# Die Rolle von NF-кB abhängigen apoptotischen Prozessen und des proapoptotischen Proteins PB1-F2 in der Influenza Virus Vermehrung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Igor Mazur aus Kevelaer

> > Juni 2007

Aus dem Institut für Molekulare Medizin Der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1.Gutachter: Prof. Dr. Stephan Ludwig

2.Gutachter: Prof. Dr. Johannes Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2007

## Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. EINLEITUNG	8
1.1. Das Influenza Virus	
1.2. Pathologie und Wirts-Spektrum	
1.3. Morphologie und Vermehrungszyklus des Influenza A Virus	10
1.4. Virusinduzierte Genexpression	
1.4.1. Influenza Virus induzierte Signaltransduktion	
1.4.2. NF-κB Signalweg und Apoptose	
1.5. Virusinduzierte Apoptose	
1.5.1. Das PB1-F2 Protein	
1.5.2. Die Rolle von NF-κB und Interferonen in der Apoptose	
1.5.3. Die Rolle der NF-κB abhängigen Apoptoseinduktion im Vermehrungszyk	clus des
1.6. Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen	
<ol> <li>Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li> <li>Zielsetzung der Arbeit</li> </ol>	25
<ol> <li>Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li> <li>Zielsetzung der Arbeit</li> <li>MATERIAL UND METHODEN</li> </ol>	25 27 29
<ol> <li>Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li> <li>Zielsetzung der Arbeit</li> <li>MATERIAL UND METHODEN</li> <li>Material</li> </ol>	25 
<ol> <li>Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li> <li>Zielsetzung der Arbeit</li> <li>MATERIAL UND METHODEN</li> <li>Material</li> <li>2.1.1. Chemikalien, Medien und Zellkulturzusätze</li> </ol>	
<ol> <li>Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li></ol>	
<ol> <li>Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li></ol>	
<ul> <li>1.6. Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li> <li>1.7. Zielsetzung der Arbeit</li> <li>2. MATERIAL UND METHODEN</li> <li>2.1. Material</li> <li>2.1.1. Chemikalien, Medien und Zellkulturzusätze</li> <li>2.1.2. Antikörper</li> <li>2.1.3. Plasmide</li> <li>2.1.4. Sonstige Materialien</li> </ul>	
<ol> <li>Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li></ol>	
<ol> <li>Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li></ol>	
<ul> <li>1.6. Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li></ul>	
<ul> <li>1.6. Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li></ul>	
<ul> <li>1.6. Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li></ul>	
<ul> <li>1.6. Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li> <li>1.7. Zielsetzung der Arbeit</li> <li>2. MATERIAL UND METHODEN</li> <li>2.1. Material</li> <li>2.1.1. Chemikalien, Medien und Zellkulturzusätze</li> <li>2.1.2. Antikörper</li> <li>2.1.3. Plasmide</li> <li>2.1.4. Sonstige Materialien</li> <li>2.2.1 Viren</li> <li>2.2.1.1. Anzucht von Influenza-Viren</li> <li>2.2.1.2. Virusinfektionen von Zellen</li> <li>2.2.1.3. Bestimmung von Virustitern mittels Plaque-Assay</li> <li>2.2.1.4. Herstellung rekombinanter Influenza Viren</li> </ul>	
<ul> <li>1.6. Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li></ul>	
<ul> <li>1.6. Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li></ul>	
<ul> <li>1.6. Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li> <li>1.7. Zielsetzung der Arbeit</li> <li>2. MATERIAL UND METHODEN</li> <li>2.1. Material</li> <li>2.1.1. Chemikalien, Medien und Zellkulturzusätze</li> <li>2.1.2. Antikörper</li> <li>2.1.3. Plasmide</li> <li>2.1.4. Sonstige Materialien</li> <li>2.2. Stämme und Anzucht</li> <li>2.2.1.1 Anzucht von Influenza-Viren</li> <li>2.2.1.2. Virusinfektionen von Zellen</li> <li>2.2.1.3. Bestimmung von Virustitern mittels Plaque-Assay</li> <li>2.2.1.4. Herstellung rekombinanter Influenza Viren</li> <li>2.2.2. Eukaryotische Zell-Linien</li> <li>2.2.2. Kultivierung adhärenter Zell-Linien</li> </ul>	
<ul> <li>1.6. Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li> <li>1.7. Zielsetzung der Arbeit</li> <li>2. MATERIAL UND METHODEN</li> <li>2.1. Material</li> <li>2.1.1. Chemikalien, Medien und Zellkulturzusätze</li> <li>2.1.2. Antikörper</li> <li>2.1.3. Plasmide</li> <li>2.1.4. Sonstige Materialien</li> <li>2.2.1. Viren</li> <li>2.2.1.1. Anzucht von Influenza-Viren</li> <li>2.2.1.2. Virusinfektionen von Zellen</li> <li>2.2.1.3. Bestimmung von Virustitern mittels Plaque-Assay</li> <li>2.2.1.4. Herstellung rekombinanter Influenza Viren</li> <li>2.2.2. Eukaryotische Zell-Linien</li> <li>2.2.2. Kultivierung adhärenter Zell-Linien</li> <li>2.2.3. Einfrieren und Lagerung eukaryotischer Zell-Linien</li> </ul>	
<ul> <li>1.6. Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li> <li>1.7. Zielsetzung der Arbeit</li> <li>2. MATERIAL UND METHODEN</li> <li>2.1. Material</li> <li>2.1.1. Chemikalien, Medien und Zellkulturzusätze</li> <li>2.1.2. Antikörper</li> <li>2.1.3. Plasmide</li> <li>2.1.4. Sonstige Materialien</li> <li>2.2. Stämme und Anzucht</li> <li>2.2.1.1. Anzucht von Influenza-Viren</li> <li>2.2.1.2. Virusinfektionen von Zellen</li> <li>2.2.1.3. Bestimmung von Virustitern mittels Plaque-Assay</li> <li>2.2.1.4. Herstellung rekombinanter Influenza Viren</li> <li>2.2.2. Eukaryotische Zell-Linien</li> <li>2.2.2. Kultivierung adhärenter Zell-Linien</li> <li>2.2.3. Einfrieren und Lagerung eukaryotischer Zell-Linien</li> <li>2.2.4. Transiente Transfektion mit Lipofectamin 2000</li> </ul>	25 27 29 29 29 29 29 30 31 32 32 32 32 32 32 32 33 34 34 34 34 35 35 35
<ul> <li>1.6. Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen</li></ul>	

2.2.1	2.7. MTT-Assay	37
2.2.1	2.8. Immunfluoreszenz	37
2.2.3.	<i>E.coli</i> Stamm	38
2.2.	3.1. Medien für <i>Escherichia coli</i>	38
2.2.	3.2. Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	38
2.2.4.	Saccharomyces cerevisiae - Stamm.	38
2.2.	4.1. Medien für Saccharomyces cerevisiae	38
2.2.4	4.2. Anzucht von S. cerevisiae	39
2.2.4	4.3. Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	39
2.2.5.	Molekularbiologische Methoden - DNA	40
2.2.	5.1. Gelelektrophorese und Geldokumentation	40
2.2.	5.2. Restriktionsenzymanalyse von Plasmid-DNA	40
2.2.	5.3. Transformation von Plasmid-DNA (E.coli)	40
2.2.	5.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	41
2.2.6.	Molekularbiologische Methoden - Proteine	41
2.2.	6.1. Luciferase-Assay	41
2.2.	6.2. Herstellung von Proteinextrakten und Bestimmung der Proteinkonzentration.	42
2.2.	6.3. Immunpräzipitation	42
2.2.	6.4. Hefe Two-Hybrid	43
2.2.7.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot-Analyse.	44
2.2.	7.1. Herstellung von denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen für die Auftrennun	ıg
von	Proteinen	44
2.2.	7.2. Durchführung der Westernblotanalyse	45
		16
2.2. <sup>*</sup> 2.2.*	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> </ul>	40 ne
2.2. 2.2. 3. ERC	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li> </ul>	40 ne 47
2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li> <li>F NF-κB-Signalweg ist wichtig für die Vermehrung des Influenza A Virus</li> <li>etylsalicylsäure als Mittel zur Hemmung des NF-κB-Signalweges</li> </ul>	40 ne 47 47 48
2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li> <li>GF-κB-Signalweg ist wichtig für die Vermehrung des Influenza A Virus</li> <li>etylsalicylsäure als Mittel zur Hemmung des NF-κB-Signalweges</li> <li>handlung infizierter Zellen mit Acetylsalicylsäure hemmt die Replikation des</li> </ul>	40 ne 47 47 48
2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel Influenz	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li></ul>	40 ne 47 47 48 50
2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel Influenz 3.3.1.	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li> <li>GEBNISSE</li> <li>r NF-κB-Signalweg ist wichtig für die Vermehrung des Influenza A Virus</li> <li>etylsalicylsäure als Mittel zur Hemmung des NF-κB-Signalweges</li> <li>handlung infizierter Zellen mit Acetylsalicylsäure hemmt die Replikation des a Virus</li> <li>Auswirkung der NF-κB-Hemmung mittels Acetylsalicylsäure auf Virusreplikation 51</li> </ul>	40 ne 47 47 48 50 n
2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel Influenz 3.3.1. 3.3.2.	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li></ul>	40 ne 47 47 47 48 50 n 53
2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel Influenz 3.3.1. 3.3.2. 3.3.3.	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li></ul>	40 ne 47 47 48 50 n 53
2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel Influenz 3.3.1. 3.3.2. 3.3.3. Zelltoo	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li></ul>	40 ne 47 47 48 50 n 53 55
2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel Influenz 3.3.1. 3.3.2. 3.3.3. Zelltoo 3.3.4.	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li></ul>	40 ne 47 47 48 50 n 53 55 n
2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel Influenz 3.3.1. 3.3.2. 3.3.3. Zelltoo 3.3.4. Zellke	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li> <li><b>GEBNISSE</b></li> <li><b>r NF-κB-Signalweg ist wichtig für die Vermehrung des Influenza A Virus</b></li> <li><b>etylsalicylsäure als Mittel zur Hemmung des NF-κB-Signalweges</b></li> <li><b>handlung infizierter Zellen mit Acetylsalicylsäure hemmt die Replikation des a Virus</b></li> <li>Auswirkung der NF-κB-Hemmung mittels Acetylsalicylsäure auf Virusreplikation 51</li> <li>Spezifität der NF-κB-Inhibition durch Acetylsalicylsäure</li> <li>Acetylsalicylsäure hemmt Caspasen-Aktivität und Induktion des apoptotischen des</li> <li>Acetylsalicylsäure hemmt den Export von Ribonukleoprotein-Komplexen aus den rn</li> </ul>	40 ne 47 47 48 50 n 53 55 n 57
2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel Influenz 3.3.1. 3.3.2. 3.3.3. Zelltoo 3.3.4. Zellke 3.3.5.	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li></ul>	47 47 47 48 50 n 53 55 n 57
2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel Influenz 3.3.1. 3.3.2. 3.3.3. Zelltoo 3.3.4. Zellke 3.3.5. Zvtoto	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li></ul>	47 47 47 48 50 n 53 55 n 57 60
2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel Influenz 3.3.1. 3.3.2. 3.3.3. Zelltoo 3.3.4. Zellke 3.3.5. Zytoto 3.3.6.	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li></ul>	40 ne 47 47 48 50 n 53 55 n 57 60
2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel Influenz 3.3.1. 3.3.2. 3.3.3. Zelltoo 3.3.4. Zellke 3.3.5. Zytoto 3.3.6. Bildum	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li></ul>	47 47 48 50 n 53 55 n 57 60 62
2.2. 2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel Influenz 3.3.1. 3.3.2. 3.3.3. Zelltoo 3.3.4. Zellke 3.3.5. Zytoto 3.3.6. Bildun 3.3.7.	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li></ul>	40 ne 47 47 48 50 n 53 55 n 57 60 62 63
2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel Influenz 3.3.1. 3.3.2. 3.3.3. Zelltoo 3.3.4. Zellke 3.3.5. Zytoto 3.3.6. Bildun 3.3.7.	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li></ul>	40 ne 47 47 47 48 50 n 53 55 n 57 60 62 63
2.2. 2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel Influenz 3.3.1. 3.3.2. 3.3.3. Zelltoo 3.3.4. Zellke 3.3.5. Zytoto 3.3.6. Bildun 3.3.7. 3.4. Das	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li></ul>	47 47 47 48 50 n 53 55 n 57 60 62 63 66
2.2. 2.2. 2.2. 3. ERC 3.1. Der 3.2. Acc 3.3. Bel Influenz 3.3.1. 3.3.2. 3.3.3. Zelltoo 3.3.4. Zellke 3.3.5. Zytoto 3.3.6. Bildun 3.3.7. 3.4. Das 3.4.1.	<ul> <li>7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran</li> <li>7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Protein 46</li> <li>GEBNISSE</li></ul>	47 47 47 48 50 n 53 55 n 57 60 62 63 66

3.4.2. PB1-F2 Knockout-Mutanten	67
3.4.3. PB1-F2 kolokalisiert mit der viralen Polymeraseuntereinheit PB1 in Influenza	70
2 4 2 1 Knockout Virusmutantan van DD1 E2 zaigen verringerte Delymerogeektiv	/U
3.4.3.2 PB1-F2 interagient direkt mit der viralen Polymeraseuntereinheit PB1	11at / 1 73
3 4 3 3 Knockout von PB1-F2 hat keinen Einfluss auf Virentiter	75
3.4.3.4. Knockout PB1-F2 zeiget einen Einfluss auf die Plaques-Morphologie	76
3.4.3.5. Veränderte Lokalisierung des PB1-Proteins in mit den PB1-F2 Knockout-	Viren
infizierten Zellen	82
3.4.3.6. Überexpression von PB1-F2 führt zur starken IRF-3- und IFNβ-	
Promotoraktivität während Influenzainfektionen	83
4. DISKUSSION	85
4.1. Acetylsalicylsäure blockiert Influenza Virus-Vermehrung über die Inhibition	des
NF-κB Signalweges	85
4.2. Acetylsalicylsäure als antivirales Mittel <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	90
4.2.1. Antiviraler Einsatz von Acetylsalicylsaure zeigt keine Tendenz zur Bildung	02
	92
4.3. Die Rolle von PB1-F2 für die Pathogenität des Influenza Virus	94
4.3.1. Lokalisation von PB1-F2	94
4.3.2. PB1-F2 interagiert direkt mit PB1	96
4.3.3. PB1-F2-Defizienz beeinträchtigt die Aktivität der viralen Polymerase, führt at	er zu
keiner virustiteranderung	98
ZUSAMMENEASSUNG	101
ZUSAMMENFASSUNG	101
SUMMARY	103
LITERATUR	104
ANHANG	115
VERÖFFENTLICHUNGEN	118

# Abkürzungsverzeichnis

AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ASA	Acetylsalicylic acid, Acetylsalicylsäure (Aspirin)
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bindedomäne
bp	Basenpaar
°C	Temperatur in Grad Celsius
dH <sub>2</sub> O	Doppelt deionisiertes Wasser
D-MEM	"Dulbecco's modified eagle medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäss
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
FACS	Fluoreszenz-Aktivierter-Zellsortierer
FPV	"fowl plague virus", hier Influenza A/FPV/Bratislava/1979 (H7N7)
g	Erdbeschleunigung; Gramm
GFP	"Green-Fluorescent-Protein"
h	Stunde
HA	Influenza Hämagglutinin
kb	Kilobasenpaar
1	Liter
Lsg.	Lösung
μ	Mikro
μl	Mikroliter
m	Milli
M, mM, µM	Molar, Milimolar, Micromolar
M1	Influenza Matrix Protein 1
M2	Influenza Matrix Protein 2
MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
MEM	"minimal essential medium"
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	Multiplicity of infection (Viruspartikel pro Zelle)
MTS	Mitochondriale Lokalisierungs-Sequenz
NA	Influenza Neuraminidase
NLS	Nukleäre Lokasilisierungs-Sequenz
NP	Influenza Nukleoprotein
NS1	Influenza "non structural protein 1"
NS2 (NEP)	Influenza "non structural protein 2", bzw. "nuclear export protein"
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PA	Influenza "polymerase acidic protein"

PB1	Influenza "polymerase basic protein 1"
PB1-F2	Influenza "polymerase basic protein 1, open reading frame 2"
PB2	Influenza "polymerase basic protein 2"
pfu	Plaque forming units
pН	"potentia Hydrogenii", Säurestärke
PR8	Influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)
PR8r	rekombinant hergestellter Virusstamm, Influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Influenza Ribonukleoprotein-Komplex
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunden
Tris	Tris (hydroxymethylmethan) aminomethan
ÜN	über Nacht
wt	Wildtyp

## 1. Einleitung

## 1.1. Das Influenza Virus

Influenza ist eine ansteckende Krankheit, die bei Menschen schwere Infektionen der Atemwege hervorruft. Die Bezeichnung "Influenza", italienisch für "Einfluss", hat ihren Ursprung in der mittelalterlichen Vorstellung, dass bestimmte Krankheiten durch ungünstige Planetenkonstellationen hervorgerufen werden. Als Ursache wurde jedoch erst 1933 von Smith et al. ein unfiltrierbares Agens als Krankheitserreger erkannt. Das Influenza A Virus gehört zusammen mit Influenza B, Influenza C, Thogotovirus (Clerx et al. 1983) und Isavirus ("infectious salmon anemia", engl. für Ansteckende Blutarmut der Lachse (Falk et al. 1997)) zu der Familie der Orthomyxoviren (Orthomyxoviridae). Es ist ein ca. 120 nm großes Virus mit einem linearen, einzelsträngigen und segmentierten RNA Genom (8 RNA Segmente, (-) ssRNA Genom) in negativer Polarität. Das Influenza A Virus ist ein Erreger, der bei Menschen und anderen Säugetieren primär die Atemwege befällt. Das natürliche Reservoir der Influenza Viren stellen jedoch wild lebende Wasservögel dar. Diese Tiere erkranken normalerweise nicht, da sich das Virus nur in einer lokalisierten Region des Darms vermehrt. Durch Mutationen im Oberflächenprotein können aber Virusstämme entstehen, die zu systemischer Infektion und hoher Mortalität in Vögeln führen.

Influenza B Viren (8 Segmente, (-) ssRNA Genom) treten dagegen nur bei Menschen auf. Influenza C ist ein (-) ssRNA Virus mit 7 Segmenten, besitzt keine Neuraminidase, stattdessen aber ein Oberflächen-Hämagglutinin-Esterase Fusionsprotein (HEF) und befällt Menschen sowie Schweine. Da die Erkrankungen nur milden Verlauf haben, spielt dieses Virus für Menschen keine wichtige Rolle. Das Thogotovirus sowie das Isavirus spielen für Menschen keine Rolle, der verursachte Schaden bei Tieren ist aber durchaus vom wirtschaftlichen Interesse.

## 1.2. Pathologie und Wirts-Spektrum

Influenza-Erkrankungen sind für ihr periodisches und plötzliches Auftreten bekannt und vielfach durch Geschichtsaufzeichnungen belegt. Dieses periodische und geographisch begrenzte Auftreten wird allgemein als Epidemie bezeichnet. Allerdings kennt man bei Influenza auch weltweite epidemische Ausbrüche, so genannte Pandemien. Alleine im 20. Jahrhundert sind bislang vier große Pandemien aufgetreten. Der bekannteste Ausbruch ist die "Spanische Grippe", die am Ende des ersten Weltkrieges in den Jahren 1918-1919 40 bis 50

Millionen Menschenleben kostete (Davis et al. 2000). Weitere bekannte Pandemien ereigneten sich 1957-1958 ("Asiatische Grippe") sowie 1968/69 ("Hong Kong Grippe") bzw. 1977 ("Russische Grippe"), die jeweils 1-2 Mio. Menschen das Leben gekostet haben. Die Pandemie von 1957 hatte zum ersten mal nachweislich aviären Ursprung, was bedeutet, dass aviäre Gensegmente in die in der menschlichen Population zirkulierenden Viren übergesprungen sind. Auch für die spanische Grippe von 1918/19 wird ein aviärer Ursprung spekuliert. Aktuell beherrscht die Medien eine Angst vor einer erneuten Pandemie, nach den "Vogelgrippe"-Ausbrüchen in Asien 1997 und 2004, bei denen Menschen von aviären H5N1-Influenza-Stämmen infiziert wurden (Claas et al. 1998). Die Gefahr besteht darin, dass sich das aviäre Virus soweit verändert, das es von Mensch zu Mensch direkt übertragbar wird. Dadurch kann die Wahrscheinlichkeit einer verheerenden Pandemie steigen (Subbarao et al. 1998; Juckett 2006). Das Zusammenleben von Mensch und Tier auf engsten Raum begünstigt die Entstehung neuer Influenzastämme, und so ist Asien, wo solche Bedingungen vielerorts herrschen, eine potentielle Quelle für neue Pandemien.

Hämagglutinin aviärer Influenza-Stämme bindet spezifisch an  $\alpha$ -2,3 gebundene Sialinsäure auf Zellmembran-Rezeptoren, so dass diese Stämme normalerweise apathogen für Menschen sind, deren Respirationstrakt-Zellen hauptsächlich  $\alpha$ -2,6 gebundene Sialinsäure präsentieren (Connor et al. 1994; Suzuki et al. 2000). Es wurde jedoch kürzlich von aviären H5N1-Stämmen berichtet, die eine erhöhte Affinität für  $\alpha$ -2,6 gebundene Sialinsäure zeigten, die somit ein erhöhtes humanpathogenes Potential besaßen (Gambaryan et al. 2006).

Die hohe Variabilität des Influenza Virus wird durch sein segmentiertes RNA-Genom begünstigt. So ist es möglich dass es zum Austausch von ganzen Segmenten des RNA-Genoms kommt, wenn zwei verschiedene Influenza-Stämme dieselbe Wirtszelle infizieren. Diesen Vorgang bezeichnet man allgemein als "antigenic shift", die so entstandenen Viren als "Reassortanten". Auf diese Weise können z.B. aviäre Stämme, welche Schweine infiziert haben, sich in dieser Spezies genetisch mit humanpathogenen mischen und von diesen Wirten auf Menschen überspringen (Castrucci et al. 1993; Brown et al. 1998; Ito et al. 1998; Zhou et al. 1999).

Eine weitere Eigenschaft von Influenza-Viren ist die fehlende "proof reading" Funktion der viralen RNA-Polymerase, d.h. die virale Polymerase besitzt keine Korrekturfunktion, was das Entstehen von Mutanten begünstigt. Das fehlende "proof reading" hat zur Folge, dass eine bis zu 10.000 mal höhere Replikationsfehlerrate im Vergleich zu DNA Polymerasen auftritt (Holland et al. 1982; Steinhauer und Holland 1987). Dies ist die Ursache für das jährliche Auftreten neuer Virus-Varianten, was man als "antigenic drift" bezeichnet.

Ein anderer Faktor der viralen Anpassung an den Wirt stellt die virale Polymerase dar. So können Mutationen der aviären Polymerase zu einer erhöhten Aktivität in Säugetieren führen (Gabriel et al. 2005).

# **1.3. Morphologie und Vermehrungszyklus des Influenza** A Virus

Das einzelsträngige, segmentierte (-) RNA Genom des Influenza A Virus ist aufgeteilt in acht Segmente und ist etwa 13 kB groß. Es codiert für bis zu elf Proteine, von denen neun die Struktur des Viruspartikels bilden und zwei, die nur in virusinfizierten Zellen exprimiert werden.



Abbildung 1: Schematische Darstellung des Influenza A Virions.

Influenza A Virus besitzt 11 Proteine codiert durch 8 einzelsträngige RNA. Segmente in negativer Orientierung, umhüllt von einer Lipid-Doppelschicht (verändert nach (Webster et al. 1992)).

- NA: Neuraminidase
- HA: Hämagglutinin

PB1,PB2, PA: Virales Polymerase-Komplex

("polymerase basic protein" 1, 2 und "polymerase acidic protein")

- NP: RNA-bindendes Nukleoprotein
- M1: Matrix-Protein

M2: integrales Membran-Protein (Ionenkanal)

NS1: nicht strukturelles Protein 1, Interferon-Antagonist

NEP/NS2: Nukleäres Export Protein, früher nicht strukturelles Protein 2 PB1-F2: Peptid vom alternativen ORF des PB1-Proteins Das Genom des Influenza A Virus ist in so genannte Ribonukleoprotein-Komplexe (RNP-Komplexe) organisiert. Sie bestehen aus der viralen (-) RNA, an die das Nukleoprotein (NP) und die

Polymeraseuntereinheiten PB1, PB2 und PA gebunden sind (siehe Abbildung 1.) Das Virion ist umgeben von einer der Wirtszelle von stammenden Lipidhülle, deren Bestandteile die Glykoproteine Hämagglutinin (HA) Neuraminidase und (NA) sowie das M2-Protein (ein pH-abhängiger Ionenkanal) sind (Abbildung 1). Es sind 16 HA- und 9 NA-Subtypen bekannt. Die Kombination aus HA und NA wird zur Bezeichnung eines

Virusstamms benutzt. Die meisten dieser Kombinationen findet man bei aviären Isolaten. Epidemisch humanpathogen sind Viren mit HA-Typ 1,2 und 3, sowie NA-Typ 1 und 2 (Rott 1992; Suzuki et al. 2000). Das HA-Protein hat die Aufgabe der Rezeptorbindung auf der Wirtszelle und Membranfusion. Neusynthetisiertes HA durchläuft mehrere posttranslationale Modifikationen, die am Ende in einer Spaltung des HA in zwei Untereinheiten HA1 sowie HA2, verbunden durch eine Disulfidbrücke resultieren. Die Spaltung erfolgt durch wirtszelleigene, trypsinähnliche Furinproteasen. (Webster et al. 1992; Garten et al. 1994). Das NA-Protein erkennt und spaltet die Sialinsäurereste der zellulären



Abbildung 2: Schematischer Darstellung des Influenza A Virus Vermehrungszyklus

Das Virus-Partikel wird endozytotisch aufgenommen, vermittelt durch Bindung an Rezeptoren an der Zelloberfläche. Das Endovesikel wird angesäuert und die viralen RNP-Komplexe (Ribonukleoprotein-Komplexe) freigesetzt. Diese werden in den Zellkern transportiert, wo die viralen Gene transkribiert und repliziert werden. Die mRNA der viralen Gene wird in das Zytoplasma transportiert und ribosomal translatiert. Die so entstandenen Proteine werden zum Teil in die Plasmamembran integriert (Glykoproteine) und zum Teil zum Zellkern zurück transportiert, wo sie zusammen mit neuer viraler RNA zu RNP-Komplexen assemblieren. Die RNP-Komplexe werden aus dem Zellkern heraus transportiert und an der Plasmamembran in neue Virionen verpackt, die durch Knospung ("Budding") freigesetzt werden.

Glykoproteine, was wahrscheinlich einen Schutzmechanismus gegen Infektion der bereits infizierten Zelle mit neu gebildetem Virus darstellt (Webster et al. 1992).

Das Matrixprotein (M1) bildet das innere der Virushülle. Die viralen RNP-Komplexe sind an das M1-Protein gebunden. Das achte RNA-Segment codiert für das nicht-strukturelle Protein 1 (NS1) und das Nukleäre Export Protein (NEP), ein Kernexportprotein, welches früher als nicht-strukturelles Protein 2 bezeichnet wurde, da es nur in sehr kleinen Mengen im Viruspartikel vorkommt (Richardson und Akkina 1991; Yasuda et al. 1993). 2001 wurde ein elftes Influenza Protein PB1-F2 entdeckt (Chen et al. 2001), dessen nähere Beschreibung in Kapitel 1.5.1 erfolgt.

Influenza Viren infizieren bei Menschen zunächst die Epithelzellen der Atemwege, aber auch T-Zellen, Monocyten und Makrophagen (Ronni et al. 1995). Die Infektion einer Zelle durch das Influenza Virus beginnt mit Bindung des HA-Proteins an zelluläre Rezeptoren. Als Rezeptormolekül dient dabei Sialinsäure, die als ein terminaler Zuckerrest auf Proteinen der Wirtszelloberfläche vorkommt (Stegmann et al. 1990). Die Aufnahme des Viruspartikels in die Zelle erfolgt durch Endozytose (Abbildung 2). Die Freisetzung des Virus aus dem endosomalen Vesikel ins Zytoplasma ist ein komplexer Vorgang, der mit der Ansäuerung des Vesikels eingeleitet wird. Die Ansäuerung wird durch die M2-Proteine vermittelt, die die Funktion von Protonenkanälen besitzen (Pinto et al. 1992). Die Änderung des pH-Werts führt zu einer Konformationsänderung des Hämagglutinins. Dabei wird die Konformation der aminoterminalen Region des HA-Moleküls so geändert, dass die endosomale und virale Membran zusammengebracht werden und miteinander fusionieren. Der Umschlag des pH-Werts in den sauren Bereich leitet einen Vorgang ein, den man als "uncoating" bezeichnet. Dabei bewirkt der niedrige pH-Wert nicht nur die Konformationsänderung des HA, sondern auch das Lösen der viralen RNP-Partikel von den M1-Proteinen, was dazu führt, dass die virale RNA ins Zytoplasma der infizierten Zelle gelangt (Bui et al. 1996). Die virale RNA wird daraufhin aus dem Zytoplasma in den Zellkern transportiert (Martin und Helenius 1991). Sie stellt einerseits die Vorlage für die Transkription von mRNA in virale Proteine und andererseits die Vorlage für die Synthese neuer viraler (-) RNA. Die frühen viralen Proteine PB1, PB2, PA, NP, NS1 und NS2 werden ribosomal im Zytoplasma synthetisiert und zurück in den Zellkern transportiert.

PB1, PB2 und PA bilden den viralen Polymerase-Komplex, der ausgehend von einer cRNA die Synthese sekundärer viraler RNA einleitet und auch für die mRNA Transkripte der späten viralen Strukturproteinen HA, NA, M1 und M2 zuständig ist. Für die Initiation der Transkription dienen dabei Promotor-ähnliche Strukturen, die an den 5' und 3' Enden der

viralen RNA-Segmente als Doppel-Strang Abschnitte entstehen. Sie ermöglichen die Bindung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, die die virale RNA vervielfältigt (Flick et al. 1996). Die Transkription viraler Influenza Gene weist eine Funktion auf, die man als "cap stealing" bezeichnet. Damit ist das Abspalten von 5'Cap-Strukturen zellulärer pre-mRNA durch das PB2 Protein gemeint, um diese als Primer für die Transkription viraler mRNA zu verwenden. Dabei erkennt und bindet das PB2 Protein an 5'CapI-Gruppe von zelleigener mRNA und spaltet diese ab (Bouloy et al. 1978; Krug et al. 1979; Plotch et al. 1979; Bouloy et al. 1980). Der Vorgang ermöglicht die zelluläre Transkriptionsrate der viralen mRNA (Shapiro und Krug 1988). Zu Beginn der Infektion ist die Transkriptionsrate der viralen RNA sehr hoch, nimmt aber im weiteren Verlauf der Infektion ab. Die Replikation bleibt dagegen während der gesamten Infektion konstant hoch (Shapiro et al. 1987).

Von allen Proteinen des viralen RNP-Komplexes ist bekannt, dass sie eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) besitzen (Nath und Nayak 1990; Mukaigawa und Nayak 1991; Nieto et al. 1994). Das NP-Protein besitzt zwei verschiedene NLS (O'Neill et al. 1995). Eine unkonventionelle NLS am N-Terminus ist für den Import des Proteins, wie auch des RNP-Komplexes verantwortlich (Cros et al. 2005). Große Proteine, wie die Proteine des RNP-Komplexes, können nicht passiv in den Zellkern diffundieren. Sie werden aktiv in den Zellkern importiert und benutzen dazu die zellulären Importmechanismen. Von Proteinen, die eine NLS besitzen ist bekannt, dass sie direkt an Importin  $\beta$ , oder indirekt über Proteine aus der Importin  $\alpha$ -Familie, binden. Vom Influenza Nukleoprotein ist bekannt, dass es mit verschiedenen Proteinen aus der Importin  $\alpha$ -Familie interagiert (Melen et al. 2003). Für den Import von PB1 scheint das Importin RanBP5 verantwortlich zu sein, das mit dem PB1, PB1-PA-Komplexen, aber nicht PB1-PB2-Komplexen, interagiert (Deng et al. 2006).

Neugebildete RNP-Komplexe werden aktiv über Kernporen in das Zytoplasma transportiert (Pleschka et al. 2001). Die M1-und NS2-Proteine spielen bei diesem Transportvorgang eine wichtige Rolle. Sie binden im Kern an die RNP's und unterstützen den Export (Avalos et al. 1997; O'Neill et al. 1998). Das M1-Protein hemmt dabei den Rücktransport der RNP's in den Zellkern (Bui et al. 1996). Diskutiert wird auch, dass das Nukleoprotein den Rücktransport der RNP's in den Ricktransport der RNP-Komplexe hemmt, indem es an die F-Aktin-Stressfibrillen bindet (Digard et al. 1999). Die Akkumulation von HA-Protein in der Zellmembran dient dabei als verstärkendes Signal für den Export der RNP-Komplexe aus dem Zellkern, vermittelt durch virusinduzierte Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskade (MAPK) (Marjuki et al. 2006).

Das NS1-Protein soll verschiedene regulatorische Funktionen ausüben; u.a. Apoptose-Regulation (Schultz-Cherry et al. 2001; Zhirnov et al. 2002), Unterdrückung der antiviralen Antwort (Garcia-Sastre et al. 1998; Garcia-Sastre 2001), Hemmung der Aktivierung von zellulären Signalwegen und durch Bindung an virale einzel- oder doppelsträngige RNA die Unterdrückung der dsRNA-aktivierten Kinase PKR (Enami et al. 1994). Die Aktivierung der PKR führt zur Phosphorylierung des Proteinsynthese-regulierenden Proteins eIF- $2\alpha$  (eukaryontischer Initiationsfaktor  $2\alpha$ ), was zum Abbruch der Proteinsynthese, als Folge einer antiviralen Reaktion führt (Lu et al. 1995). Ferner trägt NS1 zum Ausschalten der zellulären Proteinsynthese durch Inhibierung des Transports der mRNA aus dem Zellkern (Fortes et al. 1994; Qian et al. 1994) und durch Inhibition des Spleißens und der Polyadenylierung (Qiu und Krug 1994; Qiu et al. 1995) der mRNA bei.

Die späten Influenza-Genprodukte M2, NA und HA durchlaufen mehrere Modifikationen auf ihrem Weg vom endoplasmatischen Reticulum über den Golgiapparat, bevor sie in die Wirtszellmembran eingebaut werden. HA und NA werden dabei beispielsweise glykosyliert. Zum Schluss werden diese viralen Proteine in die Zellmembran eingebaut. Dabei bildet das HA-Molekül Trimere, die NA- und M2-Mpleküle Tetramere. Die viralen RNA Segmente, die als M1-NS2-RNP-Komplexe aus dem Zellkern transportiert werden, werden mit Hilfe des M1-Proteins mit den Glykoproteinen assoziiert, von der Membran umschlossen und die neu entstandenen Viruspartikel durch Knospung freigesetzt (Webster et al. 1992).

## 1.4. Virusinduzierte Genexpression

Die Infektion mit Influenza Viren aktiviert zunächst verschiedene Signalwege, die als Abwehr der Zelle gegen das Virus angeschaltet werden. Dazu gehört die Expression von Zytokinen (Julkunen et al. 2000; Julkunen et al. 2001; Mogensen und Paludan 2001). Die Zytokine bilden einen wichtigen Bestandteil der Immunabwehr. Dazu gehören die Interleukine (IL), Interferone (IFN) und Tumornekrosefaktoren (TNF). TNF- $\alpha$  wird von Makrophagen, Monocyten, Lymphozyten und Mastzellen sowie von bestimmten T-Zellen gebildet.

Virale Infektion stimuliert Phagozyten, dendritische Zellen wie auch Gewebezellen zur Freisetzung von chemotaktischen Zytokinen, so genannten Chemokinen. Man unterscheidet zwischen CC- und CXC-Chemokinen, je nach ihrer Rezeptoraffinität. Influenza Virus-Infektion führt zur Produktion von CC-Chemokinen, wie MIP-1 $\alpha$  und RANTES, die Monocyten und Makrophagen rekrutieren (Sprenger et al. 1996). Eine Influenza induzierte IL-8 Expression konnte auch in Epithelzellen nachgewiesen werden (Choi und Jacoby 1992). Bereits sehr früh wurde erkannt, dass die Interferone eine antivirale Funktion haben (Isaacs

und Lindenmann 1957; Repik et al. 1974). Typ I Interferone (INF $\alpha$  und INF $\beta$ ) werden als

eine erste Abwehrlinie infolge von Influenza-Infektionen in Monocyten, Makrophagen und auch in Epithelzellen induziert (Julkunen et al. 2001).

Die Expression von IFN $\beta$  steht unter der Kontrolle eines sog. "IFN $\beta$ -Enhaceosoms". Dieser multimere Komplex besteht aus den Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, AP-1 und IRF-3/7, die an die regulatorische Domäne des Promotors binden. Der Komplex besteht aus vier PRD-Domänen (positiv-regulatorische Domäne I-IV). So bindet z.B. der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B an PRD II und IRF3/7 an PRD I und III und kann transkriptionelle Aktivierung des INF $\beta$ -Gens einleiten (Thanos und Maniatis 1995).

#### 1.4.1. Influenza Virus induzierte Signaltransduktion

Influenza Virus-Infektion führt zur Aktivierung von mitogenen und stressaktivierten MAPK Signalwegen, wie der p38 Kaskade (Kujime et al. 2000; Maruoka et al. 2003), der Raf/MEK/ERK Kaskade, dem JNK und dem ERK5 Signalweg. Mitogen-aktivierte (MAP) Kinasen sind wichtige Regulatoren der Zytokin-Genexpression. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die ersten beiden Signalkaskaden vom Influenza Virus "missbraucht" bzw. zu Gunsten des Virus benutzt werden (Ludwig et al. 1999; Ludwig et al. 2003).

Dabei ist die Virus-unterstüzende Rolle der Raf/MEK/ERK Kaskade besonders evident. Dieser Signalweg wird von Influenza Viren für die Unterstützung des aktiven Transports der viralen RNP-Komplexe aus dem Zellkern benutzt. Eine Inhibierung des ERK-Signalweges führt zur Retention der RNP-Komplexe im Zellkern und folglich zu verminderter Virusreplikation (Pleschka et al. 2001; Ludwig et al. 2004). Dabei wird die Kaskade biphasisch aktiviert, die Bedeutung der frühen Aktivierung ist noch unklar, die späte Aktivierung wird durch Protein Kinase C  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) vermittelt und durch die Akkumulierung neu gebildeter HA-Proteine in der Zellmembran ausgelöst (Marjuki et al. 2006).

Der p38 Signalweg wird durch Influenza aktiviert, seine Bedeutung für die Replikation des Influenza Virus ist jedoch unklar. Eine Hemmung des p38 Signalweges scheint allerdings die effiziente Virusreplikation zu beeinträchtigen (Labor Ludwig, unpubliziert).

Die ERK5-Kinase Kaskade wird ebenfalls durch das Influenza Virus aktiviert, analog zur Raf/MEK/ERK Kinasekaskade, eine Inhibierung dieses Signalweges zeigt aber keinerlei Einfluss auf die virale Replikation (Labor Ludwig, unpubliziert).

Das Influenza Virus induziert ferner die Aktivität der JNK-Kinase (c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale Kinase) und AP-1 abhängige Genexpression. Die Aktivierung der JNK-Kinase scheint dabei durch die Akkumulierung viraler doppelsträngigen RNA-Intermediate zu geschehen (Chu et

al. 1999). Eine Inhibierung der JNK-Aktivität führt zu verminderter INFβ-Antwort (Ludwig et al. 2001).

Das Influenza Virus induziert zwar in der infizierten Zelle eine antivirale Antwort, hat aber gleichzeitig Mechanismen entwickelt, um diese Antwort zu umgehen. Das Virus kann dabei die Proteinsynthese des Wirtes unterbinden und die antiviralen Signalwege hemmen (Gale et al. 2000; Garcia-Sastre 2001). Die zentrale Rolle der Inhibition der Interferon-vermittelten antiviralen Antwort und der Proteinsynthese der Wirtszelle spielt dabei, das bereits im Kapitel 1.3 erwähnte NS1-Protein.

NS1 ist ein multifunktionelles Protein, das sowohl spezifisch an andere Proteine, wie auch unspezifisch an RNA binden kann (Lin et al. 2007). Dazu besitzt das NS1-Protein zwei Domänen. Zum einen die N-terminale RNA-bindende Domäne (BRD), welche das Virus vor antiviraler IFN  $\alpha/\beta$  Antwort, durch Blockierung der 2'5'-oligo(A) Synthetase, schützt. Zum anderen die C-teminale Domäne (Effektor-Domäne), welche durch Bindung an CPSF (cleavage and polyadenylation specifity factor) und PAB II (poly(A)-binding protein II) die Reifung und Export der zellulären antiviralen mRNA's inhibiert (Wang et al. 2002; Krug et al. 2003). Die Bindung von NS1 an RNA verhindert dabei die Aktivierung der PKR-Kinase und damit die Induktion der antiviralen Interferon-Antwort (Gale et al. 2000). NS1-Deletionsmutanten von Influenza sind nicht in der Lage sich effizient in Zellen oder Organismen mit intaktem Interferon-System zu vermehren (Garcia-Sastre et al. 1998).

Für die Aktivierung vieler Signalwege scheint die doppel- oder einzelsträngige RNA verantwortlich zu sein, was durch die Bindung an NS1 erschwert wird. Dabei spielen für die Aktivierung von Siglalwegen freie Triphosphatgruppen am 5'Ende des vRNA-Stranges eine wichtige Rolle (Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006).

Für die Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen durch das Einleiten einer frühen Immunantwort verfügt die Zelle über spezielle Rezeptoren. Diese wichtige Rolle erfüllen z.B. "Toll like" Rezeptoren (TLR's). Es handelt sich hierbei um Typ I Membranproteine, an deren N-terminalen Enden leucinreiche Repeats vorkommen, die die so genannten PAMP's (pathogen-associated molecular patterns) erkennen. Von den bis jetzt identifizierten elf TLR's spielen TLR3 und TLR7/8 für die Erkennung viraler Pathogene eine entscheidende Rolle.

TLR3 ist ein intrazellulärer Rezeptor, der meist in Vesikeln, aber auch an der Zelloberfläche vorkommt und doppelsträngige RNA erkennt (Alexopoulou et al. 2001). Doppelsträngige RNA ähnelt dabei wahrscheinlich den Intermediaten von Virus-RNA (Alexopoulou et al. 2001; Lund et al. 2004). Wahrscheinlich spielt TLR3 auch eine Rolle für die Erkennung von Influenza Virus-Infektionen (Guillot et al. 2005). TLR3 führt über das Adaptorprotein TRIF

zur Aktivierung von TBK1 ("tank binding kinase 1"), was eine Phosphorylierung und Dimerisierung von IRF3 und 7 zur Folge hat. Diese Transkriptionsfaktoren sind für das Einleiten der antiviralen INFB-Antwort verantwortlich.

Der in Endosomen vorkommende TLR7 ist hauptsächlich für die Erkennung einzelsträngiger RNA verantwortlich (Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004). TLR7 aktiviert IRF7 über MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) und TRAF6 (TNF-receptor associated factor 6), unter Beteiligung einer bis jetzt unbekannten Kinase (Kawai et al. 2004).

Für die Erkennung doppelsträngiger RNA kommen in Zellen zwei weitere, wichtige intrazelluläre Rezeptoren vor: RIG-I ("retinoic acid inducible gene I") und mda-5 ("melanoma differentiation associated protein 5"). Kürzlich wurde gezeigt, dass RIG-I hauptsächlich einzelsträngige RNA mit freien 5′Triphosphat Gruppen erkennt, was durch eine Interaktion von NS1 mit RIG-I inhibiert wird (Pichlmair et al. 2006). Diese Rezeptoren führen zur Induktion von antiviralen Zytokinen (Andrejeva et al. 2004; Kato et al. 2005; Siren et al. 2006). RIG-I und mda-5 sind Helikasen, die über "caspase recruiting domain" (CARD) und Helikasedomänen verfügen. Die Helikasedomäne interagiert dabei mit der doppelsträngigen RNA, die CARD-Domäne ist für die Signalweiterleitung verantwortlich, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3 und NF- $\kappa$ B führen (Yoneyama et al. 2004).

### 1.4.2. NF-KB Signalweg und Apoptose

Ein wichtiger Signalweg, der durch Influenza Viren induziert wird, ist der NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B Weg. Dieser Signalweg wird durch die Influenza Virus Infektion oder durch Expression von Influenza-Proteinen (wie HA) und doppel- oder einzelsträngigen RNA induziert (Pahl und Baeuerle 1995; Ludwig et al. 1999; Flory et al. 2000; Julkunen et al. 2000; Ludwig et al. 2003; Yoneyama et al. 2004). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B wurde als generelle antivirale Antwort der Zelle beschrieben (Hiscott et al. 2001) und spielt eine prominente Rolle für die Expression von Zytokinen, Chemokinen und für die Aktivierung der proinflammatorischen Antwort (Baeuerle und Henkel 1994), sowie bei negativer Regulation der Apoptose (Beg und Baltimore 1996; Liu et al. 1996).

NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren sind dimere Moleküle aus der Rel-Familie (Ghosh et al. 1998). In Säugern findet man fünf Rel-Proteine aus zwei Klassen vor. Die Genprodukte der ersten Klasse: Rel A (oder p65), c-Rel und Rel B werden nicht proteolytisch gespalten, wohingegen die Moleküle der zweiten Klasse p50 und p52 aus Vorläufermolekülen p105 und p100 proteolytisch prozessiert werden. Dimere, die p65 und c-Rel enthalten werden durch die Bindung an inhibitorische I $\kappa$ B-Moleküle (inhibitor of  $\kappa$ B) im Zytoplasma festgehalten. Zur I $\kappa$ B-Familie gehören die Moleküle I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , und Bcl-2 in Vertebraten sowie cactus in Drosophila.

Eine Stimulation des Signalweges führt zur Aktivierung des IkB Kinase (IKK) -Komplexes, der seinerseits IkB-Moleküle phosphoryliert (siehe Abbildung 3) (Karin 1999; Karin 1999).





Der NF- $\kappa$ B Signalweg wird auf zwei Wegen induziert. Durch TNF $\alpha$ , IL-1, LPS oder dsRNA wird die Kinase IKK $\beta$  aktiviert, die ihrerseits I $\kappa$ B $\alpha$ , das inhibitorische Molekül von p50/p65, phosphoryliert. Die Phosphorylierung führt zur Ubiquitinierung und proteosomalem Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ . Die zweite Alternative wird z.B. über Lymphotoxin  $\beta$ aktiviert und führt zur Aktivierung von IKK $\alpha$  sowie zur Phosphorylierung und Prozessierung von p100 (Karin und Lin 2002).

Die NF-kB-Aktivierung kann über die Kinase PKR eingeleitet werden. PKR phosphoryliert dabei die Protein Kinase IKK (Kumar et al. 1994). IKK besteht aus einer regulatorischen Untereinheit IKKy und zwei katalytischen Untereinheiten  $\alpha$ und  $\beta$ . Zytokine, wie TNF $\alpha$  und IL1 oder bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) sowie Doppelstrang-RNA (dsRNA) induzieren die NF-<sub>K</sub>B-Aktivierung über IKKß. IKKa wird dagegen durch Moleküle der TNF-Familie. wie aus Lymphotoxin  $\beta$  oder BLyS (B lymphocyte stimulator) aktiviert (Karin und Lin 2002).

Eine Phosphorylierung der IkB-Moleküle führt deren zu Ubiquitinierung und proteasomalem Abbau. Dadurch die wird Kernlokalisierungssequenz in der sog. RHD (Rel homology domain) frei und das NF-KB-Dimer Zellkern in den

transportiert. Die 300 AS lange RHD enthält außer der Kernlokalisierungssequenz eine DNA-

Bindungssequenz, eine Dimerisierungsdomäne und eine IκB-Interaktionsdomäne (Ghosh et al. 1998; Karin und Delhase 2000).

Unter der Kontrolle von NF-κB befindet sich eine Reihe von Genprodukten, die antiapoptotisch wirken. Dazu gehören "cellular inhibitors of apoptosis" (cIAP's), Caspase-8cFLIP (flice inhibitory protein), A1, TRAF1 und TRAF2 (TNF-receptor associated factor). Zu cIAPs gehören cIAP 1 und 2 sowie XIAP (X-chromosome linked IAP). Die cIAPs binden an Pro-Caspase 3, 6 und 7 (Effektorcaspasen) und verhindern ihre proteolytische Prozessierung und Aktivierung (Deveraux et al. 1998).

Daneben wurde gezeigt, dass die Influenza-Infektion ein latentes Chaperon-aktiviertes Protein p58IPK induziert, welches mit der PKR-Dimerisierung und Aktivierung interferiert (Julkunen et al. 2001). P58IPK wurde als Inhibitor der Apoptose identifiziert und könnte eine Rolle in der influenzainduzierten Apoptose spielen (Tang et al. 1999).

## 1.5. Virusinduzierte Apoptose

Das Influenza Virus moduliert, neben vielen anderen Viren, wie z.B. HIV (Terai et al. 1991) oder Adenovirus (Rao et al. 1992), Apoptose-Signalwege. Influenza Virus-infizierte Zellen zeigen typische Apoptose-Merkmale (Takizawa et al. 1993; Hinshaw et al. 1994). Dazu gehören: Chromatin-Kondensation, DNA-Fragmentierung, Veränderungen in der Zellmorphologie (Schrumpfen) und Caspase-Aktivierung. Die Proteine NS1 und NA scheinen dabei eine größere Rolle in der Induktion der Apoptose zu spielen. NA aktiviert TGF-ß (transforming growth factor  $\beta$ ), was in einem auto- und parakrinen Mechanismus zur Induktion der Apoptose führen kann (Schultz-Cherry und Hinshaw 1996; Morris et al. 1999). Überexpression von NS1 in MDCK- oder HeLa-Zellen ist ausreichend, um bereits Apoptose zu induzieren (Schultz-Cherry et al. 2001). Allerdings liegen auch Ergebnisse vor, die auf eine IFN-abhängige, antiapoptotische Funktion von NS1 deuten. Dabei wurde beobachtet, dass eine Influenza NS1-Deletionsmutante stärker Apoptose induzieren konnte als das wt Virus (Wildtyp Virus) (Zhirnov et al. 2002). Neuere Daten zeigen, dass Influenza Virus den PI3K/Akt (Phosphoinositid-3-Kinase/Protein Kinase B oder Akt) Signalweg durch Bindung von NS1 an PI3K aktiviert (Hale et al. 2006; Banet-Noach et al. 2007), was zu einer antiapoptotischen Antwort führen kann (Ehrhardt et al. 2007).

Eine antiapoptotische Rolle könnte auch das M-Protein spielen. So wurde gezeigt, dass das Matrix-Protein in der Lage ist Caspase 8 und auch schwach Caspase 7 zu binden. Die N-terminale Region von M1 zeigt dabei eine Ähnlichkeit mit der Anti-Caspase Domäne des

p35-Proteins vom Baculovirus, welche Caspase-inhibierende Funktion besitzt (Zhirnov et al. 2002).

Ein weiteres Influenza-Protein, das eine Rolle in der Apoptose spielen könnte, ist das erst 2001 entdeckte elfte Influenza-Protein PB1-F2.

#### 1.5.1. Das PB1-F2 Protein

Das PB1-F2 Protein wurde als letztes Influenza-Genprodukt identifiziert und als proapoptotisch beschrieben (Chen et al. 2001). PB1-F2 ist ein etwa 14 kDa großes Peptid (zwischen 79 und 101 Aminosäuren, je nach Virus-Stamm variierend, meistens 87-90 Aminosäuren (Zell et al. 2006)), das vom +1 Leserahmen des PB1-Gens kodiert wird. Es wird angenommen, dass der alternative Leserahmen mit Hilfe eines Mechanismus exprimiert wird, den man als "ribosomales Scanning" bezeichnet. Dabei "scannt" die 40S Untereinheit des Ribosoms nach weiteren AUG Triplets, um die Translation zu initiieren (Jackson 2005).

Biochemisch zeigt das Peptid Ähnlichkeiten zu anderen viralen Genprodukten, die als proapoptotisch beschrieben wurden, wie HTLV Typ 1 Protein p13 (D'Agostino et al. 2002; Silic-Benussi et al. 2004) und HIV-1 Vpr (Muthumani et al. 2002; Sherman und Greene 2002).

Das Translationsprodukt des PB1-F2 Leserahmens aus infizierten Zellen migriert im Western-Blot in drei Banden (Chen et al. 2001). Exprimiert man PB1-F2 dagegen vom rekombinanten Vaccinia Virus oder von cDNA, so wurde nur eine Proteinspezies beobachtet, was auf posttranslationale Modifikationen während Influenzainfektion, wie Phosphorylierung, hinweist (Henklein et al. 2005).

Nicht alle Influenza-Stämme besitzen den (+1)Leserahmen für PB1-F2, es ist auch nicht nachgewiesen, ob die Influenza-Stämme, die über den Leserahmen verfügen, auch das Peptid exprimieren. Zudem ist das Peptid sehr variabel, d.h. es bestehen große Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen Influenza A-Subtypen.

Eine Deletion des PB1-F2 Leserahmens zeigte, dass das Protein für das Influenza Virus nichtessentiell ist. Es wurden bis jetzt keine Effekte auf die Virusreplikation in der Zellkultur gezeigt. Die Infektion mit PB1-F2 Knockout Viren führte jedoch zu einer verminderte Pathogenität in der Maus (Zamarin et al. 2006). Diese Studie zeigte, dass die Virentiter in den Lungen der infizierten Mäuse im Vergleich zum wt Virus anfangs gleich hoch waren, im weiteren Verlauf der Infektion jedoch schneller zurückgingen, bzw. die Viren schneller vom Immunsystem eliminiert wurden. Diese Beobachtung könnte auf eine Rolle des PB1-F2 Proteins als Pathogenitätsfaktor hinweisen. Zudem wurde auch berichtet, dass PB1-F2 eine

verstärkende Rolle auf die Zerstörung von alveolaren Makrophagen haben kann (Chen et al. 2001).

Dies führt zu der Hypothese, dass das Peptid indirekt zu einer erhöhten Pathogenität von Influenza Viren beiträgt, indem es durch gezielte Schwächung der Immunabwehr Sekundärinfektionen erleichtert (Coleman 2007). Dabei sollte beachtet werden, dass die Sekundärinfektionen bei einer Influenzaerkrankung für die meisten Todesfälle verantwortlich sind (Sethi 2002). Interessanterweise verfügten die pandemischen Influenzastämme von 1918, 1957 und 1968 alle über den PB1-F2 ORF (Zamarin et al. 2006).

Das PB1-F2 Protein konnte an Mitochondrien nachgewiesen werden, eine zytoplasmatische sowie nukleäre Lokalisierung wurde aber ebenfalls beobachtet (Chen et al. 2001; Gibbs et al. 2003). Das Protein besitzt eine "mitochondrial targeting sequence" (MTS) in der Nähe des C-Terminus, die ausreichend für mitochondriale Lokalisierung ist. Das Protein ist in der Lage *in vitro* den Verlust des inneren Mitochondrienmembran-Potentials herbeizuführen, was zum apoptotischen Zelltod führen kann (Gibbs et al. 2003; Yamada et al. 2004).

Biochemisch besitzt das Peptid verschiedene Phosphorylierungsstellen mit Konsensusmotiven für die Kinasen PKCα (Protein Kinase C) und CKII (Casein Kinase II) und kann multimere Spezies formen (Chen et al. 2001). Das Peptid verfügt über eine Interaktionsdomäne, die im Bereich des C-Terminus liegt und, einzeln exprimiert, mit dem Voll-Längenprotein interagieren kann. Interessanterweise wird in infizierten Zellen ebenfalls ein C-terminales ca. 57 kDa großes Peptid von einem alternativen Start-Codon in der PB1 Sequenz synthetisiert (Zamarin et al. 2006). Dabei ist es vollkommen unbekannt, ob dieses verkürzte Peptid eine biologische Funktion besitzt oder nur ein Zufallsprodukt ist.

Die Expression des Proteins in Zellen ist nicht ausreichend, um Apoptose auszulösen (Gibbs et al. 2003), vielmehr hat das Peptid einen verstärkenden Effekt auf den apoptotischen Zelltod in Verbindung mit zytotoxischen Stimuli (Zamarin et al. 2005). Eine Interaktion mit den mitochondrialen Membranproteinen des PTPC (permeability transition pore complex) VDAC1 (voltage dependent anion channel 1) und ANT3 (adenine nucleotide translocator 3) wurde gezeigt (Zamarin et al. 2005). Ein möglicher Mechanismus zum Auslösen der Apoptose durch PB1-F2 könnte eine direkte Interaktion mit dem PTPC oder direkte Permeabilisierung der Mitochondrienmembran durch PB1-F2 mit Hilfe von ANT3 und VDAC1 sein (Zamarin et al. 2005). Für die direkte Permeabilisierung von Membranen sprechen auch die Befunde einer anderen Studie, in der gezeigt wurde, dass PB1-F2 direkt und unspezifisch Poren in Lipid-Doppellayern verursachen kann (Chanturiya et al. 2004).

Gleichwohl ist das Protein bis heute unzureichend erforscht und seine eigentliche Funktion im Kontext der viralen Infektion unbekannt. Die nukleäre Lokalisierung lässt aber auch auf andere, möglicherweise genregulierende Funktionen des Proteins schließen. Eine weitere Eigenschaft des PB1-F2 Proteins liegt darin, dass es einem hohen Selektionsdruck zu unterliegen scheint (Obenauer et al. 2006), die Ursache ist jedoch nicht ausreichend geklärt und umstritten (Holmes et al. 2006).

### 1.5.2. Die Rolle von NF-KB und Interferonen in der Apoptose

Eine Influenza Virus-Infektion führt zur Aktivierung von IRF-3 und NF- $\kappa$ B sowie Expression von Interferonen, als antivirale Antwort der Zelle. Eine Studie berichtet, dass die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Interferone Zellen gegenüber Apoptoseinduktion über den FADD/Caspase-8 Weg empfindlich machen (Balachandran et al. 2000). FADD- (Fas-associated death domain) vermittelte Apoptose wird durch die PKR Kinase vermittelt, die ihrerseits durch dsRNA oder Virus aktiviert wird (Balachandran et al. 1998). Eine weitere Studie zeigte, dass mit dsRNA transfizierte Zellen, die mit Interferonen behandelt wurden, Apoptose durchlaufen, wohingegen eine Interferonbehandlung alleine keine Induktion von Apoptose zur Folge hatte (Tanaka et al. 1998).

Ein wichtiges Interferon-induziertes proapoptotisches Molekül ist das Transmembranprotein TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) aus der TNF-Liganden Familie. TRAIL wird in Thymocyten über Typ I Interferone und in Fibroblasten über Typ II Interferone induziert. TRAIL ist in der Lage selektiv Apoptose in virusinfizierten Zellen zu induzieren (Sedger et al. 1999).

TRAIL gehört neben Fas-Ligand (FasL) zu den so genannten Todesliganden, die die Rezeptor-vermittelte Apoptose (im Unterschied zur Mitochondrien- und ER-vermittelten Apoptose) durch Bindung an einen so genannten Todesrezeptor auslösen. Zu den Todesrezeptoren gehören TRAIL Rezeptor 1 und 2 sowie CD95/Fas. Die Bindung des Liganden induziert eine Trimerisierung des Rezeptors. Dies führt zur Interaktion der intrazellulären Rezeptordomäne mit dem zytoplasmatischen Protein FADD und dessen Oligomerisierung. Über eine sog. "death effector domain" werden die Initiatorcaspasen 8 und 10 rekrutiert, was zur Bildung eines Komplexes führt, den man als DISC (death inducing signalling complex) bezeichnet. Die DISC-Bildung ermöglicht die Aktivierung von Caspasen. Die Caspasen sind eine Gruppe von Zysteinylproteasen, welche für die Apoptose-Signalwege eine zentrale Rolle spielen. Man unterscheidet zwischen Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen. Zu der ersten Gruppe gehören Caspase-8 und -9, zu der zweiten -3, -6 und -

7. Initiatorcaspasen aktivieren andere Caspasen durch ihre Spaltung. Effektorcaspasen spalten bzw. aktivieren zelluläre Substratmoleküle (Cohen 1997; Thornberry und Lazebnik 1998). Caspasen werden in der Zelle konstitutiv exprimiert und liegen in inaktiver Pro-Form vor. Es sind bereits über hundert Substrat-Moleküle der Effektorcaspasen beschrieben (Enari et al. al. 2005). Dabei wurden als Substrate Strukturproteine, 1998; Launay et Zelladhäsionsmoleküle, Interfilamentproteine (wie Aktin, Gelsolin oder Lamin A), ICAD (inhibitor of caspase activated Dnase), apoptotische Inhibitoren (wie XIAP) und Enzyme der DNA-PKCS oder (Poly(ADP)-Ribose)Polymerase-1 DNA-Reparatur (z.B. (PARP) identifiziert. Die Caspasen-Aktivität leitet Signalwege ein, die letztlich zum Zelltod führen. Caspase 3, die eine zentrale Rolle in der Apoptose-Regulation spielt, kann über zwei Wege aktiviert werden. Zum einen über den mitochondrialen Weg unter Beteiligung von Caspase 9 und zum anderen über die Oberflächenprotein-vermittelte Aktivierung von Caspasen 8 und 10 (Ashkenazi und Dixit 1998).

NF-κB spielt eine wichtige antiapoptotische Rolle, es wurde aber auch berichtet, dass unter bestimmten Bedingungen, dieser Signalweg ebenfalls eine proapoptotische Funktion haben kann, z.B. durch die positive Regulierung von FasL und FasL-Rezeptor (Baichwal und Baeuerle 1997; Barkett und Gilmore 1999). Über eine NF-κB–abhängige Fas und FasL Expression wurde bereits mehrfach berichtet (Matsui et al. 1998; Chan et al. 1999; Hsu et al. 1999). Von mit Influenza Virus infizierten Zellen ist bekannt, dass sie Fas und FasL auf ihrer Oberfläche koexprimieren (Fujimoto et al. 1998). Von anderen Viren, wie dem Dengue-Virus wurde gezeigt, dass sie Apoptose in Hepatoma-Zellen NF-κB-abhängig induzieren (Marianneau et al. 1997).

## 1.5.3. Die Rolle der NF-KB abhängigen Apoptoseinduktion im

## Vermehrungszyklus des Influenza A Virus

Sehr früh wurde gezeigt, dass eine Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 die Influenza Virus-Vermehrung negativ beeinflusst und zur Missglykosylierung von Hämagglutinin führt (Hinshaw et al. 1994; Olsen et al. 1996). Untersuchungen mit NS1-Deletionsmutanten wiesen auf eine antiapoptotische Rolle dieses Proteins hin (Zhirnov et al. 2002). Die Funktion des NS1-Proteins als Interferon-Antagonist ist bereits untersucht worden (Garcia-Sastre 2001) und da die Typ I Interferone als Simulatoren der virusinduzierter Apoptose angenommen werden (Balachandran et al. 2000), liegt die Vermutung nahe, dass der NF-κB Signalweg eine wichtige proapoptotische Rolle im Vermehrungszyklus des Influenza Virus spielen könnte. Ein weiterer Hinweis ist, dass das Influenza A und B Nukleoprotein durch Caspasen intrazellulär gespalten wird. Das ungespaltene Nukleoprotein wird nicht in neu gebildete Virionen verpackt (Zhirnov und Bukrinskaya 1981; Zhirnov et al. 1999).

Die Induktionen des NF- $\kappa$ B Signalwegs durch das Influenza Virus, wie auch seine antivirale Rolle, durch die transkriptionelle Regulation von IFN $\beta$  (Maniatis et al. 1998; Taniguchi und Takaoka 2002) sowie antiapoptotische Funktion sind bereits genau untersucht worden.

Neuere Untersuchungen zeigten, dass der NF-KB Signalweg für die Replikation des Influenza Virus essentiell ist (Nimmerjahn et al. 2004; Wurzer et al. 2004). So wurde gezeigt, dass sich das Influenza Virus in Zellen, die eine dominant-negative Mutante von IKKβ oder eine nicht phosphorylierbare Mutante von IkBa überexprimierten, schlechter vermehren konnte als in wt Zellen. In Zellen mit aktiver Mutante von IKKβ konnte sich das Influenza Virus dagegen besser vermehren (Wurzer et al. 2004). In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression einer dominant-negativen Form von IKKβ bzw. einer nicht phosphorylierbaren Mutante von I $\kappa$ B $\alpha$  zu einer geringeren Apoptoserate nach Influenza-Infektion im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen sowie Zellen mit aktiver IKKβ-Mutante führte. Dies deutete darauf hin, dass im Kontext einer Influenza-Infektion der NF-kB Signalweg eher eine pro- als eine antivirale Rolle spielt und dabei eine proapoptotische Funktion hat. Ferner wurde eine Hochregulierung von Fas, FasL und TRAIL nach Influenza-Infektion beobachtet. Eine Inhibierung von TRAIL und Fas durch spezielle lösliche Rezeptoren führte in infizierten Zellen zu geringeren Virentitern (Wurzer et al. 2004). Diese Beobachtungen zeigen, dass die NF-kB-abhängige Transkription proapoptotischer Faktoren wie TRAIL und Fas eine wichtige Rolle im Replikationszyklus des Influenza Virus spielen.

Eine weitere Arbeit belegte eine wichtige Rolle von Caspase-3 für das Influenza Virus. In Zellen, die mit Caspase-3 Inhibitoren behandelt wurden, kann sich das Virus nur schlecht replizieren. Dabei führt die Caspase-3 Inhibierung zur Retention der RNP-Komplexe im Zellkern (Wurzer et al. 2003). Die Caspase-3 spielt eine Rolle für den Transport der RNP-Komplexe aus dem Zellkern. Im Gegensatz zu dem Raf/MEK/ERK-vermittelten Kerntransport (Pleschka et al. 2001; Ludwig et al. 2004) scheint es sich nicht um eine Beeinflussung des aktiven Kerntransports zu handeln, da eine Inhibierung des aktiven Kerntransports mit Leptomycin B keinen Einfluss auf den Caspasen-vermittelten RNP-Export zeigte (Wurzer et al. 2003). Ein weiterer Hinweis auf die Rolle von Caspase-3 für die Influenzavermehrung zeigt sich in MCF-7 Zellen. Diese Brustkrebs-Zell-Linie ist Caspase-3

defizient, was durch eine Deletion im *Casp3*-Gen verursacht wird (Janicke et al. 1998; Kurokawa et al. 1999). Influenza kann sich nachweislich in MCF-7 Zellen nur schlecht replizieren. Transfiziert man jedoch MCF-7 Zellen mit Caspase-3, so werden sie für Influenza wieder permissiver (Wurzer et al. 2003).

Es ist zu vermuten, dass die Caspase-3-vermittelte Spaltung der Kernporen den passiven RNP-Exports in späteren Phasen der Influenza-Infektion unterstützen kann, wenn sehr viele RNP-Komplexe im Zellkern gebildet wurden, und der aktive Transport diese Aufgabe nicht mehr ausreichend bewältigen kann. Es wurde bereits gezeigt, dass Nukleoporine, Proteine aus den Kernporen-Komplexen, nach Induktion der Apoptose gespalten werden. Dies wurde für die Nukleoporine Nup153, RanBP2, Nup214 und Tpr demonstriert (Ferrando-May et al. 2001). Des Weiteren wurden die Nukleoporine Nup93 und Nup96 als Zielmoleküle von Caspasen identifiziert (Patre et al. 2006). Mikroinjektions-Studien zeigten, dass der Zellkern für größere Moleküle nach Apoptoseinduktion permeabel wird (Ferrando-May et al. 2001), was auch für virale RNP-Komplexe eine Möglichkeit darstellen würde, aus dem Zellkern in das Zytoplasma zu gelangen.

## **1.6.** Antivirale Therapeutika gegen Influenza Virus-Infektionen

Die gängige Bekämpfung des Influenza Virus beschränkt sich im Wesentlichen auf zwei Strategien: Immunisierung oder Behandlung mit antiviralen Substanzen. Eine Immunisierung kann aufgrund der schnellen Mutationsrate des Influenza Virus nie einen vollständigen Schutz darstellen, da die Entwicklung des Impfstoffs eine gewisse Vorlaufszeit benötigt. Die Bekämpfung mit antiviralen Mitteln beschränkt sich bei Influenza zur Zeit auf lediglich zwei Stoff-Klassen: M2-Ionenkanalblocker und Neuraminidase-Hemmer (De Clercq 2004).

Als erste wirksame Anti-Influenza-Substanz wurde Amantadin (1-Adamantanamin Hydrochlorid, verwandte Substanz: Rimantadin) bekannt (Grunert et al. 1965). Amantadin wirkt bereits in sehr geringen Konzentrationen (>5 µM) antiviral und wurde als Inhibitor des M2-Proteins, hier spezifisch als Hemmstoff der Ionenkanalfunktion, identifiziert (Hay et al. verhindert folglich 1985). Amantadin die Ansäuerung der Endosomen durch Protonenaufnahme und somit die Membranfusion und Freisetzung der viralen RNA (Hay et al. 1986). Damit ist Amantadin aber auch gegen Influenza B ineffektiv, da diese Viren kein M2-Protein besitzen.

Amantadin muss bereits sehr früh nach Infektion mit Influenza Viren eingesetzt werden und hat viele Nebenwirkungen, wie Durchfall, Depressionen, epileptische Anfälle und periphere Ödeme. Daher ist die Behandlung mit Amantadin recht problematisch und wird heute kaum angewandt.

Als größtes Problem im Kampf gegen das Influenza Virus hat sich seine Anpassungsfähigkeit durch schnelle Mutationsrate herausgestellt. Sehr viele Influenza-Stämme sind gegen Amantadin bereits resistent (Hayden und Hay 1992). Austausch nur einer Aminosäure- im M2- Protein kann zur Amantadin-Resistenz führen (Fleming 2001). Auch viele der neuen H5N1-Stämme, die in Ostasien zirkulieren sind gegen Amantadin resistent (Cheung et al. 2006).

Um diese Problematik zu umgehen, wurden neuere antivirale Substanzen entwickelt, deren Molekularmechanismus die Hemmung der Neuraminidase darstellt (Gubareva et al. 2000; Dreitlein et al. 2001). Dazu gehören die kommerziellen Wirkstoffe Oseltamivir (Tamiflu, chemisch: Ethyl-(3R,4R,5S)-4-acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-cyclohex-1-en-1-carboxylat), dessen Ausgangsstoff ausschließlich aus dem echten Sternanis (*Illicium verum*) gewonnen wird, und Zanamivir (Relanza, chemisch: 5-acetamido-4-guanidino-6-(1,2,3-trihydroxypropyl)- 5,6-dihydro-4H-pyran-2-carboxylsäure). Doch bereits wenige Jahre nach der Markteinführung wurden die ersten Resistenzfälle bekannt. So berichtete eine Studie von H3N2-resistenten Stämmen in mit Oseltamivir behandelten Kindern (Kiso et al. 2004). Auch im Zuge der H5N1-Ausbrüche in Ostasien wurden erste Resistenzfälle gegen Oseltamivir bekannt (de Jong et al. 2005).

Diese Daten zeigen deutlich, dass eine Notwendigkeit besteht, eine Strategie gegen Influenza-Infektionen zu entwickeln, die nicht auf der Hemmung von viralen Strukturen basiert. Es zeichnet sich ab, dass jede Strategie, die das Virus selbst betrifft über kurz oder lang aufgrund der schnellen Mutationsrate und des "antigenic shift" vom Virus überwunden wird.

Neuere Erkenntnisse weisen auf eine neue Möglichkeit hin, die virale Vermehrung zu hemmen, indem man zelluläre Stoffwechselwege blockiert, die das Virus für die eigene Vermehrung "missbraucht". Mit dieser Strategie könnte verhindert werden, dass Influenza Viren Resistenzen entwickeln, da das Virus das Fehlen dieser zellulären Faktoren und Mechanismen nicht einfach durch Mutationen kompensieren kann.

## 1.7. Zielsetzung der Arbeit

Es ist bekannt, dass die Infektion mit Influenza Virus von Zellen *in vitro* (Hinshaw et al. 1994; Lehmann et al. 1996; Colamussi et al. 1999) wie auch von Gewebe *in vivo* in Mäusen (Mori et al. 1995; Technau-Ihling et al. 2001) zu apoptotischen Zelltod führt, der primär als Abwehrmechanismus gegen die Infektion zu verstehen ist. In letzter Zeit wurde aber gezeigt, dass das Influenza Virus diesen Mechanismus auch zur Unterstützung der eigenen Vermehrung adaptiert hat (Ludwig et al. 2006).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung verschiedener Aspekte des kontrollierten



Abbildung 4: Inhibierung des NF-κB Signalweges durch Acetylsalicylsäure

Die Inhibierung von NF- $\kappa$ B beruht auf der Bindung von Acetylsalicylsäure (Aspirin) an die IKK $\beta$  Kinase. Dadurch wird die Bindung von ATP verhindert und damit die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  durch die IKK $\beta$  Kinase. Die I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung ist ein Signal für den proteosomalen Abbau dieses Moleküls, das an den p50/p65 Dimer bindet und dessen Translokation in den Nukleus verhindert. Wird der Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  durch Aspirin verhindert, so wird der Signalweg gehemmt.

Zelltodes in Influenza Virusinfizierten Zellen. Speziell die Beteiligung des NF-κB-Signalweges im Hinblick auf eine antivirale Strategie und die Charakterisierung des als proapoptotisch beschriebenen Influenza Virus-Proteins PB1-F2 bilden den Kernpunkt dieser Arbeit.

Neuere Studien zeigten, dass virale Induktion von NF- $\kappa$ Babhängigen proapoptotischen Faktoren und eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges für die Replikation des Influenza Virus von essentieller Bedeutung sind (Nimmerjahn et al. 2004; Wurzer et al. 2004).

Es stellt sich daher die Frage, ob man durch gezielte Hemmung des NF-κB Signalweges die Vermehrung des Influenza Virus inhibieren kann. Eine Möglichkeit den NF- $\kappa$ B Signalweg zu Hemmen stellt die direkte Inhibierung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung dar, eine andere die indirekte, durch Hemmung der IKK-Kinasenaktivität. Dies lässt sich mit verschiedenen Substanzen erreichen, gleichwohl scheinen die Salicylate wie Acetylsalicylsäure, die unter dem Namen Aspirin bekannt ist, eine besonders interessante Möglichkeit für therapeutische Ansätze darzustellen. Zum einen ist Aspirin seit der Entdeckung durch Arthur Eichgrün 1897 als Medikament großflächig im Einsatz und zum anderen zeigte Aspirin nur wenige Nebenwirkungen.

Die inhibitorische Wirkung von Salicylaten auf die NF- $\kappa$ B Aktivität wurde bereits früh erkannt (Kopp und Ghosh 1994; Frantz und O'Neill 1995; Grilli et al. 1996). Weitere Studien ergaben, dass Aspirin bzw. andere Salicylat-Derivate *in vivo* wie auch *in vitro* spezifisch die Aktivität der IKK $\beta$ -Kinase hemmen, indem sie an diese Kinase binden und die Bindung von ATP verhindern (Yin et al. 1998). Auch über eine anti-Influenza Wirkung von Acetylsalicylsäure in Zellkultur wurde bereits berichtet, ohne dass ein Zusammenhang mit der NF- $\kappa$ B Hemmung erkannt wurde (Huang und Dietsch 1988). Dieser Ansatz wird in dieser Arbeit als möglicher Angriffspunkt für eine antivirale Strategie näher untersucht.

Das PB1-F2 Peptid, scheint an der Regulation der virusinduzierten Apoptose beteiligt zu sein. Das Protein wurde als Apoptose-verstärkender Faktor identifiziert, dessen Lokalisierung zytoplasmatisch bzw. mitochondrial ist (Chen et al. 2001). Gleichwohl wurde beobachtet, dass in einer bestimmten Zahl von Influenza Virus-infizierten Zellen das Protein auch im Nukleus lokalisiert ist. Weitere Untersuchungen zeigten, dass das Peptid alleine keine Induktion der Apoptose auslöst (Gibbs et al. 2003), sondern eher eine apoptoseverstärkende Eigenschaft besitzt (Zamarin et al. 2005). Diese Beobachtungen weisen auf eine andere Funktion des PB1-F2 Proteins.

Im Rahmen dieser Arbeit wird zu einem die Rolle die Rolle des NF-κB-Signalweges im Hinblick auf einen möglichen antiviralen Einsatz untersucht und zum anderen die Rolle des biologisch wenig charakterisierten Protein PB1-F2 im Replikationszyklus des Influenza Virus durchleuchtet.

## 2. Material und Methoden

## 2.1. Material

## 2.1.1. Chemikalien, Medien und Zellkulturzusätze

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Aceton	Roth (Karlsruhe)
Acetylsalicylsäure (Aspirin)	Sigma (St. Louis)
Acrylamid (30%), Bisacrylamid (0,8%)	Roth (Karlsruhe)
Adenosin-5'Triphosphat (ATP)	Sigma (St. Louis)
Agar (gereinigt)	Oxoid (Wesel)
Agarose	Difco (USA)/Gibco
Albumin (Protease frei)	Roth (Karlsruhe)
Amantadin	Sigma (St. Louis)
Ammoniumacetat	Sigma (St. Louis)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma (St. Louis)
Aprotinin	Roth (Karlsruhe)
Avicell microcrystaline cellulose	FMC BioPolymer (Brüssel/Belgien)
BAY 11-7085	Calbiochem (Bad Soden)
Benzamidinhydrochlorid Hydrat	Sigma (St. Louis)
BioRad Protein Assay-Stammlösung	BioRad (München)
Bovines Albumin 35%	MP Biomedicals
Bromphenolblau	Fluka (Buchs, Schweiz)
Coomassie-Brilliant Blue R-250	Fluka (Buchs, Schweiz)
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)	Sigma (St. Louis)
D-MEM (4500mg/l Glucose, GlutaMAX I)	Gibco/PAA (Paisley)
DEAE Dextran	Amersham (Little Chalfont)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma (St. Louis)
Dithiotreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
EDTA (Na-Ethylendiamintetraacetat)	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol, technisch (96 %)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
F12 (HAM's) (+GlutaMAX I)	Gibco (Paisley)
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco (Paisley)
D(+)-Glucose	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Leupeptin	Serva (Heidelberg)
Lipofectamin 2000	Gibco (Paisley)

Produkt	Hersteller
Lithiumacetat	Roth (Karlsruhe)
D-Luciferin	Applichem (Darmstadt)
Luminol	Roth (Karlsruhe)
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth (Karlsruhe)
MEM (+GlutaMAX I)	Gibco (Paisley)
MEM 10x (-L-Glutamin, -NaHCO <sub>3</sub> )	Gibco (Paisley)
Methanol	Fluka (Buchs, Schweiz)
MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5- diphenytetrazoliumbromid))	Sigma (St. Louis)
Natrium Bicarbonat	Gibco (Paisley)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumorthovanadat	Sigma (St. Louis)
Neutralrot	Sigma (St. Louis)
OptiMEM I	Gibco (Paisley)
PBS 1x	PAA/Gibco (Linz/Paisley)
Pefablock	Roth (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	PAA/Gibco (Linz/Paisley)
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)	Sigma (St. Louis)
p-Coumarsäure	Sigma (St. Louis)
Polyethylen Glycol (PEG)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Protein Ladder (PageRuler)	Fermentas (Litauen)
Protein A- / Protein G-Agarose	Roche
RPMI 1640	Gibco (Paisley)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
SDS (Sodium Dodecylsulfat)	Applichem (Darmstadt)
Tris	Roth (Karlsruhe)
TritonX 100	Roth (Karlsruhe)
Trypanblau	Gibco (Paisley)
Trypsin-EDTA 0,5%	PAA/Gibco (Linz/Paisley)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
Tumor Necrosis Factor $\alpha$ (TNF $\alpha$ ), rekombinant	Sigma (St. Louis)
Wasserstoffperoxid 30%	Merck (Darmstadt)
X-Gal	Serva (Heidelberg)

## 2.1.2. Antikörper

Antikörper/Antiserum	Referenz/Herkunft
Alexa Fluor 488 chicken anti-mouse IgG	Invitrogen / Molecular Probes (Paisley/UK)
Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit IgG	Invitrogen / Molecular Probes (Paisley/UK)
Alexa Fluor 594 chicken anti-goat IgG	Invitrogen / Molecular Probes (Paisley/UK)
Alexa Fluor 594 chicken anti-mouse IgG	Invitrogen / Molecular Probes (Paisley/UK)
Alexa Fluor 594 chicken anti-rabbit IgG	Invitrogen / Molecular Probes (Paisley/UK)
Caspase-3	R&D Systems (Wiesbaden)

Antikörper/Antiserum	Referenz/Herkunft
Cleaved Caspase-3	Cell Signalling (Frankfurt a.M.)
Donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz (Heidelberg)
Donkey anti-rabbit IgG-HRP	Amersham (Little Chalfont)
ERK 2 (C-14)	Santa Cruz (Heidelberg)
ΙκΒα (C-21)	Santa Cruz (Heidelberg)
Influenza A M	Serotec (Düsseldorf)
Influenza A NP 150	Webster R. (Memphis/USA)
Influenza A NP	Serotec (Düsseldorf)
Influenza A PB1	Santa Cruz (Heidelberg)
Influenza A PB1 rabbit	Garcia-Sastre A. (New York/USA)
Influenza A PA	Ortin J. (Madrid/Spanien)
Influenza A/PR8/34 PB1-F	Schubert U. (Erlangen)
JNK1 (C-17)	Santa Cruz (Heidelberg)
_p65 (C-20)	Santa Cruz (Heidelberg)
p38 (N-20)	Santa Cruz (Heidelberg)
PARP	BD Transduction Laboratories (Heidelberg)
Phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signalling (Frankfurt a.M.)
Phospho-JNK (Thr183/Tyr185)	BD Transduction Laboratories (Heidelberg)
Phospho-P38 (Thr180/Tyr182)	Cell Signalling (Frankfurt a.M.)
Sheep anti-mouse IgG-HRP	Amersham (Little Chalfont)

## 2.1.3. Plasmide

Plasmid	Herkunft
pcDNA3	Invitrogen (Karlsruhe), siehe Anhang Abbildung 45.
pSR-GFP/Neo	pSUPER RNAi System, Oligoengine (Seattle)
pSR-GFP/Neo p65/3	Institut für Molekulare Medizin (Düsseldorf)
IFNβ luc	Hiscott, J. (Montreal), (Leblanc et al. 1990)
4xIRF-3 luc	(Ehrhardt et al. 2004), basierend auf pTATA LUC (Altschmied und Duschl 1997), siehe auch Anhang Abbildung 45
pACT2	Clontech Matchmaker Two-Hybrid System 2, siehe Abbildung 6
pACT2 PB1-F2	L.Wixler (Münster)
pACT2 PB1 (ΔPB1-F2)	L.Wixler (Münster)
pAS2-1	Clontech Matchmaker Two-Hybrid System 2, siehe Abbildung 6
pAS2-1 PB1	L.Wixler (Münster)
pAS2-1 PB1 (ΔPB1-F2)	L.Wixler (Münster)
pAS2-1 PB1-F2	L.Wixler (Münster)
pHMG NP	Pleschka, S. (Giessen), (Pleschka et al. 1996)
pHMG PB1	Pleschka, S. (Giessen), (Pleschka et al. 1996)
pHMG PB2	Pleschka, S. (Giessen), (Pleschka et al. 1996)
pHMG PA	Pleschka, S. (Giessen), (Pleschka et al. 1996)
pHW2000 PB1	(Hoffmann et al. 2000)
pHW2000 PB1 F2C	Anhlan Darisuren (Münster)
рНW2000 PB1 2хΔF2	Anhlan Darisuren (Münster)
pHW2000 PB2	(Hoffmann et al. 2000)
pHW2000 PA	(Hoffmann et al. 2000)
pHW2000 NP	(Hoffmann et al. 2000)
pB12 CMV/PB1-F2	Schubert, U. (Erlangen), siehe Anhang Abbildung 45.

## 2.1.4. Sonstige Materialien

Material	Firma
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Nitrocellulose	Schleicher & Schuell (Dassel)
Röntgenfilme	Amersham / Agfa
Whatman GB 002 Papier	Schleicher & Schuell (Dassel)

## 2.2. Stämme und Anzucht

## 2.2.1. Viren

Stamm	Herkunft
Aviäres Influenza A Virusisolat A/Bratislava/79(H7N7) (FPV)	Pleschka S. (Giessen)
Humanes Influenza A Virusisolat A/Puerto-Rico/8/34 (H1N1) (PR8)	Wolff T. (Berlin)
Rekombinantes Humanes Influenza A Virusisolat A/Puerto-Rico/8/34 (PR8) F2C (PB1-F2 ATG <sub>95</sub> →ACG)	Anhlan Darisuren (Münster)
Rekombinantes Humanes Influenza A Virusisolat A/Puerto-Rico/8/34 (PR8) F2C (PB1-F2 ATG <sub>95</sub> →ACG, TCA <sub>128</sub> →TGA)	Anhlan Darisuren (Münster)
	$(\mathbf{D}_{1}, \mathbf{d}_{2}, d$

Humanes Influenza A Virusisolat A/Thailand/1(KAN-1)/2004 (H5N1) (Puthavathana et al. 2005)

### 2.2.1.1. Anzucht von Influenza-Viren

Humanpathogene Influenza Viren, wie PR8 wurden in bebrüteten Hühnereiern vermehrt. Dazu wurden befruchtete Hühnereier bei 37°C und 70% Luftfeuchtigkeit im Brutkasten 10 Tage inkubiert. Am 11 Tag wurden die Eier unter möglichst sterilen Bedingungen mit Influenza angeimpft. Die Kalkschale wurde mit einer sterilen Kanüle direkt über der Luftkammer durchbrochen und die Viruslösung (1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,2% Bovines Albumin mit 1x10<sup>-4</sup> bis 1x10<sup>-5</sup> Plaque Forming Units Virus) in die Allantoishöhle injiziert. Dabei musste beachtet werden, dass die Embryonen nicht verletzt werden. Die Eier wurden daher zuvor durchleuchtet und die Lage der Luftkammer und des Embryos eingezeichnet. Das Loch in der Kalkschale wurde zuletzt mit Holzleim versiegelt und die infizierten Eier für weitere 50 im Brutkasten Stunden inkubiert. Vor der Virusernte wurden die Embryonen durch Inkubation für 1,5 bis 2 h bei - 20°C abgetötet, die Schalen aufgebrochen, die virushaltige Allantoisflüssigkeit abgesaugt und bei -70°C eingefroren. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte mittels Plaque-Assay auf MDCK-Zellen.

Der aviäre Influenza A Virus-Stamm FPV wurde auf MDCK-Zellen vermehrt. Dazu wurde eine konfluente 175cm<sup>3</sup> Flasche Zellen mit 15ml Infektionsmedium (MEM, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,2% Bovines Albumin)

überschichtet. Dazu wurden  $1 \times 10^{-4}$  bis  $1 \times 10^{-5}$  "plaque forming units" (pfu) des Virus zupipetiert und für 24h inkubiert. Nach 24h wurde der virushaltige Mediumüberstand abgenommen, die toten Zellen abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde bei -70°C eingefroren. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte ebenfalls mittels Plaque-Assay auf MDCK-Zellen.

#### 2.2.1.2. Virusinfektionen von Zellen

Vor einer Infektion wurden alle Zellen mit 1xPBS gewaschen, um Serum sowie Zelltrümmer zu entfernen. Die gewünschte Virus-Lösung wurde in PBS (mit 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,2% Bovines Albumin) aufgenommen bzw. verdünnt. Die Zellen wurden mit 0,5 bis 1ml Infektionslösung (1xPBS supplementiert durch 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,2% Bovines Albumin) überschichtet und für 30 min bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank infiziert. Nach dieser Absorbtionsphase wurde die Infektionslösung entfernt und durch serumfreies Medium (jeweiliges Zellmedium supplementiert mit 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml CaCl<sub>2</sub>, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/mL CaCl<sub>2</sub>, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/mL CaCl<sub>2</sub>, 100 Units/ml Penicillin, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 Units/ml Penicillin, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 Units/ml Penicillin, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin und 0,2% Bovines Albumin) ersetzt. Danach wurden die infizierten Zellen, je nach Verwendungszweck, weiter behandelt.

#### 2.2.1.3. Bestimmung von Virustitern mittels Plaque-Assay

Die Anzahl der infektiösen Virenpartikel wurde mittels eines sog. Plaque-Assays auf MDCK-Zellen bestimmt. Dazu wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Virusüberstände erstellt. Die Viruslösungen für die Verdünnungsreihe wurden in PBS (mit 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,2% Bovines Albumin) verdünnt. Die MDCK Zellen wurden in 6-Well Näpfen mit 500 µl der jeweiligen Virusverdünnung 30 min lang bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Viruslösung entfernt und mit einem Medium-Agar Gemisch (Zusammensetzung: 1% Dextran, 3 ml BA, 85 ml ddH<sub>2</sub>O, 250ml 2xMEM, dazu wurden 15 ml 46°C warmen Oxoid-Agar auf 35 ml Medium zugegeben) überschichtet. Humane Influenza-Stämme benötigen außerdem Zugabe vom Trypsin (0,025% v/v), da das Hämagglutinin humanpathogener Influenza Viren tryptisch gespalten werden muss.

Die Zellen wurden im Brutschrank für weitere 2-3 Tage, je nach Virus-Stamm inkubiert, bis zur sichtbaren Bildung von Plaques. Zuletzt wurden die Plaques mit Neutralrot (in PBS gelöst) oder Coomassie-Blau (0,1% Coomassie-Brilliant-Blue G-250 in 40% Methanol, 10% Essigsäure) angefärbt und ausgezählt.

### 2.2.1.4. Herstellung rekombinanter Influenza Viren

Um Mutationen im Influenzagenom zu generieren, wurde das rekombinante System für das Influenza Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) nach Hoffmann (Hoffmann et al. 2000; Hoffmann und Webster 2000) verwendet. Dazu wurden acht Plasmide benutzt, in die die cDNA aller viralen Gensegmente zwischen die RNA-Polymerase I (pol I) Promotor- und Terminator-Sequenzen hineinkloniert wurde. Diese pol I Abschnitte sind dabei ihrerseits von RNA Polymerase II (pol II) Promotor- und Polyadenylation-Sequenzen flankiert. Diese Anordnung ermöglicht, ausgehend von der gleichen cDNA, die Transkription der viralen (-) RNA, wie auch der mRNA zur Proteinsynthese (siehe auch Anhang, Abbildung 43).

Die acht Plasmide (je 1 µg) wurden gleichzeitig in ein Gemisch aus MDCK II und HEK293-Zellen (im Verhältnis 1:3, 75-90% konfluent, kultiviert in 6 cm-Platten auf Opti-MEM Medium ohne Zusätze) transfiziert (siehe 2.2.2.4). 16-24 h nach Transfektion wurde das Transfektionmedium gegen neues Opti-MEM ausgetauscht. Nach weiteren 24 h wurde der Mediumüberstand abgenommen. Mit 1 ml des Überstands wurden neue MDCK-Zellen infiziert (6 cm Schale, siehe 2.2.1.2) und mit 3 ml Opti-MEM überschichtet. Danach wurden die Zellen solange inkubiert, bis der cytopatische Effekt des Virus auf die Zellen deutlich sichtbar wurde (ca. 3-4 Tage). Der Überstand wurde gesammelt, die Virustiter mittels Plaque-Assay bestimmt und für Experimente eingesetzt, oder in embrionierten Hühnereiern weiter vermehrt. Die Virusüberstände wurden bei -70°C gelagert.

Zell-Linie	Beschreibung
A549	Human, epithelial, Lungenkarzinom
HeLa	Human, epithelial, Cervix Karzinom, entnommen 1951
	Human, embryonales Nierenepithelgewebe, immortalisiert mit Adenovirus 5
HEK293	DNA
MCF-7	Human, epithelial, Brust-Adenokarzinom, entnommen 1970
MDCK	Madin Darby Canine Kidney", Cockerspaniel, Nierenkarzinom, entnommen
	1958

## 2.2.2. Eukaryotische Zell-Linien

### 2.2.2.1. Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden unter der Sicherheitsbank TypII mit laminarem Luftstrom (BDK) mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, sterilen Kunststoffmaterialien oder

autoklavierten Glaswaren und unter Verwendung steriler Nährmedien durchgeführt. Alle Zell-Linien wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit gehalten in HERACell 240 Brutschränken von Heraeus gehalten.

### 2.2.2.2. Kultivierung adhärenter Zell-Linien

HEK293, A549 und HeLa Zellen wurden in D-MEM, supplementiert mit 10% FCS und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, kultiviert. MDCK Zellen wurden in 1x MEM supplementiert mit 10% FCS, und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen bei einem Konfluenzgrad von 70-90% einmal mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin/EDTA von der Kulturflasche bzw. Schale gelöst. Die abgelösten Zellen wurden im frischen Kulturmedium aufgenommen und in gewünschter Verdünnung wieder ausgesät.

### 2.2.2.3. Einfrieren und Lagerung eukaryotischer Zell-Linien

Alle Zell-Linien wurden für Langzeit-Lagerung in einer DMSO-Lösung im flüssigen Stickstoff eingefroren. Das Einfriermedium bestand aus 10% DMSO, 20% FCS und dem jeweiligen Kulturmedium.

#### 2.2.2.4. Transiente Transfektion mit Lipofectamin 2000

Um möglichst hohe Transfektionseffzienz zu erreichen, wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 von Invitrogen eingesetzt. Die Transfektion erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Die Transfektionseffizienz wurde meist unter Zuhilfenahme eines Vektors, der das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodiert, im FACS (Becton FACScalibur) bzw. Fluoreszenz-Mikroskop bestimmt.

### 2.2.2.5. Nicoletti-Assay

Eine Methode zur Bestimmung der Apoptoserate ist der DNA-Fragmentierungsassays nach Nicoletti (Nicoletti et al. 1991). Zellen in einem späteren Apoptosestadium sind durch die charakteristische Fragmentierung der DNA gekennzeichnet, da die DNA durch spezifische Nukleasen verdaut wird, die durch Caspase-3 aktiviert werden. Der Nicoletti Assay beruht auf der Färbung des diploiden Kerns (DNA Gehalt 2n) mit Propidiumiodid (PI). Propidiumiodid ist eine fluorochrome Substanz, welche zwischen die DNA-Stränge interkaliert. PI absorbiert Licht bei einem Maximum von 488 nm and emittiert Licht bei 620 nm. Fragmentierte DNA DNA Gehalt <2n gekennzeichnet. Die Messung der Fluoreszenz im FACS ermöglicht eine Zellzyklusanalyse, da die Fluoreszenzintensität dem relativen DNA Gehalt direkt proportional



Abbildung 5: Zellzyklusprofil von MDCK-Zellen im DNA-Fragmentierungs-Assay

Das FACS-Profil stellt den DNA-Gehalt anhand der Fluoreszenzintensität. Die DNA-Menge in einer wachsenden Zellpopulation ist unterschiedlich. - sie ist von der Zellzyklusphase abhängig. Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase sind diploid (2n), Der diploide wurden die Zellen 1x mit PBS Chromosomensatz wird während der S-Phase verdoppelt. In der Chromosomensatz G<sub>2</sub>/M-Phase ist der tetraploid Apoptotische Zellen zeichnen sich dagegen durch einen DNA-Gehalt, der kleiner als 2n ist. Dies bezeichnet man als  $Sub-G_1$ - Puffer resuspendiert. Die Zellen Region.Fluoreszenz Propidiumiodid-Färbung.

ist.

Die Färbung der Zellen  $(1 \times 10^6)$ Zellen / ml) erfolgte nach der gewünschten Stimulationsdauer mit Virus bzw. dem starken Apoptose-Induktor Staurosporin (positive Kontrolle) in dem hypotonem Nicoletti-Puffer (50 µg/ml PI, 0,1% Natrium-Citrat, 0,1% Triton X-100). wurden die Dazu Zellen trypsinisiert, in FACS-Röhrchen überführt und 5 min bei 500 g und RT abzentrifugiert. Anschließend (4n). gewaschen und in 250 µl Nicolettiwurden im Nicoletti-Puffer für 4h

bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die FACS-Analyse (Becton Dickinson FACSCalibur, Software: Cell Quest pro) durchgeführt. Gemessen wurde im Fluoreszenzkanal FL-2H (585 nm).

#### 2.2.2.6. Propidiumiodid-Färbung

Anders als bei Nicoletti-Assay wird mit Hilfe der Propidiumiodid-Färbung nur der Anteil an toten oder geschädigten Zellen in einer Zellpopulation bestimmt. Im Gegensatz zum soeben beschriebenen Nicoletti-Puffer, der das Detergenz Triton X-100 enthält, welches spezifisch die zytoplasmatische Membran von Zellen lysiert, kann bei der einfachen Färbung ohne Detergenz PI nur in die DNA von Zellen interkalieren, deren Zellmembran bereits geschädigt ist. Mit Hilfe dieser Methode wurde die allgemeine Viabilität von Zellen nach Behandlung z.B. mit Acetylsalicylsäure bestimmt.

Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, 1x mit PBS gewaschen und in einer PI-Lösung resuspendiert (50 µg/ml PI in PBS). Die Messung erfolgte, wie bereits beschrieben (2.2.2.5).
#### 2.2.2.7. MTT-Assay

Mittels MTT-Assay (Mosmann 1983; Alley et al. 1988) kann man die Proliferationsrate und damit die Viabilität von Zellen ermitteln. Lebende Zellen können das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenytetrazoliumbromid)) aufnehmen und mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen, welche nur in prolieferierenden Zellen aktiv sind, zu einem stark blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff umsetzen. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen.

Dazu wurden die Zellen in einer 96-Well Platte ausgesät  $(2,5x10^4$  Zellen je Well) und mit dem zu untersuchenden Inhibitor behandelt. Nach gewünschter Inkubationszeit wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und 50µl (5 mg/ml) MTT je Well wurde zugegeben. Es folgte eine 2-4 h Inkubationszeit bei 37°C. Die Umsetzung wurde danach photometrisch bei 570 nm gemessen.

#### 2.2.2.8. Immunfluoreszenz

Zur Untersuchung der Verteilung viraler Proteine in infizierten Zellen wurden MDCK oder A549 Zellen in 24-Well Platten auf Glas-Trägern ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen, wie bereits unter 2.2.1.2 beschrieben, infiziert. Nach der erforderlichen Infektionsdauer wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 3,7% Paraformaldehyd für mindestens 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen unter Schwenken zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte durch Waschen mit -20°C kaltem Aceton für 5-6 min in einer ansteigenden Konzentrationsreihe (20%, 60%, 100% Aceton). Im Anschluss an die Permeabilisierung wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS für 5 min gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 30 min Inkubation mit einer 1% BA-Lösung bei 37°C blockiert und danach wieder zweimal für 5 min in PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit primären Antikörpern bzw. Antisera für mindestens 30 min bei 37°C. Die gewünschten primären Antikörper wurden stets 1:400 in PBS gelöst eingesetzt. Nach der Inkubation mit dem Erst-Antikörper wurden die Zellen zweimal für 5 min in PBS gewaschen und mit entsprechenden Zweit-Antikörpern (stets 1:300 in PBS gelöst) für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschritten (in PBS) wurden die Zellen mit VectaShield Mounting-Medium (mit DAPI) eingedeckt und mit farblosem Nagellack versiegelt. Die Auswertung erfolgte am Zeiss Axiovert 200 M Fluoreszenzmikroskop mit ApoTome Schiebersystem (ermöglicht die Verbesserung des Signal zu Rausch Verhältnis und damit die Verbesserung der Detailauflösung). Die Bilder wurden mit der Software AxioVision Rel. 4.3 erfasst und bearbeitet.

#### 2.2.3. E.coli Stamm

Stamm	Genotyp
DH5a	F <sup>-</sup> endA1 hsdR17 ( $r_k$ , $m_k$ ) supE44 thi-1 λ <sup>-</sup> recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)-U196 $\phi$ 80dlacZΔM15

#### 2.2.3.1. Medien für Escherichia coli

LB – Medium:	10 g Bacto Trypton
	5 g Hefe Extrakt
	5 g NaCl
	13,5 g Agar (bei Platten)
	auf 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen, lösen und autoklavieren.

**LB** + **Amp**: Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 50 μg/ml).

#### 2.2.3.2. Anzucht von Escherichia coli

*E. coli* wurde in LB-Medium in aeroben Schüttel-Kulturen bei 37°C kultiviert. Plasmid-Transformanten wurden in einem Medium mit 50 µg/ml Ampicillin selektioniert.

#### 2.2.4. Saccharomyces cerevisiae -Stamm

Stammname	Genotyp	Reportergene
Y190	<i>MAT</i> a ura3-52, his3.200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, cyh <sup>r</sup> 2, LYS2::GAL1 <sub>UAS</sub> -HIS3 <sub>TATA</sub> -HIS3, URA3::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -lacZ	HIS3, lacZ

#### 2.2.4.1. Medien für Saccharomyces cerevisiae

YPD	10 g Hefe Extrakt 20 g Casein Hydrolysat (Pepton) 18 g Gibco Agar (bei Platten) auf 900 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen, lösen und autoklavieren.
SD Minimalmedium:	<ul> <li>20 g Glukose</li> <li>15 g BiTek Agar (bei Platten)</li> <li>6,7 g Yeast Nitrogen Base (YNB) auf 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, pH-Wert auf 5,8 mit 1M NaOH einstellen, lösen und autoklavieren.</li> </ul>

#### 10xAminosäuren-Mix:

Das Aminosäurengemisch ist die Kombination der folgenden Aminosäuren und wird zum SD-Medium zugegeben (1:10), ggf. ohne Aminosäuren, die zum Selektionieren gewählt wurden.

L-Isoleucin	300 mg/l	L-Methionin	200 mg/l
L-Valin	1500 mg/l	L-Phenylalanin	500 mg/l
L-Adenin	200 mg/l	L-Threonin	2000 mg/l
L-Arginin	200 mg/l	L-Tryptophan	200 mg/l
L-Histidin	200 mg/l	L-Tyrosin	300 mg/l
L-Leucin	1000 mg/l	L-Uracil	200 mg/l
L-Lysin	300 mg/l		

#### 2.2.4.2. Anzucht von S. cerevisiae

*S. cerevisiae* Stämme wurden in aeroben Schüttelkulturen in YPD bei 30°C kultiviert. Transformierte Zellen wurden auf entsprechenden SD-Mangelmedien kultiviert.

#### 2.2.4.3. Transformation von S. cerevisiae

Um Plasmide und Integrationskassetten in die Hefe zu transformieren, wurde eine hocheffiziente LiAc/Einzelstrang-DNA/PEG-Methode angewendet (Gietz et al. 1995).

- Eine 5 ml YPD Übernacht-Vorkultur wird bei 30°C inkubiert
- Pro Ansatz: 1 ml der Hefe-Kultur wird 5 min bei 3500 U/min und RT pelletiert. Der Überstand wird bis auf 50-100 µl verworfen und in dem Restvolumen resuspendiert.
- Zu den Zellen werden 2 µl Carrier-DNA (10 mg/ml Stocklösung) zugegeben und gemischt.
- 1 μg Plasmid-DNA wird zugegeben und der Ansatz gemischt (Vortex-Schüttler)
- Pro Transformationsansatz werden 0,5 ml des Transformations-Mixes zugegeben und gut gemischt (Vortex-Schüttler).
  - Transformations-Mix:
  - 90 ml PEG (45% w/v)
  - 10 ml 1M LiAc

1 ml 1M Tris-Cl (pH 7,5)

- Pro Ansatz werden zusätzlich 20 μl 1 M DTT zugegeben und gevortext.
- Die Ansätze werden 6-8 h bei RT inkubiert.
- Anschließend erfolgt ein Hitzeschock: 10-30 min bei 42°C (im Heizblock).
- 50-100 µl wurden direkt aus den abgesetzten Zellen entnommen, direkt auf Selektiv-Medien ausgestrichen und bei 30°C inkubiert

### 2.2.5. Molekularbiologische Methoden - DNA

#### 2.2.5.1. Gelelektrophorese und Geldokumentation

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen wurde Agarose der Firma Cambrex (SeaKem) benutzt. Je nach Trennbereich kamen Gele zwischen 0,7 und 1,5% zum Einsatz. 1x TBE wurde als Laufpuffer verwendet. Zum Markieren und Beschweren der Proben wurde Blaumarker hinzugefügt. Die Elektrophorese wurde bei 60-110 V in horizontaler Anordnung durchgeführt.

Die Färbung der Gele erfolgte mit Hilfe von 5µl Ethidiumbromid (EtBr) bei 50 ml Gelen, das nach dem Aufkochen der Agarose in 1x TBE zugegeben wurde. EtBr ist eine Chemikalie, die in die DNA Doppelstränge interkaliert. Bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm fluoresziert EtBr. Die DNA Moleküle sind dadurch im Gel als distinkte Banden sichtbar.

Zur Dokumentation wurde ein Photodokumentationsgerät der Firma Decon ScienceTec verwendet.

<u>10x TB Puffer:</u>	<u>1x TBE Puffer:</u>
890 mM Borsäure (550 g)	1000 ml 10x TB
890 mM Tris-HCL (1050 g)	40 ml 0,5 M EDTA
Auf 10 l mit dH <sub>2</sub> O auffüllen	Auf 10 l mit dH <sub>2</sub> O auffüllen

#### 2.2.5.2.Restriktionsenzymanalyse von Plasmid-DNA

Für die DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen wurden Enzyme von Fermentas mit den, von der Firma dafür vorgesehenen, Reaktionspuffern eingesetzt. Für eine Standardreaktion wurden ca. 3U Enzym pro 1 µg DNA eingesetzt und der Ansatz für 1h bei 37°C (mit Ausnahme von Enzymen, die bei 30°C arbeiten) inkubiert.

Zur Überprüfung der Spaltung wird der Ansatz mit Blaumarker versetzt und auf ein Agarosegel geladen.

#### 2.2.5.3.Transformation von Plasmid-DNA (E.coli)

50  $\mu$ l kompetente *E.coli* Zellen DH5 $\alpha$  wurden mit 1  $\mu$ g DNA auf Eis gemischt. Der Ansatz wurde 1 min bei 42°C inkubiert (Hitzeschock). Danach wurden sofort 600  $\mu$ l LB-Medium (ohne Antibiotika) zugegeben und anschließend 100  $\mu$ l des Ansatzes auf LB+Amp-Medien ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 2.2.5.4.Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

Um größere Mengen möglichst reiner Plasmid-DNA für z.B. Transfektionen zu gewinnen wurde ein Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen eingesetzt. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach der Anleitung der Firma Qiagen.

#### 2.2.6. Molekularbiologische Methoden - Proteine

#### 2.2.6.1. Luciferase-Assay

Um die Expression von Genen zu quantifizieren, wurde ein sog. Reportergen-Assay durchgeführt. Als Reporter wurde das Luciferase-Gen aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* verwendet. Dazu wurden Konstrukte (pTATA LUC (Altschmied und Duschl 1997)) verwendet, in die die Transkriptionsfaktor-Bindestellen des zu untersuchendes Gens (oft mehrfach hintereinander geschaltet) vor die Sequenz des Reportergens (mit Thymidin Kinase Minimalpromotor-Sequenz) hineinkloniert wurden. Findet eine Transkription des Luciferase-Gens statt, so kann man dies photometrisch detektieren. Das Enzym Luciferase spaltet das Substrat Luciferin unter Lumineszenzabgabe, was in einem Luminometer (verwendet wurde MicroLuminat Plus LB 96V von Berthold Technologies) quantifiziert werden kann. Dabei ist die erzeugte Lumineszenz direkt proportional zur Luciferase-Enzymaktivität. Um den Luciferase-Assay durchzuführen wurden die gewählten Zellen mit dem Promotor-Luciferase-Konstrukt am Vortag transfiziert. 16 bis 24h nach der Transfektion wurden die Zellen entsprechend dem Ziel des Experiments infiziert bzw. stimuliert.

Assay Puffer:
125 mM Na-MES pH 7,8
125 mM Tris-HCl pH 7,8
25 mM MgAcetat
2 mg/ml ATP

Nach gewünschter Zeitspanne wurden die Zellen 1x mit kaltem PBS gewaschen und 30 min bei 4°C im Harvesting Puffer lysiert. (das darin enthaltene Detergenz Triton-X bindet an die Proteine der Zellmembranen und bricht diese auf). Die Zell-Lysate wurden in 1,5 ml ERGs überführt und die Zelltrümmer 5 min bei 13000 g und 4°C sedimentiert. Je 50 µl des Lysats zusammen mit 50 µl Assay-Puffer wurden für die Luciferase-Aktivitätsmessung in eine 96-Well Platte überführt. Bei der Messung wurde zu dem Gemisch automatisch 50 µl Luciferin-Lösung (1mM Luciferin, 5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,8) je Well zugegeben. Die gemessene Lumineszenz ist in "relative light units" (RLU) angegeben. Die Proteinkonzentration aller Proben wurde mittels BioRad Proteinassay ermittelt und die Luziferase-Enzymaktivität in RLU auf den Proteingehalt aufeinander angeglichen.

#### 2.2.6.2. Herstellung von Proteinextrakten und Bestimmung der Proteinkonzentration

Zellen für Western-Blot Analyse bzw. Immunpräzipitation wurden stets ein- bis zweimal mit kaltem PBS gewaschen und 30 min bis 1 h bei 4°C im "Triton Lysis Buffer" (TLB, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 137 mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 50 mM Natrium-Glycerolphosphat, 20 mM Natrium-Pyrophosphat, 5µg/ml Aprotinin, 5µg/ml Leupeptin, 1mM Natrium-Vanadat, 5 mM Benzamidin) lysiert.

Anschließend wurden die Lysate in 1,5 ml ERGs überführt und die Zelltrümmer 15–30 min bei 4°C und 13000 g sedimentiert. Die Überstände wurden in neue ERGs überführt und je nach Bedarf bei -70°C gelagert oder weiter verarbeitet.

Für die Lyse von membrangebundenen Proteinen wurde der RIPA-Lysepuffer verwendet (25 mM Tris pH 8, 137 mM NaCl, 10% Glycerol, 0,1% SDS, 0,5% NaDOC, 1% IgePal, 2 mM EDTA pH8).

Die Proteinkonzentration wurde mittels BioRad-Proteinassays ermittelt. Dabei wurden keine absoluten Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt, sondern die optische Dichte bei 595 nm gemessen und die Probenvolumina in Relation zueinander eingesetzt.

Der BioRad Proteinassay basiert darauf, dass das Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie Brilliant Blau Lösung von 465 nm (rotbraun) eine Verschiebung nach Bindung an ein Protein nach 595 nm (blau) zeigt. Dabei ist die Absorptionsamplitude bei 595 nm der Proteinmenge proportional.

#### 2.2.6.3. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation oder Coimmunpräzipitation ist eine Methode um Protein-Protein Wechselwirkungen *in vitro* nachzuweisen. Dabei wird mit Hilfe eines Antikörpers ein bestimmtes Protein zusammen mit seinem Interaktionspartner aus dem Zell-Lysat präzipitiert. Dabei ist der Antikörper an Protein A- oder Protein G-beschichtete Kügelchen (engl. Beads) gebunden. Protein A bzw. G ist ein Zellwand-Bestandteil bestimmter Streptokokken-Stämme und bindet spezifisch an die Fc-Region vieler Säugetier-Immunoglobuline. Der Nachweis der Interaktion erfolgt mit der Western-Blot Analyse mit Hilfe eines weiteren Antikörpers, das den potentiellen Interaktionspartner erkennt.

Für die Immunpräzipitation wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben (2.2.6.2) mit TLB lysiert und die Proteinkonzentration der einzelnen Proben aufeinander abgestimmt. Zu den

einzelnen Lysaten wurden, je nach verwendetem Antikörper 30 µl Protein A-Agarose bzw. G –Agarose (Maus und Kaninchen: meist A, Ziege: G) zugegeben. Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:300 eingesetzt. Die Proben wurden über Nacht in einem "Rotations-Schüttler" bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend 1 min bei 2000 rpm und RT abzentrifugiert und 2x mit 500 µl TLB gewaschen. Anschließend wurden die Protein A- oder -G-Beads 1 min bei 2000 rpm sedimentiert und mit 45µl 1xLämmli versetzt. Die Proben wurden schließlich 5 min bei 95°C denaturiert und für die Western-Blot Analyse eingesetzt.

#### 2.2.6.4. Hefe Two-Hybrid

Das Hefe Two-Hybrid System wurde entwickelt, um direkte Protein-Protein Interaktionen zu untersuchen (Fields und Song 1989). Dabei werden euakaryotische Transktiptionsfaktoren verwendet, z.B. das Gal4 Protein der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, das zwei räumlich und funktionell voneinander unabhängige Domänen besitzt; eine DNA-Bindedomäne (BD) und eine Aktivierungsdomäne (AD). Die Bindedomäne bindet dabei an "upstream activation sequences" (UAS), die Aktivierungsdomäne veranlasst den RNA Polymerase II-Komplex zur Transkription von Genen, die abwärts der UAS lokalisiert sind. Beide Domänen sind notwendig für die Transkription, müssen aber nicht kovalent verbunden sein. Dieses Prinzip



Abbildung 6: Hefe Two-Hybrid Plasmide

macht sich der Two-Hybrid Test zunutze. Dabei wird die Bindedomäne des Transkriptionsfaktors als Fusionsprotein mit dem zu untersuchenden Protein zusammen mit der Aktivierungsdomäne als Fusionsprotein mit dem potentiellen Interaktionspartner in Hefe exprimiert. Eine Interaktion beider Proteine führt zur Transkription eines Reportergens, wie

Für die Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen wurde die Plasmide pAS2-1 und pACT2 des MATCHMAKER Two-Hybrid System 2 von Clontech verwendet.

*lacZ* von *E.coli*. Das *lacZ* Genprodukt setzt das Substrat X-Gal um, was zu einer Blaufärbung führt und die Identifikation positiver Klone ermöglicht.

## 2.2.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot-Analyse

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine effiziente Methode zur Auftrennung von denaturierten Proteinen in einem elektrischen Feld, ihrem Molekulargewicht entsprechend (Laemmli 1970). Das Detergenz SDS bewirkt, dass die nicht kovalenten Wechselwirkungen der nativen Proteine aufgelöst werden. Das im Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol reduziert zudem Disulfidbrücken. SDS binden an die Proteinketten, die so gebildeten Komplexe besitzen eine starke negative Ladung, die der Masse der Protein-SDS Komplexe proportional ist. Damit ist sichergestellt, dass die negativ geladenen Protein-SDS Komplexe in einem elektrischen Feld in Richtung des Plus-Pols wandern. Da alle Proteine ungefähr die gleiche negative Ladung, aber unterschiedliche Größe haben, werden sie in einem Polyacrylamid-Gel ihrer Größe nach aufgetrennt.

Die Zell-Lysate wurden jeweils, wie unter 2.2.6.2 beschrieben vorbereitet und auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt. Zu dem gewünschten Probenvolumen wurde 5xSDS Probenpuffer (155 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% SDS, 50% Glycerin, 25%  $\beta$ -Mercaptoethanol) zugegeben. Die Proben wurden 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und auf Gele aufgetragen.

# 2.2.7.1. Herstellung von denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen für die Auftrennung von Proteinen

Die Gele zur Auftrennung von Proteinen bestanden aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Das Sammelgel (3,9%) hat die Aufgabe die in den Proben enthaltenen Proteine zu konzentrieren. Die Konzentration erfolgt aufgrund eines stufenweisen pH-Anstiegs beim Übergang vom Sammel- zum Trenngel, der durch unterschiedliche Pufferbedingungen entsteht. Die Auftrennung der Proteine erfolgt im Trenngel. Für alle Experimente wurden 10-15 % Trenngele eingesetzt. Niedigprozentige Gele ermöglichen eine bessere Auftrennung von hochmolekularen Proteinen, hochprozentige entsprechend umgekehrt.

#### Herstellung eines Trenngels

- Für die Herstellung des Trenngels wurde die Acrylamidlösung (Biorad) im Verhältnis Acrylamid zu Bisacrylamid 30% : 0,2% mit dem Trenngelpuffer (1,5M tris-HCl pH 9,0, 0,4% TEMED, 0,4% SDS) und ddH<sub>2</sub>O vermischt. Zuletzt wurde vor dem Gießen der Gele Ammoniumpersulfat (10% w/v) zugegeben.
- Das Trenngel wurde so zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen, dass am oberen Rand etwa 3 cm Platz f
  ür das Sammelgel bleibt. Das Trenngel wurde mit Isopropanol oder Ethanol 
  überschichtet, um eine gleichm
  äßige Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel zu erreichen.

#### Herstellung eines Sammelgels

- Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde der Alkohol abgegossen. Alkoholreste wurden mit dH<sub>2</sub>O ausgespült.
- Das Sammelgel (3,9%) setzte sich aus einer Acrylamid zu Bisacrylamid (30% : 0,2%) Lösung und Sammelgelpuffer (140 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,11% TEMED, 0,11% SDS) zusammen. Die Polymerisation wurde ebenfalls mit Ammoniumpersulfat (10% w/v) gestartet.
- Das Sammelgel wurde auf das zuvor auspolymerisierte Trenngel gegossen und ein Kamm zwischen die Glasplatten in das Sammelgel gesteckt.
- Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wird der Kamm vorsichtig gezogen.
   Das Gel wurde in die Gelelektrophoresekammer eingespannt und die Pufferkammern mit Laufpuffer (25 mM Tris-HCl pH 6,8, 50 mM Glycin, 0,1% SDS) aufgefüllt.
- Die ausgeformten Geltaschen wurden mit Puffer ausgespült.
- Der Gell-Lauf wurde f
  ür ca. 1,5 h bei einer Stromst
  ärke von 50 mA durchgef
  ührt. Das Gel wurde danach f
  ür die Westernblotanalyse benutzt.

#### 2.2.7.2. Durchführung der Westernblotanalyse

Mit Hilfe der Westernblotanalyse (Burnette 1981) kann man Proteine, die über ein SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt wurden, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Towbin et al. 1979) und dort spezifisch sichtbar machen. Dazu werden Antikörper verwendet, welche spezifisch das zu untersuchende Protein oder ein Epitop erkennen. Dieser erste Antikörper wird durch einen zweiten Antikörper spezifisch erkannt. Der zweite Antikörper ist kovalent an eine Peroxidase (horseradish peroxidase - HRP, Meerrettich-Peroxidase) gebunden. Das Enzym katalysiert dabei die Umsetzung von Luminol mit Wasserstoffperoxyd (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in eine oxidierte Form. Dabei wird Lumineszenz freigesetzt, die auf Röntgenfilmen detektiert werden kann. Das zu untersuchende Protein erscheint als distinkte Bande auf dem entwickelten Film.

#### 2.2.7.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran

Der Elektrotransfer der Proteine wurde in einer Nass-Elektroblotkammer von BioRad durchgeführt. Für den Elektrotransfer werden 4 Whatman-Papiere und eine Nitrocellulose-Membran auf Gelgröße zugeschnitten und in Blotting-Puffer (pH 8,2, 39 mM Glycin, 48 mM Tris-HCl, 0,037% SDS, 20% Methanol) getränkt. Die Nitrocellulose-Membran wurde luftblasenfrei auf das Gel gelegt und zwischen die feuchten Whatmanpapiere gebettet. Man muss dabei beachten, dass das gesamte Sandwich möglichst luftblasenfrei bleibt. Das Sandwich wurde seinerseits zwischen zwei Schwammpads gebettet und in dem Gehäuse der Kammer befestigt. Die Kammer wurde nun mit dem Blotting-Puffer gefüllt. Der Elektrotransfer erfolgte je nach Kammergröße bei 200 bis 300 mA für 1,5 h bis 3 h.

#### 2.2.7.4. Western-Blot Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Proteine

Die Nitrocellulose-Membran wurde für mindestens 30 min bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer (5% Milchpulver in PBS-T (1x PBS mit 0,1% Tween)) inkubiert, der Blocking-Puffer anschließend verworfen und die Membran in einer Primär-Antikörper-Lösung (gelöst meist in Blocking-Puffer oder 1x PBS-T, je nach Herstellerangaben) für 1-4 h bei RT oder über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils etwa 10 min in 1x PBS-T gewaschen um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen.

Die Inkubation der Membran mit dem Sekundär-Antikörper erfolgte analog unter Schwenken für 1-4 Stunden bei RT in der Sekundär-Antikörper-Lösung (gelöst in Blocking-Puffer). Nach der Inkubation wird die Membran erneut dreimal mit 1x PBS-T für jeweils mindestens 10 min gewaschen.

Nach dem Waschen wurde die Membran mit dem Chemolumineszenz-Substrat (2,5 mM Luminol, 0,45 mM p-Coumarsäure, 100 mM Tris-HCl pH 8,5, dazu wurden kurz vor der Benutzung 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben) für ca. 1 min inkubiert. Die Membran wurde in eine Detektionskassette gelegt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Je nach Stärke des Signals bzw. Qualität der Antikörper erfolgte eine entsprechend lange Exposition des Films in der Kassette. Die Filme wurden anschließend in einem Röntgenfilm-Entwickler (AGFA Cervix 60) entwickelt.

## 3. Ergebnisse

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Hemmung des NF-κB-Signalweges auf die Vermehrung des Influenza A Virus.

# 3.1. Der NF-κB-Signalweg ist wichtig für die Vermehrung des Influenza A Virus

Bereits in früheren Arbeiten des Labors wurde gezeigt, dass die Hemmung des NF- $\kappa$ B-Signalweges eine negative Auswirkung auf die Replikation des Influenza A Virus hat (Wurzer et al. 2004). So wurde beispielsweise der Signalweg mit einer dominant-negativen



Abbildung 7: Auswirkung des Inhibition des NF-KB Signalweges mittels siRNA gegen p65 auf die Replikation von Influenza Viren

(A) HEK293 Zellen wurden mit einem Vector pSR-GFP/Neo p65/3, welcher p65 gerichtete siRNA exprimiert bzw. mit einem pSR-GFP/Neo Leervektor (siehe Anhang, Abbildung 42) transient transfiziert und 24h nach Transfektion lysiert. Die Hemmung der p65 Expression wurde mittels Western-Blot bestimmt. Die äquivalente Proteinbeladung wurde mit ERK2-Antikörper überprüft. (B) HEK293 Zellen wurden mit dem p65-siRNA exprimierenden Vector pSR-GFP/Neo p65/3 bzw. pSR-GFP/Neo Leervektor transient transfiziert und 24h nach Transfektion mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 0,01 mit Influenza A/FPV/Bratislava/1979 (H1N1) infiziert. Nach 8 bzw. 24 h nach Beginn der Infektion wurden Zellüberstände gesammelt und die Titer der Nachkommenviren mittels Plaque-Assay bestimmt.

Mutante von IKK $\beta$  bzw. einer nicht abbaubaren Mutante von I $\kappa$ B $\alpha$  unterbrochen. Zellen, die diese Mutanten exprimierten, wurden mit Influenza Virus infiziert und die Virentiter bestimmt. Es zeigte sich, dass sich das Virus im Vergleich zu Kontrollzellen schlechter repliziert hatte, was in geringeren Titern der Nachkommenviren resultierte. Eine Preaktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch Expression einer aktiven Mutante von IKK $\beta$  resultierte dagegen in höheren Virustitern im Vergleich zu Kontrollzellen. Ein ähnliches Ergebnis wurde ebenfalls in einer Arbeit eines anderen Labors durch Einsatz verschiedener NF- $\kappa$ B-Aktivatoren und -Inhibitoren erzielt (Nimmerjahn et al. 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese Ergebnisse mittels eines anderen Ansatzes bestätigt. Dieser bestand darin, die regulatorische NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 mittels einer "small interferring RNA" (siRNA) gegen die p65 mRNA zu eliminieren. Dazu wurden HEK293-Zellen transient mit einem Vektor transfiziert, der die siRNA gegen p65 kodierte. Ein Ansatz wurde 24h nach Transfektion lysiert und die Unterdrückung der p65 Expression mittels Western-Blot auf Proteinebene überprüft (siehe Abbildung 7 A). Ein zweiter Ansatz wurde mit 0,01 MOI (Multiplizität der Infektion) des Influenza Virus A/FPV/Bratislava/1979 (H1N1) (im Folgenden kurz FPV genannt) infiziert und die Virentiter mittels Plaque-Assay bestimmt (siehe Abbildung 7 B). Es zeigte sich, dass in den Zellen, die die siRNA gegen p65 expressior transfiziert wurden. Dies zeigt, dass sich dass Influenza Virus nur unzureichend in Zellen mit geringer NF- $\kappa$ B-Aktivität für die effiziente Vermehrung benötigt und dass die Hemmung dieses Signalweges als potentielle antivirale Strategie dienen könnte.

# 3.2. Acetylsalicylsäure als Mittel zur Hemmung des NFκB-Signalweges

Die IKK $\beta$ -vermittelte Phosphorylierung und der damit einhergehende proteolytische Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  stellt einen zentralen Schritt in der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges dar. Wird die Phosphorylierung und folglich der Abbau dieses Moleküls verhindert, so findet keine Translokation des p50/p65-Komplexes in den Zellkern statt und die Transkription von NF- $\kappa$ B-abhängigen Genen wird unterbunden. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, existieren verschiedene Wege um NF- $\kappa$ B zu hemmen. Acetylsalicylsäure (im Folgenden als ASA abgekürzt) ist ein bekannter Inhibitor der IKK $\beta$ -Kinase (Yin et al. 1998), seit langer Zeit in der klinischen Benutzung sowie sehr günstig in der Herstellung, was diese Substanz besonders attraktiv als potentiellen antivirales Mittel erscheinen lässt.

Um zu überprüfen, ob auch in unseren Ansätzen ASA den NF-κB-Signalweg hemmen kann wurde ein IκBα-Degradationsassay durchgeführt. Dabei wurden MDCK-Zellen mit Acetylsalicylsäure bzw. zur Kontrolle mit BAY 11-7085, einem kommerziell erhältlichen Inhibitor der NF- $\kappa$ B Aktivierung, behandelt. Durch Zugabe von TNF $\alpha$ , einem starken Aktivator des NF- $\kappa$ B-Signalweges, wurde die I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation eingeleitet. Sind die Zellen mit einer Substanz behandelt, die den Signalweg hemmt, so ist auch der TNF $\alpha$ -induzierte Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  unterbunden. Wie in der Abbildung 8 zu sehen ist, hemmen beide Substanzen den TNF $\alpha$ -induzierten Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ . Dieses Ergebnis bestätigt, dass ASA in Konzentrationen zwischen 3 und 20 mM zur Hemmung des NF- $\kappa$ B-Signalweges eingesetzt werden kann.



Abbildung 8: Die NF-κB-Signalweg Inhibitoren ASA und BAY 11-7085 hemmen den TNFα-induzierten

#### Abbau von ΙκΒα

MDCK Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von ASA (A) bzw. BAY 11-7085 (B) behandelt. Die I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation wurde mit 30ng/ml TNF $\alpha$  induziert. Nach 1 min (A) bzw. 15 min (B) wurden die Zellen lysiert. Die Proteine wurden in einem PAGE-Gel separiert, geblottet und im Western-Blot auf die I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation mit einem spezifischen Antikörper untersucht. Als Ladekontrolle diente die Detektion einer unspezifischen Bande durch den I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörper.

Die Hemmung wurde ebenfalls auf transkriptioneller Ebene in einem Luciferase-Assay (mit einem  $3xNF-\kappa B$  Promotorbindestelle-Luciferase Reportergen Konstrukt) bestätigt. Das Experiment zeigte nach Stimulation mit TPA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat, 100 ng/ml) und anschließender Inkubation mit 1-5 mM ASA eine geringere Stimulation der NF- $\kappa$ B-Promotoraktivität nach (Mazur et al. 2007).

# **3.3. Behandlung infizierter Zellen mit Acetylsalicylsäure hemmt die Replikation des Influenza Virus**

Frühere Arbeiten, sowie die Experimente dieser Arbeit zeigten, dass die Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalweges einen hemmenden Einfluss auf die Replikation des Influenza A Virus hat. Im Folgenden wird untersucht, ob ASA, als Inhibitor des NF- $\kappa$ B Signalweges eine antivirale Kapazität besitzt.

Um dies zu untersuchen wurden Zellen mit Influenza Virus infiziert und mit ASA behandelt. Die Infektion von MDCK- oder A549-Zellen mit einem hochpathogenen, aviären Influenza Virus FPV (von Subtyp H7N7) führt nach 24h zu sichtbaren Zellsterben sowie zu Zellen mit veränderter Morphologie durch zytopatischen Effekt (CPE). Dazu gehören Zell-Lyse, Fusion



Abbildung 9: Zellmorphologie Influenza A Virus infizierterter MDCK- und A549-Zellen, die mit ASA-

#### behandelten wurden

(A) MDCK-Zellen wurden mit 0,001 MOI FPV infiziert. Nach der Infektion wurde zum Infektionsmedium 5 bzw. 7 mM ASA (in PBS gelöst, auf pH 7 eingestellt) zugegeben und für 24h inkubiert. (B) A549-Zellen wurden mit 0,01 MOI FPV infiziert. Nach der Infektion wurde zum Infektionsmedium 5 bzw. 7 mM ASA (in PBS gelöst, auf pH 7 eingestellt) zugegeben und für 24h inkubiert.

von mehreren Zellen sowie Bildung nadelförmiger Zellfortsätze (siehe Abbildung 9). Wurden die infizierten Zellen jedoch mit ASA behandelt, so erhöht sich sichtbar die Anzahl lebender sowie morphologisch intakter Zellen. Besonders deutlich ist dies nach Behandlung infizierter A549-Zellen mit 7mM ASA – die Anzahl der toten Zellen ist genauso gering, wie im Fall von uninfizierten Zellen (siehe Abbildung 9). Dieses recht einfache Experiment zeigte bereits, dass die Behandlung infizierter Zellen mit ASA die Zellen vor der Zerstörung durch die Virusvermehrung in A549- und MDCK-Zellen ganz oder teilweise schützen kann (bei A549-Zellen besonders deutlich sichtbar).

Die Frage war nun, ob die Hemmung von NF-κB durch ASA in Influenza Virus infizierten Zellen auch zu verminderten Titern von Nachkommenviren führen würde.

# 3.3.1. Auswirkung der NF-κB-Hemmung mittels Acetylsalicylsäure auf Virusreplikation

Um die Auswirkung der NF-kB-Hemmung mittels ASA auf die Menge der infektiösen Viruspartikel (Virustiter) zu untersuchen, wurden A549- oder MDCK-Zellen mit verschiedenen Influenza A Virus-Stämmen infiziert und nach 8, 24 und 36h die Zellmedium-Überstände entnommen. Die Anzahl der infektiösen Virusparitikel pro ml (pfu, "plaque forming units" pro ml) wurde mittels Plaque-Assay bestimmt (siehe 2.2.1.3). Dabei war deutlich erkennbar, dass ASA-Behandlung konzentrationsabhängig in beiden Zell-Linien und bei allen eingesetzten Virus-Stämmen zu einer verringerten Anzahl der Nachkommenviren führte (siehe Abbildung 10). Besonders wirkungsvoll war dabei die Behandlung von infizierten A549-Lungenepithelzellen. Hier konnte man eine Titerreduktion beobachten, die über mehr als zwei logarithmische Stufen hinausging, und dies selbst bei einem hochaggressiven humanpathogenen HPIAV (highly pathogenic influenza A virus) vom H5N1 Subtyp, welches aus einem Menschen isoliert wurde. Die Hemmwirkung in infizierten MDCK-Zellen fiel hingegen geringer aus, diese Zell-Linie ist besonders suszeptibel für das Influenza Virus. Die Lungenepithelzellen stellen das bessere Infektionsmodel dar, da sie das Gewebe bilden, das die Influenza Viren im respiratorischen Trakt primär infizieren. Damit scheint der Einsatz von ASA eine geeignete Maßnahme zur Abwehr von Influenza Viren darzustellen.

Es hat sich ebenfalls gezeigt, dass ASA nicht nur in der Zellkultur, sondern auch *in vivo* antiviral wirkt. Die Überlebensrate von Mäusen, die mit einer letalen Dosis FPV infiziert wurden, konnte nach anschließender intranasaler Behandlung mit ASA signifikant (bis 60%) gesteigert werden, ((Mazur et al. 2007), siehe Abbildung 11 B. Die Versuche wurden in

Kooperation mit Labor O. Planz, FLI, Tübingen durchgeführt). Nicht behandelte, bzw. mit der Kontrollsubstanz Indometacin (Cyclooxygenasen-Inhibitor) behandelte Mäuse starben dagegen spätestens nach 10 Tagen. Die Aufnahme von ASA aus dem Trinkwasser erwies sich



Abbildung 10: Virustiter aus Überständen von MDCK- und A549-Zellen, die mit verschiedenen Influenza

#### A Virus-Stämmen infiziert und mit ASA behandelt wurden.

MDCK- bzw. A549-Zellen wurden mit dem Influenza Virus A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) (A, B), A/Thailand/1(KAN-1)/2004 (C, D) sowie A/FPV/Bratislava/1979 (E, F) infiziert. Nach 30 min Infektion wurden zum Infektionsmedium 5 bzw. 7 mM ASA (in PBS gelöst, auf pH 7 eingestellt) zugegeben. 8, 24, und 36h nach Infektionsbegin. wurden Zellmedium-Überstände entnommen und daraus die Virustiter mittels Plaque-Assay bestimmt (siehe 2.2.1.3).

als weniger effektiv. Es wurde nur etwa eine 20% Überlebensrate erzielt, die jedoch signifikant war (siehe Abbildung 11 A).

Die Untersuchung von Virentitern aus Lungen infizierter Mäuse zeigte bereits 24 h nach Infektion und anschließender Behandlung mit 10 mM ASA einen Rückgang der neu gebildeten Viruspartikel im Vergleich zu unbehandelten Mäusen (siehe Abbildung 11 C). Dies ist ein gutes Indiz dafür, dass der antivirale Effekt auf der direkten Hemmung der Virusreplikation gründet und nicht auf einer Modulation der adaptiven Immunantwort.



Abbildung 11: Acetylsalicylsäure als anti-Influenza Wirkstoff in vivo.

(A) Überlebenskurve von C57B1/6-Mäusen (n=5), die intranasal mit einer letalen Dosis FPV ( $10^4$  pfu) infiziert wurden. Die Mäuse bekamen nach der Infektion täglich 50 mM ASA im Trinkwasser verabreicht. Kontrollmäuse (n=5 wurden mit PBS behandelt. (B) Überlebenskurve von Mäusen, die mit einer letalen Dosis FPV ( $5x10^5$  pfu) infiziert wurden und anschließend täglich mit 2 bzw. 20 mM ASA durch direkte tracheale Applikation behandelt wurden. Kontrollmäuse (n=5) wurden mit PBS behandelt. Die Behandlung erfolgte mit einem Mouse Minivent (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus), angeschlossen an einen Vernebler (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus), angeschlossen an einen Vernebler (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus). (C) Eine Maus wurde, wie mit  $10^4$  pfu FPV infiziert und direkt tracheal mit 10 mM ASA behandelt. 24 h p.I. wurde die Maus getötet und die Virustiter in der Lunge in Plaque-Assay bestimmt.

Alle Maus-Experimente wurden in Kooperation mit Labor O.Planz, FLI, Tübingen durchgeführt.

#### 3.3.2. Spezifität der NF-κB-Inhibition durch Acetylsalicylsäure

ASA zeigt eine sehr starke Wirkung auf die Replikation von Influenza A Viren. Es stellte sich daher die Frage, ob die Wirkung alleine auf der in der Literatur beschriebenen Inhibition von NF-κB beruht oder ob ASA einen Einfluss auf weitere Virus-induzierte zelluläre Signalwege hat.

Wichtige Influenza Virus-induzierte Signalwege sind z.B. die verschiedenen MAP Kinasen-Signalkaskaden, ERK1/2, p38 und JNK1, deren Beeinflussung ebenfalls zu einer Modulation der Virusreplikation führt (siehe 1.4.1).

In Abbildung 12 ist deutlich eine verstärkte Phosphorylierung und damit die Aktivierung von ERK, JNK und p38, sowie die Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  4 und 8 h nach Virusinfektion in

unbehandelten Zellen zu sehen. Die Inkubation mit 5 oder 7 mM ASA hatte keinen Einfluss auf die virusinduzierte Aktivierung der ERK-, JNK- und p38-Signalwege. Während die I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation nach ASA-Zugabe selbst nach 8-stündiger Infektion mit einem aggressiven Virus, wie FPV (H7N7) immer noch gehemmt ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass ASA keine Wirkung auf die virusinduzierte Aktivierung von MAP Kinasen hat, allerdings könnten noch andere zelluläre Vorgänge von ASA gehemmt sein, welche zum antiviralen Effekt beitragen.



Abbildung 12: Einfluss von ASA auf verschiedene virusaktivierte zelluläre Signalwege

A549-Zellen wurden mit 5 bzw. 7 mM ASA inkubiert und mit FPV infiziert (5 MOI), bzw. ohne Zugabe von ASA oder uninfiziert belassen (0h). Nach 4 und 8 h, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und lysiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.7) separiert und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Aktivierung der ERK1/2-, JNK1- und p38-Kinasen wurde mittels phosphospezifischer Antikörper sichtbar gemacht. Der Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  wurde mit einem I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörper detektiert. Die äquivalente Beladung wurde mit ERK-2, JNK-1 sowie p38 Antikörpern kontrolliert.

Um zu klären, ob die NF- $\kappa$ B-Hemmung durch ASA alleine die verminderte Virusreplikation determiniert, wurden Virustiter von infizierten Zellen bestimmt, in denen der Signalweg durch den spezifischen NF- $\kappa$ B-Inhibitor BAY 11-7085 gehemmt war. Es zeigte sich, dass die kombinierte Behandlung mit zwei NF- $\kappa$ B-Inhibitoren gleichzeitig zu keiner signifikanten synergistischen Reduktion der Virustiter führte (siehe Abbildung 13).

Dies bedeutet, dass der jeweilige Inhibitor in der eingesetzten Konzentration spezifisch den NF-κB-Signalweg hemmt und dass etwaige zusätzlich durch ASA gehemmte Faktoren keine wichtige Rolle für die beobachtete Hemmung der Virusreplikation spielen.



Abbildung 13: Antivirale Wirkung von ASA beruht prädominant auf der Hemmung von NF-KB

# 3.3.3. Acetylsalicylsäure hemmt Caspasen-Aktivität und Induktion des apoptotischen Zelltodes.

In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass der NF-κB Signalweg die virusinduzierte Expression von TRAIL und Fas/Fas-Ligand reguliert (Wurzer et al. 2004). Andererseits ist die Aktivität der Caspase-3 für den Export der Ribonukleoprotein-Komplexe (RNP) aus dem Zellkern notwendig (Wurzer et al. 2003). Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass die Hemmung der Virusreplikation durch ASA auf Inhibition der spezifischen Induktion von NF-κB-abhängigen proapoptotischen Faktoren beruht. Es wurde bereits gezeigt, dass ASA die virusinduzierte Expression von TRAIL und Fas-Ligand hemmen kann, sowie, dass die bekannte Inhibierung der COX-2 (Cyclooxygenase-2) durch ASA keinen Einfluss auf die Virenreplikation oder virusinduzierte Apoptose hat (Mazur et al. 2007).

Eine Inkubation infizierter A549-Zellen mit 5 mM ASA führte zu einer Hemmung der Spaltung von Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP, siehe Abbildung 14). PARP ist ein

A549-Zellen wurden mit 0,01 MOI FPV infiziert und mit 7 mM ASA, 10  $\mu$ M BAY 11-7085 oder ASA (7 mM) und BAY 11-7085 (10 $\mu$ M) zusammen bzw. DMSO (Lösungsmittelkontrolle) behandelt. Nach 8 h wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und die Virentiter im Plaque-Assay bestimmt.

Enzym der DNA-Reparatur und ein direktes Substrat für Caspasen. PARP wird in zwei Fragmente, 89 und 24 kDa, gespalten (Kaufmann et al. 1993; Soldani und Scovassi 2002). Eine Inhibierung der Spaltung, wie in Abbildung 14, ist somit ein Indiz für eine verminderte Caspasen Aktivität.



Abbildung 14: ASA hemmt virusinduzierte Caspasen-Aktivität

**A,B)** A549-Zellen wurden mit FPV infiziert (0,01 MOI) und mit 5 bzw. 7 mM ASA inkubiert, bzw. ohne Zugabe von ASA infiziert oder uninfiziert (0h) belassen. Nach den angezeigten Zeitpunkten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und lysiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE separiert und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. (A) Die Caspasen Aktivierung wurde mit einem Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP, 113 kDa) Antikörper, der ebenfalls ein 24 kDa Spaltfragment (zweites Spaltfragment: 89 kDa) des Proteins erkennt, nachgewiesen. Die Ladekontrolle wurde mit einem anti-ERK-2 Antiserum überprüft. (**B**,**C**) Die Caspase-3 Aktivierung wurde anhand der Spaltung, die bei der proteolytischen Aktivierung entsteht, mit einem entsprechenden Antiserum gegen die Pro-Form des Proteins (**B**) bzw. mit einem Antikörper gegen das Spaltfragment (**C**) nachgewiesen. Die Positivkontrolle erfolgte durch Inkubation mit 2,5  $\mu$ M Staurosporin. Ladekontrolle wurde anhand einer unspezifischen Bindung des Serums (**B**) bzw. ERK-2 Serums (**C**) gezeigt.

Die aktive Form von Caspase-3 entsteht durch proteolytische Prozessierung. Die virusinduzierte Aktivierung von Caspase-3 konnte ebenfalls durch Inkubation mit ASA verhindert werden, was anhand der nicht abgebauter Pro-Caspase-3 festgestellt wurde (siehe Abbildung 14B) bzw. des Spaltfragments (siehe Abbildung 14C). Die Hemmung der

Caspasen-Aktivierung durch ASA beeinflusst resultiert schließlich in einer reduzierten DNA-Fragmentierung, die als Monitor für Apoptose diente (siehe Abbildung 15). Diese Experimente zeigen, dass die Hemmung des NF-κB-Signalweges und die damit einhergehende Hemmung der Virusreplikation die Ursache in der viralen Induktion des apoptotischen Zelltodes haben.



#### Abbildung 15: ASA hemmt virusinduzierte Apoptose

A549-Zellen wurden mit FPV infiziert (0,1 MOI) und mit 5 bzw. 7 mM ASA inkubiert. Nach 24h und 36h wurden die Überstände gesammelt, die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und mit den Zellen aus dem Überstand zusammen geführt. Im Nicoletti-assay (siehe 2.2.2.5) wurde die DNA-Fragmentierung als Apoptosemarker quantifiziert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen, als Positivkontrolle mit 1  $\mu$ M Staurosporin behandelte Zellen.

#### 3.3.4. Acetylsalicylsäure hemmt den Export von Ribonukleoprotein-

#### Komplexen aus dem Zellkern

Die Inhibierung des NF-κB-Signalweges durch ASA resultiert in geringeren Virustitern. Hat diese inhibitorische Wirkung auch einen Einfluss auf die Expression von Virusproteinen? Um diese wichtige Frage zu beantworten wurde die Expression verschiedener viraler Proteine in einer Zeitkinetik von infizierten A549-Zellen betrachtet. Dabei wurde die Menge der

jeweiligen viralen Proteine von infizierten Zellen, die mit ASA behandelt wurden, mit unbehandelten infizierten Zellen verglichen (siehe Abbildung 16). Der Vergleich lässt erkennen, dass ASA-Behandlung keinen essentiellen Einfluss auf die Akkumulation oder Prozessierung der viralen Proteine M, NS1, NP und PB1 nach Behandlung mit 5 mM ASA zeigte. Der Einsatz von 7 mM ASA führte allerdings zu einer leichten Beeinflussung der Proteinexpression von M1 und NS1. PB1 und NP, also Proteine des viralen RNP-Komplexes scheinen aber nicht betroffen zu sein. Dies könnte bedeuten, dass höhere ASA-Konzentrationen die Expression von manchen Virusproteinen hemmten Die mehrfache Wiederholung dieses Experiments zeigte stets das gleiche Bild.

Das Experiment zeigt somit, dass die Inhibierung der Virusreplikation mit geringeren ASA-Konzentrationen nicht auf der Ebene der Proteinsynthese statt findet, sondern über einen anderen Mechanismus erfolgt. Dies ist ein wichtiges Ergebnis, denn wenn ASA einen direkten inhibitorischen Einfluss auf die Synthese von Virusproteinen gehabt hätte, wäre ein direkter oder gar zellschädigender Effekt nicht vollständig auszuschließen gewesen.





A549-Zellen wurden mit 5 (A) bzw. 7 mM ASA (B) inkubiert und mit FPV infiziert (5 MOI), bzw. ohne Zugabe von ASA und uninfiziert (0h) belassen. Nach 2, 4, 8, und 10 h, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in RIPA-Puffer lysiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.7) separiert und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die viralen Proteine M, NS1, NP und PB1 wurden mit entsprechenden Antikörpern bzw. Antiserum gegen diese Proteine nachgewiesen. Die Ladekontrollen wurden mit einem ERK-2 Antiserum überprüft.

Das Influenza Nukleoprotein besitzt nukleäre Lokalisierungssequenzen (NLS), die den Import in den Zellkern vermitteln (Davey et al. 1985). Diese Sequenzen werden in RNP-Komplexen maskiert, so dass diese aus dem Zellkern ins Zytoplasma heraustransportiert werden können (Neumann et al. 1997). Der aktive Export wird durch das Influenza NS2 Protein vermittelt und benutzt die zelluläre Kernexportmachinerie. Der Raf/MEK/ERK-Signalweg scheint im Kontext einer Influenzainfektion eine Rolle im aktiven Export der RNP-Komplexe zu spielen (Pleschka et al. 2001). Neben diesem aktiven Exportweg scheint es noch einen, zu späteren Zeitpunkten einsetzenden passiven Exportweg zu geben, welcher abhängig von Caspasen ist





#### **RNP-Komplexen**

A549-Zellen wurden mit FPV infiziert (5 MOI) und mit 5 mM ASA für 5 h bzw. 15 mM ASA für 8 h inkubiert, bzw. ohne Zugabe von ASA belassen. Ein Serum gegen das Influenza Nukleoprotein (NP) wurde benutzt um virale Ribonukleoproteinin-Komplexe zu visualisieren. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

(Wurzer et al. 2003). Es wurde bereits gezeigt, dass die Inhibierung von Caspase-3 in einer Retention der viralen RNP-Komplexe im Zellkern resultiert (Wurzer et al. 2003). Da die Caspasen-Induktion im Kontext einer Influenzainfektion unter der Kontrolle von NF-κB erfolgt, stellt sich die Frage, ob eine Inhibierung dieses Signalweges zum gleichen Ergebnis führt, wie die Inhibition der Caspase-3. Wie man der Abbildung 17 gut sehen kann, führt die Inkubation von infizierten Zellen mit einer niedrigeren Konzentration von 5 mM ASA, 4h nach Beginn der Infektion, bzw. mit einer höheren von 15 mM ASA, 8h nach Beginn der Infektion zu einer Retention der RNP-Komplexe im Zellkern. Unbehandelte Zellen zeigen dagegen eine zytoplasmatische Lokalisierung der neu gebildeten RNP-Komplexe. Das bedeutet, dass in unbehandelten Zellen, die RNP-Komplexe 4h nach der Infektion mit Influenza Virus bereits aus dem Zellkern heraustransportiert wurden. Behandlung mit ASA scheint diesen Prozess zu stören. Da Inkubation von infizierten Zellen mit ASA zu keiner Änderung in der Akkumulation der viralen Proteine führt und somit der Replikationszyklus bis zu diesem Stadium ohne Störung ablaufen kann, ist davon auszugehen, dass hauptsächlich durch den gestörten Kernexport das Virus in seiner Replikationsfähigkeit gehemmt wird.

#### 3.3.5. Untersuchung von antiviral-wirkenden Acetylsalicylsäure-

#### Konzentrationen auf Zytotoxizität

Eine effektive antivirale Wirkung von ASA wurde in relativ hohen Konzentrationen beobachtet (5-7 mM), übereinstimmend mit den Literaturdaten für die NF-κB-hemmende



Abbildung 18: MTT-Proliferationsassay zur Untersuchung von Toxizität der antiviral agierenden ASA-Konzentrationen

A549-Zellen wurden mit 5 mM ASA bis 36h inkubiert. Nach 8, 24 sowie 36 h wurde der MTT-Test durchgeführt (siehe 2.2.2.7) durchgeführt. Der Farbumschlag wurde bei560nM gemessen.

Wirkung. Sind die eingesetzten ASA-Konzentrationen bei diesen Konzentrationen toxisch für die Zellen? Rein optische Sichtung der behandelten Zellen zeigte keine Änderungen in der Zellmorphologie, wie man in der Abbildung 9 sehen kann, was jedoch nur ein sehr grobes Indiz darstellt.

Um die Toxizität von ASA in antiviral agierenden Konzentrationen quantitativ zu untersuchen wurden MTT-Assay (siehe 2.2.2.7) und Propidiumiodid-Färbungen (siehe 2.2.2.6) durchgeführt.



Abbildung 19: Propidiumiodid Viabilitätstest von ASA behandelten MDCK- und A549-Zellen

(A) MDCK- und (B) A549-Zellen wurden mit antiviral wirkenden ASA-Konzentrationen 5 und 7 mM für 48h inkubiert. Nach jedem Zeitpunkt wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert, abermals mit PBS gewaschen und für 15-30 min in einer 50  $\mu$ g/ml Propidiumiodid-Lösung inkubiert (siehe 2.2.2.6). Anschließend wurden die Zellen einer FACS-Analyse unterzogen. Die Graphiken stellen die Anzahl der lebenden Zellen gemittelt aus zwei unabhängigen Experimenten dar.

Das Ergebnis aus diesen Experimenten bestätigt, dass die eingesetzte ASA-Konzentration von 5 mM keinen toxischen Effekt auf die benutzten Zell-Linien hat (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19). Der Einsatz von 7 mM ASA scheint dagegen geringfügig toxisch zu sein,

wenn man es über einen Zeitraum von 48 h in Zellkultur einsetzt. Die Viabilitäts-Tests zeigen folglich, dass die ASA-Konzentrationen 5 und 7 mM nicht bzw. geringfügig toxisch sind und sich für den antiviralen Einsatz eignen. Anhand eines MTT-Proliferationsassays wurde zusätzlich überprüft, dass die Zell-Proliferation durch ASA-Behandlung unbeeinflusst bleibt (Abbildung 18).

Gleichwohl haben Konzentrationen über 10 mM ASA eine toxische Wirkung (nicht gezeigt) und sind in der Anwendung für Zellkultur-Experimente, die über längere Zeiträume hinausgehen ungeeignet.

# 3.3.6. Hemmung der Influenza A Virusreplikation mit Acetylsalicylsäure führt nicht zu Bildung resistenter Virus-Varianten

Das große Problem bei der Bekämpfung von Influenza Viren ist seine hohe genetische Variabilität, die durch die hohe Fehlerhäufigkeit der viralen RNA-Polymerase herbeigeführt wird und zu einer sehr schnellen Resistenzbildung gegen den direkten Angriff auf das Virus mit antiviralen Mitteln führt. So ist der M2-Inhibitor Amantadin heutzutage bereits gegen die meisten Virus-Subtypen unwirksam. Auch über die neuen Hemmer der Neuraminidase





Passagierungsexperimenten

MDCK-Zellen wurden mit 0,001 MOI FPV infiziert und mit 5 mM ASA bzw. zur Kontrolle 5  $\mu$ M Amantadin inkubiert. Nach 24 h wurde der Zellmedium-Überstand abgenommen und die Virentiter im Plaque-Assay bestimmt. Mit dem Überstand wurden neue Zellen reinfiziert (wieder unter Zugabe von 5mM ASA bzw. 5  $\mu$ M Amantadin). Die Viren wurden insgesamt über fünf Infektionsrunden passagiert. Das Diagramm zeigt die Virentiter als Prozentzahl bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (auf 100% gesetzt). Alle Virentiter setzen sich aus jeweils zwei unabhängigen Infektionen zusammen.

wurden die ersten Resistenzfälle berichtet (Kiso et al. 2004). Kann sich das Influenza Virus ebenfalls an eine Hemmung von zellulären Faktoren anpassen, die für seine Replikation benötigt werden?

Um diese Problematik zu prüfen wurden Zellen mit FPV infiziert und fünf Infektionsrunden lang passagiert (siehe Abbildung 20) (Scholtissek und Muller 1991). Die infizierten Zellen wurden mit 5 mM ASA und als Vergleichskontrolle mit 5  $\mu$ M Amantadin behandelt. Das Experiment zeigt deutlich, dass die Behandlung mit Amantadin zunächst erfolgreich die Virusreplikation hemmt, der Hemmeffekt nimmt aber rapide ab. Bereits nach

der vierten Passage zeigt Amantadin keine virushemmenden Effekte. Dies bedeutet, dass das Influenza Virus unter Amantadin-Selektionsdruck innerhalb weniger Infektionsrunden Mutationen entwickelt hat, die das Pathogen gegen diese Substanz resistent macht. ASA-Behandlung führte dagegen nicht zur Bildung resistenter Virusvarianten. Eine Anpassung an eine Hemmung zellulärer Signalwege scheint damit für das Influenza Virus nicht möglich, bzw. scheint sich nicht so schnell entwickeln zu können.

#### 3.3.7. Acetylsalicylsäure als inhalierbarer, anti-influenza Wirkstoff

Aufgrund der hohen benötigten antiviralen Wirkkonzentration von ASA, welche systemisch ohne toxische Nebenwirkungen im Körper wahrscheinlich nicht erreichbar sind, ist die Vergabe der Substanz in inhalierbarer Form zu präferieren, da dann der Wirkstoff das



Abbildung 21: Furosemid und ASA/Furosemid besitzen kein toxisches Potential in Wirtszellen

MDCK-Zellen wurden mit antiviral wirkender ASA-Konzentration von 5 mM, 150  $\mu$ M Furosemid sowie mit der Kombination beider Substanzen 72 h inkubiert. Nach jedem Zeitpunkt wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert, abermals mit PBS gewaschen und für 15-30 min in einer 50  $\mu$ g/ml Propidiumiodid-Lösung inkubiert (siehe 2.2.2.6). Anschließend wurden die Zellen einer FACS-Analyse unterzogen. Die Graphiken stellen die Anzahl der lebenden Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten dar.

infizierte Gewebe im Respirationstrakt am besten erreicht und die örtlichen Wirkkonzentartionen am höchsten sind. Dies haben auch die Tierexperimente gezeigt (Abbildung 11) (Mazur et al. 2007). Allerdings könnte diese Verabreichungsform beim Menschen zu Komplikationen führen - ASA kann bei sensitiven Patienten asthmatische Beschwerden induzieren. Einen möglichen Ausweg bietet hier die Verabreichung von ASA in Kombination mit dem Mittel Furosemid. Diese Applikationsform wurde bereits untersucht. Klinische Studien haben gezeigt, dass man die Substanz Furosemid (ursprünglich ein Nierenmedikament) zusammen mit Salicylaten inhalieren kann um asthmatische Beschwerden zu lindern (Vargas et al. 1992; Bianco et al. 1995). Dabei scheint sich also eine antiasthmatische Wirkung von Salicylaten durch die relaxierende Wirkung von Furosemid zu manifestieren (Bianco et al. 1993). Die gleiche Studie zeigte ebenfalls, dass die Kombination beider Substanzen nicht toxisch ist und keine Nebenwirkungen hat. Die Substanzmischung ASA/Furosemid wurde bereits in klinischen Studien am Menschen als Asthmatherapeutikum eingesetzt. Ist ein antiviraler Einsatz dieser Lösung möglich?

Hierzu war zunächst zu untersuchen, ob die Substanzmischung das gleiche Wirkprofil zeigt und ob Furosemid-Beimischung zusätzliche, nicht gewünschte Effekte hat.

Eine Untersuchung auf Toxizität in Zellkultur zeigte keine Zell-schädigende Wirkung (PI-Staining bis 72 h nach Zugabe, Abbildung 21) von Furosemid alleine oder bei einer Kombination von 5 mM ASA und 150 µM Furosemid.





A549-Zellen wurden mit 0,01 MOI FPV infiziert und mit 5 mM ASA, 150  $\mu$ M Furosemid bzw. mit beiden Substanzen zusammen inkubiert. Nach 8, 24 und 36 h wurden die Zellmedium-Überstände abgenommen und die Virentiter im Plaque-Assay bestimmt. Alle graphisch dargestellten Werte setzen sich aus zwei unabhängigen Infektionen zusammen.

Zellen, die mit FPV infiziert wurden und mit ASA bzw. ASA/Furosemid behandelt wurden zeigen eine deutliche und in vergleichbarer Stärke eine Reduktion der Virustiter. Dabei zeigt Furosemid keinerlei antivirale Kapazität (siehe Abbildung 22).

Somit existiert bereits ein klinisch getestetes Medikament, das in klinischen Studien erfolgreich an Patienten für eine aeorosolische Vergabe angewandt wurde. Eine solche Medikamentenformulierung würde, entsprechend des Wirkprofils in Zellkultur, sich auch für eine anti-Influenza Therapie eignen.

### 3.4. Das Influenza A Protein PB1-F2

Erste Untersuchungen des elften Influenza A Proteins PB1-F2 zeigten eine proapoptotische (Chen et al. 2001) bzw. eine apoptoseverstärkende Funktion bei gleichzeitiger Exposition mit proapoptotischen Stimuli (Zamarin et al. 2005). Versuche mit Deletionsmutanten zeigten jedoch, dass Knockout-Viren im Vergleich zu Wildtyp-Viren keine Unterschiede in der Replikationseffizienz in Zellkultur zeigten (Chen et al. 2001). Im Tierversuch dagegen, zeigten PB1-F2 Deletionsmutanten von attenuierten Viren eine verminderte Pathogenität (Zamarin et al. 2006). Gleichwohl ist die biologische Relevanz für die Virusreplikation nicht bekannt und sollte daher im Folgenden näher untersucht werden.

## 3.4.1. PB1-F2 ist lokalisiert während der Influenza Infektion im

#### Zytoplasma und im Zellkern

Infiziert man Zellen mit Influenza Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (im Folgendem als PR8 abgekürzt) und verfolgt die Expression von PB1-F2 während der Infektion, so kann man beobachten, dass die Synthese von PB1-F2, wie auch der anderen frühen Influenza Virus



Abbildung 23: Zeitaufgelöste Expression von PB1-F2 während einer Influenza Virus Infektion

A549 Zellen wurden mit 1 MOI PR8 infiziert. Die Zellen wurden nach den angezeigten Zeitpunkten mit PBS gewaschen, lysiert, die Proteine denaturiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Detektion der viralen Proteine bzw. ERK2 zwecks Ladekontrolle wurde mit geeigneten Antikörpern bzw. Antisera vorgenommen.

Proteinen, bereits 2 h nach der Infektion detektierbar ist. Es erreicht aber anders als bei Proteinen wie PB1 oder NP ein Maximum nach ca. 8 h (bis 12 h, nicht gezeigt) und dann zu degradieren scheint (siehe Abbildung 23). Die Expression anderer viraler Proteine nimmt im weiteren Lauf der Infektion dagegen kontinuierlich zu.

Das PB1-F2 Peptid besitzt eine mitochondriale Lokalisierungssequenz (MTS), ist jedoch nicht nur in Mitochondrien lokalisiert, sondern auch zytoplasmatisch und im Zellkern (Chen et al. 2001). Wird PB1-F2 rekombinant in Zellen exprimiert, so ist die Lokalisierung ausschließlich zytoplasmatisch bzw. mitochondrial (siehe Abbildung 24, erste Reihe). Wird PB1-F2 dagegen viral exprimiert, so ist das Protein nicht nur im Zytoplasma, sondern in einigen Zellen auch im Zellkern lokalisiert (siehe Abbildung 24, zweite und dritte Reihe). Die Kernlokalisierung während der Influenza-Infektion stellt einen deutlichen Hinweis auf eine neue, bislang unentdeckte mögliche Funktion des Proteins im Zellkern dar.



Abbildung 24: Lokalisation des Influenza A Proteins PB1-F2 nach Transfektion oder viraler Infektion

(1.Reihe) MDCK-Zellen wurden mit dem pBC12/CMV-PB1-F2 Expressionsvektor transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die Lokalisierung des exogenen PB1-F2 mit einem PB1-F2 spezifischen Kaninchen-Serum vorgenommen.

(2.und 3.Reihe) MDCK-Zellen wurden mit einem pCDNA3 Leervektor transfiziert und 24 h nach Transfektion mit 0,1 MOI PR8 infiziert. 14 h post Infektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das virale PB1-F2 Protein mit einem PB1-F2 spezifischen Kaninchen-Serum detektiert. Die Infektionskontrolle wurde mit einem NP-Antikörper durchgeführt.

#### 3.4.2. PB1-F2 Knockout-Mutanten

Um die biologische Relevanz von PB1-F2 zu untersuchen wurden mit Hilfe reversgenetischer Methoden zwei PR8-Virusmutanten erstellt, die das Protein nicht mehr exprimieren. Die Virusmutante PB1-F2C (im Folgenden mit F2C abgekürzt) besitzt eine Substitution im PB1-F2 Start-Codon. Eine zweite Mutante, genannt PB1- $2x\Delta F2$  (im Folgenden mit  $2x\Delta F2$  abgekürzt) besitzt zusätzlich zu der Startcodon-Mutation ein Stop-Codon nach 12 Aminosäuren (siehe Abbildung 25). Beide Mutanten wurden mit Hilfe des von Hoffmann et al. eingeführten 8-Plasmid-Systems zur Herstellung rekombinanter Influenza Viren generiert (Hoffmann et al. 2000).

Die Expression von PB1-F2 wurde im Western-Blot getestet. Wie in Abbildung 26 zu sehen, wird PB1-F2 sowohl nach transienter Expression der Wildtyp PB1 cDNA alleine, wie auch nach Infektion mit rekombinanten Wildtyp PR8 Virus exprimiert. Beide Deletionsmutanten zeigen keine PB1-F2 Expression, weder von der mutierten PB1 cDNA noch vom rekombinant hergestellten mutierten Virus (siehe Abbildung 26). Die Expression der viralen Proteine des RNP-Komplexes, wie PB1, PA oder NP blieb dabei sowohl bei Wildtyp-, als auch bei den Mutanten-Viren unverändert. Besonders wichtig ist, dass die Mutationen im PB1-F2 Leserahmen keine Veränderungen der PB1-Aminosäuresequenz verursachten. Dies wurde sowohl bei der Mutagenesestrategie berücksichtigt, als auch nach erfolgreicher Klonierung durch mehrfaches Sequenzieren der betroffenen Genabschnitte bestätigt. Da auch Mutationen die nicht zu einem Aminosäureaustausch führen, die Expression eines Proteins beeinflussen können (in funktionellen Bereichen, wie z.B. Promotor-Sequenzen), wurde die identische Expressionsstärke des PB1-Proteins der PB1-F2 mutierten Gene im Vergleich zum Wildtyp-Virus im Western-Blot bestätigt (siehe Abbildung 26).

-	-	1.4
D	•	1
-	D	
	-	

ATG GAT GTC AAT CCG ACC TTA CTT TTC TTA AAA GTG CCA GCA CAA AAT GCT ATA AGC ACA 60 1 DVNPTLLFLKVPAQNAIS VMSIRPYFS\*K<u>C</u>QHKML\* 20 1 1 W Q 20 ACT TTC CCT TAT ACT GGA GAC CCT CCT TAC AGC CATCOG ACA GGA ACA GGA TAC ACC ATG 120 61 Т P P Y D H 21 Т G S G Т G G Y Т Μ 40 S 1 1 F M 40 21 Т 1 10 A 121 GAT ACT GTAAC AGG ACA CAT CAG TAC TCA GAA AAG GGA AGA TGG ACA ACA AAC ACC GAA 180 NT 
 41
 D
 T
 V
 N
 R
 T
 N
 T
 E

 41
 I
 L
 S
 T
 G
 H
 I
 S
 T
 Q
 K
 R
 E
 D
 G
 Q
 Q
 T
 P
 K

 181
 ACT
 GGA
 GCG
 CAA
 CTC
 AAC
 CCG
 ATT
 GGG
 CCA
 CGA
 GAA
 GAA
 CAA
 CCA
 AGT
 60 60 240 Q L N P R N S T M G P L P P 80 61 Т G A Е D N P S Е R н 0 61 M 80 E H R N S T R L M G H C TAT GCC CAA ACA GAT TGT GTA TTG GAG GCG ATG GCT TTC CTT GAG GAA 241 GGT TCC CAT 300 Q T D C A M A R R W I R V L E 81 G F 100 L E S Ĥ S 81 100 301 GGT ATT TTT GAA AAC TCG TGT ATT GAA ACG ATG GAG GTT GTT CAG CAA ACA CGA GTA GAC 360 A M W E T K R Q 101 G V V Т R V D 120 E N S C 1 E Q F т 101 120

### PB1-F2

### F2C: ATG<sub>95</sub>→ACG (kein Start-Codon) 2x $\Delta$ F2: ATG<sub>95</sub>→ACG und TCA<sub>128</sub>→TGA (Stop)

#### Abbildung 25: Genomische Organisation von PB1-F2 Leserahmen und der PB1-F2 Knockout-Mutanten

PB1-F2 wird von einem alternativen Start-Codon (ATG) im +1 Leserahmen des PB1-Gens (dargestellt ist die Sequenz des Influenza A/PR8/34) exprimiert. Um die Proteinexpression von PB1-F2 zu unterbinden wurden zwei Virus Knockout-Mutanten hergestellt. Eine Mutante (F2C) besitzt kein Start-Codon für PB1-F2 (ATG<sub>95</sub> $\rightarrow$ ACG), die zweite Mutante hat zusätzlich zu der Start-Codon Mutation ein eingebautes Stop-Codon (TCA<sub>128</sub> $\rightarrow$ TGA) nach 12 Aminosäuren.

Für einige Experimente wurden mutierte PB1-Segmente des 8-Plasmid Systems für das Influenza Virus A/WSN/33 (H1N1) (im Folgenden mit WSN abgekürzt) verwendet. Mit Hilfe dieses Systems für das WSN Virus wurden analog zum PR8, PB1-F2 Knockout-Mutanten cDNA sowie rekombinante Viren hergestellt. Das WSN-Virus verfügt wie auch das PR8-Virus, über einen voll funktionsfähigen Leserahmen für das PB1-F2 Protein. Die Sequenz unterscheidet sich vom PR8 nur um lediglich fünf Aminosäuren im überlappenden Leserahmen und drei zusätzlichen Aminosäuren am C-Terminus des Proteins. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass der Nachweis vom WSN-PB1-F2 im Western-Blot mit dem zur Verfügung stehendem Antiserum (das spezifisch gegen das PR8 PB1-F2 hergestellt wurde), trotz hoher Sequenzähnlichkeit, nur mit sehr großen Proteinmengen aus infizierten Zellen gelang. Abbildung 26 (C) zeigt Western-Blots von MDCK-Zellen, die mit dem Wildtyp WSN sowie PB1-F2 Knockout Virusmutanten infiziert wurden. Während das Wildtyp-Virus PB1-F2 exprimiert, zeigen die Mutanten kein sichtbares Signal. Für die Detektion vom WSN PB1-F2 war allerdings die 4 bis 5-fache Proteinmenge im Vergleich zu PR8 infizierten Zellen nötig.





(A) 293 Zellen wurden mit Plasmiden für die Expression der Polymeraseuntereinheiten PA, NP, PB2, PB1 sowie des NP-Proteins von PR8 Virus, bzw. statt Wildtyp PB1, PB1 F2C oder PB1  $2x\Delta F2$ , transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, lysiert, die Proteine denaturiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Expression von PB1 und PB1-F2 (vom gleichen cDNA Konstrukt) wurde mit speziellen Antisera sichtbar gemacht. Die Ladekontrolle wurde mit einem ERK2-Antiserum gemacht. (B) MDCK-Zellen wurden mit 5 MOI des rekombinanten wt PR8, bzw. den PB1-F2 Knockout-Mutanten F2C und  $2x\Delta F2$  infiziert. Nach 7 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, lysiert, die Proteine denaturiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Ladekontrolle wurde mit einem ERK2-Antiserum gemacht. (C) MDCK-Zellen wurden mit 5 MOI WSN bzw. den PB1-F2 Knockout-Mutanten WSN 144 und WSN F2C infiziert und wie unter (B) beschrieben behandelt.

### 3.4.3. PB1-F2 kolokalisiert mit der viralen Polymeraseuntereinheit PB1 in Influenza Virus-infizierten Zellen

Exprimiert man exogenes PB1-F2 in Zellen, so wird ausschließlich eine zytoplasmatische Lokalisierung beobachtet. Um zu überprüfen, ob sich diese Lokalisierung ändert, wenn alle Proteine des Polymerasekomplexes von Influenza Viren in der Zelle vorhanden sind, wurden gleichzeitig Plasmide transfiziert, die die Proteine PB1, PB2, PA und NP exprimieren. Ebenfalls wurden in Kombination mit PB2, PA und NP die PB1-F2 Knockout-Mutanten von PB1 untersucht. Dabei wurde sowohl PB1-F2, das von der PB1-cDNA exprimiert wird betrachtet, wie auch zusätzlich in die Zellen transfizierte PB1-F2 cDNA. Die Immunfluoreszenz-Bilder zeigten keine Änderung der Lokalisierung von PB1-F2, PB1 oder NP im Vergleich zur Einzelexpression in transfizierten Zellen (nicht gezeigt). Auch die Kombination mit Knockout-Mutanten zeigte keine Änderung der Lokalisierung von PB1 und NP. Eine direkte Kolokaliesierung von PB1-F2 mit einem anderen Influenza Virus Protein konnte nicht festgestellt werden (nicht gezeigt).

Um dieses Ergebnis im Kontext einer Virusinfektion zu verifizieren, wurden Zellen mit PR8 infiziert und auf die Lokalisierung der Proteine PB1-F2 und PB1 untersucht. Dazu wurden Zellen sowohl mit einer hohen Multiplizität der Infektion (MOI=5) für 6h, wie auch mit einer niedrigen MOI (MOI=0,1) für 14 h infiziert. In diesem Ansatz betrachtet man bei einer hohen



Abbildung 27: PB1-F2 lokalisiert mit PB1 während der Virusinfektion

MDCK Zellen wurden mit dem PR8-Virus infiziert ((A) MOI=5, (B) MOI=0,1). 6 h (A) bzw. 14 h (B) nach Infektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die Lokalisierung von PB1-F2 und PB1 mit entsprechenden Antisera vorgenommen. Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI.

MOI bis ca. 8 – 10 h nach Beginn der Infektion synchronen Infektionsverlauf aller Zellen. Infiziert man dagegen mit einer geringen MOI, so hat man eine Zellpopulation, die verschiedene Stadien der Influenza Virus-Infektion zeigt.

Das Experiment zeigte, dass PB1-F2 mit dem PB1-Protein kolokalisieren kann. Die Kolokaliesierung konnte hauptsächlich im Zytoplasma, beobachtet werden (siehe Abbildung 27). Damit zeigt sich, dass eine bislang unerkannte weitere biologische Funktion von PB1-F2 möglicherweise mit dem viralen Polymerase-Komplex zusammenhängen könnte.

#### 3.4.3.1. Knockout-Virusmutanten von PB1-F2 zeigen verringerte Polymeraseaktivität

Um zu überprüfen, ob PB1-F2 einen Einfluss auf die Aktivität der viralen Polymerase besitzt, wurden die PB1-F2 Knockout Mutanten in einem Minigenom-Reportergen Assay untersucht. Dabei wurden HEK293-Zellen verwendet, in die transient einzelne Konstrukte für Proteine des viralen Polymerasekomplexes des Virusstamms WSN zusammen mit einem Luciferase-Reportergenkonstrukt transfiziert wurden (siehe Abbildung 28A). Das Reportergen in antisense Orientierung ist dabei flankiert von den viralen Promotorsequenzen. Durch die Anwesenheit von RNA Polymerase I Promotor- und Terinator-Sequenzen kann daher von diesem Konstrukt eine RNA gebildet werden, die dem Aufbau eines viralen RNA-Segmentes gleicht. Werden die viralen Polymeraseuntereinheiten und das Nukleoprotein in der Zelle



Abbildung 28: Knockout von PB1-F2 hat einen Einfluss auf die Aktivität der viralen WSN Polymerase

HEK293 Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die die einzelnen Proteine des Polymerasekomplexes vom WSN-Virus codieren. Die virale cDNA in diesen Plasmiden ist von RNA-Polymerase II Promotor- und Polyadenylierungs-Sequenzen flankiert. Gleichzeitig mit diesen Plasmiden wird in die Zellen ein Konstrukt transfiziert, das ein Reportergen (hier das Luciferasegen aus dem Leuchtkäfer *P.pyralis*) in negativer Orientierung trägt, flankiert von viralen RNA-Polymerase I Promotorbereichen. Dieses Konstrukt führt zu einer RNA-Polymerase I abhängigen Expression eines artifiziellen RNA-Segments von Influenza Viren (A) (siehe auch Anhang, Abbildung 44). Dadurch wird ein System etabliert, dass die Aktivität der viralen Polymerase indirekt messbar macht – je höher die Polymeraseaktivität, umso höher die Expression des Reportergens, das photometrisch quantifiziert wird. Um die Aktivität von PB1-F2 Knockout Mutanten mit dem Wildtyp zu vergleichen wurden anstelle des PB1wt Plasmids, PB1-Plasmide mit ausgeknocktem PB1-F2 ORF transfiziert. Die Aktivität der jeweiligen Konstrukte wurde als X-Fache Stimulation im Vergleich zu Zellen, die nur mit dem Reportergenkonstrukt transfiziert wurden, dargestellt (B).

koexprimiert, so kann dieses artifizielle RNA-Segment von der viralen Polymerase erkannt und transkribiert werden. Dies ist an der Expression des enthaltenen Reportergens Luciferase erkennbar, die nach Zugabe des Substrats Luciferin photometrisch erfasst werden kann. Die Höhe der gemessenen Substratumsetzung durch die Luciferase ist ein direktes Maß für die virale Polymeraseaktivität.

Verglichen wurde nun die Aktivität der viralen Polymerase mit Konstrukten, bei denen der Leserahmen von PB1-F2 mutiert wurde. Dabei wurden anstelle des wt PB1-Konstrukts die Plasmide PB1 (F2 144) und PB1 (F2 120C) in die Zellen transfiziert. Die Mutation im WSN-Konstrukt PB1 (F2 120C) entspricht dem PB1 F2C aus dem rekombinanten PR8-System, es enthält also eine Substitution im PB1-F2 Start-Codon ohne eine Veränderung der Aminosäuresequenz des PB1-Proteins herbeizuführen (siehe Abbildung 25). Das Konstrukt PB1 (F2 144) enthält ein durch Mutagenese eingeführtes zusätzliches Stop-Codon im PB1-F2 Leserahmen an der Position 144. Diese Mutation führt allerdings auch zu einem Aminosäureaustausch in der PB1 Aminosäure-Sequenz.

Wie man deutlich in der Abbildung 28 sehen kann, zeigten sich nach Transfektion des PB1 (F2 144) exprimierenden Konstrukts ähnliche Basalwerte, wie die Kontrollansätze bei denen nur das Reportergenkonstrukt transfiziert wurde, wobei hier nicht zu unterscheiden ist, ob die Änderung von PB1 oder PB1-F2 die Ursache für diese verringerte Polymeraseaktivität darstellt. Überraschenderweise zeigte die Start-Codon Mutante von PB1-F2 ebenfalls eine



#### Polymerasekomplexes

(A) HEK293-Zellen wurden mit Pol II Promotor Plasmiden transfiziert, die für die einzelnen Proteine des PR8-Polymerasekomplexes codieren, zusammen mit einem Pol I Luciferase-Reportergenkonstrukt. Um die Aktivität von PB1-F2 Knockout Mutanten mit dem Wildtyp zu vergleichen wurden anstelle des PB1wt Plasmids, PB1-Plasmide mit ausgeknocktem PB1-F2 ORF transfiziert (PB1 (F2C) und PB1 ( $2x\Delta F2$ )). Die Polymeraseaktivität der jeweiligen Konstrukte, gemessen an der Luciferaseaktivität entspricht, ist als X-Fache Stimulation im Vergleich zu Zellen, die nur mit dem Reportergenkonstrukt transfiziert wurden, dargestellt (**B**) A549-Zellen wurden mit einem Pol I Luciferase-Reportergenkonstrukt transfiziert und mit 5 MOI PR8 bzw. der PR8 PB1-F2 Knockout Mutante F2C sowie PR8  $2x\Delta F2$  infiziert. Die Polymeraseaktivität der Viren ist als x-fache Stimulation zur uninfizierten, mit Reportergen transfizierten Kontrolle dargestellt.
stark verminderte Polymeraseaktivität, wobei hier keine Veränderungen in der PB1-Sequenz zu verzeichnen war.

Dies bedeutet, dass der beobachtete Effekt alleine auf die Deletion des PB1-F2 Proteins zurück zu führen ist. Dadurch liegt der Schluss nahe, dass PB1-F2 ein Kofaktor des viralen Polymerasekomplexes ist, bzw. eine Rolle bei der Expression viraler Proteine spielt.

Um das Ergebnis zu verifizieren, wurde das Experiment mit der PR8-Polymerase, sowie im Kontext einer Infektion mit rekombinanten Viren wiederholt. Dabei zeigte sich das gleiche Bild. Die Aktivität der viralen Polymerase der Knockout Mutanten im Plasmid-System wie auch in virusinfizierten Zellen war mindestens über 50% geringer im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 29 A und B).

### 3.4.3.2. PB1-F2 interagiert direkt mit der viralen Polymeraseuntereinheit PB1

Der Knockout von PB1-F2 zeigt im Minigenom-System einen Einfluss auf die Aktivität der viralen Polymerase. Damit stellt sich die interessante Frage, ob PB1-F2 mit dem viralen Polymerase-Komplex interferriert. Wenn dies der Fall ist, könnte PB1-F2 mit einem oder mehreren Proteinen aus dem Komplex direkt interagieren. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden Koimmunpräzipitations-Experimente durchgeführt, um einen potentiellen Interaktionspartner primär unter den Proteinen des viralen Polymerasekomplexes, ferner unter weiteren Influenza Virus Proteinen zu identifizieren.

Um potentielle Interaktionspartner zu finden, wurden MDCK-Zellen mit PR8 infiziert (MOI=5) und 7 h nach Infektionsbeginn lysiert. Das PB1-F2 Kaninchen-Serum (gekoppelt an Protein G-Beads) wurde benutzt, um das Peptid zu präzipitieren. Als potentielle Interaktionspartner wurden im Western-Blot die Influenza Virus Proteine PA, PB1, NP, und M untersucht.

Das Ergebnis ist in der Abbildung 30 zusammengefasst. Wie man deutlich sehen kann, sind alle untersuchten Proteine in den Lysaten der infizierten Zellen in ausreichenden Mengen vorhanden. Von allen untersuchten Influenza Virus Proteinen konnte nur die Polymeraseuntereinheit PB1 zusammen mit PB1-F2 koimmunpräzipitiert werden.

Dieses Ergebnis ist überraschend, da PB1-F2 ein Produkt eines alternativen Leserahmens von PB1 ist und nur mit PB1 interagiert, aber nicht mit PA oder NP. Eine mögliche Erklärung ist, dass PB1-F2 nur mit dem freien PB1-Protein interagiert, aber nicht mit PB1, das in einem Komplex mit PA und PB2 die virale Polymerase darstellt. Dabei zeigen die Kontroll-Präzipitationen, dass die Proteine NP, PB1 und PA in einem Komplex vorliegen.





MDCK-Zellen (1x10<sup>7</sup>) wurden mit PR8 infiziert (MOI=5) und 7 h nach Infektion lysiert. Die Lysate wurden für Koimmunpräzipitationen mit Hilfe des PB1-F2 Kaninchen-Serums eingesetzt. Zusätzlich wurden als Kontrolle PB1 und PA mit NP sowie PB1 sowie PA mit PB1 koimmunpräzipitiert.

Als weitere Kontrollen wurden jeweils Protein G-Beads ohne Antiserum- bzw. Antikörper-Zugabe sowie uninfizierte MDCK-Zellen, mit bzw. ohne Antiserum bzw. Antikörper, eingesetzt. Die Inkubation der Lysate mit bzw. ohne Antiserum erfolgte über Nacht, danach wurden die Beads gewaschen, das Präzipitat denaturiert und für Western-Blot eingesetzt. Zum Nachweis von möglichen Interaktionen wurden die Antikörper gegen NP, PA und M sowie Antisera gegen PB1 und PB1-F2 (als Kontrolle) benutzt. Die Ladekontrolle der Lysate erfolgte mit einem ERK-1/2 Antiserum.

Um das Ergebnis zu verifizieren und um zu überprüfen, ob die Interaktion von PB1 und PB1-F2 direkt oder indirekt ist, wurden Hefe Two-Hybrid Tests durchgeführt. Dazu wurden die Proteine PB1 und PB1-F2 jeweils an eine Gal4-DNA-Bindedomäne (BD) und eine Gal4-Transaktivierungsdomäne (AD) fusioniert. Als Reportergen wurde das *lacZ* Gen benutzt. Findet eine Interaktion zwischen den Fusionsiosproteinen statt, so kann das *lacZ* Genprodukt ß-Galactosidase das Substrat X-Gal umsetzen, was zu einer leicht erkennbaren Blaufärbung führt (siehe 2.2.6.4). Da vom PB1-Gen ebenfalls PB1-F2 exprimiert wird (siehe Abbildung 25) wurde ein BD- sowie AD-Konstrukt mit drei eingebauten Stop-Codons (pACT2\_PB1( $\Delta$ F2) und pAS2-1\_PB1( $\Delta$ F2)) benutzt um eine Expression von unfusioniertem PB1-F2 zu unterbinden.

Das Ergebnis der Two-Hybrid-Untersuchung ist in Abbildung 31 zusammengefasst. PB1-F2 interagiert mit PB1, was man deutlich an der Blaufärbung, dass bei der Umsetzung von X-Gal durch β-Galactosidase entsteht, erkennen kann. Die Interaktion funktioniert wechselseitig im Hintergrund der beiden Vektoren, Gal4BD-PB1-F2 mit GalAD-PB1 (Abbildung 31-1), wie auch Gal4BD-PB1 mit GalAD-PB1-F2 (Abbildung 31-4). Auch eine Interaktion von Gal4BD-PB1-F2 und GalAD-PB1-F2 wurde nachgewiesen (Abbildung 31-7). Dies ist eine Bestätigung früherer Studien, wonach PB1-F2 Dimere wie auch Multimere bilden kann (Chen et al. 2001; Henklein et al. 2005; Zamarin et al. 2006). Die Hefe Two-Hybrid Untersuchung bestätigt die Ergebnisse der Koimmunpräzipitation und zeigt darüber hinaus, dass die Interaktion von PB1-F2 und PB1 direkt ist.



Abbildung 31: PB1-F2 interagiert direkt mit PB1 im Hefe Two-Hybrid Experiment

S. cerevisiae Y190 wurden mit den Gal4-DNA-Bindedomänen- und Gal4-Transaktivierungsdomänen-Konstrukten von PB1-F2 und PB1 (wird als PB1( $\Delta$ F2) bezeichnet, exprimiert kein unfusioniertes PB1-F2, durch Einbau von drei Stop-Codons in den alternativen Leserahmen von PB1) sowie mit den jeweiligen Leervektoren, transformiert. Die Zellen wurden bei 30°C inkubiert und auf einem, mit X-Gal getränktem Filterpapier ausgestrichen.

#### 3.4.3.3.Knockout von PB1-F2 hat keinen Einfluss auf Virentiter

Knockout von PB1-F2 zeigt eine verringerte Aktivität der viralen Polymerase. Dies sollte zu einer verringerten Expression viraler Proteine und zu geringeren Virustitern führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden MDCK- sowie A549-Zellen mit den rekombinanten Viren PR8, PR8 F2C und PR8 2xAF2 mit jeweils gleicher MOI (=0,01) infiziert. In Vorversuchen wurden die Virentiter für die Infektionen mehrfach überprüft. Die Zellen wurden infiziert, die Überstände gesammelt und die Virentiter wieder mittels Plaque-Assay genau bestimmt. Mit diesen Überständen wurden nochmals Zellen infiziert, die Virustiter abermals bestimmt und für eine weitere Infektionsrunde benutzt. Damit wurde sichergestellt, dass mögliche Unterschiede in den zu bestimmenden Nachkommenvirus-Titern zwischen den drei Virusvarianten, nicht auf eine ungenaue Bestimmung der Anzahl der Ausgangs-Viruspartikel zurück zu führen sind. Beim Vergleich zwischen wt PR8 und den PB1-F2 Deletionsmutanten konnten überraschenderweise keine Unterschiede in der Anzahl der infektiösen Viruspartikel festgestellt werden (siehe Abbildung 32). Der Knockout von PB1-F2 hat folglich keinerlei Einfluss auf die Vermehrung des Influenza Virus unter den gewählten experimentellen Bedingungen. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnissee früherer Studien anderer Arbeitsgruppen (Chen et al. 2001).



Abbildung 32: Knockout von PB1-F2 hat keinen Einfluss auf die Höhe der Virentiter

MDCK-,A549- und MCF-7-Zellen wurden mit den rekombinanten PR8 und den PB1-F2 Deletionsmutanten PR8 F2C sowie PR8 2xΔF2 infiziert (MDCK und A549, MOI=0,01; MCF-7, MOI=0,5). Nach 7, 24 und 36 h wurden die Überstände abgenommen und die Virustiter im Plaque-Assay auf MDCK-Zellen bestimmt.

### 3.4.3.4.Knockout PB1-F2 zeiget einen Einfluss auf die Plaques-Morphologie

Der Knockout von PB1-F2 beeinflusst die Aktivität der viralen Polymerase, scheint aber keinen Einfluss auf die Höhe der Virustiter zu besitzen. Um diese widersprüchlichen Befunde zu erklären, wurde zunächst die -Morphologie der Virus-Plaques im MDCK-Zellrasen untersucht. Eine geänderte Plaques-Größe bzw. -Morühologie gibt auf einfache Weise eine Auskunft über ein verändertes Infektionsverhalten desVirus.

Um eine Auswirkung des PB1-F2-Knockouts auf die Morphologie der Virus-Plaques zu untersuchen, wurden jeweils MDCK-Zellen (Zellzahl je 4x10<sup>6</sup>) mit Verdünnungsstufen des rekombinanten PR8, sowie den PB1-F2 Knockout Mutanten F2C und 2xAF2 infiziert. Nach



Abbildung 33: Knockout von PB1-F2 beeinflusst die Morphologie der Virus-Plaques auf MDCK-

### Zellrasen

MDCK-Zellen wurden mit verdünnten Virusüberständen der PR8 Stämme: PR8 Wildtyp, rekombinanter PR8 Wildtyp sowie den PB1-F2 Knockout-Mutanten PR8 F2C und PR8 2xAF2 für 30 min bei 37°C infiziert, gewaschen und mit einem Agar-Overlay überschichtet. Nach 24 h wurde der Agar entfernt und die Zellen mit Coomassie-Blau gefärbt (die Bilder wurden zwecks besserer Übersicht invertiert). Die dargestellten Bilder zeigen nicht die gleiche Verdünnungsstufe der jeweiligen Viren.

24 h Inkubation wurden die Zellen mit Coomassieblau angefärbt und die Plaque-Morphologie des rekombinanten PR8 mit den PB1-F2 Knockout Mutanten vergleichen. In der Abbildung 33 ist das Ergebnis dargestellt – die Plaques, die die Knockout-Mutanten im MDCK-Zellrasen gebildet haben sind deutlich kleiner, als die Plaques des rekombinanten PR8 und des Wildtyp PR8. Dieser Befund könnte mit den gefundenen verringerten Polymeraseaktivitäten korrelieren. Allerdings stellt sich dann die Frage, warum die Virustiter nicht verändert sind. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Knockout-Mutanten einen geringeren zytopatischen Effekt auf die infizierten Zellen ausüben, als die Wildtyp-Viren, die deutlich größere Plaques im Zellrasen verursacht haben.



Abbildung 34: Knockout von PB1-F2 beeinflusst nicht die Virus-verursachte Zell-Mortilität

MDCK-Zellen (jeweils  $2x10^6$  Zellen) wurden mit den rekombinanten PR8 (PR8r) sowie den PB1-F2 Knockout-Mutanten PR8 F2C und PR8  $2x\Delta F2$  (jeweils 0,5 MOI) infiziert. Nach 14 bzw. 24 h wurden die Zellen gesammelt, mit PBS gewaschen und mit 50 µg/ml Propidiumiodid (in PBS gelöst) für 30 min inkubiert. Und im FACS gemessen. Die Graphik zeigt Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen aus jeweils drei unabhängigen Infektionen.

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Effekt darauf zurück zu führen ist, dass die Knockout-Mutanten die Zellen langsamer töten, als das wt Virus, wurden MDCK-Zellen mit den rekombinanten PR8-Virus sowie mit den PB1-F2 Knockout-Mutanten PR8 F2C und PR8  $2x\Delta F2$  (jeweils 0,5 MOI) infiziert. Nach 14 und 24 h wurde eine PI-Färbung vorgenommen, um die Anzahl der durch das Virus abgetöteten Zellen zu erfassen und miteinander zu vergleichen. Es zeigte sich aber, dass die Anzahl der durch die jeweiligen Viren abgetöteten Zellen keine signifikanten Unterschiede zeigte (siehe Abbildung 34). Um nachzuweisen, ob die Zahl der infizierten Zellen nach Infektion mit den PB1-F2 Knockout-Viren größer ist, als die sichtbaren Bereiche lysierter Zellen, wurde eine NP-Immunfluoreszenz von Zellen, die mit Verdünnungsreihen der Virusüberstände infiziert wurden, durchgeführt. Dieses Experiment sollte geeignet sein, um zu erkennen, ob die infizierten Zellen im Randbereich der Plaques in der Knockout-Situation zu einem größeren Maß infiziert sind. Es zeigte sich aber, dass der durchschnittliche Durchmesser von infizierten Zell-Plaques bei den PB1-F2 Knockoutviren insgesamt geringer war, als beim rekombinanten wt PR8 (siehe Abbildung 35).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass entgegen der ursprünglichen Annahme, dass der Knockout den zytopatischen Effekt beeinflusst, eher direkt die Ausbreitung der PB1-F2 Knockout-Viren beeinflusst ist.



Abbildung 35: Knockout von PB1-F2 führt zu einer langsameren Ausbreitung des Virus

MDCK-Zellen wurden mit verdünnten Virusüberständen der rekombinanten PR8 (PR8r), sowie den PB1-F2 Knockout-Mutanten PR8 F2C und PR8 2xΔF2 für 30 min bei 37°C infiziert, gewaschen und mit einem Avicell-Plaquemedium-Overlay überschichtet. Nach 14 h wurde der Agar entfernt und die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen das NP-Protein gefärbt. Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Plaques wurden ausgezählt und der ungefähre Durchmesser ermittelt. Die ersten Studien zu PB1-F2 zeigten, dass das Peptid an der virusinduzierten Apoptose beteiligt ist (Chen et al. 2001). Die unterschiedliche Plaques-Morphologie ist möglicherweise ein Effekt des Knockouts von PB1-F2 auf die Induktion der Apoptose.

Um diese Frage zu beantworten, wurde die Caspasen-Aktivität nach Virusinfektion mit rekombinanten PR8 und den PB1-F2 Knockout-Mutanten F2C, sowie 2xΔF2 anhand der PARP-Spaltung verglichen. Es zeigte sich, dass alle drei Viren gleich stark Caspasen-Aktivität bzw. Apoptose induzierten. Der direkte Vergleich zeigte keine relevanten Unterschiede in der Spaltung des Caspasen-Substrats PARP-1. Ebenfalls wurden in diesem Kontext keine Unterschiede in der Expression viraler Proteine PB1 und NP festgestellt, was zeigt, dass der Infektionsverlauf sowie Höhe der Proteinexpression aller drei Virusisolate annähernd gleich war (siehe Abbildung 36 und Abbildung 37).

Die Immunfluoroszenz-Kinetik in Abbildung 37 zeigt darüber hinaus deutlich, dass der Knockout von PB1-F2 keinerlei Auswirkung auf die Lokalisation des NP im zeitlichen Verlauf der Infektion hat.



Abbildung 36: Knockout von PB1-F2 zeigt keinen Effekt auf die virusinduzierte Apoptose

MDCK-Zellen  $(2x10^6)$  wurden mit rekombinanten PR8 (PR8r), F2C und  $2x\Delta F2$  infiziert (jeweils mit MOI=1). 16 und 24 h nach Infektion wurden die Zellen lysiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Als Apoptose-Kontrolle wurden Zellen mit 0,5  $\mu$ M Staurosporin behandelt. Die virusinduzierte Caspasen-Aktivität wurde anhand der Spaltung von PARP-1 untersucht. Die Kontrolle der Infektion mit den jeweiligen Virusstämmen wurde mit anti-NP Antikörper bzw. anti-PB1 Serum dargestellt. Die äquivalente Proteinbeladung wurde mit Hilfe des ERK-2 Nachweises gezeigt.

Das NP wird ca. 2-3 h nach Infektionsbeginn gebildet und ist zunächst im Zytoplasma lokalisiert (nicht gezeigt). Danach wird es in den Zellkern transportiert, wo es zu Assemblierung und Akkumulierung von viralen RNP's kommt. Nach ca. 7 h sind die RNP's aus dem Zellkern heraustransportiert und in neue Viren verpackt – dieser Prozess wird durch den Knockout von



Abbildung 37: Knockout von PB1-F2 zeigt keinen Effekt auf den Verlauf einer Infektion mit PB1-F2 Knockoutviren im Vergleich zum wt Virus

MDCK-Zellen  $(1x10^6)$  wurden mit rekombinanten PR8 (PR8r), F2C und  $2x\Delta F2$  infiziert (jeweils mit MOI=40). 3 (nicht gezeigt), 5 und 7 h nach Infektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die Lokalisierung von PB1-F2 und NP mit entsprechenden Antisera bzw. Antikörpern vorgenommen. Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI PB1-F2 nicht gestört. Dies bedeutet, dass die auftretenden Unterschiede in der Plaque-Morphologie weder auf unterschiedlichen Infektionsverlauf bzw. ungleiche Ausgangs-MOI, noch auf unterschiedliche starke Induktion der Apoptose, noch auf einen verminderten zytopatischen Effekt, zurück zu führen sind.

## 3.4.3.5. Veränderte Lokalisierung des PB1-Proteins in mit den PB1-F2 Knockout-Viren infizierten Zellen

Die Akkumulation viraler Proteine in Zellen, die mit PB1-F2 Knockout-Viren infiziert wurden, scheint im Vergleich zum Wildtyp-Virus nicht verändert zu sein. Alle Viren verhielten sich in Bezug auf die virale Proteinsynthese und die Höhe der Virustiter gleich. Nichtsdestotrotz resultierte der Knockout von PB1-F2 in verminderter Aktivität der viralen Polymerase (siehe Abbildung 28 und Abbildung 29). Ebenfalls zeigte sich, dass PB1-F2 mit





#### im Vergleich zum wt Virus geändert

MDCK-Zellen  $(2x10^5)$  wurden mit rekombinanten PR8 (A) sowie den PB1-F2 Knockout-Viren F2C (B) und  $2x\Delta F2$  (C) infiziert (jeweils mit MOI=10). 5 und 7 h nach Infektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die Lokalisierung von PB1 mit einem PB1-spezifischen Kanninchen-Serum überprüft. Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI.

freiem PB1 interagieren kann (siehe Abbildung 30). Diese Befunde werfen die Frage auf, ob die Lokalisierung des PB1-Proteins in PB1-F2 Knockout-Viren infizierten Zellen im Vergleich zum wt Virus geändert ist.

Um dies zu überprüfen, wurden MDCK-Zellen mit dem rekombinanten PR8 Virus, sowie mit den PB1-F2 Knockout-Viren F2C und  $2x\Delta F2$  mit einer hohen MOI (=10) für 5 und 7 h infiziert und die Lokalisierung von PB1 in der Immunfluoreszenz überprüft (siehe Abbildung 38). Es zeigte sich, dass 5 h nach Infektion die Lokalisierung von PB1, wie auch NP (nicht gezeigt) bei allen Viren unverändert blieb. Dies bedeutet, dass die Akkumulation der neu gebildeten RNP-Komplexe in den Zellkernen infizierter Zellen bei allen drei Viren gleich war.

7 h nach Beginn der Infektion wurde allerdings eindeutig sichtbar, dass die Lokalisierung von PB1 in Zellen, die mit Viren infiziert wurden, die kein PB1-F2 exprimierten im Vergleich zum rekombinanten wt Virus verändert war. In Abbildung 38 ist eindeutig zu sehen, dass 7 h nach Beginn der Infektion das PB1 von wt Virus im Zellkern lokalisiert ist, während in Zellen, die mit den Knockout-Viren infiziert wurden, das PB1-Protein im Zytoplasma akkumuliert.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass PB1-F2 eine Rolle für die nukleäre Lokalisierung bzw. für den Zellkern-Export von PB1 spielt. Diese Störung der PB1-Lokalisierung in den Knockout-Viren könnte somit auch die beobachtete Verminderung der viralen Polymeraseaktivität erklären, die darauf zurück zu führen ist, dass PB1, das die essentielle Polymeraseuntereinheit darstellt, zu früh aus dem Zellkern exportiert wird.

### 3.4.3.6. Überexpression von PB1-F2 führt zur starken IRF-3- und IFNβ-

### Promotoraktivität während Influenzainfektionen

Wird PB1-F2 in Zellen überexprimiert, so ist die Lokalisierung ausschließlich zytoplasmatisch bzw. mitochondrial (siehe Abbildung 24, 1.Reihe). Übereinstimmend mit neueren Literaturdaten zeigt die Überexpression vom exogenen PB1-F2 alleine keinen modulierenden Einfluss auf die virusinduzierte Apoptose (nicht gezeigt). Dennoch wurde ein überraschender Effekt der Überexpression auf einen anderen Signalweg beobachtet. Infizierte man PB1-F2 exprimierende Zellen mit Influenza Virus, so führte dies zu einer sehr starken Stimulation der IRF-3- und IFNβ-Promotoraktivitäten (siehe Abbildung 39).

Dies indiziert, dass abberate Expression von PB1-F2 in Kombination mit Virusinfektion *in vitro* zu einer starken Stimulation der antiviralen Antwort führt. Diese INFß-Aktivität ist wahrscheinlich ein artifizieller Effekt und nur in Verbindung mit der Überexpression von

PB1-F2 zu beobachten, die Deletion des PB1-F2 ORFs alleine führte zu keiner geänderten Stimulation von IFNβ. Zudem wurde in PB1-F2 exprimierenden und Virus-infizierten Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen keine Änderung der Virustiter festgestellt (nicht gezeigt). Dennoch scheinen diese Daten auf eine bislang unbekannte zelluläre Funktion des Peptids hinzudeuten.



Abbildung 39: Überexpression von PB1-F2 führt in Influenza-infizierten Zellen zu starker Stimulation von IRF-3- und INFB-Promotoraktivitäten.

MDCK- (A, C)  $(4x10^5)$  bzw. A549-Zellen (B, D)  $(1x10^5)$  wurden mit den Luciferase-Reportergenkonstrukten IRF-3 (A, B) bzw. INF $\beta$  (C, D) transfiziert. Zusätzlich erfolgte eine Kotransfektion mit dem PB1-F2 Überexpressionskonstrukt pB12 CMV/PB1-F2 (wie angezeigt). 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 5 MOI PR8 infiziert, bzw. uninfiziert belassen (wie dargestellt). Nach 7 h p.I. wurden die Zellen lysiert und die Zell-Lysate für Luciferase-Assay eingesetzt (siehe 2.2.6.1).

## 4. Diskussion

## 4.1. Acetylsalicylsäure blockiert Influenza Virus-Vermehrung über die Inhibition des NF-κB Signalweges

Seit den beängstigenden schweren Infektionsverläufen durch Influenza Viren vom Subtyp H5N1 beim Menschen, welche vom Beginn des Auftretens dieser Virus-Linie sporadisch immer wieder vorkommen, ist es deutlich geworden, dass es derzeit keine ausreichende und flächendeckende Vorbereitung gegen eine mögliche Pandemie gibt. Eine Pandemie, wie die Spanische Grippe 1918/19, würde heute in betroffenen, bevölkerungsreichen Ländern in Asien wahrscheinlich noch mehr Menschenleben kosten als vorangegangene Pandemien. Aus den "Vogelgrippe-Vorfällen" wird deutlich, dass eine Vakzinierungsstrategie initial keinen ausreichenden Schutz gegen neue Influenza Virus-Varianten darstellen kann – die Entwicklung dauert mehrere Monate, eine Zeit, die bereits infizierte Menschen nicht haben. Ein billiges und schnell erhältliches Medikament, das die Influenza Virus-Vermehrung hemmt, ist eine ideale Lösung gegen akute Infektionen.

Das Problem der schnellen Anpassung des Virus durch Bildung resistenter Varianten hat in der Vergangenheit dazu geführt, dass es nur wenige Alternativen der medikamentösen Behandlung von Influenzainfektionen gibt. Medikamente auf Basis von Amantadin sind gegen die meisten Influenzavarianten nicht mehr wirkungsvoll (Hayden und Hay 1992). Speziell besitzen mehr als 95% der asiatischen H5N1 Subtypen zwei Mutationen im M2-Protein (L26I und S31N), welche sie gegen Amantadin resistent machen (Cheung et al. 2006; Hurt et al. 2007). Zudem wirkt diese Substanz nur, wenn sie zu Beginn einer Infektion verabreicht wird. Auch gegen die neuen Neuraminidase-Inhibitoren wurden bereits die ersten resistenten Varianten gemeldet (Kiso et al. 2004; de Jong et al. 2005).

In dieser Arbeit wird eine neue Strategie zur Bekämpfung des Influenza Virus vorgeschlagen – die Hemmung zelleigener Faktoren, die das Virus für die eigene Replikation benötigt. Dieser neuartige antivirale Ansatz wurde gut in Hinsicht auf die Hemmung des Raf/MEK/ERK Signalweges untersucht (Pleschka et al. 2001; Ludwig et al. 2004).

Die Aktivierung des NF-κB-Signalweges lässt sich durch verschiedene Ansätze hemmen. Unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass freie Radikale den NF-κB-Signalweg aktivieren (Schreck et al. 1991). So besteht die Möglichkeit, durch den Einsatz von Anti-Oxidantien, die Aktivierung des NF-κB-Signalweges zu hemmen (Suzuki und Packer 1993; Piette et al. 1997).

Als Ansatzpunkt kann auch der proteolytische Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Inhibitor-Moleküls durch Inhibierung des Proteasoms bzw. der Proteasen verwendet werden (Palombella et al. 1994; Higuchi et al. 1995).

Eine weitere Möglichkeit, die den Kernpunkt dieser Arbeit darstellt, ist die direkte Hemmung der IKK-Kinaseaktivität mit Acetylsalicylsäure (ASA). Über eine antivirale Wirkung von ASA wurde bereits vor vielen Jahren berichtet (Huang und Dietsch 1988), die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen waren aber bislang völlig unklar. Erst später wurde herausgefunden und dann eingehender untersucht, dass ASA und abgeleitete Derivate die IKK $\beta$ -Kinase und somit den NF- $\kappa$ B Signalweg hemmen (Kopp und Ghosh 1994; Frantz und O'Neill 1995; Yin et al. 1998). Dabei inhibieren ASA und andere Salicylate nicht die sehr ähnliche, aber weniger aktive Kinase IKK $\alpha$  (Kwak et al. 2000).

Untersuchungen der Rolle des NF- $\kappa$ B-Signalweges bei der Influenza Virusreplikation zeigte überraschenderweise, dass der NF- $\kappa$ B Signalweg keine prädominant antivirale bei Influenza Virus hat, sondern notwendig für die Virusreplikation ist (Nimmerjahn et al. 2004; Wurzer et al. 2004).

Ein Initialexperiment der vorliegenden Arbeit unterstützt und bestätigt diese Beobachtungen. In HEK293-Zellen, die transient mit einer siRNA gegen die RNA der p65-Untereinheit von NF- $\kappa$ B transfiziert wurden, wurde eine signifikant geringere Replikation des Influenza Virus beobachtet (siehe Abbildung 7 B). Auch die Behandlung von infizierten Zellen mit Substanzen, welche den NF- $\kappa$ B-Signalweg hemmen, wie ASA oder BAY 11-7085, führten eindeutig zu einer Hemmung der Virusreplikation. Gleichzeitig war die Hemmung von NF- $\kappa$ B durch ASA im Konzentrationsbereich von 5-7 mM sehr spezifisch. Die kombinatorische Behandlung von infizierten Zellen mit ASA und einem bekannten NF- $\kappa$ B-Inhibitor BAY 11-7085 führte zu keiner synergistischen Verstärkung des antiviralen Effekts im Vergleich zur Behandlung mit den einzelnen Substanzen (siehe Abbildung 13). Dies lässt sich dahin gehend interpretieren, dass der Wirkmechanismus von beiden Substanzen größtenteils identisch ist und somit keine synergistischen Effekte auftreten, bedingt durch eine eventuelle zusätzliche inhibitorische Kapazität auf andere Zielstrukturen in der Zelle. Darüber hinaus hatte die Behandlung mit ASA

in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf andere zelluläre Signalwege, wie ERK-1/2, JNK-1 und p38 (siehe Abbildung 12).

Auch in Verbindung mit anderen pathogenen Organismen, die NF- $\kappa$ B-Aktivität induzieren, wurde ein hemmender Einfluss auf die Vermehrung durch NF- $\kappa$ B Inhibierung beobachtet. Behandelte man *Chlamydia pneumoniae* infizierte Zellen mit Aspirin, so wurde ein starker, konzentrationsabhängiger Effekt auf das Chlamydien-Wachstum beobachtet, der mit einer geringeren Anzahl intrazellulärer Chlamydien-Enschlüsse und verringerter Anzahl an Erregern einherging (Tiran et al. 2002; Yoneda et al. 2003).

Mit der gegebenen Wirkung von ASA auf NF- $\kappa$ B zeigte sich in den durchgeführten Experimenten deutlich und übereinstimmend mit früheren Publikationen, dass der NF- $\kappa$ B-Signalweg eine sehr wichtige Rolle im Vermehrungyzyklus des Influenza Virus spielt. Die Frage stellt sich aber: wie unterstützt dieser zelluläre, eigentlich antiviraler Signalweg die Replikation des Influenza Virus?

Eine vorangegangene Studie hat gezeigt, dass im Kontext einer Influenzainfektion die Expression der proapoptotischen Faktoren Fas/FasL und TRAIL, welche in einem auto- und parakrinen Mechanismus die Caspasen-Aktivierung induzieren, unter der Kontrolle des IKKβ/NF-κB Moduls steheb. Eine Hemmung von Caspasen mit Pan-Caspasen Inhibitor Z-DEVD-FMK oder siRNA gegen Caspase-3 mRNA resultiert in infizierten Zellen in geringeren Virustitern (Wurzer et al. 2004). Es ist darüber hinaus bekannt, dass sich das Influenza Virus nicht in MCF-7 Zellen (Brustkarzinom-Zellen) vermehren kann, die Caspase-3 defizient sind (Janicke et al. 1998; Kurokawa et al. 1999). Retransfiziert man diese Zell-Linie mit Caspase-3 cDNA, so erhöht sich ihre Suszeptibilität für das Influenza Virus dramatisch (Wurzer et al. 2004).

Die Exprimente dieser Arbeit zeigen, dass die Hemmung von NF- $\kappa$ B mit ASA die Induktion virusinduzierter Apoptose vermindert. Dies belegt durch eine gehemmte Caspase-3 Aktivierung und PARP-Spaltung, welche Caspasen-Aktivität indiziert. Gleichzeitig zeigt sich im Nicoletti-Assay, dass die virusinduzierte Apoptoserate insgesamt gehemmt wird. Ebenso führt die Hemmung von NF- $\kappa$ B durch ASA zu einer verminderten Expression von proapoptotischen Faktoren FasL und TRAIL, was die beobachteten Effekte auf die Apoptose erklärt (Mazur et al. 2007). Diese Daten belegen, dass der NF- $\kappa$ B-Signalweg in Zusammenhang mit Apoptose-Regulation eine Rolle bei der Influenzareplikation spielt. Welcher Schritt der Virusreplikation benötigt nun NF- $\kappa$ B-vermittelte Apoptose und Caspasen-Aktivität?

Es wurde durch frühere Studien belegt, dass die Aktivierung der Caspasen eine wichtige Rolle für den Export der viralen Ribonukleoproteinkomplexe aus dem Zellkern spielt. Die Hemmung von Caspase-3 führt zu einer Retention der RNP-Komplexe im Zellkern (Wurzer et al. 2003). Ähnliches Verhalten wurde in Caspase-3 defizienten MCF-7 Zellen beobachtet. Dabei scheint es sich um einen passiven Mechanismus in späten Phasen der Virusreplikation zu handeln. Die Behandlung mit Leptomycin B, einer Substanz, die den aktiven Kerntransport hemmt, zeigte nach Stimulation mit Apoptose-Induktoren keine Auswirkung auf die Verteilung von RNPs zwischen Zellkern und Zytoplasma (Wurzer et al. 2003). Auch der Raf/MEK/ERK Signalweg, welcher an dem aktiven Export der RNP-Komplexe beteiligt ist (Pleschka et al. 2001) und der Caspase-3 Weg scheinen sich nicht gegenseitig zu beeinflussen. Die Hemmung des Ersteren hat keinen Einfluss auf die Caspasen-Aktivität (Wurzer et al. 2003).

Die Hemmung von NF- $\kappa$ B mit ASA resultiert ebenfalls in einer Retention der RNP-Komplexe im Zellkern im Vergleich zu unbehandelten Zellen (siehe Abbildung 17). NF- $\kappa$ B-Hemmung durch ASA hatte keinen Einfluss auf die Synthese viraler Proteine (siehe Abbildung 16). Dies zeigt, dass der Signalweg nicht mit der Transkription oder Translation viraler Proteine interferiert, sondern alleine den RNP-Export aus dem Zellkern vermittelt.

Eine Hypothese besagt, dass freie Diffusion aus dem Zellkern (oder in den Zellkern hinein), unabhängig von dem aktiven Transportmechanismus, durch Abbau von Kernporenproteinen, und somit der Vergrößerung der Kernporen, unterstützt wird. Eine Arbeit zeigte, dass Caspase-9 Aktivität zur Vergrößerung von Kernporen beiträgt, indem sie Proteine der Kernporenkomplexe abbaut, was die Diffusion von größeren Molekülen in den Zellkern ermöglichen könnte (Faleiro und Lazebnik 2000). Weitere Studien untermauern diese Hypothese, indem sie zeigten, dass Caspasen spezifisch die Kernporenproteine Nup93, Nup96 (Patre et al. 2006), Nup153, Nup214, RanBP2 und Tpr (Ferrando-May et al. 2001) spalten. Eine erhöhte nukleäre Permeabilität nach Apoptoseinduktion (Roehrig et al. 2003), sowie erhöhter Import von Makromolekülen (Kihlmark et al. 2004) wurden berichtet. Dieser Mechanismus könnte auch dafür sorgen, dass so große Makromoleküle, wie die viralen RNP-Komplexe, aus dem Zellkern nach Apoptoseinduktion besser exportiert werden könnten. Dies bedeutet, dass das Influenza Virus die Caspasen-Aktivität benötigt, um die RNP-Komplexe aus dem Zellkern heraus zu transportieren. Dabei muss es sich um einen Vorgang handeln, der zusätzlich zu dem aktiven Zellkernexport stattfindet, welcher mit Hilfe der viralen M1- und NS2/NEP-Proteine abläuft. Die Proteine des RNP-Komplexes besitzen keine nukleären Exportsequenzen (NES), einzig das NS2/NEP-Protein besitzt eine NES in der N-terminalen Region. NS2/NEP bindet an CRM1, einen zellulären Exportfaktor für Proteine mit leucinreichen, nukleären Exportsequenzen (Neumann et al. 2000). Dabei spielt das M1-Protein eine Rolle, es bindet mit der C-terminalen Region an die RNP-Komplexe, erst dann bindet das NS2/NEP mit seiner C-terminalen Region an M1-Protein, was eine Interaktion mit CRM1 ermöglicht. Die Bindung ist abhängig von RanGTP (Akarsu et al. 2003). Erst dieser Proteinkomplex wird aktiv aus dem Zellkern heraustransportiert, vermutlich vermittelt über das NS2/NEP.

Möglicherweise ist dieser aktive Prozess in späteren Phasen der Influenzareplikation nicht mehr ausreichend, um die Masse der neu gebildeten RNP-Komplexe effizient aus dem Zellkern heraus



Abbildung 40: Model des NF-κB vermittelten Exports der Ribonukleoproteinin-Komplexe des Influenza Virus aus dem Zellkern.

Das Influenza Virus induziert die Transkription von proapoptotischen Faktoren, die unter der Kontrolle des NF- $\kappa$ B Signalweges stehen. Diese induzieren autokrin bzw. parakrin Caspasen. Die Caspasen-Aktivität ist notwendig in späteren Phasen des Influenza-Replikationszyklus für den Export der RNP-Komplexe aus dem Zellkern. Wird der NF- $\kappa$ B Signalweg gehemmt und damit auch die Caspasen-Aktivität, so kann der Export der RNP-Komplexe aus dem Zellkern nicht in ausreichendem Maß erfolgen. zu transportieren. Der Caspasen-vermittelte, passive Transport könnte einen weiteren Mechanismus darstellen, mit dem das Virus sicherstellt, dass möglichst viele RNPs aus dem Zellkern herausgeschleust werden. Für diese Theorie spricht, dass Caspasen die Kernporen-Proteine zerstören, welche am aktiven Kernexport involviert sind (Ferrando-May et al. 2001; Patre et al. 2006).

Ein Modell des vermuteten Mechanismus eines NF- $\kappa$ B vermittelten RNP-Exports ist in Abbildung 40 zusammengefasst. Wird eine Zelle mit Influenza Virus infiziert, so kommt es zum Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ , Translokation von p50/p65 in den Zellkern und einer NF- $\kappa$ B-abhängigen Transkription proapoptotischer Faktoren, wie Fas, FasL und TRAIL. Diese führen in autokriner bzw. parakriner Weise zur Aktivierung von Caspasen. Die Caspasen-Aktivität unterstützt in einer späteren Replikationsphase den RNP-Export durch passive Diffusion aus dem Zellkern. Wird dieser Vorgang unterbrochen, z.B. durch die Inhibierung der IKK $\beta$  Kinase durch ASA, so wird das Virus in seiner Replikationseffizienz empfindlich gestört.

# 4.2. Acetylsalicylsäure als antivirales Mittel *in vitro* und *in vivo*

Wie bereits mehrfach belegt wurde, benötigt das Influenza Virus den NF-κB Signalweg für die eigene Vermehrung. Mit Hilfe von ASA lässt sich der NF-κB Signalweg effizient hemmen, was in einer Reduktion der infektiösen Viruspartikel resultiert. ASA ist in der klinischen Anwendung, als Aspirin bekannt, seit über hundert Jahren in Gebrauch und zeigt nur wenige Nebenwirkungen. So ist durchaus vorstellbar diesen Wirkstoff gegen das Influenza Virus einzusetzen. Normalerweise wird ASA als COX-2 Inhibitor zur Linderung von Begleiterscheinungen viraler Infekte, wie Fieber, eingesetzt.

Wie die Experimente in dieser Arbeit belegen, ist ASA in antiviral wirkenden Konzentrationen nicht toxisch in der Zellkultur und zeigt keinen Einfluss auf die Zell-Proliferation (siehe Abbildung 19 und Abbildung 18). Alleine die Zugabe zum Medium infizierter Zellen verringert deutlich den zytopatischen Effekt (siehe Abbildung 9 A und B).

ASA wirkt effektiv antiviral im Konzentrationsbereich zwischen 5-7 mM. Diese relativ hohe Menge ist gleichzeitig übereinstimmend mit der aus der Literatur bekannten NF- $\kappa$ B inhibierenden Konzentration. Gleichzeitige Zugabe eines weiteren, spezifischen NF- $\kappa$ B Inhibitors BAY 11-7085 erhöht die Wirksamkeit gegen das Influenza Virus nicht signifikant (siehe Abbildung 13), was auf ein identisches Wirkspektrum zu bekannten NF-κB Inhibitoren hinweist.

Die relativ hohe antiviral wirkende Konzentration wirft ein Problem der Applikation auf, da über die gängige orale Aufnahmeroute von ASA nicht genügend hohe Wirkstoffkonzentrationen im Blut zu erzielen sind. Hier bietet sich die aeorosolische Vergabe in vernebelter Form direkt in die Lunge des Patienten an. In diesem Zusammenhang wurden bereits in therapeutischer Behandlung von Patienten Dosen von 720 mg ASA über längere Zeiträume hinweg in inhalierbarer Form appliziert, ohne dass dabei negative Nebenwirkungen auftraten (Bianco et al. 1995).

Die antivirale Wirkung wurde nicht nur in der Zellkultur beobachtet, sondern auch in *vivo* in C57B1/6 Mäusen (FLI, Tübingen), die mit einer letalen Dosis des HPIAV-Stammes FPV/Bratislava H7N7 (pfu =  $5x10^3 - 5x10^4$ ) infiziert wurden. Eine Zugabe ASA zum Trinkwasser erhöhte bereits die Überlebensrate von Mäusen von 0 auf 20%. Als sehr effektiv erwies sich aber die intratracheale Applikation von vernebelter ASA-Lösung (2 bis 20 mM) direkt in die Lunge. Damit konnten 60% der infizierten Mäuse geheilt werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Virentiter der infektiösen Viruspartikel aus der Lunge nach der ASA-Behandlung drastisch zurückgingen. Gleichzeitig zeigte die Kontrollsubstanz Indometacin (reiner COX-2 Inhibitor) keinerlei Wirkung auf das Überleben der infizierten Mäuse oder einen Hemmeffekt auf die Virusvermehrung *in vivo* wie auch *in* vitro (Mazur et al. 2007). Dies deutet darauf hin, dass nicht die COX-2 Inhibition, sondern der NF- $\kappa$ B-hemmende Effekt von ASA für die antivirale Wirkung verantwortlich ist.

Die *in vivo* Experimente zeigen deutlich den Vorteil einer inhalierbaren Lösung – die Substanz erreicht ohne Umwege den Ort der Infektion und die Applikation erlaubt zudem geringere Konzentrationen einzusetzen. *In vivo* ist vermutlich auch eine geringere Konzentration einsetzbar, da in lebenden Organismen, anders als in der Zellkultur, ein intaktes Immunsystem die Virusbekämpfung unterstützt.

Ein Medikament auf der Basis von ASA wird auch bereits erprobt, aber für einen anderen Zweck. Zusammen mit der Substanz Furosemid bildet ASA eine Basis für ein inhalierbares antiasthmatisches Medikament (Vargas et al. 1992; Bianco et al. 1995). Das Medikament wurde zwar zu einem anderen Einsatzzweck konzipiert, gleichwohl ist es denkbar, das Mittel für die Influenzabekämpfung einzusetzen. Wie die Experimente zeigten, ist Furosemid alleine absolut untoxisch in der Zellkultur und hat keinerlei Einfluss auf die Virusreplikation. Inhalierbare Acetylsalicylsäure-Lösung hat den Nachteil, dass es in manchen Fällen zu asthmatischen Beschwerden führen kann. Ein Präparat aus ASA und Furosemid hätte den Vorteil, dass diese Nebenwirkung beseitigt wird.

ASA wird bereits sehr lange und vielseitig in klinischer Behandlung ohne größere Nebenwirkungen eingesetzt. Als die schwerwiegendste ist dabei das Reye-Syndrom zu erwähnen, eine Form von akuter Enzephalopathie bei Kindern, die in Verbindung mit Aspirin und Influenza B oder *Varizella zoster* Infektionen vorkommen kann (Davis et al. 1985; Larsen 1997). Die Ursache ist eine genetisch bedingte Fehlfunktion der Mitochondrien.

### 4.2.1. Antiviraler Einsatz von Acetylsalicylsäure zeigt keine Tendenz zur Bildung resistenter Virusvarianten

Die Entwicklung antiviraler Substanzen ist im Falle des Influenza Virus durch seine hohe Variabilität erschwert. Bedingt durch die hohe Mutationsrate aufgrund fehlender "proof reading" Funktion der viralen Polymerase sowie des leichten RNA-Segment-Austausches zwischen den Subtypen kann das Influenza Virus sehr schnell resistente Varianten hervorbringen. So bildet das Virus bereits nach einigen Replikationsrunden Resistenzen gegen die Substanz Amantadin, welche die Funktion des M2-Proteins als Protonenkanal hemmt (siehe Kapitel . 1.6), (Hay et al. 1985). Auch die neuen Neuraminidase-Inhibitoren scheinen von diesem Problem betroffen zu sein (Gubareva et al. 2002; Gubareva 2004). So wurden resistente Influenza-Varianten vom H3N2- und H5N1-Subtyp nach der Behandlung mit dem Medikament Oseltamivir berichtet (Kiso et al. 2004; de Jong et al. 2005).

Der Einsatz von ASA als Hemmer eines zellulären Signalweges, den das Virus für die eigene Replikation benutzt, kann dieses Problem umgehen. Die Experimente zeigen, dass sich das Virus nicht an eine Hemmung einer zellulären Komponente anpassen kann. Wie unter 3.3.6 gezeigt, bildet das Virus auch nach fünf Passagen keine resistenten Varianten. Im Gegensatz dazu zeigt der Einsatz von Amantadin als antiviraler Wirkstoff, bereits nach der zweiten Passage ansteigende Virustiter. Nach der vierten Passage entsprechen die Titer der infektiösen Viruspartikel denen aus unbehandelten, infizierten Zellen. Dies zeigt, dass nach bereits vier Passagen eine vollkommen resistente Viruspopulation entstanden ist. Dies ist im Fall der ASA-Behandlung nicht aufgetreten.

Zusammengefasst kann man sagen, dass ASA eine sehr billige, leicht herzustellende und lang erprobte Substanz ist, die wenig toxisch ist und kaum Nebenwirkungen zeigt. Eine zukünftige

Nutzung als Influenza-Medikament hätte den Vorteil, dass ASA schnell für diesen Ansatz entwickelbar und verfügbar ist, was besonders wichtig für den Fall einer Pandemie ist, und keine Bildung resistenter Virusvarianten induziert. Zudem ist ein inhalierbares Medikament auf Acetylsalicylsäure-Basis bereits verfügbar und wird in klinischen Studien getestet. Damit scheint ASA als ein Mittel für den baldigen Einsatz gegen Influenzainfektionen geeignet zu sein.

## 4.3. Die Rolle von PB1-F2 für die Pathogenität des Influenza Virus

Das Influenza-Peptid PB1-F2 wurde nach seiner Entdeckung als proapoptotisch wirkend beschrieben, diese Funktionsweise wird aber in letzter Zeit immer wieder relativiert. So wurde zuletzt berichtet, dass PB1-F2 nur eine apoptoseverstärkende Funktion bei gleichzeitiger Exposition von proapoptotischen Stimuli, besitzt (Zamarin et al. 2005).

Die Pathogenität von Viren mit deletiertem PB1-F2 scheint in der Zellkultur nicht beeinträchtigt zu sein (Chen et al. 2001). Auch zeigten sie zunächst keine verminderte Pathogenität im Maus-Model. Erst PB1-F2 Knockout-Segmente im genetischen Hintergrund von attenuierten Viren haben eine verminderte Pathogenität in der Maus gezeigt (Zamarin et al. 2006). Lungenlavagen mit PB1-F2 Knockout-Virus-infizierten Mäusen wiesen im Vergleich zum wt Virus weniger Viruspartikel auf. Interessanterweise zeigten diese Viren in der Zellkultur keine verringerte Pathogenität. Diese Beobachtung zeigt, dass PB1-F2 einen Pathogenitätsfaktor im infizierten Organismus darstellen könnte, der für die Überwindung der Immunabwehr wichtig ist. Übereinstimmend mit dieser Hypothese berichtete eine frühere Studie, dass die Induktion der Apoptose durch PB1-F2 eine Rolle für die Depletion von Lymphozyten spielen könnte. Die Depletion von Lymphozyten ist ein Prozess, der während der Infektion mit Influenza in Tieren beobachtet wurde (Van Campen et al. 1989; Van Campen et al. 1989; Tumpey et al. 2000). Eine selektive Eliminierung von Lymphozyten durch Induktion von Apoptose könnte einen Mechanismus darstellen, der dem Influenza Virus ermöglicht die Immunabwehr zu schwächen, diese Theorie ist aber noch unbewiesen, da eine entsprechende PB1-F2 Funktion nie in vivo in infizierten Tieren bestätigt werden konnte (Zamarin et al. 2006).

### 4.3.1. Lokalisation von PB1-F2

PB1-F2 wird während des Influenza-Replikationszyklus, ähnlich wie andere frühe Influenza-Genprodukte, z.B. NP oder PB1 ca. 2 h nach Beginn der Infektion exprimiert. Aber anders als andere Proteine, erreicht die Expression von PB1-F2 einen Höhepunkt nach ca. 10-12 h. Danach wurde keine Expression mehr beobachtet. Die Expression anderer Proteine wie PB1, NP oder M verläuft dagegen kontinuierlich bis zum Tod der infizierten Zellen. Warum das Expressionsmuster sich von anderen Influenza Virus Proteinen so unterscheidet, ist völlig unklar. Es wurde berichtet, dass das Peptid eine kurze Lebensdauer besitzt, die sich durch den Einsatz von Proteasominhibitoren verlängern lässt (Henklein et al. 2005). Dies würde den Abbau erklären, nicht aber den Expressionsabbruch nach ca. 12 h nach Infektion. Die Ursache dafür bleibt unbekannt.

Die Beobachtung, dass PB1-F2 nicht nur zytoplasmatisch bzw. mitochondrial während einer Influenzainfektion lokalisiert ist war ein erster Hinweis auf eine mögliche Funktion im Zellkern (Chen et al. 2001). Zudem ist es bemerkenswert, dass die nukleäre Lokalisierung von PB1-F2 ausschließlich während einer Influenzainfektion vorkommt. Wird PB1-F2 alleine in Zellen exprimiert, so wird ausschließlich eine zytoplasmatische bzw. mitochondriale Lokalisierung vorgefunden. Allerdings zeigt nur ein Teil der infizierten Zellen eine nukleäre Lokalisation von PB1-F2, ein bestimmter Zeitpunkt der Infektion, an dem PB1-F2 in den Zellkern transportiert wird, konnte nicht identifiziert werden, es scheint aber zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion zu passieren.

Da das PB1-F2 Peptid keine bekannte nukleäre Lokalisierungssequenz besitzt (aber eine mitochondriale (Gibbs et al. 2003; Yamada et al. 2004)), kann man spekulieren, dass das Peptid möglicherweise im Komplex mit einem anderen influenzaviralen Genprodukt in den Zellkern transportiert wird.

Es ist unklar, ob die mitochondriale Lokalisierung von PB1-F2 eine biologische Funktion besitzt, einen Einfluss auf Apoptose oder andere Vorgänge *in vivo* konnte nicht nachgewiesen werden. Die mitochondriale Lokalisierung von PB1-F2 zeigt gewisse Parallelen zu PB2. Wie kürzlich *in vivo* und *in vitro* gezeigt wurde kann das Influenza Virus Protein PB2 iebenfalls in Mitochondrien lokalisieren (Carr et al. 2006). Das PB2-Protein besitzt eine MTS am N-Terminus, eine Mutation in diesem Bereich führte, anders als bei Deletionen von PB1-F2 zu verringerten Virustitern. Dabei wurde gezeigt, dass die Höhe der viralen Transkription, Replikation und Proteinexpression durch die Mutationen in der PB2 MTS nicht beeinflusst wurden. Dies wirft die Frage auf, welche Rolle Mitochondrien im Replikationszyklus des Influenza Virus spielen. Für die Polymerasefunktion dürften sie keine Rolle spielen, weil die virale Transkription und Replikation im Zellkern statt findet (Jackson et al. 1982). Da Mutationen in der PB2 MTS-Sequenz die Virentiter beeinflussen, scheint PB2 eine wichtige, von der Polymerasefunktion unterschiedliche Funktion in Mitochondrien zu besitzen. Eine vergleichbar essentielle Funktion gilt vermutlich nicht für PB1-F2, denn Knockout von PB1-F2 spielt keine Rolle für die Höhe der Virentiter in Zellkultur. Auch anders als PB1-F2 scheint PB2 weder eine pro- noch antiapoptotische Rolle zu spielen und im Gegensatz zum wt PB1-F2 bewirken MTS-Mutanten von PB2, aber nicht das wt Virus einen erhöhten Zusammenbruch des Mitochondrien-Membranpotentials (Carr et al. 2006).

### 4.3.2. PB1-F2 interagiert direkt mit PB1

Falls PB1-F2 keine ungewöhnliche Kernlokalisierungs-Sequenz besitzt, muss das Peptid mit Hilfe eines anderes Proteins oder Mechanismus in den Kern gelangen. Immunfluoreszenz-Aufnahmen zeigten im Zytoplasma eine partielle Kolokalisierung von PB1 und PB1-F2, aber nicht NP, was ein erster Hinweis darauf war, dass dieses Protein ein Bindepartner von PB1-F2 sein könnte. Eine Hefe Two-Hybrid Untersuchung bestätigte diesen Verdacht. PB1 und PB1-F2 können miteinander interagieren. Auch eine Wechselwirkung zwischen zwei PB1-F2 Molekülen wurde gezeigt, was Daten früherer Studien bestätigt, wonach PB1-F2 eine Kapazität zur Bildung von Dimeren wie auch Multimeren besitzt. Die positiven Ergebnisse der Two-Hybrid Studie deuten ferner an, dass die Interaktion von PB1 und PB1-F2 direkt ist.

Die Wechselwirkung von PB1-F2 und PB1 findet während einer Influenza Virus-Infektion statt. Beide Proteine konnten zusammen in infizierten Zellen koimmunpräzipitiert werden. Dabei ist zu beachten, dass PB1-F2 ausschließlich mit PB1, aber nicht mit PA oder NP koimmunpräzipitiert. PB1 selbst präziptiert aber sowohl mit NP, wie auch mit PA. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass PB1-F2 mit freiem PB1-Protein im Zytoplasma interagiert, aber nicht mit dem viralen Polymerase-Komplex, der aus der viraler RNA und den Proteinen PB1, PB2, PA und NP besteht und im Zellkern assembliert.

Eine Kopräzipitation von PB1-F2 mit anti-PB1 Antiserum konnte nicht gezeigt werden (nicht gezeigt). Die Ursache könnte darin liegen, dass PB1-F2 nur mit freiem, aber nicht mit im Polymerase-Komplex vorliegendem PB1 interagiert. Da dies wahrscheinlich in größerer Menge in der Zelle vorkommt, als der PB1-PB1-F2 Komplex, wurde wahrscheinlich vorwiegend das PB1 aus dem Polymerase-Komplex präzipitiert.

Aufgrund dieser Befunde liegt die Vermutung nahe, dass PB1-F2 zusammen mit PB1 in den Zellkern gelangt. Der Sinn dieses Vorgangs bzw. die biologische Funktion von PB1-F2 bleibt aber unklar. Vorstellbar ist, dass PB1-F2 an PB1 bindet, um eine Assemblierung der viralen RNP's im Zytoplasma zu verhindern und das es zusammen mit PB1 in den Zellkern gelangt, wo es anschließend degradiert.

Es ist ebenfalls vorstellbar, dass PB1-F2 ein Inhibitor für neusynthetisiertes PB1-Protein ist, bis es in den Zellkern transportiert wird, da PB1 alleine eine transkriptionelle Aktivität besitzt (Kobayashi et al. 1996). Auch über eine Förderung der basalen Aktivität von PB1 durch PB1-F2 lässt sich in diesem Zusammenhang spekulieren.



Abbildung 41: PB1-F2 als Interaktionspartner der viralen Polymeraseuntereinheit PB1

Die Abbildung zeigt schematisch den Replikationszyklus des Influenza A Virus. Nach Aufnahme des Viruspartikels in die Zelle werden die RNP-Komplexe freigesetzt und in den Zellkern transportiert, wo die viralen Gene transkribiert und repliziert werden. Die mRNA der viralen Gene wird in das Zytoplasma transportiert und ribosomal translatiert. Die so entstandenen Proteine werden zum Teil in die Plasmamembran integriert und zum Teil zum Zellkern zurück transportiert, wo sie zusammen mit neuer viraler RNA zu RNP-Komplexen assemblieren. Das PB1-F2 Protein wird, wie andere Influenza Virus Proteine zytoplasmatisch exprimiert und möglicherweise zusammen mit seinem Interaktionspartner PB1 in den Zellkern transportiert. Da die PB1-F2 Expression im Laufe des Zyklus, anders als bei anderen Influenza Virus Proteinen abnimmt, könnte das Peptid rasch degradieren. Das freie PB1 assembliert im Zellkern zusammen mit PB2, PA, NP und der viralen RNA zu fertigen RNP-Komplexen.

Einige *in vitro* Daten suggerieren eine Funktion, die mit der Immunantwort zusammenhängen könnte (siehe 3.4.3.6). Infiziert man PB1-F2 überexprimierende Zellen mit Influenza Virus, so führt dies zu einer sehr starken Stimulierung von IRF-3 abhängiger Promotoraktivität. Diese Aktivierung ist um ein Vielfaches stärker, als die, die das Virus alleine verursacht. PB1-F2 Überexpression alleine führte dagegen zu keiner signifikanten Stimulation des IFNB-Promotors oder eines IRF-3 abhängigen Promotorsegments. Dieses Experiment weist auf eine weitere unbekannte Funktion von PB1-F2, die bei Überexpression des Peptids zu einer starken zellautonomen Immunantwort führt. Dies zeigt aber auch, dass dieses Influenza Virus Protein eine biologische Funktion in infizierten Zellen haben muss. Es wurde beobachtet, dass Wildtyp Viren im Vergleich zu PB1-F2 defizienten Viren eine stärkere Apoptose in Makrophagen auslösen (Chen et al. 2001). Dies könnte mit der beobachteten starken Induktion der Interferonantwort nach Virusinfektion in PB1-F2 überexprimierenden Zellen zusammenhängen, da Typ I Interferone Apoptose induzieren können.

## 4.3.3. PB1-F2-Defizienz beeinträchtigt die Aktivität der viralen Polymerase, führt aber zu keiner Virustiteränderung

Knockout von PB1-F2 zeigte *in vitro* eine geringere virale Polymeraseaktivität im Hintergrund rekombinanter WSN- und PR8-Viren. Dabei ist zu beachten, dass die Mutationen, die den Knockout im PB1-F2 ORF herbeiführten keine Änderung der Aminosäuresequenz im PB1-Protein verursachten sowie zu keiner Änderung der viralen Proteinexpression führten.

Ein Experiment zeigte, dass eine versehentlich eingebaute Mutation im PB1-Protein bereits zum vollständigen Zusammenbruch der Aktivität der viralen Polymerase führen kann (siehe Abbildung 28). Die Polymeraseuntereinheit PB1 stellt für das Influenza Virus einen wichtigen Pathogenitätsfaktor dar. Sie ist die essentielle Untereinheit für die virale Polymerase und kann auch alleine RNA synthetisieren (Kobayashi et al. 1996; Toyoda et al. 1996).

Das Protein ist im Vergleich zu anderen Influenza Virus Proteinen hoch konserviert, Mutationen können zum Zusammenbruch der Polymeraseaktivität führen (Biswas und Nayak 1994). Dies kann z.B. erfolgen, wenn die Interaktionsdomänen mit den anderen Polymeraseuntereinheiten PA und PB2 betroffen sind. Die Assemblierung aller drei Untereinheiten zu einem Komplex ist essentiell für die effiziente Funktionalität der viralen Polymerase (Hiromoto et al. 2000).

Die Lokalisations-Experimente zeigten, dass der Knockout von PB1-F2 in einer Änderung der Lokalisierung von PB1 in infizierten Zellen resultiert. Falls PB1-F2 am Transport des PB1-

Proteins in den Zellkern bzw. am Zurückhalten von PB1 im Zellkern beteiligt ist, könnte dies die geringere Polymeraseaktivität in PB1-F2 defizienten Viren erklären. Diese Änderung ist dann möglicherweise darauf zurück zu führen, dass der Kernimport von PB1 oder Export der RNP-Komplexe durch den Knockout gestört wird.

Nichtsdestotrotz resultierte der Knockout von PB1-F2 in keiner Änderung der Virusvermehrung in der Zellkultur. Die Experimente, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden bestätigen somit die bereits publizierten Ergebnisse. Rekombinante PB1-F2 Knockout-Viren sind im Vergleich zum wt Virus in ihrer Vermehrung nicht beeinträchtigt. Sie zeigen darüber hinaus keine Änderung der virusinduzierten Apoptose oder Änderungen in der Synthese viraler Proteine unter den gewählten experimentellen Bedingungen..

Die veränderte Größe der Virus-Plaques der PB1-F2 Knockout-Viren im Vergleich zum rekombinanten wt Virus auf MDCK-Zellrasen führte zunächst zu der Vermutung, dass der Knockout eine Auswirkung auf den zytopatischen Effekt hat. Viren, die kein PB1-F2 exprimieren bilden im MDCK-Zellrasen kleinere Plaques als das wt Virus. Dies kann bedeuten, dass diese Viren die infizierten Zellen entweder langsamer töten oder sich langsamer ausbreiten.

Die erste Möglichkeit hat sich jedoch nicht bestätigt. Weitere Experimente zeigten, dass die Knockout-Viren die Zellen nicht schneller töten, bzw. nicht zytopatischer sind als das wt Virus.

Um die Ausbreitung der Viren zu untersuchen wurde eine Immunfluoreszenz von Zellen durchgeführt, die mit einer Verdünnungsreihe des rekombinanten wt PR8 und den PB1-F2 Knockout-Mutanten infiziert wurden. Hier zeigte sich, dass sich die Knockout-Viren langsamer im Zellrasen ausbreiteten, als das wt Virus, was anhand des geringeren Durchmessers der infizierten Zell-Areale deutlich sichtbar wurde.

Da der PB1-F2 Knockout die Höhe der Virustiter nicht beeinflusst, könnte dies nur bedeuten, dass die Knockoutviren sich nicht weniger effektiv replizieren, aber da die Polymeraseaktivität beeinflusst ist, langsamer ausbreiten. Der Effekt scheint aber in der Zellkultur so gering zu sein, dass es zu keiner Beeinflussung der Virusvermehrung insgesamt kommt. Es besteht die Möglichkeit, dass das PB1-F2 Peptid im infizierten Organismus eine größere Rolle spielt, als in der Zellkultur, die ein auf Virusvermehrung optimiertes System darstellt. Möglich ist auch, dass sich die Funktion von PB1-F2 im genetischen Hintergrund der Laborvirus-Stämme WSN und PR8 nicht effizient manifestiert, da diese Viren bereits zu gut an Zellkuktursysteme angepasst sind.

Möglicherweise verzögert PB1-F2 den Kernimport vom neu synthetisierten PB1. Für diese Theorie spricht, dass es zu einer Änderung der Lokalisierung von PB1 kommt, wenn Zellen mit PB1-F2 Knockout Viren infiziert wurden. Während PB1 in Zellen die mit dem wt Virus 7 h nach Infektion im Zellkern lokalisiert ist, so ist die Lokalisierung zum gleichen Zeitpunkt in Zellen, die mit PB1-F2 Knockout-Viren infiziert waren zytoplasmatisch. Zu früheren Zeitpunkten ist die Lokalisierung dagegen in mit wt Virus wie auch in den PB1-F2 Knockout-Mutanten infizierten Zellen gleich. Der schnellere Kernexport des PB1-Proteins bzw. der RNP-Komplexe aus dem Zellkern der Zellen, die mit den PB1-F2 Knockout-Mutanten infiziert wurden, könnte auch die geringere Polymeraseaktivität dieser Mutanten erklären. Vorstellbar ist, dass während die wt RNP-Komplexe PB1-F2 vermittelt länger im Zellkern verbleiben, diese nach Infektion mit den Mutantenviren vorzeitig aus dem Zellkern heraustransportiert werden. Dagegen spricht allerdings, dass bislang keinerlei Hinweise für eine Interaktion von PB1-F2 mit anderen Proteinen des RNP-Komplexes beobachtet werden konnten, sondern ausschließlich eine Interaktion von PB1-F2 und PB1.

Zusammengefasst zeigen PB1-F2 Knockout-Viren eine geringere Polymeraseaktivität, langsamere Ausbreitung und verfrühten RNP-Kernexport. Dies führt in der Zellkultur aber nicht zu einer Änderung der Virustiter, der viralen Proteinsynthese oder virusinduzierter Apoptose.

Auf der zellulären Ebene kann PB1-F2 nach Virusinfektion im Zytoplasma, wie auch im Zellkern lokalisieren. Dabei wurde eine partielle zytoplasmatische Kolokalisation mit PB1 beobachtet. Weiterhin wurde eine direkte Interaktion von PB1-F2 mit PB1 gezeigt. Die Interaktion wurde mittels Hefe Two-Hybrid und Koimmunpräzipitationen nachgewiesen. Dabei schein PB1-F2 nur mit freien PB1 zu interagieren, da keine Interaktion mit den Proteinen des viralen Polymerasekomplexes festgestellt werden konnte.

Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte scheinen widersprüchlich zu sein. Auf der einen Seite führt der Knockout von PB1-F2 zu einer verminderten Aktivität der viralen Polymerase und geringerem zytopatischen Effekt sowie Änderung der PB1-Lokalisierung, aber auf der anderen Seite hat der Knockout keinerlei Einfluss auf die Höhe der Virentiter im Vergleich zum wt Virus. Um diesen Widerspruch zu enträtseln und die molekularen Rolle von PB1-F2 zu entschlüsseln werden weitere Studien in der Zukunft notwendig sein, speziell *in vivo* mit infizierten Organismen. Möglicherweise haben die beobachteten Effekte keine starke Auswirkung auf die Vermehrung des Influenzavirus bzw. kann das Virus dem Knockout von PB1-F2 durch andere Mechanismen entgegenwirken.

## Zusammenfassung

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B ist ein wichtiger Schritt im Infektionsverlauf pathogener Organismen. Viele proinflammatorische und antivirale Zytokine stehen unter der Kontrolle von NF- $\kappa$ B, was diesen Transkriptionsfaktor im Allgemeinen zu einem essentiellen Bestandteil der antiviralen Immunantwort macht. Diese Arbeit demonstriert, übereinstimmend mit früheren Studien, dass die NF- $\kappa$ B-Aktivität im Kontext einer Influenza Virus-Infektion, tatsächlich essentiell für die virale Vermehrung ist.

Die molekulare Basis dieses Phänomens stellt die NF- $\kappa$ B-abhängige Induktion der Apoptose durch das Influenza Virus dar. Die Transkription proapoptotischer Faktoren und nachfolgend erhöhte Caspasen-Aktivität verstärkt die Replikation des Influenza Virus und unterstützt den Export viraler Ribonukleoproteinin-Komplexe (RNP-Komplexe) aus dem Zellkern. Diese Daten suggerieren, dass NF- $\kappa$ B-Inhibitoren eine geeignete Strategie für einen antiviralen Einsatz darstellen könnten. In dieser Arbeit wurde deshalb Acetylsalicylsäure (*acetylsalicylic acid*, ASA, auch bekannt als Aspirin), ein effizienter Inhibitor der IKKß-Kinase aud antivirale Effekte untersucht. Es zeigte sich, dass ASA effizient die Virenvermehrung sowohl in der Zellkultur, als auch *in vivo* in Mäusen hemmt. Darüber hinaus zeigten ASA-behandelte und infizierte Zellen reduzierte Caspasen-Aktivität und verminderte virusinduzierte Apoptose. Übereinstimmend mit dem Model der NF- $\kappa$ B-vermittelten Caspasen-Aktivität und ihrer wichtigen Rolle für den Export der RNP-Komplexe aus dem Zellkern, wurde auch eine Inhibition des nukleären RNP-Exports aus den Zellkernen ASA-behandelter Zellen beobachtet.

Die Ergebnisse implizieren somit einen möglichen Einsatz von ASA bzw. von anderen NF- $\kappa$ B-Inhibitoren als Mittel gegen Influenza Virus Infektionen. Der Einsatz von NF- $\kappa$ B-Inhibitoren zeigt dabei, im Gegensatz zu anderen etablierten anti-Influenza Medikamenten, welche ausschließlich das Virus direkt angreifen, keine Tendenz zur Bildung von resistenten Virusvarianten, da ein zellulärer Mechanismus gehemmt wird.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit beschäftigt sich mit einem weiteren apoptoserelevanten Aspekt der Influenza Virus Replikation, nämlich mit der Charakterisierung des apoptosefördernen Influenza Virus Proteins PB1-F2. Das 87 Aminosäuren umfassende Peptid wird von einem alternativen Leserahmen des PB1-Segments codiert und kann in Mitochondrien lokalisieren. Eine zytoplasmatische sowie nukleäre Lokalisation in virusinfizierten Zellen wurde ebenfalls beobachtet. Nichtsdestotrotz ist wenig darüber bekannt, welche Rolle dieses Protein in der Influenza Virus Replikation spielt. Diese Arbeit zeigt, dass PB1 und PB1-F2 im Zytoplasma kolokalisieren können, sowie dass eine Deletion des PB1-F2 Leserahmens (ohne Aminosäure-Substitutionen in der PB1-Sequenz) zu einer geringeren Polymeraseaktivität führt. Koimmunpräzipitation- sowie Hefe Two-Hybrid-Experimente zeigen, dass PB1 und PB1-F2 direkt miteinander interagieren können, was ein Hinweis auf die Beteiligung von PB1-F2 an der Regulation des viralen Polymerasekomplexes ist.

## Summary

Activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B is a hallmark of infections by viral pathogens, including influenza virus. Since gene expression of many proinflammatory and antiviral cytokines is controlled by this factor, it is a common believe that NF- $\kappa$ B and its upstream regulator IKK are essential components of the innate antiviral immune response. In contrast to this view the results in this work clearly demonstrate, that NF- $\kappa$ B activity is required for efficient influenza virus growth. On the molecular basis this is due to the NF- $\kappa$ B-dependent induction of apoptosis. The activation of apoptosis enhances virus propagation by the activation of caspases, which in turn appear to support export of the viral RNP complexes from the nucleus.

These results suggest that NF- $\kappa$ B inhibitors may be useful as efficient anti-influenza drugs. Indeed, several pharmacological NF- $\kappa$ B inhibitors, including acetylsalicylic acid (ASA, also known as Aspirin), an inhibitor of IKK $\beta$ , blocked virus propagation both in cell culture and *in vitro* and *in vivo* in infected mice. Consistent with the suggestion that caspases activity subsequently supports viral RNP export from the nucleus, a nuclear accumulation of RNPs in infected cells treated with ASA was observed, and these cells showed reduced caspases activity and impaired virus induced apoptosis.

Thus, ASA or other NF- $\kappa$ B inhibitors may be suitable as potent anti-influenza drugs. In favour for such an application, the virus showed no tendency to form resistant variants against NF- $\kappa$ B inhibitors, most likely because the virus cannot replace the missing cellular function.

The second part of this work sheds light on another apoptosis-related aspect of influenza virus replication It characterizes a novel apoptosis promoting influenza protein PB1-F2. PB1-F2 was previously shown to be involved in the induction of apoptosis in infected cells in response to cytotoxic stimuli. The 87 amino acid protein, encoded by an alternative reading frame of the PB1 polymerase gene, was described as mitochondrial, however the localisation changes during influenza virus infection between cytoplasm and nucleus. A temporarily colocalization of PB1-F2 and PB1 in this study was observed in certain stages of influenza virus infection. In addition, deletion of PB1-F2 (without amino acid changes in the PB1 gene) showed a dramatical decrease in the viral polymerase activity. Moreover, PB1-F2 co-immunoprecipitates and colocalizes with the PB1 protein. According to these observations PB1-F2 may have a potential nuclear function. Taken together PB1-F2 may be a regulatory component of the influenza virus polymerase complex as well as have other regulatory functions.

## Literatur

- Akarsu, H., W. P. Burmeister, et al. (2003). "Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2)." <u>Embo J</u> 22(18): 4646-55.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, et al. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." <u>Nature</u> **413**(6857): 732-8.
- Alley, M. C., D. A. Scudiero, et al. (1988). "Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay." <u>Cancer Res</u> 48(3): 589-601.
- Altschmied, J. and J. Duschl (1997). "Set of optimized luciferase reporter gene plasmids compatible with widely used CAT vectors." <u>Biotechniques</u> **23**(3): 436-8.
- Andrejeva, J., K. S. Childs, et al. (2004). "The V proteins of paramyxoviruses bind the IFNinducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 101(49): 17264-9.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." <u>Science</u> **281**(5381): 1305-8.
- Avalos, R. T., Z. Yu, et al. (1997). "Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells." <u>J Virol</u> 71(4): 2947-58.
- Baeuerle, P. A. and T. Henkel (1994). "Function and activation of NF-kappa B in the immune system." <u>Annu Rev Immunol</u> **12**: 141-79.
- Baichwal, V. R. and P. A. Baeuerle (1997). "Activate NF-kappa B or die?" <u>Curr Biol</u> 7(2): R94-6.
- Balachandran, S., C. N. Kim, et al. (1998). "Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling." <u>Embo J</u> 17(23): 6888-902.
- Balachandran, S., P. C. Roberts, et al. (2000). "Alpha/beta interferons potentiate virusinduced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway." <u>J Virol</u> 74(3): 1513-23.
- Banet-Noach, C., A. Panshin, et al. (2007). "Genetic analysis of nonstructural genes (NS1 and NS2) of H9N2 and H5N1 viruses recently isolated in Israel." <u>Virus Genes</u> 34(2): 157-68.
- Barkett, M. and T. D. Gilmore (1999). "Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors." <u>Oncogene</u> **18**(49): 6910-24.
- Beg, A. A. and D. Baltimore (1996). "An essential role for NF-kappaB in preventing TNFalpha-induced cell death." <u>Science</u> 274(5288): 782-4.
- Bianco, S., A. Vaghi, et al. (1993). "Potentiation of the antireactive, antiasthmatic effect of inhaled furosemide by inhaled lysine acetylsalicylate." <u>Allergy</u> **48**(8): 570-5.
- Bianco, S., A. Vaghi, et al. (1995). "Steroid-sparing effect of inhaled lysine acetylsalicylate and furosemide in high-dose beclomethasone-dependent asthma." <u>J Allergy Clin</u> <u>Immunol</u> 95(5 Pt 1): 937-43.
- Biswas, S. K. and D. P. Nayak (1994). "Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1." J Virol **68**(3): 1819-26.
- Bouloy, M., S. J. Plotch, et al. (1978). "Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 75(10): 4886-90.
- Bouloy, M., S. J. Plotch, et al. (1980). "Both the 7-methyl and the 2'-O-methyl groups in the cap of mRNA strongly influence its ability to act as primer for influenza virus RNA transcription." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 77(7): 3952-6.

- Brown, I. H., P. A. Harris, et al. (1998). "Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype." J Gen Virol 79 (Pt 12): 2947-55.
- Bui, M., G. Whittaker, et al. (1996). "Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins." J Virol **70**(12): 8391-401.
- Burnette, W. N. (1981). ""Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." <u>Anal Biochem</u> 112(2): 195-203.
- Carr, S. M., E. Carnero, et al. (2006). "Characterization of a mitochondrial-targeting signal in the PB2 protein of influenza viruses." <u>Virology</u> **344**(2): 492-508.
- Castrucci, M. R., I. Donatelli, et al. (1993). "Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs." <u>Virology</u> **193**(1): 503-6.
- Chan, H., D. P. Bartos, et al. (1999). "Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF-kappaB p50-p65 recruitment." <u>Mol Cell Biol</u> **19**(3): 2098-108.
- Chanturiya, A. N., G. Basanez, et al. (2004). "PB1-F2, an influenza A virus-encoded proapoptotic mitochondrial protein, creates variably sized pores in planar lipid membranes." J Virol **78**(12): 6304-12.
- Chen, W., P. A. Calvo, et al. (2001). "A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death." <u>Nat Med</u> 7(12): 1306-12.
- Cheung, C. L., J. M. Rayner, et al. (2006). "Distribution of amantadine-resistant H5N1 avian influenza variants in Asia." J Infect Dis **193**(12): 1626-9.
- Choi, A. M. and D. B. Jacoby (1992). "Influenza virus A infection induces interleukin-8 gene expression in human airway epithelial cells." <u>FEBS Lett</u> **309**(3): 327-9.
- Chu, W. M., D. Ostertag, et al. (1999). "JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection." <u>Immunity</u> **11**(6): 721-31.
- Claas, E. C., A. D. Osterhaus, et al. (1998). "Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus." Lancet **351**(9101): 472-7.
- Clerx, J. P., F. Fuller, et al. (1983). "Tick-borne viruses structurally similar to Orthomyxoviruses." <u>Virology</u> **127**(1): 205-19.
- Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." Biochem J 326 (Pt 1): 1-16.
- Colamussi, M. L., M. R. White, et al. (1999). "Influenza A virus accelerates neutrophil apoptosis and markedly potentiates apoptotic effects of bacteria." <u>Blood</u> **93**(7): 2395-403.
- Coleman, J. R. (2007). "The PB1-F2 protein of Influenza A virus: increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages." <u>Virol J 4(1)</u>: 9.
- Connor, R. J., Y. Kawaoka, et al. (1994). "Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates." <u>Virology</u> **205**(1): 17-23.
- Cros, J. F., A. Garcia-Sastre, et al. (2005). "An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein." <u>Traffic</u> 6(3): 205-13.
- D'Agostino, D. M., L. Ranzato, et al. (2002). "Mitochondrial alterations induced by the p13II protein of human T-cell leukemia virus type 1. Critical role of arginine residues." J Biol Chem 277(37): 34424-33.
- Davey, J., N. J. Dimmock, et al. (1985). "Identification of the sequence responsible for the nuclear accumulation of the influenza virus nucleoprotein in Xenopus oocytes." <u>Cell</u> 40(3): 667-75.
- Davis, J. L., J. A. Heginbottom, et al. (2000). "Ground penetrating radar surveys to locate 1918 Spanish flu victims in permafrost." J Forensic Sci **45**(1): 68-76.

- Davis, L. E., C. L. Green, et al. (1985). "Influenza B virus model of Reye's syndrome in mice: the effect of aspirin." <u>Ann Neurol</u> **18**(5): 556-9.
- De Clercq, E. (2004). "Antiviral drugs in current clinical use." J Clin Virol 30(2): 115-33.
- de Jong, M. D., T. T. Tran, et al. (2005). "Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection." <u>N Engl J Med</u> **353**(25): 2667-72.
- Deng, T., O. G. Engelhardt, et al. (2006). "Role of ran binding protein 5 in nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex." J Virol 80(24): 11911-9.
- Deveraux, Q. L., N. Roy, et al. (1998). "IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases." <u>Embo J</u> 17(8): 2215-23.
- Diebold, S. S., T. Kaisho, et al. (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7mediated recognition of single-stranded RNA." <u>Science</u> **303**(5663): 1529-31.
- Digard, P., D. Elton, et al. (1999). "Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments." J Virol **73**(3): 2222-31.
- Dreitlein, W. B., J. Maratos, et al. (2001). "Zanamivir and oseltamivir: two new options for the treatment and prevention of influenza." <u>Clin Ther</u> **23**(3): 327-55.
- Ehrhardt, C., C. Kardinal, et al. (2004). "Rac1 and PAK1 are upstream of IKK-epsilon and TBK-1 in the viral activation of interferon regulatory factor-3." <u>FEBS Lett</u> **567**(2-3): 230-8.
- Ehrhardt, C., T. Wolff, et al. (2007). "The influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses." J Virol.
- Enami, K., T. A. Sato, et al. (1994). "Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein." J Virol **68**(3): 1432-7.
- Enari, M., H. Sakahira, et al. (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." <u>Nature</u> **391**(6662): 43-50.
- Faleiro, L. and Y. Lazebnik (2000). "Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier." <u>J Cell</u> <u>Biol</u> **151**(5): 951-9.
- Falk, K., E. Namork, et al. (1997). "Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (Salmo salar L.)." <u>J Virol</u> 71(12): 9016-23.
- Ferrando-May, E., V. Cordes, et al. (2001). "Caspases mediate nucleoporin cleavage, but not early redistribution of nuclear transport factors and modulation of nuclear permeability in apoptosis." <u>Cell Death Differ</u> **8**(5): 495-505.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." <u>Nature</u> **340**(6230): 245-6.
- Fleming, D. M. (2001). "Managing influenza: amantadine, rimantadine and beyond." <u>Int J</u> <u>Clin Pract</u> **55**(3): 189-95.
- Flick, R., G. Neumann, et al. (1996). "Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure." <u>Rna</u> 2(10): 1046-57.
- Flory, E., M. Kunz, et al. (2000). "Influenza virus-induced NF-kappaB-dependent gene expression is mediated by overexpression of viral proteins and involves oxidative radicals and activation of IkappaB kinase." J Biol Chem **275**(12): 8307-14.
- Fortes, P., A. Beloso, et al. (1994). "Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport." <u>Embo J</u> **13**(3): 704-12.
- Frantz, B. and E. A. O'Neill (1995). "The effect of sodium salicylate and aspirin on NF-kappa B." <u>Science</u> **270**(5244): 2017-9.
- Fujimoto, I., T. Takizawa, et al. (1998). "Co-expression of Fas and Fas-ligand on the surface of influenza virus-infected cells." <u>Cell Death Differ</u> 5(5): 426-31.
- Gabriel, G., B. Dauber, et al. (2005). "The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **102**(51): 18590-5.
- Gale, M., Jr., S. L. Tan, et al. (2000). "Translational control of viral gene expression in eukaryotes." <u>Microbiol Mol Biol Rev</u> **64**(2): 239-80.

- Gambaryan, A., A. Tuzikov, et al. (2006). "Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses." <u>Virology</u> **344**(2): 432-8.
- Garcia-Sastre, A. (2001). "Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses." <u>Virology</u> **279**(2): 375-84.
- Garcia-Sastre, A., A. Egorov, et al. (1998). "Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems." <u>Virology</u> **252**(2): 324-30.
- Garten, W., S. Hallenberger, et al. (1994). "Processing of viral glycoproteins by the subtilisinlike endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones." <u>Biochimie</u> **76**(3-4): 217-25.
- Gautier, C., M. Mehtali, et al. (1989). "A ubiquitous mammalian expression vector, pHMG, based on a housekeeping gene promoter." <u>Nucleic Acids Res</u> 17(20): 8389.
- Ghosh, S., M. J. May, et al. (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." <u>Annu Rev Immunol</u> 16: 225-60.
- Gibbs, J. S., D. Malide, et al. (2003). "The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function." <u>J Virol</u> 77(13): 7214-24.
- Gietz, R. D., R. H. Schiestl, et al. (1995). "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure." <u>Yeast</u> **11**(4): 355-60.
- Grilli, M., M. Pizzi, et al. (1996). "Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation." <u>Science</u> **274**(5291): 1383-5.
- Grunert, R. R., J. W. McGahen, et al. (1965). "The In Vivo Antiviral Activity Of 1-Adamantanamine (Amantadine). I. Prophylactic And Therapeutic Activity Against Influenza Viruses." <u>Virology</u> 26: 262-9.
- Gubareva, L. V. (2004). "Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors." <u>Virus Res</u> **103**(1-2): 199-203.
- Gubareva, L. V., L. Kaiser, et al. (2000). "Influenza virus neuraminidase inhibitors." Lancet **355**(9206): 827-35.
- Gubareva, L. V., R. G. Webster, et al. (2002). "Detection of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors by an enzyme inhibition assay." <u>Antiviral Res</u> **53**(1): 47-61.
- Guillot, L., R. Le Goffic, et al. (2005). "Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus." J <u>Biol Chem</u> 280(7): 5571-80.
- Hale, B. G., D. Jackson, et al. (2006). "Influenza A virus NS1 protein binds p85beta and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 103(38): 14194-9.
- Hay, A. J., A. J. Wolstenholme, et al. (1985). "The molecular basis of the specific antiinfluenza action of amantadine." <u>Embo J 4(11)</u>: 3021-4.
- Hay, A. J., M. C. Zambon, et al. (1986). "Molecular basis of resistance of influenza A viruses to amantadine." <u>J Antimicrob Chemother</u> 18 Suppl B: 19-29.
- Hayden, F. G. and A. J. Hay (1992). "Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine." <u>Curr Top Microbiol Immunol</u> **176**: 119-30.
- Heil, F., H. Hemmi, et al. (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." <u>Science</u> **303**(5663): 1526-9.
- Henklein, P., K. Bruns, et al. (2005). "Influenza A virus protein PB1-F2: synthesis and characterization of the biologically active full length protein and related peptides." J <u>Pept Sci 11(8)</u>: 481-90.
- Higuchi, M., S. Singh, et al. (1995). "Protease inhibitors differentially regulate tumor necrosis factor-induced apoptosis, nuclear factor-kappa B activation, cytotoxicity, and differentiation." <u>Blood</u> **86**(6): 2248-56.
- Hinshaw, V. S., C. W. Olsen, et al. (1994). "Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses." J Virol **68**(6): 3667-73.

- Hiromoto, Y., T. Saito, et al. (2000). "Phylogenetic analysis of the three polymerase genes (PB1, PB2 and PA) of influenza B virus." J Gen Virol **81**(Pt 4): 929-37.
- Hiscott, J., H. Kwon, et al. (2001). "Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway." J Clin Invest 107(2): 143-51.
- Hoffmann, E., G. Neumann, et al. (2000). "A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 97(11): 6108-13.
- Hoffmann, E. and R. G. Webster (2000). "Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids." J <u>Gen Virol</u> 81(Pt 12): 2843-7.
- Holland, J., K. Spindler, et al. (1982). "Rapid evolution of RNA genomes." <u>Science</u> **215**(4540): 1577-85.
- Holmes, E. C., D. J. Lipman, et al. (2006). "Comment on "Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates"." <u>Science</u> 313(5793): 1573; author reply 1573.
- Hornung, V., J. Ellegast, et al. (2006). "5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I." <u>Science</u> **314**(5801): 994-7.
- Hsu, S. C., M. A. Gavrilin, et al. (1999). "NF-kappa B-dependent Fas ligand expression." <u>Eur</u> <u>J Immunol</u> 29(9): 2948-56.
- Huang, R. T. and E. Dietsch (1988). "Anti-influenza viral activity of aspirin in cell culture." <u>N</u> <u>Engl J Med</u> **319**(12): 797.
- Hurt, A. C., P. Selleck, et al. (2007). "Susceptibility of highly pathogenic A(H5N1) avian influenza viruses to the neuraminidase inhibitors and adamantanes." <u>Antiviral Res</u> 73(3): 228-31.
- Isaacs, A. and J. Lindenmann (1957). "Virus interference. I. The interferon." Proc R Soc Lond <u>B Biol Sci</u> 147(927): 258-67.
- Ito, T., J. N. Couceiro, et al. (1998). "Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential." J Virol 72(9): 7367-73.
- Jackson, D. A., A. J. Caton, et al. (1982). "Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus." <u>Nature</u> **296**(5855): 366-8.
- Jackson, R. J. (2005). "Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs." <u>Biochem Soc Trans</u> **33**(Pt 6): 1231-41.
- Janicke, R. U., M. L. Sprengart, et al. (1998). "Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis." J Biol Chem 273(16): 9357-60.
- Juckett, G. (2006). "Avian influenza: preparing for a pandemic." <u>Am Fam Physician</u> 74(5): 783-90.
- Julkunen, I., K. Melen, et al. (2000). "Inflammatory responses in influenza A virus infection." <u>Vaccine</u> **19 Suppl 1**: S32-7.
- Julkunen, I., T. Sareneva, et al. (2001). "Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression." <u>Cytokine Growth</u> <u>Factor Rev</u> 12(2-3): 171-80.
- Karin, M. (1999). "The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation." J Biol Chem **274**(39): 27339-42.
- Karin, M. (1999). "How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex." <u>Oncogene</u> **18**(49): 6867-74.
- Karin, M. and M. Delhase (2000). "The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling." <u>Semin Immunol</u> **12**(1): 85-98.
- Karin, M. and A. Lin (2002). "NF-kappaB at the crossroads of life and death." <u>Nat Immunol</u> **3**(3): 221-7.
- Kato, H., S. Sato, et al. (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." <u>Immunity</u> 23(1): 19-28.
- Kaufmann, S. H., S. Desnoyers, et al. (1993). "Specific proteolytic cleavage of poly(ADPribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis." <u>Cancer Res</u> 53(17): 3976-85.
- Kawai, T., S. Sato, et al. (2004). "Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6." <u>Nat Immunol</u> **5**(10): 1061-8.
- Kihlmark, M., C. Rustum, et al. (2004). "Correlation between nucleocytoplasmic transport and caspase-3-dependent dismantling of nuclear pores during apoptosis." <u>Exp Cell Res</u> 293(2): 346-56.
- Kiso, M., K. Mitamura, et al. (2004). "Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study." Lancet **364**(9436): 759-65.
- Kobayashi, M., T. Toyoda, et al. (1996). "Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase." <u>Arch Virol</u> **141**(3-4): 525-39.
- Kopp, E. and S. Ghosh (1994). "Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin." <u>Science</u> **265**(5174): 956-9.
- Krug, R. M., B. A. Broni, et al. (1979). "Are the 5' ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs?" <u>Cell</u> **18**(2): 329-34.
- Krug, R. M., W. Yuan, et al. (2003). "Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein." <u>Virology</u> **309**(2): 181-9.
- Kujime, K., S. Hashimoto, et al. (2000). "p38 mitogen-activated protein kinase and c-jun-NH2-terminal kinase regulate RANTES production by influenza virus-infected human bronchial epithelial cells." J Immunol **164**(6): 3222-8.
- Kumar, A., J. Haque, et al. (1994). "Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B." <u>Proc Natl Acad Sci U</u> <u>S A</u> 91(14): 6288-92.
- Kurokawa, H., K. Nishio, et al. (1999). "Alteration of caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in wild-type MCF-7, breast cancer cells." <u>Oncol Rep</u> **6**(1): 33-7.
- Kwak, Y. T., J. Guo, et al. (2000). "Analysis of domains in the IKKalpha and IKKbeta proteins that regulate their kinase activity." J Biol Chem **275**(19): 14752-9.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." <u>Nature</u> 227(5259): 680-5.
- Larsen, S. U. (1997). "Reye's syndrome." Med Sci Law 37(3): 235-41.
- Launay, S., O. Hermine, et al. (2005). "Vital functions for lethal caspases." <u>Oncogene</u> 24(33): 5137-48.
- Leblanc, J. F., L. Cohen, et al. (1990). "Synergism between distinct enhanson domains in viral induction of the human beta interferon gene." <u>Mol Cell Biol</u> **10**(8): 3987-93.
- Lehmann, C., H. Sprenger, et al. (1996). "Infection of macrophages by influenza A virus: characteristics of tumour necrosis factor-alpha (TNF alpha) gene expression." <u>Res</u> <u>Virol</u> **147**(2-3): 123-30.
- Lin, D., J. Lan, et al. (2007). "Structure and Function of the NS1 Protein of Influenza A Virus." <u>Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)</u> **39**(3): 155-62.
- Liu, Z. G., H. Hsu, et al. (1996). "Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death." <u>Cell</u> **87**(3): 565-76.
- Lu, Y., M. Wambach, et al. (1995). "Binding of the influenza virus NS1 protein to doublestranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the elF-2 translation initiation factor." <u>Virology</u> 214(1): 222-8.
- Ludwig, S., C. Ehrhardt, et al. (2001). "Influenza virus-induced AP-1-dependent gene expression requires activation of the JNK signaling pathway." J Biol Chem 276(24): 10990-8.

- Ludwig, S., O. Planz, et al. (2003). "Influenza-virus-induced signaling cascades: targets for antiviral therapy?" <u>Trends Mol Med</u> 9(2): 46-52.
- Ludwig, S., S. Pleschka, et al. (2006). "Ringing the alarm bells: signalling and apoptosis in influenza virus infected cells." <u>Cell Microbiol</u> **8**(3): 375-86.
- Ludwig, S., S. Pleschka, et al. (1999). "A fatal relationship--influenza virus interactions with the host cell." <u>Viral Immunol</u> **12**(3): 175-96.
- Ludwig, S., T. Wolff, et al. (2004). "MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants." <u>FEBS Lett</u> **561**(1-3): 37-43.
- Lund, J. M., L. Alexopoulou, et al. (2004). "Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **101**(15): 5598-603.
- Maniatis, T., J. V. Falvo, et al. (1998). "Structure and function of the interferon-beta enhanceosome." <u>Cold Spring Harb Symp Quant Biol</u> **63**: 609-20.
- Marianneau, P., A. Cardona, et al. (1997). "Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death." J Virol 71(4): 3244-9.
- Marjuki, H., M. I. Alam, et al. (2006). "Membrane accumulation of influenza A virus hemagglutinin triggers nuclear export of the viral genome via protein kinase Calphamediated activation of ERK signaling." J Biol Chem 281(24): 16707-15.
- Martin, K. and A. Helenius (1991). "Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import." <u>Cell</u> **67**(1): 117-30.
- Maruoka, S., S. Hashimoto, et al. (2003). "ASK1 regulates influenza virus infection-induced apoptotic cell death." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **307**(4): 870-6.
- Matsui, K., A. Fine, et al. (1998). "Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma." J Immunol 161(7): 3469-73.
- Mazur, I., W. J. Wurzer, et al. (2007). "Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity." <u>Cell Microbiol</u>.
- Melen, K., R. Fagerlund, et al. (2003). "Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein." <u>J Biol Chem</u> 278(30): 28193-200.
- Mogensen, T. H. and S. R. Paludan (2001). "Molecular pathways in virus-induced cytokine production." <u>Microbiol Mol Biol Rev</u> **65**(1): 131-50.
- Mori, I., T. Komatsu, et al. (1995). "In vivo induction of apoptosis by influenza virus." <u>J Gen</u> <u>Virol</u> **76 (Pt 11)**: 2869-73.
- Morris, S. J., G. E. Price, et al. (1999). "Role of neuraminidase in influenza virus-induced apoptosis." J Gen Virol 80 (Pt 1): 137-46.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Mukaigawa, J. and D. P. Nayak (1991). "Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2." J Virol 65(1): 245-53.
- Muthumani, K., D. S. Hwang, et al. (2002). "HIV-1 Vpr induces apoptosis through caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells." J Biol Chem 277(40): 37820-31.
- Nath, S. T. and D. P. Nayak (1990). "Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1 N1)." <u>Mol Cell Biol</u> 10(8): 4139-45.
- Neumann, G., M. R. Castrucci, et al. (1997). "Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein." <u>J Virol</u> **71**(12): 9690-700.
- Neumann, G., M. T. Hughes, et al. (2000). "Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1." Embo J 19(24): 6751-8.

- Nicoletti, I., G. Migliorati, et al. (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." J Immunol Methods 139(2): 271-9.
- Nieto, A., S. de la Luna, et al. (1994). "Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit." J Gen Virol **75 (Pt 1)**: 29-36.
- Nimmerjahn, F., D. Dudziak, et al. (2004). "Active NF-kappaB signalling is a prerequisite for influenza virus infection." J Gen Virol **85**(Pt 8): 2347-56.
- O'Neill, R. E., R. Jaskunas, et al. (1995). "Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import." J Biol Chem **270**(39): 22701-4.
- O'Neill, R. E., J. Talon, et al. (1998). "The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins." <u>Embo J</u> 17(1): 288-96.
- Obenauer, J. C., J. Denson, et al. (2006). "Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates." <u>Science</u> **311**(5767): 1576-80.
- Olsen, C. W., J. C. Kehren, et al. (1996). "bcl-2 alters influenza virus yield, spread, and hemagglutinin glycosylation." J Virol **70**(1): 663-6.
- Pahl, H. L. and P. A. Baeuerle (1995). "Expression of influenza virus hemagglutinin activates transcription factor NF-kappa B." J Virol **69**(3): 1480-4.
- Palombella, V. J., O. J. Rando, et al. (1994). "The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B." <u>Cell</u> 78(5): 773-85.
- Patre, M., A. Tabbert, et al. (2006). "Caspases target only two architectural components within the core structure of the nuclear pore complex." J Biol Chem **281**(2): 1296-304.
- Pichlmair, A., O. Schulz, et al. (2006). "RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates." <u>Science</u> **314**(5801): 997-1001.
- Piette, J., B. Piret, et al. (1997). "Multiple redox regulation in NF-kappaB transcription factor activation." <u>Biol Chem</u> **378**(11): 1237-45.
- Pinto, L. H., L. J. Holsinger, et al. (1992). "Influenza virus M2 protein has ion channel activity." <u>Cell</u> 69(3): 517-28.
- Pleschka, S., R. Jaskunas, et al. (1996). "A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus." <u>J Virol</u> 70(6): 4188-92.
- Pleschka, S., T. Wolff, et al. (2001). "Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade." <u>Nat Cell Biol</u> **3**(3): 301-5.
- Plotch, S. J., M. Bouloy, et al. (1979). "Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro." <u>Proc Natl Acad Sci</u> <u>U S A</u> 76(4): 1618-22.
- Puthavathana, P., P. Auewarakul, et al. (2005). "Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand." J Gen Virol 86(Pt 2): 423-33.
- Qian, X. Y., F. Alonso-Caplen, et al. (1994). "Two functional domains of the influenza virus NS1 protein are required for regulation of nuclear export of mRNA." J Virol 68(4): 2433-41.
- Qiu, Y. and R. M. Krug (1994). "The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A)." J Virol **68**(4): 2425-32.
- Qiu, Y., M. Nemeroff, et al. (1995). "The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing." <u>Rna</u> 1(3): 304-16.
- Rao, L., M. Debbas, et al. (1992). "The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 89(16): 7742-6.

- Repik, P., A. Flamand, et al. (1974). "Effect of interferon upon the primary and secondary transcription of vesicular stomatitis and influenza viruses." J Virol 14(5): 1169-78.
- Richardson, J. C. and R. K. Akkina (1991). "NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells." <u>Arch Virol</u> **116**(1-4): 69-80.
- Roehrig, S., A. Tabbert, et al. (2003). "In vitro measurement of nuclear permeability changes in apoptosis." <u>Anal Biochem</u> **318**(2): 244-53.
- Ronni, T., T. Sareneva, et al. (1995). "Activation of IFN-alpha, IFN-gamma, MxA, and IFN regulatory factor 1 genes in influenza A virus-infected human peripheral blood mononuclear cells." J Immunol 154(6): 2764-74.
- Rott, R. (1992). "The pathogenic determinant of influenza virus." <u>Vet Microbiol</u> **33**(1-4): 303-10.
- Scholtissek, C. and K. Muller (1991). "Failure to obtain drug-resistant variants of influenza virus after treatment with inhibiting doses of 3-deazaadenosine and H7." <u>Arch Virol</u> 119(1-2): 111-8.
- Schreck, R., P. Rieber, et al. (1991). "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1." <u>Embo J</u> 10(8): 2247-58.
- Schultz-Cherry, S., N. Dybdahl-Sissoko, et al. (2001). "Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells." J Virol **75**(17): 7875-81.
- Schultz-Cherry, S. and V. S. Hinshaw (1996). "Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta." <u>J Virol</u> **70**(12): 8624-9.
- Sedger, L. M., D. M. Shows, et al. (1999). "IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression." J Immunol 163(2): 920-6.
- Sethi, S. (2002). "Bacterial pneumonia. Managing a deadly complication of influenza in older adults with comorbid disease." <u>Geriatrics</u> **57**(3): 56-61.
- Shapiro, G. I., T. Gurney, Jr., et al. (1987). "Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs." J Virol 61(3): 764-73.
- Shapiro, G. I. and R. M. Krug (1988). "Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer." <u>J Virol</u> 62(7): 2285-90.
- Sherman, M. P. and W. C. Greene (2002). "Slipping through the door: HIV entry into the nucleus." <u>Microbes Infect</u> 4(1): 67-73.
- Silic-Benussi, M., I. Cavallari, et al. (2004). "Suppression of tumor growth and cell proliferation by p13II, a mitochondrial protein of human T cell leukemia virus type 1." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 101(17): 6629-34.
- Siren, J., T. Imaizumi, et al. (2006). "Retinoic acid inducible gene-I and mda-5 are involved in influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines." <u>Microbes Infect</u> 8(8): 2013-20.
- Soldani, C. and A. I. Scovassi (2002). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update." <u>Apoptosis</u> 7(4): 321-8.
- Sprenger, H., R. G. Meyer, et al. (1996). "Selective induction of monocyte and not neutrophilattracting chemokines after influenza A virus infection." J Exp Med 184(3): 1191-6.
- Stegmann, T., J. M. White, et al. (1990). "Intermediates in influenza induced membrane fusion." <u>Embo J</u> 9(13): 4231-41.
- Steinhauer, D. A. and J. J. Holland (1987). "Rapid evolution of RNA viruses." <u>Annu Rev</u> <u>Microbiol</u> **41**: 409-33.
- Subbarao, K., A. Klimov, et al. (1998). "Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness." <u>Science</u> **279**(5349): 393-6.

- Suzuki, Y., T. Ito, et al. (2000). "Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses." J Virol 74(24): 11825-31.
- Suzuki, Y. J. and L. Packer (1993). "Inhibition of NF-kappa B activation by vitamin E derivatives." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **193**(1): 277-83.
- Takizawa, T., S. Matsukawa, et al. (1993). "Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells." J Gen Virol 74 (Pt 11): 2347-55.
- Tanaka, N., M. Sato, et al. (1998). "Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells." <u>Genes Cells</u> **3**(1): 29-37.
- Tang, N. M., M. J. Korth, et al. (1999). "Inhibition of double-stranded RNA- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by tetratricopeptide repeat protein and cochaperone P58(IPK)." <u>Mol Cell Biol</u> 19(7): 4757-65.
- Taniguchi, T. and A. Takaoka (2002). "The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors." <u>Curr Opin Immunol</u> **14**(1): 111-6.
- Technau-Ihling, K., C. Ihling, et al. (2001). "Influenza A virus infection of mice induces nuclear accumulation of the tumorsuppressor protein p53 in the lung." <u>Arch Virol</u> **146**(9): 1655-66.
- Terai, C., R. S. Kornbluth, et al. (1991). "Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1." J Clin Invest **87**(5): 1710-5.
- Thanos, D. and T. Maniatis (1995). "Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome." <u>Cell</u> **83**(7): 1091-100.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." <u>Science</u> **281**(5381): 1312-6.
- Tiran, A., H. J. Gruber, et al. (2002). "Aspirin inhibits Chlamydia pneumoniae-induced nuclear factor-kappa B activation, cytokine expression, and bacterial development in human endothelial cells." <u>Arterioscler Thromb Vasc Biol</u> 22(7): 1075-80.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> **76**(9): 4350-4.
- Toyoda, T., M. Kobayashi, et al. (1996). "Molecular dissection of influenza virus RNA polymerase: PB1 subunit alone is able to catalyze RNA synthesis." <u>Virus Genes</u> **12**(2): 155-63.
- Tumpey, T. M., X. Lu, et al. (2000). "Depletion of lymphocytes and diminished cytokine production in mice infected with a highly virulent influenza A (H5N1) virus isolated from humans." J Virol 74(13): 6105-16.
- Van Campen, H., B. C. Easterday, et al. (1989). "Destruction of lymphocytes by a virulent avian influenza A virus." J Gen Virol **70 (Pt 2)**: 467-72.
- Van Campen, H., B. C. Easterday, et al. (1989). "Virulent avian influenza A viruses: their effect on avian lymphocytes and macrophages in vivo and in vitro." J Gen Virol 70 (Pt 11): 2887-95.
- Vargas, F. S., M. Croce, et al. (1992). "Effect of inhaled furosemide on the bronchial response to lysine-aspirin inhalation in asthmatic subjects." <u>Chest</u> **102**(2): 408-11.
- Wang, X., C. F. Basler, et al. (2002). "Functional replacement of the carboxy-terminal twothirds of the influenza A virus NS1 protein with short heterologous dimerization domains." J Virol 76(24): 12951-62.
- Webster, R. G., W. J. Bean, et al. (1992). "Evolution and ecology of influenza A viruses." <u>Microbiol Rev</u> 56(1): 152-79.
- Wurzer, W. J., C. Ehrhardt, et al. (2004). "NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation." J Biol Chem 279(30): 30931-7.

- Wurzer, W. J., O. Planz, et al. (2003). "Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation." <u>Embo J</u> **22**(11): 2717-28.
- Yamada, H., R. Chounan, et al. (2004). "Mitochondrial targeting sequence of the influenza A virus PB1-F2 protein and its function in mitochondria." <u>FEBS Lett</u> **578**(3): 331-6.
- Yasuda, J., S. Nakada, et al. (1993). "Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix." <u>Virology</u> **196**(1): 249-55.
- Yin, M. J., Y. Yamamoto, et al. (1998). "The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta." <u>Nature</u> **396**(6706): 77-80.
- Yoneda, H., K. Miura, et al. (2003). "Aspirin inhibits Chlamydia pneumoniae-induced NFkappa B activation, cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis and attenuates chlamydial growth." <u>J Med Microbiol</u> **52**(Pt 5): 409-15.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, et al. (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." <u>Nat Immunol</u> 5(7): 730-7.
- Zamarin, D., A. Garcia-Sastre, et al. (2005). "Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1." <u>PLoS Pathog</u> 1(1): e4.
- Zamarin, D., M. B. Ortigoza, et al. (2006). "Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice." J Virol **80**(16): 7976-83.
- Zell, R., A. Krumbholz, et al. (2006). "Influenza A virus PB1-F2 gene." <u>Emerg Infect Dis</u> **12**(10): 1607-8; author reply 1608-9.
- Zhirnov, O. P. and A. G. Bukrinskaya (1981). "Two forms of influenza virus nucleoprotein in infected cells and virions." <u>Virology</u> **109**(1): 174-9.
- Zhirnov, O. P., T. E. Konakova, et al. (1999). "Caspase-dependent N-terminal cleavage of influenza virus nucleocapsid protein in infected cells." J Virol **73**(12): 10158-63.
- Zhirnov, O. P., T. E. Konakova, et al. (2002). "NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis." <u>J Virol</u> **76**(4): 1617-25.
- Zhirnov, O. P., A. L. Ksenofontov, et al. (2002). "Interaction of influenza A virus M1 matrix protein with caspases." <u>Biochemistry (Mosc)</u> **67**(5): 534-9.
- Zhou, N. N., D. A. Senne, et al. (1999). "Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs." J Virol **73**(10): 8851-6.

## Anhang



p65 siRNA Zielsequenz: aacactgccgagctcaaga

Abbildung 42: pSR-GFP/Neo Vector und die p65 siRNA Zielsequenz





Das Plasmidsystem wurde zu Generierung von rekombinanten Influenza Viren vom Subtyp A/PR8/34 verwendet. Adaptiert vom (Hoffmann et al. 2000).



#### Abbildung 44: Influenza pHMG Vektor System

Das "reverse genetics" Plasmidsystem pHMG (Gautier et al. 1989) wurde für die Untersuchunger von Polymeraseaktivität verwendetverwendet. Das Reportergen-Plasmid besitzt dabei ein Luciferase ORF in negativer Orientierung und Pol I Promotorbindestellen. Die pHMG Plasmide exprimieren die Proteine PB1, PB2, PA und NP vom Influenza Subtyp A/WSN/33 von einem Hydromethylglutaryl-Coenzym A Reduktase Promotor (HMG). Diese Proteine bilden das Influenza A Polymerasekomplex und sind sodann in der Lage die "virusähnliche" Luciferase RNA vom Reportergenplasmid zu amplifizieren und transkribieren, was photometrisch erfasst werden kann und Rückchlüsse auf die Aktivität der viralen Polymerase erklaubt (adaptiert nach (Pleschka et al. 1996)).



Abbildung 45: Sonstige Vektorkarten

# Veröffentlichungen

Mazur, I., W. J. Wurzer, et al. (2007). "Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity." <u>Cell Microbiol</u>.

Mazur, I., W. J. Wurzer, et al. (2004). "The anti-influenza viral activity of aspirin involves inhibition of NF-kappaB dependent expression of proapoptotic factors and block of caspase-mediated viral RNP export." <u>8<sup>th</sup> Joint Meeting Signal Transduction</u>.

Mazur, I., Anhlan, D., et al. (2006). "Nuclear functions of the influenza virus PB1-F2 protein." <u>10<sup>th</sup> Joint Meeting Signal Transduction</u>.

Mazur, I., Anhlan, D., et al. (2006). "Novel functions of the influenza virus PB1-F2 protein." <u>Gesellschaft für Virologie, Annual Meeting 2007</u>.

Korte, V., Mazur, I., et al. (2006). "Role of the p38 MAPK cascade in influenza virus replication and host cell defense." <u>10<sup>th</sup> Joint Meeting Signal Transduction</u>.

Mazur, I., W. J. Wurzer, et al. (2006). "Acetylsalicylic acid (ASA) is a non-toxic inhalable anti-influenza virus drug that acts via inhibition of NF-κB without the tendency to induce resistant virus variants." <u>Gesellschaft für Virologie, Annual Meeting 2006</u>.

Egrhardt, C, I., Hrincius, E.R., Mazur, I. et al. (2007). "A polyphenol rich plant extract, CYSTUSS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance." <u>Antiviral Res.</u>

### Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand am Institut für Molekulare Medizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in der Zeit von November 2003 bis Februar 2005 sowie am Institut für Molekulare Virologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster vom Februar 2005 bis Juni 2007.

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mir geholfen haben, diese Arbeit anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt ...

Herrn Prof. Dr. Ludwig für die Überlassung des Themas, seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie die vielen Denkanstösse und Ideen.

Herrn Prof. Dr. Johannes Hegemann für die freundliche Bereitschaft sich als Gutachter und Prüfer bereit zu erklären.

Dr. Anhlan Darisuren für die Generierung rekombinanter Influenza Viren, gute Zusammenarbeit (und den außergewöhnlichen Genuss vom mongolischen Vodka und vergorener Stutenmilch), und Ludmilla Wixler für die Durchführung der Hefe Two-Hybrid Untersuchungen. Besten Dank an Mirko, Carina und Victor für's 1A Korrekturlesen!

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung dieser Arbeit und den Mitgliedern des Graduiertenkolleg 1045/1 für die ideenreichen Vorschläge und interessante Diskussionen.

Meinen Eltern, für ihre Unterstützung, möchte ich an dieser Stelle ganz besonders danken. Und vor allem Virginia für Ihre Geduld.

#### <u>Erklärung</u>

Die hier vorliegende Dissertation habe ich eigenhändig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch nicht bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, Juni 2007

gor Mazur

(Igor Mazur)