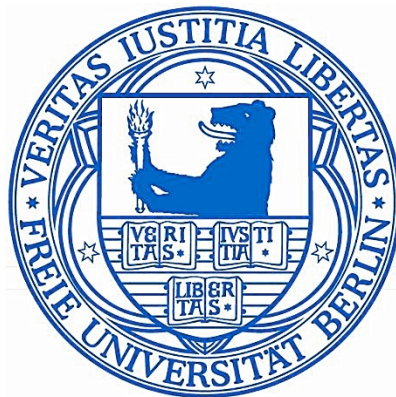


Aktivitäten des Nichtstrukturproteins 1
bei der Vermehrung von Influenza B Virus
in humanen Zellen

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

Anne Sadewasser

aus Berlin

2013

Angefertigt von April 2009 bis Juli 2013
unter der Leitung von PD Dr. Thorsten Wolff
am Robert Koch-Institut in Berlin

1. Gutachter: PD Dr. Thorsten Wolff

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 08. November 2013

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thorsten Wolff, der die Anregung zum Thema gab und der durch viele Hinweise und Diskussionen die Anfertigung dieser Dissertation gefördert hat. Ebenfalls möchte ich Frau Dr. Jana Soyka und Frau Dr. Marion Abt für die Durchsicht der Arbeit und die zahlreichen Anregungen danken. Herrn Dr. Torsten Schwecke und ganz besonders meinem Vater danke ich für die Einweisung in das komplexe Themengebiet der Massenspektrometrie.

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich für die Betreuung seitens der Freien Universität Berlin.

Der gesamten Arbeitsgruppe FG17 des Robert Koch-Institutes, besonders Viola, Katharina, Sandra, Gudrun und Andrea danke ich für die vielen (nicht nur) fachlichen Diskussionen, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern, meinem Freund Philipp und meinen guten Freundinnen Fränzi und Wiebke danke ich von Herzen dafür, dass ihr immer für mich da wart und mich über die Arbeit hinweg unterstützt habt!

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
1 Einleitung	1
1.1 <i>Das Influenzavirus</i>	1
1.1.1 Taxonomie.....	4
1.1.2 Aufbau und Genomorganisation des Influenzaviruspartikels	4
1.1.3 Replikation.....	8
1.1.4 Influenzaviren und Apoptose.....	10
1.1.5 Struktur und Funktion des Nichtstrukturproteins 1 von Influenza A und B Viren..	15
1.2 <i>Das zelluläre Chaperon HSP90</i>	19
1.3 <i>Zielsetzung dieser Arbeit</i>	22
2 Material und Methoden	25
2.1 <i>Zellkultur</i>	25
2.1.1 Passagieren von Zellen	25
2.1.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen	25
2.1.3 Transfektion von <i>small interfering</i> (si)RNA.....	26
2.2 <i>Infektiöse Arbeiten</i>	27
2.2.1 Anzucht von Influenza B Viren im Hühnerei	27
2.2.2 Hämagglutinationstest (HA-Test).....	27
2.2.3 Infektion von eukaryotischen Zellen mit Influenza B Viren	28
2.2.4 Titerbestimmung mittels Avicel-Plaque-Assay und Immunfluoreszenz.....	29
2.2.5 Herstellung der rekombinanten B/Lee Viren P122/5L und xSH3G.....	29
2.2.6 Isolierung viraler RNA.....	31
2.3 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	32
2.3.1 Reverse Transkription (RT)-PCR	32
2.3.2 Polymerasekettenreaktion.....	32
2.3.3 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	34
2.3.4 Agarosegelelektrophorese von DNA	35
2.3.5 Reinigung von PCR-Fragmenten	35
2.3.6 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelextraktion.....	35
2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten	35
2.3.8 Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien durch Hitzeschock	36
2.3.9 Plasmidpräparationen.....	36
2.3.10 DNA-Sequenzierung nach <i>Sanger</i>	37
2.4 <i>Proteinbiochemische Methoden</i>	38
2.4.1 Herstellung von Zelllysaten.....	38

2.4.2	Protein-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen.....	38
2.4.3	Färben und Trocknen von SDS-Polyacrylamidgelen.....	39
2.4.4	Westernblot und Immunodetektion.....	39
2.4.5	Überexpression von GST-Fusionsproteinen in <i>E.coli</i> BL26-Bakterien.....	39
2.4.6	Kopplung von GST-Fusionsproteinen an Glutathion-Sepharose.....	40
2.4.7	<i>In vitro</i> -Translation.....	40
2.4.8	Interaktionsstudien.....	41
2.4.9	Interferon β -ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>).....	42
2.5	<i>Zellbiologische Methoden</i>	43
2.5.1	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse.....	43
2.5.2	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie.....	43
2.5.3	Zytotoxizitäts-Test (MTT-Test).....	44
2.5.4	Luziferase-Reportergen-Assay.....	45
2.5.5	Caspase-3/7-Aktivitätstest.....	45
2.6	<i>Massenspektrometrie</i>	46
2.6.1	Inkorporation von Isotopen-markierten Aminosäuren in A549-Zellen.....	46
2.6.2	Infektion von SILAC-Zellen.....	47
2.6.3	Zellyse, BCA-Test und Ko-Immunopräzipitation.....	47
2.6.4	Reduktion, Alkylierung und tryptischer Verdau der Proteine.....	47
2.6.5	Messung mittels Nano-LC und Orbitrap.....	48
2.6.6	Peptid- und Protein-Identifikation und -Quantifizierung.....	48
3	Ergebnisse	50
3.1	<i>Einfluss der hochkonservierten Aminosäuresequenz 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127 im NS1-Protein auf die Replikation von rekombinanten Influenza B Viren</i>	50
3.1.1	Die Substitution der gesamten 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenz führt zu gesteigerter Replikation von Influenza B Viren in humanen Zelllinien.....	52
3.1.2	Die Substitution der gesamten 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenz führt zu früher viraler Proteinsynthese im Infektionsverlauf.....	54
3.1.3	Die Substitution der gesamten 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenz beschleunigt die Relokalisierung der viralen NS1- und NP-Proteine während der Replikation.....	55
3.1.4	Die Substitutionen im 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motiv des NS1-Proteins führen zu gesteigerter viraler Genexpression im Vergleich zum wt.....	57
3.1.5	Die Substitutionen im 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Aminosäuremotiv führen zu verstärkter Interaktion von NS1 mit viralen Polymerasekomponenten.....	60
3.2	<i>Das 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motiv hat keinen Einfluss auf Fähigkeit der Interferon-Antagonisierung des NS1-Proteins</i>	61

3.3	<i>Das hochkonservierte 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motiv vermittelt die Wechselwirkung des B/NS1-Proteins mit dem zellulären Adaptorprotein CrkII.....</i>	63
3.3.1	B/NS1-Crk-Interaktion ist früh im Infektionsverlauf im Zellkern lokalisiert.....	64
3.3.2	Die verringerte B/NS1-xSH3G-Crk-Interaktion führt zu gesteigerter JNK/ATF2-Signaltransduktion in infizierten Zellen.....	66
3.3.3	Die Substitution der gesamten 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenz führt zu verminderter PI3K/Akt-Signaltransduktion zu späten Zeitpunkten der Infektion.....	67
3.3.4	Crk-NS1-Interaktion spielt nur eine geringe Rolle bei der viralen Replikation.....	69
3.4	<i>Die Substitution des gesamten 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motivs im NS1-Protein führt zu verstärkter Phosphorylierung der Proteinkinase R im Infektionsverlauf.....</i>	71
3.4.1	Die Substitutionen in der 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenz haben keinen Einfluss auf B/NS1-PKR-Interaktion.....	73
3.4.2	PKR-knockdown hat nur geringe Auswirkungen auf die Influenza B Virusreplikation.....	74
3.5	<i>Die Substitution der gesamten 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenz im B/NS1-Protein führt zu gesteigerter Apoptose der infizierten Zellen.....</i>	76
3.5.1	Eine Caspase 3-Inhibition hat nur geringe Folgen für die Replikation der Influenza B Viren mit Mutationen im NS1-121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motiv.....	79
3.6	<i>Ein globaler Ansatz zur Beschreibung des Interaktoms von NS1-wt- bzw. xSH3G-Proteinen identifiziert HSP90β als differenziellen Bindungspartner.....</i>	80
3.6.1	Detektion der HSP90β-NS1-Interaktion mittels Massenspektrometrie.....	80
3.6.2	Die Substitutionen im AS-Motiv 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127 führen zu verstärkter Interaktion des NS1-Proteins mit dem Chaperon HSP90β.....	85
3.6.3	Die Substitution des gesamten NS1-122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motivs führt zu gesteigerter Assoziation von HSP90β mit NS1 und PB2 in der Infektion.....	86
3.6.4	Inhibition von HSP90 verringert die Vermehrung von Influenza B Viren.....	87
4	Diskussion.....	89
4.1	<i>Die Substitution der gesamten 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenz im B/NS1-Protein führt durch verstärkte HSP90-PB2-Bindung zu gesteigerter Replikation von Influenza B Viren in humanen Zelllinien.....</i>	90
4.2	<i>B/NS1 bindet über das Sequenzmotiv 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127 das Adaptorprotein Crk und supprimiert den JNK/ATF2-Signalweg.....</i>	96
4.3	<i>Die vollständige Substitution des 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motivs führt zu gesteigerter PKR-Aktivierung und Apoptoseinduktion in infizierten Zellen.....</i>	98
5	Zusammenfassung.....	103
6	Summary.....	104

Literaturverzeichnis	107
Anhang	116
1. <i>Materialverzeichnis</i>	116
<i>Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren</i>	127
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	127

1 Einleitung

Viren sind infektiöse Partikel, die sich extrazellulär verbreiten, aber für ihre Vermehrung auf den Wirtsmetabolismus einer Zelle angewiesen sind. Dabei greifen sie für ihre Replikation auf die Proteinfunktionen der Wirtszelle im Kern und/oder Zytoplasma zurück.

Influenza A und B Viren sind die Erreger der saisonalen Grippeepidemien. Beide Influenzavirustypen können zu schweren Krankheitsverläufen und letalen Verläufen führen. Sie haben eine Reihe von gemeinsamen, aber auch differenzielle Eigenschaften, z. B. die Funktionen einiger viraler Proteine (siehe Kapitel 1.1.3), ihre Wirtsspezifität (siehe Kapitel 1.1.1) und die Kodierungsstrategie einiger Gensegmente ihres Negativstrang-RNA-Genoms (siehe Kapitel 1.1.2).

Im Zentrum dieser Arbeit stehen die Proteinaktivitäten des Nichtstrukturproteins 1 (NS1) von Influenza B Virus mit besonderem Fokus auf den hochkonservierten Bereich 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127, der Homologien zu Klasse II-SH3-Bindemotiven (**PxxPxK/R**) zeigt. Die Peptidsequenzen der NS1-Proteine von Influenza A und B Viren (A/NS1 bzw. B/NS1) unterscheiden sich zu mehr als 75 %. Dennoch haben diese multifunktionellen Virulenzfaktoren beider Influenzavirustypen sowohl unterschiedliche als auch überlappende Eigenschaften, wie z. B. den Einfluss auf die virale Replikation und auf die Immunabwehr der Wirtszelle (siehe Kapitel 1.1.5). Die molekularen Mechanismen für diese Funktionen sind für das B/NS1-Protein bisher vergleichsweise weniger gut untersucht, als für das A/NS1-Protein.

Für die Entwicklung antiviraler Therapien ist die Kenntnis molekularer und funktioneller Eigenschaften viraler Proteine von entscheidender Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb erstmals der Einfluss des *in silico*-identifizierten hochkonservierten Aminosäuremotivs 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 auf die Funktionen des B/NS1-Proteins, im Hinblick auf dessen Aktivitäten während der Virusreplikation, auf die zelluläre Signaltransduktion und auf Protein-Protein-Interaktionen von Virus und Wirt untersucht.

1.1 Das Influenzavirus

Influenzaviren sind die Erreger der Virusgrippe und werden überwiegend über Aerosole, aber auch indirekt durch Kontaktinfektion übertragen. Nach Transmission dringen die Viren zunächst in die Epithelzellen des Nasen- und Rachenraumes ein und

breiten sich dann im oberen Respirationstrakt aus. Ein bis vier Tage nach Infektion treten mit plötzlichem Krankheitsbeginn Symptome wie Fieber, Husten, Halsschmerzen, Rhinitis, Glieder- und Kopfschmerzen auf, die meist sieben bis 14 Tage andauern. Bei schweren Verläufen, die vor allem ältere und immunsupprimierte Menschen treffen können, verbreiten sich die Viren bis in den unteren Respirationstrakt. Dies kann zu einer interstitiellen Lungenentzündung oder einer sekundären Pneumonie durch Bakterieninfektion des geschwächten Organismus führen. Pneumonie, Meningitis, Enzephalitis, Kreislaufschäden und Myokarditis können die Folgen einer Influenzainfektion sein und im schlimmsten Fall zu einem letalen Krankheitsverlauf führen (WHO, 2009). Der Krankheitsverlauf lässt keine Unterscheidung zwischen einer Influenza A oder B Virusinfektion zu. Beide Influenzasubtypen koziirkulieren jährlich mit wechselnder Dominanz während der saisonalen Epidemien (Abb. 1).

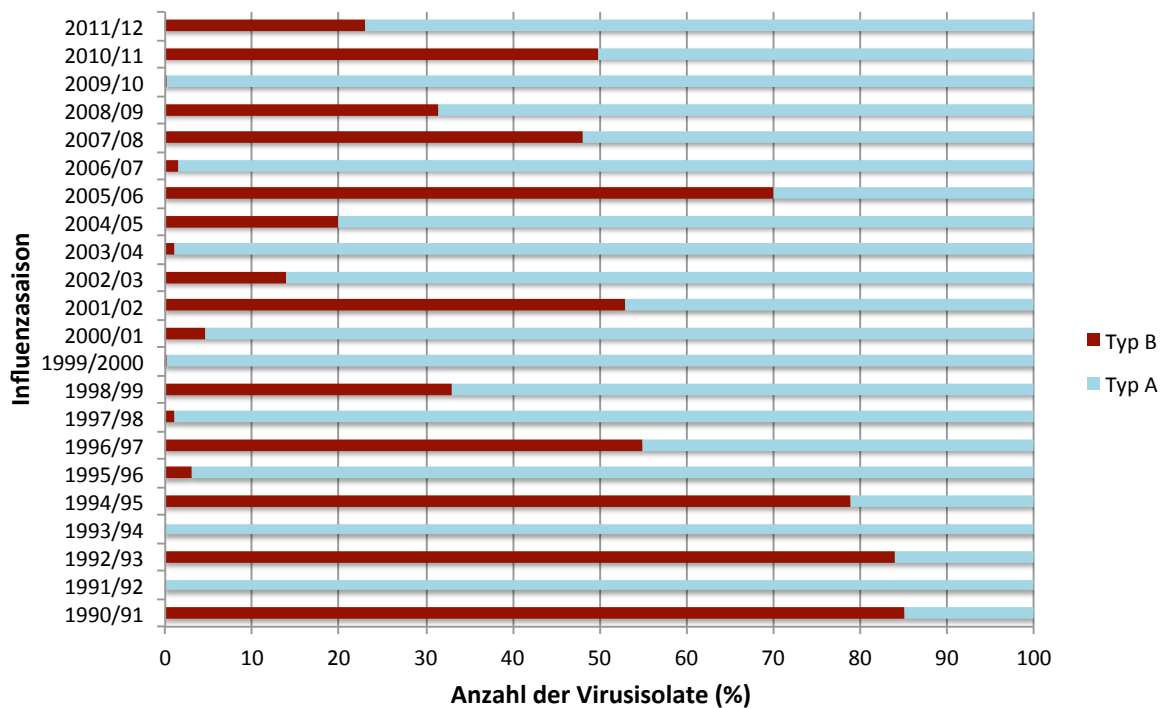


Abb. 1: Saisonale Verteilung von Influenza A und B Viren seit 1990/91 in Prozent. Quelle: AG Influenza-Saisonberichte 2008/09 und 2011/12.

Trotz verfügbarer Impfstoffe kommt es jährlich zu Hospitalisierungen und Todesfällen infolge von Grippeepidemien. Allein in der Grippezeit 2011/2012 gab es in Deutschland schätzungsweise 2,1 Millionen Exzesskonsultationen, 1,1 Millionen Arbeitsunfähigkeiten und 7.400 Hospitalisierungen. Die Todesfallzahlen sind sehr variabel. In den letzten 20 Jahren wurden in Deutschland jährlich 0-26.300 Exzess-Todesfälle als Folge einer Influenzavirusinfektion ermittelt (AG Influenza, Saisonbe-

richt 2011/2012). Die saisonalen Grippeepidemien sind durch die genetische Variabilität der Viren bedingt, die zu einer hohen Antigenflexibilität der Erreger führt. Die fehlende Korrekturlese-Aktivität der Influenzavirus RNA-Polymerase führt zur Bildung von ständig neuen Virusvarianten mit Änderungen in den viralen Oberflächen-Antigenen HA und NA, die der bestehenden Immunität einer Population gegen frühere Influenzaviren entgehen können (Palese und Shaw, 2007). Neben diesem Mechanismus des *antigenic drift*, der zur Adaptierung von Influenza A und B Viren an die humoralen Abwehrmechanismen führt, können sich die antigenen Eigenschaften des Influenza A Virus auch über den Mechanismus des *antigenic shift* drastisch verändern und zum Auftreten eines neuen Subtyps führen. Dies geschieht über den Mechanismus der Genreassortierung des segmentierten Influenzavirusgenoms. Virusreassortanten entstehen durch Doppelinfection einer Zelle mit zwei verschiedenen Virussubtypen. Dabei kommt es am Ende des Replikationszyklus zur Assemblierung von Viren, die Genomsegmente beider Subtypen tragen können (Palese, 1977; Neumann *et al.*, 2009). Führt diese Reassortierung neben weiteren Adaptationen zur Mensch-zu-Mensch-Transmission sowie zu starken Veränderungen der antigenen Eigenschaften des Virus, kann es zu weltweiten Pandemien kommen.

In den letzten 100 Jahren kam es zum Ausbruch von vier Pandemien: 1918 die „Spanische Grippe“, 1957 die „Asiatische Grippe“, 1968 die „Hongkong Grippe“ und 2009 die „Neue A/H1N1-Grippe“. Mit Ausnahme der „Neuen A/H1N1“-Pandemie, die durch relativ milde Krankheitsverläufe gekennzeichnet war, kam es bei den anderen Pandemien zu schweren Verläufen mit Millionen Todesopfern.

Die genetische Variabilität der Influenzaviren stellt das Gesundheitssystem vor medizinische und ökonomische Herausforderungen. Die zur Impfung verwendeten Stämme werden je nach Empfehlung der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization* – WHO) alle ein bis drei Jahre an die zirkulierenden Viren angepasst. Die antivirale Therapie durch Amantadine und Oseltamivir ist spezifisch gegen die Virusproteine M2 (Matrixprotein 2) bzw. NA (Neuraminidase) gerichtet (siehe Kapitel 1.1.3). Hohe Mutationsraten, kurze Replikationszeiten, die Populationsgröße und das kompakte Genom befähigen das Virus dem Selektionsdruck durch die virusspezifische Medikation durch Resistenzentwicklung zu entgehen (Geller *et al.*, 2012). Bei einer antiviralen Therapie, die spezifisch für die Virusreplikation essentielle Wirtsfaktoren angreift, wären die Therapieaussichten vielversprechender. Die Viren wären in ihrer Replikationsfähigkeit beeinträchtigt und müssten für dieselbe zelluläre Funktion

über mehrere Proteinmutationen die Fähigkeit zur Nutzung eines anderen Signalweges erwerben. Dies würde die Resistenzentwicklung erschweren. Daher ist die Kenntnis über Protein-Protein-Interaktionen von Virus und Wirt für die Entwicklung neuer antiviraler Therapien von großer Bedeutung. Besonders das NS1-Protein, das viele Wirtszellproteine in ihrer Funktionsweise manipuliert (siehe Kapitel 1.1.5) ist von großem Interesse.

1.1.1 Taxonomie

Influenzaviren gehören zusammen mit den Thogoto- und den Isaviren zur Familie der *Orthomyxoviridae* (griech.: ortho = richtig; myxa = schleim). Diese Membranbehüllten Viren kennzeichnet ein segmentiertes einzelsträngiges RNA-Genom in Negativorientierung. Influenzaviren werden aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften und der antigenen Eigenschaften ihrer Strukturproteine NP (Nukleoprotein) und M1 (Matrixprotein) in Influenza A, B und C Viren unterteilt. Sie unterscheiden sich auch durch die Breite ihres Wirtsspektrums. Während Influenza A Viren neben dem Menschen viele andere Säuger sowie domestizierte und Wildvögel infizieren können, wurden Influenza B Viren bisher nur aus Menschen und Seehunden isoliert. Influenza C Viren sind bei Menschen und Schweinen trotz hoher Seropositivität nur von geringer klinischer Bedeutung (Modrow *et al.*, 2003). Aufgrund der serologischen Eigenschaften der Oberflächenproteine HA (Hämagglutinin) und NA (Neuraminidase) lassen sich Influenza A Viren in weitere Subtypen unterteilen. Bisher sind 17 HA-Moleküle (H1 bis H17) und neun NA-Moleküle (N1 bis N9) identifiziert worden (Tong *et al.*, 2012). Die Nomenklatur erfolgt durch ein festgelegtes Schema: Dem Influenzavirustyp folgt der Wirt, das Jahr der Erstisolation, die Nummer des Isolats, das Jahr der Isolation und bei Influenza A Viren die Angabe des Subtyps; Beispiel: A/Viktoria/3/75 (H3N2). Bei humanen Isolaten wird die Wirtsspezies nicht angegeben.

1.1.2 Aufbau und Genomorganisation des Influenzaviruspartikels

Influenza A und B Viren sind membranumhüllte Viren mit kugelförmiger bis pleomorpher Gestalt und haben einen Durchmesser von 80 bis 120 nm (Abb. 2A). Ihre acht segmentierten Nukleokapside werden bei Knospung aus der Wirtszelle von deren Membran umhüllt (Kates *et al.*, 1962). In der Membran befinden sich Homotetramere

aus Neuraminidasemolekülen, sowie Homotrimere, die aus HA-Proteinen bestehen. Diese viralen Glykoproteine vermitteln Rezeptorbindung und Fusion (HA) bzw. die Abspaltung endständiger N-Acetylneuraminsäuren (NA). Bei Influenza A Viren ist außerdem das M2-Protein in die Membran eingelagert, das als Protonenkanal fungiert (Pinto *et al.*, 1992; Sugrue und Hay, 1991). Das entsprechende Influenza B Virus-Membranprotein mit Ionenkanalaktivität ist das BM2-Protein, das wie auch das NB-Protein in die Hüllmembran inseriert ist (Betakova *et al.*, 1996; Odagiri *et al.*, 1999; Paterson *et al.*, 2003). Das Matrixprotein M1 kleidet die Innenseite der Hüllmembran aus und bindet gleichzeitig die viralen Ribonukleoproteinkomplexe (vRNP). Diese bestehen jeweils aus einem der acht RNA-Segmente, sind über die volle Länge mit Nukleoproteinen komplexiert und tragen den Polymerasekomplex (Compans *et al.*, 1972). Außerdem liegen im Virion einige Kopien des nukleären Exportproteins NS2/NEP vor (Yasuda *et al.*, 1993) (Abb. 2B). Das Nichtstrukturprotein 1 (NS1) wird nicht in die Influenzapartikel eingebaut, sondern erst in der infizierten Zelle gebildet.

Die genetische Information der Influenzaviren ist auf acht RNA-Segmenten mit einer Länge von 0,9 bis 2,4 Kilobasen (kb) kodiert. Das Gesamtgenom hat eine Länge von 13,6 kb (Influenza A Virus – Flu A) bzw. 14,6 kb (Influenza B Virus – Flu B). Das einzelsträngige RNA-Genom mit seiner negativen Orientierung dient als Vorlage zur Bildung positivsträngiger Boten-RNA (*messenger RNA* – mRNA). Die kodierenden Bereiche der viralen Segmente werden von konservierten nicht-kodierenden Bereichen flankiert, die als Erkennungsregion der viralen RNA-Polymerase dienen (Desseberger *et al.*, 1980; Flick *et al.*, 1996). Diese haben am 5'-Ende der RNA-Segmente eine Länge von 13 (Flu A) bzw. 11 (Flu B) Nukleotiden und am 3'-Ende eine Länge von 12 (Flu A und Flu B) Nukleotiden. Über komplementäre Bereiche kann es zur Basenpaarung zwischen dem 3'- und dem 5'-Ende des RNA-Segmentes kommen (Crescenzo-Chaigne *et al.*, 2008). Die dadurch ausgebildete Haarnadelschleife stabilisiert die Interaktion zwischen der Promotorregion und dem Polymerasekomplex und ist essentiell für die Synthese viraler RNA (vRNA) und mRNA.

Die RNA-Segmente der Influenzaviren werden mit abnehmender Nukleotidzahl durchnummeriert. Die Segmente 1, 4 und 5 kodieren jeweils für ein virales Protein (Flu A: PB2, HA und NP; Flu B: PB1, HA und NP). Segment 2 kodiert neben der Polymerase-Untereinheit PB1 bei Influenza A Viren in einem alternativen Leserahmen auch für das proapoptotische Protein PB1-F2 (Chen *et al.*, 2001). Segment 3 von Influenza A Viren kodiert für die PA-Untereinheit der Polymerase und das Protein PA-X,

das durch eine +1 Leserasterverschiebung des Ribosoms an der mRNA gebildet wird (Jagger *et al.*, 2012).

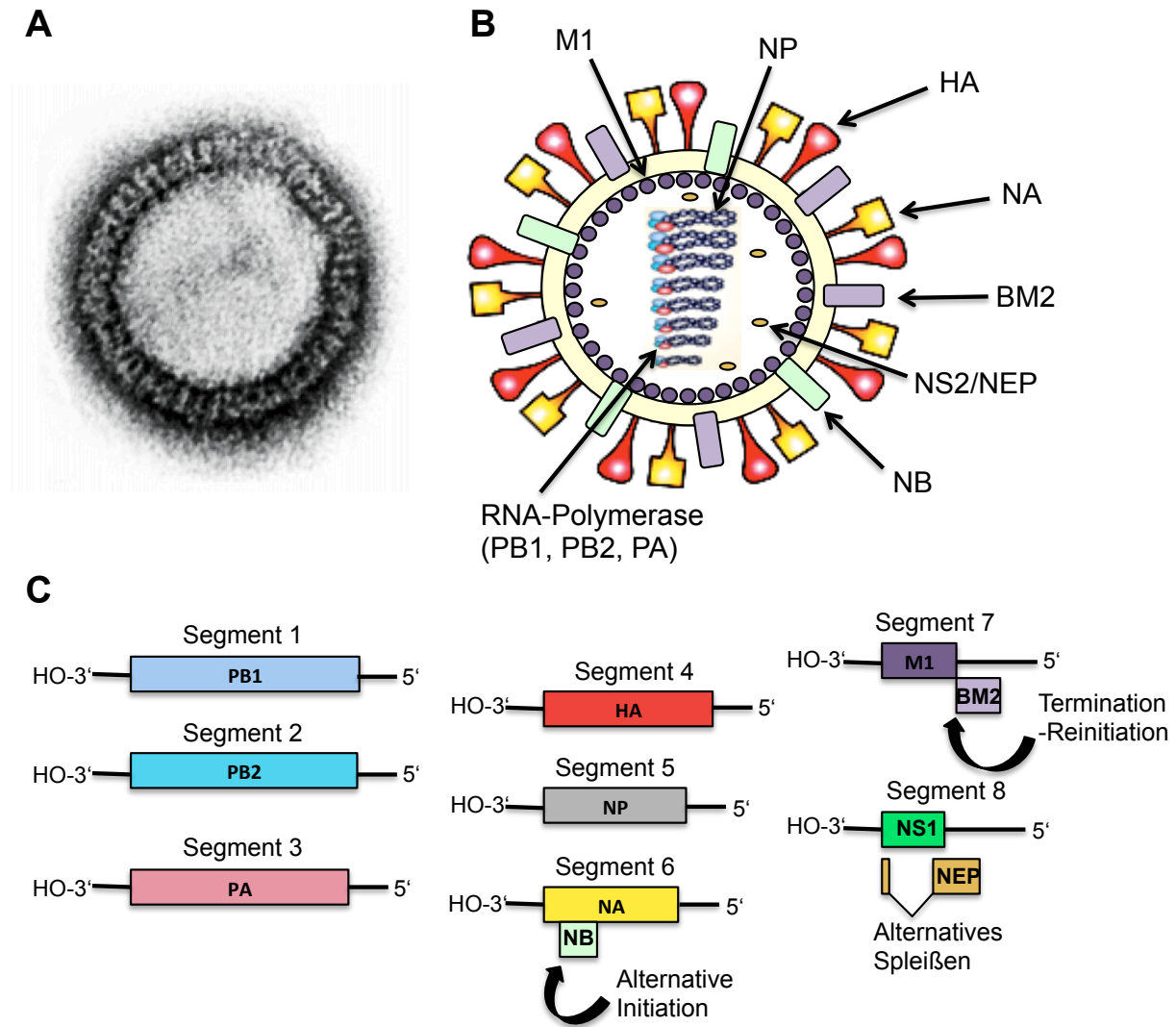


Abb. 2: Aufbau und Genomorganisation des Influenzavirus. A: Elektronenmikroskopische Aufnahme. Durchmesser ~ 100 nm. (Quelle: Knipe *et al.*, 2007) B: Schematische Darstellung eines Influenza B Virions (modifiziert nach Neumann *et al.*, 2009). C: Genomorganisation des Influenza B Virus.

Das sechste RNA-Segment kodiert für die Neuraminidase und bei Influenza B Viren außerdem für das NB-Protein (Shaw *et al.*, 1983). Die beiden kleinsten RNA-Segmente sind bei Influenza A und B Viren bicistronisch aufgebaut und kodieren für jeweils zwei Proteine. Segment 7 kodiert bei Influenza A Viren für die Proteine M1 und M2, wobei M2 von gespleißter mRNA translatiert wird. Influenza B Viren exprimieren vom siebten Segment neben dem M1- das BM2-Protein, dessen Transkription durch das Start/Stop-Pentanukleotid UAAUG initiiert wird. Dieses dient gleichzeitig als Terminationssequenz für die M1-Transkription (Horvath *et al.*, 1990). Das achte Segment kodiert bei beiden Subtypen für das NS1-Protein, das nur in der infi-

zierten Zelle vorliegt, sowie für das nukleäre Exportprotein NS2/NEP, das von gespleißter mRNA translatiert wird (Inglis und Brown, 1981; Lamb und Lai, 1980) (Abb. 2C). Die Segmentspezifitäten sowie die Funktion der kodierten Proteine sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Segmente	A/PR/8/34		B/Lee/40		Funktion
	vRNA (nt)	kodiertes Protein (AS)	vRNA (nt)	kodiertes Protein (AS)	
1	2341	PB2 (759)	2396	PB2 (769)	Untereinheit der viralen RNA-Polymerase, bindet mRNA-Caps
2	2341	PB1 (757) PB1-F2 (87)	2368	PB1 (752)	Katalytische Untereinheit der viralen RNA-Polymerase, Endonukleaseaktivität Mitochondriale Lokalisation; Induktion von Apoptose
3	2233	PA (716) PA-X (270)	2304	PA (726)	Untereinheit der viralen RNA-Polymerase, Endonukleaseaktivität Rolle in <i>host-cell shutoff</i> , Regulation der Expression von Wirtsgenen
4	1778	HA (566)	1882	HA (584)	Hämagglutinin, Typ I Membranprotein, Rezeptorbindung, Membranfusion, Induktion neutralisierender AK
5	1565	NP (498)	1841	NP (560)	Nukleoprotein, Enkapsidierung von vRNA und cRNA, über NLS Kernlokalisierung der RNPs
6	1413	NA (454)	1557	NA (466) NB (100)	Neuraminidase, Typ II Membranprotein Strukturprotein
7	1027	M1 (252) M2 (97)	1191	M1 (248) BM2 (109)	Matrixprotein, wichtig für Morphogenese Ionenkanal, Ansäuerung der Virionen, Schutz der HA-Konformation Ionenkanal
8	890	NS1 (230) NS2/NEP (121)	1096	NS1 (281) NS2/NEP (122)	Post-transkriptioneller Regulator und IFN-Antagonist, inhibiert PKR-Aktivierung Nukleärer Exportfaktor

Tab. 1: Eigenschaften der vRNA Segmente und viralen Proteine von Influenza A und B Virus (modifiziert nach Wolff und Snacken, 2003). Nukleotide (nt); Aminosäuren (AS).

1.1.3 Replikation

Influenzaviren sind für ihre Replikation auf den Metabolismus ihrer Wirtszellen angewiesen. Sie gelangen über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen, die durch Bindung der Hämagglutininmoleküle auf der Virusoberfläche an endständige N-Acetylneuraminsäuren zellulärer Rezeptoren eingeleitet wird (Skehel und Wiley, 2000).

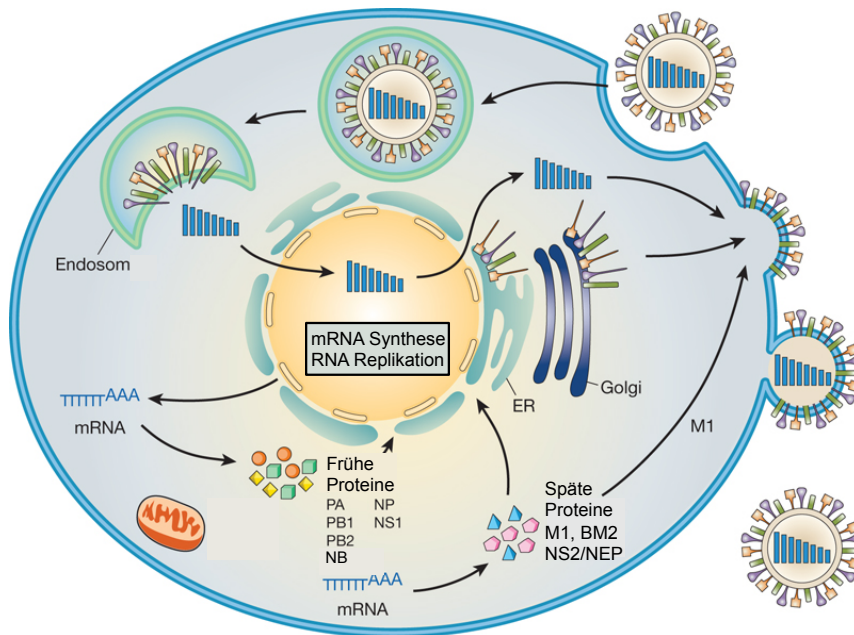


Abb. 3: Replikationszyklus von Influenza B Viren. Modifiziert nach Neumann *et al.*, 2009.

In den gebildeten Endosomen kommt es im weiteren Verlauf durch die Erniedrigung des pH-Wertes zur Konformationsänderung der HA-Proteine, sodass das hydrophobe Fusionspeptid der HA₂-Untereinheiten exponiert wird. Dieses kann in die Endosomenmembran eindringen und bewirkt dadurch die Fusion der Endosomen- und Virushüllmembran (Skehel und Wiley, 2000). Gleichzeitig kommt es über die M2-Ionenkanäle in der Membran zum Protoneneinstrom und zur Ansäuerung des Viruspartikels. Infolgedessen wird die Interaktion der Matrixproteine M1 mit den vRNPs destabilisiert und die vRNP-Partikel werden über die Fusionsporen in das Zytoplasma entlassen (Helenius, 1992; Abb. 3). Das BM2-Protein der Influenza B Viren ist ein strukturelles Homolog zum Influenza A M2-Protein und vermittelt vermutlich den gleichen Prozess (Betáková *et al.*, 2006). Allerdings kann die Funktion der BM2-Proteine durch das antivirale Therapeutikum Amantadin nicht gemindert werden (Modrow *et al.*, 2010). Bei Influenza A Viren bewirkt dieses Virostatikum durch die Blockade des Ionenkanals M2 die Inhibition der Virusreplikation (Hay, 1992).

Kernlokalisationsignale im Nukleoprotein und in den Polymeraseuntereinheiten sowie die Interaktion des NP mit zellulären Importin-Molekülen vermitteln den vRNP-Transport in den Zellkern (Cros *et al.*, 2005). Dort findet durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase die Transkription und Replikation des viralen Genoms statt. Bei der Primer-abhängigen Transkription bedient sich die virale Polymerase des sogenannten *cap-snatching*-Mechanismus. Dazu bindet die PB2-Untereinheit des Polymerasekomplexes die 5'-Methylguanosin-Cap-Strukturen neu synthetisierter zellulärer mRNAs. Die Endonukleasefunktion der PA-Untereinheit führt ungefähr 10-13 Nucleotide hinter der Cap-Struktur zur Abspaltung des 5'-Caps von der zellulären mRNA (Yuan *et al.*, 2009). Nach Anlagerung dieses zellulären Primers an das 3'-Ende der viralen RNA nutzt die PB1-Untereinheit dessen freie 3'-OH Gruppe zur Initiation der Transkription viraler RNA (Neumann *et al.*, 2004). Durch diesen Mechanismus der Transkriptionsinitiation wird die zelluläre Proteinsynthese unterbrochen und der Wirtsmetabolismus für die virale Proteinsynthese genutzt. Die PB1-Untereinheit verlängert die Nucleotidkette bis zu einer uridinreichen Sequenz am 5'-Ende der viralen RNA, die zur Polyadenylierung der viralen mRNA führt (Luo *et al.*, 1991). An zellulären Spleißosomen wird die mRNA für die M2- und NS2/NEP-Proteine gebildet. Nach dem Export der viralen mRNA ins Zytoplasma werden die Membranproteine am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) und die übrigen viralen Proteine an den freien Ribosomen translatiert. Die Kernlokalisationsignale von PB1, PB2, PA, NP, NS1 und M1 führen zu deren Transport in den Nucleus (Smith *et al.*, 1987).

Während der viralen Replikation wird die negativsträngige vRNA (-) nicht nur als Matrize zur Bildung positivsträngiger mRNA (+) für die Proteinsynthese genutzt, sondern auch zur Synthese komplementärer copyRNA (cRNA) (+), die wiederum als Vorlage für die Bildung neuer vRNA-Stränge (-) für die Nachkommenviren dient. Der vollständige Gegenstrang zur vRNA besitzt weder 5'-Cap noch eine 3'-poly(A)-Struktur und wird wie die virale RNA ohne einen Primer synthetisiert. Das Umschalten von Transkription auf Replikation wird vermutlich über die NP-Konzentration im Zellkern reguliert. Im Gegensatz zur mRNA werden neu synthetisierte cRNA und vRNA-Moleküle vollständig von Nucleoproteinen enkapsidiert und werden somit möglicherweise vor Degradation geschützt. Eine andere Erklärung ist die Stabilisierung des Polymerasekomplexes durch das NP, was die Ablösung der Polymerase an der uridinreichen Sequenz der RNA verhindert (Vreede *et al.*, 2004, Beaton und Krug, 1986). Zusammen mit den Polymerasekomplexen bilden die enkapsidierten vRNAs neue vRNPs

die im späten Infektionsverlauf durch Interaktion mit dem Matrixprotein M1 und dem nukleären Exportprotein NS2/NEP aus dem Zellkern transportiert werden (O'Neill *et al.*, 1998, Paragas *et al.*, 2001).

Die viralen Membranproteine werden vom rER über den Golgi-Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk zur Zellmembran transportiert. Dabei werden sie zu Tetrameren (NA) oder Trimeren (HA) zusammengelagert sowie mit komplexen und mannose-reichen Zuckerketten N-glykosyliert und palmitoyliert (Palese und Shaw, 2007; Abb. 3). Durch die Neuraminidase werden die endständigen Neuraminsäuren der komplexen Zucker entfernt, um eine Quervernetzung der Viruspartikel durch Bindung des HA-Proteins an diese Zuckerseitenketten zu verhindern (Samson *et al.*, 2013). Bei einigen hochpathogenen Viren der Subtypen H5 und H7 wird das HA-Protein bereits im Trans-Golgi-Netzwerk durch die Subtilisin-ähnliche Protease Furin an seiner multibasischen Spaltstelle in die Untereinheiten HA₁ und HA₂ gespalten. Beide Untereinheiten bleiben über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (Stieneke-Grober *et al.*, 1992). Diese proteolytische Spaltung des HA ist für die Initiation eines Replikationszyklus essentiell, da die strukturelle Umlagerung der HA₂-Untereinheit und damit die Exposition des Fusionspeptides in den angesäuerten Endosomen nur mit gespaltenem HA möglich ist (Klenk und Garten, 1994). Die HA-Proteine der übrigen Influenza A Virussubtypen und der Influenza B Viren besitzen eine monobasische Spaltstelle und können durch extrazelluläre Trypsin-ähnliche Proteasen (z. B. HAT und TMPRSS2) an der Zelloberfläche oder nach Freisetzung der Virionen gespalten werden (Kido *et al.*, 1999; Böttcher-Friebertshäuser *et al.*, 2010). In Zellkultur kann die Spaltung des HA-Proteins durch Zugabe von Trypsin induziert werden, so dass eine multizyklische Infektion stattfinden kann.

Befinden sich ausreichend virale Oberflächenproteine in der Zellmembran, kommt es durch Anlagerung der M1-vRNP-Komplexe zur Knospung der Virionen aus der Zelle (Abb. 3). Hierbei ist die Neuraminidase der Viren von Bedeutung, da sie endständige Neuraminsäuren auf der Zelloberfläche abspaltet. Dadurch verhindert sie die Bindung der HA-Proteine an die Sialinsäuren und ermöglicht die Freisetzung der Viruspartikel von der Zelloberfläche (Palese *et al.*, 1974).

1.1.4 Influenzaviren und Apoptose

Die Infektion mit Influenza A und B Viren führt zur Induktion von Apoptose und damit über komplexe Signaltransduktionswege zum programmierten Zelltod der Wirtszellen

(Hinshaw *et al.*, 1994). Lange Zeit wurde dieser „Selbstmord“ hauptsächlich als Abwehrmechanismus der infizierten Zellen betrachtet, um eine Ausbreitung der Viren zu verhindern. Durch die Expression antiapoptotischer Proteine können viele Viren diesen antiviralen Mechanismus umgehen. Influenzaviren können jedoch die proapoptischen Ereignisse in der Zelle auch nutzen, um ihre Replikationseffizienz zu steigern (Herold *et al.*, 2012).

Die Apoptose wird in zwei Phasen unterteilt: Initiations- und Effektorphase. In der Initiationsphase unterscheidet man den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg. Der extrinsische Signalweg wird durch Transmembranrezeptoren der TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*)-Proteinfamilie vermittelt und hauptsächlich durch die Liganden TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) und FasL (*Fas Ligand*) aktiviert. Dies führt in der Effektorphase über die Aktivierung von Caspasen zur Spaltung von Zielproteinen sowie Fragmentierung der DNA und schließlich zum Zelltod (Herold *et al.*, 2012). Die intrinsische Apoptose-Signaltransduktion wird nicht über Rezeptor-vermittelte Stimuli induziert, sondern durch die Bcl-2-Proteinfamilie reguliert. Diese steuert durch proapoptotische und antiapoptotische Signale die Permeabilität der Mitochondrienmembran. Durch proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie kommt es zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren – wie z. B. Cytochrom C – aus den Mitochondrien (Elmore, 2007). Die Bindung von Cytochrom C und dATP an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) ermöglicht die Interaktion mit Procaspase 9 und führt dadurch zur autokatalytischen Aktivierung der Caspase 9. Der entstandene Komplex wird Apoptosom genannt. Analog zur Initiator-Caspase 8 spaltet und aktiviert Caspase 9 eine weitere Gruppe von Cysteinproteasen, die Caspasen 3, 6 und 7 der Effektorphase. Dies führt – wie beim extrinsischen Signalweg – zur Auflösung zellulärer Strukturen und zum Zelltod (Thornberry und Lazebnik, 1998).

Influenzaviren haben – wie viele andere Viren auch – Proteinfunktionen entwickelt, um den Apoptose-Signalweg zu regulieren. Neben dem Virulenzfaktor PB1-F2 und dem Ionenkanal M2, exprimieren Influenza A Viren das Nichtstrukturprotein 1, um den Vorgang des programmierten Zelltods zu manipulieren.

Das PB1-F2-Protein hat bei der Replikation einiger Virusstämme (z. B. A/PR/8/34) eine proapoptotische Funktion. Durch Interaktion mit mitochondrialen Komponenten trägt es zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren bei (McAuley *et al.*, 2010). Außerdem wird angenommen,

dass PB1-F2 durch Rekrutierung von Leukozyten, die z. B. den Liganden TRAIL sekretieren, den extrinsischen Apoptoseweg stimuliert (Herold *et al.*, 2008).

Für das M2-Protein von Influenza A Viren wurde eine Inhibition der Makroautophagie beschrieben. Autophagozytose beschreibt den Abbau von zelleigenen Bestandteilen und kann das Absterben von Zellen verursachen. Außerdem spielt sie durch Abbau von Viren, Bakterien und Fremdeiweißen eine Rolle bei der Immunantwort. Das M2-Protein verhindert vermutlich die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen und reduziert damit eine Induktion der Apoptose (Gannage *et al.*, 2009).

Für das NS1-Protein von Influenza A Viren wurden sowohl antiapoptotische als auch proapoptotische Mechanismen beschrieben (Herold *et al.*, 2012; Abb. 4). Ein attenuiertes delta-NS1 Virus führte im Vergleich zum Wildtypvirus zu verstärkter Apoptoseinduktion in infizierten Zellen. Da in Interferon-defizienten Zellen die Unterschiede der Apoptoseinduktion von Wildtyp- und delta-NS1-Virus weniger stark ausgeprägt waren, wurden die antiapoptotischen Funktionen des NS1-Proteins durch dessen IFN-antagonistischen Eigenschaften begründet (Zhirnov *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen zeigten Schultz-Cherry und Kollegen, dass die transiente Expression des NS1-Proteins zu einer schnellen Apoptoseinduktion führt (Schultz-Cherry *et al.*, 2001). Demnach scheinen andere virale Faktoren, sowie die fortschreitende Virusreplikation die Rolle des NS1-Proteins bei der Apoptoseinduktion zu bestimmen (Herold *et al.*, 2012).

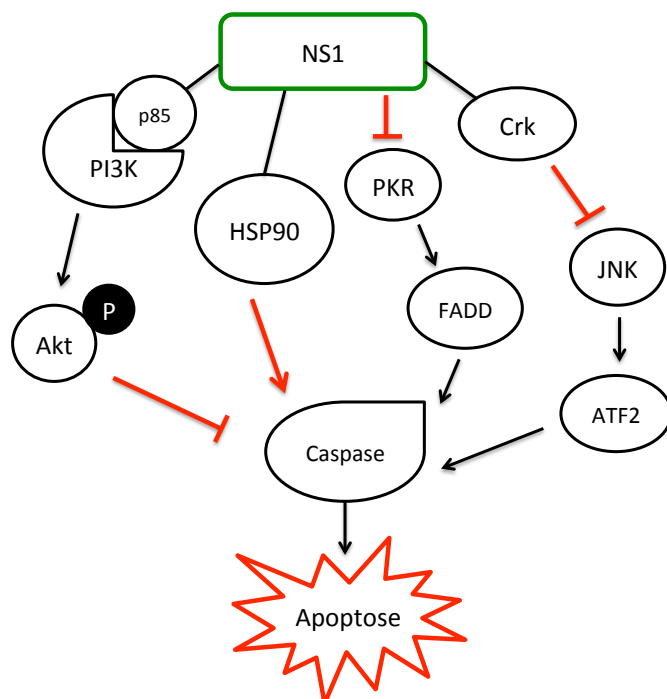


Abb. 4: Rolle des viralen Nichtstrukturproteins 1 (NS1) von Influenza A Viren in der Apoptose-regulation infizierter Zellen. Auswirkungen der NS1-Interaktion bzw. die PKR-Inhibition sind durch rote Pfeile oder Balken dargestellt. Details siehe Text.

Ein Beispiel für die antiapoptotische Wirkung des NS1-Proteins ist die Inhibition der Proteinkinase R (PKR). Aktivierte PKR induziert die FADD- (*Fas-Associated protein with Death Domain*) vermittelte Caspase-8-Aktivierung (Abb. 4), die wiederum über zwei Signalwege die Apoptose in infizierten Zellen induziert. Zum einen wird durch proteolytische Spaltung die Effektor-Caspase-3 aktiviert und zum anderen wird über Induktion der Bid/Bax-Interaktion (Proteine der Bcl-2-Familie) die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien und damit die Bildung des Apoptosoms (Apaf-1/Cytochrom C/Caspase-9) ausgelöst. Demzufolge führt die Inhibition der PKR durch das NS1-Protein zur Reduktion des programmierten Zelltods der infizierten Zellen (García *et al.*, 2007).

Eine weitere antiapoptotische Funktion, die auf das NS1-Protein von Influenza A Viren beschränkt ist, führt zur Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges. Die direkte Bindung des A/NS1-Proteins über sein konserviertes 89-YxxxM-93-SH2-Bindemotiv an die Untereinheit p85 der PI3-Kinase führt in der späten Infektionsphase zur Phosphorylierung des Effektorproteins Akt. Dies wiederum führt zur Inhibition von proapoptotischen Faktoren, wie z. B. Caspase-3 und -9 (Ehrhardt und Ludwig, 2009; Abb. 4) und steigert die virale Vermehrung (Hale *et al.*, 2006; Ehrhardt *et al.*, 2007b; Shin *et al.*, 2007). Das NS1-Protein von Influenza B Viren besitzt hingegen kein erkennbares SH2-Bindemotiv, interagiert folglich nicht mit der p85-Untereinheit der PI3-Kinase und ist daher auch nicht in der Lage die PI3K/Akt-Signaltransduktion zu induzieren (Ehrhardt *et al.*, 2007). Influenza B Viren benötigen lediglich früh im Infektionsverlauf (bis 30 min nach der Infektion) die PI3K-Aktivität und sind offenbar auf diesen antiapoptotischen Mechanismus nicht angewiesen.

Neben dem genannten SH2-Bindemotiv besitzt das NS1-Protein vieler aviärer Influenza A Viren, sowie des Virus der „Spanische Grippe“ von 1918, ein SH3-Bindemotiv mit der Konsensussequenz 212-PPLPPK-217. Prolinreiche SH3-Bindemotive interagieren mit SH3-Proteindomänen, die in Vertebraten - mit allein 409 Kopien im humanen Proteom - die häufigsten Prolin-Erkennungsdomänen sind (Li, 2005). In einem breiten Screening potenzieller SH3-Interaktionspartner konnte eine Interaktion des A/NS1-Proteins mit der N-terminalen SH3-Domäne des Adaptorproteins Crk (*CT10 Regulator of Kinase*) gezeigt werden (Heikkinen *et al.*, 2008). Diese Adaptorproteine binden zahlreiche zelluläre Proteine und sind durch Bildung von Proteinkomplexen an der Regulation vieler zellulärer Signalwege beteiligt (Feller, 2001). Die Crk-A/NS1-Interaktion bewirkt die Reprimierung des JNK/ATF2-

Signalweges (Hrncius *et al.*, 2010). Dadurch wird die Expression proapoptotischer Gene, wie TNF- α oder FasL, sowie die Interferenz von JNK mit antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen in den Mitochondrien gehemmt (Dhanasekaran und Reddy, 2008; Abb. 4). Die Crk-A/NS1-Interaktion wurde ausschließlich in Stämmen nachgewiesen, die ein SH3-Bindemotiv im NS1-Protein aufweisen (Heikkinen *et al.*, 2008). Auch für das B/NS1-Protein wurde in der AG Wolff eine Interaktion mit dem Crk-Adaptorprotein beobachtet (Sadewasser, Krämer, Wolff, nicht publiziert). Eine Zielstellung der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der biologischen Funktion dieser Crk-B/NS1-Interaktion in infizierten Zellen (Kapitel 3.3 und 4.2).

Trotz nachgewiesener antiapoptotischer Funktionen in infizierten Zellen, führt eine transiente Expression des A/NS1-Proteins in Zellkultur zur Caspase-3 und -9-Aktivierung und zur Apoptose der Zellen (Zhang *et al.*, 2011; Schultz-Cherry *et al.*, 2001). Eine mögliche Ursache dafür ist die Interaktion von A/NS1 mit dem Chaperon HSP90 (*Heat Shock Protein 90*), die in einer verminderten HSP90-Apaf-1 und einer erhöhten Apaf-1-Cytochrom C-Interaktion resultiert. Die verstärkte Bildung des Apoptosoms in NS1-exprimierenden Zellen könnte die Induktion des programmierten Zelltods erklären (Zhang *et al.*, 2011; Abb. 4).

Apoptotische zelluläre Funktionen wirken nicht ausschließlich antiviral, sondern können die Virusvermehrung in begrenztem Umfang auch stimulieren. So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2, sowie die Behandlung infizierter Zellen mit Caspase-Inhibitoren zu einer verringerten Virusvermehrung führt (Olsen *et al.*, 1996; Wurzer *et al.*, 2004). Mechanistisch wird diese Blockade der Virusvermehrung durch Retention der gebildeten vRNP-Komplexe im Zellkern erklärt (Wurzer *et al.*, 2003). Neben dem Crm 1-abhängigen aktiven Transport scheinen die Viren einen Caspase-regulierten vRNP-Export zu nutzen, der möglicherweise durch Erweiterung der Kernporen eine passive Diffusion der vRNP-Komplexe ermöglicht (Elton *et al.*, 2001; Herold *et al.*, 2012; Faleiro und Lazebnik, 2000). Dieser Mechanismus befähigt die Influenzaviren trotz erhöhter Caspase-Aktivität, welche unter anderem die Spaltung von zellulären Proteinexportfaktoren zur Folge hat (Faleiro und Lazebnik, 2000), virale RNPs in der späten Infektionsphase aus dem Zellkern zu transportieren.

Man beobachtet in infizierten Zellen sequentiell anti- und proapoptotische Effekte in Abhängigkeit von der Infektionsphase. Während Influenzaviren früh in der Infektion antiapoptotische Signaltransduktion induzieren, scheint in der späten Phase der In-

fektion gezielt Apoptose induziert zu werden (Zhirnov und Klenk, 2007). Die Reduktion der Apoptose in der frühen Infektionsphase ermöglicht den Viren die Proteinsynthese und Genomreplikation, während in der späten Phase die Apoptose-Induktion den Kernexport der vRNP und die Assemblierung der Nachkommenviren unterstützt. Wird die Zelle schließlich zerstört, sind ausreichend Nachkommenviren produziert, um weitere Zellen zu infizieren (Herold *et al.*, 2012).

Das NS1-Protein ist ein multifunktionelles Protein, das wie zuvor beschrieben auch in die zelluläre Apoptose eingreift. Im Folgenden sollen weitere Funktionen dieses Nichtstrukturproteins näher beschrieben werden.

1.1.5 Struktur und Funktion des Nichtstrukturproteins 1 von Influenza A und B Viren

Das Nichtstrukturprotein 1 von Influenza A und B Viren ist kein Bestandteil des Viruspartikels (Lamb und Krug, 2001), sondern wird früh im Infektionsverlauf als multifunktionaler Virulenzfaktor exprimiert. Für die virale Replikation ist das NS1-Protein essentiell, da rekombinante Influenza A und B Viren mit Deletionen im NS1-Gen nur zu einer stark attenuierten Vermehrung fähig sind (García-Sastre *et al.*, 1998; Dauber *et al.*, 2004). Durch die Interaktion mit zahlreichen viralen und zellulären Faktoren unterstützt es in der infizierten Zelle die virale Replikation und antagonisiert die zelluläre Immunabwehr. Die NS1-Proteine von Influenza A und B Viren haben nur eine geringe Sequenzidentität von weniger als 25 % und zeigen daher neben einigen gemeinsamen Eigenschaften auch funktionelle Unterschiede. Aufgrund der Relevanz des NS1-Proteins für die virale Vermehrung ist es Gegenstand intensiver Forschung, wobei die molekularen Funktionen des B/NS1-Proteins bisher weit weniger bekannt sind, als die des A/NS1-Proteins. Den NS1-Proteinen beider Influenzavirustypen ist eine N-terminale RNA-Bindungsdomäne gemeinsam, die im Bereich der Aminosäuren 1 bis 73 des A/NS1-Proteins (Qian *et al.*, 1994) bzw. 1 bis 93 des B/NS1-Proteins (Wang und Krug, 1996) lokalisiert ist. Diese Region überschneidet sich weitgehend mit der Dimerisierungsdomäne beider Subtypen. In der infizierten Zelle liegen die NS1-Proteine als Homodimere vor und können vermutlich nur in dieser Konformation an doppelsträngige RNA (dsRNA) binden (Nemeroff *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999; Abb. 5). Die Bindung doppelsträngiger RNA ist für die Interaktion des B/NS1-Proteins

mit der Proteinkinase R (PKR) und deren Inhibition essentiell (Dauber *et al.*, 2006; Dauber *et al.*, 2009). Für das A/NS1-Protein wurden in einem Modell zur PKR-Antagonisierung die Aminosäuren 123 bis 127 außerhalb der RNA-Binderegion als essentiell für die PKR-Bindung und –Inhibition beschrieben (Min *et al.*, 2007).

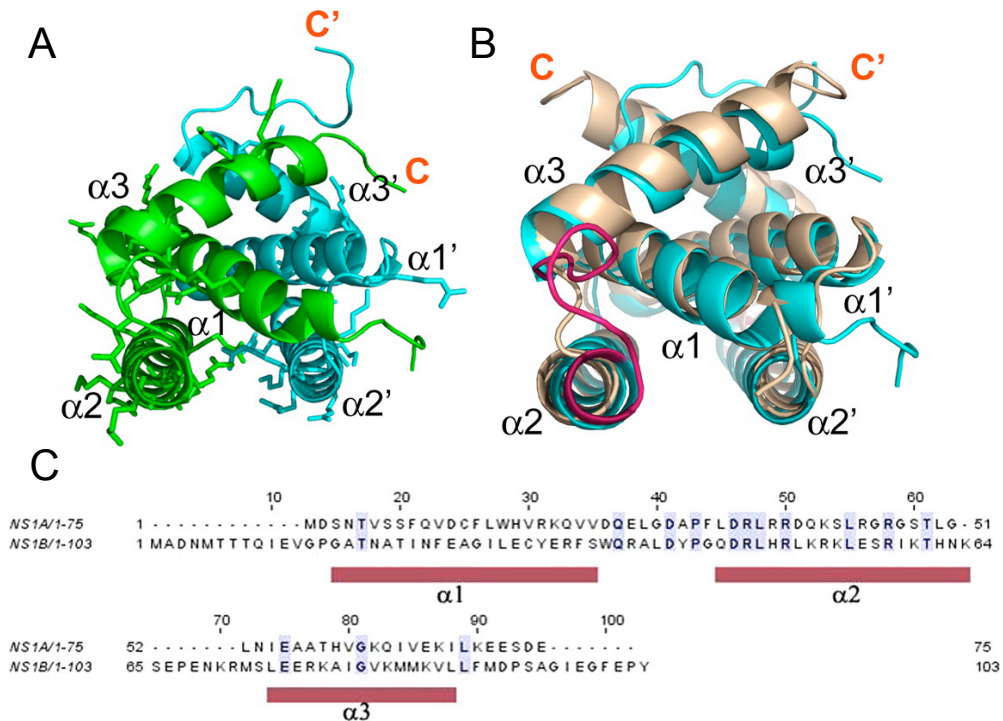


Abb. 5: Kristallstruktur der N-terminalen Domäne 1-103 von B/NS1 (Yin *et al.*, 2007). A: Darstellung der Rückgratstruktur eines N-terminalen B/NS1 Dimers mit Angabe der Arg- und Lys-Seitenketten. B: Überlagerung der N-terminalen B/NS1 Dimerstruktur (blau) mit der N-terminalen A/NS1 Struktur (AS 1-73) (beige). C: Sequenzvergleich der N-terminalen B/NS1 und A/NS1 Sequenz basierend auf der Proteinstruktur. Identische Aminosäuren sind gekennzeichnet und die Lage der drei α -Helices ist angedeutet.

Die Serin-Threonin-Kinase PKR ist ein durch Interferon-induziertes Enzym, das die durch virale Replikation gebildeten doppelsträngigen bzw. strukturierte einzelsträngige RNA-Moleküle bindet. Dies führt zur Dimerisierung und *trans*-Autophosphorylierung der PKR (Dauber *et al.*, 2009). Aktivierte PKR phosphoryliert anschließend verschiedene Effektorproteine, wie z. B. den Translationsinitiationsfaktor eIF2 α . Das durch Phosphorylierung inaktivierte eIF2 α -Protein inhibiert die zelluläre Translationsmaschinerie und somit auch die davon abhängige virale Replikation (Samuel, 1988). Aktivierte PKR induziert außerdem die FADD-vermittelte Caspase-8-Aktivierung, was wiederum zur Apoptoseinduktion der infizierten Zellen führt (García *et al.*, 2007; Kapitel 1.1.4).

Eine essentielle Funktion des NS1-Proteins ist die Antagonisierung des zellulären Typ-I-Interferonsystems. Das Typ-I-Interferonsystem ist eine wichtige Komponente

des angeborenen Abwehrsystems in Vertebratenzellen gegen Virusinfektionen. Ihm werden 14 Gene für Interferon- α (IFN α)-Isoformen sowie ein IFN β -Genlokus zugeordnet (Pestka, 2007). Die Etablierung eines revers-genetischen Systems für Influenza B Viren ermöglichte die Generierung einer Influenza B/delta NS1-Mutante mit einer Deletion des NS1-Gens. Diese Mutante ist nicht mehr in der Lage die Induktion der IFN α/β -Gene zu inhibieren. Die Fähigkeit des B/NS1-Proteins zur direkten Repression der IFN β -Sekretion wurde durch Reporterstudien gezeigt (Dauber *et al.*, 2004). Sowohl die RNA-Bindungsdomäne (Aminosäuren 1-93) als auch der C-terminale Bereich des Proteins (Aminosäuren 94-281) sind unabhängig voneinander in der Lage die Translokation des Transkriptionsfaktors IRF3 (*Interferon Regulatory Factor 3*) in den Kern und die IFN-Induktion zu reprimieren (Donelan *et al.*, 2004; Abb. 6). Durch die Transkriptionsfaktoren IRF3, AP1 und NF κ B wird die Transkription des IFN β -Gens reguliert (Wathelet *et al.*, 1998). Auch das A/NS1-Protein reprimiert die Aktivierung von IRF3 und die IFN β -Sekretion (Ludwig *et al.*, 2002).

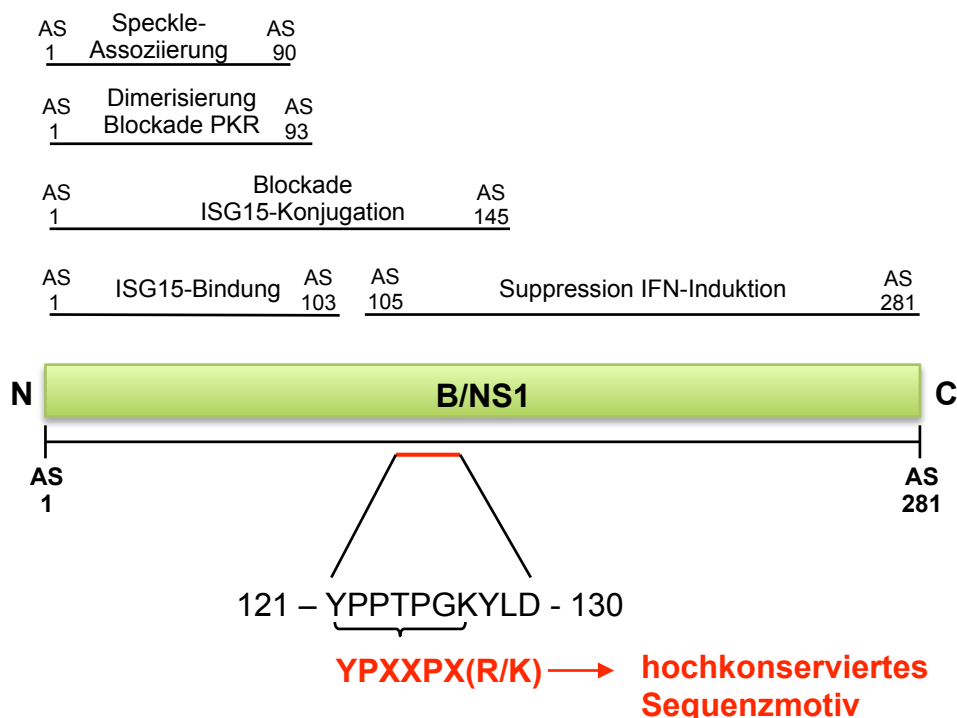


Abb. 6: Schematische Darstellung des B/NS1-Proteins mit Lokalisation wichtiger funktioneller Domänen in der Aminosäuresequenz sowie des in dieser Arbeit untersuchten hochkonservierten Sequenzmotivs. Der rot markierte Bereich deutet die Lokalisation des hochkonservierten Motivs an, welches in der unteren Bildhälfte als Aminosäuresequenz dargestellt ist.

Nach IFN-Expression kommt es durch Induktion des JAK/STAT-Signalweges zur Transkription von über 100 IFN-stimulierten Genen (ISG) (Borden und Williams, 2011). Dies führt in der infizierten Zelle, sowie den umliegenden Zellen zur Etablie-

rung eines antiviralen Status (Brierley und Fish, 2002). Eines der IFN-stimulierten Gene führt zur Expression des Ubiquitin-ähnlichen Proteins ISG15 (*Interferon Stimulated Gene 15*), das eine zentrale Rolle bei der antiviralen Immunantwort der Wirtszelle spielt (Lenschow, 2010). ISG15 wird über seinen C-terminalen Glycinrest an mehr als 300 Zielproteine verknüpft (Durfee und Huibregtse, 2010). Eine spezifische Eigenschaft des B/NS1-Proteins ist die Interaktion mit ISG15 über die Aminosäuren 1-103, sowie die Inhibition der ISG15-Konjugation an seine Zielproteine. Hierfür sind die Aminosäuren 1-145 des B/NS1-Proteins verantwortlich (Yuan und Krug, 2001; Abb. 6).

Die intrazelluläre Lokalisation des NS1-Proteins verändert sich im Laufe der Infektion. Früh im Infektionszyklus findet man immunantagonisierende Aktivitäten im Zytoplasma und eine nukleäre Translokation des Proteins (Norton *et al.*, 1987). Diese Translokation des B/NS1-Proteins wird durch die Aminosäuren 46-57 vermittelt (Schneider *et al.*, 2009). Die N-terminalen 90 Aminosäuren sind für die Kolokalisation des B/NS1-Proteins mit dem Spleißfaktor SC35 in sogenannten nukleäre Speckledomänen und deren Abrundung verantwortlich (Abb. 6). In Speckledomänen findet man eine hohe Konzentration an snRNPs (*spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins*). Sie spielen eine spezifische Rolle bei der Reifung zellulärer mRNAs (Carmo-Fonseca *et al.*, 1991; Spector *et al.*, 1991). Ein Fehlen des Speckle-Lokalisationssignals im B/NS1-Protein führt zu verminderter Replikationsfähigkeit der entsprechenden Virusmutanten (Schneider *et al.*, 2009). Im weiteren Verlauf der Virusinfektion relokalisiert das NS1-Protein ins Zytoplasma. Dort antagonisiert es die Aktivierung zytoplasmatischer Sensorproteine für virale RNA (z. B. PKR und RIGI) (Schneider *et al.*, 2009; Mibayashi *et al.*, 2007; Dauber, Voss und Wolff, unveröffentlichte Ergebnisse).

Für das A/NS1-Protein des A/Udorn/72 (H3N2)-Influenzavirus wurde neben der zytoplasmatischen und nukleären Verteilung auch eine Kolokalisation mit nukleolären Proteinen (wie z.B. Nukleolin) im Nukleolus beschrieben (Melén *et al.*, 2012). Außerdem konnte ein Einfluss des A/NS1-Proteins auf die Prozessierung zellulärer mRNAs – wie prä-mRNA-Spleißen und Polyadenylierung – gezeigt werden. Durch Bindung seiner C-terminalen Effektor-domäne an das Poly(A)-bindende Protein II (PABII), NS1-BP, Rael, die 30 kDa Untereinheit des Spaltungs- und Polyadenylierungsspezifitätsfaktor CPSF (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*), sowie an den Hauptexportrezeptor zellulärer mRNAs NXF1/TAP greift das A/NS1-Protein in die Reifung

zellulärer RNAs ein (Chen *et al.*, 1999; Fortes *et al.*, 1994; Garaigorta und Ortin, 2007; Lu *et al.*, 1994; Satterly *et al.*, 2007; Wolff *et al.*, 1998).

1.2 Das zelluläre Chaperon HSP90

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das zelluläre Chaperon HSP90 (*Heat Shock Protein 90 kDa*) als Bindungspartner bestimmter B/NS1-Proteinvarianten identifiziert. Da die Proteine der HSP90-Chaperon-Familie zudem für die Replikation vieler verschiedener DNA- und RNA-Viren von Bedeutung sind (Geller *et al.*, 2012), werden deren Eigenschaften in diesem Kapitel näher dargestellt.

HSP90 bezeichnet eine Proteinfamilie von evolutionär hochkonservierten molekularen Chaperonen, die in eukaryotischen Zellen ein bis zwei Prozent des Proteingehaltes ausmachen. Sie sind für die Viabilität von Zellen essentiell und ermöglichen ihnen zellulären Stress zu bestehen. In Säugerzellen gibt es neben dem HSP90-Homolog Grp94 im endoplasmatischen Retikulum und der mitochondrialen Variante TRAP1, zwei zytoplasmatische HSP90-Isoformen: das stress-induzierte HSP90 α und das konstitutiv exprimierte HSP90 β (Chen *et al.*, 2005). HSP90-Monomere zeigen folgende Domänenorganisation: eine hydrophobe aminoterminal ATPase-Domäne, eine azidische Mitteldomäne, sowie eine carboxyterminale Dimerisierungsdomäne, über die homodimere Komplexe gebildet werden. HSP90 α und HSP90 β unterstützen die ATP-abhängige Proteinfaltung, -reifung, -lokalisierung, -aktivität, die Komplexbildung, sowie die Fluktuation ihrer Substrate. Die HSP90-Funktion wird durch eine Vielzahl von Ko-Chaperonen reguliert. HSP90 interagiert nicht direkt mit neu synthetisierten Proteinen, sondern erhält seine Substrate über andere Chaperonsysteme (z. B. HSP70). HSP90-Proteine erkennen ihre Substrate weniger über eine bestimmte Aminosäuresequenz als vielmehr durch metastabile Strukturelemente. Bei zellulärem Stress, beispielsweise bei erhöhten Temperaturen, stabilisiert HSP90 die labile Konformation von vielen – zumeist Zellzyklus-Proteinen. Veränderte Proteine mit wenigen Aminosäuresubstitutionen sind daher viel abhängiger von HSP90 als die entsprechenden unmodifizierten Proteine (Blagosklonny *et al.*, 1996).

Die Replikation vieler verschiedener DNA und RNA-Viren ist abhängig vom zellulären Wirtsfaktor HSP90 (Geller *et al.*, 2012; Tab. 2). Durch die limitierende Größe des viralen Genoms sind viele virale Proteine multifunktionell, damit strukturell sehr komplex und abhängig von zellulären Chaperonfunktionen. Durch die hohe Mutationsrate von RNA-Viren werden in infizierten Zellen viele verschiedene Proteinvarianten ge-

bildet, die in ihren Struktur- und Faltungseigenschaften verändert sind. Diese sind stark abhängig von Chaperonen, um ihre Aktivität aufrechtzuerhalten. Chaperone puffern somit die schädliche Wirkung der Mutationen und erleichtern virale Adaptationen an antivirale Bedingungen in der Wirtszelle.

Virusfamilie	Virus	Protein	HSP90-abhängiger Prozess	Ko-Faktor
Herpes	HSV1/2	UL30	Polymerase-Lokalisierung	Hsp70, BAG3
	VZV	ORF29F	Lokalisierung von ORF29	Hsp70, BAG3
	HCMV	-	Expression von IE2	PI3K
	EBV	KH,	Apoptoseprävention, Zellproliferation	-
	KSHV	KI,v-FLIP	Apoptoseprävention	Hsp40, IKK, Cdc37
Polyoma	SV40	LT	Stabilisierung des LT-Proteins	-
Pox	Vaccinia	4a Core	Capsidassemblierung, Genexpression	Hsp70
Reo	Reo	σ 1	C' Trimerisierung von σ 1	Hsp70, p23
	Rota	NSP3	NSP3-Dimerisierung	-
Birna	IBDV	VP2	Virusinternalisierung	-
Picornia	Polio	P1	P1-Spaltung in VP1, VP2 und VP3	p23
	Rhino	P1	P1-Spaltung in VP1, VP2 und VP3	p23
	Coxsackie	P1	P1-Spaltung in VP1, VP2 und VP3	p23
Flavi	HCV	NS3	Spaltung an NS2/3, NS3-Funktion	-
		NS5A	Bildung des Replikationskomplexes	FKBP8, hB-ind1
	DENV	Rezeptor	Virusinternalisierung	Hsp70/GRP78
Arena	LCMV	NP	Antigen-Kreuzpräsentation	-
Noda	FHV	Protein A	Bildung des Replikationskomplexes	-
Hepe	HEV	Capsid	Intrazellulärer Transfer	-
Rhabdo	VSV	L-Protein	Proteinstabilisierung	-
Paramyxo	HPIV2/3	L-Protein	Proteinstabilisierung	-
	SV5/41	L-Protein	Proteinstabilisierung	-
	Masern	-	Verstärkte onkolytische Aktivität	-
	Sendai	-	Aktivierung der angeborenen Immunität	TBK1
Bunya	La Crosse	L-Protein	Proteinstabilisierung	-
Orthomyxo	Flu A	PB1,	Nucleare Lokalisierung, vRNP-	-
		PB2	Komplex-bildung, RNA-Synthese	
Filo	Ebola	-	Virusvermehrung	-
Retro	HTLV1	Tat	Transkription	-
	HIV1	Tat	Transkription, Zellviabilität	-
Hepadna	DHBV,	P-Protein	Reverse Transkriptase Priming	p23, Hsp40, Hsc70, Cdc37
	HBV			p23, Hsp40, Hsp70, Hop

Tab. 2: Zusammenfassung der bisher bekannten HSP90-abhängigen Viren und Virusproteine. Modifiziert nach Geller *et al.*, 2012.

Da Chaperone viele zelluläre Funktionen wie Signaltransduktion, Zellzyklusprogression und Apoptose regulieren, kommt es hier bei einigen Viren zur Manipulation der Wirtszellaktivität (Wen *et al.*, 2010).

Die zelluläre Proteinkinase R (PKR), die eine wichtige Rolle in der Wirtsabwehr von Influenzaviren spielt (siehe Kapitel 1.1.5), wird u. a. durch HSP90-Bindung reguliert. Im inaktiven Zustand bindet PKR den Chaperonkomplex. Doppelsträngige RNA, sowie der HSP90-Inhibitor Geldanamycin (GA) führen zur Dissoziation von HSP90 und PKR und zur Kinaseaktivierung *in vitro* und *in vivo* (Donzé *et al.*, 2001; Abb. 7A).

Auch der PI3K/Akt-Signalweg, der während der Influenza A Virusinfektion aktiviert wird (siehe Kapitel 1.1.4), wird durch HSP90-Bindung moduliert. Eine Inhibition der Akt-HSP90-Bindung führt zur Dephosphorylierung und Inaktivierung der Akt-Kinase, was die Sensitivität der Zellen für Apoptose-induzierende Stimuli steigert (Sato *et al.*, 2000; Abb. 7B).

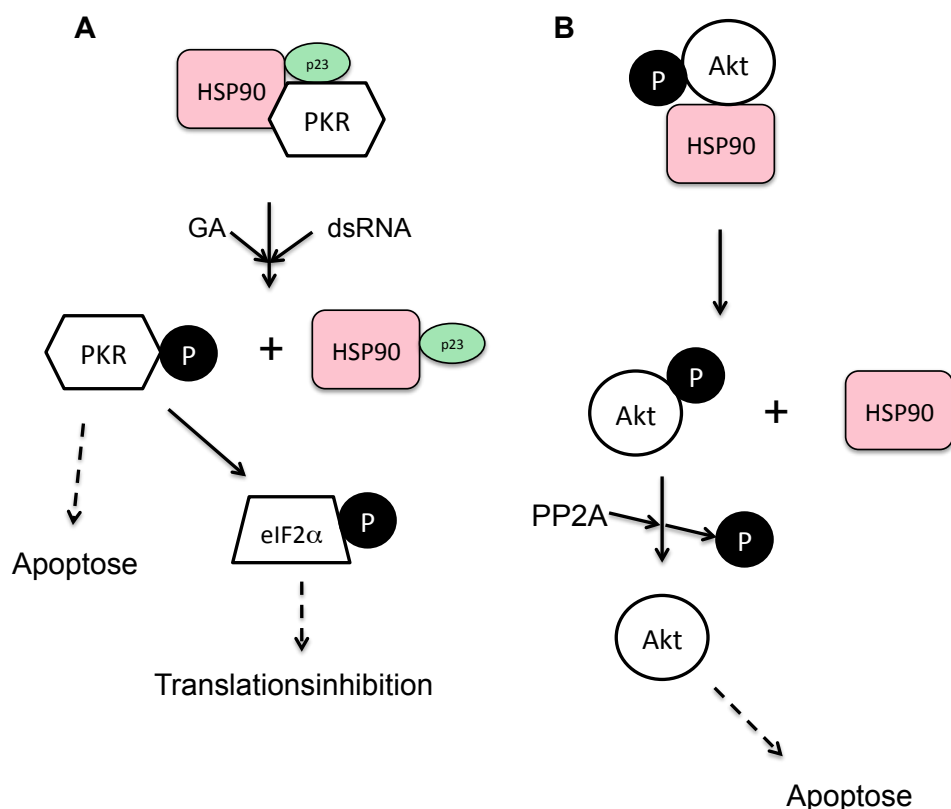


Abb. 7: Zelluläre HSP90-Funktionen. A: Regulation der PKR-Aktivität: HSP90 bindet mithilfe des Kofaktors p23 an unphosphorylierte PKR. Aktivierung von PKR durch dsRNA oder den HSP90-Inhibitor Geldanamycin führt zur Freisetzung von HSP90 aus dem Proteinkomplex (Donzé *et al.*, 2001). B: Stabilisierung der Akt-Phosphorylierung durch HSP90 verhindert Apoptose-Induktion der Zelle. Die Inhibition der Akt-HSP90-Bindung führt zur Dephosphorylierung von Akt durch die Phosphatase PP2A und zu gesteigerter Apoptose (Sato *et al.*, 2000).

Auch für die Influenza A Virus-Polymerase wurde eine HSP90-Abhängigkeit gezeigt. HSP90 ist mit den PB1- und PB2-Untereinheiten in infizierten Zellen assoziiert und relokalisiert in den Zellkern, wo es die virale RNA-Synthese unterstützt (Momose *et al.*, 2002; Naito *et al.*, 2007). HSP90-Inhibition durch Geldanamycin führt in infizierten Zellen zu verzögerter Synthese von viraler mRNA, cRNA und vRNA. Außerdem konnte gezeigt werden, dass GA die Degradierung von PB1 und PB2 verstärkt, dadurch die Bildung des vollständigen Polymerase-Komplexes reduziert und letztlich die virale Vermehrung verzögert (Chase *et al.*, 2008; Abb. 8).

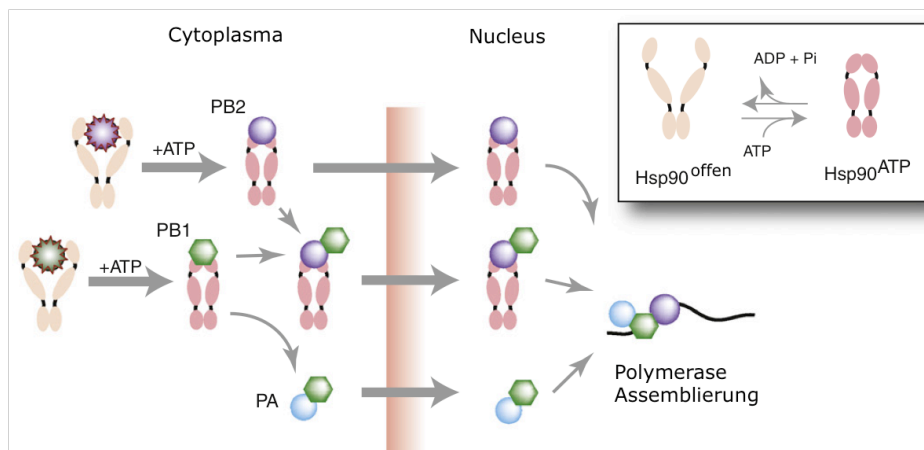


Abb. 8: HSP90 erleichtert die Polymerase-Assemblierung von Influenza A Viren. Neu synthetisiertes PB2 interagiert mit HSP90 im Cytoplasma und wird in den Nucleus transportiert. PB1 wird zusammen mit HSP90-PB2-Komplex ebenfalls in den Kern transportiert. Dort kommt es zur Bildung des trimeren Polymerasekomplexes. Box: HSP90-Konformationen werden durch ATPase-Zyklus reguliert. (Abb. modifiziert nach Geller *et al.*, 2012).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Der multifunktionelle Virulenzfaktor B/NS1 spielt für den Verlauf der Influenzavirusinfektion eine entscheidende Rolle. Rekombinante Influenza B Viren mit Deletionen im NS1-Gen sind in ihrer Vermehrungsfähigkeit stark attenuiert und lösen in den infizierten Zellen verstärkte angeborene antivirale Abwehrreaktionen aus (Dauber *et al.*, 2004). Für das A/NS1-Protein wurden bislang viele zelluläre Interaktionspartner und molekulare Mechanismen beschrieben. Über die Funktionsweise des B/NS1-Proteins, das weniger als 25 % Sequenzidentität zum A/NS1-Protein aufweist, ist hingegen weniger bekannt.

Durch die fehlende Korrekturlese-Aktivität der Influenzavirus RNA-Polymerase werden in den infizierten Zellen ständig neue Virusvarianten gebildet. Dies ermöglicht die optimale Anpassung des Virus an veränderte Bedingungen in den Wirtszellen. Pro-

teinbereiche, die trotz der hohen Mutationsrate in den verschiedenen Virusstämmen unverändert sind, haben für die Viren vermutlich wichtige strukturelle und/oder funktionelle Bedeutung. Die *in silico*-Identifikation des in über 300 Influenza B Virusstämmen konservierten NS1-Sequenzmotivs 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127 mit Homologie zum Klasse II-SH3-Bindemotiv (PxxPxK/R) (Dröseler, 2005; Abb. 9) wies auf bisher unbekannte Proteinfunktionen hin, die für die Virus-Wirt-Interaktionen und den Vermehrungsverlauf möglicherweise von Bedeutung sind.

Virusstamm **NS1-Sequenz (AS 120-131)**

	D	Y	P	S	T	P	G	K	C	L	D	D
B/Lee/40	.	.	P	Y
B/Hong Kong/05/1972	.	.	P
B/Singapore/222/79	.	.	P
B/Ann Arbor/1/1986	.	.	P	Y
B/Victoria/02/1987	.	.	P	Y
B/Panama/45/1990	.	.	P	Y	.	.	G	.
B/Beijing/184/93	.	.	P	Y
B/Malaysia/06535/1995	.	.	P	Y
B/Beijing/76/98	.	.	P	Y
B/Yamagata/K386/2001	R
B/Moscow/16/2002	R
B/Seoul/1163/2004
B/Taiwan/251/2007	R	Y	.	.	.
B/Alaska/09/2008	R
B/Maryland/02/2009	E	R
B/Hawaii/08/2009	E	R
B/Brisbane/60-9/2010	E	R
B/Florida/02/2011	R
B/Boston/DB01/2011	R
B/Taiwan/94786/2012	R

Abb. 9: Sequenzvergleich der Aminosäuren 121-130 von 20 ausgewählten Influenza B Virusstämmen im Segment 8 (NS).

Die initiale Fragestellung der vorliegenden Arbeit war daher die Aufklärung der Proteinaktivitäten des NS1-Proteins von Influenza B Viren mit besonderem Fokus auf die funktionelle Bedeutung des konservierten Sequenzmotivs 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127.

Dafür wurde der Einfluss des hochkonservierten Motivs auf die Virusreplikation durch revers-genetische Mutationsanalysen geprüft. Die Auswirkung von Mutationen in der konservierten Peptidregion auf Protein-Protein-Interaktionen von Virus und Wirtszelle wurde erstmals in einem globalen Ansatz mittels hochauflösender Massenspektrometrie und durch Analyse zellulärer Signaltransduktionswege untersucht. Die Sequenz 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127 zeigt Ähnlichkeiten mit dem SH3-Bindemotiv 211-R-P-P-L-P-P-K-217 in aviären A/NS1-Proteinen. Daher wurde in *In-vitro*-Studien die Funktion des SH3-Bindemotivs der A/NS1-Proteine (Crk-Bindung und Suppression der JNK/ATF2-Signaltransduktion) auch für das B/NS1-Sequenzmotiv überprüft.

Die Kenntnis über molekulare und funktionelle Eigenschaften viraler Proteine ist für die Entwicklung antiviraler Medikationen von großer Bedeutung. Sowohl die Identifikation zellulärer Interaktionspartner des hochkonservierten viralen Sequenzmotivs 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127, als auch die Analyse der darüber vermittelten Signaltransduktion zielt auf eine Influenzavirus-Therapie hin, die z. B. über chemische Inhibitoren spezifisch für die Virusreplikation essentielle Wirtsfaktoren und Signalwege angreift und dadurch die Resistenzentwicklung der Viren erschwert.

2 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden beschrieben. Die dazu benötigten Materialien sind im Anhang (Materialverzeichnis) aufgeführt.

2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden, soweit nicht anders dokumentiert, unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die entsprechenden Zellkulturmedien, sowie der zum Waschen der Zellen verwendete PBS-Puffer wurden vor dem Arbeiten auf 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Infizierte Zellen wurden bei 33 °C inkubiert.

2.1.1 Passagieren von Zellen

MDCKII- und Calu3-Zellen wurden in MEM-Kulturmedium und A549-, 293T- sowie HeLa-Zellen in DMEM-Kulturmedium kultiviert. Die Kultivierung Serum-freier Vero-Zellen erfolgte in OPTI PRO™ SFM-Medium. Die Zusammensetzung der einzelnen Medien kann dem Materialverzeichnis entnommen werden.

Konfluente Zellen wurden je nach Bedarf in neue Zellkulturgefäße umgesetzt. Dafür wurden die adhärennten Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und durch 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C vom Boden der T75-Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und entsprechend ihrer Vermehrungseigenschaften und des jeweiligen Bedarfs in neue Zellkulturgefäße überführt.

2.1.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die Aufnahme von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen bezeichnet man als Transfektion. Hierfür wurde das Transfektionsreagenz LipofectAMIN™2000 verwendet. Dieses Transfektionsreagenz ist ein Gemisch aus kationischen Lipiden, das zusammen mit negativ geladener DNA Mizellen ausbildet. Die Mizellen sind in der Lage die Zellmembran zu passieren und die DNA-Plasmide in die Zellen einzubringen. Dort kann die DNA abgelesen und die kodierten Proteine exprimiert werden.

Die zu transfizierenden Zellen wurden jeweils am Vortag 1:2 umgesetzt. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Transfektion von 1×10^6 Zellen. Je 1 µg DNA

wurden 1,5 µl LipofectAMINTM2000 mit 200 µl Opti-MEM versetzt und für 5 Minuten (min) bei Raumtemperatur (22 °C – RT °C) inkubiert. Die DNA wurde mit dem gleichen Volumen an Opti-MEM versehen und nach der Inkubationszeit wurden beide Ansätze vereint. Die zu transfizierenden Zellen wurden von der Zellkulturflasche gelöst und in 10 ml Transfektionsmedium aufgenommen. Nach Zentrifugation für 3 min bei 800 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute* – rpm) wurde das Zellpellet in 10 ml Transfektionsmedium resuspendiert und die benötigte Zellzahl in Zellkultur-schalen ausgesät. Nach Inkubation des Transfektionsansatzes für 20 min bei RT °C wurde dieser auf die Zellen gegeben, Ansatz und Zellen gemischt und für 24 Stunden (h) inkubiert.

2.1.3 Transfektion von *small interfering* (si)RNA

Zur Untersuchung der Funktion eines zellulären Proteins während der Influenzavirusinfektion kann die entsprechende mRNA des Proteins mittels posttranskriptionellen Gen-*Silencings* degradiert werden. Dafür wurde in dieser Arbeit interferierende RNA (*small interfering RNA* – siRNA) durch Transfektion (siehe Kapitel 2.1.2) in die Zellen eingebracht. Eine siRNA besteht aus einem kurzen doppelsträngigen Bereich (ca. 19-23 Basenpaare), der von jeweils zwei endständigen überstehenden Nukleotiden flankiert wird. Das 5'-Ende jedes Stranges ist phosphoryliert, während das 3'-Ende eine freie OH-Gruppe trägt. In der Zelle bindet die siRNA spezifisch an einen komplementären Bereich der stillzulegenden mRNA und bewirkt dadurch deren selektiven Abbau oder die Hemmung ihrer Translation.

Für die Degradierung zellulärer Crk-mRNA wurden am Vortag A549-Zellen ausgesät, sodass sie am Tag der Transfektion 50 % konfluent waren. Die spezifische Crk-siRNA, sowie Negativ-Kontroll-siRNA, die keine Homologie zu humanen mRNAs besitzt, wurden mit einer Konzentration von 25 pmol und 4 µl LipofectAMINTM2000-Reagenz transfiziert. Fünf Stunden nach Transfektion wurde das Transfektionsmedium abgenommen und die Zellen mit Infektionsmedium versehen. Die Effizienz der mRNA-Stilllegung (*knockdown*) wurde 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion überprüft. Dafür wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE und Immunoblot (siehe Kapitel 2.4.2 und 2.4.4) die Reduzierung der Crk-Proteinkonzentration bestätigt.

2.2 Infektiöse Arbeiten

2.2.1 Anzucht von Influenza B Viren im Hühnerei

Virusstammlösungen der verwendeten rekombinanten Influenza B/Lee Viren wurden in der Allantoishöhle von zehn Tage alten bebrüteten Hühnereiern angezogen. Die Bruteier wurden zudem benutzt um die Replikationseigenschaften der Viren zu testen.

Dazu wurde das Virus bis zu einer Konzentration von 5000 FFU/ml in PBS⁺⁺-Puffer verdünnt. Die Befruchtung der Eier wurde mittels Durchleuchtung kontrolliert. Zur Inokulation des Virus wurde am stumpfen Ende der Eier unter sterilen Bedingungen eine kleine Öffnung gebohrt und 100 µl der Virusverdünnung (500 FFU) mit einer Kanüle (0,55 x 25 mm) injiziert. Die Öffnung wurde mit Ponal-Klebstoff (HENKEL) verschlossen und die Eier bei 33 °C und 65 % Luftfeuchtigkeit für drei Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden sie für mindestens 4 h bei 4 °C gekühlt, um ein Zusammenziehen der embryonalen Blutgefäße und damit ein blutfreies Abnehmen der virushaltigen Allantoisflüssigkeit zu gewährleisten. Dazu wurde die Eischale, sowie die Eihaut entfernt und die Allantoisflüssigkeit mit einer Spritze (Kanüle 1,2 x 40 mm) entnommen. Nach Zentrifugation (3000 rpm, 5 min, 4 °C) wurde ein Hämagglutinationstest (siehe Kapitel 2.2.2) durchgeführt. Für die Virusstammlösung wurden die Ansätze mit dem höchsten HA-Titer vereint, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte mittels Avicel-Plaque-Assay (siehe Kapitel 2.2.4).

2.2.2 Hämagglutinationstest (HA-Test)

Der Hämagglutinationstest ermöglicht die zeitnahe Abschätzung einer Viruskonzentration in wässriger Lösung. Dabei wird die Fähigkeit des viralen Oberflächenproteins Hämagglutinin (HA) genutzt, an endständige Neuraminsäuren auf Erythrozyten zu binden und diese quer zu vernetzen (Hirst, 1941). Da auch nicht infektiöse Virionen, sogenannte DI-Partikel (*Defective Interfering particles*) zur Hämagglutininierung beitragen, kann mit diesem Test nicht zwischen replikationsfähigen und nicht replikationskompetenten Viren unterschieden werden.

Für den HA-Test wurde in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte eine 1:2 Verdünnungsreihe der Virussuspension hergestellt. Dazu wurden in die erste V-förmige Vertiefung 100 µl Virus und in jede weitere 50 µl PBS-Puffer pipettiert. Anschließend wurden

ausgehend von der ersten Vertiefung jeweils 50 µl der Verdünnung in die darauffolgende pipettiert und gemischt. Aus der letzten Vertiefung der Verdünnungsreihe wurden 50 µl verworfen. Schließlich wurde jede Vertiefung mit 50 µl einer einprozentigen Hühnererythrozytenlösung in 0,9 % NaCl-Lösung aufgefüllt und die Platte für mindestens 30 min inkubiert. Zur Gewährleistung der Erythrozyten-Quervernetzung wurde die Neuraminidaseaktivität der Influenzaviren durch Inkubation auf Eis gehemmt. Bis zu einer bestimmten Viruskonzentration sind die Influenzapartikel in der Lage Erythrozyten zu agglutinieren. Eine Reduzierung der Viruskonzentration unter dieses Niveau führt zu einem Absinken der Erythrozyten in die Spitze der Vertiefung, wo sie als rote Punkte sichtbar werden. Als Hämagglutinationstiter (HA-Titer) wird der reziproke Wert derjenigen Verdünnungsstufe bezeichnet, bei der die Vernetzung der Erythrozyten gerade noch sichtbar ist.

2.2.3 Infektion von eukaryotischen Zellen mit Influenza B Viren

Für die Infektion mit Influenza B Viren wurden Zellen in Zellkulturgefäße ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt der Infektion konfluent vorlagen. Die Größe der Zellkulturschalen richtete sich nach dem Versuchsaufbau. Vor der Infektion wurden die adherenten Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie mit einer Virusvorverdünnung überschichtet. Diese wurde in 4 °C-kaltem PBS⁺⁺-Puffer angesetzt, sodass die Zellen in Abhängigkeit vom Versuchsansatz mit einer bestimmten Zahl an Viruspartikeln (*Multiplicity Of Infection* – MOI) infiziert wurden. Das Volumen der Virusverdünnung wurde möglichst gering gehalten, aber in Abhängigkeit vom gewählten Zellkulturgefäß so gewählt, dass die Zellen während der Infektion stets bedeckt waren. Die Zellen wurden für 45 min bei RT °C inkubiert, anschließend mit PBS-Puffer gewaschen und mit Infektionsmedium versehen.

Für eine multizyklische Replikation wurde dem Medium TPCK-Trypsin zugegeben. Dieses spaltet das HA-Protein der neugebildeten Viren und ermöglicht somit weitere Replikationszyklen. Je nach Verträglichkeit der Zelllinien wurden dem Medium verschiedene Trypsin-Konzentrationen zugesetzt (Tab. 3).

Zellen	MDCKII	A549	Calu3	VeroSF	293T
Trypsin (µg/ml)	1	0,25	0	2	1,5

Tab. 3: Eingesetzte TPCK-Trypsin-Konzentrationen für multizyklische Replikation.

Zur Inhibition der zellulären Apoptose wurden die infizierten A549-Zellen zusätzlich mit 70 μM des Caspase-3-Inhibitors Z-DEVD-FMK (BD PHARMINGEN™) behandelt.

Die Inhibition des HSP90-Chaperons erfolgte durch 800 nM Geldanamycin (*INVIVOGEN*), das an die aminoternale ATP-Bindungstasche von HSP90 bindet und damit die ATP-Bindung sowie -Hydrolyse und somit die Aktivität des Chaperons in den infizierten Zellen verhindert.

2.2.4 Titerbestimmung mittels Avicel-Plaque-Assay und Immunfluoreszenz

Mithilfe eines Plaque-Tests kann die Anzahl infektiöser Viruspartikel einer Lösung bestimmt werden. Da es im herkömmlichen Plaque-Assay nach Infektion mit rekombinanten Influenza B/Lee/40 Viren nicht zur Bildung von Lysishöfen im Zellrasen kommt, wurden die infizierten Zellen, sowie die infolge der multizyklischen Replikation infizierten Nachbarzellen mittels NP-Immunfärbung im Avicel-Plaque-Assay sichtbar gemacht. Die Einheit der berechneten Titer wird daher als *Fluorescence Forming Unit* (FFU) / ml angegeben.

Für die Bestimmung der Virustiter wurden am Vortag MDCKII-Zellen in 48-Kalotten-Platten ausgesät. Virusverdünnungen (z. B. 10^{-1} bis 10^{-6}) wurden in PBS⁺⁺-Puffer angesetzt. Die konfluenten Zellen wurden infiziert und anschließend mit Avicelmedium überschichtet. Avicel verhindert die freie Diffusion der Viren im Medium, sodass gezielt die angrenzenden Nachbarzellen infiziert wurden. Nach 48 h Inkubation bei 33 °C wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen, fixiert, permeabilisiert und durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung markiert (siehe Kapitel 2.5.1). Die Platten wurden am Odyssey-Analyzer gescannt und die NP-positiven Plaques gezählt. Der Virustiter (FFU/ml) errechnete sich aus der Anzahl der NP-positiven Plaques multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert mit 10. Der Faktor 10 kommt zu Stande, da die Zellen nicht mit 1 ml, sondern mit 100 μl der Virusverdünnung infiziert wurden.

2.2.5 Herstellung der rekombinanten B/Lee Viren P122/5L und xSH3G

In der vorliegenden Arbeit wurde der Sequenzabschnitt 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 des B/NS1-Proteins auf seine Funktionalität während der Influenzavirusinfektion hin untersucht. Dafür wurde die Methode der reversen Genetik gewählt, die die Vorgehensweise der klassischen Genetik umkehrt. Statt ausgehend von einem Phänotyp

die entsprechenden Gene zu erforschen, wurden gezielt Mutationen in die Gensequenz eingefügt und die Auswirkungen dieser Veränderungen auf den Phänotypen analysiert.

Die Herausforderung bei der genetischen Veränderung von Negativstrang-RNA-Viren liegt in den Eigenschaften ihres Genoms. Die Transfektion der negativ orientierten Nukleinsäure führt *per se* nicht zur Translation viraler Proteine und zur Initiation des Infektionszyklus. Dafür muss durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase, die durch kein zelluläres Enzym ersetzt werden kann, die virale RNA (-) in mRNA (+) umgeschrieben werden. Außerdem müssen für die Transkriptions- und Replikationsprozesse die vRNA (-) und cRNA (+) mit dem Nukleoprotein encapsidiert sein. Demnach stellen virale RNPs die kleinste infektiöse Einheit dar. Durch diesen komplexen Mechanismus erklärt sich, dass die Generierung eines revers-genetischen Systems für Negativstrang-RNA-Viren deutlich später gelang als das System für Positivstrang-RNA-Viren. Inzwischen konnte jedoch ein revers-genetischen System etabliert werden, das es ermöglicht durch Transfektion von cDNA rekombinante Influenzaviren ohne den Einsatz von Helferviren *de novo* zu generieren und Mutationsanalysen durchzuführen (Hoffmann *et al.*, 2000; Dauber *et al.*, 2004; Abb. 10).

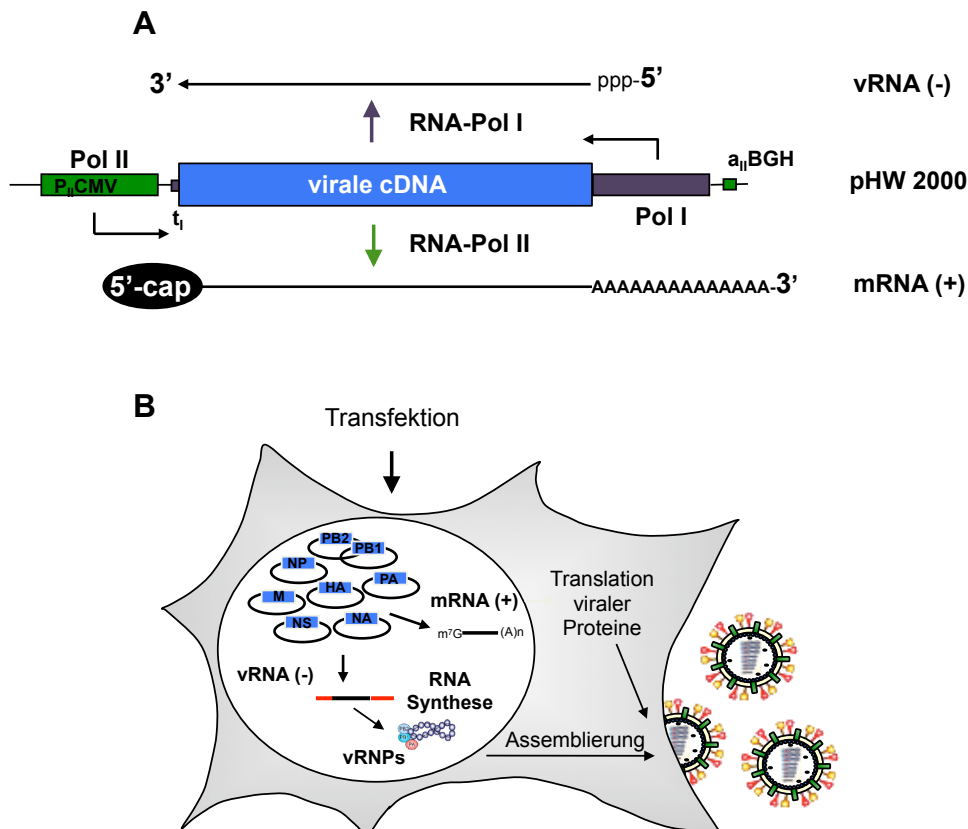


Abb. 10: Herstellung rekombinanter Influenzaviren (modifiziert nach (A) Hoffmann *et al.*, 2000 und (B) Zielecki, 2010).

In dem bidirektionalen acht-Plasmidsystem von Hoffmann *et al.* werden acht pHW2000-Plasmide, die jeweils die cDNA eines der acht Influenza A Gensegmente enthalten, in Zellen transfiziert. In den Plasmiden wird die cDNA 3' von einem Polymerase I-Promotor und einem Polyadenylierungssignal und 5' von einem Polymerase II-Promotor und einem murinen Terminator flankiert. Somit wird in der Zelle vom transfizierten Plasmid sowohl negative vRNA als auch positive mRNA gebildet (Abb. 10A). Die von der viralen mRNA translatierten Virusproteine assemblieren mit den gebildeten vRNPs und werden als Virionen von der transfizierten Zellen freigesetzt (Hoffmann *et al.*, 2000; Abb. 10B). Dieses für Influenza A Viren etablierte rekombinante System wurde von Dauber *et al.* für die Generierung rekombinanter Influenza B Viren angepasst (Dauber *et al.*, 2004) und in der vorliegenden Arbeit zur Mutationsanalyse des hochkonservierten Sequenzmotivs 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127 im NS1-Protein verwendet.

Dazu wurden jeweils 0,5 µg der Plasmide pHW2000-B/Lee- (pHW-) PB1, pHW-PB2, pHW-PA, pHW-NP, pHW-HA, pHW-NA, pHW-M und die entsprechenden pHW-NS-Plasmide mit den Mutationen P122L/P125L (P122/5L) bzw. Y121G/P122G/P123G/T124G/P125G/K127G (xSH3G) im NS-Segment mit 4,5 µl LipofectAMIN™2000-Reagenz in 1×10^6 293T-Zellen transfiziert (siehe Kapitel 2.1.2). Nach sechsstündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Transfektionsmedium durch Infektionsmedium mit TPCK-Trypsin ersetzt und die Zellen für drei Tage bei 33 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 1×10^6 MDCKII-Zellen mit 350 µl des Zellkulturüberstandes infiziert (siehe Kapitel 2.2.3) und ebenfalls für drei Tage bei 33 °C inkubiert. Die in den Überstand der Zellen freigesetzten Viruspartikel wurden in 10 d alten Hühnereiern vermehrt (siehe Kapitel 2.2.1).

Die erfolgreiche Virusmutanten-Generierung wurde durch Isolierung der viralen RNA, reverse Transkription der RNA in cDNA und Sequenzierung bestätigt (siehe Kapitel 2.2.6, 2.3.1 und 2.3.10).

2.2.6 Isolierung viraler RNA

Zur Isolierung viraler RNA-Segmente wurden 100 µl der Virusstammlösung mit 100 µl PBS-Puffer versetzt und das QIAamp®MinElute™ Virus Spin-Kit von QIAGEN nach Angaben des Herstellers verwendet. Die RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Reverse Transkription (RT)-PCR

Bei einer Reversen Transkription wird ein RNA-Molekül in einzelsträngige DNA (*copy-DNA* – cDNA) umgeschrieben. Nach spezifischer Bindung eines Oligonukleotids an das 3'-Ende der RNA fügt die retrovirale RNA-abhängige DNA-Polymerase (RT) komplementär zur RNA Desoxyribonukleotide (dNTPs) an das 3'-Ende des Oligonukleotids an und synthetisiert somit einzelsträngige DNA. Diese kann dann durch Bindung eines Rückwärts-Primers an das 3'-Ende der DNA durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase in einer PCR-Reaktion zu doppelsträngiger DNA komplementiert und amplifiziert werden.

Zum Nachweis der viralen NS-Segmente von generierten Influenza B/Lee Virusmutanten (siehe Kapitel 2.2.5) wurde diese Reaktion in einem *OneStep* RT-PCR-Ansatz (QIAGEN) mit den NS-Segment-spezifischen Primern *BsmBI-NS #1* und *#2* durchgeführt.

Reaktionsansatz:

- 5 x QIAGEN <i>OneStep</i> RT-PCR-Puffer	10 µl
- dNTP-Mix	2 µl
- <i>BsmBI-NS #1</i> / <i>BsmBI-NS #2</i> (20 µM)	je 1,5 µl
- QIAGEN <i>OneStep</i> RT-PCR Enzym-Mix	2 µl
- RNasin	0,25 µl
- Vorlage-RNA	10 µl (1 pg – 2 µg)
- RNase-freies H ₂ O	ad 50 µl

Cyclerprogramm:

Temperatur	Zeit	Reaktionsschritt	
50 °C	30 min	Reverse Transkription	
95 °C	15 min	Initiale PCR-Aktivierung	
95 °C	30 sec	Denaturierung	
52 °C	30 sec	Anlagerung	35 Zyklen
72 °C	2 min	Elongation	
72 °C	5 min	Finale Elongation	
4 °C	∞	Kühlung	

2.3.2 Polymerasekettenreaktion

Durch die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) können beliebige DNA-Abschnitte vervielfältigt werden. In der Reaktion werden zwei DNA-

Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die komplementär zu den flankierenden Regionen der zu amplifizierenden DNA-Sequenz sind. Nach Denaturierung des DNA-Doppelstranges durch hohe Temperaturen binden die Primer an die Einzelstränge. Ausgehend von den Oligonukleotiden katalysiert eine hitzebeständige DNA-Polymerase die Verknüpfung komplementärer Desoxyribonukleotide (dNTPs) an den Matrizenstrang. Nach diesem Polymerisierungsschritt liegen zwei Doppelstränge vor, an denen sich die Schritte der Denaturierung, Primeranlagerung und -Elongation wiederholen, sodass DNA-Abschnitte exponentiell amplifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden PCRs für Klonierungen mit dem *Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System* (ROCHE) durchgeführt.

PCR-Ansatz für pGEX-PB2-(AS 535-759) Klonierung:

- Vorlage-DNA 25 ng
- 5 x Puffer incl. MgSO₄ 10 µl
- dNTPs (25 mM) 1 µl
- Primer F / Primer R (20 mM) je 1 µl
- Polymerase Mix 0,5 µl
- ddH₂O ad 50 µl

Cyclerprogramm:

Temperatur	Zeit	Reaktionsschritt	
95 °C	1 min	Initiale Denaturierung	
95 °C	30 sec	Denaturierung	
52 °C	30 sec	Anlagerung	35 Zyklen
72 °C	1 min	Elongation	
72 °C	7 min	Finale Elongation	
4 °C	∞	Kühlung	

2.3.2.1 Inverse PCR zur Mutagenese von pHW2000-B/Lee-NS zur Herstellung von pHW2000-B/Lee-NS-P122/5L und pHW2000-B/Lee-NS-xSH3G

Zur Herstellung der Plasmide pHW2000-B/Lee-NS-P122/5L (pHW-NS-P122/5L) und pHW2000-B/Lee-NS-xSH3G (pHW-NS-xSH3G) mussten vier bzw. zehn Nukleotide des pHW2000-B/Lee-NS (pHW-NS-wt) -Plasmids verändert werden. Durch eine inverse PCR wurde die Mutagenese des Ausgangsplasmids vorgenommen. In dieser Reaktion flankieren die beiden Primer nicht wie bei der Standard-PCR die zu amplifizierende DNA-Sequenz, sondern lagern sich innerhalb der Sequenz versetzt an die zu mutierende Region an. Der Vorwärts-Primer war komplementär zur Ausgangsse-

quenz des 3'-5'-DNA-Stranges. Der Rückwärts-Primer hatte einen Teil, der zur Ausgangssequenz des 5'-3'-Stranges komplementär war und diese dadurch binden konnte, sowie einen Bereich, der die gewünschten Nukleotidaustausche trug. Am 5'-Ende beider Primer lag die Schnittstelle für ein und das selbe Enzym, über die das in der inversen PCR vollständig amplifizierte Plasmid schließlich re-ligiert wurde (siehe Kapitel 2.3.7). Wichtig für den erfolgreichen Verlauf der inversen PCR ist die Verwendung einer DNA-Polymerase mit 3'-5'-, jedoch ohne 5'-3'-Exonukleaseaktivität, damit das 5'-Ende der Primer, das nicht komplementär zur Vorlage-DNA ist, durch diese enzymatische Aktivität nicht abgebaut wird. Für die inverse PCR wurde daher die *Pfu-Ultra*-Polymerase und der dazugehörige 10 x PCR-Puffer aus dem *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis*-Kit (STRATAGENE) verwendet.

Reaktionsansatz:

- 10 x PCR-Puffer 5 µl
- dNTP-Mix (100 µM) 1 µl
- Primer Vorwärts & Revers (20 µM) je 1 µl (P122/5L) bzw. 2 µl (xSH3G)
- *Pfu-Ultra*-Polymerase 1 µl
- Vorlage-DNA (25 ng/µl) 2 µl (P122/5L) bzw. 1 µl (xSH3G)
- ddH₂O ad 50 µl

Cyclerprogramm:

Temperatur	Zeit	Reaktionsschritt	
95 °C	1 min	Initiale Denaturierung	
94 °C	1 min	Denaturierung	
45 °C	1 min	Anlagerung	25 Zyklen
72 °C	12 min	Elongation	
72 °C	5 min	Finale Elongation	
4 °C	∞	Kühlung	

2.3.3 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die an definierten Nukleotidsequenzen die Phosphodiesterbindungen zwischen zwei Nukleotiden eines DNA-Doppelstranges spalten. Dabei entstehen entweder glatte oder überhängende Doppelstrangenden. Beim Verdau von DNA-Fragmenten können somit Nukleotidüberhänge erzeugt werden, die eine Ligation in einen Vektor mit komplementäre Überhängen ermöglichen. Die präparativen Reaktionen fanden in einem Gesamtvolumen von 20-50 µl statt. Es wurden 0,5-2 U/µl Enzym sowie die entsprechenden Mengen

eines 10 x Restriktionspuffers nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden 2-16 h bei 37 °C inkubiert.

2.3.4 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Größenauftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer aufgekocht und vor dem Gießen des 1 %igen Gels wurde Ethidiumbromid (0,3-0,5 µg/ml Endkonzentration) hinzugefügt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und wird unter UV-Licht sichtbar. Vor dem Auftrag der Proben wurden diese mit DNA-6 x Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard wurden DNA-Marker mit definierten Fragmentlängen eingesetzt. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte in einer Elektrophorese-Kammer bei einer Spannung von 90 Volt. Die DNA-Auftrennung wurde auf einem Transilluminator unter UV-Licht detektiert.

2.3.5 Reinigung von PCR-Fragmenten

Zur Aufreinigung von DNA-PCR-Produkten von den übrigen PCR-Komponenten wurden die PCR-Ansätze mittels *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) gemäß dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Elution der PCR-Produkte erfolgte in 30 µl doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O).

2.3.6 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelextraktion

Zur Extraktion eines bestimmten DNA-Moleküls aus einer Lösung wurden die DNA-Fragmente zunächst gelelektrophoretisch entsprechend ihrer Größe aufgetrennt (siehe Kapitel 2.3.4). Unter UV-Bestrahlung wurden die Banden durch das interkalierende Ethidiumbromid sichtbar und das gewünschte Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Mittels *QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit* (QIAGEN) wurde das DNA-Fragment nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde durch 20 µl ddH₂O eluiert.

2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Über komplementäre Nukleotidüberhänge können DNA-Fragment und Vektor miteinander verbunden werden. Für den klassischen Ligationsansatz wurden Vektor und

Insert im Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Nach inverser PCR und Restriktionsverdau (siehe Kapitel 2.3.2.1 und 2.3.3) wurde der modifizierte Vektor mit sich selbst ligiert. Zur Ligation von DNA-Strängen wird die enzymatische Aktivität einer DNA-Ligase benötigt, die unter ATP-Verbrauch die Phosphodiesterbindung an den Strangbrüchen kovalent verknüpft. Es wurde die DNA-Ligase des T4-Bakteriophagen verwendet, der Vektor mit einer Konzentration von 50 ng eingesetzt und der Ligationsansatz für 16 h bei 16 °C inkubiert.

Ligationsansatz:

- 10 x Ligationspuffer (mit ATP) 1 µl
- T4-DNA-Ligase 1 µl
- Vektor 50 ng
- Insert x ng
- ddH₂O ad 10 µl

2.3.8 Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien durch Hitzeschock

Transformation bezeichnet die Aufnahme zirkulärer Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen. Für die selektive Anzucht transformierter Bakterien sind auf Plasmidvektoren Antibiotika-Resistenzgene kodiert, die den transformierten Bakterien das Überleben auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ermöglichen.

Je Transformationsansatz wurden 50 µl kompetente *E. coli XL-1 Blue*- oder *E. coli BL26*-Bakterien auf Eis aufgetaut und zusammen mit 5 µl Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen kurzzeitig erhitzt (90 sec bei 42 °C) und nach 1-2 min auf Eis unter sterilen Bedingungen mit 350 µl SOC-Medium (37 °C) versetzt. Die Bakterien wurden für 1 h bei 37 °C leicht geschüttelt und anschließend auf Selektiv-Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 16 h.

2.3.9 Plasmidpräparationen

Zur Plasmidisolierung aus *E. coli XL-1 Blue*-Bakterien wurde 2 x YT-Selektivmedium (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin zur Selektion der gewünschten Klonen) steril mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und für 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Für kleine Bakterienvolumina (2-3 ml) wurde das *Invisorb Spin Plasmid Mini Two*-Kit (INVITEK) und für große Bakterienvolumina (ca. 200 ml) das *QIAfilter Plasmid Maxi*-Kit (QIAGEN) verwendet. Die Plasmidisolierung erfolgte nach den Angaben der Hersteller. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 30 µl (Minipräparation) bzw. 150 µl (Maxipräparation) sterilem ddH₂O aufgenommen und die DNA-

Konzentration mittels NanoDrop 1000 (THERMO FISHER SCIENTIFIC) entsprechend der Herstellerangaben gemessen.

2.3.10 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung definierter DNA-Abschnitte erfolgte basierend auf der Didesoxymethode nach Sanger durch das *BigDye[®] Terminator 3.1-Kit* (APPLIED BIOSYSTEMS) (Sanger *et al.*, 1977). Die zu sequenzierende DNA wurde in einer PCR-Reaktion mit den vier Desoxyribonukleotiden (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) und speziellen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs) amplifiziert. Die ddNTPs führen aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe bei ihrem Einbau zum Strangabbruch des DNA-Stranges. Entsprechend der Position des ddNTP-Einbaus entstehen DNA-Stränge verschiedener Länge. Die Nukleotidposition des ddNTP im DNA-Strang kann durch die Fragmentlänge abgeleitet werden. Jedes der vier unterschiedlichen ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) ist an einen anderen Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt und kann nach Emission eines bestimmten Wellenlängenbereiches von den anderen ddNTPs unterschieden werden. Die Auftrennung der Reaktionsmixturen erfolgte durch Kapillarelektrophorese im hausinternen Sequenzierlabor des Robert Koch-Institutes. Durch ein Chromatogramm, das abhängig von der Stranglänge die Fluoreszenzsignale auflistet, wurden die Nukleotidpositionen der Abbruch-ddNTP und dadurch die DNA-Sequenz bestimmt.

Sequenzierungsansatz:

- Vorlage-DNA 300 ng
- Primer (20 µM) 0,5 µl
- BigDye[®] Reaktionsmix 1 µl
- 5 x ABI-Puffer 1,5 µl
- ddH₂O ad 10 µl

Cyclerprogramm:

Temperatur	Zeit	Reaktionsschritt
90 °C	1 min	Initiale Denaturierung
96 °C	10 sec	Denaturierung
55 °C	5 sec	Anlagerung
60 °C	4 min	Elongation
4 °C	∞	Kühlung

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Erzeugung von Lysaten transfizierter oder infizierter Kulturzellen wurden diese zunächst mit 4 °C-kaltem PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit Lysispuffer überschichtet, für 10 min auf Eis inkubiert und mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst. Daraufhin erfolgte die Inkubation in einem 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß für weitere 15 min auf Eis. Die Lysate wurden für 10 min bei 12000 rpm abzentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorf-Gefäße überführt.

2.4.2 Protein-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Nach Denaturierung und Ladungsausgleich (durch β -Mercaptoethanol bzw. Natriumdodecylsulfat – SDS) können Proteine anhand ihres Molekulargewichtes in der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden. Zur Herstellung der Polyacrylamidgele wurden zwischen zwei mit Ethanol entfetteten Glasplatten im Abstand von 0,75 bzw. 1,5 mm in Mini-Protean3-Gießvorrichtungen (BIORAD) Trenn- und Sammelgel gegossen.

Zusammensetzung der SDS-Gele	Trenngel		Sammelgel
	10 %	12,5 %	5 %
30 % Acrylamid/Bis (29:1)	3,3 ml	4,1 ml	0,83 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml		-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-		1,25 ml
10 % SDS	100 μ l		50 μ l
10 % APS	100 μ l		50 μ l
TEMED	6 μ l		6 μ l
H ₂ O	4 ml	3,2 ml	2,8 ml

Tab. 4: Zusammensetzung der SDS-Gele

Im Sammelgel wurden mittels eines Kammes Probenaschen freigelassen. Die Proben wurden mit Probenpuffer, der SDS und β -Mercaptoethanol enthielt, versetzt und bei 95 °C für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben aufgetragen und bei einer Stromstärke von 25 mA je Gel in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (BIORAD) in 1 % SDS-Elektrophoresepuffer aufgetrennt.

2.4.3 Färben und Trocknen von SDS-Polyacrylamidgelen

Die separierten Proteine können im Polyacrylamidgel durch Coomassie-Brilliant-Blau –R250-Färbung sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die Proteine durch eine Lösung aus 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure für 20 min im Gel fixiert. Anschließend wurde das Gel für 1 h mit der kolloidalen Coomassie-Lösung gefärbt, wobei sich der blaue Farbstoff unspezifisch an basische und aromatische Aminosäureseitenketten anlagerte. Die ungebundenen Farbmoleküle wurden durch 10 % Methanol aus dem Gel entfernt und das gefärbte Gel unter Vakuum bei 80 °C für 45 min getrocknet.

2.4.4 Westernblot und Immunodetektion

Die spezifische Detektion von Proteinen wurde nach dem Transferieren der Proteine aus dem Gel auf eine hydrophobe Nitrozellulosemembran (*Westernblot*) durch spezifisch gegen die Proteine gerichtete Antikörper (*Immunodetektion*) erzielt. Dazu wurden *Whatman*-Papiere und die Nitrozellulosemembran in *Semi-Dry-Blotting*-Puffer äquilibriert und in einer Trans-Blot[®]-Apparatur (BIORAD) zusammen mit dem Proteingel entsprechend der Lokalisation der Anode gestapelt: Anode, 3 x *Whatman*-Papier, Nitrozellulose-Membran, Gel, 3 x *Whatman*-Papier, Kathode. Die negativ geladenen Proteine wurden bei einer Stromstärke von 75 mA je Gel auf die Membran transferiert. Freie Bindungsstellen auf der Membran und den Proteinen wurden durch eine Lösung aus 3 % Milchpulver oder 5 % BSA und 1 x TBST-Puffer maskiert. Durch Inkubation der Membran mit dem spezifischen Primärantikörper wurden die Maskierungsproteine von ihren Bindungsstellen auf dem Protein verdrängt. Primär- und Sekundärantikörper wurden entsprechend der Herstellerangaben oder leicht modifiziert eingesetzt. Der Sekundärantikörper bindet spezifisch an den Erstantikörper und ist an Meerrettich-Peroxidase (*HorseRadish Peroxidase* – HRP) gekoppelt. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol, das im verwendeten Substrat *SuperSignal-Dura*-Chemolumineszenz (THERMO FISHER SCIENTIFIC) enthalten ist und entsprechend der Herstellerangaben verwendet wurde. Die entstandene Lumineszenz wurde durch lichtensitive Röntgenfilme detektiert.

2.4.5 Überexpression von GST-Fusionsproteinen in *E.coli* BL26-Bakterien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine GST-PB2 (AS 535-759), GST-PKR (K296R) und GST-PKR (AS 266-

551) sowie unfusioniertes GST wurden in *E.coli* BL26-Bakterien überexprimiert. Dazu wurden die entsprechenden DNA-Plasmide transformiert (siehe Kapitel 2.3.8) und jeweils ein entstandener Klon zum Animpfen einer Übernacht-Kultur in 2 x YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verwendet. Die Kultur wurde am nächsten Morgen in 450 ml 2 x YT-Medium überführt und für 2 h bei 33 °C schüttelnd inkubiert. Die Expression der GST-Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 0,5 mM Isopropyl-β-Thiogalactopyranidose (IPTG) induziert und erfolgte innerhalb der folgenden 4 h. Die Bakterienkulturen wurden anschließend für 15 min bei 6000 x g und 4 °C pelletiert, die Bakterienpellets in 20 ml PBS-Puffer resuspendiert und bis zur Kopplung an Glutathion-Sepharose (siehe Kapitel 2.4.6) bei -20 °C gelagert.

2.4.6 Kopplung von GST-Fusionsproteinen an Glutathion-Sepharose

Glutathion-S-Transferase (GST) wird durch Glutathion-Sepharose mit hoher Affinität gebunden. Diese Eigenschaft kann in Interaktionsstudien genutzt werden. Dafür wurden die überexprimierten GST-Fusionsproteine (siehe Kapitel 2.4.5) aus Bakterienlysaten hochrein extrahiert und an Glutathion-Sepharose gekoppelt. Die Bakterien wurden durch den SONOPULS HD 70 Hochleistungs-Ultraschall-Desintegrator (BANDELIN) (5 Pulse von 20 sec, ca. 40 Watt) partiell aufgeschlossen und mit 1 % Triton-X-100 bei 4 °C für 30 min drehend inkubiert. Anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation pelletiert und dem Zelllysat Glutathion-Sepharose zugegeben. Die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose erfolgte während der folgenden Stunde bei 4 °C. Die Sepharose mit gebundenem GST-Fusionsprotein wurde mit PBS-Puffer gewaschen und bei 4 °C gelagert. Die erfolgreiche GST-Glutathion-Sepharose-Bindung wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung nachgewiesen (siehe Kapitel 2.4.2 und 2.4.3).

2.4.7 *In vitro*-Translation

Während einer *in vitro*-Translation (i.v.T.) werden plasmidkodierte Gene in einem zellfreien System exprimiert. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu das *TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System* (PROMEGA) verwendet. Darin enthalten ist neben dem Retikulozytenlysat eine Aminosäuremischung ohne Methionin. Die Zugabe von radioaktiv markiertem [³⁵S]-Methionin führte zur radioaktiven Markierung des *in vitro*-

transkribierten und translatierten NS1-Proteins. Als Vorlage-DNA dienten die Plasmide pHW-NS-wt, pHW-NS-P122/5L und pHW-NS-xSH3G.

Reaktionsansatz:

- Retikulozytenlysat	25 µl
- TNT [®] -Puffer	2 µl
- Aminosäure-Mix ohne Methionin	1 µl
- [³⁵ S]-Methionin (10 mCi/ml)	4 µl
- TNT [®] -T7 Polymerase	1 µl
- RNasin	1 µl
- Vorlage-DNA	1 µg
- Nukleasefreies H ₂ O	ad 50 µl

Der Ansatz wurde für 90 min bei 30 °C inkubiert und die unlöslichen Bestandteile anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20 °C gelagert und im GST-Bindungsassay (siehe Kapitel 2.4.8.1) eingesetzt.

2.4.8 Interaktionsstudien

2.4.8.1 GST-Bindungsassay

Im GST-Bindungsassay wurde die Interaktion von GST-PKR-Fusionsproteinen mit *in vitro*-translatierten NS1-Proteinen des Influenza B Virus (B/NS1) untersucht. Die GST-Fusionsproteine wurden in *E.coli* BL26-Bakterien überexprimiert und an Glutathion-Sepharose gekoppelt (siehe Kapitel 2.4.5 und 2.4.6). Die B/NS1-Proteine wurden ausgehend von den Plasmiden pHW-NS-wt, pHW-NS-P122/5L und pHW-NS-xSH3G durch *in vitro*-Translation synthetisiert und radioaktiv markiert (siehe Kapitel 2.4.7).

Ansatz:

- GST bzw. -GST-Fusionsprotein (1:1)	5-30 µl
- Glutathion-Sepharose (1:1)	25-0 µl
- Radioaktives, <i>in vitro</i> translatiertes Protein	10 µl
- HEPES-Bindungspuffer	1 ml

Die Glutathion-Sepharose (1:1 verdünnt in HEPES-Bindungspuffer) mit gebundenem GST oder GST-Fusionsprotein wurde entsprechend der jeweiligen Bindungseffizienz der Fusionsproteine eingesetzt, sodass in jedem Ansatz gleiche Proteinmengen zur Interaktion mit *i.v.T.* NS1-Protein zur Verfügung standen. Die nicht-gekoppelte Glutathion-Sepharose wurde entsprechend angepasst. Die Ansätze wurden bei 4 °C für 2-3 h inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-Protein-Protein-Komplexe abzentrifugiert und mit HEPES-Bindungspuffer gewaschen. Der Überstand wurde vollstän-

dig abgenommen und die gebundenen Proteine in 2 x SDS-Probenpuffer eluiert. Die Sepharose wurde bei 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert und die Proteine im Überstand durch ein SDS-Gel separiert (siehe Kapitel 2.4.2). Die GST-Fusionsproteine wurden über Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (siehe Kapitel 2.4.3) und die Bindung der *in vitro*-translatierten Proteine an die GST-Fusionsproteine durch Autoradiographie nachgewiesen.

2.4.8.2 Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP)

Durch Ko-IP-Bindungsstudien können *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen in transfizierten oder infizierten Zellen analysiert werden. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit je Ansatz entweder 7×10^6 A549-Zellen infiziert (siehe Kapitel 3.1.5, 3.3 und 3.6.3) oder $2,5 \times 10^6$ 293T-Zellen mit 5 μ g DNA transfiziert (siehe Kapitel 3.6.2). Die Inkubation der Zellen erfolgte für 8 h bei 33 °C bzw. 24 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen in Ko-IP-Puffer lysiert (siehe Kapitel 2.4.1), 30 μ l des Zelllysates mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und als *Input*-Probe bei -20 °C gelagert. Das restliche Zelllysate wurde für die Ko-IP eingesetzt.

Parallel zur Zelllyse erfolgte die Vorkopplung des spezifischen Primärantikörpers gegen einen der Interaktionspartner an Protein G Agarose. Diese Bindung erfolgt durch die unspezifische Wechselwirkung des G-Proteins auf der Oberfläche der Agarosekügelchen mit den Kaninchen- bzw. Maus-Immunglobulinen des Antikörpers. Je Ko-IP-Ansatz wurden 30 μ l der Protein G Agarose mit Ko-IP-Puffer gewaschen und anschließend mit 500 μ l Ko-IP-Puffer und dem Primärantikörper für mindestens 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zelllysate zu der Antikörper-gekoppelten Protein G Agarose gegeben und 16 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Protein-Agarose-Komplexe wurden abzentrifugiert und ungebundene Proteine durch Waschen mit Ko-IP-Puffer aus der Suspension entfernt. Die an die Agarose gebundenen Proteine und ihre Interaktionspartner wurden in 2 x SDS-Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE und Immunoblot nachgewiesen (siehe Kapitel 2.4.2 und 2.4.4).

2.4.9 Interferon β -ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Die Bestimmung der Interferon β (IFN- β)-Konzentration im Überstand infizierter Zellen erfolgte durch einen *Sandwich*-ELISA. Bei dieser ELISA-Technik binden zwei Antikörper an das nachzuweisende Antigen und bilden Antikörper-Antigen-Antikörper-

und damit sogenannte *Sandwich*-Komplexe. A549-Zellen wurden dafür mit einer MOI von 1 mit den Influenza B/Lee Viren wt, P122/5L, xSH3G oder NS 1-104 für 20 h infiziert. Nach Abnahme der Zellkulturüberstände wurden diese bei -80 °C gelagert. Als Probenmaterial wurden 100 µl der Überstände eingesetzt und der ELISA entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Oberfläche der ELISA-Platte ist mit einem Antikörper beschichtet, der spezifisch das IFN-β-Zytokin bindet. Nach Bindung des Zytokins wurde ein Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelter Antikörper zugegeben. Die HRP katalysiert die Umsetzung eines chromogenen Substrates. Die Menge der gebildeten Antikörper-IFN-β-Antikörper-Komplexe korreliert mit dem Substrat-Umsatz der HRP und kann somit photometrisch (bei Wellenlänge 450 nm) bestimmt werden.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Die zelluläre Lokalisation von Proteinen kann in der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie durch Fluorochrom-gekoppelte Antikörper sichtbar gemacht werden. Humane Cervixkarzinom-Epithelzellen (HeLa-Zellen) wurden dafür auf Deckgläschen präpariert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit den Influenza B/Lee Viren wt, P122/5L oder xSH3G und einer MOI von 2 infiziert. Zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion (4 h, 8 h und 16 h) wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und durch 2,5 % Formaldehyd/PBS-Puffer für 15 min fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch 10 min Inkubation mit 0,2 % Triton-X-100/PBS-Puffer. Das zu detektierende Protein wurde durch einen spezifischen Primärantikörper in 3 % BSA/PBS-Puffer für 1 h bei RT °C angefärbt. Der Nachweis der Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte durch einen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper (*α-Kaninchen IgG-Alexa 488* oder *α-Maus-IgG-Alexa 594* der Firma MOLECULAR PROBES). Um ein Verblässen der Fluoreszenz zu vermeiden, wurden die Zellen unter Lichtausschluss mit der Zweitantikörper/BSA/PBS-Lösung inkubiert. Schließlich wurden die Glasplättchen durch 6 µl Mowiol auf Objektträgern fixiert.

2.5.2 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde durch konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (*Confocal Laser Scanning Microscopy* – CLSM) die intrazelluläre Proteinlokalisierung de-

tektiert. Diese Art der Mikroskopie ermöglicht die Detektion des reflektierten bzw. emittierten Lichts aus einer einzigen Ebene des Präparats. Eine Lochblende verhindert dabei die Detektion von Objektinformationen, die nicht aus der Fokusebene stammen. Der Fluoreszenzfarbstoff im Präparat wird durch einen Laserstrahl mit passender Wellenlänge (488 nm bzw. 543 nm) angeregt. Das Präparat wird zeilen- und pixelweise abgerastert und das emittierte Licht von einem Detektor aufgenommen. Durch vier konfokale Detektionskanäle mit separater Blende können mehrere Fluoreszenzfärbungen in einem Präparat ohne Signalvermischung der einzelnen Fluoreszenzkanäle nachgewiesen werden. Das entsprechende digitale Bild zeigt eine grüne (Markierung durch *IgG-Alexa 488*) bzw. rote (Markierung durch *IgG-Alexa 594*) Färbung der Proteine und zeichnet sich durch hohen Kontrast und hohes laterales Auflösungsvermögen aus.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, vorbereitet und durch das konfokale Laser Scanning Mikroskop *LSM510 Meta* (CARL ZEISS) mit dem Objektiv *C-Apochromat 63/1.2 water* mikroskopiert. Die Daten wurden mit der Software *Carl Zeiss LSM Image Browser 4.2* und *Adobe Photoshop CS5* analysiert und ausgewertet.

2.5.3 Zytotoxizitäts-Test (MTT-Test)

Zur Zytotoxizitäts-Analyse der Crk-siRNA (siehe Kapitel 2.1.3) wurde ein MTT-Test (ROCHE) zur Bestimmung der Zellviabilität nach siRNA-Behandlung durchgeführt. Dieser Proliferationsassay beruht auf der Reduktion eines gelben Tetrazoliumsalzes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromids – MTT) durch die mitochondriale Dehydrogenase in ein violetteres, wasserunlösliches Formazan. Dieses Formazan wird durch ein Lösungs-Reagenz aus den Zellen gelöst und die Konzentration photometrisch bei 570 nm bestimmt. Die Formazankonzentration korreliert direkt mit der Viabilität der Zellen. A549-Zellen wurden in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät, sodass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 50 % aufwiesen. Es folgte die Transfektion mit Crk-siRNA (siehe Kapitel 2.1.3), deren Zytotoxizität im Versuch bestimmt werden sollte. Als Kontrollversuch wurde Negativ-Kontroll-siRNA transfiziert, sowie Zellen mit siRNA-Puffer oder mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen behandelt. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen entsprechend der Herstellerangaben mit den Reagenzien des MTT-Assays behandelt und die Absorption bei 570 nm bestimmt.

2.5.4 Luziferase-Reportergen-Assay

Zur Untersuchung der Auswirkung der B/NS1-Proteinexpression auf die virale Genexpression wurden Luziferase-Reportergen-Studien mit dem *Dual-Luciferase[®]-Reporter Assay System* (PROMEGA) durchgeführt. Bei diesem Test wird ein sogenanntes Minigenom, d. h. die minimale Anzahl an Genkonstrukten für die virale Replikation und Transkription, und ein Luziferase-Expressionsplasmid in Zellen transfiziert. Das Luziferase-Plasmid enthält die genetische Information zur Expression der Leuchtkäfer (*Firefly*)-Luziferase und wird von den nichtkodierenden Bereichen (*Non-Coding Regions* – NCR) des B/NS1-Gensegments flankiert. Durch die zelluläre RNA-Polymerase-I wird in den transfizierten Zellen Influenzavirus-ähnliche vRNA mit negativer Polarität gebildet, die nur durch den viralen Polymerasekomplex in mRNA umgewandelt werden kann. Aus dieser mRNA wird durch die zelluläre Translationsmaschinerie funktionelle Luziferase gebildet. Das Enzym kann nun sein Substrat Luziferin umsetzen. Die dabei freigesetzte Lumineszenz kann im Luminometer gemessen werden und ist proportional zur viralen Genexpression der transfizierten Zellen. Unterschiede in den Transfektionseffizienzen der einzelnen Ansätze werden durch Ko-Transfektion eines konstitutiv exprimierten Luziferase-Gens (der Gemeinen Seefeder – *Renilla*) korrigiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden 293T-Zellen mit den viralen Polymerasekonstrukten pHW-PB1, pHW-PB2, pHW-PA und pHW-NP sowie dem Luziferase (*Firefly*)-Reportergenkonstrukt und dem konstitutiv exprimierten Luziferase-*Renilla*-Konstrukt transfiziert. Der Effekt der B/NS1-Expression auf die virale Genexpression wurde durch Ko-Transfektion der Konstrukte pHW-NS-wt (50 ng, 100 ng, 250 ng, 500 ng), pHW-NS-P122/5L (250 ng) oder pHW-NS-xSH3G (250 ng) untersucht. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität entsprechend den Herstellerangaben bestimmt. Zur Kontrolle der Proteinexpression in den transfizierten Zellen wurden die Lysate mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert (siehe Kapitel 2.4.2 und 2.4.4).

2.5.5 Caspase-3/7-Aktivitätstest

Die Effektor-Caspasen-3 und -7 spielen eine Schlüsselrolle bei der zellulären Apoptose (siehe Kapitel 1.1.4). Die Apoptose-induzierenden oder –reprimierenden Eigenschaften der Influenza B Viren wt, P122/5L und xSH3G wurden in der vorlie-

genden Arbeit durch das *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay (PROMEGA) bestimmt. In diesem Assay wird ein Caspase 3/7-Substrat im *Caspase-Glo*[®]-Reagenz durch die endogenen Caspasen der lysierten Zellen gespalten. Das Reagenz enthält außerdem eine Luziferase, die das gebildete Spaltprodukt umsetzt. Das entstehende Lumineszenz-Signal kann gemessen werden und ist proportional zur Caspase-3/7-Aktivität der Zellen.

A549-Zellen wurden mit einer MOI von 10 mit den Influenza B Viren wt, P122/5L oder xSH3G infiziert. Zur Bestimmung des Hintergrund-Niveaus der Caspase 3/7-Aktivität wurden Zellen mit PBS⁺⁺-Puffer (Mock-) behandelt. Als Positivkontrolle wurden Mock-behandelte Zellen für 4,5 h mit 1 µM oder 10 µM Staurosporin versetzt. Staurosporin löst den programmierten Zelltod aus. Nach 19 h Infektion wurden die Zellen entsprechend der Herstellerangaben mit *Caspase-Glo*[®]-Reagenz behandelt und die Lumineszenz am *FLUOstar Omega*-Gerät (BMG LABTECH) gemessen.

2.6 Massenspektrometrie

Durch ein hochauflösendes massenspektrometrisches Verfahren wurden in der vorliegenden Arbeit B/NS1-Proteinkomplexe analysiert. Das Prinzip des Verfahrens beruht auf einem definierten Massenunterschied der Aminosäuren in zwei Zellpopulationen. Diese Zellpopulationen wurden mit wt-Virus bzw. der Virusmutante xSH3G infiziert und die Interaktionspartner der entsprechenden NS1-Proteine durch eine NS1-Ko-Immunopräzipitation isoliert. Die durch das Massenspektrometer gemessenen Massen- und Intensitätsunterschiede der Peptidsignale ließen auf spezifische Interaktionen der zellulären Proteine mit NS1-wt- oder NS1-xSH3G-Protein schließen (siehe Kapitel 3.6.1).

2.6.1 Inkorporation von Isotopen-markierten Aminosäuren in A549-Zellen

Zur Inkorporation der „schweren“ ¹³C₆-Aminosäuren Lysin und Arginin in das Proteom wurden A549-Zellen für sechs Passagen mit speziellem Medium inkubiert, das anstelle der herkömmlichen Aminosäuren, die Isotopen-markierten ¹³C₆-Aminosäuren Lysin und Arginin enthielt. Die Vermischung markierter und nicht-markierter Aminosäuren wurde durch Ablösen der Zellen mit speziellem Zell-Dissoziierungs-Puffer anstelle von Trypsin vermieden. Eine weitere Zellpopulation

wurde durch Inkubation der Zellen mit den „leichten“ $^{12}\text{C}_6$ –Aminosäuren Lysin und Arginin generiert. Der definierte Massenunterschied von 6 Da zwischen den Proteomen der „leichten“ und „schweren“ Zellpopulationen wurde mittels massenspektrometrischer Analyse bestätigt.

2.6.2 Infektion von SILAC-Zellen

Zur Analyse der NS1-wt- bzw. NS1-xSH3G-Proteinkomplexe wurden die durch „schwere“ oder „leichte“ Aminosäureisotope markierten Zellen (*Stable Isotope Labeling in Cell culture* – SILAC) im weiteren Verlauf des Versuchs infiziert. Dazu wurden für beide Zellpopulationen 8×10^7 SILAC-Zellen verwendet. Die „leichten“ Zellen wurden mit dem wt-Virus und die „schweren“ Zellen mit dem xSH3G-Virus mit einer MOI von 4 für 16 h infiziert (siehe Kapitel 2.2.3).

2.6.3 Zelllyse, BCA-Test und Ko-Immunopräzipitation

Die infizierten Zellen wurden mit PBS-Puffer (4 °C) gewaschen und mit Ko-IP-Puffer lysiert (siehe Kapitel 2.4.1). Die Proteinkonzentration in den Lysaten wurde durch einen BCA-Test (THERMO FISHER SCIENTIFIC) entsprechend des Herstellerprotokolls bestimmt. Die Proteine der beiden Zellpopulationen wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und diese Proteinmischung für eine NS1-Ko-Immunopräzipitation eingesetzt (siehe Kapitel 2.4.8.2). Dabei wurde 3 ml Lysat zusammen mit 50 µl Protein A Agarose (1:1 verdünnt in Ko-IP-Puffer) und 40 µl B/NS1-Antikörper für 16 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Protein-Agarose-Komplexe wurden mit Ko-IP-Puffer gewaschen und die Proteine durch 2 x SDS-Probenpuffer eluiert. Die Auftrennung und Detektion der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (siehe Kapitel 2.4.2 und 2.4.3).

2.6.4 Reduktion, Alkylierung und tryptischer Verdau der Proteine

Das SDS-Gel, das die aufgetrennten Proteine enthält, wurde in 20 x 3 mm große Gelstücke geschnitten. Jedes Gelstück wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit 200 µl Entfärbelösung (200 mM Ammoniumbicarbonat/40 % Acetonitril) bei 37 °C für 30 min schüttelnd inkubiert. Durch Zugabe von Acetonitril wurde das Gelstück getrocknet und anschließend mit 10 mM DTT-Lösung für 1 h bei 60 °C inkubiert. DTT

reduziert die Disulfidbindungen der Proteine. Die frei gewordenen Thiol (-SH) – Gruppen wurden durch Inkubation mit 5 mM Iodacetamid für 1 h bei RT °C unter Lichtausschluss alkyliert. Durch Zentrifugation in der *SpeedVac Univapo 150 H* (UNIEQUIP) wurden die Gelstücke für 20 min getrocknet.

Die getrockneten Gelstücke wurden nach Zugabe von 20 µl einer Trypsin-Lösung für 15 min inkubiert. Nach dem Aufquellen der Gelstücke wurde 50 µl Trypsin-Reaktionspuffer hinzugefügt und die Proteine für 16 h bei 37 °C tryptisch verdaut. Anschließend wurde der Überstand der Gelstücke in ein neues Gefäß überführt und die restlichen Peptide aus den Gelstücken durch 50 µl Peptid-Extraktionslösung (0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) / 50 % Acetonitril) bei 37 °C für 30 min extrahiert. Die Extraktionslösung wurde mit dem Überstand vereinigt und die Proben für 30 min in der *SpeedVac* eingedampft. Der Rückstand wurde für die Nano-LC/Orbitrap-Analyse in 25 µl Ameisensäure (0,1 %) gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.6.5 Messung mittels Nano-LC und Orbitrap

Zur Messung der Trypsin-verdauten Peptide wurden 8 µl jeder Probe mit einer Flussrate von 3 µl/min auf die Säule ReproSil-Pur C C18-A (75 µm x 10 cm) der Nano-LC (PROXEON) geladen. Unter einem linearen Gradienten von 2-40 % des Lösungsmittel B (99,9 % Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure) wurden die Proben für 95 min mit einem konstanten Fluss von 300 nl/min chromatographisch aufgetrennt. Die Proben gelangten aus der Nano-LC-Säule über eine NSI- (*Nano-Spray Ionisierung*) Quelle in das Massenspektrometer LTQ-Orbitrap Discovery (THERMO FISHER SCIENTIFIC). Die Spannung des Sprays betrug 1,4 kV, die Kapillare hatte eine Temperatur von 200 °C. Im Vorläuferscan (m/z 350-6500) wurden die Massenspektren mit einem Auflösungsvermögen von $M/\Delta M=30.000$ bei m/z 400 gemessen. Die fünf Peptid-Ionen mit der höchsten Intensität wurden durch CID (*Collision Induced Dissociation*) nach Akkumulierung von 10000 Ionen fragmentiert. Die daraus resultierenden MS/MS-Spektren wurden mit einer Verzögerungszeit von 30 sec gemessen. Die Daten wurden mittels *Xcalibur*-Software (THERMO FISHER SCIENTIFIC) dokumentiert.

2.6.6 Peptid- und Protein-Identifikation und -Quantifizierung

Die Rohdaten der 20 Proben/Gelstücke aus der massenspektrometrischen Analyse wurden vereinigt und mit dem *Proteome Discoverer* (THERMO FISHER

SCIENTIFIC) analysiert. Die Identifikation und Proteinzuzuordnung der Peptid-Ionen erfolgte durch das Auswertungsprogramm *Sequest*. Die gemessenen Spektren der tryptischen Peptide wurden durch *Sequest* mit 33286 Sequenzen von *Homo sapiens*-Proteinen der NCBI-(*National Center for Biotechnology Information*) Datenbank verglichen und die zugehörigen Proteine mit den folgenden Suchparametern identifiziert: Carbamidomethylierung von Cystein-Seitenketten als statische Modifizierung und $^{13}\text{C}_6$ -Kohlenstoff als Markierung und dynamische Modifizierung; Trypsin als proteolytisches Enzym mit bis zu 2 ungeschnittenen Trypsin-Schnittstellen; Massengenauigkeit: 2 ppm (*parts per million*); Massentoleranz der Vorläuferionen: 10 ppm; Massentoleranz der Fragmentionen: 0,8 Da; Maximale *False Discovery Rate* (FDR) für Peptide mit hoher Konfidenz: 0,01 und für Peptide mit mittlerer Konfidenz: 0,05. Die aus diesen Vorschriften resultierende Wahrscheinlichkeit der Proteinidentifikation durch die gemessenen Peptid-Ionen (in Prozent) wurde als *Peptid-Score* angegeben. Zur Quantifizierung der Signalintensitäten von „schweren“ und „leichten“ Peptid-Ionen wurden nur die Signale von unigenen, also einmalig vorkommenden, Ionen verwendet. Als Schwellenwert für das Verhältnis der Signalintensitäten von „leichten“ und „schweren“ Peptiden (*heavy/light-ratio*) wurde der Faktor 2 definiert. Damit kommt ein Peptid mit einer *heavy/light-ratio* ≥ 2 häufiger in NS1-xSH3G-Komplexen vor als in NS1-wt-Proteinkomplexen. Eine *heavy/light-ratio* $\leq 0,5$ bedeutet das höhere Vorkommen des Peptids in den präzipitierten NS1-wt-Proteinkomplexen, gegenüber den NS1-xSH3G-Komplexen. Die maximal erlaubte Differenz der Signalintensitäten wurde entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers als 100 definiert. Verhältnisse von „schweren“ zu „leichten“ Peptid-Ionen über dieser Differenz wurden ebenfalls gleich 100 gesetzt. Die Verhältnisse der Signalintensitäten verschiedener Peptide, die das gleiche Protein identifizieren, wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Die gemittelte Protein-*Ratio* wurde durch den Median aller gemessenen *heavy/light-protein ratios* normalisiert.

3 Ergebnisse

Konservierte Peptidsequenzen weisen bei RNA-Viren, denen durch die hohe Fehler-rate ihrer RNA-Polymerase eine rasche Anpassung an veränderte Umweltbedingungen gelingt, auf strukturell oder funktionell wichtige Proteinabschnitte hin.

Um die Funktion des in über 300 analysierten Influenza B Virusstämmen konservierten NS1-Sequenzmotivs 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 aufzuklären, wurden Virusmutanten mit Aminosäuresubstitutionen in diesem Bereich durch Methoden der reversen Genetik hergestellt. Die Vermehrungsfähigkeit, der zeitliche Verlauf der viralen Proteinexpression sowie die Genexpression der Virusmutanten wurden mit dem Wildtyp (wt) -Virus verglichen, um über den Phänotyp auf die Funktion der hochkonservierten Aminosäuresequenz während der viralen Vermehrung rückschließen zu können. Ein derartiger Ansatz ist eine klassische Methode zur Aufklärung von viralen Proteinfunktionen und wurde in mehreren früheren Beispielen erfolgreich eingesetzt (Hoffmann *et al.*, 2000; Dauber *et al.*, 2004; Donelan *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2009; Hrinicus *et al.*, 2010).

Der Einfluss der konservierten Peptidregion auf die Protein-Protein-Interaktionen von Virus und Wirt wurde erstmals in einem globalen Ansatz mittels hochauflösender Massenspektrometrie und durch Analyse zellulärer Signaltransduktionswege untersucht. Ferner wurde in infizierten Zellen die Fähigkeit der Virusmutanten zur IFN-Antagonisierung und Apoptoseinduktion analysiert und somit schließlich die Auswirkungen der Aminosäuresubstitutionen im NS1-Protein aufgeklärt.

3.1 Einfluss der hochkonservierten Aminosäuresequenz 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 im NS1-Protein auf die Replikation von rekombinanten Influenza B Viren

Zur Herstellung rekombinanter Influenza B Virusmutanten wurde das von Dauber *et al.* beschriebene revers-genetische acht-Plasmid System verwendet (Dauber *et al.*, 2004). Die cDNAs der acht viralen Gensegmente des Influenza B/Lee/40 Virus lagen dafür in pHW2000-Vektoren vor. Die Gensequenz des NS1-Proteins wurde mittels inverser PCR (siehe Kapitel 2.3.2.1) auf die Weise verändert, dass für eine Doppelmutante die Aminosäuren (AS) P122 und P125 gegen Leucine substituiert wurden (P122/5L) (Abb. 11). Diese Mutation der zwei hochkonservierten Proline sollte die Funktion des Proteinmotivs mit Ähnlichkeit zum Klasse II-SH3-Bindemotiv

(**PxxPxK/R**, siehe Abb. 11) stören, jedoch eine größere Veränderung der Sekundärstruktur des Proteins unterbinden. Christoph Dröseler bestätigte in seiner Dissertation die universelle Eigenschaft von vier ausgewählten SH3-Domänen, prolinreiche Sequenzmotive zu binden, zeigte jedoch auch, dass die einzelnen SH3-Domänen-Liganden-Interaktionen von zusätzlichen, spezifitätsdeterminierenden Resten der SH3-Binderegion abhängig waren. Er schlussfolgerte, dass die flankierenden Aminosäuren am SH3-Bindemotiv unterschiedlich starken Einfluss auf die Interaktion mit der SH3-Domäne nehmen (Dröseler, 2005).

SH3-Bindemotiv		<u>P</u>	x	x	<u>P</u>	x	<u>K/R</u>				
Hochkonserviertes AS-Motiv in aviären A/NS1 Proteinen	211-	R	<u>P</u>	P	L	<u>P</u>	P	<u>K/R</u>	-217		
Hochkonserviertes AS-Motiv in B/NS1 Proteinen	121-	<u>Y</u>	<u>P</u>	P	T	<u>P</u>	G	<u>K/R</u>	-127		
B-Lee-NS1 Originalsequenz:	361-	TAC	CCT	CCA	ACC	CCA	GGA	AAG	TAC	CTT	-387 nt
	121-	Y	P	P	T	P	G	K	Y	L	-129 AS
B-Lee-P122/5L Mutierte Sequenz:	121-	Y	L	P	T	L	G	K	Y	L	-129 AS
	361-	TAC	CTG	CCA	ACC	CTG	GGA	AAG	TAC	CTT	-387 nt
					↑						
					<i>BspMI</i>						
B-Lee-xSH3G Mutierte Sequenz:	121-	Y	G	G	G	G	G	G	Y	L	-129 AS
	361-	TAC	GGT	GGA	GGC	GGA	GGA	GGG	TAC	CTT	-387 nt
									↑		
									<i>ACC65I</i>		

Abb. 11: Schematische Darstellung eines Klasse II-SH3-Bindemotivs (Dröseler, 2005) sowie der Mutationen im konservierten NS1-Motiv 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127 auf Nukleotid (nt) - und Aminosäure (AS) -Ebene. Die veränderten Nukleotide und Aminosäuren sind in rot dargestellt. Die für die inverse PCR verwendeten Schnittstellen sind durch Pfeile, die Restriktionsenzyme kursiv und die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme durch Linien markiert.

Um nicht nur die beiden hochkonservierten Proline, sondern die gesamte konservierte Sequenz 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127 mit seinen flankierenden Aminosäuren zu eliminieren, wurde die Nukleotidsequenz des NS1-Segmentes durch inverse PCR dahingehend verändert, dass die Aminosäuren P122, P123, T124, P125, und K127 im mutierten NS1-Protein gegen Glycine ersetzt waren (Abb. 11). Die entstandene Mutante P122G/P123G/T124G/P125G/K127G wird im weiteren Verlauf der Arbeit – zur

Vereinfachung und aufgrund der Ähnlichkeit der Ausgangssequenz mit SH3-Bindemotiven – xSH3G genannt.

Nach Mutation der pHW2000-NS-Plasmide in pHW-NS-P122/5L bzw. pHW-NS-xSH3G (siehe Kapitel 2.3.2.1) wurden diese in zwei getrennten Ansätzen zusammen mit den übrigen sieben Plasmid-Vektoren des B/Lee-Systems in Zellen transfiziert. Nach dem sequentiellen Passagieren der Überstände in MDCKII-Zellen und in zehn Tage alten Bruteiern wurde die virushaltige Allantoisflüssigkeit gesammelt und bei -80 °C gelagert (siehe Kapitel 2.2.5). Durch RNA-Isolierung, reverse Transkription und Sequenzierung wurden die eingebrachten Mutationen in den rekombinanten Viren bestätigt (siehe Kapitel 2.2.6, 2.3.1 und 2.3.10).

3.1.1 Die Substitution der gesamten 122-**P**-x-x-**P**-x-(**K/R**)-127-Sequenz führt zu gesteigerter Replikation von Influenza B Viren in humanen Zelllinien

Um einen Spezies-spezifischen Effekt der B/NS1-Mutationen zu eruieren, wurden die Virusmutanten P122/5L und xSH3G hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit in humanen und kaninen Epithelzellen, sowie im Brutei untersucht. Dafür wurden die Epithelzellen mit Wildtypvirus bzw. den Virusmutanten P122/5L oder xSH3G mit einer MOI (*Multiplicity Of Infection*) von 0,01 und die Bruteier mit 500 FFU (*Fluorescence Forming Units*) infiziert. Die Virusvermehrung wurde in einem Zeitraum von 72 h oder 96 h (Epithelzellen) bzw. 3 d (Bruteier) analysiert. Die Virustiter wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Avicel-Plaque-Assay bestimmt (Abb. 12).

In Hundenieren-Epithelzellen (MDCK: *Madin Darby Canine Kidney*) und in der Allantoisflüssigkeit von zehn Tage alten bebrüteten Hühnereiern führten die Mutationen im NS1-Protein der humanpathogenen Influenza B Viren zu keiner Veränderung in der Vermehrungsfähigkeit der Viren (Abb. 12A und 12B). Die Endtiter nach 96 h Infektion (MDCK-Zellen) bzw. 3 d Infektion (Hühnereier) lagen für das Wildtypvirus und die Virusmutanten P122/5L und xSH3G bei 5×10^8 FFU/ml.

In humanen Epithel-Lungenkarzinomzellen (A549-Zellen) replizierte das Wildtypvirus nur bis zu einem Titer von $1,2 \times 10^3$ FFU/ml. Die Mutationen im konservierten NS1-Motiv führten nicht zu einer reduzierten Vermehrungsfähigkeit der Virusvarianten. Die Virusmutante P122/5L zeigte bis 48 h p.i. eine ähnliche Vermehrungskinetik wie das Wildtypvirus und 72 h p.i. einen leicht erhöhten Virustiter von ungefähr einer Log-Stufe. Interessanterweise führte die Substitution des gesamten konservierten Motivs

hingegen zu einer stark erhöhten Virusreplikation. 72 h nach Infektion erreichte die Virusmutante xSH3G einen Titer von $2,6 \times 10^6$ FFU /ml, der gegenüber dem Wildtypvirus um drei Log-Stufen signifikant erhöht war (Abb. 12C).

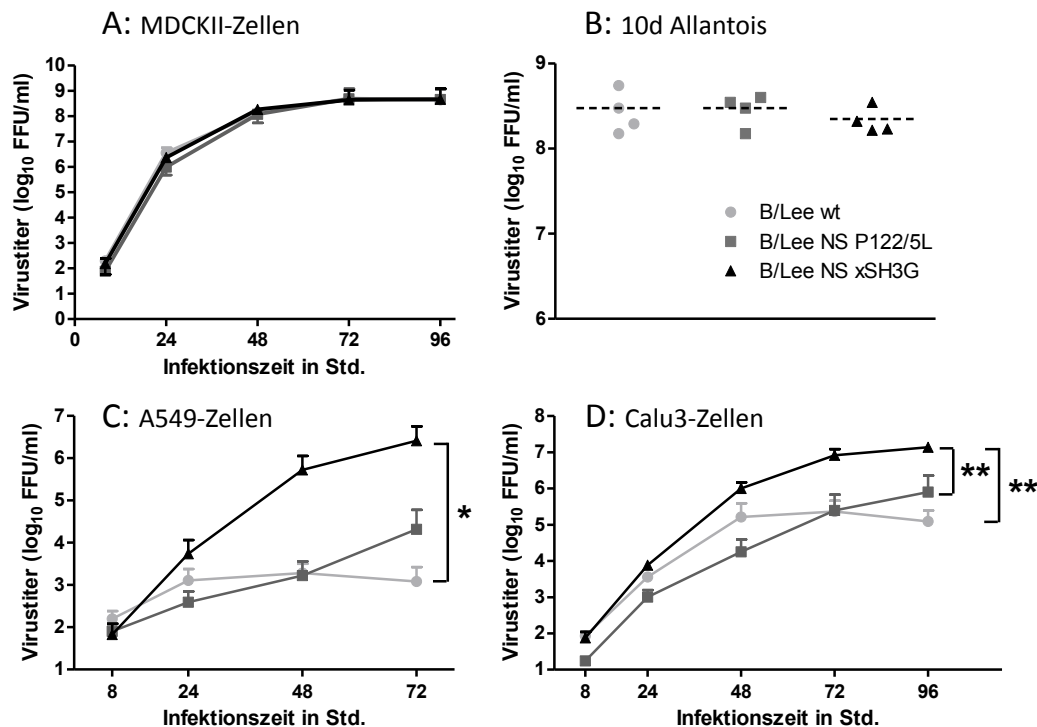


Abb. 12: Substitution der gesamten 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenz führt zu gesteigerter Replikation von Influenza B Viren in humanen Zelllinien. MDCKII-Zellen (A), A549-Zellen (C) und Calu3-Zellen (D) wurden mit wt-, P122/L- oder xSH3G-Virus mit einer MOI von 0,01 infiziert. Zellkulturüberstände wurden zu den angegebenen Zeitpunkten abgenommen und mittels Avicel-Plaque-Assay titriert. Dargestellt sind die Mittelwert und Standardabweichungen (SD) von sechs (A) bzw. vier (C und D) unabhängigen Versuchen. B: 10 Tage (10 d) alte bebrütete Hühnereier wurden mit 500 FFU der angegebenen Viren infiziert und 3 d inkubiert. Die Allantoisflüssigkeit der Eier wurde mittels Avicel-Plaque-Assay titriert. Dargestellt sind die Virustiter von je vier infizierten Eiern, sowie der Mittelwert. Die statistische Signifikanz der detektierten Differenzen zwischen wt und xSH3G (C: $p \leq 0,05$ (*)) bzw. zwischen wt oder P122/5L und xSH3G (D: $p \leq 0,01$ (**)) wurde durch Student's T-Test berechnet.

Zum Ausschluss eines zelltypspezifischen Effektes wurden für eine weitere Vermehrungskinetik humane Lungen-Adenokarzinomzellen (Calu-3-Zellen) verwendet. Hier zeigten die Virusmutanten ähnliche Vermehrungseigenschaften wie in A549-Zellen. Während das Wildtypvirus bis zu einem Virustiter von $1,2 \times 10^5$ FFU/ml replizierte, bewirkte die P122/5L-Mutation eine leicht verstärkte Virusvermehrung von ungefähr einer Log-Stufe (96 h p.i.). Die vollständige Substitution des konservierten Motivs im B/NS1-Protein führte zu einer signifikant erhöhten Virusreplikation von zwei Log-Stufen auf $1,4 \times 10^7$ FFU/ml (Abb. 12D).

Die Substitution der gesamten 122-**P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Peptidsequenz im B/NS1-Protein führte demnach zu einer stark gesteigerten Replikation von Influenza B Viren in humanen Zelllinien.

3.1.2 Die Substitution der gesamten 122-**P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Sequenz führt zu früher viraler Proteinsynthese im Infektionsverlauf

Um den Einfluss der NS1-Mutationen P122/5L und xSH3G auf die Expression von viralen Proteinen im Infektionsverlauf zu untersuchen, wurden A549-Zellen mit einer Multiplizität von 2 infiziert und Aliquots nach einer Infektionsdauer von 4 h, 6 h, 8 h bzw. 16 h lysiert. Die extrahierten Proteine wurden im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Immunoblot wurden die viralen Proteine PB2, NS1 und NP durch spezifische Antikörper sichtbar gemacht (Kapitel 2.4.4). Der Antikörper gegen das virale PB2-Protein von Influenza B Viren wurde mithilfe der Firma *BioGenes GmbH* hergestellt (Kapitel 2.3 und 2.4.5). Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinexpression in den analysierten Zelllysaten wurde das in Zellen ubiquitär exprimierte Zytoskelettprotein Aktin verwendet.

Der Immunoblot in Abbildung 13 zeigt für das Wildtypvirus 6 h p.i. nur eine geringe NS1-Proteinexpression, sowie 8 h p.i. eine beginnende PB2- und NP-Expression.

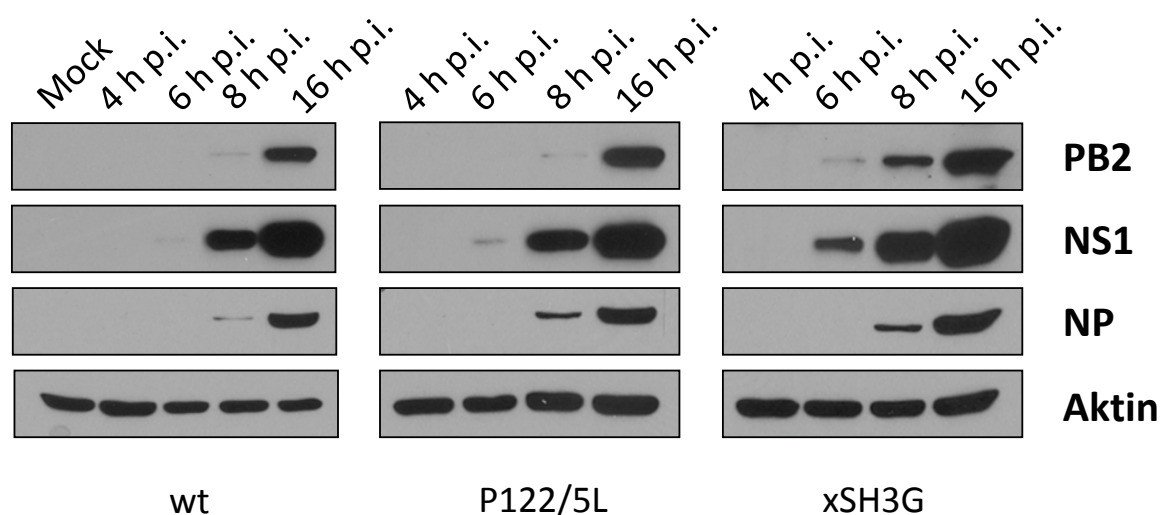


Abb. 13: Die Substitution der gesamten 122-**P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Sequenz führt zu früher viraler Proteinsynthese im Infektionsverlauf. A549-Zellen wurden mit wt-, P122/5L- oder xSH3G-Viren mit einer MOI von 2 infiziert oder Mock-behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und im Immunoblot die Expression der Proteine PB2, NS1, NP und Aktin über spezifische Antikörper untersucht. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Ein vergleichbares Expressionsmuster ist für die Virusproteine der P122/5L-Mutante zu erkennen. Im Gegensatz dazu wird das PB2-Protein des xSH3G-Virus bereits 6 h p.i. exprimiert und das NS1-Protein zeigt 6 h p.i. eine deutlich verstärkte Expression im Vergleich zum Wildtypvirus und zur P122/5L-Virusmutante.

Die Virusmutante xSH3G zeigt im Vergleich zum Wildtypvirus und der Virusmutante P122/5L eine um ca. 2 h beschleunigte Expression von viralen Proteinen in A549-Zellen (Abb. 13).

3.1.3 Die Substitution der gesamten 122-**P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Sequenz beschleunigt die Relokalisierung der viralen NS1- und NP-Proteine während der Replikation

Für die Analyse des Einflusses des Aminosäuremotivs 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 auf die subzelluläre Verteilung der Virusproteine NS1 und NP, wurden humane HeLa-Epithelzellen mit dem Wildtypvirus bzw. den Virusmutanten P122/5L oder xSH3G mit einer MOI von 2 infiziert. Nach 4 h, 8 h und 16 h Infektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die viralen Proteine NS1 und NP wurden durch spezifische Erstantikörper detektiert und die Proteinlokalisierung mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (*Confocal Laser Scanning Microscopy* – CLSM) analysiert (Abb. 14).

Das NS1-Protein des Wildtypvirus und der Virusmutanten war im frühen Infektionsstadium (4 h p.i.) im Zellkern und dort primär in nukleären Speckledomänen lokalisiert, wie bereits früher beschrieben wurde (Schneider *et al.*, 2009). Das Nukleoprotein des Wildtypvirus und der Virusmutanten war hingegen diffus im Nukleoplasma verteilt.

Nach 8 h Infektion zeigten sich Unterschiede in der Lokalisierung der NS1- und NP-Proteine von Wildtypvirus und den Virusmutanten. Während die NS1-Proteine des wt und der P122/5L-Mutante noch in den nukleären Speckledomänen lokalisiert waren, zeigte das NS1-Protein der xSH3G-Virusmutante bereits eine deutliche Relokalisierung in das Nukleo- und Zytoplasma. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich bei der Verteilung des NP. Dieses war 8 h p.i. bei Wildtypvirus und der P122/5L-Virusmutante noch ausschließlich im Kern lokalisiert, zeigte nach Infektion mit der xSH3G-Virusmutante jedoch neben der diffusen nukleären Verteilung auch eine diffuse Verteilung im Zytoplasma.

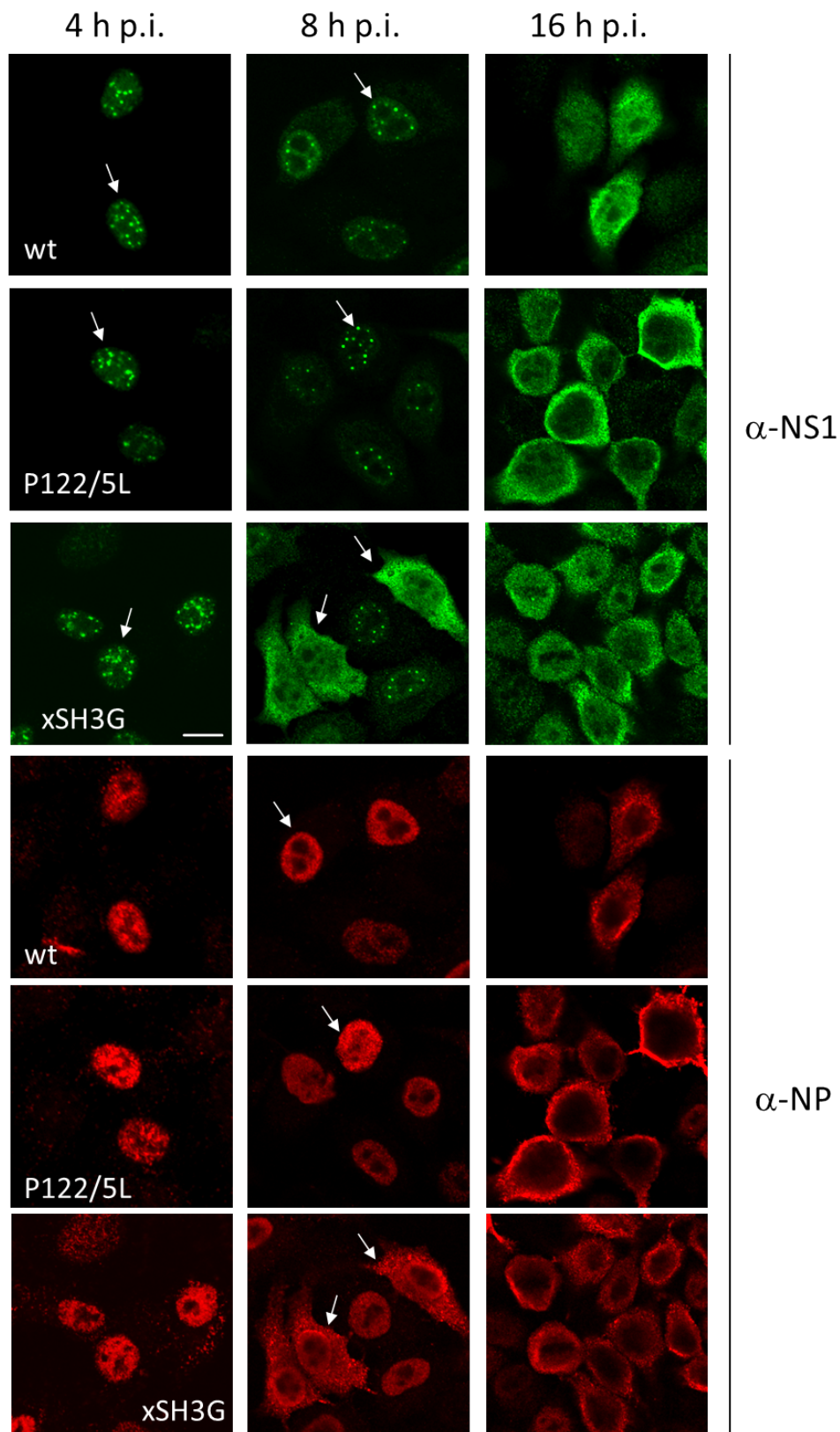


Abb. 14: Die Substitution des gesamten 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motivs beschleunigt die Relokalisierung der viralen NS1- und NP-Proteine ins Zytoplasma. HeLa-Zellen wurden mit einer MOI von 2 und dem wt-, P122/5L- oder xSH3G-Virus infiziert. 4 h, 8 h, 16 h p.i. wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die viralen Proteine NP und NS1 mit spezifischen Primärantikörpern und Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt. Anschließend wurden die Zellen im konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) analysiert. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche. Maßstab: 10 μ m.

Nach 16 h Infektion war das NS1-Protein des Wildtypvirus und der Virusmutanten P122/5L bzw. xSH3G diffus in Kern und Zytoplasma lokalisiert. Das NP-Protein war ins Zytoplasma relokalisiert.

Die Substitution der gesamten 122-**P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Sequenz im B/NS1-Protein scheint demnach die Relokalisierung der viralen NS1- und NP-Proteine ins Zytoplasma der infizierten humanen Epithelzellen zu beschleunigen und damit die gesteigerte Replikationsfähigkeit zu begünstigen.

3.1.4 Die Substitutionen im 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motiv des NS1-Proteins führen zu gesteigerter viraler Genexpression im Vergleich zum wt

Die vorangegangenen Experimente hatten eine gesteigerte virale Vermehrungsfähigkeit der xSH3G-Virusmutante, sowie deren Fähigkeit zur beschleunigten Proteinexpression und –relokalisierung gezeigt. Da die beschleunigte virale Proteinexpression in Zusammenhang mit der Aktivität der viralen RNA-Polymerase stehen kann, wurde der Einfluss des konservierten Motivs im NS1-Protein auf die virale Genexpression in einem Luziferase-Minigenomassay analysiert. In diesem Assay wird die RNA-Polymeraseaktivität indirekt durch Detektion der Luziferase-Aktivität gemessen (Forbes *et al.*, 2012). Dafür wurden ein Luziferase-Reporterkonstrukt (pPol-Luc) zusammen mit pHW-Expressionskonstrukten des viralen Polymerasekomplexes – bestehend aus PB1, PB2, PA und NP – in humane epitheliale Nierenzellen (293T-Zellen) transfiziert. In dem Reporterkonstrukt wird das Luziferase-Gen durch einen humanen Polymerase I-Promotor kontrolliert. Nach Transfektion wird in den Zellen virusähnliche vRNA mit negativer Polarität gebildet. Durch den viralen Polymerasekomplex kann diese in mRNA transkribiert und das Enzym Luziferase in den Zellen gebildet werden. Die Luziferase setzt das Substrat Luziferin um. Die Luziferase-Aktivität in den Zellen wird durch Lumineszenz-Messung bestimmt und korreliert folglich mit der transkriptionellen und replikativen Aktivität der viralen Polymerase. Für das A/NS1-Protein wurde (bei Koexpression des zellulären Faktors SF2/ASF) in der AG Wolff ein stimulatorischer Effekt auf die virale RNA-Polymeraseaktivität beschrieben (Franz, Wolff, unpublizierte Daten).

Durch Ko-Transfektion des pHW-B/NS-Expressionskonstruktes wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des B/NS-Segments bzw. der hochkonservierten Sequenz im NS1-Protein untersucht (Abb. 15).

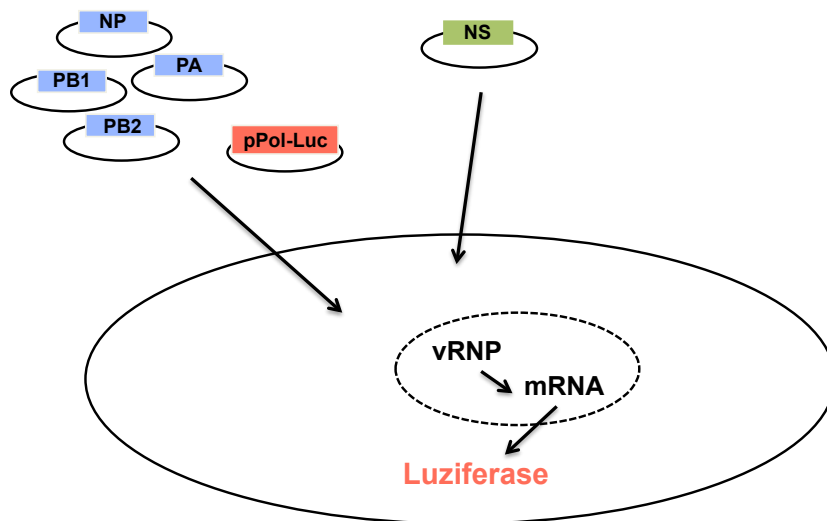


Abb. 15: **Influenza B Virus Minigenom-Assay**. 293T-Zellen wurden mit pPol-Luc und pHW-Konstrukten des viralen Polymerasekomplexes (PA, PB1, PB2 und NP) transfiziert. Das pHW-NS-Konstrukt wurde ko-transfiziert, um den Einfluss des NS1-Proteins auf die Expression viraler Konstrukte zu untersuchen.

Zur Titration der geeigneten pHW-NS-Plasmidkonzentration wurden die 293T-Zellen mit den Konstrukten des Polymerasesatzes, dem Reporterplasmid sowie verschiedenen Mengen des pHW-NS-wt-Konstruktes in drei unabhängigen Versuchen ko-transfiziert (Abb. 16A).

Der normalisierte Wert des Transfektionsansatzes ohne pHW-NS-Plasmid wurde als Positivkontrolle mit 100 % definiert. Die übrigen Werte wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne das pHW-PB1-Plasmid. In diesen Zellen wurde kein vollständiger Polymerasekomplex und somit auch nur Hintergrundwerte der Luciferase gebildet. Abbildung 16A zeigt, dass die Polymeraseaktivität mit zunehmender NS-Segmentkonzentration abnahm. Im Immunoblot wurde die zunehmende NS1-Proteinkonzentration der Transfektionsansätze, sowie die gleichmäßige Gesamtproteinkonzentration (Aktin) der Zellen bestätigt.

Der Einfluss des NS1-121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motivs auf die virale Genexpression wurde in einem weiteren Versuchsansatz mit einer pHW-NS-Plasmidkonzentration von 250 ng untersucht. Dazu wurden das Wildtyp- bzw. die mutierten pHW-NS-Plasmide mit dem Polymerasesatz und dem Reporterplasmid ko-transfiziert. Die Luciferaseaktivität des pHW-NS-wt-Ansatzes wurde als 100 % definiert und der Einfluss der Mutationen im hochkonservierten Motiv dazu ins Verhältnis gesetzt.

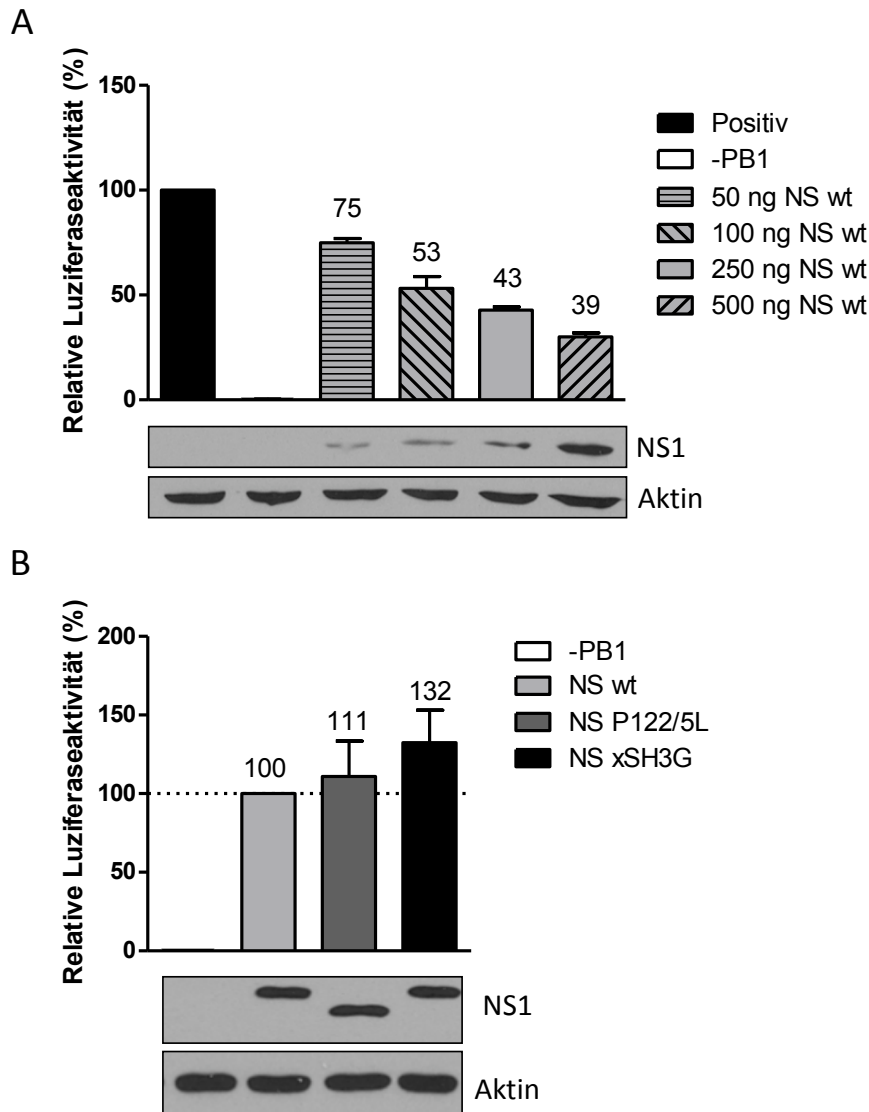


Abb. 16: Substitutionen im NS1-121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motiv führen zu gesteigerter viraler Genexpression im Vergleich zum wt. A: Titrierung des NS-Segementes. Im Minigenomassay wurden die Konstrukte pHW-PB1, pHW-PB2, pHW-PA und pHW-NP zusammen mit dem Luciferase-Reporterkonstrukt pPol-Luc in 293T-Zellen transfiziert. Die pHW-NS-wt-Konstrukte wurden in den angegebenen Konzentrationen ko-transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Luciferase-Aktivität gemessen und die Proteinexpression von NS1 und Aktin im Immunoblot nachgewiesen. Als Positivkontrolle fungierte ein Ansatz *ohne pHW-NS-Konstrukt*, die Negativkontrolle war ein Ansatz ohne pHW-PB1-Plasmid (-PB1). Die Plasmidmengen wurden durch Transfektion eines pHW-Leervektors angeglichen. Die Zahlen über den Balken sind Angaben in Prozent im Verhältnis zur Positivkontrolle (100 %). B: Ko-Transfektion von 250 ng pHW-NS-wt, bzw. pHW-NS-P122/5L oder pHW-NS-xSH3G. Die Zahlen über den Balken sind Angaben in Prozent im Verhältnis zu pHW-NS-wt (100 %). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (SD) von drei unabhängigen Versuchen.

Dabei zeigte sich, dass eine Veränderung der Sequenz zu gesteigerter viraler Genexpression im Vergleich zum NS1-wt-Protein führt. Während die P122/5L-Mutation zu 11 % mehr Luciferaseaktivität führt, steigert die Substitution des gesamten Motivs (xSH3G) die Genexpression um 32 %. Diese gesteigerte Genexpression im Vergleich zum NS1-wt-Protein weist auf einen Einfluss des konservierten Sequenzmo-

tivs 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 auf die Polymeraseaktivität hin. Im Immunoblot wurde die gleichmäßige NS1- und Aktinkonzentration der einzelnen Ansätze detektiert (Abb. 16B).

3.1.5 Die Substitutionen im 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Aminosäuremotiv führen zu verstärkter Interaktion von NS1 mit viralen Polymerasekomponenten

Für das NS1-Protein von Influenza A Viren wurde eine Interaktion mit viralen Ribonukleoproteinkomplexen (vRNP) und spezifisch mit dem Nukleoprotein in den Chromatinfractionen der Zelle beschrieben (Marión *et al.*, 1997, Robb *et al.*, 2011). Diese und weitere Studien implizieren eine regulatorische Aktivität des NS1-Proteins bei der viralen RNA-Synthese, vermutlich bei der Regulation der transkriptionellen Aktivität der viralen Polymerase (Robb *et al.*, 2011, Min *et al.*, 2007, Shimizu *et al.*, 1994).

Zur Analyse einer möglichen Interaktion des B/NS1-Proteins mit vRNP-Komplexen und der Beteiligung des 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motivs, wurden A549-Zellen mit einer MOI von 10 für 8 h mit dem rekombinanten B/Lee wt-Virus bzw. den Virusmutanten P122/5L oder xSH3G infiziert. Die Zellysate wurden 16 h bei 4 °C mit NP-Antikörpern immunopräzipitiert und die gebundenen Proteinkomplexe wurden in SDS-Probenpuffer bei 95 °C eluiert (siehe Kapitel 2.4.8.2). Die präzipitierten Proteine wurden im Immunoblot analysiert (Abb. 17).

Das Nukleoprotein wurde in allen Virus-infizierten Ansätzen gleichmäßig präzipitiert. Das PB2-Protein interagiert mit dem NP in allen Ansätzen mit gleicher Intensität. Das NS1-Protein von Influenza B Viren wurde durch das Nukleoprotein der vRNP-Komplexe ko-präzipitiert. Die Mutationen im hochkonservierten 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motiv verstärkten diese Interaktion um das Fünf- bis Sechsfache (Abb. 17C). Die NP-Bindung der NS1-xSH3G-Proteinmutante war dabei geringfügig stärker als die des NS1-P122/5L-Proteins. Durch Inkubation der Zellysate mit einem Kontrollantikörper (α -V5) wurde eine unspezifische Wechselwirkung der Virusproteine ausgeschlossen (Abb. 17B).

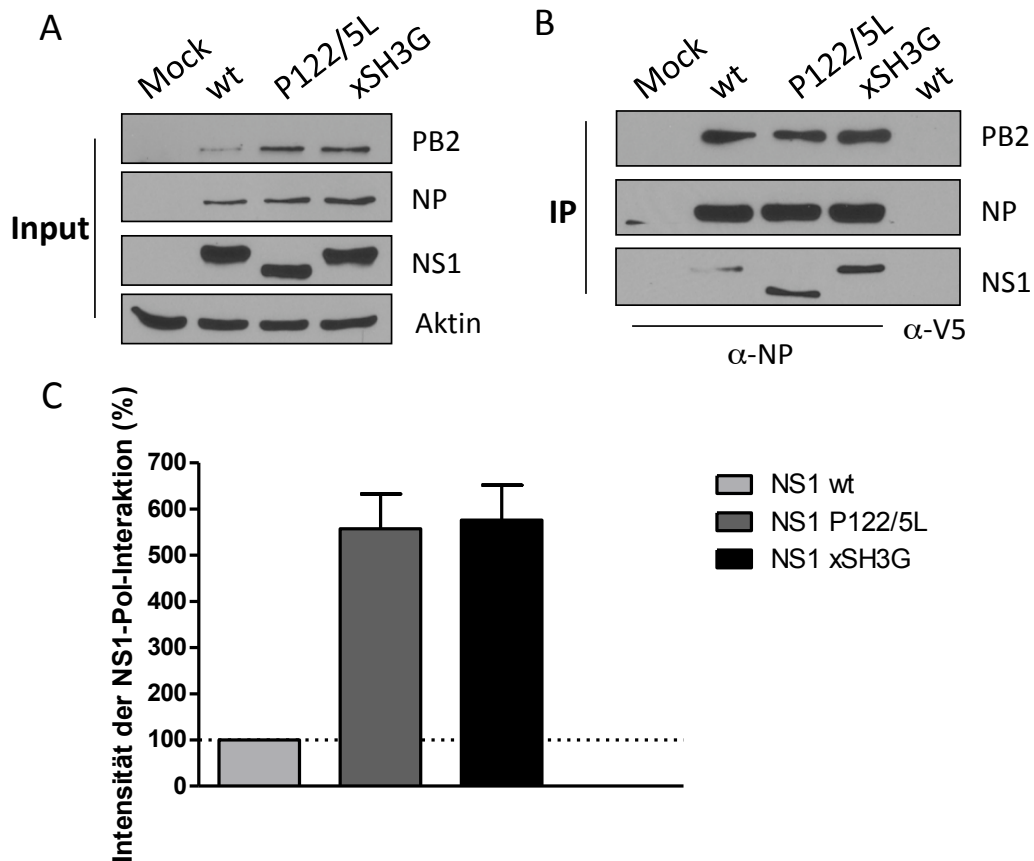


Abb. 17: Substitutionen im NS1-121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motiv führen zu verstärkter Interaktion von NS1 mit viralen Polymerasekomponenten. A549-Zellen wurden Mock-infiziert oder mit wt-, P122/5L und xSH3G-Viren mit einer MOI von 10 infiziert. Die Zellen wurden 8 h p.i. lysiert und die Zellysate über Nacht mit einem NP-spezifischen Antikörper inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden eluiert. Im Immunoblot wurden Input und IP durch spezifische PB2-, NP-, NS1- und Aktin-Antikörper analysiert. Die NS1-NP-Interaktion von zwei unabhängigen Versuchen wurde mittels AIDA-Software quantifiziert.

3.2 Das 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motiv hat keinen Einfluss auf Fähigkeit der Interferon-Antagonisierung des NS1-Proteins

Nachdem die bisher gezeigten Analysen deutlich zeigten, dass das untersuchte NS1-121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motiv einen regulatorischen Einfluss auf die virale Vermehrung besitzt, wurde versucht dieser Phänotyp mit Effekten in den Wirtszellen zu korrelieren. Virus-infizierte Zellen produzieren und sekretieren Typl-Interferone (IFN). Dies sind virusinduzierte Zytokine mit antiviraler Wirkung, die benachbarte Zellen zur Bildung von antiviralen Proteinen anregen. Dadurch vermitteln IFN eine intrazelluläre Resistenz (einen „antiviralen Zustand“) und begrenzen somit die weitere Virusausbreitung (Kayser *et al.*, 2005).

Um den Einfluss von IFN auf die Vermehrung der 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Virusmutanten zu analysieren, wurden IFN-defiziente Nierenepithelzellen der Grünen

Meerkatze (Vero-Zellen) mit dem wt-Virus bzw. den Virusmutanten P122/5L oder xSH3G infiziert. Die Zellkulturüberstände wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion abgenommen und mittels Avicel-Plaque-Assay titriert (Abb. 18A). Hierbei zeigte sich eine ähnliche Vermehrungskinetik der Viren wie auf humanen Zelllinien mit intaktem TypI-IFN-System (Kapitel 3.1.1). Während die P122/5L-Virusmutante 72 h p.i. eine leicht erhöhte Virusvermehrung von ungefähr 0,5 Log-Stufen im Vergleich zum wt-Virus zeigte, war der Virustiter der xSH3G-Virusmutante zu diesem Zeitpunkt um fast 4 Log-Stufen gegenüber dem wt-Virustiter erhöht (Abb. 18A). Demnach ist das xSH3G-Virus unabhängig vom IFN-Level in infizierten Primatenzellen zu einer stark erhöhten Virusreplikation fähig.

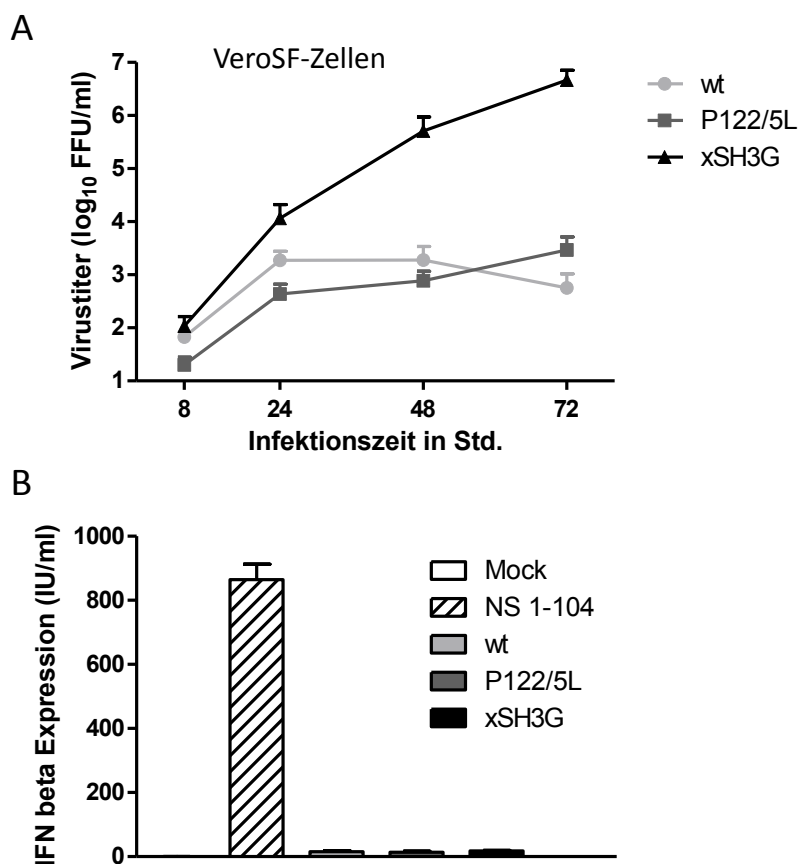


Abb. 18: Das 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motiv hat keinen Einfluss auf die NS1-Fähigkeit der Interferon-Antagonisierung. A: Vermehrung in IFN-defizienten VeroSF-Zellen. Serumfreie Vero-Zellen wurden mit den Viren wt, P122/5L und xSH3G mit einer MOI von 0,01 infiziert. Nach den angegebenen Infektionszeitpunkten wurde ein Teil des Zellkulturüberstandes abgenommen und mittels Avicel-Plaque-Assay titriert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) von vier unabhängigen Versuchen. B: A549-Zellen wurden mit den indizierten Viren und einer MOI von 1 infiziert. 20 h p.i. wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und mit einem IFN β -ELISA nach Herstellerangaben analysiert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) von drei unabhängigen Versuchen.

Sowohl die N-terminale RNA-Bindungsdomäne (AS 1-93) als auch die C-terminale Effektor-domäne (AS 94-281) des NS1-Proteins sind unabhängig voneinander fähig die Typ1-IFN-Induktion in infizierten Zellen zu inhibieren (Donelan *et al.*, 2004). Der Einfluss des 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motivs auf diese IFN-Antagonisierung wurde mittels IFN β -ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) bestimmt (siehe Kapitel 2.4.9). Als Positivkontrolle wurde das rekombinante B/Lee/40-NS 1-104-Virus verwendet. Diesem Virus fehlt die C-terminale Region des NS1-Proteins (AS 105-281). Daher ist es nicht mehr fähig die IFN-Induktion in den infizierten A549-Zellen zu inhibieren. Im Versuch zeigte sich für dieses Virus eine hohe IFN-Konzentration im Überstand infizierter Zellen von mehr als 200 IU/ml. Die Infektion mit B/Lee wt-Virus führte dagegen nur zu einer sehr geringen Erhöhung der Basis-IFN-Sekretion von infizierten Zellen. Die Mutationen im konservierten NS1-121-127-Motiv hatten keine Veränderung der IFN-Ausschüttung im Vergleich zum wt-Virus zur Folge (Abb. 18B). Demnach sind in IFN-kompetenten A549-Zellen beide Virusmutanten (P122/5L und xSH3G) zur IFN-Antagonisierung fähig und zeigen in diesen Zellen eine ähnliche Replikationskinetik wie in IFN-defizienten Vero-Zellen.

3.3 Das hochkonservierte 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motiv vermittelt die Wechselwirkung des B/NS1-Proteins mit dem zellulären Adaptorprotein CrkII**

Das konservierte 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motiv im B/NS1-Protein zeigt Homologien zu einem Sequenzmotiv, das im NS1-Protein vieler aviärer Influenza A Viren, sowie des „Spanischen Grippe“-Virus identifiziert wurde. Diese Sequenz 211-**R-P-P-L-P-P-K**-217 wurde als Klasse II-SH3-Bindemotiv beschrieben und ist für die Bindung der SH3-Domänenproteine Crk/CrkL wichtig (Heikkinen *et al.*, 2008). Die Crk-A/NS1-Bindung führt zur Suppression des antiviralen JNK/ATF2-Signalweges und damit zur Hemmung der Apoptose in infizierten Zellen (Hrincius *et al.*, 2010).

Für das B/NS1-Protein wurde ebenfalls eine Interaktion mit dem Adaptorprotein Crk beschrieben (Sadewasser, Krämer, Wolff, unpublizierte Daten). Daher stellte sich für die vorliegende Arbeit die Frage, ob das konservierte Sequenzmotiv 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 eine Rolle bei der NS1-Crk-Interaktion spielt. Dazu wurden A549-Zellen mit wt-, P122/5L- oder xSH3G-Viren für 8 h infiziert. Mit einem Crk-spezifischen Antikörper wurde das Adaptorprotein präzipitiert. Im Immunoblot konnte eine Interaktion des Crk-Proteins mit dem wt-NS1-Protein bestätigt werden (Abb. 19B).

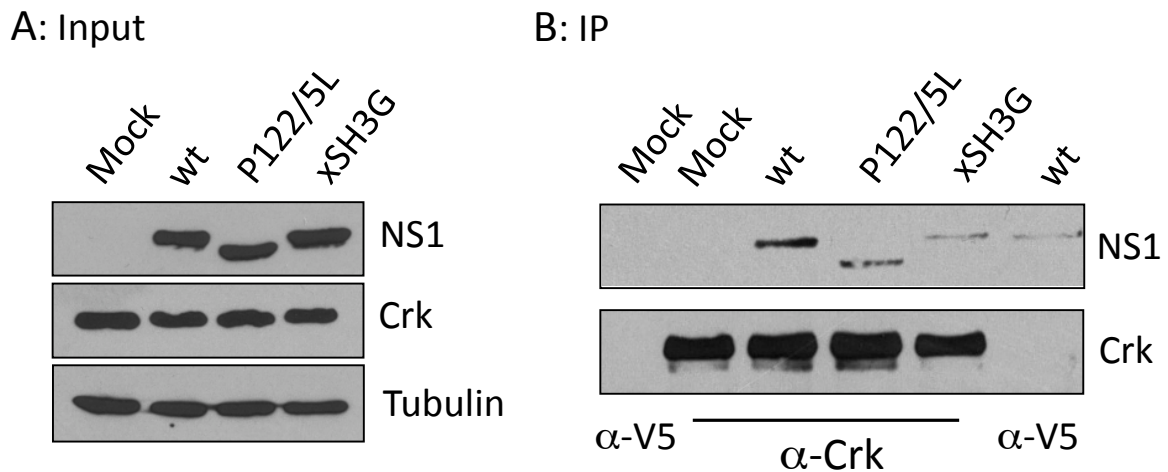


Abb. 19: Das 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motiv vermittelt die Crk-NS1-Interaktion. A549-Zellen wurden Mock-behandelt oder mit wt-, P122/5L- bzw. xSH3G-Viren und MOI 2 infiziert. 8 h p.i. wurden Zellysate hergestellt und 16 h bei 4 °C mit einem Crk-spezifischen Erstantikörper und Protein G Agarose inkubiert. Die präzipitierten Proteinkomplexe wurden nach Auftrennung im SDS-Gel durch Immunoblotanalyse detektiert. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

Interessanterweise führten die Mutationen P122/5L und xSH3G im NS1-Protein zur Abschwächung der Crk-NS1-Interaktion. Je stärker das 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motiv verändert wurde, desto weniger Crk-B/NS1-Komplexe wurden detektiert: nach Infektion mit der xSH3G-Virusmutante wurde weniger NS1-Protein durch Crk ko-präzipitiert als nach Infektion mit der Doppelmutante P122/5L (Abb. 19B). Die Crk-B/NS1-Interaktion scheint also, wie bei aviären Influenza A Viren, abhängig vom konservierten P-x-x-P-x-(K/R)-Motiv zu sein.

3.3.1 B/NS1-Crk-Interaktion ist früh im Infektionsverlauf im Zellkern lokalisiert

Crk-Proteine werden ubiquitär exprimiert und sind durch ihre Fähigkeit Proteinkomplexe zu bilden an der Regulierung vieler zellulärer Signalwege beteiligt. Durch Lokalisationsstudien wurde im Folgenden untersucht, zu welchem Zeitpunkt und in welchem Kompartiment der Zelle die Crk-NS1-Interaktion stattfindet.

Hierzu wurden humane Cervixkarzinom-Zellen (HeLa-Zellen) mit wt-Virus infiziert und nach 4 h, 8 h und 16 h fixiert und permeabilisiert. Durch spezifische Antikörper wurden Crk- und NS1-Proteine markiert und mittels Fluorochrom-gekoppelter Zweitantikörper im konfokalen Laserscanning-Mikroskop sichtbar gemacht (Abb. 20).

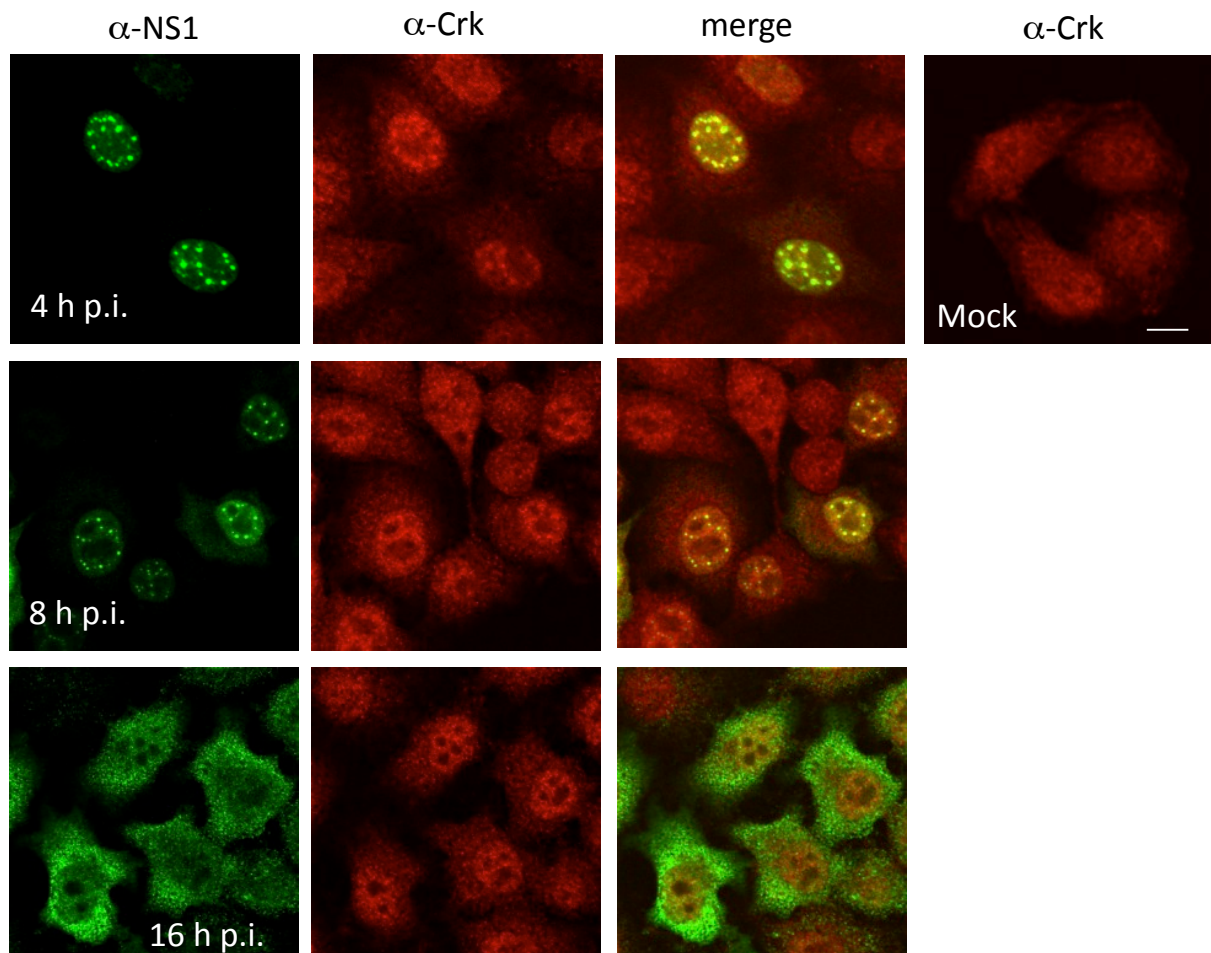


Abb. 20: Crk-NS1-Interaktion ist früh im Infektionsverlauf im Zellkern lokalisiert. HeLa-Zellen wurden mit wt-Virus und einer MOI von 2 infiziert oder Mock behandelt. Nach 4 h, 8 h und 16 h wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, mit Crk- und NS1-spezifischen Antikörpern markiert und mittels Fluorochrom-gekoppelter Zweitantikörper im konfokalen Laserscanning-Mikroskop sichtbar gemacht. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche. Maßstab: 10 μ m.

Das zelluläre Crk-Protein zeigte in Mock-infizierten Zellen eine diffuse Verteilung in Zytoplasma und Zellkern. Die Infektion bewirkte nach 4 h und 8 h eine verstärkte nukleäre Lokalisierung, die besonders nach 4 h an einigen Stellen akkumulierte. An diesen Crk-akkumulierten Regionen ko-lokalisierte das Protein mit dem viralen NS1-Protein, das eine für diesen Zeitpunkt typische Lokalisierung in nukleären Speckledomänen aufwies (Schneider *et al.*, 2009). Diese Ko-lokalisierung war 4 h p.i. am deutlichsten.

Auch 8 h nach Infektion war diese Crk-NS1-Interaktion – etwas abgeschwächt – noch detektierbar. Nach Re-Lokalisierung des NS1-Proteins ins Zytoplasma (16 h p.i.) waren die Crk-Strukturen im Zellkern dagegen kaum noch zu erkennen und eine Crk-NS1-Ko-Lokalisierung konnte nicht mehr detektiert werden (Abb. 20).

Die Crk-B/NS1-Interaktion findet überwiegend im Zellkern und früh im Infektionsverlauf statt. Das virale NS1-Protein ist zu diesem Zeitpunkt in nukleären Speckledomänen lokalisiert. Da Crk-Adaptorproteine durch Bildung von Proteinkomplexen an der Regulation zahlreicher zellulärer Signalwege beteiligt sind (Feller, 2001), beeinträchtigt die Crk-B/NS1-Interaktion möglicherweise bereits früh im Infektionsverlauf die zelluläre Signaltransduktion, wie z.B. die des JNK/ATF2-Signalweges.

3.3.2 Die verringerte B/NS1-xSH3G-Crk-Interaktion führt zu gesteigerter JNK/ATF2-Signaltransduktion in infizierten Zellen

Bei aviären Influenza A Viren mit einem intakten SH3-Bindemotiv im NS1-Protein führt die Crk-NS1-Interaktion zur Reduktion der JNK/ATF2-Signaltransduktion und zu verminderter Apoptose-Induktion (Hrincius *et al.*, 2010).

Um zu überprüfen, ob das Motiv im B/NS1-Protein möglicherweise in ähnlicher Weise funktioniert, wurde der Einfluss der Crk-B/NS1-Bindung auf die Aktivität des JNK/ATF2-Signalweges durch Infektion von A549-Zellen mit wt-Virus bzw. den NS1-Virusmutanten P122/5L und xSH3G untersucht. Vor der Infektion wurden die Zellen für zwei Tage in Infektionsmedium inkubiert, um das basale Niveau der ATF2-Phosphorylierung zu reduzieren. Zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. wurden die Zellen lysiert. Die Proteine wurden mit spezifischen Erstantikörpern gegen phosphoryliertes und unphosphoryliertes ATF2, sowie zur Infektionskontrolle gegen das virale PB2-Protein im Immunoblot angefärbt. Die gleichmäßige Proteinexpression in den Zelllysaten wurde durch Färbung des Zytoskelettproteins Aktin bestätigt (Abb. 21).

Die Infektion mit allen drei Viren führte früh in der Infektion (30 min p.i.) zu verstärkter ATF2-Phosphorylierung. Im weiteren Infektionsverlauf des wt-Virus und der P122/5L-Virusmutante war nur noch eine geringe ATF2-Phosphorylierung erkennbar. Hingegen hatte die Infektion mit der xSH3G-Mutante eine gesteigerte ATF2-Signaltransduktion bis 8 h p.i. zur Folge. Die xSH3G-Mutante, die durch Substitution des **P-x-x-P-x-(K/R)**-Motivs nur noch geringfügig in der Lage ist Crk zu binden (Abb. 19), löste eine verstärkte ATF2-Signaltransduktion aus (Abb. 21).

Die Crk-B/NS1-Interaktion scheint demnach auch bei Influenza B Viren für die Suppression des pro-apoptotischen JNK/ATF2-Signalweges verantwortlich zu sein.

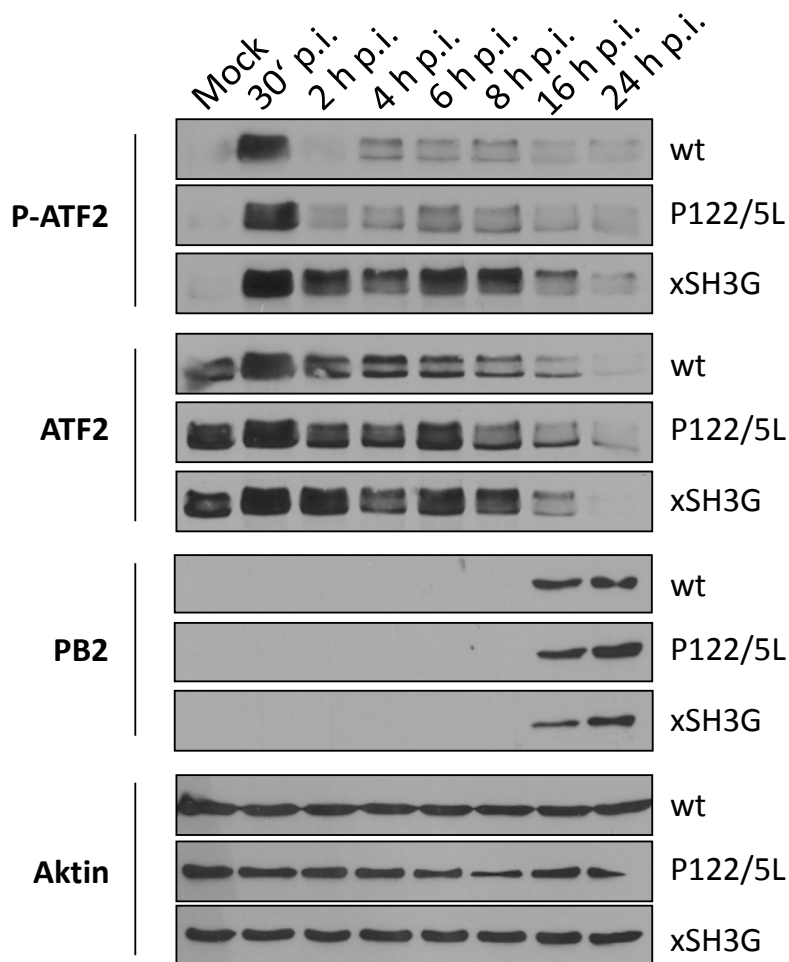


Abb. 21: Die verringerte B/NS1-xSH3G-Crk-Interaktion führt zu gesteigerter JNK/ATF2-Signaltransduktion. A549-Zellen wurden 2 d in Infektionsmedium inkubiert und anschließend mit den Viren wt, P122/5L bzw. xSH3G und einer MOI von 2 infiziert oder Mock behandelt. Zu den indizierten Zeitpunkten wurden Zelllysate hergestellt und im Immunoblot mit Phospho-ATF2-, ATF2-, PB2- und Aktin-spezifischen Antikörpern analysiert. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

3.3.3 Die Substitution der gesamten 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenz führt zu verminderter PI3K/Akt-Signaltransduktion zu späten Zeitpunkten der Infektion

Neben den Folgen für die JNK/ATF2-Signaltransduktion ist die Interaktion des Adaptorproteins Crk mit dem NS1-Protein aviärer Influenza A Viren mit verstärkter Signaltransduktion des zellulären PI3K/Akt-Signalweges assoziiert (Heikkinen *et al.*, 2008). Auch die Aktivierung dieses Signalweges ist wichtig für die effiziente Vermehrung von Influenza A Viren, sowie für die Suppression von Apoptose in den infizierten Zellen (Hale *et al.*, 2006; Ehrhardt *et al.*, 2007b). Das NS1-Protein von Influenza B Viren ist nicht in der Lage den PI3K/Akt-Signalweg spät in der Infektion zu aktivieren, was je-

doch nicht zu gesteigerter Apoptose der Influenza B Virus-infizierten Zellen führt (Ehrhardt *et al.*, 2007).

Im folgenden Versuch wurde analysiert, ob die reduzierte Crk-B/NS1-Interaktion infolge der P122/5L- bzw. xSH3G-Mutationen auf ähnliche Weise mit einer Regulation des PI3K/Akt-Signalweges korreliert werden kann. A549-Zellen wurden dafür zwei Tage in Infektionsmedium inkubiert, um die basale Akt-Phosphorylierung zu reduzieren. Anschließend wurden die Zellen mit wt-, P122/5L- oder xSH3G-Virus infiziert, um den Einfluss des konservierten B/NS1-121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motivs auf die Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges zu untersuchen. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert und die Aktivierung des PI3K-Signalweges durch Antikörper gegen phosphoryliertes Akt-Protein (P-Akt) im Immunoblot analysiert. Die Gesamtmenge an zellulärem Akt-Protein wurde durch einen Erstantikörper gegen das unphosphorylierte Protein (Akt) nachgewiesen. Der Infektionsstatus wurde durch den Nachweis von viralem PB2-Protein und die gleichmäßige Proteinexpression in den Zelllysaten durch Aktinfärbung bestätigt (Abb. 22).

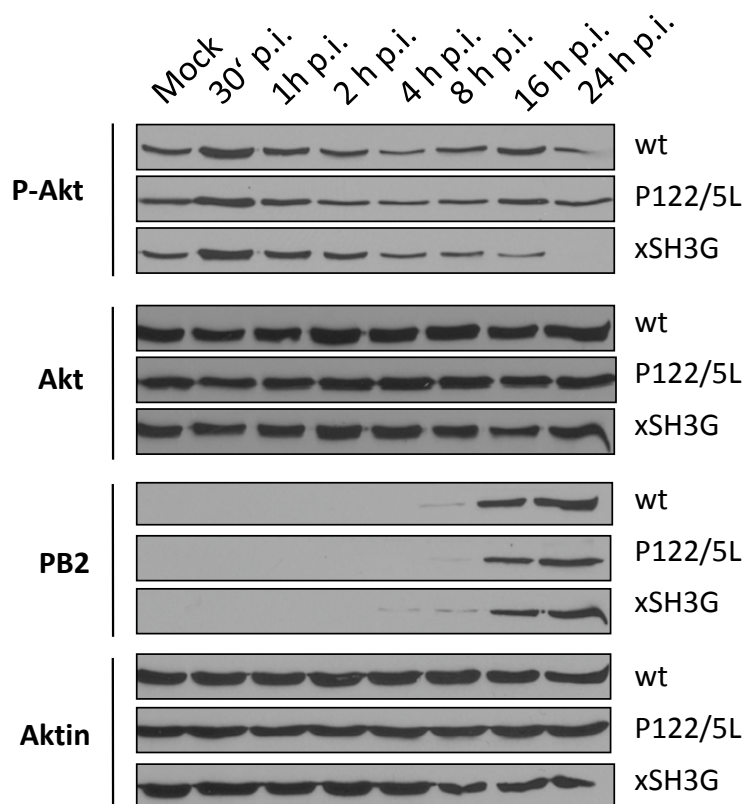


Abb. 22: Substitution der gesamten 122-**P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Sequenz führt zu verminderter PI3K/Akt-Signaltransduktion zu späten Zeitpunkten der Infektion. A549-Zellen wurden 2 d in Infektionsmedium inkubiert und anschließend mit den Viren wt, P122/5L bzw. xSH3G mit einer MOI von 2 infiziert oder Mock behandelt. Zu den indizierten Zeitpunkten wurden Zelllysate hergestellt und im Immunoblot mit Phospho-Akt-, Akt-, PB2- und Aktin-spezifischen Antikörpern analysiert. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Die Infektion mit dem wt-Virus und den Virusmutanten führte früh in der Infektion (30 min p.i.) zu vermehrter Akt-Phosphorylierung gegenüber Mock-infizierten Zellen (Abb. 22). Diese frühe Aktivierung des PI3K-Signalweges nach Influenza B Vi-

rusinfektion ist auf den Prozess der Virusbindung und -aufnahme durch die Wirtszelle zurückzuführen und wurde bereits von Ehrhardt *et al.* (2007) beschrieben. Im weiteren Verlauf der wt- und P122/5L-Virusinfektion sank das Ausmaß der Akt-Phosphorylierung wieder auf das Hintergrundniveau der Mock-Infektion.

Demgegenüber nahm die Akt-Phosphorylierung im Infektionsverlauf des xSH3G-Virus kontinuierlich ab. Zu späten Infektionszeitpunkten lag die Menge an phosphoryliertem Akt-Protein deutlich unter dem Level Mock-infizierter Zellen (16 h p.i.) bzw. war im Immunoblot nicht mehr detektierbar (24 h p.i.).

Obwohl das NS1-Protein von Influenza B Viren nicht in der Lage ist, den PI3K/Akt-Signalweg zu aktivieren (Ehrhardt *et al.*, 2007), führte die Substitution des gesamten 122-**P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motivs zu einer gegenüber nicht-infizierten Zellen verringerten Akt-Phosphorylierung zu späten Zeitpunkten der Infektion.

3.3.4 Crk-NS1-Interaktion spielt nur eine geringe Rolle bei der viralen Replikation

Bei aviären Influenza A Viren führt die posttranskriptionelle Stilllegung der CrkI- und CrkII-mRNA zu einer moderaten Reduktion der Virustiter von 0,3-0,5 Log-Stufen (Hrincius *et al.*, 2010). Da das konservierte **P-x-x-P-x-(K/R)**-Motiv im B/NS1-Protein einen ähnlichen Einfluss auf die Crk-Bindung sowie auf Crk-vermittelte Signalwege wie das homologe Sequenzmotiv im A/NS1-Protein aviärer Influenza A Viren zu haben scheint, wurde im folgenden Versuch der Einfluss des Crk-Adaptorproteins für die Replikation von Influenza B Viren untersucht.

Die Auswirkung einer CrkI/II-mRNA-Stilllegung für Influenza B Viren wurde mittels spezifischer siRNA (*small interfering RNA*) in A549-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit spezifischer Crk- oder unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen mit wt-, P122/5L- oder xSH3G-Viren infiziert und 48 h p.i. die Virustiter der Zellüberstände bestimmt. Die effiziente Stilllegung der Crk-mRNA 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion wurde durch Bestimmung der Proteinlevel im Immunoblot nachgewiesen (Abb. 23B).

Die Degradation der Crk-mRNA hatte nur geringe Auswirkungen auf die Vermehrung der NS1-Mutanten P122/5L und xSH3G. Hier zeigten sich fast identische Virustiter im Vergleich zur Infektion der Kontrollzellen. Für das wt-Virus wurde eine leichte Reduktion der Virusvermehrung durch die Transfektion der Crk-siRNA detektiert. Der Virus-

titer war im Vergleich zur Infektion der Kontrollzellen um ca. 0,4 Log-Stufen verringert (Abb. 23A). Die Reduktion der zellulären Crk-Proteinmenge zeigte einen ähnlichen Effekt für die Replikation von Influenza B Viren im Vergleich zu den aviären Influenza A Virusstämmen A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) und A/FPV/Rostock/34 (H7N1) mit **P-x-x-P-x-(K/R)**-Motiv (Hrincius *et al.*, 2010).

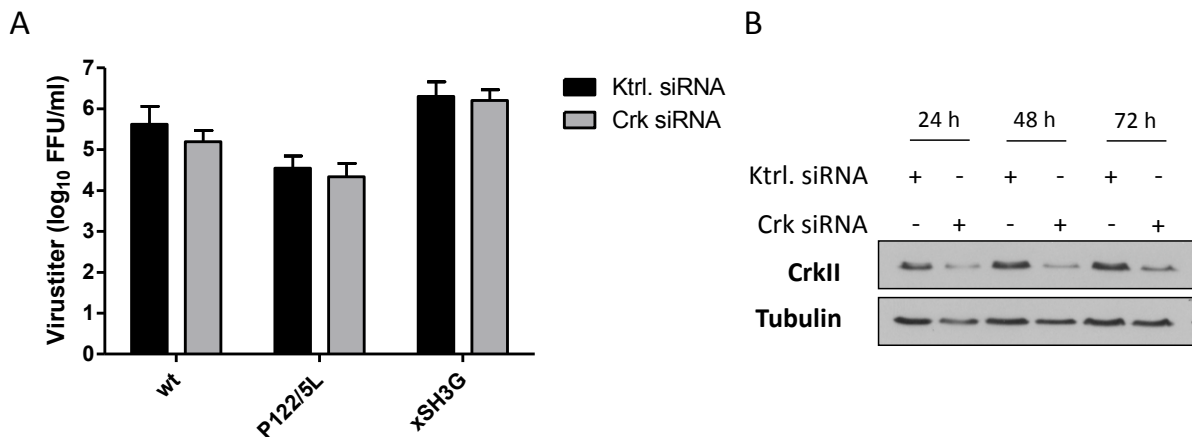


Abb. 23: Das Adaptorprotein Crk spielt nur eine geringe Rolle bei der viralen Replikation. A549-Zellen wurden mit Crk- oder Kontroll-siRNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit wt-, P122/5L- oder xSH3G-Virus mit einer MOI von 0.1 infiziert. 48 h p.i. wurden die Überstände abgenommen und die Virustiter mittels Avicel-Plaques-Assay bestimmt. Die Abbildung zeigt Mittelwert und Standardabweichung (SD) von vier unabhängigen Versuchen (A) bzw. einen repräsentativen Immunoblot (B).

Die vollständige Substitution des konservierten 122-**P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motivs hatte eine verminderte Interaktion des B/NS1-Proteins mit dem Adaptorprotein Crk zur Folge (Abb. 19). Dieser AS-Austausch führte außerdem zu veränderter Signaltransduktion. Während der pro-apoptotische JNK/ATF2-Signalweg verstärkt aktiviert wurde (Abb. 21), führte eine xSH3G-Virusinfektion zu verringerter Aktivität des anti-apoptotisch wirkenden Signalweges PI3K/Akt (Abb. 22). Diese Signalwege werden auch durch das NS1-Protein aviärer Influenza A Viren mit **P-x-x-P-x-(K/R)**-Motiv für eine effiziente Replikation und Apoptose-Suppression in den infizierten Zellen manipuliert. Die Ergebnisse für das B/NS1-Protein weisen daher ebenfalls auf eine Regulation der Apoptoseinduktion durch das konservierte 122-**P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motiv hin.

Die Reduktion der Crk-Proteinlevel hatte nur eine geringe Minderung der wt-Virusreplikation zur Folge (Abb. 23). Daher ist die Ursache der stark verbesserten Virusreplikation der xSH3G-Virusmutante in humanen Zellen (Abb. 12C/D) offenbar nicht in der Reduktion der Crk-NS1-Interaktion begründet.

Vor der Analyse der Virus-induzierten Apoptose und deren Rolle für die gesteigerte Vermehrung der xSH3G-Virusmutante, wird im folgenden Kapitel ein weiterer Signalweg untersucht, der für die Virusreplikation und Apoptose-Suppression von Bedeutung ist.

3.4 Die Substitution des gesamten 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motivs im NS1-Protein führt zu verstärkter Phosphorylierung der Proteinkinase R im Infektionsverlauf

Die Interferon-induzierte Proteinkinase R (PKR) ist ein wichtiger antiviraler Wirtsfaktor. Die Bindung doppelsträngiger RNA-Moleküle, die im Laufe der Virusinfektion gebildet werden, führt zur Phosphorylierung der Kinase und infolgedessen über Inaktivierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α zur Inhibition der Translationsmaschinerie. Außerdem induziert aktivierte PKR die Apoptose infizierter Zellen. Da Influenzaviren die zellulären Translationsmechanismen zur effizienten Replikation benötigen, haben sie die Fähigkeit entwickelt, mit ihrem NS1-Protein die PKR-Aktivität zu inhibieren. Während das B/NS1-Protein durch Bindung doppelsträngiger RNA über seine N-terminale Region mit der PKR interagiert und diese inhibiert (Dauber *et al.*, 2006), wurde für das A/NS1-Protein eine direkte PKR-Bindung durch die Aminosäuren 123-I-M-D-K-N-127 beschrieben (Min *et al.*, 2007). Mutationen in diesem Bereich führen zu verringerter PKR-Bindung und verstärkter PKR-Aktivität. Überraschenderweise konnte gezeigt werden, dass die jeweilige Substitution der Aminosäuren 123 und 124 zu Alanin zu beschleunigter Virusreplikation sowie zu verstärkter viraler RNA-Synthese und Proteinexpression führt (Min *et al.*, 2007).

Da die konservierten Aminosäuren 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127 im B/NS1-Protein in einem ähnlichen Proteinabschnitt liegen und nach Substitution des Motivs ähnliche Effekte wie bei Min *et al.* auftreten, wurde in den folgenden Versuchen die Auswirkung der AS-Substitutionen auf die PKR-Aktivität und –Bindung untersucht.

Dazu wurden A549-Zellen zur Reduktion der basalen PKR-Phosphorylierung für zwei Tage mit Infektionsmedium inkubiert, anschließend mit wt-, P122/5L-, oder xSH3G-Virus infiziert und zu den angegebenden Zeitpunkten nach Infektion lysiert. Die Proteinlysate wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Aktivierte PKR wurde durch einen anti-Phospho-PKR-Antikörper detektiert und die Gesamt-PKR-Menge mit einem Phosphorylierungs-unabhängigen Antikörper im Immunoblot gefärbt. Die

erfolgte Infektion wurde durch Färbung des viralen PB2-Proteins und die gleichmäßige Proteinkonzentration in den Zelllysaten durch zelluläres Aktin nachgewiesen (Abb. 24).

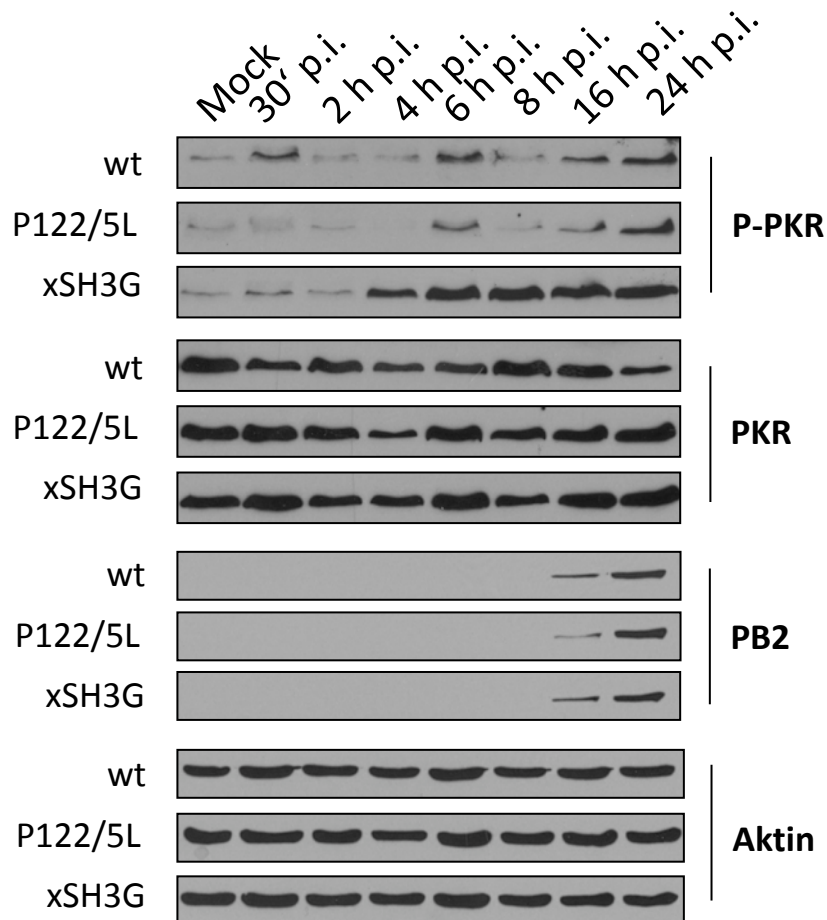


Abb. 24: Die Substitution des gesamten Aminosäuremotivs 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127 im NS1-Protein führt zu verstärkter Phosphorylierung der Proteinkinase R im Infektionsverlauf. A549-Zellen wurden 2 d in Infektionsmedium inkubiert und mit den angegebenen Viren mit einer MOI von 10 infiziert. Die Zelllysate wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion hergestellt und durch SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Phosphorylierte und unphosphorylierte PKR, sowie virales PB2- und zelluläres Aktin-Protein wurden über spezifische Antikörper detektiert. Die Abbildung ist repräsentativ für vier unabhängige Versuche.

Die Infektion mit dem wt- und dem P122/5L-Virus hatte nur eine geringe Aktivierung der PKR, mit einem Maximum nach 24 h p.i., zur Folge. Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit dem xSH3G-Virus zu einer deutlich verstärkten PKR-Phosphorylierung 4 h bis 24 h nach Infektion (Abb. 24). Die vollständige Substitution der konservierten Aminosäuren 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127 hat also auf die Aktivität der Proteinkinases R einen ähnlichen Effekt wie die Substitution der Aminosäuren 123-I-M-D-K-N-127 im A/NS1-Protein (Min *et al.*, 2007).

3.4.1 Die Substitutionen in der 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Sequenz haben keinen Einfluss auf B/NS1-PKR-Interaktion

Min und Kollegen erklärten die verstärkte Phosphorylierung der PKR mit einer verringerten A/NS1-PKR-Interaktion, die durch die Substitution der Aminosäuren 123-I-M-D-K-N-127 ausgelöst wird (Min *et al.*, 2007). Insofern stellte sich die Frage, ob auch die vollständige Substitution des konservierten Motivs 122-**P-x-x-P-x-(K/R)**-127 im B/NS1-Protein mit einer verringerten PKR-B/NS1-Bindung korreliert werden kann.

Für die Analyse der B/NS1-PKR-Bindung wurden GST-PKR-Fusionsproteine in *E.coli*-Bakterien überexprimiert, aufgereinigt und an Glutathion-Sepharose gekoppelt. Bei den PKR-Konstrukten handelte es sich zum einen um eine Proteinmutante in voller Länge, deren Kinaseaktivität durch die Punktmutation K296R inaktiviert war. Das Fusionsprotein GST-PKR (K296R) hat durch diese Mutation eine, im Vergleich zum wt, hohe Stabilität in den exprimierenden *E.coli*-Bakterien und lässt sich gut reinigen (Bonnet *et al.*, 2006). Als Negativkontrolle wurde eine PKR-Proteinmutante (PKR-AS 266-551) verwendet, die nicht mehr über die dsRNA-Bindedomäne verfügt, sondern lediglich die Kinasedomäne exprimiert (Abb. 25A). Das GST-PKR-AS 266-551-Fusionsprotein kann keine dsRNA binden und daher nicht mit dem B/NS1-Protein interagieren. Das B/NS1-wt-Protein bzw. die Mutantenproteine P122/5L und xSH3G wurden durch *in vitro*-Translation (i.v.T.) in der Gegenwart von ³⁵S-Methionin synthetisiert und markiert und anschließend in einem Präzipitationsansatz mit den Glutathion-Sepharose gekoppelten PKR-Fusionsproteinen inkubiert. Die dabei entstandenen Proteinkomplexe wurden nach Auftrennung im SDS-Gel durch Coomassie-Färbung (GST-Fusionsproteine) bzw. Autoradiographie (i.v.T. NS1-Proteine) sichtbar gemacht.

Abbildung 25B zeigt, dass die B/NS1-Proteine – unabhängig von den Mutationen im hochkonservierten 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motiv – mit etwa gleicher Intensität an das GST-PKR (K296R)-Protein binden. PKR-Proteine mit Deletion der dsRNA-Region konnten keine der B/NS1-Varianten binden. Eine unspezifische Bindung der NS1-Proteine an GST fand nicht statt. Im Input sind die gleichmäßige Proteinkonzentration der eingesetzten NS1-Varianten und im Coomassie-Gel die angeglichenen GST-Fusionsprotein-Konzentrationen zu erkennen (Abb. 25B).

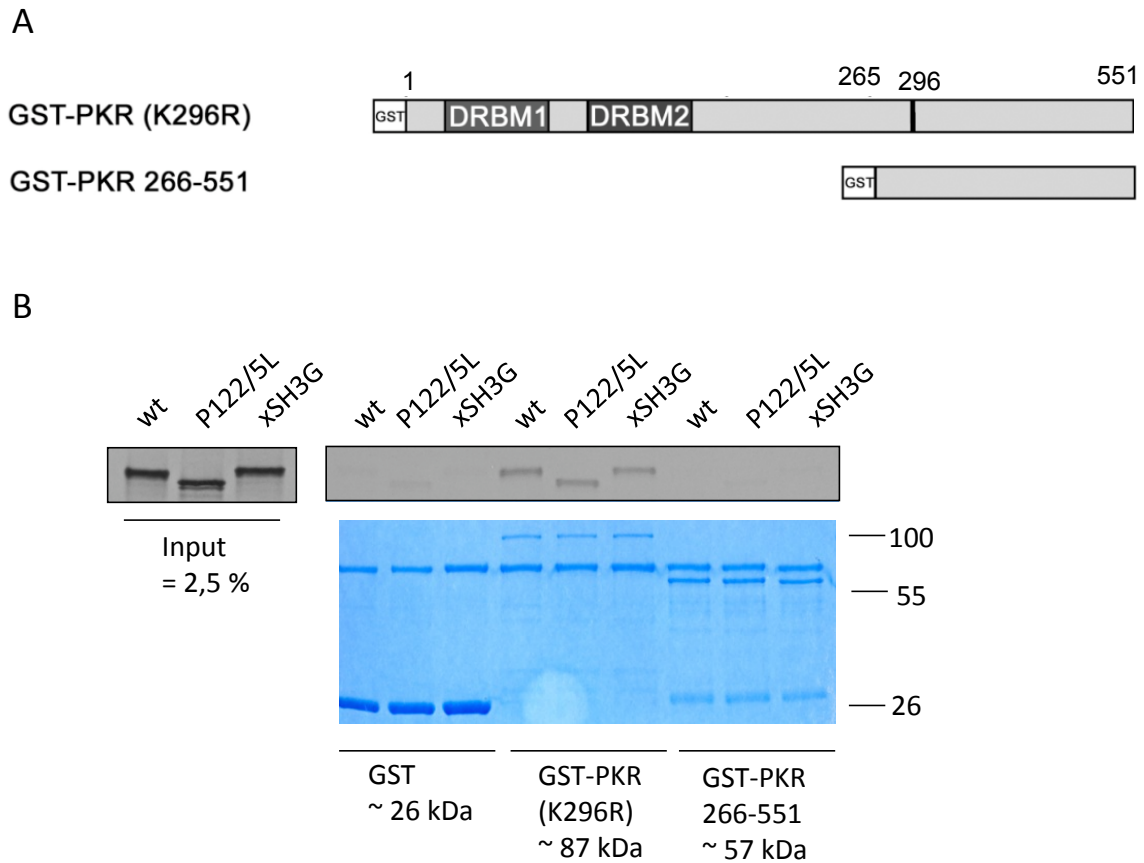


Abb. 25: Die Substitutionen in der 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenz haben keinen Einfluss auf B/NS1-PKR-Interaktion. A: Schematische Darstellung der analysierten GST-PKR-Fusionsproteine. B: Die GST-Fusionsproteine GST-PKR (K296R), GST-PKR-AS 266-551 und GST wurden in *E.coli* BL26-Bakterien überexprimiert, aufgereinigt und an Glutathion-Sepharose gekoppelt. In einem Präzipitationsansatz wurden die gekoppelten Fusionsproteine mit *in vitro*-translatierten NS1-wt, -P122/5L oder -xSH3G-Proteinen inkubiert. Die gekoppelten Proteine wurden in SDS-Probenpuffer eluiert. Das Eluat wurde in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und dieses anschließend mit Coomassie-Brillant-Blau-R250-Lösung gefärbt. Die gebundenen, radioaktiv-markierten NS1-Proteine wurden durch Autoradiographie detektiert. Der Input entspricht 2,5 % der eingesetzten Proteinmenge. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

Die Mutationen in der 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenz des B/NS1-Proteins haben demnach keinen Einfluss auf die PKR-Bindekapazität des viralen Proteins. Im Gegensatz zu Min *et al.* kann die erhöhte PKR-Phosphorylierung durch B/NS1-xSH3G nicht mit einer verminderten PKR-NS1-Bindung erklärt werden.

3.4.2 PKR-*knockdown* hat nur geringe Auswirkungen auf die Influenza B Virusreplikation

Da aktivierte PKR die virale Replikation durch Inhibition der Translation und Apoptoseinduktion beeinträchtigen kann, wurde in einem weiteren Versuch der Einfluss der Proteinkinase auf die Influenza B Virusreplikation untersucht. Dazu wurden A549-Zellen mit stabilem PKR-*knockdown* mit wt-Virus bzw. den NS1-Virusmutanten

P122/5L oder xSH3G infiziert. Die PKR-*knockdown*-Zellen sind nicht in der Lage die Proteinkinase R zu bilden. Dies wurde im Immunoblot mit PKR-spezifischem Antikörper bestätigt (Abb. 26A). Die Apoptoseinduktion der infizierten Zellen wurde durch einen *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay (PROMEGA) gemessen. Diese Reaktion beruht auf der Umsetzung eines Substrats im *Caspase-Glo*[®]-Reagenz durch aktivierte Caspasen-3 und -7. Das dabei entstehende Spaltprodukt wird durch die *UltraGlo*[™] *Luciferase* im *Caspase-Glo*[®]-Reagenz in ein Lumineszenz-Signal umgewandelt. Die Intensität der Lumineszenz ist proportional zur Caspase-Aktivität.

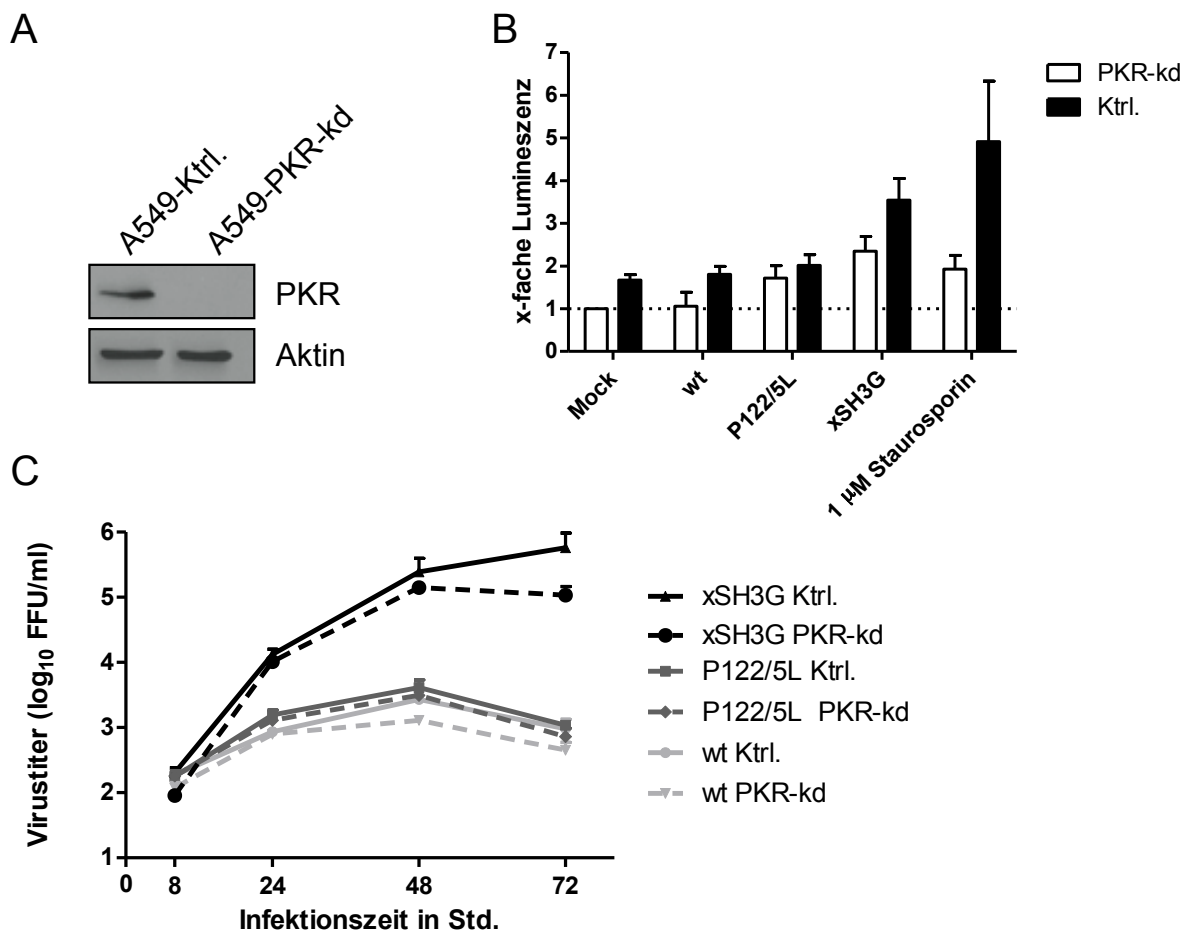


Abb. 26: Stabiler PKR-*knockdown* hat nur geringe Auswirkungen auf Influenza B Virusvermehrung. A: PKR-Expression in PKR-*knockdown* und Kontrollzellen. Herstellung von Lysaten der A549-Zellen mit stabilem PKR-*knockdown* (PKR-kd) bzw. der stabilen A549-Zellen, die mit unspezifischer shRNA behandelt wurden (Ktrl.). Im Immunoblot Nachweis von PKR und Aktin. B: Caspaseaktivität ist in PKR-*knockdown*-Zellen reduziert. A549-Zellen mit/ohne stabilem PKR-*knockdown* wurden Mock-behandelt oder mit den indizierten Viren mit einer MOI von 10 infiziert. Als Positivkontrolle wurden Mock-infizierte Zellen mit 1 μ M Staurosporin versetzt. 19 h p.i. wurden die Zellen mit *Caspase-Glo*[®]-Reagenz nach Herstellerangaben behandelt und die Lumineszenz gemessen. Die Messwerte von drei unabhängigen Versuchen wurden normalisiert und zu dem Wert der Mock-behandelten PKR-*knockdown*-Zellen (definiert als 1) ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt ist die x-fache Lumineszenz (Mittelwert+SD). C: Virusvermehrung in PKR-*knockdown*-Zellen. A549-Zellen mit/ohne stabilem PKR-*knockdown* wurden mit den angegebenen Viren und einer MOI von 0,01 infiziert. Abnahme der Zellüberstände nach 8 h, 24 h, 48 h und 72 h Infektion und Titrierung mittels Avicel-Plaques-Assay. Darstellung der Virustiter in \log_{10} FFU/ml (Mittelwert+SD). n=4.

Dabei zeigte sich, dass A549-Kontrollzellen (Ktrl.) bis 2,5mal mehr Caspase-Aktivität induzieren, als PKR-*knockdown*-Zellen (PKR-kd). Dieses Ergebnis bestätigt den Einfluss der Proteinkinase R auf die durch Infektion verursachte Apoptoseinduktion. Während Mock-, wt- und P122/5L-infizierte Zellen 19 h p.i. etwa gleich viel Apoptose in Kontroll- bzw. PKR-kd-Zellen induzierten, wurde nach xSH3G-Infektion etwa die doppelte Caspase-Aktivität gemessen. Als Positivkontrolle wurde 1 μ M Staurosporin eingesetzt, das in A549-Ktrl.-Zellen ungefähr die fünffache Menge der Caspase-Aktivität auslöste als in Mock-behandelten Zellen (Abb. 26B).

Der Einfluss der Proteinkinase R auf die virale Replikation von Influenza B Viren wurde anschließend durch Infektion der PKR-*knockdown*-Zellen bzw. der A549-Kontrollzellen ohne PKR-*knockdown* untersucht. Die Zellen wurden durch wt-, P122/5L- oder xSH3G-Viren mit einer MOI von 0,01 infiziert, die Zellüberstände nach 8 h, 24 h, 48 h und 72 h gesammelt und titriert.

Interessanterweise zeigte sich nur ein geringer Einfluss der PKR auf die Replikation der drei Viren. Während die wt- und P122/5L-Viren unabhängig vom PKR-*knockdown* zu fast identischen Titern replizierten, wurde nach PKR-*knockdown* und xSH3G-Virusinfektion eine Reduktion des Virustiters von ungefähr 0,7 Log-Stufen gegenüber PKR-exprimierenden Zellen gemessen (Abb. 26C).

Obwohl die Infektion mit xSH3G-Viren eine verstärkte PKR-Aktivierung auslöst (Abb. 24), die in den infizierten Zellen zu Apoptoseinduktion und Translationinhibition führen kann, sind diese Viren offenkundig dennoch in der Lage zu hohen Titern zu replizieren (Abb. 26C). Möglicherweise ist ein Teil der hohen Vermehrungsfähigkeit also auf eine verstärkte Apoptoseinduktion zurückzuführen, wie dies auch für Influenza A Viren beschrieben wurde (Ludwig *et al.*, 2006).

3.5 Die Substitution der gesamten 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenz im B/NS1-Protein führt zu gesteigerter Apoptose der infizierten Zellen

Da die Untersuchungen der Signalwege PI3K/Akt, JNK/ATF2 und PKR auf eine gesteigerte Apoptose nach Infektion mit dem Influenza B xSH3G-Virus hinwiesen, wurde in weiteren Experimenten die Apoptoseinduktion nach Infektion mit wt-, P122/5L- oder xSH3G-Viren untersucht und die Rolle der Apoptose für die virale Vermehrung bestimmt.

Infolge einer Apoptoseinduktion werden die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 aktiviert. Die Spaltung von Zielproteinen und die Fragmentierung der DNA führen schließlich zum programmierten Zelltod.

Um die virusinduzierte Apoptose in Abhängigkeit von der konservierten Aminosäuresequenz 121-127 im B/NS1-Protein zu analysieren, wurde in den folgenden Versuchen die Aktivität der Effektor-Caspasen-3 und -7 mit der Spaltung der Poly-ADP-Ribose Polymerase (PARP) korreliert. PARP ist ein Substrat der aktivierten apoptotischen Effektor-Caspasen und wird als klassischer Apoptosemarker benutzt. Eine Untersuchung der PARP-Spaltung ermöglicht eine weitere Bestätigung der Caspaseaktivität und somit Rückschlüsse auf die Apoptoseaktivität der Zellen.

Im Versuch wurden A549-Zellen mit den wt-, P122/5L- oder xSH3G-Viren infiziert und 19 h p.i. entsprechend der Herstellerangaben mit dem *Caspase-Glo*[®]-Reagenz (PROMEGA) behandelt sowie die Lumineszenz gemessen. Mock-behandelte Zellen fungierten im Versuch als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde 10 µM Staurosporin eingesetzt, das in Mock-infizierten Zellen ungefähr die 15fache Menge der Caspase-Aktivität auslöste als eine Infektion durch das B/Lee/40 wt-Virus (Abb. 27A). Zur Normalisierung der drei unabhängigen Messungen wurden die Werte der wt-Virus-infizierten Zellen als 1 definiert und die übrigen Messwerte dazu ins Verhältnis gesetzt. Während die Caspase-Aktivität der P122/5L-Virus-infizierten Zellen gegenüber den wt-Virus-infizierten Zellen nur leicht erhöht war, führte die Infektion mit dem xSH3G-Virus zu einer signifikant erhöhten Caspase-Aktivität auf ungefähr das 2,3fache gegenüber der wt-Virusinfektion.

Zur Analyse der PARP-Spaltung wurden A549-Zellen mit wt-, P122/5L- oder xSH3G-Virus infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die Zellproteine wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt und im Immunoblot wurden PARP, NS1 und Aktin durch spezifische Antikörper detektiert (Abb. 27B).

Zu jedem Zeitpunkt wurde das ungespaltene PARP-Protein in Mock- und Virus-infizierten Zellen detektiert. Während in wt-Virus-infizierten Zellen eine schwache Proteinbande des gespaltenen Proteins 6 h und 24 h p.i. zu erkennen war, zeigte sich in P122/5L-Virus-infizierten Zellen keine durch PARP-Spaltung detektierbare Caspaseaktivität. Dagegen konnte in xSH3G-Virus-infizierten Zellen 6-24 h p.i. eine gegenüber wt- und P122/5L-Virus-infizierten Zellen deutlich gesteigerte PARP-Spaltung detektiert werden (Abb. 27B).

Die PB2-Proteinfärbung verdeutlichte den fortschreitenden Infektionsverlauf, während die Detektion von zellulärem Aktin die gleichmäßige Proteinexpression in den Zelllysaten veranschaulichte (Abb. 27B).

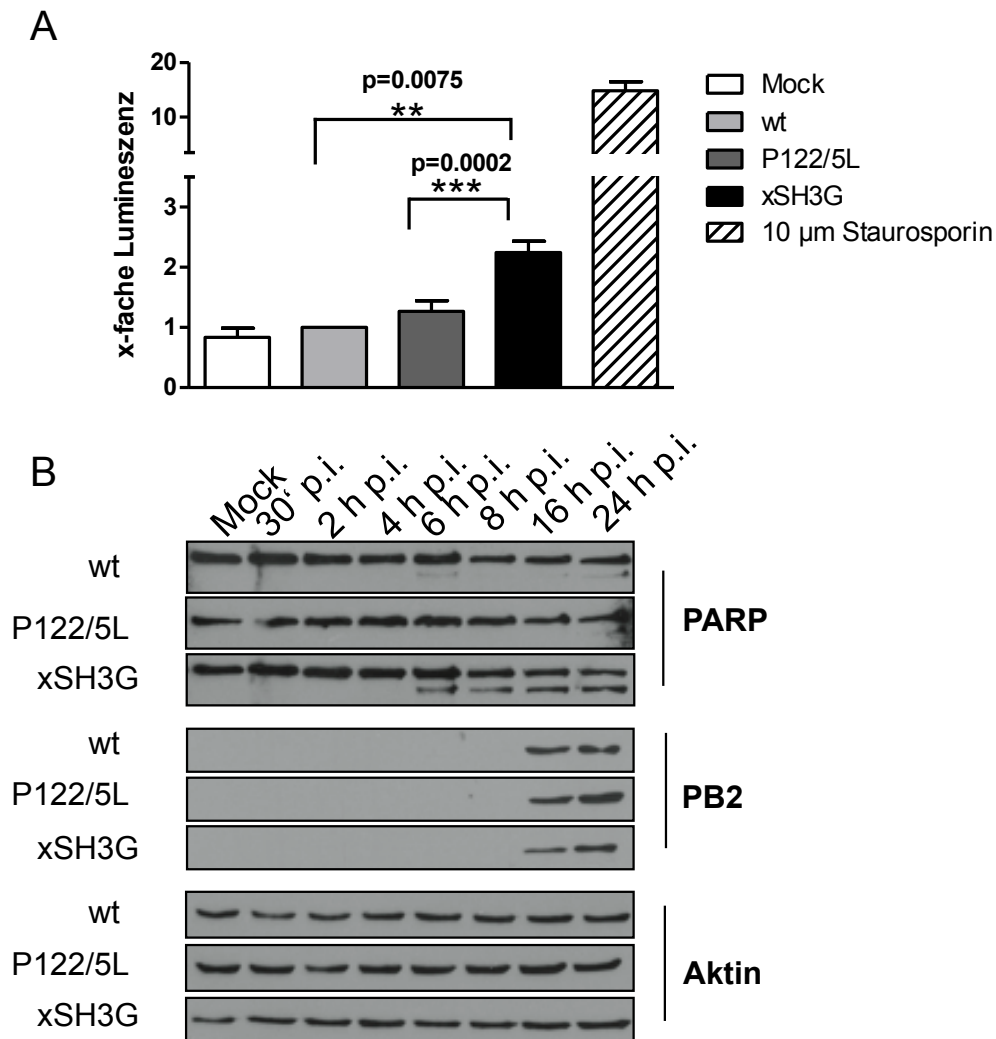


Abb. 27: Substitution der gesamten 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenz im B/NS1-Protein führt zu gesteigerter Apoptose der infizierten Zellen. A: Die Caspase 3/7-Aktivität ist während Infektion mit xSH3G-Virus signifikant erhöht. A549-Zellen wurden Mock-behandelt oder mit den indizierten Viren mit einer MOI von 10 infiziert. Als Positivkontrolle wurden Mock-behandelte Zellen mit 10 µM Staurosporin versetzt. 19 h p.i. wurden die Zellen mit *Caspase-Glo*[®]-Reagenz nach Herstellerangaben behandelt und die Lumineszenz gemessen. Die Messwerte von drei unabhängigen Versuchen wurden normalisiert und zu dem Wert der wt-Virus-infizierten Zellen ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt ist die x-fache Lumineszenz (Mittelwert+SD). Die statistische Signifikanz der detektierten Differenzen zwischen wt und xSH3G ($p \leq 0,01$ (**)) bzw. P122/5L und xSH3G ($p \leq 0,001$ (***)) wurde durch Student's T-Test berechnet. B: Die Substitution der gesamten NS1-122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenz führt zu verstärkter PARP-Spaltung im Infektionsverlauf. A549-Zellen wurden für 2 d in Infektionsmedium inkubiert. Anschließende Infektion von A549-Zellen mit wt-Virus oder den Virusmutanten P122/5L oder xSH3G und einer MOI von 10. Die Zellen wurden zu den indizierten Zeitpunkten lysiert und die Zellproteine im Immunoblot durch PARP-, PB2- und Aktin-spezifische Antikörper gefärbt. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Die verstärkte PARP-Spaltung in xSH3G-Virus-infizierten Zellen korreliert mit der im *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay gemessenen erhöhten Caspaseaktivität der Zellen und

macht deutlich, dass die verstärkte virale Replikation des xSH3G-Virus in Primatenzellen (Abb. 12C/D und 18A) mit einer erhöhten Apoptoseinduktion der infizierten Zellen einhergeht.

3.5.1 Eine Caspase 3-Inhibition hat nur geringe Folgen für die Replikation der Influenza B Viren mit Mutationen im NS1-121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motiv

Die Apoptose Virus-infizierter Zellen wird allgemein als Abwehrmechanismus der Zellen betrachtet, um eine Ausbreitung der Viren zu verhindern. Einige Untersuchungen zeigten jedoch, dass bei Influenza A Viren z. B. die Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 oder die Behandlung mit Caspase-Inhibitoren verringerte Virustiter zur Folge haben (Olsen *et al.*, 1996; Wurzer *et al.*, 2004). Influenza A Viren scheinen demnach die apoptotische Reaktion der Wirtszelle zur Optimierung der viralen Vermehrung nutzen zu können (Ludwig *et al.*, 2006).

Um die Abhängigkeit der Replikation von Influenza B Viren von der Apoptoseinduktion zu analysieren, wurden infizierte A549-Zellen mit dem in Dimethylsulfoxid (DMSO) - gelösten Caspase-3-Inhibitor Z-DEVD-FMK (BD PHARMINGEN™) behandelt. Zur Bestimmung der geeigneten Inhibitor-Konzentration wurden xSH3G-Virus-infizierte A549-Zellen mit verschiedenen Mengen des Inhibitors behandelt, nach 24 h lysiert und der Effekt des Inhibitors auf die PARP-Spaltung im Immunoblot analysiert. Kontrollzellen, die mit Solvent (DMSO) inkubiert wurden, zeigten nach xSH3G-Virusinfektion das PARP-Spaltprodukt, wie in Kapitel 3.5 (Abb. 27B) beschrieben. Die Behandlung mit 40 µM Z-DEVD-FMK führte zu einer leichten Reduktion der PARP-Spaltung, während die Inkubation mit 70 µM und 100 µM des Caspase-Inhibitors die Spaltung des Caspasesubstrates PARP hemmte. Im Immunoblot waren bei diesen Konzentrationen nur die Proteinbanden des ungespaltenen PARP-Proteins sichtbar (Abb. 28B). Die Abhängigkeit der Virusreplikation von der Caspaseaktivität der infizierten Zellen wurde im weiteren Verlauf durch den Einsatz von 70 µM Z-DEVD-FMK analysiert. A549-Zellen wurden mit dem wt-Virus oder den NS1-Virusmutanten P122/5L bzw. xSH3G infiziert. Dem Infektionsmedium wurde der in DMSO-gelöste Caspase-3-Inhibitor zugegeben. Die Kontrollzellen wurden mit der entsprechenden Menge an DMSO versetzt und für 48 h inkubiert. Die Zellüberstände wurden mittels Avicel-Plaque-Assay titriert. Für den wt zeigte sich nach Caspaseinhibition eine Reduktion des Virustiters, die auch von Wurzer und Kollegen für Influenza A Viren be-

schrieben wurde (Wurzer *et al.*, 2004). Die Reduktion betrug im Vergleich zur Replikation in DMSO-behandelten Zellen ca. 0,4 Log-Stufen (Abb. 28A).

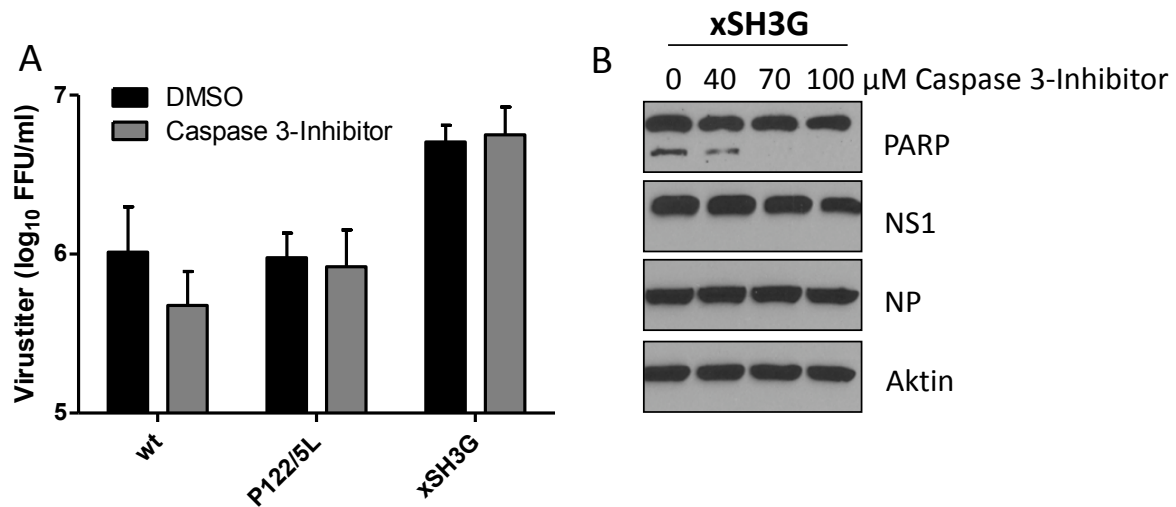


Abb. 28: Die Caspase 3-Inhibition hat nur geringe Folgen für die Replikation der Influenza B Viren mit Mutationen im NS1-121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motiv. A: Virusreplikation nach Caspase 3-Inhibition. Infektion von A549-Zellen mit den indizierten Viren und einer MOI von 1. Anschließende Behandlung der Zellen mit 70 μ M Z-DEVD-FMK bzw. DMSO. Abnahme der Zellüberstände nach 48 h Infektion und Titrierung mittels Avicel-Plaques-Assay. Darstellung der Virustiter in log₁₀ FFU/ml (Mittelwert+SD). n=3. B: Titrierung des Caspase 3-Inhibitors Z-DEVD-FMK. A549-Zellen wurden mit dem xSH3G Virus und MOI 1 infiziert. 24 h p.i. wurden die Zellen lysiert. Die Proteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt und im Immunoblot durch PARP-, NS1-, NP- und Aktin-spezifische Antikörper angefärbt.

Dagegen zeigten die Virusmutanten P122/5L und xSH3G eine von der Caspaseaktivität unabhängige Replikationsfähigkeit. Beide Virusvarianten replizierten in DMSO- oder Z-DEVD-FMK-behandelten Zellen zu jeweils fast identischen Virustitern.

Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die gesteigerte Apoptoseinduktion nach xSH3G-Infektion nicht die *Ursache* für die – im Vergleich zur wt- und P122/5L-Virusreplikation – erhöhte virale Vermehrung, sondern eine *Folge* der gesteigerten Replikation ist.

3.6 Ein globaler Ansatz zur Beschreibung des Interaktoms von NS1-wt- bzw. xSH3G-Proteinen identifiziert HSP90 β als differentiellen Bindungspartner

3.6.1 Detektion der HSP90 β -NS1-Interaktion mittels Massenspektrometrie

Wie bereits gezeigt, hat die Substitution des gesamten hochkonservierten 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motivs im B/NS1-Protein sowohl für das rekombinante Virus als auch für die infizierte Wirtszelle Folgen. Während das mutierte Virus zu effizienterer Ver-

mehrung als das wt-Virus fähig ist, wird die Signaltransduktion einzelner Signalwege der infizierten Zellen moduliert und es kommt verstärkt zum programmierten Zelltod.

Um die zelluläre Schnittstelle der veränderten Signaltransduktion in den infizierten Zellen zu identifizieren, wurde eine Methode etabliert, die erstmals die Identifikation und Quantifizierung von NS1-Interaktionspartnern während einer Influenzavirusinfektion in einem globalen Ansatz mittels hochauflösender Massenspektrometrie ermöglicht. Das Prinzip beruht dabei auf dem Vergleich von zwei Zellpopulationen (Mann, 2006). Population A wird in Medium mit den „leichten“ $^{12}\text{C}_6$ -Aminosäuren Lysin und Arginin kultiviert, während Population B durch Kultivierung mit $^{13}\text{C}_6$ -Lysin und – Arginin metabolisch markiert wird. Diese Markierungstechnik wird *SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture)* genannt. In der vorliegenden Arbeit wurde Population A mit Influenza B/Lee/40 wt-Virus und Population B mit der xSH3G-Virusmutante infiziert. Die *SILAC*-Zellen wurden lysiert, im Verhältnis 1:1 gemischt und die von Mann beschriebene Vorgehensweise dahingehend ergänzt, dass die Proteinmischung von Population A und B einer Immunopräzipitation unterzogen wurde. Mittels eines NS1-Antikörpers wurden NS1-Proteinkomplexe aus den Zellysaten präzipitiert. Nach Aufbereitung der Proben wurden die Peptidpaare mithilfe eines *LTQ-Orbitrap*-Massenspektrometers (*THERMO FISHER SCIENTIFIC*) gemessen und mittels *Proteome-Discoverer*-Software (*THERMO FISHER SCIENTIFIC*) ausgewertet. Bei der Messung im Massenspektrometer wird jedes Peptid als Peptidpaar detektiert – das Peptid mit der geringeren Masse enthält die „leichten“ Aminosäuren der Population A, während das Peptid mit der höheren Masse $^{13}\text{C}_6$ -markierte Aminosäuren enthält und von Population B stammt (Abb. 29). Da die „leichten“ und „schweren“-Aminosäuren bis auf ihre Massendifferenz keine chemischen Unterschiede aufweisen, lässt sich von dem Verhältnis der Signalintensität der Peptid-Ionen (*heavy/light-ratio*) im Massenspektrum direkt auf das relative Proteinvorkommen in den wt- und xSH3G-NS1-Proteinkomplexen schließen. Zellproteine, die unspezifisch oder nicht über das hochkonservierte Motiv an den NS1-Komplex binden oder deren Bindekapazität an die konservierten Region 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 nicht durch die Mutationen beeinträchtigt wurde, wurden mit einem Intensitätsverhältnis von 1:1 (*heavy/light-ratio*: ~1) detektiert. Eine höhere Signalintensität des „schwer“-markierten Peptids bedeutet ein höheres Vorkommen des zugehörigen Proteins im NS1-xSH3G-Komplex (*heavy/light-ratio*: >1). Das identifizierte Protein bindet damit spezifisch an die substituierte 121-**Y-G-G-G-G-G-G**-127-Sequenz und

mit geringerer Intensität an das wt-NS1-Protein. Eine höhere Signalintensität des „leicht“-markierten Peptids zeigt hingegen dessen spezifische Bindung an das 121-Y-P-x-x-P-x(K/R)-127-Motiv des NS1-wt-Proteins (*heavy/light-ratio*: <1).

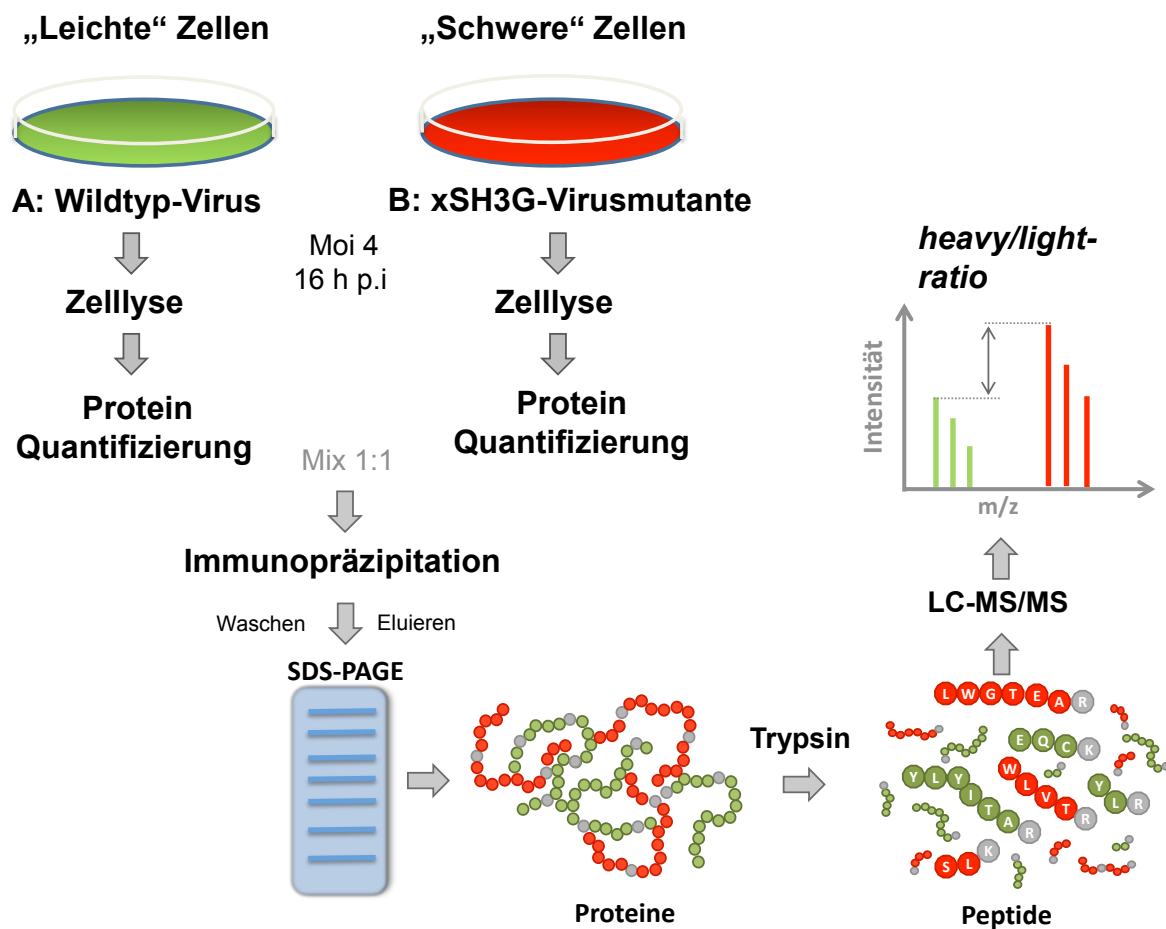


Abb. 29: Allgemeiner Versuchsaufbau des SILAC-Experimentes. Die Zellen wurden durch SILAC-Medium mit „leichtem“ $^{12}\text{C}_6$ - bzw. „schwerem“ $^{13}\text{C}_6$ - Lysin und Arginin markiert. Nach Infektion mit dem Wildtypvirus bzw. der xSH3G-Virusmutante für 16 h wurden die Zellen lysiert. Die Proteinmenge in den Zellysaten wurde bestimmt und die Proteine beider Ansätze wurden im Verhältnis 1:1 für die NS1-Immunopräzipitation eingesetzt. Die präzipitierten Proteinkomplexe wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und zu tryptischen Peptiden verdaut. Der Massenunterschied von *schwer* zu *leicht* markierten Peptiden (*heavy/light-ratio*) wurde im Orbitrap-Discovery-Massenspektrometer gemessen.

In Tabelle 4 sind Auszüge der Massenspektrometrie-basierten Analyse dargestellt. Der Schwellenwert für eine verminderte oder verstärkte Bindung an das NS1-wt-Protein wurde als *heavy/light-ratio* von 2 bzw. 0,5 definiert. Die xSH3G-Mutation hat demzufolge z. B. eine verstärkte Bindung des heterogenen nukleären Ribonukleoproteins U (HNRPU) und der RNA-abhängigen RNA-Helikase A (DHX9) zur Folge. Außerdem führte diese Mutation zu einer im Vergleich zum wt-NS1-Protein verringerten Interaktion mit dem Protein S100-A7.

Uniprot-ID	Protein-Name	Anzahl der identifizierten Peptide	MW der Proteine (kDa)	Protein-Abdeckung (%)	Peptid-Score	heavy/light-ratio	heavy/light-count
P08238	HSP90β	5	83,2	8,70	27,90	100,000	1
Q96KK5	HIST1H2AH	2	13,9	15,63	5,01	8,114	2
P11021	HSPA5	22	72,3	37,92	97,36	2,666	20
Q86XP3	DDX42	2	102,9	2,56	4,93	2,200	2
Q96BA7	HNRPU	3	79,7	4,43	11,01	2,193	2
C9JZ20	PHB	2	22,3	10,95	8,89	2,175	3
Q08211	DHX9	9	140,9	9,13	31,35	2,054	8
E7EUT5	GAPDH	5	27,9	30,38	39,54	1,614	8
P31151	S100A7	5	11,5	47,52	33,69	0,010	11

Tab. 5: Identifikation der HSP90β-NS1-xSH3G-Interaktion durch SILAC-MS/MS-Analyse. A549-Zellen wurden mit den $^{13}\text{C}_6$ -markierten Aminosäuren Lysin und Arginin oder mit den $^{12}\text{C}_6$ -markierten Aminosäuren Lysin und Arginin kultiviert. Nach Inkorporation der markierten Aminosäuren ins Zellproteom wurden die „leichten“ Zellen mit wt-Virus und die „schweren“ Zellen mit der xSH3G-Virusmutante mit einer MOI von 4 infiziert. 16 h p.i. wurden die Zellen lysiert, die Proteinkonzentration der Zelllysate mittels BCA-Test bestimmt und die beiden Zellpopulationen 1:1 gemischt. Die Proteinmischung wurde durch Inkubation mit einem NS1-Antikörper und Protein A Agarose einer Immunpräzipitation unterzogen. Die eluierten Proteinkomplexe wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Reduktion, Alkylierung und tryptischem Verdau sowie Auftrennung über Nano-LC im Orbitrap-Massenspektrometer gemessen. Die Daten wurden mittels *Proteome Discoverer*-Software ausgewertet.

Abbildung 30 zeigt exemplarisch drei Quantifizierungsspektren der Proteine Hitzeschockprotein 90β (HSP90β), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und S100-A7. Während das Peptid GTNYLADVFEK des S100-A7-Proteins lediglich als $^{12}\text{C}_6$ -Isoform detektiert wurde (Abb. 30C; *heavy/light-ratio* = 0,010), konnte für das konstitutiv exprimierte GAPDH-Protein sowohl das Isotopenmuster des „leicht“-markierten Peptids GALQNIIPASTGAAK, als auch das ähnlich starke Signal dessen „schweren“ $^{13}\text{C}_6$ -Isoform gemessen werden. GAPDH wurde somit unspezifisch präzipitiert (Abb. 30B; *heavy/light-ratio* = 1,614).

Eine für die vorliegende Arbeit wichtige Beobachtung war die im Vergleich zum NS1-wt-Protein bevorzugte Interaktion des NS1-xSH3G-Proteins mit HSP90β. Im Massenspektrum konnte nur das Isotopenmuster des $^{13}\text{C}_6$ -Lysin-markierten Peptids NPDDITQEEYGEFYK detektiert werden (Abb. 30A; *heavy/light-ratio* = 100,000). Somit wurde in diesem Versuchsansatz HSP90β spezifisch durch das mutierte NS1-xSH3G-Protein präzipitiert. Bei der Messung von Peptid-Ionen in nur einem Quantifizierungskanal (*heavy* oder *light*) wurde zur Bildung der *heavy/light-ratio* das in der

gesamten Messung am niedrigsten gemessene Peptid-Ion verwendet ($2,0079 \times 10^3$ counts * sec).

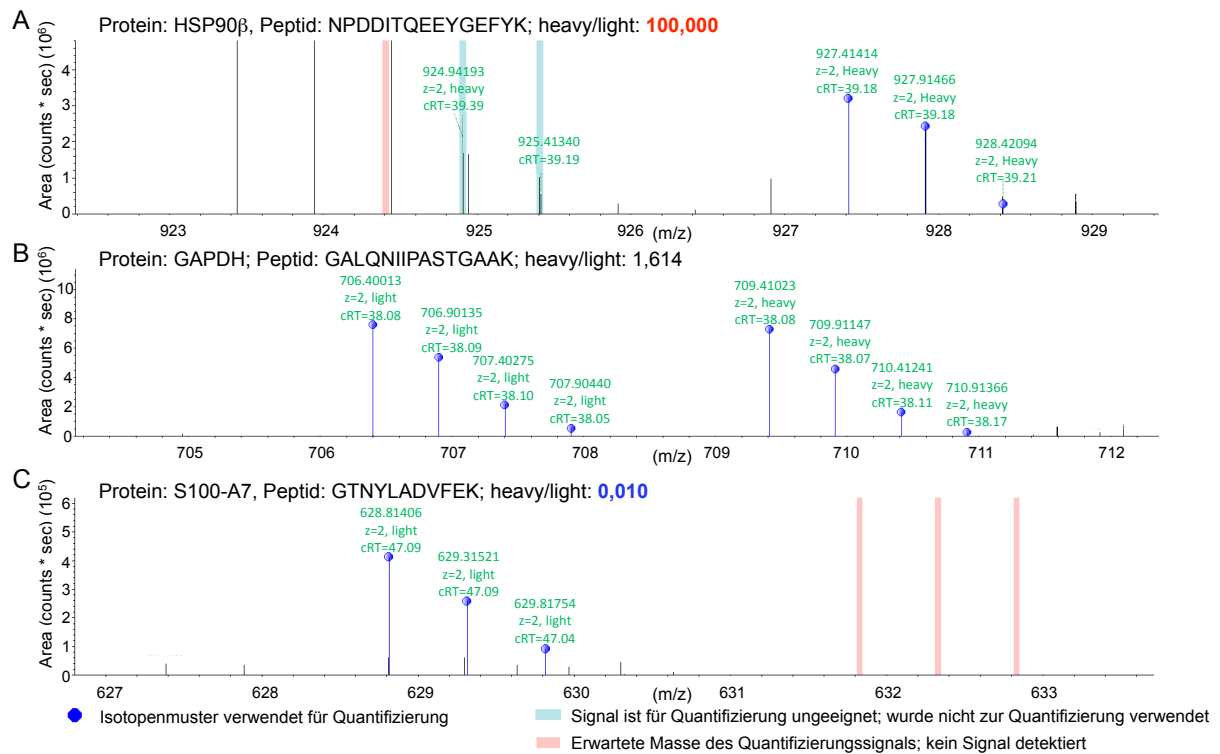


Abb. 30: Exemplarische Darstellung einiger Quantifizierungsspektren. A: Quantifizierungsspektrum des Peptids NPDDITQEEYGEFYK des HSP90 β -Proteins. Die *heavy/light-ratio* beträgt 100,000. B: Quantifizierungsspektrum des Peptids GALQNIIPASTGAAK des konstitutiv exprimierten GAPDH-Proteins. Die *heavy/light-ratio* beträgt 1,614. C: Quantifizierungsspektrum des Peptids GTNYLADVFEK des S100-A7-Proteins. Die *heavy/light-ratio* beträgt 0,010. Bei Messung von Peptid-Ionen in nur einem Quantifizierungskanal (*Markierung des fehlenden Spektrums in rosa*) oder bei Messung von ungeeigneten Peptidsignalen (*Markierung des ungeeigneten Signals in hellblau*) wurde zur Bildung der *heavy/light-ratio* das in der gesamten Messung am niedrigsten gemessene Peptid-Ion verwendet ($2,0079 \times 10^3$ counts * sec).

Das Chaperon HSP90 β stabilisiert labile Proteinkonformationen, die z. B. durch wenige Aminosäureaustausche entstehen können, hat seine Funktion in der Proteinfaltung, Komplexbildung sowie Aktivität seiner Substrate und spielt für die Regulation vieler zellulärer Prozesse (z. B. der PKR- und Akt-Aktivität) eine Rolle. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Replikation vieler verschiedener DNA und RNA-Viren von HSP90 beeinflusst wird (Geller *et al.*, 2012; Tab. 2). Für Influenza A Viren wurde eine HSP90-Bindung der Polymerase-Untereinheiten PB1 und PB2 (Naito *et al.*, 2007), sowie eine Abhängigkeit der effizienten Synthese viraler RNA von der HSP90-Aktivität beschrieben (Chase *et al.*, 2008). Die A/NS1-HSP90-Interaktion spielt vermutlich eine Rolle bei der Apoptoseinduktion infizierter Zellen (Zhang *et al.*, 2011). Eine Funktion des HSP90-Chaperons bei der Vermehrung von Influenza B Viren wurde bisher nicht beschrieben.

3.6.2 Die Substitutionen im AS-Motiv 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 führen zu verstärkter Interaktion des NS1-Proteins mit dem Chaperon HSP90 β

Zur weiteren Bestätigung und Analyse der über SILAC-MS-identifizierte HSP90-NS1-Interaktion wurden 293T-Zellen mit pHW-Vektoren transfiziert, welche für die NS-Segmente des wt-Virus oder der NS1-Virusmutanten P122/5L und xSH3G kodieren. 293T-Zellen weisen eine bessere Transfektionseffizienz als A549-Zellen auf und wurden daher für diesen Versuch verwendet. Von den pHW-NS-Vektoren werden das NS1- und das NS2/NEP-Protein transkribiert. In einem Kontrollansatz wurde nur die DNA für das NS1-wt-Protein transfiziert (pcDNA-NS1-wt), um eine spezifische HSP90 β -NS1-Bindung unabhängig vom NS2/NEP-Proteins zu bestätigen. Nach Inkubation und Lyse der transfizierten Zellen wurden die HSP90 β -Komplexe durch einen spezifischen HSP90 β -Antikörper präzipitiert und im Immunoblot analysiert (Abb. 31).

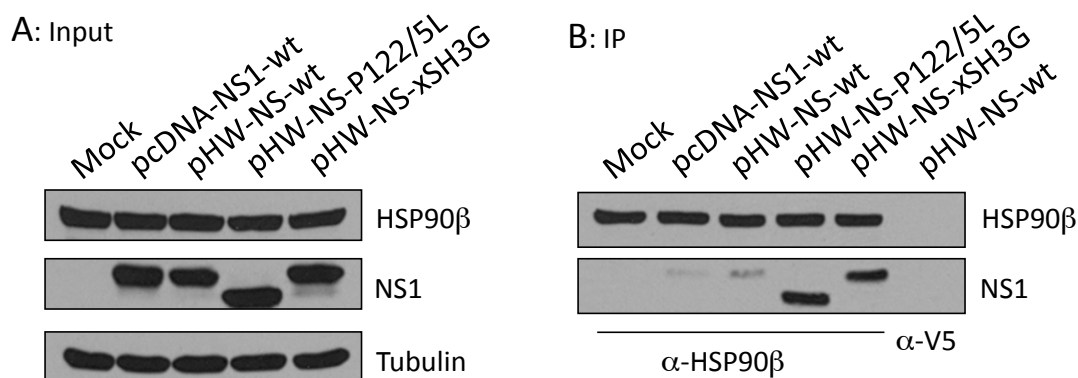


Abb. 31: Die Substitutionen im NS1-121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motiv führen zu verstärkter Interaktion des NS1-Proteins mit dem Chaperon HSP90 β . 293T-Zellen wurden Mock-transfiziert, mit pcDNA-NS1-wt oder mit pHW-NS-wt-, pHW-NS-P122/5L- bzw. pHW-NS-xSH3G-Konstrukten transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden Zelllysate hergestellt und 16 h bei 4 °C mit einem HSP90 β -spezifischen Erstantikörper und Protein G Agarose inkubiert. Die präzipitierten Proteinkomplexe wurden nach Auftrennung im SDS-Gel durch Immunoblotanalyse detektiert. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Im Input wurde die gleichmäßige Expression der transfizierten NS1-Proteine, sowie der endogen gebildeten HSP90 β - und Tubulin-Proteine detektiert (Abb. 31A). Das Chaperon HSP90 β wurde durch den HSP90 β -spezifischen Antikörper in allen IP-Ansätzen mit gleicher Intensität präzipitiert. Die HSP90 β -NS1-Ko-Immunopräzipitation bestätigte das Ergebnis aus der massenspektrometrischen Analyse. Während das NS1-wt-Protein unabhängig vom ko-exprimierten viralen NS2/NEP-Protein nur schwach vom HSP90-Protein präzipitiert wurde, zeigten die

mutierten NS1-Proteine P122/5L und xSH3G eine starke Interaktion mit dem zellulären Faktor HSP90 β (Abb. 31B).

3.6.3 Die Substitution des gesamten NS1-122-**P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motivs führt zu gesteigerter Assoziation von HSP90 β mit NS1 und PB2 in der Infektion

Für Influenza A Viren wurde bereits eine NS1-HSP90-Interaktion in transfizierten Zellen gezeigt (Zhang *et al.*, 2011). Außerdem wurde eine Interaktion von HSP90 mit Influenza A Virus PB1- und PB2-Proteinen in transfizierten und infizierten Zellen nachgewiesen (Naito *et al.*, 2007). Die Zugabe von rekombinantem HSP90 α oder HSP90 β hat in einem *in vitro*-Influenza-RNA-Synthese-System stimulatorische Aktivität (Momose *et al.*, 2002). Eine HSP90-Inhibition durch Geldanamycin führte hingegen zur verstärkten Degradierung von PB1 und PB2, zur reduzierten Synthese viraler RNA, sowie zu verzögerter viraler Replikation (Chase *et al.*, 2008). Um mögliche Rückschlüsse auf die gesteigerte Virusvermehrung der xSH3G-Virusmutante ziehen zu können, war es daher von Interesse die NS1-HSP90-Proteinkomplexe in Influenza B Virus-infizierten Zellen zu analysieren.

Dazu wurden A549-Zellen mit den Viren wt, P122/5L oder xSH3G infiziert. Acht Stunden nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und endogenes HSP90 β durch einen spezifischen Antikörper präzipitiert. Die Proteinkomplexe wurden im Immunoblot durch HSP90 β -, NS1- und PB2-Antikörper analysiert (Abb. 32).

Das endogene HSP90 β -Chaperon wurde in allen Infektionsansätzen gleichmäßig präzipitiert (Abb. 32A). Mit diesem Versuchsansatz konnte die Aussage der MS-Analyse bestätigt werden. Im Vergleich zur schwachen HSP90-NS1-wt-Bindung konnte eine deutlich verstärkte Interaktion des mutierten NS1-xSH3G-Proteins mit dem Chaperon HSP90 detektiert werden (Abb. 32B). Im Gegensatz zu der Transfektionsanalyse wurde in infizierten Zellen für die P122/5L-Proteinmutante eine ähnlich schwache HSP90-Interaktion wie für das wt-Protein nachgewiesen.

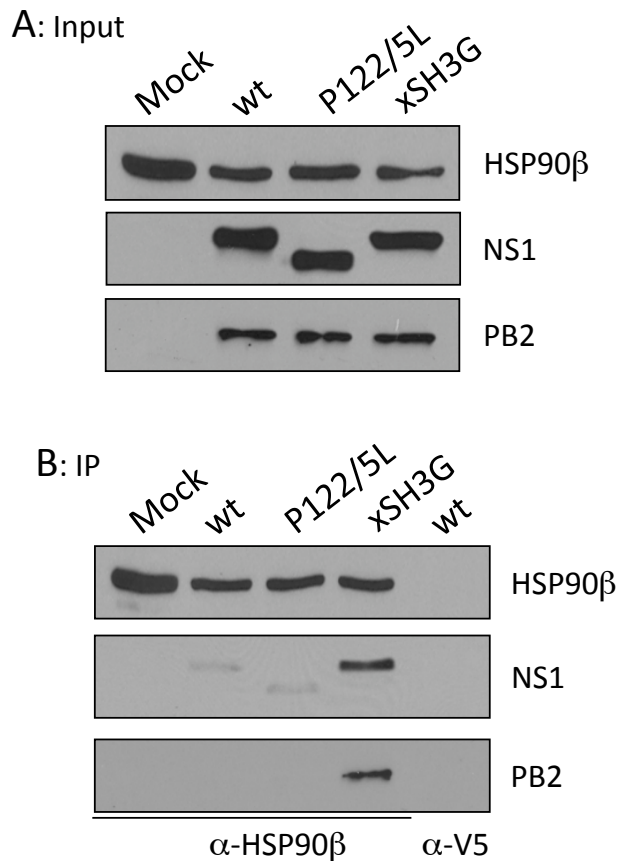


Abb. 32: Die Substitution des gesamten NS1-122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Motivs führt zu gesteigerter Assoziation von HSP90 β mit NS1 und PB2. A549-Zellen wurden Mock-behandelt oder mit wt-, P122/5L- bzw. xSH3G-Viren und einer MOI von 10 infiziert. 8 h p.i. wurden Zellysate hergestellt und 16 h bei 4 °C mit einem HSP90 β -spezifischen Erstantikörper und Protein G Agarose inkubiert. Die präzipitierten Proteinkomplexe wurden nach Auftrennung im SDS-Gel durch Immunoblotanalyse detektiert. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

In den xSH3G-Virus-infizierten Zellen konnte eine Interaktion von HSP90 mit dem viralen Polymerase-Protein PB2 gezeigt werden. In wt- und P122/5L-Virus-infizierten Zellen fand eine HSP90-PB2-Interaktion dagegen nicht statt (Abb.32B).

3.6.4 Inhibition von HSP90 verringert die Vermehrung von Influenza B Viren

Das zelluläre Chaperon HSP90 beeinflusst die Funktionsweise zahlreicher zellulärer Signalwege. Viele DNA- und RNA-Viren, die während ihrer Replikation auf die Proteinfunktionen der Wirtszelle zurückgreifen, reagieren daher auf eine HSP90-Inhibition mit verminderter Vermehrungsfähigkeit (Geller *et al.*, 2012). Um die Bedeutung des zellulären HSP90-Chaperons für die Influenza B Virusvermehrung zu analysieren, wurde der Inhibitor Geldanamycin (GA) verwendet, der durch Bindung der ATPase-Domäne von HSP90 dessen Funktion hemmt.

A549-Zellen wurden mit dem wt-Virus oder den NS1-Virusmutanten P122/5L oder xSH3G infiziert und während der Inkubationszeit mit 800 nM GA behandelt. Die Zellüberstände wurden 24 h p.i. abgenommen und titriert.

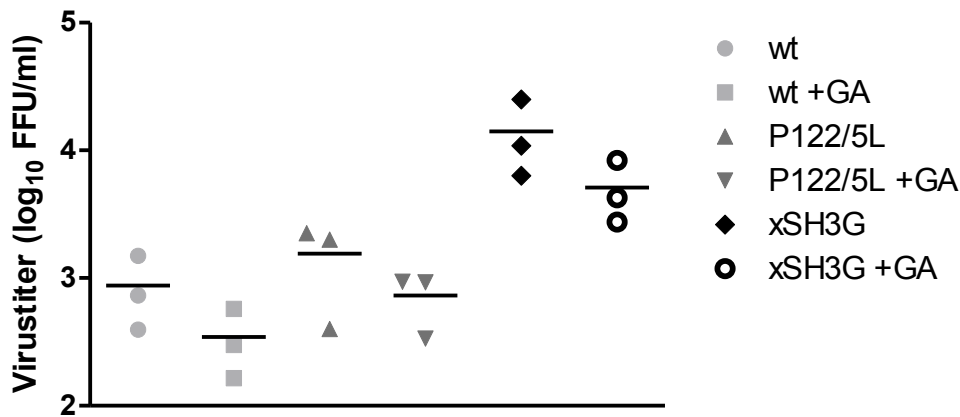


Abb. 33: Inhibition von HSP90 verringert die Vermehrung von Influenza B Viren. A549-Zellen wurden mit den Viren wt, P122/5L und xSH3G mit einer MOI von 0,01 infiziert. Dem Infektionsmedium wurde 800 nM DMSO-gelöstes Geldanamycin (GA) bzw. die entsprechende Menge DMSO (Positivkontrolle) zugesetzt. 24 h p.i. wurden die Überstände gesammelt und durch Avicel-Plaques-Assay titriert. Die Abbildung zeigt die Werte aus drei unabhängigen Versuchen und den jeweiligen Mittelwert.

Es zeigte sich bei allen drei Virusvarianten eine vergleichbare Abhängigkeit vom zellulären Chaperon HSP90. Die Virustiter des wt-, P122/5L- und xSH3G-Virus sanken infolge der GA-Behandlung um ungefähr 0,5 Log-Stufen (Abb. 33). HSP90 unterstützt demnach auch die Influenza B Virusvermehrung. Der unspezifische Effekt der Geldanamycin-Behandlung deutet darauf hin, dass neben dem mutierten NS1-Protein auch andere virale Proteine von der HSP90-Funktion abhängig sind. Auch die Beeinträchtigung von HSP90-abhängigen zellulären Signalwegen, die für die Influenza B Virusvermehrung wichtig sind (z. B. vermittelt durch Akt und PKR – siehe Abb. 7), könnten diese Beobachtung erklären.

4 Diskussion

Die hohe Fehlerrate der RNA-Polymerase von Influenzaviren (ungefähr ein Fehler pro repliziertem Genom) führt zu einer schnellen Anpassung der Viren an veränderte Bedingungen in der Wirtszelle. Durch Mutationen in der Nukleotidsequenz der viralen Gensegmente entstehen in der infizierten Zelle Proteinvarianten, welche das Überleben und die Verbreitung der adaptierten Viren sichern (Boivin *et al.*, 2010). Die hohen Mutationsraten, die Populationsgröße und die kurze Replikationszeiten befähigen das Virus außerdem zur Resistenzentwicklung gegen antivirale Therapien, die spezifisch gegen Virusproteine gerichtet sind (Geller *et al.*, 2012). Proteinbereiche, die trotz der hohen Mutationsrate unter den Virusstämmen hochkonserviert sind, weisen auf strukturell oder funktionell wichtige Sequenzabschnitte hin, auf deren Funktion die Viren nur schlecht verzichten können. Antivirale Medikationen, welche diese Proteinfunktionen torpedieren, hätten daher vielversprechende Therapieaussichten.

Im Fokus dieser Arbeit stand das NS1-Protein von Influenza B Viren. Die NS1-Proteine von Influenza A und B Viren sind essentiell für die effiziente Virusreplikation und antagonisieren das Typ I-Interferonsystem der Zelle (Dauber *et al.*, 2004; Donelan *et al.*, 2004; Wathelet *et al.*, 1998; Ludwig *et al.*, 2002), haben jedoch eine geringe Sequenzidentität von weniger als 25 %. Während für das A/NS1-Protein bislang viele zelluläre Interaktionspartner und molekulare Wirkmechanismen beschrieben wurden, liegen für das B/NS1-Protein vergleichsweise wenig Informationen in der Literatur vor (siehe Kapitel 1.1.4 und 1.1.5). Die *in silico*-Identifikation des in über 300 Influenza B Virusstämmen hochkonservierten NS1-Proteinbereichs 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 mit Homologie zum Klasse II-SH3-Bindemotiven (**PxxPxK/R**) lies bisher unbekannt und für die effiziente Virusvermehrung relevante Proteinfunktionen vermuten.

Um die Funktion der hochkonservierten Aminosäuresequenz 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 des B/NS1-Proteins aufzuklären, wurden in der vorliegenden Arbeit Virusmutanten mit Substitutionen in dem konservierten Proteinbereich generiert. Unerwarteterweise führte die Mutation der gesamten konservierten Sequenz zu 122-**G-g-g-G-g-G**-127 zu einer robusten Erhöhung der Replikationsfähigkeit in humanen Zellen. Diese

zusätzlich erzeugte Funktion der Aminosäuresubstitution ging im Vergleich zum Wildtyp mit verstärkter viraler Genexpression, sowie erhöhter Apoptoseinduktion der infizierten Wirtszellen einher, hatte jedoch keinen Einfluss auf deren IFN β -Expression. Letztlich konnte gezeigt werden, dass die vollständige Substitutionen des Aminosäuremotivs 122-**P-x-x-P-x-(K/R)**-127 während der Infektion zu einer verstärkten Interaktion des NS1-Proteins mit viralen Polymerasekomponenten und dem Wirtszellchaperon HSP90 β führen.

Die Kenntnis über die Funktionsweise des B/NS1-Proteins in der Wirtszelle ist für die Entwicklung von antiviralen Pharmazeutika von besonderem Interesse. Durch den gezielten Angriff von hochkonservierten Sequenzen des viralen Proteins oder von Wirtsfaktoren, die der Virusreplikation zuträglich sind, könnte die Resistenzentwicklung der Viren in Zukunft erschwert werden.

4.1 Die Substitution der gesamten 122-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenz im B/NS1-Protein führt durch verstärkte HSP90-PB2-Bindung zu gesteigerter Replikation von Influenza B Viren in humanen Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der konservierten 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Aminosäuresequenz auf die Replikationsfähigkeit von Influenza B Viren untersucht. Die Substitution der beiden hochkonservierten Proline zu P122/5L hatte in humanen Zelllinien eine leicht verstärkte Replikation der Virusmutante von ungefähr einer Log-Stufe gegenüber dem wt-Virus zur Folge. Die Mutation der Proteinregion zu 121-**Y-G-g-g-G-g-G**-127 (xSH3G) führte hingegen zu signifikant erhöhter viraler Vermehrung von 2-3 Log-Stufen in humanen Zellen (Abb. 12C/D). Außerdem konnten für die viralen Proteine dieser Virusmutante eine um ca. 2 h beschleunigte Expression (Abb. 13) und eine frühe Relokalisierung ins Zytoplasma im Vergleich zu den wt-Virusproteinen gezeigt werden (Abb. 14). Demgegenüber hatte die Substitution der hochkonservierten Aminosäuresequenz keinen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit des humanpathogenen Virus in kaninen Epithelzellen und im embryonalen Brutei (Abb. 12A/B). Die Funktion der hochkonservierten 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Aminosäuresequenz im NS1-Protein von Influenza B Viren scheint damit interessanterweise auf Primatenzellen beschränkt zu sein. Inwieweit sich der Phänotyp der xSH3G-Virusvariante auch *in vivo* bestätigt, könnte im Tiermodell weiterführend untersucht werden.

Die konservierten Aminosäuren 121-127 sind im NS1-Protein in einem Bereich lokalisiert, der für die Funktion der Interferon-Antagonisierung von Bedeutung ist (Donelan *et al.*, 2004). Daher stellte sich die Frage, ob die Aminosäuresubstitutionen in dieser Proteinregion Einfluss auf die Fähigkeit der Interferon-Antagonisierung des NS1-Proteins haben. Dies konnte experimentell ausgeschlossen werden. Die beiden Virusmutanten P122/5L und xSH3G sind wie das wt-Virus in der Lage die IFN-Expression in A549-infizierten Zellen zu unterdrücken (Abb. 18B). Der Einfluss von Interferon auf die Vermehrung der 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Virusmutanten wurde durch Infektion IFN-defizienter Vero-Zellen analysiert. Hierbei zeigte sich eine ähnliche Vermehrungskinetik der Viren wie auf IFN-kompetenten humanen Zelllinien (Abb. 18A). Demnach ist das xSH3G-Virus unabhängig vom IFN-Level in den infizierten Zellen zu einer stark erhöhten Virusreplikation fähig. In IFN-kompetenten A549- und Calu3-Zellen sind beide Virusmutanten zur IFN-Antagonisierung fähig und zeigen daher in diesen Zellen eine ähnliche Replikationskinetik wie in IFN-defizienten Vero-Zellen.

In den xSH3G-Virus-infizierten Zellen wurde eine verstärkte Apoptoseinduktion nachgewiesen (Kapitel 3.5 und 4.3). Da Influenza A Viren durch proapoptotische Mechanismen spät im Infektionsverlauf den programmierten Zelltod induzieren (Zhirnov und Klenk, 2007) und die antiapoptotische Reaktion der Wirtszelle zur Optimierung der viralen Vermehrung nutzen zu können (Ludwig *et al.*, 2006), wurde in dieser Arbeit durch einen Caspase-3-Inhibitor die Rolle der Apoptose für die Vermehrungsfähigkeit von Influenza B Virus analysiert. Während die Apoptoseinhibition zu einer Reduktion der wt-Virusvermehrung um ungefähr 0,4 Log-Stufen führte, hatte die Inhibition der Caspase-3 keinen Einfluss auf die verstärkte Virusreplikation der xSH3G-Virusmutante (Abb. 28). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die gesteigerte Apoptoseinduktion nach xSH3G-Infektion nicht die *Ursache* für die – im Vergleich zur wt- und P122/5L-Virusreplikation – erhöhte virale Vermehrung, sondern eine *Folge* der gesteigerten Replikation ist.

Die NS1-Proteine beider Virusvarianten P122/5L und xSH3G interagierten verstärkt mit dem Nukleoprotein viraler Ribonukleoproteinkomplexe (Abb. 17) und führten im Vergleich zum NS1-wt-Protein zu verstärkter viraler Genexpression (Abb. 16B). Dennoch zeigte nur die xSH3G-Virusmutante eine erhöhte virale Replikationsfähigkeit

von bis zu 3 Log-Stufen und eine beschleunigte virale Proteinexpression in humanen Zelllinien (Abb. 12C/D und 13). Daher stellte sich die Frage, wie sich die deutlichen Unterschiede zwischen xSH3G- und wt- bzw. P122/5L-Virusreplikation dennoch erklären lassen. Durch ein Massenspektrometrie-basiertes Verfahren und Ko-Immunopräzipitations-Analysen konnte das Wirtzellchaperon HSP90 β als mögliche zelluläre Schnittstelle für die verstärkte Vermehrung der xSH3G-Virusmutante identifiziert werden. Infolge der xSH3G-Mutationen im hochkonservierten 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Bereich wurde eine Bindung von NS1 an HSP90 in infizierten Zellen nachgewiesen (siehe Kapitel 3.6). Diese Protein-Protein-Interaktion von Virus und Wirtszelle resultierte in einer HSP90-PB2-Bindung, die in wt- und P122/5L-Virus-infizierten Zellen nicht detektiert werden konnte (Abb. 32B).

Wie kann eine B/NS1-HSP90-Interaktion die erhöhte Replikationsfähigkeit der xSH3G-Virusmutante erklären? Eine Interaktion des viralen NS1-Proteins mit HSP90 wurde bereits für Influenza A Virus beschrieben. Diese Bindung resultierte in der Apoptoseinduktion der infizierten Zellen (Zhang *et al.*, 2011). Ferner wurde für das A/NS1-Protein eine Interaktion mit viralen Ribonukleoproteinkomplexen (vRNP) beschrieben und dessen regulatorische Aktivität bei der viralen RNA-Synthese vermutet (Marión *et al.*, 1997, Robb *et al.*, 2011, Min *et al.*, 2007, Shimizu *et al.*, 1994). In vorhergehenden Studien konnte zudem eine Bindung von HSP90 an die viralen Polymerasekomponenten PB1 und PB2 des Influenza A Virus nachgewiesen werden. In einem *In vitro*-Assay stimulierte HSP90 die virale RNA-Synthese (Momose *et al.*, 2002; Naito *et al.*, 2007). Aus diesen Beobachtungen ergab sich folgendes Modell für Influenza A Virus: HSP90 wird parallel mit PB1 und PB2 in den Zellkern transportiert und bildet zusammen mit den beiden Polymerase-Untereinheiten einen stabilen Komplex, bevor durch PA-Bindung der ternäre Polymerase-Komplex gebildet wird (Abb. 8). HSP90 scheint demnach bei dem nukleären Transport der Polymerase-Untereinheiten PB1 und PB2 involviert zu sein, sowie als Chaperon des PB1-PB2-Komplexes während der Assemblierung mit der PA-Untereinheit zu dienen (Naito *et al.*, 2007). Die Inhibition von HSP90 durch Geldanamycin reduzierte die Halbwertszeit von PB1 und PB2 in der Zelle und hemmte den nukleären Import von PB1 und PA. Dadurch wurden weniger virale RNP-Komplexe in den infizierten Zellen gebildet und es kam zu verminderter RNA-Synthese sowie zu einer reduzierten viralen Vermehrung von 1-2 Log-Stufen in der Anfangsphase (bis 36 h p.i.) der Influenza A Virusinfektion (Chase *et al.*, 2008).

Anhand der Ergebnisse für Influenza A Viren und der Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit kann für die Influenza B Virusinfektion und die erhöhte Replikation der xSH3G-Virusmutante folgendes Modell zur Erklärung des Befundes vorgeschlagen werden. In der frühen Infektionsphase replizieren das wt-Virus und die NS1-Virusmutanten zu ungefähr gleichen Virustitern. Erst nach Expression der Nichtstrukturproteine ab etwa 8 h p.i. werden Replikationsunterschiede sichtbar (Abb. 13 bzw. 12C/D). Während eine Bindung des wt-NS1-Proteins mit HSP90 nicht nachweisbar ist (Kapitel 3.6 und Abb. 34A), interagiert das mutierte NS1-xSH3G-Protein mit dem zellulären HSP90-Chaperon (Kapitel 3.6), sowie verstärkt mit den Komponenten NP und PB2 des vRNP-Komplexes (Abb. 17). Es entsteht ein Komplex aus HSP90-, PB2- und dem xSH3G-NS1-Protein (Abb. 32B und 34B). HSP90 wird zusammen mit PB2 in den Zellkern transportiert und unterstützt durch die verstärkte Bildung der ternären Polymerase-Komplexe die virale Genexpression und Virusreplikation der xSH3G-Virusmutante im Vergleich zum wt-Virus (Abb. 34B). Eine HSP90-PB1-Interaktion, die in Influenza A Virus-infizierten Zellen detektiert wurde (Naito *et al.*, 2007), konnte in der vorliegenden Arbeit durch fehlende Influenza B/PB1-spezifische Antikörper nicht überprüft werden. Eine Bindung von HSP90 an den binären PB1-PB2-Komplex ist ebenfalls möglich. Weiterhin ist fraglich, ob bzw. zu welchem Zeitpunkt der Infektion das NS1-xSH3G-Protein aus dem HSP90-PB2-Komplex freigesetzt wird (Abb. 34B).

Dieses Modell kann ebenfalls für die NS1-P122/5L-Proteinvariante angewendet werden. In transfizierten Zellen bindet das mutierte Protein das zelluläre Chaperon HSP90 (Abb. 31B), sodass bei Ko-Transfektion der Polymerase-Untereinheiten eine Rekrutierung von PB2 an HSP90 stattfindet (Abb. 34B). In infizierten Zellen wird das NS1-P122/5L-Protein nicht durch HSP90 gebunden (Abb. 32B). Es findet keine Rekrutierung von PB2 statt (Abb. 32B) und die Polymerase-Assemblierung verläuft wie in wt-Virus-infizierten Zellen (Abb. 34A). Die verstärkte Genexpression nach PB2-NS1-P122/5L-Ko-Transfektion im Luziferase-Assay (Abb. 16B) lässt sich somit unabhängig von der Replikationseffizienz des P122/5L-Virus erklären (Abb. 12C/D).

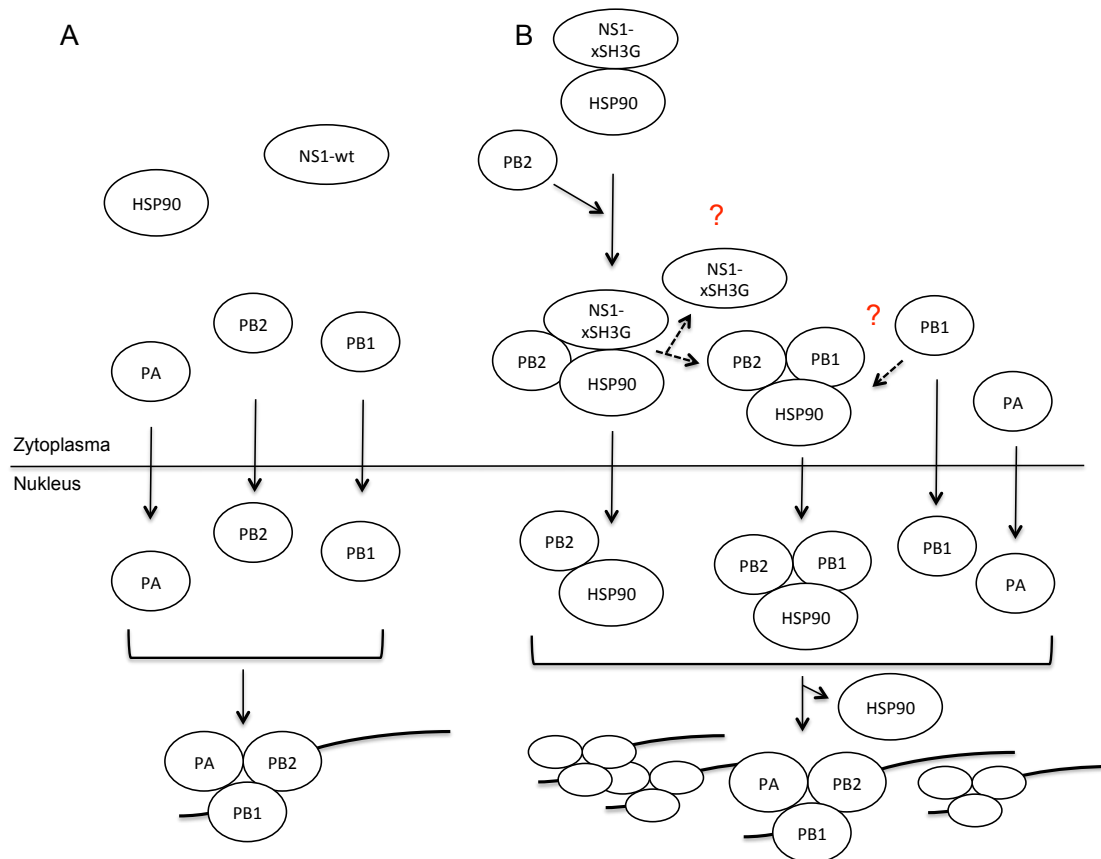


Abb. 34: Modell zum nukleären Import der Polymerase-Untereinheiten und zur Assemblierung des Polymerasekomplexes in wt-Virus- (A) und xSH3G-Virus-infizierten (B) Zellen. Details siehe Text.

Zwei ähnliche Aminosäuremotive zum konservierten 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127-Sequenzbereich im B/NS1-Protein wurden im A/NS1-Protein von Influenza A/PR/8/34 (H1N1) Viren als SH3-Bindemotive beschrieben. Die Mutation des C-terminalen SH3-Bindemotivs (212-S-P-L-T-P-216 zu 212-S-A-L-T-A-216) im A/NS1-Protein führte nur zu leicht abgeschwächter Vermehrung der rekombinanten Viren in MDCKII-Zellen. Hingegen führten die Aminosäuresubstitutionen 164-P-S-L-P-167 zu 164-A-S-L-A-167 bzw. die Mutation beider SH3-Bindemotive zu einer Reduktion der viralen Replikationsfähigkeit von ungefähr einer Log-Stufe. Funktionell wurde diese verminderte Vermehrungsfähigkeit mit einer reduzierten NS1-p85 β -Interaktion und einer verminderten PI3K/Akt-Aktivierung begründet (Shin *et al.*, 2007). Für Influenza A/PR/8/34-Viren wurde eine HSP90-Bindung an die Polymerase-Untereinheiten PB1 und PB2 beschrieben (Naito *et al.*, 2007). Inwieweit die Substitution der C-terminal lokalisierten SH3-Bindemotive des A/NS1-Proteins mit der HSP90-Funktion der Polymerasekomplex-Assemblierung zusammenhängt, ist bisher ungeklärt.

Das Modell zum Einfluss des Wirtsfaktors HSP90 auf die Assemblierung der viralen Polymerasekomplexe von Influenza B Virus wirft die Frage auf, warum das zelluläre Chaperon HSP90 mit der NS1-xSH3G-Proteinmutante interagiert und dadurch der Virusmutante gegenüber dem wt-Virus einen Replikationsvorteil verschafft. Die zellulären HSP90-Chaperone machen ungefähr ein bis zwei Prozent des Proteingehalts von Zellen aus und unterstützen unter anderem die Proteinfaltung, -reifung und -aktivität ihrer zellulären und viralen Substrate. Eine HSP90-Inhibition hat daher häufig die Degradierung eines Proteins zur Folge. Viele virale Proteine sind – wie das NS1-Protein von Influenza B Viren – aufgrund der limitierenden Größe des viralen Genoms multifunktionell und daher strukturell sehr komplex. Diese Komplexität sowie die hohe Mutationsrate der RNA-Virus-Polymerase haben eine Abhängigkeit der viralen Proteine von zellulären Chaperonfunktionen zur Folge. Chaperone puffern die schädliche Wirkung der Mutationen, halten somit die Proteinaktivitäten aufrecht und erleichtern virale Adaptationen an antivirale Bedingungen in der Wirtszelle. Der exakte Mechanismus wie HSP90 in den Vermehrungszyklus eingreift, ist für viele Viren jedoch noch unbekannt (Geller *et al.*, 2012).

Eine ähnliche Beobachtung der HSP90-Bindung infolge von Proteinmutationen machte Blagosklonny für eine mutierte Form des Tumor-Suppressorproteins p53 (p53-143^{ala}). Diese mutierte p53-Form, aber nicht das wt-Protein bindet an das Chaperon HSP90. Die Inhibition von HSP90 durch Geldanamycin hat eine Destabilisierung von p53-143^{ala} zur Folge. Das mutierte Protein kann im Gegensatz zum p53-wt-Protein immunologisch nur noch schwer nachgewiesen werden (Blagosklonny *et al.*, 1996).

Für das NS1-Protein von Influenza B Viren könnte aus diesen Erkenntnissen eine strukturelle Eigenschaft des konservierten Aminosäuremotivs 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127 abgeleitet werden. Die Bindung von HSP90 an das mutierte NS1-Protein resultiert aus Substitutionen in dem zentral lokalisierten Aminosäuremotiv. Das NS1-wt-Protein interagiert nicht oder nur in geringem Maße mit dem Hilfsprotein und benötigt dessen Eigenschaften offenbar nicht. Möglicherweise unterstützt das hochkonservierte Proteinmotiv 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127 die Bildung von NS1-Proteinen, deren stabile Konformation unabhängig von zellulären Chaperon-Proteinen ist. Im Gegensatz dazu benötigen die P122/5L- und xSH3G-Proteinmutanten das HSP90-Chaperon vermutlich zur korrekten Proteinfaltung und Aufrechterhaltung ihrer Proteinfunktion. Während in transfizierten Zellen beide mutierten NS1-Proteine P122/5L

und xSH3G das HSP90-Chaperon binden (Abb. 31B), ist in infizierten Zellen nur eine HSP90-Interaktion des mutierten xSH3G-Proteins detektierbar (Abb. 32B). Offenbar können die zwei Substitutionen P122/5L im NS1-Protein während der Infektion durch andere virale Faktoren, z. B. durch Bindung des Nukleoproteins (Abb. 17), ausgeglichen werden und nur das NS1-Protein mit vollständig substituiertem Motiv (122-**G**-g-g-**G**-g-**G**-127) benötigt zur Unterstützung seiner Stabilität das zelluläre Chaperon. In weiteren Untersuchungen könnte die Aktivität von HSP90 durch Geldanamycin-Behandlung inhibiert werden und die Stabilität der mutierten NS1-Proteine in transfizierten bzw. infizierten Zellen durch immunologische Detektion überprüft werden.

Für Influenza B Viren wurde in dieser Arbeit erstmals eine Bindung von HSP90 und viralen NS1-Proteinmutanten beschrieben. Während das NS1-wt-Protein nicht nachweisbar mit dem HSP90-Chaperon interagiert, führten die gezielten Veränderungen P122/5L und xSH3G im mittleren Bereich des multifunktionellen Proteins zur HSP90-Bindung. Eine Degradierung der Proteinvarianten wurde nicht detektiert (Abb. 13), ebensowenig eine verringerte Virusreplikation gegenüber der des wt-Virus (Abb. 12). Das HSP90-Protein scheint damit auch bei Influenza B Viren auftretende Mutationen und deren schädliche Wirkung für die Virusvermehrung zu puffern und somit die Anpassung an veränderte Umweltbedingungen zu gewährleisten. Die HSP90-Inhibition mit einer Geldanamycin-Konzentration, die die Zellviabilität nicht beeinträchtigt (Chasse *et al.*, 2008), führte sowohl bei den NS1-Virusmutanten als auch bei dem wt-Virus zu einer geminderten Virusreplikation von ungefähr 0,5 Log-Stufen (Abb. 33). Dieser Effekt deutet darauf hin, dass neben dem mutierten NS1-Protein auch andere virale Proteine von der HSP90-Funktion abhängig sein könnten. Außerdem werden durch Reduktion der HSP90-Aktivität für die virale Replikation wichtige zelluläre Signalwege (z. B. vermittelt durch Akt und PKR – Abb. 7 und 35) beeinträchtigt.

4.2 B/NS1 bindet über das Sequenzmotiv 121-Y-P-x-x-P-x-(K/R)-127 das Adaptorprotein Crk und supprimiert den JNK/ATF2-Signalweg

Das konservierte 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motiv im B/NS1-Protein zeigt Homologien zu dem Sequenzmotiv 212-**P-P-L-P-P-K**-217, das im NS1-Protein vieler aviärer Influenza A Viren, sowie des „Spanischen Grippe“-Virus identifiziert wurde. Diese Sequenz ist für die Interaktion der NS1-Proteine mit den SH3-Domänenproteinen

Crk/CrkL wichtig (Heikkinen *et al.*, 2008). Auch das konservierte 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motiv im B/NS1-Protein ist für die Bindung des zellulären Adaptorproteins Crk verantwortlich. In Immunpräzipitationsanalysen konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl der Aminosäureaustausche in diesem Motiv und der Stärke der Crk-B/NS1-Interaktion gezeigt werden. Je mehr die 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Sequenz verändert wurde, desto weniger Crk-B/NS1-Komplexe wurden detektiert (Abb. 19). Die Crk-B/NS1-Interaktion findet überwiegend im Zellkern und früh im Infektionsverlauf statt (Abb. 20). Das virale NS1-Protein ist zu diesem Zeitpunkt überwiegend in nukleären Speckledomänen lokalisiert und verhindert durch die Crk-Bindung möglicherweise eine direkte Crk-JNK-Interaktion, die zu JNK-Aktivierung führt (Girardin und Yaniv, 2001) (Abb. 35A). Die vollständige Substitution des konservierten Motivs führte neben einer stark abgeschwächten Crk-NS1-Bindung (Abb. 19) zu einer verstärkten JNK/ATF2-Signaltransduktion (Abb. 21). Gesteigerte ATF2-Aktivierung korreliert mit erhöhter Apoptoseinduktion (Abb. 35B).

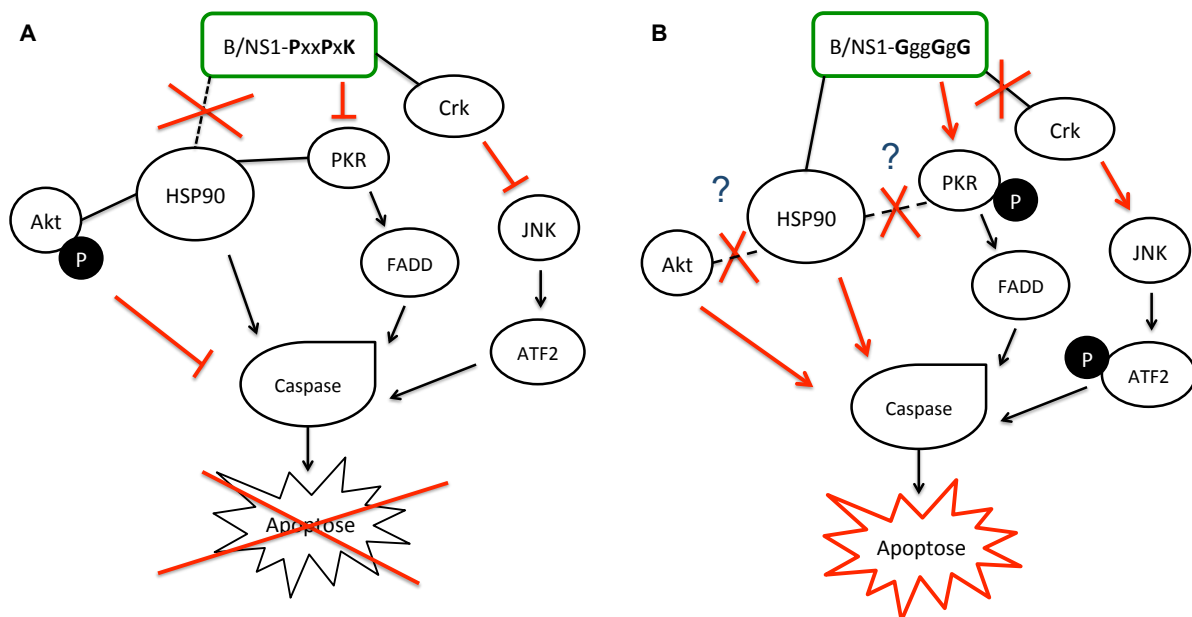


Abb. 35: Auswirkungen der vollständigen Substitution des B/NS1-121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motivs. Auswirkungen des konservierten Sequenzmotivs (PxxPxK) (A) oder seiner vollständigen Substitution (GggGgG) (B) sind durch rote Pfeile bzw. Balken dargestellt. Schwarze Balken symbolisieren Protein-Protein-Interaktion, schwarze Pfeile den Verlauf eines Signalweges. Details siehe Text.

Dennoch hat die Reduktion der zellulären Crk-Proteinmenge durch Stilllegung der CrkI/II-mRNA nur geringe Auswirkungen auf die Vermehrungsfähigkeit von Influenza B Virus (Abb. 23). Diese Effekte der SH3-Bindemotiv-abhängigen Crk-NS1-Bindung auf die zelluläre JNK/ATF2-Signaltransduktion und virale Replikation wurden bereits für aviäre Influenza A Viren beschrieben (Hrinčius *et al.*, 2010). In der vorliegenden

Arbeit konnte nun erstmal gezeigt werden, dass das konservierte 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motiv im B/NS1-Protein ähnliche Auswirkungen auf die Crk-abhängige Signaltransduktion in infizierten Zellen hat. Diese Funktion des konservierten **P-x-x-P-x-K/R**-Motivs scheint also zwischen aviären Influenza A- und humanpathogenen Influenza B Virusstämmen konserviert zu sein.

Das Sequenzmotiv 212-**P-x-x-P-x-(K/R)**-217 im NS1-Protein aviärer Influenza A Viren führt außerdem zu verstärkter PI3K/Akt-Aktivierung (Heikkinen *et al.*, 2008). Die Aktivierung dieses Signalweges findet bei Influenza B Viren nur sehr früh im Infektionsverlauf durch die Virusbindung und -aufnahme durch die Wirtszelle und damit unabhängig von der Expression des viralen NS1-Proteins statt (Ehrhardt *et al.*, 2007). Dennoch führt die vollständige Substitution des 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motivs im B/NS1-Protein spät in der Infektion zu einer Reduktion der Akt-Phosphorylierung unter das basale Hintergrund-Niveau, das nach wt- und P122/5L-Infektion erreicht wird (Abb. 22). Möglicherweise ist auch diese Beobachtung mit der HSP90-NS1-Interaktion zu begründen. Durch eine HSP90-Akt-Bindung könnte die phosphorylierte Form des Akt-Proteins stabilisiert werden. Eine Inhibition dieser Interaktion macht Akt für die Phosphatase PP2A zugänglich. Das Akt-Protein wird dephosphoryliert und in den Zellen wird Apoptose induziert (Abb. 7B; Sato *et al.*, 2000). Daher könnte die Bindung von HSP90 an das destabilisierte NS1-xSH3G-Protein die HSP90-Akt-Interaktion so reduzieren, dass zum Zeitpunkt der NS1-Expression (ab 6 h p.i. – Abb. 13) die Akt-Phosphorylierung in der Infektion abnimmt (Abb. 22 und 35). Diese Hypothese der Akt-NS1(xSH3G)-Konkurrenz um eine HSP90-Bindung könnte in weiteren Analysen durch Ko-Immunoprecipitation überprüft werden.

4.3 Die vollständige Substitution des 122-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motivs führt zu gesteigerter PKR-Aktivierung und Apoptoseinduktion in infizierten Zellen**

In Kapitel 4.2 wurden die Auswirkungen des NS1-121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motivs auf zwei zelluläre Signalwege während der Infektion beschrieben. Sowohl die Suppression des JNK/ATF2-Signalwegs, als auch die basale Phosphorylierung von Akt unterdrücken in der wt-Virus-infizierten Zelle die Induktion der Apoptose (Abb. 35A).

Ein anderer apoptotischer Signalweg, dessen Aktivierung ebenfalls durch das NS1-Protein reguliert wird, verläuft über die Proteinkinase R (PKR). Durch die N-terminale Bindung doppelsträngiger RNA interagiert das B/NS1-Protein mit PKR und inhibiert deren Aktivierung (Dauber *et al.*, 2006). Da aktivierte PKR die FADD-vermittelte Caspase-8-Aktivierung induziert und somit zur Apoptoseinduktion der infizierten Zellen führt (Abb. 35; García *et al.*, 2007), kann durch den Mechanismus der NS1-PKR-Interaktion die Apoptoseinduktion Virus-infizierter Zellen unterdrückt werden (Abb. 35A).

Die vollständige Substitution des zentral lokalisierten NS1-122-**P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motivs führte in infizierten Zellen zu einer Aktivierung der Proteinkinase R (Abb. 24), sowie zu verstärkter Apoptose (siehe Kapitel 3.5). Aktivierte PKR phosphoryliert den Translationsinitiationsfaktor eIF2 α , der dadurch inaktiviert wird und die zelluläre Translationsmaschinerie und die davon abhängige virale Replikation hemmt (Samuel, 1988). Eine verminderte Virusreplikation aufgrund einer Translationsinhibition konnte jedoch nicht festgestellt werden: das mutierte Virus zeigte sogar eine stark erhöhte Replikationsfähigkeit, die mit frühzeitig einsetzender viraler Genexpression verbunden war (Abb. 12C/D, Abb. 13 und Kapitel 4.1). Eine Reduktion der zellulären PKR-Proteinmenge durch einen stabilen PKR-*knockdown* wirkte sich nur minimal auf die virale Replikation von wt-Virus und der P122/5L-Virusmutante aus (Abb. 26). Die leicht reduzierte xSH3G-Virusreplikation von ungefähr 0,7 Log-Stufen nach PKR-*knockdown* lässt einen Einfluss der Proteinkinase R auf die effiziente Virusvermehrung vermuten, erklärt aber nicht vollständig die stark gesteigerte Replikationsfähigkeit der Virusmutante gegenüber dem wt-Virus (Abb. 26).

Ähnliche Beobachtungen machten Min und Kollegen für die zentral lokalisierten Aminosäuren 123-I-M-D-K-N-127 des NS1-Proteins von Influenza A/Udorn/72 (H3N2) Virus. Die Mutation dieser Aminosäuren hatte eine verringerte PKR-NS1-Bindung, sowie eine verstärkte Aktivierung der zellulären Proteinkinase zur Folge. Außerdem führte die Substitution der Aminosäuren 123 und 124 zu Alaninen zu vermehrter viraler RNA-Synthese, Proteinexpression und beschleunigter Virusreplikation. Sie schlussfolgerten aus diesen Ergebnissen, dass der Bereich 123-127 des A/NS1-Proteins für die direkte Interaktion mit PKR und deren Inhibition verantwortlich ist (Min *et al.*, 2007).

Für die zentral lokalisierten Aminosäuren 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 im B/NS1-Protein konnte hingegen keine Beteiligung an der PKR-NS1-Bindung nachgewiesen werden (Abb. 25).

Wie könnte ein gemeinsames Modell für den Effekt der PKR-Aktivierung nach Mutationen im zentralen Bereich der NS1-Proteine von Influenza A und B Viren aussehen? Auch hier könnte die Bindung des zellulären HSP90-Chaperons an die mutierten NS1-Proteine eine Rolle spielen. Möglicherweise wird HSP90 auch zur Proteinfaltung und –funktion der mutierten A/NS1-Proteine benötigt. Die schnelle Produktion der strukturell komplexen und durch Mutationen veränderten viralen (NS1-)Proteine führt das zelluläre Chaperonsystem möglicherweise an seine Kapazitätsgrenzen (Geller *et al.*, 2012), sodass andere HSP90-abhängige Wirtsproteine – wie z. B. PKR – nicht mehr durch das Chaperon gebunden werden können.

Das HSP90-Chaperon wird auch für die Proteinfaltung und –reifung der Proteinkinase R benötigt und fungiert zudem als PKR-Repressor. Durch doppelsträngige RNA oder HSP90-Inhibition dissoziiert der HSP90-PKR-Komplex und es kommt zur Kinaseaktivierung (Abb. 7A; Donzé *et al.*, 2001). Die HSP90-NS1-Bindung infolge der zentral lokalisierten Aminosäuresubstitutionen im NS1-Protein könnte somit zu einer Reduktion der reprimierenden PKR-HSP90-Bindung führen, PKR dissoziiert vom Chaperonkomplex und wird schließlich aktiviert (Abb. 35B). Inwieweit die NS1-HSP90-Interaktion die PKR-Inhibition durch das virale NS1-Protein beeinträchtigt, könnte in weiterführenden Studien durch Ko-Immunopräzipitation analysiert werden.

Anhand dieses Modells könnte auch die beschleunigte Virusreplikation des Influenza A/Udorn/72 (H3N2)-Virus mit I123A/M124A-Mutation im NS1-Protein erklärt werden (Min *et al.*, 2007). Die Doppelmutation im zentralen Bereich des A/NS1-Protein könnte infolge einer HSP90-Bindung – wie beim Influenza B Virus (Abb. 34) – eine gesteigerte Rekrutierung der PB2-Untereinheit an HSP90 zur Folge haben. Eine damit verbundene erhöhte Polymerasekomplex-Konzentration im Zellkern könnte der Grund für die vermehrte virale RNA-Synthese, Proteinexpression und beschleunigte Virusreplikation sein. Das vorgeschlagene Modell erweitert die Erklärung von Min und Kollegen, die eine funktionelle Interaktion der Aminosäuren 123/124 des A/NS1-Proteins mit dem viralen Polymerasekomplex und eine daraus resultierende Regulation der viralen RNA-Synthese vermuteten (Min *et al.*, 2007).

Neben dem Translationsinitiationsfaktor eIF2 α ist die ATP abhängige RNA-Helikase A DHX9 ein weiteres Substrat der PKR. In der Massenspektrometrie-basierten Analyse der vorliegenden Arbeit konnten sowohl die DHX9 als auch das heterogene nukleäre Ribonukleoproteins U (HNRPU) als NS1-xSH3G-Bindungspartner identifiziert werden (Tab. 5). Beide Proteine sind Komponenten des mRNP (*messenger* Ribonukleoprotein) –Komplexes zellulärer mRNAs. In einem mRNP-Komplex werden die mRNA-Transkripte einer Zelle durch verschiedene Proteinkomplexe gebunden, die dessen ko- und post-transkriptionale Modifikationen bestimmen (Hieronymus und Silver, 2004). Das DHX9-Protein wird durch ein Interferon-stimuliertes Gen exprimiert und besitzt sowohl RNA- als auch DNA-Helikase-Aktivität (Fullam *et al.*, 2013). Für Influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) Viren wurde bereits eine RNA-abhängige Interaktion von DHX9 mit dem NS1-Protein in infizierten Zellen beschrieben. Ein DHX9-*knockdown* führte zu reduzierter mRNA und cRNA-Produktion, sowie zu reduzierter Virusvermehrung um den Faktor 300 (Lin *et al.*, 2012). Der exakte Mechanismus der Regulation der Influenza A Virusreplikation durch DHX9 ist bisher noch unklar (Lin *et al.*, 2012). Aktivierte PKR phosphoryliert DHX9 und reduziert damit deren Affinität für RNA (Sadler *et al.*, 2009). Da in xSH3G-Virus-infizierten Zellen verstärkt PKR phosphoryliert wird (Abb. 24), stellt sich die Frage, ob die detektierte DHX9-NS1-Bindung ebenfalls RNA-abhängig ist und inwieweit diese Interaktion der Vermehrung der xSH3G-Virusmutante zuträglich ist. Diese Fragen könnten in weiteren Untersuchungen durch Bindungsassays mit und ohne RNase-Behandlung bzw. durch Vermehrungsanalysen unter DHX9-*knockdown* beantwortet werden.

Die vollständige Substitution des hochkonservierten 122-**P**-x-x-**P**-x-(**K/R**)-127-Motivs im NS1-Protein von Influenza B Virus zu 122-**G**-g-g-**G**-g-**G**-127 führt den Erkenntnissen dieser Arbeit zur Folge zu einer verstärkten NS1-HSP90 β -Bindung. Vermutlich durch die Manipulation der HSP90-Funktion sowie durch Regulation der zellulären JNK/ATF2-, Akt- und PKR-vermittelten Signalwege kommt es zur Apoptoseinduktion in den infizierten Zellen, die jedoch keine Reduktion des Virustiters zur Folge hat. Im Gegenteil: die NS1-Mutationen haben eine Interaktion von HSP90 mit der PB2-Untereinheit des viralen Polymerasekomplex zur Folge, die möglicherweise durch eine Steigerung der Viruspolymeraseassemblierung im Zellkern zu gesteigerter Virusreplikation von bis zu drei Log-Stufen in humanen Zellen führt.

Die initiale Fragestellung der vorliegenden Arbeit nach der funktionelle Bedeutung des konservierten Sequenzmotivs 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 im NS1-Protein von Influenza B Viren konnte zu einem großen Teil aufgeklärt werden. Dieses SH3-Bindemotiv des B/NS1-Proteins hat eine ähnliche Relevanz für die Regulation des Crk-vermittelten JNK/ATF2-Signalwegs und die damit verbundene Inhibition der Apoptoseinduktion wie das SH3-Bindemotiv im NS1-Protein aviärer Influenza A Viren (Hrincius *et al.*, 2000; Kapitel 3.3 und 4.2). Außerdem konnte der Einfluss der hochkonservierten Sequenz auf weitere apoptotische Signalwege gezeigt werden. Die Substitution des gesamten Proteinmotivs zu 122-**G-g-g-G-g-G**-127 hatte die gesteigerte Apoptoseinduktion in den infizierten Zellen zur Folge (Kapitel 3.5 und 4.3). Im Gegensatz zum NS1-wt-Protein interagiert die xSH3G-Proteinmutante mit HSP90 und benötigt dessen Funktion als zelluläres Chaperon vermutlich zur korrekten Proteinfaltung und Aufrechterhaltung seiner Proteinfunktion (Kapitel 4.1). Demgegenüber benötigt das NS1-wt-Protein diese Eigenschaften des Hilfsproteins offenbar nicht. Möglicherweise unterstützt das hochkonservierte Proteinmotiv 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 die Bildung von NS1-Proteinen, deren stabile Konformation unabhängig von zellulären Chaperon-Proteinen ist. Durch die Methoden der reversen Genetik ist es seit einigen Jahren möglich die Funktionen von Proteinabschnitten, -motiven oder einzelner Aminosäuren von Influenzavirusproteinen zu analysieren. Dieser Ansatz hat, wie in vielen Beispielen belegt, zu massivem Erkenntnisgewinn über die Replikation, Struktur und Pathogenität von Influenzaviren geführt (Hoffmann *et al.*, 2000; Dauber *et al.*, 2004; Donelan *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2009; Hrincius *et al.*, 2010). Die vorliegende Studie zeigt jedoch, dass durch Aminosäuresubstitutionen nicht nur die ursprüngliche Funktion dieser Aminosäuren verändert werden, sondern auch ungewollte Effekte – wie die Bindung an zelluläre Chaperone – auftreten könnten. Daher sollten Publikationen, welche die Funktionen von Virusproteinen mittels reverser Genetik analysieren auch hinsichtlich dieser Nebeneffekte überprüft werden. Eine gute Möglichkeit der Überprüfung bietet sich aus der in dieser Arbeit etablierten Methode zur globalen Untersuchung der NS1-Bindungspartner mittels Massenspektrometrie in infizierten Zellen (Kapitel 3.6.1). Dieser Ansatz ermöglicht die Identifikation von Bindungspartnern eines viralen Proteins, sodass nicht nur Hypothesengetriebene Interaktionspartner untersucht werden, sondern auch bisher unbekannte Faktoren in den Fokus der Proteinstudie rücken können.

5 Zusammenfassung

Influenza A und B Virusinfektionen können zu schweren oder letalen Krankheitsverläufen führen. Der multifunktionelle Virulenzfaktor NS1 spielt dabei für den Verlauf der Influenzavirusinfektion und die Antagonisierung der angeborenen antiviralen Abwehrreaktionen der Zelle eine entscheidende Rolle. Für das divergente NS1-Protein von Influenza A Viren (A/NS1) wurden in der Literatur bereits viele zelluläre Interaktionspartner und molekulare Mechanismen beschrieben. Im Gegensatz dazu ist über die Funktionsweise des NS1-Proteins von Influenza B Viren (B/NS1), das weniger als 25 % Sequenzidentität zum A/NS1-Protein aufweist, weniger bekannt. Die *in silico*-Identifikation des in über 300 Influenza B Virusstämmen konservierten NS1-Sequenzmotivs 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 mit Homologie zum Klasse II-SH3-Bindemotiv (**PxxPxK/R**) wies auf bisher unbekannte Proteinfunktionen hin, deren Bedeutung für die Protein-Protein-Interaktionen von Virus und Wirt und den viralen Vermehrungsverlauf in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Seit einigen Jahren ist es durch die Methoden der reversen Genetik möglich, die Funktionen von Proteinabschnitten und -motiven oder einzelner Aminosäuren von Influenzavirusproteinen zu analysieren. Zur Untersuchung des NS1-Sequenzmotivs wurden mit diesen Methoden Virusmutanten mit Aminosäuresubstitutionen in dem hochkonservierten Bereich hergestellt. Durch die Etablierung einer Methode, die erstmals in einem globalen Ansatz mittels hochauflösender Massenspektrometrie die Identifikation von NS1-Interaktionspartnern während einer Influenzavirusinfektion ermöglichte und dabei unspezifische Wechselwirkungen diskriminierte, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die vollständige Substitution des 122-**P-x-x-P-x-(K/R)**-127-Motivs durch 122-**G-g-g-G-g-G**-127 (xSH3G) zur Bindung des B/NS1-Proteins an das Chaperon HSP90 β führt. Sowohl diese Interaktion als auch die Manipulation der Crk/JNK/ATF2-, Akt- und PKR-vermittelten zellulären Signalwege korrelieren mit einer verstärkten Apoptoseinduktion in den xSH3G-Virus-infizierten Zellen. Dabei wurde jedoch keine Reduktion des Virustiters, sondern eine gesteigerte Virusreplikation von bis zu drei Log-Stufen in humanen Zellen beobachtet. Diese zusätzlich erzeugte Funktion der Aminosäuresubstitution im hochkonservierten Proteinmotiv ging mit verstärkter viraler Genexpression im Vergleich zum Wildtyp einher, wobei die IFN β -Expression der infizierten Zellen nicht beeinflusst wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die NS1-xSH3G-Mutation eine Interaktion des HSP90-Chaperons mit der viralen Polymeraseuntereinheit PB2 zur Folge hat. Dieses Ergeb-

nis deutet in Analogie zu Untersuchungen der Influenza A Virusreplikation darauf hin, dass infolge der HSP90-PB2-Bindung eine Steigerung der Viruspolymeraseassemblierung im Zellkern die erhöhte Virusvermehrung der xSH3G-Virusvariante indiziert.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass durch Mutationsanalyse eines viralen Proteins nicht nur die ursprünglichen Funktionen der substituierten Aminosäuren verloren gehen, sondern auch unerwartete Protein-Protein-Interaktionen und -aktivitäten auftreten können. Während in vorangegangenen Studien das komplexe Zusammenspiel verschiedener zellulärer Faktoren untereinander sowie mit den Komponenten des vRNP-Komplexes und dem viralen NS1-Protein nur in Ausschnitten experimentell analysiert wurden, konnte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Mutationen im hochkonservierten Aminosäuremotiv 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 des B/NS1-Proteins auf die verschiedenen Signalwege aufgeklärt und in ein Gesamtmodell eingebunden werden. Die erarbeitete Massenspektrometrie-basierte Methode bildet die Grundlage für weitere Studien über die Wechselwirkungen zwischen Influenzavirusproteinen und Proteinen der Wirtszelle. Dieser Ansatz ermöglicht die globale Identifikation von Bindungspartnern eines viralen Proteins, sodass nicht nur Hypothesengetriebene Interaktionspartner untersucht werden, sondern auch bisher unbekannte Faktoren in den Fokus von Proteinstudien rücken können. Somit kann auch in zukünftigen Analysen vermehrt Augenmerk auf mögliche Nebeneffekte von Virusmutationen gelegt und ein besseres Verständnis der Virus-Wirt-Interaktionen erreicht werden. Dies ist für die Entwicklung von antiviralen Pharmazeutika von besonderem Interesse, da durch den gezielten Angriff von Wirtsfaktoren, die der Virusreplikation zuträglich sind, die Resistenzentwicklung der Viren in Zukunft erschwert werden könnte.

6 Summary

Influenza A and B virus infections can lead to serious or lethal courses of disease. The multifunctional virulence factor NS1 plays a crucial role for the course of influenza virus infection and antagonizes the innate antiviral immune response of infected cells. Many cellular interaction partners and molecular mechanism are described for the divergent NS1 protein of influenza A virus (A/NS1) in literature. In contrast to this, little is known about the function of the NS1 protein of influenza B virus (B/NS1), which shows less than 25 % sequence identity to A/NS1 protein. The *in silico* identifi-

cation of the highly conserved motif 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 with homology to the class II SH3 binding motif (**PxxPxK/R**) within the NS1 sequence of more than 300 influenza B virus strains indicated a previously unknown protein function. The importance of this motif for protein-protein interactions of virus and host cell and for viral replication was analyzed in the presented study.

For some years it is possible to analyze functions of influenza virus protein sections and motifs or single amino acids by the methods of reverse genetics. These methods were used to generate virus mutants with amino acid substitution in the highly conserved region to investigate the NS1 protein motif. In the presented study a mass spectrometry based method was established for the first time to identify NS1 interaction partners during influenza virus infection in a global approach that discriminates unspecific interactions. Thereby, it could be shown that the entire substitution of 122-**P-x-x-P-x-(K/R)**-127 to 122-**G-g-g-G-g-G**-127 (xSH3G) leads to binding of the B/NS1 protein to the chaperon HSP90 β . Both, this interaction and manipulation of Crk/JNK/ATF2-, Akt- and PKR-mediated cellular signaling pathways correlate with increased apoptosis induction in xSH3G-infected cells. However, no reduction of virus titer was observed, but an increased virus replication up to three log levels was detected in human cells. This gain-of-function substitution within the highly conserved protein motif involved increased gene expression compared to wildtype, but had no effect on IFN- β expression levels of infected cells. It could be shown that the NS1-xSH3G mutations lead to interaction of HSP90 with the viral polymerase subunit PB2. This result indicates that HSP90-PB2 binding might induce increased virus propagation by the enhancement of virus polymerase assembly in the cell nucleus by analogy with investigations of influenza A virus replication.

The presented study clarifies that mutations within a viral protein may not only lead to a loss of the natural functions, but can also result in the occurrence of unexpected protein-protein interactions and activities. It has been shown that viral NS1 and vRNP proteins interact with several cellular proteins. However, previous studies focused only in specific virus-host-interactions. In the presented study the influence of mutations within the highly conserved NS1 amino acid motif 121-**Y-P-x-x-P-x-(K/R)**-127 on different signaling pathways was elucidated and integrated in an overall model. The established mass spectrometry based method forms the basis for further studies of interactions between influenza virus and host cell proteins. This approach enables the global identification of viral protein binding partners so that subsequent protein

studies are not only focused on hypothesis driven interaction partners, but also on so far unknown factors. In future, increased attention will be paid to possible side effects of virus mutations to facilitate a better understanding of host-virus interactions. This is a special interest for the development of antiviral pharmaceuticals, because a targeted attack of host factors beneficial for viral replication might complicate the viral development of resistance.

Literaturverzeichnis

AG Influenza (AGI). Saisonbericht 2008/09. Robert Koch-Institut.

AG Influenza (AGI). Saisonbericht 2011/12. Robert Koch-Institut.

Beaton AR and Krug RM. (1986). Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 6282-6286.

Betáková T, Nermut MV and Hay AJ. (1996). The NB protein is an integral component of the membrane of influenza B virus. *J Gen Virol* **77**: 2689-94.

Betáková T, Kollerová E. (2006). pH modulating activity of ion channels of influenza A, B, and C viruses. *Acta Virol* **50**:187-93.

Blagosklonny MV, Toretsky J, Bohan S, Neckers L. (1996). Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional HSP90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8379-8383.

Bonnet MC, Daurat C, Ottone C, and Meurs EF. (2006). The N-terminus of PKR is responsible for the activation of the NF-kappaB signaling pathway by interacting with the IKK complex. *Cell Signal* **18**: 1865-75.

Borden EC and Williams BR. (2011). Interferon-Stimulated Genes and Their Protein Products: What and How? *J Inf Cyt Res* **31**: doi: 10.1089/jir.2010.0129.

Böttcher-Friebertshäuser E, Freuer C, Sielaff F, Schmidt S, Eickmann M, Uhlendorff J, Steinmetzer T, Klenk HD, and Garten W. (2010). Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol* **84**: 5605-14.

Boivin S, Cusack S, Ruigrok RWH, and Hart DJ. (2010). Influenza A Virus Polymerase: Structural Insights into Replication and Host Adaptation Mechanisms. *J Biol Chem* **285**:28411-28417.

Brierley MM and Fish EN. (2002). Review: IFN-alpha/beta receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry. *J Interferon Cytokine Res* **22**: 835-45.

Carmo-Fonseca M, Pepperkok R, Sproat BS, Ansorge W, Swanson MS, and Lamond AI. (1991). In vivo detection of snRNP-rich organelles in the nuclei of mammalian cells. *Embo J* **10**: 1863-73.

Chase G, Deng T, Fodor E, Leung BW, Mayer D, Schwemmle M, Brownlee G. (2008). Hsp90 inhibitors reduce influenza virus replication in cell culture. *Virology* **377**: 431-439.

Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro A. (2005). The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* **86**: 627-637.

Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, and Yewdell JW. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**: 1306-1312.

Chen Z, Li Y, and Krug RM. (1999). Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *Embo J* **18**: 2273-83.

- Compans RW, Content J, and Duesberg PH. (1972). Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* 10: 795-800.
- Crescenzo-Chaigne B, Barbezange C, and van der Werf S. (2008). Non coding extremities of the seven influenza virus type C vRNA segments: effect on transcription and replication by the type C and type A polymerase complexes. *Virology* 5: 132; doi:10.1186/1743-422X-5-132.
- Cros JF, García-Sastre A, and Palese P. (2005). An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* 6: 205-13.
- Dauber B, Heins G, and Wolff T. (2004). The influenza B virus nonstructural NS1 protein is essential for efficient viral growth and antagonizes beta interferon induction. *J Virol* 78: 1865-72.
- Dauber B, Schneider J, and Wolff T. (2006). Double-stranded RNA binding of influenza B virus nonstructural NS1 protein inhibits protein kinase R but is not essential to antagonize production of alpha/beta interferon. *J Virol* 80: 11667-77.
- Dauber B, Martínez-Sobrido L, Schneider J, Hai R, Waibler Z, Kalinke U, García-Sastre A, Wolff T. (2009). Influenza B virus ribonucleoprotein is a potent activator of the antiviral kinase PKR. *PLoS Pathog* 5: e1000473.
- Desselberger U, Racaniello VR, Zazra JJ, and Palese P. (1980). The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* 8: 315-28.
- Dhanasekaran DN and Reddy EP. (2008). JNK Signaling in Apoptosis. *Oncogene* 27: 6245–6251.
- Donelan NR, Dauber B, Wang X, Basler CF, Wolff T, García-Sastre A. (2004). The N- and C-terminal domains of the NS1 protein of influenza B virus can independently inhibit IRF-3 and beta interferon promoter activation. *J Virol* 78: 11574-82.
- Donzé O, Abbas-Terki T and Picard D. (2001). The Hsp90 chaperone complex is both a facilitator and a repressor of the dsRNA-dependent kinase PKR. *Embo J* 20: 3771-3780.
- Dröseler C. (2005). Untersuchung zur Selektivität versus Promiskuität ausgewählter SH3-Domänen. Dissertation, Humboldt Universität Berlin, Medizinischen Fakultät (Charité).
- Durfee LA und Huibregtse JM. (2010). Identification and Validation of ISG15 Target Proteins. *Conjugation and Deconjugation of Ubiquitin Family Modifiers*. ISBN: 978-1-4419-6675-9.
- Ehrhardt C, Wolff T, Ludwig S. (2007). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by the non-structural NS1 protein is not conserved among type A and B influenza viruses. *J Virol* 81: 12097-100.
- Ehrhardt C, Wolff T, Pleschka S, Planz O, Beermann W, Bode JG, Schmolke M, Ludwig S. (2007b). Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J Virol* 81: 3058-67.
- Ehrhardt C and Ludwig S. (2009). A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Microbiol* 11: 863–871.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495-516.

- Elton D, Simpson-Holley M, Archer K, Medcalf L, Hallam R, McCauley J, Digard P. (2001). Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* 75: 408-419.
- Faleiro L, Lazebnik Y. (2000). Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J Cell Biol* 151: 951-959.
- Feller SM. (2001). Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* 20: 6348-71.
- Flick R, Neumann G, Hoffmann E, Neumeier E, and Hobom G. (1996). Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *Rna* 2: 1046-57.
- Forbes NE, Ping J, Dankar SK, Jia JJ, Selman M, Keleta L, Zhou Y, Brown EG. (2012). Multifunctional Adaptive NS1 Mutations Are Selected upon Human Influenza Virus Evolution in the Mouse. *PLoS ONE* 7: e31839. Doi:10.1371/journal.pone.0031839.
- Fortes P, Beloso A, and Ortin J. (1994). Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *Embo J* 13: 704-12.
- Fullam A, Schröder M. (2013). DExD/H-box RNA helicases as mediators of anti-viral innate immunity and essential host factors for viral replication. *Biochim Biophys Acta* 1829: 854-865.
- Gannage M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Ramer PC, Lee M, Strowig T, Arrey F, Conenello G, Pypaert M, Andersen J, Garcia-Sastre A, Munz C. (2009). Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe* 6:367-380.
- Garaigorta U, and Ortin J. (2007). Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res* 35: 4573-82.
- García MA, Meurs EF, Esteban M. (2007). The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control. *Biochimie* 89: 799-811.
- García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin, JE, Palese P and Muster T. (1998). Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 252: 324-330.
- Geller R, Taguwa S, Frydman J. (2012). Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochim Biophys Acta* 1823: 698-706.
- Girardin SE and Yaniv M. (2001). A direct interaction between JNK1 and CrkII is critical for Rac1-induced JNK activation. *EMBO J* 20: 3437-3446.
- Guan R, Ma L-C, Leonard PG, Amer BR, Sridharan H, Zhao C, Krug RM, and Montelione GT. (2011). Structural basis for the sequence-specific recognition of human ISG15 by the NS1 protein of influenza B virus. *PNAS* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1107032108
- Hale BG, Jackson D, Chen YH, Lamb RA, Randall RE. (2006). Influenza A virus NS1 protein binds p85beta and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14194-9.
- Hay AJ. (1992). The action of amantadinamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. *Sem Virol* 3: 21-30.

Heikkinen LS, Kazlauskas A, Melén K, Wagner R, Ziegler T, Julkunen I, Saksela K. (2008). Avian and 1918 Spanish influenza A virus NS1 proteins bind to Crk/CrkL Src homology 3 domains to activate host cell signaling. *J Biol Chem* 283: 5719-27.

Helenius, A. (1992). Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* 69: 577-578.

Herold S, Steinmueller M, von Wulffen W, Cakarova L, Pinto R, Pleschka S, Mack M, Kuziel WA, Corazza N, Brunner T, Seeger W, Lohmeyer J. (2008). Lung epithelial apoptosis in influenza virus pneumonia: the role of macrophage-expressed TNF-related apoptosis-induced ligand. *J Exp Med* 205: 3065-3077.

Herold S, Ludwig S, Pleschka S, and Wolff T. (2012). Apoptosis signaling in influenza virus propagation, innate host defense, and lung injury. *J Leukoc Biol* 92: 75-82.

Hieronymus H and Silver PA. (2004). A systems view of mRNP biology. *Genes Dev* 18: 2845-2860.

Hinshaw VS, Olsen CW, Dybdahl-Sissoko N, Evans D. (1994). Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J Virol* 68: 3667-3673.

Hirst GK. (1941). The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science* 94: 22-23.

Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, and Webster RG. (2000). A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6108-13.

Horvath CM, Williams, MA and Lamb, RA. (1990). Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: identification of the influenza B virus BM2 polypeptide. *Embo J* 9: 2639-2647.

Hrincius ER, Wixler V, Wolff T, Wagner R, Ludwig S and Ehrhardt C. (2010). CRK adaptor protein expression is required for efficient replication of avian influenza A viruses and controls JNK-mediated apoptotic responses. *Cell Microbiol* 12: 831-843.

Inglis SC and Brown CM. (1981). Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acids Res* 9: 2727-40.

Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters KA, Wills NM, Xiao YL, Dunfee RL, Schwartzman LM, Ozinsky A, Bell GL, Dalton RM, Lo A, Efstathiou S, Atkins JF, Firth AE, Taubenberger JK, Digard P. (2012). An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science* 337:199-204.

Kates M, Allison AC, Tyrell DA, and James AT. (1962). Origin of lipids in influenza virus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 27: 293-301.

Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM, Haller O, Eckert J, Deplazes P. (2005). Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie. *Thieme*, 11. Auflage.

Kido H, Murakami M, Oba K, Chen Y and Towatari T. (1999). Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses. *Mol Cells* 9: 235-244.

Klenk HD and Garten W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* 2: 39-43.

Knipe DM, Howley PM. (2007). *Fields Virology*, 5th edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Lamb RA and Lai CJ. (1980). Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* 21: 475-85.

Lamb RA and Krug RM. (2001). Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*, 4th edition: 1533-1579. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Lenschow DJ. (2010). Antiviral Properties of ISG15. *Viruses* 2: 2154-2168.

Li SSC. (2005). Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J* 390: 641-653.

Lin L, Li Y, Pyo H-M, Lu X, Raman SNT, Liu Q, Brown EG, and Zhou Y. (2011). Identification of RNA Helicase A as a Cellular Factor That Interacts with Influenza A Virus NS1 Protein and Its Role in the Virus Life Cycle. *J Virol* 86: 1942-1954.

Lu Y, Qian XY, and Krug RM. (1994). The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev* 8: 1817-28.

Luo GX, Luytjes W, Enami M and Palese P. (1991) The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol* 65: 2861-2867.

Ludwig S, Wang X, Ehrhardt C, Zheng H, Donelan N, Planz O, Pleschka S, García-Sastre A, Heins G, and Wolff T. (2002). The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol* 76: 11166-71.

Ludwig S, Pleschka S, Planz O, Wolff T. (2006). Ringing the alarm bells: signalling and apoptosis in influenza virus infected cells. *Cell Microbiol* 8: 375-86.

Mann M. (2006). Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 952-958.

McAuley JL, Chipuk JE, Boyd KL, Van De Velde N, Green DR, McCullers JA. (2010). PB1-F2 proteins from H5N1 and 20 centry pandemic influenza viruses cause immunopathology. *PLoS Pathog* 6: e1001014.

Melén K, Tynell J, Fagerlund R, Roussel P, Hernandez-Verdun D, Julkunen I. (2012). Influenza A H3N2 subtype virus NS1 protein targets into the nucleus and binds primarily via its C-terminal NLS2/NoLS to nucleolin and fibrillarin. *Virology* 439: 167.

Mibayashi M, Martinez-Sobrido L, Loo YM, Cardenas WB, Gale M, Jr. and Garcia-Sastre A. (2007). Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol* 81: 514-524.

Min JY, Li S, Sen GC, and Krug RM. (2007). A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology* 363: 236-43.

Modrow S, Falke D, and Truyen U. (2003). *Molekulare Virologie*. 2. Auflage. Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.

Modrow S, Falke D, Truyen U, and Schätzl H. (2010). *Molekulare Virologie*. 3. Auflage. Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.

- Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y, and Nagata K. (2002). Identification of Hsp90 as a Stimulatory Host Factor Involved in Influenza Virus RNA Synthesis. *J Biol Chem* 277: 45306-45314.
- Naito T, Momose F, Kawaguchi A, and Nagata K. (2007). Involvement of Hsp90 in Assembly and Nuclear Import of Influenza Virus RNA Polymerase Subunits. *J Virol* 81: 1339–1349.
- Nemeroff ME, Qian XY, Krug RM. (1995). The influenza virus NS1 protein forms multimers in vitro and in vivo. *Virology* 212: 422-8.
- Neumann G, Brownlee GG, Fodor E, and Kawaoka Y. (2004). Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 283: 121-43.
- Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459:931-9.
- Norton GP, Tanaka T, Tobita K, Nakada S, Buonagurio DA, Greenspan D, Krystal M, and Palese P. (1987). Infectious influenza A and B virus variants with long carboxyl terminal deletions in the NS1 polypeptides. *Virology* 156: 204-13.
- Odagiri T, Hong J, and Ohara Y. (1999). The BM2 protein of influenza B virus is synthesized in the late phase of infection and incorporated into virions as a subviral component. *J Gen Virol* 80: 2573-2581.
- Olsen CW, Kehren JC, Dybdahl-Sissoko NR, Hinshaw VS. (1996). Bcl-2 alters influenza virus yield, spread, and hemagglutinin glycosylation. *J Virol* 70: 663-666.
- O'Neill RE, Talon J, and Palese P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Embo J* 17: 288-296.
- Palese P, Tobita K, Ueda M and Compans RW. (1974). Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology*, 61: 397-410.
- Palese P. (1977) The genes of influenza virus. *Cell* 10: 1-10.
- Palese P and Shaw ML. (2007). Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*, 5th edition: 1647-1689. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Paragas J, Talon J, O'Neill RE, Anderson DK, García-Sastre A, and Palese P. (2001). Influenza B and C virus NEP (NS2) proteins possess nuclear export activities. *J Virol* 75: 7375-83.
- Paterson RG, Takeda M, Ohigashi Y, Pinto LH, and Lamb RA. (2003). Influenza B virus BM2 protein is an oligomeric integral membrane protein expressed at the cell surface. *Virology* 306: 7-17.
- Pestka S. (2007). The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem* 282: 20047-51.
- Pinto LH, Holsinger LJ, and Lamb RA. (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69: 517-528.
- Qian XY, Alonso-Caplen F, and Krug RM. (1994). Two functional domains of the influenza virus NS1 protein are required for regulation of nuclear export of mRNA. *J Virol* 68: 2433-41.

- Robb NC, Chase G, Bier K, Vreede FT, Shaw P-C, Naffakh N, Schwemmler M, and Fodor E. (2011). The Influenza A Virus NS1 Protein Interacts with the Nucleoprotein of Viral Ribonucleoprotein Complexes. *J Virol* 85: 5228–5231.
- Sadler AJ, Latchoumanin O, Hawkes D, Mak J, Williams BRG. (2009). An Antiviral Response Directed by PKR Phosphorylation of the RNA Helicase A. *PLoS Pathog* 5: e1000311. doi:10.1371/journal.ppat.1000311
- Samson M, Pizzorno A, Abed Y, Boivin G. (2013). Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.014>.
- Samuel CE. (1988). Mechanisms of the antiviral action of interferons. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35: 27-72.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-7.
- Sato S, Fujita N, and Tsuruo T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97: 10832–10837
- Satterly N, Tsai PL, van Deursen J, Nussenzweig DR, Wang Y, Faria PA, Levay A, Levy DE, and Fontoura BM. (2007). Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1853-8.
- Schneider J, Dauber B, Melén K, Julkunen I, and Wolff T. (2009). Analysis of influenza B virus NS1 protein trafficking reveals a novel interaction with nuclear speckle domains. *J Virol* 83:701-11.
- Schultz-Cherry S, Dybdahl-Sissoko N, Neumann G, Kawaoka Y, Hinshaw VS. (2001). Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J Virol* 75: 7875-7881.
- Shaw MW, Choppin PW, and Lamb RA. (1983). A previously unrecognized influenza B virus glycoprotein from a bicistronic mRNA that also encodes the viral neuraminidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 4879-83.
- Shin YK, Li Y, Liu Q, Anderson DH, Babiuk LA, and Zhou Y. (2007). SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signaling pathway activation. *J Virol* 81: 12730-9.
- Skehel JJ and Wiley DC. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69: 531-569.
- Smith GL, Levin JZ, Palese P, and Moss B. (1987). Synthesis and cellular location of the ten influenza polypeptides individually expressed by recombinant vaccinia viruses. *Virology* 160: 336-45.
- Spector DL, Fu XD, and Maniatis T. (1991). Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *Embo J* 10: 3467-81.
- Stieneke-Grober A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, Klenk HD and Garten W. (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *Embo J* 11: 2407-2414.
- Sugrue RJ and Hay AJ. (1991). Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology* 180: 617-24.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.

Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Alvarez Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle AS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE, and Donis RO. (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 4269-4274.

Vreede FT, Jung TE and Brownlee GG. (2004) Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol* 78: 9568-9572.

Wang W, Riedel K, Lynch P, Chien CY, Montelione GT, Krug RM. (1999). RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *Rna* 5: 195-205.

Wang W and Krug RM. (1996). The RNA-binding and effector domains of the viral NS1 protein are conserved to different extents among influenza A and B viruses. *Virology* 223: 41-50.

Wathelet MG, Lin CH, Parekh BS, Ronco LV, Howley PM, Maniatis T. (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell* 1: 507-18. Erratum in: *Mol Cell* 3: 813.

Wen KW, Damania B. (2010). Hsp90 and Hsp40/Erdj3 are required for the expression and anti-apoptotic function of KSHV K1. *Oncogene* 29: 3532-3544.

WHO. (2009). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>

Wolff T, O'Neill RE, and Palese P. (1998). NS1-Binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. *J Virol* 72: 7170-80.

Wolff T, Snacken R. (2003). Influenza: The virus, the disease, and its control. In Rüsamen-Waigmann H, Deres K, Hewlett G, Welker R. (ed.). Marcel Dekker, Inc., pp. 39-90.

Wurzer WJ, Planz O, Ehrhardt C, Giner M, Silberzahn T, Pleschka S, Ludwig S. (2003). Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *EMBO J* 22: 2717-2728.

Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Berberich-Siebelt F, Wolff T, Walczak H, Planz O, Ludwig S. (2004). NF- κ B-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *J Biol Chem* 279: 30931-30937.

Yasuda J, Nakada S, Kato A, Toyoda T, and Ishihama A. (1993). Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* 196: 249-55.

Yuan P, Bartlam M, Lou Z, Chen S, Zhou J, He X, Lv Z, Ge R, Li X, Deng T, Fodor E, Rao Z, and Liu Y. (2009). Crystal structure of an avian influenza polymerase PAN reveals an endonuclease active site. *Nature* 458: 909-914.

Yuan W, and Krug RM. (2001). Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *Embo J*. 20:362-371.

Zhang C, Yang Y, Zhou X, Yang Z, Liu X, Cao Z, Song H, He Y and Huang P. (2011). The NS1 protein of influenza a virus interacts with heat shock protein Hsp90 in human alveolar basal epithelial cells: Implication for virus-induced apoptosis. *Virology J* 8:181.

Zhirnov OP, Konakova TE, Wolff T, Klenk HD. (2002). NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J Virol* 76: 1617-1625.

Zhirnov OP, Klenk HD. (2007). Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis* 12: 1419-1432.

Zielecki F. (2010). Analyse molekularer Pathomechanismen des viralen NS1 Proteins eines Influenza A Virus vom Subtyp H5N1. Dissertation, Freie Universität Berlin. Angefertigt am Robert Koch-Institut (FG17), Berlin.

Anhang

1. Materialverzeichnis

1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (29:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ameisensäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roche, Mannheim
Avicel RC-581	FMC BioPolymer, Belgien
Bacto-Agar	Becton-Dickenson, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bruteier	Valo Biomedia GmbH, Osterholz-Scharmbeck
BSA (<i>Bovine Serum Albumine</i> , 30 %)	PAA Laboratories, Cölbe
BSA	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Cell Dissociation Buffer	Gibco® (Life Technologies), Darmstadt
CL-XPosure™ Film	Thermo Scientific, Bonn
Ciprofloxacin	MP Biomedicals, Eschwege
DABCO (1,4-Diazabicyklo-[2,2,2]-oktan)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DEAE-Dextran	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNA-Längenstandard Fast Ruler™	Fermentas (Thermo Fisher Scientific), St. Leon-Rot
DNA-Längenstandard Mass Ruler™	Fermentas (Thermo Fisher Scientific), St. Leon-Rot
DNA-6 x loading buffer	Fermentas (Thermo Fisher Scientific), St. Leon-Rot
DTT (Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethyldinitrilotetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 10 % (Methanol-frei)	Worthington, PA
Fötales Rinderserum (FBS)	Biochrom, Cambridge/U.K.
Dialysiertes FBS	Invitrogen™ (Life Technologies), Darmstadt
Geldanamycin	Invivogen (Cayla), Toulouse/Frankreich
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glutamin	Roth, Karlsruhe
Glutathion-Sepharose	GE Healthcare, Freiburg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe

Hefeextrakt	Becton-Dickinson, Heidelberg
HEPES	
(N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Igepal	Fluka Biochemika, Milano
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG (Isopropyl- β -Thiogalactopyranidose)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
L-Arginin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Arginin ($^{13}\text{C}_6$, 99 %)	Camebridge Isotope Laboratories (Eurisotop GmbH), Saarbrücken
LipofectAMINE™ 2000	Invitrogen™ (Life Technologies), Darmstadt
L-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Lysin ($^{13}\text{C}_6$, 99 %)	Camebridge Isotope Laboratories (Eurisotop GmbH), Saarbrücken
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Na- β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natrium-Orthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyruvat	PAA Laboratories, Cölbe
Nitrozellulose-Membran	Whatman (GE Healthcare), Freiburg
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin (Pen / Strep)	PAA Laboratories, Cölbe
Ponal-Klebstoff	Henkel, Düsseldorf
Protein A Agarose	Roche, Mannheim
Protein G Agarose	Roche, Mannheim
Protein-Molekulargewichtsstandard	Fermentas (Thermo Fisher Scientific), St. Leon-Rot
ReproSil-Pur C C18-A-Nano-LC-Säule	Proxeon (Thermo Fisher Scientific); Dreieich
Roti®-Blue (5x Konz.)	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
Staurosporin	Calbiochem (Merck), Darmstadt
SuperSignal Dura Chemolumineszenz	Pierce (Thermo Scientific), Bonn
TEMED	Serva, Heidelberg
TPCK-Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trifluoressigsäure (TFA)	Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin (Zellkultur)	Gibco® (Life Technologies), Darmstadt
Trypsin (proteolytisches Enzym für MS-Analyse)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Trypton
Tween-20
Ultrapure Water – Ultra LC-MS
Whatman-Papier
Z-DEVD-FMK

Difco, Heidelberg
Roth, Karlsruhe
Roth, Karlsruhe
Whatman (GE Healthcare), Freiburg
Becton-Dickinson, Heidelberg

1.2. Radiochemikalien

L-[³⁵S]Methionin (10 mCi/ml)

Hartmann Analytik GmbH, Braunschweig

1.3. Restriktionsendonukleasen

ACC65I

Fermentas (Thermo Fisher Scientific), St. Leon-Rot

BamHI

Fermentas (Thermo Fisher Scientific), St. Leon-Rot

BspMI

New England Biolabs, Frankfurt a.M.

DpnI

Fermentas (Thermo Fisher Scientific), St. Leon-Rot

XhoI

Fermentas (Thermo Fisher Scientific), St. Leon-Rot

1.4. Enzyme

CIAP (*Calf Intestine Phosphatase*)

Fermentas (Thermo Fisher Scientific), St. Leon-Rot

T4 DNA Ligase (1U/μl)

Fermentas (Thermo Fisher Scientific), St. Leon-Rot

RNasin (40U/μl)

Promega, Mannheim

1.5. Kits

BCA Protein Assay Kit

Pierce (Thermo Scientific), Bonn

BigDye[®] Terminator 3.1 Kit

Applied Biosystems, Darmstadt

Caspase-Glo[®] 3/7 Assays

Promega, Mannheim

Cell Proliferation Kit I (MTT)

Roche, Mannheim

Dual-Luciferase[®]-Reporter Assay System

Promega, Mannheim

Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System

Roche, Mannheim

Interferon β-ELISA

Fujirebio Ink (Life Technologies), Darmstadt

Invisorb[®] Spin DNA Extraction Kit

STRATEC Molecular GmbH, Berlin

Invisorb Spin Plasmid Mini Two Miniprep Kit

STRATEC Molecular GmbH, Berlin

QIAamp[®] MinElute[®] Virus Spin Kit

QIAGEN, Hilden

QIAGEN[®] OneStep RT-PCR Kit

QIAGEN, Hilden

QIAGEN Plasmid Maxi Kit

QIAGEN, Hilden

QIAGEN[®] RNeasy Mini-Kit

QIAGEN, Hilden

QIAquick[®] PCR Purification Kit

QIAGEN, Hilden

QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit

Agilent, Böblingen

TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate Systems

Promega, Mannheim

1.6. Primer

Bezeichnung	5' → 3'
303-B/NS-xSH3G-F	CGA TGC GGT ACC TTG ATG ACA TAG AAG AAG AGC CGG AAA ATG TCG
304-B/NS-xSH3G-R	CGA TGG TAC CCT CCT CCG CCT CCA CCG TAA TCG GTC CAA TCG TAA TTT GG
314-B/NS-P122/5L-F	CGAT ACC TGC CAA CCC TGG GAA AGT ACC TTG ATG ACA TAG AAG AAG AGC
315-B/NS-P122/5L-R	CGAT CCA GGG TTG GCA GGT AAT CGG TCC AAT CGT AAT TTG GAC ATT TGC
453-PB2(AS 535-759)-F	CGA TGG ATC CTG GAT ACA CCC AAG ATG TGG
454-PB2(AS 535-759)-R	CGA TCT CGA GTT AGC TCA AGG CCC ACC
BsmBNS#1	CGA TCG TCT CAG GGA GCA GAA GCA GAG G
BsmBNS#2	CGA TCG TCT CTT ATT AGT AGT AAC AAG AGG
T7-5' Universal	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

1.7. Plasmide

pGex-5x-1	Stratagene
pGex-PB2 (AS 535-759)	
pGex-PKR (K296R) ⁽¹⁾	
pGex-PKR (AS 266-551)	Bonnet <i>et al.</i> , 2006
pcDNA-3-B/Lee-NS1	Dauber <i>et al.</i> , 2004
pPol-/NS-Luc (Firefly-Luziferase)	
pRL-TK-Luc (Renilla-Luziferase)	Promega
pHW2000 (pHW)	erhalten von R. Webster, Hoffmann <i>et al.</i> , 2000
pHW2000-B/Lee-NP (pHW-NP)	Dauber <i>et al.</i> , 2004
pHW2000-B/Lee-NA (pHW-NA)	Dauber <i>et al.</i> , 2004
pHW2000-B/Lee-PA (pHW-PA)	Dauber <i>et al.</i> , 2004
pHW2000-B/Lee-HA (pHW-HA)	Dauber <i>et al.</i> , 2004
pHW2000-B/Lee-M (pHW-M)	Dauber <i>et al.</i> , 2004
pHW2000-B/Lee-PB2 (pHW-PB2)	Dauber <i>et al.</i> , 2004
pHW2000-B/Lee-PB1 (pHW-PB1)	Dauber <i>et al.</i> , 2004
pHW2000-B/Lee-NS (pHW-NS-wt)	Dauber <i>et al.</i> , 2004
pHW2000-B/Lee-NS-P122L/P125L (pHW-NS-P122/5L)	
pHW2000-B/Lee-NS-Y121G/P122G/P123G/T124G/P125G/K127G (pHW-NS-xSH3G)	

⁽¹⁾ Konstruiert und zur Verfügung gestellt von B. Dauber, FG17; RKI; Berlin

1.8. siRNA

Crk (QIAGEN #1027020) Sense: r(AGA UCA AGA GUU UGA UUC AAA)dTdT
Antisense: r(UUU GAA UCA AAC UCU UGA UCU)dCdC
Negativ-Kontroll-siRNA (QIAGEN #1027281 *AllStars Neg. Control*)

1.9 Antikörper

Primäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies/Eigenschaften	Referenz
α-Akt	polyklonal; Kaninchen	Cell Signaling
α-Phospho-Akt (P-Akt)	polyklonal; Kaninchen	Cell Signaling
α-Aktin	monoklonal; Maus	Sigma-Aldrich
α-ATF2	monoklonal; Kaninchen	Cell Signaling
α-Phospho-ATF2 (P-ATF2)	polyclonal; Kaninchen	Cell Signaling
α-Crk	monoklonal; Maus	B.D. Biosciences
α-HSP90β	monoklonal; Maus	Acris
α-Influenza B/NP Protein	polyklonal; Maus IgG2a	AbD Serotec
α-Influenza B/NS1	Kaninchen Serum 6625	BioGenes*
α-Influenza B/PB2	Kaninchen Serum #20293	BioGenes*
α-PARP	polyclonal; Kaninchen	Cell Signaling
α-PKR	monoklonal; Kaninchen	Abcam
α-Phospho-PKR (P-PKR)	monoklonal; Kaninchen	Abcam
α-α-Tubulin	monoklonal; Maus	Sigma
α-V5-Tag	monoklonal; Maus	Serotec

* Immunisierung von Kaninchen mit aufgereinigtem GST-B/NS1 bzw. GST-PB2 (AS 535-759) Protein aus Bakterien

Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies/Eigenschaften	Referenz
Alexa 594 α-mouse	Ziege; anti-Maus IgG (H + L)	Invitrogen™ (Life Technologies)
Alexa 488 α-rabbit	Ziege; anti-Kaninchen IgG (H + L)	Invitrogen™ (Life Technologies)
HRP α-rabbit	Ziege; anti-Kaninchen-HRP	Dako
HRP α-mouse	Ziege; anti-Maus-HRP	Dako
HRP α-rabbit	Ziege; anti-Kaninchen IgG	Dako

1.10. Bakterien

Escherichia coli,
Stamm BL26 [F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)gal dcm]

Escherichia coli,
Stamm XL1-Blue [F[']pro AB lac^fZΔM15 Tn10 (Tet^r)]
Fa. Bioline

1.11. Zellen

293T	Humane Epithelzelllinie aus der Niere
A549	Humane karzinome Lungen-Epithelzelllinie
A549-PKR- <i>knockdown</i> ⁽¹⁾	A549-Zellen mit stabilem PKR- <i>knockdown</i> (behandelt mit spezifischer PKR-shRNA)
A549-PKR- <i>non target</i> ⁽¹⁾	A549-Zellen behandelt mit unspezifischer shRNA; Kontrollzellen
Calu3	Humane Lungenkarzinom-Zelllinie
MDCKII (<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>)	Epithelzelllinie einer Hundeniere
SILAC-A549 (leicht)	A549-Zellen sechs Mal passagiert in SILAC-DMEM mit ¹² C ₆ -Lysin und ¹² C ₆ -Arginin
SILAC-A549 (schwer)	A549-Zellen sechs Mal passagiert in SILAC-DMEM mit ¹³ C ₆ -Lysin und ¹³ C ₆ -Arginin
Vero Serum-frei (SF)	Nieren-Epithelzelllinie der Grünen Meerkatze; IFN-defizient

⁽¹⁾ Generiert und zur Verfügung gestellt von M. Matthaei, FG17; RKI; Berlin

1.12. Virusstämme

Influenza B/Lee rekombinant (rec)	Dauber <i>et al.</i> , 2004
Influenza B/Lee NS1-104 (rec)	Dauber <i>et al.</i> , 2006
Influenza B/Lee-NS1-P122/5L (rec)	
Influenza B/Lee-NS1-xSH3G (rec)	

1.13. Puffer und Lösungen

PBS	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	80,9 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM

PBS⁺⁺	PBS	
	BSA	0,2 %
	MgCl ₂	0,1 g/l
	CaCl ₂	0,13 g/l

10 x SDS-Elektrophoresepuffer	Tris	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	10 g/l

Trenngel-Puffer, pH 8,8	Tris/HCl	1,5 M
--------------------------------	----------	-------

Sammelgel-Puffer, pH 6,8	Tris/HCl	0,5 M
---------------------------------	----------	-------

10 x TBE Puffer	Tris	0,89 M
	Borsäure	0,89 M
	EDTA, pH 8,0	10 mM
2 x SDS-Probenpuffer	0,1 M Tris-HCl, pH 6,8	2 ml
	4 % SDS (w/v)	4 ml
	20 % Glycerol	2 ml
	Bromphenolblau	9 mg/ml
	ddH ₂ O	ad 10 ml
	β-Mercaptoethanol	5 %
6 x SDS-Probenpuffer	Tris-HCl, pH 6,8	0,591 g
	SDS	0,6 g
	Glycerol (100 %)	4,8 ml
	Bromphenolblau	3 mg/ml
	β-Mercaptoethanol	8 %
	H ₂ O	ad 10 ml
Coomassie-Färbelösung	H ₂ O	60 ml
	Methanol	20 ml
	Roti [®] -Blue (5x Konz.)	20 ml
Entfärbelösung	Methanol	10 %
Fixierlösung	Ethanol	30 %
	Essigsäure	10 %
6 x DNA-Probenpuffer	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
	Xylencyanol	0,1 % (w/v)
	Glycerol	30 %
Mowiol	Mowiol 4-88	2,4 g
	Glycerol	6 ml
	dH ₂ O	6 ml
	über Nacht quellen lassen	
<u>Tris-HCl (0,2M), pH 8,5</u> 12 ml		
Zugeben und unter Rühren auf 50-60 °C erhitzen		
Gelöstes Mowiol 15 min bei 4000 rpm zentrifugieren		
Überstand mit DABCO (10 % (w/v)) versetzen		
Aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren		

HEPES-Bindungspuffer	HEPES	50 mM	
	Igepal	0,05 %	
	BSA	0,01 %	
	NaCl	150 mM	
Trypsin-Lösung	lyophilisiertes Trypsin	20 µg	
	1 mM HCl	100 µl	
Trypsin-Reaktionspuffer	Trypsin-Lösung		10 %
	40 mM Ammoniumbicarbonat/ 9 % Acetonitril		90 %
Proteinaufreinigung:			
Lysispuffer	Tris-HCl, pH 7,5	50 mM	
	NaCl	100 mM	
	Igepal	0,5 %	
	Triton-X-100	1 %	
	EDTA	1 mM	
	Na-β-Glycerophosphat	10 mM	
	Pefabloc	1 mM	
	Natrium-Orthovanadat	2 mM	
Ko-IP-Puffer	Tris-HCl, pH 7,5	50 mM	
	NaCl	150 mM	
	Igepal	0,5 %	
	EDTA	1 mM	
	Na-β-Glycerophosphat	10 mM	
	Pefabloc	1 mM	
	Natriumvanadat	2 mM	
	Semi Dry Blotting Puffer	Tris	40 mM
Glycin		30 mM	
SDS		1,3 mM	
Methanol		20 %	
10 x TBST	Tris-HCl, pH 8,0	100 mM	
	NaCl	1,5 M	
	Tween 20	0,5 %	

1.14. Medien für Bakterien

Alle Nährmedien und Zusätze wurden autoklaviert bzw. bei Hitzeinstabilität steril filtriert.

2 x YT-Medium	Trypton	16 g/l
	Hefeextrakt	10 g/l
	NaCl	10 g/l
	pH 7,2	

SOC-Medium	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 mM
	<u>KCl</u>	<u>2,5 mM</u>
Nach dem Autoklavieren		
Zugabe von Mg ²⁺ -Stock 20 mM		

MgCl₂-Stock	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 M
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 M
	Glukose	0,4 % (w/v)

2 x YT-Agar mit Ampicillin	2 x YT-Medium	
	<u>Bacto-Agar</u>	<u>1,5 % (w/v)</u>
	Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50 °C	
	Ampicillin	100 µg/µl

1.15. Zellkultur-Medien

MEM (*Minimal Essential Medium*) Gibco® (Life Technologies), Darmstadt

Ansatz für Zellkultur:	FBS	10 %
	Glutamin	2 mM
	Pen / Strep	100 µg / 100 U/ml
	Ciprofloxacin	10 µg/ml
	MEM	ad 500 ml

DMEM (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*) MP Biomedicals, Eschwege

Ansatz für Zellkultur:	FBS	10 %
	Glutamin	2 mM
	Pen / Strep	100 µg / 100 U/ml
	Ciprofloxacin	10 µg/ml
	DMEM	ad 500 ml

Infektionsmedium:	BSA	0,2 %
	Glutamin	2 mM
	Pen / Strep	100 µg/100 U/ml
	MEM bzw. DMEM	ad 500 ml

Transfektionsmedium:	FBS	10 %
	Glutamin	2 mM
	MEM bzw. DMEM	ad 500 ml

MEM + NEAS (Nicht Essentielle Aminosäuren) Gibco® (Life Technologies), Darmstadt

Ansatz für Zellkultur:	FBS	10 %
	Glutamin	2 mM
	Pen / Strep	100 µg / 100 U/ml
	Natriumpyruvat	1 mM
	5 % NaHCO ₃	15,2 ml
	MEM + NEAS	ad 500 ml

Infektionsmedium:	BSA	0,3 %
	Glutamin	2 mM
	Pen / Strep	100 µg / 100 U/ml
	Natriumpyruvat	1 mM
	5 % NaHCO ₃	15,2 ml
	MEM + NEAS	ad 500 ml

Opti-MEM® Gibco® (Life Technologies), Darmstadt

OptiPRO™ SFM-Medium Gibco® (Life Technologies), Darmstadt

Ansatz für Zellkultur:	Glutamin	1,6 mM
	OptiPRO™ SFM	ad 200 ml

SILAC-DMEM PAA Laboratories, Cölbe

Ansatz für Zellkultur:	Dialysiertes FBS	10 %
	Glutamin	2 mM
	Pen / Strep	100 µg / 100 U/ml
	L-Lysin (¹² C ₆ bzw. ¹³ C ₆)	100 mg/ml
	L-Arginin (¹² C ₆ bzw. ¹³ C ₆)	100 mg/ml
	<u>SILAC-DMEM</u>	<u>ad 500 ml</u>
	Steril filtrieren durch 0,22 µm Filter	

Avicelmedium	2,5 % Avicel RC-581	4,86 ml
	2 x MEM	4,86 ml
	30 % BSA	66,7 µl
	5 % NaHCO ₃	100 µl
	1 % Dextran	100 µl
	TPCK-Trypsin	10 µl

1.16. Geräte und Software

Zentrifugen:

Zentrifuge RC5C mit den Rotoren SS-34, GSA, GS3, SLA1500	Sorvall® Instruments
Biofuge pico	Heraeus (Thermo Scientific)
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
Labofuge 400R mit Rotor #8179	Heraeus (Thermo Scientific)
Multifuge 1S-R mit Rotor 75002000 (Sorvall/Heraeus)	Heraeus (Thermo Scientific)
SpeedVac Univapo 150 H	Uniequip

Thermocycler:

Personal Cyclor	Biometra®
Uno Thermoblock	Biometra®
Primus 96	PEQLAB

Mikroskope:

Eclipse TS100	Nikon
Immunfluoreszenz Mikroskop Nikon Diaphot 300 (Invers)	Nikon
Konfokales Laser Scan Mikroskop LSM510 Meta	Zeiss

Sonstige:

Geldokumentation	Intas UV-Systeme
SONOPULS HD 70 Hochleistungs-Ultraschall-Desintegrator	Bandelin
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Blotapparat)	Biorad
Zellbrutschrank Heracell 150	Heraeus (Thermo Scientific)
Zellbrutschrank	Binder
Gelkammer Mini-Sub Cell GT (Agarosegele)	Biorad
Mini-Protean® 3 (SDS-Gel)	Biorad
Sterilbank Hera safe	Heraeus (Thermo Scientific)
Thermomixer compact	Eppendorf
Phero-Temp 40 (Geltrockner)	BioTec Fischer
ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Odyssey Analyzer	Licor
Easy Nano-LC 2	Proxeon
LTQ Orbitrap Discovery	Thermo Fisher Scientific
NanoDrop1000	Thermo Fisher Scientific
FLUOstar Omega	BMG Labtech

Software:

Microsoft Word 2010	Textverarbeitung
Mirosoft Excel 2010	Tabellenkalkulation/Graphikerstellung
DNASTAR Lasergene 10	Sequenzauswertung
AIDA Image Analyzer 4.50	Quantifizierung von Proteinbanden
Adobe Photoshop CS5	Bildbearbeitung
GraphPad Prism 5	Graphikerstellung
Xcalibur 2.1	Dokumentation der Massenspektren
Proteome Discoverer 1.2 und 1.4	Auswertung der massenspektrometri- schen Analyse

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A _x	Absorption bei Wellenlänge x
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgemeinschaft
Amp	Ampicillin
A/NS1	NS1 Protein des Influenza A Virus
AP1	Aktivatorprotein 1
Apaf-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor 1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATF2	Aktivierender Transkriptionsfaktor 2
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	<i>BicinChoninic Acid</i>
Bcl-2	B-Zell-Lymphom 2 (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
bp	Basenpaare
BM2	Membranprotein mit Ionenkanalaktivität des Influenza B Virus
B/NS1	NS1 Protein des Influenza B Virus
BP	Bindeprotein
BSA	Rinderserum Albumin (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-
ca.	zirka
cDNA	kopierte DNA (<i>copy DNA</i>)
Ci	Curie (1 Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Bq)
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>)
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPSF	Spaltungs- und Polyadenylierungs-Spezifitätsfaktor (<i>Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor</i>)
Crk	<i>Chicken tumour virus no. 10 [CT10] regulator of kinase</i>
CrkL	<i>Crk-Like</i>
Crm 1	Exportin 1
cRNA	kopierte RNA (<i>copy RNA</i>)

d	Tag
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-oktan
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt-destiliertes Wasser
ddATP	2',3'-Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	2',3'-Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	2',3'-Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
ddTTP	2',3'-Didesoxythymidintriphosphat
DDX42	ATP-abhängige RNA Helikase DDX42
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
d. h.	das heißt
DHBV	<i>Duck</i> Hepatitis B Virus
DHX9	RNA-abhängige RNA-Helikase A
DENV	Dengue Virus
DI-Partikel	<i>Defective Interfering particles</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-Triphosphat
ds	Doppelstrang (<i>double strand</i>)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
EBV	Epstein-Barr Virus
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alteri</i>)
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FasL	Fas Ligand
FBS	Fötales Bovines Serum
FFU	Fluoreszierende Einheiten (<i>fluorescence forming units</i>)
FHV	<i>Flock House Virus</i>
Flu A / Flu B	Influenza A Virus / Influenza B Virus
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (981 cm/s ²)
GA	Geldanamycin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
°C	Grad Celsius
Grp94	Glukose-reguliertes Protein, 94 kDa
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
H ⁺	Protonen (H entspricht dem chemischen Zeichen für Wasserstoff)
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HAT	Humane Trypsin-ähnliche Atemwegsprotease (<i>Human Airway Trypsin-like protease</i>)
HA-Test	Hämagglutinationstest
HA-Titer	Hämagglutinationstiter
HBV	Hepatitis B Virus
HCl	Chlorwasserstoff

HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HEV	Hepatitis E Virus
HIST1H2AH	Histon H2A Typ 1-H
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HNRPU	Heterogenes Nukleäres Ribonukleo-Protein U
HPIV	Humanes Parainfluenza Virus
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>HorseRadish Peroxidase</i>)
HSP70	Hitzeschockprotein, 70 kDa
HSP90 α/β	Hitzeschockprotein, 90 kDa Isoform α/β
HSPA5	78 kDa Glukose-reguliertes Protein; Hitzeschock 70 kDa Protein 5
HSV	Herpes Simplex Virus
HTLV	Human adultes T-Zell Leukämie Virus
IBDV	<i>Infectious Bursal Disease Virus</i>
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
incl.	einschließlich (<i>inclusive</i>)
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactopyranidose
IRF	Interferon Regulatorischer Faktor
ISG15	Interferon-stimuliertes Gen (15 kDa)
IU	Internationale Einheiten (<i>International Units</i>)
i.v.T.	<i>in vitro</i> -Translation
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
k	Kilo (10^3)
kb	Kilobasen
kd	<i>knockdown</i>
kDa	Kilodalton
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
Ktrl.	Kontrolle
KSHV	Kaposi Sarcom-assoziiertes Herpesvirus
L	Liter
LB	Luria-Bertani-(Medium)
LCMV	Lymphozytisches Choriomeningitis Virus
log ₁₀	10facher Logarithmus
Luc	Luziferase
M	Molar (mol/l)
m	Meter
m	Milli (10^{-3})
M 1/2	Matrixprotein 1/2
mA	Milliampere
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
min	Minute
μ	Mikro (10^{-6})
MOI	infektiöse Einheiten pro Zelle (<i>Multiplicity Of Infection</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RiboNucleic Acid</i>)
mRNP	Boten-Ribonukleoprotein (<i>messenger RiboNucleoProtein</i>)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-DiMethylThiazol-2-yl)-2,5-DiphenylTetrazoliumbromid
m/z	Masse/Ladung
n	Nano (10^{-9})
n	Anzahl der Versuchsdurchführungen

N-	Amino-
NA	Neuraminidase
NaCl	Natriumchlorid
Nano-LC	Nano-Flüssigkeitschromatographie (<i>Nano Liquid Chromatography</i>)
NCR	<i>Non Coding Region</i>
NEP/NS2	Nukleäres Exportprotein/Nichtstrukturprotein 2
NES	Kernexportsignal (<i>nuclear export signal</i>)
NF κ B	Nukleärer Faktor kappa B
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localisation signal</i>)
NP	Nukleoprotein
nt	Nukleotid
NS1	Nichtstrukturprotein 1
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
NXF1/TAP	Nucleärer RNA Export Faktor 1
O	Elementsymbol von Sauerstoff
OH	Hydroxygruppe
ORF	Offener Leserahmen (<i>Open Reading Frame</i>)
p	p-Wert (<i>probability value</i>)
p85	Untereinheit der PI3K
PA	Polymeraseuntereinheit, azidisch
PAB	Poly(A)bindendes Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribose Polymerase
PA-X	Influenza A Virusprotein kodiert auf Segment 3; Regulation der Wirtsgenexpression
PB 1/2	Polymeraseuntereinheit 1/2, basisch
PB1-F2	proapoptotisches Protein von Influenza A Viren; kodiert auf Segment 2
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Pen	Penicillin
pH	potentia hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus (p) der Wasserstoffionen-Konzentration (H)
PHB	Prohibitin
pHW	Vektorplasmid pHW2000
p. i.	nach der Infektion (<i>post infectionem</i>)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKR	dsRNA-abhängige Proteinkinase R
P122/5L	P122L/P125L-Mutation im NS1 Protein des Influenza B Virus
Pol	Polymerase
PP2A	Protein Phosphatase, Regulatorische Untereinheit A
rec	rekombinant (<i>recombinant</i>)
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RIGI	<i>Retinoic acid-Inducible gene 1 protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleopartikel
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	reverse Transkription
RT °C	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Schwefel
S100A7	S100 Calcium-bindendes Protein A7
SC35	<i>Splicing Component, 35 kDa</i>
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde

SF	serumfrei
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SH	<i>Src Homology</i>
-SH	Thiol-Gruppe
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
snRNP	kleine spliceosomale Kern-Ribonukleoproteine (<i>spliceosomal small nuclear RiboNucleoProteins</i>)
ss	Einzelstrang (<i>single strand</i>)
STAT	Signalvermittler und Aktivator der Transkription (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
Std.	Stunden
Strep	Streptomycin
SV	<i>Simian Virus</i>
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMPRSS2	Transmembran Protease, Serin 2
TNF α	Tumor Nekrosis Faktor- α
TNFR	Tumor Nekrosis Faktor Rezeptor
TPCK	L-(Tosylamido-2-Phenyl)-Ethyl-Chloromethyl-Keton
TRAIL	TNF-ähnlicher Apoptose-induzierender Ligand (<i>TNF-related Apoptosis Inducing Ligand</i>)
TRAP1	TNFR-assoziiertes Protein 1
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uridin
U	Einheit (<i>unit</i>) Enzymaktivität
UV	ultraviolett
V	Volt
vRNA	virale RNA
vRNP	virale Ribonukleopartikel
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
VZV	Varicella Zoster Virus
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
x	mal
xSH3G	Y121G/P122G/P123G/T124G/P125G/K127G-Mutation im NS1-Protein von Influenza B Virus
z. B.	zum Beispiel
Z-DEVD-FMK	Benzyloxycarbonyl-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-Fluoromethylketon