

**Die Rolle der p38- und ERK5-MAPK-Kaskaden
in der Influenza-A-Virus-Vermehrung**

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

vorgelegt von
Virginia Korte
aus Leverkusen

Juli 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. Heinz Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2007

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. EINLEITUNG	10
1.1. Influenza-Pandemien	10
1.2. Morphologie des Influenza-A-Virus	12
1.3. Der Influenza-A-Virus-Replikationszyklus.....	13
1.4. Virus-induzierte Genexpression.....	17
1.5. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3, NF- κ B und AP-1 durch RNA-Sensoren .	19
1.6. Die Typ-I-Interferon-Induktion	21
1.7. Die Funktion des Influenza-Virus-Proteins NS1	21
1.8. MAPK-Kaskaden regulieren zelluläre Signale.....	23
1.9. Die p38-MAPK-Kaskade	26
1.10. Die ERK5-MAPK-Kaskade.....	30
1.11. MAPK-Kaskaden und Influenza-A-Virus-Infektion.....	33
1.11.1. Die ERK-MAPK-Kaskade reguliert den vRNP-Export.....	33
1.11.2. Die JNK-MAPK ist an der Typ-I-Interferon-Induktion beteiligt.....	34
1.11.3. Die p38-MAPK ist an der RANTES- und TNF- α -Expression beteiligt.....	34
1.12. Zielsetzung der Arbeit.....	35
2. MATERIAL UND METHODEN	37
2.1. Material.....	37
2.1.1. Chemikalien, Medien und Zellkulturzusätze.....	37
2.1.2. Antikörper	39
2.1.3. Plasmide	39
2.1.4. Sonstige Materialien.....	40
2.2. Stämme und Anzucht.....	40
2.2.1. Viren.....	40
2.2.1.1. Anzucht von Influenza-Viren in embryonalen Hühnereiern.....	40
2.2.1.2. Virale Infektion von Zellen.....	41
2.2.1.3. Bestimmung von Virustitern mittels Plaque-Assay	42
2.2.2. Eukaryotische Zell-Linien/Zellen.....	43
2.2.2.1. Zellkultur	43
2.2.2.2. Kultivierung von Zellen.....	43
2.2.2.3. Einfrieren, Lagerung und Rekultivierung eukaryotischer Zell-Linien.....	44
2.2.2.4. Transiente-Transfektion.....	44
2.2.2.5. Stabil-retrovirale-Transduktion.....	44
2.2.2.6. Immunfluoreszenz	45

2.2.3.	<i>E.coli</i> -Stamm.....	45
2.2.3.1.	Medien für <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	45
2.2.3.2.	Anzucht von <i>E. coli</i>	46
2.2.4.	Molekularbiologische Methoden - DNA/RNA	46
2.2.4.1.	Gelelektrophorese und Geldokumentation.....	46
2.2.4.2.	Restriktionsenzymanalyse von Plasmid-DNA.....	46
2.2.4.3.	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	46
2.2.4.4.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	47
2.2.4.5.	Real-Time-PCR	47
2.2.5.	Molekularbiologische Methoden - Proteine	48
2.2.5.1.	Luziferase-Assay	48
2.2.5.2.	Herstellung von Proteinextrakten und Bestimmung der Proteinkonzentration.....	49
2.2.5.3.	Proteinaufreinigung von GST-MEF2-C.....	49
2.2.5.4.	Immunpräzipitation.....	51
2.2.5.5.	Kinase-Assay	51
2.2.5.6.	BioRad-Suspensions-Proteinassay.....	52
2.2.6.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot-Analyse	52
2.2.6.1.	Herstellung von denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen für die Auftrennung von Proteinen	53
2.2.6.2.	Durchführung der Western-Blot-Analyse.....	54
2.2.6.3.	Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran	54
2.2.6.4.	Western-Blot-Analyse der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Proteine	54
3.	ERGEBNISSE.....	56
3.1.	Die p38-Kinasekaskade wurde in verschiedenen Zell-Linien durch Influenza-A-Viren aktiviert	57
3.1.1.	Das aviäre Influenza-A-Virus FPV induziert die Aktivierung von MKK3/6 und p38 in permissiven Wirtszellen.....	57
3.1.2.	Das aviäre Influenza-A-Virus FPV induziert die Aktivierung von MKK3/6 und p38 auch in nicht-permissiven Wirtszellen.....	58
3.1.3.	Das humane Influenza-A-Virus PR8 induziert die Aktivierung von MKK3/6 und p38 in permissiven Wirtszellen.....	59
3.1.4.	Verschiedene Influenza-A-Virus-Isolate induzieren die Aktivierung von MKK3/6 und p38 zu unterschiedlichen Zeitpunkten in A549-Zellen und primären Monozyten	60
3.2.	Virale RNA induziert die MKK3/6-p38-Aktivierung.....	62
3.2.1.	Synthetische Doppelstrang-RNA induziert die p38-Aktivierung.....	62
3.2.2.	Virale RNA induziert eine effiziente p38-Aktivierung	63
3.3.	Die vRNA-induzierte p38-Aktivierung involviert die Rezeptoren TLR7 und RIG-I.....	65
3.4.	Die Inhibition der MKK3/6-p38 MAPK-Kaskade resultiert in einer reduzierten Virus-	66
Vermehrung.....	66	
3.4.1.	Die Hemmung von p38 durch verschiedene chemische Inhibitoren führt zu der Reduktion der Virus-Replikation	66
3.4.2.	Die MKK6-Aktivität spielt eine wichtige Rolle für die Influenza-A-Virus-Vermehrung.....	67
3.5.	Die virale Proteinexpression wird durch Inhibition des p38-Signalweges nicht beeinflusst.....	70
3.6.	Die Inhibition von p38 bewirkt eine Retention der vRNP-Komplexe im Zellkern.....	71
3.7.	IRF-3-Phosphorylierung wird durch die p38-Inhibition nicht beeinflusst.....	74
3.8.	Die Virus-induzierte Kaspaseaktivität wird durch die p38-Inhibition nicht beeinflusst	75
3.8.1.	p38-Inhibition führt zu einer reduzierten TRAIL-mRNA-Synthese und p38-Aktivierung zu einer erhöhten PARP-Spaltung.....	75
3.8.2.	Inhibition der MKK6-p38-Signalkaskade hat keinen entscheidenden Einfluss auf die Influenza-A-Virus-induzierte Kaspaseaktivität.....	77

3.9.	Die Inhibition des p38-Signalweges führt zu einer reduzierten Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese	78
3.10.	Die Inhibition des p38-Signalweges führt zu einer reduzierten Zytokin-/Chemokin-Expression	81
3.11.	Die ERK5-Kaskade wird in verschiedenen Zell-Linien durch Influenza-A-Viren aktiviert	83
3.11.1.	Das aviäre Influenza-A-Virus FPV induziert die Aktivität von ERK5 in permissiven Wirtszellen	83
3.12.	ERK5-Aktivierung wird durch RNA induziert	84
3.13.	Die Reduktion der ERK5-Proteinexpression hat keinen Einfluss auf die Virus-Replikation ...	90
3.13.1.	Reduktion der ERK5-Proteinexpression durch das ERK5-antisense-Konstrukt, hat keinen Effekt auf die Virus-Replikation in stabil-transduzierten A549-Zellen.....	90
3.13.2.	Eine starke Reduktion der ERK5-Expression, durch vektorbasierte Expression von ERK5 shRNA, hat keinen Effekt auf die Virus-Replikation in stabil-transduzierten A549-Zellen	91
3.14.	ERK5-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Virus-Replikation.....	93
3.15.	Selektive Hyperaktivierung von ERK5 hat keinen Einfluss auf die Virus-Replikation.....	95
3.16.	ERK5 hat keinen Einfluss auf die Virus-Replikation in MDCK-Zellen oder HUVEC.....	98
3.16.1.	Die ERK5-Überexpression hat keinen Einfluss auf den Virustiter in stabil-transduzierten HUVEC	98
3.16.2.	Transiente Überexpression von ERK5 oder der ERK5-AEF-Mutanten hat keinen Effekt auf die Virus-Replikation in MDCK-Zellen.....	99
3.17.	Geänderte ERK5-Expression hat keinen Einfluss auf die IFN-β-Promotoraktivität oder die IRF-3-abhängige Transkription.....	100
4.	DISKUSSION.....	103
	ZUSAMMENFASSUNG	120
	SUMMARY.....	122
	LITERATUR	123

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
AM	Alveolare Makrophagen
AP-1	Aktivator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASA	Acetylsalicylsäure (Aspirin)
ASK1	Apoptose-signalregulierende-Kinase-1
ATF2	activating transcription factor 2
ATP	Adenosintriphosphat
BA	Bovines Albumin
BEC	Bronchialepithelialzellen
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Temperatur in Grad Celsius
Ca	Calcium
ca.	circa
DAPI	4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride
CDC	cell division cycle
CO ₂	Kohlendioxid
CPSF	cleavage and polyadenylation specificity factor
CREB	cAMP response element binding protein
CRM1	chromosome region maintenance protein 1
cRNA	Komplementäre-RNA
C-Terminus	Carboxy-Terminale
ddH ₂ O	Doppelt deionisiertes Wasser
DCs	Dendritic cells
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	Dominant-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ECL	Enhanced chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERK	Extracellular signal regulated kinase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF-2 α	Elongationsfaktor 2 α
ELK-1	Ets-like protein 1
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-Aktivierter-Zellsortierer
FBS	Fötale Rinderserum
FCS	Fötale Kälberserum

g	Erdbeschleunigung; Gramm
GADD	growth arrest and DNA-damage-inducible protein
GDP	Guanidindiphosphat
GFP	grün-fluoreszierendes-Protein
GSK-3	Glycogen synthase kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H/HA	Hämagglutinin-Epitop
HEF	Oberflächen-Hämagglutinin-Esterase-Fusionprotein
HMG-1	High mobility group protein I
Hsp	heat shock proteins
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IRF	Interferon Regulatory Faktor
ISGs	IFN-stimulated genes
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasenpaar
l	Liter
LMB	Leptomycin B
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
μ	Mikro
μl	Mikroliter
m	Milli
M	Matrixprotein
M, mM, μM	Molar, Milimolar, Micromolar
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPK-Kinase-Kinase
MAPKAPK2/3	MAPK-Activated Protein Kinase 2 and 3 or MK2 and MK3/3pK
MBP	myelin basic protein
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
MDA5	melanoma-differentiation-associated protein 5
MEF2	myocyte enhancer factor 2
MEK	Mitogen-activated ERK-activating kinase, MAPKK
MEKK	MEK-Kinase, MAPKKK
MEM	minimal essential medium
MIP-1α	macrophagen inflammatory protein-1α
min	Minute
MK2	MAPK-Activated Protein Kinase 2
MK3	MAPK-Activated Protein Kinase 3, 3pK
MKK	MAPK-Kinase, MAPKK
ml	Milliliter
MLK	Mixed lineage kinase
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	messenger-RNA

MSK1/2	Mitogen and stress activated protein kinase 1/2
MEKK4	MAPK-Kinase-Kinase 4 (MAPKKK4), (MTK1)
Mx-Proteine	myxovirus resistance proteine 1/2, GTPasen
MyD88	myeloid differentiation primary-response protein 88
N/NA	Neuraminidase
NES	Nukleäres Exportsignal
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NK	Natürliche Killerzellen
NLS	Kernlokalisierungssequenz
NPC	nukleären Porenkomplex
NPL	Nukleären Porenkomplex
NS2/NEP	Nukleäres-Export-Protein
N-Terminus	Amino-Terminus
NP	Nukleoproteine
NS	Nichtstrukturproteine
2'5'OAS	2'5'Oligoadenylat-Synthetase
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
p90 RSK	p90 ribosomal S6 kinase
p300/CBP	CREB binding protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PA	polymerase acidic protein
PABII	poly-A-Bindeprotein-II
PARP-1	Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1
PBS	Phosphate buffered saline
PB1/PB2	Polymerase basic protein
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pfu	Plaque Forming Units
pH	„potentia Hydrogenii“, Säurestärke
p.i.	post infection
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Calcium-abhängige Proteinkinase
PKR	dsRNA-abhängige Proteinkinase
Poly(IC)	Polydeoxyinosinic-Polydeoxycytidylic acid
PRD	Positiv Regulatorische Domäne
RANTES	regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RIG-I	retinoic acid-inducible gene I
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RNA	Ribonukleinsäure
RNP's	Ribonukleoprotein-Komplexe
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
RT-PCR	Realtime-PCR
SAPK	Stress activated protein kinase
SB/SB80	Inhibitor von p38, SB203580
SB/SB90	Inhibitor von p38, SB202190
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunden

SGK	Serum- und glucocorticoidinduzierbaren Kinase
SH2-Domäne	Src homology
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3
ssRNA	einzelsträngige RNA
TAB1	transforming growth factor- β -activated protein kinase 1 (TAK1)-binding protein 1
TAK1	transforming growth factor- β -activated protein kinase 1
TBK-1	Traf family member-associated NF- κ B activator-binding kinase 1
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	transforming growth factor- β
T _H	T helper
TRAF6	TNF-receptor-associated factor 6
Tris	Tris (hydroxymethylmethan) aminomethan
TRAIL	Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand, Proapoptotisches Protein
TLB	Triton Lyse Puffer
TLR	Toll Like-Rezeptoren
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
u.a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
wt	Wildtyp
V	Volt
vgl.	vergleiche
vRNA	virale RNA
vRNP	virale Ribonukleoprotein-Komplexe
wt	Wildtyp
ZAP70	ζ -chain-associated protein kinase of 70 kDa
z.B	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Influenza-Pandemien

1918-19 starben bei der „Spanischen Influenza“ Pandemie, welche durch ein Influenza-A-Virus vom Subtyp H1N1 verursacht wurde, weltweit bis zu 40 Millionen Menschen. Nach aktuellen Schätzungen waren ungefähr 700 Millionen Menschen infiziert. Gekennzeichnet durch einen sehr schnellen und klinisch akuten Krankheitsverlauf starben hauptsächlich jüngere Menschen im Alter von 15 bis 34 Jahren, was nicht alleine auf die schlechten Lebensbedingungen am Ende des ersten Weltkrieges und den Mangel an Medikamenten zurückzuführen war. Im letzten Jahrhundert kam es immer wieder zu Influenza-Pandemien wie 1957 die „Asiatische Influenza“, ausgelöst durch ein Virus vom Subtyp H2N2, 1968 die „Hong Kong Influenza“ verursacht durch H3N2 Viren und 1977 die „Russische Influenza“ mit dem Wiederauftreten des Subtyps H1N1. Die Subtypen der Influenza-A-Viren leiten sich durch distinkte Unterschiede in der Antigenität der viralen Oberflächenproteine ab. Die Benennung folgt dem Schema „HXNX“, wobei H (oder HA) für Hämagglutinin und N (oder NA) für Neuraminidase und X für den jeweiligen Subtyp steht. Diese viralen Oberflächenproteine sind die Angriffssubstanzen für die zelluläre und humorale Immunabwehr. Es gibt bislang 16 verschiedene HA- und 9 verschiedene NA-Subtypen. Eine Änderung in der Struktur der viralen Oberflächenproteine kann zu einem veränderten Wirtsspektrum sowie erhöhter Virulenz führen.

Viele Pandemien entstanden in asiatischen Gebieten, wo Menschen und Tiere im tropischen und subtropischen Klima auf engstem Raum zusammenleben. Diese idealen Bedingungen unterstützen das Entstehen neuer Influenza-Virus-Stämme. Das segmentierte Influenza-Virus-Genom fördert die Entstehung neuer Virusvarianten durch den Austausch einzelner RNA-Gensegmente (Reassortanten). Infizieren Influenza-Viren verschiedener Subtypen eine Zelle, können einzelne Gensegmente ausgetauscht werden (antigenic shift) und es können neue Reassortanten entstehen, welche die Ursache globaler Epidemien (Pandemien) sein können. Punktmutationen in antigenen Proteinbereichen (antigenic drift) sind dagegen für die alljährlichen „Influenza-Wellen“ verantwortlich. Die Einteilung der Influenza-Viren in Typ A, B und C beruht auf molekularen und serologischen Charakteristika der viralen Proteine (Nukleoproteine und Matrixproteine). Der am häufigsten vorkommende Influenza-A-Virus-Typ ist für die schwersten Erkrankungen sowie Epidemien und Pandemien verantwortlich. Im Gegensatz zu den sich langsamer verändernden Influenza-B-Virus- und Influenza-C-Virus-

Typ, verändert sich der Influenza-A-Virus-Typ ständig und bildet neue Virusvarianten. Der Influenza-A-Virus-Typ ist vermutlich aviären Ursprungs, denn wildlebende Wasservögel dienen als Hauptreservoir. Der Influenza-A-Virus-Typ befällt die Atemwege von Säugetieren und Vögeln. Der Influenza-B-Virus-Typ kommt nur beim Menschen vor und der Influenza-C-Virus-Typ befällt zwar Menschen und Schweine, führt aber nur selten beim Menschen zu Klinikaufenthalten (Webster et al. 1992).

Das Virus-Partikel bindet mit seinen HA-Molekülen Sialinsäure-enthaltende Rezeptoren, die sich auf der Wirtszelloberfläche befinden. Bisher haben sich nur drei HA-Subtypen (H1, H2 und H3) an die menschliche Population angepasst. Die meisten Viren binden bevorzugt an den Sialinsäurerezeptor „NeuAc α -2,3 Gal“ der sich auf der Zelloberfläche von aviären Zellen befindet und nicht an den Rezeptor „NeuAc α -2,6 Gal“ auf humanen Zellen. Die Änderung der Sialinsäure-Bindungsspezifität ermöglicht dem Influenza-A-Virus die Speziesbarriere zu überschreiten und sich an neue Wirte anzupassen. Da das Virus aber auch ohne Sialinsäurerezeptoren in die Wirtszelle gelangen kann, scheint es dafür noch weitere, unbekannte Rezeptoren zu geben.

Seit Ende der '90er Jahre breitet sich ein hochpathogenes, aviäres Influenza-A-Virus des Subtyps H5N1 in der Vogelpopulation Asiens aus. Diese Virus-Linie verlangt besondere Aufmerksamkeit, da sporadisch auch Menschen infiziert werden. Nach dem Stand vom 29.6.07 haben sich 317 Menschen seit 2003 mit diesen H5N1-Viren infiziert und 191 Menschen sind schon daran gestorben (WHO, Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR)). Viren dieser Sublinie stellen durch die sehr weite Verbreitung und die Anpassung an den menschlichen Sialinsäurerezeptor ein enormes Risiko dar, da sie bei weiterer Adaption an den Menschen eine Influenza-Pandemie auslösen könnten. Das Virus befällt neben den Bronchialepithelzellen auch die humanen Pneumozyten und alveolären Makrophagen (AM) des unteren Respirationstraktes, zerstört die Zellen und erzeugt Lungenentzündungen.

1.2. Morphologie des Influenza-A-Virus

Influenza-Viren gehören zu der Familie der Orthomyxoviren. Sie sind äußerlich pleomorph, haben einen Durchmesser von 80 – 120 nm mit einem linearen, einzelsträngigen, segmentierten RNA-Genom (8-RNA-Segmente, (-) ssRNA-Genom) in negativer Polarität. Das Genom besitzt eine Länge von 13 kb und codiert für bis zu elf Proteine. Neun dieser Proteine (drei Polymerase-Polypeptide PB1, PB2, PA, das Nukleoprotein (NP), die Transmembranglykoproteine HA und NA, das Matrixprotein M1, das Ionenkanalprotein M2 und das Nukleäre Exportprotein (NEP/NS2) bilden die Struktur des Viruspartikels. Zwei Proteine, PB1-F2 und das Nichtstrukturprotein NS1, sind bislang nur in Virus-infizierten Zellen nachgewiesen worden. Das Genom ist in Ribonukleoprotein Komplexen (RNPs) verpackt. Die helikale Struktur der RNPs enthält die drei Polymeraseproteine PB1, PB2, PA und das Nukleoprotein (NP), welches die viralen (-) RNA-Segmente komplexiert (Abbildung 1). Ein NP-Molekül bindet dabei an ca. 24 Nukleotide der viralen RNA (vRNA) (Compans et al. 1972). PB1, PB2 und PA binden an die teilweise komplementären Enden

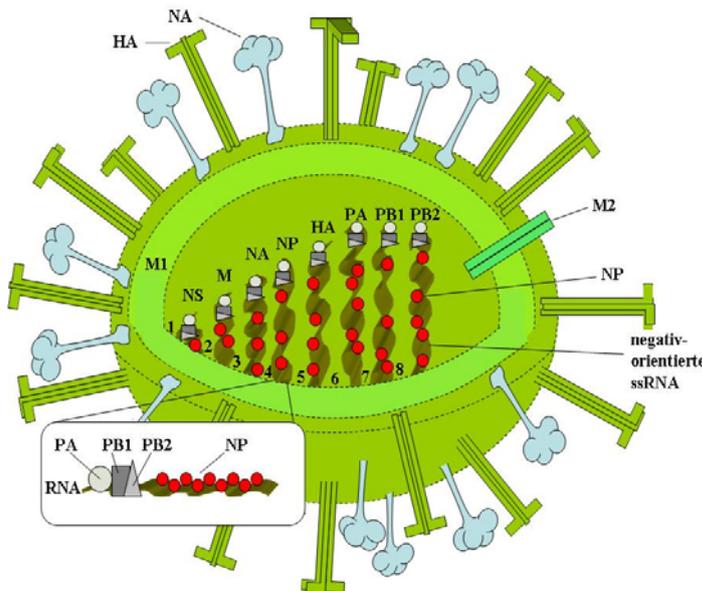


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Influenza-A-Virus

Influenza-A-Virus besitzt 11 Proteine codiert durch 8 einzelsträngige RNA-Segmente in negativer Orientierung. Die Segmente sind nach ihrer Größe sortiert. Im Viruspartikel sind die großen Segmente mittig gelegen und die kleinen Segmente umgeben diese (Noda et al. 2006). Eine Lipiddoppelschicht umhüllt die Segmente.

NS1: nicht strukturelles Protein 1, Interferon-Antagonist

NS2: nicht strukturelles Protein 2 (auch NEP, Nuklear-Export-Protein)

M1: Matrix-Protein

M2: integrales Membran-Protein (Ionenkanal)

NA: Neueaminidase

NP: RNA-bindendes Nukleoprotein

HA: Hämagglutinin

PB1, PB2, PA: Viraler Polymerase-Komplex

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

PB1-F2: Peptid vom alternativen ORF des PB1-Proteins

der vRNA und formen einen nicht kovalent verbundenen, zirkulären Komplex (Klump et al. 1997). Die RNPs haben die Aufgabe das virale Genom zu transkribieren und zu amplifizieren. Das PB2 (polymerase basic protein 2) kontrolliert die Erkennung von zellulären pre-mRNAs, deren abgespaltene Capping-Strukturen für die virale mRNA-Synthese benutzt werden. PB1 katalysiert die Nukleotidanheftung und PA (polymerase acidic protein) besitzt eine Transkriptase-Protease-Aktivität. Eine Lipiddoppelmembran schützt das Virion, in welche die

glykoproteine HA und NA, das Matrixprotein M1, das Ionenkanalprotein M2 und das Nukleäre Exportprotein (NEP/NS2) bilden die Struktur des Viruspartikels. Zwei Proteine, PB1-F2 und das Nichtstrukturprotein NS1, sind bislang nur in Virus-infizierten Zellen nachgewiesen worden. Das Genom ist in Ribonukleoprotein Komplexen (RNPs) verpackt. Die helikale Struktur der RNPs enthält die drei Polymeraseproteine PB1, PB2, PA und das Nukleoprotein (NP), welches die viralen (-) RNA-Segmente komplexiert (Abbildung 1). Ein NP-Molekül bindet dabei an ca. 24 Nukleotide der viralen RNA (vRNA) (Compans et al. 1972). PB1, PB2 und PA binden an die teilweise komplementären Enden

virale Transmembranglykoproteine HA und NA und das Matrixprotein M2, ein pH-abhängiger Ionenkanal eingelagert sind. Aufgabe des HA-Proteins ist die Rezeptorbindung und die Membranfusion. Die NA spaltet Sialinsäurereste der zellulären Glykoproteine, um neu gebildete Viruspartikel von der Zelle zu lösen (Webster et al. 1992). Das Matrixprotein (M1) bindet an die Lipiddoppelmembran und bildet das Innere der Virushülle. NS1 ist ein Interferon-Antagonist und beeinflusst darüber hinaus den zellulären RNA-Transport, das Spleißen und die Translation. Auf dem gleichen Segment befindet sich in einem überlappenden Leserahmen das NS2/NEP Protein. Das zuletzt identifizierte, elfte Influenza-Virus-Protein PB1-F2 wird von einem offenen +1 Leserahmen des PB1-Gensegmentes gebildet. Es wird bislang vermutet, dass PB1-F2 am apoptotischen Zelltod von infizierten Lymphozyten beteiligt ist (Chen et al. 2001). Das Influenza-B-Virus besitzt ein (-) ssRNA-Genom bestehend aus 8 Segmenten während der Influenza-C-Virus-Typ ein (-) ssRNA-Genom mit nur 7 Segmenten besitzt. C-Typ-Influenza-Viren haben statt der NA ein Oberflächen-Hämagglutinin-Esterase-Fusionprotein (HEF).

1.3. Der Influenza-A-Virus-Replikationszyklus

Influenza-A-Viren infizieren beim Mensch bevorzugt die Epithelzellen der oberen Atemwege, aber auch Monozyten/Makropagen und andere Leukozyten (Ronni et al. 1995; Majde 2000). Die Infektion beginnt mit der Bindung der viralen HA-Proteine an die Sialinsäure enthaltenen, zellulären Rezeptoren. Dieser Vorgang wird als Adsorption bezeichnet (Abbildung 2 (a)). Nach der HA-Bindung folgt die Aufnahme des Viruspartikels durch rezeptorvermittelte Endozytose (Abbildung 2 (b)) (Stegmann et al. 1990). Der niedrige pH-Wert in den endosomalen Vesikeln, bedingt durch den Einstrom von Protonen, welcher durch die M2-Proteine (Protonenkanäle) vermittelt wird, bewirkt eine Konformationsänderung des HA-Proteins. Dabei wird die HA2-Untereinheit freigesetzt, eine hydrophobe, fusogene Region am Amino-Terminus (N-Terminus) des HA-Proteins, die an die Endosomenmembran bindet und es kommt zu der Fusion der viralen mit der endosomalen Membran (Abbildung 2 (c)). Dies induziert die Freigabe der viralen RNP- (vRNP) Partikel von den M1-Proteinen, so dass die vRNA in das Zytoplasma der infizierten Zelle gelangt (uncoating) (Bui et al. 1996). Der „uncoating“ Prozess dauert ab der Virusanheftung ca. 25 Minuten (min) und 10 min später kann man die RNP-Komplexe schon im Zellkern nachweisen (Martin und Helenius 1991). Die Membranfusion kann durch eine Änderung des pH-Wertes z.B. mit schwachen Basen (Ammoniumchlorid, Chloroquin) oder Monensin verhindert werden (Martin and Helenius 1991; Wang et al. 1993). Auch Amantadin und Rimantadin verhindern das

„uncoating“ indem sie die Aktivität der M2-Protonenkanäle blockieren. Alle Proteine des vRNP-Komplexes besitzen mindestens zwei eigene nukleäre Lokalisierungssequenzen (NLS = nuclear localization signal), die mit den Importmechanismen der Wirtszelle interagieren und mit deren Hilfe die viralen Proteine unabhängig voneinander in den Zellkern gelangen können (Nath und Nayak 1990; Mukaigawa und Nayak 1991; Nieto et al. 1994; Boulo et al. 2006). Das Nukleoprotein besitzt N-terminal eine nicht-konventionelle NLS (O'Neill et al. 1995; Neumann et al. 1997; Cros et al. 2005) und eine klassische, zweigeteilte NLS (Weber et al. 1998). Die N-terminale NLS veranlasst den Import des NP-Proteins (Wang et al. 1997; Bullido et al. 2000; Cros et al. 2005). Es ist aber nicht bekannt, welche der NLS im vRNP-Komplex für den RNP-Import verantwortlich ist und ob die RNP-Komplexe gemeinsam oder jede Komponente für sich in den Zellkern gelangt (Boulo et al. 2006). Tatsache ist, dass die RNPs mit einem Durchmesser von 15 nm und einer Länge von 50 – 100 nm nicht passiv in den Zellkern diffundieren können (Compans et al. 1972).

Die Aufnahme (Abbildung 2 (d)) der vRNA vom Zytoplasma über die Kernpore in den Zellkern ist ein aktiver Vorgang und benötigt die Transportmechanismen der Wirtszelle (Martin und Helenius 1991). Transportmoleküle, wie Importine (oder auch Karyopherine genannt) befördern Makromoleküle, die größer als 40 kDa sind durch den nukleären Porenkomplex (NPC) (Imamoto et al. 1995). Die zwei verschiedenen Typen von Importinen, α und β gehören zu der Importin- β -Familie. Verschiedene α -Importine erkennen und binden die NLS des viralen NP (Melen et al. 2003). Dieser Komplex wird von Importin- β erkannt und gebunden. Importin- β bindet dann an die Kernpore und veranlasst die Translokation vom Zytoplasma durch die Kernpore in den Zellkern (Bayliss et al. 2000). Die verschiedenen Importin- α -Isoformen dienen als Adaptoren für verschiedene Signale, die alle von einem Importin- β -Molekül erkannt werden (Conti et al. 2006).

Die in den Zellkern transportierte vRNA (Abbildung 2 (e)) dient sowohl zu der Transkription von messenger-RNA (mRNA) für die Proteinsynthese, als auch zu der Synthese von komplementärer RNA (cRNA). Die cRNA wird wiederum für die Neusynthese von vRNA genutzt (Krug und Lamb 2001). Beim „cap stealing“ bindet das PB2-Protein an 5'-Cap-Strukturen zellulärer mRNA und bildet durch eigene Nukleaseaktivität freie 3'-OH-Gruppen, die als Primer für die Transkription viraler-mRNA durch die zelluläre Polymerase-II genutzt werden (Shapiro und Krug 1988). Die mRNA der viralen Gene wird in das Zytoplasma transportiert und ribosomal translatiert (Abbildung 2 (f)). Nach der ribosomalen Synthese der frühen Proteine (PB1, PB2, PA, NP, NS1 und NEP/NS2) im Zytoplasma gelangen diese aktiv per Transport oder passiv per Diffusion (NEP/NS2 hat keine NLS; 14,5 kDa) in den Zellkern

(Abbildung 2 (g)). Die Polymerase-Polypeptide PB1, PB2 und PA bilden den viralen Polymerase-Komplex. Dieser veranlasst die Umschreibung der sekundären vRNA in cRNA als Matrize für neue vRNA und in mRNA für die Synthese der späten, strukturellen Proteine (HA, NA, M1 und M2). Für die Replikation der vRNA bindet die RNA-abhängige RNA-Polymerase an die neu entstandenen, doppelsträngigen 5' und 3' Enden der vRNA (Flick et al. 1996). Das virale Genom wird in der frühen Infektionsphase verstärkt transkribiert und repliziert. Im weiteren Infektionsverlauf nimmt die Transkriptionsrate ab, während die Replikationsrate konstant bleibt (Shapiro et al. 1987). Die neu gebildeten Nukleokapside und RNPs häufen sich im Zellkern an (Abbildung 2 (h)) und werden von dort durch Exportine, wie das Exportin-1, auch CRM1 (Chromosome Region Maintenance protein 1) genannt, und anderen Proteinen, aktiv vom Zellkern durch den NPC in das Zytoplasma transportiert (O'Neill et al. 1998; Pleschka et al. 2001). Für den RNP-Export werden auch die viralen Proteine M1 und das nukleäre Exportprotein NEP/NS2, benötigt (O'Neill et al. 1998; Bui et al. 2000; Neumann et al. 2000). M1 enthält in der N-terminalen Domäne eine NLS und C-terminal eine Assoziationsdomäne für RNP (Baudin et al. 2001). NEP/NS2 ist ein Spleißprodukt des kleinsten viralen Gensegmentes, welches ebenfalls für das NS1 codiert. NEP/NS2 besitzt in der N-terminalen Domäne ein nukleäres Exportsignal (NES), das für den nukleären Export benötigt wird (O'Neill et al. 1998). M1 bindet mit seiner C-terminalen Domäne an die neu gebildeten RNPs und mit der N-terminalen Domäne an NEP/NS2, das wiederum mit seiner N-terminalen Domäne an CRM1 bindet (Neumann et al. 2000). CRM1 bindet an RanGTP, es folgt die Hydrolyse von GTP durch Ran und der Komplex RanGTP-CRM1-NEP/NS2-M1-RNP kann durch den NPC in das Zytoplasma exportiert werden (Akarsu et al. 2003). Man vermutet, dass ca. 20 bis 30 M1-NEP/NS2 Komplexe an ein RNP binden, da ungefähr 200 NEP/NS2 Kopien in Viruspartikeln gefunden wurden (Yasuda et al. 1993). Vermutlich werden auch mehrere CRM1-Moleküle für den Export benötigt. Des Weiteren ist unbekannt, warum nur Negativ-Strang-RNPs oder vRNP und nicht Positiv-Strang oder komplementäre-RNPs aus dem Zellkern exportiert werden (Shapiro et al. 1987). Die zwei zusätzlichen Proteine M1-NEP/NS2 müssen in hoher Konzentration vorhanden sein, um einen RNP-Export zu gewährleisten. Ihre post-translationale Modifikation wird für die Regulation benötigt, denn eine Hyperphosphorylierung von M1 führt zum nukleären Zurückhalten (Whittaker et al. 1995). Der aktive Kernexport kann auch durch das Zellgift Leptomycin B (LMB) inhibiert werden (Elton et al. 2001; Watanabe et al. 2001). LMB verändert das Cystein des Exportin CRM1, welches für die Bildung eines stabilen Substratkomplexes verantwortlich ist (Kudo et al. 1998; Kudo et al. 1999). Die Verknüpfung von M1

mit dem zytosolischen vRNPs verhindert den Reimport in den Zellkern (Whittaker et al. 1996) durch ein Maskieren der NLS der NPs (Bui et al. 1996). Ebenfalls soll die Bindung der NPs an Aktinstressfasern den Re-Import verhindern (Digard et al. 1999).

Nach der Synthese der späten viralen Proteine HA, NA und M2 an den membrangebundenen Ribosomen werden sie glykosiliert. HA, NA und M2 werden zum Golgi-Apparat transportiert und die Cysteine von HA und NA werden palmitoyliert. HA liegt als Trimer vor, NA und M2 als Tetramere. Die Oberflächenproteine HA und NA gelangen mittels Signalsequenzen an die apikale Plasmamembran polarisierter Epithelzellen. HA und NA enthalten Signale für die Verbindung mit Mikrodomänen (lipid rafts) der Plasmamembran, an denen bevorzugt die Knospung stattfindet. Die Mikrodomänen sind Cholesterol- und Sphingo-lipid-reiche Membranstrukturen der Plasmamembran. Sie können nach inter- oder extrazellulären Stimulation von Zellen Plattformen für Rezeptoren bilden, was zu der Aktivierung von weiteren Signalwegen führt. Die Akkumulierung der HA-Proteine an der Plasmamembran und die Interaktion mit den Mikrodomänen führt zu der Aktivierung der Raf-MEK-ERK-Signalkaskade durch die Proteinkinase C α (PKC α) (Marjuki et al. 2006). Die Raf-MEK-ERK-Aktivität vermittelt den aktiven RNP-Export durch Steigerung der Export-Aktivität von NEP. Dagegen wird der passive RNP-Export NF- κ B- (Nuclear factor kappa B) abhängig durch Kaspasen vermittelt (Wurzer et al. 2003; Wurzer et al. 2004) und kann durch geeignete Inhibitoren des Signalweges, wie Aspirin, unterbunden werden (Mazur et al. 2007). Der RNP-Export verläuft also zu frühen Zeitpunkten als ein aktiver, ERK- (Extracellular signal regulated kinase) vermittelter Prozess und zu späteren Zeitpunkten als passiver, Kaspase-vermittelter Export (Ludwig 2007).

Für das komplette RNA-Genom müssen auch alle acht vRNA-Segmente verpackt werden. Man ging davon aus, dass eher die Theorie der „selektiven“ statt der „willkürlichen“ Vereinigung zutrifft, bei der jedes vRNA- (vRNP) Segment unabhängig durch ein einmaliges Verpackungssignal verpackt wird und am Ende exakt acht vRNP-Segmente vorliegen (Enami et al. 1991; Bancroft und Parslow 2002). Bei der Verpackung (Abbildung 2 (i)) werden die aus dem Zellkern transportierten M1-NS2-RNP-Komplexe mit weiteren strukturellen Proteinen (HA, NA, M2) zum Virion vereint (Webster et al. 1992). Die Knospung des Influenza-A-Virus wird durch den Ansammlungsort der Oberflächenproteine bestimmt und findet an der apikalen Plasmamembran der polarisierten Zellen statt. Dieser asymmetrische Vorgang ist wichtig für die Viruspathogenese und den Zelltropismus (Schmitt und Lamb 2005). Die Knospung (Abbildung 2 (j)) beginnt mit einer äußerlichen Krümmung der Plasmamembran. HA verbindet das Virus mit den Sialinsäure enthaltenden Rezeptoren auf

der Wirtszelloberfläche. Die enzymatische Aktivität von NA entfernt die Sialinsäure und bewirkt die Freisetzung des Viruspartikels von seiner Wirtszelle und von anderen Viren (Nayak et al. 2004).

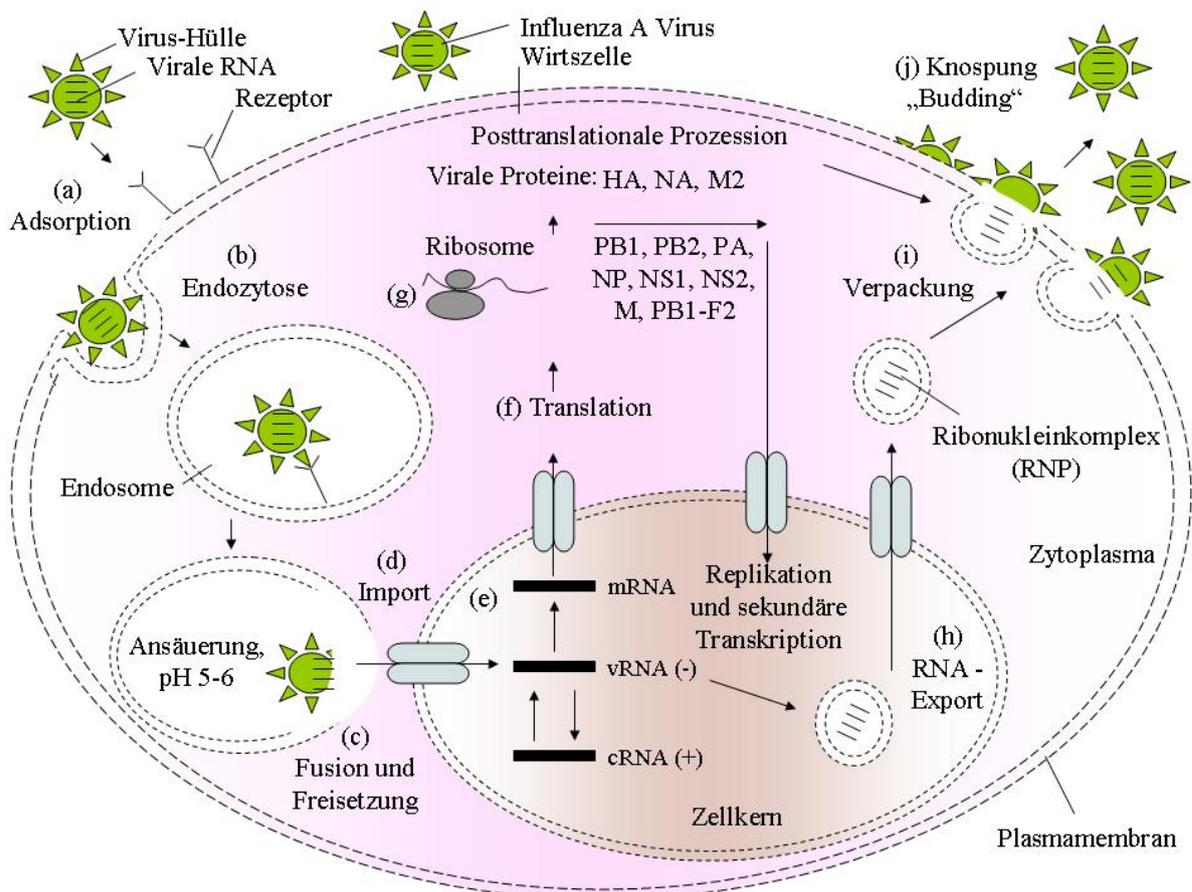


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Influenza-A-Virus-Replikationszyklus

Bei der Adsorption (a) bindet das Virus-Partikel mit seinen HA-Molekülen an die Sialinsäure enthaltenden Rezeptoren, die sich auf der Wirtszelloberfläche befinden. Durch Endozytose (b) gelangt das Virus-Partikel in die Wirtszelle. Eine Ansäuerung der Endovesikel ermöglicht die Fusion der viralen und endosomalen Membran und die vRNA-Komplexe werden freigesetzt (c). Das virale Genom wird in den Zellkern transportiert (d), wo die viralen Gene transkribiert und repliziert werden (e). Die mRNA der viralen Gene wird in das Zytoplasma transportiert und ribosomal translatiert (f). Die neu synthetisierten Polymerasen werden in den Zellkern transportiert (g) und vRNA wird durch den viralen Transkriptionskomplex zu cRNA und vRNA repliziert. Die sekundären vRNAs werden zu viralen mRNAs transkribiert für die Synthese der strukturellen Proteine. Die viralen Nukleokapside und die RNPs häufen sich im Zellkern an (h) und werden von dort in das Zytoplasma transportiert. An der Plasmamembran findet die Verpackung (i) der viralen Nukleokapside mit den RNPs statt und durch Knospung (Budding) werden die fertigen Virus-Partikel freigesetzt (j).

1.4. Virus-induzierte Genexpression

Durch virale Infektionen, vermutlich hauptsächlich durch die Akkumulation von viraler RNA in infizierten Zellen, werden verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert, die u. a. eine antivirale Immunabwehr veranlassen. Als Abwehrmechanismus exprimieren Leukozyten und

andere Zellen Zytokine und Chemokine (Julkunen et al. 2000; Julkunen et al. 2001). Zytokine sind Bestandteile der angeborenen Immunantwort, fördern Entzündungsprozesse sowie Zellproliferation und Differenzierung. Zu den Zytokinen gehören die in Leukozyten gebildeten Interleukine (IL) und die in Leukozyten, Fibroblasten und T-Lymphozyten gebildeten Interferone (IFN) und der Tumornekrosefaktor (TNF = tumor-necrosis factor). Nach einer Influenza-Virus-Infektion beim Menschen exprimieren u.a. infizierte Monozyten proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α , IL-1, IL-6 und IFN- α - β (Ronni et al. 1997; Sareneva et al. 1998). Des Weiteren werden Chemokine (chemotaktische Zytokine) von Phagozyten, dendritischen Zellen sowie Gewebezellen gebildet. Chemokine fungieren im Wesentlichen als Lockstoffe für phagozytierende Zellen, indem sie Monozyten und neutrophile Granulozyten aus dem Blut zu den Infektionsherden z.B. Virus-infiziertem Gewebe, locken. Man unterscheidet CC- und CXC-Chemokine, je nach Rezeptorspezifität. Kurz nach der Virus-Infektion werden die CC-Chemokine MIP-1 α (macrophagen inflammatory protein-1 α), MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) und RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) exprimiert. Zusätzlich werden CXC-Chemokine, wie IL-8 (Choi und Jacoby 1992) und IP-10 nach der Virus-Infektion gebildet. Die Expression der Chemokine wird im weiteren Verlauf der Virus-Infektion durch virale Mechanismen unterdrückt.

Interferone sind die wesentlich antiviral wirkenden Zytokine (Repik et al. 1974). Es gibt zwei verschiedene Gruppen von Interferonen: Typ-I-Interferone (IFN- α und IFN- β) und Typ-II-Interferone (IFN- γ) (Stark et al. 1998). Typ-I-Interferone werden von Monozyten, Makrophagen und Epithelzellen nach Virus-Infektion gebildet (Julkunen et al. 2001). Typ-II-Interferone werden von Th1-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK) exprimiert. IFN- α - β -Interferone induzieren die Expression einer Vielzahl antiviral wirkender Proteine z.B. PKR, der RNAaseL/2'-5' Oligoadenylat-Synthetase (2'-5'OAS) und Mx-Proteine (myxovirus resistance protein 1 and 2 = GTPasen) (Haller et al. 1998). Das proapoptotische Protein TRAIL (Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand) wird ebenfalls über Typ-I-Interferone in Thymozyten und über Typ-II-Interferone in Fibroblasten induziert. TRAIL induziert spezifisch Apoptose in Virus-infizierten Zellen (Sedger et al. 1999) und es kommt zu der Zerstörung des Zytoskeletts und DNA Fragmentierung.

1.5. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3, NF- κ B und AP-1 durch RNA-Sensoren

Die Akkumulation der viralen RNA (Einzelstrang-RNA (ssRNA) oder Doppelstrang-RNA (dsRNA)) während des Virus-Replikationszyklus ist ein starker Stimulus für die Aktivierung mehrerer Signalwege (Ludwig et al. 2006). Da sich die vRNA strukturell von zellulärer RNA unterscheidet, kann die Wirtszelle zwischen eigener und fremder RNA diskriminieren (Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006). Zu der Erkennung der RNA exprimiert die Zelle intrazellulär oder an der Zelloberfläche verschiedene Rezeptoren wie z. B. die TLR (Toll Like Rezeptoren). Es wurden 11 Typen von TLRs in Säugern identifiziert. TLRs spielen eine entscheidende Rolle in der frühen Immunabwehr gegen verschiedene Pathogene. Es sind Typ-I-Membranglycoproteine, die N-terminal extrazelluläre, leucinreiche Wiederholungen LRR (leucin-rich repeat) enthalten, welche konservierte, molekulare Motive, die PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) erkennen. Diese PAMPs findet man in einer Vielzahl von Pathogenen, in Bakterien, Pilzen, Protozoen und Viren (Akira et al. 2001; Takeda et al. 2003; Takeda und Akira 2005; Theofilopoulos et al. 2005). Die molekularen Motive werden von der Wirtszelle als Alarmsignal erkannt und veranlassen primär die Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Bei Virus-Infektion geht dies besonders mit der Expression von Typ-I-Interferonen einher.

TLR3 ist abhängig vom Zelltyp meist in interzellulären Vesikeln (von phagozytotischen Zellen DCs, CD8⁺) aber auch an der Zelloberfläche (Fibroblasten) lokalisiert. TLR3 erkennt dsRNA (Alexopoulou et al. 2001) und müsste daher auch Influenza-Viren in infizierten Zellen detektieren (Guillot et al. 2005). Experimentell nutzt man zu der Untersuchung von dsRNA-Effekten das synthetische Doppelstrang-Analogon poly(IC) (poly-inosinic acid-cytidylic acid). Der TLR3 leitet die Simulation durch dsRNA oder poly(IC) weiter und induziert dadurch die Einleitung der angeborenen Immunantwort (Alexopoulou et al. 2001). TLR3-defiziente Mäuse zeigten bei einer Stimulation mit poly(IC) oder genomischer RNA von Reoviren keine Einleitung der Typ-I-Interferon-Antwort und der proinflammatorischen Zytokine (Alexopoulou et al. 2001). DsRNA stimuliert TLR3 in dem Endosom oder auf der Zelloberfläche. Durch die Stimulation kann sich die konservierte, zytoplasmatische TIR-Domäne (Toll/IL-1R) des TLR3 mit dem Adaptermolekül MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88) verbinden und dieser Komplex aktiviert IRAK (IL-1R-associated kinase). Dies stellt somit eine Signalkaskade dar, die zu der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt. NF- κ B induziert die Sekretion der proinflammatorischen

Zytokine und Effektor-Zytokine, welche die adaptive Immunantwort einleiten. Über einen anderen, MyD88 unabhängigen Weg interagiert die TIR-Domäne mit dem Adapterprotein TRIF. Dieses aktiviert die Kinase TBK-1 (Traf family member-associated NF- κ B activator-binding kinase 1), was zu der Phosphorylierung, Dimerisierung und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3/-7 führt, die im Zellkern die Gene von IFN- α /- β aktivieren.

Den TLR7 findet man im Endosom (DCs), er erkennt ssRNA (Heil et al. 2004; Kawai et al. 2004), die ebenfalls während der Replikation von RNA-Viren in großen Mengen entsteht. Nach der Endozytose werden die viralen Nukleinsäuren an das endosomale Kompartiment übergeben, wo TLR7 das pathogene Muster der ssRNA detektiert. Über MyD88, IRAK, den Faktor TRAF6 (TNF-receptor-associated factor 6) und NEMO (NF- κ B essential modulator) kommt es zu der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B sowie über MyD88 und TBK1 zu der Aktivierung von IRF-3/-7. Sowohl der TLR3-, als auch der TLR7-Signalweg aktiviert über TAK1 die MAPKs (Mitogen-aktivierten Proteinkinasen, wie JNK, p38 und ERK), welche dann den Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator-Protein-1) aktivieren (Kawai und Akira 2006; Kawai und Akira 2006).

Das zytoplasmatische Protein RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) und sein strukturell verwandtes Protein MDA5 (melanoma-differentiation-associated protein 5) (Andrejeva et al. 2004) erkennen ebenfalls RNA innerhalb der Zelle (Siren et al. 2006). RIG-I bindet in Influenza-Virus-infizierten Zellen bevorzugt an virale 5'-Triphosphat-RNA, ohne Capstruktur und erkennt vorwiegend Sendai Virus (SeV) und Δ NS1-Influenza-A-Viren bzw. bevorzugt die Virenfamilien Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Flaviviridae oder Rhabdoviridae an ihrem ssRNA-Genom (Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006). MDA5 detektiert dsRNA nach Transfektion mit synthetischer dsRNA, poly(IC) oder nach Infektion mit Encephalomyocarditis Virus (EMCV, Picornavirus) oder Semliki Forest Virus (SFV). EMCV wird dagegen nicht von RIG-I registriert (Gitlin et al. 2006; Kato et al. 2006).

RIG-I ist eine DExD/H Box RNA-Helikase und besitzt zwei CARD (caspase-recruiting domain) ähnliche Domänen. Die Helikasedomäne wird für die Interaction mit RNA benötigt und die CARD ähnlichen Domänen sind für das Weiterleiten von Signalen und die Aktivierung von IRF-3 und NF- κ B nötig (Yoneyama et al. 2004; Kato et al. 2005). Dafür interagiert RIG-I mit dem IPS-1 (Interferon- β -Promotor-Stimulator-1), auch als MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein), VISA (virus-induced signaling adaptor) und Cardif (CARD adaptor inducing IFN- β) bezeichnet (Haller et al. 2006). RIG-I wird durch RNA stimuliert und dies führt über das Adapterprotein IPS-1 zu der Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 und/oder IRF-7 bei der Proteinkinase TBK1

und/oder IKK- ϵ (I κ B kinase ϵ) sowie zu der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B über IKK α /IKK β und AP-1 über MAPK (Kawai und Akira 2006; Kawai und Akira 2006). Phosphoryliertes IRF-3/-7 dimerisiert und wandert zu der Aktivierung der IFN- α /- β -Gene in den Zellkern.

1.6. Die Typ-I-Interferon-Induktion

Das sehr potente antivirale Zytokin IFN- β besitzt in seiner Promotorsequenz u.a. Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B (Nuclear factor kappa B) und AP-1 (Maniatis et al. 1998; Julkunen et al. 2001) sowie IRF-3 (Interferon Regulatorischer Faktor 3). Diese drei Transkriptionsfaktoren bilden mit weiteren Kofaktoren, wie p300/CBP (CREB binding protein) und zwei HMG-I(Y)-Proteinen (High mobility group protein I), einen übergeordneten Komplex, das IFN- β -Enhanceosom. Die drei Transkriptionsfaktoren binden an die Positiv Regulatorischen Domänen (PRD) des Promoters. Ein aus Homo- oder Heterodimeren bestehender Komplex von IRF-3 und IRF-7 bindet an PRD-I und PRD-III. NF- κ B bindet an PRD-II und das Heterodimer des Leuzinzipper-Proteins ATF2/c-Jun an PRD-IV. Die HMG-I(Y)-Proteine gehen mit NF- κ B und c-Jun eine kooperative Bindung ein. Für die durch das IFN- β -Enhanceosom kontrollierte IFN- β -Expression sind die Koaktivatoren p300/CBP notwendig (Thanos und Maniatis 1995). Die primäre Induktion von IFN- β bewirkt in auto- und parakriner Weise die starke Amplifikation von Typ-I-Interferonen. Entsprechend wirkt die IRF-3-Überexpression antiviral, da damit die Virus-induzierte Expression der Typ-I-Interferone vermittelt wird (Juang et al. 1998).

1.7. Die Funktion des Influenza-Virus-Proteins NS1

Die Influenza-A-Viren inhibieren antiviral wirkende Signalwege, unterbinden die wirtseigene Proteinsynthese und induzieren den Wechsel zu der präferenziellen viralen Proteinsynthese (Gale et al. 2000). Das Influenza-A-Virusprotein NS1 (Nichtstrukturprotein 1) ist als ein Antagonist der antiviralen Typ-I-IFN-Antwort identifiziert worden (Garcia-Sastre 2004). In Influenza-A-Virus infizierten Zellen wird das als Dimer wirkende Protein stark exprimiert. NS1-Proteine sind essentiell für eine produktive Infektion (Min und Krug 2006) und blockieren oder aktivieren Signalwege, um eine effiziente Virus-Replikation zu gewährleisten. Sie unterdrücken die Aktivierung der Rezeptorproteine TLR3, TLR7, RIG-I und/oder MDA5 (Andrejeva et al. 2004; Hiscott et al. 2006; Kato et al. 2006) sowie die Aktivierung

verschiedener Signalwege, welche Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, AP-1 und IRF-3 aktivieren und Typ-I-IFN induzieren (Garcia-Sastre 2001; Ludwig et al. 2001).

Eine Deletion des kompletten NS1 im Virus (Δ NS1) bewirkt eine 100-fach höhere IFN- α -Induktion, verglichen mit dem Wildtypvirus (Diebold et al. 2003; Fernandez-Sesma et al. 2006). Da die Funktion von NS1 in der Virusmutante fehlt, kann keine RNA mehr abgefangen werden und wird so von den Wirtszellrezeptoren erkannt, was eine erhöhte Aktivierung von der JNK (c-Jun N-terminale Kinase) (Ludwig et al. 2001) oder der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF-3 (Talon et al. 2000; Wang et al. 2000) zur Folge hat. Dagegen zeigt die klassische ERK-Kaskade keine stärkere Aktivierung bei einer Δ NS1-Infektion, was mit dem Ergebnis übereinstimmt, dass sich diese Kaskade auch nicht durch dsRNA aktivieren lässt (Marjuki et al. 2006).

Darüber hinaus sind die viralen NS1-Proteine an der mRNA-Prozessierung beteiligt (Chen und Krug 2000) und in die Apoptoseinduktion involviert (Schultz-Cherry et al. 2001; Zhirnov et al. 2002). NS1-Proteine besitzen N-terminal eine dsRNA Bindedomäne, welche an die gewöhnliche A-Form der dsRNA bindet (Chien et al. 2004). Jede Polypeptidkette der NS1-Domäne enthält drei α -Helices. In der zweiten α -Helix ist die Aminosäure, Arginin-38, welche für die NS1-dsRNA-Bindung benötigt wird und es werden Homodimere gebildet (Wang et al. 1999). NS1 bindet während der Virus-Replikation intrazellulär angehäufte ssRNA oder dsRNA-ähnliche Nukleinsäuren mit der NS1-RNA Bindedomäne und maskiert so das Signalmuster für die Rezeptorerkennung (Pichlmair et al. 2006). Diese Rezeptoren führen zu der Aktivierung der Typ-I-IFN-Gen-Expression sowie die Aktivität der IFN- α -/ β -induzierten 2'5'OAS/RNaseL. DsRNA aktiviertes 2'5'OAS polymerisiert ATP in 2'-5'oligo(A)-Ketten, was zu der RNaseL-Aktivierung führt, welche mRNAs und ribosomale RNAs abbaut und dadurch die Virus-Replikation inhibiert (Sen 2000). Die Bindung von NS1 an dsRNA verhindert die Aktivierung von 2'5'OAS und somit die Aktivierung der RNaseL (Min und Krug 2006).

Durch die Bindung der NS1-Proteine an dsRNA wird ebenfalls die Aktivierung der IFN-induzierbaren dsRNA-abhängigen Kinase PKR verhindert (Enami et al. 1994). Aktivierte PKR wirkt antiviral, weil sie durch die Phosphorylierung des eIF-2 α (Elongationsfaktor 2 α) den Abbruch der Proteinsynthese induziert (Lu et al. 1995). NS1-Proteine können mit der PKR aber auch eine direkte Bindung eingehen und somit zu der Hemmung der PKR beitragen (Tan und Katze 1998).

NS1 bindet direkt an die p85-Untereinheit der PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase) über ein phosphoryliertes Tyrosin, das durch die SH2-Domäne (Src homology) der regulatorischen

PI3K-Untereinheit registriert wird (Hale et al. 2006). Die Bindung und Aktivierung von PI3K resultiert in der Aktivierung des PI3K-Effektors Akt (PKB = Proteinkinase B), was zu der Inhibition von Kaspase-9 und GSK-3 β und somit zu der Vermeidung einer zu frühen Apoptoseinduktion in infizierten Zellen führt (Ehrhardt et al. 2006). Fünf Stunden nach Infektion induziert NS1 das Ausschalten der zellulären Proteinsynthese. Die Effektor-domäne von NS1 bindet das zelluläre poly-A-Bindeprotein-II (PABII) und den Faktor CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) (Nemeroff et al. 1995; Qian et al. 1995). Die Bindung an PABII verhindert die Erweiterung des poly-A-Teils der zellulären prä-mRNAs im Zellkern (Chen et al. 1999). CPSF kann durch die Bindung von NS1 nicht mehr an prä-mRNAs binden und es findet keine effiziente 3'End-Prozessierung statt (Shimizu et al. 1999). Durch die Hemmung der Polyadenylierung und des Spleißens von zellulären prä-mRNAs wird in beiden Fällen der Export der zellulären prä-mRNAs verhindert (Chen und Krug 2000). NS1-Proteine fördern somit die Translation von mRNAs mit viralen 5'-Sequenzen.

1.8. MAPK-Kaskaden regulieren zelluläre Signale

Durch die Rezeptoren der Zelloberfläche steht die Zelle mit ihrer Umwelt in direkter Verbindung. Auf diese wirken mitogene Stimuli (z.B. Wachstumsfaktoren, Serum), Stress-Stimuli (z.B. oxidativer Stress wie H₂O₂, UV-Bestrahlung, Hyperosmolarität, z.B. durch NaCl, Sorbitol oder Arsenit), proinflammatorische-Stimuli, wie die Zytokine, IL-1, TNF- α sowie verschiedene Pathogene (Viren, Pilze, Bakterien, Würmer). Die unterschiedlichen Stimuli werden von den verschiedenen Rezeptoren in oder auf der Zelle über intrazelluläre Signalkaskaden weitergeleitet und können in der Zelle zu Änderungen der Genexpression, des Zellmetabolismus, oder zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen. Diese Signalübertragung innerhalb der Zelle wird meist durch Kinasen vermittelt, welche in verschiedenen Kinase-Kaskaden angeordnet sind. Da diese Signalezyme nicht nur physiologische zelluläre Antworten auf einen Stimulus regulieren, sondern auch pathophysiologische Prozesse beeinflussen z.B. während einer Influenza-A-Virus-Infektion, sind sie für die virologische Forschung von zentraler Bedeutung (Ludwig et al. 2003; Ludwig 2007). MAPK-Kaskaden sind evolutionär konservierte Enzymkaskaden, die von Pflanzen bis zu Säugern in homologer Form vorkommen. Sie sind in der Lage, eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli in verschiedene zelluläre Antworten zu übertragen (English et al. 1999; Widmann et al. 1999; Hazzalin und Mahadevan 2002) und regulieren auf diese Weise zelluläre Entscheidungen, wie Proliferation, Differenzierung, Zellaktivierung, Apoptose und Immunantwort (English et al. 1999;

Widmann et al. 1999; Pearson et al. 2001; Dong et al. 2002; Johnson und Lapadat 2002; Zhang and Liu 2002; Wada und Penninger 2004).

In Säugetierzellen wurden vier verschiedene, konservierte MAPK identifiziert, von denen jeweils mehrere Isoformen existieren (Abbildung 3): ERK (ERK1/2 oder auch p44/p42 genannt); JNK (JNK1/2/3 = SAPK1 = stress-activated protein kinases); p38 (p38 α / β / γ / δ oder auch SAPK2s, oder CSBPs genannt); und ERK5 (BMK-1 α / β / γ = Big MAP kinase 1 oder MAPK7 genannt) (Sturgill und Wu 1991; Nishida und Gotoh 1993; Robinson und Cobb 1997; Davis 2000; Kyriakis und Avruch 2001; Wang und Tournier 2006). MAPKs werden an einem konservierten Motiv, an einen Tyrosin- und Threonin-Aminosäurerest (T-X-T Motiv) in der Aktivierungsschleife der Kinase phosphoryliert. Die zweifache Phosphorylierung durch MAPK-Kinasen (MAPKK) aktiviert die MAPKs und führt zu einer Konformationsänderung, welche die Substratanbindung und die enzymatische Aktivität erhöht. Die Kinasen besitzen die Fähigkeit, sich selbst zu phosphorylieren (Autophosphorylierung) (Crews et al. 1991). MAPKs haben eine Vielzahl von Substraten, wie Transkriptionsfaktoren ATF2 (activating transcription factor 2), ELK-1 (Ets-like protein 1), c-Fos, c-Jun, MEF2 (myocyte enhancer factor 2), c-Myc oder Proteinkinasen.

Mitogene Stimuli aktivieren die klassische, mitogene MAPK-Kaskade, welche den Prototyp eines MAPK-Moduls darstellt (Abbildung 3). Dabei aktiviert eine MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), eine Serin-Threonin-Kinase Raf durch Phosphorylierung die dual-spezifischen

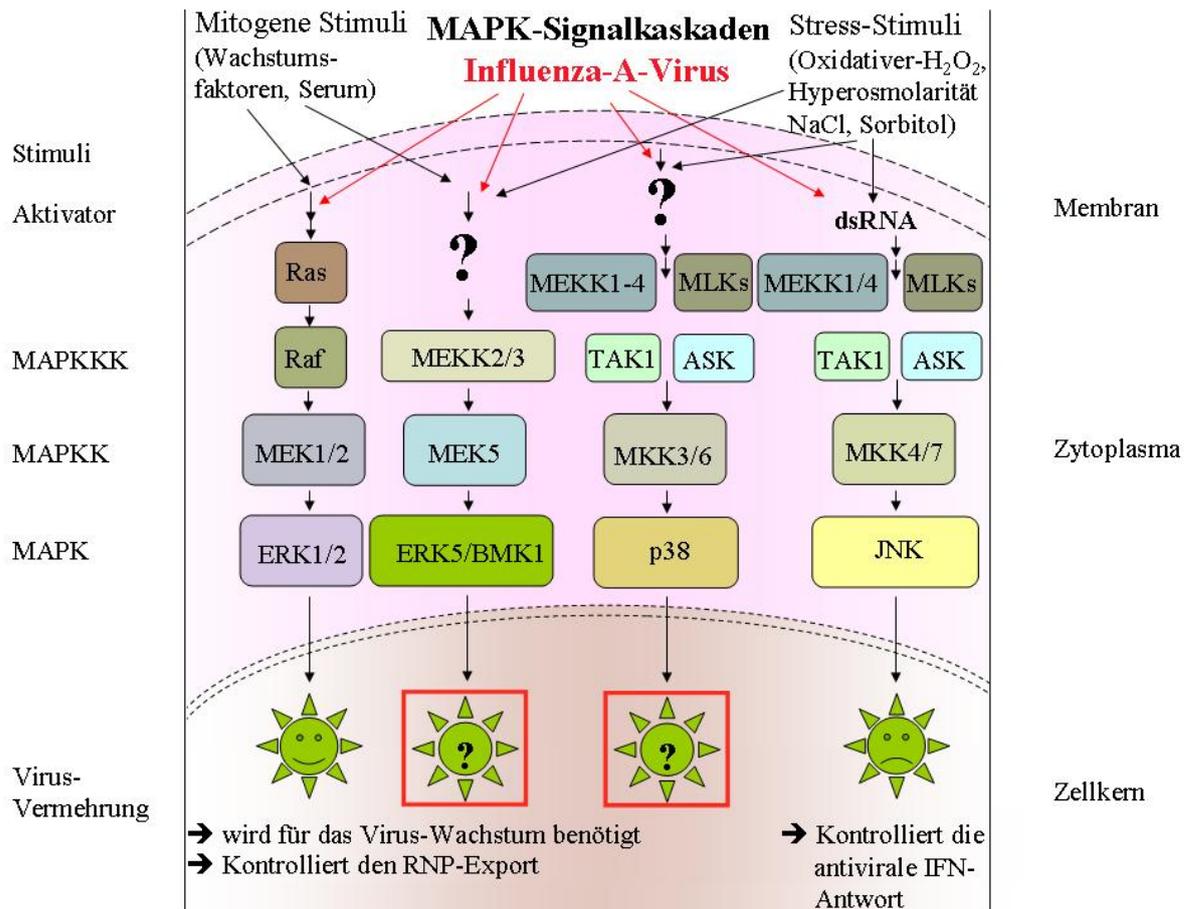


Abbildung 3: MAPK-Signalkaskaden

MAPK-Signalkaskaden sind evolutionär konservierte Module, die Signale von der Zelloberfläche in den Zellkern weiterleiten und dort spezifische Genexpression veranlassen. Es gibt vier verschiedene MAPK-Signalkaskaden in Säugetierzellen die zu der Aktivierung der MAPK-Familienmitglieder ERK1/2, ERK5/BMK-1, p38 und JNK führen. Diese MAPK-Signalkaskaden werden durch verschiedene Stimuli aktiviert. Mitogene Stimuli aktivieren die ERK1/2-Signalkaskade, während Stress-Stimuli und proinflammatorische die p38- und JNK-Signalkaskade aktivieren. Die ERK5-Signalkaskade wird durch beide Stimuli aktiviert. Alle vier bekannten MAPK-Kaskaden werden bei einer Influenza-A-Virus-Infektion aktiviert. Die ERK1/2-Kaskade wird für das Viruswachstum benötigt, da sie den vRNP-Export aus dem Zellkern kontrolliert. Im Gegensatz dazu führt die JNK-Kaskade zu einer verminderten Virus-Vermehrung, da sie die antivirale Interferon-Antwort kontrolliert. Die Untersuchung der Funktion der MAPK-Kaskaden ERK5 und p38 in Bezug auf die Virus-Vermehrung ist Teil dieser Arbeit.

Kinasen MEK1 und MEK2, welche wiederum durch Phosphorylierung die MAPKs ERK1 und ERK2 aktivieren. Stress-Stimuli dagegen führen zu der Phosphorylierung und Aktivierung der Kinasen MKK3/6 und MKK4/7, welche die MAPK p38 und JNK phosphorylieren und aktivieren. Die ERK5-Kaskade unterscheidet sich in Bezug auf ihre Aktivierung von den anderen MAPK-Signalwegen, denn sie wird sowohl von mitogenen als auch von Stress-Stimuli aktiviert. Allerdings sind in besonderen Fällen Stress- und mitogen aktivierte Kaskaden auch untereinander gekoppelt. Arsenit ist ein starker Stress-Stimulus, der zuerst die p38-Kinasekaskade aktiviert und darüber dann die ERK1/2-Kaskade. Die Überexpression von MKK6 und p38 führt zu erhöhter ERK1/2-Aktivität, dagegen konnte die

Blockade von p38 (durch dn-Mutanten oder durch den SB-Inhibitor) die ERK1/2-Aktivität herabsetzen (Ludwig et al. 1998).

1.9. Die p38-MAPK-Kaskade

Die MAPK p38 ist ein 38 kDa großes Protein. Die HOG-Kinase von *Saccharomyces cerevisiae* ist das zuerst identifizierte Homolog dieser Kinase Familie, das den Osmolaritätswechsel wahrnimmt (Han et al. 1994). Die vier p38-Isoformen werden von verschiedenen Genen codiert (Kyriakis und Avruch 2001). Die Isoformen p38 α und p38 β sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 74% (Jiang et al. 1996), p38 α /p38 γ zu 63% (Li et al. 1996) und p38 α /p38 δ zu 61% (Kumar et al. 1997; Hale et al. 1999) identisch. Alle Isoformen besitzen eine aus 12 Aminosäuren (AS) bestehende Aktivierungsschleife, in der sie an dem TGY-Motiv an Tyrosin-182 und Threonin-180 phosphoryliert und dadurch aktiviert werden (Doza et al. 1995; Raingeaud et al. 1995). Aktivierte Isoformen phosphorylieren ähnliche Phosphorylierungsstellen, im Minimalamino-säure-Konsensus, Serin-Prolin und/oder Threonin-Prolin. Die p38 α -Isoform wird in allen Immun- oder inflammatorischen Zellen exprimiert, p38 β und p38 δ wird in T-Zellen exprimiert und das Vorkommen von p38 γ ist auf Muskelzellen begrenzt (Jiang et al. 1996; Lechner et al. 1996; Wang et al. 1997).

Stress-Stimuli, pro-inflammatorische Zytokine (TNF, IL-1, TGF- β = transforming growth factor- β) und Endotoxin können unter anderen über die GTPasen der Rho-Familie (Rac1, Cdc42 = cell division cycle 42) Kinasen aktivieren (Holbrook et al. 1996), die sich oberhalb von p38 befinden. Die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinasen MEKK4 (MAPK-Kinase-Kinase 4), TAK1 (TGF- β -activated protein kinase 1) und ASK1 (Apoptose-signal-regulierende-Kinase 1) führt zu der Phosphorylierung und Aktivierung der dual-spezifischen Kinasen MKK3, MKK4 und MKK6. Die Kinase p38 wird hauptsächlich durch die MKK3, MKK6 (Cohen 1997), seltener durch MKK4 an Thr-180 und Tyr-182 phosphoryliert und aktiviert. Dabei aktivieren MKK3 und MKK6 nur p38, aber nicht ERK1/2 oder JNKs. MKK4 hingegen aktiviert hauptsächlich die JNK-Kaskade. Durch die Phosphorylierung von p38 verschiebt sich die Aktivierungsschleife von p38, was die Kinaseaktivität ansteigen lässt und die Substratanheftung erhöht. Die p38-Kinasen kontrollieren die Funktion von Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen aber auch anderer Proteine. Der Transkriptionsfaktor c-Fos wird von den Isoformen p38 α / β / γ / δ phosphoryliert (Tanos et al. 2005) sowie ATF2 von p38 α / β / δ (Jiang et al. 1996; Hu et al. 1999; Zarubin und Han 2005), ELK-1 von p38 α / β / γ (Yang et al. 1998), MEF2A, C von p38 α / β (Yang et al. 1999), c-Jun von p38 δ (Hu et al.

1999), Sap1a (SRF accessory protein 1) (Galani et al. 2001), CHOP (C/EBP homologous protein) (Wang und Ron 1996; Zarubin und Han 2005), p53 und p73 (Sanchez-Prieto et al. 2000), STAT4 (Signal transducers and activators of transcription) (Visconti et al. 2000) von p38 α phosphoryliert. Auch folgende Kinasen werden durch p38 phosphoryliert: MK2 von p38 $\alpha/\beta/\delta$ (Stein et al. 1997), MK3 von p38 α/β (Rouse et al. 1994; McLaughlin et al. 1996; Smith et al. 2000), MK5 von p38 α/β (New et al. 1998; Seternes et al. 2002; New et al. 2003) (MAPK-Activated Protein Kinases 2, 3 and 5 oder MAPKAPKs -2/-3/-5), MSK1/2 (Mitogen and stress activated protein kinase 1/2) (Deak et al. 1998), MNK1 (MAP kinase interaction protein kinase 1) (Waskiewicz et al. 1997), PRAK (p38 regulated/activated kinase) (New et al. 1998) sowie die Phosphatase CDC25 (Bulavin et al. 2001) und andere Proteine, wie Hsp25, Hsp27 (heat shock proteins) werden von p38 $\alpha/\beta/\delta$ phosphoryliert (Stein et al. 1997).

Der p38-Signalweg ist in eine Reihe verschiedener und komplexer zellulärer Prozesse involviert. Die p38-Signalweiterleitung fördert den Zelltod (Apoptose) (Sarkar et al. 2002; Porras et al. 2004; Wada und Penninger 2004), kann aber auch die Überlebensrate der Zelle erhöhen (Liu et al. 2001; Park et al. 2002) und wird für das Zellwachstum (Juretic et al. 2001) und die Differenzierung (Yosimichi et al. 2001) sowie für die Zytokin-Expression benötigt. Dabei kann p38 die Zytokin-Expression auf verschiedene, unabhängige Weisen regulieren: indirekt, durch Aktivierung anderer Kinasen und direkt durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren sowie durch Stabilisierung und Erhöhung der mRNA-Translation der in Inflammation und Immunität involvierten Zytokine und Rezeptoren, wie IL-1, TGF- β , T_H (T helper), TNF. Z.B in T-Zellen reguliert p38 die Zytokin-Expression von IFN- γ , TNF- α , IL-10 in T-Zell-Rezeptor- (TCR)/Kostimulation vermittelter Immunantwort und in der Th1- und Th2-Effektorfunktion. Somit spielt p38 für die T-Zell-Aktivierung eine wichtige Rolle (Matsuda et al. 1998; Zhang et al. 1999; Zhang und Kaplan 2000; Rincon 2001; Dodeller et al. 2005). TNF- α wiederum reguliert eine Vielzahl von Genen, u. a. auch die SOCS3- (suppressor of cytokine signaling 3) Expression auf dem Level der mRNA-Stabilisierung durch die Aktivierung der p38-MAPK-Kaskade und des Substrats MK2 (Ehltling et al. 2007).

Durch ihren regulierenden Einfluss auf die Zytokin-Expression ist p38 ein therapeutischer Angriffspunkt bei Krankheiten wie Asthma und Autoimmunität. Die Aktivierung der p38 MAPK ist entscheidend für die Zellzyklus kontrollierende, supprimierende Funktion der regulatorischen T-Zellen. Die Inhibition von p38 durch den Inhibitor SB203580 induziert dagegen eine starke Proliferation durch das Aufheben der Anergie (Nichtreagieren auf ein Antigen bei herabgesetzter Immunlage) und den G₀/G₁ Zellzyklusarrest (Adler et al. 2007). Die p38-MAPK-Kaskade kann man auf verschiedene Weisen inhibieren, durch nieder-

molekularen chemischen Inhibitoren (SB203580, SB202190) oder durch Expression dominant-negativer (dn) Mutanten, wie dnMKK3 oder dnMKK6. Die SB-Inhibitoren SB203580 und SB202190 sind Pyridinyl-Imidazol-Komponenten, die beide spezifisch p38 α und p38 β durch die Bindung in der ATP-Tasche inhibieren (Kumar et al. 1997). Dagegen werden die Isoformen p38 γ und p38 δ und enge verwandte MAPKs, wie JNKs und ERKs überhaupt nicht oder nur minimal (bei zu hohen Konzentrationen) durch die SB-Komponenten gehemmt (Cuenda et al. 1995; Kumar et al. 1997). Die Inhibitoren unterbinden die Synthese der pro-inflammatorischen Zytokine, wie IL-1 und TNF bei Makrophagen und anderen Zellen auch nach mitogener Stimulation oder TCR-Ligation mit oder ohne CD28-Kostimulation (Rincon et al. 1998; Zhang et al. 1999; Haeryfar und Hoskin 2001). Die Verabreichung von SB-Inhibitoren erwies sich in Tiermodellen bei den Krankheiten Arthritis (durch Collagen induziert) und septischer Schock (Endotoxin induziert) als heilsam (Lee et al. 1999). Auch bei gesunden Menschen, die freiwillig die SB-Inhibitoren testeten, fand man nach LPS-Stimulation der PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) eine reduzierte pro-inflammatorische Zytokin-Produktion, wenig Neutrophile, kaum Endothelzellaktivierung sowie weniger klinische Symptome (wie Kopfschmerzen oder Kältegefühle) (Branger et al. 2002; Fijen et al. 2002; van den Blink et al. 2004). Dies zeigte, dass p38 α und p38 β für die inflammatorische Antwort auf Endotoxin verantwortlich sind. Die SB-Inhibitoren werden auch als CSAD (cytokine-suppressive anti-inflammatory drug) (Lee et al. 1994) und p38 auch als CSBP (CSAD-binding protein) bezeichnet. Die SB-Inhibitoren sind hoch spezifisch, da sie zuerst an den Aminosäurerest Threonin-106 (T-106) binden und erst dadurch eine weitere Bindung an umliegende Aminosäurereste ermöglicht wird (Tong et al. 1997; Lisnock et al. 1998; Gum und Young 1999). Der Austausch der Aminosäure T-106 von p38 α gegen ein Methionin-106 (M-106) verhindert die Bindung des SB-Inhibitors und führt zu einer SB-insensitiven Kinase (Fox et al. 1998; Eyers et al. 1999). Dagegen entsteht durch den Austausch von M-106 in JNK1, p38 γ und p38 δ durch T-106 eine SB-sensitive Kinase (Eyers et al. 1998; Gum et al. 1998).

Eine weitere Möglichkeit die p38-MAPK-Kaskade zu inhibieren ist der Einsatz der dn-Mutanten MKK3 und MKK6. Mäuse, denen sowohl die Kinase MKK3, als auch MKK6 fehlte, starben an Defekten in der Plazenta und an embryonalen Gefäßleiden (Brancho et al. 2003). Fehlte dagegen nur eine der beiden Kinasen, zeigten die Mäuse einen gesunden Phänotyp (Lu et al. 1999; Wysk et al. 1999; Tanaka et al. 2002). Anscheinend kann eine Kinase die Funktion der anderen ausgleichen. In MKK3/6 doppelt-defizienten Fibroblasten blieb die durch p38-induzierte TNF-Antwort aus, es kam zum Wachstumsarrest,

Serummangel und Tumorbildung. Die Kinase p38 besitzt eine Tumor-unterdrückende Aktivität durch ihren negativen Effekt auf den Zellzyklus und die Fähigkeit, andere Tumorsuppressoren, wie p53, zu aktivieren (Bulavin et al. 1999; Bulavin und Fornace 2004). Eine Deletion von p38 α in Mäusen führt meist vor dem 11.-Tag der Embryonalentwicklung zum Tod (Allen et al. 2000). Dies geht einher mit Defekten in der Angiogenese (Gefäßentstehung), plazentale Insuffizienz (eingeschränkte Funktionsfähigkeit) und Anämie (Blutarmut). Die Anämie wird verursacht durch eine nachlassende Erythropoietin- (Epo) Genexpression, was zu Defekten in der Bildung der roten Blutkörperchen führt (Tamura et al. 2000). Dabei sollte p38 die Epo-Genexpression durch die Stabilisierung der mRNA posttranskriptional beeinflussen. Der plazentale Defekt konnte durch „tetraploid rescue“ (eine Komplementierungsmethode, welche die Entwicklung einer normalen Plazenta ermöglicht) ausgeglichen werden. Dies ist ein Indiz für sekundäre Defekte, herbeigeführt durch eine unzureichende Sauerstoff- und Nährstoff-Versorgung (Adams et al. 2000). Die Kinase p38 spielt also nicht nur eine Rolle bei der Entzündung und der Stress-Antwort, sondern auch in der Entwicklung (Ihle 2000).

Die p38-Kinase ist in der Lage, sich selber zu phosphorylieren. TAB1 ((TAK1)-binding protein 1) kann die Autophosphorylierung von p38 α herbeiführt. Der p38-Inhibitor SB203580 kann aber die zweifache Phosphorylierung von p38 α hemmen, wenn er mit TAB1 co-exprimiert wird. TAB1 leitet die Signale verschiedener Zytokin-Rezeptoren weiter und aktiviert TAK1. TAB1 bindet nur an p38 α , aber nicht an die anderen p38-Isoformen und führt zu der Phosphorylierung und Aktivierung der Kinase. Diese Aktivierung ist MKK unabhängig, da dn-Formen von MKK3, MKK4, MKK6 oder TAK1 dies nicht verhindern konnten. Durch eine TAB1-Mutante, welcher die Aminosäuren für die Interaktion mit TAK1 fehlt (Ge et al. 2002) oder durch eine alternativ gespleißte Form von TAB1, konnte gezeigt werden, dass TAK1, im Gegensatz zu der TAB1 Mutante, die p38 α Aktivierung nicht beeinflusst (Ge et al. 2003).

In T-Zellen gibt es neben dem klassischen noch einen alternativen, MKK-unabhängigen p38-Aktivierungsweg. Dieser führt über den T-Zellrezeptor und der Kinase Lck zu der Kinase ZAP70 (ζ -chain-associated protein kinase of 70 kDa), die dann p38 α /p38 β an Tyr-323 phosphoryliert. Dies induziert die Autophosphorylierung. Die Phosphorylierungsstelle Tyr-323 liegt in dem C-terminalen Bereich von p38. Das konstitutiv exprimierte Protein GADD45 α (growth arrest and DNA-damage-inducible 45 α) kann die p38-Aktivität erhöhen oder inhibieren. GADD45 α kann p38 α /p38 β binden und die Phosphorylierung von Tyr-323 sowie die Aktivität von schon an Tyr-323 phosphoryliertem p38 inhibieren. Andererseits

stimuliert GADD45 α die Kinase MEKK4, welche die Kinasen MKK3, MKK4, MKK6 phosphoryliert und somit die MAPK-Kaskaden JNK und p38 aktiviert. Alle drei Isoformen von GADD45 (α ; β und γ) können MEKK4 binden (Takekawa und Saito 1998). Der alternative Aktivierungsweg von p38, welcher durch die Phosphorylierung von Tyr-323 erfolgt, liefert einen wichtigen Beitrag für die Aktivierung von p38 in T-Zellen, die durch den T-Zell-Rezeptor stimuliert werden.

1.10. Die ERK5-MAPK-Kaskade

ERK5 hat unter den MAPK das größte Molekulargewicht und wird daher auch BMK-1 genannt. ERK5 ist mit 810 AS und etwa 98 kDa mindestens doppelt so groß wie die anderen Kinasen dieser Familie (Lee et al. 1995), z.B. ERK1/2 = 44/42 kDa; JNK1/2 = 49/55 kDa und p38 = 38 kDa. Humanes ERK5 besitzt drei verschiedene Spleißvarianten von mRNA. Die verschiedenen Isoformen ERK5 α , ERK5 β und ERK5 γ unterscheiden sich nur im nicht-kodierenden Bereich voneinander, welcher vor der kodierenden Sequenz liegt. Erstere Isoformen unterscheiden sich von ERK5 γ in der nicht kodierende Region durch ein im Leserahmen liegendes Stoppcodons (bei ERK5 α an Position -114 und bei ERK5 β an Position -12 liegend). Die humane ERK5- α Isoform hat ein Molekulargewicht von 105 kDa, β sowie γ besitzen ein Molekulargewicht von 90 kDa. Auch vom murinen ERK5-Gen konnten durch Sequenzanalysen verschiedene cDNAs als alternative Spleiß-Produkte nachgewiesen werden. Alle drei murinen Isoformen haben ein unterschiedliches Molekulargewicht (mERK5 β = 88 kDa; mERK5 γ = 80 kDa; mERK5 α = 73 kDa) (Yan et al. 2001). ERK5 besitzt Sequenzhomologie mit den MAPK FUS3/KSS1, MPK1/SLT2 und HOG1. Die Proteinsequenz von ERK5 ähnelt dabei mehr der Hefe-MAPK FUS3/KSS1 als der humanen Kinasen ERK1/2 (Lee et al. 1995).

ERK5 wird in hohen Mengen in der Lunge; im Muskel, besonders im Herz; der Plazenta und der Niere, aber nicht in der Leber exprimiert. Die Kinase ERK5 ist essentiell für die kardiovaskuläre Entwicklung und die Nervendifferenzierung. ERK5-defiziente Mäuse sterben am zehnten Tag der Embryonalentwicklung an kardiovaskulären Defekten und angiogenem Ausfall in den embryonalen und extraembryonalen Geweben (Regan et al. 2002; Sohn et al. 2002; Yan et al. 2003). Ähnliche phenotypische Abnormitäten wurden bei Mäusen entdeckt, die einen endothelspezifischen Knockout in ERK5 und in MEK5 hatten (Hayashi et al. 2004; Hayashi und Lee 2004; Wang et al. 2005). ERK5 ist essentiell für die Funktion des Endothels, denn endothelspezifische ERK5-Knockout-Mäuse zeigten, im Gegensatz zu den kardio-

myozytenspezifischen, kardiovaskuläre Defekte (Hayashi et al. 2004; Hayashi und Lee 2004). Der ERK5-Signalweg ist in die Regulation von Apoptose, neuronaler Entwicklung, Differenzierung, Proliferation und Onkogenese (Carvajal-Vergara 2005) involviert.

ERK5 besitzt *in vivo* eine anti-apoptotische Wirkung in endothelialen Zellen. Eine dn-ERK5-Mutante (statt des TEY eine AEF-Mutation) stimuliert in Zellkultur die Apoptose (Pi et al. 2004). ERK5 ist in der Regulation der Nervendifferenzierung von *Xenopus laevis* (Nishimoto et al. 2005) und der Muskeldifferenzierung (Dinev et al. 2001) in Säugern involviert sowie in der Reifungsverzögerung der Kopfausbildung bei ERK5 defizienten Mäusen (Sohn et al. 2002) bzw. des Gesamtkörpers bei *Caenorhabditis elegans* (Watanabe et al. 2005). ERK5 wird aber auch für die Proliferation der Zellen benötigt, zum Beispiel beim Antreiben der Zyklin D1-Expression für den G1/S-Übergang (Kato et al. 1998; Mulloy et al. 2003) und für die Phosphorylierung der Serum- und glucocorticoidinduzierbaren Kinase (SGK), damit die S-Phase beginnen kann (Hayashi et al. 2001).

Die N-terminale Hälfte von ERK5 enthält die konservierte Kinasedomäne mit dem TEY-Aktivierungsmotiv. Diese Loop-12-Aktivierungsschleife hat die größte Ähnlichkeit zu der Hefekinasen MPK1/SLT2, unterscheidet sich aber von ERK1/ERK2. Dagegen ist die sehr lange carboxyl-terminale (C-terminale) Domäne (~ 400 AS) einzigartig und sowohl für die Kinaseregulation, als auch für die Kinaselokalisierung zuständig. Der C-terminale Teil enthält zwei prolinreiche (PR) Domänen (AS 578-690), die keine weitere Ähnlichkeit zu anderen Säugerproteinen haben. Prolinreiche-Motive können mit anderen Proteinen mit Src-Homologie-3-Bindemotiven interagieren, um die Zell-Lokalisierung oder die Enzymproportionen zu regulieren (Kozak 1986; Plath et al. 1994). Der C-Terminus wird für die Aktivierung der Substrate benötigt, wie der Transkriptionsfaktoren MEF2-A, MEF2-C (myocyte enhancer factor 2) (Kato et al. 1997; Marinissen et al. 1999) und Sap1a (Kamakura et al. 1999), NF- κ B (Pearson et al. 2001), c-Myc (English et al. 1998), c-Fos und Fra-1 (Terasawa et al. 2003), CREB (cAMP response element binding protein) (Watson et al. 2001), Ets-1 (Dwivedi et al. 2002). Auch Kinasen, wie p90 RSK (p90 ribosomal S6 kinase), SGK (Hayashi et al. 2001) und andere Proteine, PPAR γ 1 (peroxisome proliferator activated receptor γ 1) werden von ERK5 phosphoryliert. Eine Deletion der C-terminalen Region von ERK5 führt zu der Abnahme der transkriptionellen Aktivität obiger Faktoren. Es wurde gezeigt, dass die C-terminale Hälfte von ERK5 alleine die Fähigkeit besitzt, diese transkriptionelle Aktivität zu erhöhen (Kasler et al. 2000). Ebenfalls wird der C-Terminus mit der zweiteiligen NLS (AS 505-539), für die nukleäre Lokalisierung und für die Autophosphorylierung (an Threonin, Tyrosin und Serin) benötigt (Zhou et al. 1995;

Buschbeck und Ullrich 2005). Der N-terminale Teil von ERK5 enthält eine Domäne (AS 1-77), die für die cytoplasmatische Lokalisierung wichtig ist und eine Domäne (AS 78-139), welche die Verknüpfung mit MEK5 ermöglicht sowie eine Domäne (AS 140-406), die für die Oligomerisierung benötigt wird (Yan et al. 2001). Im Gegensatz zu ERK1/2 oligomerisiert ERK5 sowohl in aktivierten, wie nicht-aktivierten Zellen, mit und ohne Expression von MEK5-D (eine konstitutiv-aktive Variante) (Lenormand et al. 1998).

Nicht nur durch ihre Größe, auch durch ihre Aktivierbarkeit durch extrazelluläre Stimuli unterscheidet sich ERK5 von den MAPK. Die meist zytoplasmatische Kinase ERK5 wird sowohl durch bestimmte Stress-Stimuli wie z.B. durch osmotischen und oxidativen Stress (Abe et al. 1996) als auch durch mitogene Stimuli (Kato et al. 1997; English et al. 1999; Kamakura et al. 1999; Kato et al. 2000) aktiviert, z. B. durch EGF (epidermal growth factor) über Tyrosin-Rezeptor-Kinasen aber auch durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Die Signalaktivierung stimuliert die Kinasen MEK2, MKK3 und Tpl-2, welche die direkt ERK5-aktivierende Kinase MEK5 induzieren. Die aktivierte MEK5 ist sehr spezifisch und phosphoryliert nur ERK5 und keine anderen MAPKs (English et al. 1995; Kato et al. 1997) an Tyrosin-220 und Threonin-218. Die Interaktion von MEK5 mit MEKK2, MEKK3 oder ERK5 wird durch die PB1-Domäne von MEK5 vermittelt (Nakamura und Johnson 2003). Dabei ist jedoch unklar, ob MEKK2 und ERK5 um die MEK5-PB1-Bindestelle konkurrieren (Seyfried et al. 2005) oder die Bindestelle ein Gerüst für den MEK2-MEK5-ERK5-Komplex darstellt (Nakamura et al. 2006).

ERK5 besitzt eine zweiteilige NLS (Kondoh et al. 2006), in der C-terminalen Region. In ruhenden Zellen interagiert aber die N-terminale und die C-terminale Hälfte von ERK5 miteinander, so dass ein NES entsteht oder eine Domäne bei einem zytoplasmatischen Ankerprotein ein NES-Signal wahrnimmt und ERK5 im Zytoplasma verbleibt. In dem Fall ist die NES-Aktivität stärker als die NLS-Aktivität. Nach Aktivierung von ERK5 wird die Interaktion zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Hälfte zerstört und die NES-Aktivität aufgehoben. Die NLS-Aktivität veranlasst, dass ERK5 in den Zellkern wandert. Die Balance zwischen Zellkern-Import und -Export wird durch die intrazelluläre Lokalisierung von ERK5 bestimmt (Kondoh et al. 2006; Nishimoto und Nishida 2006). Überexprimiertes ERK5 ist in ruhenden Zellen im Zytoplasma lokalisiert. Bei einer Co-Expression mit konstitutiv aktiver MEK5 wandert ERK5 in den Zellkern (Kato et al. 1997). Die Lokalisierung des endogenen ERK5 kann je nach Zell-Linie variieren. So kann die Kinase sowohl hauptsächlich zytoplasmatisch, aber auch nukleär oder gleich verteilt sein. Nach

Aktivierung findet man ERK5 aber immer prädominant im Zellkern (Esparis-Ogando et al. 2002; Raviv et al. 2004; Kondoh et al. 2006).

1.11. MAPK-Kaskaden und Influenza-A-Virus-Infektion

Alle vier MAPK ERK, JNK, p38 (Kujime et al. 2000; Ludwig et al. 2001; Pleschka et al. 2001) und, wie in dieser Arbeit gezeigt, ERK5 werden durch eine Infektion mit Influenza-A-Viren aktiviert. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die MAPK eine Funktion bei der Virus-Replikation und der damit verbundenen Immunantwort der Wirtszelle haben könnten.

1.11.1. Die ERK-MAPK-Kaskade reguliert den vRNP-Export

Inhibition der ERK-Kaskade in infizierten Zellen durch den chemischen Inhibitor U0126, welcher spezifisch die MEK1/2 oberhalb von ERK inhibiert oder mit Hilfe von dn-Mutanten von ERK oder dem MEK-Aktivator-Raf, führt zu einem stark erniedrigten Titer von Nachkommenviren, sowohl bei Typ-A- als auch Typ-B-Influenza-Viren (Ludwig et al. 2004), da die viralen RNPs vermehrt im Zellkern zurückgehalten werden (Pleschka et al. 2001).

Dagegen führte die Expression einer konstitutiv-aktiven Form der Raf-Kinase in den alveolären, epithelialen Lungenzellen von Mäusen oder aktiver Mutanten von Raf oder MEK in der Wirtszelle zu einer sehr effizienten Influenza-A-Virus-Replikation und zu einer erhöhten Mortalität, verglichen zu den Wildtypmäusen bzw. Ausgangszellen (Ludwig et al. 2004; Olschlager et al. 2004).

Das Influenza-A-Virus benötigt für ein effizientes Wachstum die Aktivierung der Raf-MEK-ERK-Kaskade. Auch die Replikation anderer Viren, wie Borna-Disease Virus (BDV) (Planz et al. 2001), Visna Virus (Barber et al. 2002), Coxsackie B3 Virus (CVB3) (Luo et al. 2002), humanes Cytomegalovirus (HCMV) (Johnson et al. 2001; Kong et al. 2004), HIV-1 (Yang und Gabuzda 1998; Yang und Gabuzda 1999), Rubella Virus (RV) (Cooray et al. 2005), Adenovirus (Schumann und Dobbstein 2006), Kaposi Sarcoma Herpesvirus (KSHV) (Yu et al. 2007), Maus Hepatitis Virus (MHV) (Cai et al. 2007) wird durch die Blockierung der Raf-MEK-ERK-Kaskade gehemmt.

MEK-Inhibitoren könnten sich als anti-Influenza-Virus-Agenzien eignen, da sie in einer Vielzahl getesteter Zelltypen nicht toxisch wirkten (Planz et al. 2001; Pleschka et al. 2001), keine offensichtlichen Nebenwirkungen haben, im Kontext einer Influenza-Virus-Infektion speziell auf einen gezielten, nukleären Exportweg wirken (Pleschka et al. 2001) und keine Tendenz zu der Bildung von resistenten Virusvarianten zeigten (Ludwig et al. 2004). Die

Hemmung der Raf-MEK-ERK-Kaskade könnte somit für einen antiviralen Eingriff genutzt werden.

1.11.2. Die JNK-MAPK ist an der Typ-I-Interferon-Induktion beteiligt

Es wurde beobachtet, dass Influenza-A-Virus-Infektion zu einer sehr frühen Aktivierung von AP-1-Transkriptionsfaktoren führt (Ludwig et al. 2001). Die AP-1-Faktoren c-Jun und der aktivierende Transkriptionsfaktor 2 (ATF2) werden durch die MAPK JNK phosphoryliert, um ihre transkriptionelle Aktivität zu erhöhen (Karin et al. 1997). Sowohl c-Jun, als auch ATF2 werden bei der Influenza-A-Virus-Infektion phosphoryliert (Ludwig et al. 2001; Ludwig et al. 2002). Eine Aktivierung von JNK wurde nach Infektion mit unterschiedlichen Virusstämmen und verschiedenen, permissiv infizierbaren Zell-Linien beobachtet (Kujime et al. 2000; Ludwig et al. 2001). Eine produktive Virus-Replikation sowie die Akkumulation von RNA während des Vermehrungszyklus führt zu der Aktivierung von MAPK JNK. Im viralen Kontext wurden die zwei Kinasen MKK4 und MKK7 als Aktivatoren von JNK identifiziert. Die AP-1- Faktoren c-Jun und ATF2 sind für die Expression des antiviralen Zytokins IFN- β nötig (Stark et al. 1998). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der JNK-Kaskade während einer Virus-Infektion mit Hilfe von dn-Mutanten von MKK7 oder c-Jun die Transkription vom IFN- β -Promotor beeinträchtigt und dies zu erhöhten Virustitern führt. Der JNK-Signalweg trägt daher wesentlich zu der antiviralen Immunantwort bei, indem sie die Regulation der IFN- β -Expression bei einer Influenza-Virus-Infektion bestimmt (Ludwig et al. 2001).

1.11.3. Die p38-MAPK ist an der RANTES- und TNF- α -Expression beteiligt

Es wurde publiziert, dass die ERK-Kaskade vom Influenza-A-Virus für seine eigene Vermehrung missbraucht wird (Pleschka et al. 2001) während die JNK-MAPK-Kaskade hauptsächlich die antivirale Antwort fördert (Ludwig et al. 2001). Versuche mit spezifischen Kinaseinhibitoren haben weiterhin gezeigt, dass p38 und JNK, aber nicht ERK die Expression des Chemokins RANTES in Virus-infizierten Zellen fördern, welches bei der inflammatorischen Immunantwort als Chemoattraktant für Eosinophile wirkt (Kujime et al. 2000). Blockierung der MAPKs p38, ERK und JNK verringert die Postaglandin E₂- (PGE₂, Gewebshormon das bei Influenza-A-Virus-Infektion freigesetzt wird) Freigabe (Mizumura et al. 2003), was für eine Beteiligung von p38 an der inflammatorischen Immunantwort spricht. Mäusen, die mit einem neurovirulenten Influenza-A-Virus (R404BP) infiziert waren, zeigten

eine tödliche Gehirnentzündung (Enzephalitis) wobei in den neuronalen Zellen des Gehirns eine erhöhte Phosphorylierung der MAPK JNK und p38 detektiert wurde. Es ist jedoch unklar, ob diese Aktivität direkt durch das Virus induziert wird oder indirekt durch die Immunantwort. In embryonalen Fibroblasten (MEFs) von Mäusen, die genetisch defizient für die Kinase ASK1 waren, führte eine Virus-Infektion nur zu einer geringen Aktivierung der MAPK p38 und JNK sowie einer Blockierung der Kaspase-3-Aktivierung und Apoptose. ASK1 aktiviert die Aktivatorkinasen MKK4 und MKK6 des JNK- und p38-Signalweges (Maruoka et al. 2003) und induziert so indirekt über den JNK-/p38-Signalweg die Phosphorylierung von c-Jun und ATF2.

Bei Zellen, welche mit einem hoch pathogenen aviären Influenza-A-Virus vom Subtyp H5N1 infiziert wurden, konnte eine Hyperinduktion der p38-Phosphorylierung im Gegensatz zu Infektionen mit einem Influenza-Virus des Subtyp H1N1 demonstriert werden. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die p38-Kinasekaskade in der viralen Induktion von Zytokinen und Chemokinen eine entscheidende Rolle spielt; speziell TNF- α wurde bei einer Infektion mit H5N1-Viren verglichen mit Viren des Subtyps H1N1 besonders stark exprimiert. Dagegen führte eine Inhibition von p38 mit dem SB203580-Inhibitor in den infizierten Zellen zu einer wirksamen Unterdrückung der Zytokin-Induktion (Lee et al. 2005).

1.12. Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits berichtet wurde, werden drei der insgesamt vier MAPK-Kaskaden, ERK1/2 (Pleschka et al. 2001), JNK (Ludwig et al. 2001) und p38 (Kujime et al. 2000) durch eine Infektion mit Influenza-A-Viren aktiviert. Dabei wurde gezeigt, dass die MAPK-Kaskaden JNK und ERK1/2 eine entscheidende Rolle in der Virus-Replikation spielen. Während die JNK-Kaskade die Virus-Replikation durch die Kontrolle der antiviralen Interferon-Antwort kontrolliert (Ludwig et al. 2001), steuert die ERK1/2-Kaskade die Virus-Replikation durch den vRNP-Export aus dem Zellkern (Pleschka et al. 2001). Dagegen ist über die Rolle der MAPK-Kaskaden p38 und ERK5 in Influenza-A-Virus infizierten Zellen wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der MAPK-Kaskaden p38 und ERK5 auf ihre Aktivierung und Funktion in Influenza-A-Virus-infizierten Zellen (Abbildung 3). Dabei sollte überprüft werden, ob die ERK5-Kaskade durch eine Influenza-A-Virus-Infektion aktiviert wird. Die Aktivierungskinetik der p38-Kinasekaskade sollte in verschiedenen Zellen nach Infektion mit unterschiedlichen Virusisolaten genauer betrachtet werden. Außerdem war die Rolle der Aktivatorkinasen MKK3/6 für die virusinduzierte Aktivierung von p38 zu prüfen.

Darüber hinaus sollte die Funktion der p38- und ERK5-Aktivierung in der Virus-Replikation und der angeborenen Immunantwort untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte die Rolle beider Kinasekaskaden nach Influenza-A-Virus-Infektion durch Inhibition der Signalwege (durch Behandlung mit synthetischen Inhibitoren, shRNA) oder selektive Hyperaktivierung (retrovirale oder transiente Expression von konstitutiv-aktiven Mutanten) in verschiedenen Zell-Linien dargestellt werden. Ebenfalls sollte bei einer Aktivierung überprüft werden, welche virale Komponente für die Aktivierung verantwortlich ist und welche zellulären Rezeptoren die Aktivierungssignale weiterleiten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien, Medien und Zellkulturzusätze

Produkt	Hersteller
Acrylamid (30%), Bisacrylamid (0,8%)	Roth (Karlsruhe)
Aceton	Roth (Karlsruhe)
Adenosin-5'-Triphosphat (ATP)	Sigma (St. Louis)
Agar (gereinigt)	Oxoid (Wesel)
Agarose	Difco (USA)/Gibco
Albumin (Protease frei)	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumacetat	Sigma (St. Louis)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma (St. Louis)
Aprotinin	Roth (Karlsruhe)
Bacto-Agar	Roth (Karlsruhe)
BBE (Bovine Brain Extract)	Cambrex (USA)
Benzamidin	Sigma (St. Louis)
BioRad Protein Assay-Stammlösung	BioRad (München)
Bovines Albumin 35% (BSA)	MP Biomedicals
Bromphenolblau	Fluka (Buchs, Schweiz)
β -Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid (CaCl_2)	Sigma (St. Louis)
Coomassie-Brilliant Blue R-250	Fluka (Buchs, Schweiz)
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol Dilacetat)	Sigma (St. Louis)
D-MEM (4500 mg/l Glucose, GlutaMAX I)	Gibco/PAA (Paisley)
DEAE Dextran	Amersham (Little Chalfont)
Desoxynukleosid- 5'-Phosphate (dNTP's); einzeln als dATP, dTTP, dGTP und dCTP	Fermentas (Litauen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (St. Louis)
Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
DNA-Längenstandardmarker (1 kb-Marker)	Sigma (St. Louis)
EBM (Endothelial Cell Basal Medium)	Cambrex (USA)
EDTA (Na-Ethylendiamintetraacetat)	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol, technisch (96 %)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth (Karlsruhe)
F12 (HAM's) (+GlutaMAX I)	Gibco (Paisley)
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco (Paisley)
GA-1000 (Gentamycin Sulfate, Amphotericin-B)	Cambrex (USA)
D(+)-Glucose	Roth (Karlsruhe)
Glutamin	Roth (Karlsruhe)
Glutathion-Sepharose beads	Pharmacia
Glycerin	Roth (Karlsruhe)

Produkt	Hersteller
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Hydrochloride (HCL)	Roth (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Isoropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG)	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Leupeptin	Serva (Heidelberg)
Lipofectamin 2000	Gibco (Paisley)
Lithiumacetat	Roth (Karlsruhe)
D-Luciferin	Applichem (Darmstadt)
Luminol	Roth (Karlsruhe)
M-199 (Earles Medium 199 (1x))	PAA-Laboratories (Pasching)
Magermilchpulver	Applichem (Darmstadt)
Magnesiumacetat	Sigma (St. Louis)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth (Karlsruhe)
MBP	Sigma (St. Louis)
MEM (+GlutaMAX I)	Gibco (Paisley)
MEM 10x (-L-Glutamin, -NaHCO ₃)	Gibco (Paisley)
Methanol	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natrium Bicarbonat	Gibco (Paisley)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	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)
p-Coumarsäure	Sigma (St. Louis)
Poly (I-C)	Boehringer (Mannheim)
Polybrene	Sigma (St. Louis)
Ponceau S	Sigma (St. Louis)
Protein Ladder	Fermentas (Litauen)
Protein A- / Protein G-Agarose	Roche (Mannheim)
rhEGF (Epidermal Growth Factor Human Recomb.)	Cambrex (USA)
Radiochemikalien	Amersham (Little Chalfont)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
SB202190, SB203580	Calbiochem (Darmstadt)
SDS (Sodium Dodecylsulfat)	Applichem (Darmstadt)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Trypanblau	Gibco (Paisley)
Trypsin-EDTA 0,5%	PAA/Gibco (Linz/Paisley)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)

Produkt	Hersteller
Tumor-Necrosis-Factor- α (TNF- α), rekombinant	Sigma (St. Louis)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Merck (Darmstadt)

2.1.2. Antikörper

Antikörper/Antiserum	Referenz/Herkunft
Alexa Fluor 594 chicken anti-mouse IgG	Invitrogen / Molecular Probes (Paisley/UK)
FLAG	Biomeda (Burlingame California)
BMK1/Erk5	Upstate (Hamburg)
Donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz (Heidelberg)
Donkey anti-rabbit IgG-HRP	Amersham (Little Chalfont)
ERK 2 (C-14)	Santa Cruz (Heidelberg)
ERK5 (C-20)	Santa Cruz (Heidelberg)
MKK3	Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
Influenza A M	Serotec (Düsseldorf)
Influenza A NP	Serotec (Düsseldorf)
Influenza A PB1	Santa Cruz (Heidelberg)
IRF-3	Zymed GmbH (Berlin)
HA (3F10)	Roche (Mannheim)
JNK1 (C-17)	Santa Cruz (Heidelberg)
Phospho-MKK3/6 (Ser189/207)	Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
p38 (N-20)	Santa Cruz (Heidelberg)
PARP	BD Transduction Laboratories (Heidelberg)
Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
Phospho-JNK (Thr183/Tyr185)	BD Transduction Laboratories (Heidelberg)
Phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
Sheep anti-mouse IgG-HRP	Amersham (Little Chalfont)
Anti-RAT IgG-HRP	Sigma (St. Louis)

2.1.3. Plasmide

Plasmid	Herkunft
pcDNA3-flag	Invitrogen
pcDNA3-flag-ERK5-wt	J.D. Lee (Kato et al. 1997)
pcDNA3-flag-ERK5-AEF	J.D. Lee (Kato et al. 1997)
pcDNA3-flag-p38-wt	J. Han, La Jolla
pCFG5 IEGZ (pEGZ)	(Lindemann et al. 1997)
pEGFP-RIG-I	PD Dr. rer. nat Friedemann Weber (Universitäts Klinikum Freiburg)
pEGFP-RIG-I Helicase (dn)	PD Dr. rer. nat Friedemann Weber (Universitäts Klinikum Freiburg)
pEGFP-RIG-I CARD	PD Dr. rer. nat Friedemann Weber (Universitäts Klinikum Freiburg)
pEGZ-HA	(Lindemann et al. 1997)
pEGZ-ERK5-wt sense	(Dinev et al. 2001)
pEGZ-ERK5-wt antisense	(Dinev et al. 2001)
pEGZ-ERK5-AEF sense	(Dinev et al. 2001)
pEGZ-ERK5-AEF antisense	(Dinev et al. 2001)
pEGZ-MEK5-D	D. Spiering (Münster, Doktorarbeit)
pEGZ-HA-MKK6-Ala	Prof. E. Serfling
pGreenLantern	Life Technologies
pGAG-Pol	(Markowitz et al. 1988)

pGal4 MEF2-C	Ludmilla Wixler (Münster)
pME18S-VSV-G(NJ)	(Takebe et al. 1988)
pRSV-flag	Institut für molekulare Virologie (Münster)
pRSV-flag-MKK3-Ala	Roger Davis, Howard Hughes Medical Institut, Maryland, USA
pSR-GFP/Neo	pSUPER RNAi System , Oligoengine
pSR-GFP/Neo ERK5	Ludmilla Wixler (Münster)
IFN- β luc	Hiscott, J. (Montreal), (Leblanc et al. 1990)
4x IRF-3 luc	(Ehrhardt et al. 2004), basierend auf pTATA LUC (Altschmied and Duschl 1997)
5x GAL4 luc	J.D. Lee (Han et al. 1997; Kato et al. 1997)
P uno-hTLR7	InvivoGen (San Diego, Californien, USA)
P uno-hTLR3	InvivoGen (San Diego, Californien, USA)
P zero-hTLR3 deltaTIR	InvivoGen (San Diego, Californien, USA)
P zero-hTLR7 deltaTIR	InvivoGen (San Diego, Californien, USA)

2.1.4. Sonstige Materialien

Material	Firma
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Nitrocellulose	Schleicher & Schuell (Dassel)
Röntgenfilme	Amersham/Agfa (Little Calfont/Köln)
Whatman GB 002 Papier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Zellkultur-Schalen und -Flaschen	Sarstedt (Nümbrecht)

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)
Humanes Influenza-A-Virusisolat Δ NS1-Virusmutante	Wolff T. (Berlin)
Humanes Influenza-A-Virusisolat A/Thailand/1(KAN-1)/2004 (H5N1)	(Puthavathana et al. 2005)
Humanes Influenza-A-Virusisolat A/Viktoria/3/75 (H3N2)	Pleschka S. (Giessen)

2.2.1.1. Anzucht von Influenza-Viren in embryonalen Hühnereiern

Die humanpathogenen Influenza-Viren, z.B. PR8, wurden in bebrüteten Hühnereiern vermehrt. Befruchtete Hühnereier wurden dafür bei 37°C und 70% Luftfeuchtigkeit im Brutkasten 10 Tage inkubiert. Am 11. Tag wurden die Eier unter möglichst sterilen Bedingungen mit Influenza-A-Viren angeimpft. Dafür wurden die Eier erst mit 70%igem Ethanol desinfiziert sowie die verwendeten Geräte (beispielsweise Eieröffner). Mittels Eieröffner wurde auf der Unterseite der Hühnereier ein kleines Loch durch die Kalkschale

gebohrt. Mit einer sterilen Kanüle (0,6 x 30 mm) wurde direkt über der Luftkammer ungefähr 100 µl Virus-Lösung (1 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,2% Bovines Albumin mit 1x10⁻⁴ bis 1x10⁻⁵ Plaque Forming Units Virus) in die Allantoishöhle injiziert. Damit dabei die Embryonen nicht verletzt werden, wurden zuvor die Eier durchleuchtet und die Lage der Luftkammer und des Embryos angezeichnet. Danach wurde das Loch in der Kalkschale mit Holzleim verschlossen und die infizierten Eier für weitere 50 h im Brutkasten (37°C, 70% Luftfeuchte) gelagert. Vor der Virusernte wurden die Embryonen durch Inkubation für 1,5 bis 2 h bei -20°C abgetötet. Die Eierschalen wurden mit 70%igem Ethanol gereinigt. Alle Geräte (Pinzetten etc.) mittels 70%igem Ethanol und Flamme desinfiziert. Danach wurde die Eierschale aufgebrochen, die virushaltige Allantoisflüssigkeit mit einer sterilen 10 ml-Pipette abgenommen, in sterile Röhrchen überführt, auf Eis gestellt und später bei -70°C eingefroren. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte mittels Plaque-Assay (vgl. 2.2.1.3.) auf MDCK-Zellen.

Bei der Vervielfältigung des Virusstammes ΔNS1 dürfen die Hühnereier nicht älter als 4-5 Tage sein. Diesem Influenza-Virus-Stamm fehlt die kodierende Sequenz für das NS1-Protein. NS1 wirkt dem Interferonsystem der Hühnerembryonen und somit der antiviralen Antwort entgegen. Da am Tag 8-9 das Interferonsystem der Hühnerembryonen vollständig ausgebildet ist, kann es die ΔNS1-Virusmutanten sofort vernichten. Deshalb wurde das ΔNS1-Virus nicht länger als Tag 8 in diesen Hühnerembryonen vermehrt.

Für die Vermehrung des aviären Influenza-A-Virus-Stamm FPV wurden MDCK-Zellen verwendet. Eine konfluente 175 cm³ Flasche Zellen wurde mit 15 ml Infektionsmedium (MEM, 1 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,2% Bovines Albumin) überschichtet. Ca. 1x 10⁻⁴ bis 1x 10⁻⁵ pfu (Plaque Forming Units) des Virus wurde in die Flasche mit den Zellen pipetiert und die Flasche im Brutschrank inkubiert. Nach ungefähr 24 h wurde der virushaltige Mediumüberstand abgenommen. Dieser Überstand wurde zentrifugiert, um die toten Zellen zu entfernen. Danach wurde der Überstand bei -70°C weggefroren. Auch wurde die Bestimmung des Virustiters mittels Plaque-Assay auf MDCK-Zellen durchgeführt.

2.2.1.2. Virale Infektion von Zellen

Vor der Virus-Infektion wurden die Zellen etwa 1-2x mit PBS gewaschen. Dadurch wurden restliche Serumrückstände sowie Zelltrümmer entfernt. Die Virus-Lösung wurde in PBS (mit

1 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,2% Bovines Albumin) aufgenommen bzw. verdünnt und auf Eis gelagert. Ungefähr 0,5 bis 1 ml Infektions-Lösung (1x PBS supplementiert durch 1 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,2% Bovines Albumin) wurde auf die Zellen gegeben und diese dann für 30 min bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Nach dieser Absorbionsphase wurde die Infektions-Lösung entfernt. Je nach Versuchsplanung wurden die infizierten Zellen an dieser Stelle noch mal mit PBS gewaschen, um überschüssige bzw. sich nicht anheftende Viren zu entfernen. Anschließend wurde auf diese Zellen serumfreies Medium (jeweiliges Zellmedium supplementiert mit 1 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,2% Bovines Albumin) gegeben. Danach wurden die infizierten Zellen weiter im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.3. Bestimmung von Virustitern mittels Plaque-Assay

Für die Bestimmung der infektiösen Viruspartikel wurden Plaque-Assays auf MDCK-Zellen durchgeführt. Zuerst wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe der zu testenden Virusüberstände angelegt. Dafür wurden die Virus-Lösungen für die Verdünnungsreihe in PBS (mit 1 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,2% Bovines Albumin) verdünnt. Die am Vortag auf 6-Well Näpfen ausgesäten und dicht gewachsenen MDCK-Zellen wurden mit 500 µl der jeweiligen Virusverdünnung 30 min lang bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Nach diesem Infektionsschritt wurde die Virus-suspension entfernt und mit einem Medium-Agar-Gemisch (Zusammensetzung: 1% Dextran, 3 ml BA, 85 ml ddH₂O, 250 ml 2x MEM, dazu wurden 15 ml 46°C warmen Oxoid-Agar auf 35 ml Medium zugegeben) überschichtet. Humane Influenza-Virus-Stämme benötigen außerdem Zugabe vom Trypsin (0,025% v/v), da das HA humanpathogener Influenza-Viren tryptisch gespalten werden muss. Die Erstarrung des Medium-Agar-Gemisch erfolgte bei Raumtemperatur (RT). Danach wurden die Zellen für weitere 2-3 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Dauer dieser Inkubation wird durch den Virus-Stamm bestimmt sowie die sichtbare Bildung von Plaques. Zuletzt wurden die Plaques mit 1 ml Neutralrot (in PBS gelöst) oder Coomasie-Blau (0,1% Coomasie-Brilliant-Blue G-250 in 40% Methanol, 10% Essigsäure) angefärbt. Nach ca. 1-2 h im Brutschrank wurde die Färbelösung entfernt und die Plaques wurden ausgezählt.

2.2.2. Eukaryotische Zell-Linien/Zellen

Zell-Linien/ Zellen	Beschreibung
A549	Human, epithelial, Lungenkarzinom
HeLa	Human, epithelial, Cervix-Karzinom, entnommen 1951
MCF-7	Human, epithelial, Brust-Adenokarzinom, entnommen 1970
MDCK	„Madin Darby Canine Kidney“, Cockerspaniel, Nierenkarzinom, entnommen 1958
Phoenix-Eco	Orbigen San Diego, CA (USA)
HUVEC	“Human Umbilical Vein Endothelial Cells”, Lonza, Basel (CH)
Monozyten	Primäre humane Monozyten, UKM-Münster, Institut für Experimentelle Dermatologie, PD Dr. Thomas Vogl

2.2.2.1. Zellkultur

Die Arbeiten in der Zellkultur wurden unter der Sicherheitsbank TypII mit laminarem Luftstrom (BDK) unter Verwendung steriler Kunststoffmaterialien oder autoklavierter Glaswaren und autoklavierten oder sterilfiltrierten Lsg., sowie steriler Nährmedien durchgeführt. Sämtliche Zell-Linien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit in HERACell 240 Brutschränken von Heraeus gehalten.

2.2.2.2. Kultivierung von Zellen

A549-, MCF7-, Phoenix-Zellen wurden in D-MEM, HeLa-, MDCK-Zellen wurden in 1x MEM, Monozyten in McCoy’s-Medium und HUVEC in einem Zwei-Komponentenmedium, bestehend aus einem Teil EBM und zwei Teilen M-199, kultiviert. Alle Medien, bis auf das HUVEC-Medium, enthielten zusätzlich 10% FCS. Dem McCoy’s-Medium wurden zusätzlich noch Glutamin und nicht-essentielle AS zugefügt. Das 500 ml EBM-Medium wurde zuvor noch mit 10 ml FBS, 0,5 ml GA-100, 3000 µg/ml BBE, 10 µg/ml rhEGF und 1000 µg/ml Hydrocortison und das 500 ml M-199-Medium mit 10% FCS, 50 mg/ml Gentamycin, 250 µg/ml Amphotericin B und 5000 I.E. Liquemin versetzt. Für das 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 abgelöst. Diese Zellen wurden im frischen Kulturmedium aufgenommen und in gewünschter Verdünnung auf neue Schalen verteilt.

2.2.2.3. Einfrieren, Lagerung und Rekultivierung eukaryotischer Zell-Linien

Für die Langzeit-Lagerung wurden die Zell-Linien in einer DMSO-Lsg. im flüssigen Stickstoff eingefroren. Das Einfriermedium bestand aus 10% DMSO, 20% FCS und dem jeweiligem Kulturmedium. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA von der Schale gelöst und zentrifugiert. Danach wurde das trypsinhaltige Medium entfernt, die Zellen mit Einfriermedium versetzt und weggefroren.

Für die Rekultivierung wurden die Zellen schnell aufgetaut (Handwärme), mit vorgewärmtem Medium verdünnt und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und auf Kulturschalen ausgesät. Adhärente Zellen wurden am darauf folgendem Tag einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versehen.

2.2.2.4. Transiente-Transfektion

Bei MDCK- und A549-Zellen erhält man eine hohe Transfektionseffizienz mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 von Invitrogen. Die Transfektion erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Andere Zellen kann man auch gut mit CaCl_2 bzw. PEI transfizieren. 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. Stabil-retrovirale-Transduktion

Am Vortag wurden 3×10^6 Phoenixzellen auf 0,2% Gelantine gekoateten 10 cm Platten in DMEM-Medium mit 10% FCS ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium durch 5 ml Zielzellmedium und 5% FCS ersetzt. Die Transfektions-Lsg. enthielt 50 μl Lipofectamin 2000, 1 ml Opti-MEM und DNA (16 μg GAG-Pol, 5 μg pVSV-G und 7 μg der jeweiligen DNA) und wurde tropfenweise auf die Phoenixzellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C (besser 33°C) über Nacht (ü. N.) inkubiert. Die Phoenixzellen produzieren leere Viruspartikel, in welche die transfizierte DNA integriert wird. Nach 24 h wurde der virushaltige Mediumsüberstand gesammelt und für die Isolation von Phoenixzellen durch einen Spritzenfilter mit 0,45 μm Porengröße filtriert. Der virushaltige Mediumsüberstand wurde dann mit Polybrene (5 mg/ml in H_2O , Sigma H9268) versetzt und direkt auf die am Vortag ausgesäten Zielzellen gegeben. Die Transduktion der Zielzellen wurde mittels Zentrifugation 2.000 U/min bei 20°C für 3 h erzielt. Danach erhielten die Zielzellen wieder ihr normales Medium mit 10% FCS. Für eine bessere Transduktionseffizienz wird dieser Schritt am darauf folgenden Tag mit neuem virushaltigem Medium wiederholt. Die

Transfektionseffizienz wurde mittels GFP-Expression in der FACS-Analyse und/oder mittels spezifischer Antikörper im Western-Blot überprüft.

2.2.2.6. Immunfluoreszenz

Um die Verteilung viraler Proteine in infizierten Zellen zu untersuchen, wurden MDCK- oder A549-Zellen in 24-Well-Platten auf Glas-Trägern ausgesät. Später wurden die Zellen infiziert (vgl. 2.2.1.2.), mit PBS gewaschen und mit 3,7% Paraformaldehyd für mindestens 30 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Durch Waschen mit -20°C kaltem Aceton für 5-6 min in einer ansteigenden Konzentrationsreihe (20%, 60%, 100% Aceton) wurden die Zellen permeabilisiert. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit PBS für 5 min. Durch 30 min Inkubation mit einer 10%igen FCS-Lsg. bei 37°C wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Nach zweimaligem waschen mit PBS für 5 min folgte die Inkubation mit primären Antikörpern bzw. Antiseren für mindestens 30 min bei 37°C. Die gewünschten primären Antikörper wurden stets 1:400 in PBS gelöst eingesetzt. Danach 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 Waschschriften wurden die Zellen mit VectaShield Mounting-Medium (enthält bereits DAPI) eingedeckt und mit farblosem Nagellack versiegelt. Nun wurde der Ansatz Licht geschützt weiterbehandelt, indem die schon versiegelten Ansätze unter Karton gehalten wurden. Die Auswertung erfolgte am Zeiss Axiovert 200 M Fluoreszenzmikroskop mit ApoTome Schiebersystem. Dadurch wird die Verbesserung des Signals zu Rausch-Verhältnis und damit die Verbesserung der Detailauflösung ermöglicht. Die Bilder wurden mit der Software AxioVision Rel. 4.3 erfasst und bearbeitet.

2.2.3. *E.coli*-Stamm

Stamm	Genotyp
DH5α	F ⁻ endA1 hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺) supE44 thi-1 λ ⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)-U196 φ80dlacZΔM15

2.2.3.1. Medien für *Escherichia coli* (*E. coli*)

LB – Medium: 10 g Bacto Trypton
5 g Hefe Extrakt
5 g NaCl
13,5 g Agar (bei Platten)
auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen, lösen und autoklavieren.

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

2.2.3.2. Anzucht von *E. 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. Molekularbiologische Methoden - DNA/RNA

2.2.4.1. Gelelektrophorese und Geldokumentation

Die DNA-Moleküle wurden mittels Agarose der Firma Cambrex (SeaKem) elektrophoretisch aufgetrennt. Je nach Trennbereich kamen Gele zwischen 0,7% und 1,5% zum Einsatz. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Die zu trennenden Proben wurden zum Markieren und Beschweren mit Blaumarker versetzt. Die anschließende Elektrophorese erfolgte bei 60-110 V in horizontaler Anordnung. Die Färbung der Gele erfolgte mit Hilfe von 5 µl 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. Dadurch sind DNA-Moleküle im Gel als distinkte Banden sichtbar. Für die Dokumentation wurde ein Photodokumentationsgerät der Firma Decon ScienceTec verwendet.

10x TB-Puffer:

890 mM Borsäure (550 g)

890 mM Tris-HCL (1050 g)

Auf 10 l mit ddH₂O auffüllen

1x TBE-Puffer:

1000 ml 10x TB

40 ml 0,5 M EDTA

Auf 10 l mit ddH₂O auffüllen

2.2.4.2. Restriktionsenzymanalyse von Plasmid-DNA

Für die Spaltung von Plasmid-DNA wurden Restriktionsendonucleasen der Firma Fermentas mit den entsprechenden Reaktionspuffern verwendet. Für einen Standardansatz wurden ca. 3U Enzym pro 1 µg DNA eingesetzt. Die Ansätze wurden 1 h bei 37°C inkubiert. Ausnahmen bilden hierbei Enzyme für die das Temperaturoptimum in einem andern Bereich liegt. Für die Überprüfung der Spaltung wurden die Ansätze mit Blaumarker versetzt und auf ein Agarosegel geladen.

2.2.4.3. Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Ungefähr 50 µl kompetente *E. coli* Zellen DH5α wurden mit 1 µg DNA in einem Reaktionsgefäß gemischt und für mindestens 30 min auf Eis gehalten. Anschließend wurde der Ansatz für 1 min bei 42°C inkubiert (Hitzeschock). Danach wurden sofort 600 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) zugegeben und der Ansatz 1 h schüttelnd bei 37°C inkubiert.

Danach wurden 100 µl des Ansatzes auf Selektionsmedien ausplattiert. Die Platten wurden ü. N. bei 37°C inkubiert.

2.2.4.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit einem Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen. Dabei wurde genau nach Protokoll vorgegangen.

2.2.4.5. Real-Time-PCR

A549-Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor SB202190 (20 µM) oder DMSO bzw. DMEM vorinkubiert, mit PR8 infiziert (MOI = 5) bzw. nicht-infiziert belassen und mit dem Inhibitor oder DMSO bzw. DMEM für 5 h nachinkubiert. Die 10 cm Platten mit 4×10^6 Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen. Für die RNA-Isolation wurden 350 µl Lysepuffer (RLT) mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol verwendet sowie weitere Schritte nach dem RNeasy[®] Kit von Qiagen durchgeführt. Nach der RNA-Isolation wurde die RNA-Konzentration gemessen und 1 µl RNA wurde für die Synthese und Amplifikation von cDNA in der konventionellen PCR eingesetzt: 1) 1 µg RNA und 1 µl oligo-dT-Primer wurden zu 10 µl H₂O gegeben, bei 70°C für 10 min erhitzt und auf Eis inkubiert 2) 20 µl von einem 5x Reaktionspuffer M-MuLV-RT (Fermentas) und 5 µl von 10 mM dNTP-Mix wurden in 10 µl H₂O gegeben und bei 42°C für 2 min erhitzt. Anschließend wurden 2,5 µl Revert-Aid (M-MuLV-Reverse-Transcriptase, Fermentas) dazu gegeben. Von diesem Mix wurden 8 µl in 1) gegeben, dem RNA/oligo-dT-Primermix. Es folgte eine Inkubation bei 42°C für 1 h und eine Inaktivierung bei 70°C für 5 min. Bei 4°C wurde die cDNA-Konzentration gemessen. Für die Real-time PCR wurde der Brilliant[®]-SYBR[®]-Green, QPCR-Mastermix (Stratagene) und das Mx3005 (Stratagene) Sequenz-Detektionssystem verwendet. 1,25 ng cDNA wurde in jedes PCR-Reaktionsgefäß mit einem Endvolumen von 12 µl gegeben. Die ΔCT-Werte wurden gegen eine interne Kontrolle GAPDH normiert und relativ zu einer nicht stimulierten Kontrolle kalkuliert. Die Datenanalyse der relativen Genexpression wurde mit der Real-Time, relativ-quantitativen-PCR und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode durchgeführt (Livak and Schmittgen 2001). Folgende Primerpaare (MWG) wurden für die RT-PCR verwendet, abgeleitet von Wang und Seed (Wang and Seed 2003) und waren:

<u>Name</u>	<u>Primersequenz</u>
GAPDH, vorwärts	5'-GCAAATTTCCATGGCACCGT-3'
GAPDH, rückwärts	5'-GCCCACTTGATTTTGGAGG-3'
TRAIL, vor.	5'-GTCTCTCTGTGTGGCTGTAACCTACG-3'
TRAIL, rück.	5'-AAACAAGCAATGCCACTTTTGG-3'

IL-6, vor.	5'-AGAGGCACTGGCAGAAAACAAC-3'
IL-6, rück.	5'-AGGCAAGTCTCCTCATTGAATCC-3'
IP-10, vor.	5'-AGACATCTCTTCTCACCCCTTC-3'
IP-10, rück.	5'-GGAACCTCCAGTCTCAGCACCA-3'
MCP-1, vor.	5'-TCGCCTCCATCATGAAAGTC-3'
MCP-1, rück.	5'-TTGCATCTGGCTGAGCGAG-3'

Die RT-PCR-Reaktionsbedingungen waren: 1 Zyklus (10 min 95°C), 40 Zyklen (30 sek 95°C, 1 min 60°C, 30 sek 72°C), 1 Zyklus (1 min 95°C, 30 sek 55°C, 30 sek 95°C).

2.2.5. Molekularbiologische Methoden - Proteine

2.2.5.1. Luziferase-Assay

Der Luziferase-Assay oder auch Reporteragen-Assay genannt, dient der Quantifizierung der Genexpression. Dabei wurde das Luziferase-Gen aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* als Reporter eingesetzt. Die verwendeten Konstrukte (pTATA LUC (Altschmied and Duschl 1997)) enthielten oft vor der Sequenz des Reportergens (mit Thymidin Kinase Minimal-promotor-Sequenz) mehrfach hintereinander geschaltete Transkriptionsfaktor-Bindestellen des zu untersuchenden Gens. Findet eine Transkription des Luziferase-Gens statt, so kann man dies photometrisch detektieren. Das Enzym Luziferase spaltet das Substrat Luciferin unter Lumineszenzabgabe, was quantitativ in einem Luminometer (verwendet wurde MicroLuminat Plus LB 96V von Berthold Technologies) messbar ist. Dabei ist die Lumineszenz direkt proportional zu der Luziferase-Enzymaktivität. Für den Luziferase-Assay wurden die Zellen am Vortag mit einem Promotor-Luziferase-Konstrukt transfiziert. Etwa 16 h bis 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen weiterbehandelt, meist infiziert bzw. stimuliert. Anschließend 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).

<u>Harvesting-Puffer (Zell-Lyse):</u>	<u>Assay-Puffer:</u>
50 mM Na-MES pH 7,8	125 mM Na-MES pH 7,8
50 mM Tris-HCl pH 7,8	125 mM Tris-HCl pH 7,8
10 mM DTT	25 mM MgAcetat
2% Triton-X 100	2 mg/ml ATP

Danach wurden die Zelltrümmer in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 13000 g und 4°C sedimentiert. Für die Luziferase-Aktivitätsmessung wurden je 50 µl des

Lysats zusammen mit 50 µl Assay-Puffer in eine 96-Well-Platte gegeben. Bei der Messung wurde zu dem Gemisch automatisch 50 µl Luciferin-Lsg. (1 mM Luciferin, 5 mM KH_2PO_4 pH 7,8) je Well zugegeben. Die gemessene Lumineszenz ist in „relative light units“ (RLU) angegeben. Die Luziferase-Enzymaktivität wurde auf den mittels BioRad Proteinassay ermittelten Proteingehalt bezogen.

2.2.5.2. Herstellung von Proteinextrakten und Bestimmung der Proteinkonzentration

Vor der Zell-Lyse wurden die Zellen immer mindestens 1x mit kaltem PBS gewaschen. Und anschließend mindestens 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, 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 1 mM Natriumorthovanadat, 5 mM Benzamidin) lysiert. Die Zell-Lysate wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und die Zelltrümmer 15–30 min bei 4°C und 13000 g sedimentiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt. Je nach Bedarf wurden die Überstände weiter verarbeitet oder bei -70°C gelagert.

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

Mittels BioRad-Proteinassays wurde die Proteinkonzentration ermittelt. Dabei wurden keine absoluten Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt, sondern die optische Dichte bei 595 nm mit den Proben in Relation gesetzt. Der BioRad-Proteinassay basiert darauf, dass das Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie Brilliant-Blau-Lsg. 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.

2.2.5.3. Proteinaufreinigung von GST-MEF2-C

Ü. N. wurde eine Vorkultur im 500 ml Schikane-Kolben mit 100 ml LB-Medium + 100 µl Ampicillin (von 100 mg/ml Stock) mit BL-21 Bakterien, die das GST-MEF2-C-Plasmid enthielten (T40 Gal4 MEF2-Cwt, Fragment AS 87-474), angeimpft und bei 37°C und ca. 150 rpm schütteln gelassen. Aus dieser Vorkultur wurden pro Ansatz 6 ml entnommen und in jeweils 500 ml LB-Medium (+ 500 µl Ampicillin) überführt. Nach ca. 3-4 h bei 37°C wurde regelmäßig mittels 1 ml aus dem Kulturkolben, das Bakterienwachstum durch die Optische Dichte (OD) bei 600 nm bestimmt. Das Bakterienwachstum sollte zwischen OD 1 und OD 1,5 A abgestoppt werden. Dafür wurden die Kolben auf Eis gestellt und gedreht. Nach dem

Abkühlen wurden für die Induktion der MEF2-C-Produktion zu jeweils 500 ml Bakterienkultur 500 µl der IPTG (Isoropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside Stocklsg. 200 mM) dazugegeben. Anschließend wurden die Kolben noch für 2 h bei 25°C und 100 rpm schütteln gelassen. Nach 2 h wurde der Inhalt der Kolben in der vorgekühlten großen Sorvall-Zentrifuge bei 15.000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Dann wurden die Bakterienpellets mit je 20 ml Resuspensionspuffer (Für 1 l: 50 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4-7,6), 300 mM NaCl, 1 mM EDTA) + Protease-Inhibitoren (Pefablock, Aprotinin, Leupeptin je 1:1000 und Natriumorthovanadat 1:100, Benzamidin 1:200) gut auf Eis resuspendiert. Jede Resuspension wurde in ein 50 ml Schraubröhrchen überführt und auf Eis 3x 30 sek lang mit 90-Zyklen beschallt. Es wurden nochmals Protease-Inhibitoren zugegeben sowie 1,25 ml von 20% Triton (schließt die Bakterien noch weiter auf) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol (reduziert die Disulfidbrücken). Die Lysate wurden dann für 15 min bei 4°C auf dem Rotary Stufe 4 inkubiert und im Anschluss in der Sorvall-Zentrifuge (SS34) für 30 min bei 15.000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Während dieser Zeit wurden die Glutathion-Sepharose-Kügelchen (beads) equilibriert. Dafür wurden 4x jeweils 1 ml Sepharose-beads aus der Original-Dose entnommen, in 15 ml Schraubröhrchen überführt und mit Millipore-Wasser aufgefüllt. Nach 10 min, 4°C wurden die Schraubröhrchen für 3 min bei 2600 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die beads mit Waschpuffer (für 500 ml: 500 ml Resuspensionspuffer + 71,5 µl β-Mercaptoethanol (10 mM)) aufgefüllt, ganz vorsichtig für 10 min bei 4°C invertiert und für 3 min bei 2600 rpm und 4°C zentrifugiert. Dieser Vorgang mit dem Waschpuffer wurde noch 2x wiederholt.

Von den Sorvall-Zentrifugenbechern wurde der Überstand in vorgekühlte 50 ml Schraubröhrchen überführt und die equilibrierten Sepharose-beads (1 ml pro 20 ml Überstand) zugegeben. Nach Inkubation auf dem Rotary für 1-2 h folgte der Kurzwaschgang der Sepharose-beads. Dafür wurde jedes Schraubröhrchen mit Waschpuffer + Protease-Inhibitoren aufgefüllt, invertiert für 10 min, 4°C und für 3 min bei 2600 rpm und 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde 5x wiederholt und anschließend wurden die Glutathion-Sepharose beads vereinigt. Pro 1 ml beads wurden 1,5 ml Elutionspuffer (50 mM Tris + 20 mM Glutathion (red.) pH 8) gegeben und dieser Ansatz wurde für mindestens 20 min auf dem Rotary bei 4°C inkubiert und dann für 3 min bei 2600 rpm, 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthält das Aufgereinigte GST-MEF2-C das für die Konservierung mit 10% Glycerin versetzt wurde.

Von jedem Eluat wurden 20 µl entnommen und mit 5 µl 5x SDS-Probenpuffer aufgeköcht und bei -80°C weggefroren, um später die ungefähre Konzentration des aufgereinigten GST-MEF2-C in einem 10% SDS-Gel bestimmen zu können. Nach dem Gellauf wurde das Gel mit Coomassie-Färbelsg. für 30 min inkubiert und mit Entfärbelsg. (45% Methanol, 45% H₂O, 10% Essigsäure) behandelt und später mit Wasser abgespült. Für die Aufbewahrung wurde das Gel auf nasses Whatmanpapier gelegt, mit Frischhaltefolie abgedeckt und für 2 h auf dem Geltrockner getrocknet. Die blau gefärbten GST-MEF2-C-Banden liegen bei ca. 70 kDa (25 kDa GST + 45 kDa MEF2-C) und können auf dem getrockneten Gel eingescannt werden.

2.2.5.4. Immunpräzipitation

Um Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* nachzuweisen nutzt man die Methode der Immunpräzipitation oder Co-Immunpräzipitation. Mit einem spezifischen Antikörper wird das gewünschte Protein mit seinem Interaktionspartner aus dem Zell-Lysat präzipitiert. Dabei ist der Antikörper an Protein-A oder -G beschichtete beads gebunden. Protein-A bzw. -G ist ein Zellwand-Bestandteil bestimmter Streptokokken-Stämme und bindet spezifisch an die Fc-Region vieler Säugetier-Immunglobuline. Der Nachweis der Interaktion erfolgt mittels Western-Blot und eines weiteren Antikörpers, das den potentiellen Interaktionspartner erkennt. Wie in 2.2.5.2. beschrieben wurden die Zellen für die Immunpräzipitation mit TLB bzw. RIPA lysiert und die Proteinkonzentration der einzelnen Proben aufeinander abgestimmt. Zu den einzelnen Lysaten wurden in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper, 30 µl Protein-A- bzw. -G-Agarose zugegeben. Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:300 eingesetzt. Die Proben wurden ü. N. in einem „Rotations-Schüttler“ bei 4°C inkubiert, dann 1 min bei 2000 rpm und RT zentrifugiert und 2x mit 500 µl TLB gewaschen. Die Protein-A- oder -G-beads wurden 1 min bei 2000 rpm sedimentiert, mit 45 µl 1x Laemmli-Puffer versetzt, für 7 min bei 90°C denaturiert und für die Western-Blot-Analyse verwendet.

2.2.5.5. Kinase-Assay

Die Kinaseaktivität kann man *in vitro* durch Zugabe von ³²P-γATP und einem geeigneten Substrat messen, da die Kinasen γ-Phosphatgruppen von ATP auf ein Substrat übertragen können. Dafür wurden die Kinasen, wie in 2.2.5.4. beschrieben, mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und 2x mit TLB gewaschen. Zwei weitere Waschschrte folgten mit Kinasepuffer (10 mM MgCl₂, 25 mM β-Glycerophosphat, 25 mM HEPES pH 7.5, 5 mM Benzamidin, 0,5 mM Dithiothreitol (DTT) und 1 mM Natriumorthovanadat). Anschließend

wurde der Reaktionsmix angesetzt, welcher für jede Probe 100 μ M ATP, 1 μ g geeignetes Substrat, 20 μ l Kinasepuffer und 5 μ Ci 32 P- γ ATP enthielt. Jede Probe wurde mit 20 μ l Reaktionsmix versetzt und danach für 15 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 6 μ l 5x SDS-Probenpuffer (155 mM Tris-HCL pH 6,8, 5% SDS, 50% Glycerin, 25% β -Mercaptoethanol) beendet und die Inkubation bei 80°C für 7 min denaturierte die Proben. Nachdem die Proben kurz zentrifugiert wurden, damit die Agarosepartikel sedimentieren, wurde der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.2.5.6. BioRad-Suspensions-Proteinassay

Der Bio-Plex-Zytokin-/Chemokin-Assay wurde für die Quantifizierung von humanen Zytokinen bzw. Chemokinen in A549-Zellkulturüberständen nach Virusstimulation und mit bzw. ohne SB-Inhibitorbehandlung verwendet. Bei diesem „multiplex bead“-Assay bindet das farblich-kodierte Molekül an ein Zielmolekül, gefolgt durch die Bindung mit einem biotinylierten Detektionsantikörper und dem Reportermolekül Streptavidin-PE. In dem Bio-Plex-Assay-Lesegerät ließt eine rote Klassifizierung und ein grüner Reporterlaser die individuellen beads aus, wodurch von jedem bead die Spektraladresse und das verknüpfte Reportersignal identifiziert wurde.

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

SDS-PAGE ist eine effiziente Methode für die Auftrennung von denaturierten Proteinen in einem elektrischen Feld (Laemmli 1970). Hierbei werden die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. SDS bewirkt, dass die nicht kovalenten Wechselwirkungen der nativen Proteine aufgelöst werden. Das im Probenpuffer ebenfalls enthaltene β -Mercaptoethanol reduziert zudem Disulfidbrücken. SDS bindet an die Proteinketten. Die so entstehenden Komplexe besitzen eine starke negative Ladung, die der Masse der Protein-SDS-Komplexe proportional ist. Dadurch bewegen sich die negativ geladenen Protein-SDS-Komplexe in einem elektrischen Feld in Richtung des Plus-Pols. Die negativ geladenen Proteine werden in einem Polyacrylamid-Gel ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Zell-Lysate wurden auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt und mit 5x SDS-Probenpuffer (155 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% SDS, 50% Glycerin, 25% β -Mercaptoethanol) versetzt. Anschließend wurden die Proben 7 min bei 90°C im Heizblock denaturiert und auf die Gele aufgetragen.

2.2.6.1. Herstellung von denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen für die Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in einem Trenngel, dem ein Sammelgel vorgeschaltet war. Das Sammelgel (3,9%) sorgt hierbei für eine höhere Trennschärfe der zu trennenden Proteine. Die Konzentrierung der Proben erfolgte aufgrund eines stufenweisen pH-Anstiegs beim Übergang vom Sammel- zum Trenngel, der durch unterschiedliche Pufferbedingungen entsteht. Im Trenngel wurden die Proteine aufgetrennt. Für die Experimente wurden 7,5% - 15 % Trenngele verwendet. Niedrigprozentige Gele ermöglichen eine bessere Auftrennung von hochmolekularen Proteinen. Hochprozentige Gele können niedrigmolekulare Proteine dafür besser Auftrennen.

Herstellung eines Trenngels

Eine Acrylamidlsg. (Biorad) wurde im Verhältnis Acrylamid zu Bisacrylamid 30% : 0,2% mit dem Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCL, pH 9,0, 0,4% TEMED, 0,4% SDS) und ddH₂O vermischt. Vor dem Gießen der Gele wurde Ammoniumpersulfat (10% w/v) zugefügt. Das Trenngel wurde so zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen, dass am oberen Rand etwa 3 cm Platz für das Sammelgel blieben. Anschließend wurde das Gel mit Isopropanol, Ethanol oder Wasser überschichtet. Dadurch konnte sich eine gleichmäßige Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel bilden.

Herstellung eines Sammelgels

Der Alkohol bzw. das Wasser wurden nach dem Auspolymerisieren des Trenngels abgegossen. Das Sammelgel (3,9%) besteht aus einer Acrylamid zu Bisacrylamid (30% : 0,2%) Lsg. und Sammelgel-puffer (140 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,11% TEMED, 0,11% SDS). Wieder wurde Ammoniumpersulfat (10% w/v) für die Polymerisation eingesetzt. Das Sammelgel wurde auf das zuvor auspolymerisierte Trenngel gegossen. Ein Kamm wurde zwischen die Glasplatten in das Sammelgel gesteckt, damit dort Geltaschen entstehen. Der Kamm wurde nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels 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 denaturierten Zell-Lysat-Proben beladen. Der Gellauf wurde für ca. 1,5 h bei einer Stromstärke von 50 mA durchgeführt. Das Gel wurde danach für die Western-Blot-Analyse eingesetzt.

2.2.6.2. Durchführung der Western-Blot-Analyse

Mittels Western-Blot-Analyse (Burnette 1981) kann man Proteine, die über ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt wurden (vgl. 2.2.6.1.), auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Towbin et al. 1979) und dort spezifisch sichtbar machen. Die dafür verwendeten Antikörper detektieren spezifisch das zu untersuchende Protein oder das Epitop. Der erste Antikörper wird durch einen zweiten Peroxidase („horseradish peroxidase“ HRP, Meerrettich-Peroxidase) gebundenen Antikörper spezifisch erkannt. Das Enzym katalysiert dabei die Umsetzung von Luminol mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in eine oxidierte Form. Die freigegebene Lumineszenz wurde auf einem Röntgenfilm detektiert. Auf dem entwickelten Film erscheint das zu untersuchende Protein als distinkte Bande.

2.2.6.3. Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran

Für den Elektrotransfer in einer Nass-Elektroblotkammer von BioRad wurden 4 Whatmanpapiere und eine Nitrocellulose-Membran auf Gelgröße zu Recht geschnitten und in Blotting-Puffer (pH 8,2, 39 mM Glycin, 48 mM Tris-HCl, 0,037% SDS, 20% Methanol) getränkt. Auf das Gel wurde die Nitrocellulose-Membran luftblasenfrei gelegt und zwischen die feuchten Whatmanpapiere gebettet. Das Sandwich wurde seinerseits zwischen zwei Schwammpads eingespannt und in dem Gehäuse der Kammer befestigt. Diese wurde nun mit dem Blotting-Puffer gefüllt. Der Elektrotransfer erfolgte bei 400 mA für ca. 1 h.

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

Zuerst wurde die Nitrocellulose-Membran für mindestens 30 min bei RT in Blocking-Puffer (5% Milchpulver in PBS-T (1x PBS mit 0,1% Tween)) inkubiert. Danach wurde die Membran mit PBS-T ohne Milchpulver gewaschen und in einer Primär-Antikörper-Lsg. (gelöst meist in 1x PBS-T, je nach Herstellerangaben) für 1-2 h bei RT oder ü. N. bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Später 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 (gelöst in Blocking-Puffer) erfolgte unter Schwenken für 1 h bei RT. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut dreimal mit 1x PBS-T für jeweils mindestens 10 min gewaschen und mit dem Chemolumineszenz-Substrat (2,5 mM Luminol, 0,45 mM p-Coumarsiure, 100 mM Tris-HCL pH 8,5, dazu wurden kurz vor der Benutzung 0,01% H_2O_2 zugegeben) für ca. 1 min inkubiert. Die Membran wurde in eine Detektionskassette gelegt und in der Dunkelkammer 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) gegeben.

3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Rolle zweier MAPK-Kaskaden, der p38-MAPK-Kaskade und der ERK5-MAPK-Kaskade in Influenza-A-Virus-infizierten Zellen. Im ersten Teil wurde die Aktivierung der p38-MAPK durch das Influenza-A-Virus untersucht und die Funktion des Signalweges in der Influenza-A-Virus-Vermehrung und der Wirtszellabwehr bestimmt. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der ERK5-Kaskade, ihrer Aktivierung und Funktion. Die generelle experimentelle Strategie ist im Flussdiagramm (Abbildung 4) dargestellt.

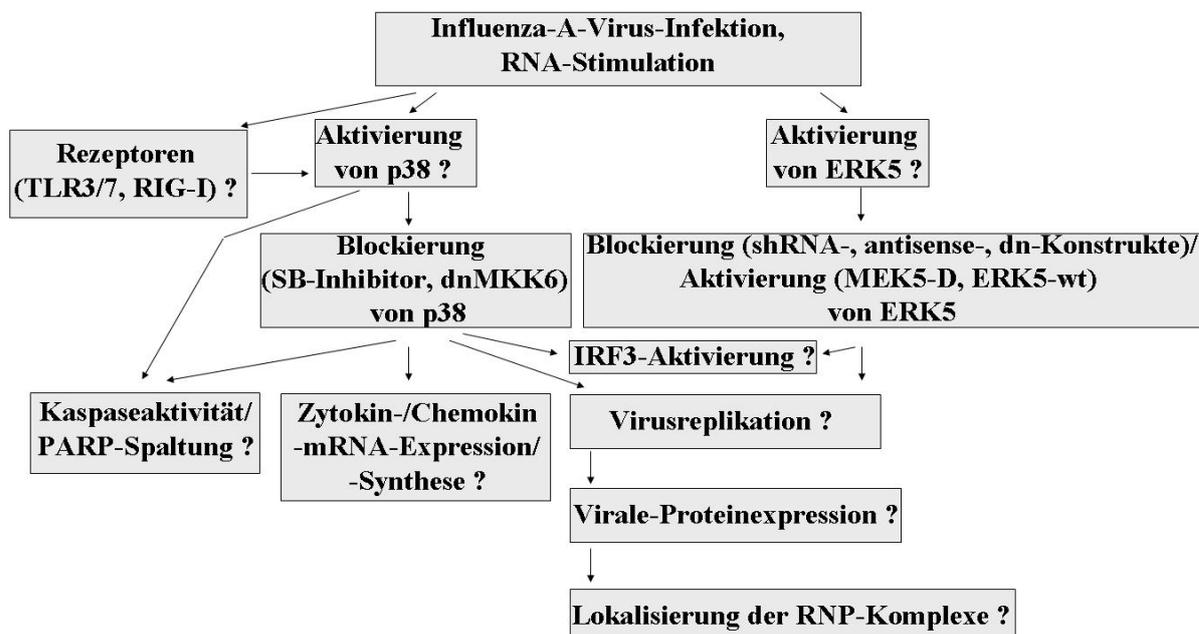


Abbildung 4: Experimentelle Strategie für die Untersuchung einer Funktion der p38- und ERK5-Kaskaden in Influenza-A-Virus-infizierten Zellen

Zunächst wurde die Aktivierung der p38- und ERK5-Kaskaden nach Influenza-A-Virus-Infektion bzw. dsRNA-Stimulation überprüft. Eine Aktivierung der Kinasekaskaden könnte ein Indiz dafür sein, dass diese eine Funktion in der Virus-Replikation oder Zellabwehr haben. Nachdem eine Aktivierung für beide Kaskaden gezeigt werden konnte, wurde zunächst der Einfluss der Signalwege auf die Vermehrung von Influenza-Viren untersucht. Dies geschah durch spezifische Inhibitoren und Expression dominant-negativer Mutanten einzelner Faktoren. Um die Ursache für eine veränderte Virus-Replikation zu klären, wurden verschiedene Parameter des viralen Replikationszyklus, wie die virale Proteinexpression, die Lokalisierung der RNP-Komplexe und die Kaspaseaktivität durch PARP-Spaltung (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) analysiert. Außerdem wurde die Wirkung auf die antivirale Antwort anhand der IRF-3-Aktivierung und der Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese und Expression überprüft. Anschließend sollten Hinweise auf die Rezeptoren gefunden werden, die für die Weiterleitung der Signale verantwortlich sind.

3.1. Die p38-Kinasekaskade wurde in verschiedenen Zell-Linien durch Influenza-A-Viren aktiviert

3.1.1. Das aviäre Influenza-A-Virus FPV induziert die Aktivierung von MKK3/6 und p38 in permissiven Wirtszellen

Schon in früheren Arbeiten konnte eine Influenza-A-Virus-induzierte Aktivierung der p38-MAPK gezeigt werden (Kujime et al. 2000; Guillot et al. 2005). In dieser Arbeit sollte eine genauere zeitliche Analyse der Aktivierung von p38 durch unterschiedliche Influenza-A-Virus-Subtypen in verschiedenen Zell-Linien durchgeführt werden sowie die Aktivierung der p38-Aktivatorkinasen MKK3/6 untersucht werden. In Zellen, welche die Replikation des Influenza-A-Virus unterstützten (so genannte permissive Zellen), wurde überprüft, ob die MKK3/6-p38-MAPK-Kaskade durch die Infektion mit Influenza-A-Viren aktiviert wird. Dafür wurden humane, epitheliale Lungenkarzinomzellen (A549) und epitheliale Nierenkarzinomzellen (MDCK) mit dem aviären Influenza-A-Virus A/FPV/Bratislava/79 (FPV) vom Subtyp H7N7 infiziert (Abbildung 5). Um die Aktivierung der Kinasen MKK3/6 und

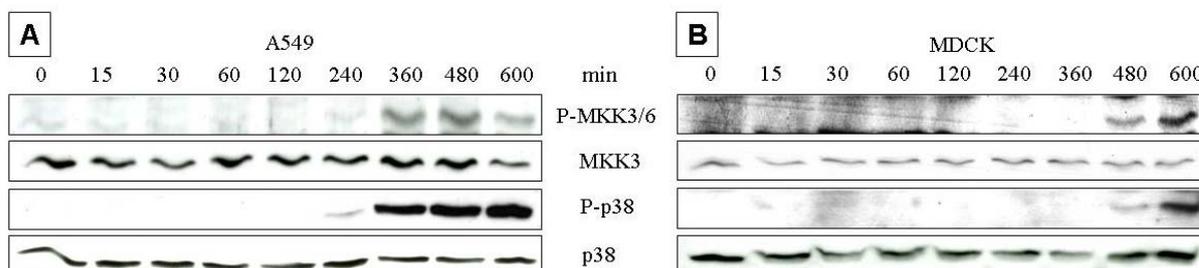


Abbildung 5: Das aviäre Influenza-A-Virus FPV induziert die MKK3/6- und p38-Aktivität in permissiven Wirtszellen

(A, B) Western-Blots mit Lysaten von A549- und MDCK-Zellen

(A) A549- und (B) MDCK-Zellen wurden mit dem Influenza-A-Virus-Stamm A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) infiziert („multiplicity of infection“ (MOI) = 5) und nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Aktivierung von MKK3/6 und p38 wurde durch phosphospezifische Antikörper detektiert. Die Kinase-Ladekontrollen MKK3 und p38 belegten die äquivalente Proteinbeladung.

p38 zu detektieren, wurden Antikörper gegen die phosphorylierte, aktivierte Form dieser Proteine eingesetzt. Es war zu erkennen, dass nach Virus-Infektion die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von MKK3/6 und p38 in A549-Zellen nach ca. 4 h und in MDCK-Zellen dagegen nach ungefähr 6 h begann und dann ständig anstieg. Da in beiden Zell-Linien das gleiche Influenza-A-Virus, FPV, für die Infektion eingesetzt wurde, könnte die unter-

schiedliche Aktivierungskinetik von MKK3/6 und p38 auf Zelltyp-spezifische Eigenschaften zurückzuführen sein.

3.1.2. Das aviäre Influenza-A-Virus FPV induziert die Aktivierung von MKK3/6 und p38 auch in nicht-permissiven Wirtszellen

Abbildung 5 zeigt, dass die MKK3/6-p38-Kaskade in permissiven Wirtszellen, je nach Zelltyp mit unterschiedlicher Kinetik aktiviert wurde. Nun sollte überprüft werden, ob diese Aktivierung der MKK3/6-p38-Kaskade auch in nicht-permissiven Wirtszellen stattfindet und ob die gezeigte Aktivierungskinetik grundlegend auch für diese Zellen zutrifft. Nicht-permissive Zellen können zwar von Influenza-A-Viren infiziert werden, der Replikationszyklus kann aber in diesen Zell-Linien nicht vollständig abgeschlossen werden. Es wurde bereits gezeigt, dass in nicht-permissiven humanen HeLa-Cervixkarzinomzellen keine Influenza-A-Virus-induzierte Aktivierung der MAPK JNK und ERK stattfindet (Ludwig et al.

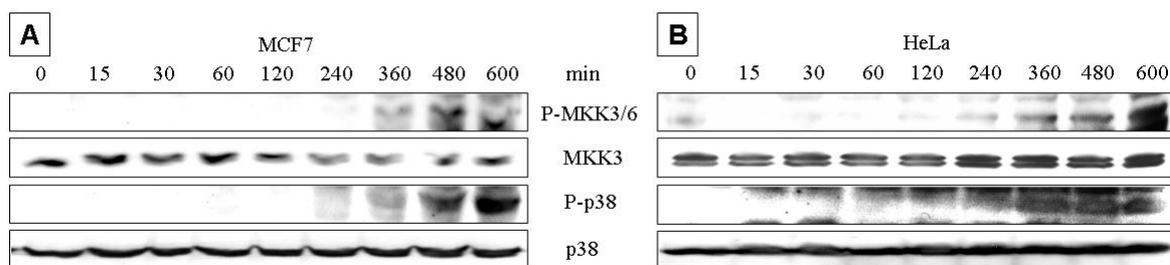


Abbildung 6: Das aviäre Influenza-A-Virus FPV induziert die MKK3/6- und p38-Aktivität in nicht-permissiven Wirtszellen

(A, B) Western-Blots mit Lysaten von MCF7- und HeLa-Zellen

(A) MCF7- und (B) HeLa-Zellen wurden mit Influenza-A-Virus A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) infiziert (MOI = 5) und nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die aktivierte Form von MKK3/6 und p38 durch phospho-spezifische Antikörper detektiert. Die Auftragung äquivalenter Proteinmengen wurde mit einem MKK3- bzw. einem p38-Antiserum bestätigt.

2001; Marjuki et al. 2006). Früher publizierte Daten zeigten, dass in den nicht-permissiven HeLa-Zellen die virale Proteinsynthese zwar normal verlief, aber der Knospungsprozess (Budding) der neuen Viruspartikel beeinträchtigt war (Gujuluva et al. 1994). Dies war vermutlich auf einen gestörten Einbau des HA in die Membran zurückzuführen (Portincasa et al. 1990). Eine weitere Zell-Linie, die nur wenig permissiv für die Influenza-Virus-Vermehrung ist, stellt die MCF7-Mammakarzinomzell-Linie dar. MCF7-Zellen besitzen eine Deletion im *Casp3*-Gen und können deswegen keine Kaspase-3 exprimieren (Janicke et al. 1998). Es wurde gezeigt, dass Kaspase-3 eine wichtige Rolle in der späten Influenza-Virus-Infektionsphase spielt. Die Influenza-A-Virus-induzierte Kaspase-3-Aktivität hatte eine

provirale Wirkung, denn sie vermittelte den RNP-Export durch passive Diffusion aus dem Zellkern, und induzierte so hohe Virustiter (Wurzer et al. 2003).

Nachdem MCF7- und HeLa-Zellen mit FPV infiziert wurden, konnte eine ansteigende Phosphorylierung von MKK3/6 und p38 beginnend etwa 4 h nach Infektion in beiden Zell-Linien detektiert werden (Abbildung 6). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der p38-Signalweg im Gegensatz zum JNK- und ERK-Signalweg zu späten Zeitpunkten im Replikationszyklus auch in nicht permissiven Wirtszellen durch das Influenza-A-Virus aktiviert werden kann.

3.1.3. Das humane Influenza-A-Virus PR8 induziert die Aktivierung von MKK3/6 und p38 in permissiven Wirtszellen

Die Aktivierung der MKK3/6-p38-Kaskade in permissiven und nicht-permissiven Zellen ließ eine Rolle der Kinasekaskade in der Influenza-A-Virus-Replikation vermuten. Da bisher die verschiedenen Zell-Linien nur mit einem Virusisolat, FPV, infiziert wurden, sollte nun die Allgemeingültigkeit dieser Beobachtung durch Infektion mit einem anderen Influenza-A-Virus-Isolat vergleichend untersucht werden. Wie Daten in Abbildung 7 zeigen, kann auch das humane Influenza-A-Virus A/Puerto Rico/8/34 (PR8) vom Subtyp H1N1 in A549- und MDCK-Zellen die Aktivierung von MKK3/6 und p38 induzieren. Im Gegensatz zum aviären Influenza-A-Virus FPV war das humane Influenza-A-Virus PR8 jedoch ein effektiverer Aktivator des Signalweges. Man konnte tatsächlich eine stetig steigende Phosphorylierung von MKK3/6 und p38 in A549-Zellen erkennen, die schon bereits 2 h nach der Infektion begann. In MDCK-Zellen begann die Phosphorylierung der p38-Kinase etwa 4 h nach der Infektion.

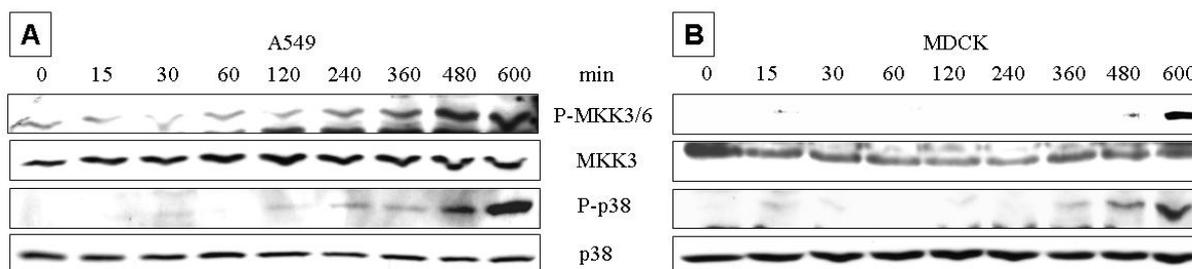


Abbildung 7: Das humane Influenza-A-Virus PR8 induziert die MKK3/6- und p38-Aktivität in permisiven Wirtszellen

(A, B) Western-Blots mit Lysaten von A549- und MDCK-Zellen

(A) A549- und (B) MDCK-Zellen wurden mit dem humanen Influenza-A-Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) infiziert (MOI = 5). Nach der Zell-Lyse wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und die phosphorylierte Form von MKK3/6 und p38 mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen. Antisera gegen MKK3 und p38 belegten die äquivalente Proteinbeladung.

3.1.4. Verschiedene Influenza-A-Virus-Isolate induzieren die Aktivierung von MKK3/6 und p38 zu unterschiedlichen Zeitpunkten in A549-Zellen und primären Monozyten

Um die Zelltypabhängigkeit und Virus-Isolat-Spezifität in der Aktivierung von p38 zu erweitern, wurden weitere Virusisolate sowie zusätzliche Zelltypen in die Analyse mit einbezogen. Hierzu wurden primäre monozytäre Zellen gewählt, da in bereits publizierten Arbeiten gezeigt wurde, dass in diesen Zellen bereits 1 h nach Infektion mit dem aviären Influenza-A-Virus A/HK/483/97 vom Subtyp H5N1 eine Hyperinduktion von p38 und ERK1/2 zu beobachten war, im Gegensatz zu der Infektion mit dem humanen Influenza-A-Virus A/HK/54/98 vom Subtyp H1N1 (Lee et al. 2005). Um zu überprüfen, ob verschiedene Influenza-A-Virus-Isolate eine unterschiedliche Aktivierung von MKK3/6-p38 in Epithelzellen im Vergleich zu primären Monozyten induzieren, wurden zunächst A549-Zellen mit Viren der Subtypen H3N2, H5N1 und H1N1 infiziert. Man konnte für alle Subtypen eine vergleichbar starke Intensität der MKK3/6- und p38-Phosphorylierung erkennen, die bei allen Subtypen erst ca. 6 h nach Infektion prominent nachweisbar war (Abbildung 8). Die Infektion mit dem Isolat vom H5N1-Subtyp führte im Vergleich zu der Infektion mit dem Humanisolat vom Subtyp H1N1 in A549-Zellen zu keiner Hyperinduktion der Kinase. In primären Monozyten ließ sich eine ähnlich starke Aktivierung von der Kinase p38 wie in A549-Zellen beobachten, die jedoch wesentlich früher einsetzte als in A549-Zellen und bereits 4 h nach Infektion gut nachweisbar war. Die Ursache hierfür könnte sein, dass primären Monozyten im Vergleich zu epithelialen Zell-Linien wesentlich sensitiver gegenüber einer Infektion sind, da

sie über Zytokinantworten die Immunantwort steuern. Verschiedene Virusisolate induzierten eine unterschiedlich starke MKK3/6-Aktivierung in primären Monozyten, die sich in dieser Ausprägung allerdings nicht auf Ebene der p38-Kinase manifestierte.

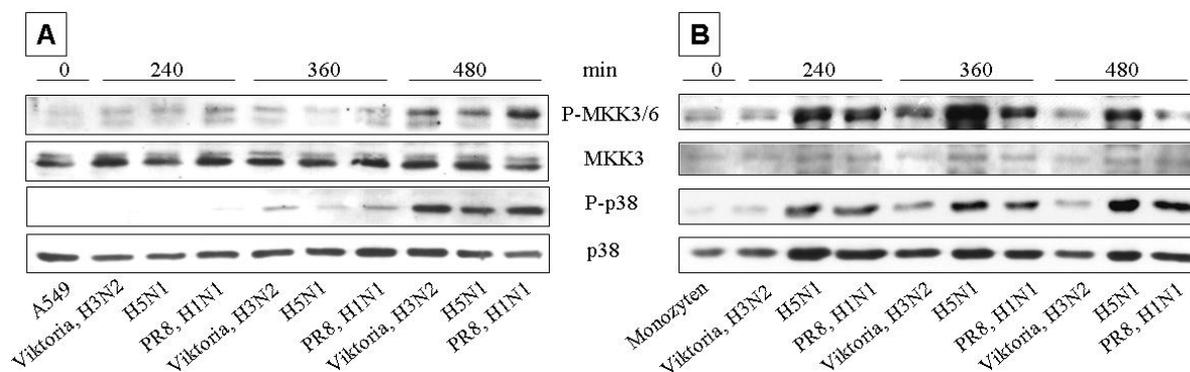


Abbildung 8: Verschiedene humane Virusisolate induzieren die MKK3/6- und p38-Aktivität in A549-Zellen und primären Monozyten

(A, B) Western-Blots mit Lysaten von A549- und primären monozytären Zellen

(A) A549-Zellen und (B) primäre Monozyten wurden mit den verschiedenen humanen Virusisolaten: A/Victoria/3/75 (H3N2), A/Thailand/1 (KAN-1)/2004 (H5N1) und A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) infiziert (MOI = 5). Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Phosphorylierung von MKK3/6 und p38 mit spezifischen Antikörpern detektiert. Antiseren gegen MKK3 und p38 belegten die äquivalente Proteinbeladung.

Um die nach Abbildung 8 zu vermutende frühere Aktivierung des MKK3/6-p38-Signalweges in primären Monozyten näher zu untersuchen, wurde die Aktivität in einer umfangreichen Infektionskinetik untersucht (Abbildung 9). Die mit H5N1-Virus-infizierten A549-Zellen und primären Monozyten zeigten unterschiedliche Aktivierungskinetiken der Kinasen MKK3/6 und p38. Während der MKK3/6-p38-Signalweg in den A549-Zellen erst nach 2-4 h aktiviert wurde, begann die Aktivierung dieser Kinasekaskade in primären Monozyten sehr viel früher und war bereits nach 60 Minuten gut nachweisbar.

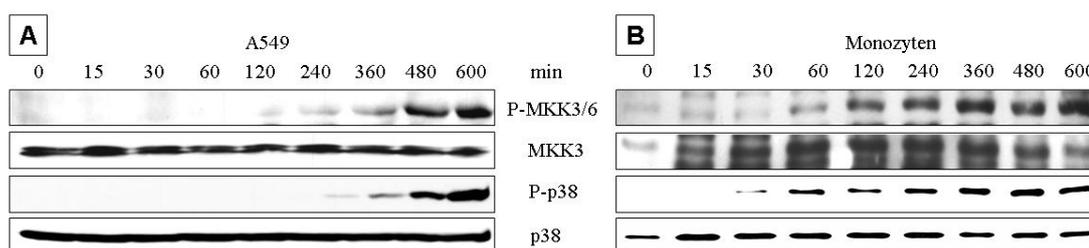


Abbildung 9: Das Influenza-A-Virus vom H5N1-Subtyp induziert die Aktivierung von MKK3/6 und p38 in A549-Zellen und primären Monozyten

(A, B) Western-Blots mit Lysaten von A549- und primären monozytären Zellen

(A) A549-Zellen und (B) primäre Monozyten wurden mit dem humanen Influenza-A-Virus-Isolat A/Thailand/1 (KAN-1)/2004 (H5N1) infiziert (MOI = 5). Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE. Die MKK3/6- und p38-Aktivität wurde mit einem phospho-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die gleichmäßige Proteinbeladung wurde mit einem MKK3- bzw. einem p38-Antiserum detektiert.

3.2. Virale RNA induziert die MKK3/6-p38-Aktivierung

3.2.1. Synthetische Doppelstrang-RNA induziert die p38-Aktivierung

Nachdem nun gezeigt war, dass die Influenza-A-Virus-Infektion zu der Aktivierung der MKK3/6-p38-Kaskade in verschiedenen Zell-Linien führt, stellte sich die Frage, welche virale Komponente für diese Aktivierung verantwortlich ist. Da aus der Literatur bekannt war, dass virale RNA, die während der Virusreplikation in der Wirtszelle akkumuliert, spezifisch Signalwege aktivieren kann (Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006), wurde zunächst überprüft, ob sich die Aktivierung der MKK3/6-p38-Kaskade auch durch das synthetische Doppelstrang-RNA- (dsRNA) Analogon Polyinosin-Polycytidyl-Säure (Poly(IC)) induzieren

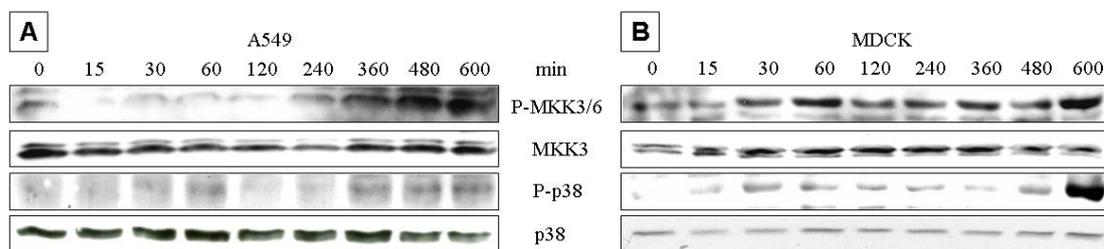


Abbildung 10: dsRNA induziert die Aktivität von MKK3/6 und p38

(A, B) Western-Blots mit Lysaten von A549- und MDCK-Zellen

(A) A549-Zellen und (B) MDCK-Zellen wurden mit dem synthetischen dsRNA-Analogon Poly(IC) (100 µg/ml) stimuliert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE. Die MKK3/6- und p38-Aktivität wurde mit einem phospho-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die gleichmäßige Proteinbeladung wurde mit einem MKK3- bzw. einem p38-Antiserum detektiert.

lässt. Dieses synthetische Produkt wurde bereits in vielen Studien genutzt, um die Effekte akkumulierender Virus-RNA zu simulieren (Majde 2000). In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass sich die ERK1/2-Kaskade zwar durch eine Influenza-A-Virus-Infektion aktivieren lässt, aber nicht durch Poly(IC) aktiviert werden konnte. Die ERK1/2-Aktivierung erfolgte also durch einen dsRNA-unabhängigen Mechanismus (Marjuki et al. 2006). Für den JNK-Signalweg konnte dagegen die Aktivierung durch Poly(IC) demonstriert werden (Ludwig et al. 2001). Zur Überprüfung der Frage, ob auch der MKK3/6- und p38-Signalweg zu den RNA-aktivierbaren Kaskaden gehört, wurden A549- und MDCK-Zellen mit dem synthetischen dsRNA-Analogon stimuliert und nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert (Abbildung 10). Man konnte eine langsam ansteigende, biphasische MKK3/6- und p38-Aktivität in beiden Zell-Linien erkennen. Dabei war eine leichte, frühe MKK3/6- und p38-Aktivierung nach ca. 60 Minuten in A549-Zellen und eine stärkere Aktivierung in MDCK-

Zellen sichtbar. Die zweite Welle der MKK3/6- und p38-Aktivierung begann in A549-Zellen nach ca. 4 h und in MDCK-Zellen nach ungefähr 6-stündiger Stimulation. Die späte, stärkere MKK3/6- und p38-Aktivierungswelle durch das dsRNA-Analogon zeigte einen identischen Verlauf mit der Virus-induzierten späten MKK3/6- und p38-Aktivierungskinetik. Es stellte sich an diesem Punkt die Frage, warum Poly(IC)-Stimulation eine zweiphasische MKK3/6-p38-Aktivierung zeigt. Während bei einer Virus-Infektion die Akkumulation von vRNA etwas Zeit benötigt, um den MKK3/6-p38-Signalweg aktivieren zu können, könnte das dsRNA-Analogon diesen Signalweg permanent aktivieren. Daher hätte man bei Poly(IC)-Stimulation eine frühe, transiente Aktivierung bzw. eine länger anhaltende Aktivierung von MKK3/6 und p38 erwartet. Wahrscheinlich wird durch das dsRNA-Analogon die späte MKK3/6-p38-Aktivierung indirekt induziert. In früheren Publikationen konnte gezeigt werden, dass MKK3/6 und p38 durch Interferone aktiviert werden können (Goh et al. 1999; Li et al. 2005). Dabei könnte die späte, dsRNA-induzierte Aktivierung von MKK3/6 und p38 durch die IFN-Induktion veranlasst worden sein.

3.2.2. Virale RNA induziert eine effiziente p38-Aktivierung

Poly(IC) ist ein Äquivalent zu dsRNA, während bei einer Influenza-A-Virus-Infektion hauptsächlich Einzelstrang-RNA vorkommt und reine dsRNA bislang nicht nachweisbar ist (Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006; Weber et al. 2006). Um die authentischen RNA-Spezies aus infizierten Zellen zu analysieren, wurden A549-Zellen mit dem humanen Influenza-A-Virus PR8 infiziert bzw. nicht-infiziert belassen. Nach 10 h wurde die RNA aus den infizierten und den nicht-infizierten Zellen isoliert und in andere A549-Zellen transfiziert. Mit Poly(IC) transfizierte Zellen wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Ungefähr 7 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Aktivität von p38 mit einem phosphospezifischen p38-Antikörper bestimmt. Man kann in Abbildung 11 eine sehr starke p38-Aktivität in den Zellen erkennen, die mit viraler RNA oder dem synthetischen dsRNA-Analogon Poly(IC) transfiziert wurden, jedoch nicht in Zellen, die mit der RNA nicht-infizierter Zellen transfiziert waren bzw. untransfiziert blieben. Aus diesem Versuch ging hervor, dass virale ssRNA eine wichtige Komponente bei einer Influenza-A-Virus-Infektion ist, welche die p38-Aktivität induziert.

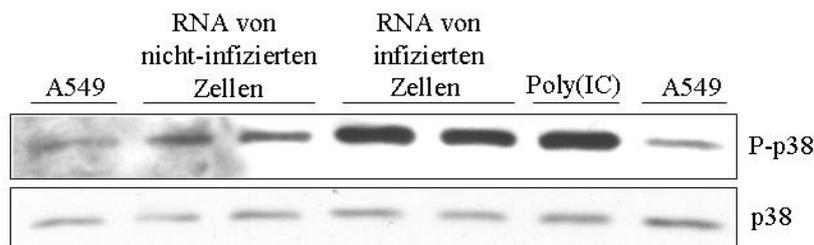


Abbildung 11: Die Aktivierung der Kinase p38 wird durch vRNA induziert

Western-Blot mit Lysaten von A549-Zellen

Aus den, mit Influenza-A-Virus, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) infizierten (MOI = 5) bzw. nicht-infizierten Zellen wurde nach 10 h die RNA isoliert. Die RNA (500 ng) wurde mittels Lipofektamin 2000 in A549-Zellen transfiziert. Als Kontrolle diente Poly(IC) (500 ng) bzw. RNA aus nicht-transfizierten A549-Zellen. Die RNA stammte aus unterschiedlichen Ansätzen und Aufreinigungen und ist daher als Doppelansatz dargestellt. Ca. 7 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE separiert und phosphoryliertes p38 mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Auftragung äquivalenter Proteinmengen wurde mit einem p38-Antiserum bestätigt.

Da das virale NS1-Protein als Antagonist RNA-abhängiger Signalwege durch Bindung an dsRNA oder Interferenz mit dem RNA-Sensor RIG-I bekannt ist (Garcia-Sastre 2004; Pichlmair et al. 2006), sollte die MKK3/6-p38-Kaskade durch die NS1-defiziente Virusmutante Δ NS1 stark aktiviert werden. Um dieser Hypothese zu verifizieren wurden MDCK-Zellen mit der Virusmutante Δ NS1 oder mit dem Isogenen Virus PR8 infiziert bzw. nicht-infiziert belassen und danach die p38-Aktivität bestimmt. Von den gleichen Proben wurde für die Bestätigung publizierter Daten (Ludwig et al. 2002) die JNK-Aktivität bestimmt (Abbildung 12) sowie vergleichend die Aktivität der MAPK ERK1/2 (Abbildung 27 D). Analog zu der Kinase JNK (Ludwig et al. 2002) konnte ebenfalls eine stärkere Phosphorylierung der MKK3/6- bzw. p38-Kinase 6 h und 9 h nach der Infektion mit der Δ NS1-Virusmutante festgestellt werden (Abbildung 12). Nicht-stimulierte MDCK-Zellen zeigten dagegen maximal ein schwaches, basales Phosphorylierungsniveau. Aus dem Experiment geht hervor, dass die MAPK-Kaskaden JNK und p38 NS1-antagonisierbare Kinasekaskaden sind, welche durch Virus-Infektion und RNA-Stimulation aktiviert werden.

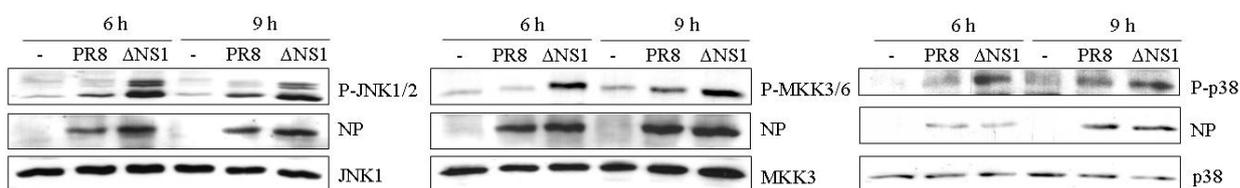


Abbildung 12: Die Δ NS1-Virusmutante induziert die Phosphorylierung von JNK1/2, MKK3/6 und p38

Western-Blots mit Lysaten von MDCK-Zellen

MDCK-Zellen wurden mit der Δ NS1-Virusmutante, der das NS1-Protein fehlte und dem PR8-Isogen (MOI = 5) infiziert bzw. nicht-infiziert belassen. Nach 6 h und 9 h wurden die Zellen lysiert, die Proteine mit SDS-PAGE aufgetrennt. Für die Detektion der Kinaseaktivierung wurden spezifische Antikörper gegen die phosphorylierten Formen von JNK1/2, MKK3/6 und p38 eingesetzt. Ein Nukleoprotein-Blot zeigte, dass die gleiche Virusmenge für die Infektion verwendet wurde. Die Kinase-Ladekontrollen JNK1, MKK3 und p38 belegten die äquivalente Proteinbeladung.

3.3. Die vRNA-induzierte p38-Aktivierung involviert die Rezeptoren TLR7 und RIG-I

Es konnte in Abbildung 11 gezeigt werden, dass die akkumulierende vRNA die prädominant-aktivierende Komponente der MKK3/6-p38-Kaskade während einer Influenza-A-Virus-Infektion darstellt. Es stellte sich nun die Frage, welche zellulären Rezeptoren dabei die tragende Rolle für die Weiterleitung und Aktivierung der MKK3/6-p38-Kaskade haben. Aus früheren, publizierten Daten war bekannt, dass die Rezeptoren TLR3 dsRNA, TLR7 ssRNA (Heil et al. 2004; Lund et al. 2004) und RIG-I virale 5' Triphosphat ssRNA erkennen, binden und dadurch aktiviert werden (Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006). Allerdings war nicht bekannt, ob die Aktivierung der Rezeptoren TLR3, TLR7 und RIG-I zu der Aktivierung der MKK3/6-p38-Kaskade führt und welcher der verschiedenen Rezeptoren für die Aktivierung dieser Kaskade während der Influenza-Virus-Infektion hauptsächlich verantwortlich sein könnte. Um dies zu überprüfen, wurden MDCK-Zellen mit einem Konstrukt für Expression von Wildtyp p38 transfiziert und mit Konstrukten für jeweils eine dominant-negative (dn) Form der Rezeptorproteine TLR3, TLR7 oder RIG-I transient transfiziert. Diese dn-Rezeptoren konkurrierten mit den in der Zelle, bereits vorhandenen-, intakten Rezeptoren um die Bindung von vRNA und blockieren diese damit. Eine Beteiligung des jeweiligen RNA-Rezeptors zeigt sich entsprechend durch eine Reduktion der Aktivierung von p38 in Anwesenheit der dn-Mutanten.

Ungefähr 24 h nach der Transfektion wurden die MDCK-Zellen mit PR8 infiziert und nach ca. 9 h lysiert. Western-Blots mit dem phospho-spezifischen p38-Antikörper veranschaulichten die starke Reduktion der Aktivierung der MAPK p38 bei Expression von dnTLR7, im Gegensatz zu der Vektorkontrolle (Abbildung 13). Dagegen schien der dnTLR3 keinen Einfluss auf die p38-Phosphorylierung zu haben, was durch die weiterhin starke Aktivität der MAPK p38 deutlich wurde. Auch nach Expression von dn-RIG-I konnte man eine Reduktion in der p38-Phosphorylierung verglichen mit der Vektorkontrolle erkennen. Aus diesen Experimenten lässt sich schließen, dass die Aktivierung der p38-Kinasekaskade durch vRNA die Rezeptoren TLR7 und RIG-I involviert. Der gleiche Versuch wurde noch mit anderen Virusisolaten durchgeführt (nicht gezeigt) und zeigte das gleiche Ergebnis.

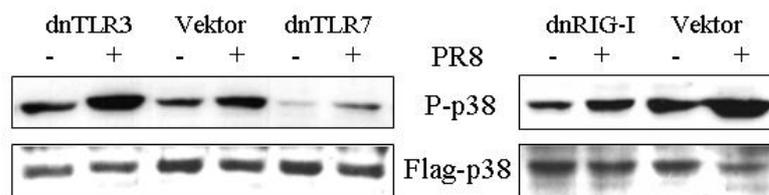


Abbildung 13: Die Expression von dn-RNA-Rezeptoren von TLR7 und RIG-I führt zu einer reduzierten p38-Phosphorylierung

Western-Blots mit Lysaten von MDCK-Zellen

MDCK-Zellen wurden mit einem Konstrukt für die p38 transfiziert und mit Konstrukten für jeweils eine dn-Form der RNA-Rezeptorproteine TLR3, TLR7, RIG-I oder der Leervektor als Kontrolle transient transfiziert. Einen Tag später wurden die Zellen mit dem humanen Influenza-A-Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) infiziert (MOI = 5) bzw. nicht-infiziert belassen. Nach 9 h wurden die Zellen lysiert, die Lysate im SDS-Gel aufgetrennt und der p38-phospho-spezifische-Antikörper eingesetzt. Da alle verwendeten Konstrukte ein Flag-Epitop besaßen, wurde eine Flag-Ladekontrolle durchgeführt.

3.4. Die Inhibition der MKK3/6-p38 MAPK-Kaskade resultiert in einer reduzierten Virus-Vermehrung

3.4.1. Die Hemmung von p38 durch verschiedene chemische Inhibitoren führt zu der Reduktion der Virus-Replikation

Nachdem nun die Aktivierung der p38-Kinasekaskade durch die Rezeptoren TLR7 und RIG-I gezeigt wurde, stellte sich die Frage, welche Funktion die MKK3/6-p38-Kaskade bei einer Influenza-A-Virus-Infektion spielt. Um die Rolle der p38-Kinasekaskade bei der Influenza-A-Virus-Infektion zu bestimmen, wurde die Kaskade auf verschiedene Weisen inhibiert. Es wurden SB-Inhibitoren oder dn-Mutanten von MKK3 oder MKK6 eingesetzt. Die verwendeten SB-Inhibitoren SB203580 (SB80) und SB202190 (SB90) können beide spezifisch p38 α und p38 β durch die Bindung in der ATP-Tasche an Threonin-106 inhibieren (Kumar et al. 1997). Der Austausch dieser Aminosäure gegen Methionin (M-106) verhinderte die Bindung des SB-Inhibitors (Fox et al. 1998; Eyers et al. 1999). Die Isoformen p38 γ , p38 δ und enge verwandte MAPKs, wie JNKs und ERKs wurden nicht oder minimal (bzw. nur in ganz hohen Konzentrationen) durch diese Substanzen inhibiert (Cuenda et al. 1995; Kumar et al. 1997). SB-Inhibitoren binden sowohl an aktivierte, als auch nicht aktivierte Formen der MAPK p38 (Young et al. 1997). MDCK-Zellen wurden mit den verschiedenen SB-Inhibitoren oder mit Dimethylsulphoxide (DMSO) als Lösungsmittelkontrolle für 30 Minuten vorinkubiert, damit die SB-Inhibitoren den p38-Signalweg schon vor der Influenza-A-Virus-Infektion inhibieren und somit das „Ausschalten“ des p38-Signalweges garantieren. Nachdem die Zellen mit FPV infiziert und der Inhibitor erneut zum Medium zugegeben wurde, wurde der Virustiter bestimmt. Hemmte man den p38-Signalweg durch den Einsatz spezifischer SB-

Inhibitoren, so war der Virustiter 9 h nach der Infektion bis zu 50% reduziert, im Vergleich zu der jeweiligen DMSO-Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 14 A). Dies zeigt, dass der p38-Signalweg schon innerhalb des ersten Virus-Replikationszyklus von etwa 8 h die Virusreplikation beeinflusst. Erhöhte man die Konzentration des SB-Inhibitors von 10 μ M auf 30 μ M, so konnte man auch nach einer längeren Zeitdauer von 24 h bzw. 36 h, welche mehrere Influenza-A-Virus-Replikationszyklen zulässt, noch eine entscheidende Reduktion von 50% in der Virus-Replikation beobachten (Abbildung 14 B). Die Inhibition der p38-Kinasekaskade führte also zu einer Reduktion der Vermehrungsfähigkeit von Influenza-A-Viren.

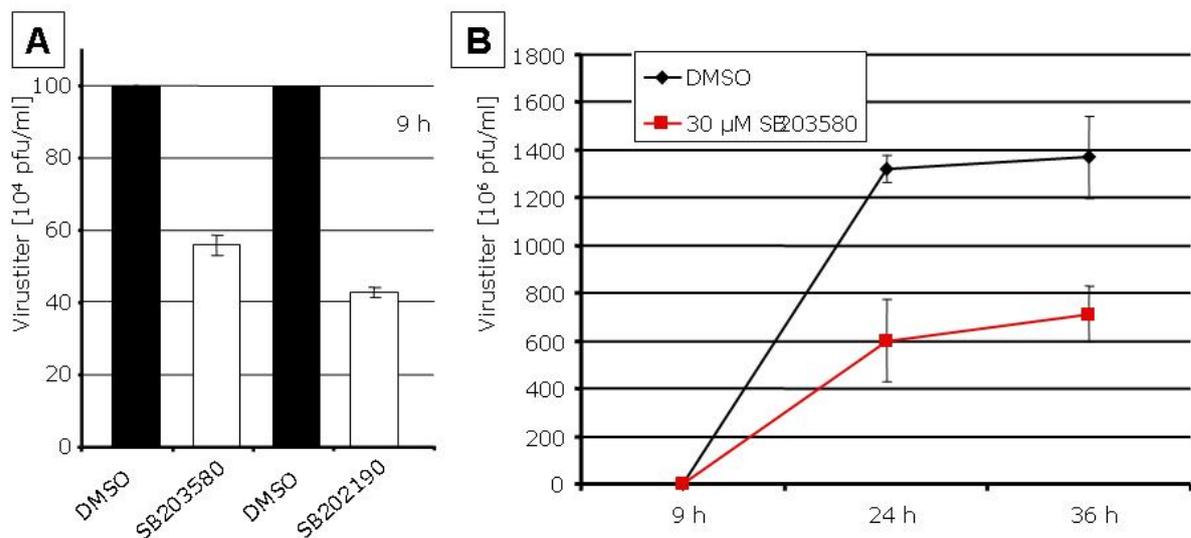


Abbildung 14: Der Einsatz verschiedener SB-Inhibitoren führt zu einer Reduktion der Virustiter

(A, B) Plaque-Assays zur Bestimmung der Virentiter

MDCK-Zellen wurden mit den Inhibitoren SB203580 und SB202190 oder mit Dimethylsulphoxide (DMSO) als Kontrolle, für 30 Minuten in Konzentrationen von (A) 10 μ M bzw. (B) 30 μ M vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion (MOI = 0,002) mit A/FPV/Bratislava/79 (H7N7). Das nach der Infektion verwendete Infektionsmedium enthielt wieder die jeweiligen SB-Inhibitoren, oder DMSO als Kontrolle. Nach 9 h (A, B) oder nach 24 h und 36 h (B) wurde der virushaltige Mediumüberstand entnommen und der Virustiter (*pfu*, plaque-forming units/ml) mittels Plaque-Assay auf MDCK-Zellen bestimmt.

3.4.2. Die MKK6-Aktivität spielt eine wichtige Rolle für die Influenza-A-Virus-Vermehrung

Eine weitere Möglichkeit, die p38-Signalkaskade zu hemmen, besteht in der Verwendung von dnMKK6- oder dnMKK3-Mutanten. Die Kinasen MKK6 und MKK3 phosphorylieren und aktivieren beide spezifisch p38, aber nicht JNK oder ERK (Raingeaud et al. 1996). Die dnMKKs konkurrierten mit den oberhalb von p38 liegenden, endogenen MKKs um die Aktivierung. Bei dem dnMKK6-Ala-Konstrukt wurde Lysin-82 in der ATP-Bindetasche durch Alanin substituiert während bei dem dnMKK3-Ala-Konstrukt Serin-189 und das Threonin-193 im TXY-Motiv durch ein Alanin ersetzt wurde (Raingeaud et al. 1996). Dies

führt dazu, dass die dnMKK6 und dnMKK3 verglichen zu den intakten MKKs nicht mehr in der Lage sind, p38 an Thr-180 und Tyr-182 zu phosphorylieren und den Signalweg zu aktivieren.

Um A549- und MDCK-Zell-Linien herzustellen, welche stabil die dnMKK6 exprimieren, wurde ein retrovirales Transduktionssystem genutzt (vgl. Abschnitt 2.2.2.5). Nach zweimaliger Transduktion an aufeinander folgenden Tagen wurde die Gentransfereffizienz durch die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins GFP, welches von der gleichen mRNA wie das Transgen von einem IRES-Element („internal ribosomal entry site“) exprimiert wird, am FACS gemessen. Die mit dem dnMKK6-Konstrukt stabil-retroviral-transduzierten A549-Zellen zeigten im Vergleich zu den nicht-transduzierten A549-Zellen (Kontrolle), eine Transduktionseffizienz von ca. 95% und für den Leervektor 96% (Abbildung 15). Die entsprechend transduzierten MDCK-Zellen zeigten eine Transduktionseffizienz von ca. 98% für das dnMKK6-Konstrukt und ca. 99% für den Leervektor.

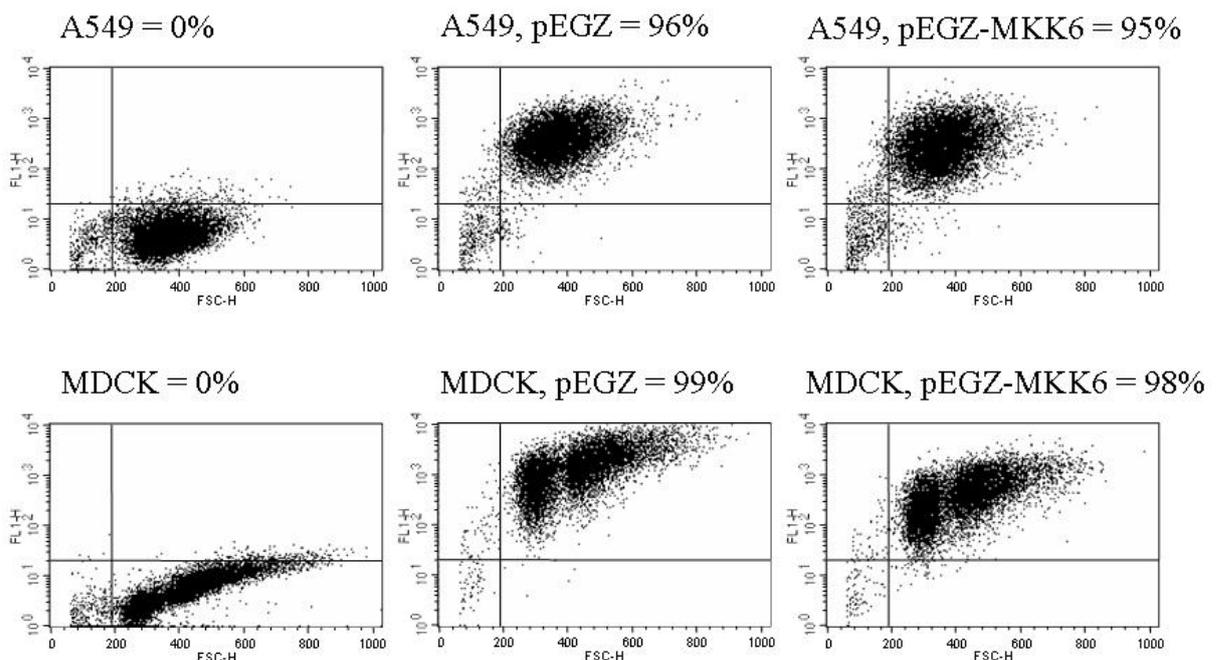


Abbildung 15: Kontrolle der Transduktionseffizienz retroviraler Konstrukte mittels FACS-Analyse

FACS-Messung zur Bestimmung der Transduktionseffizienz

Phoenixzellen wurden 24 h nach Aussaat in 10 cm Schalen mit den retroviralen Plasmidkonstrukten dnMKK6 oder dem pEGZ-Vektor transfiziert. Nach 24 h wurde der virushaltige Mediumüberstand auf die A549- und MDCK-Zellen gegeben und die Zellen transduziert. Dieser Vorgang wurde am nächsten Tag noch mal wiederholt und am dritten Tag wurde die Transduktionseffizienz mittels FACS bestimmt.

Zum Vergleich wurden MDCK-Zellen transient mit dem dnMKK3-Konstrukt bzw. mit Leervektor transfiziert. Danach wurden mit den stabil-transduzierten A549-Zellen und den transient-transfizierten MDCK-Zellen Funktionalitätstests mit verschiedenen Stimuli durch-

geführt. Es wurde bereits in anderen Zell-Linien gezeigt, dass man die MAPK p38 mit TNF- α als proinflammatorischen-Stimulus aktivieren konnte (Young et al. 1993; Lee et al. 1994; Goebeler et al. 1999). A549-Zellen und dnMKK6-exprimierende-Zellen wurden mit TNF- α stimuliert (Abbildung 16 A). Die Intensität der p38-Aktivität wurde mittels phosphospezifischer p38-Antikörper bestimmt. Aus dem Funktionalitätstest ging hervor, dass bei den dnMKK6-exprimierenden retroviral transduzierten Zellen, die induzierte Aktivierung der MAPK p38 im Vergleich zu der Kontrolle verhindert war. Diese Zell-Linien wurden mit PR8 infiziert, um zu überprüfen, ob die Virus-induzierte p38-Phosphorylierung ebenfalls gehemmt wird. Wie man in Abbildung 16 B erkennt, ist die Virus-induzierte p38-Phosphorylierung in Zellen die dnMKK6-exprimieren verhindert. MDCK-Zellen, welche transient mit dem dnMKK3-Konstrukt oder dem Leervektor transfiziert wurden und mit PR8 infiziert wurden, zeigten für die dnMKK3-exprimierenden Zellen ebenfalls eine geringere Phosphorylierung von p38 (Abbildung 16 C).

In den Zellen, welche dnMKK3 oder dnMKK6 exprimierten, konnte p38 also nur geringfügig phosphoryliert und aktiviert werden, im Gegensatz zu den Leervektorkontrollen oder den unbehandelten Zellen. Die effektivste Hemmung der p38-Aktivität war allerdings bei dem stabil-retroviral-transduzierten dnMKK6-Konstrukt zu erkennen (Abbildung 16 A, B), verglichen mit den transient-transfizierten dnMKK3-Konstrukt (Abbildung 16 C). Die dnMKK6-exprimierenden-Zellen zeigten wahrscheinlich die effektivste Hemmung der p38-Aktivität, da MKK6 eine ungefähr 300-fach größere Aktivität besitzt, als MKK3 (Raingeaud et al. 1996). Da sich aus diesen Experimenten gezeigt hat, dass die MKK6 die prädominante Kinase für die Aktivierung der MAPK p38 war, wurden, um die p38-Aktivierung so effizient wie möglich auszuschalten die dnMKK6-exprimierenden A549-Zell-Linien für weitere Versuche eingesetzt.

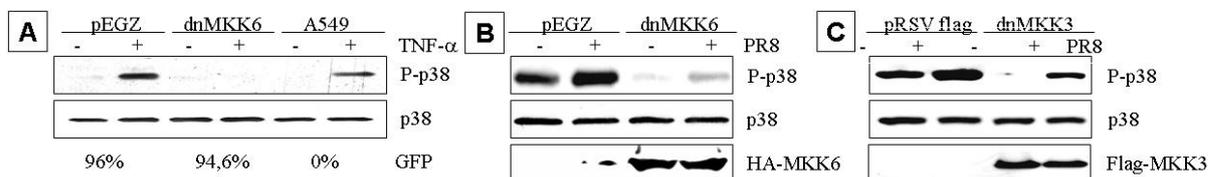


Abbildung 16: Die Expression von dnMKK6 und dnMKK3 hemmt die p38-Phosphorylierung

(A, B, C) Western-Blots mit Lysaten von (A, B) A549- und (C) MDCK-Zellen

Mit dnMKK6 oder dem Leervektor stabil-transduzierten A549-Zellen (A, B) und die mit dnMKK3 oder Leervektor transient-transfizierten MDCK-Zellen (C) sowie die jeweils nicht-transduzierten bzw. nicht-transfizierten Zellen, wurden mit verschiedenen Stimuli behandelt. Die A549-Zellen wurden mit 50 ng/ml TNF- α für 30 Minuten stimuliert und lysiert (A) oder mit dem humanen Influenza-A-Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) infiziert (MOI = 5) bzw. nicht-infiziert belassen und nach 8 h lysiert (B). MDCK-Zellen, wurden ebenfalls mit dem humanen Influenza-A-Virus-PR8 infiziert und nach 8 h lysiert (C). Nach der Proteinauftrennung wurde für die Detektion der p38-Aktivität ein phospho-spezifischer p38-Antikörper eingesetzt. Für die Proteinladekontrolle wurde das p38-Antiserum eingesetzt. Die Transfektionseffizienz wurde entweder prozentual durch das GFP angegeben oder durch einen HA-Antikörper bzw. Flag-Antiserum festgestellt.

In früher publizierten Daten konnte gezeigt werden, dass eine starke Aktivierung der p38-Kinasekaskade in T-Zellen, die konstitutiv-aktives MKK6(Glu) exprimierten, zu einem reduzierten Influenza-A-Virustiter führten (Conze et al. 2000). Um nun zu überprüfen, ob die Hemmung der p38-Kinasekaskade durch die stabil mit dem dnMKK6-Konstrukt retroviral-transduzierten A549-Zellen einen Einfluss auf die Virus-Vermehrung hat, wurden die Zellen mit FPV infiziert. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 zusammengefasst. Wie man deutlich sehen kann, sind die Nachkommen-Virustiter aus den dnMKK6-infizierten Zellen sowohl nach 9 h, wie 24 h deutlich geringer (70% - 50%) im Vergleich zu nicht-transfizierten A549-Zellen. Damit zeigte sich, in Analogie zu den Daten mit den p38-Inhibitoren, das dnMKK6 die inhibitorische Wirkung auf die Virus-Vermehrung bereits innerhalb des ersten Virus-Replikationszyklus ausübt, was sich auch nach 24 h, also nach mehreren Virus-Replikationszyklen manifestiert. Die MKK6-Funktionalität ist daher essentiell für die Influenza-A-Virus-Vermehrung.

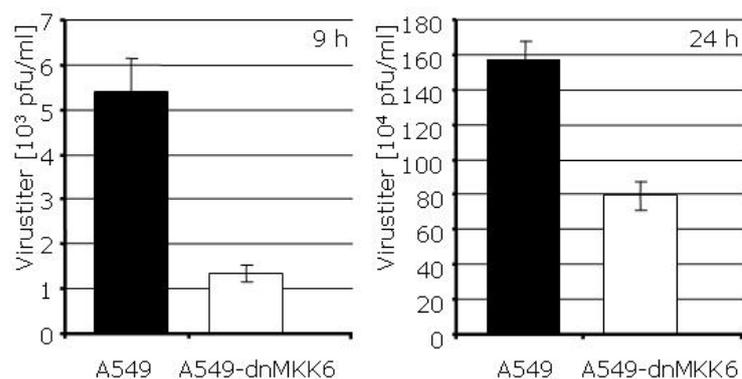


Abbildung 17: Die MKK6-Funktionalität ist wichtig für eine effiziente Influenza-A-Virus-Vermehrung

Plaque-Assays zur Bestimmung der Virentiter

A549-Zellen, die mit dnMKK6 stabil-retroviral-transduziert wurden und nicht-transduzierte Zellen wurden mit FPV infiziert (MOI = 0,005). Nach 9 h und 24 h wurde der virushaltige Mediumüberstand entnommen und der Virustiter mittels Plaque-Assay auf MDCK-Zellen bestimmt.

3.5. Die virale Proteinexpression wird durch Inhibition des p38-Signalweges nicht beeinflusst

Wie gezeigt, führte die Hemmung des MKK3/6-p38-Signalweges in Influenza-A-Virus-infizierten Zellen zu einem deutlich reduzierten Virustiter. Es stellte sich daher die Frage, an welchem Schritt des viralen Vermehrungszyklus die Influenza-A-Virus-Replikation inhibiert wird. Um dies näher zu analysieren wurde untersucht, ob die Akkumulation viraler Proteine durch die Inhibition des MKK3/6-p38-Signalweges betroffen war. Es wurde die Expression

des viralen Matrixproteins (M), des Nukleoproteins (NP) und der Polymeraseuntereinheit PB1 in Lysaten von infizierten Zellen überprüft. PR8-infizierte A549- und MDCK-Zellen (Abbildung 17 A und B) zeigten nach SB-Inhibitor- bzw. DMSO-Behandlung keine Unterschiede in der viralen Proteinexpression. Auch in den stabil dnMKK6-exprimierenden, retroviral-transduzierte A549-Zellen und die Leervektor-exprimierenden Zellen (Abbildung 17 C und D) zeigten nach Infektion die gleiche Proteinexpression. Diese Ergebnisse konnten ebenfalls nach Infektion mit einem anderen Influenza-A-Virus bestätigt werden (PR8=Abbildung 17 A, C, D, FPV=Abbildung 17 B).

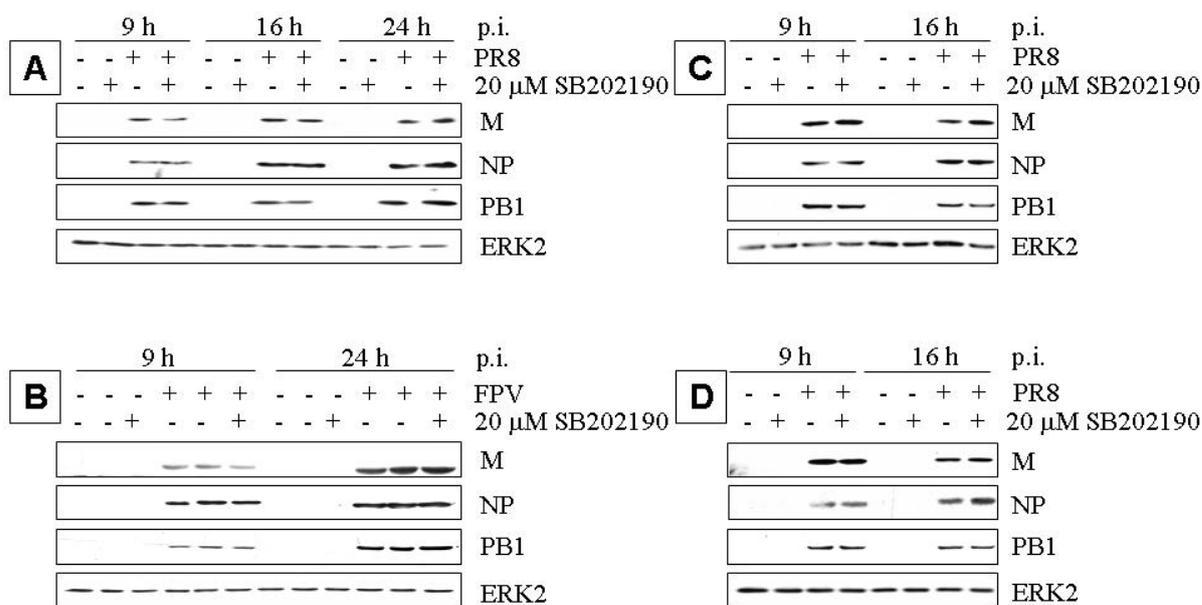


Abbildung 17: Der SB-Inhibitor bzw. das dnMKK6-Konstrukt hat keinen entscheidenden Einfluss auf die virale Proteinexpression

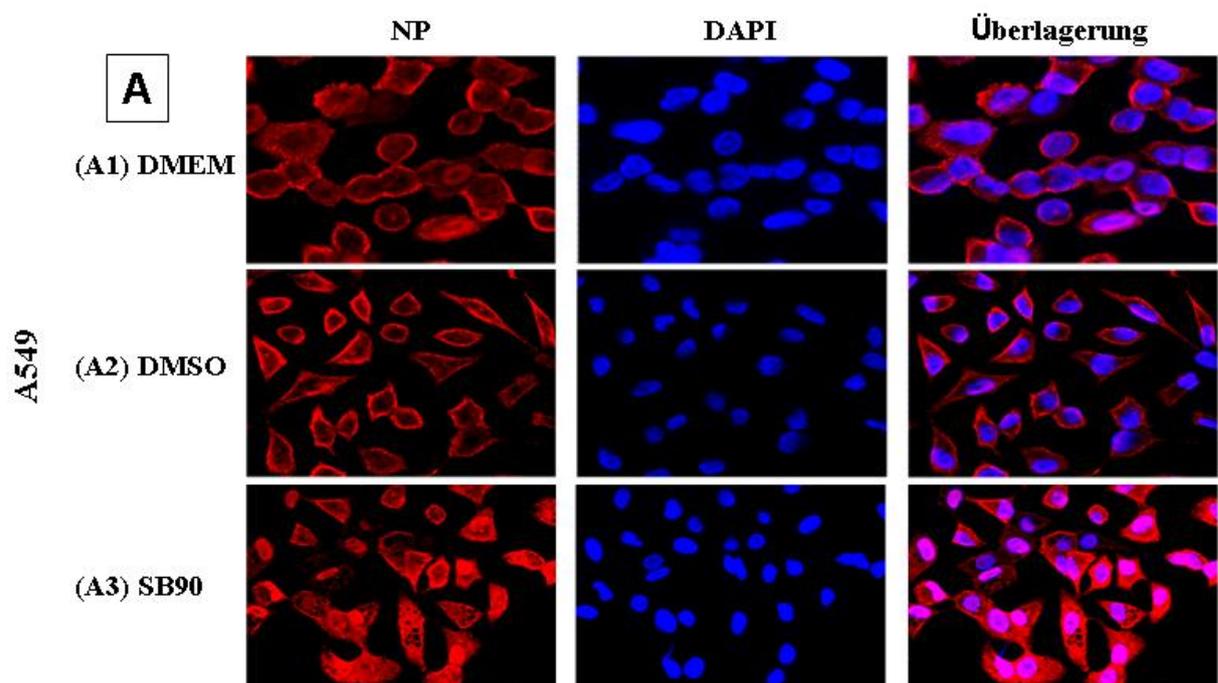
(A, B, C, D) Western-Blots mit Lysaten von (A, C, D) A549- und (B) MDCK-Zellen

(A) A549-, (B) MDCK- und (C) A549-Zellen, die retroviral mit dem Leervektor pEGZ oder (D) retroviral mit dem dnMKK6-Konstrukt transduzierte A549-Zellen wurden 30 Minuten mit 20 µM SB202190-Inhibitor oder DMSO vorinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen (A, C und D) mit humanen Influenza-A-Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) infiziert (MOI = 3) oder (B) mit A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) infiziert (MOI = 0,1) bzw. nicht-infiziert belassen. Nach der Infektion erhielten die verschiedenen Zell-Linien Infektionsmedium mit SB-Inhibitor oder DMSO und nach 9 h, 16 h und 24 h wurden die Zellen lysiert. Die Proteinaufreinigung erfolgte mittels SDS-PAGE. Spezifische Antikörper bzw. Antiseren wurden für die Detektion des Matrixproteins (M), des Nukleoproteins (NP) und der Polymeraseuntereinheit (PB1) verwendet. Die Proteinladekontrolle wurde mit einem ERK2-Antiserum durchgeführt. In (B) wurde zusätzlich zu der DMSO-Kontrolle noch eine DMEM-Kontrolle durchgeführt.

3.6. Die Inhibition von p38 bewirkt eine Retention der vRNP-Komplexe im Zellkern

Da die virale Proteinexpression durch die Blockierung der p38-Kinasekaskade nicht beeinflusst wurde, war zu vermuten, dass ein sehr später Prozess im Replikationszyklus betroffen ist. Influenza-Viren vermehren ihr Genom im Zellkern und müssen daher zu einer späten Phase im viralen Replikationszyklus die neu gebildeten RNP-Komplexe aus dem

Zellkern ausschleusen. Es konnte bereits in anderen Arbeiten nach der Blockierung von Signalwegen eine Retention der RNP-Komplexe im Zellkern beobachtet werden, wie z.B. durch die Inhibition der Raf-MEK-ERK-Kaskade (Pleschka et al. 2001) oder die Blockierung von NF- κ B-Aktivierung (Mazur et al. 2007). Die Inhibition der Caspase-3 führte ebenfalls zu einem Verbleiben der RNP-Komplexe im Zellkern ohne die generelle Akkumulation viraler Proteine zu beeinflussen (Wurzer et al. 2003). Daher wurde nun die Lokalisierung der vRNP-Komplexe anhand einer NP-Immunfluoreszenz überprüft. Dafür wurden A549-Zellen und die retroviral-transduzierten A549-Zellen mit SB-Inhibitor bzw. DMSO oder DMEM als Kontrolle behandelt, mit FPV infiziert und 6 h nach Infektion fixiert. Man konnte beobachten, dass bei den mit SB-Inhibitor behandelten Zell-Linien das Nukleoprotein, welches die neu gebildeten RNP-Komplexe repräsentiert, im Gegensatz zu der DMSO- oder DMEM-Kontrolle (Abbildung 18 A2 und B2 oder A1 und B1) hauptsächlich im Zellkern lokalisiert war (Abbildung 18 A3 und B3). Dies konnte durch eine Überlagerung der Nukleoprotein-Färbung mit den durch DAPI blau gefärbten Zellkernen besonders gut erkannt werden. Ebenfalls zeigte sich nach Inhibition der p38-Kinasekaskade durch das dnMKK6-Konstrukt eine prädominante Lokalisierung des Nukleoproteins im Zellkern (Abbildung 18 C1, C2 und C3), was durch die zusätzliche Anwendung des SB-Inhibitors nicht wesentlich gesteigert werden konnte (Abbildung 19 C3). Durch die Inhibition der MKK3/6-p38-Kaskade wurde also der Transport der RNP-Komplexe aus dem Zellkern gestört, während in unbehandelten oder mit DMSO behandelten Zellen das Nukleoprotein zu dem gleichen Zeitpunkt schon fast vollständig im Zytoplasma lokalisiert war (Abbildung 18 A1, A2 und B1, B2).



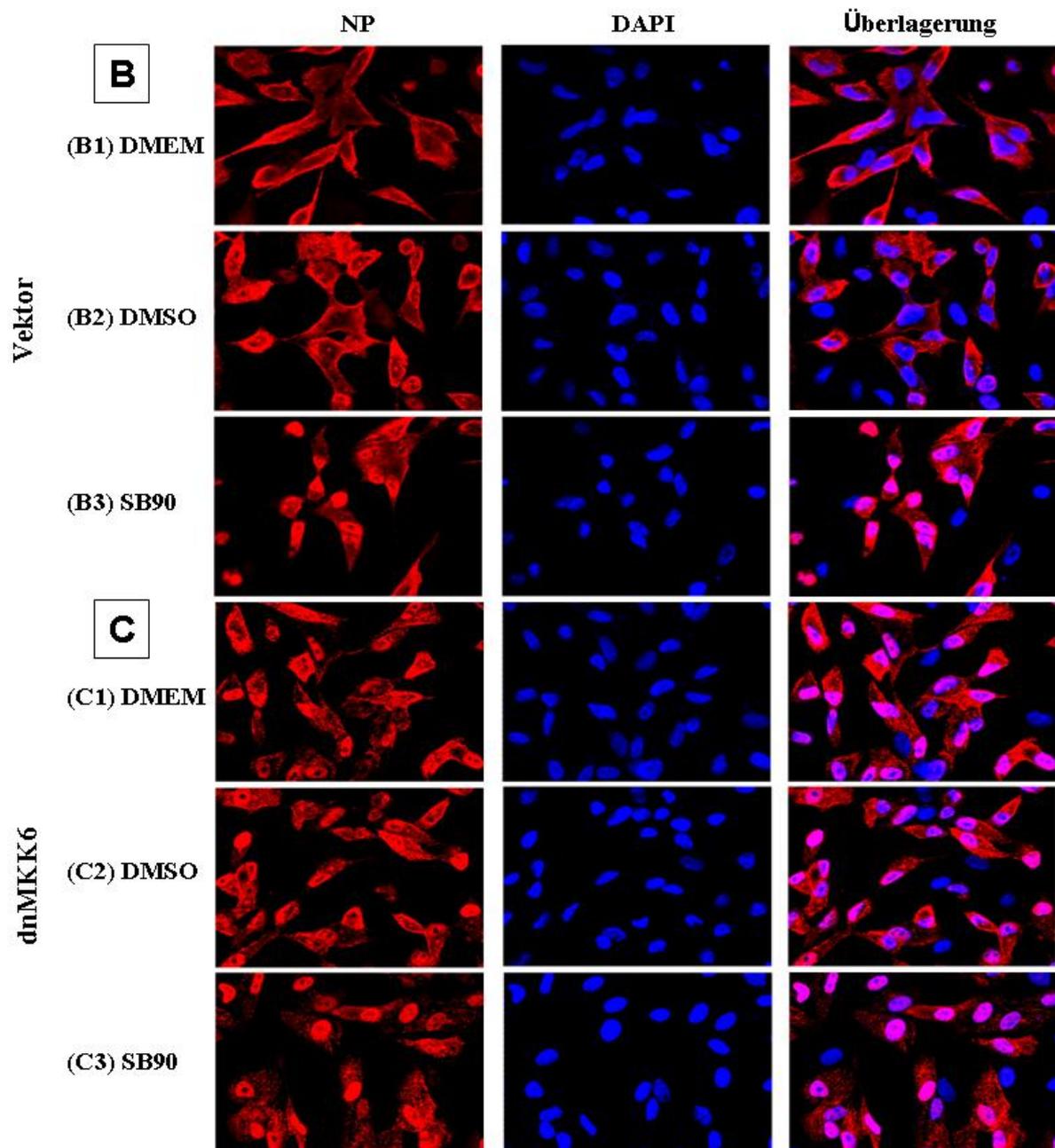


Abbildung 18: Die RNPs verbleiben nach Inhibition der p38-Kinasekaskade mit dem SB-Inhibitor oder Expression von dnMKK6 länger im Zellkern

(A, B, C, D) Immunfluoreszenz vom Nukleoprotein zur Lokalisierung der vRNP-Komplexe
 (A) A549- und (B und C) stabil-retroviral-transduzierte A549-Zellen, die den pEGZ-Leervektor (B) oder das dnMKK6-Konstrukt (C) enthalten, wurden 30 Minuten mit dem SB202190-Inhibitor (20 μ M) vorbehandelt (A3, B3, C3) oder für die Kontrolle mit DMSO (A2, B2, C2) bzw. DMEM (A1, B1, C1), dann mit A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) infiziert (MOI = 5) und wieder mit SB, DMSO oder nur Infektionsmedium (DMEM) nachbehandelt. Die Zellen wurden nach 6 h fixiert und das virale Nukleoprotein mit einem spezifischen Antikörper lokalisiert, während die Zellkerne mit DAPI (4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride) blau gefärbt wurden.

3.7. IRF-3-Phosphorylierung wird durch die p38-Inhibition nicht beeinflusst

Aus publizierten Daten ist bekannt, dass sowohl eine Influenza-A-Virus-Infektion, als auch dsRNA-Stimulation eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 induziert, einen der wichtigsten Faktoren für die Induktion antiviraler Typ-I-Interferone (Ehrhardt et al. 2004). Die direkte, Virus-induzierte oder dsRNA-stimulierte, C-terminale IRF-3-Phosphorylierung findet hauptsächlich an der Aminosäure Ser-369 statt (Servant et al. 2003). Die Phosphorylierung von IRF-3 bewirkt durch eine Konformationsänderung die Aufhebung der Autoinhibition, was wiederum zu der Aktivierung der Transkription führt. Aktiviertes IRF-3 dimerisiert und es folgt die Translokation in den Zellkern. Mit dem Koaktivator CBP/p300 bindet der gesamte Komplex an die DNA und induziert die Transkription verschiedener Gene (Lin et al. 1999). Allerdings zeigten zuvor schon Experimente mit dn- oder konstitutiv-aktiven-Mutanten der MAPK ERK1/2, JNK, p38, ERK5 und Komponenten des IKK/NF- κ B-Moduls im Luziferase-Assay, dass diese Signalwege in Bezug auf Virus- oder dsRNA-induzierte IRF-3- oder IFN- β -Promotoraktivierung keine Rolle zu spielen scheinen (Ehrhardt et al. 2004). Übereinstimmend zeigten andere Arbeiten, dass die Kinasen ERK1/2, JNK, p38, IKK α/β und PKR nicht die Phosphorylierung des C-Terminus von IRF-3 bewirken (Servant et al. 2001).

Es wurde nun im Detail überprüft, ob eine Blockierung des p38-Signalweges die endogene IRF-3-Phosphorylierung beeinträchtigen kann und somit zum beobachteten Effekt auf die Virusvermehrung beiträgt. Dafür wurde in MDCK-Zellen die p38-Signalkaskade auf verschiedene Weisen inhibiert, die Zellen daraufhin mit PR8 infiziert und die IRF-3-Aktivierung anhand der Phosphorylierung überprüft. In Abbildung 19 ist gezeigt, dass im Western-Blot zwei bzw. drei spezifische IRF-3-Banden zu detektieren waren. Nach publizierten Arbeiten existiert das endogene IRF-3-Protein in nicht-infizierten Zellen in zwei Formen: eine erste Form, welche der untersten Bande im Western-Blot entspricht, ist vermutlich nicht-phosphoryliertes IRF-3, während eine im Gel retardierte Bande wahrscheinlich die basal-phosphorylierte zweite IRF-3-Form darstellt, da sie sensitiv gegen eine Phosphatase-Behandlung war (Servant et al. 2001). Nach Virus-Infektion mit Sendai-Virus (Parainfluenzavirus) entstanden zwei zusätzliche IRF-3-Formen (in HEK293-, U937- und Jurkat-Zellen), welche die Virus-spezifisch phosphorylierten Formen darstellen (Servant et al. 2001). Wie in der Abbildung 20 gezeigt, konnte man bei den mit humanen Influenza-A-Virus PR8-infizierten MDCK-Zellen noch eine zusätzliche, phosphorylierte IRF-3-Bande erkennen, die

allerdings überall die gleiche IRF-3-Bandenstärke zeigte. Weder die verschiedenen p38-Inhibitoren (Abbildung 19 A), noch die stabile Expression von dnMKK6 zeigten in infizierten MDCK-Zellen (Abbildung 19 B) einen Einfluss auf die IRF-3-Phosphorylierung.

Auch in IRF-3- oder IFN- β -Promotor-spezifischen Reportergen-Experimenten in MDCK-Zellen bzw. A549-Zellen, welche transient bzw. stabil dnMKK6-exprimierten, war kein Einfluss auf die Virus-induzierte IFN- β -Promotoraktivität oder die IRF-3-abhängige Transkription nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Es lies sich also aus diesen Experimenten schließen, dass die Hemmung der p38-Kinasekaskade keinen Effekt auf die Virus-induzierte IRF-3-Phosphorylierung und damit auf die IRF-3-abhängige Transkription und die IFN- β -Promotoraktivität hat.

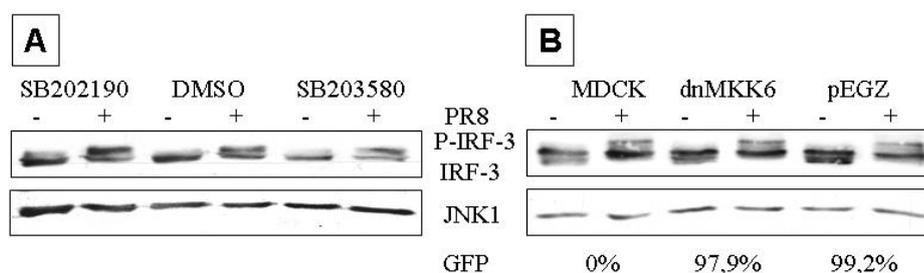


Abbildung 19: Die Hemmung der p38-Kinasekaskade beeinträchtigt nicht die Virus-induzierte IRF-3-Phosphorylierung

(A, B) Western-Blots mit Lysaten von MDCK-Zellen

(A) MDCK-Zellen wurden 30 Minuten mit den verschiedenen SB-Inhibitoren vorinkubiert oder mit DMSO als Kontrolle behandelt. Darauf wurden die Zellen mit dem humanen Influenza-A-Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) für 30 Minuten infiziert (MOI = 5) bzw. nicht-infiziert belassen und mit SB-Inhibitor- oder DMSO-enthaltenen Infektionsmedium nachinkubiert. (B) MDCK-Zellen und stabil-retroviral-transduzierte MDCK-Zellen, die zu 97,9% das dnMKK6-Konstrukt oder zu 99,2% den Leervektor enthielten, wurden ebenfalls mit dem humanen PR8-Influenza-A-Virus infiziert. Die Zellen (A und B) wurden 4 h nach der Infektion lysiert, die Proteine im SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Da das IRF-3-Antiserum (Zymed) neben dem endogenen unphosphoryliertem IRF-3 auch das phosphorylierte IRF-3 erkannte, konnte auch die phosphorylierte Variante durch eine retardierte Bande im Western-Blot angezeigt werden. Die aufgetragene Proteinmenge wurde mit einem JNK-Antiserum überprüft.

3.8. Die Virus-induzierte Kaspaseaktivität wird durch die p38-Inhibition nicht beeinflusst

3.8.1. p38-Inhibition führt zu einer reduzierten TRAIL-mRNA-Synthese und p38-Aktivierung zu einer erhöhten PARP-Spaltung

In publizierten Arbeiten wurde gezeigt, dass embryonale Fibroblasten aus Knockout-Mäusen, die eine Defizienz für die ASK1 (Apoptose-signalregulierende-Kinase-1), einen Aktivator der p38- und JNK-MAPK-Kaskade aufwiesen, nach einer Virus-Infektion eine verringerte Aktivierung der MAPK p38 und JNK sowie eine Hemmung der Kaspase-3-Aktivierung und

Apoptose zeigten (Maruoka et al. 2003). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass eine Hemmung der p38-MAPK-Kaskade eine antiapoptotische Wirkung haben könnte. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Influenza-A-Virus die Expression proapoptotischer Faktoren, TRAIL sowie Fas/FasL und Kaspase-3-Aktivität für seine Vermehrung benötigt (Wurzer et al. 2003; Wurzer et al. 2004).

Daher wurde überprüft, ob die nach Inhibition der p38-Kinasekaskade zu beobachtenden reduzierten Virustiter mit einer veränderten Synthese der TRAIL-mRNA korreliert. Dazu wurden stabil-dnMKK6-exprimierende A549-Zellen oder Vektor-tragende Vergleichszellen mit dem SB-Inhibitor bzw. DMSO/DMEM vorinkubiert. Nach der Infektion mit PR8 wurden die Zellen mit SB-Inhibitor bzw. DMSO/DMEM nachinkubiert. Die Realtime-PCR-Analyse der aus den Zell-Lysaten isolierten RNA zeigte, dass die Inhibition der p38-Kinasekaskade mit dem SB-Inhibitor oder mit dnMKK6 zu einer Reduktion der Virus-induzierten TRAIL-mRNA-Synthese führte (Abbildung 20 A und B). Dies lässt den Schluss zu, dass p38 an der Regulation der Influenza-Virus-induzierten Apoptose beteiligt sein könnte. Ein weiterer unterstützender Befund für diese Annahme, ließ sich durch Experimente mit der Δ NS1-Virusmutanten erhalten (Abbildung 20 C). Verstärkte MKK3/6- und p38-Phosphorylierung korrelierte hier mit einer stärkeren PARP-Spaltung, was ein Indikator für die apoptotische Kaspaseaktivität ist. Es ist bekannt, dass die Spaltung von PARP-1 durch Kaspase-3 die Apoptose durch die Verhinderung der DNA-Reparatur und durch die Blockade der Energie-abhängigen Nekrose-Induktion fördert. PARP-1 wird dabei in zwei Fragmente gespalten, ein 89 kDa- und ein 24 kDa-Fragment (Soldani and Scovassi 2002). Wie in der Abbildung 21 C gezeigt, konnte man die stärkere PARP-Spaltung durch das Verschwinden der Wildtyp PARP-Bande nach der Infektion mit der Δ NS1-Virusmutanten deutlich erkennen. Das virale NS1-Protein wirkte also antiapoptotisch, da die Δ NS1-Virusmutante stärker die Apoptose induzierte, als das Wildtypvirus PR8. Dies war ein weiterer Hinweis darauf, dass die p38-Kinase eine regulatorische Funktion in der Virus-induzierten Apoptose haben könnte. Daher stellte sich die Frage, ob die Inhibition der p38-Kinasekaskade durch den SB-Inhibitor oder Expression von dnMKK6 einen Einfluss auf die Influenza-A-Virus-induzierte Kaspaseaktivität hat.

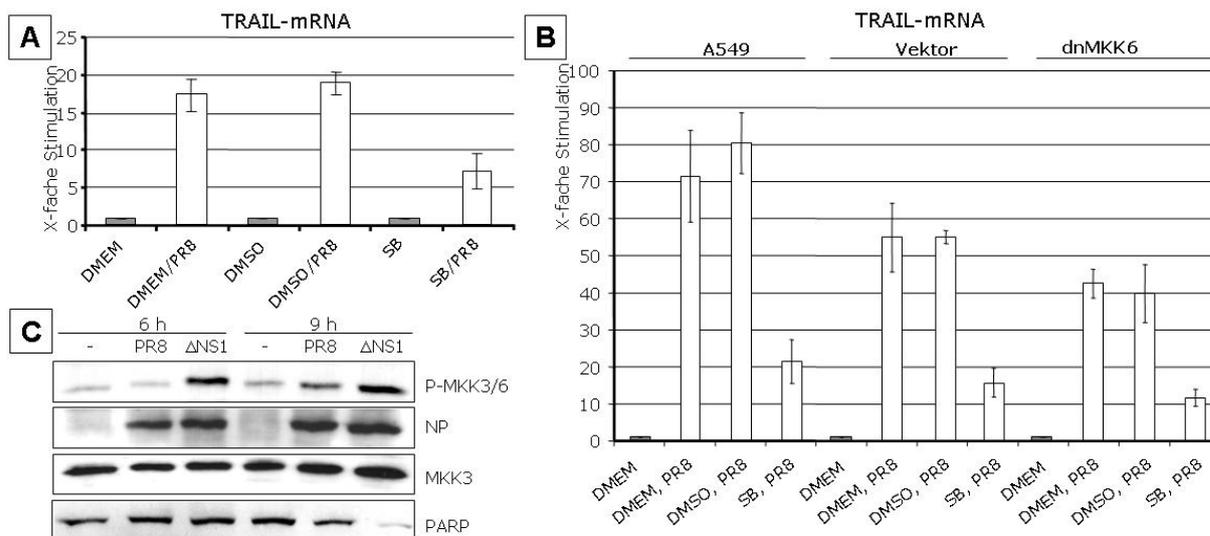


Abbildung 20: Die Hemmung der p38-Kaskade durch den SB-Inhibitor oder durch das dnMKK6-Konstrukt resultiert in einer reduzierten TRAIL-mRNA-Synthese, während eine Hyperaktivierung der p38-Kaskade durch die Δ NS1-Virusmutante mit einer erhöhten Kaspaseaktivität korreliert

(A, B) Realtime-PCR zur Bestimmung der Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese

(A) A549- und (B) A549-Zellen und stabil-dnMKK6-exprimierende oder mit dem pEGZ-Leervektor retroviral-transduzierte A549-Zellen wurden 30 Minuten mit SB202190-Inhibitor (20 μ M) oder der DMSO- bzw. DMEM-Kontrolle vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem humanen Influenza-A-Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) infiziert und mit SB-Inhibitor, DMSO oder DMEM für 5 h nachinkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die isolierte RNA amplifiziert und für die Realtime-PCR-Analyse eingesetzt.

(C) Western-Blot mit Lysaten von MDCK-Zellen

MDCK-Zellen wurden mit der Δ NS1-Virusmutante, der das NS1-Protein fehlte oder dem PR8-Isogen infiziert (MOI = 5) bzw. nicht-infiziert belassen. Nach 6 h und 9 h wurden die Zellen lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und spezifische Antikörper gegen die phosphorylierte Form von MKK3/6 eingesetzt. Das Nukleoprotein zeigte, dass die gleiche Virusmenge für die Infektion verwendet wurde. Die Kinaseladekontrolle wurde mit einem MKK3-Antiserum durchgeführt. Ein spezifischer PARP- (Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1) Antikörper machte den Abbau des PARP sichtbar.

3.8.2. Inhibition der MKK6-p38-Signalkaskade hat keinen entscheidenden Einfluss auf die Influenza-A-Virus-induzierte Kaspaseaktivität

In publizierten Arbeiten hat man gezeigt, dass die Blockierung von p38 mit SB203580 keinen Einfluss auf die H5N1-Virus-induzierte Apoptose in humanen Makrophagen hat (Mok et al. 2007). Ebenfalls sind die SB203580- und SB202190-Inhibitoren nicht in der Lage, Apoptose in Influenza-A-Virus-infizierten Chorion-Zellen (human fötale Membranzellen) zu induzieren (Uchida et al. 2007). Um zu überprüfen, ob die Blockierung der p38-Kinase einen Einfluss auf die Influenza-A-Virus-induzierte Kaspaseaktivität in den in dieser Arbeit benutzten epithelialen Zellsystem hat, wurden verschiedene Zell-Linien mit SB-Inhibitor bzw. DMSO oder DMEM als Kontrolle vor- und nach-inkubiert und mit verschiedenen Influenza-A-Viren infiziert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine aus den Zell-Lysaten, wurde die PARP-Spaltung als ein Indikator der apoptotischen Kaspaseaktivität im Western-Blot detektiert (Abbildung 21). Allerdings zeigte die Anwendung des SB-Inhibitors im

Vergleich zu den Kontrollen keinen wesentlichen Unterschied in der PARP-Spaltung. Demnach schien die p38-Inhibition keine Auswirkung auf die Influenza-A-Virus-induzierte Kaspaseaktivität zu haben.

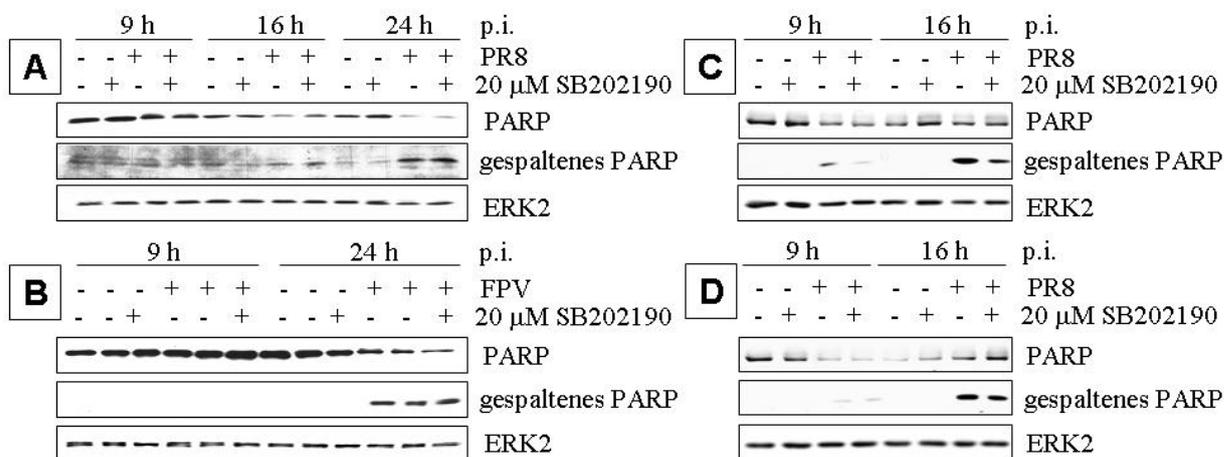


Abbildung 21: Der SB-Inhibitor bzw. Expression von dnMKK6 hat keinen Einfluss auf die Virus-induzierte Kaspaseaktivität

(A, B, C, D) Western-Blots mit Lysaten von (A, C, D) A549- und (B) MDCK-Zellen (A) A549-, (B) MDCK-Zellen und (C und D) retroviral-transduzierte A549-Zellen mit dem (C) pEGZ-Leervektor und dem (D) dnMKK6-Konstrukt wurden 30 Minuten mit 20 μM SB202190-Inhibitor oder DMSO vorinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen (A, C und D) mit humanen A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), (MOI = 3) oder (B) dem aviären Influenza-A-Virus A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) infiziert (MOI = 0,1) bzw. nicht-infiziert belassen. Nach der Infektion erhielten die verschiedenen Zell-Linien Infektionsmedium mit SB-Inhibitor oder DMSO als Kontrolle und nach 9 h, 16 h und 24 h wurden die Zellen lysiert. Die Proteinauftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE. Es wurde ein spezifischer Antikörper verwendet, der PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1) und die gesplante PARP-Bande erkennen konnte sowie ein ERK2-Antikörper für die Proteinladekontrolle. In (B) wurde neben der DMSO-Kontrolle noch eine DMEM-Kontrolle durchgeführt.

3.9. Die Inhibition des p38-Signalweges führt zu einer reduzierten Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese

Es ist aus publizierten Daten bekannt, dass p38 nach Influenza-A-Virus-Infektion die Synthese und Expression des Chemokin RANTES reguliert (Kujime et al. 2000). Bei vergleichender Infektion mit Viren der Subtypen H1N1 und H5N1 wurden in H5N1-Virus-infizierten Zellen p38-abhängig erhöhte Mengen TNF- α synthetisiert (Lee et al. 2005). Nach der p38-Hemmung mit dem SB203580-Inhibitor konnte zudem eine verringerte Prostaglandin-E₂-Sekretion festgestellt werden (Mizumura et al. 2003), was ebenfalls für eine Beteiligung von p38 an der inflammatorischen Antwort spricht. Daher stellte sich die Frage, ob die Hemmung von p38 die Influenza-A-Virus-induzierte Zytokin- bzw. Chemokin-Synthese beeinflusst. Für den Versuch wurden A549-Zellen mit SB-Inhibitor bzw. mit und ohne DMSO in DMEM vorinkubiert, mit PR8 infiziert bzw. nicht-infiziert und für 5 h

nachinkubiert. Aus den Zell-Lysaten wurde die gesamte RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und für die Realtime-PCR-Analyse eingesetzt. Es zeigte sich, dass die p38-Blockierung durch den Einsatz des SB-Inhibitors im Vergleich zu den Kontrollen zu einer Reduktion der Virus-induzierten Zytokin-mRNA-Synthese von IL-6 sowie Chemokin

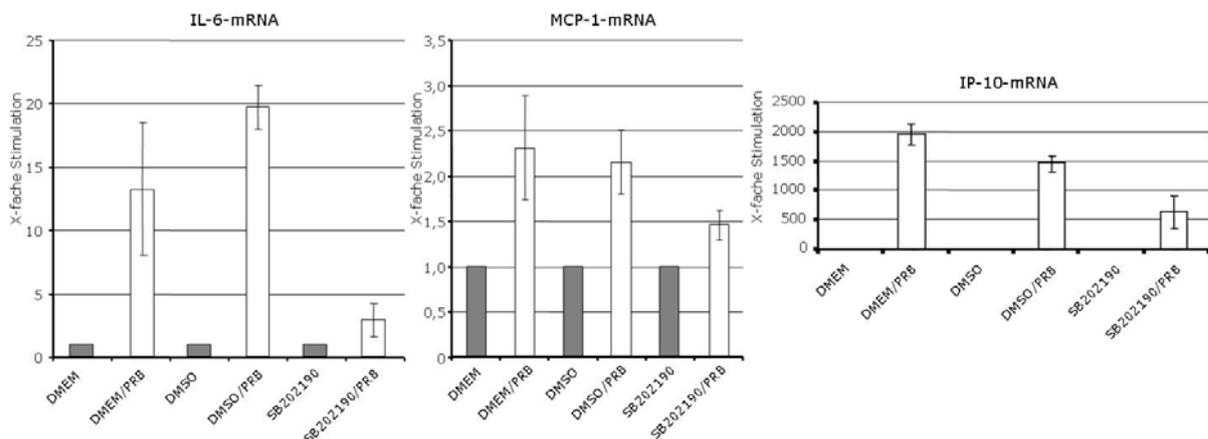


Abbildung 22: Inhibition des p38-Signalweges führt zu der reduzierten Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese

Realtime-PCR zur Bestimmung der Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese

A549-Zellen wurden 30 Minuten mit dem Inhibitor SB202190 (20 μ M) oder DMSO bzw. DMEM als Kontrolle vorbehandelt, dann mit dem humanen Influenza-A-Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) infiziert (MOI = 5) oder nicht-infiziert belassen und für 5 h mit SB-Inhibitor, DMSO oder DMEM nachinkubiert. Die Zellen wurden lysiert und anschließend die gesamte RNA isoliert, amplifiziert und für die Realtime-PCR (RT-PCR) genutzt. Für die Auswertung wurden die RT-PCR-Werte der mRNA-Synthese der nicht-infizierten, aber mit SB, DMSO oder DMEM behandelten Zellen willkürlich auf eins gesetzt und die jeweils dazu gehörigen Werte der mRNA aus infizierten Zellen in Bezug gesetzt.

mRNA-Synthese von MCP-1 und IP-10 führte (Abbildung 22).

Auch A549-Zellen, welche stabil dnMKK6 exprimierten, wurden vergleichend zu Leervektor tragenden oder Wildtyp-Zellen auf die Zytokin-mRNA-Synthese überprüft (Abbildung 23). Alle drei Zell-Linien zeigten eine Hemmung in der Zytokin-mRNA-Synthese für IL-6, MCP-1 und IP-10 unter der Wirkung des SB-Inhibitors, im Gegensatz zu der DMSO- oder Medium-Kontrolle.

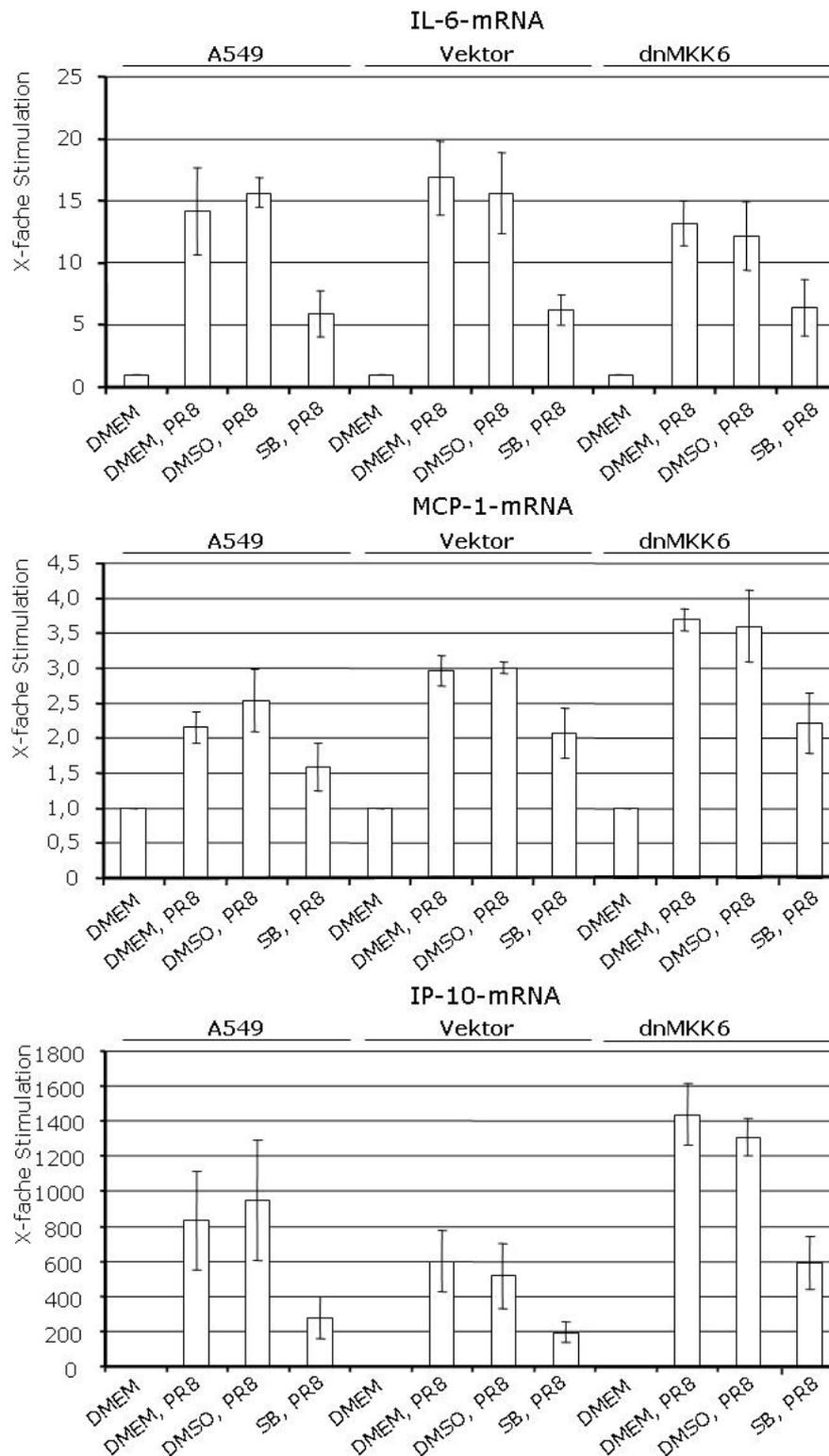


Abbildung 23: Die p38-Inhibition bewirkt in retroviral-transduzierten A549-Zellen eine reduzierte Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese von IL-6, MCP-1 und IP-10

Realtime-PCR zur Bestimmung der Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese

Die mit dem dnMKK6-Konstrukt oder dem pEGZ-Leervektor retroviral-transduzierten A549-Zellen und A549-Zellen als Kontrolle, wurden 30 Minuten mit dem Inhibitor SB202190 (20 μ M) oder DMSO bzw. DMEM als Kontrolle vorbehandelt. Danach wurden die Zellen mit dem humanen Influenza-A-Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) infiziert (MOI = 5) oder nicht-infiziert belassen und für 5 h mit SB-Inhibitor, DMSO oder DMEM nachinkubiert. Die Zellen wurden lysiert und anschließend die gesamte RNA isoliert, amplifiziert und für die Realtime-PCR genutzt. Für die Auswertung wurden die mRNA-Synthese der nicht-infizierten, aber mit SB, DMSO oder DMEM behandelten Zellen auf eins gesetzt und die jeweils dazu passenden infizierten Werte in Bezug gesetzt.

3.10. Die Inhibition des p38-Signalweges führt zu einer reduzierten Zytokin-/Chemokin-Expression

Nachdem belegt war, dass die Hemmung von p38 mit dem SB-Inhibitor zu einer reduzierten Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese führt, wurde nun die Proteinexpression dieser Zytokine bzw. Chemokine untersucht. Dafür wurden A549-Zellen welche mit SB202190 oder DMSO vor- und nachbehandelt waren, mit PR8 infiziert bzw. nicht-infiziert belassen. Nach 9 h wurden die Mediumüberstände gesammelt und für die Bestimmung der Zytokin-/Chemokin-Menge in einem BioRad-Suspensionsprotein-Array vorbereitet. Aus den Daten (Abbildung 24 A) ging eine erhöhte Zytokin-/Chemokin-Expression von IL-6, MCP-1, IP-10, MIP-1 β und IL-8 nach PR8-Infektion hervor, die durch die Anwendung des SB-Inhibitors entscheidend minimiert wurde. Durch die Anwendung des SB-Inhibitors erhielt man z.B. in PR8-infizierten Zellen eine ca. 6-fache Reduktion der Menge des Zytokins IL-6 im Mediumüberstand, verglichen mit der DMSO-Lösungsmittelkontrolle. Für die Chemokine MCP-1, IP-10, MIP-1 β erhielt man mit dem SB-Inhibitor eine ca. 2-fache und für IL-8 eine ungefähr 4-fache Reduktion. Für die Kontrolle der Wirkung des Inhibitors auf die Virus-Replikation wurde von den gleichen Mediumüberständen der Virustiter bestimmt (Abbildung 24 B). Die Titer des humanen Influenza-A-Virus PR8 wurde durch Einsatz des SB202190 verglichen zu der DMSO-Kontrolle wie zu erwarten um ca. 50% reduziert. Aus den Daten lässt sich schließen, dass die p38-Kinasekaskade umfassend die Zytokin-/Chemokin-Synthese nach Influenza-A-Virus-Infektion reguliert, was sich eventuell indirekt auf die Effizienz der Virus-Replikation und/oder den RNP-Export auswirken könnte.

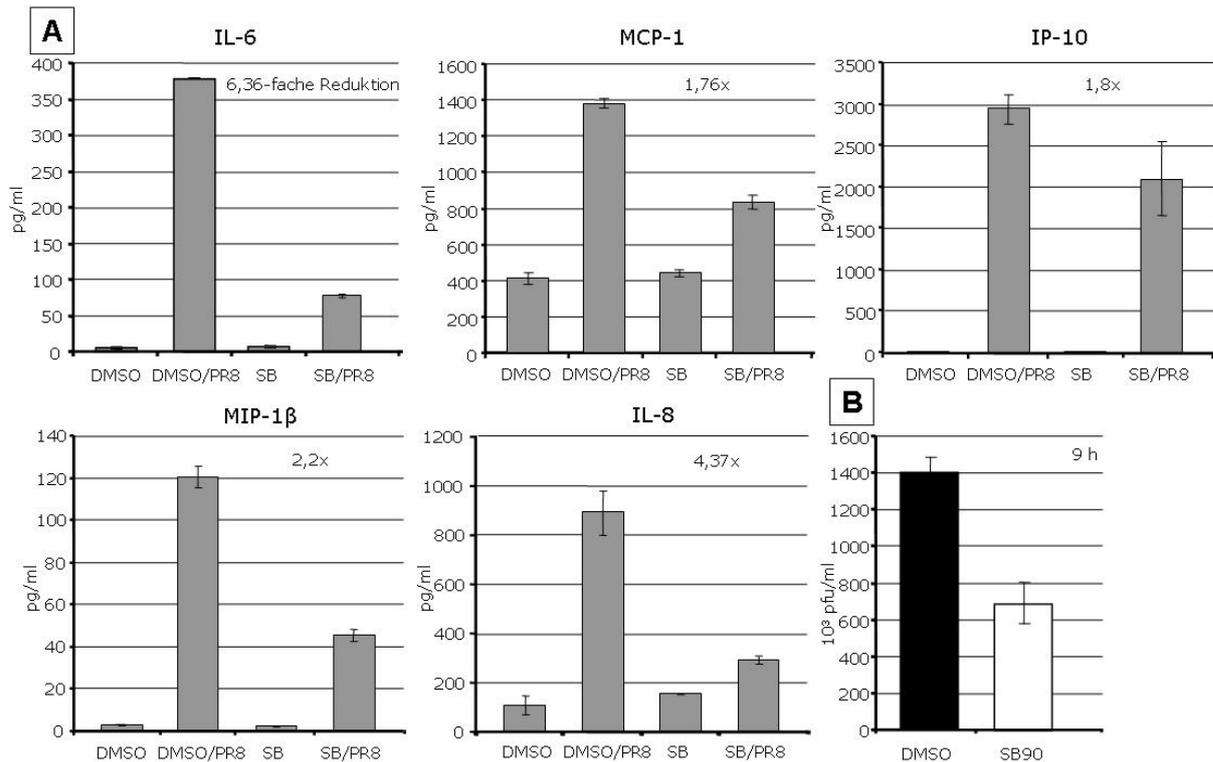


Abbildung 24: Inhibition des p38-Signalweges führt zu der Reduktion der Virus-induzierten Expression von IL-6, MCP-1, IP-10, MIP-1 β und IL-8

(A) BioRad-Suspensionsprotein-Array zur Überprüfung der Zytokin-/Chemokin-Expression

A549-Zellen wurden 30 Minuten mit dem Inhibitor SB202190 (20 μ M) oder DMSO als Kontrolle vorbehandelt, mit dem humanen Influenza-A-Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) infiziert (MOI = 3) oder nicht-infiziert belassen und für 9 h (18 h und 24 h nicht gezeigt) mit SB-Inhibitor oder DMSO nachinkubiert. Danach wurde der Mediumüberstand gesammelt und in einem BioRad-Suspensionsprotein-Array auf die Expression verschiedener Zytokine/Chemokine überprüft. Setzt man den Wert der nicht-infizierten Zellen willkürlich auf eins und bezieht den jeweiligen Wert aus infizierten Zellen darauf, ließ sich eine mit dem SB-Inhibitor erreichte x-fache Reduktion errechnen.

(B) Plaque-Assays zur Bestimmung der Virentiter

Nach 9 h wurde der gleiche Mediumüberstand für die Bestimmung des Virustiters in einen Plaque-Assay auf MDCK-Zellen verwendet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inhibition des Virus-induzierten MKK3/6-p38-Signalweges in einem erniedrigten Virustiter resultiert, wahrscheinlich durch die Retention der vRNA-Komplexe im Zellkern und/oder durch die erniedrigte Zytokin-/Chemokin Synthese und -Expression.

3.11. Die ERK5-Kaskade wird in verschiedenen Zell-Linien durch Influenza-A-Viren aktiviert

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Aktivierung und Funktion des ERK5-Signalweges in Influenza-Virus-infizierten Zellen untersucht. Es sollte hier also überprüft werden, ob die ERK5-Kaskade durch die Influenza-A-Virus-Infektion aktiviert wird und ob der Signalweg eine Rolle in der Virus-Replikation spielt.

3.11.1. Das aviäre Influenza-A-Virus FPV induziert die Aktivität von ERK5 in permissiven Wirtszellen

Der ERK5-Signalweg war bisher im Kontext einer Influenza-Virus-Infektion noch nicht untersucht. Um zu überprüfen, ob ERK5 bei einer Influenza-A-Virus-Infektion aktiviert wird, wurden A549- und MDCK-Zellen mit FPV infiziert und die Zell-Lysate für einen ERK5-Immunkomplex-Kinase-Assay verwendet (Abbildung 25). Die Kinase ERK5 wurde mit einem spezifischen Antikörper aus den Zell-Lysaten präzipitiert. Um die Aktivierung von ERK5 darzustellen, wurden unterschiedliche rekombinante Substrate eingesetzt. Das am besten charakterisierte, spezifische ERK5-Substrat ist der Transkriptionsfaktor MEF2-C (myocyte enhancer factor 2) (Kato et al. 1997), der direkt an ERK5 bindet (Yang et al. 1998). Für *in vitro* Untersuchungen kann auch das MBP (myelin basic protein) eingesetzt werden, von dem bereits gezeigt wurde, dass es ein gutes Substrat für ERK5 darstellt (Dinev et al. 2001). Die Intensität der MEF2-C- bzw. MBP-Phosphorylierung spiegelt in den *in vitro* Kinase-Assays dann die ERK5-Aktivität wider.

In verschiedenen Zell-Linien und bei Nutzung der unterschiedlichen Substrate MEF2-C oder MBP konnte man in den Kinetiken erkennen, dass das Influenza-A-Virus FPV die ERK5 biphasisch aktiviert (Abbildung 25). Die erste Aktivierungsphase fand ungefähr 15-30 Minuten nach der Infektion statt und die zweite Welle der Aktivierung folgte je nach Zell-Linie ab ca. 4 h nach Infektion und stieg dann stetig an. Bei primären HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) setzte die zweite Welle der Aktivierung schon nach einer Stunde ein. Die Influenza-A-Virus-Infektion induzierte also eine biphasische Aktivierung von ERK5, deren genauer Verlauf Zelltyp-abhängig zu sein schien. Dies ist eine Analogie zu der ebenfalls biphasischen Aktivierung der klassischen Raf/MEK/ERK-MAPK-Kaskade. Bei der biphasischen Aktivierung von ERK2 war die späte ERK2-Aktivierung funktionell entscheidend für den vRNP-Export, während die frühe Aktivierung, die wahrscheinlich durch

eine Rezeptor-Virusbindung vermittelt wird, funktionell noch nicht eingeordnet werden konnte (Pleschka et al. 2001). Diese unterschiedlichen Mechanismen könnten für die Aktivierung von ERK5 eventuell auch zutreffen.

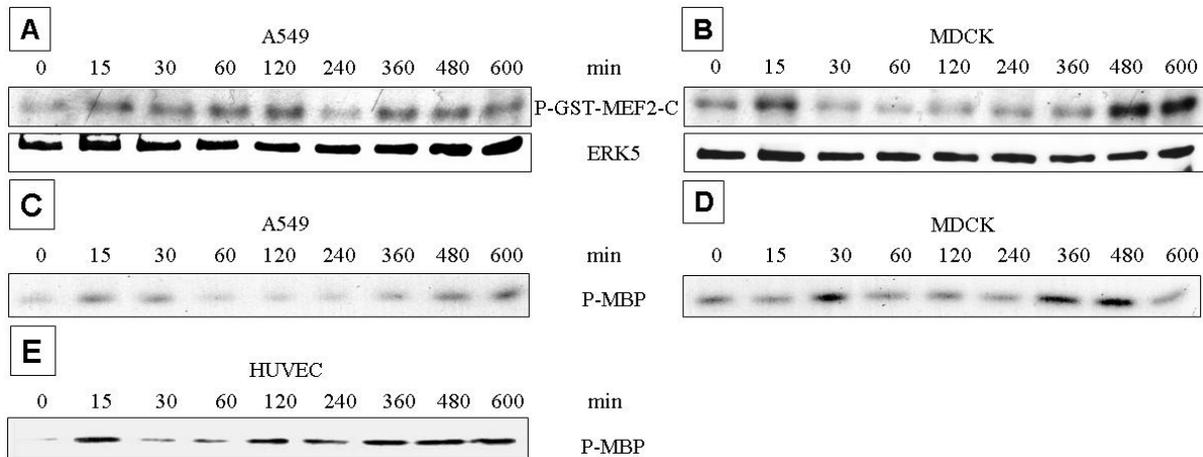


Abbildung 25: Influenza-A-Virus-Infektion aktiviert die ERK5-Kaskade in einer biphasischen Kinetik

(A - E) Kinase-Assays mit Lysaten aus verschiedenen Zellen-Linien

(A, C) A549-Zellen, (B, D) MDCK-Zellen und (E) HUVEC wurden mit A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) für 30 Minuten infiziert (MOI = 5). Anschließend wurden die Zellen mit Infektionsmedium versorgt. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert. Die Lysate wurden für einen ERK5-Immunkomplex-Kinase-Assay mit rekombinamtem GST-MEF2-C (A, B) oder MBP (C, D, E) als Substrat genutzt. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Phosphorylierung von GST-MEF2-C oder MBP durch ERK5 wurde mittels Autoradiographie detektiert. Ein Antiserum gegen ERK5 diente als Ladekontrolle.

3.12. ERK5-Aktivierung wird durch RNA induziert

Nachdem nun gezeigt war, dass die Infektion mit Influenza-A-Viren die ERK5-MAPK-Kaskade aktiviert, warf sich die Frage auf, welche virale Komponente für die Aktivierung verantwortlich ist. Wie bereits gezeigt, kann Akkumulation von vRNA verschiedene Signalwege aktivieren (Abbildung 12). Zunächst wurde daher die synthetische Verbindung Poly(IC) als Äquivalent eines RNA-Stimulus für Versuche zu der ERK5-Aktivierung eingesetzt. A549- und MDCK-Zellen wurden mit Poly(IC) stimuliert und anschließend lysiert. Die Kinase ERK5 wurde aus dem Lysat präzipitiert und für einen Immunkomplex-Kinase-Assay eingesetzt. Man konnte in beiden Zell-Linien eine biphasische Aktivierung durch Poly(IC) erkennen (Abbildung 26). Unabhängig von beiden Substraten für ERK5, wurde eine frühe ERK5-Aktivierung nach ungefähr 15 bis 30 Minuten und eine späte ERK5-Aktivierung nach ca. 4 h Stimulation detektiert. ERK5 phosphorylierte MEF2-C schon nach 15 Minuten Stimulation in A549- und MDCK-Zellen (Abbildung 26 A und B), während in den Experimenten mit MBP als Substrat in beiden Zell-Linien leicht verzögerte Aktivierungen zu erkennen waren (Abbildung 26 C und D). Die späte ERK5-Aktivierung

begann bei dem Substrat MEF2-C ebenfalls früher, z.B. bei A549-Zellen nach ungefähr 2 h und bei MDCK-Zellen nach ca. 30 Minuten (Abbildung 26 A und B), als bei dem Substrat MBP, das bei beiden Zell-Linien nach ca. 4 h aktiviert wurde (Abbildung 26 C und D). Die synthetische Doppelstrang-RNA führte zu einer biphasischen ERK5-Aktivierung, die je nach Eigenschaften der verwendeten Zelltypen und nach Einsatz des spezifischeren Substrates MEF2-C ein wenig variierte.

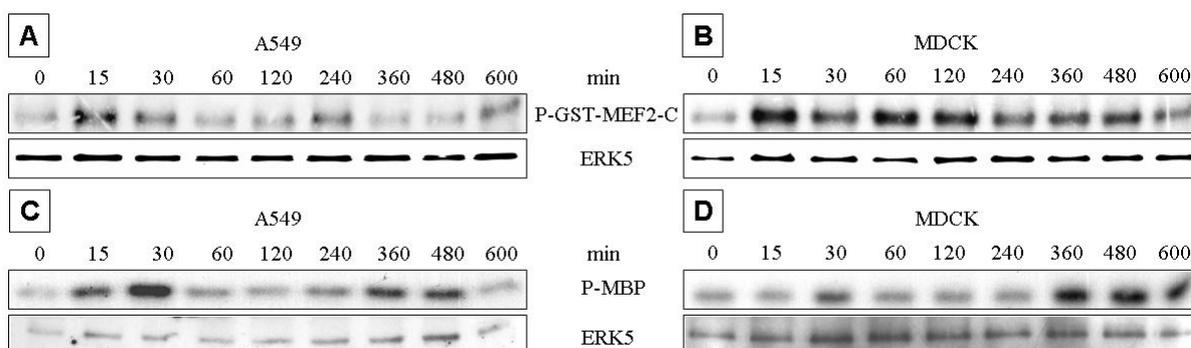


Abbildung 26: Synthetische Doppelstrang-RNA induziert eine frühe ERK5-Aktivierung nach 15 bis 30 Minuten Stimulation in A549- und MDCK-Zellen

(A - E) Kinase-Assays mit Lysaten aus verschiedenen Zellen-Linien

(A und C) A549- und (B und D) MDCK-Zellen wurden mit dem synthetischen dsRNA-Analogen Poly(IC) (100 µg/ml) stimuliert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Lysate für einen ERK5-Immunkomplex-Kinase-Assay verwendet. Um die Aktivität von ERK5 anzuzeigen, wurden die Substrate MEF2-C (A und B) sowie MBP (C und D) eingesetzt. Ein ERK5-Antiserum zeigte die äquivalente Proteinbeladung.

Eine weitere Möglichkeit, eine Rolle von RNA in der Aktivierung zu untersuchen, bietet die Infektion mit der Virusmutante Δ NS1, wie bereits dargelegt (s. Absatz 1.22.). Da die Δ NS1-Virusmutante nicht in der Lage ist, dsRNA-induzierte Effekte zu unterdrücken, sollte bei einer RNA-Stimulierbarkeit der Kinase analog der Befunde mit JNK und p38 nach Infektion mit der Mutante eine verstärkte Aktivierung von ERK5 im Vergleich zum Wildtyp erkennbar sein.

Mit Flag-ERK5 stabil, retroviral-transduzierte MDCK-Zellen wurden mit der Δ NS1-Virusmutante oder dem PR8-Isogen infiziert (Abbildung 27 A). Des Weiteren wurden diese Zellen für die Kontrolle einer starken Aktivierung der ERK5-Kaskade mit dem osmotischen Stress-Stimulus Sorbitol behandelt (Abe et al. 1996; Nicol et al. 2001; Sharma-Walia et al. 2005) bzw. nicht stimuliert belassen. Aus den Lysaten wurde Flag-ERK5 mit einem Flag-spezifischen monoklonalen Antikörper herauspräzipitiert und für einen Kinase-Assay eingesetzt. Die ERK5-Aktivität wurde durch die Phosphorylierung des zugefügten spezifischen MEF2-C-Substrates mit Hilfe von radioaktiv markiertem gamma-ATP deutlich und konnte durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Im Diagramm wurde die

Aktivitätsstärke der Kinase durch Quantifizierung der Substratphosphorylierung bestimmt (Abbildung 27 B). Dabei wurden die Werte der Aktivität aus nicht-infizierten Zellen willkürlich auf eins gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Die stärkste ERK5-Aktivität mit einer relativen Intensität der MEF2-C-Phosphorylierung von 2,5-fach, wurde nach Infektion mit der Δ NS1-Virusmutante gefunden. Dies übertraf noch den Wert des Kontrollstimulus Sorbitol mit einer relativen Intensität von 1,77. Mit den Ausgangslysaten wurde ebenfalls eine Kontrolle der Expression des Nukleoproteins und eine Kontrolle der Phosphorylierung von MKK3/6 durchgeführt (Abbildung 27 C), um die Anwendung gleicher Virusmengen und gleicher Infektiösität von Wildtyp und Mutante nachzuweisen. Im Gegensatz zu der ERK5-Aktivierung, konnte man bei der klassischen ERK1/2-Kaskade keine stärkere Aktivierung nach Δ NS1-Infektion erkennen, sondern eine fast identische ERK1/2-Aktivierung durch Infektion mit beiden Virustypen (Abbildung 27 D). Das Ausbleiben einer stärkeren ERK1/2-Aktivität bei der Δ NS1-Virusmutante war zu erwarten, da der klassische ERK1/2-Signalweg auch nicht durch das synthetische dsRNA-Analogon Poly(IC) stimuliert wurde (Marjuki et al. 2006). Dies lässt den Schluss zu, dass die MAPK ERK5 in ihrem viralen Aktivierungsprofil wohl eher zu der Gruppe der Stress-aktivierenden-Kinasen, wie p38 und JNK statt zu der mitogen aktivierten ERK1/2-Signalweg gehört. Es wurde bereits früher gezeigt, dass im Gegensatz zu der klassischen ERK1/2-Kaskade, die nur durch Virusstimulation aber nicht durch dsRNA, wie Poly(IC) (Marjuki et al. 2006) oder Δ NS1 (Abbildung 27 D) aktiviert wurde, der ERK5-Signalweg sowohl durch eine Influenza-A-Virus-Infektion, als auch durch Poly(IC) und Δ NS1 aktiviert wurde. Befund einer Virus-induzierten ERK5-Aktivierung zusammen mit der Tatsache, dass alle MAPK eine Rolle in der Virus-Replikation spielen, könnte ein Indiz dafür sein, dass ERK5 eine Funktion in der Virus-Vermehrung hat.

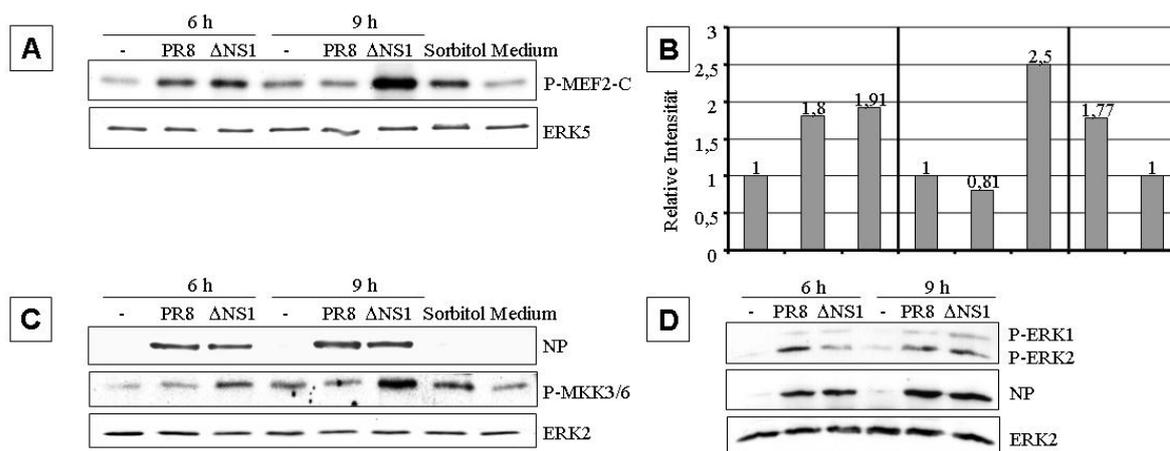


Abbildung 27: Infektion mit der Δ NS1-Virusmutanten induziert die Phosphorylierung von ERK5 aber nicht von ERK1/2

(A) Kinase-Assay mit Lysaten aus stabil transduzierten MDCK-Zellen

Mit einem Flag-ERK5-wt-Konstrukt retroviral-transduzierte, stabile MDCK-Zellen (97% GFP-positive Zellen) wurden mit der Δ NS1-Virusmutante und ihrem Isogen PR8 infiziert (MOI = 5) bzw. nicht-infiziert belassen. Die Zellen erhielten danach Infektionsmedium und wurden 6 h bzw. 9 h nach der Infektion lysiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit 0,4 M Sorbitol für 20 Minuten stimuliert oder nur auf ihrem üblichen Medium gehalten und lysiert. Aus den Lysaten wurde die Flag-ERK5 mit einem Flag-Antiserum präzipitiert und für die Kinasereaktion mit dem spezifischen Substrat MEF2-C eingesetzt. Die Intensität der MEF2-C-Phosphorylierung wurde mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Werte aus den Proben der nicht-infizierten Zellen wurden willkürlich auf eins gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. Ein pan-ERK5 Western-Blot belegte eine einheitliche ERK5-Beladung.

(B) Quantifizierung der Intensität der MEF2-C-Phosphorylierung

Die relative Intensität der MEF2-C-Phosphorylierung wurde im Diagramm quantifiziert. Die Werte nicht-infizierter Zellen bzw. nur mit Medium behandelte Zellen wurden auf eins gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen.

(C) Western-Blot mit Lysaten aus stabil transduzierten MDCK-Zellen

Die Lysate, aus denen ERK5 herauspräzipitiert wurde, konnten noch für weitere Western-Blots genutzt werden. Die Nukleoprotein-Kontrolle zeigte, dass sich sowohl Wildtyp- als auch Mutanten-Virus zu den angegebenen Zeitpunkten vergleichbar gut repliziert hatten und entsprechend auch für beide Virustypen die gleiche Menge für die Infektion eingesetzt wurde. Die Untersuchung der Phosphorylierung von MKK3/6 wurde als Kontrolle für Infektion und Aktivität mitgeführt. Die Auftragung äquivalenter Proteinmengen wurde mit einem ERK2-Antiserum bestätigt.

(D) Western-Blot mit Lysaten von MDCK-Zellen.

MDCK-Zellen wurden mit der Δ NS1-Virusmutante und ihrem Isogen PR8 infiziert (MOI = 5) bzw. nicht-infiziert belassen und später lysiert. Für die Detektion der Kinase-Aktivierung wurde ein phospho-spezifischer ERK1/2-Antikörper eingesetzt. Das Nukleoprotein zeigte, dass gleiche Virusmengen für die Infektion eingesetzt wurden und ERK2 zeigte die Proteinladungskontrolle.

Nachdem nun gezeigt war, dass alle vier MAPK-Familien (ERK1/2, JNK, p38 und ERK5) durch eine Infektion mit Influenza-A-Viren aktiviert werden und für ERK1/2, JNK und p38 eine Funktion in der Influenza-Virus-infizierten Zelle zugewiesen werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob die ERK5-Aktivierung ebenfalls funktionell in die Virus-Vermehrung involviert ist. Für die funktionelle Analyse von ERK5 kamen eine Reihe von retroviralen und transienten Expressionskonstrukten zum Einsatz. Das retrovirale Vektorsystem pEGZ wurde für die stabile Überexpression von Wildtyp ERK5 eingesetzt. Mit dem gleichen Vektorsystem wurde eine dominant negative Variante von ERK5 (pEGZ-ERK5-AEF) in Zellen, die eine Substitution in dem TEY-Phosphorylierungsmotiv besitzt (Threonin wurde zu einem Alanin (A) und das Tyrosin zu einem Phenylalanin (F) mutiert), verwendet. Diese Mutante kann

zwar an die Aktivatorkinase MEK5 binden, aber nicht mehr phosphoryliert werden. Damit wirkt die überexprimierte inaktive Kinase kompetitiv gegenüber dem endogenen Wildtyp. Die Expression einer ERK5-antisense-RNA in einem pEGZ-Konstrukt führte zu einer Reduktion der ERK5-Proteinexpression durch Blockierung der endogenen ERK5-mRNA. Für transiente Expression wurde das pCDNA3-flag Vektorsystem eingesetzt, welches für die Expression von Flag-getagtem ERK5-Wildtyp (pCDNA3-flag-ERK5-wt) sowie der ERK5-AEF-Mutanten (pCDNA3-flag-ERK5-AEF) verwendet wurde.

Zuerst wurde die Funktionalität der retroviralen Konstrukte überprüft. Dafür wurden MDCK-Zellen transient mit einem Konstrukt für ein Gal4-MEF2-C-Fusionsprotein sowie mit einem Gal4-responsiven-Reportergenkonstrukt, welches einen Promotorbereich mit fünf Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Gal4 enthielt, transfiziert. Dieses Gal4-Fusionssystem wird im Allgemeinen dazu verwendet, die Transaktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Kinasen unabhängig von ihrer eigenen DNA-Bindeaktivität zu messen. Hierzu wurde, mit den Leervektoren in parallelen Kontrollansätzen, eine konstitutiv-aktive MEK5-D-Variante ko-exprimiert. Durch die Aktivität der ERK5-Aktivatorkinase MEK5-D sollte ERK5 phosphoryliert und aktiviert werden. Das aktivierte ERK5 sollte dann in den Zellkern wandern und dort das Gal4-MEF2-C-Fusionsprotein phosphorylieren. Dieser

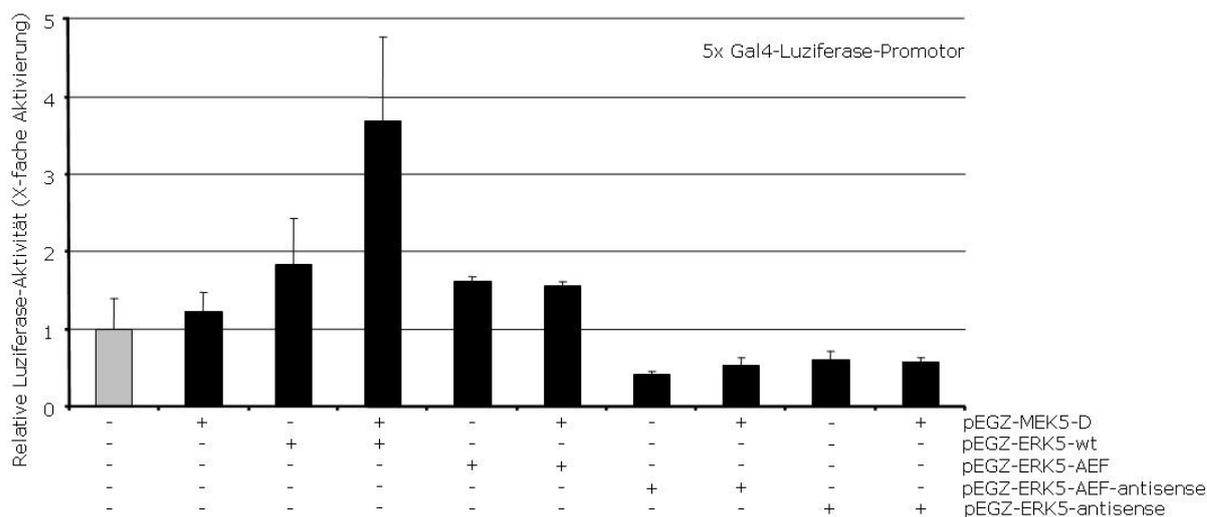


Abbildung 28: Analyse der Funktionalität von verschiedenen dn-Mutanten und antisense-Konstrukten

Luziferase-Assay mit Lysaten aus transient transfizierten MDCK-Zellen

MDCK-Zellen wurden transient mit einem Gal4-MEF2-C-Fusionskonstrukt und einem 5x Gal4-Luziferase-Promotor transfiziert. Zusätzlich wurde entweder der überexprimierte ERK5-Wildtyp; das dn-ERK5-AEF-Konstrukt; das antisense-Konstrukt oder der Leervektor transfiziert und jeweils alternativ noch das konstitutiv-aktive Konstrukt MEK5-D transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Lysate für den Luziferase-Assay eingesetzt. Die Aktivierung von MEF2-C unter den verschiedenen Bedingungen wurde durch die Luziferase-Expression von einem 5x Gal4-Luziferase-Promotor übermittelt.

Transkriptionsfaktor bindet dann an das 5x Gal4-luc-Reportergenkonstrukt und Luziferase wird gebildet, deren Aktivität im Luziferase-Assay gemessen werden kann. Die abgegebene Lichtintensität wurde 24 h nach der transienten Transfektion gemessen. Man konnte erkennen, dass alle von den retroviralen Vektoren exprimierten Proteine, Mutanten und die antisense-RNA die gewünschte Funktionalität aufwiesen (Abbildung 28). Die basale MEF2-C-Aktivierung in Vektorproben, wurde durch die konstitutiv-aktive MEK5-D-Aktivierung nur ein wenig erhöht, vermutlich aufgrund limitierter Mengen endogener ERK5. Die höchste MEF2-C-Aktivierung wurde daher auch bei der kombinierten MEK5-D und dem überexprimierten ERK5-wt erzielt. Die AEF-Mutante zeigte zwar eine basale MEF2-C-Aktivierung, welche aber durch die MEK5-D-Aktivität nicht mehr gesteigert werden konnte. In Anwesenheit von antisense-RNA zeigte sich eine reduzierte MEF2-C-Aktivität. Diese retroviralen Konstrukte wurden nun zum Erstellen von stabilen Zell-Linien eingesetzt. Die Konstrukte pEGZ-ERK5-antisense und der pEGZ-Leervektor wurde über das retrovirale System (vgl. Abschnitt 2.2.2.5) in A549- und MDCK-Zellen transduziert. Im FACS wurde die Expression des GFP-Proteins als Marker für die Gentransfereffizienz ermittelt. Den FACS-Daten war zu entnehmen, dass die Transduktion für das ERK5-antisense-Konstrukt zu ca. 97% und des pEGZ-Leervektors zu ca. 99% erfolgreich war (Abbildung 29).

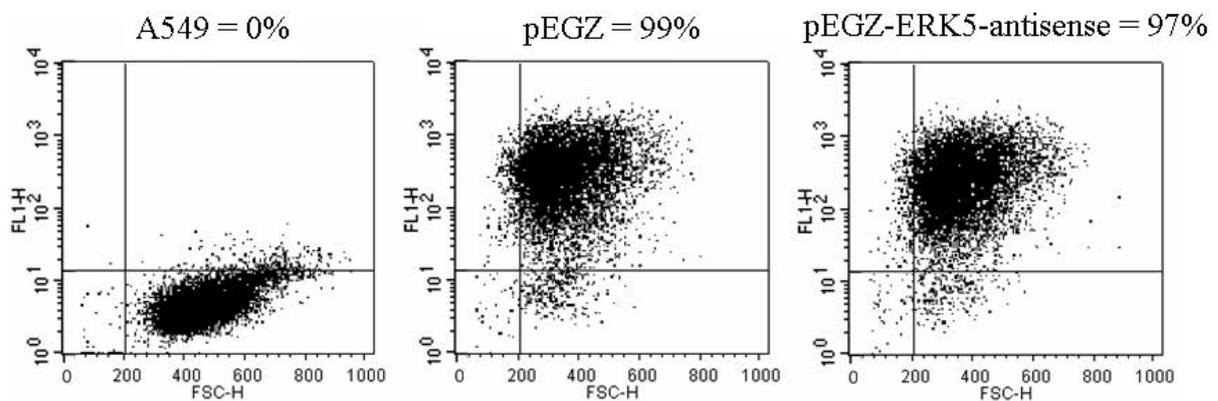


Abbildung 29: Transduktionseffizienz der mit dem Leervektor (99%) und dem ERK5-antisense-Konstrukt (97%) retroviral-transduzierten A549-Zellen

FACS-Messung zur Bestimmung der Transduktionseffizienz

Die Plasmide pEGZ und pEGZ-ERK5-antisense wurden transient in Phoenixzellen transfiziert. Nach 24 h wurde der virushaltige Mediumüberstand der Phoenixzellen für den retroviralen Gentransfer auf die A549-Zielzellen gegeben. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt. Am dritten Tag wurde die Gentransfereffizienz anhand der GFP-Expression mittels FACS-Messung ermittelt.

3.13. Die Reduktion der ERK5-Proteinexpression hat keinen Einfluss auf die Virus-Replikation

3.13.1. Reduktion der ERK5-Proteinexpression durch das ERK5-antisense-Konstrukt, hat keinen Effekt auf die Virus-Replikation in stabil-transduzierten A549-Zellen

Die entsprechend stabil, retroviral-transduzierten A549-Zellen mit dem Leervektor pEGZ und dem pEGZ-ERK5-antisense-Konstrukt sowie die nicht-transduzierten A549-Ausgangszellen wurden im Western-Blot auf ERK5-Proteinexpression überprüft (Abbildung 30 A). Bei dem pEGZ-ERK5-antisense-Konstrukt war, verglichen mit den Kontrollen, eine leichte Reduktion der ERK5-Proteinexpression zu erkennen. Da ERK5 auch eine wichtige Rolle in der Zellproliferation spielt (Kato et al. 1998; Hayashi et al. 2001; Mulloy et al. 2003) und bereits gezeigt wurde, dass die Blockade der ERK5-Expression durch das pEGZ-ERK5-antisense-Konstrukt zu einer Hemmung der Muskeldifferenzierung in murinen Myoblasten (C₂C₁₂-Zellen) führte (Dinev et al. 2001), wurden die Zell-Linien täglich gezählt und das Wachstum der Zellen miteinander verglichen (Abbildung 30 C).

Es stellte sich heraus, dass die Zellen, welche das ERK5-antisense-Konstrukt trugen, wesentlich langsamer proliferieren als Vektor-tragende oder unbehandelte Kontrollzellen. Nachdem bis zum dritten Tag alle Zell-Linien noch eine vergleichbare Wachstumsgeschwindigkeit zeigten, stagnierte am vierten Tag das Wachstum der ERK5-antisense-A549-Zellen. Durch die reduzierte ERK5-Proteinexpression scheint also die Zellproliferation inhibiert zu sein. Zusätzlich unterschieden sich die Zell-Linien in der Morphologie (Abbildung 30 B). Die ERK5-antisense-Zellen waren sehr schmal und spindelförmig, im Gegensatz zu den breiten, schneller wachsenden Kontrollzellen. Diese Zellen und die entsprechenden Leervektor-transduzierten-Zellen wurden dann für eine Influenza-A-Virus-Infektion mit FPV genutzt und die Titer der Nachkommenviren bestimmt. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die reduzierte ERK5-Expression unter den gewählten experimentellen Bedingungen keinen wesentlichen Effekt auf die Virus-Replikation hatte (Abbildung 30 D).

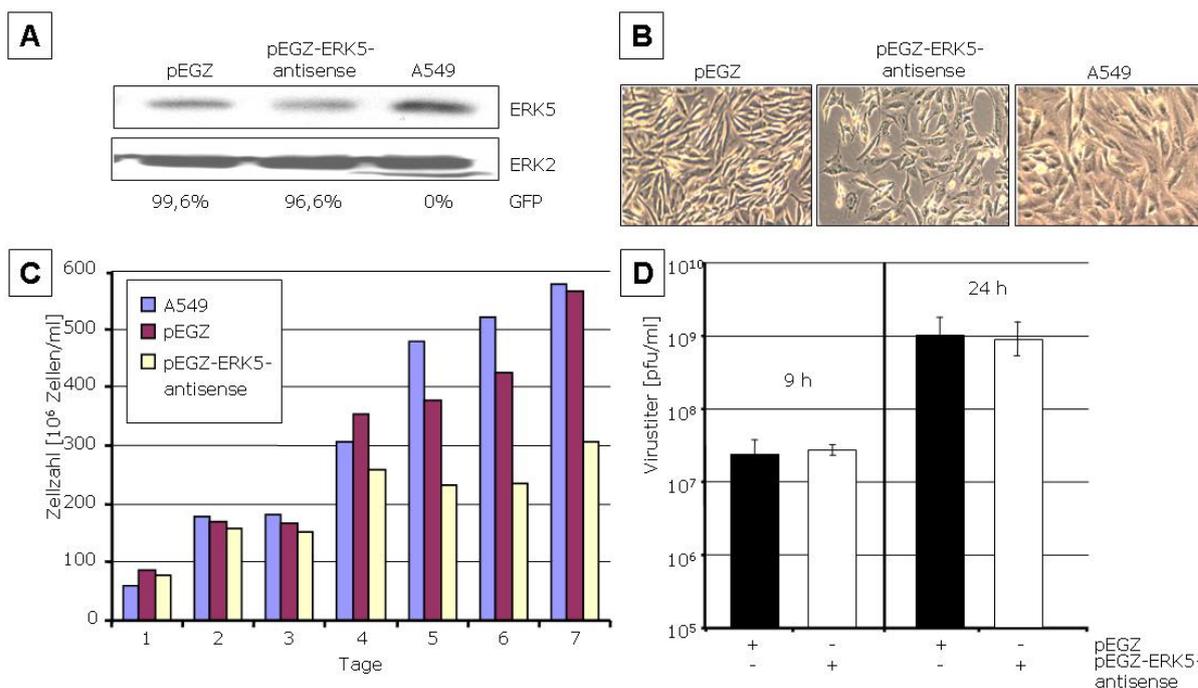


Abbildung 30: Reduzierte ERK5-Expression hat keinen Effekt auf die Influenza-A-Virus-Replikation

(A) Western-Blot mit Lysaten von A549-Zellen

A549-Zellen wurden stabil-retroviral mit dem pEGZ-Leervektor, oder mit dem pEGZ-ERK5-antisense-Konstrukt transduziert. Als weitere Kontrolle wurden nicht transduzierte Zellen verwendet. Die Transduktionseffizienz ist in % der GFP-positiven Zellen angegeben. Ein ERK5-Antiserum zeigte die ERK5-Expression an und das ERK2-Antiserum belegte die äquivalente Proteinbeladung.

(B) Mikroskopische Bilder von A549-Zellen

Von den im Western-Blot getesteten Zell-Linien wurden gleiche Zellzahlen ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Morphologie der retroviral-transduzierten A549-Zellen mit den nicht-transduzierten A549-Zellen verglichen.

(C) Wachstumsverhalten von A549-Zellen

Zellen mit dem pEGZ-ERK5-antisense-Konstrukt, dem Leervektor und A549-Zellen wurden auf ihr Wachstumsverhalten überprüft. Von den verschiedenen Zell-Linien wurde die gleiche Zellzahl ausgesät. Dann wurden die Zellen jeden Tag gezählt und die Zellzahl der verschiedenen Zell-Linien miteinander verglichen. Dieser Versuch wurde mehrmals durchgeführt und führte zum selben Ergebnis.

(D) Plaque-Assays zur Bestimmung der Virentiter

Die entsprechend retroviral-transduzierten Zellen wurden mit A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) infiziert (MOI = 0,0025) und mit Infektionsmedium versorgt. Nach 9 h und 24 h wurde der virushaltige Mediumüberstand für einen Standard Plaque-Assay auf MDCK-Zellen eingesetzt.

3.13.2. Eine starke Reduktion der ERK5-Expression, durch vektorbasierte Expression von ERK5 shRNA, hat keinen Effekt auf die Virus-Replikation in stabil-transduzierten A549-Zellen

Um die ERK5-Expression möglichst effizient zu reduzieren, wurden mit dem ERK5-antisense-Konstrukt retroviral Zellen transduziert und subkloniert. Dabei stellte sich heraus, dass jeder einzelne Klon eine unterschiedlich starke ERK5-Expression zeigte, welche aber nach kürzester Zeit (ungefähr nach einer Woche) wieder das normale Level der ERK5-Expression aufwies. Die Zellen, die positiv mit dem ERK5-antisense-Konstrukt retroviral-transduziert waren, konnten die Antisense-Wirkung also nach kürzester Zeit gegenregulieren. Daher wurden verschiedene „Small Hairpin“ (sh) shRNA-Konstrukte erstellt, um die ERK5-

Expression über diesen alternativen Weg eventuell effizienter auszuschalten. Im Gegensatz zu den synthetischen RNAi-Molekülen (siRNA) die nur eine begrenzte Halbwertszeit besitzen, können die Vektor-exprimierten RNAi-Moleküle (shRNA) beständig shRNA produzieren und kontinuierlich die Expression des Zielproteins verhindern (Taxman et al. 2006). Für diesen shRNA-Ansatz wurde der Vektor pSuperRetro-GFP/Neo (Abbildung 31) verwendet.

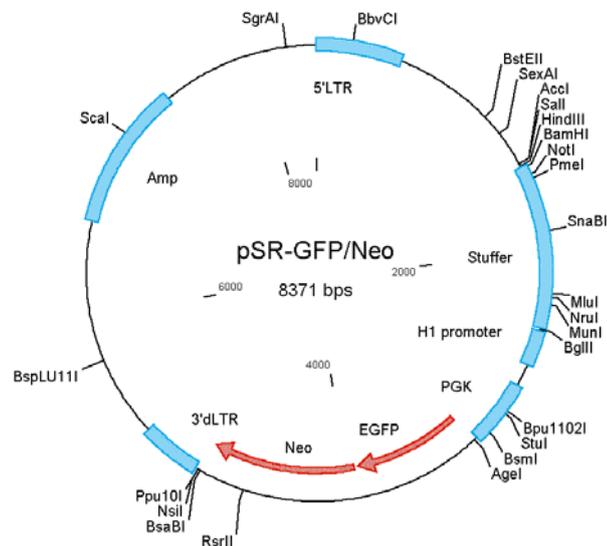


Abbildung 31: Das pSR-GFP/Neo-Vektor basierende shRNA-System wird für die Inhibition der ERK5-Expression verwendet

Klonierung von shRNA-Sequenzen in den Vektor pSR-GFP/Neo

Die shRNA-Sequenz wurde über Schnittstellen in den Vektor pSuperRetro-GFP/Neo (Oligoengine) eingefügt. Das so hergestellte Plasmid wurde transient in Phoenixzellen transfiziert. Der virushaltige Mediumüberstand wurde für die Transduktion neuer A549-Zellen verwendet. Die Transduktionseffizienz wurde im FACS überprüft. Die Zellen mit dem Leervektor pSR und mit dem pSR-shRNA-ERK5-Konstrukt bzw. ein weiteres Konstrukt waren alle zu 88% GFP-positiv. An den Zellpools der shRNA-Konstrukt-tragenen Zellen wurde dann eine Einzelzellklonierung vorgenommen.

Nach Transfektion der Plasmide in Phoenixzellen, wurde der virushaltige Mediumüberstand gesammelt und damit wieder A549-Zellen retroviral-transduziert. Die Transduktionseffizienz betrug ca. 88%, sowohl für die Zellen, die den Leervektor pSR trugen, als auch die Zellen, die positiv für das pSR-shRNA-ERK5-Konstrukt waren. Allerdings zeigte sich, dass die ERK5-Expression in den shRNA positiven Zellpopulationen nicht wesentlich effizienter reduziert wurden, als durch das ERK5-antisense-Konstrukt. Daher wurde an diesen shRNA positiven Zellen ebenfalls eine Einzelzellklonierung vorgenommen. Die einzelnen Klone zeigten wiederum alle eine unterschiedliche effiziente Reduktion in der ERK5-Expression, wie zuvor nach Expression der ERK5-antisense-RNA beobachtet. Im Western-Blot (Abbildung 32 A) zeigten allerdings zwei Klone, welche zu ca. 95-98% GFP-positiv waren eine zufrieden stellend starke Reduktion der ERK5-Proteinmenge verglichen zu den Leervektor-tragenden Zellen, die zu ca. 97% GFP-positiv waren und den unbehandelten A549-Ausgangszellen. Um eine Gegenregulation der shRNA-Wirkung zu verhindern, wurden bereits 24 h nach der

Transduktion die Zellen mit FPV infiziert. Die Zellen wurden mit einer sehr niedrigen MOI des Influenza-A-Virus FPV infiziert, damit mehrere Replikationszyklen durchlaufen und damit auch geringere Änderungen im Virustiter, welche sich erst durch Amplifikation manifestieren, erkannt werden können (Abbildung 32 B). Es stellte sich aber wieder heraus, dass die shRNA-vermittelte Reduktion der ERK5-Expression selbst nach 48 h keinen Effekt auf die Virus-Replikation in stabil-retroviral-transduzierten A549-Zellen hatte, verglichen mit den Leervektorzellen oder den nicht-transduzierten Zellen.

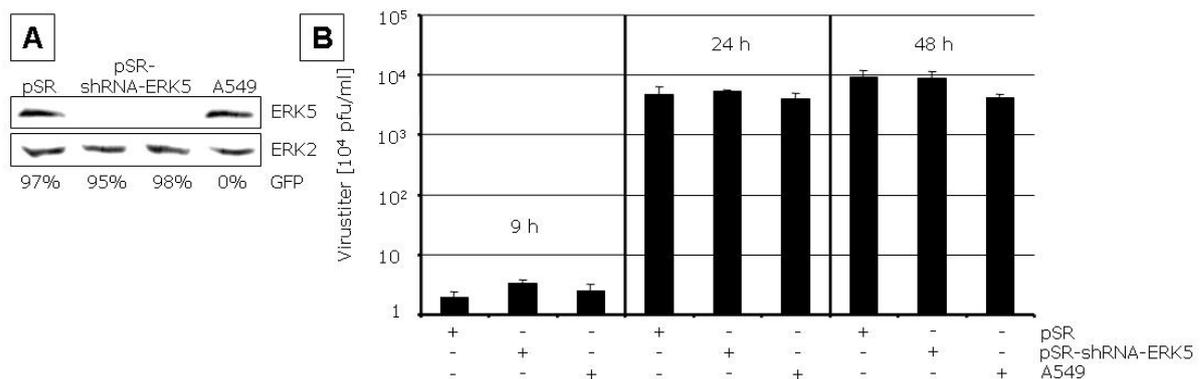


Abbildung 32: shRNA vermittelte Reduktion der ERK5-Expression hat keinen Einfluss auf die Influenza-A-Virus-Vermehrung

Die zu 88% GFP-positiv transduzierten A549-Zellen mit dem shRNA-Konstrukt wurden einer Einzelzellklonierung unterworfen. Dafür wurden die Zellen zwei Wochen zuvor dünn ausgesät (1000 Zellen/10 cm Platte). Einzelne Zellkolonien wurden mit steriler, in Whatmanpapier getränkter 0,025% Trypsinlösung, aus dem Zellgemisch herausgelöst und jede Zellkolonie separat kultiviert. Dabei wurden zwei Klone gefunden, deren ERK5-Expression mit dem Leervektor oder den A549-Zellen verglichen wurde

(A) Western-Blot mit Lysaten von A549-Zellen

Vergleich der ERK5-Expression verschiedener Zellkolonien mit den Ausgangszellen bzw. Leervektor exprimierenden Zellen. Ein ERK5-Antiserum zeigte die ERK5-Expression an und das ERK2-Antiserum belegte die äquivalente Proteinbeladung.

(B) Plaque-Assays zur Bestimmung der Virentiter

Diese Zellen wurden noch am gleichen Tag mit A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) infiziert (MOI = 0,0025) und mit Infektionsmedium versorgt. Der virushaltige Mediumüberstand wurde nach 9 h, 24 h und 48 h entnommen und für die Bestimmung des Virustiters für den Plaque-Assay auf MDCK-Zellen eingesetzt.

3.14. ERK5-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Virus-Replikation

Nachdem eine Deletion von ERK5-Expression keinerlei Einfluss auf den Virustiter hatte, wurde nun überprüft, ob eine veränderte Aktivierung der ERK5-Expression für die Virus-Replikation eine Rolle spielt. Dafür wurden A549-Zellen stabil mit dem Leervektor, einem ERK5-wt- und ERK5-AEF-Konstrukt retroviral-transduziert. Die Transduktionseffizienz, gemessen an der Anzahl GFP-positiver Zellen wurde im FACS ermittelt und betrug für alle Linien etwa 97-98% (Abbildung 33).

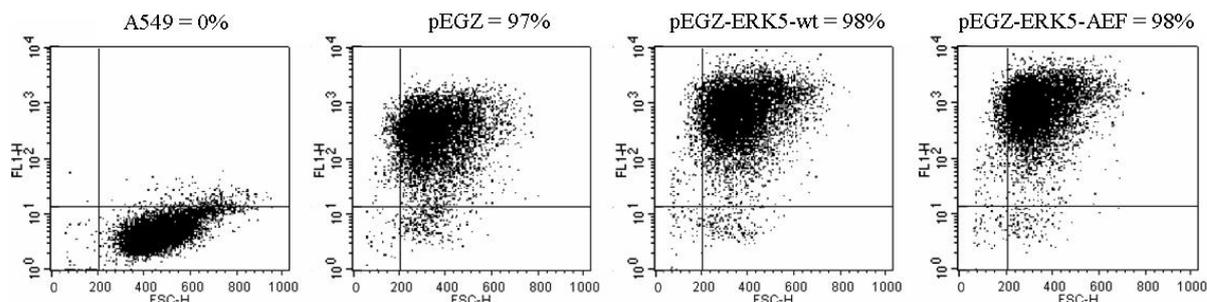


Abbildung 33: Effizienz der mit dem Leervektor, dem ERK5-wt- und dem ERK5-AEF-Konstrukt stabil-retroviral-transduzierten A549-Zellen

FACS-Messung zur Bestimmung der Transduktionseffizienz

Nachdem Phoenixzellen mit den retroviralen Konstrukten pEGZ, pEGZ-ERK5-wt und pEGZ-ERK5-AEF transient transfiziert wurden, konnte der virushaltige Mediumüberstand für die Transduktion der A549-Zellen eingesetzt werden. Nach zweimaliger Transduktion der A549-Zellen wurde anhand der Grünfluoreszenz des von dem Vektor koexprimierten GFP im FACS die Transduktionseffizienz ermittelt.

Diese Zell-Linien wurden als weitere Kontrolle im Western-Blot auf Expression der Transgene überprüft (Abbildung 34 A). Es konnte eine starke Überexpression des ERK5-Wildtyp in den Zellen detektiert werden. Im Vergleich dazu, exprimierten die Vektorzellen nur das endogene ERK5. Die ERK5-AEF positiven Zellen zeigten ebenfalls eine höhere ERK5-Expression, als die Leervektorkontrolle. Nachdem damit die Expression der ERK5-Transgene bestätigt wurde, wurden diese Zellen mit dem Influenza-A-Virus FPV infiziert (Abbildung 34 B). Der nach 9 h, 24 h und 48 h entnommene virushaltige Mediumüberstand zeigte abermals keine Unterschiede in Bezug auf die Virustiter. Überexprimiertes ERK5-wt oder Expression einer ERK5-AEF-Mutanten, hatte also zu keinem untersuchten Zeitpunkt einen signifikanten Effekt auf die Virus-Replikation in stabil-transduzierten A549-Zellen.

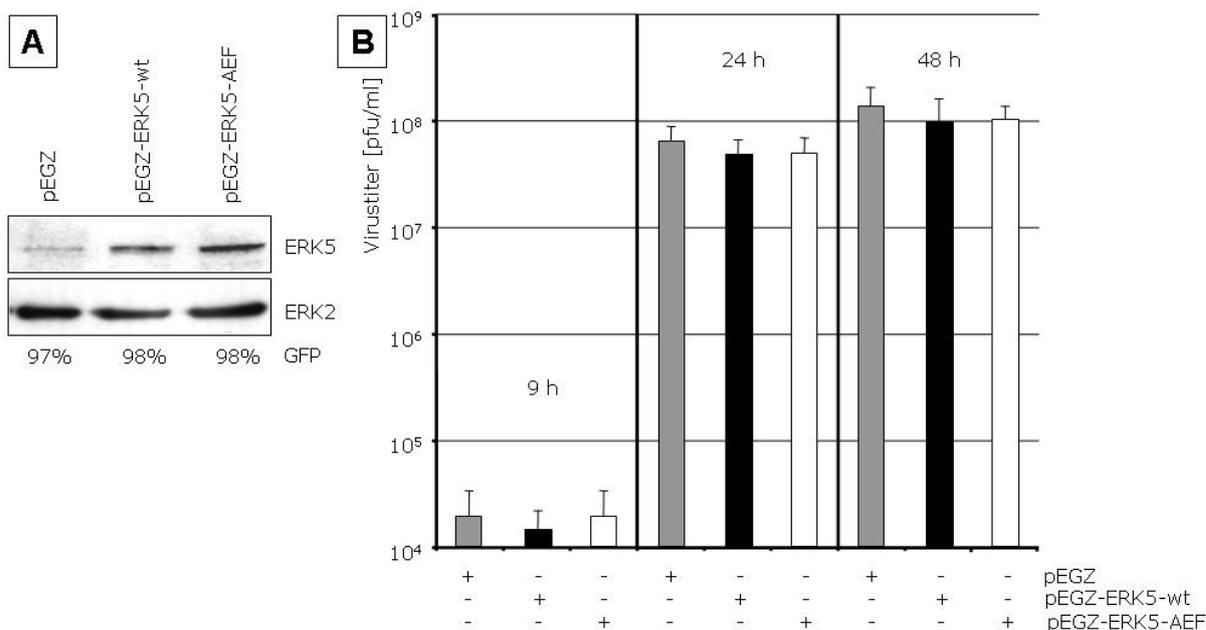


Abbildung 34: Überexpression von ERK5 in infizierten Zellen führt nicht zu einer Änderung der Virus-titer

(A) Western-Blot mit Lysaten von A549-Zellen

Stabil, retroviral-transduzierte A549-Zell-Linien wurden lysiert und zuerst im Western-Blot auf ERK5-Expression mit einem ERK5-Antiserum getestet. Ein Western-Blot mit einem ERK2-Antiserum zeigte die einheitliche Proteinbeladung.

(B) Plaque-Assays zur Bestimmung der Virentiter

Die verschiedenen Zellen wurden mit dem Influenza-A-Virus A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) infiziert (MOI = 0,0025). Der nach 9 h, 24 h und 48 h entnommene, Influenza-virushaltige Mediumüberstand wurde für einen Plaque-Assay auf MDCK-Zellen verwendet.

3.15. Selektive Hyperaktivierung von ERK5 hat keinen Einfluss auf die Virus-Replikation

Um ERK5 selektiv zu aktivieren wurde konstitutiv-aktives MEK5-D überexprimiert. Bei diesen Mutanten wurden die bei Aktivierung phosphorylierten Aminosäuren Serin und Threonin gegen Asparaginsäure ausgetauscht, was eine negative Ladung an diesen Positionen einführt und zu einer konstitutiv-aktiven MEK5-D-Variante führte. Da die MEK5-D sehr spezifisch nur die ERK5 phosphoryliert und dadurch aktiviert (English et al. 1995; Kato et al. 1997), müsste die kombinierte Expression mit dem ERK5-wt zu einer extrem starken selektiven Aktivierung der ERK5-Kaskade führen. Daher wurden A549-Zellen mit dem Leervektor (pEGZ), den Plasmiden für ERK5-wt oder MEK5-D oder mit beiden Plasmiden ERK5-wt und MEK5-D, stabil retroviral-transduziert (Abbildung 35). Die Vektor-transduzierten-Zellen waren zu ungefähr 96%, ERK5-wt-Zellen zu ca. 94%, MEK5-D-Zellen zu ca. 90% und die mit MEK5-D und ERK5-wt transduzierten Zellen zu ca. 87% GFP-positiv.

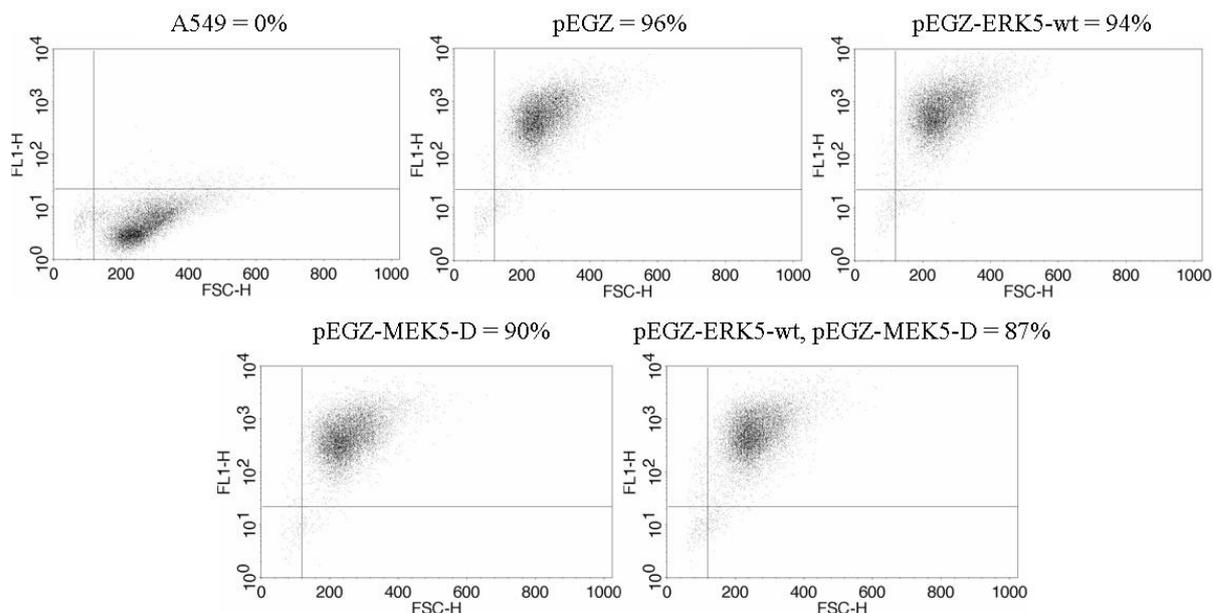


Abbildung 35: Überprüfung der stabil-retroviral-transduzierten A549-Zellen zeigt für den Vektor und die Plasmide ERK5-wt, MEK5-D und für die Kombination letzterer eine hohe Transduktionseffizienz

FACS-Messung zur Bestimmung der Transduktionseffizienz

Phoenixzellen wurden transient mit den retroviralen Plasmiden transfiziert. Mit dem virushaltigen Mediumüberstand der Phoenixzellen wurden A549-Zellen an zwei aufeinander folgenden Tagen retroviral-transduziert. Am dritten Tag wurde durch eine FACS-Messung die Expression des von den Plasmiden als Marker exprimierten GFP und damit die Transduktionseffizienz bestimmt.

Die mit unterschiedlichen Plasmiden transduzierten Zellen wurden nun auf ihre ERK5-Expression im Western-Blot getestet (Abbildung 36 A). In Leervektor tragenden A549-Zellen war endogenes ERK5 detektierbar, wobei die oberste, schwache Bande vermutlich basal phosphoryliertes ERK5 darstellt. Die darunter liegende Bande spiegelte die Expression des nicht phosphorylierten ERK5 wieder. Die darunter folgende Banden, die sowohl bei Zellen welche mit anderen Konstrukten transduziert waren, als auch bei den Wildtyp A549-Zellen zu beobachten waren, zeigten vermutlich ERK5-Spleißvarianten oder ERK5-Abbauprodukte. In ERK5-wt-überexprimierenden Zellen waren drei starke Banden zu detektieren, welche in den Versuchen zuvor, wegen einer anderen Gelaufftrennung, nicht beobachtet wurden. In den Zellen, welche konstitutiv-aktives MEK5-D trugen, zeigte sich im Unterschied zu nicht aktiviertem ERK5, die aktivierte, phosphorylierte ERK5-Variante in Form einer stärkeren, im Gel retardierten Bande. Die Zellen, welche sowohl MEK5-D als auch ERK5-wt exprimierten zeigten sowohl die stärkste ERK5-Expression als auch die stärkste ERK5-Aktivierung, was in Form der sehr starken Gel-retardierten Bande deutlich wurde. Dabei wurde sowohl das endogene, als auch das überexprimierte ERK5 durch das konstitutiv-aktive MEK5-D aktiviert. Ein spezifischer Antikörper gegen das HA-Epitop, des exogenen HA-MEK5-D-Proteins, veranschaulichte die MEK5-D-Expression in den Zell-Lysaten. Beim Passagieren

der Zellen zeigte sich, dass MEK5-D-positive-Zellen wesentlich langsamer wachsen, als die ERK5-wt-positiven-Zellen oder die kombinierte Expression beider Proteine.

Nachdem die ERK5-Expression in den verschiedenen Zellpopulationen festgestellt wurde, wurde nun die Funktionalität der Transgene in einem ERK5 Immunkomplex-Kinase-Assay überprüft (Abbildung 36 B). Aus den verschiedenen Zell-Lysaten wurde ERK5 mit einem Antiserum präzipitiert und für eine Kinasereaktion mit dem spezifischen ERK5-Substrat, MEF2-C eingesetzt. Als Äquivalent der ERK5-Aktivität in den Zellen wurde die Stärke der MEF2-C-Phosphorylierung gemessen. Die verschiedenen stabilen Zell-Linien wiesen die erwartete ERK5-Aktivität auf. Die Zellen, welche die Kombination von ERK5-wt und MEK5-D überexprimierten zeigten die stärkste MEF2-C-Phosphorylierung bzw. ERK5-Aktivität. Anscheinend reichten schon geringe Mengen von MEK5-D in den Zellen aus, um eine extrem starke ERK5-Aktivität zu induzieren. Auch die Zellen, welche das MEK5-D alleine exprimierten zeigten eine starke MEF2-C-Phosphorylierung. Dadurch wurde klar, dass die konstitutiv-aktive MEK5-D ein sehr starker ERK5-Aktivator ist.

Im Gegensatz zu dem ERK5-Western-Blot (Abbildung 36 A) wurden nach der Immunpräzipitation (IP), nur zwei der ursprünglichen drei nachgewiesenen Banden der A549-Zell-Lysate, der Vektorzellen oder der Zellen mit dem MEK5-D-Konstrukt im Western-Blot detektiert. Daher ist davon auszugehen, dass die dritte Bande im ERK5-Western-Blot entweder ein Abbauprodukt von ERK5 oder eine unspezifische Bande darstellt.

In den Versuchen wurde das ERK5-wt-Konstrukt γ verwendet. Es existieren aber zwei weitere ERK5-Spleißvarianten α und β . Dabei hat α ein Molekulargewicht von 105 kDa während β sowie γ ein Molekulargewicht von 90 kDa besitzen. Die beobachteten Banden könnten somit von Spleißvarianten oder eventuell deren phosphorylierten Formen herrühren. 24 h nachdem die A549-Zellen retroviral-transduziert wurden, folgte die Infektion mit FPV. Allerdings hatten die nach 9 h, 24 h und 48 h entnommenen virushaltigen Mediumüberstände der verschiedenen Zell-Linien einen fast einheitlichen Virustiter (Abbildung 36 C). Dies zeigte ein weiteres Mal, dass die ERK5-Kaskade keine Rolle in der Virus-Replikation zu spielen scheint.

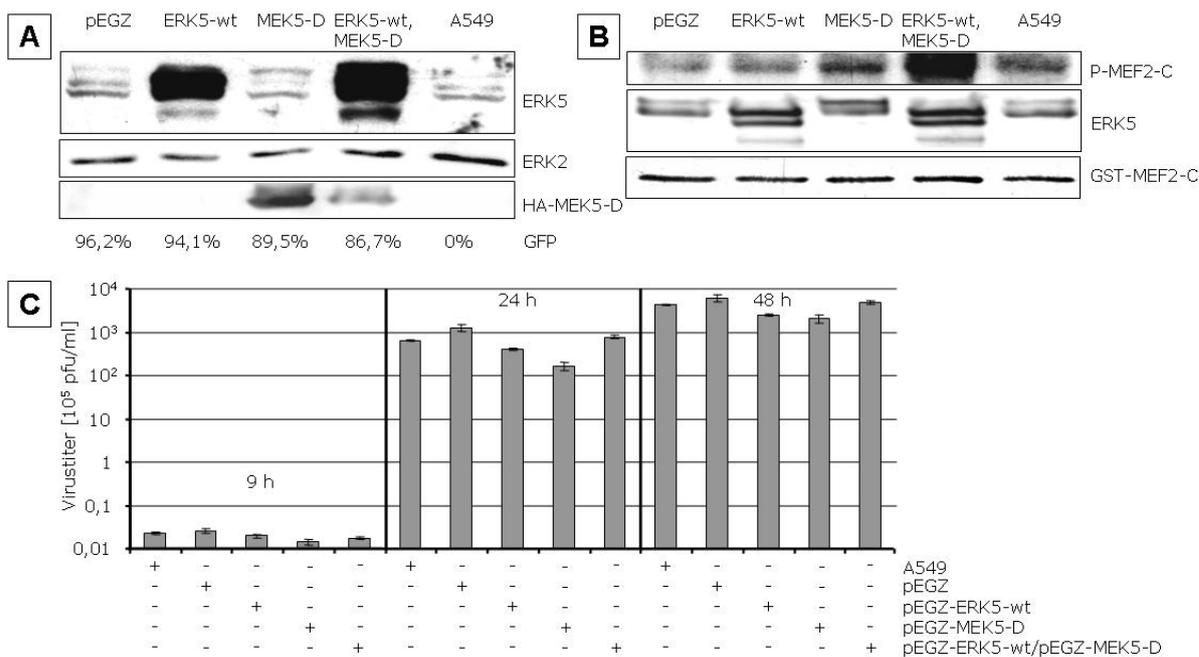


Abbildung 36: Selektive Hyperaktivierung des ERK5-Signalwegs beeinträchtigt nicht die Virus-Replikation

(A) Western-Blot mit Lysaten von stabil-transduzierten A549-Zellen

Die Zell-Lysate der verschiedenen stabil-retroviral-transduzierten A549-Zellen (Vektor, ERK5-wt, MEK5-D oder ERK5-wt + MEK5-D) wurden im Western-Blot auf ihre ERK5-Expression getestet. Ein ERK2-Antiserum belegte die äquivalente Proteinbeladung. Der HA-Antikörper detektierte das HA-MEK5-D.

(B) Kinase-Assay mit Lysaten von stabil-transduzierten A549-Zellen

Nachdem die ERK5-Expression überprüft wurde, wurde nun auch die Funktionalität der Transgene in einem ERK5-Immunkomplex-Kinase-Assay getestet. Mit einem ERK5-Antiserum wurde die Kinase aus den verschiedenen Zell-Lysaten präzipitiert und für den Kinase-Assay mit dem spezifischen ERK5-Substrat MEF2-C eingesetzt. Ein ERK5-Western-Blot zeigte die präzipitierten ERK5-Mengen der verschiedenen transduzierten Zellen. Ein Western-Blot mit einem Antiserum gegen das GST-Epitop belegte, dass gleiche Substratmengen von MEF2-C im Kinase-Assay verwendet wurden.

(C) Plaque-Assays zur Bestimmung der Virentiter

Die nach 24 h retroviral-transduzierten Zell-Linien wurden mit FPV A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) infiziert (MOI = 0,0025) und dann mit Infektionsmedium versorgt. Nach 9 h, 24 h und 48 h wurden Mediumüberstände entnommen und die Virentiter bestimmt.

3.16. ERK5 hat keinen Einfluss auf die Virus-Replikation in MDCK-Zellen oder HUVEC

3.16.1. Die ERK5-Überexpression hat keinen Einfluss auf den Virustiter in stabil-transduzierten HUVEC

Um sicher zu gehen, dass eine veränderte ERK5-Expression auch in anderen Zelltypen keine Wirkung auf die Virus-Replikation hat, wurden statt der bisher eingesetzten epithelialen Krebszellen, primäre endotheliale Blutgefäßzellen verwendet. Da die ERK5 in primären HUVEC hoch exprimiert wird und die Funktion der Kinase von entscheidender Bedeutung für das Überleben und Wachstum dieser Zellen ist, wurde überprüft, ob die Virus-Replikation in

diesen Zellen durch ERK5-Überexpression beeinflussbar ist. Die HUVEC wurden stabil, retroviral mit dem pEGZ-Leervektor oder dem pEGZ-ERK5-wt-Konstrukt transduziert. Die Gentransfereffizienz lag ungefähr bei 92-95% (Abbildung 37 A). Anschließend wurden die Zellen lysiert und die ERK5-Expression im Western-Blot kontrolliert. Diese Zellen wurden mit FPV infiziert (Abbildung 37 B). Doch der nach 9 h, 24 h und 48 h entnommene, virushaltige Mediumüberstand zeigte im Plaque-Assay auf MDCK-Zellen keine Unterschiede bezüglich der Virus-Replikation in den stabil-transduzierten Leervektorzellen und den Zellen mit dem überexprimierten ERK5.

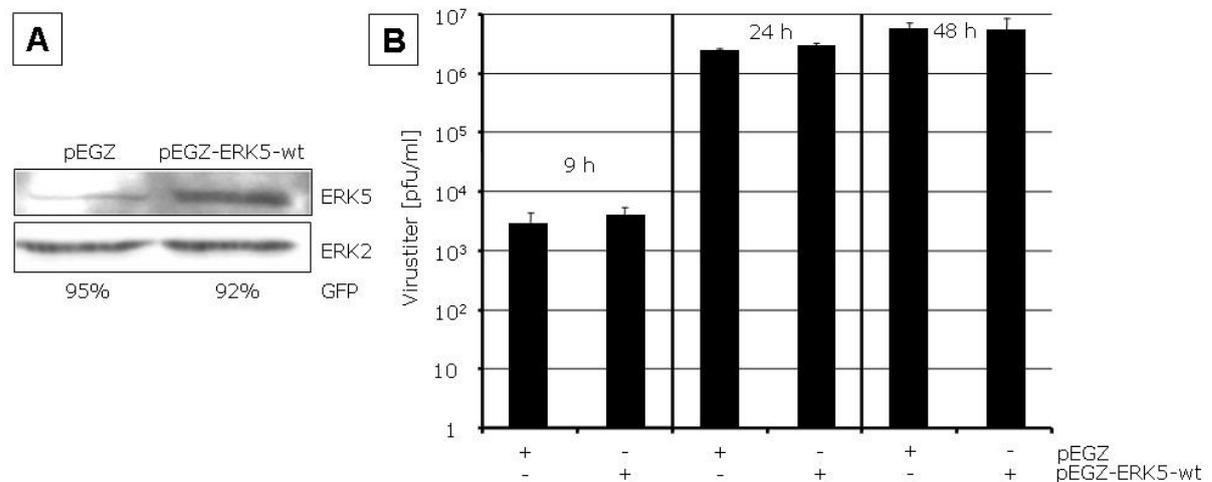


Abbildung 37: ERK5-Überexpression in HUVEC bewirkt keine Änderung der Virustiter

Nachdem die Phoenixzellen transient mit dem Leervektor oder dem ERK5-wt-Plasmid transfiziert wurden, konnte der virushaltige Mediumüberstand für die Transduktion der HUVEC verwendet werden.

(A) Western-Blot mit Lysaten von HUVEC

Die Transduktionseffizienz wurde mittels FACS-Messung bestimmt. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Das ERK5-Antiserum zeigte die ERK5-Expression und das ERK2-Antiserum belegte die äquivalente Proteinbeladung.

(B) Plaque-Assays zur Bestimmung der Virentiter

Die stabil, retroviral-transduzierten HUVEC wurden mit A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) infiziert (MOI = 0,0025). Der nach 9 h, 24 h und 48 h gesammelte virushaltige Mediumüberstand wurde mittels Plaque-Assay auf MDCK-Zellen bestimmt.

3.16.2. Transiente Überexpression von ERK5 oder der ERK5-AEF-Mutanten hat keinen Effekt auf die Virus-Replikation in MDCK-Zellen

Zusätzlich wurden die Expressionskonstrukte nach transienter Expression in MDCK-Zellen getestet. Die Transfektionseffizienz der mit dem Leervektor, dem ERK5-wt-Plasmid und dem ERK5-AEF-Plasmid, transient-transfizierten MDCK-Zellen betrug etwa 40-55% (Abbildung 38). Nach 24 h wurden die Zellen mit FPV infiziert. Allerdings konnte unter den gewählten experimentellen Bedingungen nach 9 h, 24 h und 48 h in den virushaltigen Mediumüberständen keine Veränderungen im Virustiter nachgewiesen werden.

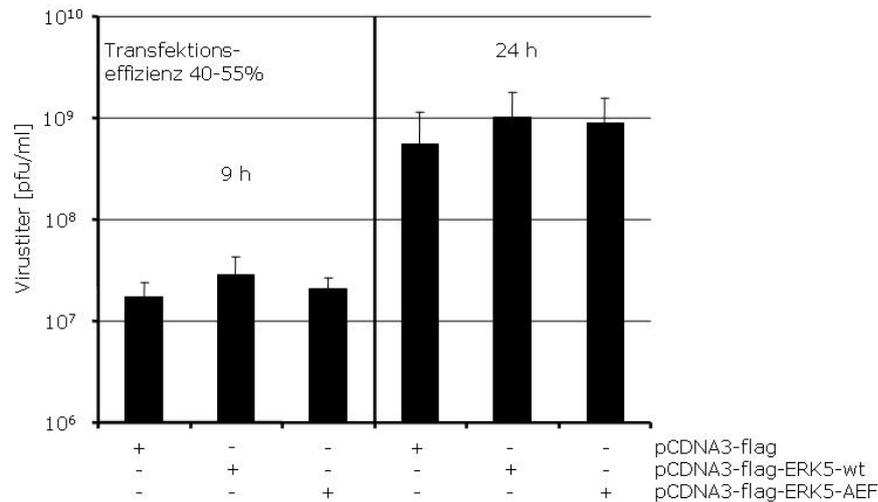


Abbildung 38: Die mit dem ERK5-wt- und dem ERK5-AEF-Plasmid transient-transfizierten MDCK-Zellen zeigen einen einheitlichen Virustiter

Plaque-Assays zur Bestimmung der Virentiter

MDCK-Zellen wurden transient mit dem Vektor, dem ERK5-wt- und dem ERK5-AEF-Plasmid transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) infiziert (MOI = 0,002) und mit Infektionsmedium versorgt. Der Virustiter wurde nach 9 h und 24 h anhand des virushaltigen Mediumüberstandes im Plaque-Assay auf MDCK-Zellen bestimmt.

3.17. Geänderte ERK5-Expression hat keinen Einfluss auf die IFN- β -Promotoraktivität oder die IRF-3-abhängige Transkription

Es wurde schon früher gezeigt, dass nach Influenza-A-Virus-Infektion oder RNA-Stimulation eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 erfolgt (Ehrhardt et al. 2004). IRF-3 ist ein wichtiger Regulator in der Virus-vermittelten Expression von Typ-I-IFN. Daher wurde nun eine potentielle Wirkung der ERK5-Kaskade in Bezug auf Virus-induzierte IFN- β -Promotoraktivität bzw. die IRF-3-abhängige Transkription überprüft. MDCK-Zellen wurden für einen Luziferase-Assay transient mit unterschiedlichen Expressionsvektoren für Komponenten des ERK5-Signalwegs sowie mit einem IFN- β -Promotor-Reportergenkonstrukt oder einem Konstrukt, welches die Luziferase unter Kontrolle eines artifiziellen Promotors mit 4x IRF-3 Bindestellen exprimierte, kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit dem humanen Influenza-A-Virus PR8 infiziert und nach 4 h lysiert, um die Reporteraktivität der Luziferase zu bestimmen. In den Diagrammen (Abbildung 39) sind die Werte aus den Lysaten der infizierten Zellen auf die nicht-infizierten Zellen mit den gleichen Plasmiden bezogen worden. Aus den Diagrammen ging hervor, dass durch die ERK5-wt-, ERK5-AEF-

und ERK5-antisense-Plasmide in MDCK-Zellen unterschiedlich erzeugten ERK5-Expressions- oder Aktivitäts-Bedingungen keine maßgeblichen Auswirkungen auf die IFN- β -Promotoraktivität oder die IRF-3-abhängige Transkription hatten.

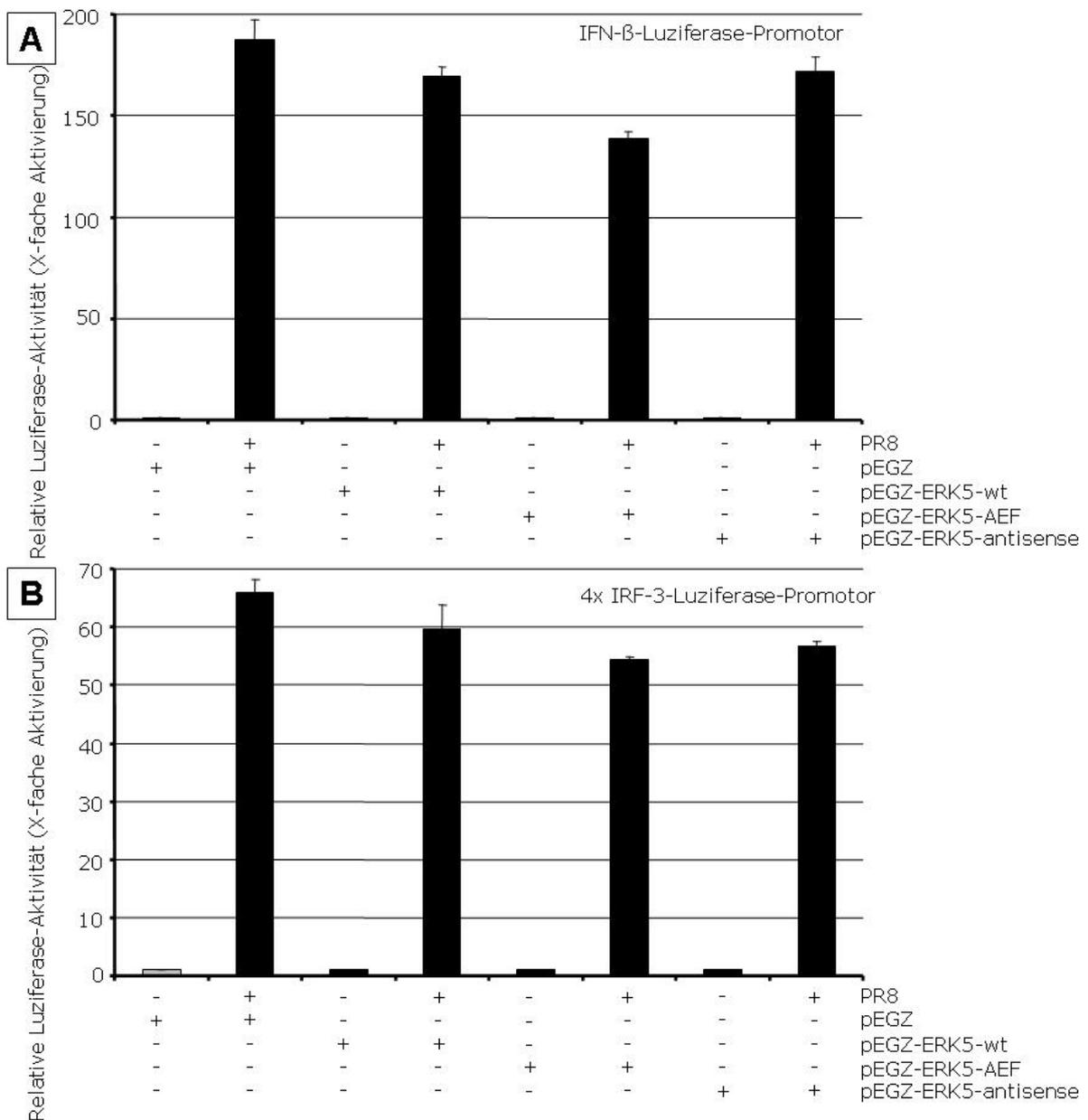


Abbildung 39: Manipulation der ERK5-Expression oder Aktivität beeinflusst nicht die Virus-induzierte IFN- β -Promotoraktivität oder die IRF-3-abhängige Transkription

(A, B) Luziferase-Assay mit Lysaten aus transient transfizierten MDCK-Zellen

MDCK-Zellen wurden transient mit Leervektor, ERK5-wt; ERK5-AEF; ERK5-antisense und (A) IFN- β oder (B) 4x IRF-3 transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 h mit dem humanen Influenza-A-Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) infiziert (MOI = 5) oder nicht-infiziert belassen für 4 h und im Luziferase-Assay ausgewertet. Die, durch die unterschiedlichen ERK5-Plasmide, erzeugten experimentellen Bedingungen wurden jeweils durch die Luziferase-Expression von einem IFN- β - oder IRF-3-Luziferase-Promotor übermittelt. In den beiden Diagrammen wurde der jeweils infizierte Wert auf den nicht-infizierten Wert, mit den gleichen Plasmiden, bezogen.

Zusammenfassend konnte erstmals eine Virus-induzierte ERK5-Aktivierung demonstriert werden. Dabei erfolgt die ERK5-Aktivierung prädominant durch Akkumulation viraler RNA in infizierten Zellen.

4. Diskussion

Es wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass verschiedene MAPK-Kaskaden eine entscheidende Rolle in der Influenza-A-Virus-Replikation spielen (Kujime et al. 2000; Ludwig et al. 2001; Pleschka et al. 2001; Lee et al. 2005). Diese Signalwege werden in infizierten Zellen aktiviert und können sowohl die Wirtszell-Abwehrmechanismen regulieren, als auch durch die Influenza-A-Viren genutzt werden, um die eigene Replikation zu unterstützen. Beispielsweise hat die JNK-Kaskade eine antivirale Funktion, da sie an der Kontrolle der Typ-I-IFN-Induktion beteiligt ist (Ludwig et al. 2001; Ludwig et al. 2002). Dagegen wird die ERK1/2-Kaskade für die virale Vermehrung benötigt, weil sie den viralen RNP-Export aus dem Zellkern kontrolliert (Pleschka et al. 2001; Ludwig et al. 2004). Über die Virus-induzierte Aktivierung und Rolle der p38- und ERK5-MAPK-Kaskaden in der Influenza-A-Virus-infizierten Zelle war allerdings nur wenig bekannt. Die nähere Untersuchung der Funktion der p38- und ERK5-Signalwege in der Virus-/Wirtszell-Wechselwirkung war entsprechend das Ziel dieser Arbeit.

Die MKK3/6-p38- und ERK5-Kaskaden werden in verschiedenen Zell-Linien durch Influenza-A-Viren aktiviert

In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich die Aktivierungsmuster der MAPK JNK (Ludwig et al. 2001), ERK1/2 (Pleschka et al. 2001) und p38 (Kujime et al. 2000; Lee et al. 2005) nach Influenza-A-Virus-Infektion ähneln.

In dieser Arbeit konnte die Aktivierung der p38-Kinasekaskade durch Influenza-A-Viren bestätigt werden. Darüber hinaus konnte eine detaillierte zeitliche Analyse der Kinaseaktivität von p38 sowie ihrer Aktivatorinasen MKK3/6 mittels spezifischer Antikörper gegen die phosphorylierte, aktivierte Form dargestellt werden. Da die Kinasen MKK3/6 die direkten Aktivatoren der Kinase p38 sind, war zu erwarten, dass sie eine zeitgleiche Phosphorylierungskinetik mit der p38 haben (Abbildung 5, 6, 7, 8, 9, 10).

In verschiedenen Zell-Linien wurde die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der MKK3/6 und p38 mittels unterschiedlicher Virusisolate untersucht. Dafür wurden die epithelialen Zell-Linien A549 und MDCK mit dem humanen Influenza-A-Virus PR8 oder dem aviären Influenza-A-Virus FPV infiziert. Dabei hätte man eine wesentlich stärkere bzw. frühere MKK3/6- und p38-Phosphorylierung in A549 und MDCK nach Infektion mit PR8 (Abbildung 7), als nach Infektion mit FPV (Abbildung 5) erwartet. Aus unpublizierten Daten

geht hervor, dass PR8 stärker IFN β induziert, als FPV (M. Schmolke, unpubliziert). Da in publizierten Arbeiten demonstriert werden konnte, dass IFN β den MKK3/6-p38-Signalweg aktiviert (Goh et al. 1999; Li et al. 2005) hätte man eine effektivere Aktivierung dieses Weges nach einer Infektion mit PR8 im Vergleich zu FPV erwarten können. Allerdings waren bei Betrachtung der gleichen Zell-Linien keine Unterschiede bezüglich der MKK3/6- und p38-Aktivierung nach Infektion mit PR8 oder FPV detektierbar. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivierung des Signalweges nicht durch das verwendete Virusisolat bestimmt wird.

Bei Betrachtung verschiedener Zell-Linien konnte aber nach Infektion mit einem Virusisolat eine unterschiedliche Aktivierung der MKK3/6-p38-Kaskade detektiert werden. Diese zelltypspezifische Phosphorylierung beginnt in A549-Zellen früher, ca. 4 h nach der Infektion, während sie in MDCK-Zellen erst verzögert, nach 6 h zu detektieren ist (Abbildung 5, 7).

Ebenfalls zeigten A549-Zellen nach parallelen Infektionen mit Viren der Subtypen H5N1, H1N1 und H3N2 eine etwa gleichstarke und zu der gleichen Zeit beginnende MKK3/6-p38-Phosphorylierung (Abbildung 8). Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Beginn und die Stärke der Phosphorylierung der MKK3/6-p38-Kaskade nicht vom verwendeten Virusisolat abhängig ist, sondern durch die Eigenschaften der verwendeten Zell-Linien bestimmt wird. In bereits publizierte Arbeiten wurde entsprechendes für die MAPK JNK gefunden (Ludwig et al. 2001). Während Stärke und Dauer der Phosphorylierung nur wenig bei verschiedenen Virusisolaten (A/FPV/Bratislava/79 (H7N7), A/Asia/57 (H2N2), WSN-HK (H1N2)) variierte, wurden diesbezüglich größere Unterschiede nach Infektion von verschiedenen Zell-Linien (MDCK, HEK293, U937) beobachtet (Ludwig et al. 2001). Dagegen wurden unterschiedliche Kinetiken der ERK1/2-Phosphorylierung, sowohl nach Infektion mit verschiedenen Virusisolaten, als auch in Abhängigkeit von den verwendeten Zell-Linien, gefunden (Pleschka et al. 2001). Darüber hinaus werden die MAPK p38, JNK und ERK1/2 durch eine Infektion mit Influenza-B-Viren aktiviert (Ludwig et al. 2004). Allerdings zeigt sich im Vergleich zu der biphasischen Phosphorylierungskinetik nach einer Influenza-A-Virus-Infektion bei Influenza-B-Virus keine frühe Phosphorylierung von ERK1/2 (Pleschka et al. 2001; Ludwig et al. 2004).

Im Gegensatz zu A549-Zellen, bei denen Infektionen mit verschiedenen Virusisolaten identische Muster in der MKK3/6-p38- Phosphorylierungskinetik zeigten, konnte man in primären monozytären Zellen nach Infektion mit Viren der Subtypen H5N1, H1N1 und H3N2 Unterschiede in der MKK3/6-Phosphorylierung detektieren. Allerdings wirkten sich diese nicht auf Ebene der Phosphorylierung von p38 aus (Abbildung 8). Dies widerspricht früheren

Arbeiten, in denen Influenza-A-Viren vom Subtyp H5N1 verglichen mit Viren vom Subtyp H1N1 eine wesentlich stärkere Aktivierung (eine so genannte Hyperinduktion) der MAPK p38 in primären Makrophagen induzierten (Lee et al. 2005).

Vermutlich sind primäre Monozyten wesentlich sensitiver gegenüber Virus-Infektionen als epitheliale Zell-Linien (wie A549-Zellen), da diese Zellen die Aufgabe haben, über Zytokine die Immunantwort zu regulieren. Daher könnten feinere Detektionsmechanismen in diesen Zellen zum Tragen kommen. Möglicherweise verhalten sich die primären Monozyten, die Vorläuferzellen der Makrophagen, aber auch anders, da diese Zellen noch nicht ausdifferenziert sind. Beispielsweise wird die Rezeptor-Expression (z.B. der TLRs) erst während der Differenzierung von Zellen (wie Monozyten zu Makrophagen) induziert (Matsumoto et al. 2004), was dann die Typ-I-IFN-Synthese in diesen Zellen verstärken könnte. Die Diskrepanzen zu der Lee und Kollegen (Lee et al. 2005) publizierten, stärkeren Aktivierung von p38 durch H5N1 könnten daher rühren, dass hier nicht primäre Monozyten, sondern Makrophagen verwendet wurden. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit aber auch ein anderer H5N1-Virusstamm verwendet, A/HK/483/97 (H5N1), was ebenfalls eine Ursache für beobachtete Unterschiede sein könnte.

Infektion mit dem gleichen Influenza-A-Virus-Stamm vom Subtyp H5N1 führte in A549-Zellen und primäre Monozyten zu einer unterschiedlichen MKK3/6-p38-Phosphorylierungskinetik. Bei primären monozytären Zellen setzte die Phosphorylierung schon 15 Minuten nach Virus-Infektion ein, während in A549-Zellen erst nach ca. 4 h eine einleitende Aktivierung zu erkennen war (Abbildung 9). Dies könnte damit zu erklären sein, dass primäre Monozyten viel sensitiver gegenüber äußeren Einflüssen sind im Gegensatz zu der epithelialen Krebszell-Linie.

Die MKK3/6-p38-Kaskade wird durch Influenza-A-Viren sowohl in permissiven Zellen, welche die Replikation der Influenza-Viren unterstützen, wie A549- und MDCK-Zellen (Abbildung 5, 7, 8, 9) als auch in den nicht-permissiven Wirtszellen, wie HeLa- und MCF7-Zellen aktiviert (Abbildung 6). Diese Beobachtung war überraschend, da in früheren Arbeiten gezeigt wurde, dass die verwandte MAPK JNK in nicht-permissiven Zellen nach Influenza-A-Virus-Infektion nicht aktiviert wurde (Ludwig et al. 2001). In nicht-permissiven Zellen gibt es gleich mehrere Interferenzen mit dem viralen Replikationsprozess. In HeLa-Zellen ist sowohl der Viruseintrittsprozess, als auch das Entlassen der neu gebildeten Viruspartikel erschwert. Daher laufen in diesen Zellen alle Virus-Replikationsschritte wesentlich langsamer bzw. gar nicht ab (Gujuluva et al. 1994). Allerdings konnte dafür in HeLa- und MCF7-Zellen jedoch

recht schnell, ungefähr 4 h nach der Virus-Infektion eine Phosphorylierung von MKK3/6 und p38 detektiert werden. Diese Aktivierung könnte durch die Akkumulation viraler RNA während des Vermehrungszyklus ausgelöst worden sein, da bereits gezeigt wurde, dass virale RNA die aktivierende Komponente verschiedener Signalwege darstellt (Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006).

In früher publizierten Arbeiten wurde eine biphasische Phosphorylierung der Kinasen JNK, ERK1/2 und p38 nach Influenza-A-Virus-Infektion in den Zellen MDCK und BEC gezeigt (Kujime et al. 2000; Pleschka et al. 2001). In den in dieser Arbeit präsentierten Experimenten konnte jedoch keine biphasische, Influenza-A-Virus-induzierte MKK3/6-p38-Phosphorylierungskinetik festgestellt werden (Abbildung 5, 6, 7, 9). Es wurde nur eine späte Influenza-A-Virus-induzierte Phosphorylierung von MKK3/6 und p38 beobachtet, die in den epithelialen Zell-Linien A549, MCF7 und HeLa nach ungefähr 4 h und in MDCK-Zellen verzögert, erst nach etwa 6 h detektierbar war. Diese späte Phosphorylierung von MKK3/6 und p38 kann nicht durch die Bindung der Viren an die Wirtszellrezeptoren veranlasst werden, sondern wird wahrscheinlich nur über die Akkumulation von RNA während des viralen Vermehrungszyklus und/oder, wie in publizierten Daten dargestellt, durch die RNA-induzierte Interferoninduktion ausgelöst (Goh et al. 1999; Li et al. 2005). Dies lässt den Schluss zu, dass dieser Signalweg eher in der späten Phase des viralen Replikationszyklus oder der Wirtszellabwehr eine Rolle spielen könnte.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die ERK5-MAPK-Kaskade in verschiedenen Zell-Linien durch unterschiedliche Influenza-A-Viren aktiviert wird (Abbildung 25, 28). Dabei wurde eine biphasische Aktivierungskinetik beobachtet, die ca. 15-30 min nach der Infektion ihren ersten Höhepunkt und nach ca. 4 h den zweiten Höhepunkt erreichte. Dieser Verlauf der Phosphorylierung von ERK5 könnte genau wie bei p38 auf spezifische Eigenschaften der verwendeten Zellen zurückzuführen sein. Während beispielsweise in primären humanen Zellen (HUVEC) der Beginn der zweiten ERK5-Phosphorylierungsphase bereits eine Stunde nach Infektion beobachtet werden kann, findet man in A549- und MDCK-Zellen diese zweite Phase von ERK5 erst 4 h Stunden nach der Infektion (Abbildung 25).

Die Experimente zeigten, dass die Kinase ERK5 die Substrate MEF2-C wie auch MBP *in vitro* phosphorylieren konnte, wobei je nach Substrat Unterschiede in den Kinetiken auftraten. Da MBP ein Substrat für viele Kinasen darstellt könnte die unterschiedliche Phosphorylierung von MBP im Vergleich zu MEF2-C durch die Aktivität anderer Kinasen erfolgen, die bei der

Immunpräzipitation nicht vollständig entfernt wurden. Somit spiegeln die *in vitro* Kinase-Assays mit dem Substrat MEF2-C etwas genauer die Aktivität von ERK5 wider. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Zugabe des viralen Oberflächenproteins HA zu einer Aktivierung der PKC führt, welche ein Aktivator der ERK-Kaskade ist (Marjuki et al. 2006). Entsprechend kann man vermuten, dass Virus-gebundenes HA beim Anheften der Viruspartikel an die Wirtszellmembran ein rezeptorvermitteltes Signal induziert, welches zu der frühen Aktivierung von Kinasen, wie ERK1/2, aber auch ERK5 führen kann. Im Fall von ERK1/2 ist HA für die späte Phase der Aktivierung verantwortlich. Eine späte Akkumulation des neu synthetisierten HA-Proteins in der Wirtszellmembran ist für den „Budding“-Prozess nötig, um die Aktivierung von ERK1/2 zu induzieren (Marjuki et al. 2006). Allerdings konnte bei der späten ERK1/2-Aktivierung die Beteiligung anderer viraler Proteine bzw. Prozesse nicht ausgeschlossen werden (Marjuki et al. 2006). Daher könnten andere virale Proteine in der späten Phase des Virus-Replikationszyklus oder dadurch ausgelöste Prozesse ebenfalls die Aktivierung anderer MAPK-Kaskaden vermitteln und somit zu einer späten Kinasephosphorylierung beitragen. Während die frühe Kinaseaktivierung, meistens bis 30 Minuten nach der Infektion, durch eine Bindung des Virus an die Wirtszellrezeptoren veranlasst werden könnte und somit die frühe Phosphorylierung von ERK5 induziert, könnte die späte Aktivierungsphase von ERK5 und p38 während des Virus-Vermehrungsprozesses anderen Mechanismen, zugrunde liegen. Als ein entscheidender Regulationsmechanismus der späten ERK5- und p38-Aktivierung konnte in dieser Arbeit die Akkumulation von viraler RNA während des Vermehrungszyklus identifiziert werden (Abbildung 11, 12, 28).

Die MKK3/6-p38- und ERK5-Kaskade werden durch das synthetische Doppelstrang-RNA-Analogon Poly(IC) sowie nach Infektion mit der Δ NS1-Virusmutante aktiviert

Die Akkumulation viraler RNA ist der hauptsächliche Signalgeber in der späten Phase der Influenza-Virus-Replikation. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Stimulation mit Poly(IC) eine biphasische Phosphorylierungskinetik von MKK3/6 und p38 induziert (Abbildung 10), ähnlich der ERK5- und ERK1/2-Phosphorylierung nach Influenza-Virus-Infektion. Der MKK3/6-p38-Signalweg wird üblicherweise durch Stress-Stimuli aktiviert. Das synthetische dsRNA-Analogon Poly(IC) scheint ein stärkerer Stimulus zu sein, als eine Influenza-A-Virus-Infektion, da es die Aktivierung von MKK3/6 und p38 schon nach ungefähr 30 bis 60 Minuten induziert (Abbildung 10), während dieser Signalweg nach einer Influenza-A-Virus-Infektion erst erheblich später, nach ungefähr 4 h aktiviert wird (Abbildung 5, 7, 9). Vermutlich wird die Poly(IC) induzierte frühe Phosphorylierung von

MKK3/6 und p38 durch eine direkte RNA-Rezeptorbindung vermittelt. Die spätere, Poly(IC)-induzierte Phosphorylierung von MKK3/6 und p38 stimmt mit der Kinetik der Influenza-A-Virus-induzierten Phosphorylierung überein. Eine biphasische Aktivierung durch den nicht dynamischen Stimulus Poly(IC) war überraschend. Man hätte nach Poly(IC)-Anwendung eine transiente Aktivierung oder eine durchgängige Phosphorylierung von MKK3/6 und p38 erwarten können. Die zweite Aktivierungswelle, analog einer Virus-Infektion (Abbildung 10), zeigt, dass wahrscheinlich durch Poly(IC) ein oder mehrere Signalwege stimuliert werden, welche indirekt zu der Aktivität von MKK3/6 und p38 führen. In publizierten Arbeiten wurde gezeigt, dass die Aktivierung des MKK3/6-p38-Signalweges durch Typ-I-Interferone veranlasst werden kann (Goh et al. 1999; Li et al. 2005). Da Poly(IC) die IFN-Expression induziert, könnte die zweite Welle der Aktivierung von MKK3/6 und p38 durch diesen Mechanismus bewirkt werden.

Die Stimulation mittels Poly(IC) induzierte ebenfalls eine biphasische Phosphorylierungskinetik von ERK5 (Abbildung 26). Somit ist die ERK5-Phosphorylierungskinetik sowohl nach Virus, als auch nach Poly(IC) biphasisch. Im Gegensatz dazu zeigt die Phosphorylierungskinetik von p38 nur nach Poly(IC), nicht aber nach Virus-Infektion einen biphasischen Verlauf. Somit scheinen die gezeigten biphasischen Aktivierungskinetiken für ERK5 einem anderen Regulationsmechanismus zu unterliegen, als die des MKK3/6-p38-Signalweges. Die durch das dsRNA-Analogon oder durch Virus-Infektion ausgelöste biphasische ERK5-Aktivierungskinetik zeigt bei Betrachtung einer Zell-Linie in fast allen Fällen einen zeitparallelen Verlauf. Die Verwendung des gleichen ERK5 Substrates und die Betrachtung gleicher Zell-Linien zeigt eine fast einheitliche, biphasische ERK5-Aktivierungskinetik, nach FPV-Infektion oder Poly(IC)-Stimulation (Abbildung 25, 27).

Das NS1-Protein ist ein Antagonist RNA-abhängiger Signalwege. Durch Bindung an intrazellulär angehäufter ssRNA- oder dsRNA-ähnliche Nukleinsäuren oder Interferenz mit den RNA-Sensoren RIG-I bzw. TLR3/7 hemmt NS1 die angeborene Interferonantwort. Durch diesen Mechanismus führt die Infektion mit der Δ NS1-Virusmutante verglichen mit dem isogenen Wildtyp PR8, der das intakte NS1 besitzt zu einem verstärkten RNA-induzierten Signalereignis. Die stärkere Aktivierung durch die Δ NS1-Virusmutante konnte in vorherigen Arbeiten schon anhand der MAPK JNK gezeigt werden (Ludwig et al. 2002). Das NS1-Protein reprimiert die Aktivierung der antiviral wirkenden JNK-Kaskade, was als Gegenstrategie zur Wirtszell-Immunantwort zu verstehen ist (Ludwig et al. 2002). In dieser Arbeit konnte die stärkere Aktivierung von JNK nach Δ NS1-Infektion im Vergleich zum Isogenen

PR8-Virus bestätigt werden (Abbildung 12). Auch für die Kinasen MKK3/6, p38 und ERK5 konnte erstmals eine stärkere Aktivierung durch die Δ NS1-Virusmutante gezeigt werden (Abbildung 12, Abbildung 27 A), aber nicht für die klassische, mitogen-aktivierenden Kinasen ERK1/2 (Abbildung 27 D). Dies ist ein eindeutiges Indiz dafür, dass das Virus diese Kinasen über unterschiedliche Regulationsmechanismen aktiviert. Die ERK1/2 wird zwar wie die anderen MAPK p38, JNK und ERK5 durch eine Influenza-A-Virus-Infektion aktiviert (Pleschka et al. 2001), aber im Gegensatz zu den anderen MAPK kann sie nicht effizient durch dsRNA, wie Poly(IC) (Marjuki et al. 2006) oder Infektion mit Δ NS1-Virus stimuliert werden (Abbildung 27 D). Dies zeigt, dass Virus-induzierte ERK1/2-Aktivierung durch einen dsRNA unabhängigen Mechanismus stattfindet, vermutlich durch die Ansammlung der HA-Proteine in der Wirtszellmembran (Marjuki et al. 2006). Obgleich die ERK5-Kaskade sowohl durch mitogene, als auch Stress-Stimuli aktiviert werden kann, scheint das Influenza-A-Virus, da eine stärkere Aktivierung durch Δ NS1 stattfindet, eher die „Stress-Kinase-Eigenschaften“ von ERK5 zu nutzen, als die „Eigenschaften der mitogenen Kinase“.

Zusammengefasst kann man sagen, dass die MAPK JNK, p38 und ERK5 aber nicht ERK1/2 durch die synthetische Doppelstrang-RNA und die Δ NS1-Virusmutante stimuliert werden (Abbildung 40).

Virale RNA induziert über die RNA-Sensoren TLR7 und RIG-I eine effiziente Aktivierung von p38

Die virale RNA ist bei einer Influenza-A-Virus-Infektion ein effizienter Stimulator von Signalwegen (Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006). Durch Stimulation von Zellen mit Poly(IC) oder durch unterschiedlich aufgereinigte virale RNAs konnte in der vorliegenden Arbeit eine effiziente Aktivierung der MAPK p38 induziert werden (Abbildung 11). Dabei könnte die Aktivierung von p38 durch Poly(IC) wahrscheinlich über den Wirtszellrezeptor MDA5 induziert werden, während virale 5' Triphosphat ssRNA eher den RIG-I-Rezeptorweg aktiviert (Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006).

Es konnte weiterhin in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die vRNA-induzierte Aktivierung von p38 über die RNA-Sensoren TLR7 und RIG-I verläuft, aber nicht über TLR3 (Abbildung 40). Dieses Ergebnis steht bezüglich des Rezeptors TLR3 in Widerspruch zu früheren Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass TLR3 in die angeborene Immunantwort von epithelialer Lungenzellen nach Poly(IC)-Stimulation und Influenza-A-Virus-Infektion mit A/Scotland/20/74 (H3N2) involviert ist (Guillot et al. 2005). Wie in dieser Arbeit gezeigt, spielt allerdings TLR3 nach Infektion mit PR8 für die Aktivierung von p38 in den getesteten

MDCK-Zellen keine entscheidende Rolle. Die Diskrepanzen zu der Arbeit von Guillot und Kollegen könnten durch die Verwendung unterschiedlicher Zellen bzw. Influenza-A-Viren

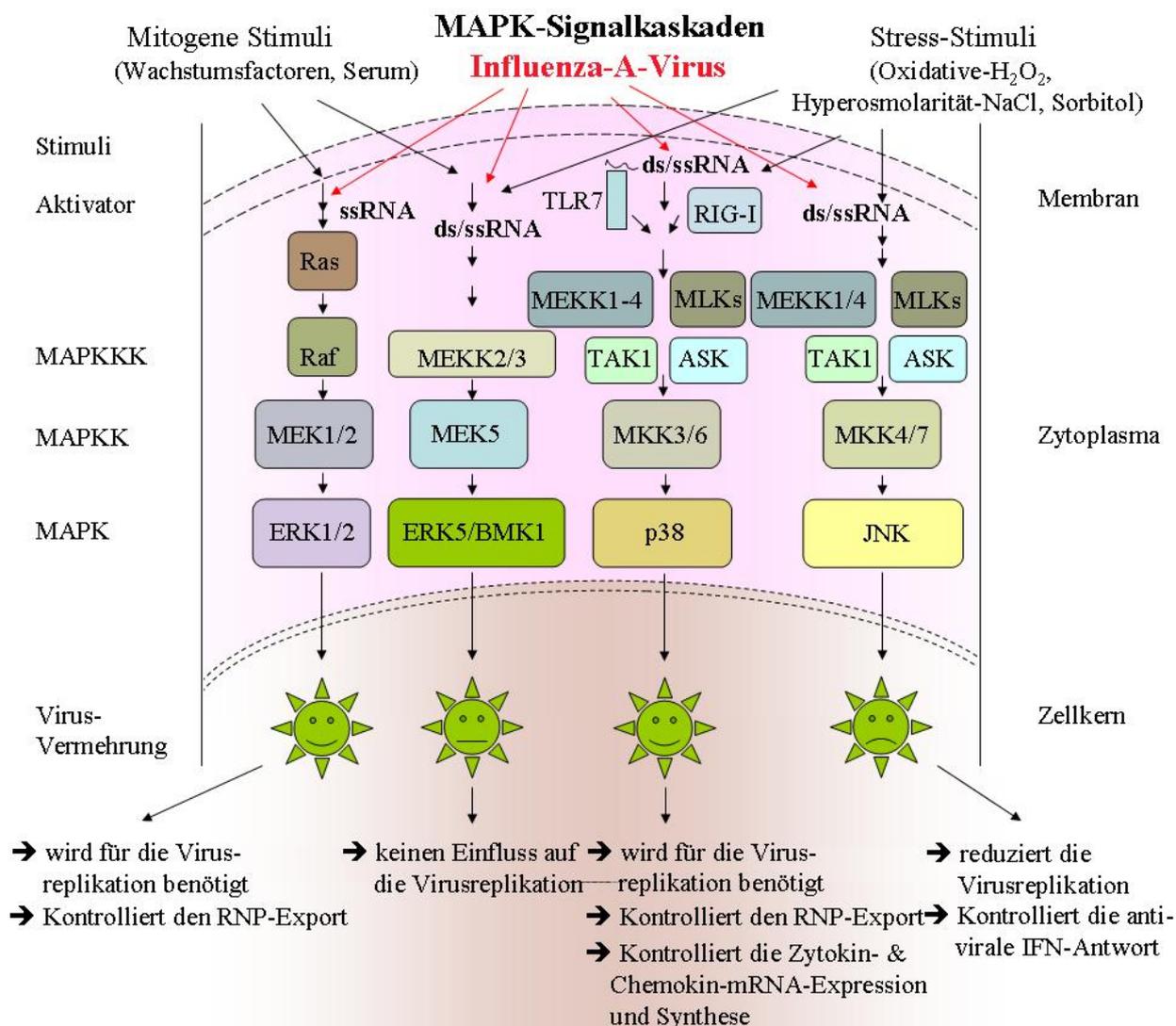


Abbildung 40: Zusammenfassende Darstellung der Aktivierung und Funktion der vier MAPK-Kaskaden

Alle vier MAPK-Kaskaden werden durch eine Influenza-A-Virus-Infektion aktiviert. Während die ERK5-, p38- und JNK-Kaskade durch dsRNA und ssRNA aktiviert werden, wird die ERK1/2-Kaskade nicht durch dsRNA aktiviert. Die Aktivierung des MKK3/6-p38-Signalweges durch Influenza-A-Virus involviert die Rezeptoren TLR7 und RIG-I. Die ERK1/2 und p38-Kaskade wird für die Virus-Replikation benötigt, denn sie kontrollieren den vRNP-Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die MKK3/6-p38-Kaskade die Zytokin- und Chemokin-mRNA-Expression und Synthese reguliert. Im Gegensatz dazu reduziert die JNK-Kaskade die Virus-Replikation, indem sie die antivirale IFN-Antwort kontrolliert. Die ERK5-Kaskade ist die einzige Kinasekaskade, die durch eine Influenza-A-Virus-Infektion aktiviert wird, aber keinen Einfluss auf die Virus-Replikation hat.

entstanden sein. Es konnte in weiteren Publikationen demonstriert werden, dass die Regulation der TLR-Expression vom Stimulus, dem Zelltyp, dem betrachteten Gewebe und der Spezies abhängig ist (Rehli 2002; Heinz et al. 2003). In publizierten Arbeiten wurde auch berichtet, dass TLR3-mRNA nicht in Monozyten, Lymphozyten, Leukozyten und NK-Zellen vorkommt (Matsumoto et al. 2004). Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nach Virus-Infektion auch primäre Monozyten trotz des Fehlens von TLR3 eine starke

Aktivität von MKK3/6 und p38 besitzen (Abbildung 8). Auch in früheren Arbeiten wurde nach Infektion mit verschiedenen Viren (LCMV, VSV, MCMV, Reovirus) gezeigt, dass der TLR3-Signalweg im Mausmodell keinen Einfluss auf die angeborene Immunantwort hat (Edelmann et al. 2004).

Expression eines rekombinanten dn-Rezeptor TLR7 bewirkte die stärkste Wirkung auf die Virus-induzierte Phosphorylierung von p38 (Abbildung 13 für PR8, für FPV nicht gezeigt) und scheint deshalb einer der wichtigeren RNA-Sensoren für die Aktivierung der p38-Kinasekaskade zu sein. In publizierten Daten konnte ebenfalls eine TLR7 abhängige antivirale Immunantwort in Influenza-A-Virus-infizierten, dendritischen Mauszellen demonstriert werden (Boehme und Compton 2004; Diebold et al. 2004; Lund et al. 2004). Expression des dn-Rezeptor RIG-I führte auch zu einer reduzierten p38-Phosphorylierung nach Virus-Infektion, welche aber nicht so ausgeprägt war, wie bei der Anwendung mit dem dnTLR7-Rezeptor. Daher scheint die Expression des dn-Rezeptor RIG-I eher im geringeren Maße in die Aktivierung von p38 involviert zu sein (Abbildung 13).

Die Virus-induzierte MKK3/6-p38-Kaskade wird für die Influenza-A-Virus-Replikation benötigt, während die Virus-induzierte ERK5-Aktivität keinen entscheidenden Effekt auf die Virus-Replikation hat

Alle MAPK werden durch eine Influenza-A-Virus-Infektion aktiviert (Abbildung 40). Auch das synthetische dsRNA-Analogon Poly(IC) und die Δ NS1-Virusmutante konnten die p38-, ERK5- und JNK-Aktivität (Ludwig et al. 2001), aber nicht die ERK1/2-Aktivität induzieren (Marjuki et al. 2006). Im Gegensatz zu der antiviral-wirkenden JNK-Kaskade (Ludwig et al. 2001) ist die ERK1/2-Kaskade aber essentiell für die Virus-Replikation (Pleschka et al. 2001). Auch der NF- κ B-Signalweg spielt für die Virusvermehrung eine wichtige Rolle (Mazur et al. 2007).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch der MKK3/6-p38-Signalweg für die Virus-Replikation benötigt wird. Die Hemmung dieses Signalweges in Zellen durch Expression von dnMKK6 oder durch die sehr spezifischen Inhibitoren, SB202190 und SB203580, führte zu einer reduzierten Virus-Replikation mit einer verringerten Produktion von Nachkommenviren um ungefähr 50%-75% (Abbildung 14, 17). Dies ist kein verzögernder Effekt, da die Hemmung von p38 durch SB-Inhibitoren oder durch dnMKK6 auch nach mehreren Virus-Replikationszyklen den Virustiter um etwa 50% reduziert. Allerdings konnte bei den Zellen die dnMKK6 exprimieren nach 9 h eine ca. 75%ige und nach 24 h eine ungefähr 50%ige Reduktion der Titer festgestellt werden, was den Schluss zulässt, dass Influenza-A-Viren die

fehlende Aktivierung von p38 durch die dnMKK6 umgehen konnten, vermutlich durch die Nutzung der redundant wirkenden MKK3. Zumindest konnte gezeigt werden, dass Mäuse, welche nur eine der Kinasen MKK3 oder MKK6 besitzen, überleben, weil die Kinasen eine Vielzahl der Funktionen gegenseitig ersetzen konnten (Lu et al. 1999; Wysk et al. 1999; Tanaka et al. 2002; Brancho et al. 2003). Zwar wurde MKK6 als der Hauptaktivator von p38 identifiziert, schon weil MKK6 eine ungefähr 300-fach größere Aktivität besitzt, als die MKK3 (Raingeaud et al. 1996), doch eine minimale Funktion von MKK3 reichte zum Überleben der Mäuse aus (Lu et al. 1999; Wysk et al. 1999; Tanaka et al. 2002; Brancho et al. 2003). Wahrscheinlich könnte MKK3 die fehlende Funktion der dnMKK6 ersetzen und für die Virus-Replikation genutzt worden sein. Da die Kinase MKK6 alle p38-Isoformen phosphoryliert und aktivieren kann, aber MKK3 nur die Isoformen p38 α , p38 γ und p38 δ bzw. MKK4 die Isoformen p38 α und p38 δ (Jiang et al. 1996; Jiang et al. 1997; Enslen et al. 1998; Kessler et al. 1998), könnten diese Kinasen ersetzend zu der Aktivierung von p38 und Unterstützung der Virus-Replikation genutzt worden sein.

Die Hemmung von p38 durch verschiedene Konzentrationen von SB-Inhibitoren hatte dagegen nach einmaliger Anwendung eine konstante Reduktion der Titer von Nachkommen-viren um ungefähr 50% zur Folge (Abbildung 14). Da die SB-Inhibitoren an die Aminosäure Threonin (T106) binden, welche nur in den MAPK p38 α und p38 β vorkommt, sind sie sehr spezifische Inhibitoren für diese Isoformen (Tong et al. 1997; Lisnock et al. 1998; Gum und Young 1999) und zeigen eher eine länger anhaltende Inhibition, als stabil dnMKK6 exprimierende Zellen. Möglicherweise setzen sich Zellen mit einer geringeren Expression von dnMKK6 in der Zellkultur durch. Eine zusätzliche Inhibition anderer Isoformen von p38 könnte eventuell eine weitere Reduktion der Virus-Replikation erzielen. P38 γ wird hauptsächlich in Muskelzellen exprimiert (Jiang et al. 1996; Lechner et al. 1996; Wang et al. 1997) und kann deshalb als aktivierende Komponente in A549-Zellen vernachlässigt werden. Die Isoform p38 δ wird dagegen in vielen Geweben exprimiert (Jiang et al. 1997; Wang et al. 1997) und könnte somit die Komponente sein, welche gegen eine vollständige Inhibition der p38-Kinasekaskade arbeiten könnte.

Um die Influenza-A-Virus-Vermehrung zu hemmen scheint die Anwendung des p38-Inhibitors besser geeignet zu sein, als eine stabile Expression von dnMKK6. In ersten Fall war eine konstante Inhibition der Virus-Replikation festzustellen und nicht wie bei den MKK6-exprimierenden Zellen, ein Nachlassen der antiviralen Funktion 24 h nach Virus-Infektion (Abbildung 17). Des Weiteren wäre die Anwendung durch den SB-Inhibitor ausbaufähig, da eine erneute Zugabe des SB-Inhibitors nach 36 h eine weitere Reduktion der Virus-

Replikation über einen längeren Zeitraum ermöglichen könnte. Optimal wäre noch die Inhibition von p38 δ , um den p38-Signalweg vollständig auszuschalten und eine weitere Reduktion im Virustiter zu erreichen.

Auch Inhibition anderer intrazellulärer Signalwege führte zu einer Reduktion der viralen Replikation. Die Inhibition des ERK1/2-Signalweg durch den MEK-Inhibitor U0126 oder durch dominant-negative Mutanten von ERK und Raf, reduzierte die Anzahl der infektiösen Viruspartikel bis zu 80% (Pleschka et al. 2001). Die Inhibition des NF- κ B-Signalweges mit Acetylsalicylsäure (ASA) (bzw. siRNA gegen p65 oder dem Inhibitor Bay 11-7805) führte zu einer Blockade der Virus-Replikation um zwei bis drei Logstufen (Mazur et al. 2007). Durch die Hemmung der Kaspase-3 mit siRNA bzw. mit Z-DEVD-FMK Kaspase-3 Inhibitor oder Expression von XIAP (x-linked inhibitor of apoptosis) konnte der Virustiter um ungefähr ein 10-Faches reduziert werden (Wurzer et al. 2003). Die Überexpression von Prokaspase-3 in MCF7-Zellen, die eine Kaspase-3-Defizienz besitzen, zeigte eine 30-fache Erhöhung des Influenza-A-Virustiters (Wurzer et al. 2003). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des antiapoptotischen Protein Bcl-2 zu reduzierten Influenza-Virus-Titern führte (Olsen et al. 1996). Somit wird klar, dass die Hemmung oder Aktivierung der wirtseigenen Signalwege eine gute Grundlage für einen antiviralen Angriff gegen die Virus-Replikation ist, welche an manchen Punkten sicherlich neu kombiniert und weiter modifiziert werden kann. Da das virale Genom zum Eigenschutz und zu der Replikation nur ein Minimum von Proteinen kodiert und antivirale Ansätze gegen virale Faktoren durch eine hohe Mutationsrate schnell zu resistenten Virusvarianten führen, stellt die Hemmung zellulärer Wirtsfaktoren eine attraktive neue Möglichkeit dar (Scholtissek und Muller 1991).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Influenza-A-Virus-Infektion die ERK5-Aktivierung induzierte, konnten auch synthetische (Poly(IC)) und virale RNA als ERK5-Aktivatoren in verschiedenen Zell-Linien identifiziert werden. Doch weder eine Blockade der ERK5-Synthese durch antisense-RNA oder shRNA (Abbildung 30, Abbildung 32), noch eine selektive Hyperaktivierung des ERK5-Signalwegs durch den konstitutiv aktiven Aktivator MEK5-D und die Überexpression des ERK5-wt (Abbildung 36 u.a.), hatte in den verschiedenen Zell-Linien einen Einfluss auf die Virus-Replikation. Auch eine geänderte Expression von ERK5 durch die ERK5-AEF, einer mutierten inaktivierten Form der Kinase, bewirkte keine Modulation der Virus-Replikation (Abbildung 34, Abbildung 38).

Da ERK5 in den primären HUVEC hoch exprimiert wird, hätte man im Vergleich zu den epithelialen A549- bzw. MDCK-Zellen einen Effekt auf die Virus-Replikation erwartet. Es konnte aber gezeigt werden, dass ERK5 auch in diesen Zellen auf die Virus-Replikation keine

Wirkung hatte (Abbildung 37, 38, 39). Die ERK5-Kaskade ist somit der einzige MAPK-Signalweg, der durch eine Influenza-A-Virus-Infektion aktiviert wird, aber keinen Einfluss auf die Virusvermehrung hat (Abbildung 40). Diese Befunde stützen die Sonderstellung der ERK5. Diese unterscheidet sich wesentlich von den anderen MAPK u.a. da sie sowohl von Stress- als auch von mitogenen Stimuli aktiviert wird, ein doppelt so hohes Molekulargewicht wie andere MAPK aufweist, als einzige der MAPK nicht MK3 phosphorylieren kann und im Gegensatz zu den anderen MAPK nun auch keine Rolle in der Virus-Replikation spielt.

Die virale Proteinexpression wird durch Inhibition des MKK3/6-p38-Signalweges nicht beeinflusst

Um genauer zu bestimmen, an welchem Schritt des viralen Vermehrungszyklus die Influenza-Virus-Replikation durch die p38-Inhibitoren oder den stabilen dnMKK6-exprimierenden Zell-Linien gehemmt wird, wurde zunächst die virale Proteinsynthese überprüft. Es wurde gezeigt, dass die Hemmung des p38-Signalweges durch die verschiedenen SB-Inhibitoren sowie durch die stabil dnMKK6-exprimierenden retroviral-transduzierten A549-Zellen, nicht die virale Proteinexpression nach 9 h, 16 h bzw. 24 h beeinflusst (Abbildung 17). Auch die Hemmung der ERK1/2- und NF- κ B-Signalwege bzw. die Kaspase-3-Aktivität zeigte für ERK1/2 nach 8 h, für NF- κ B nach 4 h, 8 h, 10 h bzw. für Kaspase-3 nach 24 h keinen Einfluss auf die virale Proteinexpression, was für eine Inhibition zu späteren Zeitpunkten im viralen Replikationszyklus spricht (Pleschka et al. 2001; Wurzer et al. 2003; Mazur et al. 2007). Während für eine effiziente Hemmung des p38-Signalweges durch den SB-Inhibitor eine 30-minütige Vorinkubation vor der Virus-Infektion bemessen wurde, konnte in publizierten Arbeiten gezeigt werden, dass die Inhibition der ERK1/2- und NF- κ B-Signalwege bzw. die Kaspase-3-Aktivität auch zu einem späten Zeitpunkt nach Virus-Infektion eine Reduktion des Virustiters bewirkte. In diesen Arbeiten konnte ein ungefähr um 50% reduzierter Virustiter für den ERK1/2-Signalweg festgestellt werden, wenn ein MEK-Inhibitor 1 h nach der Virus-Infektion entfernt wurde oder erst nach ca. 4 h der Infektion zugefügt wurde. Dies zeigt, dass eine späte Stufe in der Virusvermehrung durch den MEK-Inhibitor beeinflusst wird (Pleschka et al. 2001). Ebenfalls konnte in publizierten Arbeiten gezeigt werden, dass antiviral wirksame Konzentrationen von ASA (3-15 mM), die spezifisch die NF- κ B-Aktivität inhibiert, nicht die virale Proteinsynthese beeinflussen, was ein Indiz dafür war, dass ASA nicht mit einem frühen Schritt der Virus-Replikation interagiert (Mazur et al. 2007).

Auch die Inhibition der Kaspase-3 beeinflusst nicht die Akkumulation der viralen Proteine und eine effiziente Hemmung der Virus-Replikation konnte auch ungefähr 4 h nach der

Virus-Infektion erzielt werden (Wurzer et al. 2003). Die Anwesenheit des Inhibitors in den ersten 2 h nach der Virus-Infektion konnte dagegen den Virustiter nicht beeinflussen (Wurzer et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht getestet, ob der SB-Inhibitor noch zu einem späteren Zeitpunkt z.B. nach ungefähr 4 h Virus-Infektion in der Lage ist, die Virus-Replikation effizient zu hemmen. Zwar konnte die Wirkung des p38-Inhibitors noch nach 36 h nachgewiesen werden, aber auch nur nach Vorinkubation mit einer erhöhten SB-Inhibitor-Konzentration (30 μ M) und der stetigen Anwesenheit im Infektionsmedium. Da der SB-Inhibitor instabil ist, könnte eine erneute Zugabe nach 36 h eventuell weitere Effekte in der Reduktion der Virustiter erzielen. Da die virale Proteinexpression durch die Hemmung der MKK3/6-p38-Kaskade bis etwa 24 h nach der Infektion nicht beeinflusst wird, sondern sich erst nach dieser Zeit in den SB-Inhibitor behandelten Zellen vermehrt virale Proteine nachgewiesen wurden (nicht gezeigt), ist davon auszugehen, dass auch hier ein späterer Schritt im viralen Replikationszyklus inhibiert wird.

Inhibition der MKK3/6-p38-Kaskade bewirkt eine Retention der vRNP-Komplexe im Zellkern

Nachdem keine Veränderungen der viralen Proteinsynthese nach Hemmung der MKK3/6-p38-Signalkaskade detektiert werden konnten, wurde ein späterer Prozess des Virus-replikationszyklus, der nukleäre Export der vRNP-Komplexe in p38-Inhibitor behandelten Zellen bzw. stabil dnMKK6-exprimierenden Zellen, überprüft. Es ist bekannt, dass die Inhibition der ERK1/2-Kaskade den aktiven vRNP-Export durch NS2/NEP aus dem Zellkern verhindert und somit auch die Bildung von Viruspartikeln blockiert, was sich wiederum in niedrigen Virustitern äußert (Pleschka et al. 2001). Auch die Hemmung von NF- κ B und der NF- κ B abhängigen proapoptotischen Faktoren TRAIL und Fas/FasL und eine nachfolgend reduzierte Kaspase-3-Aktivität inhibiert den passiven vRNP-Export in späteren Phasen des Influenza-Virus-Replikationszyklus (Wurzer et al. 2003; Wurzer et al. 2004; Mazur et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass ASA die Virus-induzierte NF- κ B-Aktivität spezifisch blockiert, aber nicht die MAPK p38, JNK und ERK1/2 beeinflusst. Es stellte sich heraus, dass ASA effizient den Export der vRNP-Komplexe inhibiert (Mazur et al. 2007). Ebenfalls vermindert die Hemmung der Kaspase-3 den vRNP-Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma (Wurzer et al. 2003). Dieser Vorgang ist passiv, da Leptomycin B, ein Inhibitor des aktiven Kern-Exportes nicht den Kaspase vermittelten vRNP-Export blockieren kann (Wurzer et al. 2003). Der Kaspase-3-abhängige vRNP-Export ist eine alternative Export-

strategie, unabhängig von der Funktion der zellulären Exportmaschinerie. Denn Kaspasen spalten proteolytisch die Proteine des Kernporenkomplexes, was zu einer Kernporenvergrößerung führen könnte, welche die freie Diffusion von Proteinkomplexen aus dem Zellkern begünstigt (Faleiro und Lazebnik 2000). Dadurch können auch Makromoleküle, wie vRNPs, die in der späten Phase des Virus-Replikationszyklus im Zellkern akkumulieren durch passive Diffusion aus dem Zellkern freigesetzt werden. Auch die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 (Hinshaw et al. 1994) sowie Kinaseinhibitoren (Bui et al. 2000) führen zu einer Retention der vRNP-Komplexe im Zellkern und somit zu einer reduzierten Virusvermehrung. Es konnte gezeigt werden, dass Resveratrol, ein Polyphenol aus einem Pflanzenextrakt, die MAPK JNK und p38 sowie den vRNP-Export und die Virus-Replikation blockiert (Palamara et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun auch durch die Hemmung der MKK3/6-p38-Kaskade mit den p38-Inhibitoren oder den stabil exprimierenden dnMKK6-Zellen, ein Signalweg identifiziert werden, welcher ebenfalls zu der Retention der vRNP-Komplexe im Zellkern beiträgt (Abbildung 19).

Die Virus-induzierte Kaspaseaktivität wird durch die MKK3/6-p38-Inhibition nicht beeinflusst

Die Einleitung der Apoptose spielt bei einer Vielzahl von Krankheiten sowie Virus-Infektionen eine wichtige Rolle (Razvi und Welsh 1995; Fischer und Schulze-Osthoff 2005). Sie ist als antivirale Abwehr zu verstehen, um Folgeinfektionen zu vermeiden. Es wurde gezeigt, dass die Inhibition der p38- und JNK-Kaskade zu der Hemmung der Kaspase-3-Aktivierung und Apoptose führt (Maruoka et al. 2003).

Im Gegensatz dazu bewirkt die Influenza-Virus-Infektion, die Synthese von NF- κ B-abhängigen proapoptotischen Faktoren, wie TRAIL, Fas/FasL und Aktivierung der Kaspase-3 (Wurzer et al. 2003). Nicht nur durch Influenza-A-Virus, sondern auch durch die Infektion mit anderen Viren (Mundt et al. 2003) wird das NF- κ B-abhängige, proapoptotische Protein TRAIL und der TRAIL-Rezeptor in Zellen hochreguliert. TRAIL wird für die virale Vermehrung und die virale Induktion der Apoptose benötigt (Wurzer et al. 2004).

Da die Inhibition von p38 zu der Hemmung der Apoptose führt (Maruoka et al. 2003) sowie zur Retention von vRNPs im Zellkern und zu einem reduzierten Virustiter (Abbildung 14), war zu erwarten, dass auch eine reduzierte TRAIL-mRNA-Synthese zu detektieren ist. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die verstärkte Aktivierung von p38 durch die Δ NS1-Virusmutante mit einer erhöhten PARP-Spaltung einhergeht (Abbildung 20).

Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Wildtyp-Virus-induzierte Kaspaseaktivität nicht durch Hemmung von MKK3/6 oder p38 beeinträchtigt wird (Abbildung 21). Die PARP-Spaltung blieb unverändert, unabhängig von den verwendeten Zell-Linien bzw. den dnMKK6-exprimierenden Zellen oder von der Behandlung mit p38-Inhibitoren. Diese Beobachtungen konnten kürzlich von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden, die gezeigt haben, dass die Blockierung von p38 durch die SB-Inhibitoren keinen Einfluss auf die Influenza-A-Virus-induzierte Apoptose hat (Mok et al. 2007; Uchida et al. 2007).

Die MAPKs p38 und ERK5 haben keinen Einfluss auf die Virus-induzierte IFN- β -Promotoraktivität oder die IRF-3-abhängige Transkription

Für die IFN- β -Induktion wird die Bindung der drei Transkriptionsfaktoren NF- κ B, IRF-3 und AP-1 (Aktivator-Protein-1) an das IFN- β -Enhanceosome benötigt. Dies bewirkt die primäre Induktion von IFN- β was über eine autokrine Schleife zu einer zusätzlichen Bildung von IFN und Stimulation von ISGs (IFN-stimulated genes) führt, die antiviral wirken. Entsprechend wirkt eine IRF-3-Überexpression antiviral (Juang et al. 1998).

In publizierten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Influenza-A-Virus-Infektion, als auch eine Stimulation mit dsRNA den endogenen Transkriptionsfaktor IRF-3 aktivieren kann (Ehrhardt et al. 2004). Das Influenza-Virus exprimiert einen effizienten IFN-Antagonisten, das virale dsRNA-bindende Protein NS1, um die Konsequenz der IRF-3-/NF- κ B-Aktivierung und antivirale Genexpression zu limitieren (Talon et al. 2000; Wang et al. 2000). Die Inhibition von NF- κ B führt zu einem abnehmenden Level der IFN-induzierten Gene (M. Schmolke, unpubliziert).

Expression dn- oder konstitutiv-aktive Mutanten der MAPK ERK1/2, JNK, p38, ERK5 und Komponenten des IKK/NF- κ B-Moduls zeigten im Luziferase-Assay in Bezug auf Virus- oder dsRNA-induzierte IFN- β - oder IRF-3-Promotoraktivierung keine Effekte (Ehrhardt et al. 2004). Im Einklang mit diesen Daten konnten die Kinasen ERK1/2, JNK, p38, IKK α/β und PKR nicht die Phosphorylierung des C-Terminus von IRF-3 bewirken (Servant et al. 2001). MAPKs (wie JNK, p38 und ERK) aktivieren den Transkriptionsfaktor AP-1 (Kawai und Akira 2006).

Dass die Kinase p38 keinen Einfluss auf die IRF-3-Phosphorylierung hat, konnte in dieser Arbeit mittels Western-Blot-Analyse bestätigt werden (Abbildung 19). Weiterhin konnte durch Hemmung mittels p38-Inhibitoren oder durch Expression von dnMKK6 in MDCK-Zellen keine Beeinträchtigung der Virus-induzierten IRF-3-Phosphorylierung erzielt werden.

Auch die Virus-induzierte IFN- β -Promotoraktivität war nach stabiler oder transientser Expression von dnMKK6 nicht beeinflusst.

Eine geänderte ERK5-Proteinexpression durch Überexpression von wt-ERK5, dn-AEF-ERK5 oder ERK-antisense-RNA, zeigte ebenfalls in diesen Luziferase-Reporter-Assays keinen Einfluss auf die Influenza-A-Virus-induzierte IFN- β -Promotoraktivität (Abbildung 39). Demnach scheinen die MAPK-Kaskaden nicht wesentlich zu der Influenza-A-Virus oder dsRNA-induzierten IRF-3- bzw. IFN- β -Aktivierung beizutragen. Dagegen konnten in publizierten Arbeiten die I κ B-Kinase-epsilon (IKK ϵ) und die Kinase TBK-1 oder auch NF- κ B-aktivierende Kinase (NAK) als Virus-induzierende IRF-3-Aktivatoren identifiziert werden (Fitzgerald et al. 2003; Sharma et al. 2003).

Die Inhibition des p38-Signalweges führt zu einer reduzierten Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese und Proteinexpression

NF- κ B reguliert nach Virus-Infektion die Zytokinexpression (Knobil et al. 1998; Pahl 1999) sowie die Aktivierung des apoptotischen Zelltodes (Baichwal und Baeuerle 1997; Barkett und Gilmore 1999). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Zytokine IFN- β und TNF- α keinen Einfluss auf die NF- κ B-abhängige Virus-Replikation haben (W. Wurzer, Doktorarbeit). ASA vermittelte NF- κ B-Hemmung konnte die erhöhte Zytokinexpression inhibieren, die zu einer hohen Pathogenität des aviären H5N1 Influenza-A-Virus beiträgt (Cheung et al. 2002).

Influenza-Virus-Infektionen und dsRNA-Behandlung induzieren spezifische Signalkaskaden, welche die Aktivierung von AP-1 und anderen Transkriptionsfaktoren veranlassen (Garcia-Sastre 2001; Ludwig et al. 2001). Diese führen zu der Synthese und Expression von antiviralen (IFN- α / β), proinflammatorischen (TNF- α und IL-6) und chemotaktischen (RANTES) Zytokinen/Chemokinen, die zusammen die angeborene und erworbene Immunantwort in Säugern gegen eine Virus-Infektion vermitteln (Julkunen et al. 2001). Es wurde bereits gezeigt, dass p38 nach Influenza-A-Virus-Infektion die Synthese und Expression des Chemokins RANTES reguliert (Kujime et al. 2000). Auch TNF- α wird nach H5N1-Virus-Infektion in erhöhten Mengen synthetisiert (Lee et al. 2005) sowie die Prostaglandin-E₂-Sekretion durch p38 reguliert (Mizumura et al. 2003). Die Beteiligung der p38-Kinasekaskade an der inflammatorischen Immunantwort konnte in dieser Arbeit durch Beeinflussung der Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese von IL-6, MCP-1, IP-10 (Abbildung 22, Abbildung 23) und der Proteine IL-6, MCP-1, IP-10, MIP-1 β und IL-8 (Abbildung 24) veranschaulicht werden. Die Blockierung der p38-Kaskade durch den Inhibitor SB202190 konnte die Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese und Proteinexpression entscheidend minimieren (Abbildung

40). Auch die stabil dnMKK6-exprimierenden A549-Zellen sowie die Zellen mit dem Leervektor zeigten nach Anwendung des p38-Inhibitors eine wesentlich reduzierte Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese von IL-6, MCP-1 und IP-10. Da bei Zellen mit stabiler Expression von dnMKK6 auch der p38-Signalweg schon ohne Anwendung des SB-Inhibitors gehemmt sein sollte, hätte man eine stärkere Reduktion in der MCP-1 und IP-10 Gesamtsynthese im Vergleich zu den Kontroll-A549-Zellen erwarten können sowie eine noch weitere Reduktion der Zytokin-/Chemokin-Synthese nach Anwendung des p38-Inhibitors (Abbildung 23). Obwohl die MKK6 der Hauptaktivator der p38-Kinase ist, könnte eventuell eine andere Kinase beispielsweise MKK3 und MKK4 dieses Defizit ausgeglichen haben. Möglicherweise ist die dnMKK6 nicht effizient in der Lage mit den intakten, endogenen Kinasen zu interferieren und erzielt daher nicht die vergleichbar starke Reduktion in der Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese wie der SB-Inhibitor. Unterschiede könnten eventuell auch auf die verschiedenen p38-Isoformen zurückzuführen sein, denn die SB-Inhibitoren hemmen nur p38 α und p38 β , während die dnMKK6 die Aktivierung aller p38-Isoformen verhindert. Da die SB-Inhibitoren so spezifisch sind, kann man davon ausgehen, dass die Isoformen p38 α und p38 β statt p38 γ und p38 δ hauptsächlich in die Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese involviert sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass die p38-Kaskade in die Zytokin-/Chemokin-mRNA-Synthese und Proteinexpression involviert ist (Abbildung 40).

Nachdem von den gleichen Proben der Zytokin-/Chemokin-Expression der virushaltige Mediumüberstand bestimmt wurde, konnte diesmal auch für das PR8-Virus eine Reduktion des Virustiters um ungefähr 50% gezeigt werden (Abbildung 24). Daraus lässt sich schließen, dass die Blockierung von p38 durch den SB-Inhibitor eine ca. 50%ige Reduktion des Virustiters zeigt, unabhängig von dem verwendeten Virusisolaten PR8 oder FPV (Abbildung 14, Abbildung 24). Es stellte sich die Frage, inwiefern die reduzierte Virus-Replikation mit der reduzierten Zytokin-/Chemokin-Expression interferiert. Weniger Viren induzieren vielleicht auch weniger Zytokine/Chemokine. Demnach hat eine Reduktion des Virustiters um etwa 50% auch eine wesentlich erniedrigte Zytokin-/Chemokin-Expression zur Folge. Möglicherweise missbraucht das Influenza-A-Virus die Zytokin-/Chemokin-Expression für die Regulation der Virus-Replikation, wie es z.B. bei TRAIL der Fall ist (Wurzer et al. 2004). Nach Virus-Infektion wird der proapoptotische Faktor TRAIL vermehrt exprimiert, welcher die Induktion der Apoptose und Freisetzung der viralen RNP-Komplexe garantiert.

Zusammenfassung

Bisher wurden in Säugetierzellen vier mitogen aktivierbare Protein-Kinase- (MAPK) Kaskaden identifiziert, die in der Aktivierung von JNK, ERK1/2, p38 und ERK5 resultieren und eine grundlegende Rolle in der Zellteilung, Differenzierung, Immunantwort oder Überleben von Zellen spielen. Alle vier MAPK-Signalwege werden durch eine Influenza-A-Virus-Infektion aktiviert. Während die JNK-MAPK-Kaskade in die Kontrolle der antiviralen Typ-I-IFN-Induktion involviert ist, unterstützt der ERK1/2-MAPK-Signalweg die virale Vermehrung, indem er den viralen RNP-Export aus dem Zellkern kontrolliert.

Über die Aktivierung und Funktion der p38- und ERK5-MAPK in Influenza-A-Virus infizierten Zellen war bisher nur sehr wenig bekannt. Die Aufgabe dieser Arbeit war daher, die Rolle dieser beiden MAPK-Kaskaden in Influenza-A-Virus infizierten Zellen im Detail zu untersuchen. Im Verlauf der Arbeit wurde gezeigt, dass Influenza-A-Viren die Aktivierung von p38 durch die Aktivatoren MKK3 und MKK6 in permissiven und nicht-permissiven Zell-Linien induziert. Ebenfalls konnte erstmals eine ERK5-Aktivierung nach Virus-Infektion demonstriert werden. Durch Stimulation mit RNA, die als Äquivalent für eine virale RNA-Akkumulation während der Replikation genutzt wurde, konnte für beide MAPK eine RNA-abhängige Aktivierung aufgezeigt werden.

Inhibition des MKK3/6-p38-Signalweges in infizierten Zellen durch dominant-negative MKK6 oder p38-Inhibitoren resultiert in deutlich reduzierten Titern an Nachkommen-Viren. Die Manipulation der Virus-induzierte Aktivierung von ERK5 oder des Aktivators MEK5 durch Expression von dominant-negativen Mutanten, antisense- oder shRNA-Konstrukten beeinflusste weder die Effizienz der Virus-Replikation, noch die antivirale Antwort auf die Virus-Infektion. Dieses Ergebnis identifizierte den ERK5-Signalweg als erstes Beispiel eines Influenza-A-Virus-induzierten Signalprozesses, welcher nicht mit der Virus-Vermehrung interferiert.

Die p38- und ERK5-Aktivierung erfolgt prädominant durch Akkumulation viraler RNA in infizierten Zellen. Die Aktivierung von p38 wird durch die RNA-Sensoren TLR7 und RIG-I, aber nicht TLR3 vermittelt. Während die Blockade der p38-Kaskade keinen Effekt auf die Akkumulation viraler Proteine hatte, konnte ein verspäteter Export der viralen RNP-Komplexe beobachtet werden. Die p38-Kaskade fördert die Virus-induzierte Synthese und Expression von etlichen Zytokinen und Chemokinen, eingeschlossen des proapoptotischen Faktors TRAIL. Es wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass TRAIL die Kaspase-aktivität induziert, was wiederum den viralen RNP-Export beeinflusst. Die Inhibition des

RNP-Exportes durch Inhibition der p38-Kaskade korrelierte aber nicht mit einer Änderung der Kaspaseaktivität in den infizierten Zellen. Dies deutet an, dass p38 den RNP-Export über einen anderen Mechanismus regulieren könnte. Zusammenfassend reguliert der MKK6/p38-Signalweg die Virus-induzierte Zytokin-/Chemokin-Synthese und -Expression und wird für eine effiziente Virus-Replikation benötigt, höchstwahrscheinlich über einen supportiven Effekt auf den RNP-Export.

Summary

Four mitogen-activated protein kinases (MAPK) cascades leading to the activation of the MAPKs JNK, ERK1/2, p38 und ERK5 have been identified in mammalian cells so far. All four MAPKs are activated upon influenza A virus infection. While the JNK MAPK cascade is involved in the control of the typ I IFN induction and thus has an antiviral function, the ERK1/2-MAPK pathway supports viral propagation, because it controls viral RNP export from the nucleus.

Until now only little is known about activation and function of the p38- and ERK5-MAPK in influenza A virus infected cells. In this work it was shown that influenza A viruses induce activation of p38 via its upstream activators MKK3 and MKK6 in permissive and non-permissive cell lines. As seen for p38, ERK5 activity is also induced upon productive virus infection. Both MAPKs are activated by stimulation with double-stranded RNA and other RNA species as a mimic for viral RNA accumulation.

Inhibition of the MKK3/6-p38 pathway in infected cells by dominant negative MKK6 or p38 inhibitors resulted in slightly but significantly reduced progeny virus titers. However, interference with virus-induced activation of ERK5 or it's upstream kinase MEK5 by expression of dominant negative mutants, antisense or shRNA constructs does neither affect viral replication efficiencies nor antiviral responses to virus infection. Thus the ERK5 pathway is the first example of an influenza A virus-induced signaling process, which does not interfere with the outcome of virus propagation.

Activation of kinases occurs in response to accumulation of viral RNA in the infected cell and p38 activation involves the RNA sensors TLR7 and RIG-I but not TLR3. While blockade of the p38 cascade had no effect on the accumulation of viral proteins, a delayed export of viral RNP complexes was observed. The p38 kinase cascade promoted virus-induced synthesis and expression of several cytokines and chemokines, including the proapoptotic factor TRAIL. TRAIL was previously shown to induce caspase activity that in turn affects RNP export. However, inhibition of RNP export upon inhibition of the p38 cascade did not correlate with a significant alteration of caspase activity in the infected cell. This indicates that p38 might regulate RNP export by a different mechanism. In summary, the MKK6/p38 pathway regulates virus induced cytokine/chemokine synthesis and expression and is required for efficient virus replication, most likely due to its effect on RNP export.

Literatur

- Abe, J., M. Kusuhara, et al. (1996). "Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase." *J Biol Chem* **271**(28): 16586-90.
- Adams, R. H., A. Porras, et al. (2000). "Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development." *Mol Cell* **6**(1): 109-16.
- Adler, H. S., S. Kubsch, et al. (2007). "Activation of MAP kinase p38 is critical for the cell cycle controlled suppressor function of regulatory T cells." *Blood*.
- 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)." *Embo J* **22**(18): 4646-55.
- Akira, S., K. Takeda, et al. (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." *Nat Immunol* **2**(8): 675-80.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, et al. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." *Nature* **413**(6857): 732-8.
- Allen, M., L. Svensson, et al. (2000). "Deficiency of the stress kinase p38alpha results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells." *J Exp Med* **191**(5): 859-70.
- Altschmied, J. and J. Duschl (1997). "Set of optimized luciferase reporter gene plasmids compatible with widely used CAT vectors." *Biotechniques* **23**(3): 436-8.
- Andrejeva, J., K. S. Childs, et al. (2004). "The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(49): 17264-9.
- Baichwal, V. R. and P. A. Baeuerle (1997). "Activate NF-kappa B or die?" *Curr Biol* **7**(2): R94-6.
- Bancroft, C. T. and T. G. Parslow (2002). "Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza a virus genome." *J Virol* **76**(14): 7133-9.
- Barber, S. A., L. Bruett, et al. (2002). "Visna virus-induced activation of MAPK is required for virus replication and correlates with virus-induced neuropathology." *J Virol* **76**(2): 817-28.
- Barkett, M. and T. D. Gilmore (1999). "Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors." *Oncogene* **18**(49): 6910-24.
- Baudin, F., I. Petit, et al. (2001). "In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein." *Virology* **281**(1): 102-8.
- Bayliss, R., T. Littlewood, et al. (2000). "Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking." *Cell* **102**(1): 99-108.
- Boehme, K. W. and T. Compton (2004). "Innate sensing of viruses by toll-like receptors." *J Virol* **78**(15): 7867-73.
- Boulo, S., H. Akarsu, et al. (2006). "Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes." *Virus Res*.
- Brancho, D., N. Tanaka, et al. (2003). "Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo." *Genes Dev* **17**(16): 1969-78.
- Branger, J., B. van den Blink, et al. (2002). "Anti-inflammatory effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia." *J Immunol* **168**(8): 4070-7.
- 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.
- Bui, M., E. G. Wills, et al. (2000). "Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins." *J Virol* **74**(4): 1781-6.
- Bulavin, D. V. and A. J. Fornace, Jr. (2004). "p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor." *Adv Cancer Res* **92**: 95-118.
- Bulavin, D. V., Y. Higashimoto, et al. (2001). "Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase." *Nature* **411**(6833): 102-7.
- Bulavin, D. V., S. Saito, et al. (1999). "Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation." *Embo J* **18**(23): 6845-54.
- Bullido, R., P. Gomez-Puertas, et al. (2000). "Several protein regions contribute to determine the nuclear and cytoplasmic localization of the influenza A virus nucleoprotein." *J Gen Virol* **81**(Pt 1): 135-42.
- 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." *Anal Biochem* **112**(2): 195-203.
- Buschbeck, M. and A. Ullrich (2005). "The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling." *J Biol Chem* **280**(4): 2659-67.
- Cai, Y., Y. Liu, et al. (2007). "Suppression of coronavirus replication by inhibition of the MEK signaling pathway." *J Virol* **81**(2): 446-56.

- Chen, W., P. A. Calvo, et al. (2001). "A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death." *Nat Med* **7**(12): 1306-12.
- Chen, Z. and R. M. Krug (2000). "Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells." *Trends Microbiol* **8**(8): 376-83.
- Chen, Z., Y. Li, et al. (1999). "Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery." *Embo J* **18**(8): 2273-83.
- Cheung, C. Y., L. L. Poon, et al. (2002). "Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease?" *Lancet* **360**(9348): 1831-7.
- Chien, C. Y., Y. Xu, et al. (2004). "Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode." *Biochemistry* **43**(7): 1950-62.
- Choi, A. M. and D. B. Jacoby (1992). "Influenza virus A infection induces interleukin-8 gene expression in human airway epithelial cells." *FEBS Lett* **309**(3): 327-9.
- Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." *Biochem J* **326** (Pt 1): 1-16.
- Compans, R. W., J. Content, et al. (1972). "Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus." *J Virol* **10**(4): 795-800.
- Conti, E., C. W. Muller, et al. (2006). "Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport." *Curr Opin Struct Biol* **16**(2): 237-44.
- Conze, D., J. Lumsden, et al. (2000). "Activation of p38 MAP kinase in T cells facilitates the immune response to the influenza virus." *Mol Immunol* **37**(9): 503-13.
- Cooray, S., L. Jin, et al. (2005). "The involvement of survival signaling pathways in rubella-virus induced apoptosis." *Virol J* **2**: 1.
- Crews, C. M., A. A. Alessandrini, et al. (1991). "Mouse Erk-1 gene product is a serine/threonine protein kinase that has the potential to phosphorylate tyrosine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(19): 8845-9.
- 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." *Traffic* **6**(3): 205-13.
- Cuenda, A., J. Rouse, et al. (1995). "SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1." *FEBS Lett* **364**(2): 229-33.
- Davis, R. J. (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases." *Cell* **103**(2): 239-52.
- Deak, M., A. D. Clifton, et al. (1998). "Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB." *Embo J* **17**(15): 4426-41.
- Diebold, S. S., T. Kaisho, et al. (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." *Science* **303**(5663): 1529-31.
- Diebold, S. S., M. Montoya, et al. (2003). "Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers." *Nature* **424**(6946): 324-8.
- 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.
- Dinev, D., B. W. Jordan, et al. (2001). "Extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) is required for the differentiation of muscle cells." *EMBO Rep* **2**(9): 829-34.
- Dodeller, F., A. Skapenko, et al. (2005). "The p38 mitogen-activated protein kinase regulates effector functions of primary human CD4 T cells." *Eur J Immunol* **35**(12): 3631-42.
- Dong, C., R. J. Davis, et al. (2002). "MAP kinases in the immune response." *Annu Rev Immunol* **20**: 55-72.
- Doza, Y. N., A. Cuenda, et al. (1995). "Activation of the MAP kinase homologue RK requires the phosphorylation of Thr-180 and Tyr-182 and both residues are phosphorylated in chemically stressed KB cells." *FEBS Lett* **364**(2): 223-8.
- Dwivedi, P. P., C. S. Hii, et al. (2002). "Role of MAP kinases in the 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced transactivation of the rat cytochrome P450C24 (CYP24) promoter. Specific functions for ERK1/ERK2 and ERK5." *J Biol Chem* **277**(33): 29643-53.
- Edelmann, K. H., S. Richardson-Burns, et al. (2004). "Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections?" *Virology* **322**(2): 231-8.
- Ehrling, C., W. S. Lai, et al. (2007). "Regulation of Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) mRNA Stability by TNF- α Involves Activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 Cascade." *J Immunol* **178**(5): 2813-26.
- 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." *FEBS Lett* **567**(2-3): 230-8.
- Ehrhardt, C., H. Marjuki, et al. (2006). "Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence." *Cell Microbiol* **8**(8): 1336-48.
- Elton, D., M. Simpson-Holley, et al. (2001). "Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway." *J Virol* **75**(1): 408-19.

- Enami, K., T. A. Sato, et al. (1994). "Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein." *J Virol* **68**(3): 1432-7.
- Enami, M., G. Sharma, et al. (1991). "An influenza virus containing nine different RNA segments." *Virology* **185**(1): 291-8.
- English, J., G. Pearson, et al. (1999). "New insights into the control of MAP kinase pathways." *Exp Cell Res* **253**(1): 255-70.
- English, J. M., G. Pearson, et al. (1998). "Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases." *J Biol Chem* **273**(7): 3854-60.
- English, J. M., G. Pearson, et al. (1999). "Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control." *J Biol Chem* **274**(44): 31588-92.
- English, J. M., C. A. Vanderbilt, et al. (1995). "Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms." *J Biol Chem* **270**(48): 28897-902.
- Enslin, H., J. Raingeaud, et al. (1998). "Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6." *J Biol Chem* **273**(3): 1741-8.
- Esparis-Ogando, A., E. Diaz-Rodriguez, et al. (2002). "Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2." *Mol Cell Biol* **22**(1): 270-85.
- Eyers, P. A., M. Craxton, et al. (1998). "Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution." *Chem Biol* **5**(6): 321-8.
- Eyers, P. A., I. P. van den, et al. (1999). "Use of a drug-resistant mutant of stress-activated protein kinase 2a/p38 to validate the in vivo specificity of SB 203580." *FEBS Lett* **451**(2): 191-6.
- Faleiro, L. and Y. Lazebnik (2000). "Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier." *J Cell Biol* **151**(5): 951-9.
- Fernandez-Sesma, A., S. Marukian, et al. (2006). "Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein." *J Virol* **80**(13): 6295-304.
- Fijen, J. W., J. E. Tulleken, et al. (2002). "Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase: dose-dependent suppression of leukocyte and endothelial response after endotoxin challenge in humans." *Crit Care Med* **30**(4): 841-5.
- Fischer, U. and K. Schulze-Osthoff (2005). "Apoptosis-based therapies and drug targets." *Cell Death Differ* **12 Suppl 1**: 942-61.
- Fitzgerald, K. A., S. M. McWhirter, et al. (2003). "IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway." *Nat Immunol* **4**(5): 491-6.
- Flick, R., G. Neumann, et al. (1996). "Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure." *Rna* **2**(10): 1046-57.
- Fox, T., J. T. Coll, et al. (1998). "A single amino acid substitution makes ERK2 susceptible to pyridinyl imidazole inhibitors of p38 MAP kinase." *Protein Sci* **7**(11): 2249-55.
- Galanis, A., S. H. Yang, et al. (2001). "Selective targeting of MAPKs to the ETS domain transcription factor SAP-1." *J Biol Chem* **276**(2): 965-73.
- Gale, M., Jr., S. L. Tan, et al. (2000). "Translational control of viral gene expression in eukaryotes." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2): 239-80.
- Garcia-Sastre, A. (2001). "Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses." *Virology* **279**(2): 375-84.
- Garcia-Sastre, A. (2004). "Identification and characterization of viral antagonists of type I interferon in negative-strand RNA viruses." *Curr Top Microbiol Immunol* **283**: 249-80.
- Ge, B., H. Gram, et al. (2002). "MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha." *Science* **295**(5558): 1291-4.
- Ge, B., X. Xiong, et al. (2003). "TAB1beta (transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1-binding protein 1beta), a novel splicing variant of TAB1 that interacts with p38alpha but not TAK1." *J Biol Chem* **278**(4): 2286-93.
- Gitlin, L., W. Barchet, et al. (2006). "Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(22): 8459-64.
- Goebeler, M., K. Kilian, et al. (1999). "The MKK6/p38 stress kinase cascade is critical for tumor necrosis factor-alpha-induced expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in endothelial cells." *Blood* **93**(3): 857-65.
- Goh, K. C., S. J. Haque, et al. (1999). "p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons." *Embo J* **18**(20): 5601-8.
- 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 Biol Chem* **280**(7): 5571-80.
- Gujuluva, C. N., A. Kundu, et al. (1994). "Abortive replication of influenza virus A/WSN/33 in HeLa229 cells: defective viral entry and budding processes." *Virology* **204**(2): 491-505.

- Gum, R. J., M. M. McLaughlin, et al. (1998). "Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket." *J Biol Chem* **273**(25): 15605-10.
- Gum, R. J. and P. R. Young (1999). "Identification of two distinct regions of p38 MAPK required for substrate binding and phosphorylation." *Biochem Biophys Res Commun* **266**(1): 284-9.
- Haeryfar, S. M. and D. W. Hoskin (2001). "Selective pharmacological inhibitors reveal differences between Thy-1- and T cell receptor-mediated signal transduction in mouse T lymphocytes." *Int Immunopharmacol* **1**(4): 689-98.
- Hale, B. G., D. Jackson, et al. (2006). "Influenza A virus NS1 protein binds p85beta and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(38): 14194-9.
- Hale, K. K., D. Trollinger, et al. (1999). "Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages." *J Immunol* **162**(7): 4246-52.
- Haller, O., M. Frese, et al. (1998). "Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses." *Rev Sci Tech* **17**(1): 220-30.
- Haller, O., G. Kochs, et al. (2006). "The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses." *Virology* **344**(1): 119-30.
- Han, J., Y. Jiang, et al. (1997). "Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation." *Nature* **386**(6622): 296-9.
- Han, J., J. D. Lee, et al. (1994). "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells." *Science* **265**(5173): 808-11.
- Hayashi, M., S. W. Kim, et al. (2004). "Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure." *J Clin Invest* **113**(8): 1138-48.
- Hayashi, M. and J. D. Lee (2004). "Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice." *J Mol Med* **82**(12): 800-8.
- Hayashi, M., R. I. Tapping, et al. (2001). "BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase." *J Biol Chem* **276**(12): 8631-4.
- Hazzalin, C. A. and L. C. Mahadevan (2002). "MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch?" *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(1): 30-40.
- Heil, F., H. Hemmi, et al. (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." *Science* **303**(5663): 1526-9.
- Heinz, S., V. Haehnel, et al. (2003). "Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice." *J Biol Chem* **278**(24): 21502-9.
- 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.
- Hiscott, J., R. Lin, et al. (2006). "MasterCARD: a priceless link to innate immunity." *Trends Mol Med* **12**(2): 53-6.
- Holbrook, N. J., Y. Liu, et al. (1996). "Signaling events controlling the molecular response to genotoxic stress." *Exs* **77**: 273-88.
- Hornung, V., J. Ellegast, et al. (2006). "5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I." *Science* **314**(5801): 994-7.
- Hu, M. C., Y. P. Wang, et al. (1999). "Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines." *J Biol Chem* **274**(11): 7095-102.
- Ihle, J. N. (2000). "The challenges of translating knockout phenotypes into gene function." *Cell* **102**(2): 131-4.
- Imamoto, N., T. Shimamoto, et al. (1995). "In vivo evidence for involvement of a 58 kDa component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import." *Embo J* **14**(15): 3617-26.
- 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.
- Jiang, Y., C. Chen, et al. (1996). "Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta)." *J Biol Chem* **271**(30): 17920-6.
- Jiang, Y., H. Gram, et al. (1997). "Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta." *J Biol Chem* **272**(48): 30122-8.
- Johnson, G. L. and R. Lapadat (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." *Science* **298**(5600): 1911-2.
- Johnson, R. A., X. L. Ma, et al. (2001). "The role of MKK1/2 kinase activity in human cytomegalovirus infection." *J Gen Virol* **82**(Pt 3): 493-7.
- Juang, Y. T., W. Lowther, et al. (1998). "Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(17): 9837-42.
- Julkunen, I., K. Melen, et al. (2000). "Inflammatory responses in influenza A virus infection." *Vaccine* **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." *Cytokine Growth Factor Rev* **12**(2-3): 171-80.

- Juretic, N., J. F. Santibanez, et al. (2001). "ERK 1,2 and p38 pathways are involved in the proliferative stimuli mediated by urokinase in osteoblastic SaOS-2 cell line." *J Cell Biochem* **83**(1): 92-8.
- Kamakura, S., T. Moriguchi, et al. (1999). "Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus." *J Biol Chem* **274**(37): 26563-71.
- Karin, M., Z. Liu, et al. (1997). "AP-1 function and regulation." *Curr Opin Cell Biol* **9**(2): 240-6.
- Kasler, H. G., J. Victoria, et al. (2000). "ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain." *Mol Cell Biol* **20**(22): 8382-9.
- Kato, H., S. Sato, et al. (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." *Immunity* **23**(1): 19-28.
- Kato, H., O. Takeuchi, et al. (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." *Nature* **441**(7089): 101-5.
- Kato, Y., T. H. Chao, et al. (2000). "Role of BMK1 in regulation of growth factor-induced cellular responses." *Immunol Res* **21**(2-3): 233-7.
- Kato, Y., V. V. Kravchenko, et al. (1997). "BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C." *Embo J* **16**(23): 7054-66.
- Kato, Y., R. I. Tapping, et al. (1998). "Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor." *Nature* **395**(6703): 713-6.
- Kawai, T. and S. Akira (2006). "Innate immune recognition of viral infection." *Nat Immunol* **7**(2): 131-7.
- Kawai, T. and S. Akira (2006). "TLR signaling." *Cell Death Differ* **13**(5): 816-25.
- Kawai, T., S. Sato, et al. (2004). "Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6." *Nat Immunol* **5**(10): 1061-8.
- Keesler, G. A., J. Bray, et al. (1998). "Purification and activation of recombinant p38 isoforms alpha, beta, gamma, and delta." *Protein Expr Purif* **14**(2): 221-8.
- Klumpp, K., R. W. Ruigrok, et al. (1997). "Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure." *Embo J* **16**(6): 1248-57.
- Knobil, K., A. M. Choi, et al. (1998). "Role of oxidants in influenza virus-induced gene expression." *Am J Physiol* **274**(1 Pt 1): L134-42.
- Kondoh, K., K. Terasawa, et al. (2006). "Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms." *Mol Cell Biol* **26**(5): 1679-90.
- Kong, X., H. San Juan, et al. (2004). "ERK-1/2 activity is required for efficient RSV infection." *FEBS Lett* **559**(1-3): 33-8.
- Kozak, M. (1986). "Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes." *Cell* **44**(2): 283-92.
- Krug, R. M. and R. A. Lamb (2001). "Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication." *Fields Virology*, 4th edition.
- Kudo, N., N. Matsumori, et al. (1999). "Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9112-7.
- Kudo, N., B. Wolff, et al. (1998). "Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1." *Exp Cell Res* **242**(2): 540-7.
- 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, S., P. C. McDonnell, et al. (1997). "Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles." *Biochem Biophys Res Commun* **235**(3): 533-8.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiol Rev* **81**(2): 807-69.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Leblanc, J. F., L. Cohen, et al. (1990). "Synergism between distinct enhancer domains in viral induction of the human beta interferon gene." *Mol Cell Biol* **10**(8): 3987-93.
- Lechner, C., M. A. Zahalka, et al. (1996). "ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9): 4355-9.
- Lee, D. C., C. Y. Cheung, et al. (2005). "p38 mitogen-activated protein kinase-dependent hyperinduction of tumor necrosis factor alpha expression in response to avian influenza virus H5N1." *J Virol* **79**(16): 10147-54.
- Lee, J. C., S. Kassib, et al. (1999). "p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials." *Pharmacol Ther* **82**(2-3): 389-97.
- Lee, J. C., J. T. Laydon, et al. (1994). "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." *Nature* **372**(6508): 739-46.

- Lee, J. D., R. J. Ulevitch, et al. (1995). "Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase." *Biochem Biophys Res Commun* **213**(2): 715-24.
- Lenormand, P., J. M. Brondello, et al. (1998). "Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins." *J Cell Biol* **142**(3): 625-33.
- Li, Y., S. Batra, et al. (2005). "Activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) 3 and MKK6 by type I interferons." *J Biol Chem* **280**(11): 10001-10.
- Li, Z., Y. Jiang, et al. (1996). "The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases." *Biochem Biophys Res Commun* **228**(2): 334-40.
- Lin, R., Y. Mamane, et al. (1999). "Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains." *Mol Cell Biol* **19**(4): 2465-74.
- Lindemann, D., E. Patriquin, et al. (1997). "Versatile retrovirus vector systems for regulated gene expression in vitro and in vivo." *Mol Med* **3**(7): 466-76.
- Lisnock, J., A. Tebben, et al. (1998). "Molecular basis for p38 protein kinase inhibitor specificity." *Biochemistry* **37**(47): 16573-81.
- Liu, B., M. Fang, et al. (2001). "Involvement of JNK-mediated pathway in EGF-mediated protection against paclitaxel-induced apoptosis in SiHa human cervical cancer cells." *Br J Cancer* **85**(2): 303-11.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-8.
- Lu, H. T., D. D. Yang, et al. (1999). "Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice." *Embo J* **18**(7): 1845-57.
- Lu, Y., M. Wambach, et al. (1995). "Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor." *Virology* **214**(1): 222-8.
- Ludwig, S. (2007). "Exploited defense: how influenza viruses take advantage of antiviral signaling responses." *Future Virol.*
- Ludwig, S. (2007). "Influenza viruses and MAP kinase cascades - Novel targets for an antiviral intervention?" *Signal Transduction.*
- 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., A. Hoffmeyer, et al. (1998). "The stress inducer arsenite activates mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 via a MAPK kinase 6/p38-dependent pathway." *J Biol Chem* **273**(4): 1917-22.
- Ludwig, S., O. Planz, et al. (2003). "Influenza-virus-induced signaling cascades: targets for antiviral therapy?" *Trends Mol Med* **9**(2): 46-52.
- Ludwig, S., S. Pleschka, et al. (2006). "Ring the alarm bells: signalling and apoptosis in influenza virus infected cells." *Cell Microbiol* **8**(3): 375-86.
- Ludwig, S., X. Wang, et al. (2002). "The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors." *J Virol* **76**(21): 11166-71.
- Ludwig, S., T. Wolff, et al. (2004). "MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants." *FEBS Lett* **561**(1-3): 37-43.
- Lund, J. M., L. Alexopoulou, et al. (2004). "Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(15): 5598-603.
- Luo, H., B. Yanagawa, et al. (2002). "Coxsackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway." *J Virol* **76**(7): 3365-73.
- Majde, J. A. (2000). "Viral double-stranded RNA, cytokines, and the flu." *J Interferon Cytokine Res* **20**(3): 259-72.
- Maniatis, T., J. V. Falvo, et al. (1998). "Structure and function of the interferon-beta enhanceosome." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**: 609-20.
- Marinissen, M. J., M. Chiariello, et al. (1999). "A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5." *Mol Cell Biol* **19**(6): 4289-301.
- 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 Calpha-mediated activation of ERK signaling." *J Biol Chem* **281**(24): 16707-15.
- Markowitz, D., S. Goff, et al. (1988). "A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids." *J Virol* **62**(4): 1120-4.
- Martin, K. and A. Helenius (1991). "Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import." *Cell* **67**(1): 117-30.
- Martin, K. and A. Helenius (1991). "Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus." *J Virol* **65**(1): 232-44.

- Maruoka, S., S. Hashimoto, et al. (2003). "ASK1 regulates influenza virus infection-induced apoptotic cell death." *Biochem Biophys Res Commun* **307**(4): 870-6.
- Matsuda, S., T. Moriguchi, et al. (1998). "T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A." *J Biol Chem* **273**(20): 12378-82.
- Matsumoto, M., K. Funami, et al. (2004). "Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses." *Microbiol Immunol* **48**(3): 147-54.
- Mazur, I., W. J. Wurzer, et al. (2007). "Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity." *Cell Microbiol*.
- McLaughlin, M. M., S. Kumar, et al. (1996). "Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase." *J Biol Chem* **271**(14): 8488-92.
- Melen, K., R. Fagerlund, et al. (2003). "Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein." *J Biol Chem* **278**(30): 28193-200.
- Min, J. Y. and R. M. Krug (2006). "The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(18): 7100-5.
- Mizumura, K., S. Hashimoto, et al. (2003). "Role of mitogen-activated protein kinases in influenza virus induction of prostaglandin E2 from arachidonic acid in bronchial epithelial cells." *Clin Exp Allergy* **33**(9): 1244-51.
- Mok, C. K., D. C. Lee, et al. (2007). "Differential onset of apoptosis in influenza A virus H5N1- and H1N1-infected human blood macrophages." *J Gen Virol* **88**(Pt 4): 1275-80.
- 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.
- Mulloy, R., S. Salinas, et al. (2003). "Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade." *Oncogene* **22**(35): 5387-98.
- Mundt, B., F. Kuhnel, et al. (2003). "Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis." *Faseb J* **17**(1): 94-6.
- Nakamura, K. and G. L. Johnson (2003). "PB1 domains of MEKK2 and MEKK3 interact with the MEK5 PB1 domain for activation of the ERK5 pathway." *J Biol Chem* **278**(39): 36989-92.
- Nakamura, K., M. T. Uhlik, et al. (2006). "PB1 domain-dependent signaling complex is required for extracellular signal-regulated kinase 5 activation." *Mol Cell Biol* **26**(6): 2065-79.
- 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)." *Mol Cell Biol* **10**(8): 4139-45.
- Nayak, D. P., E. K. Hui, et al. (2004). "Assembly and budding of influenza virus." *Virus Res* **106**(2): 147-65.
- Nemeroff, M. E., X. Y. Qian, et al. (1995). "The influenza virus NS1 protein forms multimers in vitro and in vivo." *Virology* **212**(2): 422-8.
- Neumann, G., M. R. Castrucci, et al. (1997). "Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein." *J Virol* **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.
- New, L., Y. Jiang, et al. (2003). "Regulation of PRAK subcellular location by p38 MAP kinases." *Mol Biol Cell* **14**(6): 2603-16.
- New, L., Y. Jiang, et al. (1998). "PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase." *Embo J* **17**(12): 3372-84.
- Nicol, R. L., N. Frey, et al. (2001). "Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy." *Embo J* **20**(11): 2757-67.
- 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.
- Nishida, E. and Y. Gotoh (1993). "The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways." *Trends Biochem Sci* **18**(4): 128-31.
- Nishimoto, S., M. Kusakabe, et al. (2005). "Requirement of the MEK5-ERK5 pathway for neural differentiation in *Xenopus* embryonic development." *EMBO Rep* **6**(11): 1064-9.
- Nishimoto, S. and E. Nishida (2006). "MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2." *EMBO Rep* **7**(8): 782-6.
- Noda, T., H. Sagara, et al. (2006). "Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles." *Nature* **439**(7075): 490-2.
- 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." *Embo J* **17**(1): 288-96.
- Olschlager, V., S. Pleschka, et al. (2004). "Lung-specific expression of active Raf kinase results in increased mortality of influenza A virus-infected mice." *Oncogene* **23**(39): 6639-46.

- 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. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." *Oncogene* **18**(49): 6853-66.
- Palamara, A. T., L. Nencioni, et al. (2005). "Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol." *J Infect Dis* **191**(10): 1719-29.
- Park, J. M., F. R. Greten, et al. (2002). "Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition." *Science* **297**(5589): 2048-51.
- Pearson, G., J. M. English, et al. (2001). "ERK5 and ERK2 cooperate to regulate NF-kappaB and cell transformation." *J Biol Chem* **276**(11): 7927-31.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* **22**(2): 153-83.
- Pi, X., C. Yan, et al. (2004). "Big mitogen-activated protein kinase (BMK1)/ERK5 protects endothelial cells from apoptosis." *Circ Res* **94**(3): 362-9.
- Pichlmair, A., O. Schulz, et al. (2006). "RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates." *Science* **314**(5801): 997-1001.
- Planz, O., S. Pleschka, et al. (2001). "MEK-specific inhibitor U0126 blocks spread of Borna disease virus in cultured cells." *J Virol* **75**(10): 4871-7.
- Plath, K., K. Engel, et al. (1994). "Characterization of the proline-rich region of mouse MAPKAP kinase 2: influence on catalytic properties and binding to the c-abl SH3 domain in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* **203**(2): 1188-94.
- Pleschka, S., T. Wolff, et al. (2001). "Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade." *Nat Cell Biol* **3**(3): 301-5.
- Porrás, A., S. Zuluaga, et al. (2004). "P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli." *Mol Biol Cell* **15**(2): 922-33.
- Portincasa, P., G. Conti, et al. (1990). "Abortive replication of influenza A viruses in HeLa 229 cells." *Virus Res* **18**(1): 29-40.
- 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., C. Y. Chien, et al. (1995). "An amino-terminal polypeptide fragment of the influenza virus NS1 protein possesses specific RNA-binding activity and largely helical backbone structure." *Rna* **1**(9): 948-56.
- Raingeaud, J., S. Gupta, et al. (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." *J Biol Chem* **270**(13): 7420-6.
- Raingeaud, J., A. J. Whitmarsh, et al. (1996). "MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway." *Mol Cell Biol* **16**(3): 1247-55.
- Raviv, Z., E. Kalie, et al. (2004). "MEK5 and ERK5 are localized in the nuclei of resting as well as stimulated cells, while MEKK2 translocates from the cytosol to the nucleus upon stimulation." *J Cell Sci* **117**(Pt 9): 1773-84.
- Razvi, E. S. and R. M. Welsh (1995). "Apoptosis in viral infections." *Adv Virus Res* **45**: 1-60.
- Regan, C. P., W. Li, et al. (2002). "Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14): 9248-53.
- Rehli, M. (2002). "Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression." *Trends Immunol* **23**(8): 375-8.
- 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.
- Rincon, M. (2001). "MAP-kinase signaling pathways in T cells." *Curr Opin Immunol* **13**(3): 339-45.
- Rincon, M., H. Enslen, et al. (1998). "Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway." *Embo J* **17**(10): 2817-29.
- Robinson, M. J. and M. H. Cobb (1997). "Mitogen-activated protein kinase pathways." *Curr Opin Cell Biol* **9**(2): 180-6.
- Ronni, T., S. Matikainen, et al. (1997). "Regulation of IFN-alpha/beta, MxA, 2',5'-oligoadenylate synthetase, and HLA gene expression in influenza A-infected human lung epithelial cells." *J Immunol* **158**(5): 2363-74.
- 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.
- Rouse, J., P. Cohen, et al. (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." *Cell* **78**(6): 1027-37.

- Sanchez-Prieto, R., J. M. Rojas, et al. (2000). "A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents." Cancer Res **60**(9): 2464-72.
- Sareneva, T., S. Matikainen, et al. (1998). "Influenza A virus-induced IFN-alpha/beta and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma gene expression in human T cells." J Immunol **160**(12): 6032-8.
- Sarkar, D., Z. Z. Su, et al. (2002). "mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 10054-9.
- Schmitt, A. P. and R. A. Lamb (2005). "Influenza virus assembly and budding at the viral budzone." Adv Virus Res **64**: 383-416.
- 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." Arch Virol **119**(1-2): 111-8.
- Schultz-Cherry, S., N. Dybdahl-Sissoko, et al. (2001). "Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells." J Virol **75**(17): 7875-81.
- Schumann, M. and M. Dobbstein (2006). "Adenovirus-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylation during the late phase of infection enhances viral protein levels and virus progeny." Cancer Res **66**(3): 1282-8.
- 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.
- Sen, G. C. (2000). "Novel functions of interferon-induced proteins." Semin Cancer Biol **10**(2): 93-101.
- Servant, M. J., N. Grandvaux, et al. (2003). "Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA." J Biol Chem **278**(11): 9441-7.
- Servant, M. J., B. ten Oever, et al. (2001). "Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3." J Biol Chem **276**(1): 355-63.
- Seternes, O. M., B. Johansen, et al. (2002). "Both binding and activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) play essential roles in regulation of the nucleocytoplasmic distribution of MAPK-activated protein kinase 5 by cellular stress." Mol Cell Biol **22**(20): 6931-45.
- Seyfried, J., X. Wang, et al. (2005). "A novel mitogen-activated protein kinase docking site in the N terminus of MEK5alpha organizes the components of the extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway." Mol Cell Biol **25**(22): 9820-8.
- 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." J Virol **62**(7): 2285-90.
- Sharma-Walia, N., H. H. Krishnan, et al. (2005). "ERK1/2 and MEK1/2 induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) early during infection of target cells are essential for expression of viral genes and for establishment of infection." J Virol **79**(16): 10308-29.
- Sharma, S., B. R. tenOever, et al. (2003). "Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway." Science **300**(5622): 1148-51.
- Shimizu, K., A. Iguchi, et al. (1999). "Influenza virus inhibits cleavage of the HSP70 pre-mRNAs at the polyadenylation site." Virology **254**(2): 213-9.
- 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." Microbes Infect **8**(8): 2013-20.
- Smith, J. A., C. E. Poteet-Smith, et al. (2000). "Creation of a stress-activated p90 ribosomal S6 kinase. The carboxyl-terminal tail of the MAPK-activated protein kinases dictates the signal transduction pathway in which they function." J Biol Chem **275**(41): 31588-93.
- Sohn, S. J., B. K. Sarvis, et al. (2002). "ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression." J Biol Chem **277**(45): 43344-51.
- Soldani, C. and A. I. Scovassi (2002). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update." Apoptosis **7**(4): 321-8.
- Stark, G. R., I. M. Kerr, et al. (1998). "How cells respond to interferons." Annu Rev Biochem **67**: 227-64.
- Stegmann, T., J. M. White, et al. (1990). "Intermediates in influenza induced membrane fusion." Embo J **9**(13): 4231-41.
- Stein, B., M. X. Yang, et al. (1997). "p38-2, a novel mitogen-activated protein kinase with distinct properties." J Biol Chem **272**(31): 19509-17.
- Sturgill, T. W. and J. Wu (1991). "Recent progress in characterization of protein kinase cascades for phosphorylation of ribosomal protein S6." Biochim Biophys Acta **1092**(3): 350-7.

- Takebe, Y., M. Seiki, et al. (1988). "SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat." *Mol Cell Biol* **8**(1): 466-72.
- Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." *Int Immunol* **17**(1): 1-14.
- Takeda, K., T. Kaisho, et al. (2003). "Toll-like receptors." *Annu Rev Immunol* **21**: 335-76.
- Takekawa, M. and H. Saito (1998). "A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK." *Cell* **95**(4): 521-30.
- Talon, J., C. M. Horvath, et al. (2000). "Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein." *J Virol* **74**(17): 7989-96.
- Tamura, K., T. Sudo, et al. (2000). "Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis." *Cell* **102**(2): 221-31.
- Tan, S. L. and M. G. Katze (1998). "Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase." *J Interferon Cytokine Res* **18**(9): 757-66.
- Tanaka, N., M. Kamanaka, et al. (2002). "Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis." *EMBO Rep* **3**(8): 785-91.
- Tanos, T., M. J. Marinissen, et al. (2005). "Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role in the AP-1 response to UV light." *J Biol Chem* **280**(19): 18842-52.
- Taxman, D. J., L. R. Livingstone, et al. (2006). "Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors." *BMC Biotechnol* **6**: 7.
- Terasawa, K., K. Okazaki, et al. (2003). "Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway." *Genes Cells* **8**(3): 263-73.
- Thanos, D. and T. Maniatis (1995). "Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome." *Cell* **83**(7): 1091-100.
- Theofilopoulos, A. N., R. Baccala, et al. (2005). "Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity." *Annu Rev Immunol* **23**: 307-36.
- Tong, L., S. Pav, et al. (1997). "A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket." *Nat Struct Biol* **4**(4): 311-6.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4.
- Uchida, N., K. Ohyama, et al. (2007). "Effects of mitogen-activated protein kinase inhibitors on tumor necrosis factor-alpha gene expression and apoptosis induction in cultured human fetal membrane chorion cells infected with influenza virus." *Intervirology* **50**(2): 99-107.
- van den Blink, B., J. Branger, et al. (2004). "P38 mitogen activated protein kinase is involved in the downregulation of granulocyte CXC chemokine receptors 1 and 2 during human endotoxemia." *J Clin Immunol* **24**(1): 37-41.
- Visconti, R., M. Gadina, et al. (2000). "Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity." *Blood* **96**(5): 1844-52.
- Wada, T. and J. M. Penninger (2004). "Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation." *Oncogene* **23**(16): 2838-49.
- Wang, C., K. Takeuchi, et al. (1993). "Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block." *J Virol* **67**(9): 5585-94.
- Wang, P., P. Palese, et al. (1997). "The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal." *J Virol* **71**(3): 1850-6.
- Wang, W., K. Riedel, et al. (1999). "RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids." *Rna* **5**(2): 195-205.
- Wang, X., M. Li, et al. (2000). "Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon." *J Virol* **74**(24): 11566-73.
- Wang, X., A. J. Merritt, et al. (2005). "Targeted deletion of mek5 causes early embryonic death and defects in the extracellular signal-regulated kinase 5/myocyte enhancer factor 2 cell survival pathway." *Mol Cell Biol* **25**(1): 336-45.
- Wang, X. and B. Seed (2003). "A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis." *Nucleic Acids Res* **31**(24): e154.
- Wang, X. and C. Tournier (2006). "Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway." *Cell Signal* **18**(6): 753-60.
- Wang, X. S., K. Diener, et al. (1997). "Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem* **272**(38): 23668-74.
- Wang, X. Z. and D. Ron (1996). "Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase." *Science* **272**(5266): 1347-9.
- Waskiewicz, A. J., A. Flynn, et al. (1997). "Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2." *Embo J* **16**(8): 1909-20.

- Watanabe, K., N. Takizawa, et al. (2001). "Inhibition of nuclear export of ribonucleoprotein complexes of influenza virus by leptomycin B." *Virus Res* **77**(1): 31-42.
- Watanabe, N., Y. Nagamatsu, et al. (2005). "Control of body size by SMA-5, a homolog of MAP kinase BMK1/ERK5, in *C. elegans*." *Development* **132**(14): 3175-84.
- Watson, F. L., H. M. Heerssen, et al. (2001). "Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response." *Nat Neurosci* **4**(10): 981-8.
- Weber, F., G. Kochs, et al. (1998). "A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins." *Virology* **250**(1): 9-18.
- Weber, F., V. Wagner, et al. (2006). "Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses." *J Virol* **80**(10): 5059-64.
- Webster, R. G., W. J. Bean, et al. (1992). "Evolution and ecology of influenza A viruses." *Microbiol Rev* **56**(1): 152-79.
- Whittaker, G., M. Bui, et al. (1996). "Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons." *J Virol* **70**(5): 2743-56.
- Whittaker, G., I. Kemler, et al. (1995). "Hyperphosphorylation of mutant influenza virus matrix protein, M1, causes its retention in the nucleus." *J Virol* **69**(1): 439-45.
- Widmann, C., S. Gibson, et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." *Physiol Rev* **79**(1): 143-80.
- 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." *Embo J* **22**(11): 2717-28.
- Wysk, M., D. D. Yang, et al. (1999). "Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3763-8.
- Yan, C., H. Luo, et al. (2001). "Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains." *J Biol Chem* **276**(14): 10870-8.
- Yan, L., J. Carr, et al. (2003). "Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development." *BMC Dev Biol* **3**: 11.
- Yang, C. C., O. I. Ornatsky, et al. (1998). "Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1." *Nucleic Acids Res* **26**(20): 4771-7.
- Yang, S. H., A. Galanis, et al. (1999). "Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factors." *Mol Cell Biol* **19**(6): 4028-38.
- Yang, S. H., A. J. Whitmarsh, et al. (1998). "Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1." *Embo J* **17**(6): 1740-9.
- Yang, X. and D. Gabuzda (1998). "Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and regulates the HIV-1 Vif protein." *J Biol Chem* **273**(45): 29879-87.
- Yang, X. and D. Gabuzda (1999). "Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway." *J Virol* **73**(4): 3460-6.
- Yasuda, J., S. Nakada, et al. (1993). "Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix." *Virology* **196**(1): 249-55.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, et al. (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." *Nat Immunol* **5**(7): 730-7.
- Yosimichi, G., T. Nakanishi, et al. (2001). "CTGF/Hcs24 induces chondrocyte differentiation through a p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), and proliferation through a p44/42 MAPK/extracellular-signal regulated kinase (ERK)." *Eur J Biochem* **268**(23): 6058-65.
- Young, P., P. McDonnell, et al. (1993). "Pyridinyl imidazoles inhibit IL-1 and TNF production at the protein level." *Agents Actions* **39 Spec No**: C67-9.
- Young, P. R., M. M. McLaughlin, et al. (1997). "Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site." *J Biol Chem* **272**(18): 12116-21.
- Yu, F., J. N. Harada, et al. (2007). "Systematic Identification of Cellular Signals Reactivating Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus." *PLoS Pathog* **3**(3): e44.
- Zarubin, T. and J. Han (2005). "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway." *Cell Res* **15**(1): 11-8.
- Zhang, J., K. V. Salojin, et al. (1999). "p38 mitogen-activated protein kinase mediates signal integration of TCR/CD28 costimulation in primary murine T cells." *J Immunol* **162**(7): 3819-29.
- Zhang, S. and M. H. Kaplan (2000). "The p38 mitogen-activated protein kinase is required for IL-12-induced IFN-gamma expression." *J Immunol* **165**(3): 1374-80.
- Zhang, W. and H. T. Liu (2002). "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells." *Cell Res* **12**(1): 9-18.
- Zhirnov, O. P., T. E. Konakova, et al. (2002). "NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis." *J Virol* **76**(4): 1617-25.

Zhou, G., Z. Q. Bao, et al. (1995). "Components of a new human protein kinase signal transduction pathway." J Biol Chem **270**(21): 12665-9.

Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt ...

Herrn Prof. Dr. Stephan Ludwig für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas, seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie die vielen Denkanstöße und Ideen.

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

Allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Herrn PD. Dr. Viktor Wixler für zahlreiche interessante Diskussionen und eine gute Zusammenarbeit, Ludmilla Wixler für Plasmidklonierungen und Mirco Schmolke, Christina Luig, Carina Banning, Carola Will und Viktor Wixler für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

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

All meinen Freunden, dass sie mir ihre Vernachlässigung nicht übel nehmen!

Meinen lieben Eltern und meinem „kleinen“ Brüderchen. Sie haben mich in vielerlei Hinsicht stets unterstützt.

Meinem Freund Igor Mazur für seine „Präsenz“ in allen Lebenslagen.

Erklärung

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, Juli 2007

(Virginia Korte)