

**Untersuchungen zum Einfluss des Rötelvirus auf die
MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK, den NF- κ B-
Signalweg sowie die Apoptose in immortalisierten
Zelllinien sowie in primären Endothelzellen**

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Paul Rennert

Berlin

2018

Die in dieser Dissertation beschriebenen Experimente wurden vom September 2014 bis September 2018 am Robert Koch - Institut unter der Leitung von Prof. Dr. Annette Mankertz durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Annette Mankertz

2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Wahl

Disputation am 07.02.2020

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Röteln	1
1.1.1 Klinik - Postnatale Infektion	2
1.1.2 Klinik - Pränatale Infektion	3
1.1.3 Pathogenese	4
1.1.4 Epidemiologie	5
1.2 Das Rötelnvirus	6
1.2.1 Klassifizierung.....	6
1.2.2 Aufbau	7
1.2.3 Replikationszyklus	9
1.2.4 Einfluss auf die Wirtszelle.....	14
1.3 MAPK-Signalwege	17
1.3.1 Allgemeine Charakterisierung	17
1.3.2 ERK1/2	19
1.3.3 p38	21
1.3.4 JNK	23
1.4 NF-κB-Signalweg	24
1.4.1 Allgemeine Charakterisierung	24
1.4.2 Kanonischer NF- κ B-Signalweg	26
1.5 Zielsetzung	29
2. Material	32
2.1 Chemikalien	32
2.2 Medien	33
2.3 Eukaryotische Zellen	33

Inhaltsverzeichnis

2.3.1	Zelllinien	33
2.3.2	Primäre Zellen	34
2.4	Viren	34
2.5	Inhibitoren	34
2.6	Plasmide	34
2.7	Puffer	35
2.7.1	Fertige Puffer	35
2.7.2	Angesetzte Puffer	35
2.8	Enzyme.....	36
2.9	Proteinmarker.....	36
2.10	Antikörper	37
2.11	Kits.....	38
2.12	Geräte.....	38
2.13	Verbrauchsmaterialien	39
2.14	Software und Internetseiten	40
3.	Methoden	41
3.1	Zellbiologische Methoden.....	41
3.1.1	Auftauen von eukaryotischen Zellen	41
3.1.2	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	41
3.1.3	Einfrieren von eukaryotischen Zellen	42
3.1.4	Transfektion von eukaryotischen Zelllinien	43
3.1.5	Anzucht von Rötelnviren.....	44
3.1.6	Ankonzentrierung von Rötelnviren	45
3.1.7	Virusinfektion von eukaryotischen Zellen.....	46
3.1.8	Lyse von eukaryotischen Zellen.....	47

3.1.9	Zellviabilitätstest.....	47
3.2	Proteinbiochemische Methoden.....	48
3.2.1	BCA-Assay.....	48
3.2.2	SDS-PAGE.....	49
3.2.3	Western Blot.....	52
3.2.4	Immuncolorimetrischer Assay.....	55
3.2.5	Caspase-Glo 3/7 Assay	57
3.2.6	Reportergen Assay.....	58
4.	Ergebnisse	60
4.1	Charakterisierung der RV-Infektion in immortalisierten Zelllinien.....	60
4.1.1	Einfluss des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK.....	60
4.1.2	Einfluss des RV auf den kanonischen NF- κ B-Signalweg.....	66
4.1.3	Einfluss des RV auf die Apoptose	72
4.2	Charakterisierung der RV-induzierten ERK1/2-Aktivierung in A549-Zellen.....	76
4.2.1	Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die Phosphorylierung von ERK1/2 ..	76
4.2.2	Einfluss der ERK1/2-Inhibition auf die Zellviabilität	78
4.2.3	Einfluss der ERK1/2-Inhibition auf das Wachstum des RV	80
4.2.4	Einfluss der ERK1/2-Inhibition auf die RV-induzierte Apoptose	82
4.3	Charakterisierung der RV-induzierten p38-Aktivierung in A549-Zellen	87
4.3.1	Einfluss des p38-Inhibitors SB202190 auf die Expression von COX-2 und die Phosphorylierung von ATF2	87
4.3.2	Einfluss der p38-Inhibition auf die Zellviabilität.....	89
4.3.3	Einfluss der p38-Inhibition auf das Wachstum des RV.....	91
4.3.4	Einfluss der p38-Inhibition auf die RV-induzierte Apoptose.....	94
4.4	Charakterisierung der RV-induzierten JNK-Aktivierung in A549-Zellen	98

4.4.1	Einfluss des JNK-Inhibitors SP600125 auf die Phosphorylierung von c-Jun	98
4.4.2	Einfluss der JNK-Inhibition auf die Zellviabilität	100
4.4.3	Einfluss der JNK-Inhibition auf das Wachstum des RV	102
4.4.4	Einfluss der JNK-Inhibition auf die RV-induzierte Apoptose	104
4.5	Charakterisierung der RV-induzierten NF-κB-Aktivierung in A549-Zellen	110
4.5.1	Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die Aktivität eines NF- κ B-abhängigen Reportergens	110
4.5.2	Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf die Zellviabilität	112
4.5.3	Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf das Wachstum des RV	114
4.5.4	Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf die RV-induzierte Apoptose	117
4.6	Charakterisierung der RV-Infektion in primären Endothelzellen	121
4.6.1	Einfluss des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK	121
4.6.2	Einfluss des RV auf den kanonischen NF- κ B-Signalweg	125
4.6.3	Einfluss des RV auf die Apoptose	129
4.6.4	Einfluss des RV auf NF- κ B-induzierte Apoptose-Inhibitoren in HUVEC	133
4.7	Charakterisierung der basalen ERK1/2-Aktivität in HUVEC	135
4.7.1	Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die basale Phosphorylierung von ERK1/2	135
4.7.2	Einfluss der ERK1/2-Inhibition auf die Zellviabilität	137
4.7.3	Einfluss der ERK1/2-Inhibition auf das Wachstum des RV	139
4.7.4	Einfluss der ERK1/2-Inhibition auf die RV-induzierte Caspase-3/7-Aktivität	142
4.8	Charakterisierung der RV-induzierten NF-κB-Aktivierung in HUVEC	143
4.8.1	Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die Morphologie der HUVEC	144
4.8.2	Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf die Zellviabilität	146
4.8.3	Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf das Wachstum des RV	148
4.8.4	Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf die RV-induzierte Caspase-3/7-Aktivität	150

4.9	Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	153
5.	Diskussion	157
5.1	Auswirkung einer RV-Infektion in immortalisierten Zelllinien.....	157
5.1.1	Das RV induziert die Aktivierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK	157
5.1.2	Das RV aktiviert den kanonischen NF- κ B-Signalweg in A549-Zellen.....	159
5.1.3	Das RV leitet die Apoptose in A549-Zellen ein.....	160
5.2	Das RV induziert die Aktivierung des proliferativen ERK1/2-Signalwegs für eine erfolgreiche Replikation und die Hemmung der Apoptose in A549-Zellen.....	162
5.3	Die Aktivierung des p38-Signalwegs hemmt die RV-Replikation in A549-Zellen .	163
5.4	Der JNK-Signalweg ist entscheidend für die RV-Replikation und induziert die Apoptose in A549-Zellen	165
5.5	Der kanonische NF-κB-Signalweg ist entscheidend für die Replikation des RV und induziert die Apoptose in A549-Zellen	167
5.6	Auswirkung einer RV-Infektion in primären Endothelzellen.....	170
5.6.1	RV-HPV-77, aber nicht RV-Würzburg-12 aktiviert die MAPK p38 in HUVEC	170
5.6.2	Das RV aktiviert den kanonischen NF- κ B-Signalweg in HUVEC.....	171
5.6.3	Das RV leitet die Apoptose in HUVEC ein	172
5.6.4	RV-HPV-77, aber nicht RV-Würzburg-12 induziert die Expression von cIAP2 in HUVEC	173
5.7	Die basale ERK1/2-Phosphorylierung in den HUVEC ist entscheidend für die RV- Replikation und wirkt der RV-induzierten Apoptose entgegen	174
5.8	Der kanonische NF-κB-Signalweg ist entscheidend für die Replikation des RV und reguliert die Apoptose in den HUVEC.....	176
6.	Zusammenfassung	178

Inhaltsverzeichnis

7. Summary.....	181
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	184
Abkürzungsverzeichnis	190
Literaturverzeichnis	195
Eidesstattliche Erklärung	214

1. Einleitung

1.1 Röteln

Die Röteln, die im deutschen Sprachraum auch als *Rubeola* bzw. *Rubella* bekannt sind, sind eine ansteckende Infektionskrankheit, die durch das Rötelvirus (RV) ausgelöst werden und eine lebenslange Immunität bei den Betroffenen induzieren (Lambert *et al.*, 2015). Obwohl die Röteln zu den klassischen Kinderkrankheiten gehören, können sich auch Jugendliche und Erwachsene mit dem Erreger infizieren.

Erstmals wurde die Erkrankung *Rötheln* von verschiedenen deutschen Medizinern wie de Bergen und Orlow im 18. Jahrhundert beschrieben (Forbes, 1969). Die Anerkennung als eigenständige Krankheit, die sich unabhängig von Masern und Scharlach manifestiert, wurde jedoch erst von dem deutschen Mediziner Georg de Maton im Jahre 1814 vorgenommen (Wesselhoeft, 1947). Im Jahre 1938 konnten Hiro und Tasaka erstmals das Rötelvirus als Ursache für die Erkrankung dokumentieren (Forbes, 1969; Lee und Bowden, 2000). Die Ansicht, dass es sich bei Röteln ausschließlich um eine milde Krankheit von Kindern handelt, änderte sich im Jahre 1941, als der australische Augenarzt Sir Norman McAlister Gregg während eines Rötelnausbruchs in Australien eine große Anzahl von Neugeborenen mit angeborenem Katarakt (grauem Star) beobachtete. Er erkannte, dass eine Rötelninfektion in einer frühen Phase der Schwangerschaft kongenitale Defekte („Gregg-Syndrom“) zur Folge haben kann (Gregg, 1941). Im Jahre 1962 gelang es zwei unabhängigen Gruppen gleichzeitig das Rötelvirus in Zellkultur zu züchten (Parkman *et al.*, 1962; Weller und Neva, 1962). Diese Errungenschaft sowie die weltweite Rötelnepidemie von 1962 bis 1965 gaben den Anstoß einen Impfstoff zu entwickeln (Lee und Bowden, 2000). Im Jahre 1966 wurde der erste attenuierte Lebendimpfstoff HPV-77, *high passaged virus 77*, hergestellt (Parkman *et al.*, 1966). Drei Jahre später wurde dieser als erster Rötelnimpfstoff in den USA zugelassen (Lee und Bowden, 2000). Durch die Einführung weiterer RV-Impfstoffe sowie die Umsetzung globaler Impfprogramme konnte die Inzidenz von Röteln über die Jahrzehnte stetig verringert werden. Da der Mensch der einzig bekannte Wirt ist, der Impfstoff sicher sowie sehr effektiv ist und genaue diagnostische Verfahren existieren, kann das RV weltweit ausgerottet („Eradikation“) werden. Nichtsdestotrotz haben viele Länder die Rötelnimpfung

noch immer nicht in ihre nationalen Impfprogramme integriert, sodass die regionale sowie weltweite Elimination der Röteln noch andauert (Lambert *et al.*, 2015).

1.1.1 Klinik - Postnatale Infektion

Die postnatalen Röteln sind eine milde, relativ harmlose Erkrankung und verlaufen in etwa 20 bis 50 % der Fälle asymptomatisch (Best, 2007; Modrow *et al.*, 2010). Bei einer solchen RV-Infektion zeigen sich vor allem unspezifische Symptome wie generelles Unwohlsein, leichtes Fieber, Kopf- und Halsschmerzen, Husten, Konjunktivitis (Entzündung der Bindehaut), Lymphadenopathie (Anschwellen vor allem der subokzipitalen, postaurikulären und zervikalen Lymphknoten), aber auch ein nicht konfluierender, makulopapulöser (knotig-fleckiger) Ausschlag, der nach einer Inkubationszeit von etwa 14 Tagen erscheint (Lee und Bowden, 2000; Best, 2007). Das Exanthem entsteht zuerst im Gesicht, breitet sich über den Rumpf zu den Extremitäten aus und bleibt bis zu 3 Tage (Best, 2007).

Zu den häufigsten Komplikationen zählen Arthritiden und Arthralgien, an denen bis zu 70 % der postpubertären Frauen leiden (Tingle *et al.*, 1986; Best, 2007). Die Symptome halten für gewöhnlich 3 bis 4 Tage an, können aber auch bis zu einem Monat andauern (Best, 2007). Die Ausbildung zu einer chronischen Arthritis konnte bisher nicht bestätigt werden (Slater *et al.*, 1995; Banatvala und Brown, 2004). Zudem kann es häufig zur Entwicklung einer akuten Bronchitis oder Mittelohrentzündung kommen (Macdonald *et al.*, 1918; Sloyer *et al.*, 1977). Eine weitaus schwerwiegendere Komplikation ist die Thrombozytopenie (in 1 von 3.000 Fällen), durch die Purpura und Hämorrhagien entstehen können (Steen und Torp, 1956; Best, 2007). Außerdem kann es zu einer postinfektiösen Enzephalopathie (in 1 von 6.000 Fällen) oder Enzephalomyelitis kommen, die zu 20 % tödlich verlaufen (Kenny *et al.*, 1965; Lee und Bowden, 2000; Best, 2007; Modrow *et al.*, 2010). Eine überaus seltene, aber zumeist tödliche neurodegenerative Erkrankung ist die progressive Rötelnpanenzephalitis (PRP), die als späte Komplikation in der Kindheit auftreten kann (Abe *et al.*, 1983; Frey, 1997; Lee und Bowden, 2000). Weitere, ebenfalls seltene Komplikationen, die nach einer postnatalen Rötelninfektion am Herzen vorkommen können, sind die Myo- und Perikarditis (Fink *et al.*, 1987; Thanopoulos *et al.*, 1989). Außerdem wurde berichtet, dass Röteln auch eine stille Thyreoiditis auslösen kann, die meist schmerzlos ist und von selbst wieder verschwindet (Nakamura *et al.*, 1990).

1.1.2 Klinik - Pränatale Infektion

Die pränatalen Röteln verursachen im Vergleich mit den postnatalen Röteln hingegen schwere Schäden. Kommt es nämlich zur maternalen RV-Infektion, kann das Virus die Blut-Plazenta-Schranke überwinden und infiziert den sich entwickelnden Fetus (Banatvala und Brown, 2004). Wenn sich die Infektion in den ersten Monaten der Schwangerschaft ereignet, kann dies zum Abort, zur Frühgeburt oder zu Missbildungen am ungeborenen Kind führen (Banatvala und Brown, 2004; Modrow *et al.*, 2010). Dabei werden die kongenitalen Defekte als kongenitales Rötelsyndrom (CRS) zusammengefasst (Lambert *et al.*, 1965).

Das Risiko für Schäden am Fetus liegt im ersten Trimester der Schwangerschaft bei annähernd 100 %, nimmt zu Beginn des zweiten Trimesters bis auf 35 % ab und ist nach der 20. Schwangerschaftswoche bei weniger als 2 % (Ghidini und Lynch, 1993; Banatvala und Brown, 2004). Zu den klassischen Abnormalitäten des CRS zählen Defekte an Herz, Augen, Ohren und am zentralen Nervensystem. Es gibt jedoch diverse weitere Missbildungen, die ebenfalls auftreten können. Zu den vorübergehenden Manifestationen, die gewöhnlich nach ein paar Tagen oder Wochen wieder verschwinden, gehören ein geringes Geburtsgewicht, eine Hepatitis, Hepatosplenomegalie, Meningoenzephalitis, Lymphadenopathie, Myokarditis, thrombozytopenische Purpura und ein purpurfarbener Ausschlag (Banatvala und Brown, 2004; Best, 2007). Permanente Missbildungen umfassen Defekte am Herzen (z.B. persistierender *Ductus arteriosus*, Stenose/Hypoplasie der Pulmonalarterie und Ventrikelseptumdefekt), an den Augen (z.B. Katarakt, Glaukom, Hypoplasie der Iris, Mikrophthalmie und Retinopathie), an den Ohren (z.B. sensorineurale/zentrale Gehörlosigkeit) und am zentralen Nervensystem (z.B. Mikrozephalie, mentale/psychomotorische Retardierung und Sprachstörungen) (Banatvala und Brown, 2004; Best, 2007). Da das CRS eine fortschreitende Erkrankung ist, die unter anderem durch die Persistenz des RV und Defekte in der Immunantwort verursacht wird, und viele kongenitale Defekte bei der Geburt nicht erkannt werden, können sich bereits vorhandene Manifestationen sowie verschiedene Abnormalitäten erst später zeigen (Menser und Forrest, 1974). Dabei handelt es vor allem um Hör- und Augenschäden, Entwicklungsdefekte, Verhaltensauffälligkeiten, Lernschwierigkeiten, *Diabetes mellitus*, Schilddrüsenerkrankungen und die progressive Rötelnpanenzephalitis (Banatvala und Brown, 2004; Best, 2007).

1.1.3 Pathogenese

Das RV ist moderat infektiös, sodass in Europa jede infizierte Person im Durchschnitt 3 bis 8 weitere susceptible Personen mit dem Erreger ansteckt (RKI, 2018). Da der Mensch der einzig bekannte Wirt für das RV ist und das Virus in der Umwelt instabil ist, kann es nur von Person zu Person weitergegeben werden (Falke, 1998; Atreya *et al.*, 2004b). Dabei wird das Virus aerogen durch Tröpfcheninfektion übertragen und infiziert zunächst die epithelialen Zellen der Schleimhaut des oberen Respirationstraktes. Durch die weitere Infektion von Makrophagen und Lymphozyten gelangt das Virus in das lymphatische Gewebe des Nasopharynx und des oberen Respirationstraktes (Banatvala und Brown, 2004; Modrow *et al.*, 2010). Von dort kommt es wahrscheinlich zur Virämie, sodass das RV sowohl frei als auch zellgebunden im Blut vorliegt, sich über den gesamten Organismus ausbreiten und eine systemische Infektion im Wirt etablieren kann (Modrow *et al.*, 2010). Im Anschluss lässt sich das Virus unter anderem in der Tränenflüssigkeit, im Nasen-Rachen-Raum, im Zervixsekret, im Liquor und in der Synovialflüssigkeit nachweisen (Modrow *et al.*, 2010). Die Virämie endet, sobald sich die humorale Immunantwort ausbildet. Dies ist durch den Rückgang des Ausschlages erkennbar (Banatvala und Brown, 2004).

Bei Schwangeren kann es während der maternalen Virämie zur Infektion der Plazenta kommen. Dabei infiziert das Virus die Chorionzotten, wodurch es zur Nekrose im Epithelium sowie in den Endothelzellen der Kapillaren kommt. Die sich ablösenden, infizierten Zellen gelangen als Emboli in den fetalen Blutkreislauf und das RV kann den sich entwickelnden Fetus infizieren (Banatvala und Brown, 2004). Das Virus konnte aus sämtlichen fetalen Organen isoliert werden, wenn die Infektion in einer frühen Phase der Schwangerschaft stattfand (Töndury und Smith, 1966). Zudem konnten keinerlei Entzündungsreaktionen in diesem Entwicklungsstadium beobachtet werden, was darauf zurückzuführen ist, dass sich das Immunsystem des Fetus noch ausreichend ausgebildet hat (Best, 2007). Mikroskopische Analysen von infizierten Feten zeigten die Zerstörung von Zellen an mehreren Stellen, z.B. Nekrose in den Strukturen der Augen, des Herzens, des Gehirns und der Ohren. Missbildungen an diesen Organen sind charakteristisch für Patienten mit CRS. Außerdem konnten Nekrosen in den Endothelzellen der Blutgefäße des Herzens beobachtet werden, die zu Thrombosen in kleineren Gefäßen und weiteren Nekrosen im umliegenden Gewebe führen könnten (Töndury und Smith, 1966; Webster, 1998). Obwohl eine Vielzahl RV- ausgelöster physiologischer Defekte in der Organogenese beobachtet bzw. beschrieben

wurden, konnte der molekulare Mechanismus, der zur teratogenen Wirkung einer kongenitalen RV-Infektion führt, noch nicht aufgeklärt werden. Als Ursache für die Teratogenität wurden bisher RV-induzierte Modifikationen des Zelltods, des Zellzyklus, des Zytoskeletts und der Mitochondrien diskutiert (Bowden *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1996; Best, 2007).

1.1.4 Epidemiologie

Die Röteln sind weltweit verbreitet (Lee und Bowden, 2000). In den Ländern der gemäßigten Klimazone gibt es im Frühjahr eine erhöhte Inzidenz. Nichtsdestotrotz ist die Erkrankung das gesamte Jahr präsent (Wolinsky, 1996). In der Zeit, bevor die Impfung gegen Röteln eingeführt wurde, kam es alle 3 bis 5 Jahre in Europa und alle 6 bis 9 Jahre in den USA zu Röteln-Epidemien, da in diesen Intervallen die Anzahl an suszeptiblen Personen in der Population wieder anstieg (Wolinsky, 1996; Parkman, 1999; Lambert *et al.*, 2015). Dabei wurden vor allem 5- bis 9-Jährige infiziert (Lee und Bowden, 2000). Durch die Einführung der Impfung sowie die Umsetzung der Röteln-Impfstrategien konnte die Anzahl an Rötelnfällen in vielen Ländern reduziert werden, sodass laut WHO die weltweit gemeldeten Fälle von 670.000 im Jahr 2000 auf 10.000 im Jahr 2016 gesenkt werden konnten (Lambert *et al.*, 2015; RKI, 2018). In Deutschland gibt es seit 2013 eine namentliche Meldepflicht für die Erkrankung. Die STIKO, die Ständige Impfkommission, empfiehlt eine Impfung mit einem attenuierten Kombinations-Lebendimpfstoff gegen Masern, Mumps, Röteln (MMR) und gegebenenfalls Varizellen (MMRV) zwischen dem 11. und 14. Lebensmonat und eine zweite Dosis zwischen dem 15. und 23. Lebensmonat bzw. frühestens 4 Wochen nach der ersten Dosis (RKI, 2017; RKI, 2018). Als erster Meilenstein in der Röteln-Eradikation konnte im Jahr 2009 erreicht werden, dass die endemische Transmission auf dem gesamten amerikanischen Kontinent als unterbunden erklärt werden konnte (Andrus *et al.*, 2011). Europa konnte hingegen das von der WHO ausgegebene Ziel, die Rötelntransmission auf dem Kontinent bis 2015 zu unterbrechen, nicht einhalten. Im Jahr 2016 wurden aber schon 37 von 53 Mitgliedstaaten der europäischen WHO-Region eine Unterbrechung der endemischen RV-Transmission bescheinigt (RKI, 2018). In Deutschland konnte dies für die Jahre 2016 und 2017 nicht erreicht werden (ECDC, 2018). Die WHO schätzt, dass weltweit immer noch jedes Jahr über 100.000 CRS-Fälle auftreten, die vor allem in Ländern der westpazifischen und südostasiatischen WHO-Region sowie in Afrika vorkommen (Robertson *et al.*, 2003;

Banatvala und Brown, 2004; Lambert *et al.*, 2015). Den letzten CRS-Fall in Deutschland gab es im Jahr 2013 (RKI, 2018). Im *Global Vaccine Action Plan* wurde nun die Elimination der Röteln in fünf von sechs WHO-Regionen bis zum Jahr 2020 festgelegt, was von allen 194 WHO-Mitgliedsstaaten unterstützt wurde (Lambert *et al.*, 2015).

Studien mit monoklonalen Antikörpern zeigten, dass es nur einen Serotyp des RV gibt (Lee und Bowden, 2000). Anhand von phylogenetischen Analysen der Nukleotidsequenz des Gens *E1* verschiedener Isolate wurde das RV zwar in zwei Kladen, die sich zu circa 8 bis 10 % in ihrer Nukleotidsequenz unterschieden, eingeteilt. Beim Vergleich der Aminosäuresequenz zeigte sich jedoch, dass sich diese nur zu 1 bis 3 % unterschied, sodass die Varianz im Antigen nur gering ist. Klade 1, welches sich in zehn Genotypen (1A-J) unterteilt, umfasste die größte Gruppe von Isolaten und stammte vor allem aus Nordamerika, Europa und Asien (unter anderem Japan). Die dem Klade 2 zugeordneten Isolate kamen hauptsächlich aus Asien (Indien, China, Korea, Russland), aber auch aus Italien und teilen sich in drei Genotypen (2A-C) auf (Frey *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 2003; WHO, 2013). Momentan zirkulieren vor allem die Genotypen 1E, 1G, 1J sowie 2B in vielen Regionen der Erde (WHO, 2013; CDC, 2017). Beim Vergleich der Nukleotidsequenzen von CRS-Stämmen mit nicht-teratogenen Stämmen konnten keine offensichtlichen Mutationen, die eine Unterscheidung ermöglichen würden, identifiziert werden (Frey *et al.*, 1998; Lee und Bowden, 2000).

1.2 Das Rötelnvirus

1.2.1 Klassifizierung

Das RV gehört zur Familie der *Togaviridae* (Latein: *toga* = Mantel, Hülle) und wird als einziges Mitglied dem Genus *Rubivirus* zugeordnet (Lee und Bowden, 2000; Modrow *et al.*, 2010). Das Genus *Alphavirus* ist das einzig andere Genus in dieser Familie und umfasst ungefähr 30 Vertreter wie das Sindbis-Virus, das Semliki-Forest-Virus und das Chikungunya-Virus (Lee und Bowden, 2000; Brown *et al.*, 2018). Während der Mensch der einzig bekannte natürliche Wirt für das RV ist, infizieren die Alphaviren Vertebraten wie Pferde, Nagetiere sowie verschiedene Vogelarten und Arthropoden wie Moskitos. Das RV und die Alphaviren besitzen viele gemeinsame Eigenschaften vor allem bei der Genomorganisation sowie Replikationsstrategie (Lee und Bowden, 2000; Modrow *et al.*, 2010).

1.2.2 Aufbau

Die RV-Virionen variieren in ihrer Form. Die runden Partikel, die circa 50 % aller Virionen ausmachen, besitzen einen Durchmesser von durchschnittlich 70 nm. Die eiförmigen bzw. zylindrisch verlängerten Partikel können dagegen bis zu 150 nm lang sein (Battisti *et al.*, 2012). Alle Virionen bestehen aus einem von einer Membranhülle umgebenen sphärischen bzw. nicht-sphärischen Nukleocapsid, welches sich aus mehreren Kopien des Capsidproteins sowie dem viralen RNA-Genom zusammensetzt (Lee und Bowden, 2000; Battisti *et al.*, 2012). Das Capsidprotein, welches Homodimere über eine Disulfidbrücke bildet, interagiert über eine basische Region am N-Terminus mit der viralen RNA (Liu *et al.*, 1996; Lee und Bowden, 2000). Am C-terminalen Ende des Capsidproteins befindet sich das hydrophobe Signalpeptid des E2-Proteins, was die Befestigung des Capsidproteins und somit des Nukleocapsids an die virale Membran ermöglicht (Suomalainen *et al.*, 1990). Das Capsidprotein wird nicht glykosyliert, besitzt aber einige Serin-/Threonin-Phosphorylierungsstellen, die die RNA-Bindung beeinflussen (Oker-Blom, 1983; Marr *et al.*, 1991; Law *et al.*, 2003). In der Membran befinden sich die Glykoproteine E1 und E2, die Typ I Transmembranproteine sind, sich als Heterodimere zusammenlagern und 5 bis 8 nm aus der Lipidmembran herausragen (Lee und Bowden, 2000; Battisti *et al.*, 2012). Am N-Terminus des E1-Proteins konnten drei N-Glykosylierungsstellen identifiziert werden (Qiu *et al.*, 1992b). Die Anzahl an N-Glykosylierungsstellen am N-terminalen Ende des E2-Proteins variiert abhängig vom RV-Stamm. Für die Stämme M33 und HPV-77 konnten vier Glykosylierungsstellen beschrieben werden, wohingegen Therien und RA27/3 drei besitzen (Vidgren *et al.*, 1987; Frey und Marr, 1988; Nakhasi *et al.*, 1989; Qiu *et al.*, 1992a; Lee und Bowden, 2000). Außerdem konnten O-Glykosylierungsstellen am E2-Protein nachgewiesen werden (Lundström *et al.*, 1991). In Abbildung 1 ist der schematische Aufbau eines *Togaviridae*-Partikels dargestellt (Modrow *et al.*, 2010).

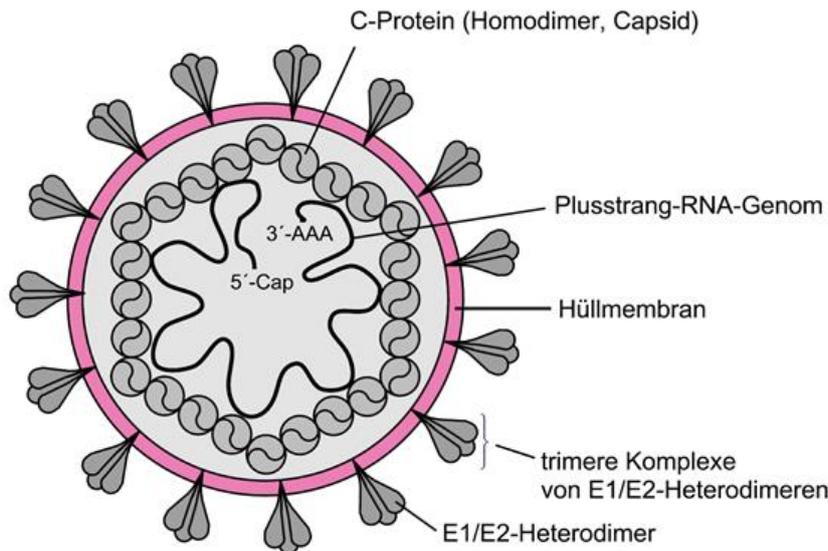


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines *Togaviridae*-Partikels (Modrow *et al.*, 2010)

Das RNA-Genom des RV ist linear, nicht-segmentiert, einzelsträngig und liegt in positiver Orientierung vor (Modrow *et al.*, 2010). Der Anteil an Guanin/Cytosin ist mit ungefähr 70 % der höchste aller bisher untersuchten RNA-Viren (Dominquez *et al.*, 1990). Das 5'-Ende des RNA-Moleküls besitzt eine 7-Methylguanosisin-Gruppe (*cap*-Struktur) und das 3'-Ende ist polyadenyliert. Das Genom hat eine Länge von ca. 10.000 Nukleotiden und enthält zwei nicht-überlappende polycistronische offene Leserahmen (ORF, *open reading frame*), welche durch einen nicht-translatierten Bereich von ungefähr 124 Nukleotiden getrennt sind. Am 5'- bzw. 3'-Ende gibt es ebenfalls nicht-translatierte Regionen von ca. 41 bzw. 61 Nukleotiden. Der erste ORF kodiert für das Vorläuferpolyprotein p200, aus dem sich durch proteolytische Spaltung die Nichtstrukturproteine (NSP) p150 und p90 bilden. Der zweite ORF enthält die genetische Information für das Vorläuferpolyprotein p110. Aus diesem werden durch ER-Membran-assoziierte zelluläre Signalpeptidasen die Strukturproteine (SP) Capsid, E2 und E1 gebildet (Modrow *et al.*, 2010). Der Genomaufbau sowie die Translations- und Prozessierungsstrategie der Nichtstrukturproteine und Strukturproteine des RV sind in Abbildung 2 schematisch gezeigt (Lee und Bowden, 2000).

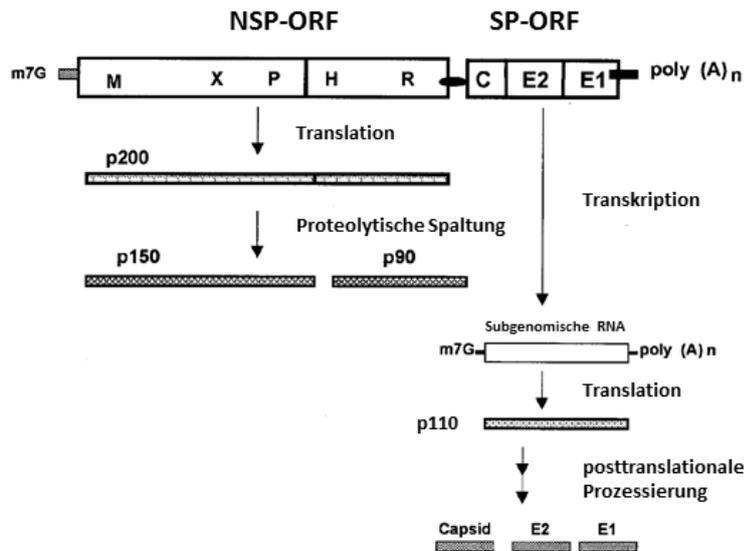


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Genomaufbaus sowie der Translations- und Prozessierungsstrategie der Nichtstrukturproteine (NSP) sowie Strukturproteine (SP) des RV

Das RNA-Genom des RV besitzt eine 7-Methylguanodin-Gruppe (m7G) am 5'-Ende und ist am 3'-Ende polyadenyliert (poly (A)_n). Zudem enthält es zwei nicht-überlappende offene Leserahmen (ORF). Der erste ORF kodiert für das Vorläuferpolyprotein p200, welches eine Methyltransferase (M), ein unbekanntes Motiv (X), eine Papain-ähnliche Cysteinprotease (P), eine Helikase (H) sowie eine Replikase (R) enthält. Durch die proteolytische Spaltung von p200 bilden sich die Nichtstrukturproteine (NSP) p150 und p90. Der zweite ORF enthält die genetische Information für die Strukturproteine (SP) Capsid (C), E2 sowie E1. Von der subgenomischen RNA wird das Vorläuferpolyprotein p110 translatiert, welches durch posttranslationale Prozessierung in die drei SP gespalten wird (Lee und Bowden, 2000; Modrow *et al.*, 2010).

1.2.3 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus des RV beginnt durch die Adsorption des Virions an die Membran der Zelle. Dies wird durch das virale Glykoprotein E1 vermittelt, welches die zellulären Rezeptoren erkennt und sich an diesen anlagert (Chaye *et al.*, 1992; Cong *et al.*, 2011; Mangala Prasad *et al.*, 2017). Bisher wurde das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein als Interaktionspartner für das E1 beschrieben (Cong *et al.*, 2011). Dieser Rezeptor wird aber hauptsächlich im zentralen Nervensystem exprimiert, sodass weitere Rezeptoren für das RV in Betracht gezogen werden müssen (Cong *et al.*, 2011; Trinh *et al.*, 2018). Des Weiteren sind zelluläre Phospho- sowie Glykolipide an der Bindung des RV an die Wirtsmembran beteiligt (Mastromarino *et al.*, 1990). Dabei sind vor allem Sphingomyelin, aber auch Cholesterin für den Eintritt des RV essenziell (Otsuki *et al.*, 2017). Nach der Bindung des Viruspartikels an die Wirtsmembran wird das Virus mittels Clathrin-vermittelter Endozytose internalisiert (Kee *et*

al., 2004). In den frühen Endosomen (engl. *early endosomes*) werden die Virionen Calcium-Ionen ausgesetzt, sodass die Spitze der verlängerten Domäne II des E1-Proteins, die zwei konservierte hydrophobe Fusionsschleifen (engl. *fusion loops*) mit einer Calcium-Bindungsstelle besitzt, durch eine Konformationsänderung in die endosomale Zielmembran inseriert (DuBois *et al.*, 2013; Dubé *et al.*, 2014; Dubé *et al.*, 2016). Durch die Ansäuerung des Endosoms kommt es zur Bildung von E1-Homotrimeren, die die Ausbildung einer Haarnadel-ähnlichen Struktur ermöglichen, wodurch es zur räumlichen Nähe sowie anschließend zur Fusion von endosomaler und viraler Membran kommt (Katow and Sugiura, 1988; DuBois *et al.*, 2013; Dubé *et al.*, 2014; Dubé *et al.*, 2016). Dabei wird das virale Nukleocapsid in das Zytoplasma entlassen (Dubé *et al.*, 2016). Es wird vermutet, dass durch die Phosphorylierung der Capsidproteine durch zelluläre Kinasen die starke Bindung von Capsid-Homodimeren und RNA-Genom aufgehoben wird, sodass das virale Genom frei im Zytoplasma vorliegt (Law *et al.*, 2003). Da aufgrund der Plusstrangorientierung die RNA des RV in der Zelle als mRNA erkannt wird, bindet der zytoplasmatische *cap-binding*-Komplex an die *cap*-Struktur des viralen Genoms und sorgt für die Rekrutierung der ribosomalen Untereinheiten, was zur Translation des ersten ORF führt (Modrow *et al.*, 2010). Das Vorläuferpolyprotein der Nichtstrukturproteine, p200, wird an den Ribosomen synthetisiert und sorgt über eine Membran-bindende Domäne am N-Terminus dafür, dass die genomische RNA zu den Membranen des ER, an denen sich später die Replikationskomplexe bilden, transportiert wird (Matthews *et al.*, 2009; Matthews *et al.*, 2012). Dort nutzt p200 die genomische Plusstrang-RNA als Template, um die Negativstrang-RNA zu synthetisieren (Liang and Gillam, 2000; Liang and Gillam, 2001; Matthews *et al.*, 2012). Außerdem besitzt p200 in seiner Sequenz eine Papain-ähnliche Cysteinprotease, die die Spaltung des Vorläuferpolyproteins in die Nichtstrukturproteine p150 (N-terminaler Teil des p200) und p90 (c-terminaler Teil des p200) katalysiert (Gorbalenya *et al.*, 1991; Marr *et al.*, 1994; Liang *et al.*, 2000). Die beiden viralen Proteine bilden im Anschluss einen Replikase-Komplex, der mit der Negativstrang-RNA als Template die Synthese der genomischen sowie subgenomischen Plusstrang-RNA ermöglicht (Liang and Gillam, 2000; Matthews *et al.*, 2012). Dabei sorgt p150 über den N-Terminus für die ER-Membran-Assoziation und enthält die Methyltransferase, die am 5'-Ende der viralen RNA die *cap*-Struktur bildet (Rozanov *et al.*, 1992; Matthews *et al.*, 2009). Das Protein p90 besteht aus zwei Domänen. Am N-Terminus findet sich die RNA-Helikase und der C-Terminus enthält die RNA-abhängige RNA Polymerase

(Dominquez *et al.*, 1990; Liang and Gillam, 2000). Bei der Translation der subgenomischen RNA wird das Vorläuferpolyprotein p110, welches die viralen Strukturproteine in der Reihenfolge NH₂-Capsid-E2-E1-COOH enthält, durch die Ribosomen an der ER-Membran gebildet (Oker-Blom, 1984; Oker-Blom *et al.*, 1984; Modrow *et al.*, 2010). Durch zwei separate Signalpeptide am N-Terminus des E2- und E1-Proteins wird das sich in der Translation-befindliche Polyprotein in die Membran des ER transportiert und verankert. ER-Membran-assoziierte zelluläre Signalpeptidasen spalten das p110 nach den Signalpeptidsequenzen und bilden die drei einzelnen Strukturproteine (Lee und Bowden, 2000; Modrow *et al.*, 2010). Dabei wird der C-Terminus des Capsidproteins über das hydrophobe Signalpeptid des E2-Proteins in der ER-Membran verankert, sodass der N-Terminus des viralen Capsidproteins ins Zytoplasma ragt und mit der neu-synthetisierten genomischen Plusstrang-RNA interagieren kann (Suomalainen *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1996). Die Membranproteine E1 und E2 ragen mit ihrem N-Terminus in das ER-Lumen, wohingegen sich der C-Terminus des E1 im Zytoplasma befindet und das C-terminale Ende des E2 aus einem kurzen zytoplasmatischen Teil sowie dem in der Membran-verankerten Signalpeptid des E1-Proteins besteht (Mangala Prasad *et al.*, 2013). Dabei werden beide C-terminalen Domänen des E2 als Anker für das Capsidprotein diskutiert, um die intrazelluläre Abknospung (engl. *budding*) zu induzieren (Garbutt *et al.*, 1999; Mangala Prasad *et al.*, 2013). Die Position sowie die Orientierung der viralen Strukturproteine in der Membran des ER sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt (Mangala Prasad *et al.*, 2013).

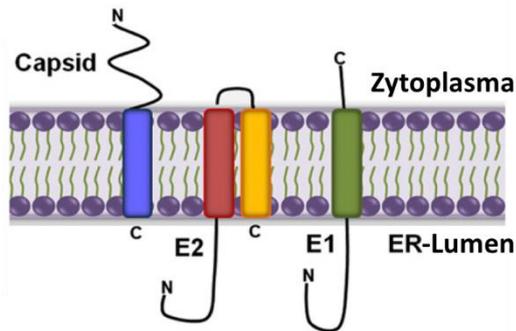


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Position sowie der Orientierung der viralen Strukturproteine in der Membran des ER

Das Capsidprotein ist durch das Signalpeptid des E2-Proteins (blau) am C-Terminus in der ER-Membran verankert, sodass der N-Terminus ins Zytoplasma ragt. Die Membranproteine E1 und E2 ragen mit ihrem N-Terminus in das ER-Lumen, wohingegen sich der C-Terminus des E1 im Zytoplasma befindet und das C-terminale Ende des E2 aus einem kurzen zytoplasmatischen Teil sowie dem in der Membran-verankerten Signalpeptid des E1-Proteins (gelb) besteht. Die Transmembrandomänen von E1 bzw. E2 sind grün bzw. rot dargestellt (Mangala Prasad *et al.*, 2013).

E1 und E2 werden im ER-Lumen korrekt gefaltet, posttranslational modifiziert (z.B. N-Glykosylierungen) und bilden Heterodimere, wodurch das im E1-lokalisierte ER-Retentionssignal maskiert wird und E1 aus dem ER in den Golgi-Komplex transportiert werden kann (Hobman *et al.*, 1993; Hobman *et al.*, 1997). Im Golgi-Apparat werden die beiden Virusproteine abschließend posttranslational modifiziert (z.B. Modifikation der N-Glykosylierungen, O-Glykosylierungen) und durch ein am E2-lokalisiertes Golgi-Retentionssignal im Kompartiment gehalten (Hobman *et al.*, 1995; Hobman *et al.*, 1997). Die Assemblierung der viralen Strukturproteine sowie Abknospung des Viruspartikels erfolgt an den Membranen des Golgi-Apparats (Mangala Prasad *et al.*, 2017). Hierfür wird das Capsidprotein wahrscheinlich durch die Proteinphosphatase 1A dephosphoryliert, wodurch es eine erhöhte Affinität für die virale RNA besitzt und die neusynthetisierte genomische RNA vermehrt bindet (Law *et al.*, 2003). Das sich bildende Nukleocapsid löst durch seine Bindung an den C-Terminus des E2-Proteins die Abknospung an der Membran des Golgi-Apparats aus, sodass das unreife Virion als gleichmäßig-dichtes Partikel im Lumen des Golgi-Apparats vorliegt (Garbutt *et al.*, 1999; Risco *et al.*, 2003; Mangala Prasad *et al.*, 2017). Während des Transportes durch den Golgi-Komplex reifen die Virionen durch einen bisher unbekanntem Mechanismus heran, sodass sich durch strukturelle Veränderungen eine doppelschalige Architektur im Nukleocapsid ausbildet. Die reifen Virionen werden über den

sekretorischen Weg aus der Zelle geschleust, liegen als infektiöse Viruspartikel im extrazellulären Raum vor und können im Anschluss weitere Wirtszellen infizieren (Prasad *et al.*, 2017). In Abbildung 4 ist der Replikationszyklus des RV schematisch gezeigt.

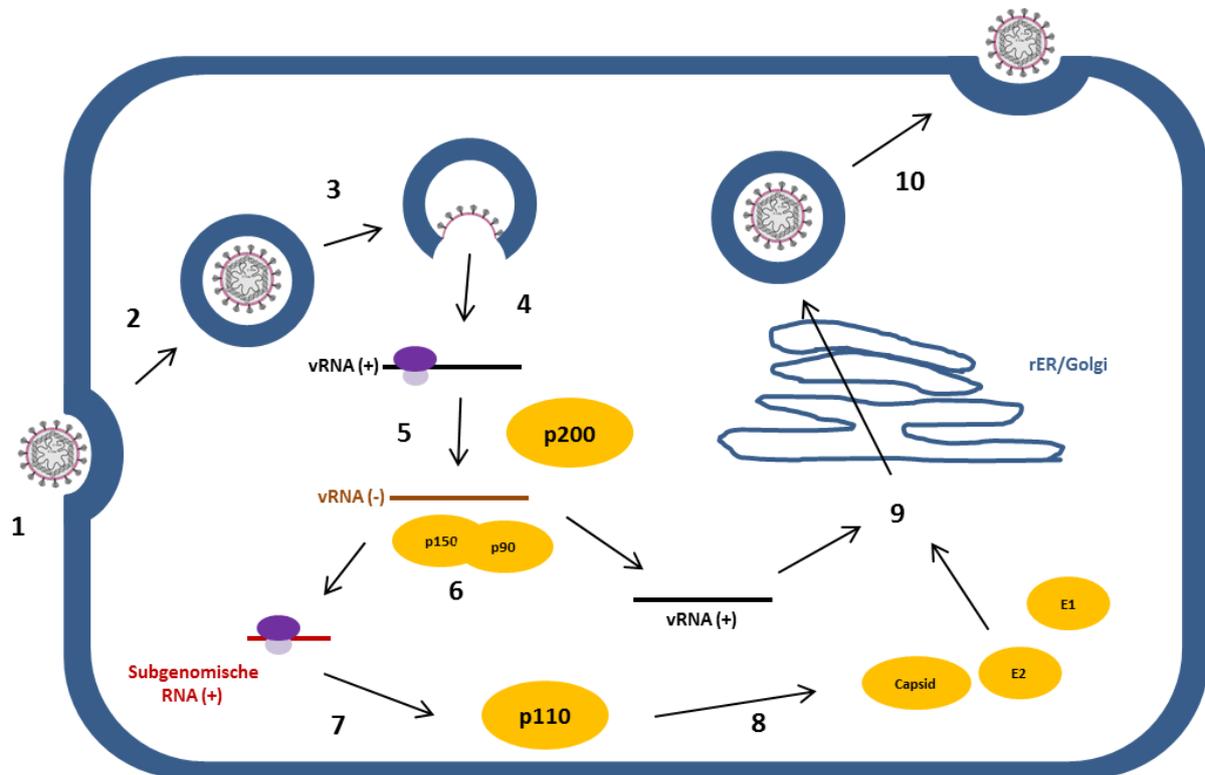


Abbildung 4: Schematische Darstellung des RV-Replikationszyklus

Nach der Adsorption an die zellulären Rezeptoren (1) wird das RV-Virion (Modrow *et al.*, 2010) mittels Clathrin-vermittelter Endozytose aufgenommen (2). Im Endosom kommt es aufgrund von Calcium-Ionen und der Absenkung des pH-Werts zur Fusion von endosomaler und viraler Membran (3) und das virale RNA-Genom (vRNA (+), schwarz) wird ins Zytoplasma entlassen (4). Dort erkennen ribosomalen Untereinheiten (violett) die virale RNA und produzieren das Vorläuferpolyprotein der Nichtstrukturproteine (p200), welches mit Hilfe der genomischen Plusstrang-RNA als Template die Negativstrang-RNA (vRNA(-), braun) synthetisiert (5). Durch die Spaltung des Vorläuferpolyproteins in die Nichtstrukturproteine p150 und p90 kommt es zur Bildung des Replikase-Komplexes, der mit der Negativstrang-RNA als Template die Synthese der neuen genomischen (schwarz) sowie der subgenomischen Plusstrang-RNA (rot) ermöglicht (6). Durch die Translation der subgenomischen RNA wird das Vorläuferpolyprotein der Strukturproteine gebildet (p110) (7). Dieses wird durch ER-Membran-assoziierte zelluläre Signalpeptidasen gespalten und es bilden sich die einzelnen Strukturproteine Capsid, E2 und E1 (8). Nach der posttranslationalen Modifikation im ER erfolgt die Assemblierung der viralen Strukturproteine mit dem viralen RNA-Genom und die Abknospung des Viruspartikels an den Membranen des Golgi-Apparats (9). Über den sekretorischen Weg werden die neuen Virionen aus der Zelle geschleust (10).

1.2.4 Einfluss auf die Wirtszelle

Das RV beeinflusst während seiner Replikation eine Vielzahl von zellulären Kompartimenten, Prozessen bzw. Faktoren im Wirt. Verschiedene RV-induzierte Modifikationen wurden mit der teratogenen Wirkung des Pathogens in Verbindung gebracht. Nichtsdestotrotz ist der molekulare Mechanismus noch nicht komplett aufgeklärt. Als Ursache für die Teratogenität des RV wurden bisher die Veränderungen der Mitochondrien und des Zytoskeletts, der Arrest des Zellzyklus und die Induktion bzw. Hemmung des Zelltods diskutiert (Bowden *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1996; Best, 2007).

Während der RV-Infektion bilden sich Replikationskomplexe endosomalen und lysosomalen Ursprungs, in deren räumlicher Nähe sich raues ER, Golgi-Apparat und Mitochondrien befinden (Bowden *et al.*, 1987; Lee und Bowden, 2000; Risco *et al.*, 2003). In diesen Zentren findet die virale RNA-Synthese statt (Lee *et al.*, 1994a). Im Anschluss wird von dort die replizierte RNA zu den Assemblierungsstellen an den Membranen des Golgi-Apparats transferiert (Risco *et al.*, 2003). Eine wichtige zelluläre Komponente der Replikationskomplexe ist das mitochondriale Matrixprotein p32 (C1QBP), das sowohl mit dem Capsidprotein als auch mit dem p150 interagiert (Beatch and Hobman, 2000; Beatch *et al.*, 2005; Suppiah *et al.*, 2012). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass p32 während der RV-Infektion die Mitochondrien verlässt, im Zytoplasma akkumuliert und sich an sowie in den Replikationskomplexen anreichert (Fontana *et al.*, 2007; Ilkow *et al.*, 2010; Fontana *et al.*, 2010). Es wird vermutet, dass p32 als zelluläre Strukturkomponente die Mitochondrien zu den Replikationskomplexen dirigiert, um den Energiebedarf der RV-Replikation zu decken (Fontana *et al.*, 2010; Claus *et al.*, 2011). Frühere Studien zeigten bereits, dass Mitochondrien während der RV-Infektion eine wichtige Rolle spielen. Es konnte in RV-infizierten BHK-21-Zellen (engl. *baby hamster kidney*) beobachtet werden, dass 1 hpi (engl. *hour/s post infection*) die Menge an ATP abnahm (Bardeletti, 1977), während die Respiration (O₂-Aufnahme), Glykolyse und Alanin-Synthese zunahm (Vaheri und Cristofalo, 1967; Bardeletti *et al.*, 1972; Bardeletti, 1977). Außerdem veränderte sich nach einer RV-Infektion die Morphologie der Mitochondrien (Lee *et al.*, 1996). Die beobachtete Anlagerung von Nukleocapsiden an die Mitochondrien während der Replikation geht auf die Assoziation des Capsidproteins an die mitochondrialen Oberfläche zurück, wodurch der Import neu synthetisierter Proteine in die Mitochondrien beeinträchtigt wird (Lee *et al.*, 1999; Ilkow *et al.*, 2010). Es wird vermutet, dass auf diese Weise das RV die Induktion der Apoptose hemmt

(Ilkow *et al.*, 2010). Das RV beeinflusst des Weiteren die Aktivitäten der Komplexe der Atmungskette, die in der inneren Membran der Mitochondrien sitzen. Dabei zeigte Komplex II als Hauptziel der Modulation die stärkste Erhöhung der Aktivität (Claus *et al.*, 2013). Ebenso konnte ein erhöhter ATP-Spiegel zu späten Zeitpunkten der Infektion gemessen werden (Claus *et al.*, 2011). Wahrscheinlich verändert das RV den Energiestoffwechsel gezielt, um die fortlaufende Versorgung mit Energie während der Replikation zu gewährleisten (Claus *et al.*, 2013).

Eine RV-Infektion scheint ebenso Komponenten des Zytoskeletts zu beeinflussen (Lee und Bowden, 2000). Immunfluoreszenz-Analysen in RV-infizierten Vero- und BHK-21-Zellen offenbarten die Veränderung der Aktinfilamente von filamentösen Strukturen zu amorphen Klumpen, bei denen es sich wahrscheinlich um depolymerisierte Aktinfilamente handelt (Bowden *et al.*, 1987; Kujala *et al.*, 1999). Eine Reorganisation der Mikrotubuli, einer weiteren Komponente des Zytoskeletts, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Kujala *et al.*, 1999). Es wird aber spekuliert, ob die Mikrotubuli für die Ausbildung der RV-induzierten zytoplasmatischen Faserstrukturen benötigt werden (Matthews *et al.*, 2010). In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Mikrotubuli in Zusammenarbeit mit p32 in einer frühen Phase der Infektion die Umverteilung der Mitochondrien dirigieren (Claus *et al.*, 2011). Außerdem konnte die Interaktion von p90 mit der Citron-Kinase nachgewiesen werden (Atreya *et al.*, 2004a). Die Citron-Kinase ist der kleinen GTPase Rho vorgelagert, die die zytoplasmatische Bildung von Aktinfilamenten während der Zellteilung reguliert (Atreya *et al.*, 2004b).

Die Beeinflussung des Zellzyklus während der RV-Infektion könnte ebenfalls zur teratogenen Wirkung beitragen. Nach der RV-Infektion sowie p90-Überexpression konnte eine diskrete Subpopulation von Zellen mit tetraploiden Nukleus (4N DNA) identifiziert werden. Dies legt nahe, dass der Zellzyklus nach der S-Phase arretiert und die Expression des viralen p90 die Zellteilung behindert. Es wird vermutet, dass die Interaktion von p90 mit der Citron-Kinase, einem regulatorischen Protein der Zellteilung, den Arrest des Zellzyklus hervorruft und eventuell Apoptose in den infizierten Zellen induziert (Atreya *et al.*, 2004a). Dieser RV-ausgelöste Arrest des Zellzyklus könnte die Beobachtung erklären, warum in vielen Organen von CRS-Kindern eine reduzierte Zellzahl vorhanden ist (Naeye und Blanc, 1965). Des Weiteren konnte eine Interaktion des viralen p90 mit dem zellulären Retinoblastom-Protein

(RB), einem weiteren regulatorischen Protein des Zellzyklus, identifiziert werden (Atreya *et al.*, 1998; Fornig und Atreya, 1999).

Die Auslösung sowie die Vermeidung der Apoptose, dem programmierten Zelltod, nach einer RV-Infektion konnten abhängig vom Zelltyp ebenso beobachtet werden und werden als weitere mögliche Ursachen für die Teratogenität des RV diskutiert (Lee und Bowden, 2000). Bei der Apoptose handelt es sich um einen gerichteten zellulären Prozess, der durch extrinsische Signale wie Zytokine oder durch intrinsische Stimuli wie zellulären Stress, der zur p53-abhängigen Expression von proapoptotischen Faktoren der BCL-2 Familie (wie z.B. BAX, PUMA, usw.) führt, ausgelöst wird. Beide Signalkaskaden münden in der Aktivierung der Caspasen-3/6/7, die unter anderem die Degradation des Zytoskeletts sowie der nukleären Proteine, die Kondensation des Chromatins, die Fragmentierung der DNA, die Ausbildung von apoptotischen Körperchen und schließlich den Zelltod zur Folge hat (Elmore, 2007). In den Zelllinien Vero, BHK-21 und RK13 (engl. *rabbit kidney*) verursachte das RV Apoptose. Dies war durch die Abkuglung von apoptotischen Zellen vom Zellrasen, der Fragmentierung der DNA sowie der Kondensation des Chromatins detektierbar (Pugachev und Frey, 1998; Duncan *et al.*, 1999; Hofmann *et al.*, 1999; Megyeri *et al.*, 1999). Es wurde außerdem beschrieben, dass die RV-induzierte Apoptose sowohl p53- als auch Caspase-abhängig ist (Pugachev und Frey, 1998; Megyeri *et al.*, 1999; Claus *et al.*, 2015). In den primären humanen embryonalen Fibroblasten konnte jedoch keine Apoptose durch das RV induziert werden, was möglicherweise die virale Persistenz in fetalen Geweben erklären könnte (Adamo *et al.*, 2004). Eine DNA-Microarray-Genanalyse von RV-infizierten adulten und fetalen Fibroblasten offenbarte zusätzlich, dass die Apoptose in adulten Zellen, jedoch nicht in fetalen Zellen begünstigt wird (Adamo *et al.*, 2008). Eine persistente RV-Infektion ohne zytopathischen Effekt (CPE) konnte ebenso in humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC, engl. *human umbilical vein endothelial cells*) beobachtet werden (Perelygina *et al.*, 2013). Das virale Capsidprotein wird im Kontext der Apoptose-Hemmung als antiapoptotischer Faktor diskutiert, da es zum einen an die mitochondriale Oberfläche assoziiert und somit den mitochondrialen Import hemmt (Ilkow *et al.*, 2010). Zum anderen bindet es den proapoptotischen Faktor BAX und inhibiert so die BAX-induzierte Apoptose (Ilkow *et al.*, 2011). Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass das Capsidprotein die IRF3-abhängige Apoptose hemmt (Willows *et al.*, 2014). Außerdem wurde beschrieben, dass die RV-abhängige Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs das Überleben von RV-infizierten Zellen

verlängert und so der Apoptose entgegenwirkt. Die RV-induzierte Aktivierung des proliferativen MAPK ERK1/2-Signalwegs hatte ebenso einen positiven Effekt auf die RV-Replikation (Cooray *et al.*, 2005). Eine Genexpressionsanalyse von RV-infizierten primären Endothelzellen fetalen und adulten Ursprung zeigte erst kürzlich eine RV-abhängige Beeinflussung einer Vielzahl von zellulären Signalwegen, wie dem JAK-STAT-, NF- κ B-, RIG-I- und MAPK-Signalweg, die alle eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Apoptose sowie der angeborenen Immunantwort spielen (Geyer *et al.*, 2016).

1.3 MAPK-Signalwege

1.3.1 Allgemeine Charakterisierung

MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinases*) sind Serin-/Threonin-spezifische Proteinkinasen, die extrazelluläre Stimuli wie Mitogene, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Hormone bzw. zellulären Stress in eine Vielzahl zellulärer Antworten umwandeln (Cargnello und Roux, 2011). Entwicklungsgeschichtlich zählen die MAPK zu den ältesten Signaltransduktionswegen und sie spielen bei vielen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle (Widmann *et al.*, 1999). In eukaryotischen Zellen sind die MAPK-Signalwege stark konserviert und regulieren zelluläre Prozesse wie Genexpression, Zellteilung, Metabolismus, Motilität, Überleben, Apoptose und Differenzierung, die auch während der Embryogenese von fundamentaler Bedeutung sind. In Säugetieren konnten bisher 14 MAPK identifiziert werden, die sich in 7 Gruppen aufteilen (Cargnello und Roux, 2011). Dabei gehören 4 Gruppen zu den konventionellen MAPK wie ERK1/2 (engl. *extracellular signal-regulated kinases 1/2*), p38 (Isoformen α , β , γ , δ), JNK1/2/3 (engl. *c-Jun N-terminal kinases 1/2/3*) und ERK5 (Chen *et al.*, 2001). Die atypischen MAPK, die keine übereinstimmenden Besonderheiten haben, umfassen mit ERK3/4, ERK7 und NLK (engl. *Nemo-like kinase*) die 3 verbliebenen Gruppen (Coulombe und Meloche, 2007).

Jede Gruppe der konventionellen MAPK besteht aus einer Kaskade dreier sich nacheinander aktivierender Kinasen: der MAPKK Kinase (MAPKKK), der MAPK Kinase (MAPKK) und der MAPK. Dabei kommt es ausgelöst durch einen extrazellulären Stimulus zur Aktivierung der MAPKKK durch Phosphorylierung und/oder Interaktion mit einem kleinen GTP-Bindeprotein aus der Ras/Rho-Familie. Im Anschluss führt die MAPKKK-Aktivierung zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der nachfolgenden MAPKK. Diese induziert wiederum die duale

Phosphorylierung im konservierten Threonin-X-Tyrosin-Motiv der MAPK, wodurch diese aktiviert wird. Die große Vielfalt der MAPK-regulierten Funktionen wird durch die Phosphorylierung verschiedener Substrate bestimmt, die als MAPKAPK (engl. *MAPK-activated protein kinases*) bezeichnet werden. Zu ihnen zählen 11 Mitglieder, die sich in folgende 5 Gruppen einteilen: RSK (engl. *p90 ribosomal S6 kinases*), MSK (engl. *mitogen- and stress-activated kinases*), MNK (engl. *MAPK-interacting kinases*), MK2/3 (engl. *MAPK-activated protein kinase 2/3*) und MK5. Die MAPKAPK repräsentieren dabei einen zusätzlichen Amplifizierungsschritt in der MAPK-Signalkaskade (Cargnello und Roux, 2011). In Abbildung 5 ist eine Übersicht der vier konventionellen MAPK-Signalwege gezeigt (Cargnello und Roux, 2011). Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den drei konventionellen MAPK ERK1/2, p38 und JNK, die in den nachfolgenden Kapiteln 1.3.2 – 1.3.4 näher erläutert werden.

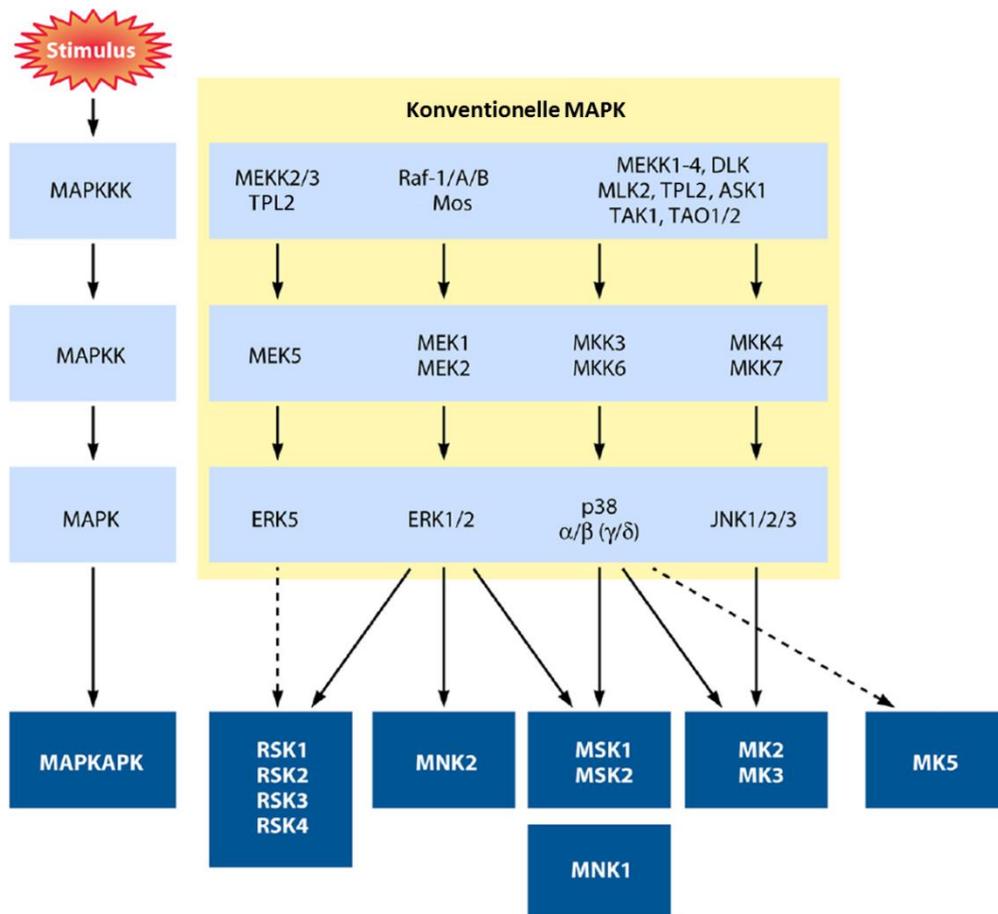


Abbildung 5: Schematische Darstellung der konventionellen MAPK-Signalwege

Die Signalwege der konventionellen MAPK bestehen aus einer Kaskade dreier sich nacheinander aktivierender Kinasen: der MAPKK Kinase (MAPKKK), der MAPKK Kinase (MAPKK) und der MAPK. Durch einen extrazellulären Stimulus kommt es mit Hilfe kleiner GTP-Bindeproteine aus der Ras/Rho-Familie zur Aktivierung der MAPKKK (z.B. MEKK1-4, Raf-1, TPL2, TAK1), die die MAPKK (MEK5, MEK1/2, MKK3/6, MKK4/7) phosphoryliert und damit aktiviert. Diese induziert wiederum die duale Phosphorylierung der MAPK ERK5, ERK1/2, p38 und JNK1/2/3, wodurch diese aktiviert werden. Die Substrate der MAPK werden als MAPKAPK bezeichnet und teilen sich in 5 Gruppen auf: RSK, MSK, MNK, MK2/3 und MK5 (Cargnello und Roux, 2011).

1.3.2 ERK1/2

Die erste charakterisierte MAPK aus dem Säugetier war ERK1, die auch als MAPK3 oder p44 bezeichnet wird (Cargnello und Roux, 2011). Die Kinase wurde als Protein beschrieben, welches in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren an Tyrosin- und Threoninresten phosphoryliert wird (Cooper *et al.*, 1982; Kazlauskas und Cooper, 1988; Ray und Sturgill, 1988). ERK1 und ERK2, die auch als MAPK1 oder p42 bezeichnet wird, zeigen in ihrer Aminosäuresequenz eine Übereinstimmung von 83 % und werden in unterschiedlichem

Maße in allen Geweben exprimiert, wobei besonders große Mengen im Gehirn, in der Skelettmuskulatur, im Thymus und im Herz vorhanden sind (Boulton *et al.*, 1990). Die alternativen *splice*-Isoformen für ERK1 bzw. ERK2 sind ERK1b und ERK1c bzw. ERK2b (Gonzalez *et al.*, 1992; Shaul und Seger, 2006).

Die Aktivierung der beiden MAPK erfolgt durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*), EGF (engl. *epidermal growth factor*) und NGF (engl. *nerve growth factor*) sowie mit Insulin (Boulton *et al.*, 1990). Zudem können sie durch Liganden der GPCR (engl. *G protein-coupled receptors*), Zytokine, osmotischen Stress und Mikrotubuli-Desorganisation aktiviert werden (Raman *et al.*, 2007). Die ERK1/2-Signalkaskade besteht aus den MAPKKK A-Raf, B-Raf und C-Raf (Raf-1), wobei auch MEKK1, MOS und TPL2 als MAPKKK fungieren können, aus den MAPKK MEK1 und MEK2 sowie den MAPK ERK1 und ERK2 (Cargnello und Roux, 2011).

Die Initiierung sowie Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs erfolgt prinzipiell durch zelluläre Oberflächenrezeptoren wie die Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK). Diese werden durch Liganden-vermittelte Rezeptordimerisierung aktiviert und es kommt zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten in der intrazellulären Domäne des Rezeptors. Die phosphorylierten Aminosäuren dienen als spezifische Bindungsstellen für Proteine mit einer SH2- oder PTB-Domäne wie GRB2 (engl. *growth factor receptor-bound protein 2*). Das Protein SOS2 (engl. *son of sevenless*), ein GEF (engl. *guanine-nucleotide exchange factor*), interagiert im Anschluss mit GRB2 und stimuliert den Austausch von GDP zu GTP bei Ras, einer kleinen GTPase. Dadurch kann Ras mit einem Mitglied der Raf-Familie interagieren und aktiviert diese. Die aktivierte MAPKKK Raf wiederum bindet und phosphoryliert die MAPKK MEK1/2, die die duale Phosphorylierung im konservierten Thr-Glu-Tyr-Motiv von ERK1/2 induzieren (Cargnello und Roux, 2011). In nicht-stimulierten Zellen befinden sich alle Komponenten des Signalwegs im Zytoplasma. Kommt es jedoch zur extrazellulären Stimulation, akkumuliert ein großer Teil von ERK1/2 im Nukleus (Chen *et al.*, 1992; Lenormand *et al.*, 1993). Nach der Aktivierung phosphoryliert ERK1/2 eine Vielzahl von Substraten im Zytoplasma wie DAPK, TSC2, RSK und MNK oder im Nukleus wie NF-AT, ELK1, MEF2, c-Fos, c-Myc und STAT3. Weitere Substrate sind Membran-assoziiert wie CD120a, SYK und Calnexin oder mit dem Zytoskelett verbunden wie Neurofilamente und Paxillin (Yoon und Seger, 2006).

Der ERK1/2-Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation. Die dauerhafte Aktivierung der Signalkaskade ist notwendig für die Progression des Zellzyklus von G1- zur S-Phase und ist assoziiert mit der Induktion von positiven Regulatoren des Zellzyklus sowie der Inaktivierung von antiproliferativen Genen (Meloche und Pouyssegur, 2007).

Um die biologische Funktion des ERK1/2-Signalwegs genauer zu charakterisieren, wurden verschiedene Inhibitoren wie unter anderem U0126 entwickelt (Favata *et al.*, 1998). Dieser ist ein hoch selektiver Inhibitor von MEK1 und MEK2, der durch seine Bindung an die inaktive nicht-phosphorylierte Kinase dessen Phosphorylierung und/oder Konformationsänderung zum aktiven Enzym verhindert (Alessi *et al.*, 1995; Favata *et al.*, 1998; Cargnello und Roux, 2011). Durch die Hemmung der MAPKK MEK1/2 wird die duale Phosphorylierung von ERK1/2 inhibiert und der gesamte Signalweg ist blockiert.

1.3.3 p38

Die MAPK p38 α (MAPK14) wurde erstmals 1994 beschrieben und zeigt im Vergleich mit ERK2 eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von 50 % (Han *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994b; Rouse *et al.*, 1994). Neben p38 α konnten drei weitere Isoformen, p38 β / γ / δ (MAPK11/12/13), identifiziert werden (Cuadrado und Nebreda, 2010). Während p38 α , p38 β und p38 δ in Zelllinien und Geweben ubiquitär exprimiert werden, ist die Expression von p38 γ auf die Skelettmuskulatur begrenzt und hat wahrscheinlich spezialisierte Funktionen (Jiang *et al.*, 1996; Human Protein Atlas, 2018). Außerdem wird p38 α in der Regel höher exprimiert als p38 β (Cargnello und Roux, 2011).

Die vier Isoformen von p38 werden durch physikalischen Stress wie UV-Strahlung, oxidativen Stress, Hypoxie und Ischämie sowie durch inflammatorische Zytokine wie TNF α (Tumornekrosefaktor α) und IL-1 (Interleukin-1) aktiviert (Cuadrado und Nebreda, 2010). Die beiden Entzündungsfaktoren TNF α und IL-1 lösen durch ihre extrazelluläre Bindung an den entsprechenden Rezeptor die Anlagerung von TRAF-Adapterproteinen (engl. *tumor necrosis factor receptor-associated factors*) an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors aus. Durch diese Rekrutierung wird die Aktivierung verschiedener MAPKKK induziert (Bradley und Pober, 2001). Des Weiteren können GPCR und die kleinen GTPasen Rac und Cdc42 aus der Rho-Familie ebenso die MAPKKK aktivieren (Bagrodia *et al.*, 1995; Goldsmith und Dhanasekaran, 2007). Zu den MAPKKK gehören unter anderem MEKK1/2/3, MLK2/3, ASK1,

TPL2, TAK1 und TAO1/2 (Cuadrado und Nebreda, 2010). Dabei finden sich einige MAPKKK des p38-Signalwegs auch im JNK-Signalweg wieder (Cargnello und Roux, 2011). Die MAPKKK phosphorylieren die p38-spezifischen MAPKK MKK3 und MKK6 (Derijard *et al.*, 1995; Han *et al.*, 1996; Stein *et al.*, 1996). Erstere aktiviert im Anschluss selektiv die p38-Isoformen α , γ und δ , wohingegen MKK6 alle vier p38-Isoformen phosphorylieren kann. Außerdem scheint die MKK4, eine der beiden MAPKK aus dem JNK-Signalweg, die MAPK p38 ebenfalls zu aktivieren (Meier *et al.*, 1996). Diese drei MAPKK sorgen für die duale Phosphorylierung im konservierten Thr-Gly-Tyr-Motiv von p38 und aktivieren diese (Cargnello und Roux, 2011). Ohne p38-spezifischen Stimulus liegen alle Isoformen von p38 sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus vor (Ben-Levy *et al.*, 1998). Dabei dienen die MAPKAPK MK2, MK3 und MK5 als zytoplasmatische Anker für p38 (Gaestel, 2006). Kommt es zur Aktivierung des Signalwegs, akkumuliert die MAPK im Nukleus (Raingeaud *et al.*, 1995). Durch die Aktivierung phosphoryliert p38 eine Vielzahl von Substraten im Zytoplasma wie cPLA2, MNK1/2, MK2/3, HuR, BAX und Tau sowie im Nukleus wie ATF1/2/6, MEF2, ELK1, GADD153, ETS1, p53 und MSK1/2 (Cuadrado und Nebreda, 2010). Die MAPKAPK MK2 scheint jedoch das Schlüsselsubstrat in den p38-abhängigen Prozessen zu sein (Gaestel, 2006; Ronkina *et al.*, 2008).

Die p38-Signalkaskade spielt eine entscheidende Rolle bei Immunantworten und inflammatorischen Reaktionen (Cuadrado und Nebreda, 2010). Dies wird unter anderem daran deutlich, dass p38 durch zahlreiche extrazelluläre Entzündungsmediatoren wie chemotaktisch-wirkende Stoffe, Zytokine, Chemokine und LPS (engl. *lipopolysaccharides*) aktiviert wird. Eine wichtige Funktion von p38 ist zudem die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, was durch die Modulation von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B reguliert werden kann (Karin, 2006; Cargnello und Roux, 2011). Ebenso ist die MAPK p38 an der Zellproliferation sowie am Überleben der Zelle beteiligt. Die Isoform p38 α verhindert die Zellzyklus-Progression beim G1/S- und G2/M-Übergang, indem sie zum einen die Cycline herunterreguliert und zum anderen die CDK-Inhibitoren (engl. *cyclin-dependent kinases*) hochreguliert (Thornton und Rincon, 2009). Außerdem konnte in einigen Studien beobachtet werden, dass p38 α für das Überleben der Zelle sorgt. Nichtsdestotrotz zeigte sich bei der Mehrzahl, dass bei Auslösung von zellulärem Stress p38 α die Apoptose induziert (Cuenda und Rousseau, 2007). Der aktivierte p38-Signalweg erhöht zudem die COX-2-

Expression (Cyclooxygenase-2) sowie die PGE₂-Synthese (Prostaglandin E₂) in verschiedenen Zellen (Guan *et al.*, 1997; Singer *et al.*, 2003; Grishin *et al.*, 2006).

Die genauere Charakterisierung der biologischen Funktionen von p38 wurde erst durch die Entwicklung der entzündungshemmenden Medikamente SB203580 und SB202190 möglich. Diese beiden Stoffe binden als kompetitive Inhibitoren spezifisch an die ATP-Bindestelle der Isoformen p38 α und p38 β und blockieren somit die Aktivität der Kinasen (Lee *et al.*, 1994b; Cargnello und Roux, 2011).

1.3.4 JNK

Die MAPK JNK, die auch als SAPK (engl. *stress-activated protein kinase*) bezeichnet wird, wurde erstmals 1990 als Cycloheximid-aktivierte MAPK beschrieben (Kyriakis und Avruch, 1990). Von JNK sind bisher drei Isoformen (JNK1/2/3) bekannt (Derijard *et al.*, 1994; Kyriakis *et al.*, 1994). Diese haben in ihrer Aminosäuresequenz eine Übereinstimmung von 85 % und werden durch drei verschiedene Gene kodiert, von denen 10 oder mehr *splice*-Formen mit einem Molekulargewicht von 46 bis 55 kDa gebildet werden (Derijard *et al.*, 1994; Kyriakis *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1996). Während JNK1 und JNK2 in vielen Geweben vorkommen, ist JNK3 primär in neuronalen Geweben zu finden (Bode und Dong, 2007).

Die JNK-Isoformen werden ähnlich wie bei p38 durch verschiedene Formen von zellulärem Stress wie Hitze, ionisierender Strahlung, oxidativem Stress, DNA-schädigende Agenzien, Zytokinen, UV-Strahlung sowie DNA- und Proteinsynthese-Inhibitoren aktiviert. Weitere, jedoch deutlich schwächere Aktivatoren sind Wachstumsfaktoren, einige GPCR-Liganden und Serum (Bogoyevitch *et al.*, 2010). Durch die Stimulation kommt es zur Aktivierung der MAPKKK MEKK1/2/3/4, MLK1/2/3, ASK1/2, TPL2, DLK, TAK1 und TAO1/2 (Kyriakis und Avruch, 2001; Wagner und Nebreda, 2009). Diese phosphorylieren und aktivieren die JNK-spezifischen MAPKK MKK4 und MKK7, die in Kooperation die verschiedenen JNK-Isoformen im konservierten Thr-Pro-Tyr-Motiv dual phosphorylieren (Lawler *et al.*, 1998). Kommt es zur Stimulation des JNK-Signalwegs gelangt ein Teil der aktivierten MAPK vom Zytoplasma in den Nukleus (Mizukami *et al.*, 1997). Dort dient der Transkriptionsfaktor c-Jun als Substrat für die JNK-Isoformen, dessen Phosphorylierung am Serin63/73 die c-Jun-abhängige Transkription erhöht (Weston und Davis, 2002). Dabei scheinen funktionelle Unterschiede zwischen den JNK-Isoformen einen Einfluss auf die Regulation von c-Jun zu haben (Sabapathy *et al.*, 2004). JNK1 und JNK2 wurden als positive Regulatoren der c-Jun-abhängigen Expression und der

Zellproliferation diskutiert (Jaeschke *et al.*, 2006). Weitere durch JNK-phosphorylierte Transkriptionsfaktoren sind p53, ATF2, NF-ATc1, ELK1, HSF-1, STAT3, c-Myc und JunB (Raman *et al.*, 2007; Bogoyevitch *et al.*, 2010). Nichtsdestotrotz ist wenig darüber bekannt, inwieweit die verschiedenen JNK-Isoformen zu der Regulierung der Transkriptionsfaktoren beitragen (Cargnello und Roux, 2011).

Der JNK-Signalweg ist an der Regulation der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Dhanasekaran und Reddy, 2008). Dabei scheinen vor allem der Stimulus sowie der Zelltyp eine Rolle zu spielen (Lin und Dibling, 2002; Liu und Lin, 2005). Kommt es zur Phosphorylierung von c-Jun, bildet sich der AP-1-Komplex (engl. *activator protein 1*), ein Heterodimer aus c-Jun und c-Fos, der die Transkription von Genen mit AP-1-Bindungsmotiven induziert. Diese umfassen proliferative Gene, die den Zellzyklus regulieren wie Cyclin D1, aber auch proapoptotische Gene wie TNF α , FasL und BAK (Fan und Chambers, 2001; Sabapathy *et al.*, 2004). Zudem wurde gezeigt, dass durch das Fehlen von JNK1/2 die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma und somit die Induktion der Apoptose durch den intrinsischen Signalweg inhibiert war (Tournier *et al.*, 2000). Da JNK die Phosphorylierung von p53 induziert, wird spekuliert, ob die JNK-induzierte Apoptose auf die p53-abhängige Hochregulation von proapoptotischen Genen wie *BAX* (engl. *BCL-2-associated X protein*) und *PUMA* (engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*) zurückzuführen ist (Dhanasekaran und Reddy, 2017).

Um die Funktionen des JNK-Signalwegs genauer zu untersuchen, wurden verschiedene kompetitive Inhibitoren wie unter anderem SP600125 entwickelt. Diese binden reversibel an die ATP-Bindestelle von JNK1/2/3 und hemmen so die Phosphorylierung des JNK-Substrats c-Jun (Cargnello und Roux, 2011).

1.4 NF- κ B-Signalweg

1.4.1 Allgemeine Charakterisierung

NF- κ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) wurde erstmals 1986 als Transkriptionsfaktor (TF) beschrieben (Sen und Baltimore, 1986). Kurz nach der Entdeckung wurde klar, dass NF- κ B in nahezu allen Zelltypen exprimiert wird und eine Vielzahl von Genen mit unterschiedlichen Funktionen reguliert (May und Ghosh, 1998). Unter anderem hat der TF eine entscheidende Rolle bei der angeborenen Immunität,

Entzündungsreaktionen, der Zelldifferenzierung, dem Überleben sowie der Proliferation von Zellen und der Apoptose (Viatour *et al.*, 2005; Hoesel und Schmid, 2013). Zu der Familie der NF- κ B-Transkriptionsfaktoren gehören die fünf Mitglieder RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105 bzw. p50) und NF- κ B2 (p100 bzw. p52) (Caamamo und Hunter, 2002). Alle fünf Proteine können miteinander Homo- oder Heterodimere formen und besitzen eine hochkonservierte Rel-Homologie-Domäne (RHD) am N-Terminus, die für die Dimerisierung, die Translokation in den Nukleus und die Bindung an die entsprechenden DNA-Elemente essenziell ist (Miyamoto und Verma, 1995; May und Ghosh, 1997). In nicht-stimulierten Zellen liegen die Dimere gebunden an den inhibitorischen Proteinen der I κ B-Familie (I κ B α / β / ϵ) hauptsächlich im Zytoplasma vor. Diese NF- κ B-Inhibitoren besitzen repetitive Ankyrin-Einheiten (ANK), die mit der DNA-bindenden Domäne des TF interagieren und so die transkriptionelle Aktivität des TF unterbinden (Hoesel und Schmid, 2013). Auch am C-Terminus von p105 und p100 finden sich solche Wiederholungen, die als interne Inhibitoren fungieren. Bei der Reifung dieser beiden Vorläuferproteine werden die repetitiven Ankyrin-Einheiten abgespalten und es entstehen die DNA-bindenden Proteine p50 und p52. Am C-Terminus der Rel-Proteine, aber nicht von p50 und p52 befindet sich eine Transaktivierungsdomäne (TA), die für die transkriptionelle Aktivität essenziell ist. Interagiert eines der Rel-Proteine mit p50 oder p52, so bilden sich transkriptionell aktive NF- κ B-Dimere. Homo- und Heterodimere aus p50 und/oder p52 agieren hingegen als Repressoren der NF- κ B-abhängigen Promotoren (Hoesel und Schmid, 2013). Außerdem haben die unterschiedlichen NF- κ B-Dimere gewisse Präferenzen hinsichtlich ihrer Bindung an bestimmte DNA-Sequenzen, wodurch die verschiedenen NF- κ B-abhängigen Gene unterschiedlich stark durch die verschiedenen NF- κ B-Dimere adressiert und induziert werden (Wong *et al.*, 2011). Außerdem können Phosphorylierungen und andere posttranslationale Modifikationen der einzelnen NF- κ B-Untereinheiten ebenso die Aktivierung des Signalwegs sowie die Interaktion mit anderen Signalwegen beeinflussen (Oeckinghaus und Ghosh, 2009). In Abbildung 6 ist die Familie der NF- κ B-Transkriptionsfaktoren schematisch dargestellt (Hoesel und Schmid, 2013). Beim NF- κ B-Signalweg wird zwischen dem kanonischen, nicht-kanonischen und atypischen NF- κ B-Signalweg unterschieden (Hoesel und Schmid, 2013). In dieser Arbeit liegt der Fokus auf dem kanonischen NF- κ B-Signalweg, der im nachfolgenden Kapitel 1.4.2 näher beschrieben wird.

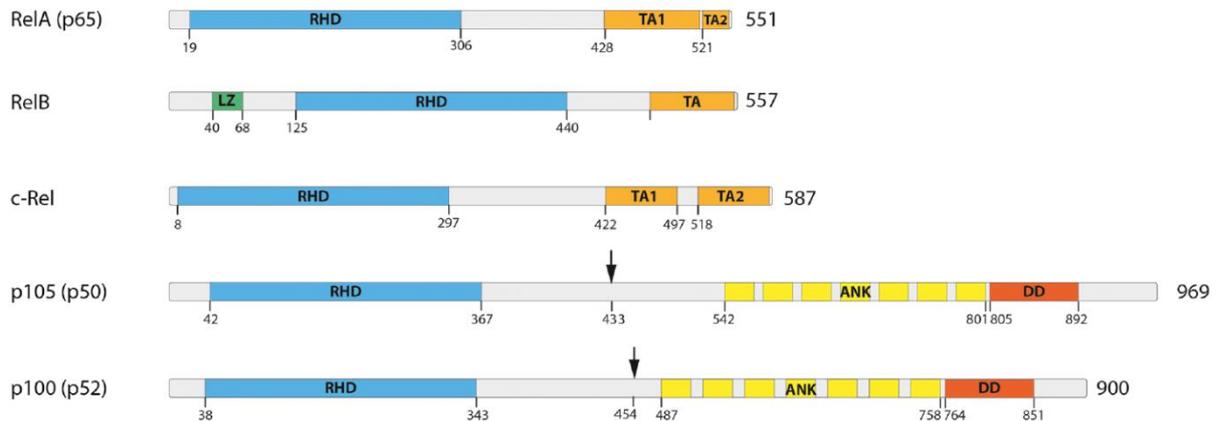


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Familie der NF-κB-Transkriptionsfaktoren

Zu der Familie der NF-κB-Transkriptionsfaktoren zählen fünf Mitglieder: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p105 bzw. p50) und NF-κB2 (p100 bzw. p52). Bei der Reifung von p105 bzw. p100 werden die repetitiven Ankyrin-Einheiten (ANK, gelb) abgespalten und es bilden sich die DNA-bindenden Proteine p50 bzw. p52 (siehe Pfeil). Alle Mitglieder der NF-κB-Familie besitzen am N-Terminus eine hochkonservierte Rel-Homologie-Domäne (RHD, blau), die für die Dimerisierung, die Translokation in den Nukleus und die Bindung an die entsprechenden DNA-Elemente erforderlich ist. Die Transaktivierungsdomäne (TA, orange), die für die transkriptionelle Aktivität essenziell ist, findet sich jedoch nur am C-Terminus von RelA (p65), RelB und c-Rel (Hoesel und Schmid, 2013).

1.4.2 Kanonischer NF-κB-Signalweg

Der kanonische NF-κB-Signalweg gilt unter normalen physiologischen Bedingungen als zentraler Regulator von Entzündungsreaktionen (Cildir *et al.*, 2016). Die Stimulation des Signalwegs erfolgt über extrazelluläre Signale wie proinflammatorische Zytokine (z.B. TNFα, IL-1β), PAMPs (engl. *pathogen-associated molecular patterns*) sowie DAMPs (engl. *damage-associated molecular patterns*) und über intrazelluläre Signale wie DNA-Schädigungen (Tergaonkar *et al.*, 2002; Shih *et al.*, 2011; Cildir *et al.*, 2016). Bei den PAMPs handelt es sich um Strukturen bzw. Moleküle, die bei verschiedenen Mikroorganismen hochkonserviert sind und von den Rezeptoren des Immunsystems erkannt werden. Dies können unter anderem Lipopolysaccharide (LPS) von Bakterien sowie dsRNA von Viren sein (Zamanian-Daryoush *et al.*, 2000; Hoesel und Schmid, 2013). Körper-eigene Strukturen bzw. Moleküle, die von beschädigten Zellen stammen, werden dagegen als DAMPs bezeichnet. Zu den NF-κB-aktivierenden Rezeptoren gehören der TNF-Rezeptor (TNFR), der IL-1-Rezeptor (IL-1R), verschiedene *toll-like*-Rezeptoren (TLRs) und Antigen-erkennende Rezeptoren (Hoesel und Schmid, 2013). Durch die Aktivierung der Rezeptoren kommt es Rekrutierung verschiedener zellulärer Adapterproteine zum entsprechenden Rezeptorkomplex, der an der

Plasmamembran sitzt (Viatour *et al.*, 2005). Die am Rezeptorkomplex gebundene Kinase TAK1 (engl. *TGF-beta-activated kinase 1*) phosphoryliert die im I κ B-Kinasekomplex (IKK-Komplex) gebundene Untereinheit IKK β am Ser177 und Ser181, was zur Aktivierung des IKK-Komplexes führt (Wang *et al.*, 2001). Dieser setzt sich aus den katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ , die auch als NEMO (engl. *NF- κ B essential modulator*) bezeichnet wird, zusammen (Zandi *et al.*, 1997; Yamaoka *et al.*, 1998; Rothwarf *et al.*, 1998). Kommt es zur Aktivierung des IKK-Komplexes, wird das am TF-gebundene I κ B α am Ser32 und Ser36 phosphoryliert. Dies führt zur K48-verknüpften Polyubiquitinierung von I κ B α sowie zu dessen anschließender Degradierung durch das 26S-Proteasom (Liu *et al.*, 2012). Durch die Dissoziation von I κ B α vom NF- κ B-Dimer, welches sich am häufigsten aus den Untereinheiten p65 (RelA) und p50 zusammensetzt, wird die Kernlokalisierungssequenz (NLS) des TF freigelegt und der TF kann in den Nukleus translozieren (Latimer *et al.*, 1998; Cildir *et al.*, 2016). Dort akkumuliert er auf dem Chromatin, bindet an Promotoren mit NF- κ B-spezifischen Bindungssequenzen und reguliert die Transkription von NF- κ B-abhängigen Genen (Cildir *et al.*, 2016). Die Effektivität des TF kann zudem durch posttranslationale Modifikationen seiner Untereinheiten beeinflusst werden. Kommt es zum Beispiel zur Phosphorylierung von p65 am Ser536, so wird das Transaktivierungspotenzial des TF erhöht (Sakurai *et al.*, 1999; Viatour *et al.*, 2005). Der kanonische NF- κ B-Signalweg ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt (Hoesel und Schmid, 2013).

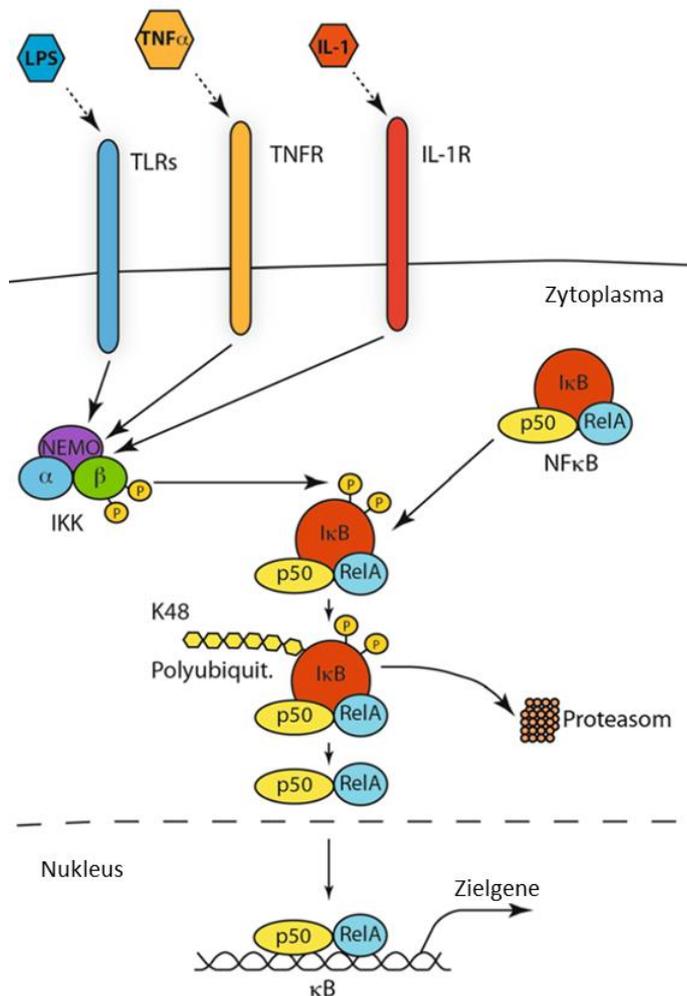


Abbildung 7: Schematische Darstellung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs

Der kanonische NF- κ B-Signalweg wird durch die Stimulation der Rezeptoren TNFR und IL-1R sowie verschiedener TLRs aktiviert. Durch die am Rezeptorkomplex gebundene Kinase TAK1 (nicht dargestellt) kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung der im I κ B-Kinasekomplex (IKK-Komplex) gebundene Untereinheit IKK β . Durch die Aktivierung des IKK-Komplexes wird das an NF- κ B-gebundene I κ B α phosphoryliert, was zur K48-verknüpften Polyubiquitinierung von I κ B α sowie zu dessen anschließender Degradierung durch das Proteasom führt. Durch die Dissoziation von I κ B α kann NF- κ B in den Nucleus translozieren, bindet dort an NF- κ B-spezifische Bindungssequenzen in der DNA und reguliert so die Transkription von NF- κ B-abhängigen Zielgenen (Hoesel und Schmid, 2013).

Der NF- κ B-Signalweg induziert abhängig vom Zelltyp sowie von der Zugänglichkeit des Genoms eine Vielzahl verschiedener Zielgene (Viatour *et al.*, 2005). Zu den prominentesten Vertretern gehören antiapoptotische Gene der *BIRC*-Familie (engl. *Baculoviral IAP repeat-containing protein*) wie z.B. *BIRC2* (cIAP1), *BIRC3* (cIAP2) und *BIRC4* (XIAP), der *BCL-2*-Familie (engl. *B-cell lymphoma 2*) wie z.B. *BCL-2* (BCL-2), *BCL2L1* (BCL-XL) und *BCL2A1* (A1) sowie aus weiteren Familien wie der von *TNFAIP3* (TNFAIP3/A20) und *CFLAR* (c-FLIP) (Karin und Lin,

2002; Hoesel und Schmid, 2013). Dennoch kommt es auch zur Expression proapoptotischer Gene wie dem Fas-Rezeptor CD95 (FasR) und dem Fas-Ligand (FasL) (Pahl, 1999). Des Weiteren werden Zytokine wie TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 und IFN- γ , Chemokine wie CCL2 und CCL5 (engl. *(C-C motif) ligand*), Wachstumsfaktoren wie VEGF und Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 und ICAM-1 durch die NF- κ B-Aktivierung exprimiert (Pahl, 1999; Karin und Lin, 2002; Wickremasinghe *et al.*, 2004; Hoesel und Schmid, 2013). Verschiedene Viren wie unter anderem das humane Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) sowie das humane Zytomegalievirus (HCMV) besitzen ebenfalls NF- κ B-spezifische Bindungssequenzen in ihren Promotoren (Nabel und Baltimore, 1987; Sambucetti *et al.*, 1989). Außerdem ist die Aktivität des NF- κ B-Signalwegs z.B. für die Replikation von Influenzaviren entscheidend (Nimmerjahn *et al.*, 2004; Wurzer *et al.*, 2004). Aus diesem Grund wurden potente NF- κ B-Inhibitoren entwickelt, die in der Zukunft für eine antivirale Therapie zum Einsatz kommen könnten (Leban *et al.*, 2007). Einer dieser Inhibitoren ist SC75741, der die DNA-Bindung der NF- κ B-Untereinheit p65 und somit die Expression von NF- κ B-abhängigen Genen unterbindet (Leban *et al.*, 2007; Ehrhardt *et al.*, 2013).

1.5 Zielsetzung

Die Röteln sind eine ansteckende Infektionskrankheit, die weltweit vorkommt und durch das Rötelnvirus (RV) ausgelöst wird. Während eine postnatale Infektion mild ist und selten mit Komplikationen einhergeht, kann eine Infektion in den ersten Monaten der Schwangerschaft zum Abort oder zu Missbildungen an Herz, Augen, Ohren und am zentralen Nervensystem des ungeborenen Kindes führen (Banatvala und Brown, 2004). Diese Defekte werden als kongenitales Röteln Syndrom (CRS) bezeichnet (Lambert *et al.*, 1965). Obwohl sich eine Vielzahl von Studien mit der Pathogenese des RV beschäftigt hat, sind die molekularen Mechanismen, die die teratogene Wirkung des Pathogens verursachen, noch nicht aufgeklärt. Als Ursachen für die Teratogenität wurden bisher Veränderungen der Mitochondrien sowie des Zytoskeletts, der Arrest des Zellzyklus, die Beeinträchtigung der Apoptose sowie die Aktivierung von proliferativen Signalwegen diskutiert. Die meisten Studien sehen jedoch in der Beeinflussung der Apoptose den Hauptgrund für die teratogene Wirkung. Eine Genexpressionsanalyse von RV-infizierten primären Endothelzellen fetalen und adulten Ursprungs offenbarte eine mögliche RV-abhängige Beeinflussung einer Vielzahl

von zellulären Signalwegen, wie unter anderem dem MAPK- und dem NF- κ B-Signalweg, die beide eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Apoptose haben (Geyer *et al.*, 2016). Die Bedeutung dieser Signalwege für die virale Replikation sowie für die RV-induzierte Apoptose ist jedoch völlig unklar. In dieser Arbeit sollte daher der Einfluss des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK, den kanonischen NF- κ B-Signalweg sowie die Apoptose in immortalisierten Zelllinien sowie in primären Endothelzellen fetalen und adulten Ursprungs näher untersucht werden.

Dafür sollten im ersten Teil der Arbeit die humane Lungenepithel-Zelllinie A549 mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 infiziert werden und die Aktivierung der drei MAPK und von NF- κ B sowie die PUMA-Expression, ein Marker für die frühe Apoptose, und die Aktivität der Caspasen-3 und -7, ein Marker für die späte Apoptose, analysiert werden. Um zu überprüfen, ob die für die MAPK beobachteten Effekte in einer weiteren immortalisierten Zelllinie nachweisbar sind, sollten zusätzlich Vero-Zellen aus dem Affen mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 für die Unterscheidung herangezogen werden. Im nächsten Schritt sollte die RV-induzierte Aktivierung der drei MAPK bzw. von NF- κ B durch die spezifischen Inhibitoren U0126, SB202190 und SP600125 bzw. SC75741 in A549-Zellen dosisabhängig gehemmt werden. Eine geeignete Konzentration des jeweiligen Inhibitors sollte aufgrund der möglichen Toxizität in einem Zellviabilitätstest in nicht-infizierten sowie in RV-infizierten Zellen analysiert werden. Um die Bedeutung der drei MAPK bzw. von NF- κ B auf die virale Replikation zu untersuchen, sollten Wachstumskurven ohne und mit Inhibitor durchgeführt werden. Den Einfluss der drei MAPK bzw. von NF- κ B auf die RV-induzierte Apoptose sollte durch die Untersuchung der PUMA-Expression, Caspase-3/7-Aktivität und Messung an toten Zellen im Zellkulturüberstand ermittelt werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollten primäre Endothelzellen fetalen (HUVEC, engl. *human umbilical vein endothelial cells*) und adulten Ursprungs (HSaVEC, engl. *human saphenous vein endothelial cells*) ebenfalls mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 bzw. dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 infiziert werden und die Aktivierung der drei MAPK und von NF- κ B sowie die PUMA-Expression und die Aktivität der Caspasen-3 und -7 analysiert werden. Außerdem sollte die NF- κ B-abhängige Expression der zellulären Apoptose-Inhibitoren A20/TNFAIP3, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in den HUVEC untersucht werden. Im Anschluss sollte die basale ERK1/2-Aktivität durch U0126 in den HUVEC dosisabhängig reduziert und eine geeignete Konzentration des Inhibitors in einem

Zellviabilitätstest getestet werden. Auch für den NF- κ B-Inhibitor SC75741 sollte eine Konzentration ermittelt werden, bei der die Viabilität der HUVEC nicht beeinträchtigt wird. Um den Einfluss der beiden Signalwege auf die virale Replikation zu untersuchen, sollten Wachstumskurven ohne und mit Inhibitor durchgeführt werden. Inwiefern die Apoptose durch die basale ERK1/2-Aktivität bzw. die RV-induzierte NF- κ B-Aktivierung manipuliert wird, sollte durch die Messung der RV-induzierten Caspase-3/7-Aktivität ohne und mit Inhibitor bestimmt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten das Verständnis über die RV-Pathogenese erweitern und klären, inwieweit die MAPK-Signalwege und der NF- κ B-Signalweg die virale Replikation und RV-ausgelöste Apoptose Zelltyp-spezifisch beeinflussen. Mögliche Unterschiede zwischen dem teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 und dem nicht-teratogenen Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 sowie zwischen den infizierten Endothelzellen fetalen und adulten Ursprungs sollten zudem Erkenntnisse über die teratogene Wirkung des Pathogens liefern. Aus den Vorarbeiten mit den verschiedenen Inhibitoren sollten sich Ansätze zur Entwicklung einer antiviralen Therapie ableiten.

2. Material

2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	Roth (D)
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich (USA)
BSA (bovines Serumalbumin) (30 %)	PAN Biotech (D)
CMC (Carboxymethylcellulose)	Sigma-Aldrich (USA)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Amresco (USA)
Ethanol	Roth (D)
FKS (fetales Kälberserum)	PAN Biotech (D)
Glycerin	Roth (D)
Glycin	Roth (D)
Isopropanol	Roth (D)
L-Glutamin	Invitrogen (USA), Lonza (CH)
<i>Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Substrate</i>	(Roche)/Sigma-Aldrich (USA)
<i>LuminataTM Forte Western HRP Substrate</i>	Merck (D)
Lysoform	Lysoform Dr. Hans Rosemann GmbH (D)
Magermilchpulver	Sucofin (D)
MEM (10x, <i>minimum essential medium</i>)	Sigma-Aldrich (USA)
Methanol	Roth (D)
Natriumazid	Merck (D)
Natriumcarbonat	Promega (USA)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (D)
Natriumhydroxid	Merck (D), Roth (D)
OptiMEM I	Gibco (UK)
Penicillin/Streptomycin	Gibco (UK), Invitrogen (USA), Thermo Scientific (USA)
PFA (Paraformaldehyd) (16 %)	Alfa Aesar, Thermo Scientific (UK)
<i>PrestoBlue[®] Cell Viability Reagent</i>	Thermo Scientific (USA)
Protease Inhibitor Cocktail (#P8340)	Sigma-Aldrich (USA)

Material

Salzsäure (37 %)	Roth (D)
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich (USA), Roth (D)
Staurosporin	Enzo Life Sciences (CH)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth (D)
Terralin	Schülke & Mayr GmbH (D)
TNF α (Tumornekrosefaktor α)	PromoKine (D)
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin), präzipitierend	Mikrogen Diagnostik (D)
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth (D)
Trypanblau	Roth (D)
Tween® 20	Roth (D)
<i>X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent</i>	(Roche)/Sigma-Aldrich (USA)

2.2 Medien

Medium	Bestandteile
DMEM (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)	3,7 g NaHCO ₃ 13,3 g DMEM-Pulver (Thermo Scientific, USA), pH 7,2 (HCl), add 1 l dH ₂ O, sterilfiltriert
ECGM (engl. <i>Endothelial Cell Growth Medium</i>)	keine Angabe (PromoCell, D) (#C-22010)

2.3 Eukaryotische Zellen

2.3.1 Zelllinien

Zellen	Organismus	Organ	Zellkulturmedium
A549	Mensch	Lunge (Epithel)	DMEM, 5 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin
Vero76	grüne Meerkatze	Niere (Epithel)	DMEM, 5 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin

2.3.2 Primäre Zellen

Zellen	Organismus	Organ	Zellkulturmedium
HUVEC	Mensch	<i>Vena umbilicalis</i> (Endothel)	ECGM, <i>SupplementMix</i> , 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
HSaVEC	Mensch	<i>Vena saphena</i> (Endothel)	ECGM, <i>SupplementMix</i> , 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

2.4 Viren

Virus	Bestand
RVi/Wuerzburg.DEU/47.11 (Genotyp 2B) (RV-Würzburg-12)	Universität Würzburg (Dr. Benedikt Weißbrich)
RV-HPV-77	Robert Koch – Institut (Prof. Dr. Annette Mankertz)

2.5 Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller	Artikelnummer
U0126	CST (Cell Signaling Technology, USA)	9903
SB202190	CST (USA)	8158
SP600125	Sigma-Aldrich (USA)	S5567
SC75741	Selleckchem (USA)	S7273

2.6 Plasmide

Plasmid	Bestand	Funktion
pCMV-HA	Clontech (USA)	Expression des HA-tag (Leervektor)
pCMV-βGal	S. Goodbourn (UK)	Expression des Enzyms β-Galaktosidase
p(PRDI)5tkΔ(-39)lucifer	S. Goodbourn (UK)	Expression des Enzyms Luciferase des Leuchtkäfers <i>Photinus pyralis</i> unter der Kontrolle von NF-κB-Bindeelementen des IFN-β-Promotors

2.7 Puffer

2.7.1 Fertige Puffer

Puffer	Hersteller
<i>RestoreTM Western Blot Stripping Buffer</i>	Thermo Scientific (USA)
RIPA-Puffer (engl. <i>radioimmunoprecipitation assay</i>)	Sigma-Aldrich (USA)
Roti [®] -Load 1	Roth (D)

2.7.2 Angesetzte Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Blockpuffer I (Immuncolorimetrischer Assay)	0,6 % BSA 1,0 % FKS 0,1 % Tween-20 in PBS
Blockpuffer II (Western Blot)	5 % Magermilchpulver in PBS-T _{0,05}
CMC-Overlay (Immuncolorimetrischer Assay)	50 ml CMC (1 %) 6,0 ml 10x MEM 3,0 ml FKS 2,2 ml NaHCO ₃ -Lösung (7,5 %) 1,0 ml Penicillin/Streptomycin add 100 ml DMEM
PBS	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ pH 7,2 (HCl) add 1 l dH ₂ O
PBS-T _{0,05}	0,05 % Tween [®] 20 in PBS

Material

PBS-T _{0,1}	0,1 % Tween® 20 in PBS
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	1 M TRIS pH 6,8 (HCl) in dH ₂ O
10x SDS-Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,25 M TRIS 2 M Glycin 1 % SDS in dH ₂ O
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M TRIS pH 8,8 (HCl) in dH ₂ O
Transferpuffer (Western Blot)	0,5 l dH ₂ O 0,3 l 1x SDS-Laufpuffer 0,1 l Methanol (100 %)
Trypanblau/PBS (Zellkultur)	0,25 % Trypanblau in PBS

2.8 Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Benzonase</i> ® Nuklease	Merck (D)
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) für immortalisierte Zellen	PAN Biotech (D)
Trypsin/EDTA (0,04 %/0,03 %) für primäre Zellen	PromoCell (D)
<i>Trypsin Neutralizing Solution</i> (0,05 % Trypsin-Inhibitor in 0,1 % BSA) für primäre Zellen	PromoCell (D)

2.9 Proteinmarker

Proteinmarker	Hersteller
<i>PageRuler</i> TM Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (USA)
<i>PageRuler</i> TM Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (USA)

2.10 Antikörper

Antigen	Hersteller	Bestellnummer	Interne Nummer
A20/TNFAIP3	CST (USA)	5630	211
ATF2	CST (USA)	9226	FG17
clAP1	CST (USA)	7065	213
clAP2	CST (USA)	3130	214
c-Jun	CST (USA)	9165	224
COX-2	Abcam (UK)	ab15191	177
ERK1/2	CST (USA)	4695	149
GAPDH	CST (USA)	5174	130
I κ B α	CST (USA)	4814	156
JNK	CST (USA)	9258	151
MK2	CST (USA)	12155	203
p38	CST (USA)	8690	150
p65	CST (USA)	8242	178
Phospho-ATF2 (Thr71)	CST (USA)	9221	FG17
Phospho-c-Jun (Ser63)	CST (USA)	2361	222
Phospho-c-Jun (Ser73)	CST (USA)	3270	223
Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	CST (USA)	4370	128
Phospho-I κ B α (Ser32)	CST (USA)	2859	155
Phospho-JNK (Thr183/Tyr185)	CST (USA)	4668	129
Phospho-MK2 (Thr222)	CST (USA)	3316	201
Phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	CST (USA)	4511	127
Phospho-p65 (Ser536)	CST (USA)	3033	157
PUMA	CST (USA)	12450	188
RV-Capsid	Meridian (USA)	C66496M	140
RV-E1	Merck (D)	MAB925	137
XIAP	CST (USA)	2045	212
Anti-Kaninchen IgG-HRP (Ziege)	Dianova (D)	111-035-003	9
Anti-Maus IgG-HRP (Pferd)	CST (USA)	7076	159
Anti-Maus IgG-HRP (Ziege)	Thermo (USA)	G-21040	MMR-Diagnostik

2.11 Kits

Kit	Hersteller
<i>β-Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer</i>	Promega (USA)
<i>Caspase-Glo® 3/7 Assay System</i>	Promega (USA)
<i>ONE-Glo™ Luciferase Assay System</i>	Promega (USA)
<i>Pierce™ BCA Protein Assay Kit</i>	Thermo Scientific (USA)
<i>Pierce Micro BCA™ Protein Assay Kit</i>	Thermo Scientific (USA)

2.12 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe <i>Vacusafe comfort</i>	INTEGRA Biosciences (D)
Blotapparatur <i>Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell</i>	Bio-Rad (USA)
Brutschrank/CO ₂ -Inkubator	Binder (D)
Durchlichtmikroskop	Nikon (J), Zeiss (D)
Einfrierbox	neoLab (D)
Eismaschine	Scotman (USA)
Entwicklungsmaschine <i>Agfa CP 1000</i>	AGFA (B)
Entwicklungsmaschine <i>Agfa Curix 60</i>	AGFA (B)
Feinwaagen	Sartorius (D), Mettler-Toledo (USA)
Gefrierschränke (-20 °C)	AEG, Bosch, Liebherr (alle D)
Gefrierschränke (-80 °C)	Heraeus Sepatech (D), Thermo Scientific (USA)
Gefrierschrank (-150 °C)	Sanyo (J)
Gelelektrophoresekammer	GE Healthcare (USA)
Horizontalschüttler	Biometra, Roth (beide D), Bibby Scientific (UK), Scientific Industries (USA)
Kamera am Durchlichtmikroskop	Nikon (J)
Kühlschränke (4 °C)	Bosch, Liebherr (beide D)
Laborzentrifugen	Heraeus Sepatech (D), Thermo

Material

	Scientific (USA)
<i>LUNA Automated Cell Counter</i>	Logos Biosystems (ROK)
Magnetrührer	IKA (D)
pH-Messgerät	Sartorius (D)
Photometer <i>FLUOstar Omega</i>	BMG Labtech (D)
Pipetboy	INTEGRA Biosciences (D)
Pipetten	Eppendorf (D), Gilson (F), Mettler-Toledo, Thermo Scientific (beide USA)
Scanner <i>HP Scanjet G4050</i>	HP (USA)
Spannungsgeräte	Biometra (D)
Sicherheitswerkbänke	Thermo Scientific (USA)
Stoppuhren	Roth (D)
Thermomixer comfort	Eppendorf (D)
Tischzentrifugen	Eppendorf (D), Thermo Scientific (USA)
Vortexer	IKA (D), Labinco (NL), Bibby Scientific (UK), Scientific Industries (USA)
Wärmeschrank (37 °C)	Eurotherm (UK)
Wasserbad	Haake (D)

2.13 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
<i>Combitips advanced</i>	Eppendorf (D)
Combitips unsteril	VWR (USA)
Einweg-Reaktionsgefäße	TPP (CH), Eppendorf, Sarstedt (beide D), Thermo Scientific (USA)
Einweg-Zellkulturgefäße	Sarstedt (D), Thermo Scientific (USA)
Filterpapier (dick)	Bio-Rad, GE Healthcare (beide USA)
Filterpapier (dünn)	VWR (USA)

Material

Glaspipetten	Brand, Hirschmann (beide D)
Glaswaren	Schott (D)
Handschuhe	Kimberly-Clark, Thermo Scientific (beide USA)
Kanülen	Braun (D)
Kryoröhrchen	Thermo Scientific (USA)
<i>Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film</i>	Merck (D)
LUNA-Zellkammer	Logos Biosystems (ROK)
Parafilm	Pechiney Plastic Packing (USA)
Pipettenspitzen	Eppendorf (D), Mettler-Toledo, Thermo Scientific (beide USA)
<i>PVDF Western Blotting Membranes</i>	Merck (D)
Vivaspin 20-Röhrchen (300 kDa)	Sartorius (D)

2.14 Software und Internetseiten

EndNote X7	Thomson Reuters (USA)
FileMaker Pro 9.0	FileMaker Inc. (D)
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc. (USA)
NCBI-Homepage	www.ncbi.nlm.nih.gov (USA)
MACH Web 2.0	MACH AG (D)
Microsoft Office 2010	Microsoft (USA)
Omega-Control 3.00 R3	BMG Labtech (D)
Omega MARS-Data Analysis 3.01 R2	BMG Labtech (D)
Paint 6.1	Microsoft (USA)

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Auftauen von eukaryotischen Zellen

Die eukaryotischen Zelllinien (A549 und Vero) sowie die primären Endothelzellen (HUVEC und HSAVEC) wurden aus einer -150 °C-Kühltruhe (bei einer Kurzzeitlagerung der Zellen auch aus einer -80 °C-Kühltruhe) entnommen und schnell in den Händen aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurde komplett in eine T75-Zellkulturflasche mit 10 ml frischem Zellkulturmedium (siehe Kapitel 2.3), welches zuvor für 20 bis 30 min im Brutschrank erwärmt wurde, überführt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde bei den Zellen ein Mediumwechsel durchgeführt, um die Reste an DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen. Dabei erfolgte der Mediumwechsel bei den Zelllinien nach ca. 24 h und bei den primären Zellen nach 16 h.

3.1.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Bei den eukaryotischen Zelllinien (A549 und Vero) wurde das Zellkulturmedium aus einer konfluent bewachsenen T75-Zellkulturflasche abgegossen. Die Zellen wurden zweimal (A549) bzw. dreimal (Vero) mit PBS gewaschen. Zur Ablösung der adhären Zellen wurde 1 ml Trypsin/EDTA in die Zellkulturflasche gegeben und die Zellen für 5 bis 10 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 8 ml frischen Zellkulturmedium suspendiert und in ein 15 ml-Greiner-Röhrchen überführt. In eine neue T75-Zellkulturflasche wurden 15 ml Zellkulturmedium vorgelegt und dann die Zellen in einer 1/10- (A549) oder 1/15-Verdünnung (Vero) umgesetzt. Die Zellen kamen im Anschluss in den Brutschrank zu 37 °C und 5 % CO₂. Dieses Passagieren erfolgte alle drei bis vier Tage, wenn die Zellen konfluent waren.

Bei den primären Endothelzellen (HUVEC und HSAVEC) wurde das Zellkulturmedium abgesaugt. Im Anschluss wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin/EDTA behandelt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Trypsinierung wurde mit 2 ml *Trypsin Neutralizing Solution* gestoppt. Nach Zugabe von 2 ml Zellkulturmedium wurden die Zellen suspendiert und in ein 15 ml-Greiner-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde für 3 min bei 300 x g zentrifugiert und der Trypsin-haltige Überstand

abgesaugt. Im Anschluss wurde das Pellet in 4 bis 6 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen und resuspendiert. In die neue T75-Zellkulturflasche wurden 15 ml Zellkulturmedium vorgelegt und dann die Zellen in einer 1/3-Verdünnung umgesetzt. Die Zellen kamen im Anschluss in den Brutschrank zu 37 °C und 5 % CO₂. Das Passagieren erfolgte immer dann, wenn die Zellen 80 bis 90 % konfluent waren. Zusätzlich musste bei den primären Zellen alle zwei bis drei Tage das alte Zellkulturmedium durch frisches ausgetauscht werden.

Zur Bestimmung der Zellzahl für die sich anschließenden Experimente wurde das automatische Zellzählgerät *LUNA* verwendet. Dazu wurden 20 µl der Zellsuspension aus dem 15 ml-Greiner-Röhrchen in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 20 µl einer Trypanblau/PBS-Lösung (0,25 %) gemischt. Im Anschluss wurden 10 µl dieser Verdünnung in eine *LUNA*-Zellkammer überführt und die Zellzahl pro ml automatisch bestimmt.

3.1.3 Einfrieren von eukaryotischen Zellen

Für das Einfrieren der eukaryotischen Zelllinien (A549 und Vero) sowie der primären Endothelzellen (HUVEC und HSAVEC) wurde zunächst das Einfriermedium (90 % FKS und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid)) hergestellt und bei Raumtemperatur equilibriert. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, von der Oberfläche einer T75-Zellkulturflasche abgelöst und in Zellkulturmedium aufgenommen. Danach wurde die Suspension mit den Zellen für 5 min bei 1.200 rpm bzw. 400 x g (A549 und Vero) bzw. für 3 min bei 300 x g (HUVEC und HSAVEC) zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das aus einer T75-Zellkulturflasche-stammende Pellet wurde in 3 ml Einfriermedium resuspendiert und je 1 ml dieser Suspension wurde in ein 1 ml-Kryoröhrchen aliquotiert. Die befüllten Kryoröhrchen wurden in eine Einfrierbox überführt, welche im Anschluss in eine -80 °C-Kühltruhe gestellt wurde. Diese Boxen ermöglichen ein langsames und schonendes Einfrieren der Zellen von 1 °C pro min, sodass die sich bildenden Eiskristalle die zellulären Membranen nicht zerstören. Am nächsten Tag wurden die eingefrorenen Zellen für die Langzeitlagerung in eine -150 °C-Kühltruhe überführt.

3.1.4 Transfektion von eukaryotischen Zelllinien

Die Transfektion bezeichnet in der Zellbiologie das Einbringen von Fremd-DNA bzw. -RNA in eukaryotische Zellen. Dabei wird zwischen einem zeitweiligen Einbringen (transient) und einem dauerhaften Einbau ins Genom (stabil) unterschieden. Die eingebrachte Fremd-DNA liegt zumeist als Expressionsplasmid vor, welches einen offenen Leserahmen (ORF) für das zu exprimierende Protein besitzt. Der ORF wird durch einen spezifischen Promotor kontrolliert, der von dem zellulären Transkriptionskomplex erkannt wird und die Expression des Proteins reguliert. Der biotechnologisch am häufigsten verwendete Promotor ist der des humanen Zytomegalievirus (HCMV). Da der Transkriptionskomplex für diesen viralen Promotor eine sehr hohe Affinität besitzt, wird eine Überexpression des zu untersuchenden Proteins ermöglicht. Bei der Transfektion gibt es verschiedene Methoden, um die Expressionsplasmide in die eukaryotische Zelle einzuschleusen. Physikalische Verfahren sind z.B. Mikroinjektion, Magnetofektion oder Elektroporation. Bei den chemischen Verfahren kommen verschiedene Reagenzien wie z.B. Calciumphosphat oder *X-tremeGeneTM HP DNA Transfection Reagent (Roche)* zum Einsatz. Letzteres ist ein nicht-liposomales Multikomponenten-Reagenz, welches einen Komplex mit der DNA formt, der wahrscheinlich endozytotisch aufgenommen wird.

Einen Tag vor der Transfektion mit *X-tremeGeneTM HP DNA* wurden $1,3 \times 10^5$ A549-Zellen pro ml bzw. Vertiefung auf einer 12-Lochplatte ausgesät, sodass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion zu 60 bis 80 % konfluent waren. Kurz vor der Transfektion wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgesaugt und durch 1 ml frisches Zellkulturmedium ersetzt. Für den Transfektionsansatz wurden zunächst 200 µl OptiMEM I in ein Reaktionsgefäß vorlegt. Zu diesem wurden dann 2 µg DNA gegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Zur Bildung der Komplexe wurden als nächstes 2 µl *X-tremeGeneTM HP DNA* Transfektionsreagenz zu dem Transfektionsansatz pipettiert und dieser 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In Tabelle 1 sind die verschiedenen Volumen- und Mengenangaben eines *X-tremeGeneTM HP DNA* Transfektionsansatzes zusammengefasst. Im Anschluss wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise und gleichmäßig verteilt auf die Zellen gegeben. Nach kurzem und vorsichtigem Schwenken der Platte wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurde der Transfektionsansatz von den Zellen abgesaugt und die Zellen, wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben, mit dem RV infiziert.

Tabelle 1: Volumen- und Mengenangaben eines *X-tremeGeneTM HP DNA* Transfektionsansatzes

Plattenformat	Medium auf den Zellen [μ l]	OptiMEM I [μ l]	DNA [μ g]	Transfektionsreagenz [μ l]
12-Loch	1000	200	2	2

3.1.5 Anzucht von Rötelnviren

Die Anzucht des RV erfolgte mit Hilfe der eukaryotischen Zelllinie Vero. Um eine ausreichend große Menge an Zellen für die Anzucht zu haben, wurde eine konfluente T75-Zellkulturflasche, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, behandelt und je 3 ml der Zellsuspension auf drei T175-Zellkulturflaschen, in denen 20 ml frisches Zellkulturmedium vorgelegt war, pipettiert. Dies entsprach näherungsweise einer 1/8-Verdünnung. Die drei Zellkulturflaschen wurden für drei bis vier Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen der drei konfluenten Zellkulturflaschen trypsiniert und die Zellsuspension gleichmäßig auf acht T175-Zellkulturflaschen bzw. 150 mm-Zellkulturschalen mit jeweils 15 ml frischem vorgelegtem Zellkulturmedium verteilt. Dies entsprach ungefähr einer 1/3-Verdünnung. Die acht Zellkulturflaschen bzw. Zellkulturschalen wurden im Anschluss für einen Tag im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und 15 ml frisches Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Danach blieben vier der acht T175-Zellkulturflaschen bzw. 150 mm-Zellkulturschalen unbehandelt. Diese nicht-infizierten Ansätze wurden im Anschluss auf die gleiche Weise wie die infizierten Ansätze behandelt und fungierten als Referenz für die Virusinfektion-Experimente in Kapitel 3.1.7. Die anderen vier Zellkulturflaschen/-schalen wurden mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 infiziert. Dafür wurden jeweils 250 μ l einer 1 ml-Virussuspension mit einem viralen Titer zwischen 2 und 5 x 10⁶ pfu/ml (engl. *plaque forming unit*) tröpfchenweise zu den Zellen der T175-Zellkulturflaschen bzw. 150 mm-Zellkulturschalen gegeben. Dabei wurden die Zellen mit einer MOI (engl. *multiplicity of infection*) zwischen 0,02 und 0,06 infiziert. Die MOI steht für das Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln zu den zu infizierenden Zellen. Eine MOI von 5 bedeutet, dass fünf infektiöse Viruspartikel auf eine zu infizierende Zelle treffen. Die vier unbehandelten und die vier infizierten Ansätze wurden geschwenkt und inkubierten für sechs Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Der Überstand wurde nach dieser Zeit

abgenommen. Auf die Zellen wurden 15 ml frisches Zellkulturmedium gegeben und die acht T175-Zellkulturflaschen bzw. 150 mm-Zellkulturschalen inkubierten für drei weitere Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Neun Tage nach Infektionsstart wurde der Überstand wieder abgenommen. Die virusfreien sowie virushaltigen Überstände von diesen beiden Zeitpunkten (6 und 9 dpi, engl. *day/s post infection*) wurden jeweils für 10 min bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert, um die abgelösten Zellen bzw. Zellbestandteile zu pelletieren. Im Anschluss wurden die Überstände entweder aliquotiert und bei -80 °C eingefroren, um sie für eine weitere Anzucht der Viren einzusetzen, oder mit Hilfe eines Konzentrators, wie in Kapitel 3.1.6 beschrieben, eingeeengt.

3.1.6 Ankonzentrierung von Rötelnviren

Da das RV in der eukaryotische Zelllinie Vero nur zu einem Titer zwischen 10⁵ und 10⁶ pfu/ml heranwächst, muss das Virus zur Verwendung in manchen Experimenten in einem zusätzlichen Schritt konzentriert werden, um einen viralen Titer zwischen 10⁷ und 10⁸ pfu/ml zu erreichen (Geyer *et al.*, 2016). Dafür kamen Vivaspin 20-Röhrchen als Konzentratoren zum Einsatz. Diese bestehen aus einer oberen und einer unteren Kammer mit einem Fassungsvermögen von jeweils 20 ml, die beide durch einen Filter mit einer Ausschlussgrenze von 300 kDa getrennt sind. 20 ml der bereinigten RV-freien bzw. RV-haltigen Überstände (siehe Kapitel 3.1.5) wurden in die obere Kammer des Vivaspin 20-Röhrchens gegeben und der Konzentrator für 10 min bei ca. 3000 x g und 4 °C zentrifugiert. Durch die Porengröße des Filters verbleibt das RV in der oberen Kammer. Das Filtrat aus der unteren Kammer wurde verworfen und das Retentat aus der oberen Kammer wurde mit Überstand wieder auf 20 ml aufgefüllt. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis der gesamte Überstand von ca. 60 ml auf 1 ml eingeeengt war. Daraufhin wurde das Retentat in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 7.200 x g zentrifugiert, um die verbliebenen festen Bestandteile abzutrennen. Als Referenz für die Virusinfektion-Experimente in Kapitel 3.1.7 wurden die RV-freien Überstände auf die gleiche Weise konzentriert und behandelt (DMEMc = DMEM konzentriert). Damit sollte kontrolliert werden, ob Komponenten des eingeeengten Zellkulturmediums Einfluss auf die zu untersuchenden Signalwege haben. Die RV-freien sowie -haltigen Konzentrate wurden mit einem Volumen von 50 bzw. 100 µl in die Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Um den Titer der Virussuspension zu bestimmen und um zusätzlich sicherzustellen, dass die RV-freien Konzentrate kein RV

enthalten, wurde der immuncolorimetrische Assay, wie in Kapitel 3.2.4 erläutert, durchgeführt.

3.1.7 Virusinfektion von eukaryotischen Zellen

Einen Tag vor der Infektion mit dem RV wurden die eukaryotischen Zelllinien (A549 und Vero) sowie die primären Zellen (HUVEC und HSaVEC) auf Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert und parallel mit DMEMc behandelt. Bei der Berechnung der MOI wurde berücksichtigt, dass sich die Zellzahl in 24 h verdoppelt hatte. Zur Infektion der Zelllinien wurde das RV und ein gleiches Volumen an DMEMc in serumfreien Zellkulturmedium (DMEM mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin) verdünnt. Für die Infektion der primären Zellen wurde das in Kapitel 2.3.2 beschriebene Zellkulturmedium zur Verdünnung des Virus sowie von DMEMc verwendet. Nach Zugabe des Virus bzw. von DMEMc inkubierten die Zellen für 2 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Danach wurden die DMEMc- bzw. RV-haltige Lösung von den Zellen abgesaugt und die Zellen bis zum entsprechenden Experiment mit frischem Zellkulturmedium im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Abhängig vom Zelltyp und verwendeten Format der Zellkulturplatten wurden verschiedene Mengen an Zellen ausgesät und unterschiedliche Volumina der Medien für die Aussaat/Kultivierung und Infektion der Zellen gewählt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Verwendete Zellzahl pro Vertiefung und Volumina bei der Kultivierung und Infektion der Zellen abhängig von Zelltyp und Format der Zellkulturplatten

Zelltyp	Format der Zellkulturplatte	Zellzahl pro Vertiefung	Volumen bei Kultivierung [µl]	Volumen bei Infektion [µl]
A549/Vero	6-Loch	$2,5 \times 10^5$	2.000	1.000
A549/Vero	12-Loch	$1,0 \times 10^5$	1.000	400
A549/Vero	96-Loch	$1,35 \times 10^4$	100	30
HUVEC/HSaVEC	6-Loch	$1,25 \times 10^5$	2.000	1.000
HUVEC/HSaVEC	12-Loch	$0,5 \times 10^5$	1.000	400
HUVEC/HSaVEC	96-Loch	$0,7 \times 10^4$	100	30

3.1.8 Lyse von eukaryotischen Zellen

Der Aufschluss von eukaryotischen Zellen durch Lyse ist für die Analyse der zellulären Proteine und deren posttranslationalen Modifikationen mittels SDS-PAGE und Western Blot (siehe 3.2.2/3.2.3) essenziell. Dafür wurde das Zellkulturmedium der in den Zellkulturplatten kultivierten Zellen abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Für die Lyse wurde RIPA-Puffer (engl. *radioimmunoprecipitation assay*), dem ein Proteaseinhibitor-Cocktail (Verdünnung: 1/100) zugesetzt war, auf den Zellrasen gegeben. Der sich ablösende Zellrasen wurde abgekratzt und das Zelllysate wurde im Anschluss komplett in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit der Nuklease *Benzonase*[®] für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde pro 100 µl Zelllysate 0,5 µl Enzym zugegeben. Durch Zentrifugation für 2 min bei 13.200 rpm wurden die Zelltrümmer pelletiert und das Zelllysate wurde bei -20 °C eingefroren. Abhängig vom Zelltyp und von dem verwendeten Format der Zellkulturplatten wurden unterschiedliche Volumina vom RIPA-Puffer für die Lyse der Zellen eingesetzt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Verwendete Volumina des RIPA-Puffers abhängig von Zelltyp und Format der Zellkulturplatten

Zelltyp	Format der Zellkulturplatte	Volumen des RIPA-Puffers [µl]
A549/Vero	6-Loch	200
A549/Vero	12-Loch	100
HUVEC/HSaVEC	6-Loch	150
HUVEC/HSaVEC	12-Loch	75

3.1.9 Zellviabilitätstest

Für die Bestimmung der Zellviabilität von eukaryotischen Zellen wurde das *PrestoBlue*[®]-Zellviabilitätsreagenz von *Thermo Scientific* verwendet. Dabei handelt es sich um eine Lösung mit blauem Resazurin, welches die Membran einer lebenden Zelle passieren kann und durch die reduzierenden Bedingungen in einer lebenden Zelle irreversibel zum rosa-farbenen, fluoreszierenden Resorufin umgesetzt wird. Dieser intrazelluläre Umsatz dient als Maß für die Zellviabilität und kann mittels Absorptions- oder Fluoreszenzmessungen quantifiziert werden.

Der Einfluss verschiedener MAPK-Inhibitoren (U0126, SB202190 und SP600125) und eines NF-κB-Inhibitors (SC75741) auf die Viabilität der eukaryotischen Zelllinie A549 bzw. den

primären Zellen HUVEC sollte im Kontext einer RV-Infektion getestet werden. Dafür wurden die Zellen einen Tag vor der Infektion mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 auf eine 96-Lochplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben, infiziert oder mit DMEMc behandelt. Beim Mediumwechsel nach der Infektion wurden 90 µl Zellkulturmedium, welches entweder mit DMSO oder dem entsprechenden Inhibitor versetzt war, auf die Zellen gegeben und die Zellen bis zur Durchführung des Zellviabilitätstest im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Referenz für die Hintergrund-Absorption der Platte und des Mediums wurden Vertiefungen ohne Zellen mit DMSO- bzw. Inhibitorhaltigem Medium parallel mitgeführt. Für die Messung der Zellviabilität wurden 1 h vor dem Messzeitpunkt 10 µl *PrestoBlue*[®]-Zellviabilitätsreagenz direkt in das Zellkulturmedium einer jeden Vertiefung gegeben und die Zellkulturplatte nach kurzem Schwenken im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Messzeitpunkt wurde mit Hilfe des Photometers *FLUOstar Omega* die Absorption einer jeden Vertiefung bei 570 und 600 nm gemessen. Bei 600 nm liegt das Absorptionsmaximum vom Edukt Resazurin. Wird Resazurin durch metabolisch aktive Zellen umgesetzt, kann das Produkt Resorufin bei einer Wellenlänge von 570 nm detektiert werden. Bei der Auswertung wurde daher für jede Vertiefung die Absorption bei 600 nm von der Absorption bei 570 nm abgezogen. Von diesen Werten wurde im Anschluss zudem die Mediumskontrolle mit DMSO bzw. Inhibitor subtrahiert. Abschließend wurden die korrigierten Werte der Zellen, die mit DMEMc und DMSO behandelt wurden, als Referenz für die korrigierten Werte der anderen Ansätze verwendet. Dafür wurde bei den DMEMc- sowie DMSO-behandelten Zellen idealisiert von einer Zellviabilität von 100 % ausgegangen.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 BCA-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate (siehe Kapitel 3.1.8), die für die einheitliche Beladung der Gele bei der SDS-PAGE erforderlich war, wurde der Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) durchgeführt. Die Methode basiert darauf, dass unter alkalischen Bedingungen Peptidbindungen Cu²⁺-Ionen komplexieren (Biuret-Reaktion) und zu Cu⁺-Ionen reduzieren. Die Menge an reduzierten Kupferionen ist dabei proportional zur Menge an Proteinen in der Lösung. Die Cu⁺-Ionen bilden in einem weiteren Schritt mit der

Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex, der photometrisch durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert wird. Diese Farbreaktion ermöglicht durch den Vergleich mit einem Proteinstandard die Quantifizierung der Proteinkonzentration des entsprechenden Zelllysats.

Für die hier beschriebenen Experimente wurden das *Pierce Micro BCA™ Protein Assay Kit* und das *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* verwendet. Vor dem Assay wurde die BCA-Lösung entsprechend des Herstellerprotokolls frisch angesetzt. Der BCA-Assay wurde auf einer sterilen 96-Lochplatte mit Flachboden durchgeführt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe (2000/1000/500/200/100/50/25/12,5/0 µg/ml) des Proteins BSA erzeugt und je 10 µl pro Vertiefung aufgetragen. Die Proteinproben wurden mit PBS 1/10 sowie 1/2 verdünnt und ebenfalls 10 µl pro Vertiefung aufgetragen. Es wurden außer für die 1/2-Verdünnung jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Im Anschluss wurden 100 µl der BCA-Lösung zu jeder Vertiefung gegeben und die 96-Lochplatte für 30 bis 40 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Platte kurz geschwenkt und mit Hilfe des Photometers *FLUOstar Omega* die Absorption bei 562 nm gemessen. Aus den Absorptionswerten der BSA-Verdünnungsreihe wurde eine Regressionsgerade berechnet, mit deren Hilfe die Proteinkonzentration des entsprechenden Zelllysats ermittelt wurde.

3.2.2 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren, um Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer molaren Masse zu trennen. Dabei dient ein Gel aus Polyacrylamid als Matrix. Dieses bildet sich durch radikalische Polymerisation aus den Edukten Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. Die Reaktion wird durch Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet und durch N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert. Vor der Trennung der Proteine müssen diese zuvor denaturiert werden. Dafür werden die Proben in einem SDS- und β-Mercaptoethanol-haltigem Probenpuffer aufgeköcht. Die zugeführte Hitze dient dazu, die nicht-kovalenten Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken-Bindungen sowie hydrophobe und ionische Wechselwirkungen, die für die Ausbildung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine verantwortlich sind, zu lösen. Das im Probenpuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, was zum einen die Eigenladung der Proteine überdeckt, sodass diese eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen. Zum anderen verhindert das SDS nach der

Denaturierung, dass sich die Proteine teilweise oder vollständig zurückfalten. Damit hält das SDS die denaturierten Proteine in ihrer linearen Form, die für die Auftrennung im elektrischen Feld essenziell ist. Das β -Mercaptoethanol sorgt aufgrund der stark reduzierenden Eigenschaften für die Spaltung der kovalenten Disulfidbrücken und unterstützt dadurch die vollständige Denaturierung der Proteine. Sind die Proteine vollständig denaturiert und besitzen ein konstantes Ladungs-/Masse-Verhältnis, ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel aufgrund des Molekularsiebeffekts der Gelporen umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts. Dadurch lassen sich die Proteine aufgrund ihrer molaren Masse auftrennen. Mit Hilfe eines Proteinmarkers, der verschiedene Proteine unterschiedlicher, aber bekannter Größe enthält, lässt sich die Größe der aufgetrennten Proteine im Gel abschätzen.

Die in den Experimenten verwendeten vertikalen Gele basieren auf einer Trennung der Proteine durch diskontinuierliche Elektrophorese. Diese Diskontinuität beruht darauf, dass der Sammelgel- und Trenngelpuffer unterschiedliche pH-Werte und das Sammel- und Trenngel unterschiedliche Porengröße besitzen. Die aufbereiteten Proteinproben laufen zuerst in ein großporiges Sammelgel mit einem pH-Wert von 6,8 ein. Dort sammeln sich alle Proteine unabhängig von ihrem Molekulargewicht an einer Lauffront. Sobald dieser Proteinstapel auf das deutlich engmaschigere Trenngel mit einem pH-Wert von 8,8 trifft, werden die Proteine noch weiter aufgestaut und liegen enger beieinander. Im Trenngel werden die unterschiedlich großen Proteine dann aufgrund der kleinen Poren nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die diskontinuierliche Elektrophorese verbessert auf diese Weise die Auflösung der Proteinbanden.

Für die SDS-PAGE wurden einen Tag vor dem Experiment SDS-Polyacrylamidgele gegossen. Dafür wurde die kurz vor der Polymerisation stehende Trenngellösung (12 %) zwischen eine Glasplatte und eine Keramikplatte pipettiert, die in einer Gelapparatur fixiert und auf beiden Seiten mit Abstandshaltern (engl. *spacer*) abgedichtet waren, und mit destilliertem Wasser überschichtet, um für eine glatte Trenngelgrenze zu sorgen. Die Polymerisation des Gels war nach ca. 10 bis 15 min abgeschlossen. Das Wasser wurde abgegossen und die im Zwischenraum verbliebenen Wasserreste mit Papiertüchern und Filterpapieren aufgenommen. Im Anschluss wurde die kurz vor der Polymerisation stehende Sammelgellösung (5 %) auf das Trenngel pipettiert und der Kamm zur Erzeugung der

Probentaschen in das Sammelgel gesteckt. Nach 2 bis 10 min war die Polymerisation abgeschlossen. Um eine Austrocknung während der Lagerung zu vermeiden, wurden die hergestellten Gele in mit Wasser angefeuchteten Papiertüchern eingewickelt, in eine Plastiktüte verpackt und über Nacht im 4 °C-Kühlschrank gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Gele für die SDS-PAGE vorbereitet. Dafür wurde vorsichtig der Kamm gezogen und Gelreste in den Probentaschen mit dem Skalpel entfernt. Das Gel wurde anschließend in eine Laufkammer gespannt und mit 1x SDS-Laufpuffer umspült. Mögliche Luftblasen und in die Probentaschen gespülte Gelreste wurden entfernt. Die Zellysate (siehe 3.1.8) wurden aufgetaut, für 5 min bei 13.200 rpm zentrifugiert und die benötigten Volumen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden unter dem Abzug mit *Roti-Load 1*, einem 4x konzentriertem Probenpuffer, versetzt, sodass der Probenpuffer in jeder Probe einfach vorlag. Im Anschluss wurden die Ansätze für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und für 2 min bei 13.200 rpm zentrifugiert. Das aufzutragende Volumen wurde so gewählt, dass pro Probentasche 40 µg Protein (siehe 3.2.1) eingesetzt wurden. In seltenen Fällen wurden auch 30 µg, wenn die Proteinkonzentrationen zu gering waren, oder 60 µg pro Probentasche, wenn Zellysate konzentrierter waren, verwendet. Zur Beladung der SDS-Polyacrylamidgele wurden 4 µl vom Proteinmarker *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* oder *PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)* und die entsprechenden Volumen der zu analysierenden Proteinproben in die Probentaschen pipettiert. Um Diffusionseffekte zu minimieren, wurde die Elektrophorese schnellstmöglich gestartet. Zum Einlaufen der Proben wurde eine Spannung zwischen 80 und 100 V angelegt. War die Lauffront als distinkte Bande erkennbar, wurde für die Restdauer des Experiments eine Spannung zwischen 120 und 136 V gewählt. Je nach gewünschtem Auftrennungsgrad dauerte die SDS-PAGE 2 bis 3 h. Die Zusammensetzung der 12 % Trenn- und 5 % Sammelgele ist in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der 12 % Trenn- und 5 % Sammelgele für die SDS-PAGE

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

3.2.3 Western Blot

Beim Western Blot werden die aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel (siehe 3.2.2) in einem elektrischen Feld auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Dabei wandern die Proteine aufgrund ihrer durch das SDS erzeugten negativen Ladung von der Kathode zur Anode und werden aufgrund hydrophober Wechselwirkungen auf der PVDF-Membran immobilisiert. Die gebundenen Proteine können im Anschluss durch spezifische Antikörper (Primärantikörper) selektiv markiert werden. Durch die Interaktion mit dem Fc-Teil des Primärantikörpers wird der Sekundärantikörper immobilisiert. An diesem ist das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) gebunden, welches die Detektion des zu untersuchenden Proteins ermöglicht. Dabei katalysiert die HRP die Reduktion der in der Detektionsreagenz enthaltenen Peroxide. Die bei der Reaktion freigesetzten Protonen oxidieren das ebenfalls in der Detektionsreagenz enthaltene Luminol, was als Chemilumineszenz gemessen werden kann. Die Lichtmenge ist dabei proportional zur Menge an Antigen-gebundenen Antikörpern, was eine relative Quantifizierung der immobilisierten Proteine erlaubt. Der Nachweis der Chemilumineszenz-Signale ist unter anderem durch das Auflegen eines Röntgenfilms möglich.

In dieser Arbeit erfolgte der Transfer der Proteine mit Hilfe des *Semi-Dry-Blot*-Verfahrens. Dafür wurden *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell*-Kammern (*Bio-Rad*) verwendet. Während der SDS-PAGE wurden die PVDF-Membran sowie zwei Filterpapiere etwas größer als das Trenngel (9 x 9 cm) zurechtgeschnitten. Im Anschluss wurde die Membran für 15 s in Methanol aktiviert, für 2 min in destilliertem Wasser gewaschen und für 5 min in Western Blot-Transferpuffer equilibriert. Die zwei Filterpapiere und das Trenngel wurden ausschließlich in Western Blot-Transferpuffer inkubiert. Danach erfolgte die Schichtung des Stapels in der Blotkammer. Da der Transfer von der Kathode (oben) zur Anode (unten) verläuft, wurden die verschiedenen Schichten von oben nach unten wie folgt angeordnet: Filterpapier, Trenngel, PVDF-Membran und Filterpapier. Anschließend wurden Luftblasen aus dem Stapel entfernt, um eine Unterbrechung des Stromflusses an diesen Stellen zu vermeiden. Für den Transfer der Proteine wurde für 60 min ein elektrisches Feld von 0,8 mA pro cm² angelegt. Die Spannung war zu Beginn bei ca. 4 V und stieg während des Western Blots auf ungefähr 16 V an. Nach dem Transfer wurden die Blot-Kammer sowie der Stapel wieder auseinandergelassen und die Membran getrocknet. Anschließend wurde die Membran für 15 s in Methanol reaktiviert und für 2 min in destilliertem Wasser gewaschen. Um freie

unspezifische Bindungsstellen der Antikörper auf der Membran abzusättigen, wurde diese für 1 h bei Raumtemperatur in Blockpuffer II inkubiert. Danach wurden die zu untersuchenden Proteine mit den entsprechenden Primärantikörpern markiert. Dafür wurde der Primärantikörper in 3 ml Blockpuffer II verdünnt, auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C vorsichtig auf dem Schüttler geschwenkt. Die verwendeten Primärantikörper kamen ausschließlich aus dem Kaninchen sowie der Maus und wurden unterschiedlich verdünnt eingesetzt (siehe Tabelle 5). Am nächsten Tag wurde die Primärantikörper-Lösung wieder abgenommen und im Kühlschrank zur wiederholten Anwendung (max. dreimal) gelagert. Die markierte Membran wurde dreimal für je 5 min mit PBS-T_{0,05} gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem in 5 ml Blockpuffer II verdünnten Sekundärantikörper auf dem Schüttler für 1 h bei Raumtemperatur. Die verwendeten Sekundärantikörper waren aus der Ziege (Ziege-gegen-Kaninchen-HRP, interne Nummer 9, Verdünnung: 1/5.000 bis 20.000) oder aus dem Pferd (Pferd-gegen-Maus-HRP, interne Nummer 159, Verdünnung: 1/3.000). Um verbliebene Reste an unspezifisch gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal für je 5 min mit PBS-T_{0,05} gewaschen. Zusätzlich wurde die Membran zweimal für je 5 min mit PBS gewaschen, um die Menge an Tween-20 zu verringern. Für die Detektion der Chemilumineszenz-Reaktion wurden bei schwachen Signalen das Reagenz *Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Substrate (Roche/Sigma-Aldrich)* bzw. bei sehr starken Signalen das Reagenz *Luminata Forte Western HRP Substrate (Merck/Millipore)* verwendet. Das erste Reagenz bestand aus zwei einzelnen Lösungen, der *Luminol/Enhancer-* und *Stable Peroxide Solution*, die zu gleichen Teilen zusammengegeben wurden. Die zweite Detektionslösung konnte direkt auf die Membran gegeben werden. Beide Reagenzien inkubierten für 5 min auf der Membran, um die Chemilumineszenz-Reaktion zu starten. Dafür wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Überschüssiges Reagenz wurde nach der Inkubation am Folienrand mit Papiertüchern abgenommen. Die Chemilumineszenz wurde mit Hilfe von Röntgenfilmen detektiert. Je nach Stärke des zu detektierenden Chemilumineszenz-Signals musste der Film für wenige Sekunden oder mehrere Stunden aufgelegt werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die zu detektierenden Signale nicht überexponiert waren. Die Entwicklung und Fixierung der Filme erfolgte automatisch in den Entwicklungsmaschinen *Agfa Curix 60* und *Agfa CP 1000*. Die erhaltenen Röntgenfilme wurden mit Hilfe des Scanners *HP Scanjet G4050* digitalisiert.

Methoden

Für die Färbung weiterer Proteine wurde die Membran einmal kurz mit PBS gewaschen und anschließend für 5 bis 15 min mit dem *Restore™ Western Blot Stripping Buffer* (Thermo Scientific) behandelt, um die gebundenen Antikörper der vorangegangenen Färbung von der Membran zu entfernen. Nachdem die Membran im Anschluss zweimal für je 5 min mit PBS gewaschen wurde, wurde sie, wie oben beschrieben, wieder abgesättigt und erneut mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt.

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper für den Western Blot mit den entsprechenden Verdünnungen

Antigen des Primärantikörpers	Wirtsspezies	Verdünnung
Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	1/1.000
ERK1/2	Kaninchen	1/2.000
Phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	Kaninchen	1/1.000
p38	Kaninchen	1/1.000
Phospho-JNK (Thr183/Tyr185)	Kaninchen	1/1.000
JNK	Kaninchen	1/1.000
Phospho-IκBα (Ser32)	Kaninchen	1/1.000
IκBα	Maus	1/1.000
Phospho-p65 (Ser536)	Kaninchen	1/1.000
p65	Kaninchen	1/2.000
PUMA	Kaninchen	1/500
COX-2	Kaninchen	1/5.000
Phospho-ATF2 (Thr71)	Kaninchen	1/1.000
ATF2	Kaninchen	1/1.000
Phospho-MK2 (Thr222)	Kaninchen	1/1.000
MK2	Kaninchen	1/1.000
Phospho-c-Jun (Ser63)	Kaninchen	1/1.000
Phospho-c-Jun (Ser73)	Kaninchen	1/1.000
c-Jun	Kaninchen	1/1.000
A20/TNFAIP3	Kaninchen	1/1.000
ciAP1	Kaninchen	1/1.000
ciAP2	Kaninchen	1/1.000
XIAP	Kaninchen	1/1.000
GAPDH	Kaninchen	1/20.000
RV-E1	Maus	1/500

3.2.4 Immuncolorimetrischer Assay

Der immuncolorimetrische Assay (ICA) ist eine Methode, um die Anzahl an infektiösen Viruspartikeln in einem definierten Volumen zu bestimmen. Daraus lässt sich der Titer einer Virussuspension berechnen. Das Verfahren basiert auf dem Nachweis der Expression viraler Proteine mittels RV-spezifischer Antikörper in infizierten Zellen. Die Suspensionen aus Kapitel 3.1.5 und 3.1.6 wurden auf diese Weise titriert.

Für den Assay wurden Vero-Zellen einen Tag vor der Infektion auf eine 48-Lochplatte ausgesät, sodass der Zellrasen am nächsten Tag zu 80 bis 90 % konfluent war. Vor der Infektion wurde auf einer separaten 48-Lochplatte eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Suspension vorbereitet. Für die Verdünnungsreihe wurden in jede Vertiefung 450 µl serumfreies Zellkulturmedium vorgelegt. Anschließend wurden 50 µl der zu untersuchenden Suspension in die erste Vertiefung einer Reihe pipettiert, um eine Verdünnung von 10^{-1} herzustellen. Durch Überpipettieren von 50 µl aus der vorangegangenen Vertiefung in die nächste Vertiefung der Reihe wurde eine weitere Verdünnungsstufe (10^{-2}) generiert. Dies wurde bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} wiederholt. War das Volumen der zu untersuchenden Suspension kleiner als 50 µl und/oder der zu erwartende Virustiter größer als 10^8 pfu/ml, wurde vor der ersten Verdünnungsreihe eine separate 1/10-Vorverdünnung in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß hergestellt. Für die Infektion wurde das alte Zellkulturmedium von den Vero-Zellen abgesaugt und 100 µl von der jeweiligen Virusverdünnung auf die entsprechende Vertiefung gegeben. Die 48-Lochplatte mit den Zellen inkubierte für 2 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Im Anschluss wurden die Zellen, ohne dass die zu untersuchende Suspension abgesaugt wurde, mit 500 µl Carboxymethylcellulose-Overlay (CMC-Overlay) überschichtet. Die Inkubation erfolgte für sechs Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Für die Fixierung der Zellen wurde der CMC-Overlay abgesaugt, die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 200 µl 2 % Paraformaldehyd (PFA) behandelt. Die Inkubation der 48-Lochplatte erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Fixierungslösung abgesaugt und die fixierten Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen. Um die Zellen für die Inkubation mit den Antikörpern zu permeabilisieren, wurde zu jeder Vertiefung 200 µl -20 °C kaltes Methanol (100 %) gegeben. Die 48-Lochplatte wurde für eine Inkubation von 10 min in den -20 °C-Tiefkühler gestellt. Danach erfolgte ein weiterer Waschschriff mit kaltem PBS. Um freie unspezifische Bindungsstellen der Antikörper auf und in den Zellen abzusättigen, wurden

diese für 30 min bei Raumtemperatur mit 200 µl Blockpuffer I auf dem Schüttler inkubiert. Die Lösung wurde im Anschluss verworfen und die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur mit 100 µl Primärantikörperlösung behandelt. Dafür wurde der gegen das virale Capsid-Protein gerichtete monoklonale Primärantikörper C66496M (*Meridian*) aus der Maus 1/2.000 in Blockpuffer I verdünnt. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit PBS-T_{0,1}. Um die Markierung mit dem Primärantikörper zu detektieren, wurden 100 µl der Sekundärantikörpersuspension zu jeder Vertiefung gegeben. Der Sekundärantikörper Ziege-gegen-Maus, an den das Enzym Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt war, wurde dafür 1/1.000 in Blockpuffer I verdünnt. Die Inkubation mit der Sekundärantikörperlösung erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS-T_{0,1} gewaschen. Für den Nachweis des viralen Capsid-Proteins in den infizierten Zellen wurden 100 µl des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substrat (TMB-Substrat) zu jeder Vertiefung pipettiert. Durch die am Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase wurde die Reduktion von Peroxiden katalysiert. Die sich bildenden Protonen sorgten im Anschluss für die Oxidation des farblosen TMB-Substrats, was als Farbumschlag nachweisbar war. Das blaue Produkt, welches am Ort der Umsetzung präzipitierte, konnte anschließend an den Stellen im Zellrasen beobachtet werden, an denen der Antikörper-Peroxidase-Komplex gebunden hatte und folglich das virale Capsid-Protein exprimiert wurde. Die 48-Lochplatte wurde für 5 bis 60 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler geschwenkt, bis die blaugefärbten Plaques im Zellrasen sichtbar waren. Das restliche TMB-Substrat wurde verworfen und die Vertiefungen mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet. Anschließend wurden die Plaques in den verschiedenen Verdünnungsstufen ausgezählt.

Um den Titer des RV in der Suspension zu bestimmen, wurde idealerweise angenommen, dass jeder gebildete Plaque auf genau ein infektiöses Viruspartikel zurückgeht. Diese Annahme wurde durch die Überschichtung des Zellrasens mit viskosem CMC-Overlay ermöglicht, der eine Ausbreitung der freigesetzten Viren mittels Diffusion über die gesamte Vertiefung verhinderte. Damit blieb die initiale Infektion auf die direkte Umgebung des Zellrasens begrenzt und konnte als einzelner Plaque ausgezählt werden. Unter Berücksichtigung der entsprechenden Verdünnungen und des bei der Infektion eingesetzten Volumens konnte aus der Anzahl der Plaques pro Vertiefung auf die Anzahl der infektiösen Viruspartikel in der zu untersuchenden Virussuspension geschlossen werden. Der Virustiter wurde als pfu/ml angegeben.

3.2.5 Caspase-Glo 3/7 Assay

Der *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay von *Promega* ist ein Lumineszenz-basierter Assay zur Messung der Aktivität von Caspase-3 und -7 in Zellkultur. Das Reagenz enthält unter anderem das luminogene Caspase-3/7-Substrat Z-DEVD-Aminoluciferin, welches die Caspase-3/7-spezifische Erkennungssequenz DEVD enthält. Sind die Caspasen-3/7 aktiv, so wird diese Zielsequenz vom Aminoluciferin abgespalten. Durch das ebenfalls im Reagenz enthaltene Enzym Luciferase wird das freigesetzte Aminoluciferin in einer zweiten Reaktion in lumineszierendes Oxyluciferin umgesetzt. Die Lumineszenz ist dabei proportional zur Aktivität der Caspasen-3/7.

Für diesen Assay wurden einen Tag vor der Infektion mit dem RV, wie in Kapitel 3.1.7 aufgeführt, $1,35 \times 10^4$ A549-Zellen bzw. $0,7 \times 10^4$ HUVEC pro Vertiefung auf eine weiße 96-Lochplatte ausgesät. Dabei wurde für jeden Messzeitpunkt eine separate 96-Lochplatte verwendet. Außerdem wurden zur Bestimmung der Hintergrund-Lumineszenz Vertiefungen mit Medium ausgelegt. Um die Morphologie des Zellrasens sowie den Verlauf der Infektion zu überprüfen, wurde parallel zu den weißen Zellkulturplatten eine durchsichtige 96-Lochplatte mitgeführt, die während des Assays auf die gleiche Weise behandelt wurde. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Als Positivkontrolle für die Caspase-3/7-Aktivierung fungierten Zellen, die für 24 h mit $1 \mu\text{M}$ Staurosporin, einem Apoptose-induzierenden Alkaloid, stimuliert wurden. Nach der Infektion wurde die Infektionslösung abgesaugt und die Zellen bekamen frisches Zellkulturmedium oder Zellkulturmedium mit DMSO bzw. entsprechendem Inhibitor. Bis zum Messzeitpunkt inkubierten die 96-Lochplatten im Brutschrank bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$. Für die Messung der Caspase-3/7-Aktivität wurden die Zellen wieder aus dem Brutschrank genommen und aus jeder Vertiefung $50 \mu\text{l}$ Zellkulturmedium verworfen. Anschließend wurde zu jeder Vertiefung $50 \mu\text{l}$ CaspaseGlo-3/7-Reagenz gegeben. Dieses induzierte die Lyse der Zellen, setzte damit die Caspasen frei und ermöglichte die oben beschriebenen Reaktionen. Im Anschluss wurde die 96-Lochplatte auf dem Plattenschüttler für 30 s bei 600 rpm geschwenkt und danach bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Lumineszenz erfolgte am Photometer *FLUOstar Omega* nach 30 min Inkubation. Bei der Auswertung wurde zunächst die Lumineszenz des entsprechenden Mediums als Hintergrund von den zu untersuchenden Proben abgezogen. Anschließend wurden die RV-infizierten Zellen mit den DMEMc-behandelten Zellen ins

Verhältnis gesetzt, um die n-fache Aktivierung der Caspasen-3/7 durch das RV zu bestimmen. Die Experimente wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

3.2.6 Reportergen Assay

Um die Aktivität von spezifischen Promotoren zu untersuchen, kann ein Reportergen Assay durchgeführt werden. Die Expression eines Reportergens wie z.B. Luciferase, β -Galaktosidase oder alkalischer Phosphatase steht dabei unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promotors. Wird dieser durch die Bindung eines Transkriptionsfaktors wie NF- κ B aktiviert, wird das Reportergen transkribiert und das Reporterprotein hergestellt. Durch die Zugabe eines spezifischen Substrats kann die Aktivität des Enzyms als freigesetzte Lumineszenz oder colorimetrisch gemessen werden. Dabei ist die Aktivität des Promotors bzw. die Expression des Reportergens proportional zur Lumineszenz oder zur Absorption.

Der in dieser Arbeit durchgeführte Reportergen Assay diente dazu, die Aktivität des NF- κ B-abhängigen IFN- β -Promoters im Kontext einer RV-Infektion zu bestimmen. Dieser war auf einem Expressionsplasmid kodiert und regulierte die Expression des Reportergens *firefly*-Luciferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (Visvanathan und Goodbourn, 1989). Zusätzlich wurde ein Plasmid verwendet, welches für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. Aufgrund des CMV-Promotors wird dieses Reportergen konstitutiv exprimiert und dient daher zur Überprüfung der Transfektionseffizienz. Beide Plasmide wurden mittels Transfektion, wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, in die A549-Zellen eingebracht. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen, wie in 3.1.7 erläutert, infiziert und für 48 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Messzeitpunkt wurden die Zellen aus dem Brutschrank genommen und zweimal mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu lysieren, wurden pro Vertiefung 200 μ l *Reporter Lysis Buffer* gegeben und die 12-Lochplatte für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der lysierte Zellrasen wurde im Anschluss von der Oberfläche der Vertiefung abgeschabt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach 15 s Vortexen wurden die festen Bestandteile durch Zentrifugation bei 13.200 rpm für 2 min pelletiert. Um die Aktivität der Luciferase zu bestimmen, wurde das *ONE-Glo™ Luciferase Assay System (Promega)* verwendet. Dafür wurden 50 μ l Lysat in eine weiße 96-Lochplatte pipettiert und 50 μ l *ONE-Glo Buffer*, ein Puffer mit dem Substrat 5'-Fluoroluciferin, dazugegeben. Durch die Aktivität der Luciferase wird das Substrat zum lumineszierenden Oxyluciferin umgesetzt. Die Messung der freigesetzten Lumineszenz erfolgte sofort nach Zugabe des Substrats am Photometer

FLUOstar Omega. Um die Aktivität der β -Galaktosidase zu detektieren, wurde das β -Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer (*Promega*) genutzt. Dafür wurden 50 μ l Lysat in eine durchsichtige 96-Lochplatte vorgelegt und 50 μ l *Assay 2x Buffer*, der Substratpuffer für die β -Galaktosidase-Reaktion, dazupipettiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min auf dem Schüttler bei 37 °C. Durch Zugabe von 150 μ l 1 M Natriumcarbonatlösung wurde die Enzymreaktion angehalten. Der β -Galaktosidase-abhängige Umsatz des farblosen Substrats o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) in Galaktose und das gelbgefärbte Produkt o-Nitrophenol wurde als Absorption bei einer Wellenlänge von 420 nm mit Hilfe des Photometers *FLUOstar Omega* gemessen. Bei der Auswertung des Reportergen Assays wurden die Hintergrund-korrigierten Lumineszenz-Messwerte durch die zugehörigen Absorptions-Messwerte geteilt und damit normalisiert. Um die n-fache Aktivierung von NF- κ B durch das RV zu berechnen, wurde der normalisierte Wert eines RV-infizierten Ansatzes mit dem normalisierten Wert eines DMEMc-behandelten Ansatzes ins Verhältnis gesetzt.

4. Ergebnisse

Die RV-abhängige Beeinflussung der MAPK-Signalkaskaden und des NF- κ B-Signalwegs wurde durch eine Genexpressionsanalyse von RV-infizierten primären Endothelzellen fetalen und adulten Ursprungs nachgewiesen (Geyer *et al.*, 2016). Diese Signalwege spielen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung und der Inhibition der Apoptose, die als Hauptgrund für die teratogene Wirkung des Pathogens diskutiert wird. Inwieweit das RV die zellulären Signalkaskaden modifiziert und welchen Einfluss die Signalwege auf das Wachstum des RV sowie auf die RV-induzierte Apoptose haben, ist jedoch völlig unklar. In dieser Arbeit sollte daher der Einfluss des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK, den kanonischen NF- κ B-Signalweg sowie die Apoptose in immortalisierten Zelllinien sowie in primären Endothelzellen fetalen und adulten Ursprungs näher untersucht werden.

4.1 Charakterisierung der RV-Infektion in immortalisierten Zelllinien

4.1.1 Einfluss des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK

Zu Beginn der Arbeit wurde untersucht, ob das RV die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK durch die duale Phosphorylierung im konservierten Threonin-X-Tyrosin-Motiv der MAPK aktiviert. Dafür wurde die immortalisierte Zelllinie A549, die in der Virologie als Modellzellen verwendet werden und bei denen es sich um humane Lungenepithelzellen handelt, einen Tag vor der Infektion ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit DMEMc behandelt oder mit dem teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den Zeitpunkten 0, 24, 32, 48, 56, 72, 80 und 96 hpi wurden die A549-Zellen lysiert. Die Proteine in den Lysaten wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe des Western Blots auf eine PVDF-Membran transferiert und untersucht (siehe 3.2.2/3.2.3). Die duale Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 (44/42 kDa), p38 (ca. 40 kDa) und JNK (46 und 54 kDa) wurde durch Phospho-MAPK-spezifische Antikörper nachgewiesen. Um die gesamte Menge der entsprechenden MAPK zu detektieren, wurden Antikörper verwendet, deren Epitop unabhängig vom Phosphorylierungsgrad der Kinase erkannt wird, sodass sowohl die phosphorylierte als auch die nicht-phosphorylierte Form der MAPK nachweisbar waren. Als Beladungskontrolle wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, 37 kDa), ein konstitutiv exprimiertes Enzym der Glykolyse, mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers markiert. Zur Überprüfung der Infektion mit dem RV wurde das virale

Glykoprotein E1 (ca. 60 kDa) gefärbt. Alle verwendeten Primärantikörper wurden mittels HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender Chemilumineszenz nachgewiesen.

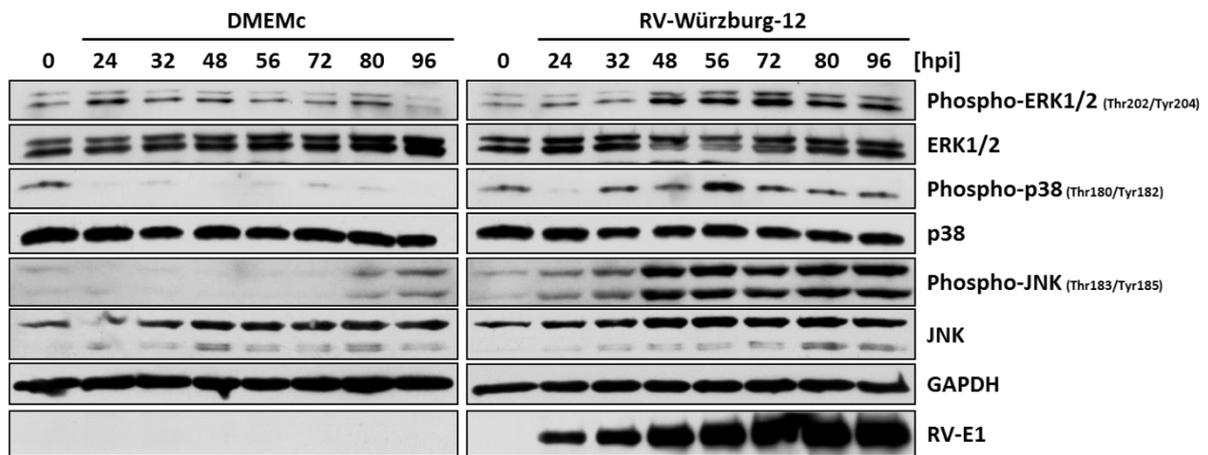


Abbildung 8: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 auf die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK in A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probentaste aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), ERK1/2, Phospho-p38 (Thr180/Tyr182), p38, Phospho-JNK (Thr183/Tyr185), JNK, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Wie in Abbildung 8 gezeigt ist, war in den DMEMc-behandelten Zellen eine schwache basale Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 vorhanden. Wurden die Zellen mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 infiziert, stieg jedoch die Phosphorylierung von ERK1/2 48 hpi an und blieb im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen bis 96 hpi erhöht. Die Menge an ERK1/2 war in den DMEMc-behandelten Zellen über den gesamten Zeitraum des Experimentes konstant. In den infizierten Zellen war die Menge an ERK1/2 zwischen 0 und 32 hpi konstant, nahm zwischen 48 und 72 hpi ab und war zu den Zeitpunkten 80 und 96 hpi wieder konstant. Dabei konnte die Reduktion von ERK1/2 parallel zur Zunahme der Phosphorylierung beobachtet werden. Dies könnte auf zelluläre Prozesse zurückzuführen zu sein, die durch Verringerung der Menge an ERK1/2 versuchen, der starken Phosphorylierung der Kinase

entgegenzuwirken. In DMEMc-behandelten Zellen konnte nur zum Zeitpunkt 0 hpi eine schwache Phosphorylierung der MAPK p38 beobachtet werden. Zwischen 24 und 96 hpi war die basale Phosphorylierung der Kinase jedoch kaum detektierbar. In infizierten Zellen erhöhte sich die Menge an phosphoryliertem p38 32 hpi bis zu einem Maximum bei 56 hpi und ging zu den späteren Zeitpunkten wieder auf das Level von 32 und 48 hpi zurück. Die Gesamtmenge an p38 war in DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen über den gesamten Zeitraum des Versuches gleich. Eine schwache Phosphorylierung der MAPK JNK konnte in den nicht-infizierten Zellen erst 80 und 96 hpi nachgewiesen werden. Nach der Infektion mit dem Wildtypstamm zeigte sich jedoch bereits 24 hpi eine Zunahme der Phosphorylierung von JNK, die sich bis zu den Zeitpunkten 48 und 56 hpi noch weiter erhöhte und bis 96 hpi annähernd konstant hoch blieb. In DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen war die Menge von JNK über die gesamte Dauer des Experiments gleich. Ebenso zeigten sich bei der Beladungskontrolle GAPDH konstante Banden. Das Virusprotein E1 war 24 hpi nur in den infizierten Zellen detektierbar und akkumulierte über die Dauer der Infektionskinetik. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Infektion von A549-Zellen mit dem teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 die duale Phosphorylierung und somit die Aktivierung der drei konventionellen MAPK ERK1/2, p38 und JNK induziert. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die RV-ausgelöste Phosphorylierung von ERK1/2 mit einer Abnahme der Gesamtmenge an ERK1/2 einhergeht.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Aktivierung der drei MAPK um einen RV-spezifischen oder RV-Stamm-spezifischen Effekt handelt, wurden die A549-Zellen zusätzlich mit dem Labor-adaptierten, nicht-teratogenen Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert und das Experiment, wie oben beschrieben, auf die gleiche Weise wie für den Wildtypstamm durchgeführt.

Ergebnisse

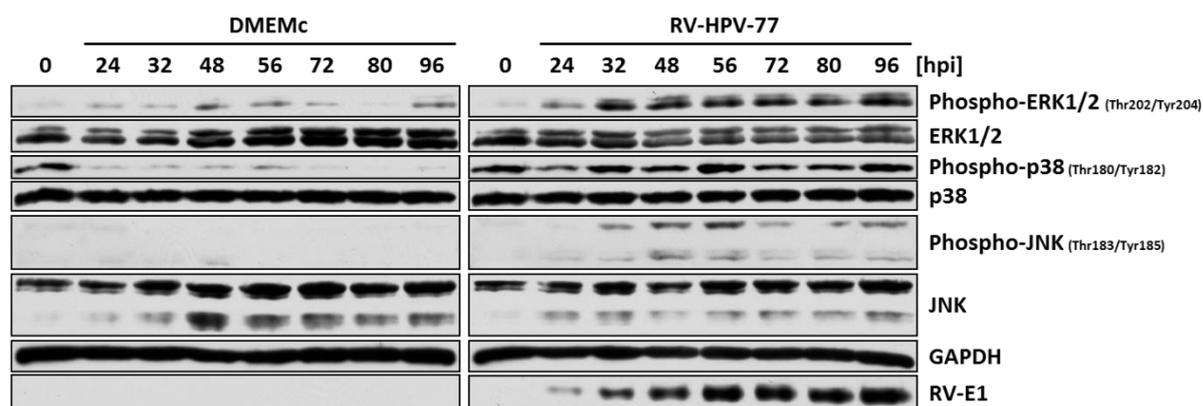


Abbildung 9: Einfluss des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK in A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probentaste aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), ERK1/2, Phospho-p38 (Thr180/Tyr182), p38, Phospho-JNK (Thr183/Tyr185), JNK, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Es zeigt sich in Abbildung 9, dass in den DMEMc-behandelten Zellen eine schwache basale Phosphorylierung von ERK1/2 nachweisbar war. Nach der Infektion mit dem Labor-adaptierten RV-Stamm konnte die Zunahme der Phosphorylierung der MAPK 24 hpi beobachtet werden, die ab 32 hpi über die gesamte Dauer des Experiments konstant hoch blieb. In den DMEMc-behandelten Zellen war die Menge an ERK1/2 24 und 32 hpi etwas verringert, jedoch zu jedem späteren Zeitpunkt annähernd gleich. Eine konstante Menge an ERK1/2 konnte ebenfalls in den infizierten Zellen zwischen 0 und 32 hpi detektiert werden. 48 hpi wurde aber eine leichte Abnahme der Menge an ERK1/2 beobachtet, die bis zum Zeitpunkt 96 hpi auf einem konstanten Level blieb. Dieser Effekt trat ebenso bei der Infektion mit dem Wildtypstamm auf (siehe Abbildung 8). Die Phosphorylierung von p38 in den nicht-infizierten Zellen war bis auf dem Zeitpunkt 0 hpi kaum detektierbar. Durch die Infektion mit RV-HPV-77 kam es im Vergleich zu den DMEMc-behandelten Zellen ab 24 hpi zur Zunahme der Phosphorylierung von p38, die eine maximale Aktivierung 56 hpi zeigte und zwischen 72 und 96 hpi leicht zurückging. Die Menge an p38 war in den DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen zu jedem Zeitpunkt gleich. In den DMEMc-behandelten

Zellen konnte keine Phosphorylierung von JNK detektiert werden. Das RV-HPV-77 induzierte jedoch die Aktivierung von JNK, sodass ab Zeitpunkt 32 hpi für den gesamten Zeitraum des Versuches eine vermehrte Phosphorylierung von JNK beobachtbar war. Die maximale Phosphorylierung von JNK konnte 56 hpi gesehen werden. Während des Versuches war die Menge an JNK in DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen annähernd vergleichbar. Auch die GAPDH-Banden deuteten auf eine gleichmäßige Beladung der Geltaschen hin. Das virale E1-Protein konnte nur in den RV-HPV-77-infizierten Ansätzen detektiert werden, stieg bis 56 hpi an und blieb auf einem konstanten Level bis 96 hpi. Folglich führte die Infektion mit dem Labor-adaptierten, nicht-teratogenen Stamm RV-HPV-77 ebenso zur Aktivierung der drei konventionellen MAPK ERK1/2, p38 und JNK, sodass das RV unabhängig vom Virusstamm die MAPK aktiviert. Außerdem konnte wie für den Wildtypstamm eine Abnahme der Gesamtmenge an ERK1/2 während der Infektion beobachtet werden.

Der Einfluss des RV auf die drei MAPK wurde in einer weiteren immortalisierten Zelllinie untersucht. Damit sollte sichergestellt werden, dass die beobachtete Aktivierung der Kinasen durch das RV nicht nur in den A549-Zellen präsent ist, sondern auch in einer weiteren Zelllinie induzierbar ist. Dazu wurden Vero-Zellen, bei denen es sich um Nierenzellen aus der grünen Meerkatze handelt, einen Tag vor der Infektion ausgesät und am darauffolgenden Tag mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Die Durchführung des Versuchs erfolgte auf die gleiche Weise, wie es im oberen Abschnitt für die A549-Zellen beschrieben wurde.

Ergebnisse

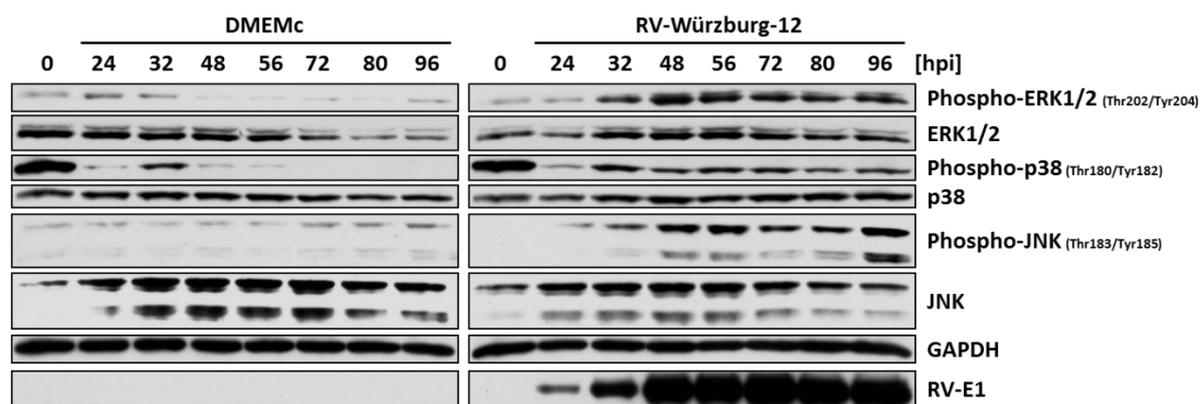


Abbildung 10: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 auf die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK in Vero-Zellen

Vero-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probentaste aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), ERK1/2, Phospho-p38 (Thr180/Tyr182), p38, Phospho-JNK (Thr183/Tyr185), JNK, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Wie in Abbildung 10 gezeigt, war eine sehr schwache Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 in den DMEMc-behandelten Zellen nur 24 und 32 hpi nachweisbar. Nach Infektion mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 kam es jedoch 32 hpi zur Aktivierung der Kinase. Die Phosphorylierung von ERK1/2 stieg bis zum Zeitpunkt 48 hpi an und ging anschließend wieder leicht zurück. Die Gesamtmenge an ERK1/2 war in nicht-infizierten Zellen zwischen den Zeitpunkten 0 und 56 hpi annähernd gleich, nahm jedoch zu den Zeitpunkten 72, 80 und 96 hpi wieder ab. In den infizierten Zellen war die Menge an ERK1/2 zu den Zeitpunkten 0 sowie 24 hpi geringer und stieg 32 hpi auf ein konstantes Level, was bis zum Ende des Versuches konstant blieb. Für die MAPK p38 konnte eine starke Phosphorylierung zu Beginn des Experiments (0 hpi), also vor der Zugabe von DMEMc und des RV, beobachtet werden. In den DMEMc-behandelten Zellen ging diese 24 hpi wieder zurück und stieg 32 hpi kurzzeitig wieder an. Zwischen 48 und 96 hpi konnten jedoch nur sehr schwache bzw. keine Banden detektiert werden. Der Verlauf der Phosphorylierung von p38 war zwischen 0 und 32 hpi in den nicht-infizierten sowie infizierten Zellen annähernd gleich. Eine vermehrte Phosphorylierung von p38 konnte aber in den infizierten Zellen zwischen 48 und 96 hpi

nachgewiesen werden. Die Menge an p38 war dabei in beiden Ansätzen und zu allen Zeitpunkten gleich. In den DMEMc-behandelten Zellen konnten nur sehr schwache Banden für die phosphorylierte MAPK JNK detektiert werden. Durch die Infektion kam es jedoch 32 hpi zur Zunahme der Phosphorylierung von JNK. Diese Aktivierung war zu allen späteren Zeitpunkten immer höher als in den nicht-infizierten Zellen. Die Menge an JNK war in den DMEMc-behandelten bzw. RV-infizierten Zellen annähernd konstant. Die Beladungskontrolle GAPDH war in beiden Ansätzen zu jedem Zeitpunkt gleich. Das virale E1-Protein wurde 24 hpi in den infizierten Zellen nachgewiesen und stieg bis 48 hpi an. Bis zum Zeitpunkt 96 hpi blieb die Menge des Virusproteins konstant. Somit führte die Infektion von Vero-Zellen mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 ebenfalls zur vermehrten Phosphorylierung der drei konventionellen MAPK ERK1/2, p38 und JNK, sodass das Virus nicht nur in humanen A549-Zellen, sondern auch in Vero-Zellen aus dem Affen diese Signalkaskaden induziert. Eine Abnahme der Menge an ERK1/2 nach der Infektion, wie es in den A549-Zellen nachweisbar war, konnte in den Vero-Zellen jedoch nicht beobachtet werden und scheint ein Zelltyp-spezifischer Effekt zu sein.

4.1.2 Einfluss des RV auf den kanonischen NF- κ B-Signalweg

Zusätzlich zur Aktivierung der MAPK wurde untersucht, ob das RV den kanonischen NF- κ B-Signalweg in A549-Zellen beeinflusst. Um zu überprüfen, ob es zur Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade durch eine RV-Infektion kommt, wurde zunächst die Phosphorylierung am Ser32 sowie die Gesamtmenge des zellulären NF- κ B Inhibitors I κ B α analysiert. Zudem wurde die Phosphorylierung von p65 am Ser536, ein Marker für die Transaktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, untersucht. Für dieses Experiment wurden A549-Zellen einen Tag vor der Infektion ausgelegt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit DMEMc behandelt oder mit dem teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Die Lyse der Zellen erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Die in den Lysaten befindlichen Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE separiert und mittels Western Blot auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Für die Detektion der Phosphorylierungen von I κ B α und p65 wurden Phospho-spezifische Antikörper eingesetzt. Die Gesamtmenge der beiden Faktoren wurde mit Hilfe von Antikörpern bestimmt, deren Epitop unabhängig von der Phosphorylierung des zu untersuchenden Proteins war. Als Beladungskontrolle fungierte GAPDH. Der Verlauf der Infektion war über den Nachweis des RV-spezifischen E1-Proteins

nachvollziehbar. Die Detektion der markierten Proteine wurde, wie in Kapitel 3.2.3 erläutert, durchgeführt.

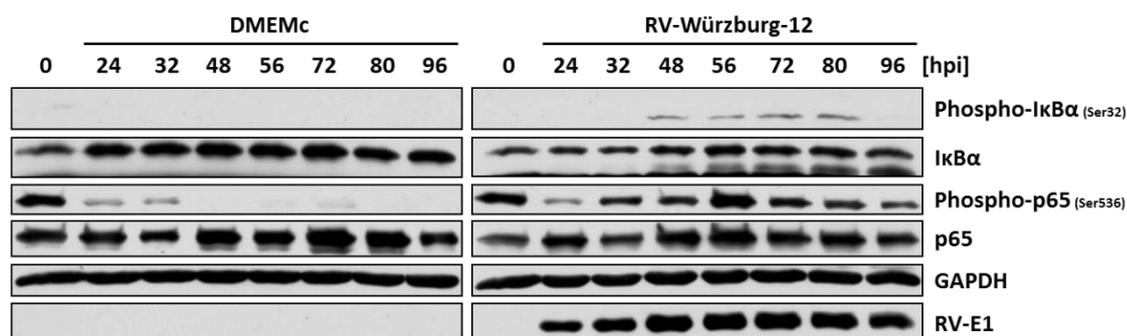


Abbildung 11: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 auf die Phosphorylierung von IκBα und p65 in A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probentaste aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen Phospho-IκBα (Ser32), IκBα, Phospho-p65 (Ser536), p65, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die Daten für Phospho-IκBα (Ser32) und IκBα stammen von einem Experiment. Die Daten für Phospho-p65 (Ser536), p65, GAPDH und RV-E1 sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Wie sich in Abbildung 11 zeigt, wurde keine Phosphorylierung von IκBα am Ser32 in den DMEMc-behandelten Zellen beobachtet. Nach Infektion mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 konnte jedoch eine schwache Phosphorylierung von IκBα am Ser32 zwischen 48 und 80 hpi detektiert werden. Die Menge an IκBα war in den nicht-infizierten Zellen zu jedem Zeitpunkt gleich. Dabei wurde nur die obere von zwei möglichen Banden detektiert. In den infizierten Zellen war bei der Betrachtung der oberen Banden die Menge an IκBα ebenfalls konstant. Beim Vergleich von nicht-infizierten und infizierten Zellen zeigte sich, dass die Menge an IκBα in den infizierten Zellen deutlich geringer war. Dies könnte auf die proteasomale Degradierung des NF-κB Inhibitors während der RV-Infektion hindeuten. Außerdem konnte eine weitere IκBα-Bande in den infizierten Zellen detektiert werden, die während der SDS-PAGE unterhalb der regulären IκBα-Bande, aber auf der Höhe des phosphorylierten IκBα lief. Diese konnte nur zwischen 48 und 96 hpi detektiert werden und geht wahrscheinlich ausschließlich auf die phosphorylierte Form des IκBα zurück. Kommt es

nämlich zur Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs, wird I κ B α am Ser32 phosphoryliert und anschließend schrittweise degradiert, was die Abnahme des Molekulargewichts von I κ B α in den infizierten Zellen erklären könnte. Ein weiterer Nachweis für die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs ist die Zunahme der Phosphorylierung der NF- κ B-Untereinheit p65 am Ser536. Zum Zeitpunkt 0 hpi wurde eine starke Phosphorylierung von p65 detektiert. In den DMEMc-behandelten Zellen war die Phosphorylierung von p65 24 und 32 hpi nur noch schwach nachweisbar und verschwand zwischen 48 und 96 hpi vollständig. Beim Vergleich mit den infizierten Zellen zeigte sich 32 hpi eine RV-abhängige Zunahme der Phosphorylierung von p65 bis zu einem Maximum bei 56 hpi. Zwischen 72 und 96 hpi nahm die Menge an phosphoryliertem p65 dann wieder leicht ab. Die Gesamtmenge an p65 schwankte während des Experimentes zwischen den Zeitpunkten. Beim direkten Vergleich der einzelnen Zeitpunkte von DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen zeigte sich jedoch, dass die Menge an p65 für den jeweiligen Zeitpunkt annähernd konstant war und die zeitliche Variation nicht auf die RV-Infektion zurückging. Die GAPDH-Banden waren während des gesamten Versuches gleich, was auf eine gleichmäßige Beladung der Geltaschen hindeutete. Ausschließlich in den infizierten Zellen konnte das virale E1-Protein nachgewiesen werden. Folglich konnte damit gezeigt werden, dass der teratogene Wildtypstamm RV-Würzburg-12 den kanonischen NF- κ B-Signalweg in A549-Zellen aktiviert.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs auch durch den Labor-adaptierten, nicht-teratogenen Stamm RV-HPV-77 ausgelöst wird. Hierfür wurde die immortalisierte Zelllinie A549 einen Tag vor der Infektion ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit DMEMc behandelt oder mit dem RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Im Anschluss wurde der Versuch, wie im oberen Abschnitt für den Wildtypstamm beschrieben, durchgeführt.

Ergebnisse

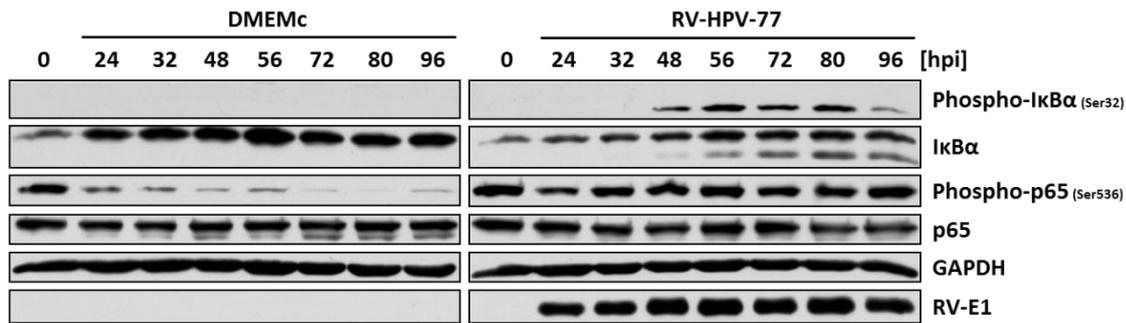


Abbildung 12: Einfluss des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Phosphorylierung von IκBα und p65 in A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probentaste aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen Phospho-IκBα (Ser32), IκBα, Phospho-p65 (Ser536), p65, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die Daten für Phospho-IκBα (Ser32) und IκBα stammen von einem Experiment. Die Daten für Phospho-p65 (Ser536), p65, GAPDH und RV-E1 sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass in den DMEMc-behandelten Zellen keine Ser32-Phosphorylierung von IκBα detektierbar war. Nach Infektion mit dem ehemaligen Impfstamm konnte jedoch eine Phosphorylierung von IκBα am Ser32 zwischen 48 und 96 hpi beobachtet werden. In den nicht-infizierten Zellen waren die Banden für IκBα zu jedem Zeitpunkt gleich, wobei nur die obere der beiden IκBα-Banden nachweisbar war. Die Menge an IκBα in den infizierten Zellen war bei der Betrachtung der oberen Bande annähernd konstant. Im Vergleich mit den nicht-infizierten Ansätzen zeigte sich jedoch eine deutlich verringerte Menge an IκBα zu jedem Zeitpunkt des Versuches, was auf den Abbau des Inhibitors nach Infektion mit dem RV-HPV-77 hindeuten könnte. Außerdem wurde in den infizierten Zellen eine zusätzliche IκBα-Bande unterhalb der regulären IκBα-Bande zwischen 48 und 96 hpi detektiert, die wahrscheinlich auf den Abbau der phosphorylierten Form von IκBα zurückzuführen ist. Die Phosphorylierung von p65 am Ser536 war zum Zeitpunkt 0 hpi sehr stark. In den DMEMc-behandelten Zellen nahm die Phosphorylierung zu den Zeitpunkten 24 und 32 hpi wieder ab und konnte zwischen 48 und 96 hpi nur noch sehr schwach detektiert werden. Nach Infektion mit dem RV-HPV-77 war die Menge an phosphoryliertem p65 zu jedem Zeitpunkt konstant hoch und im Vergleich mit den nicht-

infizierten Zellen immer erhöht. Die Gesamtmenge an p65 war in beiden Ansätzen zu jedem Zeitpunkt annähernd gleich. Die Beladung der Geltaschen war ebenfalls konstant, was an den gleichmäßigen GAPDH-Banden erkennbar war. Das virale E1-Protein konnte nur in den infizierten Zellen nachgewiesen werden. Somit induzierte der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 ebenfalls wie der Wildtypstamm in A549-Zellen die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs durch die Phosphorylierung sowie den anschließenden Abbau des I κ B α und die Phosphorylierung von p65. Dieser Effekt scheint RV-spezifisch und unabhängig vom entsprechenden Virusstamm zu sein.

Um zu quantifizieren, wie stark die beiden RV-Stämme den NF- κ B-Signalweg aktivieren, wurde ein NF- κ B-abhängiger Reporter-gen Assay durchgeführt. Dazu wurden A549-Zellen einen Tag vor der Transfektion ausgesät. Am nächsten Tag wurde der Transfektionsansatz für den Reporter-gen Assay (siehe 3.2.6) auf die Zellen gegeben. 24 h nach Transfektion wurden die A549-Zellen mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert und für 48 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. 4 h vor der Lyse wurden mit die Zellen mit TNF α , einem potenten Aktivator des NF- κ B-Signalwegs, stimuliert oder blieben die Zellen unstimuliert. Nach der Lyse der transfizierten und infizierten Zellen wurde die Aktivität der Luciferase sowie der β -Galaktosidase separat gemessen. Um die n-fache Aktivierung von NF- κ B durch das RV zu berechnen, wurden die RV-infizierten Ansätze mit dem DMEMc-behandelten Ansatz ins Verhältnis gesetzt.

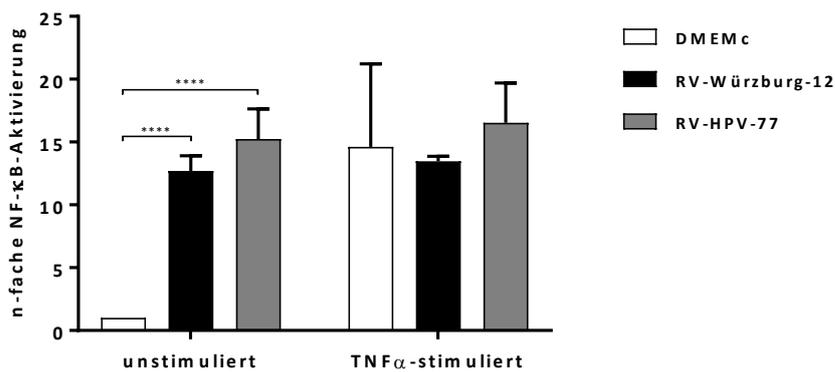


Abbildung 13: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die n-fache NF- κ B-Aktivierung in unstimulierten und TNF α -stimulierten A549-Zellen

A549-Zellen wurden einen Tag nach der Aussaat für 24 h mit p(PRDI1)5tk Δ (-39)lucifer (480 ng), pCMV- β Gal (70 ng) und pCMV-HA (1450 ng) transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Die Zellen inkubierten bis zur Lyse für 48 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. 4 h vor der Lyse blieben die Zellen unstimuliert oder wurden mit 100 ng/ml TNF α stimuliert. Nach der Lyse wurde die Aktivität der Luciferase sowie der β -Galaktosidase gemessen. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten. ****, p<0,0001; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 13 ist der Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die n-fache NF- κ B-Aktivierung in unstimulierten und TNF α -stimulierten A549-Zellen gezeigt. In den unstimulierten Zellen induzierte der Wildtypstamm eine signifikante, 13-fache Aktivierung von NF- κ B. Für den Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 konnte eine signifikante, 15-fache NF- κ B-Aktivierung beobachtet werden. Der Unterschied zwischen den beiden RV-Stämmen war statistisch nicht signifikant. Durch die Stimulation der Zellen mit TNF α wurde eine 15-fache NF- κ B-Aktivierung induziert. Diese war mit der Aktivierung durch das RV vergleichbar. In den TNF α -stimulierten Zellen löste die Infektion mit dem RV-Würzburg-12 und mit dem RV-HPV-77 im Vergleich zu den unstimulierten Zellen nur eine geringfügige Zunahme der n-fachen Aktivierung von NF- κ B aus. Dies deutete daraufhin, dass die Aktivierung von NF- κ B nach der Infektion mit den beiden RV-Stämmen mit der TNF α -Stimulation vergleichbar war. Folglich konnte mit Hilfe des NF- κ B-abhängigen Reportergen Assays gezeigt werden, dass die zwei verschiedenen RV-Stämme die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in A549-Zellen deutlich induzieren.

4.1.3 Einfluss des RV auf die Apoptose

In den nicht-humanen immortalisierten Zelllinien Vero, BHK-21 und RK13 wurde beobachtet, dass das RV Apoptose verursacht (Pugachev und Frey, 1998; Duncan *et al.*, 1999; Hofmann *et al.*, 1999; Megyeri *et al.*, 1999). Um zu bestimmen, ob das RV in den humanen A549-Zellen ebenfalls den programmierten Zelltod auslöst, wurde sowohl die Expression von PUMA, einem frühen Apoptose-Marker, als auch die Aktivität der Caspasen-3/7, ein Marker für die späte Apoptose, im Kontext einer RV-Infektion untersucht. Dafür wurden A549-Zellen einen Tag vor der Infektion ausgelegt. Am Tag darauf wurden die Zellen mit DMEMc behandelt oder mit dem teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Auftrennung der Proteine aus den Lysaten erfolgte mittels SDS-PAGE. Durch den Western Blot wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und immobilisiert. Die Markierung des zu untersuchenden Apoptose-Proteins PUMA, der Beladungskontrolle GAPDH und des RV-spezifischen E1-Proteins war mit Hilfe spezifischer Antikörper möglich. Die Detektion der markierten Proteine erfolgte, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

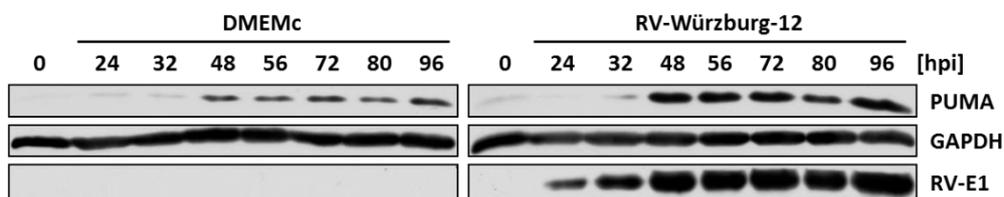


Abbildung 14: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 auf die Expression des frühen Apoptose-Markers PUMA in A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Proben tasche aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen PUMA, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundäntikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Abbildung 14 zeigt, dass sowohl zum Zeitpunkt 0 hpi als auch in den DMEMc-behandelten Zellen zu den Zeitpunkten 24 und 32 hpi nur eine sehr schwache Bande für den Apoptose-Marker PUMA nachgewiesen werden konnte. Die Menge an PUMA nahm in den DMEMc-

behandelten Zellen 48 hpi jedoch zu und blieb bis 96 hpi annähernd konstant. In den infizierten Zellen konnte zu den Zeitpunkten 24 und 32 hpi ebenfalls nur eine schwache Bande nachgewiesen werden, die in ihrer Intensität mit der jeweiligen Bande in den nicht-infizierten Zellen annähernd vergleichbar war. Die Expression von PUMA nahm jedoch 48 hpi deutlich zu und blieb bis zum Ende des Versuches auf dem hohen Niveau. Beim Vergleich mit den nicht-infizierten Zellen konnte festgestellt werden, dass in den infizierten Zellen die Menge an PUMA zwischen 48 und 96 hpi deutlich erhöht war. Die GAPDH-Banden waren während des gesamten Experimentes gleich. Das virale E1-Protein wurde nur in den infizierten Zellen nachgewiesen. Somit konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 die Expression des proapoptotischen Proteins PUMA in A549-Zellen induziert.

Um zu überprüfen, ob der Labor-adaptierte, nicht-teratogene Stamm RV-HPV-77 ebenfalls die Expression des Apoptose-Markers PUMA initiiert, wurden A549-Zellen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit dem RV-Stamm mit einer MOI von 5 infiziert. Der Versuch wurde im Anschluss, wie oben beschrieben, auf die gleiche Weise wie für den Wildtypstamm durchgeführt.

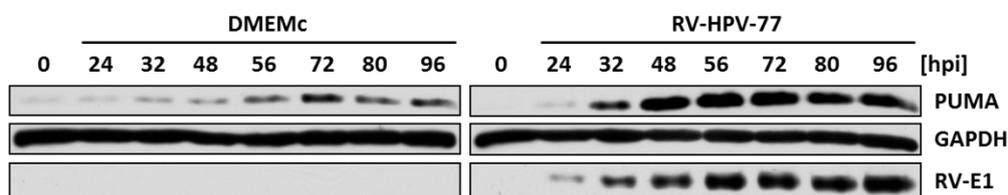


Abbildung 15: Einfluss des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Expression des frühen Apoptose-Markers PUMA in A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probentaste aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen PUMA, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass zum Zeitpunkt 0 hpi nur eine sehr schwache PUMA-Bande detektierbar war. In den DMEMc-behandelten Zellen nahm die Menge an PUMA

24 hpi bis zu einem Maximum bei 72 hpi kontinuierlich zu. Anschließend ging die Expression wieder zurück und war auf dem Niveau von Zeitpunkt 56 hpi. In den infizierten Zellen wurde 24 hpi eine schwache PUMA-Bande detektiert, dessen Intensität mit der PUMA-Bande in den nicht-infizierten Zellen zu diesem Zeitpunkt vergleichbar war. 32 hpi kam es zu einer deutlichen Zunahme der PUMA-Menge, die 48 hpi ihr Maximum erreichte und bis zum Zeitpunkt 96 hpi annähernd konstant war. Die Expression von PUMA war in den infizierten Zellen zwischen 32 und 96 hpi im Vergleich zu den DMEMc-behandelten Zellen deutlich gesteigert. Die GAPDH-Banden waren zu jedem untersuchten Zeitpunkt gleich. In den infizierten Zellen konnte das virale E1-Protein 24 hpi nachgewiesen werden, stieg bis zu einem Maximum bei 56 hpi an und blieb bis zum Zeitpunkt 96 hpi annähernd auf einem Niveau. Damit konnte festgestellt werden, dass auch der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 eine vermehrte Expression des proapoptotischen PUMA in A549-Zellen verursacht. Folglich scheint eine RV-Infektion die Induktion der frühen Apoptose zu begünstigen. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den beiden Virusstämmen identifiziert werden.

Anschließend sollte der Einfluss einer RV-Infektion auf die Aktivität der Caspasen-3/7, ein Marker für die späte Apoptose, untersucht werden. Dafür wurden A549-Zellen am Tag vor der Infektion ausgelegt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder mit dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert und bis zum Messzeitpunkt im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Messung der Aktivität der Caspasen-3/7 wurde der Lumineszenz-basierte *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay verwendet. Um die n-fache Aktivierung der beiden Caspasen durch das RV zu bestimmen, wurden die RV-infizierten Ansätze mit dem DMEMc-behandelten Ansatz ins Verhältnis gesetzt.

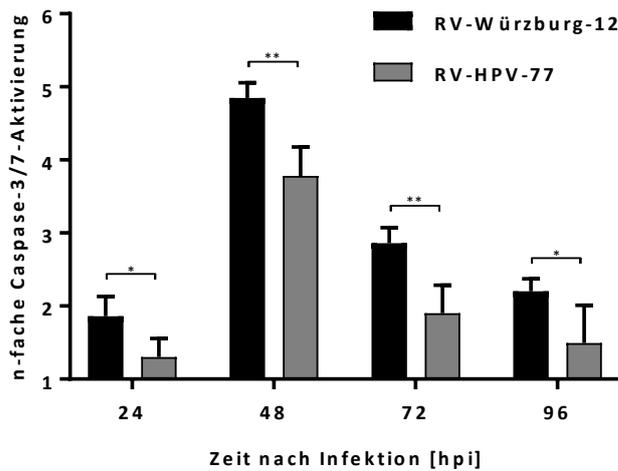


Abbildung 16: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die n-fache Caspase-3/7-Aktivierung in A549-Zellen

A549-Zellen wurden ausgesät und am nächsten Tag mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Caspasen-3/7 nach 30 min Inkubation mit dem Caspase-3/7-Substrat gemessen. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von vier unabhängigen Experimenten. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 16 ist der Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die n-fache Caspase-3/7-Aktivierung in A549-Zellen gezeigt. Nach Infektion mit dem Wildtypstamm konnte 24 hpi eine 2-fache Aktivierung der Caspase-3/7-Aktivität detektiert werden. Diese stieg 48 hpi auf eine 5-fache Aktivierung an und ging 72 hpi auf eine 3-fache Aktivierung zurück. 96 hpi wurde eine Aktivierung von mehr als das 2-fache beobachtet. In den RV-HPV-77-infizierten Zellen konnte für den Zeitpunkt 24 hpi nur eine schwache Aktivierung der Caspasen-3/7 von 1,4-fach detektiert werden. 48 hpi kam es zu einer 4-fachen Aktivierung der beiden Caspasen, die jedoch zum Zeitpunkt 72 hpi wieder zurückging und ungefähr bei einer 2-fachen Aktivierung lag. Zum Zeitpunkt 96 hpi war nur noch eine schwache, 1,5-fache Aktivierung der Caspasen-3/7 beobachtbar. Beim Vergleich der beiden Viren zeigte sich, dass die Aktivierung der späten Apoptose nach Infektion mit dem Wildtypstamm zu jedem Zeitpunkt signifikant höher war als in den RV-HPV-77-infizierten Zellen. Damit konnte zusammenfassend festgestellt werden, dass eine Infektion sowohl mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 als auch mit dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 die Zunahme der Aktivität der Caspasen-3/7 in A549-Zellen

verursacht. Folglich induzierte das RV neben der frühen, auch die späte Apoptose. Außerdem war die Aktivierung der Caspasen-3/7 durch den teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 in den A549-Zellen signifikant höher.

4.2 Charakterisierung der RV-induzierten ERK1/2-Aktivierung in A549-Zellen

Nachdem die RV-induzierte Aktivierung der MAPK ERK1/2 in humanen A549-Zellen gezeigt werden konnte (siehe 4.1.1), sollte der beobachtete Effekt genauer untersucht werden. Dazu sollte vom Inhibitor U0126, der hoch selektiv für die MAPKK MEK1 und MEK2 ist und dadurch den ERK1/2-Signalweg blockiert, eine geeignete Konzentration ermittelt werden, um die ERK1/2-Phosphorylierung in RV-infizierten Zellen zu hemmen. Die Zytotoxizität dieser Konzentration sollte im Anschluss in einem Zellviabilitätstest überprüft werden. Im Weiteren sollte zudem geklärt werden, welchen Einfluss die Hemmung des ERK1/2-Signalwegs auf das Wachstum des RV sowie auf die RV-induzierte Apoptose hat.

4.2.1 Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die Phosphorylierung von ERK1/2

Um eine optimale Konzentration des MEK1/2-Inhibitors U0126 zu bestimmen, bei der die RV-ausgelöste Phosphorylierung von ERK1/2 in den A549-Zellen hemmt wird, wurden die Zellen einen Tag vor der Infektion ausgesät und am nächsten Tag mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Wechsel des Infektionsmediums 2 hpi wurde zu den DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen frisches Zellkulturmedium gegeben, welches den Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 0, 10, 20 oder 40 μM enthielt. Die Zellen inkubierten bis zum Zeitpunkt 72 hpi im Brutschrank und wurden im Anschluss lysiert. Hierbei wurde bewusst ein späterer Zeitpunkt in der Infektion gewählt, bei dem eine starke Aktivierung der MAPK beobachtet werden konnte. Die zu untersuchenden Proteine wurden, wie in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben, aufgetrennt und detektiert.

Ergebnisse

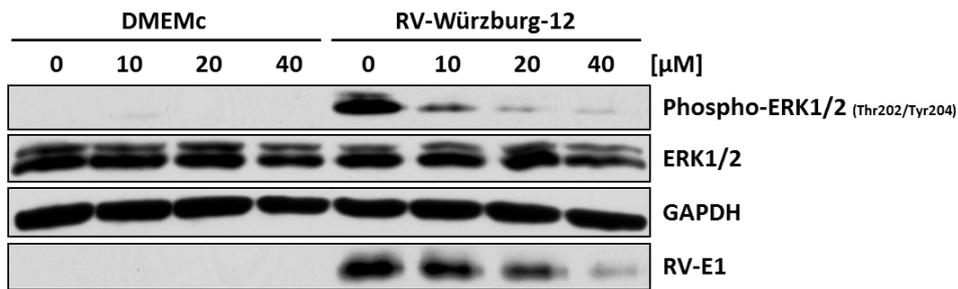


Abbildung 17: Einfluss verschiedener Konzentrationen des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 in A549-Zellen 72 hpi

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO (0 µM) oder den MEK1/2-Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 10, 20 oder 40 µM enthielt. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probestasche aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), ERK1/2, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

Wie sich in Abbildung 17 zeigt, konnte in den DMEMc-behandelten Zellen unabhängig von der verwendeten Konzentration des Inhibitors U0126 keine Phosphorylierung von ERK1/2 nachgewiesen werden. Durch die Infektion mit dem RV-Wildtypstamm konnte hingegen die Aktivierung der MAPK beobachtet werden. Wurden die infizierten A549-Zellen mit steigender Konzentration des Inhibitors U0126 behandelt, nahm die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 konzentrationsabhängig ab. Die stärkste Hemmung der Phosphorylierung konnte dabei bei einer Konzentration von 20 und 40 µM erreicht werden. Für die nachfolgenden Experimente wurde daher eine U0126-Konzentration von 20 µM eingesetzt. Die Menge an ERK1/2 war in den DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen bei jeder Konzentration des Inhibitors annähernd gleich. Zudem zeigte sich bei den GAPDH-Banden kein Unterschied, was auf eine konstante Beladung der Geltaschen hindeutete. Das E1-Protein des RV war nur in den infizierten Ansätzen detektierbar. Dabei nahm die Menge des viralen Proteins jedoch mit steigender Konzentration des Inhibitors U0126 ab. Es konnte gezeigt werden, dass die RV-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 mit Hilfe des MEK1/2-Inhibitors U0126 konzentrationsabhängig gehemmt wurde. Zusätzlich wurde beobachtet,

dass durch die Hemmung des MAPK-Signalwegs die Menge an viralem E1-Protein abnahm, was auf die Bedeutung des aktivierten ERK1/2-Signalwegs für die RV-Replikation hinweist.

4.2.2 Einfluss der ERK1/2-Inhibition auf die Zellviabilität

Nachdem eine geeignete U0126-Konzentration von 20 μ M ermittelt wurde, bei der die RV-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 gehemmt werden konnte, sollte im nächsten Schritt mit Hilfe des Zellviabilitätstest untersucht werden, inwieweit der MEK1/2-Inhibitor die Viabilität der DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen beeinflusst. Dazu wurden die Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. 2 hpi wurde das Infektionsmedium verworfen und frisches Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben, in dem DMSO oder 20 μ M U0126 enthalten war. Zu den Zeitpunkten 24, 48, 72, 96 und 144 hpi wurde mit Hilfe des *PrestoBlue*[®]-Reagenzes, wie in Kapitel 3.1.9 erläutert, die Viabilität der A549-Zellen bestimmt.

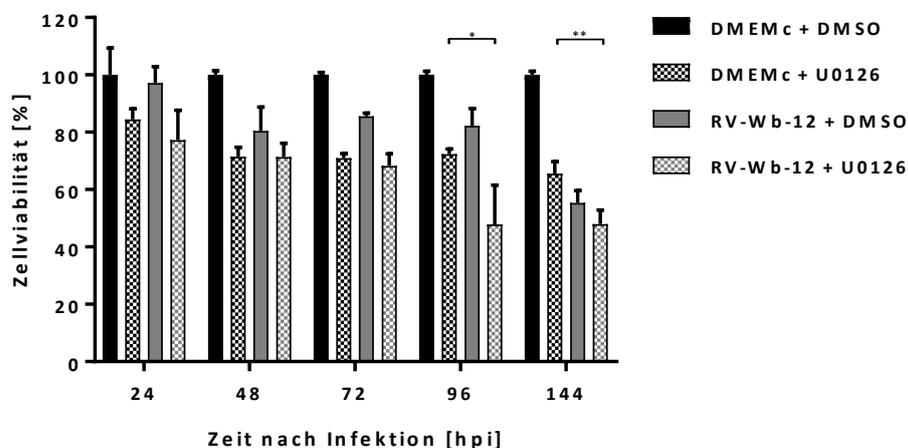


Abbildung 18: Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 (RV-Wb-12) mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den MEK1/2-Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 20 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mit Hilfe des *PrestoBlue*[®]-Reagenzes die Zellviabilität bestimmt. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. *, $p \leq 0,05$; **, $p < 0,01$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 18 ist gezeigt, wie der MEK1/2-Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 20 μM die Viabilität in DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen beeinflusst. In den DMEMc-behandelten Zellen, die den Inhibitor bekamen, konnte 24 hpi eine Abnahme der Viabilität von ca. 15 % beobachtet werden. Zwischen 48 und 96 hpi lag die Abnahme der Viabilität bei 30 %. Zum letzten Messzeitpunkt 144 hpi war die Viabilität der Zellen um 35 % reduziert. Damit verringerte eine U0126-Konzentration von 20 μM die Viabilität der A549-Zellen nur geringfügig. In den infizierten Zellen, die mit DMSO-haltigem Zellkulturmedium kultiviert wurden, war die Viabilität 24 hpi unverändert bei ca. 100 % und sank um ca. 20 % zu den Zeitpunkten 48, 72 und 96 hpi. 144 hpi war die Viabilität sogar um 45 % reduziert. Somit verursacht eine RV-Infektion ebenfalls eine Abnahme der Viabilität der A549-Zellen. In den infizierten Zellen, die den Inhibitor bekamen, war 24 hpi die Viabilität um etwas mehr als 20 % reduziert. Zu den Zeitpunkten 48 und 72 hpi nahm die Viabilität um ca. 30 % ab. Eine Reduktion von ungefähr 50 % konnte zu den letzten beiden Zeitpunkten detektiert werden. Damit nimmt die Viabilität in den infizierten Zellen, die mit U0126 behandelt wurden, ebenso ab. Beim Vergleich der DMEMc-behandelten mit den infizierten Zellen, die beide den Inhibitor bekamen, zeigte sich zwischen 24 und 72 hpi eine vergleichbare Viabilität, sodass die Abnahme der Viabilität zu diesen Zeitpunkten auf den Inhibitor zurückging und kein RV-spezifischer Effekt vermutet werden konnte. Bei den letzten beiden Zeitpunkten zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ansätzen. Dabei war die Viabilität in den infizierten Zellen, die mit MEK1/2-Inhibitor behandelt wurden, stärker reduziert als in den DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen, die mit DMSO-haltigem Zellkulturmedium kultiviert wurden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Aktivierung des proliferativen ERK1/2-Signalwegs für das RV zu diesen Zeitpunkten notwendig ist, um der Abnahme der Viabilität durch die virale Replikation entgegenzuwirken. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass eine U0126-Konzentration von 20 μM die Viabilität der A549-Zellen nur geringfügig senkte, weshalb diese Konzentration des Inhibitors in den nachfolgenden Experimenten verwendet wurde. Zudem scheint die RV-induzierte Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs, die Viabilität in den infizierten Zellen zu den späteren Zeitpunkten der Infektion zu erhöhen.

4.2.3 Einfluss der ERK1/2-Inhibition auf das Wachstum des RV

Welche Bedeutung der ERK1/2-Signalweg für das Wachstum des RV hat, sollte im nächsten Experiment untersucht werden. Hierfür wurden A549-Zellen, die einen Tag zuvor ausgesät worden waren, mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 bzw. mit dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. 2 hpi wurde das Infektionsmedium abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um während des Versuches nur die neugebildeten Virionen nachzuweisen. Im Anschluss wurde frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 20 μ M enthielt, auf die infizierten Zellen gegeben. Zu den Zeitpunkten 4, 24, 48, 72, 96 und 144 hpi wurde ein Teil des virushaltigen Zellkulturüberstandes abgenommen und mit Hilfe des immuncolorimetrischen Assays, der in 3.2.4 beschrieben wird, der Virustiter bestimmt.

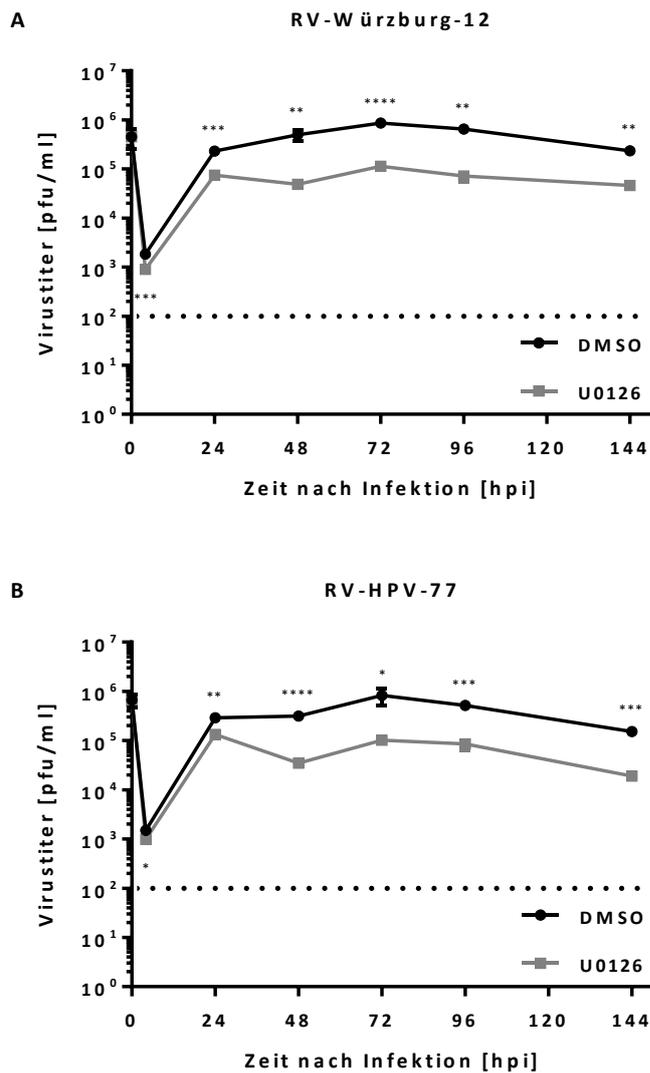


Abbildung 19: Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf das Wachstum des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 bzw. des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 in A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 (A) bzw. dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 (B) mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums und drei PBS-Waschschritten bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den MEK1/2-Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 20 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Teil des virushaltigen Zellkulturüberstandes abgenommen und mit Hilfe des immuncolorimetrischen Assays der Virustiter bestimmt. Die Detektionsgrenze des Assays lag bei 10² pfu/ml (gepunktete Linie). Die Graphen zeigen den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ****, p<0,0001; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 19 sind die Wachstumskurven für den Wildtypstamm RV-Würzburg-12 (Abbildung 19A) und den Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 (Abbildung 19B) unter dem

Einfluss von DMSO bzw. des MEK1/2-Inhibitors U0126 mit einer Konzentration von 20 μ M gezeigt. Zum Zeitpunkt 0 hpi wurde der Virustiter bestimmt, der im Infektionsmedium vorlag. Dabei zeigte sich, dass bei den verschiedenen Ansätzen die gleiche Menge an Virus auf die Zellen gegeben wurde. 4 hpi war nur eine geringe Virusmenge nachweisbar, da durch den langen Replikationszyklus des RV noch keine neuen Virionen durch die Zellen produziert wurden. Daher diente der Zeitpunkt zur Bestimmung der auf den Zellen verbliebenen Virusmenge. Bei der Betrachtung des ersten Graphen (Abbildung 19A) zeigte sich, dass RV-Würzburg-12 unter DMSO-Bedingungen 24 hpi zu einem Titer von über 10^5 pfu/ml anstieg, der bis zum Zeitpunkt 144 hpi konstant in einem Bereich von 10^5 bis 10^6 pfu/ml blieb. Das Maximum konnte 72 hpi detektiert werden. Wurden die RV-Würzburg-12-infizierten Zellen jedoch mit dem MEK1/2-Inhibitor U0126 behandelt, war der produzierte Titer zu jedem Zeitpunkt der Wachstumskurve signifikant niedriger und lag in einem Bereich von 10^4 bis 10^5 pfu/ml. Dabei konnte für die Zeitpunkte 48, 72 und 96 hpi ein deutlicher Unterschied von einer logarithmischen Stufe beobachtet werden, sodass zu diesen Zeitpunkten zehnfach weniger Virus nachgewiesen werden konnte. Beim RV-HPV-77 zeigte sich ein ähnlicher Verlauf (Abbildung 19B). Unter DMSO-Bedingungen stieg der Virustiter 24 hpi über 10^5 pfu/ml und blieb bis zum letzten Messzeitpunkt in einem Bereich von 10^5 bis 10^6 pfu/ml. Das Maximum war 72 hpi beobachtbar. In den RV-HPV-77-infizierten Zellen, die mit U0126 behandelt wurden, wuchs das Virus zu einem signifikant niedrigeren Titer, der in einem Bereich von 10^4 bis 10^5 pfu/ml lag. Dabei konnte zwischen 48 und 144 hpi ein Unterschied von einer logarithmischen Stufe beobachtet werden. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass durch die Hemmung der RV-induzierten ERK1/2-Aktivierung sowohl der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 als auch der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 signifikant weniger infektiöse Virionen aus den A549-Zellen freisetzen. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Unterschied im Virustiter auch durch die Abnahme der Viabilität durch den MEK1/2-Inhibitor U0126 verursacht werden könnte.

4.2.4 Einfluss der ERK1/2-Inhibition auf die RV-induzierte Apoptose

Um zu verstehen, welche Rolle der ERK1/2-Signalweg bei der RV-induzierten Apoptose spielt, sollte der Einfluss der ERK1/2-Inhibition auf die PUMA-Expression, die Caspase-3/7-Aktivität sowie die Abkugelung von toten Zellen genauer untersucht werden. Zur Analyse der PUMA-Expression wurden A549-Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit DMEMc

behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums wurde zu den DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen frisches Zellkulturmedium gegeben, welches den Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 0, 10, 20 oder 40 μM enthielt. 72 hpi wurden die Zellen lysiert und die zu untersuchenden Proteine, wie in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 erläutert, separiert und nachgewiesen.

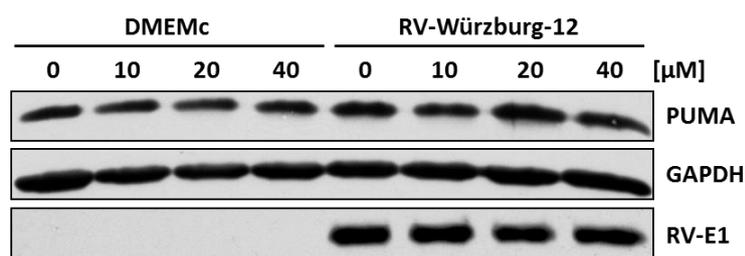


Abbildung 20: Einfluss verschiedener Konzentrationen des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Expression von PUMA in A549-Zellen 72 hpi

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO (0 μM) oder den MEK1/2-Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 10, 20 oder 40 μM enthielt. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 μg Protein pro Probentaste aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen PUMA, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Wie sich in Abbildung 20 zeigt, konnte in den DMEMc-behandelten Zellen eine basale Expression des proapoptotischen PUMA, die bei jeder verwendeten Konzentration von U0126 annähernd gleich war, beobachtet werden. Wurden die Zellen mit dem RV-Würzburg-12 infiziert, erhöhte sich die Menge an PUMA. Nach der Behandlung der infizierten Zellen mit U0126 konnte keine Veränderung der PUMA-Menge beobachtet werden. Die Banden für GAPDH waren für alle Ansätze gleich. Das virale E1-Protein konnte nur in den infizierten Zellen nachgewiesen werden. Folglich verursachte die ERK1/2-Inhibition in den A549-Zellen keine Veränderung der RV-induzierten PUMA-Expression 72 hpi.

Im nächsten Schritt sollte zur weiteren Untersuchung der RV-induzierten Apoptose die Aktivierung der Caspasen-3/7, ein Hinweis auf die Induktion der späten Apoptose, im

Kontext der Hemmung der MAPK ERK1/2 analysiert werden. Hierfür wurden A549-Zellen am Tag vor der Infektion ausgesät. Am Tag darauf wurden die Zellen mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums 2 hpi bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches DMSO bzw. 20 μ M U0126 enthielt. Bis zum entsprechenden Messzeitpunkt wurden die Lochplatten im Brutschrank inkubiert. Zur Messung der Aktivität der Caspasen-3/7 wurde der Lumineszenz-basierte *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.5).

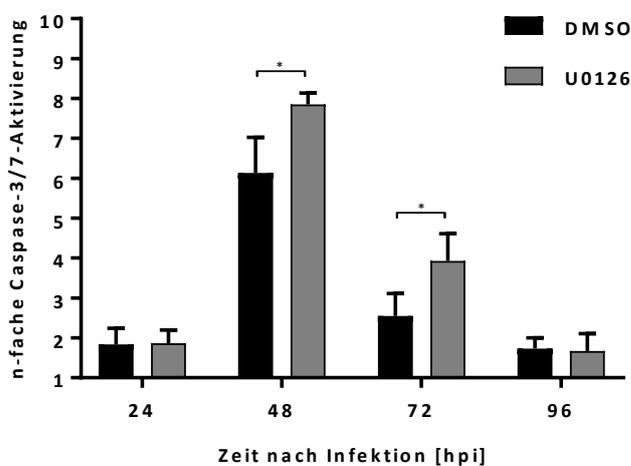


Abbildung 21: Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen

A549-Zellen wurden ausgesät und am nächsten Tag mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den MEK1/2-Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 20 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Caspasen-3/7 nach 30 min Inkubation mit dem Caspase-3/7-Substrat gemessen. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von vier unabhängigen Experimenten. *, $p \leq 0,05$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 21 ist der Einfluss der ERK1/2-Hemmung auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen gezeigt. Dabei konnte für die infizierten Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, ein leichter Anstieg der Caspase-3/7-Aktivierung um etwas weniger als das 2-fache 24 hpi beobachtet werden. 48 hpi stieg die Aktivierung um das 6-fache an, ging 72 hpi wieder auf annähernd das 3-fache zurück und war zum Zeitpunkt 96 hpi wieder auf dem Niveau von 24 hpi. Wurde zu den infizierten Zellen jedoch der MEK1/2-

Inhibitor gegeben und damit die RV-induzierte ERK1/2-Aktivierung gehemmt, konnte für die Zeitpunkte 48 bzw. 72 hpi eine 8- bzw. 4-fache Aktivierung der Caspasen-3/7 detektiert werden. Im Vergleich zu den infizierten Zellen, die Zellkulturmedium mit DMSO bekamen, zeigte sich dabei eine signifikante Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivierung. 24 und 96 hpi konnte kein Unterschied zwischen den DMSO- und U0126-behandelten infizierten Zellen nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der RV-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2 zu den Zeitpunkten 48 und 72 hpi die RV-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 erhöht. Dies könnte darauf hindeuten, dass das RV den aktivierten ERK1/2-Signalweg in den A549-Zellen benötigt, um die RV-abhängige Einleitung der Apoptose zu minimieren.

Im letzten Teil sollte der Einfluss der ERK1/2-Inhibition auf die Abkuglung von toten Zellen, als Maß für den späten Zelltod, im Kontext einer RV-Infektion untersucht werden. Hierfür wurden A549-Zellen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums wurde zu den DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen frisches Zellkulturmedium gegeben, welches den Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 0, 10, 20 oder 40 μ M enthielt. 72 hpi wurde der komplette Zellkulturüberstand abgenommen und die sich im Zellkulturüberstand-befindlichen Zellen pelletiert sowie resuspendiert. Mit Hilfe des Zellzählgerätes *LUNA* wurde die Anzahl an toten Zellen im Überstand bestimmt.

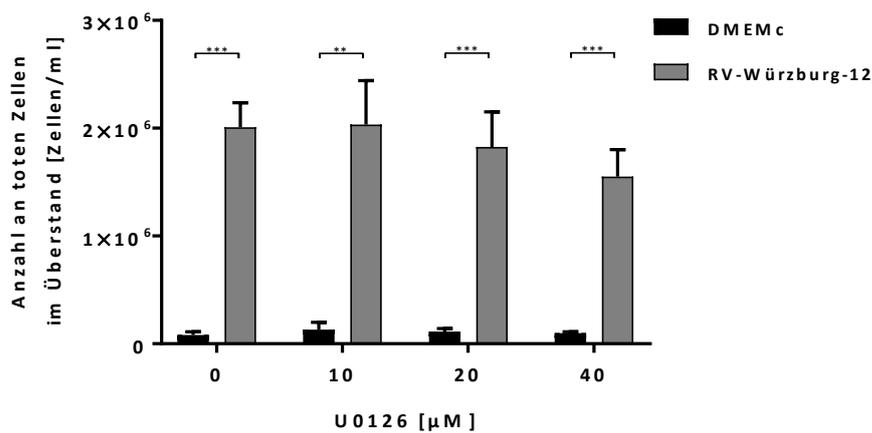


Abbildung 22: Einfluss verschiedener Konzentrationen des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die Ablösung von toten Zellen in den Zellkulturüberstand von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen 72 hpi

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO (0 μM) oder den MEK1/2-Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 10, 20 oder 40 μM enthielt. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurden der Zellkulturüberstand abgenommen, die abgelösten Zellen pelletiert und in 100 μl Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in Trypanblau/PBS verdünnt und mit Hilfe des Zellzählgerätes *LUNA* die Anzahl an toten Zellen im Zellkulturüberstand bestimmt. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. **, p < 0,01; ***, p < 0,001; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 22 ist der Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die Ablösung von toten Zellen in den Zellkulturüberstand von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen dargestellt. In den DMEMc-behandelten Zellen konnte nur eine geringe Menge von $0,8 \times 10^5$ toten Zellen pro ml im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Durch den Einsatz steigender Konzentrationen des Inhibitors blieb die Abkuglung von toten Zellen annähernd gleich. Nach der Infektion der Zellen mit dem Wildtypstamm stieg die Menge an toten Zellen signifikant an, sodass 2×10^6 Zellen pro ml gemessen wurden. Dies entsprach einer RV-abhängigen Zunahme um das 25-fache. Nach dem Einsatz von 10 μM U0126 zeigte sich keine Veränderung in der Menge an toten Zellen. Die Ablösung von toten Zellen nahm jedoch nach der Verwendung von 20 und 40 μM U0126 leicht ab. Aufgrund der Standardabweichung bei den infizierten Ansätzen war dieser Effekt jedoch nicht sehr stark ausgeprägt. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Infektion von A549-Zellen mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 die Menge an toten Zellen zum Zeitpunkt 72 hpi

deutlich erhöhte. Nach dem Einsatz von höheren Konzentrationen des Inhibitors U0126 nahm die Menge an toten Zellen jedoch wieder leicht ab.

4.3 Charakterisierung der RV-induzierten p38-Aktivierung in A549-Zellen

In A549-Zellen konnte im Kontext einer RV-Infektion die Aktivierung der p38-Signalkaskade erstmals gezeigt werden (siehe 4.1.1). Um diese Beobachtung genauer zu charakterisieren, sollte eine optimale Konzentration des p38-Inhibitors SB202190 ermittelt werden, bei der die Aktivität der MAPK blockiert wird. Dies sollte über die Hemmung der Expression des p38-abhängigen COX-2, ein Enzym des Arachidonsäure-Stoffwechsels, sowie der Phosphorylierung des p38-Substrats ATF2 bestimmt werden (Guan *et al.*, 1997; Singer *et al.*, 2003; Grishin *et al.*, 2006). Im Anschluss sollte mit Hilfe des Zellviabilitätstest sichergestellt werden, dass die verwendete Konzentration des Inhibitors für die A549-Zellen nicht toxisch ist. Außerdem sollte die Bedeutung des p38-Signalwegs für das Wachstum des RV sowie die RV-induzierte Apoptose analysiert werden.

4.3.1 Einfluss des p38-Inhibitors SB202190 auf die Expression von COX-2 und die Phosphorylierung von ATF2

Um den Einfluss des p38-Signalwegs im Kontext einer RV-Infektion näher zu untersuchen, sollte mit Hilfe des p38-Inhibitors SB202190 die p38-abhängige Expression von COX-2 und die Phosphorylierung des p38-Substrats ATF2 konzentrationsabhängig gehemmt werden. Dabei sollte eine geeignete Konzentration des Inhibitors für die nachfolgenden Experimente ermittelt werden. A549-Zellen wurden hierfür ausgesät und am nächsten Tag mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. 2 hpi wurde das Infektionsmedium abgesaugt und zu den DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen wurde frisches Zellkulturmedium gegeben, welches den Inhibitor SB202190 mit einer Konzentration von 0, 2,5, 5 oder 10 μM enthielt. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurden die Zellen lysiert und die Proteine, wie in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 aufgeführt, aufgetrennt und nachgewiesen.

Ergebnisse

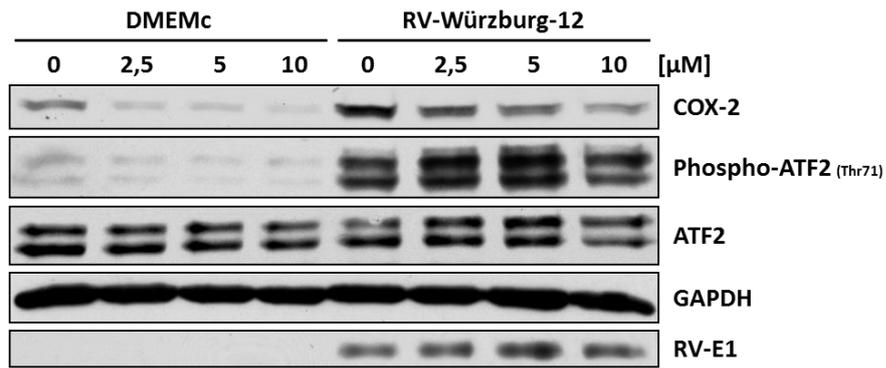


Abbildung 23: Einfluss verschiedener Konzentrationen des p38-Inhibitors SB202190 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Expression von COX-2 sowie Phosphorylierung von ATF2 in A549-Zellen 72 hpi

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO (0 µM) oder den p38-Inhibitor SB202190 mit einer Konzentration von 2,5, 5 oder 10 µM enthielt. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probenflasche aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen COX-2, Phospho-ATF2 (Thr71), ATF2, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Wie sich in Abbildung 23 zeigt, konnte in den DMEMc-behandelten Zellen eine basale Expression von COX-2 nachgewiesen werden. Diese reduzierte sich kontinuierlich durch die Erhöhung der Konzentration des p38-Inhibitors SB202190. Nach Infektion der Zellen mit dem Wildtypstamm konnte eine deutliche Zunahme der Menge an COX-2 beobachtet werden. Durch den Einsatz des p38-Inhibitors konnte auch die RV-induzierte COX-2-Expression konzentrationsabhängig verringert werden. Dabei konnte die größte Reduktion mit einer Konzentration von 10 µM erreicht werden. In den DMEMc-behandelten Zellen, die mit DMSO- bzw. SB202190-haltigem Zellkulturmedium kultiviert worden waren, wurde nur eine sehr schwache Phosphorylierung des p38-Substrats ATF2 am Thr71 beobachtet. Durch die Infektion mit dem RV-Würzburg-12 kam es jedoch zu einer vermehrten Phosphorylierung von ATF2 am Thr71. Durch die Hemmung von p38 konnte diese Phosphorylierung jedoch nicht konzentrationsabhängig reduziert werden, was darauf hindeutet, dass ATF2 im Kontext einer RV-Infektion p38-unabhängig aktiviert wird. Die Menge an ATF2 war in allen Ansätzen gleich. Auch die GAPDH-Banden waren konstant. In den infizierten Zellen zeigte sich beim

viralen E1-Protein eine leichte konzentrationsabhängige Zunahme der Menge nach der Behandlung der Zellen mit 2,5 und 5 μM SB202190. Auch beim Ansatz, der mit 10 μM p38-Inhibitor behandelt worden war, war die Menge an E1 leicht erhöht und mit dem Niveau vom 2,5 μM SB202190-Ansatz vergleichbar. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die RV-induzierte Expression von COX-2 mit Hilfe des p38-Inhibitors SB202190 konzentrationsabhängig gehemmt wurde. Da die COX-2-Expression p38-abhängig ist, konnte damit die Aktivität von p38 inhibiert werden. Die größte Abnahme an COX-2 konnte bei einer SB202190-Konzentration von 10 μM beobachtet werden, weshalb diese Konzentration in den nachfolgenden Experimenten verwendet wurde. Die Menge an phosphoryliertem ATF2 wurde durch die Infektion mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 erhöht, konnte aber durch die Hemmung der p38-Signalwegs nicht verringert werden, sodass die Aktivierung von ATF2 wahrscheinlich auf einen anderen Signalweg, möglicherweise den JNK-Signalweg, zurückgeht. Zudem erhöhte sich durch die Inhibition des RV-aktivierten p38-Signalwegs die Menge an viralem E1-Protein, was darauf hinweisen könnte, dass sich bei der p38-abhängigen Expression von COX-2 um einen antiviralen Prozess handelt.

4.3.2 Einfluss der p38-Inhibition auf die Zellviabilität

Bei der Untersuchung der Hemmung des RV-induzierten p38-Signalwegs konnte für den p38-Inhibitor SB202190 eine geeignete Konzentration von 10 μM ermittelt werden. Um zu überprüfen, ob diese Konzentration die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen beeinflusst, sollte der Zellviabilitätstest durchgeführt werden. Dazu wurden die Zellen einen Tag nach dem Aussäen mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. 2 hpi wurde das Infektionsmedium abgesaugt und frisches Zellkulturmedium, in dem DMSO oder 10 μM SB202190 enthalten war, auf die Zellen pipettiert. Zu den Zeitpunkten 24, 48, 72, 96 und 144 hpi wurde mit Hilfe des *PrestoBlue*[®]-Reagenzes, wie in Kapitel 3.1.9 beschrieben, die Viabilität der A549-Zellen bestimmt.

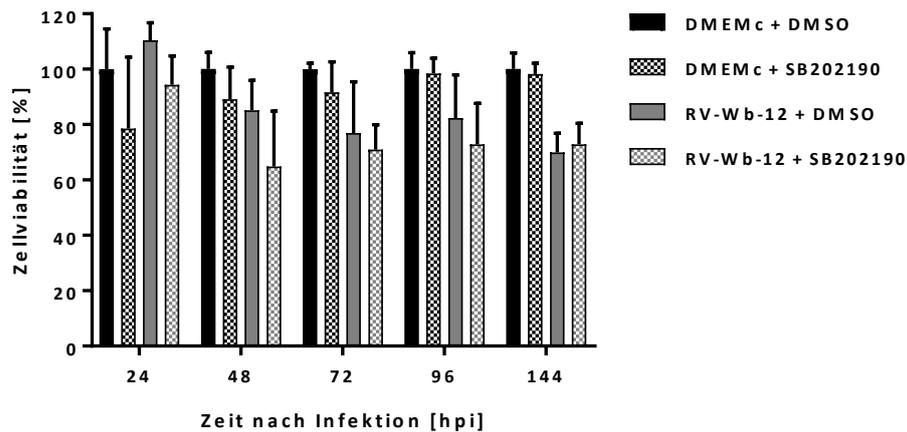


Abbildung 24: Einfluss des p38-Inhibitors SB202190 auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 (RV-Wb-12) mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den p38-Inhibitor SB202190 mit einer Konzentration von 10 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mit Hilfe des *PrestoBlue*[®]-Reagenzes die Zellviabilität bestimmt. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. Die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 24 wird gezeigt, welchen Einfluss der p38-Inhibitor SB202190 mit einer Konzentration von 10 μ M auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen hatte. In den DMEMc-behandelten Zellen, die den Inhibitor ausgesetzt waren, nahm die Viabilität 24 hpi um ca. 20 % ab. Dabei war die Standardabweichung jedoch sehr groß. Zu den Zeitpunkten 48 und 72 hpi war die Viabilität nur um ungefähr 10 % reduziert. 96 und 144 hpi konnte kein Unterschied im Vergleich zu den DMEMc- und DMSO-behandelten Zellen mehr festgestellt werden. In den infizierten und DMSO-behandelten Zellen lag die Viabilität 24 hpi leicht über 100 % und sank zwischen 48 und 96 hpi um ungefähr 20 %. Zum Zeitpunkt 144 hpi war die Viabilität sogar um 30 % verringert. In den infizierten Zellen, die den Inhibitor bekamen, zeigte sich zum Zeitpunkt 24 hpi eine Abnahme der Viabilität um 10 %. Zwischen 48 und 144 hpi lag diese im Bereich von ca. 30 %. Wurde jedoch im selben Zeitraum die Viabilität zwischen den infizierten Zellen, die entweder DMSO oder den Inhibitor bekamen, verglichen, zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Ansätzen. Somit konnte kein Einfluss des p38-Inhibitors auf die Viabilität in den infizierten Zellen beobachtet werden. Des Weiteren senkte die SB202190-

Konzentration von 10 μM die Viabilität der A549-Zellen kaum, weshalb diese Konzentration des p38-Inhibitors für die nachfolgenden Experimente geeignet war.

4.3.3 Einfluss der p38-Inhibition auf das Wachstum des RV

Um zu ermitteln, welchen Einfluss die Hemmung der RV-induzierten Aktivierung des p38-Signalwegs auf das Wachstum des RV hat, wurden A549-Zellen einen Tag vor der Infektion ausgesät und mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 bzw. mit dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Entfernen des Infektionsmediums 2 hpi wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den Inhibitor SB202190 mit einer Konzentration von 10 μM enthielt, auf die infizierten Zellen gegeben. Zu den Zeitpunkten 4, 24, 48, 72, 96 und 144 hpi wurde ein Teil des virushaltigen Zellkulturüberstandes abgenommen und mit Hilfe des immuncolorimetrischen Assays, der in Kapitel 3.2.4 erläutert wird, der Virustiter bestimmt.

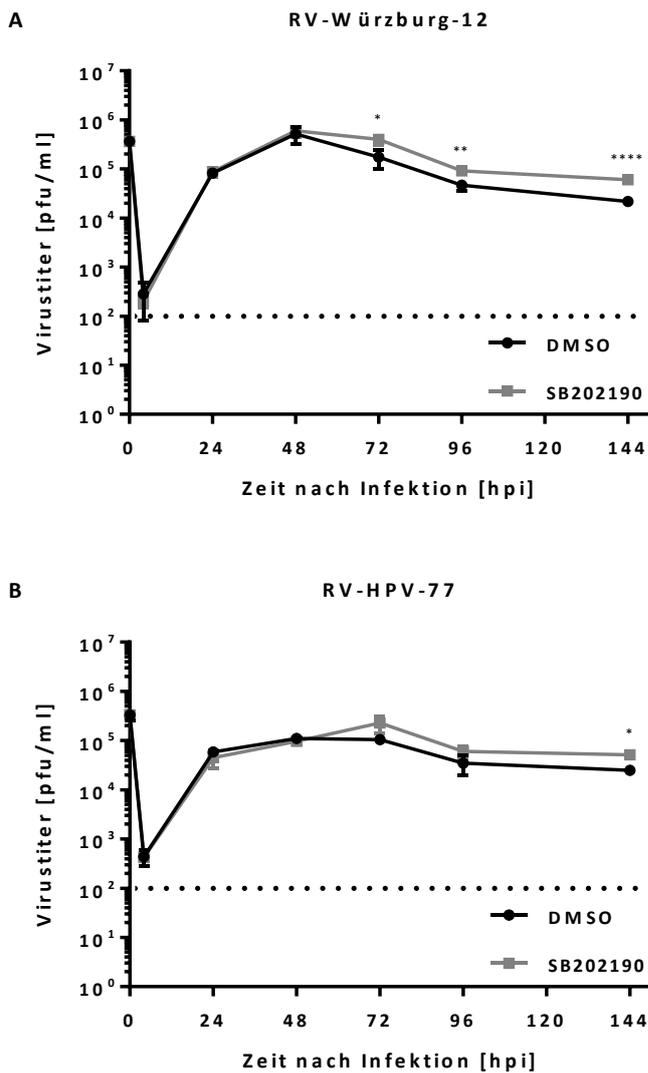


Abbildung 25: Einfluss des p38-Inhibitors SB202190 auf das Wachstum des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 bzw. des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 in A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 (A) bzw. dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 (B) mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums und drei PBS-Waschschrritten bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den p38-Inhibitor SB202190 mit einer Konzentration von 10 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Teil des virushaltigen Zellkulturüberstandes abgenommen und mit Hilfe des immuncolorimetrischen Assays der Virustiter bestimmt. Die Detektionsgrenze des Assays lag bei 10² pfu/ml (gepunktete Linie). Die Graphen zeigen den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. *, $p \leq 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 25 sind die Wachstumskurven für den Wildtypstamm RV-Würzburg-12 (Abbildung 25A) und den Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 (Abbildung 25B) unter dem

Einfluss von DMSO bzw. 10 μ M SB202190 dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 hpi zeigte sich keine Varianz beim eingesetzten Virustiter, der bei ca. $10^{5,2}$ pfu/ml lag, sodass alle Ansätze gleich infiziert wurden. 4 hpi ging die Menge an Virus im Zellkulturmedium aufgrund der PBS-Waschschritte zurück und erreichte einen basalen Virustiter zwischen 10^2 und 10^3 pfu/ml, der auf den Zellen verblieb. Wie in Abbildung 25A zu erkennen ist, konnte 24 hpi ein Anstieg des Titers vom RV-Würzburg-12 auf 10^5 pfu/ml beobachtet werden. Danach stieg der Titer noch weiter an und erreichte 48 hpi ein Maximum von $10^{5,3}$ pfu/ml. Dabei zeigte sich zu den beiden Zeitpunkten kein Unterschied zwischen den DMSO- und SB202190-behandelten Zellen. Zwischen den Zeitpunkten 72 und 144 hpi ging der Virustiter, der von den DMSO-behandelten Zellen produziert wurde, kontinuierlich zurück, lag aber noch in einem Bereich von 10^4 bis leicht über 10^5 pfu/ml. Auch bei den SB202190-behandelten Zellen konnte eine Abnahme des Virustiters in diesem Zeitraum beobachtet werden. Dabei zeigte sich jedoch, dass der Titer beim Vergleich mit dem DMSO-behandelten Ansatz signifikant höher war. Wie in Abbildung 25B gezeigt ist, konnte für den Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 ein ähnlicher Verlauf der Wachstumskurven nachgewiesen werden. 24 hpi kam es zum Anstieg des Virustiters auf einen Wert von etwas unter 10^5 pfu/ml, der 48 hpi ein Maximum bei 10^5 pfu/ml erreichte. Zu diesen beiden Zeitpunkten konnte kein Unterschied zwischen dem DMSO- und SB202190-behandelten Ansatz detektiert werden. Der von den DMSO-behandelten Zellen produzierte Titer ging zwischen 72 und 144 hpi leicht zurück und lag in einem Bereich von 10^4 bis 10^5 pfu/ml. Beim SB202190-behandelten Ansatz stieg der Titer zum Zeitpunkt 72 hpi noch weiter an und erreichte ein Maximum über 10^5 pfu/ml. Zu den Zeitpunkten 96 und 144 hpi ging der Virustiter dann leicht zurück. Beim Vergleich mit den DMSO-behandelten Zellen zeigte sich, dass der Titer des RV-HPV-77 durch den Einsatz des p38-Inhibitors zwischen 72 und 144 hpi höher war. Dieser Unterschied war jedoch nur für Zeitpunkt 144 hpi signifikant. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass durch die Inhibition der RV-induzierten p38-Aktivierung sowohl der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 als auch der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 mehr infektiöse Virionen zu den späteren Zeitpunkten der Infektion aus den A549-Zellen freisetzen. Dies könnte darauf hindeuten, dass es sich bei der Aktivierung von p38 durch das RV um einen antiviralen Prozess der Zellen handelt.

4.3.4 Einfluss der p38-Inhibition auf die RV-induzierte Apoptose

Welchen Einfluss der p38-Signalweg auf die RV-induzierte Apoptose hat, sollte im nächsten Abschnitt untersucht werden. Dazu sollte in RV-infizierten Zellen durch die Hemmung der MAPK durch den Inhibitor SB202190 die Expression des proapoptotischen PUMA, die Aktivität der Caspasen-3/7 und die Abkuglung von toten Zellen analysiert werden. Zur Untersuchung der PUMA-Expression wurden A549-Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Wechsel des Infektionsmediums 2 hpi wurden die Zellen mit neuem Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder SB202190 mit Konzentrationen von 2,5, 5 oder 10 μM enthielt, kultiviert. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurden die Zellen lysiert und die zu untersuchenden Proteine, wie in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben, aufgetrennt, markiert und nachgewiesen.

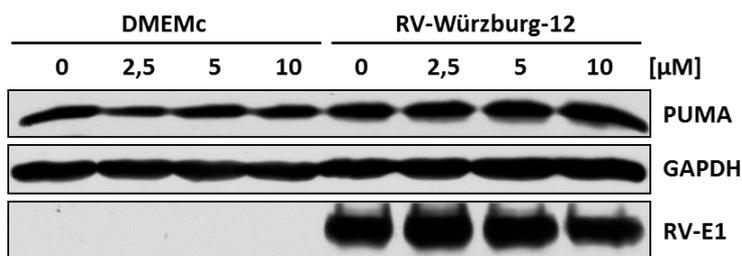


Abbildung 26: Einfluss verschiedener Konzentrationen des p38-Inhibitors SB202190 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Expression von PUMA in A549-Zellen 72 hpi

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO (0 μM) oder den p38-Inhibitor SB202190 mit einer Konzentration von 2,5, 5 oder 10 μM enthielt. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 μg Protein pro Probentaste aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen PUMA, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Wie sich auf dem Immunoblot in Abbildung 26 zeigt, konnte in den DMEMc-behandelten Zellen eine basale Expression des Apoptose-Markers PUMA detektiert werden, die unabhängig von der SB202190-Konzentration konstant blieb. In den infizierten Zellen konnte ein RV-ausgelöster Anstieg der PUMA-Expression nachgewiesen werden. Durch die

Erhöhung der p38-Inhibitor-Konzentration in den infizierten Zellen nahm auch die Menge an PUMA leicht zu. Die GAPDH-Banden waren für alle Ansätze konstant. Das virale E1-Protein konnte nur in den infizierten Zellen nachgewiesen werden und stieg bei einer SB202190-Konzentration von 2,5 und 5 μM an. Bei einer Konzentration von 10 μM war die Zunahme an viralem E1 nicht sichtbar. Folglich konnte gezeigt werden, dass durch die Hemmung der RV-induzierten p38-Aktivierung die Menge an proapoptotischem PUMA in den A549-Zellen 72 hpi leicht zunahm.

Im nächsten Experiment sollte zur weiteren Analyse der RV-induzierten Apoptose die Auswirkung der p38-Inhibition auf die RV-induzierte Caspase-3/7-Aktivität untersucht werden. A549-Zellen wurden dafür ausgelegt und am nächsten Tag mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nachdem das Infektionsmedium 2 hpi verworfen wurde, wurde frisches Zellkulturmedium, welches DMSO bzw. 10 μM SB202190 enthielt, auf die Zellen gegeben. Bis zu den angegebenen Messzeitpunkten wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert. Zur Messung der Aktivität der Caspasen-3/7 wurde der Lumineszenz-basierte *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.5).

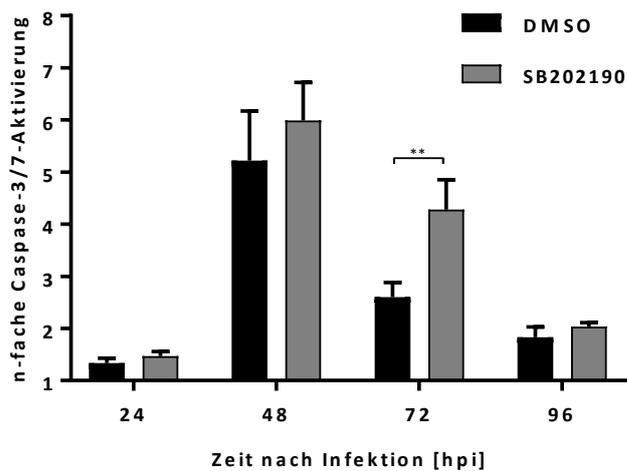


Abbildung 27: Einfluss des p38-Inhibitors SB202190 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen

A549-Zellen wurden ausgesät und am nächsten Tag mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den p38-Inhibitor SB202190 mit einer Konzentration von 10 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Caspasen-3/7 nach 30 min Inkubation mit dem Caspase-3/7-Substrat gemessen. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von vier unabhängigen Experimenten. **, $p < 0,01$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

Der Einfluss der p38-Hemmung auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen ist in Abbildung 27 dargestellt. In den infizierten Zellen, die Zellkulturmedium mit DMSO bekamen, zeigte sich 24 hpi eine 1,5-fache Aktivierung der Caspasen-3/7, die zum Zeitpunkt 48 hpi ein Maximum erreichte. Dabei wurde eine 5-fache Aktivierung beobachtet. 72 bzw. 96 hpi ging die Aktivierung der Caspasen-3/7 auf das 2,5-fache bzw. 2-fache zurück. In den infizierten Zellen, bei denen die Aktivität von p38 durch SB202190 gehemmt war, konnte 24 hpi ebenfalls eine 1,5-fache Aktivierung der Caspasen beobachtet werden. Diese lag 48 hpi jedoch im Vergleich zu den DMSO-behandelten und infizierten Zellen höher und erreichte eine 6-fache Aktivierung. 72 hpi konnte eine 4-fache Aktivierung der Caspasen detektiert werden. Im Vergleich mit den DMSO-behandelten Zellen war dabei die Aktivität sogar signifikant erhöht. Zum Zeitpunkt 96 hpi konnte ebenso wie für die DMSO-behandelten sowie infizierten Zellen eine 2-fache Aktivierung der Caspasen-3/7 gemessen werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der RV-induzierten

Aktivierung des p38-Signalwegs zu den Zeitpunkten 48 und 72 hpi die RV-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 erhöht.

Um zu überprüfen, ob die p38-Inhibition einen Einfluss auf die Ablösung von toten Zellen vom Zellrasen hat, wurden A549-Zellen ausgesät und mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. 2 h nach Infektion wurde auf die Zellen frisches Zellkulturmedium mit DMSO oder SB202190 gegeben. Der Inhibitor wurde dabei mit einer Konzentration von 2,5, 5 oder 10 μM eingesetzt. 72 hpi wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, die abgekugelten Zellen pelletiert und die Anzahl der toten Zellen bestimmt.

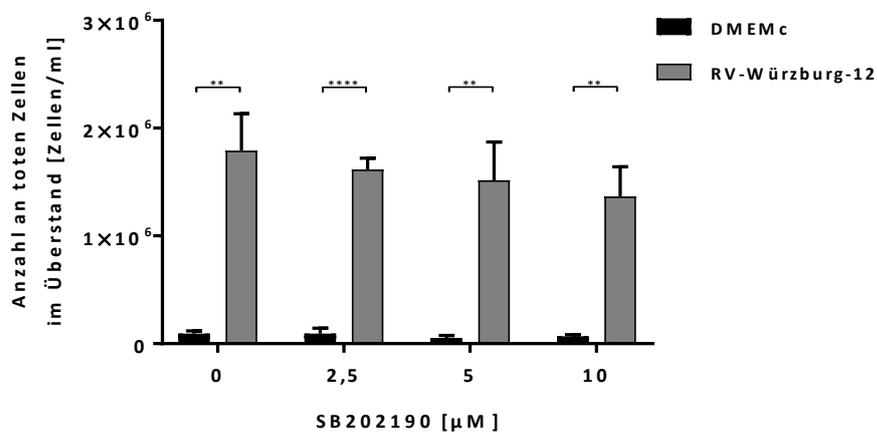


Abbildung 28: Einfluss verschiedener Konzentrationen des p38-Inhibitors SB202190 auf die Ablösung von toten Zellen in den Zellkulturüberstand von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen 72 hpi

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO (0 μM) oder den p38-Inhibitor SB202190 mit einer Konzentration von 2,5, 5 oder 10 μM enthielt. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurden der Zellkulturüberstand abgenommen, die abgelösten Zellen pelletiert und in 100 μl Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in Trypanblau/PBS verdünnt und mit Hilfe des Zellzählgerätes *LUNA* die Anzahl an toten Zellen im Zellkulturüberstand bestimmt. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 28 ist der Einfluss des p38-Inhibitors SB202190 auf die Ablösung von toten Zellen in den Zellkulturüberstand von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen 72 hpi gezeigt. In den DMEMc-behandelten Zellen konnte nur eine geringe

Menge an toten Zellen von $0,9 \times 10^5$ Zellen pro ml im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Durch die Erhöhung der SB202190-Konzentration zeigte sich in den nicht-infizierten Zellen keine Veränderung. In den infizierten Zellen, die Zellkulturmedium mit DMSO bekamen, konnte eine signifikante Zunahme der Menge an toten Zellen beobachtet werden. Dabei wurden $1,8 \times 10^6$ Zellen pro ml gemessen, was einer 20-fachen Zunahme entsprach. Die Menge an toten Zellen nahm mit steigender Konzentration des p38-Inhibitors leicht ab. Diese Abnahme war jedoch nicht signifikant. Folglich konnte damit gezeigt werden, dass eine Infektion von A549-Zellen mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 die Menge an toten Zellen 72 hpi deutlich erhöhte. Durch die Verwendung steigender Konzentrationen des Inhibitors SB202190 nahm die Menge an toten Zellen wieder leicht ab.

4.4 Charakterisierung der RV-induzierten JNK-Aktivierung in A549-Zellen

Auch die Aktivierung des JNK-Signalwegs im Kontext einer RV-Infektion konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden (siehe 4.1.1). Um die Bedeutung des MAPK-Signalwegs für das Virus detaillierter zu verstehen, sollte mit Hilfe des JNK-Inhibitors SP600125 zunächst die Phosphorylierung des JNK-Substrats c-Jun konzentrationsabhängig gehemmt werden. Dabei sollte eine geeignete Konzentration des Inhibitors ermittelt werden, dessen Zytotoxizität mittels Zellviabilitätstest überprüft werden sollte. Der Einfluss der Hemmung des JNK-Signalwegs auf das RV-Wachstum sowie die RV-induzierte Apoptose sollte im Anschluss charakterisiert werden.

4.4.1 Einfluss des JNK-Inhibitors SP600125 auf die Phosphorylierung von c-Jun

Um eine geeignete Konzentration des JNK-Inhibitors SP600125 zu ermitteln, bei der die Phosphorylierung des JNK-Substrats c-Jun in RV-infizierten A549-Zellen inhibiert wird, wurden die Zellen einen Tag nach dem Aussäen mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. 2 h nach Infektion wurden die Zellen mit Zellkulturmedium, welches den Inhibitor mit einer Konzentration von 0, 10, 20 und 40 μM enthielt, kultiviert. 72 hpi wurden die Zellen lysiert und die Proteine, wie in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 erläutert, aufgetrennt und detektiert.

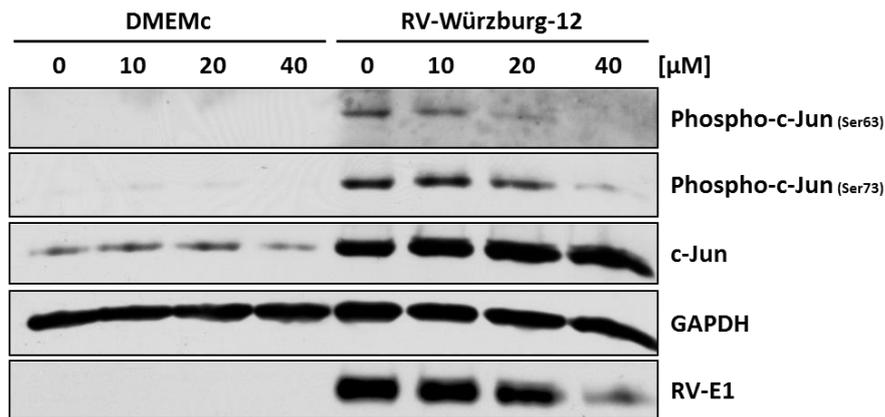


Abbildung 29: Einfluss verschiedener Konzentrationen des JNK-Inhibitors SP600125 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Phosphorylierung des JNK-Substrats c-Jun in A549-Zellen 72 hpi

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO (0 µM) oder den JNK-Inhibitor SP600125 mit einer Konzentration von 10, 20 oder 40 µM enthielt. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probestasche aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen Phospho-c-Jun (Ser63), Phospho-c-Jun (Ser73), c-Jun, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In Abbildung 29 zeigt, dass in den DMEMc-behandelten Zellen keine Phosphorylierung von c-Jun am Ser63 und Ser73 nachweisbar war. Dies war unabhängig von der eingesetzten Konzentration des Inhibitors. In den infizierten Zellen kam es zur Phosphorylierung des JNK-Substrats c-Jun am Ser63 und Ser73. Durch den Einsatz des Inhibitors konnte die Ser63-Phosphorylierung konzentrationsabhängig reduziert werden. Bei einer SP600125-Konzentration von 10 µM zeigte sich dabei eine schwache Abnahme der Phosphorylierung. Wenn die infizierten Zellen jedoch mit 20 bzw. 40 µM SP600125 behandelt wurden, war die Phosphorylierung kaum bzw. gar nicht mehr detektierbar. Die RV-induzierte Phosphorylierung am Ser73 konnte ebenfalls durch den Inhibitor konzentrationsabhängig gehemmt werden. Dabei zeigte sich jedoch, dass die Phosphorylierung erst mit einer Konzentration von 20 µM SP600125 gehemmt werden konnte. Bei einer Konzentration von 40 µM SP600125 war nur noch eine schwache Bande für das Ser73-phosphorylierte c-Jun nachweisbar. In den DMEMc-behandelten Zellen war die Menge an c-Jun unabhängig von der Konzentration des Inhibitors annähernd gleich. Durch die Infektion mit dem

Wildtypstamm kam es jedoch zu einer deutlichen Zunahme an c-Jun. In den infizierten Zellen veränderte sich durch den Einsatz des JNK-Inhibitors die Menge an c-Jun jedoch nicht und blieb konstant. Die GAPDH-Banden waren für jeden Ansatz annähernd gleich. Das virale E1-Protein konnte nur in den infizierten Zellen nachgewiesen werden. Der Einsatz des JNK-Inhibitors führte jedoch zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des viralen Glykoproteins. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 die Phosphorylierung am Ser63 und Ser73 sowie die Expression des JNK-Substrats c-Jun induziert. Durch die Verwendung des JNK-Inhibitors SP600125 konnten beide c-Jun-Phosphorylierungen konzentrationsabhängig gehemmt werden. Dabei wurde eine SP600125-Konzentration von 20 μM als die geringste Menge an Inhibitor identifiziert, bei der beide Phosphorylierungen von c-Jun gehemmt waren. Diese wurde in den nachfolgenden Experimenten verwendet. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass durch die Hemmung des JNK-Signalwegs die Menge an viralem E1-Protein konzentrationsabhängig abnahm, was auf die Bedeutung des aktivierten Signalwegs für die RV-Replikation hinweist.

4.4.2 Einfluss der JNK-Inhibition auf die Zellviabilität

Die Zytotoxizität der ermittelten SP600125-Konzentration von 20 μM sollte im nächsten Schritt mit Hilfe des Zellviabilitätstestes analysiert werden. Dazu wurden A549-Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. 2 hpi wurde das Infektionsmedium abgesaugt und die Zellen bekamen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder 20 μM SP600125 enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mit Hilfe des *PrestoBlue*[®]-Reagenzes, wie in Kapitel 3.1.9 aufgeführt, die Viabilität der A549-Zellen bestimmt.

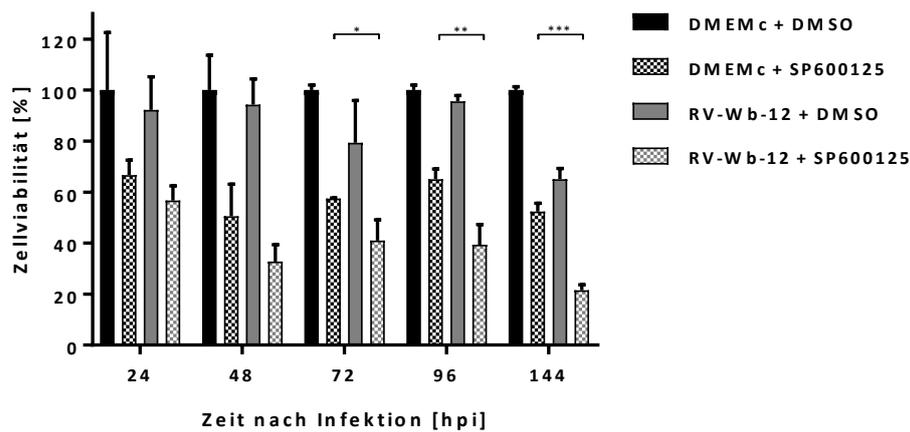


Abbildung 30: Einfluss des JNK-Inhibitors SP600125 auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 (RV-Wb-12) mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den JNK-Inhibitor SP600125 mit einer Konzentration von 20 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mit Hilfe des *PrestoBlue*[®]-Reagenzes die Zellviabilität bestimmt. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 30 ist gezeigt, wie der JNK-Inhibitor SP600125 mit einer Konzentration von 20 μ M die Viabilität in DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen beeinflusst. In den DMEMc-behandelten Zellen, die in SP600125-haltigem Zellkulturmedium kultiviert wurden, zeigte sich 24 hpi eine Abnahme der Viabilität um ca. 30 %. Zum Zeitpunkt 48 hpi sank diese um 50 %. 72 bzw. 96 hpi nahm die Viabilität wieder zu, sodass diese nur noch um ca. 40 bzw. 30 % reduziert war. Zum letzten Zeitpunkt war die Viabilität wieder auf dem Level von Zeitpunkt 48 hpi. In den infizierten Zellen, die mit DMSO-haltigem Zellkulturmedium kultiviert wurden, nahm die Viabilität 24 und 48 hpi um ca. 10 % ab. Zum Zeitpunkt 72 hpi lag dieser Wert bei 20 %. Nahezu keine Abnahme der Viabilität zeigte sich 96 hpi. Die Viabilität war zum letzten Messzeitpunkt um 35 % verringert. In den infizierten und SP600125-behandelten Zellen war die Viabilität im Vergleich zu den SP600125-behandelten oder infizierten Zellen zu jedem Zeitpunkt niedriger. 24 hpi war die Viabilität um etwas mehr als 40 % reduziert. Zwischen den Zeitpunkten 48 und 96 hpi lag die Abnahme bei ca. 60 %. Zum letzten Zeitpunkt war die Viabilität um 80 % verringert. Der Unterschied zwischen den DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen, bei denen JNK mit

Hilfe des Inhibitors gehemmt worden war, war zu den Zeitpunkten 72, 96 und 144 hpi signifikant. Abschließend konnte damit gezeigt werden, dass der JNK-Inhibitor SP600125 mit einer Konzentration von 20 μ M die Viabilität der A549-Zellen reduzierte. Da jedoch die Phosphorylierungen von c-Jun nur mit 20 μ M SP600125 gehemmt werden konnten, wurde diese trotzdem in den nachfolgenden Experimenten verwendet. Die Beeinflussung der Viabilität durch den Inhibitor wurde dabei berücksichtigt. Da in den infizierten Zellen im Vergleich mit den DMEMc-behandelten Zellen, die beide den Inhibitor bekamen, die Viabilität zusätzlich reduziert war, könnte die RV-induzierte Aktivierung des JNK-Signalwegs die Viabilität in den infizierten Zellen erhöhen. Dieser Effekt könnte aber auch auf die Abnahme der Viabilität durch die RV-Infektion zurückgehen.

4.4.3 Einfluss der JNK-Inhibition auf das Wachstum des RV

Inwiefern die Hemmung des RV-induzierten JNK-Signalwegs das Wachstum des RV beeinflusst, sollte im nächsten Experiment untersucht werden. Dazu wurden A549-Zellen ausgesät und am Tag darauf mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 bzw. mit dem Laboradaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Nachdem das Infektionsmedium abgesaugt worden war, wurden die infizierten Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um zu den Messzeitpunkten nur die neugebildeten Viruspartikel nachzuweisen. Die Zellen bekamen anschließend frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den JNK-Inhibitor mit einer Konzentration von 20 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Teil des virushaltigen Zellkulturüberstandes abgenommen und mit Hilfe des immuncolorimetrischen Assays, der in Kapitel 3.2.4 dargestellt ist, der Virustiter bestimmt.

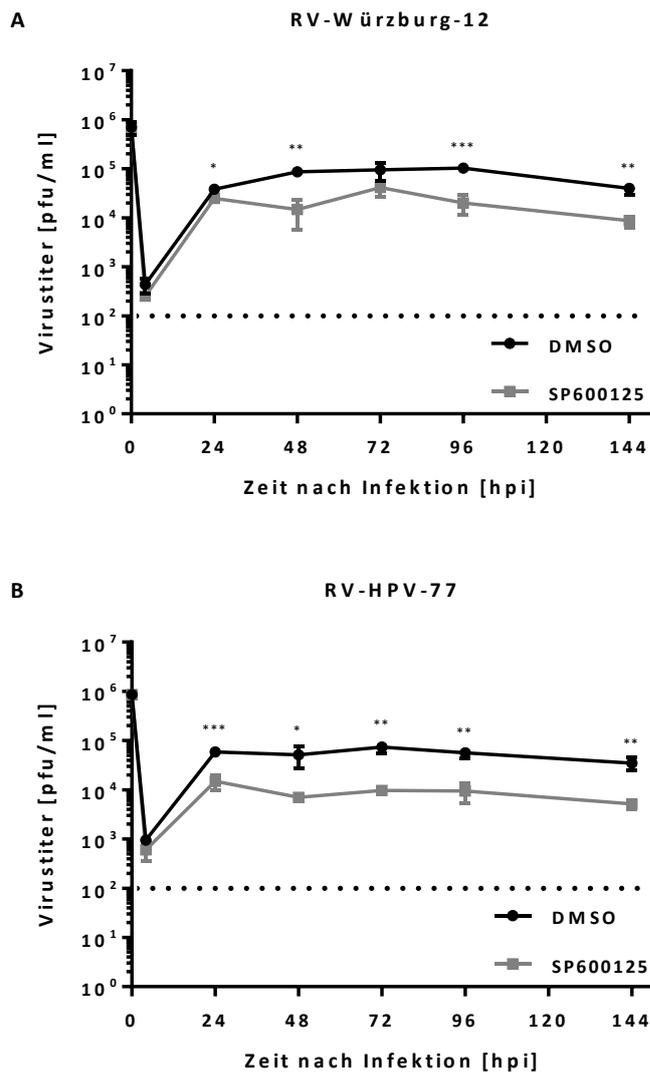


Abbildung 31: Einfluss des JNK-Inhibitors SP600125 auf das Wachstum des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 bzw. des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 in A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 (A) bzw. dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 (B) mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums und drei PBS-Waschschritten bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den JNK-Inhibitor SP600125 mit einer Konzentration von 20 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Teil des virushaltigen Zellkulturüberstandes abgenommen und mit Hilfe des immuncolorimetrischen Assays der Virustiter bestimmt. Die Detektionsgrenze des Assays lag bei 10² pfu/ml (gepunktete Linie). Die Graphen zeigen den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. *, p \leq 0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 31 ist der Einfluss der JNK-Inhibition auf das Wachstum des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 (Abbildung 31A) bzw. des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77

(Abbildung 31B) dargestellt. Zu Beginn der Infektion (0 hpi) zeigte sich kein Unterschied beim eingesetzten Virustiter, der bei ungefähr 10^6 pfu/ml lag, sodass alle Ansätze gleich infiziert wurden. Durch das Absaugen des Infektionsmediums und das anschließende Waschen mit PBS ging der Virustiter 4 hpi auf einen Wert zwischen 10^2 und 10^3 pfu/ml zurück. In Abbildung 31A zeigt sich, dass der Virustiter des RV-Würzburg-12, welcher von den DMSO-behandelten Zellen produziert worden war, 24 hpi wieder anstieg und zwischen 10^4 und 10^5 pfu/ml lag. In diesem Bereich blieb der Titer während des gesamten Experimentes. Wurden die RV-Würzburg-12-infizierten Zellen jedoch mit dem JNK-Inhibitor SP600125 behandelt, war der produzierte Titer zwischen den Zeitpunkten 24 und 144 hpi niedriger. Dieser Unterschied war für die Zeitpunkte 24, 48, 96 und 144 hpi signifikant. Für den Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 konnte, wie in Abbildung 31B gezeigt, ein ähnlicher Verlauf der Wachstumskurven beobachtet werden. Bei den DMSO-behandelten infizierten Zellen stieg die Virusmenge im Zellkulturüberstand 24 hpi an und lag zwischen 10^4 und 10^5 pfu/ml. Während des gesamten Experimentes verblieb der Virustiter annähernd konstant auf diesem Level. Wurden die Zellen jedoch mit dem JNK-Inhibitor behandelt, war der Virustiter zwischen 24 und 144 hpi signifikant reduziert. Dabei konnte zwischen 48 und 144 hpi ein Unterschied von einer logarithmischen Stufe beobachtet werden. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit dem JNK-Inhibitor sowohl der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 als auch der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 signifikant geringere Mengen an infektiösen Viruspartikeln aus den A549-Zellen freisetzen. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Unterschied im Virustiter auch durch die Abnahme der Viabilität durch den JNK-Inhibitor SP600125 verursacht werden könnte.

4.4.4 Einfluss der JNK-Inhibition auf die RV-induzierte Apoptose

Nachdem die Bedeutung des JNK-Signalwegs für das Wachstum des RV bestimmt wurde, sollte im nächsten Abschnitt der Einfluss der JNK-Inhibition auf die RV-induzierte Apoptose untersucht werden. Dabei sollte in RV-infizierten Zellen durch die Hemmung der MAPK durch den Inhibitor SP600125 die Expression des proapoptotischen PUMA, die Aktivität der Caspasen-3/7 und die Ablösung von toten Zellen vom Zellrasen näher charakterisiert werden. Für die Überprüfung der JNK-abhängigen PUMA-Expression wurden A549-Zellen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. 2 h nach Infektion wurde das Infektions-

medium entfernt und frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO bzw. 10, 20 oder 40 μM SP600125 enthielt, auf die Zellen gegeben. 72 hpi wurden die Zellen lysiert und die zu untersuchenden Proteine, wie in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 erläutert, separiert und nachgewiesen.

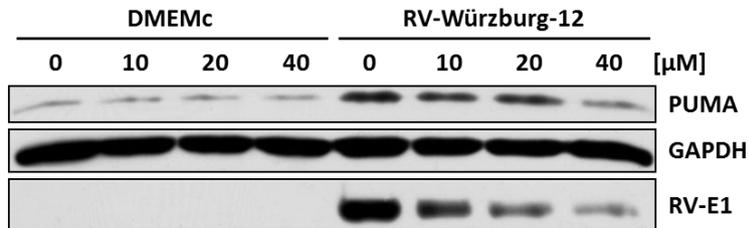


Abbildung 32: Einfluss verschiedener Konzentrationen des JNK-Inhibitors SP600125 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Expression von PUMA in A549-Zellen 72 hpi

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO (0 μM) oder den JNK-Inhibitor SP600125 mit einer Konzentration von 10, 20 oder 40 μM enthielt. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 μg Protein pro Probenasche aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen PUMA, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In Abbildung 32 ist der Einfluss des JNK-Inhibitors SP600125 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Expression von PUMA in A549-Zellen 72 hpi dargestellt. In den DMEMc-behandelten Zellen zeigte sich unabhängig von der verwendeten Konzentration des Inhibitors eine basale Expression des proapoptotischen Faktors. Nach der Infektion mit dem Wildtypstamm nahm die Menge an PUMA zu. Durch die Verwendung steigender Konzentrationen von SP600125 ging die Expression von PUMA konzentrationsabhängig zurück. Dabei war die Menge an PUMA in den infizierten Zellen, die mit 10 oder 20 μM SP600125 behandelt wurden, vergleichbar. Mit einer Konzentration von 40 μM konnte nur noch eine geringe Menge an PUMA detektiert werden. Die GAPDH-Bande war in jedem Ansatz gleich. Zur Überprüfung der Infektion mit dem RV wurde das virale E1-Protein nachgewiesen. Dies konnte nur in den infizierten Zellen detektiert werden und sank konzentrationsabhängig durch die Hemmung des JNK-Signalwegs. Folglich konnte damit

gezeigt werden, dass sich durch die Hemmung der RV-induzierten JNK-Aktivierung die Menge an proapoptotischem PUMA in den A549-Zellen 72 hpi konzentrationsabhängig verringerte.

Im nächsten Abschnitt sollte der Einfluss der JNK-Inhibition auf die RV-induzierte Caspase-3/7-Aktivität untersucht werden. Dafür wurden A549-Zellen am Tag vor der Infektion ausgesät und mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums 2 hpi bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO bzw. 20 μ M SP600125 enthielt. Bis zu den angegebenen Messzeitpunkten wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Messung der Aktivität der Caspasen-3/7 wurde der Lumineszenz-basierte *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay verwendet (siehe Kapitel 3.2.5).

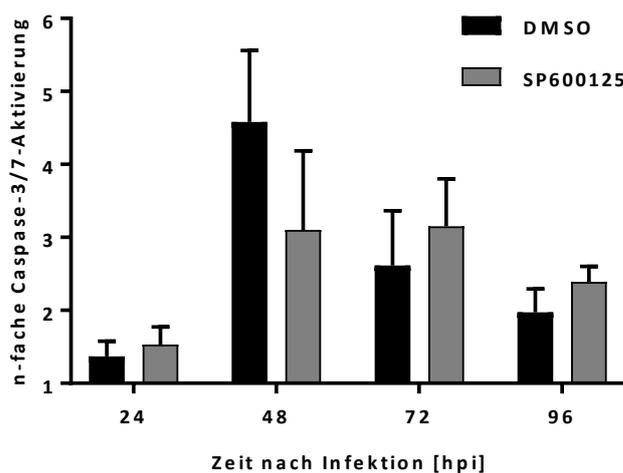


Abbildung 33: Einfluss des JNK-Inhibitors SP600125 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen

A549-Zellen wurden einen Tag nach dem Aussäen mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den JNK-Inhibitor SP600125 mit einer Konzentration von 20 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Caspasen-3/7 nach 30 min Inkubation mit dem Caspase-3/7-Substrat gemessen. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von vier unabhängigen Experimenten. Die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 33 ist der Einfluss der JNK-Inhibition auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen dargestellt. In den infizierten Zellen, die mit

DMSO-haltigem Zellkulturmedium kultiviert worden waren, zeigte sich 24 hpi eine ca. 1,4-fache Aktivierung der Caspasen-3/7, die 48 hpi ein Maximum erreichte. Dabei waren die Caspasen 4,5-fach aktiviert. 72 bzw. 96 hpi ging die Caspase-3/7-Aktivität zurück und war nur noch 2,5- bzw. 2-fach erhöht. Wurden die infizierten Zellen mit dem JNK-Inhibitor behandelt, zeigte sich 24 hpi eine 1,5-fache Aktivierung der Caspasen-3/7, sodass der Unterschied im Vergleich mit den DMSO-behandelten Zellen nur sehr gering war. 48 hpi kam es zur Zunahme der Aktivierung um das 3-fache. Im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen war die Caspase-3/7-Aktivität zu diesem Zeitpunkt jedoch reduziert. Zu den letzten beiden Zeitpunkten 72 bzw. 96 hpi konnte eine 3- bzw. 2,5-fache Aktivierung der Caspasen gemessen werden, die im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen etwas höher war. Aufgrund der großen Standardabweichung waren die beobachteten Effekte jedoch nicht signifikant. Zusammenfassend konnte damit festgehalten werden, dass die Hemmung der RV-induzierten Aktivierung des JNK-Signalwegs zum Zeitpunkt 48 hpi die Aktivierung der Caspasen-3/7 durch das RV verringerte. Damit könnte der starke Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität während dieser Phase der RV-Infektion auf die Aktivierung des JNK-Signalwegs zurückzuführen sein.

Um die Abnahme der RV-induzierten Caspase-3/7-Aktivierung durch die Inhibition des JNK-Signalwegs zum Zeitpunkt 48 hpi genauer zu charakterisieren, wurde das im Abschnitt zuvor beschriebene Experiment leicht modifiziert und erneut durchgeführt. Bei dieser veränderten Versuchsanordnung wurde das Zellkulturmedium mit dem DMSO bzw. JNK-Inhibitor nicht nach dem Wechsel des Infektionsmediums, sondern 6 h vor dem Messzeitpunkt 48 hpi zu den Zellen gegeben. Dabei sollte ausgeschlossen werden, dass möglicherweise die reduzierte Zellviabilität durch die lange Exposition mit dem Inhibitor oder der durch die JNK-Inhibition verringerte Virustiter die Abnahme der Caspase-3/7-Aktivität verursachten.

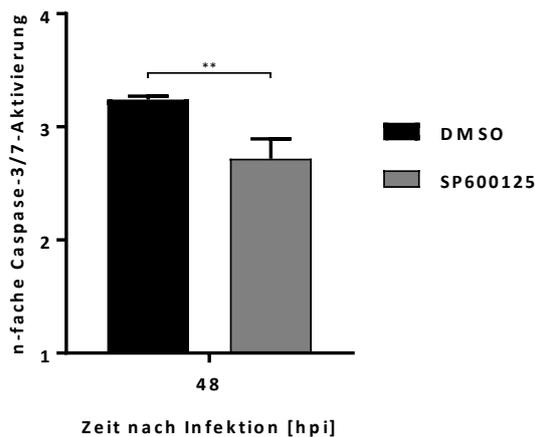


Abbildung 34: Einfluss des JNK-Inhibitors SP600125 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen 48 hpi

A549-Zellen wurden einen Tag nach dem Aussäen mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium. Die Zellen erhielten 6 h vor der Messung erneut frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den JNK-Inhibitor SP600125 mit einer Konzentration von 20 μ M enthielt. Zum Zeitpunkt 48 hpi wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Caspasen-3/7 nach 30 min Inkubation mit dem Caspase-3/7-Substrat gemessen. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von vier unabhängigen Experimenten. **, $p < 0,01$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

Abbildung 34 zeigt den Einfluss der JNK-Inhibition auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7, wenn das DMSO- bzw. SP600125-haltige Zellkulturmedium 6 h vor dem Messzeitpunkt 48 hpi auf die Zellen gegeben wurde. Dabei konnte beobachtet werden, dass in den DMSO-behandelten Zellen eine 3,2-fache Caspase-3/7-Aktivierung durch das RV vorlag. Durch die Verwendung des JNK-Inhibitors waren die Caspasen nur noch 2,7-fach durch das RV aktiviert. Der beobachtete Unterschied war signifikant. Somit reduziert die Hemmung der RV-induzierten Aktivierung des JNK-Signalwegs die Aktivierung der Caspasen-3/7 durch das RV zum Zeitpunkt 48 hpi.

Im letzten Abschnitt sollte der Einfluss der JNK-Inhibition auf die Ablösung von toten Zellen vom Zellrasen untersucht werden. Für dieses Experiment wurden A549-Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums wurde zu den DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen frisches Zellkulturmedium gegeben, welches entweder DMSO oder den Inhibitor SP600125 mit einer Konzentration von 10, 20 oder

40 μM enthält. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und mit Hilfe des Zellzählgerätes *LUNA* die Anzahl an toten Zellen bestimmt.

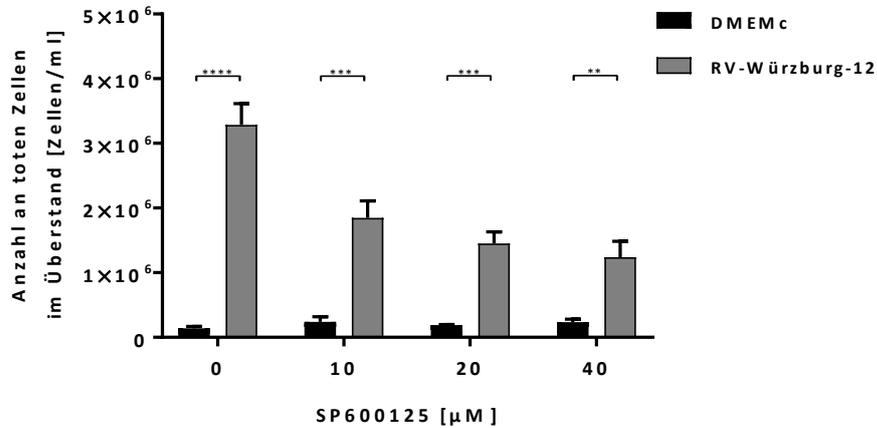


Abbildung 35: Einfluss verschiedener Konzentrationen des JNK-Inhibitors SP600125 auf die Ablösung von toten Zellen in den Zellkulturüberstand von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen 72 hpi

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO (0 μM) oder den JNK-Inhibitor SP600125 mit einer Konzentration von 10, 20 oder 40 μM enthält. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurden der Zellkulturüberstand abgenommen, die abgelösten Zellen pelletiert und in 100 μl Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in Trypanblau/PBS verdünnt und mit Hilfe des Zellzählgerätes *LUNA* die Anzahl an toten Zellen im Zellkulturüberstand bestimmt. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 35 ist gezeigt, dass sich im Zellkulturüberstand von DMEMc-behandelten Zellen mit $1,4 \times 10^5$ Zellen pro ml nur eine geringe Menge an toten Zellen befand. Durch den Anstieg der SP600125-Konzentration konnte in den nicht-infizierten Zellen keine Veränderung beobachtet werden. Nach der Infektion mit dem Wildtypstamm nahm die Menge an toten Zellen im Zellkulturüberstand signifikant zu, sodass $3,3 \times 10^6$ Zellen pro ml gezählt wurden. Dies entsprach einer Zunahme um mehr als das 23-fache. Die Menge an toten Zellen nahm mit steigender Konzentration des JNK-Inhibitors wieder ab, sodass mit einer Konzentration von 10 μM die Menge an toten Zellen auf $1,8 \times 10^6$ Zellen pro ml sank, was einer Verringerung von 45 % entsprach. Bei einer Konzentration von 20 bzw. 40 μM waren nur noch $1,5 \times$ bzw. $1,2 \times 10^6$ tote Zellen pro ml detektierbar. Die Abnahme betrug

dabei 55 bzw. 64 %. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass die Menge an toten Zellen nach einer Infektion von A549-Zellen mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 zum Zeitpunkt 72 hpi deutlich anstieg. Durch die Verwendung von steigenden Konzentrationen des Inhibitors SP600125 nahm die Menge an toten Zellen wieder deutlich ab.

4.5 Charakterisierung der RV-induzierten NF- κ B-Aktivierung in A549-Zellen

Nachdem die RV-induzierte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in A549-Zellen durch die Phosphorylierung verschiedener Komponenten des Signalwegs mittels Western Blot sowie im NF- κ B-abhängigen Reporter-Gen-Assay gezeigt werden konnte, sollte die Bedeutung des Signalwegs für die RV-Infektion näher untersucht werden. Dazu sollte für den NF- κ B-Inhibitor SC75741, der die DNA-Bindung der NF- κ B-Untereinheit p65 und somit die Expression von NF- κ B-abhängigen Genen unterbindet, eine geeignete Konzentration bestimmt werden, um die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in RV-infizierten Zellen zu hemmen (Leban *et al.*, 2007; Ehrhardt *et al.*, 2013). Die Zytotoxizität der ermittelten Konzentration des Inhibitors sollte im Anschluss in einem Zellviabilitätstest überprüft werden. Im Weiteren sollte außerdem geklärt werden, welchen Einfluss die Hemmung des NF- κ B-Signalwegs auf das Wachstum des RV sowie auf die RV-induzierte Apoptose hat.

4.5.1 Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die Aktivität eines NF- κ B-abhängigen Reportergens

Um die RV-induzierte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in A549-Zellen zu hemmen, sollte für den NF- κ B-Inhibitor SC75741 eine geeignete Konzentration ermittelt werden. Dazu sollte ein NF- κ B-abhängiger Reporter-Gen-Assay durchgeführt. Hierfür wurden die A549-Zellen zur Aufnahme des Reportergens Luciferase unter Kontrolle des NF- κ B-abhängigen IFN- β -Promoters und des Reportergens β -Galaktosidase unter Kontrolle des CMV-Promoters transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die A549-Zellen mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. 2 hpi wurde das Infektionsmedium abgesaugt und frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 5, 10 bzw. 20 μ M enthielt, auf die Zellen gegeben. Zum Messzeitpunkt 48 hpi wurden die transfizierten und infizierten Zellen

lysiert und die Aktivität der Luciferase sowie der β -Galaktosidase gemessen. Um die n-fache Aktivierung von NF- κ B durch das RV zu berechnen, wurde der RV-infizierte Ansatz mit dem DMEMc-behandelten Ansatz ins Verhältnis gesetzt. Im Anschluss wurde die durch das RV induzierte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in den DMSO-behandelten Zellen auf 100 % gesetzt und mit den SC75741-behandelten Ansätzen verglichen, um die prozentuale Hemmung durch den NF- κ B-Inhibitor zu bestimmen.

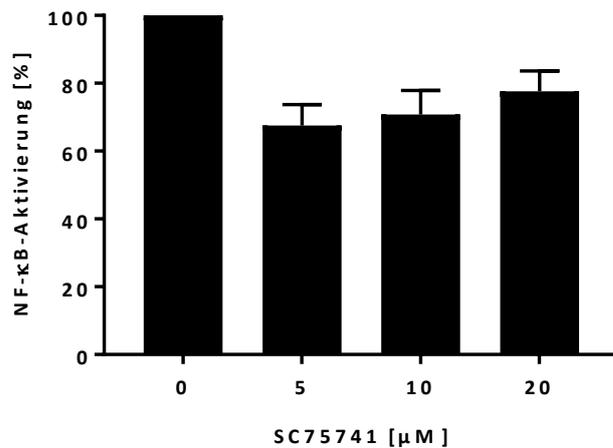


Abbildung 36: Einfluss verschiedener Konzentrationen des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die RV-Würzburg-12-induzierte NF- κ B-Aktivierung 48 hpi

A549-Zellen wurden einen Tag nach der Aussaat mit p(PRDI)5tk Δ (-39)lucifer (480 ng), pCMV- β Gal (70 ng) und pCMV-HA (1450 ng) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO (0 μ M) oder den NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 5, 10 oder 20 μ M enthielt. Die Zellen inkubierten bis zum Zeitpunkt 48 hpi im Brutschrank und wurden anschließend lysiert. Nach der Lyse wurde die Aktivität der Luciferase sowie der β -Galaktosidase gemessen. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von zwei unabhängigen Experimenten. Die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 36 ist der Einfluss der NF- κ B-Hemmung auf die RV-Würzburg-12-induzierte NF- κ B-Aktivierung 48 hpi dargestellt. Es zeigte sich, dass durch die Verwendung von 5 bzw. 10 μ M SC75741 die Aktivierung des Signalwegs durch das RV um ca. 30 % gehemmt war. Durch den Einsatz von 20 μ M SC75741 wurde der aktivierte NF- κ B-Signalweg um etwas weniger als 25 % inhibiert. Somit konnte gezeigt werden, dass die RV-induzierte Aktivierung von NF- κ B mit Hilfe des Inhibitors SC75741 gehemmt werden konnte. Die prozentuale

Abnahme durch die verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors war jedoch annähernd vergleichbar, sodass für die nachfolgenden Experimente eine SC75741-Konzentration von 5 μ M verwendet wurde, die in Experimenten mit Influenzavirus-infizierten A549-Zellen bereits eingesetzt wurde (Ehrhardt *et al.*, 2013).

4.5.2 Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf die Zellviabilität

Mit Hilfe des NF- κ B-abhängigen Reporter-gen-Assays wurde eine SC75741-Konzentration von 5 μ M als geeignet ermittelt, um die RV-abhängige NF- κ B-Aktivierung in A549-Zellen zu inhibieren. In Experimenten mit Influenzaviren konnte bereits gezeigt werden, dass eine SC75741-Konzentration von 5 μ M die Zellviabilität in A549-Zellen nur geringfügig reduziert (Ehrhardt *et al.*, 2013). Um den Einfluss des NF- κ B-Inhibitors auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen einen Tag nach dem Aussäen mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Das Infektionsmedium wurde 2 hpi verworfen und die Zellen bekamen frisches Zellkulturmedium, in dem entweder DMSO oder 5 μ M SC75741 gelöst war. Die Viabilität der A549-Zellen wurde mit Hilfe des *PrestoBlue*[®]-Reagenzes, wie in Kapitel 3.1.9 beschrieben, zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt.

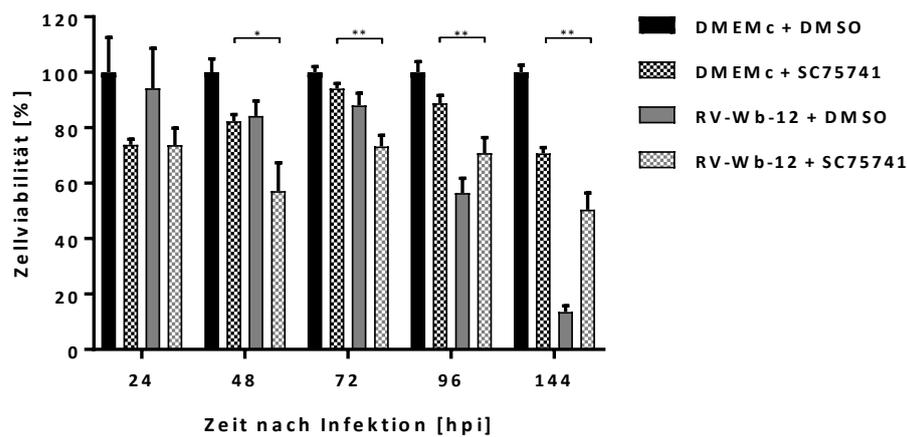


Abbildung 37: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 (RV-Wb-12) mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 5 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mit Hilfe des *PrestoBlue*[®]-Reagenzes die Zellviabilität bestimmt. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. *, $p \leq 0,05$; **, $p < 0,01$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 37 ist der Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 mit einer Konzentration von 5 μ M auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen dargestellt. In den DMEMc-behandelten Zellen, die den Inhibitor bekamen, zeigte sich 24 hpi eine Abnahme der Viabilität um ca. 25 %. 48 hpi lag die Reduktion bei 20 %. Die Viabilität nahm 72 und 96 hpi wieder zu, sodass diese nur noch um ca. 10 % verringert war. Zum letzten Messzeitpunkt lag die Abnahme bei 30 %. In den infizierten Zellen, die mit dem DMSO-haltigen Zellkulturmedium kultiviert worden waren, konnte 24 hpi eine Verringerung der Viabilität von ca. 5 % beobachtet werden. Diese stieg 48 und 72 hpi auf 15 % an. Zu den letzten beiden Zeitpunkten 96 bzw. 144 hpi konnte eine starke RV-abhängige Abnahme der Viabilität von 45 bzw. 90 % nachgewiesen werden. In den infizierten Zellen, bei denen der NF- κ B-Signalweg gehemmt wurde, war die Viabilität 24 hpi um 25 % verringert. Zum Zeitpunkt 48 hpi stieg die Reduktion auf ca. 40 %. Nichtsdestotrotz war die Viabilität zu den Messzeitpunkten 72 und 96 hpi wieder um 25 % reduziert. Zum letzten Zeitpunkt ging die Viabilität sogar um 50 % zurück. Beim Vergleich der DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen, die beide 5 μ M SC75741 bekamen, zeigte sich zwischen 48 und 144 hpi, dass nach

Infektion die Viabilität signifikant niedriger war. Dabei war beim Vergleich der beiden infizierten Ansätze die Viabilität in den SC75741-behandelten Zellen 48 bzw. 72 hpi niedriger und 96 bzw. 144 hpi höher. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass der NF- κ B-Inhibitors SC75741 mit einer Konzentration von 5 μ M die Viabilität der A549-Zellen nur geringfügig reduzierte und daher für die nachfolgenden Experimente eingesetzt werden konnte. Außerdem führte die Hemmung von NF- κ B in den infizierten Zellen zu einer Erniedrigung der Viabilität zu den Zeitpunkten 48 und 72 hpi und zu einer Erhöhung der Viabilität 96 und 144 hpi.

4.5.3 Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf das Wachstum des RV

Welche Auswirkung die Hemmung des NF- κ B-Signalwegs auf das Wachstum des RV hat, sollte im nächsten Abschnitt untersucht werden. Dafür wurden A549-Zellen ausgelegt und am nächsten Tag mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder mit dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Nachdem das Infektionsmedium abgesaugt worden war, wurden die infizierten Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um die auf den Zellen verbliebenen Viruspartikel zu entfernen. Im Anschluss bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder 5 μ M SC75741 enthielt. Zu den in Abbildung 38 gezeigten Zeitpunkten wurde ein Teil des virushaltigen Zellkulturüberstandes abgenommen und mittels des immuncolorimetrischen Assays, der in Kapitel 3.2.4 beschrieben wird, die Menge an infektiösen Viruspartikeln im Zellkulturüberstand bestimmt.

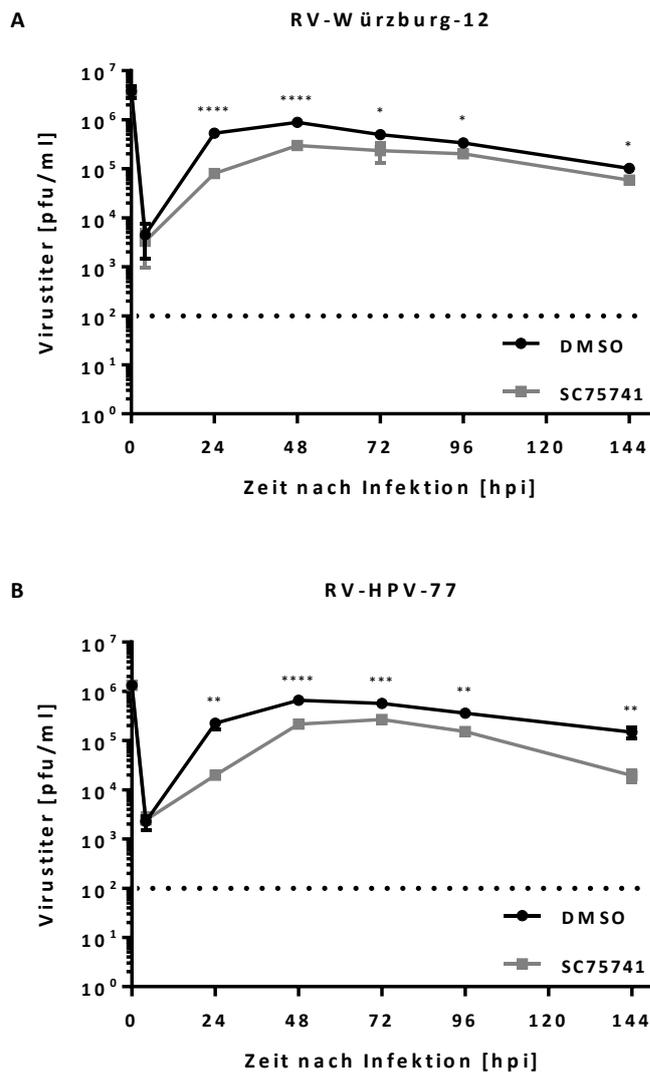


Abbildung 38: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf das Wachstum des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 bzw. des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 in A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 (A) bzw. dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 (B) mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums und drei PBS-Waschschritten bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 5 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Teil des virushaltigen Zellkulturüberstandes abgenommen und mit Hilfe des immuncolorimetrischen Assays der Virustiter bestimmt. Die Detektionsgrenze des Assays lag bei 10² pfu/ml (gepunktete Linie). Die Graphen zeigen den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. *, p \leq 0,05; **, p \leq 0,01; ***, p \leq 0,001; ****, p \leq 0,0001; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 38 ist der Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 mit einer Konzentration von 5 μ M auf das Wachstum des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 (Abbildung 38A) und des

Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 (Abbildung 38B) in A549-Zellen gezeigt. Dabei konnte zum Zeitpunkt 0 hpi ein Virustiter zwischen 10^6 und 10^7 pfu/ml bestimmt werden. Dieser war für das entsprechende Virus konstant, sodass alle Ansätze die gleiche Menge an Virus bekamen. 4 hpi ging der Virustiter auf einen Wert zwischen 10^3 und 10^4 pfu/ml zurück, was auf das Absaugen des Infektionsmediums sowie das mehrmalige Waschen mit PBS zurückzuführen ist. Dadurch wurde der im Zellkulturmedium-verbliebene Virustiter bestimmt. In Abbildung 38A ist gezeigt, dass 24 hpi ein deutlicher Anstieg des RV-Würzburg-12-Titers auf einen Wert zwischen 10^5 und 10^6 pfu/ml nachweisbar war. Diese erreichte 48 hpi ein Maximum von 10^6 pfu/ml. Zwischen 72 und 144 hpi ging der Virustiter leicht zurück und lag immer noch in einem Bereich von 10^5 bis 10^6 pfu/ml. Wurden die RV-Würzburg-12-infizierten Zellen jedoch mit dem SC75741-haltigen Zellkulturmedium kultiviert, war die produzierte Titer zwischen 24 und 144 hpi signifikant reduziert. Dabei konnte der größte Unterschied von annähernd einer logarithmischen Stufe 24 hpi gemessen werden. Die beobachtete Differenz zwischen dem DMSO- und SC75741-behandelten Ansatz wurde im Verlauf des Experimentes immer kleiner. Wie in Abbildung 38B gezeigt, konnte 24 hpi eine Zunahme des RV-HPV-77-Titers auf etwas mehr als 10^5 pfu/ml beobachtet werden, wenn die RV-HPV-77-infizierten Zellen mit DMSO-haltigen Zellkulturmedium behandelt wurden. Zum Zeitpunkt 48 hpi stieg der Titer leicht an und erreichte ein Maximum bei $10^{5,5}$ pfu/ml. Zwischen 72 und 144 hpi ging der Virustiter leicht zurück und lag aber immer noch zwischen 10^5 und 10^6 pfu/ml. Wenn die RV-HPV-77-infizierten Zellen jedoch mit 5 μ M SC75741 behandelt wurden, zeigte sich wie beim Wildtypstamm eine signifikante Verringerung des viralen Titers zwischen den Zeitpunkten 24 und 144 hpi. Der größte Unterschied von über einer logarithmischen Stufe konnte dabei ebenfalls 24 hpi beobachtet werden. Die Differenz nahm anschließend bis zum Zeitpunkt 72 hpi wieder ab und vergrößert sich zwischen 72 und 144 hpi wieder. Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass durch die Inhibition der RV-induzierten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs sowohl der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 als auch der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 signifikant geringere Mengen an infektiösen Viruspartikeln aus den A549-Zellen freisetzen. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Unterschied im Virustiter auch durch die Abnahme der Viabilität durch den NF- κ B-Inhibitor SC75741 verursacht werden könnte.

4.5.4 Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf die RV-induzierte Apoptose

Inwieweit die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durch das RV die RV-induzierte Apoptose beeinflusst, sollte im nächsten Abschnitt genauer untersucht werden. Dafür sollte der Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die RV-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 sowie die Ablösung von toten Zellen vom Zellrasen durch das RV betrachtet werden. Zur Untersuchung der Caspase-3/7-Aktivität wurden A549-Zellen ausgesät und am Tag darauf mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Das Infektionsmedium wurde 2 hpi abgesaugt und die Zellen bekamen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder 5 μ M SC75741 enthielt. Zu den angegebenen Messzeitpunkten wurde die Aktivität der Caspasen-3/7 mit Hilfe des Lumineszenz-basierten *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assays gemessen (siehe 3.2.5).

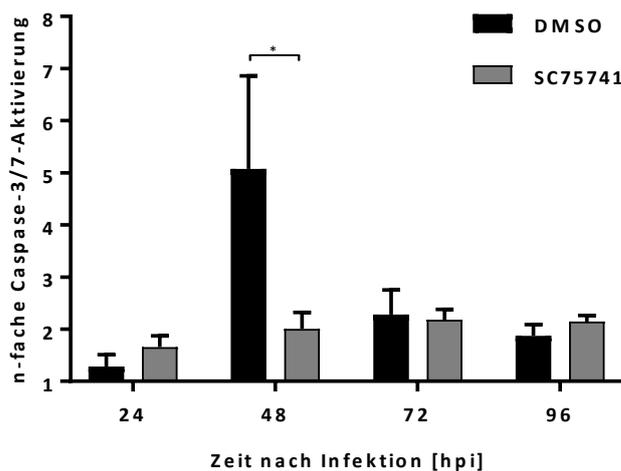


Abbildung 39: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen

A549-Zellen wurden einen Tag nach dem Aussäen mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 5 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Caspasen-3/7 nach 30 min Inkubation mit dem Caspase-3/7-Substrat gemessen. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von vier unabhängigen Experimenten. *, $p \leq 0,05$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 39 ist der Einfluss der Inhibition des NF- κ B-Signalwegs auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen dargestellt. In den infizierten Zellen, die mit DMSO-haltigem Zellkulturmedium kultiviert wurden, stieg die Aktivierung der Caspasen 24 hpi um das 1,3-fache an und erreichte 48 hpi ein Maximum, bei dem eine 5-fache Aktivierung bestimmt wurde. 72 und 96 hpi ging die Aktivierung wieder zurück und war nur noch ca. 2-fach erhöht. In den infizierten Zellen, bei denen der NF- κ B-Signalweg durch SC75741 gehemmt war, konnte 24 hpi eine 1,6-fache Aktivierung der Caspasen-3/7 beobachtet werden. Diese Aktivierung war mit den DMSO-behandelten und infizierten Zellen annähernd vergleichbar. 48 hpi waren die Caspasen nur um das 2-fache aktiviert, sodass die starke Induktion der Caspasen durch das RV signifikant reduziert war. Auf diesem Level konnte die Aktivierung auch zu den Zeitpunkten 72 und 96 hpi nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich ebenfalls kein Unterschied im Vergleich mit den DMSO-behandelten und infizierten Zellen. Somit konnte festgestellt werden, dass die Inhibition der RV-induzierten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs die Aktivierung der Caspasen-3/7 durch das RV 48 hpi deutlich verringerte. Damit geht der starke Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität zu diesem Zeitpunkt der RV-Infektion auf die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs zurück.

Um diesen Effekt zu überprüfen, wurde das oben beschriebene Experiment leicht verändert und wiederholt. Dabei sollte ausgeschlossen werden, dass möglicherweise die leicht reduzierte Zellviabilität durch die lange Exposition mit dem Inhibitor oder der durch die NF- κ B-Inhibition verringerte Virustiter die Abnahme der Caspase-3/7-Aktivität verursachten. Dafür wurde das DMSO- bzw. SC75741-haltige Zellkulturmedium 6 h vor dem Messzeitpunkt 48 hpi und nicht direkt nach dem Wechsel des Infektionsmediums 2 hpi auf die Zellen gegeben.

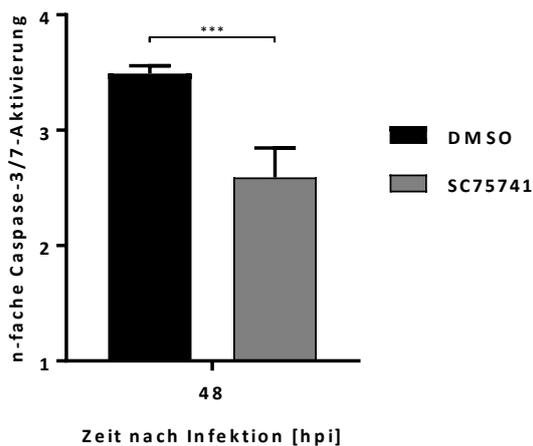


Abbildung 40: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen 48 hpi

A549-Zellen wurden einen Tag nach dem Aussäen mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium. Die Zellen erhielten 6 h vor der Messung erneut frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 5 μ M enthielt. Zum Zeitpunkt 48 hpi wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Caspasen-3/7 nach 30 min Inkubation mit dem Caspase-3/7-Substrat gemessen. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von vier unabhängigen Experimenten. ***, $p < 0,001$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

Abbildung 40 zeigt den Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7, wenn das DMSO- bzw. SC75741-haltige Zellkulturmedium 6 h vor dem Messzeitpunkt 48 hpi auf die Zellen pipettiert wurde. In den DMSO-behandelten und infizierten Zellen konnte dabei eine 3,5-fache Aktivierung der Caspasen nachgewiesen werden. Wurden die infizierten Zellen mit dem NF- κ B-Inhibitor behandelt, war die Aktivierung signifikant reduziert und zeigte nur noch eine 2,6-fache Erhöhung. Folglich konnte festgestellt werden, dass die Hemmung der RV-induzierten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs die Aktivierung der Caspasen-3/7 durch das RV zum Zeitpunkt 48 hpi reduziert. Somit scheint die Aktivierung der Caspasen durch das RV auf den NF- κ B-Signalweg zurückzugehen.

Im letzten Teil sollte der Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf die Abkuglung von toten Zellen vom Zellrasen untersucht werden. Dafür wurden A549-Zellen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Verwerfen des Infektionsmediums wurde zu den

DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen frisches Zellkulturmedium gegeben, welches entweder DMSO oder den Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 5, 10 oder 20 μM enthielt. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und mit Hilfe des Zellzählgerätes *LUNA* die Anzahl an toten Zellen im Zellkulturüberstand bestimmt.

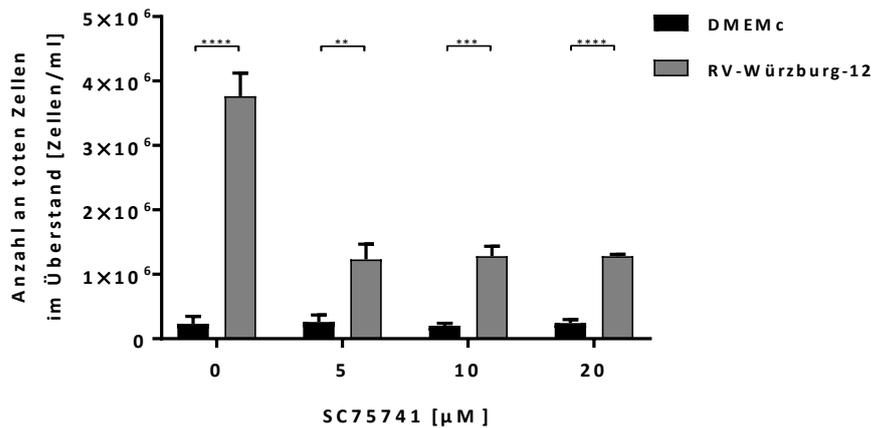


Abbildung 41: Einfluss verschiedener Konzentrationen des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die Ablösung von toten Zellen in den Zellkulturüberstand von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen 72 hpi

A549-Zellen wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO (0 μM) oder den NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 5, 10 oder 20 μM enthielt. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurden der Zellkulturüberstand abgenommen, die abgelösten Zellen pelletiert und in 100 μl Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in Trypanblau/PBS verdünnt und mit Hilfe des Zellzählgerätes *LUNA* die Anzahl an toten Zellen im Zellkulturüberstand bestimmt. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

Abbildung 41 zeigt, dass in den DMEMc-behandelten Zellen nur eine geringe Menge an toten Zellen im Zellkulturüberstand von $2,3 \times 10^5$ Zellen pro ml nachgewiesen werden konnte. Dies veränderte sich durch den Einsatz steigender Konzentrationen des NF- κ B-Inhibitors SC75741 nicht. Durch die Infektion mit dem Wildtypstamm nahm die Menge an toten Zellen im Zellkulturüberstand signifikant zu, sodass $3,8 \times 10^6$ Zellen pro ml gezählt wurden. Somit kam es zur Steigerung um mehr als das 16-fache. Die Menge an toten Zellen nahm durch die Verwendung des NF- κ B-Inhibitors deutlich ab. Dabei konnte kein konzentrationsabhängiger Effekt beobachtet werden. Für die Konzentrationen 5, 10 und 20 μM konnten

1,2 x 10⁶ Zellen pro ml nachgewiesen werden. Dies entsprach einer Abnahme von ca. 70 %. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass die Menge an toten Zellen nach einer Infektion von A549-Zellen mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 zum Zeitpunkt 72 hpi anstieg. Durch die Verwendung des NF-κB-Inhibitors SC75741 nahm die Menge an toten Zellen konzentrationsunabhängig um ungefähr 70 % ab. Somit scheint die Aktivierung des NF-κB-Signalwegs durch das RV die Apoptose in infizierten A549-Zellen zu verursachen.

4.6 Charakterisierung der RV-Infektion in primären Endothelzellen

Die Infektion von Endothelzellen durch das RV führte bei CRS-Feten unter anderem zur Schädigung von Blutgefäßen des Herzens (Töndury und Smith, 1966). Eine unterschiedliche Reaktion von Endothelzellen fetalen und adulten Ursprungs auf eine RV-Infektion könnte möglicherweise Erkenntnisse über die teratogene Wirkung des Virus liefern. Vor kurzem konnte mit Hilfe dieses Zellmodells die RV-abhängige Beeinflussung der MAPK-Signalkaskaden, des NF-κB-Signalwegs und der Apoptose nachgewiesen werden (Geyer *et al.*, 2016). Inwieweit das RV diese Signalwege in den Endothelzellen verändert, ist jedoch völlig ungeklärt. Daher sollte in diesem Kapitel der Einfluss des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK, den kanonischen NF-κB-Signalweg sowie die Apoptose in humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC), die fetalen Ursprungs waren, und in humanen Endothelzellen aus der *Vena saphena* (HSaVEC) von Erwachsenen näher untersucht werden.

4.6.1 Einfluss des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK

Zu Beginn sollte zunächst analysiert werden, ob das RV in den HUVEC wie in den A549- und Vero-Zellen (siehe 4.1.1) die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK durch die duale Phosphorylierung im konservierten Threonin-X-Tyrosin-Motiv der MAPK aktiviert. Dabei sollte zusätzlich untersucht werden, ob es Unterschiede zwischen dem teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 und dem Labor-adaptierten, nicht-teratogenen Stamm RV-HPV-77 gibt. Für dieses Experiment wurden die HUVEC einen Tag vor der Infektion ausgesät und am nächsten Tag mit DMEMc behandelt oder mit den beiden Stämmen mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten 0, 24, 48, 72 und 96 hpi wurden die Zellen lysiert. Die Proteine in den Lysaten wurden mittels SDS-PAGE separiert und mit Hilfe des

Ergebnisse

Western Blots auf eine PVDF-Membran transferiert und untersucht, wie in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 dargelegt ist.

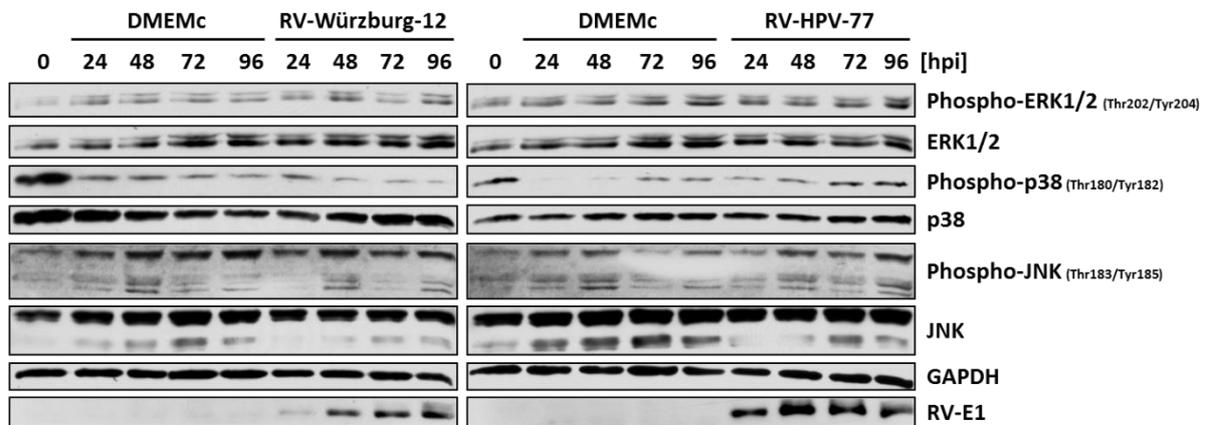


Abbildung 42: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK in HUVEC

HUVEC wurden mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probenflasche aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), ERK1/2, Phospho-p38 (Thr180/Tyr182), p38, Phospho-JNK (Thr183/Tyr185), JNK, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundäntikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In Abbildung 42 ist gezeigt, wie der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 sowie der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK in den HUVEC beeinflussten. In den RV-Würzburg-12-infizierten Zellen zeigte sich im Vergleich mit den DMEMc-behandelten Zellen keine veränderte Phosphorylierung von ERK1/2. Dies konnte ebenso für die RV-HPV-77-infizierten Zellen beobachtet werden. Die Menge an ERK1/2 war dabei in beiden Experimenten annähernd gleich. Zum Zeitpunkt 0 hpi konnte eine starke Phosphorylierung von p38 beobachtet werden, die 24 hpi in den DMEMc-behandelten Zellen vom RV-Würzburg-12-Experiment zurückging und anschließend zu jedem Zeitpunkt annähernd gleich war. Nach der Infektion mit dem Wildtypstamm zeigte sich keine veränderte Phosphorylierung von p38. In den DMEMc-behandelten Zellen vom RV-HPV-77-Experiment ging die Menge an phosphoryliertem p38 24 hpi ebenfalls zurück, stieg 48 und 72 hpi wieder leicht an und blieb bis zum Zeitpunkt 96 hpi auf einem Level. Die

Phosphorylierung von p38 war in den RV-HPV-77-infizierten HUVEC zu jedem der vier untersuchten Zeitpunkte höher. Die Menge an p38 war im jeweiligen Experiment annähernd vergleichbar. Der Nachweis von phosphoryliertem JNK war nur durch eine lange Exposition des Röntgenfilms möglich, was an der starken Hintergrundfärbung erkennbar war. In den RV-Würzburg-12- sowie RV-HPV-77-infizierten HUVEC offenbarte sich im Vergleich mit den DMEMc-behandelten HUVEC keine veränderte Phosphorylierung von JNK. Die Menge an JNK war in den DMEMc-behandelten Zellen im Vergleich mit den infizierten Zellen leicht erhöht. Die GAPDH-Banden waren in beiden Experimenten konstant und das virale E1-Protein konnte nur in den infizierten Zellen nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass die Infektion von HUVEC mit dem teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 die Aktivierung der drei konventionellen MAPK ERK1/2, p38 und JNK nicht induzierte. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach der Infektion mit dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77, dass die Phosphorylierung von p38, aber nicht von ERK1/2 und JNK in den HUVEC anstieg.

Im nächsten Abschnitt sollte die Aktivierung der drei MAPK ERK1/2, p38 und JNK durch das RV in den HSAVEC, den Endothelzellen adulten Ursprungs, untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit DMEMc behandelt bzw. mit dem teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten, nicht-teratogenen Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Anschließend wurde das Experiment auf die gleiche Weise wie für die HUVEC durchgeführt.

Ergebnisse

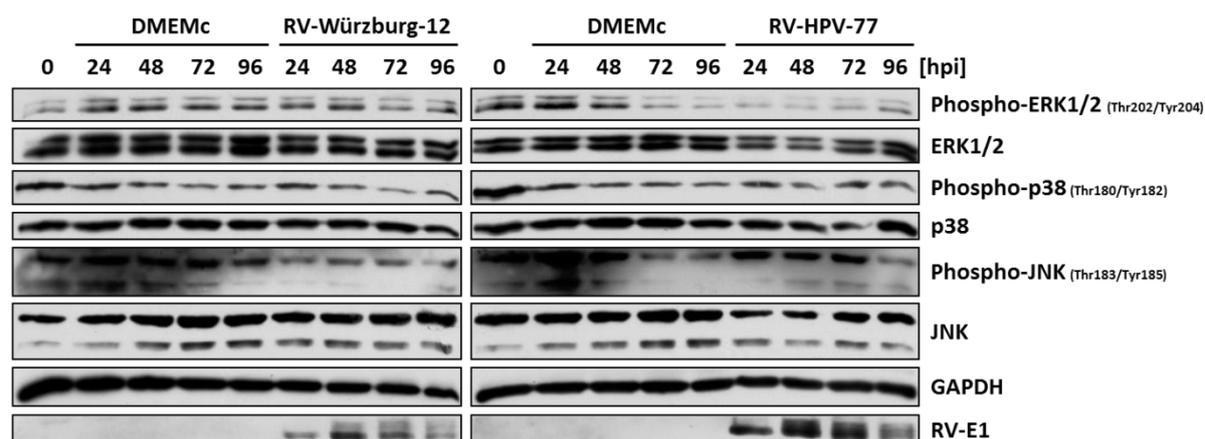


Abbildung 43: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK in HSAVEC

HSAVEC wurden mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probenflasche aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), ERK1/2, Phospho-p38 (Thr180/Tyr182), p38, Phospho-JNK (Thr183/Tyr185), JNK, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundäntikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei (RV-Würzburg-12) bzw. zwei (RV-HPV-77) unabhängige Experimente.

Abbildung 43 zeigt den Einfluss einer RV-Würzburg-12- bzw. RV-HPV-77-Infektion auf die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK in den HSAVEC. Wurden die Zellen mit dem Wildtypstamm infiziert, offenbarte sich im Vergleich mit den DMEMc-behandelten Zellen kein Unterschied bei der Menge an phosphoryliertem ERK1/2. Dabei war die Menge an ERK1/2 während der gesamten Zeit des Experiments konstant. In den DMEMc-behandelten Zellen vom RV-HPV-77-Experiment konnte 24 hpi eine stärkere Phosphorylierung von ERK1/2 detektiert werden, die im Verlauf des Versuches wieder abnahm und zu den Zeitpunkten 72 und 96 hpi ein konstantes Level erreichte. In den RV-HPV-77-infizierten Zellen war die Menge an aktiviertem ERK1/2 zwischen 24 und 96 hpi gering, aber annähernd gleich. Beim Vergleich mit den DMEMc-behandelten Zellen zeigte sich, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 in den infizierten Zellen zu den Zeitpunkten 24 und 48 hpi geringer war. Dieser Effekt könnte auf die reduzierte Menge an ERK1/2 zu diesen beiden Zeitpunkten zurückzuführen sein, die ansonsten während des gesamten Experimentes konstant war. In den RV-Würzburg-12- sowie RV-HPV-77-infizierten HSAVEC

konnte im Vergleich mit den DMEMc-behandelten HSaVEC keine veränderte Phosphorylierung der MAPK p38 nachgewiesen werden. Die Menge an p38 war in beiden Versuchen annähernd konstant. Die Phosphorylierung von JNK war nur durch eine lange Exposition des Röntgenfilms detektierbar, was an der starken Hintergrundfärbung erkennbar war. Es zeigte sich, dass in den DMEMc-behandelten Zellen die Menge an phosphoryliertem JNK größer war als in den RV-Würzburg-12-infizierten Zellen. Dabei war die Gesamtmenge an JNK konstant. In den RV-HPV-77-infizierten HSaVEC war die Phosphorylierung im Vergleich mit den nicht-infizierten HSaVEC 24 und 48 hpi reduziert, 72 hpi erhöht und 96 hpi vergleichbar, sodass keine klare Tendenz ermittelt werden konnte. Die Menge an JNK war in diesem Experiment jedoch annähernd konstant. Die Beladungskontrolle GAPDH war in beiden Ansätzen gleich und das virale E1-Protein konnte nur in den RV-infizierten HSaVEC nachgewiesen werden. Folglich kann zusammengefasst werden, dass die Infektion der HSaVEC mit dem teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 sowie dem Labor-adaptierten, nicht-teratogenen Stamm RV-HPV-77 die Aktivierung der drei konventionellen MAPK ERK1/2, p38 und JNK nicht induzierte.

4.6.2 Einfluss des RV auf den kanonischen NF- κ B-Signalweg

Nachdem die Aktivierung der MAPK in den primären Zellen nach RV-Infektion untersucht wurde, sollte in diesem Kapitel der Einfluss des RV auf den kanonischen NF- κ B-Signalweg analysiert werden. Dazu sollte in den HUVEC die Phosphorylierung am Ser32 sowie die Gesamtmenge des zellulären NF- κ B Inhibitors I κ B α überprüft werden. Des Weiteren sollte die Phosphorylierung von p65 am Ser536, ein Marker für die Transaktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, in den HUVEC und HSaVEC untersucht werden. Dafür wurde zunächst die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs in den HUVEC betrachtet. Die Zellen wurden dazu einen Tag nach dem Aussäen mit DMEMc behandelt bzw. mit dem teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten, nicht-teratogenen Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den in Abbildung 44 gezeigten Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die zu untersuchenden Proteine, wie in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 erläutert, aufgetrennt und detektiert.

Ergebnisse

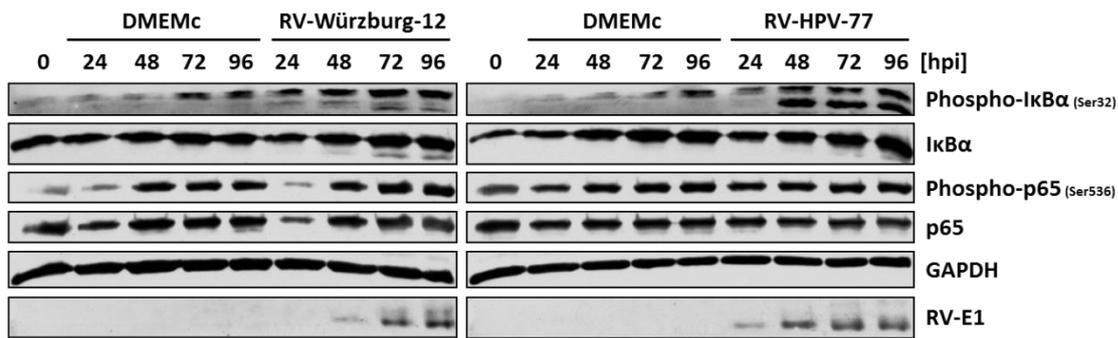


Abbildung 44: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Phosphorylierung von IκBα und p65 in HUVEC

HUVEC wurden mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probenflasche aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen Phospho-IκBα (Ser32), IκBα, Phospho-p65 (Ser536), p65, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In Abbildung 44 ist der Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 sowie des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Phosphorylierung von IκBα und p65 in HUVEC dargestellt. In den DMEMc-behandelten HUVEC vom RV-Würzburg-12-Experiment konnte eine sehr schwache Phosphorylierung von IκBα am Ser32 24 und 48 hpi detektiert werden. Zu den Zeitpunkten 72 und 96 hpi gab es eine Zunahme. In den RV-Würzburg-12-infizierten Zellen war die Menge an phosphoryliertem IκBα zu jedem untersuchten Zeitpunkt größer. Zudem konnte die untere Bande für das phosphorylierte IκBα nur in den infizierten HUVEC zwischen 24 und 96 hpi nachgewiesen werden. In den DMEMc-behandelten Zellen vom RV-HPV-77-Experiment konnte zwischen 24 und 72 hpi eine schwache Phosphorylierung von IκBα beobachtet werden, die 96 hpi anstieg. Nach der Infektion mit dem Labor-adaptierten Stamm konnte zu jedem Zeitpunkt eine vermehrte Phosphorylierung von IκBα im Vergleich mit den DMEMc-behandelten HUVEC detektiert werden. Des Weiteren wurde nur in den infizierten Zellen die untere Bande für das phosphorylierte IκBα nachgewiesen. Diese konnte zwischen 48 und 96 hpi in den mit dem Labor-adaptierten Stamm infizierten HUVEC deutlich identifiziert werden. Die Menge an IκBα war in nicht-infizierten und infizierten Zellen, wenn die obere Bande des jeweiligen Zeitpunkts verglichen wurde, annähernd gleich. Die untere

Bande von I κ B α konnte 48 hpi in den RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC und 72 hpi in den RV-HPV-77-infizierten HUVEC detektiert werden. Bei der Untersuchung der Phosphorylierung von p65 am Ser536, einem weiteren Nachweis über die Aktivierung des NF- κ B-Signalweg, zeigte sich, dass in den DMEMc-behandelten Zellen vom RV-Würzburg-12-Experiment die Menge an phosphoryliertem p65 zu den Zeitpunkten 0 und 24 hpi konstant war, 48 hpi anstieg und während der späteren Zeitpunkte auf diesem Level blieb. In den RV-Würzburg-12-infizierten Zellen war die Phosphorylierung von p65 zu den jeweiligen Zeitpunkten mit den DMEMc-behandelten Zellen vergleichbar, sodass keine vermehrte RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung von p65 festgestellt wurde. Dies konnte auch beim Vergleich von DMEMc-behandelten und RV-HPV-77-infizierten HUVEC beobachtet werden. Die Menge an p65 war beim Vergleich der einzelnen Zeitpunkte von nicht-infizierten und infizierten Zellen annähernd gleich. Die GAPDH-Banden waren während der beiden Experimente konstant. Das virale E1-Protein konnte nur in den infizierten Ansätzen nachgewiesen werden. Damit konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass sowohl der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 als auch der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 die Phosphorylierung von I κ B α , aber nicht von p65 induzierten und somit den kanonischen NF- κ B-Signalweg in den HUVEC aktivierten.

Der Einfluss des teratogenen Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten, nicht-teratogenen Stammes RV-HPV-77 auf den kanonischen NF- κ B-Signalweg sollte zudem in den HSAVEC analysiert werden. Dazu sollte die Phosphorylierung von p65 am Ser536 untersucht werden. Die primären Zellen adulten Ursprungs wurden dafür einen Tag vor der Infektion ausgesät und mit DMEMc behandelt bzw. mit den beiden RV-Stämmen mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die HSAVEC lysiert und die zu untersuchenden Proteine wurden anschließend, wie in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben, aufgetrennt und detektiert.

Ergebnisse

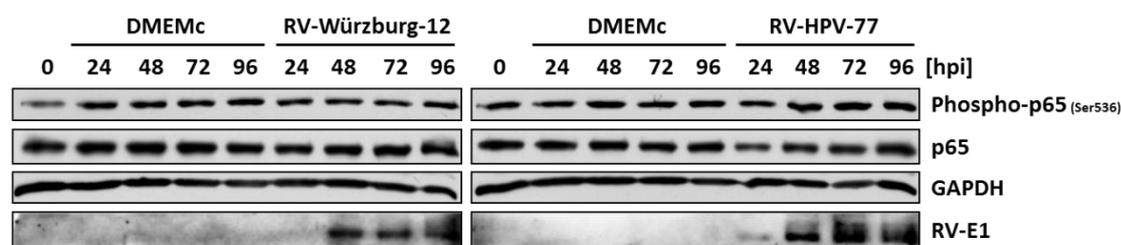


Abbildung 45: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Phosphorylierung von p65 in HSAVEC

HSAVEC wurden mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probentaste aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen Phospho-p65 (Ser536), p65, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei (RV-Würzburg-12) bzw. zwei (RV-HPV-77) unabhängige Experimente.

Inwieweit der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 bzw. der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 die Phosphorylierung von p65 am Ser536 in den HSAVEC beeinflussten, ist in Abbildung 45 gezeigt. Dabei konnte in den DMEMc-behandelten HSAVEC eine konstante Phosphorylierung zu jedem Zeitpunkt des Experiments beobachtet werden. In den RV-Würzburg-12-infizierten Zellen konnte eine vergleichbare Phosphorylierung von p65 detektiert werden. Die Menge an p65 war dabei konstant. In den DMEMc-behandelten sowie den RV-HPV-77-infizierten HSAVEC war die Phosphorylierung von p65 ebenfalls zu jedem Zeitpunkt vergleichbar. Die Expression von p65 war in allen Ansätzen annähernd gleich. Eine konstante Beladung konnte durch die vergleichbaren GAPDH-Banden nachgewiesen werden. Die RV-Infektion der HSAVEC erfolgte durch den Nachweis des viralen E1-Proteins. Somit konnte festgestellt werden, dass in den HSAVEC sowohl der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 als auch der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 die Phosphorylierung von p65 nicht erhöhten. Auf diese Weise konnte in den HSAVEC die Aktivierung des kanonischen NF-κB-Signalwegs durch das RV nicht nachgewiesen werden.

4.6.3 Einfluss des RV auf die Apoptose

Die Auslösung der Apoptose in der Modellzelllinie A549 durch das RV konnte in Kapitel 4.1.3 bereits gezeigt werden. Inwiefern das Virus in den Endothelzellen fetalen und adulten Ursprungs den programmierten Zelltod induziert, sollte in diesem Kapitel untersucht werden. Dazu sollte im ersten Schritt die Expression des proapoptotischen Proteins PUMA, ein Marker für die frühe Apoptose, in den primären Endothelzellen im Kontext einer RV-Infektion überprüft werden. Dazu wurden die HUVEC und HSAVEC ausgesät und am nächsten Tag mit DMEMc behandelt bzw. mit dem teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten, nicht-teratogenen Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert und die zu untersuchenden Proteine wurden, wie in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 dargestellt ist, aufgetrennt und nachgewiesen.

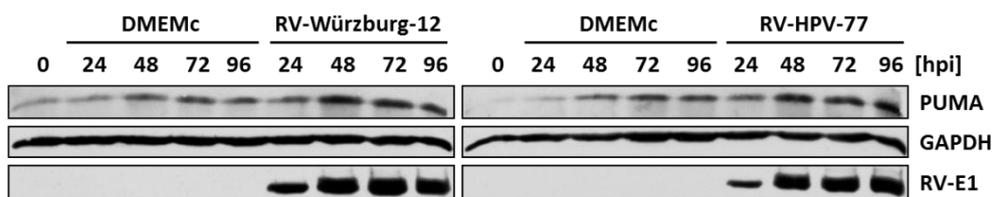


Abbildung 46: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Expression des frühen Apoptose-Markers PUMA in HUVEC

HUVEC wurden mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probenflasche aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen PUMA, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In Abbildung 46 ist gezeigt, welche Auswirkung eine Infektion mit dem RV-Würzburg-12 sowie dem RV-HPV-77 auf die Expression des proapoptotischen Proteins PUMA in den HUVEC hatte. Zum Zeitpunkt 0 hpi konnte eine geringe Menge des Apoptose-Markers detektiert werden. In den DMEMc-behandelten HUVEC vom RV-Würzburg-12-Experiment zeigte sich 24 hpi keine Zunahme der Expression. Die Menge an PUMA stieg 48 hpi leicht an und blieb bis zum Zeitpunkt 96 hpi auf dem Niveau. In den RV-Würzburg-12-infizierten Zellen

konnte bereits 24 hpi eine Zunahme der Expression nachgewiesen werden, die 48 hpi noch weiter anstieg und zu den letzten beiden Zeitpunkten annähernd auf einem Level blieb. Dabei war die Expression von PUMA in den infizierten HUVEC im Vergleich mit den DMEMc-behandelten HUVEC zu jedem Zeitpunkt erhöht, was mit einer starken E1-Expression korrelierte. In den DMEMc-behandelten HUVEC vom RV-HPV-77-Experiment konnte zwischen 24 und 72 hpi eine kontinuierliche Zunahme der Expression beobachtet werden. Zum letzten Zeitpunkt blieb die Menge auf dem Niveau vom Zeitpunkt 72 hpi. In den RV-HPV-77-infizierten Zellen nahm die Expression von PUMA 24 sowie 48 hpi zu und blieb bis zum letzten Zeitpunkt auf diesem hohen Niveau. Im Vergleich mit den DMEMc-behandelten HUVEC war die Menge des Apoptose-Markers in den infizierten Zellen zu jedem Zeitpunkt erhöht, was ebenfalls mit einer starken E1-Expression korrelierte. Die GAPDH-Banden waren in beiden Experimenten konstant. Das virale E1-Protein konnte nur in den infizierten Zellen nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass sowohl der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 als auch der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 die Expression des proapoptotischen PUMA in den HUVEC induzierten.

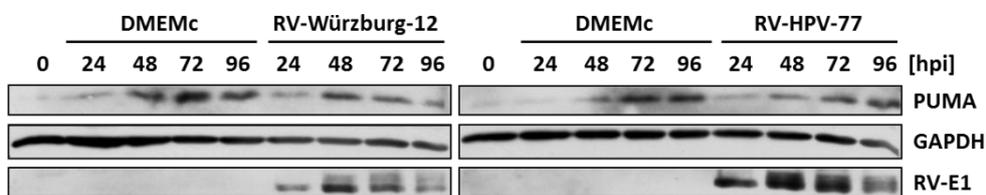


Abbildung 47: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Expression des frühen Apoptose-Markers PUMA in HSaVEC

HSaVEC wurden mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probenflasche aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen PUMA, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei (RV-Würzburg-12) bzw. zwei (RV-HPV-77) unabhängige Experimente.

In Abbildung 47 ist der Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Expression des proapoptotischen Proteins PUMA in den HSaVEC dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 hpi konnte nur eine sehr schwache PUMA-Bande

detektiert werden. In den nicht-infizierten Zellen vom RV-Würzburg-12-Experiment kam es zwischen 24 und 72 hpi zu einer Zunahme der Expression, die 96 hpi wieder auf das Niveau von Zeitpunkt 48 hpi zurückging. Durch die Infektion mit RV-Würzburg-12 nahm die Menge an PUMA zu den Zeitpunkten 24 und 48 hpi ebenfalls zu und ging danach wieder leicht zurück. Im Vergleich mit den DMEMc-behandelten Zellen war die Expression zu den Zeitpunkten 24 und 48 hpi vergleichbar und 72 und 96 hpi reduziert. In den DMEMc-behandelten HSaVEC vom RV-HPV-77-Experiment kam es zwischen 24 und 96 hpi zu einer Zunahme von PUMA, wobei das Maximum zu den letzten beiden Zeitpunkten detektiert wurde. Nach der Infektion mit dem Labor-adaptierten Stamm konnte ebenfalls ein kontinuierlicher Anstieg der PUMA-Expression zwischen 24 und 96 hpi beobachtet werden. Im Vergleich mit den nicht-infizierten Zellen war die Menge an PUMA 24 und 48 hpi annähernd vergleichbar und 72 und 96 hpi verringert. Die GAPDH-Banden waren annähernd konstant und die Synthese des Virusproteins E1 konnte nur in den infizierten Zellen nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass sowohl der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 als auch der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 die Expression des proapoptotischen PUMA zu den Zeitpunkten 72 und 96 hpi in den HSaVEC hemmten.

Da die erhöhte Expression von PUMA nur in den RV-infizierten HUVEC nachgewiesen werden konnte, sollte im nächsten Abschnitt die Aktivität der Caspasen-3/7, ein Marker für die späte Apoptose, im Kontext einer RV-Infektion in den HUVEC bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen ausgesät und am Tag darauf mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder mit dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert und bis zum Messzeitpunkt im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Messung der Aktivität der Caspasen-3/7 wurde der Lumineszenz-basierte *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay durchgeführt (siehe 3.2.5).

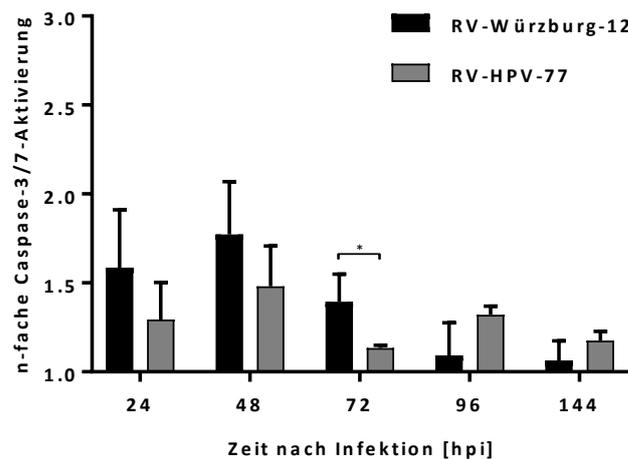


Abbildung 48: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die n-fache Caspase-3/7-Aktivierung in HUVEC

HUVEC wurden einen Tag nach dem Aussäen mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Caspasen-3/7 nach 30 min Inkubation mit dem Caspase-3/7-Substrat gemessen. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von vier unabhängigen Experimenten. *, $p < 0,05$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

Inwieweit der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 und der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 die Aktivierung der Caspasen-3/7 in den HUVEC veränderten, ist in Abbildung 48 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass durch die Infektion mit dem Wildtypstamm die n-fache Aktivierung der Caspasen 24 hpi auf das 1,6-fache anstieg. Das Maximum wurde 48 hpi erreicht und lag bei einer 1,8-fachen Aktivierung. Danach ging die Aktivierung der Caspasen kontinuierlich zurück, wodurch 72 hpi nur noch eine 1,4-fache Aktivierung detektierbar war und 96 sowie 144 hpi die Aktivität der beiden Caspasen in den RV-Würzburg-12-infizierten und DMEMc-behandelten Zellen annähernd gleich war. In den RV-HPV-77-infizierten HUVEC stieg die Aktivierung 24 hpi auf das 1,3-fache und erreichte 48 hpi ein Maximum mit einer 1,5-fachen Aktivierung. 72 hpi ging die Aktivität wieder zurück und war nur noch ca. 1,2-fach erhöht. Die Aktivierung der Caspasen nahm 96 hpi wieder leicht zu, sodass diese 1,3-fach gesteigert war. 144 hpi ging die Aktivierung jedoch wieder zurück und war nur noch ca. 1,2-fach erhöht. Beim Vergleich der beiden Stämme zeigte sich zwischen den Zeitpunkten 24 und 72 hpi, dass die Aktivierung durch den Wildtypstamm höher war. Dabei war der Unterschied 72 hpi signifikant. Zu den letzten beiden Zeitpunkten war jedoch die Aktivität der Caspasen-3/7 in

den RV-HPV-77-infizierten HUVEC etwas höher bzw. fast gleich. Somit konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass es eine schwache Aktivierung der Caspasen-3/7 in den HUVEC zu Beginn der Infektion mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 und dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 gab. Dabei war die Aktivierung der Caspasen-3/7 durch den teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 etwas höher. 4 dpi war die Aktivität der beiden Caspasen in den infizierten und nicht-infizierten HUVEC annähernd gleich.

4.6.4 Einfluss des RV auf NF- κ B-induzierte Apoptose-Inhibitoren in HUVEC

In den RV-infizierten HUVEC konnten bisher die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs (siehe 4.6.2) sowie die Expression des proapoptotischen Proteins PUMA (siehe 4.6.3) gezeigt werden. Nichtsdestotrotz konnte eine schwache Aktivierung der proapoptotischen Caspasen-3/7 nur zu Beginn der Infektion detektiert werden (siehe 4.6.3). In anderen RV-infizierten Zellen, wie den A549-Zellen, konnte jedoch eine starke Induktion der Apoptose beobachtet werden (siehe 4.1.3). Daher könnte eine RV-Infektion in den HUVEC zelluläre Prozesse einleiten, die der RV-induzierten Apoptose entgegenwirken. Der NF- κ B-Signalweg induziert u.a. die Expression von antiapoptotischen Genen wie z.B. *TNFAIP3* (TNFAIP3/A20), *BIRC2* (cIAP1), *BIRC3* (cIAP2) oder *BIRC4* (XIAP). Daher sollte die Expression der vier antiapoptotischen Proteine im Kontext einer RV-Infektion analysiert werden. Dazu wurden HUVEC ausgesät und am nächsten Tag mit DMEMc behandelt bzw. mit dem teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten, nicht-teratogenen Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den Zeitpunkten 0, 24, 48, 72 und 96 hpi wurden die Zellen lysiert. Die Proteine wurden im Anschluss, wie in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben, separiert, immobilisiert und detektiert.

Ergebnisse

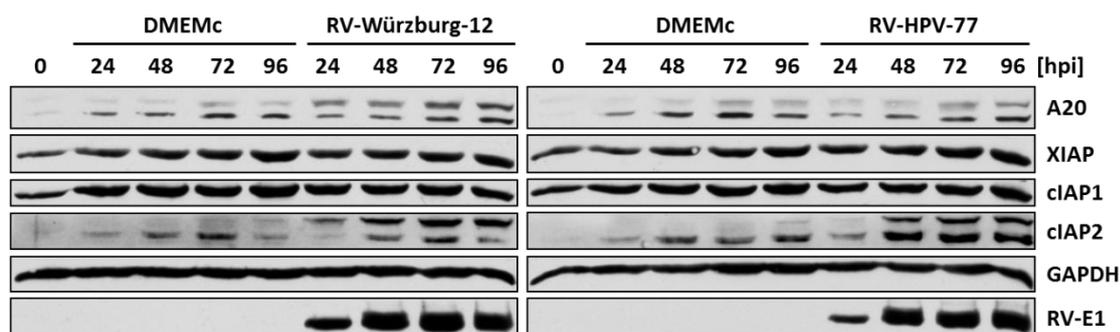


Abbildung 49: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Expression der antiapoptotischen Proteine A20, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in HUVEC

HUVEC wurden mit DMEMc behandelt bzw. mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probenflasche aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen A20 (TNFAIP3), XIAP, cIAP1, cIAP2, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In Abbildung 49 ist der Einfluss einer RV-Würzburg-12- bzw. RV-HPV-77-Infektion auf die Expression der NF-κB-abhängigen antiapoptotischen Proteine A20, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in den HUVEC gezeigt. In den DMEMc-behandelten Zellen konnte eine kontinuierliche Zunahme von A20 (Betrachtung der unteren Bande) beobachtet werden. Diese war mit dem Anstieg an A20 in den RV-infizierten Zellen vergleichbar. Die Expression von XIAP und cIAP1 war in den DMEMc-behandelten bzw. RV-infizierten Zellen über den gesamten Zeitraum des Versuches konstant. In den DMEMc-behandelten HUVEC vom RV-Würzburg-12-Experiment zeigte sich bis zum Zeitpunkt 72 hpi eine kontinuierliche Zunahme von cIAP2 (Betrachtung der unteren Bande), die 96 hpi wieder zurückging. Nach der Infektion mit dem RV-Würzburg-12 konnte ein ähnlicher Verlauf für die Expression von cIAP2 festgestellt werden. In den DMEMc-behandelten Zellen vom RV-HPV-77-Versuch zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der Menge an cIAP2 bis zum Zeitpunkt 96 hpi. Durch die Infektion mit dem Labor-adaptierten Stamm wurde die Menge an cIAP2 zwischen den Zeitpunkten 48 und 96 hpi im Vergleich mit den DMEMc-behandelten Zellen jedoch deutlich erhöht. Die GAPDH-Banden waren während der Experimente konstant und das virale E1-Protein konnte nur in den infizierten Zellen nachgewiesen werden. Folglich konnte gezeigt werden, dass eine Infektion der HUVEC mit

dem teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 die Expression der vier antiapoptotischen Proteine A20, XIAP, cIAP1 und cIAP2 nicht veränderte. In den RV-HPV-77-infizierten HUVEC war die Menge an cIAP2, jedoch nicht an A20, XIAP und cIAP1 erhöht.

4.7 Charakterisierung der basalen ERK1/2-Aktivität in HUVEC

Die RV-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 konnte in den HUVEC nicht gezeigt werden. Dennoch konnte eine hohe basale Aktivierung der MAPK in den Zellen beobachtet werden. Dieser Effekt könnte auf den im Zellkulturmedium der primären Endothelzellen enthaltenen Wachstumsfaktor EGF zurückzuführen sein, der den ERK1/2-Signalweg aktiviert und somit die mögliche Induktion des Signalwegs durch das RV maskiert (Cooper *et al.*, 1982). Um die Bedeutung der basalen ERK1/2-Aktivität für das Virus in den HUVEC zu untersuchen, sollte der Inhibitor U0126 eingesetzt werden. Dieser ist hoch selektiv für die MAPKK MEK1 und MEK2 und blockiert dadurch den ERK1/2-Signalweg. Zunächst sollte eine geeignete Konzentration des Inhibitors ermittelt werden, um die basale ERK1/2-Phosphorylierung in den DMEMc-behandelten bzw. RV-infizierten Zellen zu hemmen. Die Zytotoxizität dieser Konzentration sollte im Anschluss in einem Zellviabilitätstest untersucht werden. Zusätzlich sollte geklärt werden, welchen Einfluss die Hemmung der basalen ERK1/2-Aktivität auf das Wachstum des RV sowie auf die RV-induzierte Apoptose hat.

4.7.1 Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die basale Phosphorylierung von ERK1/2

Um eine geeignete Konzentration des MEK1/2-Inhibitors U0126 zur Hemmung der basalen Phosphorylierung von ERK1/2 in den HUVEC zu ermitteln, wurden die Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Wechsel des Infektionsmediums 2 hpi wurde zu den DMEMc-behandelten bzw. infizierten Zellen frisches Zellkulturmedium gegeben, welches entweder DMSO oder den Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 2,5, 5 oder 10 μM enthielt. Bis zum Zeitpunkt 72 hpi inkubierten die HUVEC im Brutschrank und wurden anschließend lysiert. Die Proteine aus den Lysaten wurden, wie in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 erläutert wird, aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und spezifisch nachgewiesen.

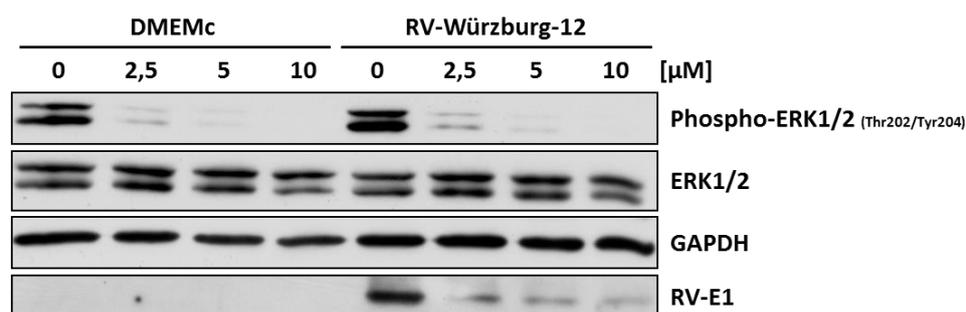


Abbildung 50: Einfluss verschiedener Konzentrationen des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die basale Phosphorylierung von ERK1/2 in DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC 72 hpi

HUVEC wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO (0 µM) oder den MEK1/2-Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 2,5, 5 oder 10 µM enthielt. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurden die Zellen lysiert. Vom Lysat wurden 40 µg Protein pro Probestasche aufgetragen. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), ERK1/2, GAPDH und RV-E1 wurden die zu untersuchenden Proteine markiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und die Messung der Chemilumineszenz. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

In Abbildung 50 ist gezeigt, wie verschiedene Konzentrationen des MEK1/2-Inhibitors U0126 die basale Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 in DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC 72 hpi beeinflussten. Dabei konnte in den DMEMc-behandelten Zellen, die mit DMSO-haltigen Zellkulturmedium kultiviert wurden, eine starke Phosphorylierung von ERK1/2 nachgewiesen werden. Diese basale Aktivierung der MAPK konnte durch steigende Konzentrationen des Inhibitors gehemmt werden. Dabei konnten nach einer Behandlung mit 2,5 und 5 µM U0126 schwache Banden für das phosphorylierte ERK1/2 beobachtet werden. Durch den Einsatz von 10 µM U0126 war die basale Phosphorylierung der MAPK nicht mehr detektierbar. Ein ähnliches Detektionsmuster zeigte sich in den RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC. In den mit DMSO-haltigen Zellkulturmedium kultivierten infizierten Zellen war eine starke Phosphorylierung von ERK1/2 nachweisbar, die mit der Menge an phosphoryliertem ERK1/2 in den DMEMc-behandelten Zellen annähernd vergleichbar war. Durch den Einsatz steigender Konzentrationen des Inhibitors nahm die Phosphorylierung der MAPK in den infizierten Zellen kontinuierlich ab, sodass nach einer Behandlung mit 2,5 und 5 µM U0126 nur noch schwache Banden für das phosphorylierte

ERK1/2 detektierbar waren. Durch die Verwendung von 10 μM U0126 im Zellkulturmedium war die Phosphorylierung von ERK1/2 nicht mehr nachweisbar, weshalb diese Konzentration in den nachfolgenden Experimenten verwendet wurde. Die Menge an ERK1/2 war in den nicht-infizierten sowie infizierten HUVEC unabhängig von der eingesetzten Konzentration des MEK1/2-Inhibitors vergleichbar. Auch bei den GAPDH-Banden konnte kein Unterschied beobachtet werden. Das virale E1-Protein wurde nur in den infizierten Zellen nachgewiesen. Hierbei zeigte sich aber, dass die Menge des viralen Glykoproteins durch den Einsatz von U0126 konzentrationsabhängig abnahm. Zusammenfassend konnte damit festgestellt werden, dass die basale Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 in DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC durch den Einsatz des MEK1/2-Inhibitors U0126 konzentrationsabhängig reduziert werden konnte. Zusätzlich wurde beobachtet, dass durch steigende Konzentrationen des Inhibitors auch die Menge an viralem E1-Protein abnahm, was auf die Bedeutung des ERK1/2-Signalwegs für die RV-Replikation in den HUVEC hinweist.

4.7.2 Einfluss der ERK1/2-Inhibition auf die Zellviabilität

Die Zytotoxizität der im Kapitel zuvor ermittelten U0126-Konzentration von 10 μM , bei der die basale ERK1/2-Phosphorylierung in den HUVEC gehemmt war, sollte im nächsten Schritt mit Hilfe des Zellviabilitätstestes bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen ausgelegt und am darauffolgenden Tag mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. 2 hpi wurde das Infektionsmedium abgesaugt und die Zellen bekamen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den MEK1/2-Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 10 μM enthielt. Zu den in Abbildung 51 gezeigten Messzeitpunkten wurde mit Hilfe des *PrestoBlue*[®]-Reagenzes, wie in Kapitel 3.1.9 dargestellt, die Viabilität der HUVEC bestimmt.

Ergebnisse

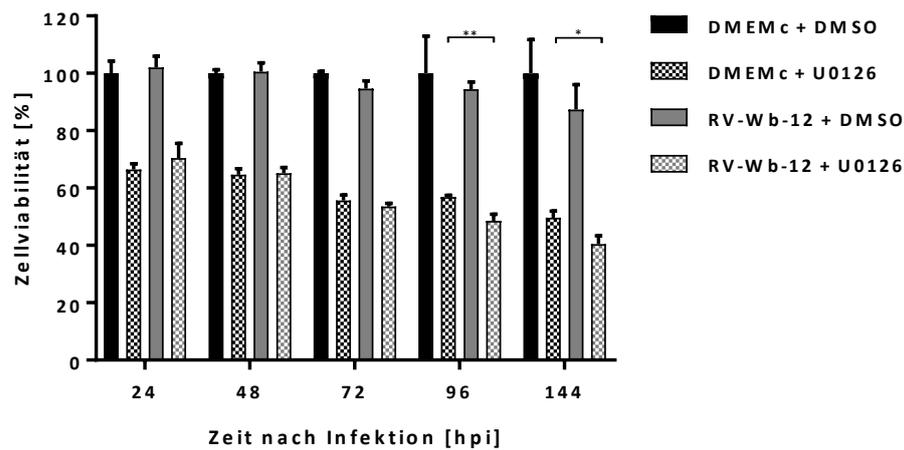


Abbildung 51: Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC

HUVEC wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 (RV-Wb-12) mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den MEK1/2-Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 10 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mit Hilfe des *PrestoBlue*[®]-Reagenzes die Zellviabilität bestimmt. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. *, $p \leq 0,05$; **, $p < 0,01$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

Der Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 mit einer Konzentration von 10 μ M auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC ist in Abbildung 51 gezeigt. In den DMEMc-behandelten HUVEC, die das U0126-haltige Zellkulturmedium bekamen, nahm die Viabilität 24 und 48 hpi um ca. 35 % ab. Zu den Zeitpunkten 72 und 96 hpi erhöhte sich diese Reduktion auf 45 %. Zum letzten Messzeitpunkt war die Viabilität sogar um 50 % verringert. Im Vergleich mit den DMEMc- und DMSO-behandelten Zellen reduzierte der MEK1/2-Inhibitor somit die Viabilität der HUVEC. In den infizierten Zellen, die mit Zellkulturmedium mit DMSO kultiviert wurden, war die Viabilität 24 und 48 hpi unverändert. Eine Abnahme um 5 % konnte 72 und 96 hpi gemessen werden. 144 hpi war die Viabilität um 10 % verringert. Die RV-Würzburg-12-Infektion verringerte damit die Viabilität der HUVEC nur sehr geringfügig. Wurden die infizierten Zellen mit U0126-haltigem Zellkulturmedium kultiviert, nahm die Viabilität 24 hpi um 30 % und 48 hpi um 35 % ab. Zu den Zeitpunkten 72 bzw. 96 hpi war die Viabilität um 45 bzw. 50 % reduziert. 144 hpi nahm die Viabilität um 60 % ab. Im Vergleich mit den infizierten HUVEC, die DMSO-haltiges Zellkulturmedium bekamen, war die Viabilität der infizierten und U0126-behandelten Zellen

zu jedem Zeitpunkt verringert. Außerdem zeigte sich durch den Einsatz von U0126 eine etwas höhere Viabilität 24 hpi, eine unveränderte Viabilität 48 sowie 72 hpi und eine signifikant reduzierte Viabilität 96 sowie 144 hpi in den infizierten im Vergleich mit den DMEMc-behandelten HUVEC. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass sich die Viabilität der HUVEC durch die Verwendung von U0126 mit einer Konzentration von 10 μ M verringerte. Da jedoch diese Inhibitor-Konzentration die basale ERK1/2-Phosphorylierung in den HUVEC komplett hemmte, wurden 10 μ M U0126 in den nachfolgenden Experimenten verwendet. Zudem scheint die basale Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs, die Viabilität in den infizierten Zellen zu den Zeitpunkten 96 und 144 hpi zu erhöhen.

4.7.3 Einfluss der ERK1/2-Inhibition auf das Wachstum des RV

Welchen Einfluss die basale Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs auf das Wachstum des RV in HUVEC hat, sollte im nächsten Experiment untersucht werden. Dazu wurden die Zellen ausgesät und am Tag darauf mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder mit dem Laboradaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums 2 hpi wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um während des Versuches nur die neugebildeten Virionen nachzuweisen. Im Anschluss wurde frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den MEK1/2-Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 10 μ M enthielt, auf die infizierten Zellen pipettiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Teil des virushaltigen Zellkulturüberstandes abgenommen und mit Hilfe des immuncolorimetrischen Assays, der in Kapitel 3.2.4 beschrieben wird, der Virustiter ermittelt.

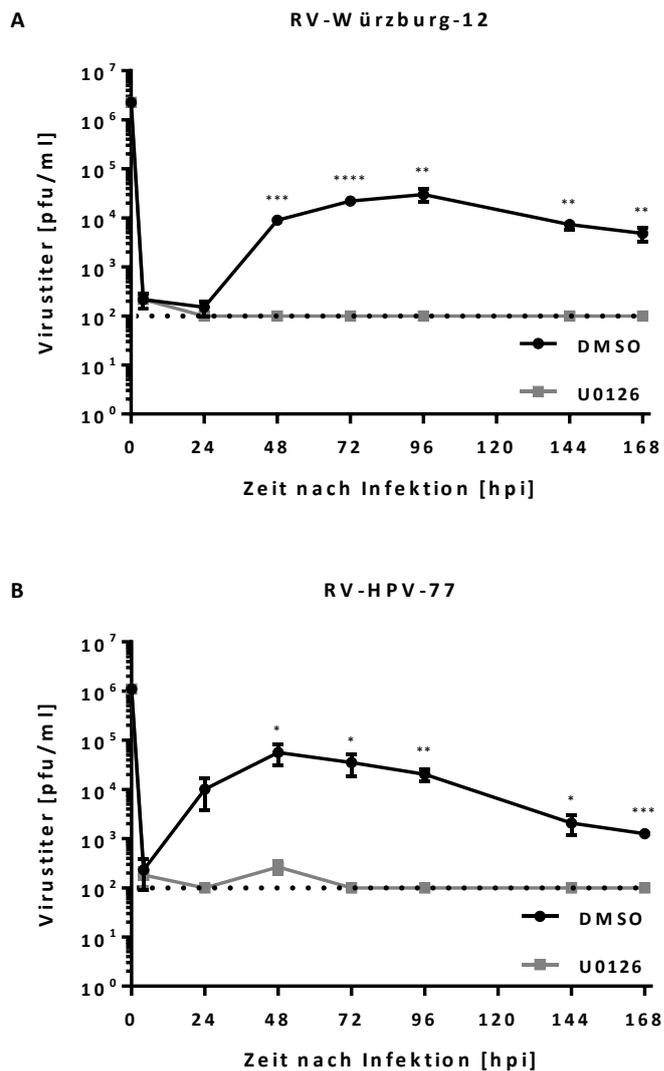


Abbildung 52: Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf das Wachstum des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 bzw. des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 in HUVEC

HUVEC wurden mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 (A) bzw. dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 (B) mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums und drei PBS-Waschschritten bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den MEK1/2-Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 10 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Teil des virushaltigen Zellkulturüberstandes abgenommen und mit Hilfe des immuncolorimetrischen Assays der Virustiter bestimmt. Die Detektionsgrenze des Assays lag bei 10² pfu/ml (gepunktete Linie). Die Graphen zeigen den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 52 sind die Wachstumskurven für den Wildtypstamm RV-Würzburg-12 (Abbildung 52A) und den Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 (Abbildung 52B) unter dem

Einfluss von DMSO bzw. des MEK1/2-Inhibitors U0126 mit einer Konzentration von 10 μ M gezeigt. Zum Zeitpunkt 0 hpi wurde der Virustiter des Infektionsmediums bestimmt. Dabei konnte für den Wildtypstamm ein Titer zwischen 10^6 und 10^7 pfu/ml und für den Labor-adaptierten Stamm ein Titer von 10^6 pfu/ml ermittelt werden. Dieser war für das entsprechende Virus konstant, sodass bei allen Ansätzen die gleiche Menge an Virus auf die Zellen gegeben wurde. 4 hpi ging der Virustiter aufgrund des Absaugens des Infektionsmediums und der PBS-Waschschritte auf einen Wert zwischen 10^2 und 10^3 pfu/ml zurück. Damit war der im Zellkulturmedium-verbliebene Virustiter bestimmt. Wie in Abbildung 52A zu erkennen ist, konnte für den Wildtypstamm, der in den DMSO-behandelten HUVEC replizierte, 24 hpi ebenfalls ein Virustiter zwischen 10^2 und 10^3 pfu/ml beobachtet werden, was zeigt, dass zu diesem Zeitpunkt noch keine neuen Virionen produziert worden waren. Zwischen 48 und 96 hpi stieg der Virustiter jedoch kontinuierlich an und erreichte einen Wert zwischen 10^4 und 10^5 pfu/ml. Nach dem Maximum zum Zeitpunkt 96 hpi verringerte sich der Virustiter wieder und lag zu den Zeitpunkten 144 bzw. 168 hpi nur noch in einem Bereich von 10^3 und 10^4 pfu/ml. Bei den U0126-behandelten HUVEC blieb der RV-Würzburg-12-Titer zu den Zeitpunkten 4 und 24 hpi auf dem Level des DMSO-Ansatzes. Zu den nachfolgenden Zeitpunkten konnte kein Virustiter nachgewiesen werden, der höher als 10^2 pfu/ml war. Dieses Limit ergab sich aus der Detektionsgrenze des immuncolorimetrischen Assays. Der beobachtete Unterschied zwischen den DMSO- bzw. U0126-behandelten Zellen war zu jedem Zeitpunkt ab 48 hpi signifikant. Wie in Abbildung 52B dargestellt ist, zeigte sich für den Labor-adaptierten Stamm, der die DMSO-behandelten HUVEC infiziert hatte, 24 hpi ein Anstieg des Virustiters auf 10^4 pfu/ml. 48 hpi erreichte der RV-HPV-77-Titer ein Maximum zwischen 10^4 und 10^5 pfu/ml. Der Virustiter ging zu den nachfolgenden Zeitpunkten wieder leicht zurück und lag 72 und 96 hpi aber immer noch zwischen 10^4 und 10^5 pfu/ml. Zu den letzten beiden Zeitpunkten war der Virustiter in einem Bereich von 10^3 und 10^4 pfu/ml. Durch die U0126-Behandlung der HUVEC war der RV-HPV-77-Titer ab 24 hpi zu jedem Zeitpunkt reduziert und lag nur in einem Bereich von 10^2 bis 10^3 pfu/ml, wobei ein Virustiter unter 10^2 pfu/ml aufgrund des Detektionslimits des immuncolorimetrischen Assays nicht nachweisbar war. Der beobachtete Unterschied war ab dem Zeitpunkt 48 hpi signifikant. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass durch die Hemmung der basalen ERK1/2-Aktivierung sowohl der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 als auch der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 signifikant weniger infektiöse

Virionen aus den HUVEC freisetzen. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass der Unterschied im Virustiter auch durch die Abnahme der Viabilität durch den MEK1/2-Inhibitor U0126 verursacht werden könnte.

4.7.4 Einfluss der ERK1/2-Inhibition auf die RV-induzierte Caspase-3/7-Aktivität

Inwiefern die basale Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs die RV-induzierte Caspase-3/7-Aktivität in den HUVEC beeinflusst, sollte in diesem Kapitel untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen einen Tag nach dem Aussäen mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Das Infektionsmedium wurde 2 hpi gewechselt und die Zellen bekamen frisches Zellkulturmedium, das entweder DMSO oder den MEK1/2-Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 10 μ M enthielt. Zu den in Abbildung 53 angegebenen Messzeitpunkten wurde die Aktivität der Caspasen-3/7 mit Hilfe des Lumineszenz-basierten *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assays bestimmt (siehe Kapitel 3.2.5).

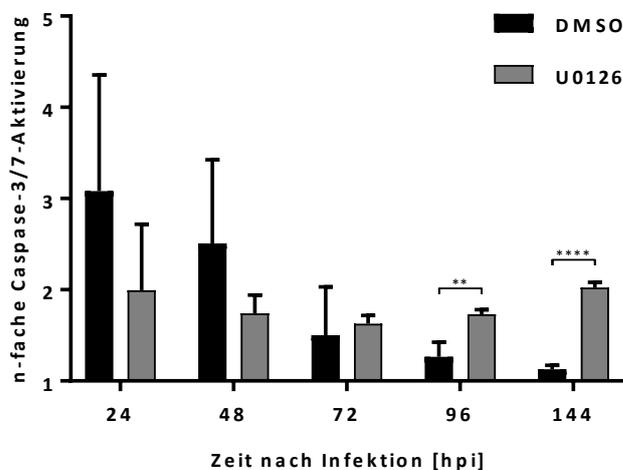


Abbildung 53: Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in HUVEC

HUVEC wurden einen Tag nach dem Aussäen mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den MEK1/2-Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 10 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Caspasen-3/7 nach 30 min Inkubation mit dem Caspase-3/7-Substrat gemessen. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von vier unabhängigen Experimenten. **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 53 ist gezeigt, wie sich die Hemmung der basalen ERK1/2-Phosphorylierung durch den MEK1/2-Inhibitor U0126 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in HUVEC auswirkte. In den infizierten Zellen, die mit DMSO-haltigem Zellkulturmedium kultiviert wurden, konnte 24 hpi eine 3-fache Aktivierung der Caspasen beobachtet werden, die im Verlauf der Infektion immer weiter abnahm. Dabei waren die Caspasen 48 hpi 2,5-fach bzw. 72 hpi 1,5-fach aktiviert. Zu den Zeitpunkten 96 und 144 hpi konnte nur noch eine sehr schwache Aktivierung gemessen werden, sodass die Aktivität in den DMEMc-behandelten bzw. infizierten HUVEC annähernd gleich war. Wurden die infizierten Zellen mit U0126-haltigem Zellkulturmedium kultiviert, zeigte sich 24 hpi eine 2-fache Caspase-3/7-Aktivierung. Diese ging 48 hpi leicht zurück und lag bei einer 1,8-fachen Aktivierung. Auf diesem Level blieb die Aktivität zu den Zeitpunkten 72 und 96 hpi. Zum letzten Zeitpunkt konnte wieder eine 2-fache Caspase-3/7-Aktivierung detektiert werden. Beim Vergleich mit den DMSO-behandelten HUVEC zeigte sich, dass durch die Hemmung der basalen ERK1/2-Aktivierung die Caspase-3/7-Aktivität 24 sowie 48 hpi reduziert, 72 hpi vergleichbar und 96 sowie 144 hpi erhöht war. Dabei war die Standardabweichung zu den Zeitpunkten 24 und 48 hpi sehr groß, sodass der Effekt nicht sehr ausgeprägt war. Der beobachtete Unterschied zu den letzten beiden Zeitpunkten war jedoch signifikant. Folglich konnte festgestellt werden, dass die Hemmung der basalen ERK1/2-Aktivierung im Kontext einer RV-Würzburg-12-Infektion die Aktivität der Caspasen-3/7 zu den Zeitpunkten 96 und 144 hpi erhöhte.

4.8 Charakterisierung der RV-induzierten NF- κ B-Aktivierung in HUVEC

Die RV-induzierte Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs in den HUVEC konnte durch den Nachweis der Phosphorylierung von P-I κ B α mit Hilfe des Western Blots gezeigt werden (siehe 4.6.2). Welche Bedeutung der Signalweg für die RV-Infektion in den HUVEC hat, ist jedoch völlig unklar und sollte daher genauer untersucht werden. Dazu sollte der NF- κ B-Inhibitor SC75741, der die DNA-Bindung der NF- κ B-Untereinheit p65 und somit die Expression von NF- κ B-abhängigen Genen unterbindet, eingesetzt werden (Leban *et al.*, 2007; Ehrhardt *et al.*, 2013). Zuerst sollte für den Inhibitor eine geeignete Konzentration ermittelt werden, bei der die Morphologie der HUVEC nicht beeinträchtigt wird. Um zu überprüfen, ob diese Konzentration die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-

infizierten A549-Zellen beeinflusst, sollte ein Zellviabilitätstest durchgeführt werden. Im Weiteren sollte der Einfluss der Hemmung des NF- κ B-Signalwegs auf das Wachstum des RV sowie auf die RV-induzierte Apoptose in den HUVEC analysiert werden.

4.8.1 Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die Morphologie der HUVEC

Um eine geeignete Konzentration des NF- κ B-Inhibitors SC75741 zu bestimmen, bei der die Morphologie der HUVEC nicht beeinträchtigt wird, wurden die Zellen ausgesät und am Tag darauf mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. 2 hpi wurde das Infektionsmedium abgesaugt und die HUVEC bekamen frisches Zellkulturmedium mit DMSO oder mit dem NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 0,5, 1 oder 2 μ M. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurden lichtmikroskopische Aufnahmen von den DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC gemacht.

Ergebnisse

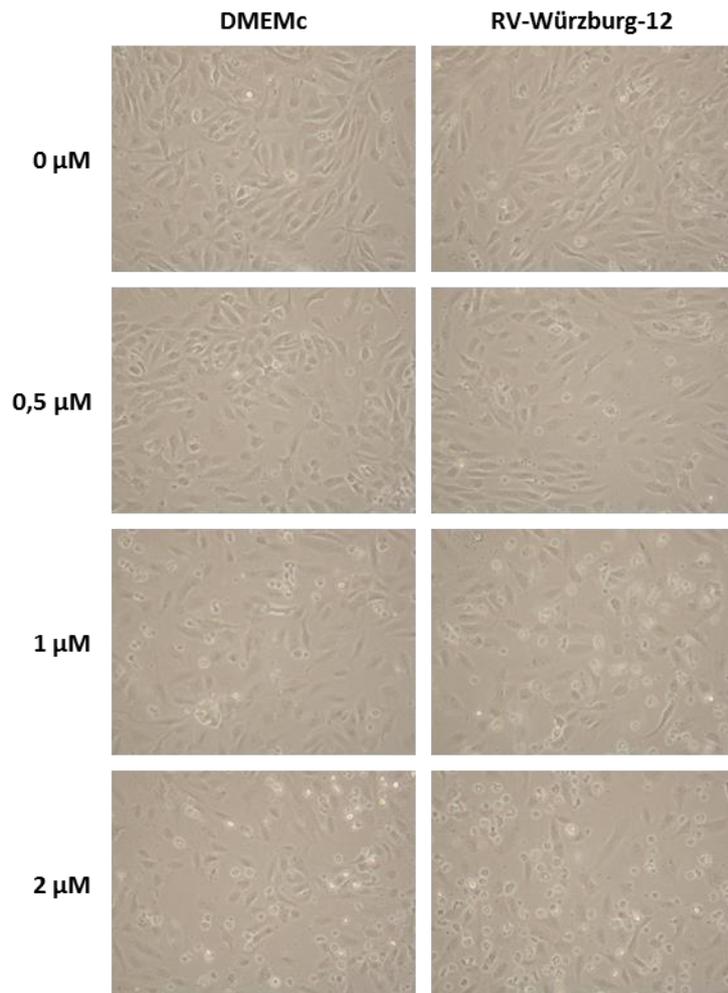


Abbildung 54: Einfluss verschiedener Konzentrationen des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die Morphologie von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC 72 hpi

HUVEC wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO (0 μ M) oder den NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 0,5, 1 oder 2 μ M enthielt. Zum Zeitpunkt 72 hpi wurden von den Zellen lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In Abbildung 54 ist der Einfluss verschiedener Konzentrationen des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die Morphologie von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC 72 hpi gezeigt. In den nicht-infizierten Zellen konnte nach der Verwendung von 0 und 0,5 μ M SC75741 kein Unterschied in der Morphologie der HUVEC beobachtet werden. Durch den Anstieg der Konzentration auf 1 und 2 μ M wuchsen die Zellen deutlich schlechter und es konnten vermehrt vom Zellrasen abgelöste Zellen im Zellkulturmedium gesehen werden. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei den infizierten Zellen. Nach Behandlung mit 0 und 0,5 μ M SC75741 war die Morphologie der HUVEC nicht beeinträchtigt. Durch die Verwendung von 1

und 2 μM SC75741 war die Zelldichte der HUVEC deutlich geringer und die Menge an abgekugelten Zellen nahm zu. Beim Vergleich von nicht-infizierten und infizierten Zellen, die mit den beiden höheren SC75741-Konzentrationen behandelt wurden, zeigte sich, dass nach Infektion mit dem Wildtypstamm die Menge an abgelösten Zellen höher war. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass eine SC75741-Konzentration von 0,5 μM die Morphologie der DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC nicht beeinflusste, sodass diese Konzentration in den nachfolgenden Experimenten verwendet wurde. Zusätzlich zeigte sich bei diesem Versuch, dass durch die Hemmung des NF- κ B-Signalwegs in den RV-infizierten HUVEC die Menge an abgekugelten Zellen im Vergleich mit den DMEMc-behandelten HUVEC zunahm.

4.8.2 Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf die Zellviabilität

Um zu überprüfen, ob der NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 0,5 μM die Viabilität der HUVEC beeinträchtigt, sollte im nächsten Abschnitt ein Zellviabilitätstest durchgeführt werden. Dafür wurden die Zellen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. 2 hpi wurde das Infektionsmedium abgesaugt und auf die Zellen wurde frisches Zellkulturmedium gegeben, welches entweder DMSO oder den NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 0,5 μM enthielt. Zu den in Abbildung 55 angegebenen Messzeitpunkten wurde mit Hilfe des *PrestoBlue*[®]-Reagenzes, wie in Kapitel 3.1.9 erläutert, die Viabilität der HUVEC ermittelt.

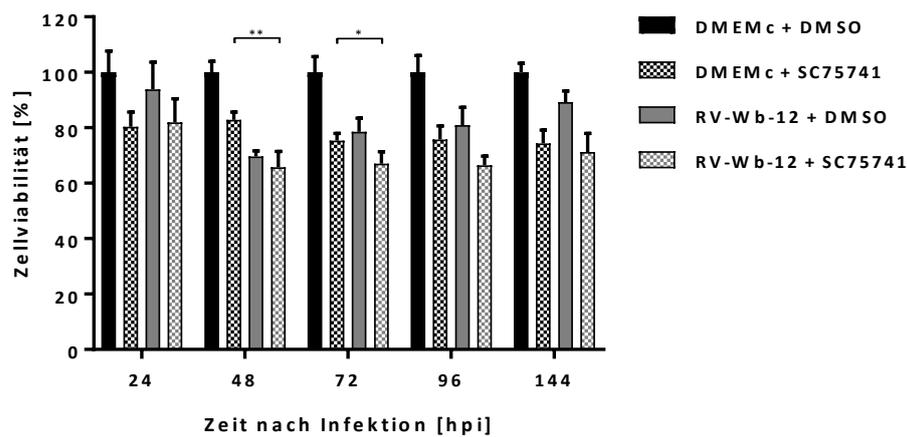


Abbildung 55: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC

HUVEC wurden mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 (RV-Wb-12) mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 0,5 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mit Hilfe des *PrestoBlue*[®]-Reagenzes die Zellviabilität bestimmt. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. *, $p \leq 0,05$; **, $p < 0,01$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 55 ist der Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 mit einer Konzentration von 0,5 μ M auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC gezeigt. In den DMEMc-behandelten Zellen, die mit Zellkulturmedium mit dem NF- κ B-Inhibitor kultiviert wurden, konnte 24 und 48 hpi eine Abnahme der Viabilität um ca. 20 % beobachtet werden. Zwischen 72 und 144 hpi reduzierte sich die Viabilität um ca. 25 %. Damit hatte der NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 0,5 μ M nur einen geringfügigen Einfluss auf die Viabilität der HUVEC. In den infizierten Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, nahm die Viabilität 24 hpi um 5 % ab. 48 hpi stieg diese Reduktion auf 30 %. Zu den Zeitpunkten 72 und 96 hpi war die Viabilität in den infizierten Zellen nur noch um 20 % verringert. Zum letzten Zeitpunkt lag die Abnahme der Viabilität bei 10 %. Wurden die infizierten Zellen mit SC75741-haltigem Zellkulturmedium kultiviert, nahm die Viabilität 24 hpi um 20 % ab. Zwischen den Zeitpunkten 48 und 96 hpi lag die Reduktion bei ca. 35 %. 144 hpi war die Viabilität um 30 % verringert. In den infizierten Zellen, bei denen der NF- κ B-Inhibitor im Zellkulturmedium war, war die Viabilität im Vergleich zu den DMSO-behandelten und infizierten Zellen zwischen den Zeitpunkten 48 und 144 hpi reduziert. Auch

beim Vergleich von DMEMc-behandelten mit infizierten HUVEC, die beide Zellkulturmedium mit dem Inhibitor bekamen, zeigte sich zwischen 48 und 96 hpi eine Reduktion der Viabilität in den infizierten Zellen. Dieser Unterschied war für die Zeitpunkte 48 und 72 hpi signifikant. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass eine SC75741-Konzentration von 0,5 μ M die Viabilität der HUVEC nur geringfügig senkte, weshalb diese Konzentration des Inhibitors in den nachfolgenden Experimenten verwendet wurde. Zudem könnte die RV-induzierte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs, die Viabilität in den infizierten HUVEC zu den Zeitpunkten 48 und 96 hpi leicht erhöhen. Dies zeigte sich durch den Vergleich von infizierten und SC75741-behandelten Zellen mit den DMEMc- und SC75741-behandelten sowie mit den infizierten und DMSO-behandelten Zellen.

4.8.3 Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf das Wachstum des RV

Inwieweit die Hemmung des RV-induzierten NF- κ B-Signalwegs mit Hilfe des Inhibitors SC75741 das Wachstum des RV in den HUVEC beeinflusst, sollte untersucht werden. Dazu wurden die Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder mit dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Wechsel des Infektionsmediums wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um während des Versuches nur die neugebildeten Viruspartikel nachzuweisen. Die infizierten Zellen bekamen anschließend frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 0,5 μ M enthielt. Zu den in Abbildung 56 aufgeführten Zeitpunkten wurde ein Teil des virushaltigen Zellkulturüberstandes abgenommen und mit Hilfe des immuncolorimetrischen Assays, der in Kapitel 3.2.4 beschrieben wird, der Virustiter bestimmt.

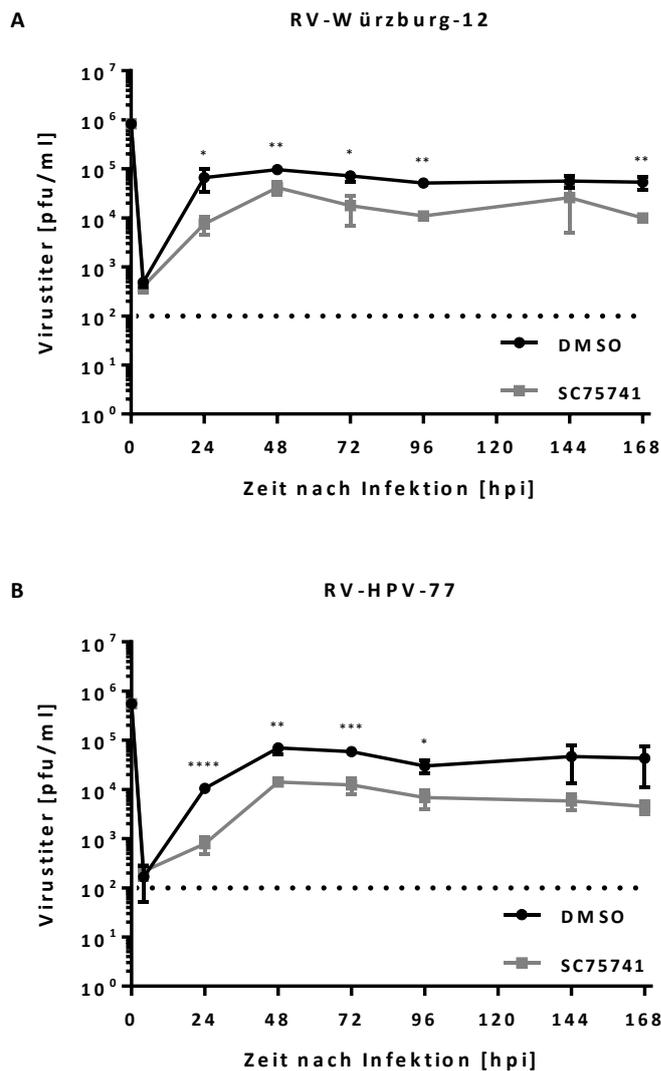


Abbildung 56: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf das Wachstum des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 bzw. des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 in HUVEC

HUVEC wurden mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 (A) bzw. dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 (B) mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums und drei PBS-Waschschritten bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 0,5 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Teil des virushaltigen Zellkulturüberstandes abgenommen und mit Hilfe des immuncolorimetrischen Assays der Virustiter bestimmt. Die Detektionsgrenze des Assays lag bei 10² pfu/ml (gepunktete Linie). Die Graphen zeigen den Mittelwert sowie die SD von drei unabhängigen Experimenten. *, p \leq 0,05; **, p \leq 0,01; ***, p \leq 0,001; ****, p \leq 0,0001; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

In Abbildung 56 ist der Einfluss der Hemmung des NF- κ B-Signalwegs auf das Wachstum des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 (Abbildung 56A) und des Labor-adaptierten Stammes RV-

HPV-77 (Abbildung 56B) in den HUVEC gezeigt. 0 hpi wurde der Virustiter im Infektionsmedium ermittelt und es zeigte sich, dass für beide Viren ein Wert von ca. 10^6 pfu/ml bestimmt werden konnte. Dieser war für das entsprechende Virus konstant, sodass alle Ansätze die gleiche Virusmenge bekamen. Zum Zeitpunkt 4 hpi wurde der im Zellkulturmedium-verbliebene Virustiter bestimmt. Dabei konnte ein Wert zwischen 10^2 und 10^3 pfu/ml ermittelt werden. Wie in Abbildung 56A zu erkennen ist, zeigte sich für die DMSO-behandelten HUVEC 24 hpi ein Anstieg des RV-Würzburg-12-Titers auf 10^5 pfu/ml. Zwischen den Zeitpunkten 48 und 168 hpi blieb die Menge des Virus im Zellkulturmedium konstant. Bei den SC75741-behandelten HUVEC konnte ab 24 hpi zu jedem Zeitpunkt der Wachstumskurve ein verringerter RV-Würzburg-12-Titer beobachtet werden. Dieser Unterschied war ab 24 hpi zu jedem Zeitpunkt, außer 144 hpi, signifikant. Wie in Abbildung 56B dargestellt, konnte für die DMSO-behandelten und RV-HPV-77-infizierten HUVEC 24 hpi eine Zunahme des Virustiters auf 10^4 pfu/ml detektiert werden. 48 hpi erreichte der RV-HPV-77-Titer mit annähernd 10^5 pfu/ml ein Maximum, ging anschließend wieder leicht zurück und blieb bis zum Zeitpunkt 168 hpi annähernd konstant in einem Bereich von 10^4 und 10^5 pfu/ml. Bei den SC75741-behandelten HUVEC war der RV-HPV-77-Titer ab 24 hpi zu jedem Zeitpunkt der Wachstumskurve reduziert. Dabei war der beobachtete Unterschied zwischen 24 und 96 hpi signifikant. In der Zusammenfassung konnte damit gezeigt werden, dass durch die Hemmung der RV-induzierten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs sowohl der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 als auch der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 signifikant weniger infektiöse Viruspartikel aus den HUVEC freisetzen. Hierbei muss jedoch angemerkt werden, dass der Unterschied im Virustiter auch durch die Abnahme der Viabilität durch den NF- κ B-Inhibitor SC75741 verursacht werden könnte.

4.8.4 Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf die RV-induzierte Caspase-3/7-Aktivität

Welche Auswirkung die Hemmung der RV-induzierten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs auf die Caspase-3/7-Aktivität in den HUVEC hat, sollte nun näher untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen ausgesät und am Tag darauf mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Wechsel des Infektionsmediums bekamen die HUVEC frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den NF- κ B-Inhibitor mit einer Konzentration von 0,5 μ M enthielt. Zu den in

Abbildung 57 angegebenen Messzeitpunkten wurde die Aktivität der Caspasen-3/7 mit Hilfe des Lumineszenz-basierten *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assays gemessen (siehe 3.2.5).

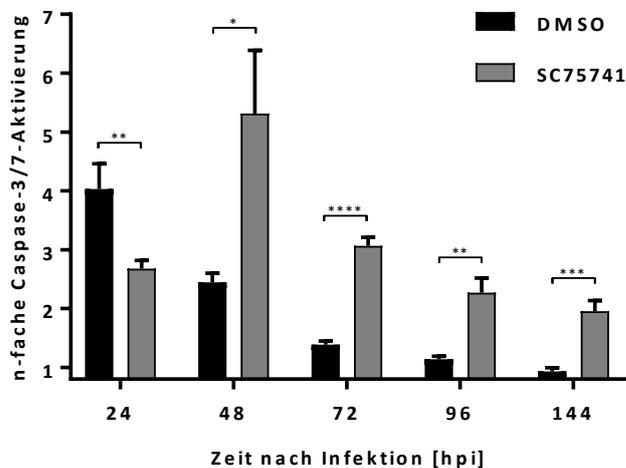


Abbildung 57: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in HUVEC

HUVEC wurden einen Tag nach dem Aussäen mit DMEMc behandelt oder mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 mit einer MOI von 5 infiziert. Nach dem Absaugen des Infektionsmediums bekamen die Zellen frisches Zellkulturmedium, welches entweder DMSO oder den NF- κ B-Inhibitor SC75741 mit einer Konzentration von 0,5 μ M enthielt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Caspasen-3/7 nach 30 min Inkubation mit dem Caspase-3/7-Substrat gemessen. Der Graph zeigt den Mittelwert sowie die SD von vier unabhängigen Experimenten. *, $p \leq 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$; die Statistik wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt.

Abbildung 57 zeigt den Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 mit einer Konzentration von 0,5 μ M auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in HUVEC. In den DMSO-behandelten und infizierten Zellen stieg die Caspase-3/7-Aktivität 24 hpi um das 4-fache an und ging anschließend wieder zurück. Dabei konnte 48 hpi noch eine 2,5-fache Aktivierung beobachtet werden. Zu den Zeitpunkten 72, 96 und 144 hpi war die Aktivität der Caspasen nur noch leicht erhöht. In den SC75741-behandelten und infizierten Zellen zeigte sich 24 hpi eine 2,8-fache Aktivierung der Caspasen. Diese stieg 48 hpi auf das 5-fache an und ging anschließend wieder zurück. Dabei konnte zum Zeitpunkt 72 hpi eine 3-fache Aktivierung detektiert werden. 96 bzw. 144 hpi war die Aktivität der Caspasen um das 2,2- bzw. 2-fache erhöht. Beim Vergleich mit den DMSO-behandelten HUVEC zeigte sich, dass die

Caspase-3/7-Aktivität durch die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung 24 hpi verringert und zu den Zeitpunkten 48, 72, 96 und 144 hpi deutlich erhöht war. Dabei war der Unterschied zu jedem beobachteten Zeitpunkt signifikant. Damit konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung im Kontext einer RV-Würzburg-12-Infektion die Aktivität der Caspasen-3/7 zum Zeitpunkt 24 hpi verringerte und zwischen den Zeitpunkten 48 und 144 hpi erhöhte. Dies könnte darauf hindeuten, dass das RV die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs in den HUVEC zu den späteren Zeitpunkten der Infektion benötigt, um die RV-induzierte Apoptose zu hemmen.

4.9 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Resultate dieser Arbeit sind in den Tabellen 6 bis 9 zusammengefasst. Tabelle 6 zeigt den Einfluss des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK, den kanonischen NF- κ B-Signalweg und die Apoptose in immortalisierten Zelllinien (siehe auch Kapitel 4.1).

Tabelle 6: Zusammenfassung des Einflusses des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK, den kanonischen NF- κ B-Signalweg und die Apoptose in immortalisierten Zelllinien

	RV-Würzburg-12- infizierte A549-Zellen	RV-HPV-77- infizierte A549-Zellen	RV-Würzburg-12- infizierte Vero-Zellen
Phosphorylierung von ERK1/2	erhöht (48 – 96 hpi)	erhöht (24 – 96 hpi)	erhöht (32 – 96 hpi)
Phosphorylierung von p38	erhöht (32 – 96 hpi)	erhöht (24 – 96 hpi)	erhöht (48 – 96 hpi)
Phosphorylierung von JNK	erhöht (24 – 96 hpi)	erhöht (32 – 96 hpi)	erhöht (32 – 96 hpi)
Phosphorylierung von IκBα	erhöht (48 – 80 hpi)	erhöht (48 – 96 hpi)	
Menge an IκBα	verringert (24 – 96 hpi)	verringert (24 – 96 hpi)	
Phosphorylierung von p65	erhöht (32 – 96 hpi)	erhöht (24 – 96 hpi)	
Aktivierung von NF-κB	13-fach aktiviert (48 hpi)	15-fach aktiviert (48 hpi)	
Expression von PUMA	erhöht (48 – 96 hpi)	erhöht (32 – 96 hpi)	
Aktivität der Caspasen-3/7	erhöht (24 – 96 hpi)	erhöht (24 – 96 hpi)	

Die Charakterisierung der RV-induzierten Aktivierung von ERK1/2, p38, JNK sowie NF- κ B in den A549-Zellen, wie in den Kapiteln 4.2 – 4.5 dargestellt, ist in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Charakterisierung der RV-induzierten Aktivierung von ERK1/2, p38, JNK bzw. NF- κ B mit Hilfe der Inhibitoren U0126, SB202190, SP600125 bzw. SC75741 in den A549-Zellen

	RV-Würzburg-12-infizierte A549-Zellen			
	U0126 [20 μM]	SB202190 [10 μM]	SP600125 [20 μM]	SC75741 [5 μM]
Titration des Inhibitors	Phospho-ERK1/2 verringert	COX-2 verringert	Phospho-c-Jun verringert	NF- κ B-Aktivierung verringert
RV-E1-Expression	verringert (72 hpi)	leicht erhöht (72 hpi)	verringert (72 hpi)	<i>nicht untersucht</i>
Viabilität	verringert (96 + 144 hpi)	unverändert	verringert (72 – 144 hpi)	verringert (48 + 72 hpi)/ erhöht (96 + 144 hpi)
Wachstum des RV	verringert (24 -144 hpi) (ebenso bei RV-HPV-77)	erhöht (72 -144 hpi) (ebenso bei RV-HPV-77)	verringert (24 -144 hpi) (ebenso bei RV-HPV-77)	verringert (24 -144 hpi) (ebenso bei RV-HPV-77)
PUMA-Expression	unverändert (72 hpi)	leicht erhöht (72 hpi)	verringert (72 hpi)	<i>nicht untersucht</i>
Caspase-3/7-Aktivität	erhöht (48 + 72 hpi)	erhöht (48 + 72 hpi)	verringert (48 hpi)	verringert (48 hpi)
Ablösung von toten Zellen	leicht verringert (72 hpi)	leicht verringert (72 hpi)	verringert (72 hpi)	verringert (72 hpi)

Tabelle 8 zeigt den Einfluss des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK, den kanonischen NF- κ B-Signalweg, die Induktion der Apoptose sowie die Apoptose-Inhibitoren A20, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in primären Endothelzellen (siehe auch Kapitel 4.6).

Tabelle 8: Zusammenfassung des Einflusses des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK, den kanonischen NF- κ B-Signalweg, die Induktion der Apoptose sowie die Apoptose-Inhibitoren A20, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in primären Endothelzellen

	RV-Würzburg-12- infizierte HUVEC	RV-HPV-77- infizierte HUVEC	RV-Würzburg-12- infizierte HSaVEC	RV-HPV-77- infizierte HSaVEC
Phosphorylierung von ERK1/2	unverändert	unverändert	unverändert	verringert (24 + 48 hpi)
Phosphorylierung von p38	unverändert	erhöht (24 – 96 hpi)	unverändert	unverändert
Phosphorylierung von JNK	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert
Phosphorylierung von IκBα	erhöht (24 – 96 hpi)	erhöht (24 – 96 hpi)	<i>nicht untersucht</i>	<i>nicht untersucht</i>
Menge an IκBα	unverändert	unverändert	<i>nicht untersucht</i>	<i>nicht untersucht</i>
Phosphorylierung von p65	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert
Expression von PUMA	erhöht (24 – 96 hpi)	erhöht (24 – 96 hpi)	verringert (72 + 96 hpi)	verringert (72 + 96 hpi)
Aktivität der Caspasen-3/7	leicht erhöht (24 – 144 hpi)	leicht erhöht (24 – 144 hpi)	<i>nicht untersucht</i>	<i>nicht untersucht</i>
Expression von A20	unverändert	unverändert		
Expression von XIAP	unverändert	unverändert		
Expression von cIAP1	unverändert	unverändert		
Expression von cIAP2	unverändert	erhöht (48 – 96 hpi)		

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Charakterisierung der basalen ERK1/2-Aktivität bzw. der Aktivierung von NF- κ B mit Hilfe der Inhibitoren U0126 bzw. SC75741 in RV-infizierten HUVEC, wie in den Kapiteln 4.7 und 4.8 gezeigt, sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Charakterisierung der basalen ERK1/2-Aktivität bzw. der Aktivierung von NF- κ B mit Hilfe der Inhibitoren U0126 bzw. SC75741 in RV-infizierten HUVEC

	RV-Würzburg-12-infizierte HUVEC	
	U0126 [10 μM]	SC75741 [0,5 μM]
Titration des Inhibitors	Phospho-ERK1/2 verringert	Morphologie unverändert
RV-E1-Expression	verringert (72 hpi)	verringert (72 hpi) (Behrsing, persönliche Kommunikation, 2018)
Viabilität	verringert (96 + 144 hpi)	verringert (48 - 96 hpi)
Wachstum des RV	verringert (48 -168 hpi) (ebenso bei RV-HPV-77)	verringert (24 -168 hpi) (ebenso bei RV-HPV-77)
Caspase-3/7-Aktivität	erhöht (96 + 144 hpi)	verringert (24 hpi) erhöht (48 – 144 hpi)

5. Diskussion

Bei einer maternalen Infektion kann das RV die Blut-Plazenta-Schranke passieren und den sich entwickelnden Fetus infizieren (Banatvala und Brown, 2004). In den ersten Monaten der Schwangerschaft kann dies zum Abort, zur Frühgeburt oder zu Missbildungen am ungeborenen Kind führen. Bei akzidentell geimpften Frauen in der Frühschwangerschaft ist das Risiko für den Fetus aufgrund der stark verringerten Teratogenität der RV-Impfviren hingegen minimal (Enders, 1984). Die molekularen Mechanismen, die die teratogene Wirkung des RV verursachen und damit die kongenitalen Defekte hervorrufen, sind jedoch noch immer nicht aufgeklärt. Eine Vielzahl von Studien sieht in der Modifikation der Apoptose den Hauptgrund für die Teratogenität des Virus. Erst kürzlich konnte in einer Genexpressionsanalyse von RV-infizierten primären Endothelzellen fetalen und adulten Ursprungs die RV-abhängige Beeinflussung einer Vielzahl von zellulären Signalwegen, wie z.B. dem MAPK- und NF- κ B-Signalweg, beobachtet werden (Geyer *et al.*, 2016). Diese Signalkaskaden sind unter anderem an der Regulation der Apoptose beteiligt und können diese entweder induzieren oder inhibieren. Auf welche Weise das RV den MAPK- und NF- κ B-Signalweg in humanen Zellen beeinflusst und welche Bedeutung diese Signalwege für die RV-Infektion haben, wurde bisher nicht charakterisiert. In dieser Arbeit sollte daher der Einfluss des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK, den kanonischen NF- κ B-Signalweg sowie die Apoptose in immortalisierten Zelllinien sowie in primären Endothelzellen fetalen und adulten Ursprungs näher untersucht werden. Dabei sollten mögliche Unterschiede in der Infektion mit dem teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 und dem Labor-adaptierten, nicht-teratogenen Stamm RV-HPV-77 identifiziert werden.

5.1 Auswirkung einer RV-Infektion in immortalisierten Zelllinien

5.1.1 Das RV induziert die Aktivierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK

Die Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs im Kontext einer RV-Infektion konnte in der immortalisierten Zelllinie RK13, bei der es sich um Nierenzellen aus dem Kaninchen handelt, bereits beobachtet werden. Dabei war die aktivierte MAPK für die virale Replikation und die RV-induzierte Apoptose erforderlich (Cooray *et al.*, 2005). Ob der ERK1/2-Signalweg durch

das RV auch in humanen Zellen induziert wird und welchen Einfluss das Virus auf die beiden MAPK p38 und JNK hat, war jedoch nicht bekannt. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte in der humanen Zelllinie A549 durch die Infektion mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 und dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 die duale Phosphorylierung und somit die Aktivierung der drei konventionellen MAPK ERK1/2, p38 und JNK gezeigt werden. Die Aktivierung der Kinasen erfolgte dabei zu einem frühen Zeitpunkt der RV-Infektion (24 bis 48 hpi) und blieb im Anschluss für die gesamte Dauer des Experiments erhöht. Somit scheint es sich bei der Aktivierung der MAPK um einen dauerhaften und keinen zeitlich begrenzten Effekt zu handeln. Da beide Viren die drei MAPK induzierten, konnte keine Stammspezifische Aktivierung identifiziert werden. Dennoch fiel auf, dass das ehemalige Impfvirus die drei MAPK früher aktivierte als der Wildtypstamm, was womöglich darauf zurückzuführen ist, dass das RV-HPV-77 aufgrund der Attenuierung in den Vero-Zellen besser an die Zellkultur angepasst ist. Um zu überprüfen, ob die Aktivierung von ERK1/2, p38 und JNK auch in einer weiteren Modellzelllinie der Virologie, den Vero-Zellen, beobachtet werden kann, wurden die Zellen mit dem RV-Wildtypstamm infiziert. In der Tat zeigte sich, dass auch in diesen Zellen die drei MAPK vermehrt phosphoryliert wurden, sodass die Signalwege unabhängig von der infizierten Zelllinie eingeleitet wurden. Damit konnte die Phosphorylierung von ERK1/2 durch das RV in drei unabhängigen Zelllinien beobachtet werden (Cooray *et al.*, 2005). Die Aktivierung von p38 und JNK war hingegen in zwei unabhängigen Zelllinien nachweisbar. Beim Vergleich mit anderen Mitgliedern der *Togaviridae*-Familie aus dem Genus *Alphavirus* konnte festgestellt werden, dass die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK auch durch das Sindbis-Virus oder das Chikungunya-Virus induziert wird (Nakatsue *et al.*, 1998; Rust *et al.*, 2012; Varghese *et al.*, 2016). Damit könnte die Aktivierung der drei MAPK-Signalwege einen generellen Mechanismus der Mitglieder der *Togaviridae*-Familie darstellen. Parallel zu der RV-ausgelösten Phosphorylierung von ERK1/2 konnte eine Abnahme der Gesamtmenge an ERK1/2 in den A549-Zellen beobachtet werden. Dieser Effekt war bei den MAPK p38 und JNK nicht nachweisbar und könnte mit der Beobachtung erklärt werden, dass es nach einer Stress-induzierten ERK1/2-Aktivierung, wie es bei einer RV-Infektion möglich ist, zum proteasomalen Abbau von ERK1/2 kommt (Lu *et al.*, 2002). Auf diese Art könnte die Zelle auf die dauerhafte Aktivierung der MAPK reagieren und versuchen durch die Verringerung der Menge an ERK1/2 die Aktivität der MAPK zu reduzieren. In Mumpsvirus-infizierten A549-

Zellen konnte die Abnahme an ERK1/2, die zeitgleich zur Phosphorylierung von ERK1/2 nachweisbar war, ebenso beobachtet werden (Richter, 2015). Die Aktivierung der drei MAPK könnte im Kontext einer RV-Infektion außerdem dazu führen, dass das Capsidprotein vermehrt phosphoryliert wird. Zelluläre Kinasen wurden für diesen wichtigen Schritt in der RV-Replikation vorgeschlagen. Dadurch könnte die starke Bindung von Capsid-Homodimeren und RNA-Genom aufgehoben werden, sodass das virale Genom frei im Zytoplasma vorliegt (Law *et al.*, 2003). Die Rekrutierung der ribosomalen Untereinheiten an die virale RNA könnte anschließend erfolgen und die Replikation würde voranschreiten. Die vermehrte Phosphorylierung des Capsidproteins wurde zudem als Apoptose-inhibierend beschrieben, sodass die MAPK auf diese Weise der Apoptose entgegenwirken könnten (Willows *et al.*, 2014). Die Aktivierung der konventionellen MAPK ERK5 wurde im Kontext einer RV-Infektion nicht untersucht, da diese Kinase vor allem durch physikalische Stimuli wie oxidativen Stress oder Hyperosmolarität induziert wird (Wang *et al.*, 2006).

5.1.2 Das RV aktiviert den kanonischen NF- κ B-Signalweg in A549-Zellen

Inwiefern das RV den NF- κ B-Signalweg durch die Infektion beeinflusst, wurde durch keine Studie bisher beschrieben. Dass es jedoch zu einer Beeinflussung von NF- κ B-abhängigen Genen und Prozessen im Kontext einer RV-Infektion kommt, konnte vor kurzem in der Arbeitsgruppe Mankertz mit Hilfe einer Genexpressionsanalyse von RV-infizierten Endothelzellen nachgewiesen werden (Geyer *et al.*, 2016). In dieser Arbeit zeigte sich, dass sowohl der teratogene Wildtypstamm RV-Würzburg-12 als auch der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 die Phosphorylierung von I κ B α und p65 sowie die Abnahme von I κ B α induzierten und somit den kanonischen NF- κ B-Signalweg in den A549-Zellen aktivierten. Interessant war dabei, dass für den zellulären NF- κ B-Inhibitor I κ B α zwei distinkte Banden identifiziert werden konnten. Bei der oberen handelte es sich um die im Datenblatt des Antikörpers beschriebene Bande für I κ B α , die beim Vergleich mit dem Proteinmarker auch auf der korrekten Höhe für das Molekulargewicht von I κ B α lief. Beim Vergleich mit dem Immunoblot, bei dem die Phosphorylierung von I κ B α detektiert wurde, konnte die untere der zwei I κ B α -Banden als das phosphorylierte I κ B α identifiziert werden, dessen Molekulargewicht bereits reduziert war. Diese Abnahme könnte damit erklärt werden, dass durch die Phosphorylierung am I κ B α der proteasomale Abbau des Inhibitors bereits eingeleitet wurde. Dadurch wird NF- κ B freigesetzt und ist als Transkriptionsfaktor aktiv.

Kommt es zudem, wie es ebenfalls nach der RV-Infektion beobachtet wurde, zur Phosphorylierung der NF- κ B-Untereinheit p65 am Ser536, wird die Expression NF- κ B-abhängiger Gene effizienter induziert (Sakurai *et al.*, 1999; Viatour *et al.*, 2005). Um zu bestimmen, wie stark der NF- κ B-Signalweg durch die beiden RV-Stämme aktiviert wird, wurde zusätzlich ein NF- κ B-abhängiger Reporter-gen-Assay durchgeführt. Dieser zeigte, dass 48 hpi beide Viren den Signalweg annähernd gleich um mehr als das zehnfache aktivierten, sodass keine Stamm-spezifische Beeinflussung identifiziert werden konnte. Die Betrachtung von einem späteren Zeitpunkt in der RV-Infektion war aufgrund der Versuchsanordnung nicht möglich, da die Menge an transfizierten Zellen über die Dauer des Experimentes kontinuierlich abnahm. Auch bei den Alphaviren zeigten verschiedene Studien die Beeinflussung des Signalwegs. So konnte nach einer Infektion mit dem Sindbis-Virus die Aktivierung von NF- κ B ebenfalls beobachtet werden (Lin *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu nutzt das Chikungunya-Virus eine zelluläre miRNA um die NF- κ B-Aktivierung zu hemmen (Selvamani *et al.*, 2014). Auch für das ebenfalls teratogene HCMV wurde berichtet, dass es den Signalweg modifiziert. Das Virus besitzt eine Virion-assoziierte Kinase, die I κ B α phosphoryliert und somit für die Freigabe des Transkriptionsfaktors sorgt (Yurochko *et al.*, 1995; Nogalski *et al.*, 2007). Dieser interagiert mit den NF- κ B-spezifischen Bindungssequenzen im viralen Genom und ermöglicht so die Expression der frühen Gene (Sambucetti *et al.*, 1989). Die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs ist außerdem für die Replikation von Inflenzaviren entscheidend (Nimmerjahn *et al.*, 2004; Wurzer *et al.*, 2004).

5.1.3 Das RV leitet die Apoptose in A549-Zellen ein

Die Induktion der Apoptose durch das RV wurde für eine Vielzahl von Zellen bereits beschrieben. Trotzdem wurde der programmierte Zelltod nicht in allen Zelltypen wie z.B. den primären humanen embryonalen Fibroblasten durch das RV induziert (Adamo *et al.*, 2004). In immortalisierten Zelllinien wie z.B. Vero, BHK-21 und RK13 verursachte das RV hingegen Apoptose. Dies wurde durch die Abkuglung von apoptotischen Zellen vom Zellrasen, die Fragmentierung der DNA sowie der Kondensation des Chromatins nachgewiesen (Pugachev und Frey, 1998; Duncan *et al.*, 1999; Hofmann *et al.*, 1999; Megyeri *et al.*, 1999). Zudem wurde beobachtet, dass die RV-induzierte Apoptose sowohl p53- als auch Caspase-abhängig ist (Pugachev und Frey, 1998; Megyeri *et al.*, 1999; Claus *et al.*, 2015). Interessanterweise wurden RV-infizierte A549-Zellen in den ersten 48 h der Infektion

als Apoptose-resistent beschrieben (Ilkow *et al.*, 2011). In dieser Arbeit konnte durch die Infektion von A549-Zellen mit dem RV-Wildtypstamm bzw. dem Labor-adaptierten RV-Stamm eine deutliche Zunahme der Expression des proapoptotischen Faktors PUMA 48 hpi bzw. 32 hpi detektiert werden. Die Menge an PUMA blieb anschließend bis zum Zeitpunkt 96 hpi konstant hoch, sodass kein Stamm-spezifischer Effekt beobachtet werden konnte. Die Expression von PUMA wird über den Transkriptionsfaktor p53 reguliert (Yu *et al.*, 2001; Nakano und Vousden, 2001), dessen Aktivierung im Kontext einer RV-Infektion bereits beschrieben wurde (Megyeri *et al.*, 1999; Claus *et al.*, 2015). Somit ist es wahrscheinlich, dass durch die RV-induzierte Aktivierung von p53 die Expression von PUMA induziert wird. Da PUMA antiapoptotische Proteine wie unter anderem BCL-2, BCL-XL und A1 bindet, verhindert PUMA deren Bindung an die proapoptotischen Faktoren BAK und BAX. Diese liegen im Anschluss ungebunden vor und translozieren zu den Mitochondrien. Dort sorgen BAK und BAX für die Freisetzung von Cytochrom C und die Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials, wodurch die Apoptose eingeleitet wird (Yu *et al.*, 2001; Nakano und Vousden, 2001; Liu *et al.*, 2003). Auf diesem Weg führt eine vermehrte PUMA-Expression zu einer erhöhten Aktivierung der Caspasen3/7. Diese war nach der Infektion mit dem Wildtypstamm und dem ehemaligen Impfstamm ebenfalls beobachtbar. Die höchste Aktivierung konnte dabei 48 hpi nachgewiesen werden. Zu den späteren Zeitpunkten ging die Aktivität der Caspasen dann wieder zurück, sodass die Apoptose vor allem zu den frühen Zeitpunkten erhöht war. Da jedoch die PUMA-Expression in den infizierten Zellen 48 hpi konstant erhöht war, sollte die Aktivierung der Caspasen ebenfalls konstant bleiben. Daher kann vermutet werden, dass ab dem Zeitpunkt 48 hpi die Expression von antiapoptotischen Proteinen eingeleitet wird, sodass in den infizierten Zellen nur noch im geringen Maße Apoptose induziert wird und das Virus in den Zellen länger persistieren kann. Hierbei könnte sich zum einen um einen viralen Faktor handeln. Für das virale Capsidprotein wurde z.B. beschrieben, dass es durch die Bindung an BAX die Apoptose inhibiert (Ilkow *et al.*, 2011). Auf diesem Weg könnte das RV die durch die p53-abhängige Expression von PUMA eingeleitete Apoptose inhibieren. Zum anderen könnte das RV die Expression von antiapoptotischen zellulären Proteinen wie A20/TNFAIP3 oder cIAP2 induzieren, die an der Hemmung der Apoptose beteiligt sind. Eine erhöhte Transkription der beiden Faktoren konnte in einer Genexpressionsanalyse von RV-infizierten A549-Zellen bereits nachgewiesen werden (Henriette Geyer, unveröffentlichte Daten, 2014). Zudem war die Caspase-3/7-

Aktivität in den RV-Würzburg-12-infizierten Zellen im Vergleich mit den RV-HPV-77-infizierten Zellen zu jedem untersuchten Zeitpunkt signifikant höher. Dadurch wird der Abbau von zellulären Strukturen wie unter anderem dem Zytoskelett sowie von nukleären Proteinen vermehrt eingeleitet (Elmore, 2007). Hierbei kann vermutet werden, dass die durch den Wildtypstamm ausgelöste Apoptose beim Embryo bzw. Fetus deutlich mehr zelluläre Schäden verursacht. Durch die Attenuierung des Impfstammes wurde die Pathogenität des RV verringert, weshalb dieser weniger stark die Apoptose induziert und womöglich weniger zelluläre Schäden hervorruft.

5.2 Das RV induziert die Aktivierung des proliferativen ERK1/2-Signalwegs für eine erfolgreiche Replikation und die Hemmung der Apoptose in A549-Zellen

Da der ERK1/2-Signalweg für die Proliferation der Zellen von entscheidender Bedeutung ist, nutzen eine Vielzahl der RNA- und DNA-Viren die Aktivierung des Signalwegs, um die Viabilität zu beeinflussen und um die Apoptose zu regulieren, sodass die Viren besser in den Zellen replizieren können (Pleschka, 2008). In RV-infizierten RK13-Zellen wurde durch die Hemmung des ERK1/2-Signalwegs beobachtet, dass die Zellviabilität erhöht war, das Virus einen geringeren Titer produzierte und die Apoptose reduziert wurde (Cooray *et al.*, 2005). Ein Problem dieser Studie war jedoch die starke Beeinflussung der Viabilität der Zellen durch den MEK1/2-Inhibitor U0126. In den A549-Zellen zeigte sich durch die Verwendung des Inhibitors nur eine geringe Abnahme der Viabilität, sodass diese Zellen zur Untersuchung der Hemmung der RV-induzierten ERK1/2-Aktivierung geeigneter waren. Dabei konnte im Gegensatz zur vorangegangenen Studie beobachtet werden, dass in den RV-infizierten A549-Zellen die Viabilität abnahm, der Virustiter ebenfalls verringert war und die Apoptose zunahm. Die Reduktion der Viabilität aufgrund der Hemmung von ERK1/2 konnte 96 und 144 hpi beobachtet werden und lässt vermuten, dass das Virus die Zellen durch die Aktivierung des Signalwegs in einem proliferativen Stadium hält, um wahrscheinlich ausreichend Zeit für eine erfolgreiche Replikation zu haben. Dies war durch das verringerte Wachstum des Virus sowie die reduzierte Produktion des viralen E1-Proteins in den infizierten Zellen nach der Behandlung mit U0126 erkennbar. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Unterschied im viralen Titer auch auf die geringe Abnahme der Viabilität durch den Inhibitor zurückgehen könnte. Die zusätzliche Zunahme der Caspase-

3/7-Aktivität aufgrund der ERK1/2-Inhibition zu den Zeitpunkten 48 und 72 hpi zeigte zudem, dass die Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs im Kontext einer RV-Infektion der RV-induzierten Apoptose entgegenwirkt. Ein Einfluss auf die PUMA-Expression konnte nicht beobachtet werden, sodass die Verringerung der Apoptose durch ERK1/2 auf einen anderen Mechanismus zurückgeht. Für ERK1/2 wurde z.B. beschrieben, dass es den Faktor BCL-2 phosphoryliert, sodass dieser seine antiapoptotische Wirkung ausüben kann (Wortzel und Seger, 2011). Zudem war die MAPK an der vermehrten Phosphorylierung und damit der Inaktivierung des proapoptotischen Faktors BAD beteiligt, wodurch dessen inhibierende Bindung an verschiedene antiapoptotische Proteine verhindert wird (Baines *et al.*, 2002). Dennoch nahm die Menge an toten Zellen im Zellkulturmedium von infizierten A549-Zellen nach der Zunahme der Konzentration von U0126 leicht ab. Aufgrund der großen Standardabweichung war der Effekt jedoch vernachlässigbar. Um zu überprüfen, ob es aufgrund der ERK1/2-Hemmung in RV-infizierten Zellen zu einer Zunahme an toten Zellen im Zellkulturüberstand kommt, sollte für zukünftige Experimente ein späterer Analysezeitpunkt gewählt werden. Durch die Hemmung des ERK1/2-Signalwegs konnte in Sindbis-Virus-infizierten Endothelzellen ebenso die Abnahme des viralen Titers sowie die Zunahme der Apoptose beobachtet werden (Rust *et al.*, 2012). Auch eine Infektion von humanen Zellen mit dem Venezolanischen-Pferdeenzephalitis-Virus (VEEV), als Vertreter der Neuwelt-Alphaviren, resultierte in der Aktivierung der ERK1/2-Signalkaskade, die für virale Replikation erforderlich war (Voss *et al.*, 2014). Dies konnte ebenfalls für das Chikungunya-Virus beobachtet werden (Varghese *et al.*, 2016). Der Einsatz von therapeutischen MEK1/2- oder ERK1/2-Inhibitoren wie Trametinib, Selumetinib, Cobemetinib oder ähnlichen könnte auch die Behandlung von Patienten mit einer Rötelninfektion ermöglichen (Voss *et al.*, 2014).

5.3 Die Aktivierung des p38-Signalwegs hemmt die RV-Replikation in A549-Zellen

Die Aktivität der MAPK p38 konnte in RV-infizierten A549-Zellen durch den Einsatz des Inhibitors SB202190 reduziert werden. Dies war durch die konzentrationsabhängige Hemmung der RV-induzierten COX-2-Expression, die in den A549-Zellen unter anderem durch p38 ausgelöst wird, nachweisbar (Turpeinen *et al.*, 2010). Die Thr71-Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ATF2, einem direkten Substrat von p38, stieg im Kontext einer RV-

Infektion an, konnte aber durch die Hemmung von p38 nicht verringert werden. Damit könnte die vermehrte Phosphorylierung von ATF2 durch das RV auf die MAPK JNK zurückzuführen sein. Dies sollte in zukünftigen Experimenten überprüft werden. Die Thr222-Phosphorylierung von MK2, dem Schlüsselsubstrat von p38 (Gaestel, 2006; Ronkina *et al.*, 2008), wurde durch das RV nicht induziert, sodass die SB202190-abhängige Hemmung der MK2-Phosphorylierung nicht untersuchbar war (Daten nicht gezeigt). Die in den RV-infizierten A549-Zellen ermittelte Konzentration des p38-Inhibitors von 10 μ M wurde ebenso für Influenzavirus-infizierte A549-Zellen verwendet (Klemm *et al.*, 2017). Nach der Hemmung von p38 konnte in den RV-infizierten Zellen keine Veränderung der Viabilität nachgewiesen werden. Dennoch nahm die Menge an PUMA sowie die Aktivität der Caspasen-3/7 durch die Inhibition der MAPK zu, sodass von einer vermehrten Apoptose ausgegangen werden konnte. Dies könnte mit der antiapoptotischen Wirkungsweise von COX-2 erklärt werden. Da für COX-2 eine Interaktion mit p53 beschrieben wurde, wodurch der proapoptotische Transkriptionsfaktor inhibiert wird, könnte durch die Hemmung der p38-abhängigen COX-2-Expression die Aktivität von p53 im Kontext einer RV-Infektion erhöht werden (Megyeri *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2009). Dadurch käme es, wie in dieser Arbeit beobachtet, zu einer erhöhten Expression p53-abhängiger proapoptotischer Gene wie *PUMA*, wodurch sich im Weiteren die Aktivität der Caspasen-3/7 erhöhen würde. Damit wäre die vermehrte Apoptose aufgrund der p38-Inhibition in RV-infizierten A549-Zellen erklärbar. Das RV zeigte zudem in den DMSO- bzw. SB202190-behandelten Zellen bis zum Zeitpunkt 48 hpi ein vergleichbares Wachstum. 72 hpi stieg der virale Titer jedoch aufgrund der Behandlung mit dem p38-Inhibitor an und blieb zum letzten Messzeitpunkt erhöht. Diese Zunahme konnte für beide RV-Stämme parallel zur stärksten Phosphorylierung von p38 56 hpi beobachtet werden. Zudem konnte zum Zeitpunkt 72 hpi festgestellt werden, dass sich die Menge an E1 in den RV-infizierten Zellen durch steigende Konzentrationen des p38-Inhibitors leicht erhöhte. Diese beiden Beobachtungen deuten darauf hin, dass sich bei der Aktivierung der p38/COX-2-Kaskade um einen antiviralen Prozess handeln könnte. Da der p38-Signalweg bei Immunantworten und inflammatorischen Reaktionen eine entscheidende Rolle spielt, könnte die Hemmung dieser Prozesse einen Vorteil für die virale Replikation darstellen und das Wachstum des Virus erhöhen (Cuadrado und Nebreda, 2010). Die Hemmung der p38-abhängigen COX-2-Expression könnte z.B. die Synthese des Prostaglandins E2 (PGE2) verringern, welches an Entzündungsreaktionen beteiligt ist. Die vermehrte Sekretion von

PGE2 konnte bereits bei RV-infizierten HUVEC gemessen werden (Madela, 2016). In Sindbis-Virus-infizierten Vero-Zellen führte die Inhibition von p38 zu vermehrtem Zelltod, was zu der Beobachtung der vermehrten Apoptose in den RV-infizierten A549-Zellen passt (Nakatsue *et al.*, 1998). Welche Konsequenz die Hemmung der MAPK auf das Wachstum des Alphavirus hat, wurde jedoch bisher nicht untersucht. Die Verwendung von SB203580, einem weiteren p38-Inhibitor, hatte keinen Einfluss auf das Wachstum des Chikungunya-Virus, wobei in dieser Studie nur ein Zeitpunkt betrachtet wurde (Varghese *et al.*, 2016). Beim Influenza-A-Virus, einem Mitglied der *Orthomyxoviridae*-Familie, hatte die Hemmung der p38-Aktivierung zur Folge, dass die viral induzierte Apoptose, die Replikation sowie der Virustiter verringert wurden (Nencioni *et al.*, 2009). Auch bei einer Vielzahl von weiteren Viren verursachte die Verwendung von SB202190 die Inhibition der viralen Replikation (Hirasawa *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2018). Diese Beobachtungen stehen im Kontrast mit den für das RV beobachteten Effekten und untermauern die Hypothese, dass der p38-Signalweg für die RV-Replikation keine Rolle spielt und dessen Aktivierung im Kontext einer RV-Infektion einen antiviralen Prozess induziert. Der Einsatz von entzündungshemmenden Medikamenten wie SB203580 oder SB202190 im Kontext einer RV-Infektion sollte daher nicht erfolgen.

5.4 Der JNK-Signalweg ist entscheidend für die RV-Replikation und induziert die Apoptose in A549-Zellen

Die JNK-Signalkaskade spielt bei einer Vielzahl von Viren eine wichtige Rolle bei der Replikation sowie bei der Einleitung des Zelltods (Lin *et al.*, 2001; Perkins *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015; Varghese *et al.*, 2016). Der Einfluss der MAPK auf die Replikation des RV sowie die RV-induzierte Apoptose wurde jedoch bisher in keiner Studie untersucht. Durch die Verwendung des JNK-Inhibitors SP600125 konnte die Aktivität von JNK in RV-infizierten A549-Zellen inhibiert werden. Dabei wurden die RV-induzierten Phosphorylierungen am Ser63 und Ser73 von c-Jun, einem direkten Substrat von JNK, konzentrationsabhängig gehemmt. Bei einer SP600125-Konzentration von 20 μ M konnten beide Phosphorylierungen von c-Jun inhibiert werden. Diese Konzentration des Inhibitors wurde bereits in Experimenten mit Influenza-A-Virus-infizierten A549-Zellen verwendet (Lu *et al.*, 2010). Durch die Phosphorylierung von c-Jun bildet sich ein Heterodimer aus c-Jun und

c-Fos (AP-1-Komplex), welches die Transkription von proliferativen sowie proapoptotischen Genen induziert (Fan und Chambers, 2001; Sabapathy *et al.*, 2004). Die Expression von c-Jun wird auf diese Weise ebenfalls erhöht, sodass durch die Aktivierung des JNK-Signalwegs die Menge an c-Jun zunimmt (Angel *et al.*, 1988). Diese Zunahme an c-Jun konnte auch in den RV-infizierten A549-Zellen beobachtet werden. Dass die Hemmung des JNK-Signalwegs die Replikation des RV beeinflusst, zeigte sich zum einen durch die konzentrationsabhängige Verringerung der Menge an viralem E1-Protein in den infizierten Zellen. Zum anderen nahm der Titer des Wildtypstammes und des Labor-adaptierten Stammes aufgrund der JNK-Inhibition mit 20 μ M SP600125 ab. Durch den Einsatz von 40 μ M des JNK-Inhibitors war die Abnahme des viralen Titers sogar noch größer, wobei bei dieser Konzentration die Viabilität der A549-Zellen stärker beeinflusst wurde (Daten nicht gezeigt). Damit ist der JNK-Signalweg für die Replikation des RV entscheidend. Da die aktivierte JNK-Signalkaskade vor allem die Apoptose einleitet, wurde der Einfluss von SP600125 auf die RV-induzierte PUMA-Expression sowie Caspase-3/7-Aktivität untersucht. Durch die Hemmung von JNK konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme an PUMA 72 hpi beobachtet werden. Damit scheint die Aktivierung der MAPK an der Expression des proapoptotischen Faktors im Kontext einer RV-Infektion beteiligt zu sein. Da für JNK beschrieben wurde, dass es auch die Phosphorylierung von p53 und damit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors induziert, kann vermutet werden, dass es nach einer RV-Infektion durch die Aktivierung der MAPK zur p53-abhängigen Expression des proapoptotischen Gens *PUMA* kommt, wodurch die Apoptose induziert wird (Dhanasekaran und Reddy, 2017). Damit würde der JNK-Signalweg zum Zelltod durch das RV beitragen. Diese Hypothese konnte bei der Untersuchung der RV-induzierten Caspase-3/7-Aktivität bestätigt werden. Die starke zum Zeitpunkt 48 hpi induzierte Aktivierung der Caspasen durch das RV konnte durch die Zugabe des JNK-Inhibitors reduziert werden. Zudem führte der Einsatz steigender Konzentrationen von SP600125 72 hpi zu einer kontinuierlichen und deutlichen Abnahme an toten Zellen, die durch die RV-Infektion vermehrt im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden konnten. Im Widerspruch dazu steht jedoch die Beobachtung, dass in den RV-infizierten Zellen die Viabilität durch die JNK-Hemmung ab dem Zeitpunkt 72 hpi signifikant reduziert war. Des Weiteren war 72 und 96 hpi die Caspase-3/7-Aktivität durch die JNK-Hemmung leicht erhöht. Damit kann aufgrund der vorliegenden Resultate festgestellt werden, dass die Aktivierung des JNK-Signalwegs zu Beginn der Infektion an der Zunahme der Apoptose aufgrund der Einleitung der PUMA-

Expression beteiligt ist, jedoch im späteren Verlauf der Infektion antiapoptotische Prozesse einleiten könnte. Da die MAPK sowohl die Apoptose als auch die Proliferation reguliert, wären die beobachteten Ergebnisse während der RV-Infektion erklärbar (Fan und Chambers, 2001; Sabapathy *et al.*, 2004). Beim Vergleich mit einem weiteren Virus aus der Familie der *Togaviridae* zeigte sich, dass in Chikungunya-Virus-infizierten BHK-21-Zellen nach der Behandlung mit SP600125 der virale Titer ebenfalls reduziert war (Varghese *et al.*, 2016). Auch das ebenfalls teratogene HCMV benötigt die Aktivität von JNK für die virale Replikation (Zhang *et al.*, 2015). Mehrere Studien konnten zudem zeigen, dass durch Hemmung des JNK-Signalwegs die Replikation von Influenza-A-Viren sowohl auf der RNA- als auch auf der Proteinebene gestört war (Nacken *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). Dass der JNK-Signalweg an der viral induzierten Apoptose beteiligt ist, konnte für eine Vielzahl von Viren, z.B. das Herpes-simplex-Virus Typ 1, verschiedene Influenzaviren, das Dengue-Virus und das Hepatitis-C-Virus, beobachtet werden (Lin *et al.*, 2001; Perkins *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2010; Sreekanth *et al.*, 2017; Takaki *et al.*, 2017). Damit passen die für das RV ermittelten Ergebnisse zu den beschriebenen Beobachtungen bei anderen Viren. Durch die Aktivierung des JNK-Signalwegs sowie die Einleitung der Apoptose könnte das RV in den entsprechenden fetalen Geweben die während des CRS auftretenden physiologischen Schäden hervorrufen. Dies sollte jedoch in einem geeigneteren Zellkulturmodell, z.B. in embryonalen oder in induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC), überprüft werden (Hübner *et al.*, 2017). Die Klasse der ATP-kompetitiven Inhibitoren, zu der auch der JNK-Inhibitor SP600125 gehört, wurde im Kontext einer Influenza-A-Virus-Infektion bereits als antivirales Therapeutikum vorgeschlagen und könnte auch bei der Behandlung von Patienten mit einer Rötelninfektion das virale Wachstum begrenzen (Nacken *et al.*, 2012).

5.5 Der kanonische NF- κ B-Signalweg ist entscheidend für die Replikation des RV und induziert die Apoptose in A549-Zellen

Der kanonische NF- κ B-Signalweg wird als zentraler Regulator von Entzündungsreaktionen beschrieben, da die Signalkaskade die Expression von inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Immunrezeptoren induziert (Ehrhardt *et al.*, 2013; Cildir *et al.*, 2016). Trotzdem benötigen z.B. Influenza-A-Viren diesen Signalweg für eine effiziente Replikation (Nimmerjahn *et al.*, 2004; Wurzer *et al.*, 2004). Welche Bedeutung der MAPK-Signalweg für

die Replikation des RV sowie die RV-induzierte Apoptose hat, sollte durch die Verwendung des NF- κ B-Inhibitors SC75741 aufgeklärt werden (Leban *et al.*, 2007). In RV-infizierten Zellen konnte die NF- κ B-abhängige Aktivität eines Reporterproteins mit Hilfe von 5 μ M SC75741 um ca. 30 % verringert werden. Diese Konzentration des Inhibitors wurde bereits für Influenza-A-Virus-infizierte A549-Zellen verwendet (Ehrhardt *et al.*, 2013). Die Viabilität der nicht-infizierten Zellen wurde durch den Einsatz von 5 μ M SC75741 nur geringfügig verringert, sodass diese Konzentration für die durchgeführten Versuche geeignet war. Durch die Hemmung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs konnte das Wachstum des Wildtypstammes und des Labor-adaptierten Stammes ab 24 hpi zu jedem untersuchten Zeitpunkt signifikant reduziert werden. Dabei war der größte Unterschied im viralen Titer 24 und 48 hpi beobachtbar, sodass es scheint, dass der kanonische NF- κ B-Signalweg vor allem in der frühen Phase der Infektion für die Replikation des RV in den A549-Zellen bedeutend ist. Die zum Zeitpunkt 48 hpi detektierte Zunahme der Caspase-3/7-Aktivität um das 5-fache konnte durch die Hemmung der NF- κ B-abhängigen Genexpression deutlich verringert werden und reduzierte sich auf das 2-fache. Damit scheint der starke Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität während der RV-Infektion auf die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs zurückzugehen. Der verbliebene Anteil der Caspase-3/7-Aktivität, so wie es auch für die nachfolgenden Zeitpunkte detektiert wurde, wird wahrscheinlich durch andere Signalwege und zelluläre Prozesse induziert. Der NF- κ B-Signalweg könnte die Aktivierung der Caspasen 48 hpi durch die Expression von proapoptotischen Genen wie *FASL* oder *TRAIL* (engl. *TNF-related apoptosis inducing ligand*) hervorrufen, wie es für Influenza-A-Viren beschrieben wurde (Wurzer *et al.*, 2003; Wurzer *et al.*, 2004; Ehrhardt *et al.*, 2013). In diesem Fall war die Aktivierung der Caspasen für die Replikation des Virus erforderlich, um die Ribonukleoprotein-Komplexe aus dem Nukleus freizusetzen (Wurzer *et al.*, 2003; Kramer *et al.*, 2008). Da das RV jedoch nicht im Zellkern repliziert, liegt der Vorteil der Apoptose für die virale Replikation in anderen NF- κ B-abhängigen Prozessen begründet. Dass es durch die Hemmung des NF- κ B-Signalwegs zu einer Verringerung des Zelltods kommt, konnte zudem daran gezeigt werden, dass sich durch die Verwendung von SC75741 die Menge an toten Zellen im Zellkulturüberstand, die sich durch eine RV-Infektion deutlich erhöhte, wieder reduzierte. Die Ergebnisse des Zellviabilitätstestes stehen jedoch zum Teil im Widerspruch zu den zuvor diskutierten Beobachtungen der NF- κ B-abhängigen Apoptose. Zu den Zeitpunkten 48 und 72 hpi war die Viabilität in den infizierten Zellen durch die Hemmung von NF- κ B leicht

reduziert, sodass vermutet werden konnte, dass der NF- κ B-Signalweg ebenso die Expression von antiapoptotischen Genen während dieser Phase der Infektion induziert. Zu den letzten beiden Zeitpunkten konnte jedoch in den infizierten Zellen die Zunahme der Viabilität aufgrund der NF- κ B-Inhibition gemessen werden. Damit führt die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs zu den späteren Zeitpunkten der Infektion zu einer Abnahme der Zellviabilität, die wahrscheinlich auf die Zunahme der RV-induzierten Apoptose zurückgeht. Die Aktivierung der Signalkaskade im Kontext einer RV-Infektion verursacht somit vermehrt Zelltod in den A549-Zellen. Diese virusunterstützende sowie proapoptotische Funktion von NF- κ B wurde ebenso für Influenza-A-Viren beschrieben. Dabei war die Virus-induzierte Aktivierung der Caspasen-3, -7, -8 und -9 NF- κ B-abhängig (Ehrhardt *et al.*, 2013). Die Akkumulation von einzelsträngiger viraler RNA im Kontext einer Influenza-Virus-Infektion wird dabei als Hauptursache für die Aktivierung des Signalwegs angenommen (Pichlmair *et al.*, 2006). Auch beim Sindbis-Virus führte die Hemmung der NF- κ B-Aktivität zu einer Abnahme der Virus-induzierten Apoptose. Hierbei war jedoch das Wachstum des Virus durch den *knockout* von p65 nicht verändert (Lin *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu war bei einer Vielzahl von weiteren Viren wie beim humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1), Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV) sowie Epstein-Barr-Virus die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs für die virale Replikation entscheidend (Hiscott *et al.*, 2001). Im Kontext einer RV-Infektion induzieren somit sowohl JNK als auch NF- κ B die Apoptose in A549-Zellen. Interessanterweise wird in der Literatur diskutiert, dass der JNK-Signalweg durch die Aktivierung von NF- κ B herunterreguliert wird und damit die JNK-abhängige Apoptose inhibiert (Nakano, 2004). Eine solche Beobachtung konnte in RV-infizierten Zellen nicht nachgewiesen werden, sodass beide Signalwege durch die Induktion der Apoptose zur teratogenen Wirkung des Pathogens beitragen könnten. Durch vermehrte Apoptose in fetalen Geweben könnte das RV die während des CRS auftretenden pathophysiologischen Veränderungen verursachen. Daher sollte in weiteren Experimenten die Aktivierung von NF- κ B in embryonalen oder in induzierten pluripotenten Stammzellen untersucht werden (Hübner *et al.*, 2017). Die Klasse der NF- κ B-Inhibitoren, zu denen auch SC75741 gehört, wurde zur Behandlung von Influenzavirus-Infektionen vorgeschlagen und könnte in Zukunft auch als antivirales Therapeutikum bei Patienten mit einer RV-Infektion zum Einsatz kommen (Leban *et al.*, 2007; Ehrhardt *et al.*, 2013).

5.6 Auswirkung einer RV-Infektion in primären Endothelzellen

5.6.1 RV-HPV-77, aber nicht RV-Würzburg-12 aktiviert die MAPK p38 in HUVEC

Da vaskuläre Abnormalitäten während des CRS als Grund für den Tod des Fetus angesehen werden, wurden primäre humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) zur Charakterisierung der RV-Infektion vorgeschlagen und untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein RV-Wildtypstamm eine persistente Infektion ohne CPE in den fetalen Zellen etablierte (Perelygina *et al.*, 2013). In einer weiteren Studie mit den primären Endothelzellen fetalen (HUVEC) und adulten Ursprungs (HSaVEC) konnte zudem die Beeinflussung einer Vielzahl von Signalwegen wie unter anderem des MAPK- sowie des NF- κ B-Signalwegs und der Apoptose im Kontext einer RV-Infektion nachgewiesen werden (Geyer *et al.*, 2016). Inwiefern die Signalkaskaden durch das Virus in den Endothelzellen modifiziert werden, wurde jedoch bisher noch nicht analysiert. In den HUVEC konnte im Gegensatz zu den immortalisierten Zelllinien keine Aktivierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK durch den Wildtypstamm RV-Würzburg-12 detektiert werden. Damit scheint die Induktion der MAPK-Phosphorylierungen während der RV-Infektion vom entsprechenden Zelltyp abhängig zu sein, sodass die drei Kinasen in RV-infizierten Zellen nicht generell aktiviert werden. Die ausbleibende Aktivierung des antiviralen p38-Signalwegs sowie des proapoptotischen JNK-Signalwegs könnte jedoch für die Etablierung einer persistenten Infektion in den fetalen Endothelzellen förderlich sein und damit zur teratogenen Wirkung des Pathogens beitragen. Interessanterweise konnte in den RV-HPV-77-infizierten HUVEC die vermehrte Phosphorylierung von p38, aber nicht von ERK1/2 und JNK nachgewiesen werden, sodass die MAPK den beobachteten Unterschied zwischen Wildtypstamm und Labor-adaptierten Stamm hinsichtlich der Ausbildung der Persistenz erklären könnte (Perelygina *et al.*, 2013). Da p38 eine entscheidende Rolle bei Immunantworten und inflammatorischen Reaktionen spielt, könnte dessen Aktivierung durch das Impfvirus z.B. die Freisetzung von Zytokinen induzieren, was eine Immunreaktion auslöst und die RV-Infektion begrenzt (Cuadrado und Nebreda, 2010). Der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 würde eine solche Immunantwort nicht auslösen und könnte in den HUVEC persistieren, was die beim CRS auftretenden Schäden hervorrufen könnte. In Influenzavirus-infizierten HUVEC wurde z.B. durch die Hemmung von p38 mit Hilfe von SB202190 die Expression von IFN- β und weiteren Zytokinen reduziert (Börgeling *et al.*, 2014). Damit kontrolliert der MAPK-Signalweg in infizierten HUVEC die

Synthese bestimmter Zytokine. In weiterführenden Experimenten sollte daher die Expression bzw. Freisetzung p38-abhängiger Zytokine mittels qPCR bzw. ELISA in RV-Würzburg-12- und RV-HPV-77-infizierten HUVEC näher untersucht und verglichen werden. Für die MAPK ERK1/2 konnte in den Endothelzellen unabhängig von der Infektion eine starke Phosphorylierung nachgewiesen werden. Dies war unter anderem an der sehr kurzen Expositionszeit der Röntgenfilme für diesen Immunoblot erkennbar. Daher kann vermutet werden, dass die Kinase bereits aktiviert und damit der Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung durch das RV maskiert war. Da der Wachstumsfaktor EGF im Zellkulturmedium der primären Endothelzellen enthalten ist und dieser die MAPK aktiviert, könnte eine mögliche RV-induzierte Aktivierung des Signalwegs nicht detektierbar sein (Cooper *et al.*, 1982). In den RV-infizierten HSAVEC zeigte sich unabhängig vom verwendeten RV-Stamm keine Aktivierung von ERK1/2, p38 oder JNK, sodass in den adulten Endothelzellen die drei MAPK-Signalwege für die RV-Infektion keine Rolle spielen. Bei der Betrachtung muss jedoch berücksichtigt werden, dass sich die HSAVEC im Vergleich mit den A549- und Vero-Zellen deutlich schlechter infizieren ließen und daher die RV-induzierte Aktivierung der drei MAPK möglicherweise nicht nachweisbar war (Geyer *et al.*, 2016).

5.6.2 Das RV aktiviert den kanonischen NF- κ B-Signalweg in HUVEC

Da die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs durch das RV in der immortalisierten Zelllinie A549 gezeigt werden konnte, sollte der Effekt ebenfalls in primären Zellen überprüft werden. Dabei konnte in den HUVEC nach der Infektion mit dem Wildtypstamm sowie dem Labor-adaptierten Stamm die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs durch die Zunahme der I κ B α -Phosphorylierung am Ser32, die zum proteasomalen Abbau des zellulären NF- κ B-Inhibitors führt, gezeigt werden. Die in den infizierten Zellen detektierten I κ B α -Banden mit reduziertem Molekulargewicht deuteten auf die Degradierung des zellulären Faktors hin. Eine vermehrte p65-Phosphorylierung am Ser536 wie in den A549-Zellen konnte jedoch nicht beobachtet werden. Da diese posttranslationale Modifikation von p65 die NF- κ B-abhängige Genexpression erhöht, kann vermutet werden, dass die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs in den HUVEC nicht so stark wie in den A549-Zellen ist (Sakurai *et al.*, 1999; Viatour *et al.*, 2005). Ein NF- κ B-abhängiger Reporter-gen-Assay zur Quantifizierung der NF- κ B-Aktivierung in den RV-infizierten HUVEC konnte jedoch aufgrund der schlechten Transfektionseffizienz bei den primären Endothelzellen nicht durchgeführt

werden (Daten nicht gezeigt). In den RV-infizierten HSaVEC wurde nur die p65-Phosphorylierung am Ser536 untersucht, bei der wie in den HUVEC kein Unterschied nach der Infektion detektiert werden konnte. Damit kommt es zu keiner Transaktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Um zu überprüfen, ob es in den HSaVEC jedoch überhaupt zur Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs kommt, müsste in einem weiteren Versuch z.B. die I κ B α -Phosphorylierung am Ser32 analysiert werden. Das RV induziert somit unabhängig vom verwendeten Stamm den kanonischen NF- κ B-Signalweg unterschiedlich stark in der immortalisierten Zelllinie A549 und den primären Endothelzellen HUVEC. Damit könnte es sich bei der Aktivierung um einen generellen Mechanismus während der RV-Infektion handeln, die in allen RV-infizierten Zellen beobachtet werden kann. Mögliche Unterschiede in der NF- κ B-abhängigen Genexpression zwischen einem Wildtypstamm sowie einem Labor-adaptierten Stamm könnten zudem Hinweise auf das teratogene Verhalten des Pathogens geben. Die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in HUVEC im Kontext einer viralen Infektion konnte bereits für verschiedene Influenzaviren sowie das Hantaan-Virus gezeigt werden (Schmolke *et al.*, 2009; Viemann *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2014). Interessanterweise konnten dabei deutliche Unterschiede in der NF- κ B-abhängigen Reaktion der Wirtszelle zwischen einem hoch- und niedrigpathogenen Influenzavirusstamm identifiziert werden (Schmolke *et al.*, 2009).

5.6.3 Das RV leitet die Apoptose in HUVEC ein

In vorangegangenen Studien wurde der Einfluss des RV auf die Induktion der Apoptose in primären Endothelzellen noch nicht untersucht. Es wurde bisher nur beobachtet, dass der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 in HUVEC und HSaVEC 2 dpi einen geringen CPE verursacht (Geyer *et al.*, 2016). In dieser Arbeit induzierten aber sowohl der Wildtypstamm RV-Würzburg-12 als auch der Labor-adaptierte Stamm RV-HPV-77 die Expression des proapoptotischen PUMA in den HUVEC. Dabei war die Menge in den infizierten Zellen zwischen 24 und 96 hpi erhöht, sodass das RV die Apoptose dauerhaft in den Zellen induzierte. In den adulten Endothelzellen konnte hingegen eine unveränderte bzw. verringerte Expression von PUMA nachgewiesen werden. Damit könnte die Einleitung der Apoptose durch das RV auf die fetalen Endothelzellen beschränkt sein, sodass möglicherweise die vom Virus hervorgerufenen Schäden in den fetalen Geweben auf eine erhöhte PUMA-Expression und somit vermehrte Apoptose zurückgehen. Da nur für das

Wildtyp-Virus beschrieben wurde, dass es während der Persistenz den gesamten Zellrasen der HUVEC infiziert, könnte eine dauerhafte Induktion der Apoptose in den Zellen das Wachstum des sich entwickelnden Fetus beeinträchtigen (Perelygina *et al.*, 2013). Zudem konnte in den HUVEC während der frühen Zeitpunkte der RV-Infektion eine schwache Aktivierung der Caspasen-3/7 gemessen werden. Diese war wie in den A549-Zellen für den Wildtypstamm im Vergleich mit dem Labor-adaptierten Stamm höher. Durch die gesteigerte Aktivität der Caspasen könnte der teratogene RV-Stamm zu den beim CRS beobachteten Schäden beitragen. Im Vergleich mit der immortalisierten Epithel-Zelllinie fiel außerdem auf, dass die Aktivierung der beiden Caspasen in den fetalen Endothelzellen jedoch deutlich geringer war. Folglich erhöht das Virus abhängig vom infizierten Zelltyp die Aktivität der Caspasen-3/7 unterschiedlich stark. Dadurch könnte das RV in bestimmten Geweben wie z.B. dem Epithel mehr Zelltod hervorrufen als in den endothelialen Zellen. Dies könnte die beobachteten Unterschiede beim RV-induzierten Zelltod in verschiedenen Zelltypen erklären (Pugachev und Frey, 1998; Duncan *et al.*, 1999; Hofmann *et al.*, 1999; Megyeri *et al.*, 1999; Adamo *et al.*, 2004). Ab 4 dpi war die Aktivität der Caspasen durch die Infektion nur noch sehr schwach in den HUVEC erhöht, sodass die eingeleitete Apoptose womöglich, wie auch für die A549-Zellen diskutiert, im späteren Verlauf der Infektion inhibiert werden könnte. Dies würde es dem Virus ermöglichen, länger in den Zellen zu persistieren, um genügend Zeit für die Replikation und Virusvermehrung zu haben.

5.6.4 RV-HPV-77, aber nicht RV-Würzburg-12 induziert die Expression von cIAP2 in HUVEC

Da das RV in den HUVEC den NF- κ B-Signalweg aktivierte und die RV-induzierte Caspase-3/7-Aktivität zu den späteren Zeitpunkten der Infektion trotz dauerhaft erhöhter PUMA-Expression zurückging, konnte vermutet werden, dass das Virus die Apoptose womöglich durch die Expression von NF- κ B-abhängiger antiapoptotischer Gene inhibiert. In der Genexpressionsanalyse von RV-infizierten Endothelzellen konnte bereits eine erhöhte Transkription von A20 und cIAP2 nachgewiesen werden (Geyer *et al.*, 2016). Um dies auf der Proteinebene zu überprüfen, wurde in den HUVEC die Expression der vier antiapoptotisch wirkenden Faktoren A20, XIAP, cIAP1 und cIAP2 im Kontext einer RV-Infektion untersucht (Hoesel und Schmid, 2013). Nach der Infektion mit dem Wildtypstamm zeigte sich keine durch das RV erhöhte Expression der vier Proteine, sodass die Apoptose auf diese Weise nicht gehemmt wird. Interessanterweise konnte jedoch für A20 und cIAP2 auf dem

Immunoblot eine weitere Bande oberhalb der vom Hersteller beschriebenen Bande beobachtet werden, die nur in den infizierten Ansätzen nachweisbar war und im Verlauf der Infektion stärker wurde. In der Literatur fand sich keine Erklärung für dieses Phänomen. Hierbei könnte aber spekuliert werden, dass es sich um eine posttranslationale Modifikation handeln könnte, die das Molekulargewicht der beiden Faktoren erhöhte. In den RV-HPV-77-infizierten HUVEC war die Expression von A20, XIAP und cIAP1 im Vergleich mit den nicht-infizierten Zellen ebenfalls unverändert. Interessanterweise war jedoch die Menge an cIAP2 zwischen 48 und 96 hpi deutlich erhöht. Damit könnte cIAP2, welches unter anderem als E3-Ligase für die Caspasen-3/7 beschrieben wurde, an der Hemmung der RV-induzierten Apoptose beteiligt sein und die im Vergleich mit dem Wildtypstamm verringerte Caspase-3/7-Aktivität in den RV-HPV-77-infizierten HUVEC erklären (Choi *et al.*, 2009; Lau *et al.*, 2012). Zudem fungierte cIAP2 im Kontext einer HBV-Infektion als antiviraler Faktor, der für die proteasomale Degradierung der viralen Polymerase verantwortlich war (Wang *et al.*, 2011). Da dieser zelluläre Faktor nur in den HUVEC, die mit dem Labor-adaptierten RV-Stamm infiziert wurden, hochreguliert war, könnte spekuliert werden, dass cIAP2 auch in den RV-HPV-77-infizierten Zellen die Infektion begrenzt. Dies könnte möglicherweise erklären, warum der Labor-adaptierte Stamm F-Therien im Gegensatz zu verschiedenen Wildtypstämmen nur in einer kleinen Subpopulation von HUVEC eine persistente Infektion etablieren kann (Perelygina *et al.*, 2013). Des Weiteren war in cIAP2-defizienten Mäusen die Suszeptibilität sowie Mortalität nach einer Influenza-A-Virus-Infektion erhöht. Dabei ging die Letalität auf die *death-receptor*-induzierte Nekrose der Atemwegsepithelzellen zurück, die zur Degeneration des Bronchialepithels führte (Rodrigue-Gervais *et al.*, 2014). Somit könnte spekuliert werden, dass es in RV-Wildstamm-infizierten Feten im Gegensatz zum Impfstamm durch das Ausbleiben einer erhöhten cIAP2-Expression ebenfalls zu einem schweren Verlauf der Infektion kommt.

5.7 Die basale ERK1/2-Phosphorylierung in den HUVEC ist entscheidend für die RV-Replikation und wirkt der RV-induzierten Apoptose entgegen

Aufgrund der starken basalen Phosphorylierung von ERK1/2 in den HUVEC, die möglicherweise auf den im Zellkulturmedium der primären Zellen enthaltenen Wachstumsfaktor EGF zurückgeht, könnte eine mögliche Aktivierung der Signalkaskade durch das RV nicht

detektierbar sein. Um zu überprüfen, ob der MAPK-Signalweg jedoch in den HUVEC für die RV-Replikation sowie die RV-induzierte Caspase-3/7-Aktivität von Bedeutung ist, wurde mit Hilfe des MEK1/2-Inhibitors U0126 die basale Phosphorylierung von ERK1/2 gehemmt. Dabei konnte eine geeignete Konzentration von 10 μ M ermittelt werden, die bereits auch bei anderen Studien mit den primären Zellen zum Einsatz kam (Cale und Bird, 2006; Chiew *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015). Dennoch reduzierte diese U0126-Konzentration die Viabilität der HUVEC. Durch die Hemmung der basalen ERK1/2-Aktivierung in den HUVEC konnte zum einen die Menge an dem viralen Glykoprotein E1 konzentrationsabhängig verringert werden. Zum anderen war das Wachstum des Wildtypstammes sowie Labor-adaptierten Stammes komplett inhibiert, sodass das RV wie in den A549- als auch RK13-Zellen den ERK1/2-Signalweg für die Replikation benötigt (Cooray *et al.*, 2005). Durch die Hemmung der basalen ERK1/2-Aktivierung in HUVEC erhöhte sich im Kontext einer RV-Würzburg-12-Infektion die Aktivität der Caspasen-3/7 96 und 144 hpi signifikant. Zeitgleich zu diesen Zeitpunkten konnte im Zellviabilitätstest eine signifikante Abnahme der Viabilität in den infizierten Zellen im Vergleich mit den nicht-infizierten Zellen, die beide den MEK1/2-Inhibitor bekamen, beobachtet werden. Damit könnte die durch die Hemmung der basalen ERK1/2-Phosphorylierung erhöhte Aktivität der beiden Caspasen die Viabilität der infizierten HUVEC reduzieren. Somit scheint die in den HUVEC beobachtete ERK1/2-Phosphorylierung wie in den A549-Zellen der RV-induzierten Apoptose entgegenzuwirken. Interessanterweise konnte dieser Effekt jedoch abhängig vom infizierten Zelltyp zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Infektion beobachtet werden. Dies könnte durch zeitliche Unterschiede im Verlauf der Infektion verursacht werden. Da der ERK1/2-Signalweg während der Embryogenese für die Differenzierung und das Wachstum des Fetus eine bedeutende Rolle spielt, könnte das Virus die bereits aktivierte Signalkaskade für eine erfolgreiche Replikation in den fetalen Zellen nutzen. Während der embryonalen Entwicklung von Mäusen konnte eine transiente Aktivierung der MAPK auch in den Anlagen von Auge, Ohr und Herz beobachtet werden (Corson *et al.*, 2003). Da das RV in den bestimmten Zellen den ERK1/2-Signalweg jedoch dauerhaft aktiviert, könnten das zeitlich organisierte Aktivierungsmuster der MAPK und damit die Organogenese gestört werden. Dies könnte unter anderem die beim CRS beobachteten pathophysiologischen Effekte an Augen, Ohren und Herzen verursachen.

5.8 Der kanonische NF- κ B-Signalweg ist entscheidend für die Replikation des RV und reguliert die Apoptose in den HUVEC

Welchen Einfluss der NF- κ B-Signalweg auf die Replikation des RV sowie auf die RV-induzierte Replikation in den HUVEC hat, wurde mit Hilfe des neuartigen NF- κ B-Inhibitors SC75741 untersucht (Leban *et al.*, 2007; Ehrhardt *et al.*, 2013). In der Literatur fanden sich jedoch keine Angaben zu einer geeigneten Konzentration für die HUVEC. In den Experimenten zeigte sich, dass eine SC75741-Konzentration von 1 bzw. 2 μ M die Morphologie der primären Zellen beeinflusste, sodass die Zelldichte abnahm und es vermehrt zu Ablösungen von toten Zellen kam. In den HUVEC, die mit 0,5 μ M SC75741 behandelt wurden, konnten hingegen keine Veränderungen am Zellrasen beobachtet werden und die Viabilität nahm nur geringfügig ab, sodass diese Konzentration für die Experimente mit den primären Zellen verwendet werden konnte. Durch die Hemmung der NF- κ B-abhängigen Genexpression mit Hilfe des NF- κ B-Inhibitors konnte das Wachstum des Wildtypstammes sowie des Laboradaptierten Stammes reduziert werden. Des Weiteren zeigten Vorexperimente mit HUVEC, die mit steigenden Konzentrationen von SC75741 behandelt wurden, dass die Synthese des viralen E1-Proteins konzentrationsabhängig gehemmt wurde (Behrsing, persönliche Kommunikation, 2018). Wie in den A549-Zellen bereits beobachtet wurde, ist damit der kanonische NF- κ B-Signalweg auch für die RV-Replikation in den HUVEC entscheidend. Im Zellviabilitätstest zeigte sich nach der Behandlung von SC75741 zwischen 48 und 144 hpi eine zusätzliche Abnahme der Viabilität der infizierten Zellen im Vergleich mit den nicht-infizierten Zellen. Damit scheint der NF- κ B-Signalweg in den infizierten HUVEC die Viabilität zu erhöhen. Parallel zu diesen Zeitpunkten führte die Hemmung von NF- κ B zu einer signifikanten Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität, sodass die Abnahme der Viabilität möglicherweise auf die Aktivierung der Caspasen zurückgeht. Daher kann vermutet werden, dass der NF- κ B-Signalweg durch die Expression von antiapoptotischen Genen die Apoptose im späteren Verlauf der Infektion hemmt und dadurch die Viabilität der RV-infizierten HUVEC erhöht. Das RV kann damit in den HUVEC länger persistieren und genügend Virionen über eine längere Zeit produzieren, was für das Überleben des Virus elementar ist. Die Abnahme der RV-induzierten Caspase-3/7-Aktivität zum Zeitpunkt 24 hpi durch die Hemmung von NF- κ B geht womöglich auf die Expression von proapoptotischen Genen zu Beginn der Infektion zurück, wie es auch für RV-infizierte A549-Zellen diskutiert und für Influenza-A-Virus-infizierte Zellen beschrieben wurde (Ehrhardt *et al.*, 2013). Dass der

Transkriptionsfaktor NF- κ B während der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielt, belegen Entwicklungsabnormalitäten, die in Tieren und Menschen mit veränderten NF- κ B-Komponenten gefunden wurden (Espin-Palazon und Traver, 2016). NF- κ B ist dabei unter anderem an der Ausbildung der dorsalen/ventralen Orientierung sowie der muskulären und neuralen Entwicklung beim Embryo beteiligt. Durch die RV-abhängige Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in fetalen Zellen könnte somit die humane Embryogenese beeinflusst und modifiziert werden. Dies könnte die durch das Pathogen verursachten Aborte bzw. kongenitalen Defekte während der Embryonalentwicklung erklären.

6. Zusammenfassung

Das Rötelvirus (RV) gehört zu den teratogenen Viren, die die Blut-Plazenta-Schranke passieren und den sich entwickelnden Fetus infizieren und schädigen können. Die dabei am ungeborenen Kind auftretenden kongenitalen Defekte werden als kongenitales Rötelsyndrom (CRS) bezeichnet. Obwohl sich eine Vielzahl von Studien mit der Pathogenese des RV beschäftigt haben, sind die molekularen Mechanismen, die die teratogene Wirkung des Pathogens verursachen, noch nicht aufgeklärt. Als Hauptgrund für die Teratogenität diskutieren die meisten Studien jedoch die Modifikation der Apoptose. Eine in der Arbeitsgruppe Mankertz durchgeführte Genexpressionsanalyse von RV-infizierten Endothelzellen fetalen und adulten Ursprungs zeigte die Beeinflussung des MAPK- sowie NF- κ B-Signalwegs, die beide eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Apoptose spielen (Geyer *et al.*, 2016). Inwiefern diese Signalwege für die virale Replikation sowie für die RV-induzierte Apoptose von Bedeutung sind, ist bisher ungeklärt.

In dieser Arbeit sollte daher der Einfluss des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK, den kanonischen NF- κ B-Signalweg sowie die Apoptose in immortalisierten Zelllinien sowie in primären Endothelzellen fetalen und adulten Ursprungs näher untersucht werden. Im ersten Teil konnte nach Infektion der humanen Lungenepithel-Zelllinie A549 mit dem Wildtypstamm RV-Würzburg-12 oder dem Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 die Aktivierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK beobachtet werden. Dies konnte auch in RV-Würzburg-12-infizierten Vero-Zellen nachgewiesen werden. Zudem induzierte die Infektion von A549-Zellen mit dem Wildtypstamm sowie dem Labor-adaptierten Stamm die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs und die Einleitung der Apoptose, was durch die vermehrte Expression des proapoptotischen Faktors PUMA sowie die erhöhte Aktivität der Caspasen-3/7 gezeigt werden konnte. Um den entsprechenden Signalweg im Kontext einer RV-Infektion in A549-Zellen genauer zu charakterisieren, wurden spezifische Inhibitoren für die drei MAPK sowie NF- κ B eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass in RV-infizierten Zellen durch die Hemmung des ERK1/2-Signalwegs mit Hilfe von U0126 die Expression des viralen E1-Proteins sowie das virale Wachstum verringert waren. Zudem war die Viabilität zu den späteren Zeitpunkten der Infektion reduziert und die Caspase-3/7-Aktivität, aber nicht die PUMA-Expression erhöht. Folglich induziert das RV die Aktivierung des proliferativen ERK1/2-Signalwegs für eine erfolgreiche Replikation und die Hemmung der Apoptose. Durch die Inhibition der RV-induzierten p38-Aktivierung mittels SB202190 nahm

die Menge an viralem E1-Protein zu und das Wachstum des Virus war gesteigert. Außerdem verringerte sich die COX-2-Expression. Die Menge an PUMA sowie die Aktivität der Caspasen-3/7 waren hingegen erhöht. Die Aktivierung des p38-Signalwegs hemmt damit die RV-Replikation. Die Zunahme der Apoptose während der p38-Inhibition könnte auf die Abnahme der RV-induzierten COX-2-Menge zurückgehen, da die Cyclooxygenase-2 den proapoptischen Transkriptionsfaktor p53 bindet und inhibiert. Durch den Einsatz des JNK-Inhibitors SP600125 in RV-infizierten Zellen waren die Expression des viralen E1-Proteins und das virale Wachstum verringert. Außerdem wurde die Abnahme der RV-induzierten PUMA-Expression, Caspase-3/7-Aktivität und Ablösung von toten Zellen beobachtet. Somit ist der JNK-Signalweg entscheidend für die RV-Replikation und induziert die Apoptose. Durch die Hemmung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs mit Hilfe des NF- κ B-Inhibitors SC75741 war das Wachstum des RV reduziert. Zusätzlich konnten eine Zunahme der Viabilität zu den späteren Zeitpunkten der Infektion sowie die Abnahme der RV-induzierten Caspase-3/7-Aktivität und die Ablösung der toten Zellen beobachtet werden. Damit ist der kanonische NF- κ B-Signalweg für die Replikation des RV entscheidend und induziert ebenfalls die Apoptose. Im zweiten Teil konnte nach Infektion der fetalen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) mit dem Wildtypstamm keine Aktivierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK detektiert werden. Nichtsdestotrotz konnte eine starke basale ERK1/2-Phosphorylierung beobachtet werden. Durch die Infektion mit dem Labor-adaptierten Stamm war jedoch die Phosphorylierung von p38, aber nicht von ERK1/2 und JNK erhöht. In den adulten Endothelzellen (HSaVEC) war keine der drei MAPK nach der Infektion mit dem Wildtypstamm oder dem Labor-adaptierten Stamm aktiviert. Die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs in HUVEC nach Infektion mit dem Wildtypstamm oder dem Labor-adaptierten Stamm konnte durch die Zunahme der Phosphorylierung von I κ B α , aber nicht von p65 nachgewiesen werden. In den RV-infizierten HSaVEC zeigte sich ebenfalls keine vermehrte Phosphorylierung von p65. Durch die Infektion mit dem Wildtypstamm oder dem Labor-adaptierten Stamm konnten in den HUVEC eine vermehrte PUMA-Expression und eine leicht erhöhte Caspase-3/7-Aktivität, die zu den späteren Zeitpunkten der Infektion immer geringer wurde, beobachtet werden. In den RV-infizierten HSaVEC war hingegen eine Verringerung der Menge an PUMA nachweisbar. Die Untersuchung der NF- κ B-induzierten Apoptose-Inhibitoren A20, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC zeigte, dass die Expression der vier zellulären Faktoren nicht verändert war. Nach

Infektion der HUVEC mit dem Labor-adaptierten Stamm konnte hingegen eine erhöhte Expression von cIAP2, aber nicht von A20, XIAP sowie cIAP1 detektiert werden. Zur Charakterisierung der basalen ERK1/2-Aktivität bzw. der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in RV-infizierten HUVEC wurden U0126 bzw. SC75741 als spezifische Inhibitoren verwendet. Durch die Hemmung der basalen ERK1/2-Phosphorylierung in den RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC nahmen die Menge an viralem E1-Protein sowie das Wachstum des RV ab. Zu den späteren Zeitpunkten der Infektion erhöhte sich zudem die Caspase-3/7-Aktivität und die Viabilität nahm ab. Damit ist die basale ERK1/2-Phosphorylierung in den HUVEC für die RV-Replikation entscheidend und wirkt der RV-induzierten Apoptose entgegen. Durch den Einsatz des NF- κ B-Inhibitors SC75741 in den RV-infizierten HUVEC konnte das virale Wachstum reduziert werden. Außerdem konnten zu den späteren Zeitpunkten der Infektion eine Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität sowie eine Reduktion der Viabilität gemessen werden. Dadurch ist der kanonische NF- κ B-Signalweg ebenfalls für die Replikation des RV entscheidend und wirkt der RV-induzierten Apoptose entgegen.

Letztlich konnte in dieser Arbeit das Verständnis über die Pathogenese des RV erweitert werden. Abhängig vom Zelltyp konnte der Einfluss des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK, den kanonischen NF- κ B-Signalweg sowie die Apoptose gezeigt werden. Zudem wurde die Bedeutung des jeweiligen Signalwegs für die virale Replikation sowie für die RV-induzierte Apoptose charakterisiert. Die identifizierten Unterschiede zwischen teratogenen Wildtypstamm RV-Würzburg-12 und dem nicht-teratogenen Labor-adaptierten Stamm RV-HPV-77 sowie zwischen den infizierten Endothelzellen fetalen und adulten Ursprungs könnten mögliche Ansatzpunkte zur Aufklärung der teratogenen Wirkung des Pathogens liefern. Aus den Vorarbeiten mit den verschiedenen Inhibitoren könnten sich zudem Ansätze zur Entwicklung einer antiviralen Therapie ableiten.

7. Summary

Rubella virus (RV) is one of the teratogenic viruses that can pass the blood-placental barrier and infect as well as damage the developing fetus. The congenital defects occurring in the unborn child are called congenital rubella syndrome (CRS). Although a variety of studies have addressed the pathogenesis of RV, the molecular mechanisms that cause the teratogenicity of the pathogen have not yet been elucidated. However, most studies discuss the modification of apoptosis as the main reason for teratogenicity. A gene expression analysis of RV-infected endothelial cells of fetal and adult origin carried out in the Mankertz group showed the RV-dependent influence on MAPK and NF- κ B signaling pathways (Geyer *et al.*, 2016). Both play a crucial role in the regulation of apoptosis. However, how these signaling pathways are important for viral replication and for RV-induced apoptosis is completely unclear.

In this work the influence of RV on the MAPK signaling pathways ERK1/2, p38 and JNK, the canonical NF- κ B signaling pathway as well as the apoptosis was examined in immortalized cell lines as well as in primary endothelial cells of fetal and adult origin. In the first part, the activation of the MAPK ERK1/2, p38 and JNK was observed after infection of the human lung epithelial cell line A549 with the wild-type strain RV-Würzburg-12 or the laboratory strain RV-HPV-77. This was also detected in RV-Würzburg-12-infected Vero cells. In addition, infection of A549 cells with the wild-type strain and the laboratory strain induced the activation of the canonical NF- κ B signaling pathway and the initiation of apoptosis. The latter was detectable as increased expression of the pro-apoptotic factor PUMA as well as increased activity of the caspases 3 and 7. Specific inhibitors for the three MAPK as well as NF- κ B were used to characterize the corresponding signaling pathway in the context of RV infection in A549 cells. It was shown that inhibition of ERK1/2 signaling pathway with U0126 reduced expression of viral protein E1 as well as viral growth in RV-infected cells. Moreover, viability was reduced at later time points of infection and caspase-3/7 activity but not PUMA expression was increased. Thus, RV induces activation of the proliferative ERK1/2 signaling pathway for successful replication and inhibition of apoptosis. Inhibition of RV-induced p38 activation by SB202190 increased the amount of viral protein E1 and viral growth. In addition, COX-2 expression was decreased and the amount of PUMA as well as the activity of caspases 3 and 7 was increased. The increase in apoptosis during p38 inhibition could be due to the decrease of RV-induced COX-2 level since cyclooxygenase-2 binds and inhibits the pro-

apoptotic transcription factor p53. Application of the JNK inhibitor SP600125 in RV-infected cells reduced expression of the viral protein E1 and viral growth. Moreover, a reduction of RV-induced PUMA expression, caspase 3/7 activity, and dead cell detachment were observed. Thus, JNK signaling pathway is critical for RV replication and induces apoptosis. Inhibition of canonical NF- κ B signaling pathway with NF- κ B inhibitor SC75741 reduced growth of the RV. Additionally, an increase of cell viability at later time points of infection, a decrease of the RV-induced caspase-3/7 activity and a reduction of amount of dead cells were observable. Thus, the canonical NF- κ B signaling pathway is crucial for RV replication and also induces apoptosis. In the second part, infection of endothelial cells from the umbilical cord (HUVEC) with the wild-type strain caused no activation of MAPK ERK1/2, p38, and JNK. Nonetheless, strong basal ERK1/2 phosphorylation was observed. However, infection of HUVEC with the laboratory strain increased the phosphorylation of p38, but not of ERK1/2 and JNK. In endothelial cells of adult origin (HSaVEC), none of the three MAPK was activated after infection with wild-type strain or laboratory strain. Activation of the canonical NF- κ B signaling pathway was detectable after infection of HUVEC with wild-type strain as well as laboratory strain. This was demonstrated by the increase in phosphorylation of I κ B α but not of p65. RV-infected HSAVEC also showed no increased phosphorylation of p65. Infection of HUVEC with wild-type strain or laboratory strain resulted in an increased PUMA expression and a slightly increased activity of the caspases 3 and 7, which decreased at later stages of infection. In RV-infected HSAVEC, however, a reduction in the amount of PUMA was detectable. Examination of the NF- κ B-induced apoptosis inhibitors A20, XIAP, cIAP1, and cIAP2 in RV-Würzburg-12-infected HUVEC revealed that the expression of the four cellular factors was not altered. However, an increased expression of cIAP2, but not of A20, XIAP and cIAP1 was detected in HUVEC after infection with the laboratory strain. To characterize the basal ERK1/2 activity and the activation of the NF- κ B signaling pathway in RV-infected HUVEC, U0126 and SC75741 were used as specific inhibitors, respectively. Inhibition of basal ERK1/2 phosphorylation in RV-Würzburg-12-infected HUVEC resulted in a reduction of the amount of viral protein E1 and of the viral growth. At later time points of infection, caspase-3/7 activity increased and cell viability decreased. Thus, basal ERK1/2 phosphorylation in HUVEC is crucial for RV replication and counteracts RV-induced apoptosis. In the RV-infected HUVEC, treatment with NF- κ B inhibitor SC75741 decreased the viral growth. In addition, an increase of caspase-3/7 activity and a reduction of viability were measured at later time

points of RV infection. Thus, the canonical NF- κ B signaling pathway is also crucial for the replication of the RV and counteracts RV-induced apoptosis.

All in all, the knowledge about the RV pathogenesis was extended. Depending on the cell type, the influence of RV on the MAPK signaling pathways ERK1/2, p38 and JNK, the canonical NF- κ B signaling pathway and apoptosis were shown. In addition, the importance of the four signaling pathways for viral replication and for RV-induced apoptosis was characterized. The identified differences between the teratogenic wild-type strain RV-Würzburg-12 and the non-teratogenic laboratory strain RV-HPV-77 as well as between the infected endothelial cells of fetal and adult origin could provide a possible starting point for elucidating the teratogenic effect of the pathogen. Preparations for the development of antiviral therapy could also be derived from the preliminary work with various inhibitors.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines *Togaviridae*-Partikels (Modrow *et al.*, 2010)
- Abbildung 2: Schematische Darstellung des Genomaufbaus sowie der Translations- und Prozessierungsstrategie der Nichtstrukturproteine (NSP) sowie Strukturproteine (SP) des RV
- Abbildung 3: Schematische Darstellung der Position sowie der Orientierung der viralen Strukturproteine in der Membran des ER
- Abbildung 4: Schematische Darstellung des RV-Replikationszyklus
- Abbildung 5: Schematische Darstellung der konventionellen MAPK-Signalwege
- Abbildung 6: Schematische Darstellung der Familie der NF- κ B-Transkriptionsfaktoren
- Abbildung 7: Schematische Darstellung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs
- Abbildung 8: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 auf die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK in A549-Zellen
- Abbildung 9: Einfluss des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK in A549-Zellen
- Abbildung 10: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 auf die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK in Vero-Zellen
- Abbildung 11: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 auf die Phosphorylierung von I κ B α und p65 in A549-Zellen
- Abbildung 12: Einfluss des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Phosphorylierung von I κ B α und p65 in A549-Zellen
- Abbildung 13: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die n-fache NF- κ B-Aktivierung in unstimulierten und TNF α -stimulierten A549-Zellen
- Abbildung 14: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 auf die Expression des frühen Apoptose-Markers PUMA in A549-Zellen
- Abbildung 15: Einfluss des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Expression des frühen Apoptose-Markers PUMA in A549-Zellen
- Abbildung 16: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die n-fache Caspase-3/7-Aktivierung in A549-Zellen

- Abbildung 17: Einfluss verschiedener Konzentrationen des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 in A549-Zellen 72 hpi
- Abbildung 18: Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen
- Abbildung 19: Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf das Wachstum des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 bzw. des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 in A549-Zellen
- Abbildung 20: Einfluss verschiedener Konzentrationen des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Expression von PUMA in A549-Zellen 72 hpi
- Abbildung 21: Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen
- Abbildung 22: Einfluss verschiedener Konzentrationen des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die Ablösung von toten Zellen in den Zellkulturüberstand von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen 72 hpi
- Abbildung 23: Einfluss verschiedener Konzentrationen des p38-Inhibitors SB202190 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Expression von COX-2 sowie Phosphorylierung von ATF2 in A549-Zellen 72 hpi
- Abbildung 24: Einfluss des p38-Inhibitors SB202190 auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen
- Abbildung 25: Einfluss des p38-Inhibitors SB202190 auf das Wachstum des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 bzw. des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 in A549-Zellen
- Abbildung 26: Einfluss verschiedener Konzentrationen des p38-Inhibitors SB202190 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Expression von PUMA in A549-Zellen 72 hpi
- Abbildung 27: Einfluss des p38-Inhibitors SB202190 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen
- Abbildung 28: Einfluss verschiedener Konzentrationen des p38-Inhibitors SB202190 auf die Ablösung von toten Zellen in den Zellkulturüberstand von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen 72 hpi

- Abbildung 29: Einfluss verschiedener Konzentrationen des JNK-Inhibitors SP600125 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Phosphorylierung des JNK-Substrats c-Jun in A549-Zellen 72 hpi
- Abbildung 30: Einfluss des JNK-Inhibitors SP600125 auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen
- Abbildung 31: Einfluss des JNK-Inhibitors SP600125 auf das Wachstum des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 bzw. des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 in A549-Zellen
- Abbildung 32: Einfluss verschiedener Konzentrationen des JNK-Inhibitors SP600125 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Expression von PUMA in A549-Zellen 72 hpi
- Abbildung 33: Einfluss des JNK-Inhibitors SP600125 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen
- Abbildung 34: Einfluss des JNK-Inhibitors SP600125 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen 48 hpi
- Abbildung 35: Einfluss verschiedener Konzentrationen des JNK-Inhibitors SP600125 auf die Ablösung von toten Zellen in den Zellkulturüberstand von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen 72 hpi
- Abbildung 36: Einfluss verschiedener Konzentrationen des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die RV-Würzburg-12-induzierte NF- κ B-Aktivierung 48 hpi
- Abbildung 37: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen
- Abbildung 38: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf das Wachstum des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 bzw. des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 in A549-Zellen
- Abbildung 39: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen
- Abbildung 40: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in A549-Zellen 48 hpi
- Abbildung 41: Einfluss verschiedener Konzentrationen des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die Ablösung von toten Zellen in den Zellkulturüberstand von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten A549-Zellen 72 hpi

- Abbildung 42: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK in HUVEC
- Abbildung 43: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK in HSaVEC
- Abbildung 44: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Phosphorylierung von I κ B α und p65 in HUVEC
- Abbildung 45: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Phosphorylierung von p65 in HSaVEC
- Abbildung 46: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Expression des frühen Apoptose-Markers PUMA in HUVEC
- Abbildung 47: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Expression des frühen Apoptose-Markers PUMA in HSaVEC
- Abbildung 48: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die n-fache Caspase-3/7-Aktivierung in HUVEC
- Abbildung 49: Einfluss des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 und des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 auf die Expression der antiapoptotischen Proteine A20, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in HUVEC
- Abbildung 50: Einfluss verschiedener Konzentrationen des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die basale Phosphorylierung von ERK1/2 in DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC 72 hpi
- Abbildung 51: Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC
- Abbildung 52: Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf das Wachstum des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 bzw. des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 in HUVEC
- Abbildung 53: Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in HUVEC

- Abbildung 54: Einfluss verschiedener Konzentrationen des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die Morphologie von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC 72 hpi
- Abbildung 55: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die Viabilität von DMEMc-behandelten bzw. RV-Würzburg-12-infizierten HUVEC
- Abbildung 56: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf das Wachstum des Wildtypstammes RV-Würzburg-12 bzw. des Labor-adaptierten Stammes RV-HPV-77 in HUVEC
- Abbildung 57: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors SC75741 auf die RV-Würzburg-12-induzierte Aktivierung der Caspasen-3/7 in HUVEC
- Tabelle 1: Volumen- und Mengenangaben eines X-tremeGeneTM HP DNA Transfektionsansatzes
- Tabelle 2: Verwendete Zellzahl pro Vertiefung und Volumina bei der Kultivierung und Infektion der Zellen abhängig von Zelltyp und Format der Zellkulturplatten
- Tabelle 3: Verwendete Volumina des RIPA-Puffers abhängig von Zelltyp und Format der Zellkulturplatten
- Tabelle 4: Zusammensetzung der 12 % Trenn- und 5 % Sammelgele für die SDS-PAGE
- Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper für den Western Blot mit den entsprechenden Verdünnungen
- Tabelle 6: Zusammenfassung des Einflusses des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK, den kanonischen NF- κ B-Signalweg und die Apoptose in immortalisierten Zelllinien
- Tabelle 7: Zusammenfassung der Charakterisierung der RV-induzierten Aktivierung von ERK1/2, p38, JNK bzw. NF- κ B mit Hilfe der Inhibitoren U0126, SB202190, SP600125 bzw. SC75741 in den A549-Zellen
- Tabelle 8: Zusammenfassung des Einflusses des RV auf die MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und JNK, den kanonischen NF- κ B-Signalweg, die Induktion der Apoptose sowie die Apoptose-Inhibitoren A20, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in primären Endothelzellen

Tabelle 9: Zusammenfassung der Charakterisierung der basalen ERK1/2-Aktivität bzw. der Aktivierung von NF- κ B mit Hilfe der Inhibitoren U0126 bzw. SC75741 in RV-infizierten HUVEC

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
A	Österreich
ANK	Ankyrin-Einheiten
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASK	<i>apoptosis signal-regulating kinase</i>
ATF	<i>activating transcription factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
βGal	β-Galaktosidase
BCA	Bicinchoninsäure
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
BIRC	<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
C	Kohlenstoff
c	Konzentration
c	Zenti
C1QBP	<i>complement component 1 Q subcomponent-binding protein</i>
Ca	Calcium
ca.	circa
CCL	<i>(C-C motif) ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Cdc42	<i>cell division control protein 42 homolog</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinases</i>
CH	Schweiz
ciAP1	<i>cellular inhibitor of apoptosis 1</i>
ciAP2	<i>cellular inhibitor of apoptosis 2</i>
Cl	Chlor
CMC	Carboxymethylcellulose
CMV	Zytomegalievirus
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPE	zytopathischer Effekt
cPLA2	<i>cytosolic phospholipases A2</i>
CRS	kongenitales Rötelsyndrom
CST	Cell Signaling Technology
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cu	Kupfer
D	Deutschland
d	Tag/e

Abkürzungsverzeichnis

DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DAPK	<i>death-associated protein kinase</i>
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DLK	<i>dual leucine zipper-bearing kinase</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i>
DMEMc	DMEM konzentriert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>day/s post infection</i>
dsRNA	doppelsträngige RNA
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
ECGM	<i>Endothelial Cell Growth Medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
et al.	<i>et alii</i> / und andere
ETS1	<i>protein C-ets-1</i>
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
Fc	<i>crystallisable fragment</i>
FG17	Fachgruppe 17
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
GADD	<i>growth arrest and DNA-damage-inducing protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GE	<i>General Electric</i>
GEF	<i>guanine-nucleotide exchange factor</i>
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRB2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
H	Wasserstoff
h	Stunde/n
HA	Hämagglutinin
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCMV	humanes Zytomegalievirus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV-1	humanes Immundefizienz-Virus 1
HP	Hewlett-Packard
hpi	<i>hour/s post infection</i>
HPV-77	<i>high passaged virus 77</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>

Abkürzungsverzeichnis

HSaVEC	<i>human saphenous vein endothelial cells</i>
HSF-1	<i>heat shock factor 1</i>
HuR	<i>human antigen R</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICA	Immuncolorimetrischer Assay
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
I κ B α	<i>inhibitor of NF-κB α</i>
IKK α/β	I κ B Kinase α/β
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1-Rezeptor
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen
IRF3	<i>interferon regulatory factor 3</i>
J	Japan
JAK	<i>Janus kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K	Kalium
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
m	Meter
m	Milli
μ	Mikro
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKAPK	<i>MAPK-activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>MAPK kinase</i>
MAPKKK	<i>MAPKK kinase</i>
MEF2	<i>myocyte enhancer factor 2</i>
MEK	<i>MAP/ERK kinase</i>
MEKK	<i>MEK kinase</i>
MEM	<i>minimum essential medium</i>
min	Minute/n
miRNA	microRNA
MK	<i>MAPK-activated protein kinase</i>
MKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MLK	<i>mixed-lineage kinase</i>
MMR	Masern, Mumps, Röteln
MMRV	Masern, Mumps, Röteln, Varizellen
MNK	<i>MAPK-interacting kinase</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSK	<i>mitogen- and stress-activated kinase</i>
n	Nano
Na	Natrium
ncbi	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>

Abkürzungsverzeichnis

NF-AT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NL	Niederlande
NLK	<i>Nemo-like kinase</i>
NLS	Kernlokalisierungssequenz
NSP	Nichtstrukturproteine
N-Terminus	Amino-Terminus
O	Sauerstoff
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
ORF	<i>open reading frame</i>
P	Phosphor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline with Tween-20</i>
pCMV	Promotor des humanen Zytomegalievirus
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>plaque forming units</i>
PGE2	Prostaglandin E2
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PRP	progressive Rötelnpanenzephalitis
Pro	Prolin
PTB	<i>phosphotyrosine-binding</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RB	Retinoblastom-Protein
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene I</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RK13	<i>rabbit kidney 13</i>
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
ROK	Südkorea
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RSK	<i>p90 ribosomal S6 kinase</i>
RTK	<i>receptor tyrosine kinases</i>
RV	Rötelnvirus
s	Sekunde/n
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
SH2	<i>Src homology 2</i>

Abkürzungsverzeichnis

SOS2	<i>son of sevenless 2</i>
SP	Strukturproteine
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
STIKO	Ständige Impfkommision
SYK	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TA	Transaktivierungsdomäne
TAK1	<i>TGF-β-activated kinase 1</i>
TAO	<i>thousand-and-one-amino-acid protein kinase</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Thr	Threonin
TLRs	<i>toll-like-Rezeptoren</i>
TMB	3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor Alpha
TNFAIP3	<i>TNFα-induced protein 3</i>
TNFR	TNF α -Rezeptor
TPL2	<i>tumor progression locus 2 protein kinase</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC2	<i>tuberous sclerosis 2</i>
Tyr	Tyrosin
U	<i>unit/s</i>
UK	Großbritannien
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VEEV	Venezolanischen-Pferdeenzephalitis-Virus
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vRNA	virale RNA
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XIAP	<i>X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis</i>
z.B.	zum Beispiel

Literaturverzeichnis

Abe T, Nukada T, Hatanaka H, Tajima M, Hiraiwa M et al. Myoclonus in a case of suspected progressive rubella panencephalitis. *Archives of neurology* **1983**; 40(2):98-100.

Adamo MP, Zapata M, Frey TK. Analysis of gene expression in fetal and adult cells infected with rubella virus. *Virology* **2008**; 370(1):1-11.

Adamo P, Asis L, Silveyra P, Cuffini C, Pedranti M et al. Rubella virus does not induce apoptosis in primary human embryo fibroblast cultures: a possible way of viral persistence in congenital infection. *Viral immunology* **2004**; 17(1):87-100.

Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* **1995**; 270(46):27489-27494.

Andrus JK, de Quadros CA, Solorzano CC, Periago MR, Henderson DA. Measles and rubella eradication in the Americas. *Vaccine* **2011**; 29 Suppl 4:D91-96.

Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* **1988**; 55(5):875-885.

Atreya CD, Kulkarni S, Mohan KV. Rubella virus P90 associates with the cytokinesis regulatory protein Citron-K kinase and the viral infection and constitutive expression of P90 protein both induce cell cycle arrest following S phase in cell culture. *Archives of virology* **2004a**; 149(4):779-789.

Atreya CD, Lee NS, Forng RY, Hofmann J, Washington G et al. The rubella virus putative replicase interacts with the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Virus genes* **1998**; 16(2):177-183.

Atreya CD, Mohan KV, Kulkarni S. Rubella virus and birth defects: molecular insights into the viral teratogenesis at the cellular level. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* **2004b**; 70(7):431-437.

Bagrodia S, Derijard B, Davis RJ, Cerione RA. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *The Journal of biological chemistry* **1995**; 270(47):27995-27998.

Baines CP, Zhang J, Wang GW, Zheng YT, Xiu JX et al. Mitochondrial PKCepsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection. *Circulation research* **2002**; 90(4):390-397.

Banatvala JE, Brown DWG. Rubella. *The Lancet* **2004**; 363(9415):1127-1137.

Bardeletti G. Respiration and ATP level in BHK21/13S cells during the earliest stages of rubella virus replication. *Intervirology* **1977**; 8(2):100-109.

Bardeletti G, Henry M, Sohler R, Gautheron D. Primary effects of the rubella virus on the metabolism of BHK-21 cells grown in suspension cultures. *Archiv für die gesamte Virusforschung* **1972**; 39(1):26-34.

Battisti AJ, Yoder JD, Plevka P, Winkler DC, Prasad VM et al. Cryo-electron tomography of rubella virus. *J Virol* **2012**; 86(20):11078-11085.

Beatch MD, Everitt JC, Law LJ, Hobman TC. Interactions between rubella virus capsid and host protein p32 are important for virus replication. *J Virol* **2005**; 79(16):10807-10820.

Beatch MD, Hobman TC. Rubella virus capsid associates with host cell protein p32 and localizes to mitochondria. *J Virol* **2000**; 74(12):5569-5576.

Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Current biology: CB* **1998**; 8(19):1049-1057.

Best JM. Rubella. *Semin Fetal Neonatal Med* **2007**; 12(3):182-192.

Bode AM, Dong Z. The functional contrariety of JNK. *Molecular carcinogenesis* **2007**; 46(8):591-598.

Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY, Ng DC. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochimica et biophysica acta* **2010**; 1804(3):463-475.

Börgeling Y, Schmolke M, Viemann D, Nordhoff C, Roth J et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase impairs influenza virus-induced primary and secondary host gene responses and protects mice from lethal H5N1 infection. *The Journal of biological chemistry* **2014**; 289(1):13-27.

Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C et al. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science (New York, NY)* **1990**; 249(4964):64-67.

Bowden DS, Pedersen JS, Toh BH, Westaway EG. Distribution by immunofluorescence of viral products and actin-containing cytoskeletal filaments in rubella virus-infected cells. *Archives of virology* **1987**; 92(3-4):211-219.

Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* **2001**; 20(44):6482-6491.

Brown RS, Wan JJ, Kielian M. The Alphavirus Exit Pathway: What We Know and What We Wish We Knew. *Viruses* **2018**; 10(2).

Caamano J, Hunter CA. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* **2002**; 15(3):414-429.

Cale JM, Bird IM. Inhibition of MEK/ERK1/2 signalling alters endothelial nitric oxide synthase activity in an agonist-dependent manner. *The Biochemical journal* **2006**; 398(2):279-288.

Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **2011**; 75(1):50-83.

CDC. <https://www.cdc.gov/rubella/lab/genetic-analysis.html> **2017**.

Chaye H, Chong P, Tripet B, Brush B, Gillam S. Localization of the virus neutralizing and hemagglutinin epitopes of E1 glycoprotein of rubella virus. *Virology* **1992**; 189(2):483-492.

Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Molecular and cellular biology* **1992**; 12(3):915-927.

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G et al. MAP kinases. *Chemical reviews* **2001**; 101(8):2449-2476.

Chiew GG, Fu A, Low KP, Luo KQ. Physical supports from liver cancer cells are essential for differentiation and remodeling of endothelial cells in a HepG2-HUVEC co-culture model. *Sci Rep* **2015**; 5:10801.

Choi EM, Kim SR, Lee EJ, Han JA. Cyclooxygenase-2 functionally inactivates p53 through a physical interaction with p53. *Biochimica et biophysica acta* **2009**; 1793(8):1354-1365.

Cildir G, Low KC, Tergaonkar V. Noncanonical NF-kappaB Signaling in Health and Disease. *Trends Mol Med* **2016**; 22(5):414-429.

Claus C, Chey S, Heinrich S, Reins M, Richardt B et al. Involvement of p32 and microtubules in alteration of mitochondrial functions by rubella virus. *J Virol* **2011**; 85(8):3881-3892.

Claus C, Manssen L, Hubner D, Rossmark S, Bothe V et al. Activation of the Mitochondrial Apoptotic Signaling Platform during Rubella Virus Infection. *Viruses* **2015**; 7(12):6108-6126.

Claus C, Schonefeld K, Hubner D, Chey S, Reibetanz U et al. Activity increase in respiratory chain complexes by rubella virus with marginal induction of oxidative stress. *J Virol* **2013**; 87(15):8481-8492.

Cong H, Jiang Y, Tien P. Identification of the myelin oligodendrocyte glycoprotein as a cellular receptor for rubella virus. *J Virol* **2011**; 85(21):11038-11047.

Cooper JA, Bowen-Pope DF, Raines E, Ross R, Hunter T. Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. *Cell* **1982**; 31(1):263-273.

Cooray S, Jin L, Best JM. The involvement of survival signaling pathways in rubella-virus induced apoptosis. *Virology* **2005**; 2:1.

Corson LB, Yamanaka Y, Lai KM, Rossant J. Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development (Cambridge, England)* **2003**; 130(19):4527-4537.

Coulombe P, Meloche S. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochimica et biophysica acta* **2007**; 1773(8):1376-1387.

Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical journal* **2010**; 429(3):403-417.

Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et biophysica acta* **2007**; 1773(8):1358-1375.

Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **1994**; 76(6):1025-1037.

Derijard B, Raugeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J et al. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science (New York, NY)* **1995**; 267(5198):682-685.

Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* **2008**; 27(48):6245-6251.

Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. *Genes & cancer* **2017**; 8(9-10):682-694.

Dominguez G, Wang CY, Frey TK. Sequence of the genome RNA of rubella virus: evidence for genetic rearrangement during togavirus evolution. *Virology* **1990**; 177(1):225-238.

Dube M, Etienne L, Fels M, Kielian M. Calcium-Dependent Rubella Virus Fusion Occurs in Early Endosomes. *J Virol* **2016**; 90(14):6303-6313.

Dube M, Rey FA, Kielian M. Rubella virus: first calcium-requiring viral fusion protein. *PLoS Pathog* **2014**; 10(12):e1004530.

DuBois RM, Vaney MC, Tortorici MA, Kurdi RA, Barba-Spaeth G et al. Functional and evolutionary insight from the crystal structure of rubella virus protein E1. *Nature* **2013**; 493(7433):552-556.

Duncan R, Muller J, Lee N, Esmaili A, Nakhasi HL. Rubella virus-induced apoptosis varies among cell lines and is modulated by Bcl-XL and caspase inhibitors. *Virology* **1999**; 255(1):117-128.

ECDC. ECDC SURVEILLANCE REPORT Measles and rubella surveillance – 2017. *ECDC* **2018**.

Ehrhardt C, Ruckle A, Hrinicius ER, Haasbach E, Anhlan D et al. The NF-kappaB inhibitor SC75741 efficiently blocks influenza virus propagation and confers a high barrier for development of viral resistance. *Cellular microbiology* **2013**; 15(7):1198-1211.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **2007**; 35(4):495-516.

Enders G. [Accidental rubella vaccination in pregnancy]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* **1984**; 109(47):1806-1809.

Espin-Palazon R, Traver D. The NF-kappaB family: Key players during embryonic development and HSC emergence. *Exp Hematol* **2016**; 44(7):519-527.

Falke D. Virologie am Krankenbett: Klinik, Diagnostik, Therapie. *Springer* **1998**.

Fan M, Chambers TC. Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **2001**; 4(4):253-267.

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *The Journal of biological chemistry* **1998**; 273(29):18623-18632.

Fink C, Schaad UB, Stocker FP. [Pericarditis as a complication of rubella]. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* **1987**; 117(1):28-32.

Fontana J, Lopez-Iglesias C, Tzeng WP, Frey TK, Fernandez JJ et al. Three-dimensional structure of Rubella virus factories. *Virology* **2010**; 405(2):579-591.

Fontana J, Tzeng WP, Calderita G, Fraile-Ramos A, Frey TK et al. Novel replication complex architecture in rubella replicon-transfected cells. *Cellular microbiology* **2007**; 9(4):875-890.

Forbes JA. Rubella: historical aspects. *American journal of diseases of children (1960)* **1969**; 118(1):5-11.

Forng RY, Atreya CD. Mutations in the retinoblastoma protein-binding LXCXE motif of rubella virus putative replicase affect virus replication. *The Journal of general virology* **1999**; 80 (Pt 2):327-332.

Frey TK. Neurological aspects of rubella virus infection. *Intervirology* **1997**; 40(2-3):167-175.

Frey TK, Abernathy ES, Bosma TJ, Starkey WG, Corbett KM et al. Molecular analysis of rubella virus epidemiology across three continents, North America, Europe, and Asia, 1961-1997. *The Journal of infectious diseases* **1998**; 178(3):642-650.

Frey TK, Marr LD. Sequence of the region coding for virion proteins C and E2 and the carboxy terminus of the nonstructural proteins of rubella virus: comparison with alphaviruses. *Gene* **1988**; 62(1):85-99.

Gaestel M. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nature reviews Molecular cell biology* **2006**; 7(2):120-130.

Garbutt M, Law LM, Chan H, Hobman TC. Role of rubella virus glycoprotein domains in assembly of virus-like particles. *J Virol* **1999**; 73(5):3524-3533.

Geyer H, Bauer M, Neumann J, Ludde A, Rennert P et al. Gene expression profiling of rubella virus infected primary endothelial cells of fetal and adult origin. *Virology* **2016**; 13:21.

Ghidini A, Lynch L. Prenatal diagnosis and significance of fetal infections. *The Western journal of medicine* **1993**; 159(3):366-373.

Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* **2007**; 26(22):3122-3142.

Gonzalez FA, Raden DL, Rigby MR, Davis RJ. Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS letters* **1992**; 304(2-3):170-178.

Gorbalenya AE, Koonin EV, Lai MM. Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS letters* **1991**; 288(1-2):201-205.

Gregg NM. Congenital cataract following German measles in the mother. *Trans Ophthalmol Soc Aust* **1941**; 3:35-46.

Grishin AV, Wang J, Potoka DA, Hackam DJ, Upperman JS et al. Lipopolysaccharide induces cyclooxygenase-2 in intestinal epithelium via a noncanonical p38 MAPK pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)* **2006**; 176(1):580-588.

Guan Z, Baier LD, Morrison AR. p38 mitogen-activated protein kinase down-regulates nitric oxide and up-regulates prostaglandin E2 biosynthesis stimulated by interleukin-1beta. *The Journal of biological chemistry* **1997**; 272(12):8083-8089.

Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO journal* **1996**; 15(11):2760-2770.

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science (New York, NY)* **1994**; 265(5173):808-811.

Han J, Lee JD, Jiang Y, Li Z, Feng L et al. Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *The Journal of biological chemistry* **1996**; 271(6):2886-2891.

Han L, Xin X, Wang H, Li J, Hao Y et al. Cellular response to persistent foot-and-mouth disease virus infection is linked to specific types of alterations in the host cell transcriptome. *Sci Rep* **2018**; 8(1):5074.

Hirasawa K, Kim A, Han HS, Han J, Jun HS et al. Effect of p38 mitogen-activated protein kinase on the replication of encephalomyocarditis virus. *J Virol* **2003**; 77(10):5649-5656.

Hiscott J, Kwon H, Genin P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *The Journal of clinical investigation* **2001**; 107(2):143-151.

Hobman TC, Lemon HF, Jewell K. Characterization of an endoplasmic reticulum retention signal in the rubella virus E1 glycoprotein. *J Virol* **1997**; 71(10):7670-7680.

Hobman TC, Woodward L, Farquhar MG. The rubella virus E2 and E1 spike glycoproteins are targeted to the Golgi complex. *The Journal of cell biology* **1993**; 121(2):269-281.

Hobman TC, Woodward L, Farquhar MG. Targeting of a heterodimeric membrane protein complex to the Golgi: rubella virus E2 glycoprotein contains a transmembrane Golgi retention signal. *Molecular biology of the cell* **1995**; 6(1):7-20.

Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* **2013**; 12:86.

Hofmann J, Pletz MW, Liebert UG. Rubella virus-induced cytopathic effect in vitro is caused by apoptosis. *The Journal of general virology* **1999**; 80 (Pt 7):1657-1664.

Hubner D, Jahn K, Pinkert S, Bohnke J, Jung M et al. Infection of iPSC Lines with Miscarriage-Associated Coxsackievirus and Measles Virus and Teratogenic Rubella Virus as a Model for Viral Impairment of Early Human Embryogenesis. *ACS infectious diseases* **2017**; 3(12):886-897.

Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000188130-MAPK12/tissue> **2018**.

Ilkow CS, Goping IS, Hobman TC. The Rubella virus capsid is an anti-apoptotic protein that attenuates the pore-forming ability of Bax. *PLoS Pathog* **2011**; 7(2):e1001291.

Ilkow CS, Weckbecker D, Cho WJ, Meier S, Beatch MD et al. The rubella virus capsid protein inhibits mitochondrial import. *J Virol* **2010**; 84(1):119-130.

Jaeschke A, Karasarides M, Ventura JJ, Ehrhardt A, Zhang C et al. JNK2 is a positive regulator of the cJun transcription factor. *Molecular cell* **2006**; 23(6):899-911.

Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA et al. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *The Journal of biological chemistry* **1996**; 271(30):17920-17926.

Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* **2006**; 441(7092):431-436.

Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature immunology* **2002**; 3(3):221-227.

Katow S, Sugiura A. Low pH-induced conformational change of rubella virus envelope proteins. *The Journal of general virology* **1988**; 69 (Pt 11):2797-2807.

Kazlauskas A, Cooper JA. Protein kinase C mediates platelet-derived growth factor-induced tyrosine phosphorylation of p42. *The Journal of cell biology* **1988**; 106(4):1395-1402.

Kee SH, Cho EJ, Song JW, Park KS, Baek LJ et al. Effects of endocytosis inhibitory drugs on rubella virus entry into VeroE6 cells. *Microbiology and immunology* **2004**; 48(11):823-829.

Kenny FM, Michaels RH, Davis KS. Rubella encephalopathy. Later psychometric, neurologic, and encephalographic evaluation of seven survivors. *American journal of diseases of children (1960)* **1965**; 110(4):374-380.

Klemm C, Bruchhagen C, van Kruchten A, Niemann S, Loffler B et al. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) regulate IL-6 over-production during concomitant influenza virus and Staphylococcus aureus infection. *Sci Rep* **2017**; 7:42473.

Kramer A, Liashkovich I, Oberleithner H, Ludwig S, Mazur I et al. Apoptosis leads to a degradation of vital components of active nuclear transport and a dissociation of the nuclear lamina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**; 105(32):11236-11241.

Kujala P, Ahola T, Ehsani N, Auvinen P, Vihinen H et al. Intracellular distribution of rubella virus nonstructural protein P150. *J Virol* **1999**; 73(9):7805-7811.

Kyriakis JM, Avruch J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *The Journal of biological chemistry* **1990**; 265(28):17355-17363.

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological reviews* **2001**; 81(2):807-869.

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA et al. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **1994**; 369(6476):156-160.

Lambert HP, Stern H, Wellsted AJ. Congenital rubella syndrome. *Lancet (London, England)* **1965**; 2(7417):826-827.

Lambert N, Strebel P, Orenstein W, Icenogle J, Poland GA. Rubella. *The Lancet* **2015**; 385(9984):2297-2307.

Latimer M, Ernst MK, Dunn LL, Drutskaya M, Rice NR. The N-terminal domain of IkappaB alpha masks the nuclear localization signal(s) of p50 and c-Rel homodimers. *Molecular and cellular biology* **1998**; 18(5):2640-2649.

Lau R, Niu MY, Pratt MA. cIAP2 represses IKKalpha/beta-mediated activation of MDM2 to prevent p53 degradation. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **2012**; 11(21):4009-4019.

Law LMJ, Everitt JC, Beatch MD, Holmes CFB, Hobman TC. Phosphorylation of Rubella Virus Capsid Regulates Its RNA Binding Activity and Virus Replication. *Journal of Virology* **2003**; 77(3):1764-1771.

Lawler S, Fleming Y, Goedert M, Cohen P. Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Current biology: CB* **1998**; 8(25):1387-1390.

Leban J, Baierl M, Mies J, Trentinaglia V, Rath S et al. A novel class of potent NF-kappaB signaling inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**; 17(21):5858-5862.

Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **1994b**; 372(6508):739-746.

Lee JY, Bowden DS. Rubella Virus Replication and Links to Teratogenicity. *Clinical Microbiology Reviews* **2000**; 13(4):571-587.

Lee JY, Bowden DS, Marshall JA. Membrane junctions associated with rubella virus infected cells. *Journal of submicroscopic cytology and pathology* **1996**; 28(1):101-108.

Lee JY, Marshall JA, Bowden DS. Characterization of rubella virus replication complexes using antibodies to double-stranded RNA. *Virology* **1994a**; 200(1):307-312.

Lee JY, Marshall JA, Bowden DS. Localization of rubella virus core particles in vero cells. *Virology* **1999**; 265(1):110-119.

Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A et al. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *The Journal of cell biology* **1993**; 122(5):1079-1088.

Liang Y, Gillam S. Mutational analysis of the rubella virus nonstructural polyprotein and its cleavage products in virus replication and RNA synthesis. *J Virol* **2000**; 74(11):5133-5141.

Liang Y, Gillam S. Rubella virus RNA replication is cis-preferential and synthesis of negative- and positive-strand RNAs is regulated by the processing of nonstructural protein. *Virology* **2001**; 282(2):307-319.

Liang Y, Yao J, Gillam S. Rubella virus nonstructural protein protease domains involved in trans- and cis-cleavage activities. *J Virol* **2000**; 74(12):5412-5423.

Lin A, Dibling B. The true face of JNK activation in apoptosis. *Aging cell* **2002**; 1(2):112-116.

Lin C, Zimmer SG, Lu Z, Holland RE, Jr., Dong Q et al. The involvement of a stress-activated pathway in equine influenza virus-mediated apoptosis. *Virology* **2001**; 287(1):202-213.

Lin KI, DiDonato JA, Hoffmann A, Hardwick JM, Ratan RR. Suppression of steady-state, but not stimulus-induced NF-kappaB activity inhibits alphavirus-induced apoptosis. *The Journal of cell biology* **1998**; 141(7):1479-1487.

Liu F, Xia Y, Parker AS, Verma IM. IKK biology. *Immunol Rev* **2012**; 246(1):239-253.

Liu FT, Newland AC, Jia L. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochemical and biophysical research communications* **2003**; 310(3):956-962.

Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell research* **2005**; 15(1):36-42.

Liu Z, Yang D, Qiu Z, Lim KT, Chong P et al. Identification of domains in rubella virus genomic RNA and capsid protein necessary for specific interaction. *J Virol* **1996**; 70(4):2184-2190.

Lu X, Masic A, Li Y, Shin Y, Liu Q et al. The PI3K/Akt pathway inhibits influenza A virus-induced Bax-mediated apoptosis by negatively regulating the JNK pathway via ASK1. *The Journal of general virology* **2010**; 91(Pt 6):1439-1449.

Lu Z, Xu S, Joazeiro C, Cobb MH, Hunter T. The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Molecular cell* **2002**; 9(5):945-956.

Lundström ML, Mauracher CA, Tingle AJ. Characterization of carbohydrates linked to rubella virus glycoprotein E2. *The Journal of general virology* **1991**; 72 (Pt 4):843-850.

Macdonald WM, Ritchie TR, Fox JC, White PB. PURULENT BRONCHITIS COMPLICATING MEASLES AND RUBELLA. *British medical journal* **1918**; 2(3018):481-486.

Madela JC. Charakterisierung der Prostaglandin E2 Synthese während einer Rötelninfektion von humanen primären Endothelzellen. *Masterarbeit, RKI und Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald* **2016**.

Mangala Prasad V, Klose T, Rossmann MG. Assembly, maturation and three-dimensional helical structure of the teratogenic rubella virus. *PLoS Pathog* **2017**; 13(6):e1006377.

Mangala Prasad V, Willows SD, Fokine A, Battisti AJ, Sun S et al. Rubella virus capsid protein structure and its role in virus assembly and infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**; 110(50):20105-20110.

Marr LD, Sanchez A, Frey TK. Efficient in vitro translation and processing of the rubella virus structural proteins in the presence of microsomes. *Virology* **1991**; 180(1):400-405.

Marr LD, Wang CY, Frey TK. Expression of the rubella virus nonstructural protein ORF and demonstration of proteolytic processing. *Virology* **1994**; 198(2):586-592.

Mastromarino P, Cioe L, Rieti S, Orsi N. Role of membrane phospholipids and glycolipids in the Vero cell surface receptor for rubella virus. *Medical microbiology and immunology* **1990**; 179(2):105-114.

Matthews JD, Tzeng WP, Frey TK. Determinants of subcellular localization of the rubella virus nonstructural replicase proteins. *Virology* **2009**; 390(2):315-323.

Matthews JD, Tzeng WP, Frey TK. Analysis of the function of cytoplasmic fibers formed by the rubella virus nonstructural replicase proteins. *Virology* **2010**; 406(2):212-227.

Matthews JD, Tzeng WP, Frey TK. Determinants in the maturation of rubella virus p200 replicase polyprotein precursor. *J Virol* **2012**; 86(12):6457-6469.

May MJ, Ghosh S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Seminars in cancer biology* **1997**; 8(2):63-73.

May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunology today* **1998**; 19(2):80-88.

Megyeri K, Berencsi K, Halazonetis TD, Prendergast GC, Gri G et al. Involvement of a p53-dependent pathway in rubella virus-induced apoptosis. *Virology* **1999**; 259(1):74-84.

Meier R, Rouse J, Cuenda A, Nebreda AR, Cohen P. Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated-protein kinase kinase homologues in PC12 and KB cells. *European journal of biochemistry* **1996**; 236(3):796-805.

Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* **2007**; 26(22):3227-3239.

Menser MA, Forrest JM. Rubella--high incidence of defects in children considered normal at birth. *The Medical journal of Australia* **1974**; 1(5):123-126.

Miyamoto S, Verma IM. Rel/NF-kappa B/I kappa B story. *Advances in cancer research* **1995**; 66:255-292.

Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, Yoshida K. A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *The Journal of biological chemistry* **1997**; 272(26):16657-16662.

Modrow S, Falke D, Truyen U, Schatzl H. Molekulare Virologie. *Spektrum Akademischer Verlag* **2010**; 3. Auflage.

Nabel G, Baltimore D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* **1987**; 326(6114):711-713.

Nacken W, Ehrhardt C, Ludwig S. Small molecule inhibitors of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) possess antiviral activity against highly pathogenic avian and human pandemic influenza A viruses. *Biological chemistry* **2012**; 393(6):525-534.

- Naeye RL, Blanc W.** Pathogenesis of congenital rubella. *Jama* **1965**; 194(12):1277-1283.
- Nakamura S, Kosaka J, Sugimoto M, Watanabe H, Shima H et al.** Silent thyroiditis following rubella. *Endocrinologia japonica* **1990**; 37(1):79-85.
- Nakano H.** Signaling crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Trends in immunology* **2004**; 25(8):402-405.
- Nakano K, Vousden KH.** PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell* **2001**; 7(3):683-694.
- Nakatsue T, Katoh I, Nakamura S, Takahashi Y, Ikawa Y et al.** Acute infection of Sindbis virus induces phosphorylation and intracellular translocation of small heat shock protein HSP27 and activation of p38 MAP kinase signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications* **1998**; 253(1):59-64.
- Nakhasi HL, Thomas D, Zheng DX, Liu TY.** Nucleotide sequence of capsid, E2 and E1 protein genes of Rubella virus vaccine strain RA27/3. *Nucleic acids research* **1989**; 17(11):4393-4394.
- Nencioni L, De Chiara G, Sgarbanti R, Amatore D, Aquilano K et al.** Bcl-2 expression and p38MAPK activity in cells infected with influenza A virus: impact on virally induced apoptosis and viral replication. *The Journal of biological chemistry* **2009**; 284(23):16004-16015.
- Nimmerjahn F, Dudziak D, Dirmeier U, Hobom G, Riedel A et al.** Active NF-kappaB signalling is a prerequisite for influenza virus infection. *The Journal of general virology* **2004**; 85(Pt 8):2347-2356.
- Nogalski MT, Podduturi JP, DeMeritt IB, Milford LE, Yurochko AD.** The human cytomegalovirus virion possesses an activated casein kinase II that allows for the rapid phosphorylation of the inhibitor of NF-kappaB, IkappaBalpha. *J Virol* **2007**; 81(10):5305-5314.
- Oeckinghaus A, Ghosh S.** The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2009**; 1(4):a000034.
- Oker-Blom C.** The gene order for rubella virus structural proteins is NH2-C-E2-E1-COOH. *J Virol* **1984**; 51(2):354-358.
- Oker-Blom C, Kalkkinen N, Kaariainen L, Pettersson RF.** Rubella virus contains one capsid protein and three envelope glycoproteins, E1, E2a, and E2b. *J Virol* **1983**; 46(3):964-973.
- Oker-Blom C, Ulmanen I, Kaariainen L, Pettersson RF.** Rubella virus 40S genome RNA specifies a 24S subgenomic mRNA that codes for a precursor to structural proteins. *J Virol* **1984**; 49(2):403-408.
- Otsuki N, Sakata M, Saito K, Okamoto K, Mori Y et al.** Both sphingomyelin and cholesterol in the host cell membrane are essential for Rubella virus entry. *J Virol* **2017**.

Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **1999**; 18(49):6853-6866.

Parkman PD. Making vaccination policy: the experience with rubella. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **1999**; 28 Suppl 2:S140-146.

Parkman PD, Buescher EL, Artenstein MS. Recovery of rubella virus from army recruits. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* **1962**; 111:225-230.

Parkman PD, Meyer HM, Jr., Kirschstein RL, Hopps HE. Attenuated rubella virus. I. Development and laboratory characterization. *The New England journal of medicine* **1966**; 275(11):569-574.

Perelygina L, Zheng Q, Metcalfe M, Icenogle J. Persistent infection of human fetal endothelial cells with rubella virus. *PLoS One* **2013**; 8(8):e73014.

Perkins D, Gyure KA, Pereira EF, Aurelian L. Herpes simplex virus type 1-induced encephalitis has an apoptotic component associated with activation of c-Jun N-terminal kinase. *Journal of neurovirology* **2003**; 9(1):101-111.

Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science (New York, NY)* **2006**; 314(5801):997-1001.

Pleschka S. RNA viruses and the mitogenic Raf/MEK/ERK signal transduction cascade. *Biological chemistry* **2008**; 389(10):1273-1282.

Pugachev KV, Frey TK. Rubella virus induces apoptosis in culture cells. *Virology* **1998**; 250(2):359-370.

Qiu Z, Hobman TC, McDonald HL, Seto NO, Gillam S. Role of N-linked oligosaccharides in processing and intracellular transport of E2 glycoprotein of rubella virus. *J Virol* **1992a**; 66(6):3514-3521.

Qiu Z, Tufaro F, Gillam S. The influence of N-linked glycosylation on the antigenicity and immunogenicity of rubella virus E1 glycoprotein. *Virology* **1992b**; 190(2):876-881.

Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *The Journal of biological chemistry* **1995**; 270(13):7420-7426.

Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **2007**; 26(22):3100-3112.

Ray LB, Sturgill TW. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**; 85(11):3753-3757.

Richter E. Charakterisierung des Einflusses des Mumpsvirus auf den ERK-Signalweg. *Masterarbeit, RKI und Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf* **2015**.

Risco C, Carrascosa JL, Frey TK. Structural maturation of rubella virus in the Golgi complex. *Virology* **2003**; 312(2):261-269.

RKI. Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut – 2016/2017. *Epidemiologisches Bulletin Nr. 34* **2017**.

RKI. Ratgeber Roeteln. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Roeteln.html **2018**.

Robertson SE, Featherstone DA, Gacic-Dobo M, Hersh BS. Rubella and congenital rubella syndrome: global update. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health* **2003**; 14(5):306-315.

Rodrigue-Gervais IG, Labbe K, Dagenais M, Dupaul-Chicoine J, Champagne C 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.

Ronkina N, Kotlyarov A, Gaestel M. MK2 and MK3--a pair of isoenzymes? *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* **2008**; 13:5511-5521.

Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I-kappaB kinase complex. *Nature* **1998**; 395(6699):297-300.

Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **1994**; 78(6):1027-1037.

Rozanov MN, Koonin EV, Gorbalenya AE. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *The Journal of general virology* **1992**; 73 (Pt 8):2129-2134.

Rust NM, Papa MP, Scovino AM, da Silva MM, Calzavara-Silva CE et al. Bradykinin enhances Sindbis virus infection in human brain microvascular endothelial cells. *Virology* **2012**; 422(1):81-91.

Sabapathy K, Hochedlinger K, Nam SY, Bauer A, Karin M et al. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Molecular cell* **2004**; 15(5):713-725.

Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W. I-kappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *The Journal of biological chemistry* **1999**; 274(43):30353-30356.

Sambucetti LC, Cherrington JM, Wilkinson GW, Mocarski ES. NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *The EMBO journal* **1989**; 8(13):4251-4258.

Schmolke M, Viemann D, Roth J, Ludwig S. Essential impact of NF-kappaB signaling on the H5N1 influenza A virus-induced transcriptome. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)* **2009**; 183(8):5180-5189.

Selvamani SP, Mishra R, Singh SK. Chikungunya virus exploits miR-146a to regulate NF-kappaB pathway in human synovial fibroblasts. *PLoS One* **2014**; 9(8):e103624.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **1986**; 46(5):705-716.

Shaul YD, Seger R. ERK1c regulates Golgi fragmentation during mitosis. *The Journal of cell biology* **2006**; 172(6):885-897.

Shih VF, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. A single NFkappaB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell research* **2011**; 21(1):86-102.

Singer CA, Baker KJ, McCaffrey A, AuCoin DP, Dechert MA et al. p38 MAPK and NF-kappaB mediate COX-2 expression in human airway myocytes. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* **2003**; 285(5):L1087-1098.

Slater PE, Ben-Zvi T, Fogel A, Ehrenfeld M, Ever-Hadani S. Absence of an association between rubella vaccination and arthritis in underimmune postpartum women. *Vaccine* **1995**; 13(16):1529-1532.

Sloyer JL, Howie VM, Ploussard JH, Bradac J, Habercorn M et al. Immune response to acute otitis media in children III. Implications of viral antibody in middle ear fluid. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)* **1977**; 118(1):248-250.

Srekanth GP, Chuncharunee A, Cheunsuchon B, Noisakran S, Yenchitsomanus PT et al. JNK1/2 inhibitor reduces dengue virus-induced liver injury. *Antiviral research* **2017**; 141:7-18.

Steen E, Torp KH. Encephalitis and thrombocytopenic purpura after rubella. *Archives of disease in childhood* **1956**; 31(160):470-473.

Stein B, Brady H, Yang MX, Young DB, Barbosa MS. Cloning and characterization of MEK6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase cascade. *The Journal of biological chemistry* **1996**; 271(19):11427-11433.

Suomalainen M, Garoff H, Baron MD. The E2 signal sequence of rubella virus remains part of the capsid protein and confers membrane association in vitro. *J Virol* **1990**; 64(11):5500-5509.

Suppiah S, Mousa HA, Tzeng WP, Matthews JD, Frey TK. Binding of cellular p32 protein to the rubella virus P150 replicase protein via PxxPxR motifs. *The Journal of general virology* **2012**; 93(Pt 4):807-816.

Takaki H, Akazawa Y, Kido Y, Morishita M, Honda T et al. Hepatitis C Virus Infection Increases c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Phosphorylation and Accentuates Hepatocyte Lipoapoptosis. *Medical Science Monitor* **2017**; 23:4526-4532.

Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, Wahl G, Verma I. p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer cell* **2002**; 1(5):493-503.

Thanopoulos BD, Rokas S, Frimas CA, Mantagos SP, Beratis NG. Cardiac involvement in postnatal rubella. *Acta paediatrica Scandinavica* **1989**; 78(1):141-144.

Thornton TM, Rincon M. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *International journal of biological sciences* **2009**; 5(1):44-51.

Tingle AJ, Allen M, Petty RE, Kettlys GD, Chantler JK. Rubella-associated arthritis. I. Comparative study of joint manifestations associated with natural rubella infection and RA 27/3 rubella immunisation. *Annals of the rheumatic diseases* **1986**; 45(2):110-114.

Töndury G, Smith DW. Fetal rubella pathology. *The Journal of pediatrics* **1966**; 68(6):867-879.

Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science (New York, NY)* **2000**; 288(5467):870-874.

Trinh QD, Pham NTK, Takada K, Komine-Aizawa S, Hayakawa S. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-Independent Rubella Infection of Keratinocytes and Resistance of First-Trimester Trophoblast Cells to Rubella Virus In Vitro. *Viruses* **2018**; 10(1).

Turpeinen T, Nieminen R, Moilanen E, Korhonen R. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 negatively regulates the expression of interleukin-6, interleukin-8, and cyclooxygenase-2 in A549 human lung epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **2010**; 333(1):310-318.

Vaheri A, Cristofalo VJ. Metabolism of rubella virus-infected BHK 21 cells. Enhanced glycolysis and late cellular inhibition. *Archiv fur die gesamte Virusforschung* **1967**; 21(3):425-436.

Varghese FS, Thaa B, Amrun SN, Simarmata D, Rausalu K et al. The Antiviral Alkaloid Berberine Reduces Chikungunya Virus-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *J Virol* **2016**; 90(21):9743-9757.

Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* **2005**; 30(1):43-52.

Vidgren G, Takkinen K, Kalkkinen N, Kaariainen L, Pettersson RF. Nucleotide sequence of the genes coding for the membrane glycoproteins E1 and E2 of rubella virus. *The Journal of general virology* **1987**; 68 (Pt 9):2347-2357.

Viemann D, Schmolke M, Lueken A, Boergeling Y, Friesenhagen J et al. H5N1 virus activates signaling pathways in human endothelial cells resulting in a specific imbalanced inflammatory response. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)* **2011**; 186(1):164-173.

Visvanathan KV, Goodbourn S. Double-stranded RNA activates binding of NF-kappa B to an inducible element in the human beta-interferon promoter. *The EMBO journal* **1989**; 8(4):1129-1138.

Voss K, Amaya M, Mueller C, Roberts B, Kehn-Hall K et al. Inhibition of host extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation decreases new world alphavirus multiplication in infected cells. *Virology* **2014**; 468-470:490-503.

Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature reviews Cancer* **2009**; 9(8):537-549.

Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J et al. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **2001**; 412(6844):346-351.

Wang X, Finegan KG, Robinson AC, Knowles L, Khosravi-Far R et al. Activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 downregulates FasL upon osmotic stress. *Cell death and differentiation* **2006**; 13(12):2099-2108.

Wang Z, Ni J, Li J, Shi B, Xu Y et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by cIAP2 involves accelerating the ubiquitin-proteasome-mediated destruction of polymerase. *J Virol* **2011**; 85(21):11457-11467.

Webster WS. Teratogen update: congenital rubella. *Teratology* **1998**; 58(1):13-23.

Wei L, Zhu Z, Wang J, Liu J. JNK and p38 mitogen-activated protein kinase pathways contribute to porcine circovirus type 2 infection. *J Virol* **2009**; 83(12):6039-6047.

Weller TH, Neva FA. Propagation in Tissue Culture of Cytopathic Agents from Patients with Rubella-Like Illness. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1962**; 111(1):215-225.

Wesselhoeft C. Rubella (German measles). *The New England journal of medicine* **1947**; 236(25):943.

Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Current opinion in genetics & development* **2002**; 12(1):14-21.

WHO. Rubella virus nomenclature update: 2013. *Weekly epidemiological record 8832* **2013**; p337-342.

Wickremasinghe MI, Thomas LH, O'Kane CM, Uddin J, Friedland JS. Transcriptional mechanisms regulating alveolar epithelial cell-specific CCL5 secretion in pulmonary tuberculosis. *The Journal of biological chemistry* **2004**; 279(26):27199-27210.

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews* **1999**; 79(1):143-180.

Willows S, Ilkow CS, Hobman TC. Phosphorylation and membrane association of the Rubella virus capsid protein is important for its anti-apoptotic function. *Cellular microbiology* **2014**; 16(8):1201-1210.

Wolinsky JS. Fields Virology. *Lippincott Williams & Wilki* **1996**; p. 899–929.

Wong D, Teixeira A, Oikonomopoulos S, Humburg P, Lone IN et al. Extensive characterization of NF-kappaB binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits. *Genome biology* **2011**; 12(7):R70.

Wortzel I, Seger R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & cancer* **2011**; 2(3):195-209.

Wu F, Song H, Zhang Y, Zhang Y, Mu Q et al. Irisin Induces Angiogenesis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells In Vitro and in Zebrafish Embryos In Vivo via Activation of the ERK Signaling Pathway. *PLoS One* **2015**; 10(8):e0134662.

Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Berberich-Siebelt F, Wolff T et al. NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *The Journal of biological chemistry* **2004**; 279(30):30931-30937.

Wurzer WJ, Planz O, Ehrhardt C, Giner M, Silberzahn T et al. Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *The EMBO journal* **2003**; 22(11):2717-2728.

Xie J, Zhang S, Hu Y, Li D, Cui J et al. Regulatory roles of c-jun in H5N1 influenza virus replication and host inflammation. *Biochimica et biophysica acta* **2014**; 1842(12 Pt A):2479-2488.

Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R et al. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* **1998**; 93(7):1231-1240.

Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors (Chur, Switzerland)* **2006**; 24(1):21-44.

Yu H, Jiang W, Du H, Xing Y, Bai G et al. Involvement of the Akt/NF-kappaB pathways in the HTNV-mediated increase of IL-6, CCL5, ICAM-1, and VCAM-1 in HUVECs. *PLoS One* **2014**; 9(4):e93810.

Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Molecular cell* **2001**; 7(3):673-682.

Yurochko AD, Kowalik TF, Huong SM, Huang ES. Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters. *J Virol* **1995**; 69(9):5391-5400.

Zamanian-Daryoush M, Mogensen TH, DiDonato JA, Williams BR. NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. *Molecular and cellular biology* **2000**; 20(4):1278-1290.

Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* **1997**; 91(2):243-252.

Zhang H, Niu X, Qian Z, Qian J, Xuan B. The c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 inhibits human cytomegalovirus replication. *Journal of medical virology* **2015**; 87(12):2135-2144.

Zhang S, Tian H, Cui J, Xiao J, Wang M et al. The c-Jun N-terminal kinase (JNK) is involved in H5N1 influenza A virus RNA and protein synthesis. *Archives of virology* **2016**; 161(2):345-351.

Zheng DP, Frey TK, Icenogle J, Katow S, Abernathy ES et al. Global distribution of rubella virus genotypes. *Emerging infectious diseases* **2003**; 9(12):1523-1530.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass ich diese Arbeit weder in dieser noch in einer abgewandelten Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe.

Berlin, den 28. September 2018

Paul Rennert