Als ursächlich hierfür wird ein diffuser Alveolarschaden mit Barrierestörung der alveolo-kapillaren Membran angesehen, infolge dessen der pulmonale Gasaustausch gestört ist. Ein wesentlicher Faktor des Alveolarschadens scheint eine erhöhte Apoptoserate von Typ-II Alveolarepithelzellen (AEC II) zu sein. Allerdings sind die zugrundeliegenden Mechanismen der Apoptoseinduktion während der IAV-Infektion bisher nur unvollständig verstanden. Insbesondere die Rolle der mitochondrialen Dysfunktion ist weitgehend unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird erstmals in einem humanen *ex vivo* Lungenmodell der zeitliche Infektionsverlauf von IAV in AEC II Zellen mittels Lebendgewebemikroskopie gezeigt. Zeitgleich konnten Alterationen an den Mitochondrien beobachtet werden. Überdies gelang nach Etablierung eines *in vitro* Infektionsmodells mit A549-Zellen für die Lebendzellmikroskopie die Messung mitochondrialer Funktionen während der IAV-Infektion. Dabei konnte demonstriert werden, dass mitochondriale Funktionen über einen langen Zeitraum während der IAV-Infektion erhalten bleiben. Trotz frühzeitiger Caspase-3/7-Aktivierung finden mitochondriale Alterationen erst sehr spät im Infektionsprozess statt. Sobald diese eintraten, konnte eine Abrundung der Mitochondrien, ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, die Rekrutierung von *BCL-2-associated X protein* sowie eine Freisetzung von *cytochrom C* detektiert werden, welche eine starke Caspase 3/7-Aktivierung induzierte und zur Apoptose der infizierten Zelle führte.

Schlussfolgernd zeigen die Ergebnisse, dass IAV-infizierte AEC II über einen langen Zeitraum der Infektion stabile mitochondriale Parameter aufweisen und erst mit deren später Alteration Apoptose in infizierten Zellen auftritt, trotz bereits voraktivierter Effektor-Caspasen. Hiermit geben die vorliegenden Daten Hinweise auf die zentrale Bedeutung der Mitochondrien im IAV-Infektionsprozess bis hin zur Induktion des Zelltodes.

Abstract

Community acquired pneumonia is an acute infection of lung tissue and causes high morbidity and mortality worldwide. Influenza A virus (IAV) is the most common isolated pathogen besides bacteria. Severe IAV infections can lead to acute lung injury. The cause of this is considered to be a diffuse alveolar damage with disruption of the alveolar-capillary barrier resulting in disturbance of pulmonary gas exchanges. An important factor of alveolar damage seems to be an increased apoptosis rate of type II alveolar epithelial cells (AEC II). However, the underlying mechanism of apoptosis induction during IAV infection and the contribution of mitochondrial alterations in particular are currently only partially understood.

In this thesis it was possible for the first time to show the effects of an IAV infection in real time on mitochondria in AEC II using spectral confocal microscopy. Moreover, after establishment of an *in vitro* infection model with A549 cells for live cell imaging, mitochondrial activity could be measured. It could be demonstrated that mitochondrial activity was unaffected over the timespan of an IAV infection. Even though early caspase 3/7 activation was detected, mitochondrial alterations took place very late during the infection process. As soon as mitochondrial alterations occurred, mitochondrial fragmentation, loss of mitochondrial membran potential, recruitment of *BCL-2-associated X protein* and the release of cytochrom C could be detected, which induced a strong caspase 3/7 activation und led to apoptosis of the infected cells.

In summary, the results indicate that IAV infected AEC II preserve mitochondrial activity over a long timespan and despite preactivated effector caspases, only dying cells have alterations of mitochondria. The available data hereby supports the importance of mitochondria during the IAV infection process up to the induction of cell death.

1. Einleitung

1.1 Ambulant erworbene Pneumonie

Die ambulant erworbene Pneumonie (*community acquired pneumonia*; CAP) ist definiert als eine akute mikrobielle Infektion des Lungenparenchyms und zählt weltweit zu den häufigsten Infektionserkrankungen [1-3]. Durch jährliche Epidemien und länderübergreifende Pandemien hat sie Auswirkung auf die Sozialgesellschaft, Ökonomie und Weltpolitik [4, 5]. Weltweit steht die CAP an dritter Stelle der zehn häufigsten Todesursachen und führt jährlich zu etwa drei Millionen Todesfällen, insbesondere bei Kindern unter 5 Jahren und älteren Menschen über 65 Jahre [3, 6]. In Deutschland wird die Inzidenz auf 9.7 Fälle pro 1000 Einwohner und Jahr geschätzt [2]. Aufgrund der hohen Hospitalisierungsrate von 46,5 % der Fälle stellt die CAP auch in Deutschland eine große ökonomische Belastung dar [7]. Begünstigte Faktoren für eine Hospitalisierung und damit auch schwere Verlaufsformen sind u.a. höheres Alter, Komorbiditäten und Immunsuppression [2, 7]. Die Diagnose CAP ergibt sich aus den klinischen Symptomen wie Husten mit Auswurf, Fieber und Dyspnoe in Verbindung mit typischen auskultatorisch hörbaren Rasselgeräuschen und dem radiologischen Nachweis eines pneumogenen Infiltrates [2]. Der häufigste ursächliche Erreger einer CAP ist *Streptococcus pneumoniae* [1, 3]. Neben Bakterien werden respiratorische Viren wie Influenzaviren, respiratorische Synzytial-Viren, Parainfluenzaviren oder Rhinoviren als Erreger isoliert [8]. In Deutschland sind Viren für etwa 12 % aller CAP Fälle verantwortlich, darunter zählen IAV zu den häufigsten Erregern bei Erwachsenen [9, 10].

1.2 Influenza-A-Virus Infektion

IAV gehören zur Gruppe der Orthomyxoviridae, die in Typen A, B und C eingeteilt werden. Von klinischer Bedeutung sind die Typen A und B, weil sie saisonale Epidemien während der kalten Jahreszeit auf der Nordhalbkugel von Dezember bis April verursachen [8]. Aufgrund der Vielzahl verschiedener Varianten werden IAV zusätzlich in weitere Subtypen anhand ihrer zwei antigenwirksamen Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) auf der Oberfläche der Virushülle eingeteilt. Neben den humanpathogenen saisonalen Subtypen H1 - H3, N1 und N2 konnten noch weitere 18 HA und 11 NA Varianten aus Tieren, vornehmlich Wildvögeln, isoliert werden [11].

Zwei verschiedene IAV-Ausbrüche sind in der Bevölkerung bekannt: saisonale und sporadisch pandemische Ausbrüche. Die Ursache für saisonale Epidemien ergibt sich aus

Einleitung

Mechanismen der Antigenvariation auf der Oberfläche der Virushülle. Durch fehlende Korrekturfähigkeit der RNA-Polymerasen entstehen eine Reihe von Punktmutationen in den Genen der viralen Oberflächenantigene HA und NA. Dieser Prozess, auch bekannt als *antigen drift*, führt dazu, dass Viren Abwehrmechanismen des Immunsystems unterwandern und im Wirt bereits vormals gebildete Antikörper gegen die genetisch leicht veränderten Viren ihre Wirksamkeit verlieren [12-15]. Jährlich zirkulieren auf diese Weise Viren des gleichen Subtyps mit veränderten HA- und NA-Proteinen in der Bevölkerung und lösen Epidemien mit großen gesundheitlichen und ökonomischen Schäden aus [12]. Pandemische Ausbrüche werden im Gegensatz dazu durch das Erscheinen neuartiger IAV-Stämme ausgelöst. Die sporadischen Ereignisse entstehen durch den Prozess des *antigen shift*, bei dem eine Zelle von zwei unterschiedlichen IAV-Subtypen infiziert wird und die Gensegmente der Viren untereinander ausgetauscht werden. Dabei besitzen insbesondere Schweine als „*mixing vessel*“ eine besondere Bedeutung bei der Entstehung neuer pathogener Influenzaviren. Sowohl aviäre als auch humane Influenzaviren können im Respirationstrakt von Schweinen replizieren, was eine genetische Reassortierung begünstigt und eine Durchbrechung der Speziesbarriere von humanen, aviären und porzinen Virusstämmen ermöglichen kann [12, 14, 16]. Die neuartigen Virusstämme infizieren eine Bevölkerung, die noch keine spezifische Immunität besitzt wodurch es in Folge zu einer hohen Infektionsrate mit schneller Ausbreitung kommen kann [13]. Im letzten Jahrhundert kam es zu vier Influenza-Pandemien mit jeweils unterschiedlicher Herkunft: ausgelöst durch H1N1 in 1918 („Spanische Grippe“), H2N2 in 1957 („Asiatische Grippe“), H3N2 in 1968 („Hongkong Grippe“) und zuletzt durch H1N1 in 2009 („Schweinegrippe“) [16]. Nach jeder Pandemie etabliert sich der neue Virusstamm in der humanen Bevölkerung und ersetzt bzw. zirkuliert zusammen mit vorherigen Subtypen.

1.2.1 Klinik

Die Übertragung von IAV geschieht durch eine Tröpfchen- oder Schmierinfektion. Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch plötzlichen Krankheitsbeginn, hohes Fieber, Muskel- und Kopfschmerzen und ein allgemeines Schwächegefühl. Zusätzlich können nicht-produktiver Husten, Halsschmerzen, Konjunktivitis sowie klarer, wässriger Tränenfluss und nasaler Ausfluss auftreten. Abhängig vom Alter und Gesundheitszustand des Patienten variieren die Krankheitsverläufe von milden und grippalen Symptomen bis hin zu schweren Pneumonien [12]. In der körperlichen Untersuchung können sich unspezifische

Einleitung

Befunde wie Rhinitis und eventuell pfeifende Atemgeräusche zeigen. Die Rasselgeräusche als klinisches Korrelat eines pneumonischen Infiltrates fehlen im Allgemeinen und treten erst bei Komplikationen auf [8]. Als Hinweise für eine virale Pneumonie können interstitielle bilaterale Infiltrate in der Thoraxröntgenaufnahme erscheinen [17]. Zur weiteren Diagnostik und insbesondere auch zur Abgrenzung von bakteriellen Pneumonien wurden Influenza-Schnelltests mit Nachweis von verschiedenen Influenza-A/B-Antigenen aus Nasen- und Rachenraum entwickelt. Allerdings besitzen diese Tests nur eine geringe Sensitivität, sodass zusätzlich *polymerase chain reaction* (PCR) gestützte Verfahren genutzt werden [12, 18]. Komplikation einer IAV-Infektion ist die primäre Pneumonie mit respiratorischem Versagen und Entwicklung eines *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) [8, 12, 17, 18]. Deutlich öfter treten allerdings sekundäre bakterielle Infektionen im Verlauf oder in Folge einer IAV-Infektion auf, verursacht durch Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (auch methicillinresistente Stämme), *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pyogenes* [12, 19]. Bakterielle Superinfektionen steigern häufig die Schwere des Krankheitsverlaufes mit Risiko eines ARDS und sind folglich auch ein häufiger Grund einer IAV verbundenen Hospitalisierung [20, 21].

1.2.2 Therapie und Prävention

Der Umfang einer Therapie bei IAV-Infektionen hängt stark von den klinischen Symptomen des Erkrankten ab. In den meisten Fällen ist von einer unkomplizierten Infektion der oberen Atemwege auszugehen und die Therapie beschränkt sich auf unterstützende Maßnahmen wie ausreichende Volumentherapie und Fiebersenkung [13, 22]. Allerdings kann bei hochgradigem Verdacht, insbesondere während der Saison, bei Patienten mit hohem Risiko für Komplikationen innerhalb von 48 h nach Symptombeginn eine antivirale Therapie eingeleitet werden [13]. Dafür sind zwei Klassen von Virusstatika in Europa und den USA für die Therapie von milden bis schweren IAV-Infektionen zugelassen [12]. Amantadin und Rimantadin sind Vertreter der Klasse von M2-Membranproteinhemmer und wirksam gegen IAV. Allerdings haben M2-Membranproteinhemmer keine Wirkung gegen Influenza-B-Viren (IBV). Zudem haben aktuell zirkulierenden IAV Resistenzen entwickelt, sodass eine Anwendung in der klinischen Praxis nicht mehr empfohlen wird [12, 23]. Die zweite Klasse umfasst Neuraminidasehemmer wie Oseltamivir, Zanamivir und Peramivir. Sie verhindern die Freisetzung von neugebildeten Viren aus infizierten Zellen und besitzen Wirksamkeit gegen IAV und IBV [13, 22]. Während bei unkomplizierten IAV-Infektionen lediglich eine geringe Verkürzung der Krankheitsdauer erzielt wird, kamen

Einleitung

Studien an hospitalisierten Patienten zu dem Ergebnis, dass eine frühe Gabe von Neuraminidasehemmern zu einer statistisch signifikanten Senkung des Mortalitätsrisikos führten [24, 25]. Aus diesem Grund empfehlen verschiedene Fachgesellschaften eine frühe antivirale Therapie bei Patienten, die wegen einer IAV-Infektion stationär aufgenommen werden, eine schwere komplizierte und progressive Erkrankung aufweisen oder zu einer Risikogruppen angehören [23]. Jedoch wurden bereits gegenüber Oseltamivir Resistenzen beobachtet, vermutlich ausgelöst durch eine Genmutation im NA-Protein [8, 10, 12, 13]. So führte beispielsweise ein Aminosäureaustausch von Histidin gegen Tyrosin im NA-Protein des H1N1-Virus während der Influenza-Saison von 2007-2008 zu einer Resistenzbildung gegenüber Oseltamivir [12]. Die effektivste Methode zur Prävention und Kontrolle von Influenzaausbrüchen sind Impfungen [22, 23]. Als Impfstoffe werden Totimpfstoffe mit drei oder vier Antigenen von zwei inaktivierten Subtypen des IAV und von einem (trivalent) oder von beiden IBV-Typen (tetraivalent) verwendet [23]. Die saisonalen Veränderungen von NA und HA auf der Virusoberfläche erfordern die jährliche Entwicklung neuer Impfstoffe. Auf Basis klinischer Informationen, Daten aus Laboren und nationalen Überwachungseinrichtungen erstellt die Weltgesundheitsorganisation Empfehlungen für die Zusammensetzung der Impfstoffe [12]. In Deutschland ist der tetraivalente Impfstoff seit 2018 Standard aufgrund der schwer verlaufenden Saison 2017/2018, in der beide IBV-Typen in der Bevölkerung zirkulierten [26]. Die ständige Impfkommission vom Robert-Koch-Institut empfiehlt eine Impfung für alle Personen über 60 Jahren, Risikopatienten mit chronischen Erkrankungen und Schwangeren ab dem zweiten Trimenon sowie Bewohnern von Alters- und Pflegeheimen. Zudem ist sie indiziert bei Personen, die im Gesundheitswesen oder im engen Kontakt mit Geflügel/Wildvögeln arbeiten [23, 26]. Obwohl Impfungen nach wie vor den besten Schutz vor einer IAV-Infektion darstellen, sind die Impfquoten in Deutschland niedrig [23]. Laut Robert-Koch-Institut waren lediglich 34,8 % aller Personen über 59 Jahre und 24 % der chronisch Kranken im Jahr 2018 geimpft [27].

1.3 Pathogenese der Influenza-A-Virus Infektion

1.3.1 Aufbau und Replikation von Influenza-A-Viren

IAV sind behüllte Viren mit einer einzelsträngigen, negativen RNA. Die Virushülle besteht aus der Plasmamembran der infizierten Wirtszelle, in der das Virus sich zuvor vermehrt hat. Eingelagert in die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran sind die drei viruseigenen Transmembranproteine HA, NA und das Matrixprotein 2 (M2) (Abbildung 1) [11, 28]. HA, mit dessen homotrimerischen Spikes, bildet den Hauptanteil und ragt zusammen mit NA, einem Homotetramer, über die Virushülle hinaus. Während HA und NA mit *lipid rafts* der Virushülle assoziiert sind, ist M2 an Cholesterol gebunden [28]. M2 hat die Funktion eines Protonenkanals und bildet mit 16-20 Molekülen pro Virus den kleinsten Anteil der Hülle [28]. Auf der Innenseite der Lipiddoppelschicht befindet sich eine Schicht des Matrixproteins 1 (M1) die eine Matrix bildet und den Viruskern einschließt [11, 28, 29].

Das Genom besteht aus acht RNA-Segmenten, die zusammen mit dem Nukleoprotein (NP) die viralen Ribonukleoprotein (vRNP) Komplexe bilden. Die acht Segmente sind nummeriert in absteigender Richtung nach ihrer Länge und kodieren jeweils für ein bis zwei virale Proteine (Tabelle 1).

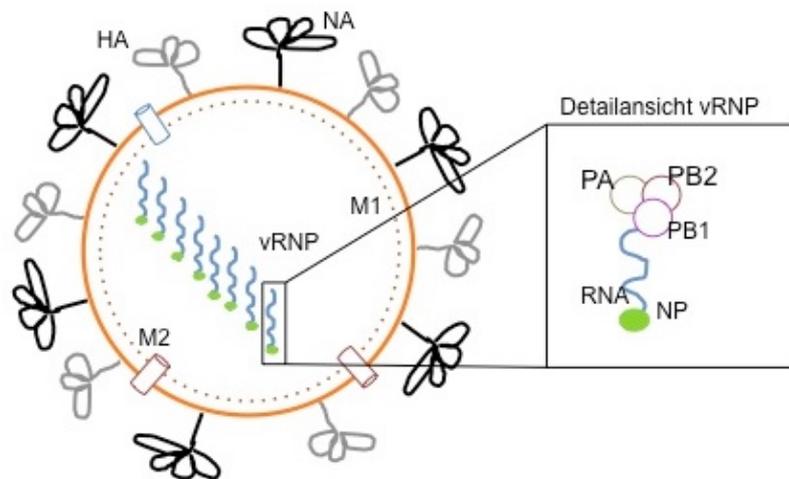


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Influenza-A-Virus. Auf der Außenseite der Virushülle sind die Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) und Matrixprotein M2 (M2). Der Virus-Kern wird vom Matrixprotein M1 (M1) ausgekleidet und enthält die Virus-RNA mit den 8 Segmenten, die jeweils zusammen mit den Nukleoproteinen (NP) und dem RNA-Polymerase-Komplex aus PB2 (basisches Polymeraseprotein 2), PB1 (basisches Polymeraseprotein 1) und PA (saures Protein) den viralen Ribonukleoprotein (vRNP)-Komplex bilden. Die Abbildung wurde modifiziert nach Grant E.J. et al. [15].

Einleitung

Zu jedem dieser einzelnen Segmente ist jeweils ein RNA-Polymerase-Komplex zugehörig, das aus den drei Untereinheiten der viralen Polymerase besteht: basisches Polymeraseprotein 2 (PB2), basisches Polymeraseprotein 1 (PB1) und saures Protein (PA) [30]. Die Segmente 1, 3, 4, 5 und 6 kodieren jeweils für PB2, PA, HA, NP und NA. Das Segment 2 kodiert für PB1 und besitzt bei einigen IAV-Stämmen einen zusätzlichen Leseraster, das für PB1-F2 kodiert, einem viralen Protein mit proapoptotischer Aktivität [31]. Die Segmente 7 und 8 kodieren jeweils für zwei Proteine. Das Segment 7 kodiert für die beiden Matrixproteine M1 und M2. Aus dem alternativen *splicing*-Produkt des Segmentes 8 entstehen zusätzlich das Nicht-Strukturprotein 1 (NS1) und 2 (NEP/NS2) [11]. Mittels HA bindet IAV an N-Acetyl-Neuraminsäuren, Derivate der Sialinsäure, auf der Oberfläche der Wirtszelle. Die endständigen Kohlenstoffatome der Sialinsäure bilden eine α -2,3- oder α -2,6 glykosidische Verbindung mit Galactose aus, welche jeweils in eine unterschiedliche sterische Konfiguration resultiert. HA-Moleküle der verschiedenen IAV-Subgruppen präferieren eine dieser Verbindungen und nutzen sie als Rezeptor für die Aufnahme in die Wirtszelle [11].

Segment	Kodiertes Protein	Proteinfunktion
1	PB2 (basisches Polymeraseprotein 2)	Polymerase-Untereinheit, mRNA-Cap Erkennung
2	PB1 (basisches Polymeraseprotein 1)	Polymerase-Untereinheit, Endonuklease, RNA-Elongation
	PB1- F2	alternatives Leseraster, proapoptotische Aktivität
3	PA (saures Protein)	Polymerase Untereinheit, Protease
4	HA (Hämaggutinin)	Oberflächenprotein, Hauptantigen, Rezeptorbindung und Membranfusion
5	NP (Nukleoprotein)	bindet RNA, Kernimport Regulation
6	NA (Neuroaminidase)	Oberflächenprotein, Sialidase, Virus-Release
7	M1 (Matrixprotein 1)	vRNA-Interaktion, Regulation RNA-Kernexport, virales <i>budding</i>
	M2 (Matrixprotein 2)	Protonenkanal, Virus- <i>uncoating</i> und - <i>assembly</i>
8	NS1 (Nicht-Strukturprotein 1)	Interferonantagonist
	NEP/NS2 (Nicht-Strukturprotein 2)	RNA Kernexport

Tabelle 1: Influenza-A-Virus Proteine und ihre Funktion. Die Tabelle wurde modifiziert nach Bouvier N. M. and P. Palese [11].

Einleitung

Bei aviären IAV-Stämmen bindet HA bevorzugt an die hoch exprimierten α -2,3-Verbindungen im Intestinaltrakt von Vögeln und stellt dort den primären Replikationsort dar. Humanpathogene IAV-Stämme binden vorwiegend an α -2,6-Verbindungen, die im humanen Respirationsepithel der Trachea hoch exprimiert werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die humane Lunge beide α -2,6- und α -2,3-Verbindung aufweist [32]. Damit können sowohl humanpathogene als auch aviäre Viren an die AEC II anheften und schwere Pneumonien verursachen [11, 29, 32]. Nach Bindung an der Oberfläche der Wirtszelle wird IAV durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und ein Entmantelungsprozess beginnt bei dem die virale RNA freigesetzt wird. Durch die zelluläre Ansäuerung des Endosoms wird die Struktur des viralen HA-Moleküls verändert, sodass eine Verschmelzung der Virusmembran mit der Membran des Endosoms ermöglicht wird [33, 34]. Darüber hinaus vermittelt der saure pH-Wert eine Öffnung der M2-Protonenkanäle, welche wiederum zu einer Ansäuerung im Virus führt, die eine Lösung aller Proteinverbindungen bewirkt und eine Freisetzung der vRNPs ins zelluläre Zytoplasma erlaubt [11, 35]. Aufgrund ihrer Größe können die vRNP-Komplexe nicht passiv in den Zellkern diffundieren und benötigen folglich einen aktiven Transport in den Zellkern. Alle Proteine des vRNP-Komplexes verfügen über Kernlokalisationssequenzen die eine Erkennung durch zelluläre α -Importine ermöglicht [11, 36, 37]. Mittels α -Importine können die viralen Proteine an die Kernporen binden, um anschließend aktiv in den Zellkern aufgenommen zu werden [36]. Im Zellkern erfolgt die Replikation und Transkription des Virusgenoms. Die RNA-Polymerase synthetisiert mit Hilfe der viralen RNA mit negativer Polarität als Vorlage zwei RNA-Varianten mit positiver Polarität: eine *messenger* RNA (mRNA) und eine *complementary* RNA (cRNA). Die mRNA dient als Vorlage für die virale Proteinsynthese und die cRNA wird von der viralen Polymerase für die Synthese neuer genomischer viralen RNA genutzt [11]. Für die Initiierung der viralen RNA-Synthese nutzt IAV 5'-Cap-Primer von der Vorläufer-mRNA der Wirtszelle, dieser Prozess wird auch „*cap snatching*“ genannt. Durch diese Markierung kann die virale RNA wie die Wirts-mRNA erkannt und transkribiert und anschließend aus dem Zellkern transportiert werden, um als Vorlage am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) für die virale Proteinsynthese genutzt zu werden [11, 29]. Beim Export von vRNA-Segmenten aus dem Zellkern sind M1 und NS2 involviert. Dabei interagiert M1 mit NP und bringt die vRNA mit den NP-Proteinen als vRNP-Komplex zusammen [38]. Die virale Proteinsynthese erfolgt am rauen ER und die Membranproteine HA, NA und M2 werden mittels des zelleigenen Golgi-Apparats zur apikalen Zellmembran transportiert [39].

Nachdem eine ausreichende Menge an HA- und NA-Proteinen an der Lipiddoppelschicht akkumuliert sind, wird der *budding* Prozess und damit die Abspaltung der neu gebildeten Virionen initiiert. Mit Hilfe von M1 und M2 werden die neu synthetisierten Viruspartikel versammelt und die Membran beginnt sich auszustülpen. Nur diejenigen Viren mit vollständigem Genom können später Zellen infizieren. Über die HA-*spikes* sind Viren an der Zelloberfläche fixiert und werden mittels Sialidase-Aktivität der NA endgültig von der Wirtszelle abgespalten. Darüber hinaus entfernt die NA alle Sialinsäurereste an der Virushülle und verhindert so ein Aneinanderklumpen der neu gebildeten Viren [11].

1.3.2 Pulmonale Folgen einer schweren Influenza-A-Viruspneumonie

Während bei milden Verläufen einer IAV-Infektion vor allem das obere Respirationsepithel beteiligt ist, sind bei schweren Infektionen vorwiegend distale Lungenabschnitte betroffen [40]. Die dortige Infektion des Alveolarepithels kann zusammen mit der generalisierten Inflammationsreaktion zu gravierenden Lungenschäden führen, infolge dessen es zur Ausbildung eines ARDS kommen kann [41, 42]. Das ARDS ist eine akute lebensbedrohliche, schwere Schädigung der Lunge und eine häufige Komplikation bei Patienten mit einer primären viralen Pneumonie, die durch hochpathogene aviäre Viren wie H5N1 aber auch durch H1N1 verursacht werden [42-45]. Der typische histopathologische Befund eines ARDS ist ein diffuser Alveolarschaden, der charakterisiert ist durch intraalveoläre und interstitielle Ödeme, Hämorrhagien, Kapillarthrombosen sowie Ausbildung hyaliner Membranen [40]. Verursacht wird der Alveolarschaden durch den Untergang von AEC und Endothelzellen innerhalb der Alveole. Es kommt zum Verlust der alveolären Integrität mit Störung der alveolo-kapillaren Barriere, was zu einem vermehrten Austritt von Flüssigkeit, Plasmaproteinen und Zellen aus den Lungenkapillaren in die Alveole führt. Das schwere Lungenödem bewirkt wiederum eine Verlängerung der Diffusionsstrecke von Atemgasen, wodurch es zu einer Verschlechterung der Gasaustauschfläche kommt [46].

Bei den Pathomechanismen des IAV-induzierten Alveolarschadens nimmt insbesondere das Alveolarepithel eine bedeutende Rolle ein: AEC sind einerseits eine wesentliche Komponente der alveolo-kapillaren Barriere, andererseits stellen AEC II auch die primären Zielzellen von IAV dar [32, 42]. AEC werden in AEC I und AEC II eingeteilt. AEC I sind flache Zellen, die den größten Anteil der Zellen in der Alveole ausmachen und den Gasaustausch zwischen Blut und Luft im Alveolarraum ermöglichen. AEC II kleiden le-

Einleitung

diglich 5 % der Alveolaroberfläche aus und stellen *surfactant* bereit, welches für die Aufrechterhaltung der Oberflächenspannung notwendig ist und antimikrobielle Eigenschaften besitzt [47]. Während einer schweren IAV-Infektion macht der Zelltod von AEC somit den Hauptanteil bei der Zerstörung der alveolo-kapillaren Barriere aus, wobei dieser vermutlich sowohl aus der direkten zytopathologischen Wirkung von IAV als auch aus einer überschießenden Immunantwort resultiert [42]. Retrospektive Analysen von Patientenfällen, die mit dem aviären H5N1-Virus infiziert waren, zeigten, dass es sich bei der Mehrheit der Fälle um junge und gesunde Patienten handelte und 75% davon ein tödlich verlaufendes ARDS entwickelten [44]. Als ursächlich für die hohe Letalität bei jungen Patienten wurde eine überschießende Immunantwort postuliert [48, 49]. Bei *post mortem* Untersuchungen an letal verlaufenden H1N1-Infektionen waren beispielsweise sehr hohe Expressionen von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, u.a. von *macrophage inflammatory protein 1-beta* (IL-1 β), Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8 sowie *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), im Lungengewebe zu beobachten [50]. Die große Menge dieser proinflammatorischen Mediatoren wird durch einwandernde Neutrophile sowie den residenten Alveolarmakrophagen produziert. Durch die Freisetzung von Chemokinen kommt es zur weiteren Rekrutierung von Neutrophilen sowie Monozyten, die sich in der Lunge zu Alveolarmakrophagen und dendritischen Zellen differenzieren [48, 49]. Neutrophile tragen vermutlich durch Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies zur Schädigung von AEC bei. Die eingewanderten Alveolarmakrophagen hingegen produzieren neben Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α auch *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL), der Apoptose von AEC induzieren kann und so den weiteren Progress eines ARDS begünstigt [42, 49]. Allerdings scheinen auch virale Faktoren Apoptoseprozesse in AEC zu beeinflussen. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen legen nahe, dass IAV alleine Apoptose induzieren, um effektiv in der Wirtszelle replizieren zu können [51].

1.4 Mitochondrien

1.4.1 Aufbau und Funktion von Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen mit einer zentralen Rolle bei der Regulation des Energiestoffwechsels, insbesondere bei der Synthese von Adenosintriphosphat (ATP). Ihre spezielle Morphologie dient der Subkompartimentierung zahlreicher biochemischer Prozesse wie der Synthese von Eisen-Schwefel-Cluster, Häm-Molekülen und Aminosäuren sowie Synthese und Abbau von Proteinen [52]. Als einzige Zellorganellen besitzen Mitochondrien eine eigene DNA, die sich von der somatischen DNA des Kerns unterscheidet. Allerdings codiert die mitochondriale DNA (mtDNA) nur für 13 Proteine, von denen alle Bestandteile der Atmungskette sind. Die überwiegende Mehrheit der mitochondrialen Proteine, die zum Aufbau benötigt werden, sind im Kern codiert und werden zu den Mitochondrien transportiert. Mitochondrien werden von zwei Membransystemen begrenzt, der inneren und äußeren mitochondrialen Membran (Abbildung 2) Die innere Membran ist weitgehend undurchlässig und bildet die Hauptbarriere zwischen Zytosol und Mitochondrienmatrix. Die äußere Membran hingegen enthält Poren und Kanäle, die von kleinen Molekülen und Ionen passiert werden können.

Der Raum zwischen innerer und äußerer Membran ist der Intermembranraum, wo wichtige Proteine für Transport- oder Apoptoseprozesse wie beispielsweise *cytochrom C* lokalisiert sind. Innerhalb der Mitochondrienmatrix befindet sich die mtDNA, Ribosome und

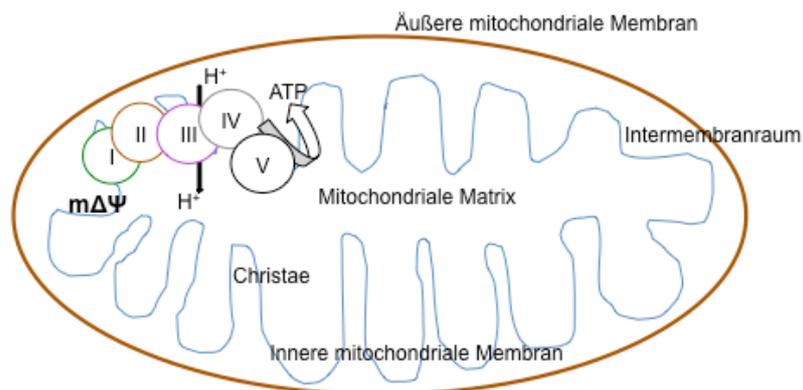


Abbildung 2: Schematische Struktur eines Mitochondriums. Die kompartimentierte Struktur aus äußerer und innerer mitochondrialer Membran, Intermembranraum und der mitochondrialen Matrix bildet einen Reaktionsraum für verschiedene chemische Prozesse. Die Einstülpungen, Christae, der inneren Membran vergrößern die Oberfläche. Mittels der Elektronen-Komplexe I (Ubichchinon-Oxidoreduktase, grün), II (Succinat-Dehydrogenase, orange), III (Cytochrom-C-Reduktase, lila) und IV (Cytochrom-C-Oxidase, grau) werden Wasserstoffprotonen (H^+) über die innere mitochondriale Membran gepumpt und ein mitochondriales Membranpotential ($m\Delta\Psi$) wird generiert. Die ATP-Synthase nutzt den Protonengradient (Komplex V, schwarz) für die oxidative Phosphorylierung von ATP. Die Abbildung wurde modifiziert nach Kuhlbrandt W. [53].

Einleitung

Enzyme für die oxidative Phosphorylierung, den Citratzyklus, der β -Oxidation von Fettsäuren sowie der Oxidation von Pyruvat [52, 53]. Über zahlreiche Einstülpungen *christae* wird die Oberfläche der inneren Membran vergrößert. An der inneren Membran befinden sich die einzelnen Komplexe der Atmungskette. Die Komplexe I-IV sind eine Reihe hintereinander angeordneter Redox-Moleküle, die Elektronen aufnehmen bzw. abgeben können. Die freigesetzten energiereichen Elektronen werden zum Transport von Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum genutzt, was die Bildung eines Protonen- und Spannungsgradienten bewirkt und folglich das mitochondriale Membranpotential ($m\Delta\Psi$) entstehen lässt. Der elektrochemische Protonengradient wird von der ATP-Synthase (Komplex V) für die Phosphorylierung von ATP genutzt [52, 54]. ATP wird anschließend zu Orten der Zelle mit hohem Energieverbrauch transportiert. Die Mitochondrien bewegen sich dabei entlang der zellulären Mikrotubuli, reguliert von Kinesin- und Dynein-Motorproteinen [55]. Innerhalb der Zelle bilden Mitochondrien dynamische, tubuläre Netzwerke aus. Ihre Form und Größe können dabei abhängig vom Zelltyp und physiologischen Zustand der Zelle variieren. Viele dieser Veränderungen basieren auf der Fähigkeit von Mitochondrien zu fusionieren oder sich zu teilen. Beide Ereignisse werden auch als *fusion* und *fission* bezeichnet und stellen aktive Prozesse dar, die ein Zusammenspiel spezialisierter Proteine erfordern. So sind drei GTPasen für die *fusion* von Mitochondrien notwendig. Die Proteine Mitofusin-1 und -2 auf den Außenmembranen benachbarter Mitochondrien können dimerisieren und induzieren eine Verschmelzung der beiden Außenmembranen. Die *fusion* der Innenmembranen erfolgt anschließend mit Hilfe von OPA-1, ein Protein des Intermembranraums. Mitochondriales *fission* erfordert eine Rekrutierung des *dynamin-related protein* (Drp1) vom Zytosol zur mitochondrialen Außenmembran. Bei der richtigen Verteilung und Funktion von Drp1 ist das *mitochondrial fission 1* Protein beteiligt, welche an der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert ist [55]. Dysfunktionen innerhalb dieses dynamischen Netzwerkes erscheinen beispielsweise während der frühen Phase von Zelltodprozessen, in welcher Mitochondrien fragmentieren und eine erhöhte *fission* Aktivität aufweisen [55].

1.4.2 Rolle von Mitochondrien bei der angeborenen Immunantwort

Das angeborene Immunsystem stellt die erste unspezifische Abwehr gegen eindringende Pathogene dar. Die Voraussetzung für eine effektive Aktivierung der angeborenen Immunabwehr ist die Erkennung von eindringenden Pathogenen durch die Wirtszelle [56]. Die Erkennung erfolgt mithilfe sogenannter *pattern recognition receptors* (PRRs), die in

Einleitung

der Keimbahn codiert sind und unabhängig vom immunologischen Gedächtnis in Immunzellen einschließlich Makrophagen, dendritischen Zellen, B- und T-Zellen sowie Epithelzellen und Fibroblasten exprimiert werden [57]. Die verschiedenen Klassen von transmembranen und zytosolischen PRRs detektieren konservierte, molekulare Muster von Pathogenen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) und initiieren über eine Aktivierung von zellulären Signalkaskaden die Induktion von Transkriptionsfaktoren, was eine Expression von proinflammatorischen Mediatoren zur Folge hat [56, 57]. Zur Klasse der PRRs gehören *toll-like-Rezeptoren*, *nucleotide oligomerization domain-like-Rezeptoren*, *C-type lectine-Rezeptoren* und *retinoic acid-inducible gene 1-like-Rezeptoren* (RLRs). Bei der Detektion von Viren sind insbesondere die drei zytosolischen RLRs beteiligt: *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* [56-58]. RLRs erkennen durch virale Transkription entstandene intrazelluläre RNA und induzieren die Produktion von Typ-I-Interferonen (IFN) und proinflammatorischen Zytokinen. Die Struktur der Rezeptoren beinhaltet zwei signalgebenden n-terminale *caspase activation and recruitment domain* (CARD) eine zentrale *DexD/H-box RNA helicase*-Domäne zur Detektion der zytosolischen RNA und eine c-terminale regulierende Domäne. Studien konnten Mitochondrien mit dem Adaptermolekül *mitochondrial antiviral signalling protein* (MAVS) als wichtige Strukturen bei der RLR-Signalkaskade identifizieren (Abbildung 3). MAVS ist mit seiner c-terminalen Transmembrandomäne an die äußere mitochondriale Membran gebunden und dient als Vermittler zwischen Rezeptoren und pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor κB* (NF-κB) und *interferon regulatory factor* (IRF) [59-61]. An dem n-terminalen Ende des MAVS-Moleküls sind CARD-Domänen, die mit den CARD-Domänen der RLR interagieren können. Nach Aktivierung rekrutiert MAVS eine Reihe von Signalmoleküle, wie *tumor necrosis factor receptor-associated Faktor*, *family member-associated NF-κB-Aktivator* oder *TNFR1-associated death domain Protein*, die zusammen mit MAVS durch spezielle Kinasen zur Phosphorylierung von NF-κB und IRF führen [58]. Morphologische Veränderungen von Mitochondrien aufgrund von *fission* und *fusion* scheinen für eine Verstärkung oder Abschwächung des MAVS-vermittelten antiviralen Signalweges mitverantwortlich zu sein. So bewirkt eine *fusion* des mitochondrialen Netzwerkes eine erhöhte Interaktion von MAVS mit den nachgeschalteten Signalmolekülen [58]. Während der IAV-Infektion scheint die IFN-Antwort überwiegend durch eine RIG-I-Aktivierung induziert zu werden [62, 63]. Allerdings ist der genaue Mechanismus bisher nur unvollständig verstanden [64]. Eine Studie von Killip M. J. *et al.* konnte zeigen, dass

Einleitung

sowohl die RNA-Synthese von IAV als auch deren nuklearer Export zur IFN-Induktionen notwendig ist [65]. Andererseits scheinen vRNPs in der frühen IAV-Infektion mit Mitochondrien assoziiert zu sein und über eine Interaktion mit RIG-I zur Inhibition der MAVS-vermittelten IFN-Induktion zu führen, welche von der viralen Synthese unabhängige Mechanismen vermuten lässt [64].

Neben PAMPs können PRRs auch zelluläre Schäden und Stresssignale mittels zelleigener Moleküle, *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), erkennen. DAMPs sind zumeist intrazelluläre Bestandteile, die während pathologischen Prozessen ausgeschüttet werden. Sie dienen anderen Zellen als Warnsignale, um weitere Gewebeschäden zu minimieren und die Wiederherstellung der Gewebeintegrität zu fördern [58]. Als wichtige Quelle von DAMPs konnten Mitochondrien identifiziert werden [58, 66, 67]. Aufgrund ihrer bakteriellen Herkunft besitzen Mitochondrien verschiedene morphologische und biochemische Merkmale von Bakterien, die bei einer Freisetzung von PRRs erkannt werden können [58, 66]. Beispielsweise enthält mtDNA ähnlich zu bakterieller DNA hypermethylierte CpG-Elemente, die von *toll-like-Rezeptor 9* erkannt werden und nachfolgend die Aktivierung von neutrophilen Leukozyten induziert [68, 69]. Studien an Patienten mit schwerem Trauma und hämorrhagischem Schock konnten demonstrieren, dass freigesetzte mtDNA im Blut dieser nachweisbar war und eine *in-vivo*-Applikation von mitochondrialen Bestandteilen in Mäusen zu einer schweren systemischen Lungen- und Leberentzündung führte [58, 69].

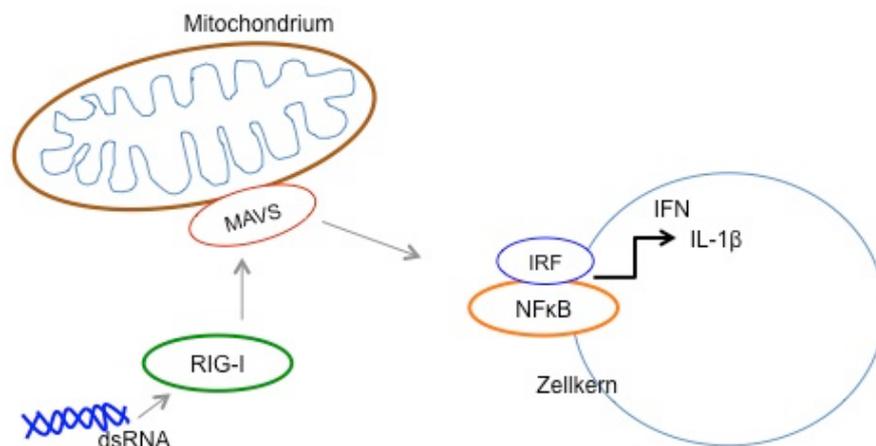


Abbildung 3: Antivirale Immunantwort an Mitochondrien. Virale RNA wird im Zytosol von *retinoinducible gene 1*-Rezeptor (RIG-I) erkannt. Das *Mitochondrial antiviral signalling protein* (MAVS) interagiert mit RIG-I und vermittelt nachfolgenden Signalkaskaden zur Aktivierung von pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor κB* (NF-κB) und *interferon regulatory factor* (IRF). Die Transkriptionsfaktoren induzieren die Expression von Typ I *interferon* (IFN) und *cytokine* wie *interleukin 1-β* (IL-1β) im Rahmen der antiviralen Immunantwort. Die Abbildung wurde modifiziert nach Mills E. L. *et al.* [61].

1.5 Apoptose

Apoptose ist eine Form des kontrollierten Zelltodes, der einen zellulären, molekularen Apparat involviert. Als Mechanismus zur Erhaltung eines biologischen Gleichgewichts besitzt Apoptose eine wichtige Bedeutung bei der Beseitigung unbrauchbarer und eventuell schädlicher Zellen, ohne jedoch eine Immunantwort zu initiieren. Das morphologische Bild ist gekennzeichnet durch Schrumpfung des Zytoplasmas, begleitet von Chromatin-Kondensation (Pyknosis), Fragmentierung des Zellkerns und Abschnürung von Plasmamembranvesikeln (*apoptotic bodies*). Gemäß aktuellen Konzepten erfolgt die Einteilung von Apoptoseprozessen in verschiedene Typen, die durch multiple Signalwege induziert werden und sich anhand molekularer Bestandteile, morphologischer Manifestationen, biochemischen Merkmalen und immunologischen Konsequenzen unterscheiden. Die am besten charakterisierten Typen sind der intrinsische und der extrinsische Apoptoseweg. Zentrale Komponenten beider Apoptosewege sind proteolytisch wirksame Caspasen, die als Proenzyme, sogenannten Initiator-Caspasen, produziert werden und durch Spaltung von Effektor-Caspasen aktiviert werden. Die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 wiederum spalten Proteine der zellulären Homöostase, die zum Überleben der Zelle wichtig sind einschließlich Strukturproteine, Signalproteine und DNA-Reparaturproteine [70].

1.5.1 Extrinsischer Apoptoseweg

Der extrinsische Apoptoseweg wird durch Störung der extrazellulären Mikroumgebung initiiert, die eine Aktivierung von Zellmembran verankerten Todesrezeptoren zur Folge hat. Die Rezeptoren gehören der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie (TFN) an und besitzen eine zytoplasmatische Proteindomäne (*death domain*, DD). Zu den TFN-Rezeptoren gehören beispielsweise der Fas-Rezeptor und TNF-Rezeptor-1. Ihre Liganden umfassen u.a. Fas-Ligand (FasL), TRAIL und TNF- α [70]. Nach Bindung eines spezifischen Liganden kommt es an TFN-Rezeptoren zur Rekrutierung der DD enthaltenden Adaptermoleküle *Fas associated DD* oder *TNF receptor-associated DD*, die zusammen mit dem Rezeptoren an ihren zytosolischen Enden Multiproteinkomplexe ausbilden können, um nachfolgenden proapoptische Signalwege zu aktivieren [70, 71]. Die Rezeptorbindung von *Fas associated DD* bildet zusammen mit der Initiator-Caspase 8 einen *death-inducing signaling complex*, der eine Autokatalysierung und damit Aktivierung von Caspase 8 induziert. Die Menge an aktivierter Caspase 8 kann anschließend über die Spaltung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 Apoptose einleiten [70].

1.5.2 Intrinsischer Apoptoseweg

Der intrinsische Apoptoseweg umfasst Reaktionen auf Stresssignale aufgrund von Störungen der intrazellulären Homöostase und wird über die Mitochondrien reguliert. Wichtigster Schritt bei dieser Art der Apoptoseinduktion ist die irreversible Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran, kontrolliert von proapoptotischen und antiapoptotischen Mitgliedern der *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2)-Protein-Familie [70, 72]. Als Antwort auf apoptotische Stimuli induzieren *BCL-2 antagonist killer 1* (BAK) und *BCL-2-associated X protein* (BAX) die mitochondriale Membranpermeabilisierung (Abbildung 4). Beide proapoptotischen Bcl-2-Proteine besitzen die Fähigkeit, Poren in die äußere mitochondriale Membran zu formen [70]. Im physiologischen Zustand ist BAK an der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert, während BAX kontinuierlich zwischen Zytosol und Mitochondrium zirkuliert. Apoptotische Signale verursachen Konformationsänderungen von BAK und BAX, die zu einer Porenbildung in der mitochondrialen Membran und nachfolgend zum Verlust des $m\Delta\Psi$ führen. Dadurch kommt es zur Freisetzung proapoptotischer Proteine u.a. aus dem Intermembranraum, wie beispielsweise *cytochrom C*. Zusammen mit *apoptotic protease-activating factor 1* bildet *cytochrom C* im Zytosol das Apoptosom aus, welches über die Bindung und Aktivierung der Caspase 9 als deren Aktivierungsplattform dient. Die aktivierte Caspase 9 spaltet nachfolgend Caspase 3, 6 und 7, was wiederum zur Apoptose der Zelle führt [70, 72]. Reguliert werden proapoptotische Bcl-2 Proteine vor allem posttranslational. Überwiegen antiapoptotische Bcl-2-Proteine, wie Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-1, kommt es zur Inhibition von BAX und BAK, direkt durch Verhinderung ihrer Oligomerisierung oder indirekt durch Förderung der zytosolischen Translokation von BAX [70]. Die Aktivität von BAX und BAK wird außerdem von *BH3-only* Proteine, wie Bim, Bid oder Puma kontrolliert, proapoptotischen Initiatorproteinen, die indirekt über Bindung und Neutralisierung von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen eine Membranpermeabilisierung verhindern [70, 72]. *BH3-only* Proteine entsprechen zelluläre Stresssensoren und unterliegen selbst diversen transkriptionalen und posttranslationalen

Einleitung

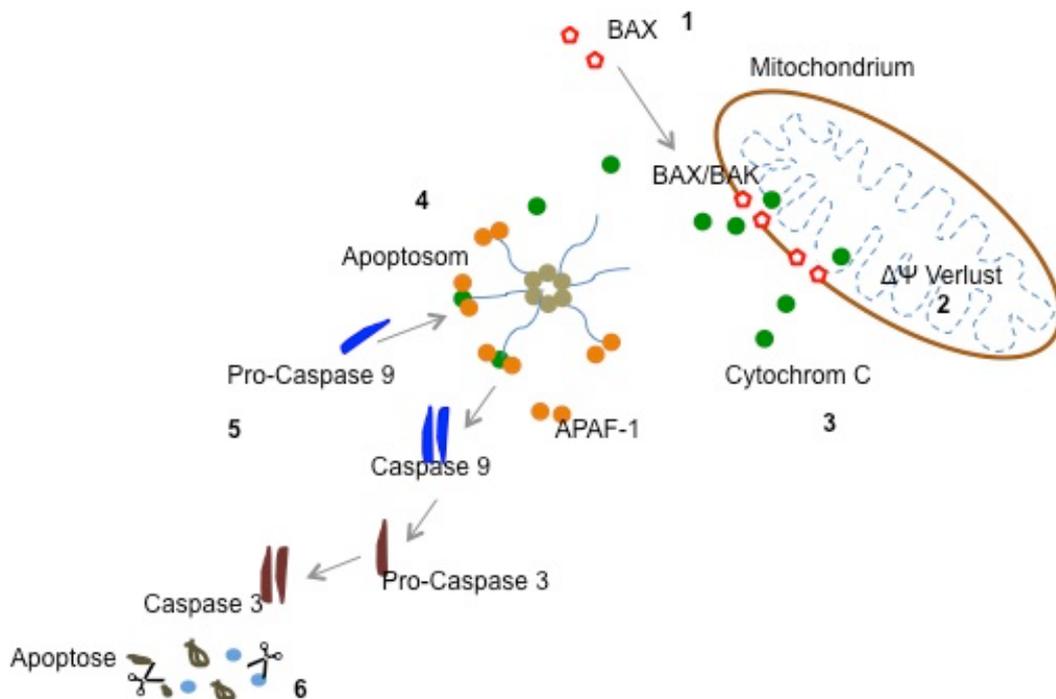


Abbildung 4: Mitochondrial vermittelter intrinsischer Apoptoseweg. (1) Durch die zytosolische Translokation von *BCL-2-associated X protein* (BAX) zum Mitochondrium kommt es zusammen mit *BCL-2 antagonist killer 1* (BAK) zur Ausbildung von Poren an der äußeren mitochondrialen Membran. (2) Infolgedessen kommt es zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi$). (3) Über die Poren wird die Freisetzung von Cytochrom C gefördert, was welches zusammen mit *apoptotic protease-activating factor 1* (Apaf-1) im Zytosol das Apoptosom formt (4). (5) Das Apoptosom aktiviert die Pro-Caspase 9, welche als aktive Protease die Pro-Caspase 3 spaltet und in Folge ihre Aktivierung induziert. (6) Caspase 3 führt zur Apoptose mit Proteolyse von Zellbestandteilen. Die Abbildung wurde modifiziert nach Galluzzi L. *et al.* [72].

Mechanismen. Über Transkriptionsfaktoren und micro-RNAs kann ihre Expression reguliert werden. Die Aktivität und Verfügbarkeit wird durch Phosphorylierungen, Proteolyse oder Sequestrierung kontrolliert [73]. So kann Caspase beispielsweise die Spaltung von Bid bewirken. Das dabei entstehende Fragment *truncated bid* führt zur Inhibierung von Bcl-2, Bcl-XL, was durch Überwiegen von BAX und BAK eine mitochondriale Porenbildung verursacht. Auf diese Weise kann auch durch extrazelluläre Stimulation von TNF-Rezeptoren die mitochondriale Membranpermeabilisierung beeinflusst werden [70, 72, 74].

1.5.3 Zelluläre Apoptoseinhibitoren

Neben den antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen, die vorwiegend beim intrinsischen Apoptoseweg eine wichtige Rolle einnehmen, existieren weitere zelluläre Inhibitoren, die Caspasen inaktivieren und in Folge Apoptose inhibieren können. Die wichtigste Gruppe

beinhaltet die Mitglieder der *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs). IAPs werden definiert durch das Vorhandensein einer *baculovirus IAP repeat* (BIR)-Domäne, welche Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht. Bisher sind acht verschiedene IAPs identifiziert wurden: XIAP, cIAP-1, cIAP-2, NIAP, ILP-2, Livin, cIAP-Bruce und Survivin [75, 76]. Allerdings konnte nur für XIAP eine aktive Inhibition von Caspasen beschrieben werden. Über seine BIR2-Domäne ist XIAP in der Lage das katalytische Zentrum von Caspase 3 und 7 zu binden, um ihre Aktivierung zu inhibieren [77]. Die BR3-Domäne hingegen kann das n-terminale Ende der kleinen Untereinheit von Caspase 9 binden, um ihre Dimerisierung zu verhindern. Die Caspase 9 wird so in einem inaktiven, monomeren Zustand gehalten [78]. Andere Domänen in IAPs sind CARD-Domänen, Ubiquitin-konjugierende Domänen und *really interesting new gene* (RING) Domänen. Alle Domänen können nur indirekt Apoptoseprozesse inhibieren. So sind IAPs in der Lage durch die RING-Domäne E2 Ubiquitin-gebundene Enzyme zu binden, welche für die Degradation von Proteinen verantwortlich sind. Das cIAP-Bruce-Protein führt beispielsweise durch seine Ubiquitin-konjugierende Domäne zu einer Ubiquitylierung von Caspase 9, was einen Abbau des Proteins verursacht [76].

1.6 Apoptoseprozesse während der Influenza-A-Virus Infektion

Untersuchungen zur Apoptoseinduktion durch IAV gewinnen zunehmend an Bedeutung für das Verständnis der Viruspathogenität [51, 79-82]. Verschiedene *in-vitro* und *in-vivo*-Studien konnten intrinsische und extrinsische Apoptosewege in infizierten Zellen nachweisen [83-87]. Auch *post-mortem*-Untersuchungen an H1N1 erkrankten Patienten zeigten, dass Apoptose von AEC zum Alveolarschaden bei schweren Krankheitsverläufen beiträgt [50]. Allerdings sind die genauen Regulationsmechanismen der IAV induzierten Apoptose bisher nur unvollständig verstanden und verschiedene zelluläre als auch virale Faktoren werden diskutiert. Wie viele andere Viren scheint IAV über seine viralen Proteine zelluläre Apoptoseprozesse zu modulieren (Tabelle 2) [54]. Das virale Protein NA führt beispielsweise zu einer vermehrten Expression des proapoptotischen *transforming growth factor β* während der IAV-Infektion, was über einen auto-und parakrinen Mechanismus zur Apoptose führt [88]. NP kann mit dem antiapoptotischen Protein Clusterin interagieren, was die Einleitung des intrinsischen Apoptoseweges verhindert, indem es BAX bindet und so seine Translokation zu den Mitochondrien unterbindet. Die Expression von NP führt zu einer erniedrigten Bindung zwischen Clusterin und BAX. Eine Überexpression von Clusterin hatte hingegen eine verringerten Apoptosinduktion zur Folge [89].

Einleitung

Influenza A-Virus-Protein	Bedeutung bei Apoptose
PB1- F2	PB1-F2 induziert Apoptose durch Formation von Ionenkanälen in die mitochondriale Membran [31, 90]
NP (Nukleoprotein)	NP-Expression induziert intrinsische Apoptose durch Interaktion mit antiapoptotischem Protein Clusterin [89]
	NP induziert Apoptose durch Herunterregulation der Expression von <i>apoptosis inhibitor protein 5</i> (API5) [91]
	NP-Interaktion mit RING finger protein 43 (RNF43) resultiert in Stabilisation von p53 mit konsekutiver Apoptoseinduktion [92]
NA (Neuroaminidase)	NA induziert Apoptose über transforming growth factor β Apoptose [88]
M2 (Matrixprotein 2)	M2 induziert Inhibition von lysosomaler Autophagosom-Degradation und führt zu einer vermehrten Apoptoseinduktion [93]
NS1 (Nicht-Strukturprotein 1)	NS1 Bindung an p85 Untereinheit von PI3K und nachfolgende Aktivierung von PKB inhibiert proapoptotische Faktoren [94]
	NS1-Expression induziert Apoptose in mit Todesrezeptor-Ligand FasL vorstimulierten Zellen [95]

Tabelle 2: Influenza-A-Virus Proteine und ihre Bedeutung bei der Apoptose

Die proapoptotische Wirkung von NP kann ebenfalls über die Suppression des antiapoptotischen Proteins API5, welches die vom Transkriptionsfaktor E2F1-abhängige Apoptose antagonisiert, ausgelöst werden [91]. Zudem scheint NP mit dem zellulären *RING finger protein 43* interagieren zu können, welches wiederum über Ubiquitinierung des Tumorsuppressorproteins p53 zu dessen Stabilisierung führt und in der Zelle eine erhöhte Apoptoserate induziert [92]. NS1 hingegen beeinflusst in Abhängigkeit seiner Expression die Apoptoseprozesse unterschiedlich [52]. Das virale Protein ist in der Lage die zelluläre IFN-Antwort zu inhibieren [96]. In einer Studie von Schultz-Cherry S. et al. führte die Expression von NS1 des aviären H5N1 Virus zu einer starken Apoptoseinduktion in MDCK- und HeLa-Zellen [89]. Da die NS1 induzierte Apoptose in mit FasL vorstimulierten Zellen signifikant erhöht war, wird vermutet, dass NS1 möglicherweise in der

Einleitung

Fas-gesteuerten Apoptoseinduktion während der extrinsischen Apoptose eine Rolle spielt [90]. Nachfolgende Studien zeigten jedoch, dass NS1 auch antiapoptotische Eigenschaften aufweist. So konnten IAV bei denen ein funktionsfähiges NS1-Protein fehlte effektiver replizieren und höhere Apoptoseraten induzieren im Vergleich zu Wildtyp-Viren [97]. Darüber hinaus kann IAV durch Bindung von NS1 an *phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3K) auch den PI3K- und *akt/protein kinase B* (PKB) Signalweg aktivieren, um eine antiapoptotische Antwort in Zellen zu bewirken [94, 98]. Das M2-Protein scheint im Zusammenhang mit Autophagieprozessen Apoptose in infizierten Zellen zu induzieren. Dabei kann M2 die Verschmelzung von Autophagosomen und Lysosomen blockieren, ein Prozess, welcher der infizierten Zelle als Überlebensstrategie dient. In infizierten Zellen, bei denen Autophagieprozesse inhibiert waren, zeigte sich eine vermehrte Apoptoseinduktion [93]. Hinweise einer mitochondrialen Beteiligung bei Apoptoseprozessen während der IAV-Infektion kommen von Studien über das virale PB1-F2-Protein. Es besitzt eine *mitochondrial targeting sequence* an seinem c-terminalen Ende und ist in der Lage in Zellkulturen den Verlust des $m\Delta\Psi$ herbeizuführen mit Induktion von Apoptose [31, 90]. Ein möglicher Mechanismus, der zum Verlust des $m\Delta\Psi$ führen könnte, ist die direkte Interaktion zwischen PB1-F2 mit den beiden mitochondrialen Membranproteinen *voltage dependent anion channel 1* und *adenine nucleotide translocator 3*, was eine Membranpermeabilisierung herbeiführt [99]. Für eine direkte Membranpermeabilisierung spricht außerdem, dass PB1-F2 direkt und unspezifisch Poren in Lipiddoppelmembrane induzieren kann und so zu einer Destabilisation der mitochondrialen Membran führt [100]. Obwohl Apoptoseinduktion als zellulärer Abwehrmechanismus gegen eindringende Viren betrachtet wird, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass IAV die Apoptose von infizierten Zellen zum Vorteil seiner Replikation nutzen kann. Insbesondere die Aktivierung von Caspase 3 scheint für eine effektive Virusreplikation notwendig zu sein, denn eine Hemmung der Caspasenaktivität führt zu einer Retention der neu gebildeten vRNPs im Nukleus [101]. Außerdem kann die Überexpression des antiapoptotischen mitochondrialen Bcl-2-Proteins eine verringerte Virusproduktion verursachen, was vermuten lässt, dass die virale Replikation auch vom intrinsischen Apoptoseweg abhängig ist [33]. So zeigte eine Studie von Tran A. T. *et al.* eine Spaltung von BAD, einem Mitglied der porapoptotischen Bcl-2-Proteine, und in Folge eine *cytochrom C* Freisetzung sowie Caspase-3- und -7-Aktivierung zu späten Zeiten der Virusreplikation. Eine Deletion von BAD führte hingegen zu einer verminderten Apoptoseinduktion in IAV infizierten Zellen [87]. Zudem scheint IAV nur durch eine Translokation von BAX an die Mitochondrien mit

Einleitung

Folge einer mitochondrialen Membranpermeabilisierung zur Apoptose zu führen. Zellen mit fehlendem BAX-Protein sterben zwar während der IAV-Infektion, allerdings einen alternativen Zelltod durch Autophagieprozesse [86].

1.7 Fragestellung

IAV-Infektionen stellen aufgrund der hohen Morbidität und Letalität eine große sozioökonomische Belastung für die Gesellschaft dar. Komplikationen sind eine primäre Viruspneumonie, die zu schweren Schäden des Alveolarepithels mit Ausbildung eines ARDS führen kann. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Apoptose von AEC während der IAV-Infektion induziert wird und dies zur Pathogenese eines schweren Verlaufs beiträgt. Die zugrundeliegenden Mechanismen und Faktoren der Apoptoseinduktion sind bisher allerdings unvollständig verstanden. Insbesondere die Rolle der mitochondrialen Dysfunktion ist weitgehend unbekannt. Zudem wurden in den meisten Modellen über IAV-induzierte Apoptose überwiegend Summensignalantworten untersucht. Allerdings ist eine individuelle Betrachtung mit zeitlicher Auflösung und Korrelation der Apoptoseprozesse für ein besseres Verständnis von Virus-Wirts-Interaktionen wichtig, es wurde jedoch in der Regel nicht durchgeführt. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, ein geeignetes Modell zur Lebendzell- und Gewebemikroskopie zu etablieren, um Apoptoseprozesse und die Rolle der Mitochondrien hierbei im zeitlichen Verlauf während der IAV-Infektion zu untersuchen. Vor diesem Hintergrund wurden die folgenden Fragestellungen bearbeitet:

1. Induzieren IAV mitochondriale Alterationen in AEC II des humanen Lungengewebes?
2. Wie stellen sich die mitochondrialen Prozesse im zeitlichen Verlauf der IAV-Infektion dar?
3. Welche Rolle spielen mitochondriale Veränderungen und einhergehende Dysfunktion in Hinblick auf die IAV-induzierte Apoptose?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft
Madin-Darby Canine Kidney-Zellen	MDCK-Zellen (Spezies Hund)
A549-Zellen	Alveolarepithelzellen (Spezies Mensch)

Tabelle 3: Zelllinien

2.1.2 Pathogene

Bezeichnung	Virusstamm	Herkunft
Pan/99(H3N2)	H3N2 A/Panama/2007/1999	PD Dr. T. Wolff, Robert-Koch-Institut, Berlin, Deutschland
PR8 NS1-GFP(H1N1)	A/Puerto Rico/8/34 (NS1-GFP)	

Tabelle 4: Pathogene

2.1.3 Stimulanzen

Bezeichnung	Herkunft
Staurosporin, <i>Streptomyces sp.</i>	Cell Signaling Technology
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma Aldrich
Pneumolysin	Prof. Dr. Timothy Mitchell, University of Birmingham, UK
Oligomycin	Sigma Aldrich

Tabelle 5: Stimulanzen

2.1.4 Enzyme

Bezeichnung	Herkunft
Trypsin/EDTA (1 x)	Sigma Aldrich
TPCK Trypsin	Sigma Aldrich

Tabelle 6: Enzyme

2.1.5 Plasmide

Bezeichnung	Herkunft
cytoATEAM	Prof. Hiromi Imamura, Kyoto Universität Japan
mitoATEAM	

Tabelle 7: Plasmide

Beide Plasmiden wurden von Imamura H. *et al.* entwickelt und sind Förster-Resonanzenergie-Transfer (FRET) basierende ATP-Indikatoren, ATeam (*adenosine 5'-triphosphate indicator based on epsilon subunit for analytical measurements*) genannt, bestehend aus der ATP sensitiven ϵ -Untereinheit, welche von der F₀F₁-ATP- Synthase von *bacillus subtilis* abstammt. Durch eine zusätzlich n-terminale mitochondriale Signalsequenz wird eine mitochondriale Lokalisierung erreicht (mitoATEAM) [102].

2.1.6 Zell- und Gewebekulturmedien mit Zusätzen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kulturmedium	Hams F12, 500 ml FCS, 10 % Glutamin, 1 %
Infektionsmedium	phenolrotfreies Hams F12, 500 ml BSA (Lösung, steril), 0,3 % Glutamin, 1 %
Galaktosemedium	DMEM + L-Glutamin, - D-Glucose FBS, dialysiert, 2 % D-(+)-Galaktose, 1 %
Kryokonservierungsmedium	Hams F12, 500 ml FCS, 10 % DMSO, 10 %

Tabelle 8: Medien und Zusätze für A549-Zellen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kulturmedium	MEM, 500 ml FCS, 10 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 %

Material und Methoden

Avicel-Überschichtungsmedium (10 ml)	<p>Avicel Stocklösung, 2,5 %, in Aqua bidest., autoklaviert, 4,86 ml</p> <p>2x konzentriertes MEM Medium, autoklaviert, 4,86 ml</p> <p>BSA (Lösung, steril), 0,3 %, 66,7 µl</p> <p>NaHCO₃ Stocklösung, 5 % in Aqua bidest., steril filtriert, 100 µl</p> <p>DEAE-Dextran Lösung, 1 % in Aqua bidest., steril filtriert, 100 µl</p> <p>TPCK Trypsin Stock (1 mg/ml), 10 µl</p>
PBS ⁺⁺ /BSA für Virusinkubation	<p>Dulbeccos PBS w Ca²⁺/Mg²⁺, 500 ml</p> <p>BSA (Lösung steril), 0,3 %</p>

Tabelle 9: Medien und Zusätze MDCK-Zellen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kultivierungs- und Infektionsmedium	<p>RPMI-1640, 500 ml</p> <p>BSA 30% (w/v) Solution, steril, 1 %</p> <p>Glutamin, 1 %</p> <p>Penicillin/Streptomycin, 1 %</p>

Tabelle 10: Medien und Zusätze für humanes Lungengewebe

2.1.7 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
D-(+)-Galaktose	Sigma Aldrich
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Roth
DMEM + L-Glutamin, – D-Glucose	Life Technologies
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (1 x)	Life Technologies
Dulbeccos PBS, 10x Pulver konzentriert	Life Technologies

Material und Methoden

Dulbeccos Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) w Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (1 x)	Life Technologies
Entwickler	Kodak
Ethanol, ≥99,8 %, vergällt	Roth
Ethanol, absolut, unvergällt	Fischer Chemicals
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Fetale Calf Serum (FCS)	Life Technologies
Fetales Bovines Serum (FBS), dialysiert	Life Technologies
Fixierer	Kodak
Formaldehydlösung (37 %)	Sigma-Aldrich
Glutamin	Life Technologies
Glyzerin	Roth
Ziegenserum	Sigma Aldrich
Hams F12	PAA
Isopropanol	Roth
Kaleidoscope™ Prestained Standard	Bio-Rad
Kristallviolett	Merck
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
Minimal Essential Medium (MEM)	Life Technologies
MitoTracker® Deep Red FM	Life Technologies
MitoTracker® Orange	Life Technologies
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth
Natriumfluorid (NaF)	Sigma Aldrich
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Natriumpyrophosphat (Na ₄ P ₂ O ₇)	Sigma Aldrich
Natriumvanadat (NaVO ₃)	Sigma Aldrich
Nonidet® P40 (99 %) (NP40)	Fluka
Odyssey-Blocking-Puffer	LI-COR
Penicillin/Streptomycin	BIOCHROM AG
PFA	Sigma Aldrich
Ponceau S	Sigma Aldrich

Material und Methoden

RPMI-1640	Gibco
Salzsäure (HCl)	Roth
SDS	Serva
Syto82	Life Technologies
Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE)	Life Technologies
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Triton X-100	Serva
Tween-20	Roth
ViaFect™ Transfection Reagent	Promega
β-Mercaptoethanol	Roth

Tabelle 11: Chemikalien und Reagenzien

2.1.8 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
0,01 M PBS-Waschpuffer (für Immunfluoreszenzfärbung)	1 mM NaHPO ₄ 1 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl, pH 7,6 alles in Aqua bidest.
10 x-PBS (Waschpuffer für Western Blot)	PBS (10 x Pulver) in 10 l Aqua bidest. + 0,05 % Tween- 20 für 1 x-PBS: 1:10 verdünnt mit Aqua bi- dest.
10 x-SDS-Elektrophoresepuffer	1 x-SDS-Elektrophoresepuffer: 1:10 ver- dünnt in Aqua bidest.
10 x-Transferpuffer	Tris-Base 30,3 g Glycin 144 g mit Aqua bidest. auf 100 ml 1 x-Transferpuffer: 1:10 verdünnt in Aqua bidest. + 20 % Methanol (v/v)

Material und Methoden

4 x-SDS-Probenpuffer (Lämmli-Puffer)	<p>1,25 ml Tris-Cl (0,5 M, pH 6.8) 5 ml SDS (10 % Stock) 1,25 ml Bromophenolblau (1 % Stock) 2,5 ml Glycerin vor Verwendung 10 % β-Mercaptoethanol versetzt</p>
Kristallviolett-Formaldehydlösung	<p>(a) Kristallviolett-Lösung (20 % Ethanol (v/v), 1 % Formaldehydlösung (w/v) Kristallviolett in Aqua bidest.) (b) Formaldehyd-Lösung (10 % (v/v) von 37 %ige Formaldehyd-Lösung in Aqua bidest.) (c) Kristallviolett-Lösung Formaldehydlösung (1:10)</p>
Milchpulverlösung	5 % Milchpulver (w/v) in 1x PBS-T
Odyssey-Pufferlösung	Odysseypuffer: PBS (1 x) (1:1)
PFA-Fixierlösung	3,7 % PFA in PBS
Phosphoproteinwaschpuffer	<p>In 1 xPBS 1 M NaF 150 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 200 mM NaVO_3</p>
Phospho-Zellysepuffer	<p>je 1 ml: 100 μl Tris/HCl (50 mM/ pH 7,4) 810 μl Phosphoproteinwaschpuffer 50 μl NP40 1 % 40 μl Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten</p>

Material und Methoden

Sammelgellösung	<p>Aqua bidest. (3,6 ml)</p> <p>40 %iges Bis-Acrylamid Ratio 19:1 (0,8 ml)</p> <p>Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (1,5 ml)</p> <p>SDS (10 % w/v) (60 µl)</p> <p>APS 10 % (60 µl)</p> <p>TEMED (15 µl)</p>
Trenngellösung 12 %	<p>Aqua bidest. (5,386 ml)</p> <p>40 %iges Bis-Acrylamid Ratio 19:1 (5,64 ml)</p> <p>Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (3,75 ml)</p> <p>SDS (10 % w/v) (150 µl)</p> <p>APS 10 % (75 µl)</p> <p>TEMED (15 µl)</p>
Tris-EDTA-Puffer	<p>10 mM Tris Base</p> <p>1 mM EDTA Lösung, pH 9,0</p>
Verdünnungsmedium (für Immunfluoreszenz)	<p>10 mM PBS</p> <p>1 % BSA (w/v)</p> <p>0,05 % Tween-20 (v/v)</p>
Permeabilisierungsmedium (für Immunfluoreszenz)	<p>Triton X-100, 1 %</p> <p>PBS, 50 ml</p>
Blockingmedium (für Immunfluoreszenz)	<p>Wirtsserum des sekundären Antikörpers, 5 %</p> <p>verdünnt in Verdünnungsmedium</p>

Tabelle 12: Puffer und Lösungen

2.1.9 Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Nummer	Bezugsquelle
Cleaved Caspase 3 (Asp175)	Ziege	1:1000	#9661	Cell Signaling Technology
Caspase 8 (<i>full; cleaved</i>)	Maus	1:1000	#9746	Cell Signaling Technology
Caspase 9 (<i>full; cleaved</i>)	Kaninchen	1:1000	#9502	Cell Signaling Technology
Beta-Aktin	Kaninchen	1:1000	#A1978	Sigma Aldrich

Tabelle 13: Primärantikörper für Western Blot

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Nummer	Bezugsquelle
Anti-Maus IgG-HRP	Ziege	1:2000	sc-2005	Santa Cruz
Anti-Kaninchen IgG-HRP	Ziege	1:2000	sc-2004	Santa Cruz
Anti-Ziege IgG-HRP	Esel	1:2000	sc-2033	Santa Cruz
Anti-Kaninchen IRDye 800 (für LICOR)	Ziege	1:2000	610-131-121	Rockland

Tabelle 14: Sekundärantikörper für Western Blot

Material und Methoden

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Nummer	Bezugsquelle
Nucleoprotein (Influenza A)	Maus	1:100	M101100NP65	EVL
<i>cytochrom C</i>	Maus	1:200	556432	BD Bioscience
BAX (clone YTH6A7)	Maus	1:200	2281MC100	Trevigen
TOM 20	Kaninchen	1:200	sc-11415	Santa Cruz

Tabelle 15: Primärantikörper für Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Nummer	Bezugsquelle
Anti-Kaninchen- Alexa Fluor 488	Ziege	1:8000	A-11070	Life Technologies
Anti-Maus-Alexa Fluor 488	Ziege	1:8000	A-11017	Life Technologies
Anti-Maus-Alexa Fluor 555	Ziege	1:8000	A-21127	Life Technologies
Anti-Maus-Alexa Fluor 647	Ziege	1:8000	A-21237	Life Technologies

Tabelle 16: Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz

2.1.10 Kits und Assays

Bezeichnung	Hersteller
DC Protein Assay	Bio-Rad
DyLight™ 594 Microscale Antibody Labeling Kit	Thermo Scientific
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific

Tabelle 17: Kits und Assays

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Biomax Light Röntgenfilme	Sigma Aldrich
Combitips (1, 2, 5 und 10 ml)	Eppendorf
Einweg-Pipetten, serologisch (2, 5, 10 und 25 ml)	Falcon

Material und Methoden

Immun-Blot® PVDF Membrane 0.45 µm	Bio-Rad
Kryoröhrchen (1, 5 und 2 ml)	Roth
MicroAmp™ Optical 96-well reaction plate	Applied Biosystems
Mikrotiterplatten, 96 well	Sarstedt
Petrischalen (10cm Durchmesser)	Falcon
Pipettenspitzen, gestopft, <i>low binding</i> (1000, 200, 10 µl)	Biozym
Reaktionsgefäße (0,5, 1 und 2 ml)	Sarstedt
Schraubbecher (100 ml)	Sarstedt
Whatman-Papier	vWR
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt
Zellkulturplatten (24, 12 und 6 Vertiefungen)	BD
Zellschaber	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (25 und 50 ml)	Falcon
Ibidi µ-slide, 8-well (glass bottom)	Ibidi
Ibidi µ-slide, 8-well	Ibidi
Skalpell	FEATHER®
Objekttäger	SuperFrost®

Tabelle 18: Verbrauchsmaterialien

2.1.12 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Thermo Electron Corporation
Höchstauflösungsmikroskop, ELYRA PS.1	Zeiss
Feinwaage HM-300	A&D Instruments
Filter Max F5 Multi-Mode	Molecular Devices
Kreisschüttler GFL 3005	GFL
Labdancer (Mini-Tischvortex)	vWR™ Avantor
<i>Life-Cell-Imaging</i> Mikroskop LSM 780	Zeiss
Magnetrührer D-6011	Neolab
Mini Trans Blot® Cell-Tank-Blot-System inklusive Zubehör	Bio-Rad

Material und Methoden

Mini-Protean® TetraCell- Elektrophoresekammer mit Zubehör	Bio-Rad
Neubauer-Zählkammer	Laboroptik
Odyssey-Scanner	LI-COR Biosciences
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Sicherheitswerkbank HERAsafe KS	Thermo Electron Corporation
Smart Office Scanner PL2546	PlusTek
SpectraMax M2 Multimode Reader	Molecular Devices
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Vakuumsaugpumpe	Millipore
Waage 440-33	KERN
Zentrifuge Biofuge primo	Heraeus Instruments

Tabelle 19: Geräte

2.1.13 Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop Elements 7.0	Adobe Systems
ImageJ	open source
Imaris v8.1.2	Bitplane AG
Prism 6	GraphPad
SoftMax Pro 6.4	Molecular Devices
ZEN 2.1	ZEISS
ZEN 2012	ZEISS

Tabelle 20: Software

2.2 Methoden

2.2.1 Zell- und Gewebekultur

Sämtliche zellbiologische Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Zellkulturbank unter der Sicherheitsstufe S2. Soweit nicht anders vermerkt erfolgten Kultivierung, Stimulation und Infektion aller Zellen und Gewebe stets bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Zellkulturschrank.

2.2.1.1 Auftauen von Zellen

Für die Aussaat der A549- und MDCK-Zellen wurden die Kryoröhrchen zunächst vorsichtig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, anschließend in 10 ml Hams F12 (mit 10 % FCS, 1 % Glutamin) resuspendiert und für 5 min bei 900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 12 ml frischem Medium in T75-Zellkulturflaschen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium ausgetauscht.

2.2.1.2 Anlegen von Kryostocks

Für die Konservierung wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben von der Zellkulturflasche abgelöst, 5 min bei 900 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde daraufhin mit dem entsprechenden Medium, welches zuvor mit 10 % DMSO versetzt wurde, resuspendiert und je 1 ml der Zellsuspension auf Kryoröhrchen verteilt. Um Kristallisationsschäden während des Einfrierens zu verhindern, wurden die Zellen in einer mit Isopropanol gefüllten Box für mindestens 24 h bei -80 °C eingelagert. Danach wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.3 Kultivierung und Aussaat von A549-Zellen

Bei der A549-Zelllinie handelt es sich um humane AEC, die aus einem Lungenkarzinom entnommen wurden und Eigenschaften von AEC II besitzen [103]. Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen kultiviert und zweimal wöchentlich beim Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % passagiert. Das Medium wurde dafür abgenommen, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und für 5 min bei 37 °C mit 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde mithilfe des zuvor abgenommenen Mediums gestoppt und die Zellsuspension 5 min bei 900 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet mit 5-8 ml Medium gelöst und für weitere Passagen im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 in die Zellkulturflaschen ausgesät. Für geplante Experimente wurde zunächst die Zellzahl bestimmt, dafür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypan-

blau vermischt und mittels einer Neubauer-Zählkammer in allen 4 Quadranten unter einem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro ml berechnete sich mit der folgenden Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Mittelwert der Zellzahl aus 4 Quadranten}}{2 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerkonstante } (10^4)}$$

Die Zellsuspension wurde entsprechend im Kulturmedium verdünnt und ausgesät.

2.2.1.4 Kultivierung und Aussaat von MDCK-Zellen

MDCK-Zellen sind aus der Niere eines gesunden Hundes entnommen und werden standardmäßig für die Titration und Vermehrung von Influenzaviren verwendet [104]. Ähnlich der A549-Zellen wurden die Zellen in T75-Zellkulturflaschen mit 12 ml MEM (mit 10 % FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Zweimal pro Woche wurden die Zellen passagiert, sobald sie eine 95-prozentige Zelldichte erreichten. Das Kulturmedium wurde dafür abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin bei 37 °C abgelöst. Nachdem die enzymatische Reaktion mit Medium abgestoppt und die Zellen abzentrifugiert wurden, konnte das Zellpellet im frischen Medium gelöst und die Zellen erneut ausgesät werden.

2.2.1.5 Transiente Transfektion von A549-Zellen

Für die FRET basierte Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts wurden A549-Zellen transient mit beiden Plasmiden mitoATEAM und cytoATEAM transfiziert. Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von $2,5 \times 10^4$ bzw. 3×10^4 pro well mit einem Volumen von 250 μl in einem 8-Well Ibidi $\mu\text{-slide}$ ausgesät. Am Folgetag der Aussaat wurde je 30 μl OptiMEM in 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt und 0,4 μg der Plasmid-DNA hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 1 μl ViaFect™ *transfection reagent* und die Ansätze wurden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit je 170 μl frischem Medium versehen, welches nach Ablauf der 15 min Inkubationszeit mit je 30 μl des Transfektionsansatzes aufgefüllt wurde. Nach 6 h wurde der Transfektionsansatz abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Am nächsten Tag wurde die Transfektionseffizienz mittels eines Fluoreszenzmikroskops überprüft und das Medium erneut durch Frisches ausgetauscht. Für die Infektionsversuche wurde das Medium 48 h nach erfolgreicher Transfektion durch je 200 μl Infektionsmedium (phenolrotfreies Hams F12 mit 0,3 % BSA, 1 % Glutamin) mit H3N2 bzw. ohne Virus zur Kontrolle ersetzt. Die Funktion der ATP-Sensoren wurde mithilfe des mitochondrialen ATP-Synthase-

Hemmers Oligomycin überprüft. Nach 24 h Inkubation mit galaktosehaltigem Medium wurden die Zellen mit 10 µg/ml Oligomycin für 30 min stimuliert. Die Galaktose sensibilisiert die Zellen für mitochondriale Inhibitoren, weil die ATP-Synthese auf die Mitochondrien verlagert wird. Vor jeder Messung wurden die *slides* für eine Stunde im zuvor auf 37 °C und 5 % CO₂ eingestellten Fluoreszenzmikroskop equilibriert.

2.2.1.6 Kultivierung von humanem Lungengewebe

Das humane Lungengewebe entstammt von Patienten, die sich Lungentumorresektionen unterziehen mussten. Die Berliner Thoraxchirurgien des Helios Klinikums Emil von Behring Zehlendorf, dem DRK Klinikums Mitte, dem Vivantes Klinikum Berlin Neukölln und der Charité Campus Mitte stellen in freundlicher Unterstützung diese Proben peri-operativ her und zur Verfügung. Das tumorfreie Normalgewebe dieser Proben findet dabei Verwendung. Alle Patienten wurden vor der Operation über die Probenentnahme aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis für die weitere Verwendung ihres Gewebes zu Forschungszwecken. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité (Projekte WEA2/050/08 und EA2/023/07) genehmigt. Das Lungengewebe wurde nach der Entnahme in sterilem RPMI-1640 gekühlt bei 4°C per Bote an das Labor verschickt. Dort wurden die Gewebeproben unmittelbar präpariert und mit einem Skalpell in einer Petrischale auf Eis in ca. 1 mm dünne Scheiben geschnitten. Die Stücke wurden gewogen, mit zusatzfreiem RPMI-1640 gewaschen und in 24-well-Platten über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ mit je 1,5 ml RPMI-1640 (mit 30 % BSA, 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung in ein mit 250 µl Medium gefüllten 8-well Ibidi *µ-slide*. Vor jeder Versuchsreihe wurden die Proben für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ vor inkubiert.

2.2.2 Influenza-A-Virus Infektion von Zellkulturen und humanem Lungengewebe

2.2.2.1 Virusvermehrung

Für die Vermehrung von H3N2 A/Panama/2007/1999 und A/Puerto Rico/8/34 (NS1-GFP) wurden MDCK-Zellen verwendet. Die Zellen wurden dafür in T75-Zellkulturflaschen kultiviert und nach Erreichen einer Zelldichte von 95 % eingesetzt. Die Infektion erfolgte nach einmaligem Waschen mit PBS mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 0,001 für 45 min bei Raumtemperatur. Nach jeweils 10 min wurden die Flaschen geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Viren zu erreichen. Die Virusverdünnungen erfolg-

ten in PBS⁺⁺/BSA und es wurden je 1 ml pro Zellkulturflasche eingesetzt. Die Viren wurden abgesaugt und die Zellen mit frischem MEM (mit 10 % FCS, 1 % Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) inkubiert. Das Medium wurde zuvor mit 1 mg/ml TPCK-Trypsin versetzt, welches für die Produktion von neuen infektiösen Viren nötig ist. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellüberstände abgenommen, bei 2500 rpm für 5 min zentrifugiert und aliquotiert für eine Lagerung bei -80 °C.

2.2.2.2 Plaqueassay

Der Virustiter von H3N2 A/Panama/2007/1999 wurde mittels eines Avicel-Plaqueassay ermittelt, welcher die Quantifizierung von infektiösen Viruspartikeln in einer virushaltigen Lösung ermöglicht. Auf Grundlage des zytopathischen Effekts von IAV auf Zellen wird ein Virustiter ermittelt und als plaquebildende Einheit (*plaque forming unit*, pfu) angegeben. MDCK-Zellen wurden in 12-well Platten ausgesät und 24 h nach Erreichen der Konfluenz mit je 150 µl einer Verdünnungsreihe, der zur überprüfenden Probe, infiziert. Die Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-10}) wurden mit PBS in 1,5 ml Reaktionsgefäßen angefertigt. Das Virus wurde für 45 min schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde Avicelmedium, welches mit 1 mg/ml TPCK-Trypsin versetzt war, auf die Zellen gegeben und für 48 h im Zellkulturschrank inkubiert. Das Medium stellt sicher, dass ausschließlich angrenzende Zellen infiziert werden und die ausgebildeten Plaques im Zellrasen der Virusverdünnung entsprechen. Nach 48 h Inkubationszeit wurde das Avicelmedium durch gründliches Waschen mit PBS entfernt bis keine Avicelflocken mehr sichtbar waren. Anschließend wurden die Zellen mithilfe einer 10 % Formaldehyd- und 1 % Kristallviolettlösung fixiert und gefärbt. Die Plaques wurden ausgezählt und die pfu/ml zusammen mit dem eingesetzten Volumen errechnet. Auf dieser Grundlage konnte die MOI für alle Zellkulturexperimente ermittelt werden.

2.2.2.3 Infektion von Zellen

Für die Infektionsversuche mit Pan/99(H3N2) wurden A549-Zellen ausgesät und am nächsten Tag für die Infektion vorbereitet. Zur einheitlichen Infektion wurde eine MOI von 5 gewählt. Die hohe MOI gewährleistete, dass alle Zellen infiziert wurden. Das Virus wurde mit phenolrotfreiem Hams F12 (mit 0,3 % BSA, 1 % Glutamin) verdünnt, die Volumina wurden je nach Versuchsaufbau an die jeweiligen Zellkulturschalen angepasst. Das Medium während der Infektion enthielt kein TPCK-Trypsin und die MOI wurde für die zuvor gewählten Zellzahlen bei der Aussaat errechnet; basierend auf einem theoretischen Wachstumsfaktor von 2. Das Kulturmedium der Zellen wurde nach einmaligem

Waschen mit PBS durch phenolrotfreiem Hams F12 (mit 0,3 % BSA, 1 % Glutamin) mit H3N2 bzw. ohne Virus zur Kontrolle ersetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation in einem Zellkulturschrank für die entsprechenden Zeitpunkte (1, 16, 24 und 48 h). Zu entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen entweder für die Lebendzellmikroskopie vorbereitet, fixiert für Immunfluoreszenzanalysen oder für die Proteinextraktion lysiert. Für die Quantifizierung von Viruspartikeln wurden die Zellüberstände gesammelt, bei 13000 rpm für 10 min und 4 °C zentrifugiert und aliquotiert bei - 80°C gelagert.

2.2.2.4 Infektion von humanem Lungengewebe

Für die Infektion humanen Lungengewebes wurden die Proben auf einem sterilen Tuch trocken getupft und zusammen mit dem in RPMI-1640 (mit 30 % BSA, 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin) verdünnten PR8 *NS1-green fluorescent protein* (GFP) (H1N1) Virus jeweils in ein *well* eines Ibidi μ -slide gegeben. Für die Darstellung der Zellorganellen wurden die Lebendfarbstoffe Tetramethylrhodamin Ethyl Ester (TMRE), CellEvent™ Caspase-3/7Green Substrat, MitoTracker®Orange und Syto82, der die DNA in Zellkernen markiert, verwendet. Das Gewebe wurde je nach Fluoreszenzfarbstoff für 30 min bis 2 h vor der Messung mit dem Farbstoff im Zellkulturschrank inkubiert, anschließend dreimal mit HBSS gewaschen und mit neuem Medium versehen. Das Caspase 3/7-Substrat wurde direkt auf die Lungenproben gegeben, ohne den Farbstoff auszuwaschen. Die Lebendzellmikroskopie erfolgte über 48 h bei 37 °C und 5% CO₂ in einem Zellinkubator.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinextraktion und Proteinquantifizierung

Für die Proteingewinnung wurden A549-Zellen in 6-Well Platten mit einer Zellzahl von 1×10^6 pro *well* in 1 ml ausgesät und am nächsten Tag infiziert. Zur Vermeidung der Degradation durch Proteasen erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis. Das Infektionsmedium wurde abgesaugt und es folgte die Zugabe von 100 μ l eiskaltem Phospho-Zellyse-Puffer. Nach 10 min Inkubationszeit wurde das Zellysat mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Proteine vom überschüssigen Zellabfall zu befreien wurden die Proben für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe eines DC-Protein-Assays und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Der DC-Protein-Assay ist ein kolorimetrisches Verfahren, welches auf der Methode der Proteinbestimmung nach

Lowry basiert [105]. Nach Zugabe von Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagens zu einem zuvor gebildeten Kupfer-Protein-Komplex wird das Reagens zusammen mit Kupfer im Komplex reduziert. Die Absorption kann bei der Wellenlänge von 750 nm gemessen werden und korreliert mit der Menge des vorhandenen Proteins. Anhand der Standards von 1,5-0,2 mg/ml BSA wurde eine Standardkurve erstellt. Anschließend wurden die Lysate 1:4 mit 4 x Lämmli-Puffer verdünnt, für 5 min bei 95 °C auf einem Heizblock denaturiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 Western Blot

Die Proteine wurden anhand ihres Molekulargewichts in einem 12 %igen SDS-Trenngel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Trenngel und das Sammelgel, welches die Probensammlung vor der Auftrennung ermöglicht, wurden in einer Gießvorrichtung zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die Gele wurden anschließend in eine Laufkammer gespannt und die Kammern mit einem geeigneten Laufpuffer gefüllt. Für die Proteinauftrennung wurden pro Gel je 60 oder 80 µg Protein eingesetzt. Zusätzlich wurde für jedes Gel ein vorgefärbter Proteinmarker als Größenmarker mitgeführt. Die Proteinauftrennung erfolgte bei 100-120 V und die Gelelektrophorese wurde gestoppt, sobald die Proben den unteren Rand des Gels erreicht hatten. Im Anschluss wurden die zuvor aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Trägermembran für 1 h bei 100 V transferiert. Der Transfer erfolgte in einer mit eiskalten Transferpuffer gefüllten Blotkammer, in welcher die Trenngele zusammen mit der Trägermembran und zwei Lagen Whatman-Papier pro Seite eingespannt wurden. Um den Erfolg des Western Blots zu überprüfen und die Proteine auf der Membran zu fixieren, wurde eine PonceauS-Färbung durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für 1 h in 5 % Milchpulverlösung schwenkend bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die primären Antikörper wurden im Verhältnis 1:1000 für die ECL-basierte Detektion in 5 % Milchpulverlösung oder für die LICOR-basierte Detektion in Odyssey-Puffer verdünnt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. In einem dreimaligen Waschgang wurde der überschüssige Primärantikörper von der Membran entfernt und die Membran anschließend für 1 h schwenkend bei RT mit einem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert. Die eingesetzten Sekundärantikörper für die Detektion mittels ECL wurden in 5 % Milchpulverlösung im Verhältnis 1:20000 verdünnt, die fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper für das LICOR-System in Odyssey Puffer im Verhältnis 1:2000. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die

Detektion entweder direkt in einem LICOR-Scanner oder die Membran wurde nach Herstellerangaben mit einem ECL-Reagenz inkubiert und mithilfe eines Röntgenfilmes belichtet. Die Caspasen 3, 8 und 9 wurden mittels ECL detektiert und das dazugehörige Aktin auf derselben Membran mittels LICOR Odyssey nachgewiesen.

2.2.4 Immunhistochemie

2.2.4.1 Probenfixierung

Zur indirekten Immunfluoreszenzanalyse wurden A549-Zellen in einem 8-well Ibidi μ -slide, die einen optischen Glasboden besitzen, mit einer Zellzahl von 7×10^4 pro well in 250 μ l ausgesät. Am nächsten Tag folgte die Infektion mit Pan/99(H3N2), um 48 h nach Beginn der Infektion die Zellen mit einer 3,7 %igen Paraformaldehydlösung (PFA) zu fixieren. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 200 μ l PFA versetzt, welches für 15 min bei RT unter dem Abzug mit den Zellen inkubiert wurde. Im Anschluss folgte ein dreimaliger Waschvorgang mit PBS.

2.2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Detektion von Zellorganellen- und -strukturen mittels Fluoreszenzfarbstoffen wurden A549-Zellen nach der Fixierung für 5 min bei RT mit 1 % Triton (200 μ l je well) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimalig mit PBS gewaschen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit Blockingmedium (PBS, 1 % BSA, 0,05 % Tween-20 mit 5 % des Serums vom Sekundärantikörper), was unspezifische Bindungen der Antikörper verhindert. Das Medium wurde anschließend abgenommen und die Zellen mit 200 μ l des in PBS (mit 1 % BSA, 0,05 % Tween-20) verdünnten Primärantikörpers bei 4 °C über Nacht inkubiert. In einem dreimaligen Waschvorgang mit PBS wurde der überschüssige Primärantikörper von den Zellen entfernt, um anschließend den Sekundärantikörper erneut bei 4 °C über Nacht zu inkubieren. Für einige Experimente erhielten die Zellen eine zweifache Fluoreszenzfärbung und der Vorgang wurde wiederholt. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und zur Färbung der Zellkerne für 20 min bei RT mit 200 μ l 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Lösung versehen. Es folgte ein dreimaliger Waschvorgang und die Zellen wurden für die Experimente mittels hochauflösender Mikroskopie in 200 μ l CFM3-Medium oder PBS, welches zuvor mit 0,01 % Natriumazid versetzt wurde, bei 4 °C gelagert.

2.2.5 Lebendzell- und gewebsmikroskopie

Für alle Experimente der Lebendzell- und Gewebsmikroskopie erfolgte die mikroskopische Auswertung mithilfe des LSM 780 Mikroskop, einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop der Firma Zeiss. Für die Aufnahmen wurden die folgende Objektive verwendet: 40x Wasser-Objektiv (Plan Achromat, Differentialinterferenzkontrast-DIC) M27, Numerische Apertur 1,2) und ein 63x Öl-Objektiv (Plan Achromat, DIC M27, Numerische Apertur 1,4). Während der Lebendzell- und gewebsmikroskopie wurden die Kulturplatten in einer speziellen Inkubationskammer im Mikroskop platziert. Damit konnten stabile Kulturbedingungen von 37 °C und 5 % CO₂ über einen Zeitraum von 48 h kontinuierlich aufrechterhalten werden. Die verwendeten Zellmedien wurden für jeden Versuch vorgewärmt auf die Zellen bzw. auf das Gewebe gegeben. Spezielle Messungen mittels Lebendmikroskopie werden in den folgenden Kapiteln aufgeführt.

2.2.5.1 Mitochondriales Membranpotential und Caspasen-3/7-Aktivierung

Das $m\Delta\Psi$ wurde zusammen mit der Aktivierung von Caspasen 3/7 während der Pan/99(H3N2) Infektion in einer Zeitserie über 48 h gemessen. Zunächst wurden A549-Zellen für 30 min mit 10 nM TMRE inkubiert, welches abhängig vom $m\Delta\Psi$ in alle Mitochondrien diffundiert. Der überschüssige Fluoreszenzfarbstoff wurde anschließend mittels eines dreimaligen Waschvorgangs abgewaschen und das Medium durch phenolrot-freies Hams F12 (mit 0,3 % BSA, 1 % Glutamin) mit Pan/99(H3N2) bzw. ohne Virus ersetzt. Für die Messung der Apoptoseinduktion wurde das Medium zusätzlich mit dem CellEvent™ Caspase-3/7-Green-Substrat versetzt (im Verhältnis von 1:500 verdünnt). Das Substrat besitzt eine DEVD-Peptid-Sequenz, welche mit einem Nukleinsäurefarbstoff verbunden ist. Die Sequenz verhindert, dass der Farbstoff an die DNA bindet, wodurch initial keine Fluoreszenz messbar ist. Mit der Anwesenheit aktivierter Caspasen 3/7 wird der Farbstoff von dem DEVD-Peptid abgespalten und kann an die DNA binden, wodurch ein Fluoreszenzsignal im Zellkern sichtbar wird. Das TMRE- und Caspasen-3/7-Signal wurde über einen Zeitraum von 48 h kontinuierlich alle 10 min aufgenommen. Für die Berechnungen des $m\Delta\Psi$ pro Zelle wurde das TMRE-Signal, welches auf die Kontrolle normiert war, auf die gesamte Zellzahl relativiert. Für die Messung des Caspase-3/7-Signals nach Zugabe von Apoptose induzierender Substanzen wurden A549-Zellen in 96-well-Platten ausgesät. Es folgte die Infektion mit Pan/99(H3N2) und die Stimulation mit entsprechenden Substanzen für 48 h. Die Caspasen-3/7-Aktivität wurde unter Inkubation

mit 2,5 mM H₂O₂, 4 µM Staurosporin und 1 µg/ml Pneumolysin gemessen. Das Fluoreszenzsignal wurde an den entsprechenden Zeitpunkten bei einer Wellenlänge von 530 nm in einem Mikroplatten-Reader gemessen.

2.2.5.2 Messungen intrazellulären ATP-Konzentration mittels Förster-Resonanz-Energie-Transfer

Für die mitochondriale und zytosolische Bestimmung der ATP-Konzentration erfolgte die Transfektion mit den Plasmiden beider ATP-Sensoren wie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben. Die Messungen basieren auf dem FRET-Mechanismus, bei dem ein strahlungsfreier Energietransfer zwischen einem Donor- und Akzeptorchromophor erfolgt. Für den effektiven Transfer wird eine Distanz zwischen beiden Chromophoren von maximal 10 nm benötigt und das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen [106]. Der FRET-basierte ATP-Sensor ATEAM setzt sich aus einem Fluoreszenzpaar zusammen. Dabei ist das cyanfluoreszierende Protein (CFP) mit der monomeren Variante des Venus-Proteins, ein gelb fluoreszierendes Protein (YFP) über die ϵ -Untereinheit der F₀F₁-ATP-Synthase von *bacillus subtilis* verbunden. Die physiologische Rolle der ϵ -Untereinheit ist die Regulation der F₀F₁-ATP-Synthase abhängig von dem intrazellulären ATP-Gehalt. Nach der Bindung von ATP verändert die Untereinheit ihre Konformation von einer relaxierten in eine gefaltete Form, wodurch die räumliche Nähe beider Fluoreszenzproteine variiert. In Anwesenheit von ATP faltet sich die Untereinheit zusammen und verringert die Distanz beider Proteine zueinander, auf diese Weise wird die FRET-Effizienz verstärkt und Licht vermehrt bei 527 nm emittiert. Die relaxierte Form bei lokal geringeren ATP-Konzentrationen verringert die räumliche Nähe des Akzeptors YFP zum zugehörigen Donor, der FRET-Effekt verringert sich und Fluoreszenzenergie wird größtenteils bei 475 nm von CFP emittiert. Während das eine ATEAM-Konstrukt hauptsächlich im Zytosol exprimiert wird (cytoATEAM), wurde durch eine zusätzlich am N-terminalen Ende lokalisierte mitochondriale Signalsequenz (2x Cytochrome C-Oxidase-Untereinheit VIII) eine mitochondriale Lokalisierung erreicht (mitoATEAM) [102]. Für die exakte Trennung der sehr ähnlichen Emissionsspektren von CFP und YFP wurde bei der Analyse der FRET-Signale spektrale, konfokolae Lebendzellmikroskopie eingesetzt. Die ATP-Sensoren wurden in allen FRET-Experimenten bei einer Wellenlänge von 458 nm angeregt. Bei der mikroskopischen Auswertung wurden je Zeitpunkt und Kondition mindestens 10 Zellen pro Experiment analysiert.

2.2.5.3 Mitochondriale Motilität

A549-Zellen wurden in einem 8-well μ -slide (ibiTreat) mit einer Zellzahl von 7×10^4 pro well in 250 μ l ausgesät und am Tag darauf mit Pan/99(H3N2) infiziert. Nach entsprechenden Zeitpunkten (1, 16, 24 und 48 h) wurden die Zellen mit MitoTracker®Orange für 30 min im Zellkulturschrank gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde in phenolrotfreiem Hams F12 (mit 0,3 % BSA, 1 % Glutamin) verdünnt mit einer Endkonzentration von 100 nM. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen, danach mit frischem Medium versetzt und für eine kurze Zeit in der Inkubationskammer kalibriert. Die mitochondriale Motilität wurde über eine Zeitreihe alle 3 s visualisiert und die Bewegungen einzelner Mitochondrien mittels eines automatisierten Trackingprogramms der Bildanalysesoftware Imaris gemessen. Dabei wurden zufällig ausgewählte Bildausschnitte der Kontrolle und infizierten Probe mit je 10-20 Zellen pro Experiment analysiert. Mithilfe der Software Imaris wurde ein geeigneter Filter für die Messung einzelner Mitochondrien über die aufgezeichnete Zeitserie generiert. Die Auswahl und Einstellungen des Trackingprogramms erfolgten mit freundlicher Unterstützung von Dr. Andreas Nehrlich. Folgende Parameter des Programms für die Analyse wurden dafür ausgewählt: Diameter = 1.0 μ m, Hintergrundsubtraktion, maximale *track*-Entfernung = 3 μ m, *maximum gap size* = 0 Bilder, Trackingalgorithmus = autoregressive Bewegungen. *Tracks* mit einer Länge von $<0.355 \mu$ m bis $>8 \mu$ m wurden von der Messung ausgeschlossen. Je Zeitpunkt und Kondition erfolgte die automatisierte Auswertung von mindestens 8-10 Zellen pro Bildausschnitt.

2.2.6 Spektrale Konfokalmikroskopie

Die Methode der Fluoreszenzmikroskopie stützt sich auf die Eigenschaft von Fluorochromen, welche das Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und anschließend Licht einer längeren Wellenlänge emittieren können. Allerdings wird das Licht bei Proben wie beispielsweise Lungengewebe, was eine Schnittdicke von etwa 10 μ m besitzt, auch ober- und unterhalb der Fokusebene emittiert. Die ursprünglich scharfe Aufnahme verliert an Bildqualität und zuvor sichtbare Strukturen der Probe werden möglicherweise nicht mehr optisch aufgelöst. Zur Umgehung dieses Problems wurde bei der konfokalen Mikroskopie eine Lochblende vor dem Detektor eingeführt, welche Lichtsignale außerhalb der Fokusebene ausblendet. Die Blende ist derartig angeordnet, dass ihre Öffnung und der Beleuchtungspunkt in der Probe gleichzeitig im Fokus, zueinander konfokal sind. Folglich wird nur die Fluoreszenz einer optischen Ebene detektiert, was zu einer deutlich

höheren optischen Auflösung und einem stärkeren Bildkontrast im Vergleich zur herkömmlichen Lichtmikroskopie führt. Das konfokale Fluoreszenzbild entsteht durch das digitale Zusammensetzen der einzelnen Bildpunkte, die zuvor durch punktförmiges Abtasten der Probe mithilfe eines Laserstrahls erfasst wurden. Durch Verschieben der Fokusebene können die Proben in viele optische Schnitte zerteilt werden, welche dann zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammengesetzt und digital verarbeitet werden.

Humanes Lungengewebe weist einen hohen Anteil an kollagenen Fasern auf, sodass sich bei Mikroskopie dieses Gewebes die Problematik der Autofluoreszenz ergibt. Die spezifischen Spektren der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe werden überlagert und Strukturen im Präparat können nicht mehr sicher zugeordnet werden. Zur Umgehung des Problems wurde die Methode des spektralen Entmischens bei allen Experimenten der Lebendgewebemikroskopie angewendet. Dabei wird das emittierte Fluoreszenzsignal der Probe über ein Prisma im Mikroskop in seine einzelnen Wellenlängen aufgetrennt und anschließend über einen Spektraldetektor mit 32 Kanälen den etwa 8 nm breiten Bildkanälen (λ -Kanäle) zugeordnet. Das Ergebnis ist ein Bilddatensatz, dessen Pixel die gesamte spektrale Information enthält. Die Anteile der verschiedenen Fluoreszenzsignale von überlagerten Spektren können anschließend mittels zuvor gemessener Referenzspektren in jedem Bildpixel errechnet und voneinander getrennt werden [106].

2.2.7 Hochauflösende Mikroskopie

Für die sogenannte 3D *structured illumination microscopy* (SIM) ein Verfahren der hochauflösenden Mikroskopie, wurde ein ELYRA PS.1 Mikroskop mit einem 63x Öl-Objektiv (Plan Achromat, DIC M27, Numerische Apertur 1,4) verwendet. Bei diesem Verfahren wird ein 3D-Datensatz der Probe mit einem strukturierten, räumlich angeordneten Anregungslicht erstellt. Zur Erzeugung des SIM-Rohbilddatensatz wurden 15 bzw. 25 Bilder jeder Ebene mit fünf Phasenverschiebungen und drei oder fünf Drehungen eines Linien-gitternetzes aufgenommen. Aus diesem 3D-Rohbilddatensatz wurde anschließend ein Bild mit gesteigerter Auflösung errechnet. Für die Bildverarbeitung wurde die ZEN 2.1 Software mit automatisch determinierten Parametern des Herstellers verwendet.

2.2.8 Bildanalyse

Die Bilderfassung und -verarbeitung erfolgte mittels ZEN 2012 Software der Firma Zeiss. Für die Quantifizierung des Caspase-3/7-Signals und $m\Delta\Psi$ wurde jeweils eine rechteckige *region of interest* (ROI) in dem Bildausschnitt platziert. Der Bildausschnitt wurde als 2 x 2 bzw. 3 x 3 *tile scan* aufgenommen und enthielt ca. 250-500 Zellen. Aus der

Intensität aller Bildpunkte in der ausgewählten ROI wurde der Mittelwert gebildet. Anschließend wurde die Differenz von Werten der Kontrolle und Infektion ermittelt, wobei die Kontrollwerte das jeweilige Hintergrund Fluoreszenzsignal darstellten. Um das $m\Delta\Psi$ einzelner Zellen im Bildausschnitt zu messen, wurde die Zellzahl zu den Zeitpunkten 1, 16, 24 und 48 h mithilfe eines Zusatzprogrammes von Fiji/ImageJ manuell gezählt und der resultierende Wert vom Mittelwert der maximalen Intensität der Bildpunkte subtrahiert. Bei Vergleichen von mehreren Bildern wurden die gleichen Einstellungen für die Intensitäten einzelner Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Sämtliche Bildanalysen erfolgten mit freundlicher Unterstützung von Dr. Andreas Nerlich.

2.2.9 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die mikroskopischen Abbildungen sind repräsentative Versuchsergebnisse aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen mit je 2-5 Bildausschnitten. Die Ergebnisse wurden zudem durch einen zweiten Untersucher kontrolliert. Für die Abbildung der Western Blots wurden ebenfalls repräsentative Blots aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism 7 (Version 7.01). Es wurde nicht von einer Gauß'schen Normalverteilung der Variablen ausgegangen. Zur Analyse der Daten wurde eine mehrfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die Statistischen Signifikanzen wurden wie folgt beschrieben: n.s. nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Zur graphischen Darstellung wurden die Daten als Mittelwerte \pm *Standard error of the mean* (SEM) der jeweiligen Versuchsreihe angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Influenza-A-Virus induziert mitochondriale Alterationen und Zelltod im humanen Lungengewebe

Frühere Untersuchungen am Modell der *ex vivo* infizierten humanen Lunge zeigen, dass AEC II die primären Zielzellen für die virale Vermehrung von IAV im Menschen sind [32]. Mithilfe dieses in der Arbeitsgruppe bereits etablierten humanen *ex vivo* Lungenkulturmodells sollte nun weiterhin untersucht werden, wie sich der zeitliche Verlauf einer IAV-Infektion im primären Zielgewebe hinsichtlich Zelltodinduktion darstellt und ob bzw. zu welchem Zeitpunkt mitochondriale Alterationen diesen Prozess begleiten.

Um die virusinfizierten AEC II zu identifizieren, wurde das *ex-vivo*-Lungengewebe mit einem GFP-exprimierenden PR8 NS1-GFP(H1N1) Virus infiziert. Das Virus beinhaltet eine trunkierte NS1-Sequenz und kann damit nicht die wirtsseitig induzierte IFN-Antwort unterdrücken, jedoch ist es voll vermehrungsfähig und zeigt den gleichen zellulären Tropismus wie andere IAV-Subtypen. Mittels spektraler, konfokaler Lebendgewebemikroskopie wurden zunächst GFP-positive Zellen in den Alveolen identifiziert (Abbildung 5 A). Erste positive AEC II traten im Zeitraum von 6-10 h nach Infektion auf. Die dreidimensionale Rekonstruktion des Gewebes mittels *z-stacks* zeigt das kollagene Gerüst der Alveole in weiß. Schwarze Areale repräsentieren den luftgefüllten Anteil der Alveolen. Die Syto82 markierten Zellkerne zeigen uninfizierte AEC sowie weitere Zellen des dreidimensionalen Gewebeverbandes (ocker). In weiteren Infektionsexperimenten wurde ein ähnliches Vorgehen gewählt, jedoch der Schwerpunkt auf die zeitliche Verfolgung einzelner virusinfizierter AEC II gelegt. Dabei unterblieb die Färbung mit Syto82, welches neben nukleärer DNA auch Mitochondrien markiert, für die stattdessen MitoTrackerOrange verwendet wurde (Abbildung 5 B). Zu Beginn der Lebendgewebemikroskopie (12 h nach Infektion) waren IAV-infizierte AEC II (cyan) regulär im Gewebeverband verortet und zeigten eine stabile Verbindung mit der Basalmembran sowie elongierte und motile Mitochondrien. Jedoch zeigte sich nach ca. 20 h eine zunehmende Fragmentierung/Abrundung und ein Stillstand der Mitochondrien sowie eine sukzessive Ablösung der Zelle von der Basalmembran. Dieser Zelltodprozess inklusive einer vollständigen Loslösung von der Basalmembran war nach ca. 38h abgeschlossen.

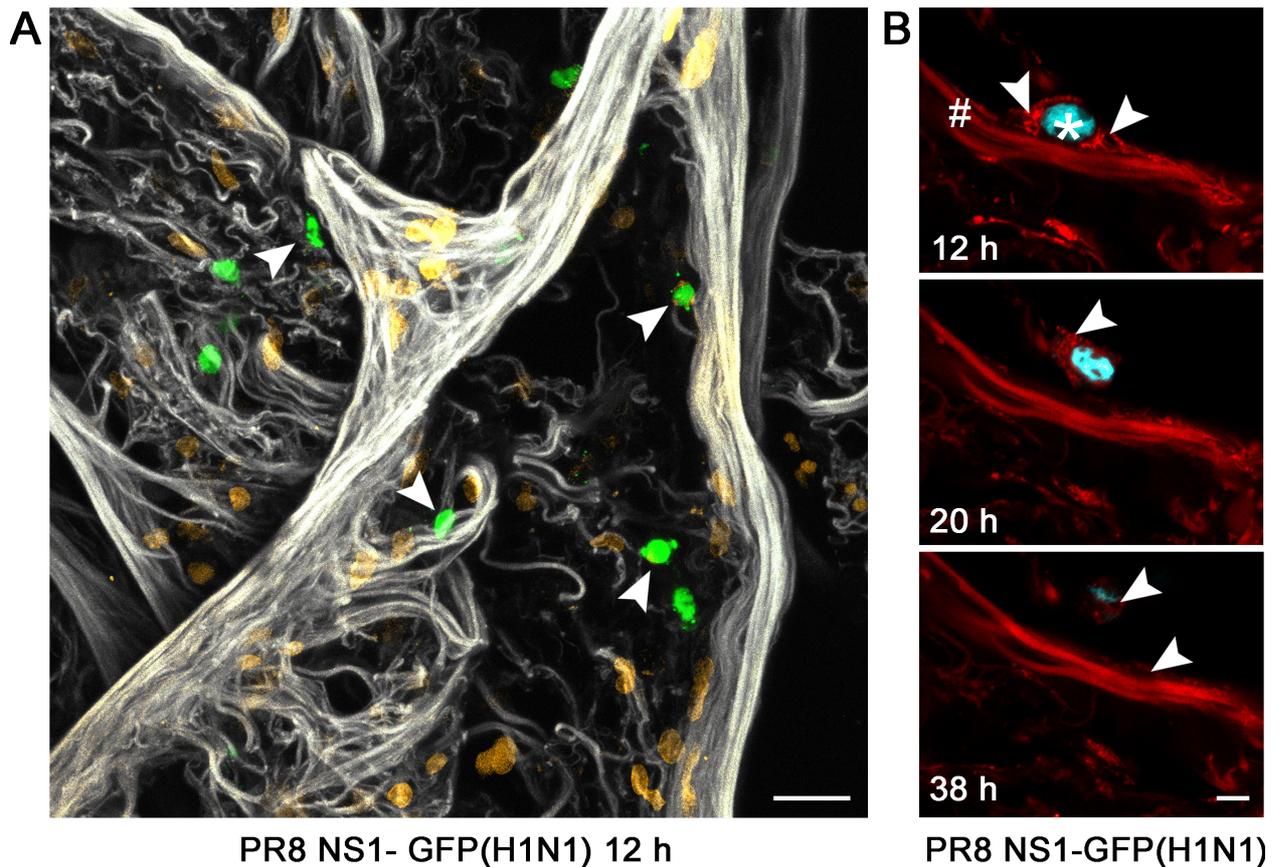


Abbildung 5: Spektrale, konfokale Lebendgewebemikroskopie von Influenza-A-Virus infiziertem humanen Lungengewebe. (A) Humanes *ex vivo* Lungengewebe wurde mit PR8 NS1-GFP(H1N1)-Virus infiziert und mittels spektraler, konfokaler Lebendgewebemikroskopie visualisiert. In der dreidimensionalen Rekonstruktion des Gewebes mittels *z-stacks* zeigen sich das kollagene Gerüst (weiß) sowie die luftgefüllten Anteile der Alveole (schwarz). Mittels Syto22 wurden die Zellkerne von uninfizierten Alveolarepithelzellen (AEC) markiert (ocker). Anhand des positiven GFP-Signals konnten ab ca. 12 h nach Infektion die virusinfizierten AEC im Zellverband identifiziert werden (grün, weiße Pfeilspitzen). (B) In der zeitlichen Verfolgung einzelner virusinfizierter AEC (cyan, weiße Sterne) mittels Lebendgewebemikroskopie war zu Beginn (ca. 12 h nach Infektion) eine stabile Verbindung mit der Basalmembran (weiße Raute) sowie elongierte und motile Mitochondrien (weiße Pfeilspitzen) zu beobachten. Ab ca. 20 h zeigten sich eine zunehmende Fragmentierung und ein Stillstand der Mitochondrien. Begleitend konnte eine vollständige Loslösung von der Zellmembran nach ca. 38 h beobachtet werden. Maßstabsbalken A: 20 μm ; B: 5 μm .

Zur Überprüfung einer effizienten Infektion von IAV im *ex-vivo*-Lungengewebe wurde die Anzahl infektiöser Partikel nach 1, 16, 24 und 48 h im Überstand mithilfe eines Plaque-Assays gemessen. Im Zeitraum von 1 bis 48 h nach Infektion mit einer MOI von 0,1 zeigte sich ein steiler Anstieg der Replikationskurve von Pan/99(H3N2) als Zeichen einer aktiven Virusproduktion. Es konnte ein Replikationsanstieg auf ca. 10^7 pfu/ml beobachtet werden (Abbildung 6).

Ergebnisse

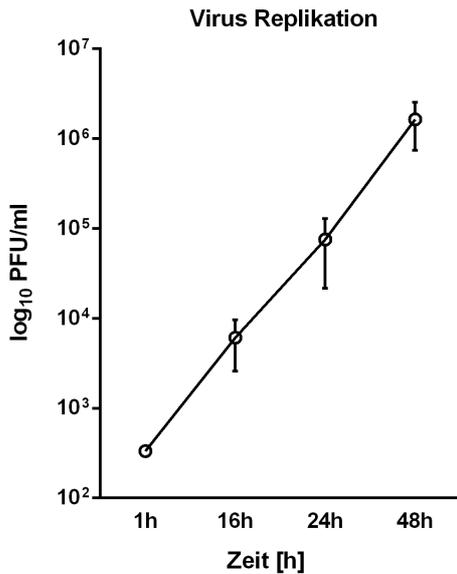


Abbildung 6: Replikation von Pan/99(H3N2) im humanen Lungengewebe. Dargestellt ist die Replikationskurve von Pan/99(H3N2) mit einer *multiplicity of infection* von 0,1 im ex vivo Lungengewebe. Nach Messung der infektiösen Partikel im Überstand von ex vivo Lungengewebe mittel Plaque-Assay zeigt sich ein steiler Anstieg im Zeitraum von 1-48 h. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM und repräsentative Bildausschnitte aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.2 Infektion und Replikation von Influenza-A-Viren in A549-Zellen

Um die mitochondrialen Alterationen während der IAV-Infektion besser charakterisieren zu können, wurde im nächsten Schritt ein *in vitro* Infektionsmodell für die Lebendzellmikroskopie etabliert. Als vergleichbares Modellsystem von AEC II wurden A549-Zellen verwendet und mit dem saisonalen Pan/99(H3N2) IAV (MOI 5) infiziert. Als Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse sollte zunächst das Infektions- und Replikationsverhalten von Pan/99(H3N2) in A549-Zellen überprüft werden.

Immunfluoreszenzfärbungen gegen virales NP zeigten, dass bei einer MOI 5 alle Zellen nach 16, 24 und 48 h homogen mit IAV infiziert wurden, was dem zeitlichen Zyklus der Infektion in humanem Lungengewebe entspricht (Abbildung 7 A). Im Vergleich zur Kontrolle (Mock) wurde nach 16 h eine deutliche Expression (grün) im Zytosol von virusinfizierten Zellen beobachtet, die ferner auch nach 24 und 48 h vereinzelt im Zellkern nachweisbar waren. Bei der mikroskopischen Betrachtung im DIC-Kanal fiel auf, dass alle Zellen, die NP-positiv waren, prominente Nukleoli im Zellkern aufweisen, welches als Zeichen einer unter Virusinfektion veränderten zellulären Homöostase gesehen werden kann (Abbildung 7 B). Um eine effiziente Virusreplikation zu bestätigen, erfolgte zu den festgelegten Zeitpunkten (1, 16, 24 und 48 h) die Messung der Anzahl von infektiösen Partikeln in den entnommenen Zellkulturüberständen der virusinfizierten A549-Zellen mittels Plaque-Assay. Im Vergleich zur Infektion im ex vivo Lungengewebe mit einer MOI von 0,1 zeigte sich, dass Pan/99(H3N2) mit einer MOI von 5 im Zeitraum von 1-16 h nach Infektion einen Anstieg der Replikation auf ca. 10^4 pfu/ml aufweist (Abbildung 7 C).

Ergebnisse

Nach Erreichen eines Plateaus konnte ab 16 h keine weitere Steigerung der viralen Replikation gemessen werden. Tendenziell war ein geringfügiger Abfall nach 24 h zu beobachten.

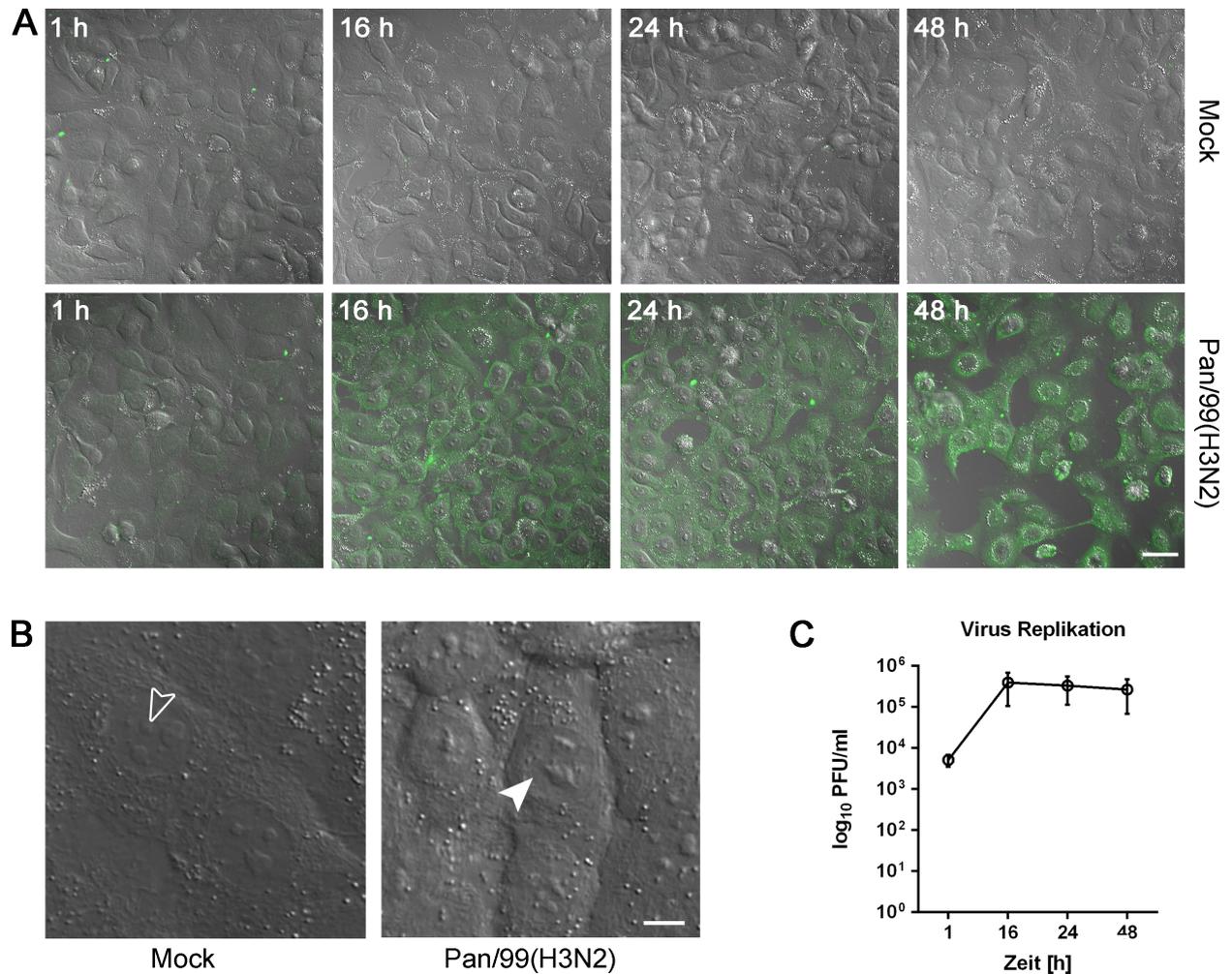


Abbildung 7: Etablierung eines Influenza-A-Virus Infektionsmodells in A549-Zellen. (A) Dargestellt sind A549-Zellen nach Infektion mit Pan/99(H3N2) (*multiplicity of infection* 5) im Vergleich zur Kontrolle (Mock). Immunfluoreszenzfärbungen gegen virales Nukleoprotein zeigten nach 16 h eine homogene Expression im Zytosol von virusinfizierten Zellen (grün), die ferner auch nach 24 h und 48 h vereinzelt im Zellkern nachweisbar war. (B) Bei der mikroskopischen Betrachtung im DIC-Kanal fiel auf, dass alle Nukleoprotein positiven Zellen prominente Nukleoli im Zellkern aufweisen (weiße Pfeilspitze), die in der Kontrolle nicht zu sehen waren (offene Pfeilspitze). (C) Bei Messung von infektiösen Partikeln im Zellüberstand von virusinfizierten A549-Zellen mittels Plaque-Assay zeigte sich ein Replikationsanstieg zwischen 1-16 h mit einem Plateau ab 16 h. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM und repräsentative Bildausschnitte aus 3 unabhängigen Experimenten. Maßstabsbalken: A und B 20 μ m; D 5 μ m.

3.3 Influenza-A-Virus induziert ex- und intrinsische Apoptose

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass IAV *in vitro* und *in vivo* Apoptose induzieren kann und proteolytisch aktive Caspasen der extrinsischen und intrinsischen Apoptose dabei involviert sind [51, 81]. Da in den meisten Studien der Nachweis von Caspasen in Western Blots erfolgte, wurden zunächst die Zelllysate von Mock- bzw. virusinfizierter A549-Zellen mithilfe dieser Methode auf die Aktivierung von Caspasen 8, 9 und 3 überprüft. Nach 24 h zeigte sich im Western Blot von Zelllysaten der virusinfizierten A549-Zellen eine Aktivierung von Caspase 8, eine Initiator-Caspase des extrinsischen Apoptoseweges, die im geringeren Maß auch nach 48 h noch nachweisbar war (Abbildung 8)). Die Initiator-Caspase 9 der intrinsischen Apoptose wurde ebenfalls während der IAV-Infektion ab 24 bis 48 h in A549-Zellen aktiviert. Bei weiteren Untersuchungen zum Nachweis der Effektor-Caspase 3 zeigte sich, dass IAV nach 24 h eine Aktivierung dieser induzierte, die nach 48 h wieder leicht abnahm. Eine gleichmäßige Proteinbeladung im Western Blot konnte in allen Experimenten durch Detektion des konstant exprimierten Strukturproteins Aktin nachgewiesen werden.

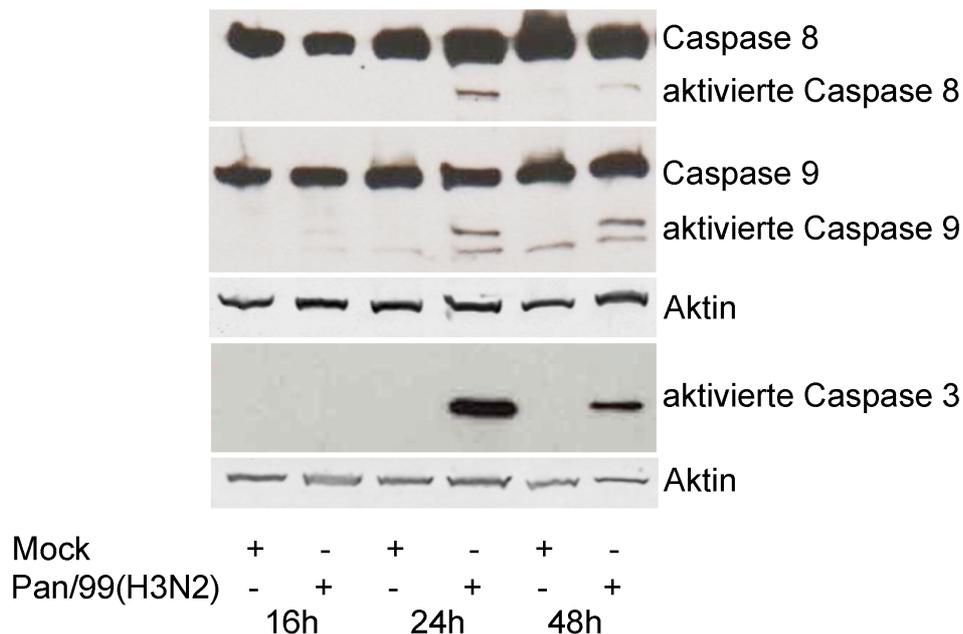


Abbildung 8: Nachweis aktivierter Caspasen 8, 9 und 3 in Zelllysaten von virusinfizierten A549-Zellen. A549-Zellen wurde mit Pan/99(H3N2) bzw. Mock infiziert und nach 16, 24 und 48 h Zelllysate für Western Blot Untersuchungen hergestellt. Nach 24 h konnte eine Aktivierung von Caspase 8, 9 und 3 in virusinfizierten Zellen beobachtet werden, die ebenfalls weniger stark nach 48 h nachweisbar waren. Aktin diente als Ladekontrolle für die Proteinkonzentration. Dargestellt sind repräsentative Western Blots aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

3.4 Caspasen-3/7-Aktivierung und Alteration des mitochondrialen Membranpotentials während der Influenza-A-Virus Infektion

Obwohl eine Aktivierung von Caspasen 8, 9 und 3 während der IAV-Infektion mittels Western Blot zu bestimmten Zeitpunkten nachgewiesen wurde, ging aus diesen Untersuchungen nicht hervor, welche der Initiator-Caspasen 8 oder 9 tatsächlich zu einer Aktivierung von Caspase 3 und damit Apoptoseinduktion führt. Da die Western Blot Untersuchungen Summensignalantworten darstellen, wurde in den nachfolgenden Experimenten mittels konfokaler Lebendzellmikroskopie der zeitliche Verlauf der Caspasen 3/7-Aktivierung während der IAV-Infektion gemessen. Um zu überprüfen, ob es ursächlich durch mitochondriale Dysfunktion mit Verlust des $m\Delta\Psi$ zur Aktivierung von Caspase 9 und somit zur Aktivierung von Caspasen 3/7 kommt, wurde im gleichen Infektionsexperiment zusätzlich das $m\Delta\Psi$ in virusinfizierten A549-Zellen bestimmt.

In der Echtzeitmessung der Caspasen 3/7-Aktivierung über 48 h wurde ab ca. 1 h nach Infektion ein kontinuierlicher Anstieg in den virusinfizierten A549-Zellen detektiert (Abbildung A). Ab ca. 20 bis 48 h zeigte die Kurve mit Zunahme des Fluoreszenzsignals von Caspase 3/7 auch eine zunehmende Steilheit an. Gleichzeitig war bei der Messung des TMRE-Fluoreszenzsignals (Summensignal über Zeit) in der gesamten untersuchten Zellpopulation kein Abfall des $m\Delta\Psi$ über 48 h zu beobachten (Abbildung 9 B).

Bei mikroskopischer Betrachtung von Einzelzellen zeigte sich, dass in Zellen der virusinfizierten Probe im Vergleich zur Kontrolle mit intaktem $m\Delta\Psi$ sowie fehlendem Caspase-3/7-Signal zwei verschiedene Zustände zu beobachten waren (Abbildung 9 C): Es fanden sich einerseits Zellen mit einem leicht positiven Caspase-3/7-Signal (grün) im Zellkern und einem intaktem $m\Delta\Psi$ (rot). Andererseits solche Zellen, die ein stark akkumuliertes Caspase-3/7-Signal bei gleichzeitigem Verlust des $m\Delta\Psi$ aufwiesen. Daneben fielen in denjenigen Zellen mit leicht positivem Caspase-3/7-Signal im Zellkern bei noch intaktem $m\Delta\Psi$ im Zytosol kleine Vesikel auf. In einem weiteren Infektionsexperiment stellten sich diese als Autophagievesikel mit abgebautem Caspase-3/7-Substrat dar (*data not shown*). Zur Kontrolle der Ergebnisse wurde in einem Experiment untersucht, ob potentiell Zelltod induzierende Stimulanzen zu einer vergleichbaren Caspasen-3/7-Aktivierung führen (Abbildung 9 D). Messungen der Fluoreszenzintensität des Caspasen-3/7-Signals zeigten einen starken Anstieg nach 16 h Stimulation mit dem bakteriellen Toxin Pneumolysin von *Streptococcus pneumoniae*. Ähnlich zu Pan/99(H3N2) führte die Stimulation mit

Ergebnisse

Staurosporin, ein potenter Apoptoseinduktor, und H_2O_2 , welches mittels Sauerstoffradikale die Zellen schädigt, zu einer Caspasen-3/7-Aktivierung nach 48 h.

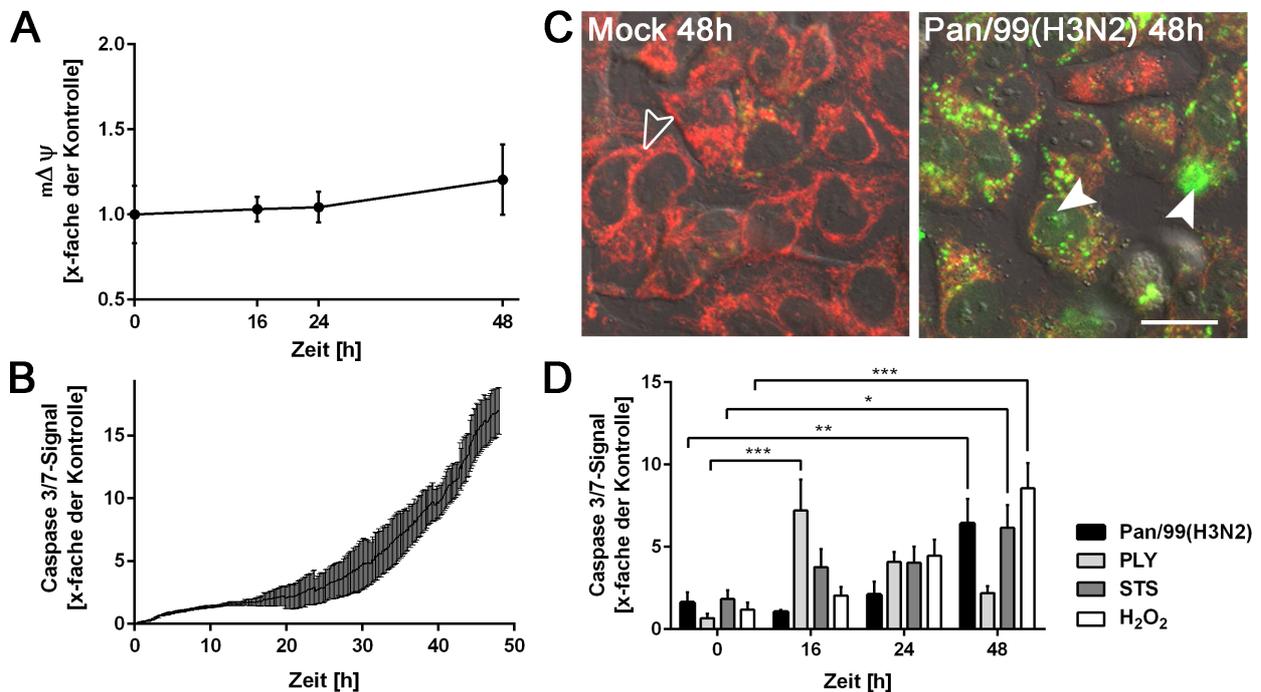


Abbildung 9: Echtzeitmessung von Caspasen-3/7-Aktivierung und mitochondrialem Membranpotential in virusinfizierten A549-Zellen mittels konfokaler Lebendzellmikroskopie. Nach Infektion mit Pan/99(H3N2) wurde in Mock bzw. virusinfizierten A549-Zellen mittels konfokaler Lebendzellmikroskopie die Caspase-3/7-Aktivierung und das mitochondriale Membranpotential ($m\Delta\Psi$) über eine Zeitspanne von 48 h gemessen. (A) Ab ca. 1 h nach Infektion zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Caspasen-3/7-Aktivität mit zunehmender Steilheit der Kurve ab 20 h. (B) Gleichzeitig konnte über 48 h in den virusinfizierten Zellen keine Abnahme des auf die gesamte Zellzahl normalisierten $m\Delta\Psi$ detektiert werden. (C) In der mikroskopischen Betrachtung von Einzelzellen zeigte sich in der Kontrolle (Mock) ab ca. 48 h aufgrund des intakten $m\Delta\Psi$ eine homogene Färbung der Mitochondrien mit dem Lebendfarbstoff TMRE sowie eine fehlende Caspasen-3/7-Aktivierung. Bei der virusinfizierten Probe zeigten sich hingegen einerseits Zellen mit noch intaktem $\Delta\Psi_m$ und leicht positiven Caspase-3/7-Signal im Zellkern (grün, weiße Pfeilspitze) als auch solche Zellen mit Verlust des $m\Delta\Psi$ und stark positiver Caspasen-3/7-Aktivierung (grün, offene Pfeilspitze). Zudem war in diejenigen Zellen mit intaktem $m\Delta\Psi$ ein Abbau des Caspase-3/7-Substrats in kleine Vesikel zu beobachten (weiße Raute). (D) Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität des Caspasen-3/7-Signals nach Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Pneumolysin (PLY), 4 μM Staurosporin (STS) und 2,5 mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Im Vergleich zu Pan/99(H3N2) führte das bakterielle Toxin PLY bereits nach 16 h zu einer starken Caspase-3/7-Aktivierung, bei STS und H_2O_2 hingegen erst nach 48 h. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM normalisiert auf die Kontrolle aus 3 unabhängigen Experimenten. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) und repräsentative Bildausschnitte aus 3 unabhängigen Experimenten. Maßstab: 20 μm .

3.5 Auswirkungen der Influenza-A-Virus Infektion auf die intrazelluläre ATP-Konzentration

Mitochondrien besitzen eine zentrale Rolle im zellulären Energiestoffwechsel und die treibende Kraft bei der mitochondrialen ATP-Produktion ist das $m\Delta\Psi$ [72].

Nachdem mittels konfokaler Lebendzellmikroskopie in der Summensignalantwort kein

Ergebnisse

Verlust des $m\Delta\Psi$ in virusinfizierten A549-Zellen gemessen wurde, sollte im nächsten Schritt der intrazelluläre ATP-Gehalt unter IAV-Infektion untersucht werden.

Um Echtzeitmessungen von ATP im Zytosol und in Mitochondrien durchzuführen wurden FRET-basierte Sensoren verwendet. Lebendzellaufnahmen von A549-Zellen, die zuvor mit dem cytoATEAM- und mitoATEAM-Konstrukten transfiziert wurden, zeigen jeweils eine zytosolische bzw. mitochondriale Expression (Abbildung 10 A). Nach Messung der ATEAM-Spektren beider Kompartimente zeigte sich ein unterschiedliches Verhältnis der maximalen Fluoreszenzintensitäten der beiden FRET-Partner CFP und YFP in der spektralen Lebendzellmikroskopie (Abbildung 10 B).

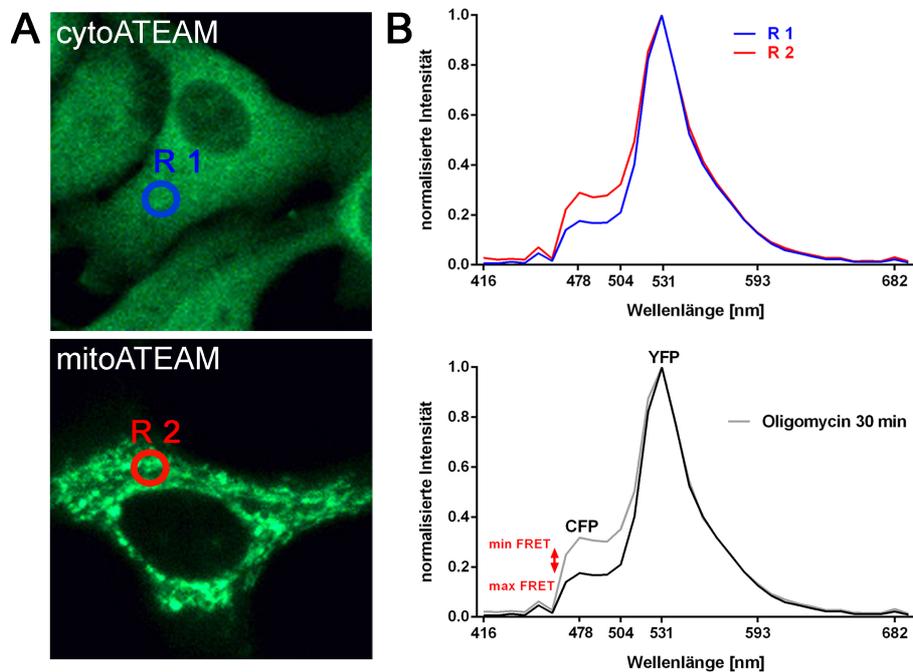


Abbildung 10: Charakterisierung von FRET-basierten intrazellulären ATP-Sensoren. Dargestellt sind A549-Zellen, welche mit den ATP-bindenden FRET-Sensoren cyto- und mitoATEAM transfiziert wurden. (A) Aufnahmen der Lebendzellmikroskopie zeigen nach 48 h eine zytosolische und mitochondriale Expression von cytoATEAM bzw. mitoATEAM (grün). (B) Mithilfe spektraler Lebendzellmikroskopie wurden die jeweiligen Fluoreszenzspektren der beiden FRET-Partner *yellow fluorescent protein* (YFP) und *cyan fluorescent protein* (CFP) ermittelt. Die Intensitätsunterschiede des YFP- auf CFP- normalisierten Fluoreszenzsignals in ausgewählten Regionen (R1 - zytosolisch; R2 - mitochondrial) beider Zellkompartimente indiziert einen höheren ATP-Gehalt im Zytosol im Vergleich zu den Mitochondrien. Nach Inkubation mit Oligomycin zeigte sich innerhalb von 30min ein CFP-Signalanstieg zytosolisch, der durch die abfallende ATP-Konzentration und den konsekutiven Anstieg des FRET-Effektes verursacht wurde. Maßstabsbalken: 5 μm .

Ergebnisse

Da die Spektren auf das YFP-Signal normalisiert werden, kann der Vergleich der CFP-Maxima eine Aussage über die intrazelluläre ATP-Konzentration geben. Ein niedriges CFP-Signal wird durch einen hohen FRET-Effekt verursacht und reflektiert eine hohe ATP-Konzentration. Demnach ergaben die Messungen der Fluoreszenzspektren eine höhere ATP-Konzentration im Zytosol von A549-Zellen als in den Mitochondrien. In allen durchgeführten Experimenten wurde der ATP-Synthase-Inhibitor Oligomycin als Positivkontrolle verwendet. Nach 30-minütiger Inkubation mit Oligomycin stieg das CFP-Signal deutlich an, verursacht durch den Abfall des intrazellulären ATP-Gehalts (Abbildung 10 B, unterer Graph).

Nach erfolgreicher Etablierung der ATP-Sensoren erfolgte die Messung der ATP-Konzentration in virusinfizierten A549-Zellen im Zeitraum von 1 bis 48 h nach Infektion. In der Auswertung von maximalen Fluoreszenzintensitäten beider FRET-Partner zeigte sich im Summensignal aller vitaler Zellen, dass es unter der IAV-Infektion sowohl in Mitochondrien (Abbildung 11 A, oberer Graph) als auch im Zytosol (Abbildung 11 A, unterer Graph) über 48 h zu keinem Abfall der ATP-Konzentration kommt. Um eine möglicherweise ineffiziente IAV-Infektion nach Transfektion mit den cytoATEAM- und mitoATEAM-Konstrukten auszuschließen, wurde nach 48 h eine Immunfluoreszenzfärbung gegen virales NP durchgeführt, welche im Gegensatz zur Kontrolle deutlich positiv in den virusinfizierten Zellen sichtbar war und somit eine erfolgreiche Infektion auch nach Transfektion bestätigte (Abbildung 11 B). Oligomycin wurde auch hier als Positivkontrolle mitgeführt. Nach 30-minütiger Inkubation zeigte sich eine Abnahme der ATP-Konzentration um ca. 50 % im Zytosol und um ca. 25 % in den Mitochondrien (Abbildung 11 C).

Ergebnisse

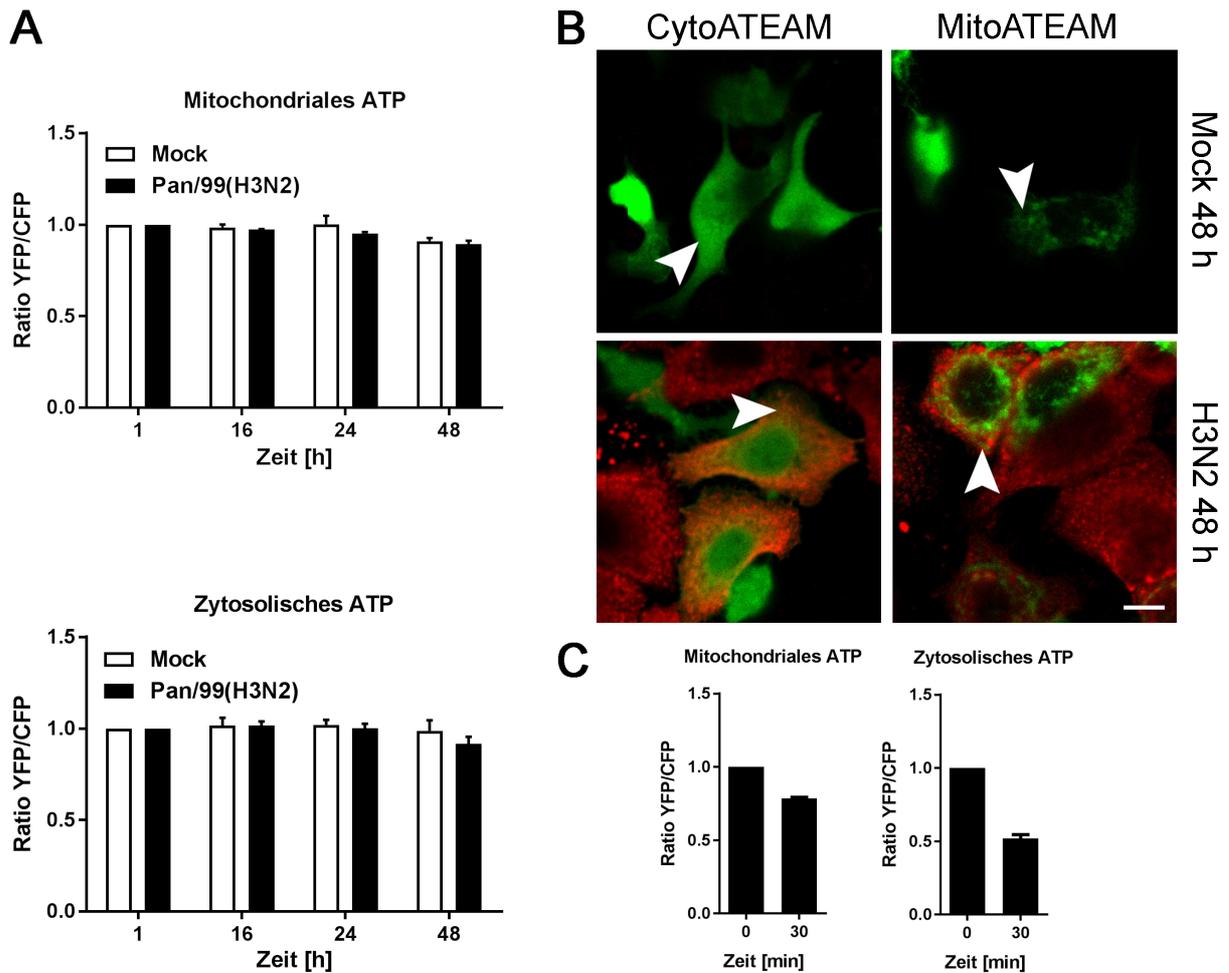


Abbildung 11: Intrazelluläre ATP-Konzentration in A549-Zellen während der Influenza-A-Virus Infektion. A549-Zellen wurden mit FRET-basierten ATP-Sensoren transfiziert und anschließend Mock- bzw. mit Pan/99(H3N2) infiziert. Für die Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration wurde mittels spektraler Lebendzellmikroskopie zu den entsprechenden Zeitpunkten (1, 16, 24 und 48 h nach Infektion) die Ratio beider Fluoreszenzspektren von *yellow fluorescent protein* (YFP) und *cyan fluorescent protein* (CFP) im Zytosol (cytoTEAM) und in Mitochondrien (mitoATEAM) ermittelt. (A) Im Vergleich zur Kontrolle (weißer Balken) war unter der Influenza A-Infektion (schwarzer Balken) zwischen 1-48 h im Summensignal vitaler Zellen kein Abfall des ATP in Mitochondrien bzw. Zytosol detektierbar (B) Zur Überprüfung der Infektionseffizienz wurden die virusinfizierten Zellen nach 48 h fixiert und mittels Immunfluoreszenzfärbung virales Nukleoprotein (rot, weiße Pfeilspitze) im Zytosol positiv transfizierter Zellen (grün) markiert. (C) Mitochondrialer und zytosolischer ATP-Abfall nach 30-minütiger Stimulation mit ATP-Synthase-Inhibitor Oligomycin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. Maßstabsbalken: 10 μ m.

3.6 Auswirkung der Influenza-A-Virus Infektion auf die mitochondriale Motilität

Da Mitochondrien sich kontinuierlich entlang des mikrotubulären Netzwerkes bewegen um ATP zu zellulären Kompartimenten mit hohem Energieverbrauch zu liefern, stellt die mitochondriale Motilität neben $m\Delta\Psi$ und ATP-Produktion einen weiteren wichtigen Parameter zur Beurteilung der mitochondrialen Funktion dar [55]. Um den Einfluss von IAV

Ergebnisse

auf die mitochondriale Motilität zu untersuchen, wurde mittels Lebendzellmikroskopie und digitaler Bildanalyse eine Methode zu dessen Quantifizierung etabliert. Interessanterweise zeigten die virusinfizierten A549-Zellen nach 16 h einen signifikanten Anstieg der mitochondrialen Motilität (Abbildung 12). Im weiteren Verlauf konnte zwischen 24-48 h kein wesentlicher Unterschied zwischen Kontrollzellen und virusinfizierten Zellen ermittelt werden. Allerdings handelte es sich auch hier um Summensignale, denn bei der mikroskopischen Analyse von Einzelzellen in den infizierten Proben konnte ab 24-48 h in sterbenden Zellen ein Stillstand der Mitochondrien beobachtet werden, was innerhalb von 1-2 min zur Apoptoseinduktion führte (*data not shown*).

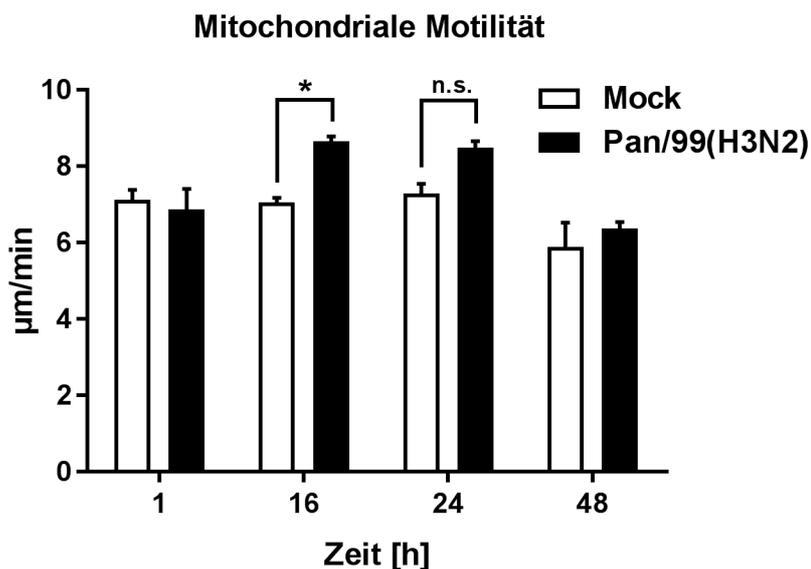


Abbildung 12: Influenza-A-Virus beeinflusst mitochondriale Motilität in A549-Zellen. A549-Zellen wurden mit Pan/99(H3N2) bzw. Mock infiziert. Anschließend wurden die Mitochondrien zu den angegebenden Zeitpunkten (1, 16, 24 und 48 h nach Infektion) mit MitoTrackerOrange markiert. Mithilfe digitaler Bildanalyse erfolgte die Messung der mitochondrialen Motilität. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen virusinfizierten Zellen (schwarze Balken) im Vergleich zu Mock (weiße Balken) ermittelt werden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$, n.s. nicht signifikant).

3.7 Einzelzellanalysen mitochondrialer Alterationen und Apoptoseinduktion während der Influenza-A-Virus Infektion

Aufgrund der widersprüchlichen Befunde einer Caspasen-3/7-Aktivierung in IAV-infizierten A549-Zellen bei gleichzeitig vitalen Mitochondrien mit intaktem $m\Delta\Psi$ sowie uneingeschränkter / zeitweise erhöhter Motilität, ergab sich die Annahme, dass durch die gemessenen Summensignale die zellspezifischen Apoptoseprozesse in ihrem zeitlichen Verlauf nicht ausreichend erfasst werden. Da sich anhand der Ergebnisse von Abbildung 9 C bereits vermuten ließ, dass unter den virusinfizierten Zellen verschiedene Zustände

Ergebnisse

zu beobachten sind und nur diejenigen mit dysfunktionalen Mitochondrien tatsächlich in Apoptose gehen, sollte im nächsten Schritt auf Einzelzellebene untersucht werden, welche zeitliche Korrelation zwischen mitochondrialen Alterationen und Apoptoseinduktion während der IAV-Infektion besteht.

Mittels Lebendzellmikroskopie und anschließender Immunfluoreszenzfärbung konnte in den Kontrollzellen nach 48 h ein intaktes $m\Delta\Psi$ (rot) und ein mitochondrial lokalisiertes *cytochrom C* (grün) bei gleichzeitiger Abwesenheit aktivierter Caspasen 3/7 (weiß) beobachtet werden (Abbildung 13 A). Aufnahmen mittels höchstaflösender Mikroskopie zeigten eine normale mitochondriale Morphologie mit elongierten und miteinander verbundene Mitochondrien (Abbildung 13 B). Hingegen konnten in den virusinfizierten Zellen ab ca. 48 h wiederum zwei verschiedene Zustände beobachtet werden: Es zeigten sich Zellen mit positivem Caspasen-3/7-Signal bei intaktem $m\Delta\Psi$ und fehlender Freisetzung von *cytochrom C* sowie einer mitochondrialen Morphologie vergleichbar mit Kontrollzellen (Abbildung 13 C), auch wenn bereits im Zellkern eine Kondensation der DNA detektiert werden konnte (Abbildung 13 D).

Ergebnisse

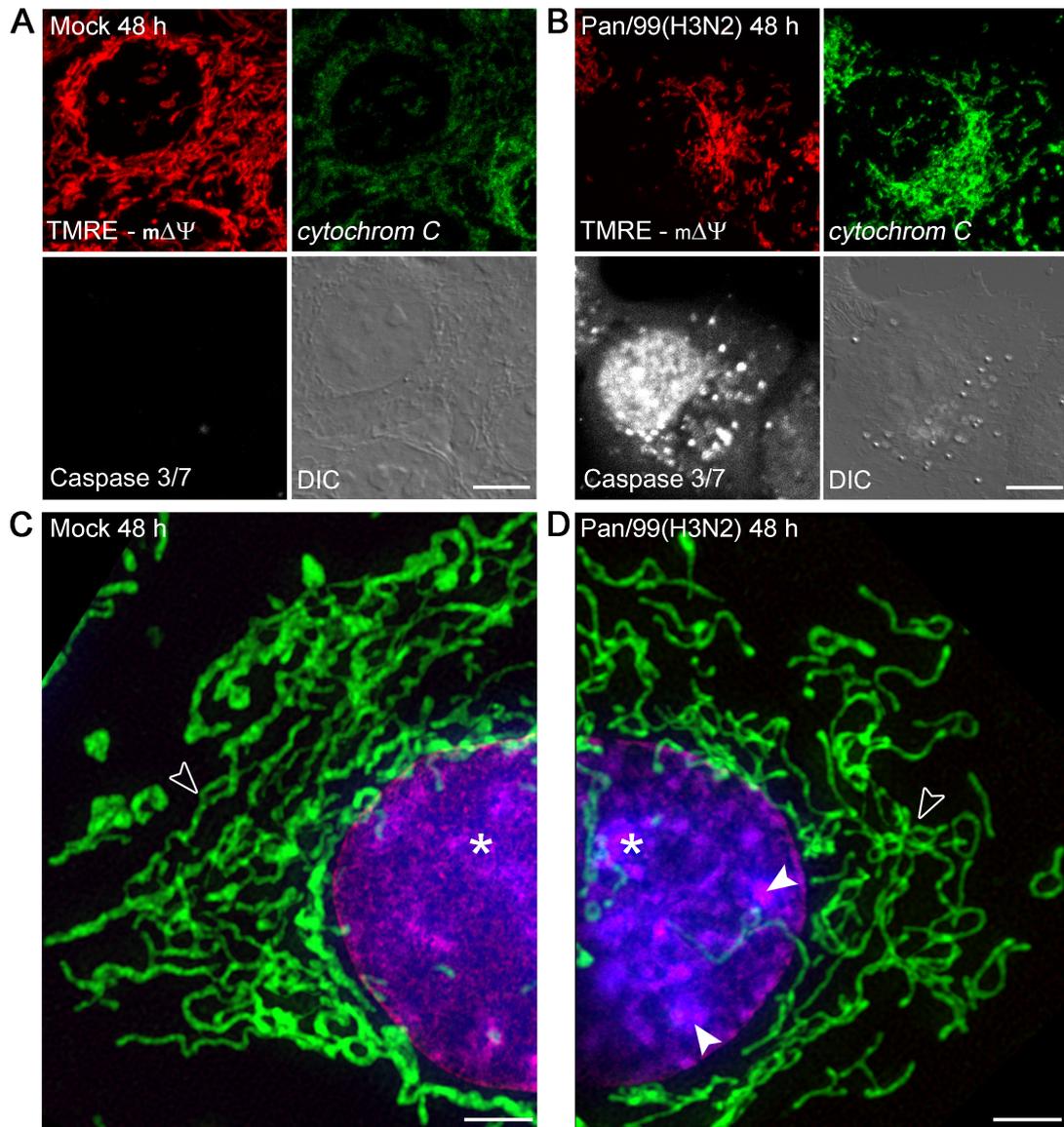


Abbildung 13: Caspasen-3/7-Aktivierung unabhängig von mitochondrialer Dysfunktion in virusinfizierten A549-Zellen. Die Bildausschnitte zeigen Mock- bzw. virusinfizierte A549-Zellen in der Lebendzellmikroskopie mit Messung von Caspasen 3/7 und mitochondrialem Membranpotential ($m\Delta\Psi$) bei anschließender Immunfluoreszenzfärbung gegen *cytochrom C*. (A) Nach 48 h zeigen die Zellen der Kontrolle (Mock) eine positive TMRE-Färbung aufgrund des intakten $m\Delta\Psi$ (rot), eine mitochondriale *cytochrom C* Lokalisation (grün) und die Abwesenheit von Caspasen 3/7 (weiß). (B) In Zellen der infizierten Probe konnte eine Aktivierung von Caspase 3/7 bei intaktem $m\Delta\Psi$ und fehlender *cytochrom C* Freisetzung beobachtet werden. (C) Mittels *structured illumination microscopy*, einem Verfahren der hochauflösenden Mikroskopie, wurden Mitochondrien hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht. Dargestellt sind Mitochondrien in Kontrollzellen, bei denen zuvor das mitochondriale Strukturprotein TOM20 und die DNA mittels DAPI markiert wurden. Hier zeigen sich elongierte und untereinander verbundene Mitochondrien (grün, offene Pfeilspitze) sowie ein unauffälliger Zellkern (lila, Stern). (D) Im Vergleich hierzu fand sich in Zellen der mit Influenza A-Virus infizierten Probe nach 48 h eine Caspasen-3/7-Aktivierung ohne Nachweis von $m\Delta\Psi$ -Verlust und *cytochrom C* Freisetzung. (D) Trotz bereits kondensierter DNA im Zellkern (weiße Pfeilspitzen) zeigen die infizierten Zellen nach 48 h eine vergleichbare mitochondriale Morphologie zur Kontrolle (offene Pfeilspitze). Dargestellt sind repräsentative Bilder aus jeweils 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Maßstabsbalken A+B: 10 μm ; C+D: 2 μm .

Ergebnisse

Im Gegensatz dazu wurden auch solche virusinfizierten Zellen identifiziert, die Zeichen der Apoptose wie Verlust des $m\Delta\Psi$, zytosolisches *cytochrom C*, Caspasen-3/7-Aktivierung und eine abgerundete Zellform aufwiesen (Abbildung 14 A).

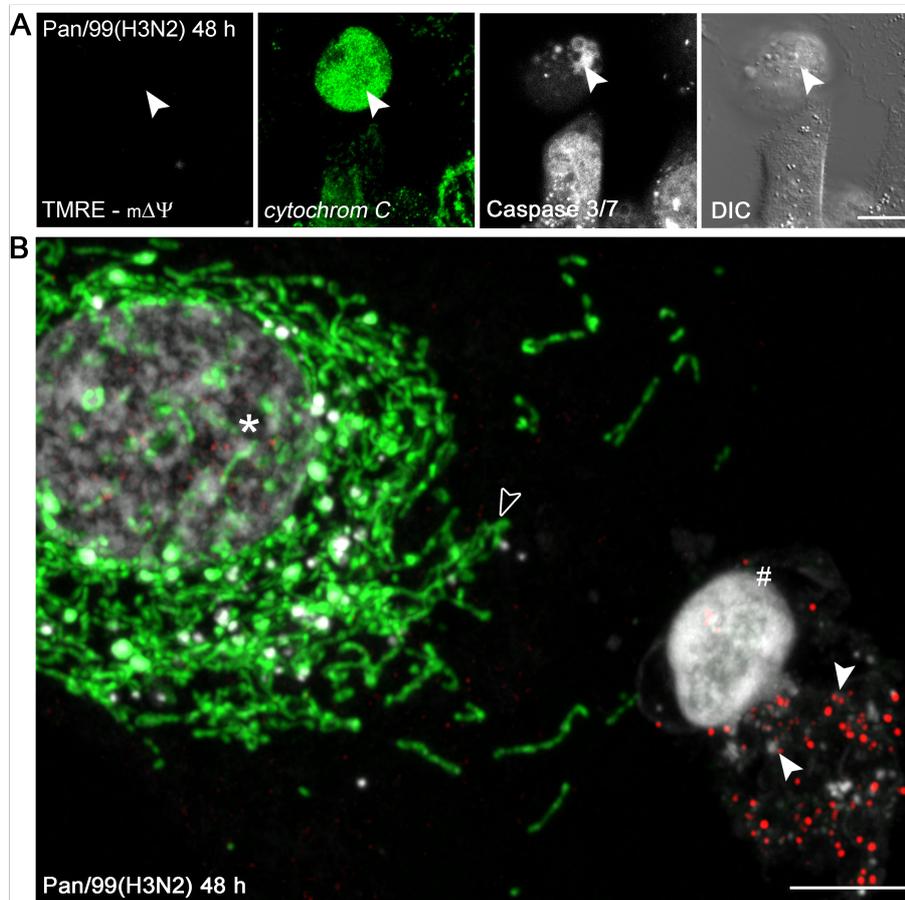


Abbildung 14: Mitochondriale Alteration mit *cytochrom C* Freisetzung und BAX-Aktivierung induziert Apoptose in A549-Zellen während der Influenza-A-Virus Infektion. Bildausschnitte stellen mit Pan/99(H3N2) infizierte A549-Zellen in der Lebendzellmikroskopie dar mit Messung von mitochondrialem Membranpotentials ($m\Delta\Psi$) und Caspasen-3/7-Aktivierung bei anschließender Immunfluoreszenzfärbung gegen *cytochrom C* und *BCL-2-associated X protein* (BAX). (A) Infizierte Zellen zeigen eine vollständige Apoptoseinduktion nach Verlust des $m\Delta\Psi$ (rot, weiße Pfeilspitzen) und Freisetzung von *cytochrom C* (grün, weiße Pfeilspitzen) bei einer starken Caspasen-3/7-Aktivierung (weiß, weiße Pfeilspitzen) sowie deutlich abgerundeter Zellenmorphologie. (B) In infizierten Zellen mit geringer Caspasen-3/7-Aktivierung (weiß, Stern) werden Mitochondrien mit intaktem $m\Delta\Psi$ detektiert (grün, offene Pfeilspitzen). Im Vergleich weisen Zellen mit positiven BAX-Signal (rot, weiße Pfeilspitzen) einen Verlust des $m\Delta\Psi$ und starke Aktivierung von Caspasen 3/7 (weiß, Raute) auf. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus jeweils 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Maßstabsbalken A: 10 μ m; B: 2 μ m.

Da die mitochondriale Membranpermeabilisierung u.a. durch das Bcl-2-Protein BAX reguliert wird, welches Poren in die äußere mitochondriale Membran formen kann [70], wurde in einem weiteren Infektionsexperiment mit ähnlichen Vorgehen zusätzlich die Translokation von BAX-Molekülen an Mitochondrien untersucht. Dabei zeigte sich, dass während der IAV-Infektion in denjenigen Caspasen 3/7 positiven Zellen mit Verlust des

Ergebnisse

$m\Delta\Psi$ die BAX-Moleküle sich als punktförmige Strukturen an Mitochondrien darstellten (Abbildung 14 B).

In Aufnahmen mittels hochauflösender Mikroskopie waren die BAX-Moleküle deutlich mit den markierten Mitochondrien in den apoptotischen Zellen der infizierten Probe assoziiert (Abbildung A und B). Bei weiterer Auflösung zeigte sich, dass BAX an der Außenseite der stark abgerundeten Mitochondrien verortet ist (Abbildung 15 C).

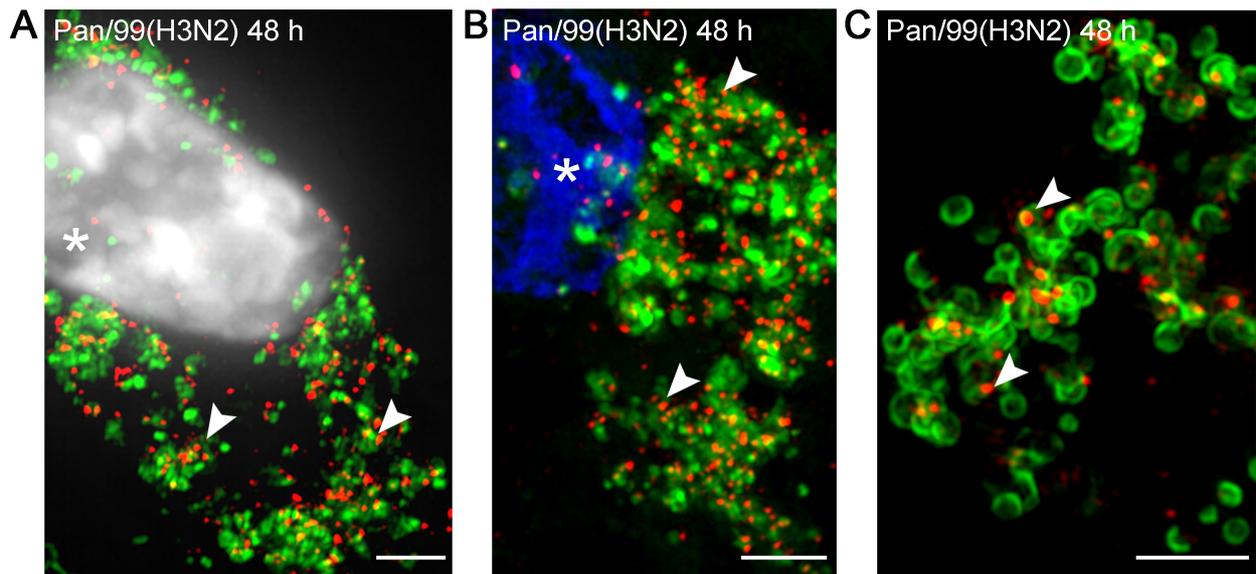


Abbildung 15: Lokalisation von BAX an Mitochondrien von virusinfizierten A549-Zellen. Dargestellt sind mit Pan/99(H3N2) infizierte A549-Zellen, welche zuvor gegen *BCL-2-associated X protein* (BAX) und TOM20 markiert wurden. Mittels *structured illumination microscopy*, einem Verfahren der höchstauflösenden Mikroskopie. (A) Nach 48h Infektion finden sich in Caspase 3/7 positiven Zellen (weiß, Sterne) die deutlich abgerundeten Mitochondrien (grün, weiße Pfeilspitzen) mit positiver BAX-Färbung (rot). (B und C) Bei weiterer Auflösung zeigt sich, dass der Zellkern von infizierten Zellen fragmentiert ist (blau, weißer Stern) und die BAX-Moleküle an den mitochondrialen Strukturen lokalisiert sind. (weiße Pfeilspitzen). Dargestellt sind repräsentative Bilder aus jeweils 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Maßstabsbalken: 2 μm .

3.8 Influenza-A-Virus induziert Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, BAX-Translokation und Aktivierung von Caspasen 3/7 in der humanen Lunge

Die Befunde des Zellkulturmodells zeigen, dass die Mitochondrien in virusinfizierten A549-Zellen über einen langen Zeitraum der IAV-Infektion intakt sind, obwohl bereits Caspasen 3/7 aktiviert wurden. Erst in späten Stadien der Infektion nach ca. 48 h wurde die Apoptose über den Verlust des $m\Delta\Psi$, Rekrutierung von BAX-Proteinen an die Mitochondrien

Ergebnisse

chondrien und der Freisetzung von *cytochrom C* induziert. Um festzustellen, ob vergleichbare Prozesse im humanen Lungengewebe zu beobachten sind, erfolgte die Analyse einzelner mit IAV infizierter AEC II in der Lebendgewebemikroskopie.

Die Infektion mit PR8 NS1-GFP(H1N1) zeigte ein intaktes $m\Delta\Psi$ und die Abwesenheit von aktivierten Caspasen 3/7 in virusinfizierten AEC II bis zu einem Zeitpunkt von ca. 32 h (Abbildung 16 A bis C). Im Zeitraum von 40 h bis 48 h war in den IAV-positiven Zellen ein Verlust des $m\Delta\Psi$ (grün) begleitet von einer Caspasen-3/7-Aktivierung (cyan) zu beobachten. Im weiteren Verlauf kam es zum Stillstand der Mitochondrien (MitoTrackerOrange, rot) und zu einer sukzessiven Ablösung der apoptotischen Zelle von der Basalmembran.

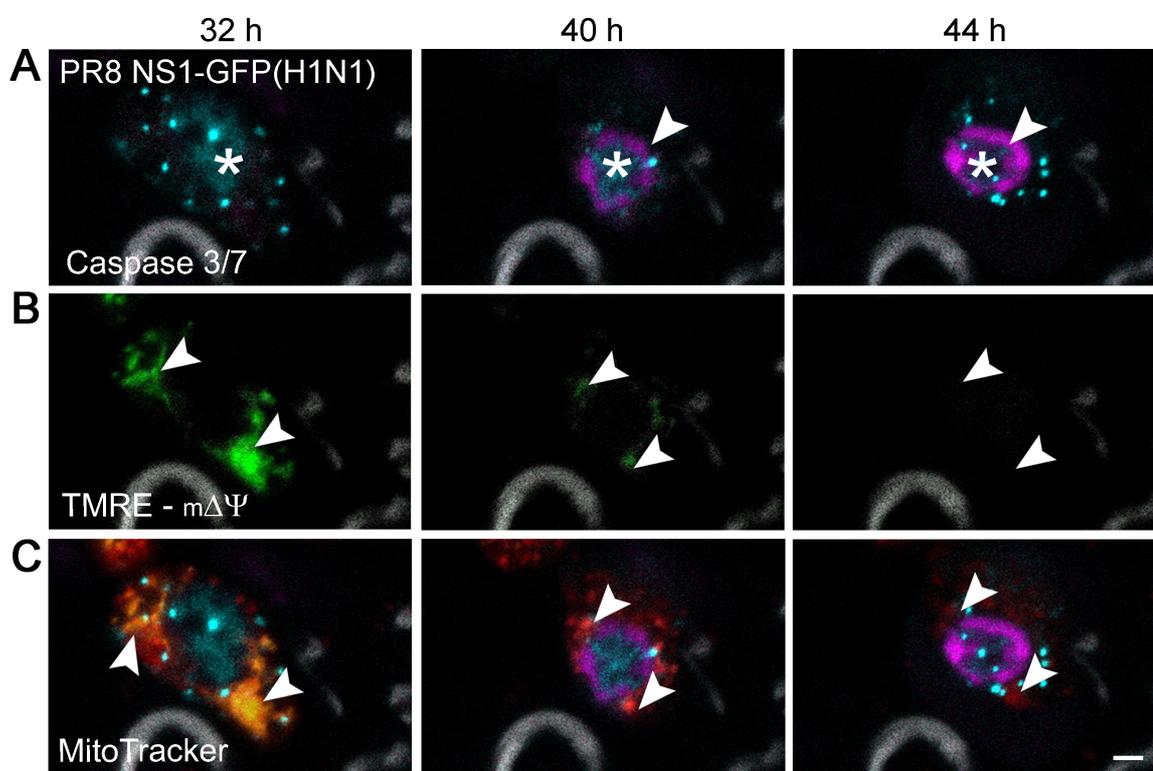


Abbildung 16: Verlust von mitochondrialem Membranpotential induziert Apoptose in virusinfizierten Zellen des humanen Lungengewebes während der Influenza-A-Virus Infektion. Dargestellt ist eine AEC II im zeitlichen Verlauf der Influenza-A-Virus Infektion. (A) Ausschnitte der Lebendgewebemikroskopie zeigen, dass die infizierte Zelle (cyan, weiße Sterne) im Zeitraum von 32 h bis 48 h Caspasen 3/7-positiv (magenta, weiße Pfeilspitzen) wird und (B) es zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($m\Delta\Psi$) (grün, weiße Pfeilspitzen) kommt. (C) Im weiteren Verlauf war eine Abrundung der Mitochondrien (MitoTrackerOrange, rot, weiße Pfeilspitzen) sowie eine Loslösung der virusinfizierten, apoptotischen Zelle von der Basalmembran zu beobachten. Maßstabsbalken: 2 μ m.

Immunfluoreszenzfärbung von mit PR8 NS1-GFP(H1N1) infiziertem *ex vivo* Lungengewebe gegen TOM20 zeigte, dass virusinfizierten AEC II eine Fragmentierung der Mitochondrien aufweisen (Abbildung 17 A bis C).

Ergebnisse

Bei zusätzlichen Markierungen gegen BAX war unter denjenigen infizierten Zellen, welche sich ab ca. 48 h nach Infektion im Apoptoseprozess befanden und sich bereits von der Basalmembran abgelöst hatten, eine positive Färbung zu detektieren (Abbildung 17 D). In Übereinstimmung mit den Befunden der Zellkulturen war auch hier die punktförmige Struktur der BAX-Moleküle mit den abgerundeten Mitochondrien der virusinfizierten Zellen assoziiert (Abbildung 17 E).

Ergebnisse

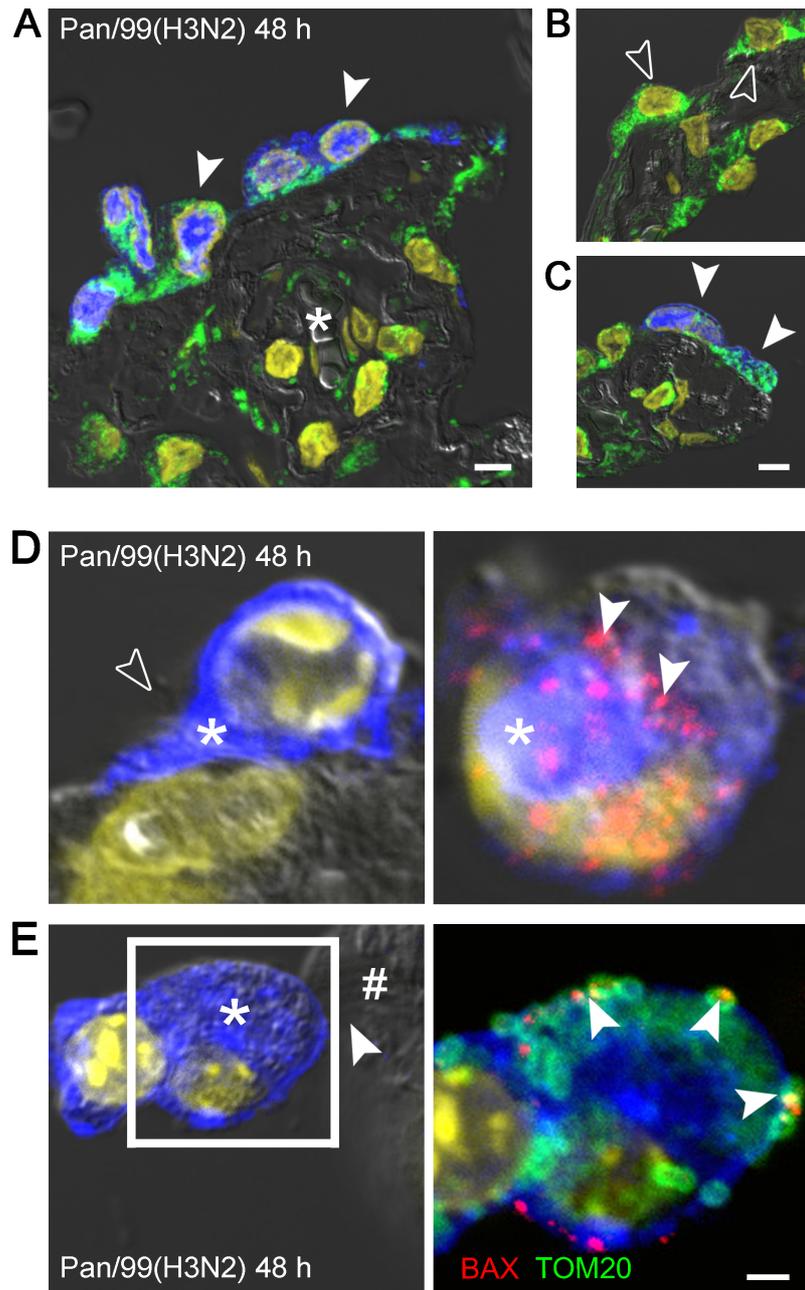


Abbildung 17: Influenza-A-Virus induziert Translokation von BAX zu den Mitochondrien im humanen Lungengewebe. (A bis C) Dargestellt sind Gewebeschnitte von *ex vivo* Lungengewebe, welches mit PR8 NS1-GFP(H1N1)-Virus infiziert und gegen DNA und TOM20 markiert wurde. (A) Die zweidimensionale Gewebedarstellung zeigt die Verteilung von virusinfizierten (blau, weiße Pfeilspitzen) und nicht infizierten Zellen (gelb, weißer Stern) in der Alveole. (B und C) Ausschnitte zeigen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (offene Pfeilspitzen) eine Fragmentierung der Mitochondrien (weiße Pfeilspitzen) in virusinfizierten Zellen (weiße Pfeilspitzen). (D) Nach Immunfluoreszenzfärbung gegen aktiviertes *BCL-2-associated X protein* (BAX) sieht man, dass diejenigen im Apoptoseprozess befindlichen virusinfizierten Zellen (blau, weiße Sterne) nach 48 h im Vergleich zu den anderen infizierten Zellen (offene Pfeilspitzen) eine positive BAX-Markierung aufweisen (rot, weiße Pfeilspitzen) (E) Dargestellt ist eine IAV-positive Zelle (linkes Bild, weißer Pfeil) im Apoptoseprozess. BAX ist deutlich an den abgerundeten Mitochondrien lokalisiert (rechtes Bild, weiße Pfeile). Dargestellt sind repräsentative Bilder aus jeweils 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Maßstab A+B: 2 μ m

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der zentralen Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem *ex vivo* Lungengewebekulturmodell und *in vitro* Infektionsmodell (A549-Zellen) der zeitliche Verlauf mitochondrialer Dysfunktionen hinsichtlich des Apoptoseprozesses in infizierten AEC II mittels Lebendmikroskopie und digitaler Bildanalyse untersucht. Ziel war, die Rolle von Mitochondrien im konkreten Ablauf des IAV-induzierten Zelltodes besser einordnen zu können.

Die Beobachtungen der Lebendmikroskopie zeigten, dass die Mitochondrien von infizierten humanen AEC II und A549-Zellen über einen langen Zeitraum während der IAV-Infektion intakt und motil waren (Abbildung 18 A). Obwohl bereits ein positives Caspase-3/7-Signal in den infizierten Zellen zu detektieren war, wurden weder Zeichen mitochondrialer Dysfunktion noch der morphologischen Apoptose beobachtet. Die Befunde lassen vermuten, dass Mitochondrien so lange wie möglich während der IAV-Infektion in ihrer Funktion aufrechterhalten werden, um die Lebensfähigkeit der Zelle und folglich auch die Virusreplikation zu sichern. Sobald mitochondriale Dysfunktion eintrat, konnte eine Abrundung der Mitochondrien, ein Verlust des $m\Delta\Psi$, die Rekrutierung von BAX sowie eine Freisetzung von *cytochrom C* detektiert werden. Die Zellen zeigten eine starke Caspase-3/7-Aktivierung und eindeutige Zeichen der Apoptose (Abbildung 18 B). Aktive Caspasen in infizierten Zellen scheinen somit nicht per se zu beweisen, dass Zellen kurz vor oder bereits im Zelltod sind, sondern vermutlich auf dem Weg dorthin. Der entscheidende Auslöser für eine tatsächliche Apoptoseinduktion während der IAV-Infektion ist höchstwahrscheinlich die Dysfunktion der Mitochondrien, worauf zeitlich dann relativ schnell der Zelltod folgt.

Hiermit geben die vorliegenden Daten Hinweise auf die zentrale Bedeutung der Mitochondrien im IAV-Infektionsprozess bis hin zur Induktion des Zelltodes.

Diskussion

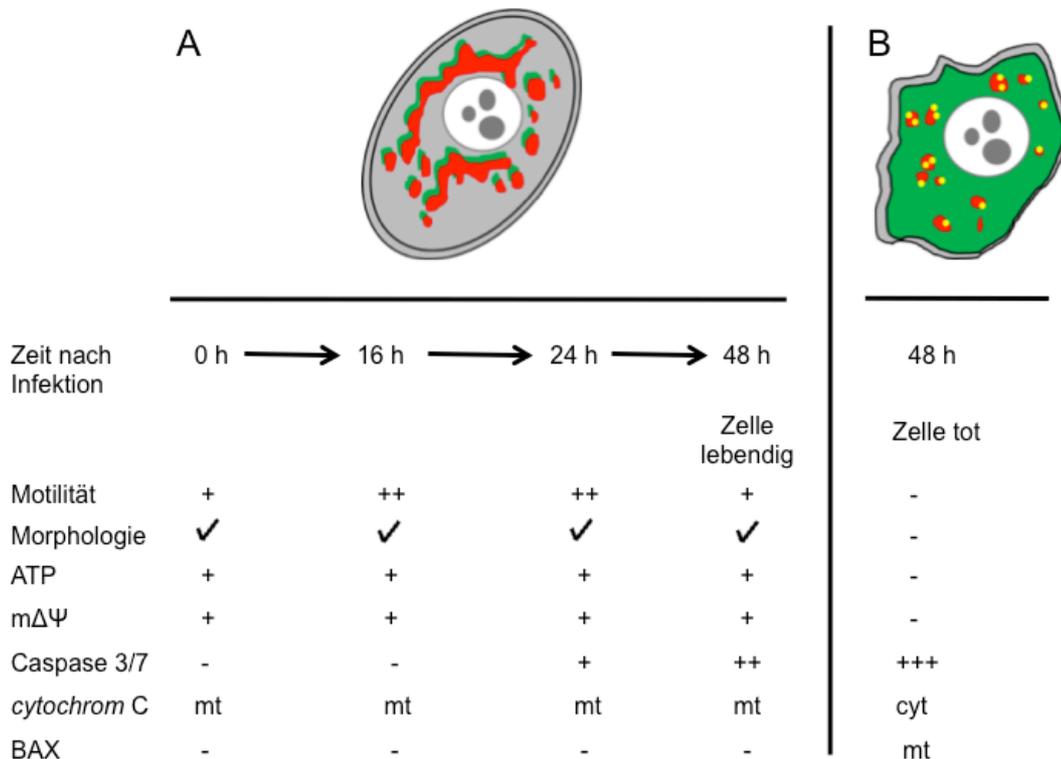


Abbildung 18: Modell der Zelltodprozesse und Rolle von Mitochondrien während der Influenza-A-Virus Infektion. (A) Über einen Beobachtungszeitraum von 48 h während der IAV-Infektion werden die Mitochondrien in ihrer Funktion erhalten, um die Lebensfähigkeit der Zelle und somit auch die Virusreplikation zu sichern. Dabei sind bereits Caspasen-3/7 aktiviert, obwohl weder eine Veränderung der mitochondrialen Morphologie noch ein Verlust des $m\Delta\Psi$ oder weitere morphologische Zeichen der Apoptose zu beobachten sind. Lediglich die Zellkerne der infizierten Zellen weisen prominente Nukleoli als Zeichen der Virusinfektion auf. (B) Mit Eintritt der mitochondrialen Dysfunktion kommt es in späteren Stadien der IAV-Infektion zum Verlust des $m\Delta\Psi$, zur Abrundung der Mitochondrien, der Translokation von BAX, einer Freisetzung von *cytochrom C*, einer starken Caspasen-3/7-Aktivierung sowie zu eindeutigen Zeichen der Apoptose mit Abrundung der ganzen Zelle und zum Stillstand der Mitochondrien. (mt = mitochondrial, cyt = zytosolisch, $m\Delta\Psi$ = mitochondriales Membranpotential).

4.2 Bedeutung von Apoptoseprozessen für die Pathogenese der Influenza-A-Virus Infektion

Neben dem Auftreten von neuartigen IAV-Stämmen mit Gefahr einer weltweiten Pandemie, stellen vor allem die jährlichen IAV-Infektionen nach wie vor eine große Bedrohung für die Gesundheit der Bevölkerung dar [13]. In Abhängigkeit von Risikofaktoren und Komorbiditäten kann eine IAV-Infektion sowohl zu einer milden, selbstlimitierenden Erkältungserkrankung als auch zu einer schweren Pneumonie mit Entwicklung eines ARDS führen [12]. Beobachtungen aus Autopsien von Patienten mit schweren Verläufen ergaben, dass IAV einen diffusen Alveolarepithelschaden verursacht, infolgedessen es durch Exsudation von Flüssigkeit und Proteinen zur Störung des Gasaustausches kam [49, 107]. Als ein wichtiger Pathomechanismus für die Schäden am Alveolarepithel wird die

Diskussion

Apoptose von AEC diskutiert. Dabei wird einerseits angenommen, dass eine überschießende inflammatorische Reaktion mit fehlender Selbstlimitierung die Apoptose der AEC induzieren kann, andererseits scheinen IAV Apoptoseprozesse der Wirtszelle für ihre effektive Replikation zu manipulieren [79-81, 98, 108, 109].

Die Untersuchungen an humanen AEC II und A549-Zellen zeigen, dass mit IAV infizierte Zellen in Apoptose gehen. Diese Befunde konnte bereits in mehreren Studien *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden [110-113]. Die vorliegende Arbeit ist die erste ihrer Art, die explizit den Apoptoseprozess und die Rolle der Mitochondrien im zeitlichen Ablauf der IAV-Infektion mittels Lebendmikroskopie untersuchte. Hierbei ließ sich beobachten, dass infizierte Zellen über einen Zeitraum von ca. 48 h während der IAV-Infektion, trotz Aktivierung von Caspase 3/7, am Leben erhalten werden. Möglicherweise ist die Schwelle an aktivierten Caspasen nicht erreicht, um in der Zelle Apoptose zu induzieren, oder IAV hemmt zugunsten einer effektiven Replikation zelluläre Apoptoseprozesse. Aus der Literatur sind antiapoptotische Eigenschaften des viralen NS1-Proteins bekannt. NS1 wird zusammen mit NP in frühen Stadien der Infektion exprimiert und dient der Supprimierung der zellulären IFN-Abwehr [94, 97, 114]. Zhirnov O. P. *et al.* beobachteten eine frühzeitige Apoptoseinduktion und eine damit verbundene verringerte Replikation in Zellen, die mit einem NS1-defizienten Virus infiziert wurden. Gleichzeitig konnten die Autoren zeigen, dass die antiapoptotischen Eigenschaften von NS1 in Zellen mit fehlenden IFN- α /IFN- β -Antwort ausblieben, sodass sie einen IFN-abhängigen Mechanismus der Apoptoseinhibition vermuteten [97]. Nachfolgenden Studien identifizierten die PI3K und eine ihrer wichtigsten Effektor kinase PKB, als molekularen Mechanismus für die NS1 vermittelte Apoptoseinhibition [98]. Die Bindung von NS1 an die p85-Untereinheit von PI3K resultiert in eine Aktivierung von PKB, die wiederum eine Inhibition von proapoptotischen Faktoren wie Caspase 3 und Caspase 9 zur Folge hat [94, 98]. Zudem wird diskutiert, ob das *PDZ-binding motif* von NS1, was aufgrund seiner Eigenschaft an das proapoptotische Protein *scribble* zu binden, die Apoptose von mit H5N1 infizierten Zellen reduzieren kann [114]. Als direkte Inhibitoren der Caspasenaktivität könnten IAPs ebenfalls eine Zielstruktur zur Unterdrückung einer vorzeitigen Apoptoseinduktion während der IAV-Infektion darstellen. Interessanterweise zeigte sich in einer Studie von Rodrigue-Gervais I. G. *et al.*, dass IAP-defiziente Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit und Mortalität während der IAV-Infektion aufweisen. Die erhöhte Mortalität war dabei durch eine vermehrte Nekrose von AEC zu erklären, die zu einer schweren Degeneration der Bronchien und Epithelzellen führte. Eine

Diskussion

Hemmung des Nekrosesignalweges verminderte die Letalität der IAP-defizienten Mäuse, welches die Autoren vermuten ließ, dass möglicherweise über die Aktivierung von IAP ein gewisser Schutz vor Gewebeschaden entsteht. Einen Unterschied hinsichtlich der Virusreplikation in Wildtypmäusen und IAP-defizienten Mäusen konnte nicht beobachtet werden [115]. Die Ergebnisse der Studie lassen entgegen der vorangegangenen Hypothese einen Vorteil für den Wirt, durch den IAP-vermittelten Antagonismus zur Verhinderung der Epithelzellnekrose, vermuten. Allerdings fehlen Hinweise aus menschlichen Proben, beispielsweise aus der humanen Lunge, um die tatsächliche Rolle von IAPs während der IAV-Infektion aufzuklären.

Trotz einer verzögerten Apoptoseinduktion wurde in den Versuchen der vorliegenden Arbeit in den infizierten A549-Zellen ab Beginn der Infektion ein kontinuierlicher Anstieg der Caspasen-3/7-Aktivität gemessen. Die Aktivierung zeigte sich auch in den *western blot* Untersuchungen der Caspase 3. Allerdings werden bei dieser Art von Untersuchung alle Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten analysiert, sodass die Befunde lediglich Summen-signalantworten darstellen. Dies könnte dazu führen, dass andere zelluläre Reaktionen nicht detektiert werden und es folglich zu generalisierten Schlussfolgerungen kommt, die nicht Zell individuelle Antworten widerspiegeln. So zeigte die Betrachtung einzelner Zellen mittels Lebendzellmikroskopie, dass die Mehrheit der Caspase 3/7-positiven Zellen eine intaktes $m\Delta\Psi$, kein ATP-Abfall, keine *cytochrom C* Freisetzung sowie motile Mitochondrien aufweisen. Der Nachweis aktiver Effektor-Caspasen scheint demnach nicht per se zu beweisen, dass Zellen kurz vor oder bereits im Zelltod sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass die aktive Caspase 3 für eine effektive Virusreplikation notwendig ist: Caspasen 3/7 könnten in den infizierten Zellen aufgrund der Virusreplikation aktiviert worden sein. Die Studie von Wurzer W. J. und seinen Kollegen zeigten eine geringere IAV-Replikation in Anwesenheit eines Caspaseinhibitors. Gleichzeitig konnte eine deutlich verringerte Replikationseffizienz in MCF-7-Zellen beobachtet werden, bei denen eine *deletion* des Caspase-3-Gens vorlag. Durch eine ektopische Expression des Proteins konnte wiederum die virale Replikation auf das 30-fache erhöht werden. Als ursächlich für die erniedrigte Virusreplikation fand sich eine Retention der vRNPs im Zellkern der Wirtszelle, was die Formation neuer, infektiöser Viruspartikel verhinderte [101]. Übereinstimmend hierzu konnten Hinshaw V. S. *et al.* bereits im Jahr 1994 eine reduzierte Virusreplikation sowie Retention von vRNP in Zellen beobachten, in welcher das antiapoptotische

Bcl-2-Protein überexprimiert war [110]. Der genaue Mechanismus dieses Caspase-abhängigen Exports der vRNPs wurde durch Mühlbauer D. *et al.* in einer weiteren Studie untersucht. Die Autoren beobachteten, dass zum späten Zeitpunkt der IAV-Infektion eine Caspasenaktivität für die Degradation des Nukleoporins Nup153 notwendig war. Die Degradation führte wiederum zu einer Vergrößerung der Zellkernporen in IAV-infizierten Zellen, was einen passiven nukleären Export der neugebildeten vRNPs ermöglichte. Da die Replikation von IAV im Zellkern erfolgt und das Virus zur Vervollständigung seines Replikationszyklus von zellulären Transportmechanismen abhängig ist, vermuteten die Autoren, dass dieser passive Export zu einer effektiven Replikation beiträgt [116]. Ergänzend hierzu konnten Zhirnov O.P. *et al.* beobachten, dass das virale NP in infizierten Zellen ebenfalls durch aktive Caspasen in seine 53 kDA Form gespalten wird, was ebenfalls die wichtige Rolle der Caspasen während der IAV-Replikation unterstreicht [117]. Es erscheint demnach naheliegend, dass IAV eine Caspasenaktivierung induzieren kann. Belege hierfür könnten sich in einer weiteren Studie von Wurzer W. J. *et al.* finden, welche die Folgen einer Aktivierung des *NF- κ B*-Signalweges während einer IAV-Infektion untersuchte. Während der IAV-Infektion wurde dort in den infizierten Zellen eine *NF- κ B* vermittelte Expression der proapoptotischen Faktoren wie TRAIL und FasL nachgewiesen. Eine Inhibition dieser Faktoren führte zu einer verringerten Virusreplikation, gleichzeitig schien eine Zugabe von rekombinanten TRAIL oder FasL zu einer erhöhten Virusproduktion beizutragen [118, 119]. Übereinstimmend mit diesem Befund konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden, dass IAV über die proapoptotischen Faktoren TRAIL und FasL den extrinsischen Weg Apoptose induzieren kann [84, 112]. Es ist demnach ein Modell denkbar bei dem die IAV-Infektion über eine *NF- κ B* kontrollierte TRAIL und FasL Expression die Apoptose via auto und parakrine Mechanismen induziert und so Caspasen für eine effiziente Replikation aktiviert [51, 116]. Zur Prüfung dieses Modells sind weitere Studien notwendig, die einen Zusammenhang der TRAIL- und FasL-Expression und Caspasenaktivierung untersuchen. Hierbei könnte beispielsweise überprüft werden, ob es in Gegenwart eines Caspaseinhibitors zu einer verringerten Aktivierung von *NF- κ B* und in Folge dessen zur verringerten TRAIL- und FasL-Expression kommt. Interessant wäre außerdem die Konzentration von TRAIL und FasL im zeitlichen Verlauf der IAV-Infektion zu messen, um eine Abhängigkeit von der Caspasen-3/7-Aktivierung festzustellen.

Als entscheidenden Auslöser der Apoptose konnte in der vorliegenden Arbeit die Dysfunktion der Mitochondrien identifiziert werden. Sobald die mitochondriale Dysfunktion in

Diskussion

den infizierten A549-Zellen eintrat, konnte eine Abrundung der Mitochondrien, ein Verlust des $m\Delta\Psi$, die Rekrutierung von BAX, Freisetzung von *cytochrom C* detektiert werden und die Zellen zeigten eine starke Caspase-3/7-Aktivierung sowie eindeutige morphologische Zeichen der Apoptose. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen ist aus der Literatur bekannt, dass die mitochondrialen Bcl2-Proteine bei der Apoptoseinduktion während der IAV-Infektion involviert sind. Zur Gruppe der proapoptischen Bcl-2-Proteine zählen BAX und BAK, welche die äußere mitochondriale Membranpermeabilisierung direkt regulieren, sowie BID, BIM, Bad, die apoptotischen Reize erfassen und BAX/BAK aktivieren oder antiapoptische Proteine wie Bcl-2 hemmen können [70, 120]. McLean J. E. *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass die Apoptoseinduktion während der IAV-Infektion von BAX und BAK abhängig ist: In Übereinstimmung mit den Befunden der vorliegenden Arbeit zeigte sich in deren Studie ab 24 h eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in der infizierten Probe. Zudem war nach 18 h eine *cytochrom C* Freisetzung und BAX-Translokation zu den Mitochondrien zu beobachten. Ein Mangel an BAX führte zu einer verminderten Apoptoseinduktion und Virusreplikation, gleichzeitig war in Zellen mit defizienten BAX vermehrt andere Zelltodwege wie Autophagie zu beobachten. Interessanterweise war die BAK Expression während der IAV Infektion herunter reguliert. Zudem kam es in BAK deletierten embryonalen Mausfibroblasten zu einer verstärkten Apoptoseinduktion sowie verstärkter Virusreplikation von IAV, was die Autoren vermuten ließ, dass BAK die virale Replikation supprimieren kann und möglicherweise von IAV herunter reguliert wird [86]. Das proapoptische BAD-Protein scheint ebenfalls für die Apoptoseinduktion in infizierten Zellen notwendig zu sein: In einer Studie von Tran A. T. *et al.* führte die IAV-Infektion zu einer Spaltung von BAD zu späten Zeitpunkten der Virusreplikation. In Zellen mit deletierten BAD zeigte sich eine reduzierte *cytochrom C* Freisetzung mit Suppression des intrinsischen Apoptoseweges, welches eine verminderte Virusreplikation zur Folge hatte [87]. Das der mitochondriale Apoptoseweg möglicherweise auch für eine effektive Virusreplikation nötig ist, demonstrierte eine Studie an infizierten Zellen, in welcher eine Überexpression des antiapoptischen Bcl-2-Proteins mit verminderten Virustiter assoziiert war und zudem mit einer Glykosylierungsstörung von HA korrelierte [83]. Zusammenfassend wird die Erkenntnis, dass der mitochondriale Apoptoseweg während IAV-Infektion möglicherweise zentral involviert ist, damit noch unterstützt. Die alleinige Aktivierung der Effektor-Caspasen 3/7 scheint nicht auszureichen, um in den

infizierten Zellen Apoptose vollständig zu induzieren. Folglich führt erst die mitochondriale Dysfunktion mit Abrundung der Mitochondrien, Verlust des $m\Delta\Psi$, Rekrutierung von BAX sowie Freisetzung von *cytochrom C* zum Zelltod während der IAV-Infektion.

Die ursächlichen Mechanismen, die zur mitochondrialen Dysfunktion und damit zur tatsächlichen Apoptoseinduktion führen, wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Bisher bleibt unklar, ob die Apoptose durch virale oder zelluläre Faktoren induziert wird. Apoptoseprozesse stellen einen wichtigen Mechanismus der zellulären Virusabwehr dar, um virusinfizierte Zellen zu eliminieren und eine weitere Virusverbreitung zu verhindern [121]. Allerdings wurden bereits für PB1-F2, NP, NA, M1, M2 und NS1 proapoptotische Eigenschaften beschrieben (zusammengefasst in Kapitel 1.5), was nahelegt, dass IAV Fähigkeiten erworben hat, um die zellulären Abwehrmechanismen zum Vorteil seiner Replikation zu nutzen. Dies schließt möglicherweise eine frühe Induktion der Caspasenaktivität mit ein, aber nicht notwendigerweise die Ausführung des vollständigen Apoptoseprozesses, der höchstwahrscheinlich eine antivirale, zelluläre Reaktion ist [80]. Da bereits gezeigt werden konnte, dass eine Vielzahl von intrazellulären Signalwegen während der IAV-Infektion aktiviert werden, könnte die mitochondriale Dysfunktion in den infizierten Zellen durch zelluläre Faktoren ausgelöst sein [30, 80]. Hierbei könnte insbesondere die Aktivierung von BAX von Bedeutung sein: grundsätzlich kann die Translokation und Aktivierung von BAX durch die Interaktion mit proapoptotischen Bcl-2-Proteine, welche als „Sensoren“ von zellulären Stressantworten fungieren, verursacht werden. Darüber hinaus kann BAX direkt durch intrazelluläre Homöostasestörungen wie pH-Änderungen, oxidativen Stress oder ER-Stress aktiviert werden [70, 72]. Beispielsweise induziert das Tumorsuppressor-Protein p53 bei Akkumulation im Zytosol eine BAX-Translokation zu den Mitochondrien und kann damit direkt zur Apoptoseinduktion führen. Klassischerweise wird p53 bei DNA-Schäden aktiviert, jedoch können auch Zellstresssignale seine Aktivierung fördern [70, 120, 122]. Verschiedene Studien zeigen, dass während der IAV-Infektion erhöhte p53-Proteinspiegel mit der Apoptoseinduktion assoziiert sind [92, 123-126]. Dabei scheint die erhöhte p53-Aktivität und Apoptose hauptsächlich in späten Phasen der IAV-Infektion aufzutreten [124, 126]. Shen Y. *et al.* beobachteten, dass die Akkumulation und Phosphorylierung von p53 eine Aktivierung von BAX in den virusinfizierten Zellen verursachte [124]. Hingegen zeigte sich bei Inhibition von p53 eine erhöhte IAV-Replikation durch Modulation der IFN-Antwort, welches zusätzlich die Funktion von p53 als antiviralen Faktor im Rahmen der Immunantwort der Wirtszelle unterstreicht [125]. Somit könnte die erhöhte Aktivität von p53 in späten Phasen der IAV-Infektion,

ausgelöst durch z. Bsp. Zellstresssignale und die antivirale Immunantwort, ein potentieller Mechanismus der BAX-Aktivierung mit konsekutiver Apoptoseinduktion sein. Andererseits ist denkbar, dass intrazelluläre Signalkaskaden von *mitogen-activated protein kinasen* (MAPK) an der BAX-Aktivierung beteiligt sind. Diese Hypothese unterstützend, konnte eine Studie von Lu X. *et al.* demonstrieren, dass es *jun-n-terminal kinase* (JNK)-abhängig zur Aktivierung von BAX in A549-Zellen während der IAV-Infektion kommt [127]. Die JNK gehört zur Familie der MAPK, die verschiedenen extrazellulären Signale in Zellantworten umwandeln können. Ihre Aktivierung wurde während der IAV-Infektion beobachtet [128]. Über direkte Phosphorylierung kann JNK zu einer Konformationsänderung von BAX und anschließender Translokation zu den Mitochondrien führen und somit zur Permeabilisierung der mitochondrialen Membran beitragen [129]. Da die Befunde der vorliegenden Arbeit darauf hindeuten, dass BAX bei der Apoptoseinduktion während der IAV-Infektion aktiviert wird, können Untersuchungen zu Mechanismen der BAX-Aktivierung eine Grundlage für weitere mechanistische Studien bilden.

Abschließend ist zu diskutieren, ob A549-Zellen ein geeignetes Modellsystem sind, um Apoptoseprozesse während der IAV-Infektion zu untersuchen. Die Zellen sind ein häufig verwendetes Modellsystem für die Analyse von Virus-Wirt-Interaktionen. Allerdings handelt es sich bei diesen Zellen um Abkömmlinge eines nicht-kleinzelligen Lungentumors [103]. Ein wesentliches Merkmal von Karzinomzellen ist u.a. die Fehlregulation von Apoptoseprozessen [130]. Demnach kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Mechanismen möglicherweise nur in diesen Karzinomzellen aufgrund einer dysregulierten Apoptose nachzuweisen sind. Zudem sind Zellkulturen zweidimensionale Untersuchungsmodelle: Infektionsprozesse finden nicht in der physiologischen Lungenumgebung statt und der Einfluss von anderen typischen Gewebezellen, wie beispielsweise Alveolarmakrophagen, fehlt. Aus diesen genannten Gründen wurden die zentralen Befunde der A549-Zellen im humanen *ex vivo* Lungenmodell verifiziert (siehe Abbildung 16 und 17). In der Lebendgewebemikroskopie ließ sich nachweisen, dass die IAV-infizierte AEC II über einen Zeitraum von ca. 40 h ein intaktes $m\Delta\Psi$ besitzen. Mit Stillstand der Mitochondrien und Verlust des $m\Delta\Psi$ konnte eine Caspase-3/7-Aktivierung mit konsekutivem Zelltod der infizierten Zelle beobachtet werden (siehe Abbildung 16). Auch ließ sich mithilfe des *ex vivo* Lungenmodells in den apoptotischen AEC II eine Translokation von BAX zu den Mitochondrien nachweisen (siehe Abbildung 17). Zusammen mit den Befunden der Zellkultur unterstreichen diese Ergebnisse die zentrale Bedeutung der Mitochondrien während des Apoptoseprozess im IAV-Infektionsprozess.

4.3 Auswirkungen der Influenza-A-Virus Infektion auf mitochondriale Funktionen

Mitochondrien sind Zellorganellen, die zentral am Energiestoffwechsel und der zellulären Immunantwort beteiligt sind. Ihre Fehlfunktion wurde bei der Manifestation verschiedener Lungenerkrankungen beobachtet [131]. Gleichzeitig haben Viren Mechanismen entwickelt, um Mitochondrien und den Metabolismus sowie das Überleben der Wirtszelle für eine effektive Replikation zu modulieren [54, 132]. Als primäre Zielzellen von IAV besitzen AEC II eine zentrale Rolle bei IAV-induzierten Immunreaktionen und Reparaturprozessen der Lunge [32, 49, 133]. Strukturell unterscheiden sich AEC II durch ein größeres mitochondriales Volumen von anderen Zellen der Lunge wie Endothelzellen oder AEC I [134]. Dem liegt wahrscheinlich zugrunde, dass sie auf einer kontinuierlichen Energieversorgung aufgrund ihrer hohen metabolischen und sekretorischen Aktivität angewiesen sind, beispielsweise bei der *surfactant* Produktion [66, 135]. Da Mitochondrien eine wichtige Rolle für die physiologische Funktion der Zielzellen von IAV einnehmen, erschien es naheliegend, die direkte Auswirkung der Virusinfektion auf die mitochondrialen Parameter Motilität, ATP und $m\Delta\Psi$ zu untersuchen.

4.3.1 Mitochondriales Membranpotential

Das $m\Delta\Psi$ ist ein wichtiger Indikator für die Intaktheit von Mitochondrien und Zelle, weil der Verlust des $m\Delta\Psi$ zu einem Zusammenbruch der mitochondrialen Funktionen führt und somit einen frühen, irreversiblen Schritt der Apoptoseinduktion darstellt [54, 72, 136]. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit war das $m\Delta\Psi$ sowohl in AEC II der Lunge als auch in A549-Zellen über langen Zeitraum der IAV-Infektion stabil. Erst bei Analyse auf Einzelzellebene zeigte sich, dass es mit Dysfunktion der Mitochondrien zu einem Verlust des $m\Delta\Psi$ kommt, welches dann eine rasche Apoptoseinduktion zur Folge hatte. In weiteren Untersuchungen war mit Verlust des $m\Delta\Psi$ eine Translokation von BAX an die Mitochondrien nachweisbar.

Hinweise, dass IAV zur Alteration des $m\Delta\Psi$ mit konsekutiver Apoptoseinduktion führt, stammen z. B. von der Entdeckung des viralen PB1-F2-Proteins [31]. Als Produkt eines alternativen Leserasters von PB1 wird es von fast allen IAV-Stämmen kodiert und Polymorphismen tragen wesentlich zur erhöhten Virulenz des jeweiligen Stammes bei [137]. Studien wiesen nach, dass PB1-F2 mit der inneren und äußeren mitochondrialen Membran interagieren kann und eine Veränderung der mitochondrialen Morphologie sowie den Verlust des $m\Delta\Psi$ induziert. In Zellen mit einer künstlichen Expression von PB1-F2 zeigte

Diskussion

sich eine Fragmentierung der Mitochondrien mit Verlust des $m\Delta\Psi$ und der Apoptoseinduktion [31, 90, 138]. Zudem interagiert PB1-2 mit den mitochondrialen Molekülen ANT3 und VDAC1, welches eine erhöhte Permeabilität der mitochondrialen Membran induziert und Zellen für apoptotische Reize sensibilisiert [99]. Da die Expression von PB1-F2 in anderen Studien ihr Maximum nach 5 h erreichte und das Protein relativ schnell proteasomal abgebaut wurde [31, 139], ist der nach überwiegend ab 48 h induzierte Verlust des $m\Delta\Psi$ in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit schwerlich allein durch eine proapoptotische Wirkung von PB1-F2 zu erklären. Überdies scheint die Apoptoseinduktion durch PB1-F2 für jeden Zelltyp spezifisch zu sein. So konnten Chen W. S. *et al.* beobachten, dass hauptsächlich Monozyten betroffen sind. Die Autoren vermuteten, dass PB1-F2 *in vivo* die Beseitigung von IAV-infizierten Immunzellen fördert, um eine effiziente Immunantwort zu verhindern [31]. PB1-F2 von hoch pathogenen IAV-Stämmen scheint außerdem in HEK293-Zellen das $m\Delta\Psi$ mithilfe von mitochondrialen Tom40-Kanälen zu reduzieren, was zur Apoptose der infizierten Zellen führt [138]. Insbesondere konnte dabei eine Suppression der RIG-I vermittelten Signalwege sowie eine Hemmung des *nod-like receptor family pyrin domain-containing 3* (NLRP3) Inflammasoms beobachtet werden [31, 138]. Damit übereinstimmend demonstrierten Koshiba, T. *et al.* in einer Studie die Korrelation zwischen einer verminderten durch MAVS-vermittelten antiviralen Immunantwort und einem reduzierten $m\Delta\Psi$ [140]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Verlust des $m\Delta\Psi$ mit einer Verminderung der IL1 β -Sekretion nach Infektion mit IAV einhergeht [140]. Ein intaktes $m\Delta\Psi$ war für die Interaktion zwischen NLRP3 und Mitofusion-2, einem wichtigen Regulationsprotein der mitochondrialen Fusions-Prozesse, notwendig. Die Autoren der Studie demonstrierten damit eine Verbindung zwischen Mitochondrien und Inflammasom-Aktivierung [140]. Es ist zu spekulieren, ob PB1-F2 möglicherweise über eine schnelle Apoptoseinduktion die antivirale Aktivität des Wirts und somit eine effiziente Immunantwort eindämmen könnte. Weitere Studien über den Mechanismus der PB1-F2 induzierten Apoptoseinduktion sind notwendig, um dieser Hypothese nachzugehen.

Wie bereits erwähnt, konnte eine BAX-Translokation zu den Mitochondrien sowohl in den A549-Zellen als auch in AEC II des humanen *ex vivo* Lungenmodell während der IAV-Infektion beobachtet werden. BAX gehört zu den proapoptotischen Bcl-2-Proteinen und kann zusammen mit BAK zum Verlust des $m\Delta\Psi$ führen [44, 46]. Im physiologischen Zustand werden beide Proteine permanent zwischen Zytosol und Mitochondrien transportiert. Während Apoptose wird der Transport von BAX zurück zum Zytosol blockiert und

es kommt zu Akkumulation von BAX-Molekülen am Mitochondrium. Dabei verändert BAX seine Konformation, was eine Oligomerisierung der BAX-Moleküle bewirkt, die zu späten Stadien der Apoptose zur Ausbildung großer „BAX-Cluster“ an der äußeren mitochondrialen Membran führt [141, 142]. Eine Studie von Grosse L. *et al.* konnte mittels hochauflösender Mikroskopie zeigen, dass BAX-Moleküle sich als ringartige Strukturen an Mitochondrien von apoptotischen Zellen zusammenfügen. Gleichzeitig korrelierte die Formation solcher „BAX-Ringe“ mit der Freisetzung von *cytochrom C*. Die Autoren der Studie vermuten, dass die Freisetzung der proapoptischen Proteine wie z. Bsp. *cytochrom C* aus dem Intermembranraum möglicherweise über diese „BAX-Ringe“, die als Poren fungieren, stattfindet [141]. Durch diese Änderung der Integrität der äußeren mitochondrialen Membran kommt es wiederum zum Verlust des $m\Delta\Psi$ und konsekutiv zur Apoptoseinduktion [120]. Es wäre denkbar, dass BAX auch während der IAV-Infektion über den genannten Mechanismus den Verlust $m\Delta\Psi$ herbeiführt. Aufnahmen der hochauflösenden Mikroskopie zeigten, dass die BAX-Moleküle sich als punktförmige Struktur an den Mitochondrien von infizierten, apoptotischen A549-Zellen und AEC II darstellen (siehe Abbildungen 15 und 17). Allerdings ist die mikroskopische Auflösung bei den Untersuchungen nicht ausreichend, um die Porenbildung an der mitochondrialen Membran darzustellen. In der vorliegenden Arbeit konnten Strukturen bis zu einer Auflösungsgrenze von ca. 250 μm detektiert werden, die BAX-Poren besitzen dagegen eine Größe von durchschnittlich 400 nm [141]. Es bedarf demnach weitere Untersuchungen, um den Mechanismus der BAX-abhängige mitochondriale Membranpermeabilisierung während der IAV-Infektion zu klären.

4.3.2 Mitochondriale ATP-Produktion

Der Hypothese folgend, dass IAV möglicherweise zu einer Störung der mitochondrialen Funktionen führen kann, wurde der mitochondriale und zytosolische ATP-Gehalt im Verlauf der Infektion in A549-Zellen gemessen. Für eine dynamische Messung in Echtzeit erfolgte die Untersuchung mithilfe FRET-basierter ATP-Sensoren. Dabei wurde eine Methode nach Imamura H. *et al.* verwendet [102]. In Übereinstimmung mit Ergebnissen dieser Studie zeigte sich bei A549-Zellen ein höherer ATP-Gehalt im Zytosol als in den Mitochondrien. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnte die Aktivität der ATP/ADP-Translokase sein, die ATP in das Zytosol pumpt und somit eine größere Differenz zwischen ATP/ADP erzeugt. Dies wiederum könnte ein wichtiger Stimulus für die ATP-Synthase zur Produktion von ATP darstellen [102].

Diskussion

Bei Messung des ATP-Gehalts während der 48-stündigen IAV-Infektion konnten keine Änderungen im Zytosol oder den Mitochondrien detektiert werden. Eine insuffiziente Infektion mit IAV und damit auch falsch negative Ergebnisse wurden mit positivem Nachweis einer NP-Immunfluoreszenzfärbung in den gleichen mit IAV-infizierten und transfizierten A549-Zellen ausgeschlossen. Allerdings handelte es sich hier wie bei den Befunden des $m\Delta\Psi$ um Summensignalantworten. Messungen einzelner apoptotischer Zellen waren aufgrund methodischer Probleme nicht durchführbar, weil die transfizierten und gleichzeitig infizierten Zellen im weiteren Verlauf der Infektion schwerer zu identifizieren waren. Es ist demnach anzunehmen, dass es, entsprechend der Befunde zum $m\Delta\Psi$ während des überwiegenden Zeitraums der IAV-Infektion, zu keinem messbaren Abfall der ATP-Konzentration kommt. Diese Befunde unterstreichend konnten Ritter J. B. *et al.* zeigen, dass eine IAV-Infektion bei Messungen von intrazellulären und extrazellulären Konzentrationen von Stoffwechselmetaboliten zu keiner Veränderung des Wirtsmetabolismus führte [143]. Es ist denkbar, dass ein Großteil mitochondrialer Funktionen, insbesondere eine kontinuierliche Energieproduktion, über eine gewisse Zeit der Virusinfektion erhalten bleiben, um eine effiziente Produktion neuer Viren zu ermöglichen. Studien von Ackermann W. W. *et al.* beschrieben bereits 1951 und 1953 die Abhängigkeit der IAV-Replikation von der zellulären ATP-Produktion [144, 145]. Später konnte gezeigt werden, dass ATP bei der Initiation der Transkription durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase [146] und für den effizienten *budding*-Prozess von IAV beim Abspalten neuer Viruspartikel von der Zelloberfläche notwendig sind [147]. Interessanterweise scheint IAV die Erhaltung der mitochondrialen Funktionen mittels PB2, einer Untereinheit der viralen RNA-Polymerase, zu beeinflussen [148]. Die Autoren der Studie konnten zeigen, dass PB2 neben einer nukleären Lokalisation auch eine mitochondriale Kolokalisation aufwies, welche durch eine N-terminale Sequenz von PB2 vermittelt wird. In Experimenten mit rekombinant veränderten Viren korrelierte die Inhibition des mitochondrialen Imports von PB2 mit einem reduzierten $m\Delta\Psi$ und führte in Folge zu einem verminderten Virustiter [148]. Andererseits kann spekuliert werden, dass ein Erhalt der ATP-Produktion durch intakte Mitochondrien während der IAV-Infektion auch von Vorteil für die Wirtszelle sein könnte. Beispielsweise sind wichtige Funktionen von AEC II wie die *surfactant*-Produktion und intrazelluläre Immunantworten von einer kontinuierlichen ATP Bereitstellung abhängig [149]. Diesbezüglich sind allerdings noch weitere Studien nötig, um die Bedeutung einer aufrechterhaltenden ATP-Produktion während der IAV-Infektion zu klären.

4.3.3 Mitochondriale Motilität

Viele mitochondriale Funktionen sind mit Veränderungen von Dynamik, Morphologie sowie Verteilung innerhalb der Zelle verbunden [55, 132]. Fragmentierte Mitochondrien wurden bei Mitophagie und Apoptose beobachtet, elongierte Mitochondrien waren dagegen mit einer erhöhten Energieproduktion und einer gesteigerten Immunantwort assoziiert [54, 55, 58, 131]. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss von IAV auf die mitochondriale Motilität nachgewiesen. Bei Lebendgewebemikroskopie der humanen Lunge zeigten sich bewegende Mitochondrien in AEC und Zellen des umgebenden Gewebes, vergleichbar zur mitochondrialen Motilität der A549-Zellen. In infizierten AEC II war die mitochondriale Motilität bis kurz vor dem eigentlichen Apoptoseprozess nachweisbar. Bei den A549-Zellen war eine unveränderte, zeitweise sogar erhöhte, Motilität während der IAV-Infektion zu beobachten. Aber auch hier zeigte sich ein Stillstand der Mitochondrien mit Einleitung des Apoptoseprozesses.

Die Bedeutung des Einflusses von Virusinfektionen auf die mitochondriale Dynamik konnte bereits in einigen Studien demonstriert werden [132]. So scheinen etwa Hepatitis-B- und -C-Viren die Änderungen der mitochondrialen Dynamik für die Aufrechterhaltung der chronischen Infektion zu nutzen [132, 150, 151]. Kim S. J. *et al.* wiesen nach, dass mitochondriale *fission*-Prozesse während der chronischen Hepatitis-C-Virus-Infektion durch Phosphorylierung von Drp1, einem an der Teilung von Mitochondrien beteiligten Protein, induziert werden. In Folge dessen wurde vermehrt Mitophagie beobachtet, was Apoptoseprozesse verhinderte und somit zu einer persistierenden Virusinfektion beitrug [151]. In einer anderen Studie konnte die Bedeutsamkeit der mitochondrialen Dynamik für MAVS-induzierte Signalwege identifiziert werden [152]. Die RLR-Aktivierung durch einen defekten Sendai-Virus oder zytosolische Doppelstrang-RNA führte zu einer Elongation und *fusion* von Mitochondrien, was eine Verstärkung der MAVS-vermittelten Signalwege und einer erhöhten Interaktion von MAVS mit dem ER-assoziierten Protein *stimulator of interferon genes* (STING) zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu bewirkte die mitochondriale Fragmentierung sowohl eine verspätete Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor IRF3 als auch verminderte MAVS-STING-Interaktion und inhibierte RLR-Signalwege [152]. Vor diesem Hintergrund wäre es interessant, weitere Untersuchungen über die zugrundeliegenden Mechanismen der IAV-induzierten mitochondrialen Motilität durchzuführen. Möglicherweise ist die erhöhte Motilität in der frühen Infektion mit einer MAVS-vermittelten Immunantwort assoziiert und ein Versuch der Wirtszelle den eindrin-

genden Virus zu eliminieren. In weiteren Experimenten könnte die Aktivierung von in *fusion*- und *fission*-Prozessen involvierten Proteinen untersucht werden, um nachfolgend in der Gegenprobe zu überprüfen, wie sich eine Inhibition der mitochondrialen Motilität auf das Replikationsverhalten von IAV auswirkt.

4.4 Techniken der Lebendzellmikroskopie zur Untersuchung der Virus-Wirt-Interaktion während der Influenza-A-Virus Infektion

Die Anwendung der Lebendmikroskopie stellt einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der Pathogenese von IAV-Infektionen dar [153, 154]. Die Methode hat den Vorteil die dynamischen und zeitabhängigen Prozesse während der Virus-Wirt-Interaktion zu untersuchen. Zudem können zusätzliche zellspezifische Reaktionen gemessen werden, die ansonsten im Summensignal untergehen würden. Das ist wiederum von besonderer Bedeutung, wenn mehrere physiologische Signale in heterozellulären Proben untersucht werden, wie beispielsweise Lungengewebe, wo verschiedene Zelltypen vorhanden sind [153-155]. Zudem bietet sie die Möglichkeit, mitochondriale Parameter wie $m\Delta\Psi$ oder Motilität in Echtzeit in infizierten Zellen zu messen. Anstatt einzelner Befunde zu spezifischen Zeitpunkten kann die Visualisierung der IAV-Infektion zu einem Gesamtüberblick der zellulären Prozesse während der Virusinfektion beitragen [155].

Die Analyse von *ex vivo* humanem Lungengewebe mittels Lebendgewebemikroskopie erlaubte erstmalig die Darstellung des Schicksals von Mitochondrien während der IAV-Infektion auf Einzelzellebene in einem dreidimensionalen Modell. Die Technik konnte auf ein *in vitro* Infektionsmodell übertragen werden, in welchem die Echtzeitmessungen der mitochondrialen Parameter $m\Delta\Psi$, Motilität sowie ATP-Gehalt möglich waren. Obwohl die Lebendgewebemikroskopie eine nicht-invasive Untersuchung von subzellulären Prozessen in vitalen Zellen darstellt, kann das Auftreten von phototoxischen Ereignissen mit zunehmender Länge der Experimente zu einem limitierenden Faktor werden [156]. Darüber hinaus stellt die kontinuierliche Abnahme der Fluoreszenzintensität aufgrund der lichtinduzierten Inaktivierung von Fluorophoren eine weitere Einschränkung von Langzeitmessungen dar [157]. Die physiologischen Veränderungen durch die Anwendung von Anregungslicht mit hoher Intensitäten, das zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe notwendig ist und insbesondere auch bei der hohen räumlichen oder zeitlichen Auflösung wie z.B. bei der Untersuchung von Mitochondrien eingesetzt wird, führt zu Artefakten und

abnormalen Reaktionen während der Messungen [157]. Phototoxizität geht mit der Bildung von zellschädigenden, reaktiven Sauerstoffspezies einher, die ATP-verbrauchende Reparaturenzyme aktivieren und insbesondere auch mitochondriale Funktionen beeinflussen können [156, 157]. Überdies ist die Wahrnehmung von phototoxischen Zellschäden problematisch, weil eine hohe Variabilität der jeweiligen Reaktionen zwischen verschiedenen Geweben und Zellen besteht. Beispielsweise können Zellen über eine lange Zeitspanne vital erscheinen, um anschließend nach Kumulation der phototoxischen Ereignisse oder durch bestimmte Auslöser wie Zellteilung in den Zelltod zu gehen. Auch konnte bei Zellen durch Phototoxizität eine erhöhte Sensitivität auf bestimmte Stimuli beobachtet werden [156, 157]. Zur Vermeidung phototoxischer Einflüsse wurde in dieser Arbeit mithilfe eines speziellen Zellinkubators, welcher am Mikroskop installiert war, versucht, optimale Zellkulturbedingungen zu schaffen. Bei den Langzeitmessungen der Lebendmikroskopie wurden auf hohe Lichtintensitäten verzichtet und die Belichtungszeiten möglichst geringgehalten. Die Auswertung erfolgte stets mit Betrachtung des DIC-Kanals und im Vergleich zu Kontrollzellen, um eine mögliche Phototoxizität früh zu erkennen und auszuschließen. Dennoch ist bei der Interpretation der Daten zu berücksichtigen, dass Phototoxizität möglicherweise die beobachteten Ergebnisse beeinflusst hat und sich dementsprechend die Pathomechanismen von den physiologischen des gesunden Gewebes unterscheiden können.

4.5 Humane Lungenmodelle zur Untersuchung der Pathogenese von Influenza-A-Virus Infektionen

Bei Untersuchungen zur Pathogenese von IAV-Infektionen ist die Wahl eines geeigneten experimentellen Modellsystems mit einer hohen Übereinstimmung zu physiologischen Vorgängen und somit späterer klinischer Aussagekraft von entscheidender Bedeutung. Die möglicherweise irreführenden Ergebnisse, die bei Translationsprozessen zwischen verschiedenen Modellsystemen entstehen, können somit vermieden werden. Da ein Großteil der Studien zur IAV-Infektion bisher auf Zellkultur- oder Mausmodellen basiert, besitzt die Entwicklung von humanen Lungenmodellen eine große Relevanz.

Als Modellsystem für AEC II wird häufig die A549-Zelllinie verwendet. Isoliert aus einem Lungenkarzinom [103], lässt sich die Zelllinie einfach und kostengünstig kultivieren mit guter Reproduzierbarkeit und breiter Anwendbarkeit für verschiedene Experimente. Das

Modell eignet sich zur mechanistischen und funktionalen Analyse der Zell-Pathogen-Interaktion [158]. Allerdings wachsen die Zellen als *monolayer* auf Kunststoffoberflächen und Studien zeigten, dass häufiges Passagieren zum Verlust von zelltypischen Eigenschaften führen kann. Dabei konnten sowohl morphologische Veränderungen und das Fehlen von wichtigen Oberflächenmarkern beobachtet werden [159, 160]. Diese Veränderungen, aber auch die Unterschiede in Zellarchitektur und Barrierefunktion gegenüber von primären AEC II, lassen die Eignung dieser Zelllinie als vergleichbares Modellsystem für primäre AEC II in Frage stellen [161]. Die Erkenntnisse von Mechanismen der Apoptoseinduktion während der Influenzainfektion stammen hauptsächlich aus Studien mit Zelllinien, insbesondere A549-Zellen [87, 101, 116]. Im Hinblick auf die potentiell fehlregulierten Apoptoseprozesse in Karzinomzellen, lassen sich auch hier deutliche Einschränkungen dieses Modellsystems finden. Darüber hinaus spiegeln die Zellkulturmodelle weder die Gewebediversität noch die zelluläre Interaktion in einer Lungenalveole wider [158]. Insbesondere in der vorklinischen Evaluation von neuen präventiven und therapeutischen Interventionen wie Impfungen oder antiviraler Medikamente sind komplexere Modelle notwendig [162].

Eine Alternative für integrative *in vitro* und *ex vivo* Modelle sind Tiermodelle, welche zusätzlich mittels genetischer Manipulationen die Pathogen-Wirt-Interaktion während einer IAV-Pneumonie *in vivo* analysieren können [162]. Dabei werden am häufigsten Mausmodelle verwendet, deren Ergebnisse sich jedoch nicht bedingungslos auf den Menschen übertragen lassen. Dies ist einerseits bedingt durch z. B. die Unterschiede in der Anatomie der Lunge und den vielen Bereichen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zwischen Menschen und Maus [163, 164]. Andererseits unterscheiden sich beide Spezies auch in der Krankheitsausprägung während einer IAV-Infektion. So kommt es beispielsweise in der murinen Lunge im Vergleich zum häufig milden Verlauf bei Menschen bei Infektion mit IAV zu einer primären viralen Pneumonie mit Zyanose und schweren pulmonalen Schäden [162]. Zudem besteht ein weiteres Problem bei der Untersuchung von Infektionserkrankungen in der Wirtsspezifität von Pathogenen [158]. Ein Großteil der isolierten humanen IAV-Stämme kann zwar in der murinen Lunge replizieren, allerdings führt erst eine Anpassung durch mehrfaches Passagieren zur Krankheitsausprägung in den Labormäusen [158, 162]. Diese verwendeten Viren sind demnach weder genetisch noch antigenetisch repräsentativ für die Viren, welche aktuell in der Bevölkerung zirkulieren [162].

Diskussion

Humane *ex vivo* Lungengewebe Modelle ergänzen die bestehenden Infektionsmodelle und können bereits bestehende Erkenntnisse aus Zellkultur- und Mausmodellen überprüfen. Verschiedene Studien untersuchten die IAV-Infektion im *ex vivo* Lungenkulturmodell mit Schwerpunkt auf viraler Replikation, Gewebetropismus und Freisetzung von Zytokinen sowie Chemokinen [158]. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der in 2009 neu isolierte und vom Schwein abstammende H1N1-Virus im Vergleich zu hoch virulenten IAV-Stämmen wie dem aviären H5N1- oder dem pandemischen H3N2-Virus ein mittleres Replikationsverhalten im humanem Lungengewebe hat [32, 133, 165]. Dies korreliert mit dem moderaten klinischen Verlauf bei Infektion mit dem Erreger in der humanen Bevölkerung [166]. Zudem bietet das humane *ex vivo* Lungengewebe Modell als weiteren Vorteil die direkte Nutzung von Virusstämmen, die von infizierten Patienten isoliert wurden. Die Anwendung dieses Modells könnte daher insbesondere bei neu auftretenden IAV-Epidemien helfen, sowohl das mögliche Potential einer schnellen Ausbreitung in der Gesellschaft als auch das Ausmaß der Lungenschädigung abzuschätzen [158]. Da die strukturelle Integrität des Lungengewebes weitestgehend erhalten bleibt, bieten humane *ex vivo* Lungengewebe Modelle überdies die Möglichkeit die verschiedenen zellulären Alterationen oder die Freisetzung von Immunmediatoren wie Zytokinen und Chemokinen während der IAV-Infektion zu untersuchen [158]. Übereinstimmend mit den Befunden der vorliegenden Arbeit entsprechen die räumliche Anordnung und Verteilung der Zellen weitgehend den physiologischen Bedingungen, sodass von einer annähernden *in vivo* Situation ausgegangen werden kann. Darauf basierend können humane *ex vivo* Lungenmodelle auch für die präklinische Prüfung neuer Medikamente genutzt werden. So zeigte beispielsweise eine Studie von Berg J. *et al.* in einem humanen *ex vivo* Ko-Infektionsmodell der IAV-assoziierten sekundären Pneumokokken-Pneumonie, dass der Einsatz eines spezifischen IFN-Rezeptor-Kinase-Inhibitors Tyk2 zu einer Aufhebung der IAV-induzierten IFN-abhängigen Blockade der IL1- β und *granulocyte-macrophage colony-stimulating* Freisetzung führte [167].

Dessen ungeachtet ist auch das humane *ex vivo* Lungenmodell durch bestimmte Faktoren limitiert: Durch die fehlende Sauerstoffzufuhr über die Ventilation und der unterbrochenen Gefäßzirkulation werden Prozesse wie Apoptose oder Nekrose begünstigt. Außerdem fehlen die Einwanderung von Immunzellen und der Zustrom von inflammatorischen Mediatoren mit dem Blut, sodass nur die Immunreaktion des isolierten und nicht die des Gesamtorganismus berücksichtigt werden kann. Im Gegensatz zum physiologischen Infektionsweg über die Atemwege erfolgt die Infektion der Pathogene über das

Medium. Überdies entstammen die Proben in der Regel von Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen, was die Reaktivität des Gewebes gegenüber Pathogenen im Vergleich zu gesundem Gewebe variieren lässt.

Zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass die Verwendung von humanen Lungenmodellen zur Untersuchung von Pathomechanismen der IAV-Infektion relevant ist, da die beobachteten Mechanismen möglicherweise zell- und gewebeabhängig sind. Auch im Hinblick auf die schnellere und effizientere Entwicklung neuer Medikamente gegen IAV erscheint es wichtig, integrative Ansätze mithilfe von humanen Lungenmodellen für ein besseres Verständnis der Virus-Wirt-Interaktion zu etablieren.

4.6 Ausblick: Virus-Wirt-Interaktion als Grundlage für die Entwicklung neuer antiviraler Therapien

Als schnell replizierende Viren mit einer fehleranfälligen Polymerase besitzen IAV die Eigenschaft, sich schnell an antivirale Medikamente anzupassen und Resistenzen zu bilden [168]. Alle aktuell zugelassenen Virusstatika gegen IAV wie beispielweise M2-Membranprotein- und Neuraminidase-Hemmer haben ausschließlich virale Proteinfunktionen zum Ziel und es wurden bereits Resistenzen gegen diese Medikamente beobachtet [12, 169]. Da die IAV-Replikation vollständig von der Wirtszelle abhängig ist und die Infektion mit der Aktivierung von einer Vielzahl zellulärer Signalwege einhergeht, hat in den letzten Jahren die Entwicklung neuer antiviraler Therapien auf Grundlage von Virus-Wirt-Interaktionen an Bedeutung gewonnen [168-170]. Unter diesen finden sich beispielsweise MAPK-vermittelte Signalwege, vor allem Raf/MEK/ERK, die zu späteren Zeitpunkten der IAV-Infektion den Export neuer vRNP vom Zellkern ins Zytosol auslösen und damit essentiell für die virale Replikation sind [168, 171]. Zuletzt konnte in einer Studie von Schrader T. *et al.* gezeigt werden, dass der bereits klinisch geprüfte MAPK-Inhibitor Trametinib sowohl die Replikation von endemischen als auch stark pathogenen aviären IAV limitieren kann. Im Mausmodell führte die Therapie mit Trametinib zu einem verbesserten klinischen Bild und zum Überleben der virusinfizierten Mäuse [168]. Übereinstimmend damit wurde eine antivirale Aktivität des MAPK-Inhibitors U0126 gegen verschiedene IAV-Stämme, darunter auch bei neuraminidaseresistenten Stämmen, *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen [172]. Beide Inhibitoren zeichneten sich dabei durch geringe Nebenwirkungen aus [168, 172]. Interessanterweise führte die Kombination von MAPK-Inhibitoren und Oseltamivir zu einer gesteigerten Wirkung von Oseltamivir, welches die Nutzung dieser

Diskussion

neuen antiviralen Mittel als Kombinationstherapie mit bereits etablierten Medikamenten unterstreicht [173]. Ein anderer therapeutisch interessanter Signalweg ist der NF- κ B-Signalweg. Er wird während der IAV-Infektion aktiviert, spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von proinflammatorischen Mediatoren und beeinflusst die Apoptoseinduktion [119, 169, 170]. Seitdem verschiedene Studien zeigen konnten, dass die IAV-Replikation auch NF- κ B abhängig ist, wurden unterschiedliche NF- κ B-Inhibitoren getestet, mit einer erfolgreichen Suppression der viralen Replikation [169, 170]. Acetylsalicylsäure (ASS) ist ein breit eingesetztes Medikament und überdies ein NF- κ B-Inhibitor [174]. Mazur I. *et al.* beobachteten eine ASS-abhängige Inhibition der Expression von proapoptotischen Faktoren und der Caspase-Aktivierung in A549-Zellen, was eine Retention von vRNPs und eine reduzierte Replikationskurve von IAV zur Folge hatte [174]. Nach Inhalations-Therapie mit ASS konnte auch *in vivo* eine verminderte Replikation von IAV nachgewiesen werden. Daneben könnte die NF- κ B-Inhibition sich positiv auf die überschießende Zytokinbildung während der IAV-Infektion auswirken, sodass die Autoren der Studie diskutierten ASS auch wegen seiner geringen Zelltoxizität als neues mögliches antivirales Notfallmedikament in der Klinik zu testen [174].

Mithilfe genomweiter Screeningmethoden gelang es zudem, neue Wirtsfaktoren, die essentiell für die IAV-Replikation sind, als potentielle Angriffspunkte von Virusstatika zu identifizieren [175-177]. Als ein Ergebnis von verschiedenen Genomweiten und RNA-Interferenz-basierten Screenings wurden *polo-like* Kinasen (PLK), die zu der Familie der Serin/Threonin-Kinasen zählen, identifiziert. Das Ausschalten von PLKs, sowie die Behandlung von Zellen mit PLK-Inhibitoren führten zu einer Verminderung der IAV-Replikation. Bei Zugabe des PLK-Inhibitors BI2536 konnte die IAV-Replikation in virusinfiziertem *ex vivo* Lungengewebe deutlich reduziert werden ohne Nachweis von Toxizität im Gewebe [176].

Bisher liegen keine Studien vor, welche direkt eine antivirale Therapie mit Modulation von Apoptoseprozessen untersucht haben. Die Tatsache, dass Apoptose im Allgemeinen als antiinflammatorischer Prozess gewertet wird und damit eine überschießende Immunantwort verhindert, könnten Apoptoseprozesse zu einem interessanten Ziel in der Entwicklung von adjuvanten Therapien gegen IAV machen. Andererseits scheint Apoptose die Replikation und Verbreitung zu verstärken, indem IAV aktiv zu seiner effizienteren Replikation zelluläre Apoptoseprozesse manipuliert [81, 101]. Zusammenfassend bedarf es in

Diskussion

Zukunft Studien, die zu einem tieferen und insbesondere auch zu einem kontextbezogenen Verständnis von Apoptoseprozessen während der IAV-Infektion beitragen. Nur so können gezielte therapeutische Angriffspunkte identifiziert werden, die nicht versehentlich zur einer Progression der Erkrankung führen [81].

Literaturverzeichnis

1. Hoffken G, Lorenz J, Kern W, Welte T, Bauer T, Dalhoff K, Dietrich E, Ewig S, Gastmeier P, Grabein B *et al*: **[Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network CAPNETZ Germany]**. *Pneumologie* 2009, **63**(10):e1-68.
2. Kolditz M, Ewig S: **Community-Acquired Pneumonia in Adults**. *Dtsch Arztebl Int* 2017, **114**(49):838-848.
3. Welte T, Torres A, Nathwani D: **Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe**. *Thorax* 2012, **67**(1):71-79.
4. Fauci AS, Morens DM: **The perpetual challenge of infectious diseases**. *N Engl J Med* 2012, **366**(5):454-461.
5. Global Burden of Disease Study C: **Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013**. *Lancet* 2015, **386**(9995):743-800.
6. **The top 10 causes of death** [<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>] (Accessed September 11, 2018)
7. Kolditz M, Tesch F, Mocke L, Hoffken G, Ewig S, Schmitt J: **Burden and risk factors of ambulatory or hospitalized CAP: A population based cohort study**. *Respiratory medicine* 2016, **121**:32-38.
8. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR: **Viral pneumonia**. *Lancet* 2011, **377**(9773):1264-1275.
9. Alimi Y, Lim WS, Lansbury L, Leonardi-Bee J, Nguyen-Van-Tam JS: **Systematic review of respiratory viral pathogens identified in adults with community-acquired pneumonia in Europe**. *J Clin Virol* 2017, **95**:26-35.

10. Pletz MW, Rohde G, Schutte H, Bals R, von Baum H, Welte T: **[Epidemiology and Aetiology of Community-acquired Pneumonia (CAP)]**. *Dtsch Med Wochenschr* 2011, **136**(15):775-780.
11. Bouvier NM, Palese P: **The biology of influenza viruses**. *Vaccine* 2008, **26 Suppl 4**:D49-53.
12. Paules C, Subbarao K: **Influenza**. *Lancet* 2017.
13. Peteranderl C, Herold S, Schmoldt C: **Human Influenza Virus Infections**. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 2016, **37**(4):487-500.
14. Schrauwen EJ, Fouchier RA: **Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals**. *Emerg Microbes Infect* 2014, **3**(2):e9.
15. Grant EJ, Chen L, Quinones-Parra S, Pang K, Kedzierska K, Chen W: **T-cell immunity to influenza A viruses**. *Crit Rev Immunol* 2014, **34**(1):15-39.
16. Short KR, Richard M, Verhagen JH, van Riel D, Schrauwen EJ, van den Brand JM, Manz B, Bodewes R, Herfst S: **One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus**. *One Health* 2015, **1**:1-13.
17. Dandachi D, Rodriguez-Barradas MC: **Viral pneumonia: etiologies and treatment**. *J Investig Med* 2018, **66**(6):957-965.
18. **S3-Leitlinie: Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention** [https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020020l_S3_ambulant_erworbene_Pneumonie_Behandlung_Praevention_2016-02-2.pdf] (Accessed October 11, 2018)
19. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS: **Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: Implications for pandemic influenza preparedness**. *Journal of Infectious Diseases* 2008, **198**(7):962-970.

Literaturverzeichnis

20. van der Sluijs KF, van der Poll T, Lutter R, Juffermans NP, Schultz MJ: **Bench-to-bedside review: bacterial pneumonia with influenza - pathogenesis and clinical implications.** *Crit Care* 2010, **14**(2):219.
21. von Baum H, Schweiger B, Welte T, Marre R, Suttorp N, Pletz MWR, Ewig S: **How deadly is seasonal influenza-associated pneumonia? The German Competence Network for Community-Acquired Pneumonia.** *European Respiratory Journal* 2011, **37**(5):1151-1157.
22. Uyeki TM: **Influenza.** *Ann Intern Med* 2017, **167**(5):ITC33-ITC48.
23. Malainou C, Herold S: **[Influenza].** *Der Internist* 2019.
24. Louie JK, Yang S, Acosta M, Yen C, Samuel MC, Schechter R, Guevara H, Uyeki TM: **Treatment with neuraminidase inhibitors for critically ill patients with influenza A (H1N1)pdm09.** *Clin Infect Dis* 2012, **55**(9):1198-1204.
25. Muthuri SG, Venkatesan S, Myles PR, Leonardi-Bee J, Al Khuwaitir TS, Al Mamun A, Anovadiya AP, Azziz-Baumgartner E, Baez C, Bassetti M *et al*: **Effectiveness of neuraminidase inhibitors in reducing mortality in patients admitted to hospital with influenza A H1N1pdm09 virus infection: a meta-analysis of individual participant data.** *The Lancet Respiratory medicine* 2014, **2**(5):395-404.
26. Impfkommision S: **Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert Koch-Institut.** *Epid Bull* 2017, **34**:333-380.
27. Rieck T, Feig M, Siedler A, Wichmann O: **Aktuelles aus der KV-Impfsurveillance–Impfquoten ausgewählter Schutzimpfungen in Deutschland.** 2018.
28. Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S: **Influenza virus morphogenesis and budding.** *Virus Res* 2009, **143**(2):147-161.
29. Szewczyk B, Bienkowska-Szewczyk K, Krol E: **Introduction to molecular biology of influenza a viruses.** *Acta Biochim Pol* 2014, **61**(3):397-401.

30. Ludwig S, Planz O, Pleschka S, Wolff T: **Influenza-virus-induced signaling cascades: targets for antiviral therapy?** *Trends Mol Med* 2003, **9**(2):46-52.
31. Chen WS, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P *et al*: **A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death.** *Nature Medicine* 2001, **7**(12):1306-1312.
32. Weinheimer VK, Becher A, Tonnies M, Holland G, Knepper J, Bauer TT, Schneider P, Neudecker J, Ruckert JC, Szymanski K *et al*: **Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung.** *J Infect Dis* 2012, **206**(11):1685-1694.
33. Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC: **Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion.** *Nature* 1994, **371**(6492):37-43.
34. Skehel JJ, Bayley PM, Brown EB, Martin SR, Waterfield MD, White JM, Wilson IA, Wiley DC: **Changes in the Conformation of Influenza-Virus Hemagglutinin at the Ph Optimum of Virus-Mediated Membrane-Fusion.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1982, **79**(4):968-972.
35. Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA: **Influenza-Virus M2 Protein Has Ion Channel Activity.** *Cell* 1992, **69**(3):517-528.
36. Cros JF, Palese P: **Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses.** *Virus Res* 2003, **95**(1-2):3-12.
37. O'Neill RE, Jaskunas R, Blobel G, Palese P, Moroianu J: **Nuclear Import of Influenza-Virus Rna Can Be Mediated by Viral Nucleoprotein and Transport Factors Required for Protein Import.** *Journal of Biological Chemistry* 1995, **270**(39):22701-22704.
38. Bui M, Wills EG, Helenius A, Whittaker GR: **Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins.** *Journal of Virology* 2000, **74**(4):1781-1786.

39. Whittaker GR: **Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine.** *Expert Rev Mol Med* 2001, **2001**:1-13.
40. Kuiken T, Taubenberger JK: **Pathology of human influenza revisited.** *Vaccine* 2008, **26 Suppl 4**:D59-66.
41. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA: **The acute respiratory distress syndrome.** *J Clin Invest* 2012, **122**(8):2731-2740.
42. Short KR, Kroeze E, Fouchier RAM, Kuiken T: **Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome.** *Lancet Infect Dis* 2014, **14**(1):57-69.
43. Bauer TT, Ewig S, Rodloff AC, Muller EE: **Acute respiratory distress syndrome and pneumonia: A comprehensive review of clinical data.** *Clinical Infectious Diseases* 2006, **43**(6):748-756.
44. Chotpitayasunondh T, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, Chunsuthiwat S, Sawanpanyalert P, Kijphati R, Lochindarat S, Srisan P, Suwan P, Osotthanakorn Y *et al*: **Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**(2):201-209.
45. Investigators AI, Webb SA, Pettila V, Seppelt I, Bellomo R, Bailey M, Cooper DJ, Cretikos M, Davies AR, Finfer S *et al*: **Critical care services and 2009 H1N1 influenza in Australia and New Zealand.** *N Engl J Med* 2009, **361**(20):1925-1934.
46. Mizgerd JP: **Acute lower respiratory tract infection.** *N Engl J Med* 2008, **358**(7):716-727.
47. Mason RJ: **Biology of alveolar type II cells.** *Respirology* 2006, **11 Suppl**:S12-15.
48. Brandes M, Klauschen F, Kuchen S, Germain RN: **A systems analysis identifies a feedforward inflammatory circuit leading to lethal influenza infection.** *Cell* 2013, **154**(1):197-212.

49. Herold S, Becker C, Ridge KM, Budinger GR: **Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment.** *Eur Respir J* 2015, **45**(5):1463-1478.
50. Gao R, Bhatnagar J, Blau DM, Greer P, Rollin DC, Denison AM, DeLeon-Carnes M, Shieh WJ, Sambhara S, Tumpey TM *et al*: **Cytokine and chemokine profiles in lung tissues from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1): role of the host immune response in pathogenesis.** *Am J Pathol* 2013, **183**(4):1258-1268.
51. Herold S, Ludwig S, Pleschka S, Wolff T: **Apoptosis signaling in influenza virus propagation, innate host defense, and lung injury.** *Journal of Leukocyte Biology* 2012, **92**(1):75-82.
52. Duchon MR: **Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology.** *Mol Aspects Med* 2004, **25**(4):365-451.
53. Kuhlbrandt W: **Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes.** *BMC Biol* 2015, **13**:89.
54. Anand SK, Tikoo SK: **Viruses as modulators of mitochondrial functions.** *Adv Virol* 2013, **2013**:738794.
55. Detmer SA, Chan DC: **Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**(11):870-879.
56. Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttorp N: **Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction.** *Respir Res* 2006, **7**:97.
57. Akira S: **Pathogen recognition by innate immunity and its signaling.** *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009, **85**(4):143-156.
58. West AP, Shadel GS, Ghosh S: **Mitochondria in innate immune responses.** *Nat Rev Immunol* 2011, **11**(6):389-402.

59. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ: **Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3.** *Cell* 2005, **122**(5):669-682.
60. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB: **VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling.** *Mol Cell* 2005, **19**(6):727-740.
61. Mills EL, Kelly B, O'Neill LAJ: **Mitochondria are the powerhouses of immunity.** *Nat Immunol* 2017, **18**(5):488-498.
62. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ *et al*: **Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses.** *Nature* 2006, **441**(7089):101-105.
63. Loo YM, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, Akira S, Gill MA, Garcia-Sastre A, Katze MG *et al*: **Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity.** *J Virol* 2008, **82**(1):335-345.
64. Liedmann S, Hrincius ER, Guy C, Anhlan D, Dierkes R, Carter R, Wu G, Staeheli P, Green DR, Wolff T *et al*: **Viral suppressors of the RIG-I-mediated interferon response are pre-packaged in influenza virions.** *Nature Communications* 2014, **5**.
65. Killip MJ, Smith M, Jackson D, Randall RE: **Activation of the interferon induction cascade by influenza A viruses requires viral RNA synthesis and nuclear export.** *J Virol* 2014, **88**(8):3942-3952.
66. Cloonan SM, Choi AM: **Mitochondria: commanders of innate immunity and disease?** *Curr Opin Immunol* 2012, **24**(1):32-40.
67. Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, Vandenabeele P: **Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation.** *Trends Immunol* 2011, **32**(4):157-164.
68. Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ: **Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase.** *Shock* 2010, **34**(1):55-59.

69. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ: **Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury.** *Nature* 2010, **464**(7285):104-107.
70. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW *et al*: **Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018.** *Cell Death Differ* 2018, **25**(3):486-541.
71. Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A: **Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks.** *Nat Immunol* 2009, **10**(4):348-355.
72. Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G: **Mitochondrial control of cellular life, stress, and death.** *Circ Res* 2012, **111**(9):1198-1207.
73. Happo L, Strasser A, Cory S: **BH3-only proteins in apoptosis at a glance.** *J Cell Sci* 2012, **125**(Pt 5):1081-1087.
74. Youle RJ, Strasser A: **The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**(1):47-59.
75. Hrdinka M, Yabal M: **Inhibitor of apoptosis proteins in human health and disease.** *Genes Immun* 2019, **20**(8):641-650.
76. Silke J, Meier P: **Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013, **5**(2).
77. Scott FL, Denault JB, Riedl SJ, Shin H, Renatus M, Salvesen GS: **XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs.** *Embo j* 2005, **24**(3):645-655.
78. Bratton SB, Salvesen GS: **Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome.** *J Cell Sci* 2010, **123**(Pt 19):3209-3214.
79. Ludwig S, Pleschka S, Wolff T: **A fatal relationship - Influenza virus interactions with the host cell.** *Viral Immunology* 1999, **12**(3):175-196.

80. Ludwig S, Pleschka S, Planz O, Wolff T: **Ringling the alarm bells: signalling and apoptosis in influenza virus infected cells.** *Cell Microbiol* 2006, **8**(3):375-386.
81. Atkin-Smith GK, Duan M, Chen W, Poon IKH: **The induction and consequences of Influenza A virus-induced cell death.** *Cell Death Dis* 2018, **9**(10):1002.
82. Fujikura D, Miyazaki T: **Programmed Cell Death in the Pathogenesis of Influenza.** *Int J Mol Sci* 2018, **19**(7).
83. Olsen CW, Kehren JC, DybdahlSissoko NR, Hinshaw VS: **bcl-2 alters influenza virus yield, spread, and hemagglutinin glycosylation.** *Journal of Virology* 1996, **70**(1):663-666.
84. Fujimoto I, Takizawa T, Ohba Y, Nakanishi Y: **Co-expression of Fas and Fas-ligand on the surface of influenza virus-infected cells.** *Cell Death Differ* 1998, **5**(5):426-431.
85. Lowy RJ: **Influenza virus induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms.** *Int Rev Immunol* 2003, **22**(5-6):425-449.
86. McLean JE, Datan E, Matassov D, Zakeri ZF: **Lack of Bax prevents influenza A virus-induced apoptosis and causes diminished viral replication.** *J Virol* 2009, **83**(16):8233-8246.
87. Tran AT, Cortens JP, Du Q, Wilkins JA, Coombs KM: **Influenza virus induces apoptosis via BAD-mediated mitochondrial dysregulation.** *J Virol* 2013, **87**(2):1049-1060.
88. Schultz-Cherry S, Hinshaw VS: **Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta.** *J Virol* 1996, **70**(12):8624-8629.
89. Tripathi S, Batra J, Cao W, Sharma K, Patel JR, Ranjan P, Kumar A, Katz JM, Cox NJ, Lal RB *et al*: **Influenza A virus nucleoprotein induces apoptosis in human airway epithelial cells: implications of a novel interaction between nucleoprotein and host protein Clusterin.** *Cell Death & Disease* 2013, **4**.
90. Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Bennink JR, Yewdell JW: **The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted**

- basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function.** *Journal of Virology* 2003, **77**(13):7214-7224.
91. Mayank AK, Sharma S, Nailwal H, Lal SK: **Nucleoprotein of influenza A virus negatively impacts antiapoptotic protein API5 to enhance E2F1-dependent apoptosis and virus replication.** *Cell Death & Disease* 2015, **6**.
92. Nailwal H, Sharma S, Mayank AK, Lal SK: **The nucleoprotein of influenza A virus induces p53 signaling and apoptosis via attenuation of host ubiquitin ligase RNF43.** *Cell Death & Disease* 2015, **6**.
93. Gannage M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Ramer PC, Lee M, Strowig T, Arrey F, Conenello G *et al*: **Matrix Protein 2 of Influenza A Virus Blocks Autophagosome Fusion with Lysosomes.** *Cell Host & Microbe* 2009, **6**(4):367-380.
94. Ehrhardt C, Wolff T, Pleschka S, Planz O, Beermann W, Bode JG, Schmolke M, Ludwig S: **Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses.** *J Virol* 2007, **81**(7):3058-3067.
95. Schultz-Cherry S, Dybdahl-Sissoko N, Neumann G, Kawaoka Y, Hinshaw VS: **Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells.** *Journal of Virology* 2001, **75**(17):7875-7881.
96. Jia D, Rahbar R, Chan RW, Lee SM, Chan MC, Wang BX, Baker DP, Sun B, Peiris JS, Nicholls JM *et al*: **Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling.** *PLoS One* 2010, **5**(11):e13927.
97. Zhirnov OP, Konakova TE, Wolff T, Klenk HD: **NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis.** *J Virol* 2002, **76**(4):1617-1625.
98. Ehrhardt C, Ludwig S: **A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway.** *Cell Microbiol* 2009, **11**(6):863-871.
99. Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao XY, Wang R, Palese P: **Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1.** *Plos Pathogens* 2005, **1**(1):40-54.

100. Chanturiya AN, Basanez G, Schubert U, Henklein P, Yewdell JW, Zimmerberg J: **PB1-F2, an influenza A virus-encoded proapoptotic mitochondrial protein, creates variably sized pores in planar lipid membranes.** *J Virol* 2004, **78**(12):6304-6312.
101. Wurzer WJ, Planz O, Ehrhardt C, Giner M, Silberzahn T, Pleschka S, Ludwig S: **Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation.** *Embo Journal* 2003, **22**(11):2717-2728.
102. Imamura H, Nhat KP, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai T, Noji H: **Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(37):15651-15656.
103. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP: **In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.** *J Natl Cancer Inst* 1973, **51**(5):1417-1423.
104. Madin SH, Darby NB: **Established Kidney Cell Lines of Normal Adult Bovine and Ovine Origin.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1958, **98**(3):574-576.
105. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951, **193**(1):265-275.
106. Mulisch M, Aescht E, Romeis B: **Romeis Mikroskopische Technik Maria Mulisch ... (Hrsg.). Mit Beitr. von Erna Aescht,** 19. Aufl. edn. Berlin [u.a.]: Berlin u.a. : Springer Spektrum; 2015.
107. Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper SA, Shaw M, Uyeki TM, Zaki SR, Hayden FG, Hui DS, Kettner JD *et al*: **Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection.** *The New England journal of medicine* 2010, **362**(18):1708-1719.
108. Downey J, Pernet E, Coulombe F, Divangahi M: **Dissecting host cell death programs in the pathogenesis of influenza.** *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2018, **20**(9-10):560-569.

109. Iwai A, Shiozaki T, Miyazaki T: **Relevance of signaling molecules for apoptosis induction on influenza A virus replication.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013, **441**(3):531-537.
110. Hinshaw VS, Olsen CW, Dybdahl-Sissoko N, Evans D: **Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses.** *J Virol* 1994, **68**(6):3667-3673.
111. Mori I, Komatsu T, Takeuchi K, Nakakuki K, Sudo M, Kimura Y: **In-Vivo Induction of Apoptosis by Influenza-Virus.** *Journal of General Virology* 1995, **76**:2869-2873.
112. Takizawa T, Matsukawa S, Higuchi Y, Nakamura S, Nakanishi Y, Fukuda R: **Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells.** *J Gen Virol* 1993, **74 (Pt 11)**:2347-2355.
113. Uprasertkul M, Kitphati R, Puthavathana P, Kriwong R, Kongchanagul A, Ungchusak K, Angkasekwinai S, Chokephaibulkit K, Srisook K, Vanprapar N *et al*: **Apoptosis and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) virus in humans.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**(5):708-712.
114. Liu HB, Golebiewski L, Dow EC, Krug RM, Javier RT, Rice AP: **The ESEV PDZ-Binding Motif of the Avian Influenza A Virus NS1 Protein Protects Infected Cells from Apoptosis by Directly Targeting Scribble.** *Journal of Virology* 2010, **84**(21):11164-11174.
115. Rodrigue-Gervais IG, Labbe K, Dagenais M, Dupaul-Chicoine J, Champagne C, Morizot A, Skeldon A, Brincks EL, Vidal SM, Griffith TS *et al*: **Cellular inhibitor of apoptosis protein cIAP2 protects against pulmonary tissue necrosis during influenza virus infection to promote host survival.** *Cell host & microbe* 2014, **15**(1):23-35.
116. Muhlbauer D, Dzieciolowski J, Hardt M, Hocke A, Schierhorn KL, Mostafa A, Muller C, Wisskirchen C, Herold S, Wolff T *et al*: **Influenza virus-induced caspase-dependent enlargement of nuclear pores promotes nuclear export of viral ribonucleoprotein complexes.** *J Virol* 2015, **89**(11):6009-6021.

117. Zhirnov OP, Konakova TE, Garten W, Klenk H: **Caspase-dependent N-terminal cleavage of influenza virus nucleocapsid protein in infected cells.** *J Virol* 1999, **73**(12):10158-10163.
118. Ludwig S, Planz O: **Influenza viruses and the NF-kappaB signaling pathway - towards a novel concept of antiviral therapy.** *Biol Chem* 2008, **389**(10):1307-1312.
119. Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Berberich-Siebelt F, Wolff T, Walczak H, Planz O, Ludwig S: **NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation.** *J Biol Chem* 2004, **279**(30):30931-30937.
120. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C: **Mitochondrial membrane permeabilization in cell death.** *Physiol Rev* 2007, **87**(1):99-163.
121. Barber GN: **Host defense, viruses and apoptosis.** *Cell Death Differ* 2001, **8**(2):113-126.
122. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR: **Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis.** *Science* 2004, **303**(5660):1010-1014.
123. Munoz-Fontela C, Pazos M, Delgado I, Murk W, Mungamuri SK, Lee SW, Garcia-Sastre A, Moran TM, Aaronson SA: **p53 Serves as a Host Antiviral Factor That Enhances Innate and Adaptive Immune Responses to Influenza A Virus.** *Journal of Immunology* 2011, **187**(12):6428-6436.
124. Shen Y, Wang X, Guo L, Qiu Y, Li X, Yu H, Xiang H, Tong G, Ma Z: **Influenza A virus induces p53 accumulation in a biphasic pattern.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **382**(2):331-335.
125. Turpin E, Luke K, Jones J, Tumpey T, Konan K, Schultz-Cherry S: **Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication.** *J Virol* 2005, **79**(14):8802-8811.

126. Zhirnov OP, Klenk HD: **Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling.** *Apoptosis* 2007, **12**(8):1419-1432.
127. Lu X, Masic A, Li Y, Shin Y, Liu Q, Zhou Y: **The PI3K/Akt pathway inhibits influenza A virus-induced Bax-mediated apoptosis by negatively regulating the JNK pathway via ASK1.** *J Gen Virol* 2010, **91**(Pt 6):1439-1449.
128. Ludwig S, Ehrhardt C, Neumeier ER, Kracht M, Rapp UR, Pleschka S: **Influenza virus-induced AP-1-dependent gene expression requires activation of the JNK signaling pathway.** *J Biol Chem* 2001, **276**(24):10990-10998.
129. Kim BJ, Ryu SW, Song BJ: **JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells.** *J Biol Chem* 2006, **281**(30):21256-21265.
130. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
131. Cloonan SM, Choi AM: **Mitochondria in lung disease.** *J Clin Invest* 2016, **126**(3):809-820.
132. Khan M, Syed GH, Kim SJ, Siddiqui A: **Mitochondrial dynamics and viral infections: A close nexus.** *Biochim Biophys Acta* 2015, **1853**(10 Pt B):2822-2833.
133. Chan MC, Chan RW, Yu WC, Ho CC, Yuen KM, Fong JH, Tang LL, Lai WW, Lo AC, Chui WH *et al*: **Tropism and innate host responses of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus in ex vivo and in vitro cultures of human conjunctiva and respiratory tract.** *Am J Pathol* 2010, **176**(4):1828-1840.
134. Massaro GD, Gail DB, Massaro D: **Lung oxygen consumption and mitochondria of alveolar epithelial and endothelial cells.** *J Appl Physiol* 1975, **38**(4):588-592.
135. Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, Amselem S, Clement A: **Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis.** *Int J Biochem Cell Biol* 2013, **45**(11):2568-2573.

136. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G: **Mitochondria: master regulators of danger signalling.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012, **13**(12):780-788.
137. McAuley JL, Hornung F, Boyd KL, Smith AM, McKeon R, Bennink J, Yewdell JW, McCullers JA: **Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia.** *Cell Host Microbe* 2007, **2**(4):240-249.
138. Yoshizumi T, Ichinohe T, Sasaki O, Otera H, Kawabata SI, Mihara K, Koshiha T: **Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity.** *Nature Communications* 2014, **5**.
139. Mazur I, Anhlán D, Mitzner D, Wixler L, Schubert U, Ludwig S: **The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein.** *Cell Microbiol* 2008, **10**(5):1140-1152.
140. Koshiha T, Yasukawa K, Yanagi Y, Kawabata S: **Mitochondrial Membrane Potential Is Required for MAVS-Mediated Antiviral Signaling.** *Science Signaling* 2011, **4**(158).
141. Grosse L, Wurm CA, Bruser C, Neumann D, Jans DC, Jakobs S: **Bax assembles into large ring-like structures remodeling the mitochondrial outer membrane in apoptosis.** *Embo Journal* 2016, **35**(4):402-413.
142. Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ: **Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis.** *J Cell Biol* 2001, **153**(6):1265-1276.
143. Ritter JB, Wahl AS, Freund S, Genzel Y, Reichl U: **Metabolic effects of influenza virus infection in cultured animal cells: Intra- and extracellular metabolite profiling.** *BMC Syst Biol* 2010, **4**:61.
144. Ackermann WW, Johnson RB: **Some Energy Relations in a Host-Virus System.** *Journal of Experimental Medicine* 1953, **97**(3):315-322.
145. Ackermann WW, Klernschmidt E: **Concerning the relation of the Krebs cycle to virus propagation.** *J Biol Chem* 1951, **189**(1):421-428.

146. Klumpp K, Ford MJ, Ruigrok RWH: **Variation in ATP requirement during influenza virus transcription.** *Journal of General Virology* 1998, **79**:1033-1045.
147. Hui EK, Nayak DP: **Role of ATP in influenza virus budding.** *Virology* 2001, **290**(2):329-341.
148. Carr SM, Carnero E, Garcia-Sastre A, Brownlee GG, Fodor E: **Characterization of a mitochondrial-targeting signal in the PB2 protein of influenza viruses.** *Virology* 2006, **344**(2):492-508.
149. Chintagari NR, Mishra A, Su L, Wang Y, Ayalew S, Hartson SD, Liu L: **Vacuolar ATPase regulates surfactant secretion in rat alveolar type II cells by modulating lamellar body calcium.** *PLoS One* 2010, **5**(2):e9228.
150. Kim SJ, Khan M, Quan J, Till A, Subramani S, Siddiqui A: **Hepatitis B virus disrupts mitochondrial dynamics: induces fission and mitophagy to attenuate apoptosis.** *PLoS Pathog* 2013, **9**(12):e1003722.
151. Kim SJ, Syed GH, Khan M, Chiu WW, Sohail MA, Gish RG, Siddiqui A: **Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**(17):6413-6418.
152. Castanier C, Garcin D, Vazquez A, Arnoult D: **Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway.** *EMBO Rep* 2010, **11**(2):133-138.
153. Fukuyama S, Katsura H, Zhao D, Ozawa M, Ando T, Shoemaker JE, Ishikawa I, Yamada S, Neumann G, Watanabe S *et al*: **Multi-spectral fluorescent reporter influenza viruses (Color-flu) as powerful tools for in vivo studies.** *Nat Commun* 2015, **6**:6600.
154. Ueki H, Wang IH, Fukuyama S, Katsura H, da Silva Lopes TJ, Neumann G, Kawaoka Y: **In vivo imaging of the pathophysiological changes and neutrophil dynamics in influenza virus-infected mouse lungs.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018, **115**(28):E6622-e6629.

155. Bain J, Gow NA, Erwig LP: **Novel insights into host-fungal pathogen interactions derived from live-cell imaging.** *Semin Immunopathol* 2015, **37**(2):131-139.
156. Waldchen S, Lehmann J, Klein T, van de Linde S, Sauer M: **Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy.** *Sci Rep* 2015, **5**:15348.
157. Magidson V, Khodjakov A: **Circumventing photodamage in live-cell microscopy.** *Methods Cell Biol* 2013, **114**:545-560.
158. Hocke AC, Suttorp N, Hippenstiel S: **Human lung ex vivo infection models.** *Cell Tissue Res* 2017, **367**(3):511-524.
159. Corbiere V, Dirix V, Norrenberg S, Cappello M, Remmelink M, Mascart F: **Phenotypic characteristics of human type II alveolar epithelial cells suitable for antigen presentation to T lymphocytes.** *Respir Res* 2011, **12**:15.
160. Mason RJ, Williams MC: **Phospholipid composition and ultrastructure of A549 cells and other cultured pulmonary epithelial cells of presumed type II cell origin.** *Biochim Biophys Acta* 1980, **617**(1):36-50.
161. Swain RJ, Kemp SJ, Goldstraw P, Tetley TD, Steyens MM: **Assessment of Cell Line Models of Primary Human Cells by Raman Spectral Phenotyping.** *Biophysical Journal* 2010, **98**(8):1703-1711.
162. Thangavel RR, Bouvier NM: **Animal models for influenza virus pathogenesis, transmission, and immunology.** *Journal of Immunological Methods* 2014, **410**:60-79.
163. Irvin CG, Bates JH: **Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size.** *Respiratory Research* 2003, **4**(4).
164. Mestas J, Hughes CC: **Of mice and not men: differences between mouse and human immunology.** *J Immunol* 2004, **172**(5):2731-2738.
165. Zhang J, Zhang Z, Fan X, Liu Y, Wang J, Zheng Z, Chen R, Wang P, Song W, Chen H *et al*: **2009 pandemic H1N1 influenza virus replicates in human lung tissues.** *J Infect Dis* 2010, **201**(10):1522-1526.

166. Peiris JS, Tu WW, Yen HL: **A novel H1N1 virus causes the first pandemic of the 21st century.** *Eur J Immunol* 2009, **39**(11):2946-2954.
167. Berg J, Zscheppang K, Fatykhova D, Tonnies M, Bauer TT, Schneider P, Neudecker J, Ruckert JC, Eggeling S, Schimek M *et al*: **Tyk2 as a target for immune regulation in human viral/bacterial pneumonia.** *European Respiratory Journal* 2017, **50**(1).
168. Schrader T, Dudek SE, Schreiber A, Ehrhardt C, Planz O, Ludwig S: **The clinically approved MEK inhibitor Trametinib efficiently blocks influenza A virus propagation and cytokine expression.** *Antiviral Research* 2018, **157**:80-92.
169. Loregian A, Mercorelli B, Nannetti G, Compagnin C, Palu G: **Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches.** *Cell Mol Life Sci* 2014, **71**(19):3659-3683.
170. Ludwig S: **Disruption of virus-host cell interactions and cell signaling pathways as an anti-viral approach against influenza virus infections.** *Biological Chemistry* 2011, **392**(10):837-847.
171. Pleschka S, Wolff T, Ehrhardt C, Hobom G, Planz O, Rapp UR, Ludwig S: **Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade.** *Nature Cell Biology* 2001, **3**(3):301-305.
172. Droebner K, Pleschka S, Ludwig S, Planz O: **Antiviral activity of the MEK-inhibitor U0126 against pandemic H1N1v and highly pathogenic avian influenza virus in vitro and in vivo.** *Antiviral Res* 2011, **92**(2):195-203.
173. Haasbach E, Hartmayer C, Planz O: **Combination of MEK inhibitors and oseltamivir leads to synergistic antiviral effects after influenza A virus infection in vitro.** *Antiviral Res* 2013, **98**(2):319-324.
174. Mazur I, Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Puthavathana P, Silberzahn T, Wolff T, Planz O, Ludwig S: **Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity.** *Cell Microbiol* 2007, **9**(7):1683-1694.

Literaturverzeichnis

175. König R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann HH, Bhattacharyya S, Alamares JG, Tscherne DM, Ortigoza MB, Liang Y *et al*: **Human host factors required for influenza virus replication**. *Nature* 2010, **463**(7282):813-817.
176. Pohl MO, von Recum-Knepper J, Rodriguez-Frandsen A, Lanz C, Yanguéz E, Soonthornvacharin S, Wolff T, Chanda SK, Stertz S: **Identification of Polo-like kinases as potential novel drug targets for influenza A virus**. *Sci Rep* 2017, **7**(1):8629.
177. Watanabe T, Kawaoka Y: **Influenza virus-host interactomes as a basis for antiviral drug development**. *Current Opinion in Virology* 2015, **14**:71-78.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Eva Pappe, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Rolle der mitochondrialen (Dys-)funktion im Apoptoseprozess humaner Alveolarepithelzellen während der Infektion mit Influenza-A-Viren“, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Lebenslauf

Publikationen

Vorträge:

- 1) Eva Pappe, Andreas Nerlich, Stefan Hippenstiel, Andreas Hocke (2016)
Role of mitochondria for innate immune activation in pneumonia.
SFB-TR 84 "Innate Immunity of the Lung: Mechanisms of Pathogen Attack and Host Defence in Pneumonia", Retreat
Schloss Rauschholzhausen 26.-28.04.2016

- 2) Eva Pappe, Maren Mieth, Jens Ruckert, Jens Neudecker, Torsten Bauer, Mario Tonnies, Norbert Suttorp, Torsten Wolff, Stefan Hippenstiel, Andreas Hocke, Andreas Nerlich (2016)
Role of Mitochondrial (Dys-)Function for Cell Death and Immune Activation in Influenza and Pneumococcal Infection
American Thoracic Society International Conference, San Francisco,
13-18.05.2016 [Publication Page: A4306]

- 3) Eva Pappe, Andreas Nerlich, Maren Mieth, Katja Zscheppang, Diana Fatykhova, Katharina Hellwig, Thorsten Wolff, Norbert Suttorp, Stefan Hippenstiel, Andreas Hocke. (2016)
Role of mitochondrial (dys-)function for cell death and immune activation in influenza infection
Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie, Pathophysiologie/ Aerosolmedizin sowie Infektiologie und Tuberkulose in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Hannover, 2016

Poster:

- 1) Eva Pappe, Andreas Nerlich, Maren Mieth, Katja Zscheppang, Diana Fatykhova, Katharina Hellwig, Thorsten Wolff, Norbert Suttorp, Stefan Hippenstiel, Andreas Hocke. (2016)
Role of mitochondrial (dys-)function for cell death and immune activation in influenza infection
2nd International Conference „Innate immunity of the lung – Improving pneumonia outcome”, SFB-TR48, Berlin, 15-17.09.2016

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Suttorp für die Möglichkeit bedanken meine Dissertation in der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie an der Charité zu Berlin anfertigen zu können.

Prof. Dr. Andreas Hocke und Prof. Dr. Stefan Hippenstiel danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas sowie exzellenten Betreuung während der Promotion. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Andreas Hocke, der mich als Mentor sowohl beim Anfertigen dieser Arbeit als auch bei meinem weiteren Berufsweg sehr engagiert betreut hat. Seine sorgfältige Anleitung, die wertvollen Ratschläge und zahlreichen Gespräche auf intellektueller und persönlicher Ebene bestärkten meinen wissenschaftlichen Werdegang.

Dr. Andreas Nerlich und Dr. Maren Mieth danke ich für Ihre intensive und gründliche Einarbeitung im Labor sowie ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft. Dr. Andreas Nehrlich danke ich insbesondere für Hilfe bei der digitalen Bildanalyse. Auch das tolle Arbeitsklima, der Zusammenhalt des Laborteams sowie viele aufmunternden Gespräche haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Daher möchte ich mich ganz herzlich beim gesamten Laborteam und insbesondere bei Dr. Katja Hönzke, Katharina Hellwig und Dr. Diana Fatykhova für Ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft bedanken.

Weiterhin möchte ich den kooperierenden Thoraxchirurgen für die kontinuierliche Bereitstellung von humanem Lungengewebe danken. Der Arbeitsgruppe von PD. Dr. Thorsten Wolff danke ich für die Bereitstellung der verschiedenen Influenza-A-Virus Stämme.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, Gero und Mechthild Pappe, sowie meiner Schwester Johanna Pappe für ihre liebevolle Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit. Ohne ihren notwendigen Rückhalt in schweren Zeiten, ihre ständige Motivation und die Möglichkeit stets nach „Hause“ zu kommen, hätte ich das Projekt Promotion nicht abschließen können. Meiner guten Freundin, Ulrike Krause, danke ich für die mehrfache und sehr gründliche Korrektur der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt außerdem Max Schlüter und meinen Freunden, die mich auf meinen bisherigen Lebensweg begleitet und stets an mich geglaubt haben.