
Philipps



Universität
Marburg

Regulation von Apoptose in Ebolavirus-infizierten Zellen

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Judith Olejnik (geb. Küsters)

aus Moers

Marburg/ Lahn 2008

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am: _____

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl
Zweitgutachter: PD Dr. Elke Mühlberger

Tag der mündlichen Prüfung am: _____

1. Einleitung	1
1.1 Apoptose	1
1.1.2.1 Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand induzierte Apoptose/ externer Signalweg	4
1.1.2.2 Regulation der Apoptose an den Mitochondrien/ interner Signalweg	6
1.1.2.3 Die dsRNA-abhängige Proteinkinase R und Apoptose	8
1.1.2.4 Die Rolle der Akt-Kinase in der Apoptoseregulation	10
1.2 Das Ebolavirus	14
1.2.1 Virusaufbau und Verbreitung	14
1.2.2 Hemmung des Interferonsystems durch EBOV	17
1.2.3 Rolle der Apoptose in der Pathogenese	18
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	20
2. Material	21
2.1 Chemikalien und Reagenzien	21
2.2 Molekularbiologische und biochemische Kits	23
2.3 Puffer und Lösungen	23
2.4 Wachstumsmedien für eukaryotische Zelllinien	27
2.5 Eukaryotische Zelllinien	27
2.6 Antikörper	28
2.7 Viren	29
2.8 DNA-Oligonukleotide/ Primer	29
2.9 DNA-/ Proteinmarker	30
2.10 Verbrauchsmaterial	31
2.11 Geräte	31
3. Methoden	33
3.1 Arbeiten mit Zellen	33
3.1.1 Kultivierung und Passagierung von eukaryotischen Zellen	33
3.1.2 Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen	34
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	35
3.1.4 Behandlung von Zellen mit Apoptose-induzierenden Reagenzien	35
3.1.5 Transfektion von poly-IC mittels LipofectamineLTX	36
3.2 Arbeiten mit Viren	36
3.2.1 Infektion von Zellen	36
3.2.2 Anzucht und Isolierung von Ebolavirus und Vesicular-Stomatitis-Virus	37
3.2.3 Anzüchten und Isolierung von Sendaivirus	38
3.2.4 Ultrazentrifugation zur Konzentrierung von Ebolavirus	38
3.2.5 Bestimmung von Virustitern mittels TCID50-Analyse	39
3.2.6 Bestimmung von Virustitern mittels Plaquetest	39
3.2.7 Bestimmung von Virustitern mittels Hämagglutinationstest	40
3.3 Arbeiten mit Proteinen	41
3.3.1 Zellernte für Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Chaps-Puffer	41
3.3.2 Zellernte für Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Cell Extraction Buffer	42
3.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	42
3.3.4 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)	43
3.3.5 Detektion von Proteinen über Antikörperbindung	44
3.3.6 Entfernung gebundener Antikörper von der Membran (Strippen)	46
	I

3.4 Arbeiten mit Nukleinsäuren	47
3.4.1 Isolierung und Aufreinigung von RNA	47
3.4.2 Detektion spezifischer RNA mittels RT-PCR	48
3.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA mittels Agarosegel	49
3.5 Immunfluoreszenzanalyse	50
3.5.1 Infektionsnachweis mittels Immunfluoreszenz	50
3.5.2 Nachweis von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche	51
4. Ergebnisse	52
4.1 Untersuchung von Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand -induzierter Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen	52
4.2 Analyse der mitochondrial induzierten Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen	59
4.2.1 Induktion von Apoptose mittels Camptotecin	59
4.2.1.1 Untersuchung der Bax- und Bcl-2-Level	59
4.2.1.2 Analyse von Caspase- und PARP-Spaltung	66
4.2.2 Induktion von Apoptose durch Infektion mit dem vesikulären Stomatitis-Virus	68
4.3 Untersuchung der Rolle der dsRNA-abhängigen Proteinkinase R in der Apoptoseregulation durch ZEBOV	73
4.3.1 Aktivierung der dsRNA-abhängigen Proteinkinase R über Sendaivirus-Infektion	73
4.3.1.1 Untersuchungen in Vero-Zellen	73
4.3.1.2 Untersuchungen in HeLa-Zellen	76
4.3.2 Aktivierung der dsRNA-abhängigen Proteinkinase R durch poly-IC	80
4.4 Induktion von Apoptose durch Überexpression des ZEBOV-GP	85
4.5 Analyse der Akt-Kinase Aktivität in ZEBOV-infizierten Zellen	93
5. Diskussion	96
5.1 Die Infektion mit ZEBOV führt nicht zur Induktion von Apoptose in infizierten Zellen	96
5.2 ZEBOV ist nicht in der Lage Apoptose aktiv zu regulieren	98
5.3 Die Rolle der PKR-Hemmung durch ZEBOV in der Apoptoseregulation	102
5.4 ZEBOV-Infektion induziert keine Überlebenssignale über Akt	106
5.5 Die Rolle von Apoptose und TRAIL in der Pathogenese von ZEBOV	109
5.6 Resumé	112
6. Zusammenfassung	114
7. Anhang	116
7.1 Abbildungsverzeichnis	116
7.2 Tabellenverzeichnis	117
7.3 Abkürzungsverzeichnis	118
7.4 Literaturverzeichnis	122
7.5 Lebenslauf	135
7.6 Veröffentlichungen und Präsentationen	137
7.7 Danksagung	139
7.8 Eidstattliche Erklärung	141

1. Einleitung

1.1 Apoptose

1.1.1 Apoptose - eine Form des programmierten Zelltodes

Der Begriff Apoptose wurde 1972 von Kerr, Wyllie und Currie eingeführt, um eine Form des Zelltodes mit spezifischen Charakteristika zu beschreiben, welche sich morphologisch von der Nekrose unterscheidet [1]. Bei der Apoptose findet ein von der Zelle selbst kontrollierter Abbau statt, weshalb Apoptose lange mit programmiertem Zelltod gleichgesetzt wurde. Im Gegensatz dazu galt Nekrose, z.B. nach Verletzungen, als unkontrollierter Prozess [2, 3]. Nach neusten Erkenntnissen jedoch geht man davon aus, dass es verschiedene Formen des kontrollierten Zelltodes gibt und auch Nekrose gezielt reguliert werden kann [2-4]. Hierbei bildet die Apoptose aber die bekannteste und am besten untersuchte Form des programmierten Zelltodes.

Nekrotische und apoptotische Zellen lassen sich durch verschiedene Charakteristika voneinander unterscheiden. Morphologisch sichtbar ist das Anschwellen von nekrotischen Zellen, welches zum Zerplatzen der Plasmamembran führt. Dabei werden die entstehenden Zelltrümmer frei und als Folge tritt eine Entzündungsreaktion ein [2, 3]. Im Gegensatz dazu werden apoptotische Zellen komplett fragmentiert und in Membran-umhüllten Vesikeln (apoptotic bodies) von der sterbenden Zelle abgeschnürt, welche dann über Phagozytose von umgebenden Zellen aufgenommen werden. Dadurch sind keine freien Zellbestandteile vorhanden und es kommt zu keiner Immunreaktion am Ort der Apoptose [3-5]. Während der Apoptose bleibt die Plasmamembran der sterbenden Zellen intakt, weist jedoch spezifische Veränderungen auf. Weiteres Charakteristikum ist die Fragmentierung der DNA, welche man spät in der Apoptose als Chromatinkondensation beobachten kann. Jedoch kommt es in vivo durch die Phagozytose zur sehr schnellen Eliminierung der absterbenden Zellen, wodurch oftmals nur wenige apoptotische Zellen beobachtet werden können, obwohl große Zellmengen betroffen sind [4, 5]. Findet keine Phagozytose der apoptotic bodies statt, werden sie unkontrolliert abgebaut, was man als sekundäre Nekrose bezeichnet [4]. Um einen kontrollierten Abbau der Zelle während der Apoptose zu vollziehen, ist ein komplexes

Regulationsnetzwerk zur Kontrolle der Apoptose vorhanden (siehe 1.1.2) [2, 6]. Apoptose ist ein wichtiger Bestandteil in der normalen Entwicklung eines mehrzelligen Organismus und ist auch zwischen verschiedenen Spezies konserviert [7, 8]. Vor allem in der Embryogenese kommt ihr eine zentrale Rolle zu, z.B. bei Ausbildung von Fingern in der Handentwicklung [9] oder während der Entwicklung des zentralen Nervensystems [10]. Auch bei der Entwicklung des Immunsystems ist Zelltod durch Apoptose beteiligt [11, 12] und cytotoxische T-Zellen induzieren Apoptose in ihren Zielzellen als Teil der zellulären Immunantwort [13]. Apoptose spielt weiterhin eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Virusinfektionen (Näheres siehe 1.1.3) [4, 14, 15].

1.1.2 Biochemie der Apoptose - Caspasen

Die genetische Regulation der Apoptose wurde in Studien mit dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* aufgeklärt [16] und die grundlegenden Mechanismen der Regulation sind auch in Säugern mit vielen homologen Proteinen zu finden. Durch die Entstehung zusätzlicher Signalwege findet man jedoch in Säugern ein viel komplexeres Signalnetzwerk zur Regulation der Apoptose [8, 17].

Das zentrale Element ist die Aktivierung der Cystein-Aspartat-spezifischen Proteasen (= Caspasen). Der Name wurde anhand der Charakteristika dieser Proteasen gewählt, da sie im aktiven Zentrum ein Cystein besitzen und ihre Zielsubstrate immer hinter einem Aspartat spalten. Dabei wird die Substratspezifität durch die vier aminoterminal der Spaltstelle liegenden Aminosäuren bestimmt [2, 5, 18-20]. Bisher sind 14 Caspasen beschrieben, wovon jedoch nur 11 in humanen Zellen vorkommen [17, 18, 21]. Caspasen liegen in lebenden Zellen als inaktive Vorläuferproteine (= Procaspasen) im Cytoplasma vor, nach Induktion von Apoptose findet eine Aktivierung über Spaltung statt [2, 5, 17, 18, 20]. Die durch die Spaltung von zwei Procaspasen entstehenden Fragmente bilden nach Hetero-Tetramerisierung die aktive Protease mit zwei aktiven Zentren, die an entgegengesetzten Enden des Moleküls liegen [4, 8, 22]. Dies gilt für alle bekannten Caspasen außer Caspase 9, welche nach Spaltung keine erhöhte proteolytische Aktivität aufweist. Aktivierung von Caspase 9 erfordert eine zusätzliche Interaktion mit einem Adapterprotein, wodurch

es zu einer Konformationsänderung des aktiven Zentrums kommt (siehe auch 1.1.2.2) [20, 22, 23]. Die Caspasen lassen sich aufgrund ihrer Funktion in drei Gruppen unterteilen [17, 21]. Die ersten Caspasen, die nach einem Apoptose-Stimulus aktiviert werden, bilden die Gruppe der Initiatorcaspasen. Unterschieden werden kann dabei zwischen einem externen Signalweg, wobei es nach Ligand-Rezeptorbindung intrazellulär zur Aktivierung der Initiatorcaspase kommt (bei Caspase 2,8,10, siehe auch 1.1.2.1) und einer internen Induktion von Apoptose nach z.B. irreparablen Schäden am Erbgut. Hierbei findet eine Regulation über die Mitochondrien statt, was zur Aktivierung von Caspase 9 führt (siehe auch 1.1.2.2) [18, 20, 23]. Zur Aktivierung der Initiatorcaspasen muss eine Interaktion mit spezifischen Adapterproteinen stattfinden, welche durch die für Caspasen charakteristischen Protein-Interaktionsdomänen die **death effector domain (DED)** oder die **Caspase activation and recruitment domain (CARD)** vermittelt werden, die in der langen Prodomäne der Initiatorcaspasen lokalisiert sind [8, 18, 21, 24, 25]. Die Initiatorcaspasen aktivieren über Spaltung die Effektorcaspasen (z.B. Caspase 3), welche durch die Spaltung ihrer Zielproteine zur Fragmentierung der Zelle führen [5, 17, 18, 20]. Bisher sind etwa 100 Zielproteine der Effektorcaspasen bekannt, darunter fallen Proteine, die an Signalwegen beteiligt sind (z.B. Raf), Strukturproteine (z.B. Lamin A), Reparaturproteine (z.B. PARP), Zellzyklusregulatoren (z.B. p27) und Moleküle der Immunantwort oder an der Ausprägung von Krankheiten beteiligte Proteine (z.B. Interleukine) [20, 22]. Da zur Aktivierung der Effektorcaspasen keine Protein-Interaktion vorliegen muss, besitzen sie nur eine kurze Prodomäne [8, 21]. Als dritte Gruppe der Caspasen existieren sogenannte inflammatorische Caspasen, welche neben der Auslösung des Zelltodes zu einer inflammatorischen Antwort der Zelle führen, da sie Cytokine durch Spaltung aktivieren [17, 21, 26, 27].

Die Aktivierung von Caspasen ist das Hauptcharakteristikum der Apoptose, jedoch zeigen Studien, dass eine Hemmung von Caspasen nicht immer zur kompletten Hemmung von Apoptose führt oder keine aktiven Caspasen in apoptotischen Zellen nachgewiesen werden können [19, 20, 28]. Eine wichtige Rolle in Caspase-unabhängiger Apoptose spielt der **Apoptosis inducing factor (AIF)**. AIF ist in gesunden Zellen im Intermediärraum der Mitochondrien lokalisiert, nach Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) in der Apoptose findet jedoch ein Transport in den Zellkern statt. Dort vermittelt AIF dann die

Induktion der für apoptotische Zellen charakteristischen Chromatinkondensation, ohne dass Caspasen aktiviert werden [19, 29].

Um die Phagozytose der apoptotischen Zellen einzuleiten, findet eine Translokation von Phosphatidylserin in der Plasmamembran von der Innenseite auf die Zelloberfläche statt. Dieses Charakteristikum der Apoptose, sowie weitere Veränderungen in der Plasmamembranzusammensetzung, sind eines der ersten Ereignisse in der Apoptose, so dass eine schnelle Eliminierung der sterbenden Zellen möglich ist [4, 30].

1.1.2.1 Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand induzierte Apoptose/ externer Signalweg

Zellen können gezielt durch einen externen Stimulus in Apoptose geleitet werden. Hierzu binden spezifische Apoptose-induzierende Liganden an ihren Rezeptor, was intrazellulär zur Aktivierung der Caspasekaskade führt. Der Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL oder auch Apo2L) ist ein TyII-membrangebundenes Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Familie, welcher eine hohe Homologie zu cytotoxischem FasL/CD95L aufweist [31-34]. TRAIL liegt als Trimer vor und kann durch Membran-gebundene Cystein-Proteasen gespalten werden, so dass eine lösliche Form frei wird [31, 32]. Wie FasL/CD95L ist TRAIL in der Lage, in vielen Tumorzellen gezielt Apoptose zu induzieren, jedoch im Gegensatz zu FasL/CD95L wird TRAIL in vielen verschiedenen Zellen und Geweben exprimiert [31, 32, 35]. Bisher sind 5 Rezeptoren für TRAIL bekannt, wovon jedoch nur Death receptor 4 (DR 4 oder TRAIL-R1) und 5 (DR 5/ TRAIL-R2/ KILLER/ TRICK-2) zur Induktion von Apoptose führen. Sie besitzen intrazellulär eine death domain (DD) zur Protein-Proteininteraktion, über welche das Apoptosesignal weitergeleitet wird. Die übrigen TRAIL-Rezeptoren besitzen keine oder eine verkürzte DD, so dass eine Bindung von TRAIL nicht zur Einleitung von Apoptose führt, weshalb man sie als Decoy-Rezeptoren bezeichnet [31, 32, 36, 37]. DR4 und DR5 werden wie TRAIL in vielen Zellen (Tumor- und Nicht-Tumorzellen) exprimiert. Durch die gezielte Expression der Decoy-Rezeptoren kann die Induktion von Apoptose jedoch reguliert

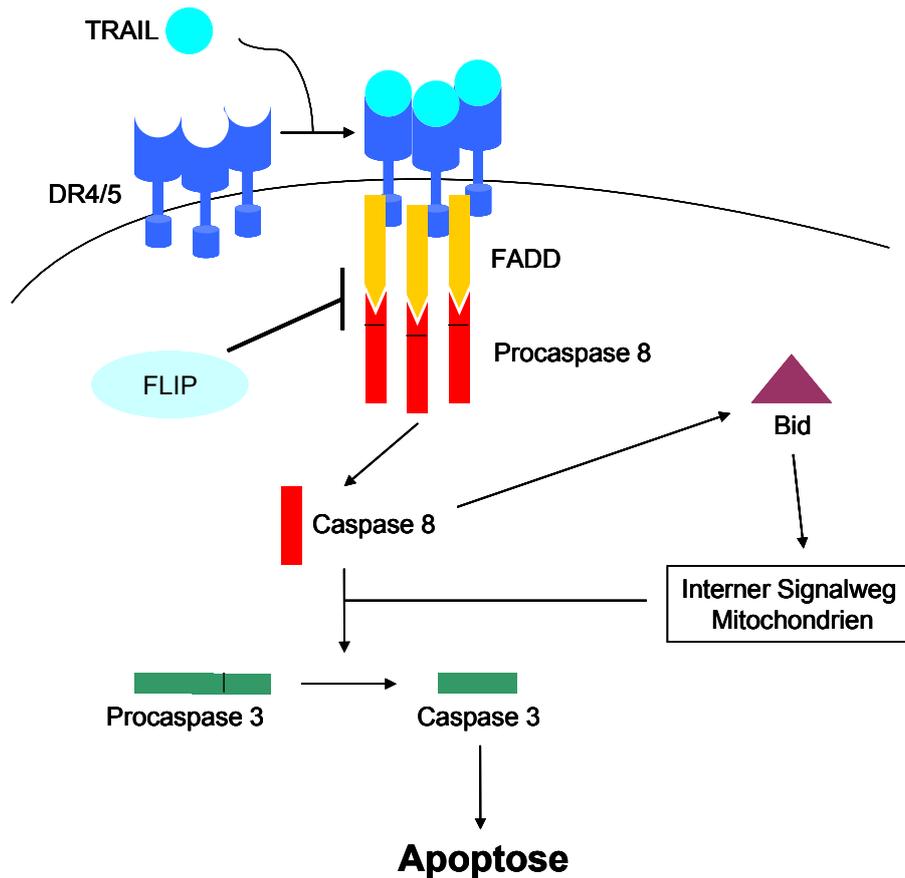


Abbildung 1: Schema der TRAIL-induzierten Apoptose

Die Bindung von TRAIL an seinen Rezeptor führt zur Bildung eines Proteinkomplexes aus Rezeptoren, Adaptorproteinen und Procaspase 8 (DISC), wodurch es zur Aktivierung von Caspase 8 kommt. Diese aktiviert durch Spaltung die Effektorcaspase 3. Eine Interaktion mit Signalwegen der internen Apoptoseinduktion findet über das proapoptotische BH3-only Protein Bid statt, welches durch Caspase 8 gespalten und damit aktiviert wird.

werden, da sie das apoptotische TRAIL-Signal blockieren [32, 35]. Durch die trimere Form von TRAIL führt die Bindung auch zur Trimerisierung von DR4/5 auf der Zelloberfläche, wodurch der aktive **death-inducing signalling complex** (DISC) gebildet wird [32]. In diesen Komplex wird das Adapterprotein **Fas-associated death domain protein** (FADD oder Mort1), welches dann die Bindung von Procaspase 8 über die **death effector domain** (DED) vermittelt [21, 31, 32, 35]. Durch die räumliche Nähe der Procaspasen im DISC können sie sich gegenseitig autokatalytisch durch Spaltung aktivieren [23-25]. Aktivierte Caspase 8 führt dann zur Aktivierung der Effektorcaspase 3 und es kommt zur apoptotischen Fragmentierung der Zelle [23, 31, 32] (Abbildung 1). Eine wichtige Regulation dieser Form der Apoptoseinduktion findet über das **cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting**

enzyme-inhibitory protein (c-FLIP) statt. FLIP besitzt hohe Homologie zu Caspase 8, besitzt jedoch keine Proteaseaktivität [23, 32]. FLIP interagiert über seine DED mit FADD und Caspase 8, was die Bildung eines funktionellen DISC verhindert, die Aktivierung von Caspase 8 blockiert und eine Resistenz gegenüber TRAIL vermittelt [23, 38]. Eine Verknüpfung des externen Rezeptor-vermittelten Apoptose-Signalweges mit der Regulation der Apoptose an den Mitochondrien findet über das pro-apoptotische BH3-only Protein Bid statt (Mitglied der Bcl-2 Protein-Familie, siehe auch 1.1.2.2). Bid liegt in inaktiver Form im Cytoplasma der Zelle vor und kann durch Caspase 8 gespalten und damit aktiviert werden. Nach seiner Aktivierung transloziert Bid in die Mitochondrienmembran, wodurch es zum Ausstrom von Cytochrom C und Aktivierung von Caspase 9 kommt (siehe auch 1.1.2.2) [25, 26, 39-41].

1.1.2.2 Regulation der Apoptose an den Mitochondrien/ interner Signalweg

Die Hauptregulation des internen Apoptosesignalweges nach zellulärem Stress erfolgt an den Mitochondrien und als Initiatorcaspase wird Caspase 9 aktiviert. Der zentrale Punkt ist der Ausstrom von Molekülen, z.B. Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Cytoplasma, durch den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$), wodurch es zur Induktion von Apoptose kommt [20, 21, 23, 42]. Eine zentrale Rolle in dieser Regulation kommt dabei den Proteinen der Bcl-2-Familie zu. Namensgebend für diese Familie ist das Bcl-2-Protein, welches in humanen **B-cell** Lymphomen mit einer apoptosehemmenden Funktion entdeckt wurde [23, 43-45]. Die Bcl-2-Proteine können anhand ihrer Struktur und Funktion in drei Gruppen unterteilt werden. Neben Bcl-2 als charakteristischem Vertreter gibt es eine Reihe weiterer anti-apoptotischer Proteine, z.B. Bcl-X_L, welche alle vier charakteristischen **Bcl-2** homology (BH) Domänen besitzen. Ebenso existieren aber auch pro-apoptotische Bcl-2-Proteine mit nur 3 BH-Domänen (BH1 bis BH3). Die dritte Gruppe bilden die BH3-only Proteine, welche nur die zentrale BH3-Domäne beinhalten und pro-apoptotisch wirken [23, 42, 44-46]. Das Verhältnis der verschiedenen Proteine zueinander ist entscheidend für das Auslösen von Apoptose oder Überleben. Die proapoptotischen Bcl-2 Proteine, z.B. Bax oder Bad, bilden nach

einem apoptotischen Stimulus durch Oligomerisierung Poren in der Mitochondrienmembran, so dass Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Cytoplasma der Zelle freigesetzt wird, was zur Aktivierung von Caspase 9 führt [23, 42, 46, 47]. Die anti-apoptischen Bcl-2 Proteine verhindern über Interaktion mit den pro-apoptotischen Proteinen (z.B. Bax-Bcl-2 Heterodimere) den Ausstrom von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Somit ist das Verhältnis der verschiedenen Bcl-2 Proteine essentiell zur Regulation der Apoptose [22, 23, 44, 45].

Neben der Interaktion der verschiedenen Bcl-2 Proteine kann auch schon auf transkriptioneller Ebene oder durch Abbau der Proteine eine Regulation der Apoptose geschehen, z.B. konnte eine verstärkte Expression von Bcl-2 in Krebszellen gezeigt werden, wodurch eine Apoptosehemmung stattfindet [44, 48, 49]. Ein wichtiger Faktor in der transkriptionellen Regulation von Bcl-2 Proteinen spielt der Zellzyklusregulator p53. p53 wird nach Schäden am Erbgut (DNA-Schäden) aktiviert und kontrolliert die Entscheidung über Einleitung eines Zellzyklusarrest oder Apoptose, welche von unterschiedlichen Faktoren (z.B.

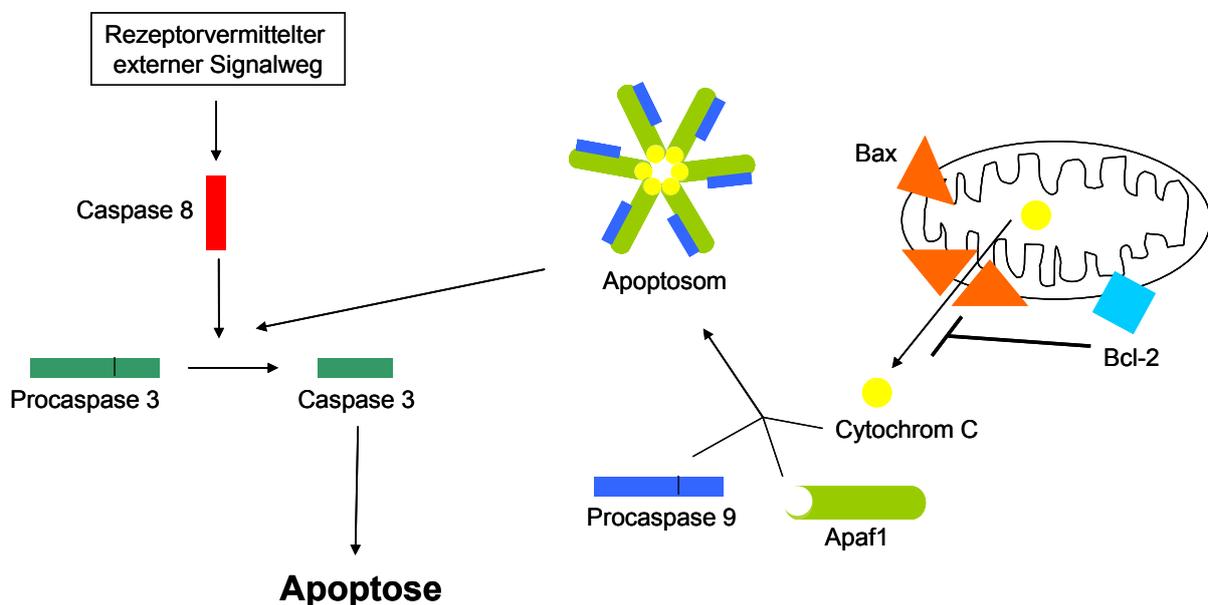


Abbildung 2: Mitochondrial-vermittelte Apoptose

Interne Apoptosesignale (zellulärer Stress, DNA-Schäden) führen zum Ausstrom von Cytochrom C aus den Mitochondrien, welcher über die Bcl-2 Proteine reguliert wird. Freies Cytochrom C induziert die Bildung des Apoptosoms, welches die aktive Form von Caspase 9 darstellt und zu einer Spaltung der Effektorcaspase 3 führt.

Vorhandensein von Wachstumsfaktoren, Ausmaß der DNA-Schäden) abhängig ist [50]. Bei Induktion von Apoptose vermittelt p53 die verstärkte Transkription der proapoptotischen Bcl-2 Proteine Bax, Bid, Puma und Noxa [45, 50-52]. Weiterhin können verschiedene Bcl-2 Proteine phosphoryliert werden, wodurch es zu einer Inaktivierung oder Abbau des Proteins kommt (siehe auch 1.1.2.4) [25, 44, 53]. Über das BH3-only Protein Bid findet eine Interaktion mit dem Rezeptor-vermittelten Apoptosesignalweg statt (siehe 1.1.2.1), wodurch ein komplexes Regulationsnetzwerk entsteht. Der Ausstrom von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Cytoplasma führt zur Aktivierung der Initiatorcaspase 9. Hierbei findet die Bildung eines Proteinkomplexes, dem Apoptosom statt, woran mehrere Proteine beteiligt sind. An das freigesetzte Cytochrom C bindet im Cytoplasma der apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1), wodurch es zur Oligomerisierung von Apaf-1 kommt. An diesen Komplex können mehrere Moleküle der Procaspase 9 über die vorhandenen CARD-Domänen binden, wodurch es zur Aktivierung von Caspase 9 kommt [18-20, 23, 25, 54]. Caspase 9 wird durch Bindung an Apaf-1 aktiviert und das Apoptosom stellt die aktive Form der Caspase 9 dar [18-20, 22, 23] (Abbildung 2). An das Apoptosom können sich nun Moleküle der Procaspase 3 anlagern, wodurch es dann zur Aktivierung der Effektorcaspasen kommt. Diese leiten dann durch Spaltung ihrer Zielsubstrate den Abbau der Zelle ein [5, 17, 18, 20].

1.1.2.3 Die dsRNA-abhängige Proteinkinase R und Apoptose

Eine zentrale Rolle in der Abwehr von Virusinfektionen spielt das Interferonsystem, da Interferone (IFN) von infizierten Zellen sekretiert werden und ihre Nachbarzellen in einen antiviralen Status versetzen können. Bei einer Virusinfektion kommt es zur Expression von IFN α und IFN β , welche über Bindung an ihren heterodimeren Rezeptor (IFNAR) zur Induktion einer Signalkaskade führen. An deren Ende steht die Transkription von Genen, die unter Kontrolle IFN-abhängiger Promotoren, der Interferon-stimulated response elements (ISRE) stehen bzw. der Interferon-stimulated genes (ISGs) [55-57]. Zu diesen Genen gehört auch das Gen für die dsRNA-abhängige Proteinkinase (PKR). Die PKR spielt eine zentrale Rolle in der

Abwehr von Virusinfektionen, da ihre Aktivierung zu einem Translationsstopp in der Zelle, aber auch zur Induktion von Apoptose führen kann, wodurch eine effiziente Virusreplikation verhindert wird. Die PKR ist eine Serin-Threonin-Kinase, welche neben der Kinase-Domäne zwei Bindestellen für **doppelsträngige RNA** (dsRNA) besitzt. Bindung von dsRNA, die als Replikationsintermediat bei viraler Replikation auftritt, führt zu einer Dimerisierung und Autophosphorylierung der PKR, wodurch sie aktiviert wird und ihre Substrate phosphorylieren kann [55, 56, 58-61]. Die Aktivierung der PKR kann aber auch unabhängig von der Bindung von dsRNA nach zellulärem Stress am **endoplasmatischen Retikulum** (ER) erfolgen. Hierbei findet eine Interaktion mit dem **PKR activating protein** (PACT) statt, wodurch es zur Aktivierung der PKR kommt [55, 56, 58, 61, 62]. Das am besten charakterisierte Substrat der

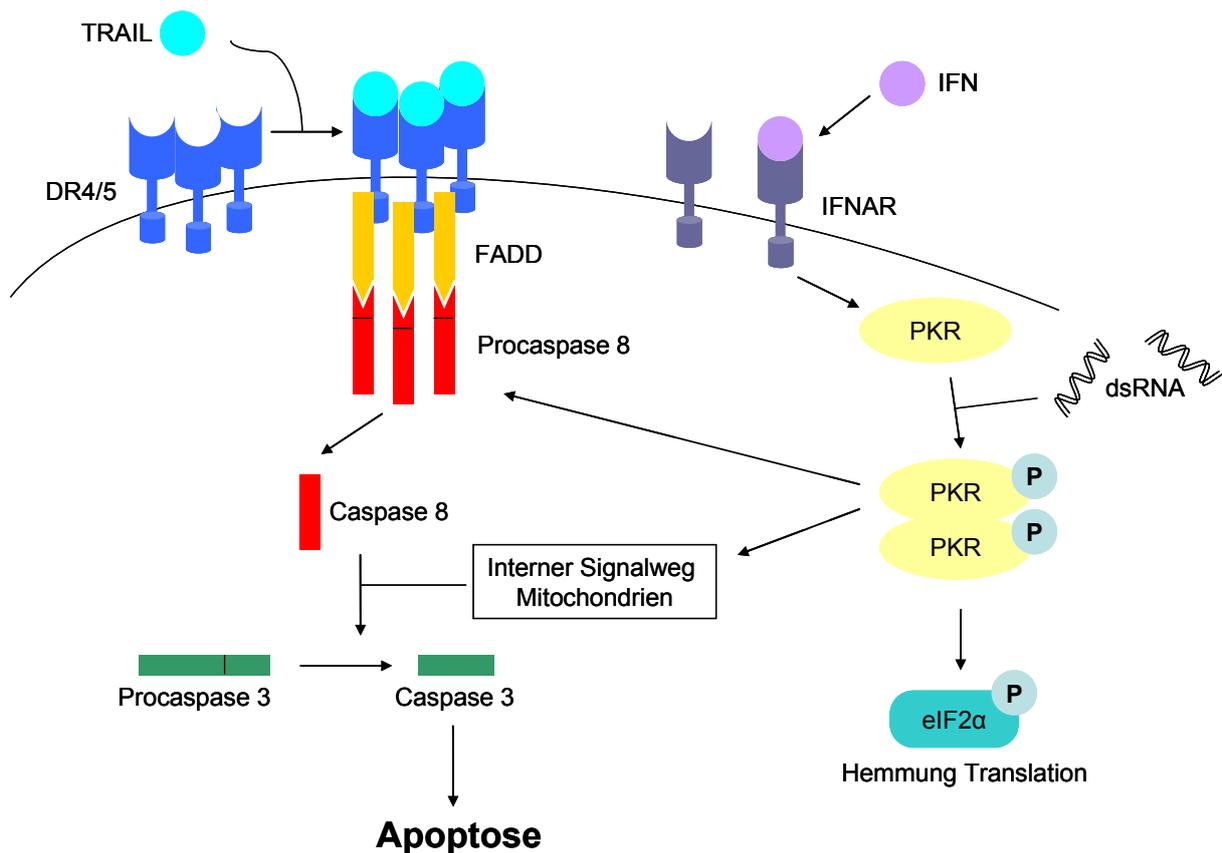


Abbildung 3: Rolle der PKR in der Apoptoseregulation

Die Bindung von IFN an seinen Rezeptor führt zur erhöhten Expression der PKR in der Zelle. Die Bindung von dsRNA, einem Replikationsintermediat der Virusreplikation, an PKR führt zur Aktivierung von PKR durch Autophosphorylierung. Die Phosphorylierung des PKR-Substrates eIF2α führt zur Hemmung der Proteinsynthese; zusätzlich induziert PKR Apoptose über verschiedene Signalwege.

PKR ist der eukaryotische Initiationsfaktor **2 α** (eIF2 α). Phosphoryliertes eIF2 α kann die Translation nicht mehr unterstützen, wodurch es zu einem Stopp der Proteinbiosynthese in der Zelle kommt [55, 58, 59, 61]. Dies kann zur Induktion von Apoptose führen, jedoch kann aktive PKR Apoptose auch über weitere Signalwege induzieren. Nach Aktivierung der PKR über dsRNA kommt es zur Bildung von **dsRNA-triggered death inducing signalling complexes** (dsRNA-DISCs) und darüber zur Aktivierung von Caspase 8. Es konnte gezeigt werden, dass FADD und TRADD (TNF-**R**eceptor-associated **D**eath **D**omain) an dieser Komplexbildung beteiligt sind, jedoch keine death receptors benötigt werden (siehe auch 1.1.2.1) [63]. Ebenso scheint es aber auch zur gezielten Expression von pro-apoptischen Genen zu kommen, z.B. Fas/CD95 und dem pro-apoptischen Protein Bax [64]. Da eine Hemmung von PKR-induzierter Apoptose durch Überexpression von Bcl-2 beobachtet werden konnte sowie eine Aktivierung von Caspase 9, scheint auch der interne Apoptosesignalweg durch PKR beeinflusst zu werden [59, 65]. Die genauen Mechanismen über die PKR zur Einleitung von Apoptose führt, besonders in Virus-infizierten Zellen, müssen noch besser untersucht werden, um das komplexe Regulationsnetzwerk komplett zu verstehen.

1.1.2.4 Die Rolle der Akt-Kinase in der Apoptoseregulation

Die Regulation der Apoptose ist eng mit den Signalwegen für zelluläres Überleben und Zellzykluskontrolle verknüpft. Ein wichtiges Element zur Regulation von Apoptose ist die Kinase Akt (oder auch **protein kinase B** = PKB). Eine Aktivierung von Akt findet über die **Phosphatidylinositol-3-Kinase** (PI3K) statt. PI3K wird nach Bindung von Wachstumsfaktoren an ihren zellulären Rezeptor durch Phosphorylierung aktiviert und kann dann membranständige Phosphoinositole phosphorylieren (Bildung von Phosphatidylinositide 3,4,5-Triphosphaten = PIP₃) [66-68]. Diese binden nun über **Pleckstrin homology** (PH) Domänen an ihre Zielproteine, zu denen Akt gehört, welches in seiner N-terminalen Domäne ebenfalls eine PH-Domäne besitzt. Durch Bildung dieses Proteinkomplexes findet eine Phosphorylierung von Akt an zwei Stellen unabhängig voneinander statt. Die

Phosphorylierung an Threonin³⁰⁸ wird über die PDK1 (PIP₃ dependant kinase) durchgeführt, die für die Phosphorylierung an Serin⁴⁷³ verantwortliche Kinase konnte bisher noch nicht identifiziert werden, wird aber als PDK2 bezeichnet und scheint eng mit PDK 1 verwandt zu sein [66-69]. Aktiviertes Akt kann eine Vielzahl von Proteinen phosphorylieren, wodurch es zur Regulation des Zellmetabolismus, der Proteinsynthese und der Apoptose kommt. Hierbei führt aktives Akt zur Induktion von zellulären Überlebenssignalen und gezielter Hemmung des internen Apoptosesignalweges und damit zur Hemmung von Apoptose [67-70]. Ein Zielprotein ist das pro-apoptotische Bcl-2 Protein Bad (siehe auch 1.1.2.2), nach dessen Phosphorylierung es zur einer Translokation in das Cytoplasma über Interaktion mit 14-3-3 Proteinen kommt. Dadurch kann Bad nicht mehr an die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X binden und deren Funktion hemmen, so dass es zu einer

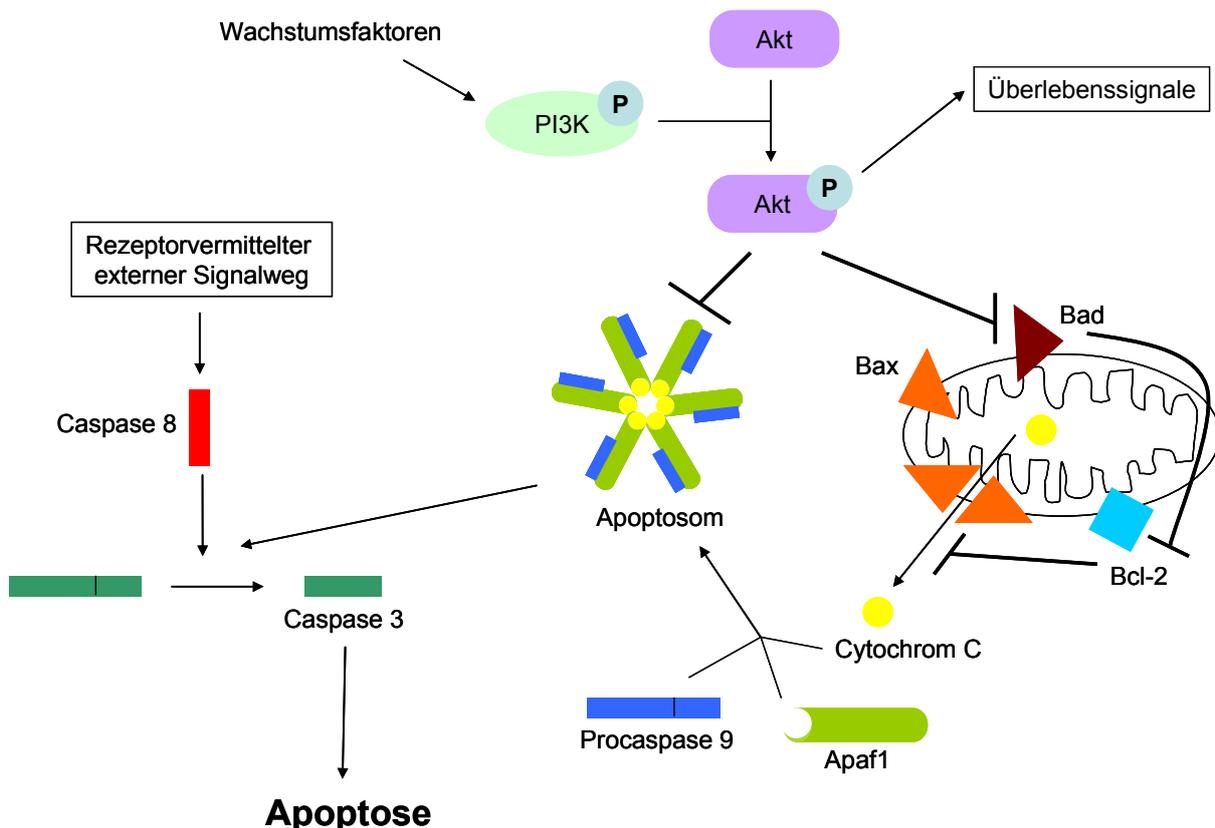


Abbildung 4: Einfluss von Akt auf die Apoptose

Aktivierung der PI3K über Wachstumsfaktoren induziert die Phosphorylierung von Akt, wodurch zelluläres Überleben eingeleitet wird. Zusätzlich hemmt aktives Akt durch Phosphorylierung von Proteinen des internen Apoptosesignalweges die Apoptose in der Zelle.

Hemmung von Apoptose durch das Überwiegen von anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen kommt [44, 51, 68, 69]. Ebenso kann die Initiatorcaspase 9 durch Akt phosphoryliert werden, wodurch ihre proteolytische Aktivität verloren geht. Beobachtet wurde weiterhin eine Phosphorylierung von Procaspase 9, welche dann nicht mehr über Bindung im Apoptosom aktiviert werden kann [44, 68, 70]. Dabei wurde festgestellt, dass die Strategie, die Apoptose durch Phosphorylierung von Caspase 9 zu hemmen, nicht zwischen verschiedenen Spezies konserviert ist und nur in menschlichen Zellen nachgewiesen werden konnte [68, 71]. Weiterhin gibt es eine Regulation von Transkriptionsfaktoren durch Akt, wodurch eine Hemmung der Apoptose auf Transkriptionsebene geschieht. Die Forkhead-Transkriptionsfaktoren können die Expression des Liganden für Fas/CD95 kontrollieren, durch Phosphorylierung werden sie aber im Cytoplasma zurückgehalten und es kommt nicht zur Expression des Apoptose-induzierenden Liganden FasL [68, 72]. Akt führt ebenfalls zur Phosphorylierung von I κ B-Kinasen, wodurch die Retention des Transkriptionsfaktors NF κ B (**n**uclear **f**actor κ **B**) im Cytoplasma aufgehoben wird und NF κ B im Nucleus die Transkription von anti- apoptotischen Genen auslöst [68, 69]. Neben der aktiven Hemmung der Apoptose führt die Aktivierung von Akt auch zur Induktion von Wachstumsfaktoren und Interleukinen, wodurch zelluläres Überleben gesichert wird [67].

1.1.3 Apoptose und Virusinfektion

Viren sind auf intakte Zellen angewiesen, da sie die zelluläre Synthesemaschinerie zur Replikation und Vermehrung nutzen. Daher wird die gezielte Induktion von Apoptose zur Eliminierung infizierter Zellen und Verhinderung der Virusausbreitung als Mechanismus zur Virusabwehr des Körpers genutzt. Eine Virusinfektion löst also in vielen Fällen Apoptose in den infizierten Zellen aus. Um eine effiziente Virusreplikation zu gewährleisten, haben eine Vielzahl von Viren Mechanismen entwickelt, um Apoptose zu hemmen oder zu verzögern [5, 73, 74]. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass Viren die zellulären Apoptosesignalwege gezielt ausnutzen oder sogar für eine effiziente Vermehrung oder Ausbreitung darauf angewiesen sind [73, 75]. Die Interferonantwort des Wirtes ist eng mit der Apoptose

verknüpft (siehe auch 1.1.2.3) und beide können auf unterschiedlichsten Wegen durch Viren inhibiert oder reguliert werden [55, 73, 74]. Im Folgenden sind einige Beispiele exemplarisch dargestellt, wie Viren die Apoptose in infizierten Zellen regulieren. Viren besitzen z.T. Proteine, die in der Lage sind, die Aktivierung von Caspasen zu hemmen, die **viral inhibitors of apoptosis proteins (vIAPs)** [73, 76, 77]. Eine Regulation der Apoptose über den Rezeptorvermittelten Weg durch Viren erfolgt über virale Homologe zu FLIP (**vFLIP**), welche die Bildung eines funktionellen DISC verhindern. So kann das apoptotische Signal nicht in die Zelle weitergeleitet werden und Apoptose wird schon in einem frühen Stadium gehemmt (siehe 1.1.2.1) [73]. Ebenso kodieren Viren Proteine, die eine hohe Homologie zu den Rezeptoren über die Apoptose eingeleitet wird, besitzen. Diese können nach Expression auf der Zelloberfläche das apoptotische Signal (z.B. TRAIL) binden, es kommt jedoch nicht zur Induktion von Apoptose [73, 78]. Verschiedene Viren, wie z.B. **Ebstein-Barr-Virus (EBV)** oder Herpesviren besitzen virale Bcl-2-Homologe, die die zellulären pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine binden können und somit zur Hemmung der Apoptose an den Mitochondrien führen können (siehe auch 1.1.2.2) [73, 74, 77, 79]. Ebenso kann es nach Virusinfektion (z.B. EBV und dem **humanen Immundefizienz Virus (HIV)**) aber auch zur gezielten Verstärkung der zellulären anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine kommen, wodurch Apoptose unterdrückt wird [73, 80]. Die Unterdrückung von Apoptose in infizierten Zellen kann auch über die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges erfolgen, durch den Überlebenssignale und anti-apoptotische Signale in der Zelle aktiviert werden (siehe 1.1.2.4) [81-83]. Eine wichtige Beeinflussung der Apoptose findet auch über Interaktion viraler Proteine mit dem Zellzyklusprotein p53 statt, wobei ein Zellzyklusarrest oder die Auslösung der Apoptose verhindert wird [73, 77, 84]. Auf welche Art Viren Apoptose unterdrücken, ist aber in vielen Fällen noch ungeklärt.

1.2 Das Ebolavirus

1.2.1 Virusaufbau und Verbreitung

Das Ebolavirus (EBOV) bildet zusammen mit dem Marburg-Virus (MARV) die Familie der *Filoviridae*. Diese zählt zusammen mit den *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae* und *Bornaviridae* zur Ordnung der *Mononegavirales* [85-89]. Als gemeinsames Charakteristikum besitzen die *Mononegavirales* ein einzelsträngiges nicht-segmentiertes RNA-Genom in negativer Orientierung. Das Genom des EBOV hat eine Größe von 19 Kilobasen (kb) und kodiert für 7 Proteine. Das RNA-Genom ist vom Nukleoprotein (NP) enkapsidiert und bildet so zusammen mit der viralen Polymerase L und den viralen Proteinen VP35 und VP30 das Nukleokapsid (Abbildung 5) [86-88, 90, 91]. Für die Replikation von EBOV werden die Polymerase L und ihr Cofaktor VP35 benötigt, die den aktiven Polymerasekomplex bilden. Im Gegensatz zu MARV ist bei der Transkription von EBOV VP30 essentiell, wobei die genaue Funktion noch unklar ist [92-95]. Das Virus besitzt zwei Matrixproteine, VP40 und VP24, wobei das Hauptmatrixprotein VP40 das Nukleokapsid mit der Hüllmembran verbindet. Als einziges Oberflächenprotein ist das Glycoprotein (GP) in die Membran eingelagert (Abbildung 5) [86-88, 90, 91]. GP vermittelt die Bindung an die Zielzellen und die Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran, was zum Eindringen des Virus in die Zelle erforderlich ist. Bisher wurden verschiedene Oberflächenmoleküle beschrieben, z.B. DC-SIGN, die die Adsorption von EBOV verstärken können [96-101]. Die Viruspartikel sind fadenförmig, z.T. verzweigt und können eine Länge von bis zu 14 µm erreichen (durchschnittlich 970 nm), ihr Durchmesser beträgt konstant 80 nm [85, 87, 90]. Bisher sind 4 Spezies des EBOV bekannt, die Namensgebung erfolgte nach ihren Erstausbruchsorten. **Ebolavirus Zaire** (ZEBOV), **Ebolavirus Sudan** (SEBOV) und **Ebolavirus Côte d'Ivoire** (CIEBOV) lösen hämorrhagische Fieber bei Menschen aus, wobei ZEBOV mit bis zu 90% die höchste Mortalitätsrate besitzt. Dagegen scheint **Ebolavirus Reston** (REBOV) das einzige für Menschen nicht pathogene Virus dieser Familie zu sein [87, 88, 102, 103]. Die Erstisolierung des EBOV fand 1976 bei Ausbrüchen hämorrhagischen Fiebers in Zentralafrika statt, wo bei zwei verschiedenen Ausbrüchen ZEBOV und SEBOV als Auslöser identifiziert werden konnten. REBOV trat 1989 und CIEBOV 1992 zum ersten Mal auf [85, 87, 88]. Seit dem ersten Auftreten des Virus kommt es immer

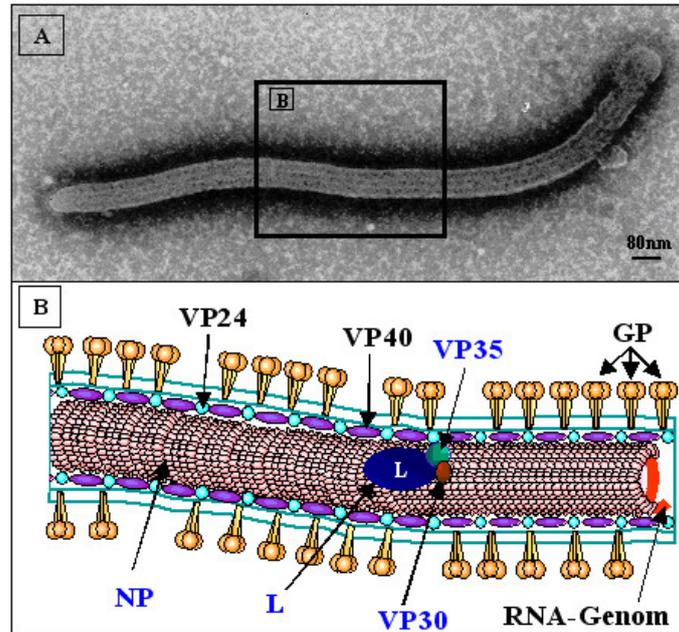


Abbildung 5: Aufbau des EBOV-Partikel

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EBOV-Virions in 5000-facher Vergrößerung (Dr. Larissa Kolesnikova, Universität Marburg)

(B) Schematischer Aufbau eines EBOV-Virions (entnommen aus [104])

wieder zu Ausbrüchen von EBOV in Zentralafrika (Abbildung 6), insgesamt nimmt die Anzahl der Ausbrüche zu. Die Infektion scheint beim Menschen sowie in nicht-humanen Primaten gleich zu verlaufen, weshalb für Studien Experimente mit z.B. grünen Meerkatzen als Modell verwendet werden [105-107]. In den letzten Jahren wurde auch deutlich, dass durch ZEBOV eine Gefährdung für wildlebende Affen, besonders Gorillas und Schimpansen in Zentralafrika besteht. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass 2002/2003 in ZEBOV-Ausbruchsgebieten 5000 Gorillas durch die Infektion mit EBOV getötet wurden und inzwischen vom Aussterben bedroht sind [89, 108, 109]. Die Übertragung des Virus findet über infektiöse Körperflüssigkeiten, besonders Blut der infizierten Personen/Tiere, statt. In den Ausbruchsregionen in Afrika kommt es aufgrund von mangelnder Hygiene und Desinfektion (besonders in Krankenhäusern), sowie durch Wiederverwendung von medizinischen Geräten (Spritzen/Kanülen), zu hohen Ausbruchsraten. Ebenso ist dort eine Übertragung durch Kontakt mit infizierten Affen oder durch den Verzehr von Affenfleisch häufig zu beobachten [85, 89, 110]. Das natürliche Reservoir der Filoviren scheinen Flughunde (fruit bats) zu sein, jedoch konnte dies bisher nicht

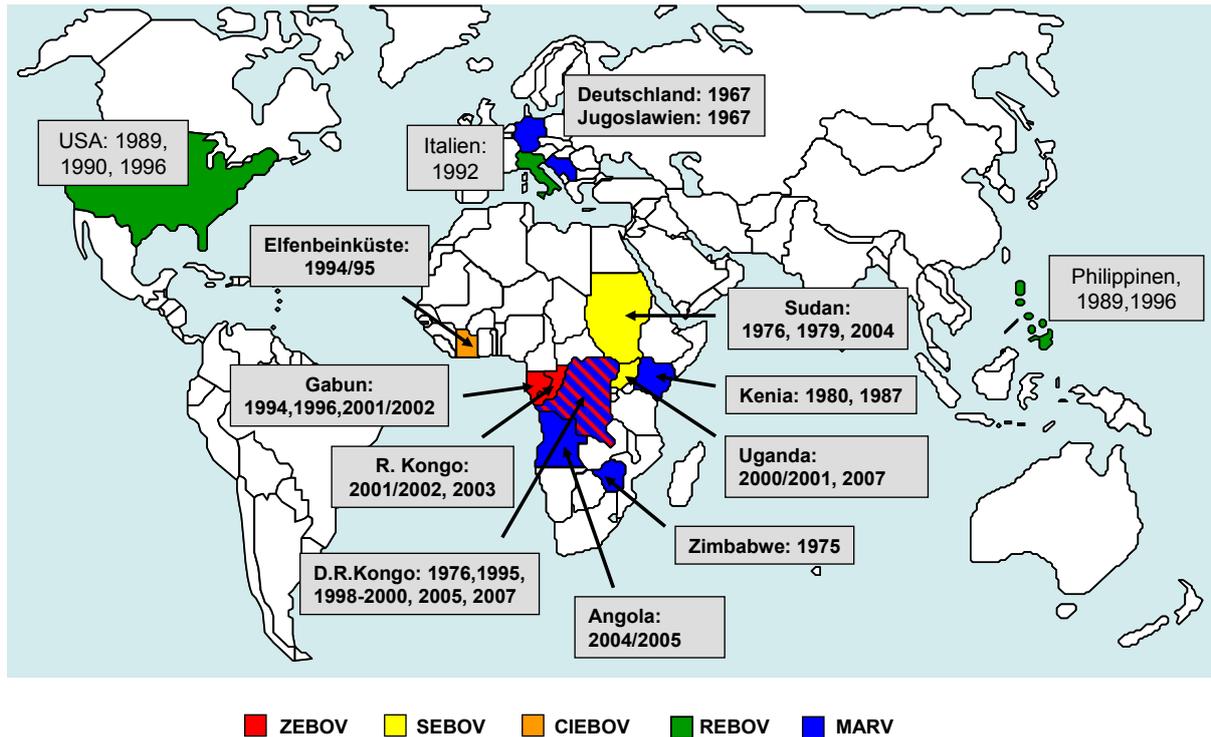


Abbildung 6: Darstellung der Filovirusausbrüche

definitiv nachgewiesen werden [85, 89, 111-113]. Bisher gibt es keine wirksame Therapie oder einen zugelassenen Impfstoff gegen EBOV. Zur Behandlung wird die ausreichende Flüssigkeitsversorgung und Gabe von Nährstoffen gewährleistet sowie gegebenenfalls die Gabe von Antibiotika oder Antimalaria-Mitteln angewendet. Inzwischen gibt es verschiedene Ansätze zur Entwicklung eines Impfstoffes. Da die Krankheit in Affen und Menschen ähnlich verläuft, sind die im Affenmodell positiv getesteten Ansätze am Erfolg versprechendsten. Bisher konnte ein Schutz von nicht-humanen Primaten mit der Kombination einer DNA-Vakzine und rekombinanten humanen Adenoviren, die das EBOV-GP exprimieren, erzielt werden. Hierbei konnte im ersten Versuch jedoch ein ausreichender Immunschutz erst nach 6 Monaten gewährleistet werden, neuere Daten zeigen jedoch, dass auch ein früherer Schutz möglich ist. Ein Problem könnte hier die bei Menschen bereits hohe Immunität gegen Adenoviren sein, da eventuell die Entwicklung einer EBOV-spezifischen Immunität beeinflusst wird [91, 99, 114-116]. Daneben wurde die Impfung von nicht-humanen Primaten mit rekombinanten vesikulären Stomatitis-Viren (VSV) erfolgreich durchgeführt, welche das GP von EBOV oder MARV enthielten. In dieser Studie

wurde replikationsfähiges attenuiertes VSV eingesetzt, wodurch sich Sicherheitsbedenken beim Einsatz für Menschen ergeben und weitere Forschungsarbeit nötig sein wird, um einen zugelassenen Impfstoff zu entwickeln [91, 99, 114, 117].

1.2.2 Hemmung des Interferonsystems durch EBOV

Ein wichtiger Teil der Immunabwehr bei einer Virusinfektion ist die Interferonantwort, welche auch eng mit der Regulation von Apoptose verknüpft ist (siehe auch 1.1.2.3). EBOV ist in der Lage spezifisch die Interferonantwort des Wirtes zu hemmen, wobei die Expression der ISGs verhindert wird, jedoch die Expression der Interleukine IL-1 β oder IL-6 nicht beeinflusst wird [118]. Ebenso wird die Expression von Genen, die nach Detektion von dsRNA in der Zelle aktiviert werden, wie z.B. die PKR (siehe 1.1.2.3) durch ZEBOV unterdrückt [119]. Die Hemmung der Interferonantwort kann bei allen Filoviren beobachtet werden, wobei jedoch das für Menschen vermutlich nicht-pathogene REBOV den schwächsten Effekt zeigt. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass EBOV und MARV verschiedene Mechanismen zur Regulation der zellulären Signalwege einsetzen [120].

Bisher konnten zwei virale Proteine des ZEBOV identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Interferonantwort zeigen. Der Cofaktor der viralen Polymerase VP35 spielt in der Hemmung der Interferonantwort eine zentrale Rolle, da er als Typ1-IFN Antagonist wirkt [121]. Dabei können verschiedene Signalwege durch VP35 gehemmt werden. Zum einen verhindert VP35 die Aktivierung über Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors interferon regulatory factor 3 (IRF3). IRF3 kann so nicht mehr in den Zellkern translozieren, wo er die Transkription des IFN β -Gens vermittelt [122, 123]. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass VP35 in der Lage ist dsRNA zu binden und die Aktivierung von PKR zu verhindern. VP35 kann dabei die Phosphorylierung der PKR sowie ihres Substrates eIF2 α verhindern [124, 125]. Der genaue Mechanismus der PKR-Hemmung ist jedoch noch nicht bekannt. Auch weiß man nicht, ob die Bindung von dsRNA dabei eine Rolle spielt [123, 125]. Neben VP35 ist auch das zweite virale Matrixprotein VP24 in der Lage die Interferonantwort zu regulieren. VP24 blockiert den Transport des Transkriptionsfaktors STAT1, indem

es mit Karyopherin α interagiert, welches für den Kerntransport von STAT1 verantwortlich ist [126, 127]. EBOV ist also in der Lage, sowohl die Bildung von IFN als auch die Expression von antiviralen Molekülen (z.B. PKR) zu verhindern. Daneben findet zusätzlich eine Interaktion mit dem zellulären Interferonsignalweg statt, wodurch eine komplexe Interaktion von EBOV mit dem Interferonsystem entsteht.

1.2.3 Rolle der Apoptose in der Pathogenese

Viele Daten zur Pathogenese des durch EBOV verursachten hämorrhagischen Fiebers stammen aus Studien mit nicht-humanen Primaten (siehe 1.2.1) [105-107, 114]. Im Verlauf der Infektion kommt es zu einer massiven Störung der Immunantwort, wobei ein starker Rückgang in der Lymphozytenzahl zu verzeichnen ist. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Lymphozyten ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$), in welchen keine Virusreplikation von EBOV nachgewiesen werden kann, aufgrund von Apoptose stattfindet, wodurch die Immunabwehr des Wirtes stark beeinflusst wird [91, 105, 106, 128-133]. Die Apoptose der Lymphozyten scheint eine wichtige Rolle in der Pathogenese zu spielen, da sie nur in tödlichen Verläufen von humanen Infektionen beobachtet wurde, bei Überlebenden der Infektion kam es hingegen nicht zur Apoptose von Lymphozyten. Damit übereinstimmend konnte nur in Patienten, die die EBOV-Infektion überlebten, eine spezifische IgG-Antwort detektiert werden. Es wird vermutet, dass die fehlende Immunantwort in den tödlichen Verläufen großteils durch die Eliminierung der Lymphozyten durch Apoptose zu erklären ist [130-132]. Neuere Studien konnten allerdings eine funktionelle $CD8^+$ T-Zell-Antwort nach EBOV-Infektion feststellen, die jedoch ineffizient zu sein scheint [128]. Die ersten Zielzellen des Virus sind Monozyten/Makrophagen und auch dendritische Zellen, von welchen dann eine Ausbreitung im ganzen Körper erfolgt. Im späten Stadium der Infektion sind eine Vielzahl von Zellen betroffen [91, 99, 105-107, 132]. In infizierten Zellen, die das Virus vermehren und für eine Ausbreitung der Infektion sorgen, konnte keine Apoptose nachgewiesen werden, in einem späteren Stadium der Infektion findet z.T. Zelltod durch Nekrose statt [105, 106, 132]. Dies konnte auch in Zellkultur-Experimenten im Rahmen der dieser Doktorarbeit zugrunde

liegenden Diplomarbeit gezeigt werden [134]. Es wird vermutet, dass die Induktion von Apoptose in nicht-infizierten Lymphozyten mit der Ausschüttung von Cytokinen aus den infizierten Zellen zusammenhängt [105, 107, 129, 132, 133, 135]. Welche Moleküle hierbei aber spezifisch zur Induktion von Apoptose führen, ist noch unklar. Einerseits wurde beschrieben, dass über 95% der EBOV-infizierten Zellen verstärkt TRAIL (siehe 1.1.2.1) und nur eine geringe Anzahl infizierter Zellen lösliches Fas (FasL) exprimieren [107]. Andererseits gibt es aber Daten, die besagen, dass es zu einer verstärkten Expression von Fas/FasL kommt [131, 133], dass beide Faktoren beteiligt sind [106] oder dass keine spezifischen Veränderungen im TRAIL oder FasL-Level zu beobachten ist [129]. Daher kann auch die Rolle von anderen Faktoren in der Apoptoseinduktion der Lymphozyten nicht ausgeschlossen werden. Eine wichtige Rolle in der Pathogenese von EBOV scheint das Oberflächenprotein GP zu spielen, welches für die Cytotoxizität des Virus verantwortlich ist [136]. Es gibt verschiedene Formen von GP, die durch Spaltung nach der Proteinbiosynthese oder durch fehlendes transkriptionelles Editing entstehen [86, 137]. Dabei werden auch nicht-membrangebundene Formen gebildet, welche von den infizierten Zellen sekretiert werden. Die membrangebundene Form des GP induziert die Abrundung und Ablösung der Zellen, wobei eine Herabregulierung von Zelladhäsionsmolekülen (z.B. β -Integrine) stattfindet [138]. Dies kann als **cytophatischer Effekt (CPE)** im Mikroskop beobachtet werden. Dieser Effekt ist bei den verschiedenen EBOV-Spezies unterschiedlich stark ausgeprägt, korreliert aber mit der Pathogenität. So ist Ablösung der Zellen bei ZEBOV am höchsten, bei REBOV am niedrigsten. Nach Überexpression von GP konnte in Zellkultur eine verstärkte Ablösung der Zellen vom Untergrund sowie anschließende Apoptose beobachtet werden (G. Zimmer, Institut für Virologie, Universität Hannover, nicht veröffentlichte Daten) [136]. Ob dieser Effekt jedoch zelltypspezifisch ist (keine Apoptose in von Monozyten abstammender Zellkultur [136]) und eine Rolle in der natürlichen EBOV-Infektion spielt, ist noch unklar.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

In ZEBOV-infizierten Zellen kann weder *in vivo* noch *in vitro* Apoptose beobachtet werden [105, 106, 132, 134]. Der Rückgang der Lymphozyten im Verlaufe einer ZEBOV-Infektion aufgrund von Apoptose wird jedoch der Sekretion von Apoptose-auslösenden Molekülen aus den infizierten Zellen zugeschrieben (siehe auch 1.2.3) [105, 106, 128-133]. Da infizierte Zellen jedoch keine Anzeichen von Apoptose zeigen, lässt dies vermuten, dass in diesen Zellen eine Regulation oder Hemmung von Apoptose stattfindet.

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob eine Hemmung der Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen vorliegt und welche zellulären Signalwege dabei durch ZEBOV beeinflusst werden.

Zu diesem Zweck sollten die verschiedenen zellulären Apoptosesignalwege in ZEBOV-infizierten Zellen näher untersucht werden. Da Apoptose über verschiedene Mechanismen induziert und reguliert wird, sollten auch die verschiedenen Signalwege (externer/ Rezeptorvermittelter und interner/ mitochondrialvermittelter Apoptosesignalweg, siehe 1.1.2.1 und 1.1.2.2) berücksichtigt werden, wozu verschiedene Apoptose-Stimuli verwendet wurden.

Die Untersuchung der Aktivität verschiedener Caspasen (Initiator- und Effektorcaspasen) sollte Aufschluss darüber geben, ob und wo ein Eingriff von ZEBOV in die Apoptoseregulation stattfindet.

Da ZEBOV in der Lage ist, das Interferonsystem zu antagonisieren (siehe 1.2.2) und auch eine Hemmung der PKR beobachtet werden kann, sollte geklärt werden, ob dies auch einen Einfluss auf die Regulation der Apoptose in den infizierten Zellen hat (siehe 1.1.2.3).

Eine Regulation der Apoptose durch Viren findet auch durch den Eingriff in zelluläre Überlebenssignalwege statt (siehe 1.1.2.4). Ob eine ZEBOV-Infektion zur Einleitung von Überlebenssignalen in den infizierten Zellen führt, ist bisher nicht bekannt und sollte daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

2. Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Riedel-de-Häen (Seelze)
Agarose	Invitrogen (Paisley, UK)
ϵ -Amino-Capronsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad (Hercules, USA)
Biocoll Separationslösung	Biochrom AG (Berlin)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva (Heidelberg)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Caliculin A (Phosphatase-Inhibitor)	Cell Signaling Technology (Beverly , USA)
Calciumchlorid (CaCl_2)	Merck (Darmstadt)
Camptotecin (CAM)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Chaps Cell Extract Buffer	Cell Signaling Technology (Beverly , USA)
Cell Extraction Buffer	Biosource (Camarillo, USA)
Complete (Protease-Inhibitor-Cocktail)	Roche Applied Science (Penzberg)
4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1mg/ml)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	Biorad (Hercules, USA) Cell Signaling Technology (Beverly , USA)
Dulbecco`s Modified Eagle Medium	Gibco (Karlsruhe)
Essigsäure	Riedel-de-Häen (Seelze)
Ethanol (EtOH)	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Ethidiumbromid-Lösung (EtBr, 10 mg/ml)	Roche Applied Science (Penzberg)
Fluoroprep	bio Mérieux (Nürtingen)
FluorSave™ Reagent	Calbiochem (Darmstadt)

Material

Formaldehyd-Lösung (37%)	Merck (Darmstadt)
Glutamin (L) 200 mM	Gibco (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Riedel-de-Häen (Seelze)
HygromycinB	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Isopropanol	Acros Organics (New Jersey, USA)
fötale Kälberserum (FCS)	Gibco (Karlsruhe)
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
Kristallviolett	Sigma-Aldrich (Steinheim)
LipofectamineLTX	Invitrogen (Carlsbad, USA)
6x Loading Dye	Fermentas (St. Leon-Rot)
Magermilchpulver	Saliter (Obergrünsburg)
Minimum Essential Medium	Gibco (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methanol (MeOH)	Riedel-de-Häen (Seelze)
Mifepriston (MP)	Sigma-Aldrich (Saint-Louis USA)
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich (Saint-Louis USA)
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel-de-Häen (Seelze)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
Natrium-Pyruvat (100 mM)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Gibco (Karlsruhe)
OptiMEM	Gibco (Karlsruhe)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt)
Penicillin (5000 U/ml)/ Streptomycin (5000 µg/ml)	Gibco (Karlsruhe)
Poly-IC (künstliche dsRNA)	Sigma-Aldrich (Saint-Louis USA)
RiboLock Ribonuclease-Inhibitor	Fermentas (St. Leon-Rot)
RPMI 1640-Medium	Gibco (Karlsruhe)
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid-Lösung)	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
Super Signal™ West Dura Extended	

Material

Duration Substrate	PIERCE (Rockford, USA)
Super Signal™ West Femto Maximun	
Sensivity Substrate	PIERCE (Rockford, USA)
N,N,N',N' - Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Biorad (Hercules, USA)
Seaplaque Agarose	FMC Bio Products (Rockland, USA)
Soluble TRAIL, Human, Recombinant	Biomol International (Plymouth Meeting, USA)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Acros Organics (New Jersey, USA)
Triton-X-100	Serva (Heidelberg)
Trypsin-EDTA	Gibco (Karlsruhe)
Tween 20	Serva (Heidelberg)
Zeocin	Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.2 Molekularbiologische und biochemische Kits

Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche Applied Science (Penzberg)
OneStep RT-PCR-Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)

2.3 Puffer und Lösungen

Blocking-Reagenz (Immunfluoreszenz)	20 g BSA 2 ml Tween 20 30 ml Glycerin 5 ml NaN ₃ (10 % Lösung) ⇒ ad 1 Liter PBS _{def} steril filtrieren
-------------------------------------	--

Material

Glycin (0,1 M)	3,75 g Glycin ⇒ ad 500 ml H ₂ O
Kristallviolett-Lösung	270 ml 37%ige Formaldehyd- lösung 730 ml H ₂ O 1 g Kristallviolett
Paraformaldehyd (4%) in DMEM	20 g PFA 500 ml DMEM ⇒ auf 60 °C erwärmen und unter Rühren lösen
PBS ⁺⁺ (pH 7,5)	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ 0,13 g CaCl ₂ ⇒ ad 1 Liter H ₂ O autoklavieren
PBS _{def} (pH 7,5)	wie PBS ⁺⁺ , jedoch ohne CaCl ₂ autoklavieren
Protease-Inhibitormix (25x)	1 Tablette Complete 2 ml H ₂ O ⇒ durch Mischen lösen
Proteingellaufpuffer (10x)	10 g SDS 30 g Tris 144 g Glycin

Material

	⇒ ad 1 Liter H ₂ O
2,5% Seaplaque –Agarose	5 g Seaplaque – Agarose 200 ml H ₂ O ⇒ autoklavieren und vor Gebrauch aufkochen
SDS (10 %)	50 g SDS 500 ml H ₂ O
SDS-Proteinprobenpuffer (2x)	20 ml Glycerin (50 %) 5 ml DTT (1M) 10 ml SDS (10 %) 4,5 ml Tris-HCl (1 M, pH 6,8) 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Stripping-Puffer	100 mM 2-Mercaptoethanol 2 % SDS 62,5 mM Tris/HCl ph 6,8 ⇒ in H ₂ O lösen
TAE (50x)	242g Tris 57,1 ml Essigsäure (konz.) 100 ml EDTA (pH 8,0) ⇒ ad 1 Liter H ₂ O, auf pH 8,5 mit HCl einstellen
TBS (10x pH 7,6)	24,2 g Tris 80 g NaCl ⇒ ad 1 Liter H ₂ O, mit HCl pH 7,6 einstellen

Material

TBS + 0,1 % Tween	100 ml 10 x TBS 900 ml H ₂ O 1 ml Tween 20
Triton (0,1 %)	0,1 ml Triton-X-100 ⇒ ad 100 ml PBS _{def}
1,5 M Tris pH 8,8 (SDS-Trenngelpuffer)	181,71 g Tris ⇒ ad 1 Liter H ₂ O, mit HCl pH 8,8 einstellen
1,5 M pH 6,8 (SDS-Sammelgelpuffer)	181,71 g Tris ⇒ ad 1 Liter H ₂ O, mit HCl pH 6,8 einstellen
Western Blot - Anodenpuffer I	36,34 g Tris 200 ml EtOH (vergällt) ⇒ ad 1 Liter H ₂ O
Western Blot - Anodenpuffer II	3,03 g Tris 200 ml EtOH (vergällt) ⇒ ad 1 Liter H ₂ O
Western Blot - Kathodenpuffer	5,25 g ε-Amino-Capronsäure 3,03 g Tris 200 ml EtOH (vergällt) ⇒ ad 1 Liter H ₂ O

2.4 Wachstumsmedien für eukaryotische Zelllinien

Als Wachstumsmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (mit Natrium-Pyruvat, ohne L-Glutamin, ohne Pyridoxin) verwendet. Vor Verwendung wurden pro 500 ml Medium 5ml L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin zugegeben, dieses Medium wird im Folgenden als DMEM bezeichnet. Für die verwendeten MDCK-Zellen wurde Minimum Essential Medium (+ Earles basal salts ohne L-Glutamin) verwendet. Vor Verwendung wurden pro 500 ml Medium 5ml L-Glutamin zugegeben, das Medium wird im Folgenden als MEM bezeichnet. Zu den verwendeten Medien wurden verschiedene Konzentrationen fötales Kälberserum (FCS) zugesetzt. Beim Umsetzen der Zellen wurde Trypsin-EDTA zum Ablösen der Zellen vom Untergrund verwendet.

2.5 Eukaryotische Zelllinien

H1299 (humane Lungenkarzinomzellen)	American Type Culture Collection (ATCC)
HeLa (Zellen des humanen Cervixkarzinoms)	European collection of Cell cultures (ECACC)
MDCKII (Hundenierenzellen)	Dr. G. Zimmer, Institut für Virologie (Hannover)
MDCK-ZEBOV-GP-GFP (Hundenierenzellen mit stabiler Expression von ZEBOV-GP-GFP)	Dr. G. Zimmer, Institut für Virologie (Hannover)
Vero C1008 (Nierenzellen der grünen Meerkatze)	European collection of Cell cultures (ECACC)
Vero (Vero corvallis, Nierenzellen der grünen Meerkatze)	American Type Culture Collection (ATCC), erhalten von Dr. D. Stein, AVI BioPharma Inc. (Corvallis, USA)

2.6 Antikörper

Antikörper	Firma
Maus-anti-ZEBO-NP	Institut für Virologie, Universität Marburg
Ziege-anti-ZEBOV	Institut für Virologie, Universität Marburg
Kaninchen-anti-Sendaivirus	Prof. Dr. W. Neubert, MPI für Biochemie, Martinsried
Kaninchen-anti-Caspase 3 / 7 / 9	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)
Maus-anti-Caspase 8	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)
Kaninchen-anti-PARP	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)
Kaninchen-anti-Akt	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)
Kaninchen-anti-Akt-phospho (Ser 473)	Cell Signaling Technology (Beverly, USA)
Maus-anti-PKR	BD Biosciences (Heidelberg)
Kaninchen-anti-PKR-phospho (Thr 446)	Epitomics (Burlingame, USA)
Maus-anti-eIF2 α	Biosource (Camarillo, USA)
Maus-anti-eIF2 α -phospho (Ser 52)	Biosource (Camarillo, USA)
Maus-anti-Bcl2	Sigma-Adrich (Taufkirchen)
Kaninchen-anti-Bax	Serotec (Düsseldorf)
Maus-anti- β -Aktin	Abcam (Cambridge, UK)
Ziege-anti-Kaninchen-Rhodamin	Dianova (Hamburg)
Ziege-anti-Maus-Rhodamin	Dianova (Hamburg)
Esel-anti-Ziege-AlexaFluor495	Molecular Probes (Eugene, USA)
Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase	Dianova (Hamburg)
Ziege-anti-Maus-Peroxidase	Dianova (Hamburg)
Esel-anti-Ziege-Peroxidase	Dianova (Hamburg)
Esel-anti-Maus-IRDye800	Rockland (Gilbertville, USA)
Ziege-anti-Kaninchen-AlexaFluor680	Molecular Probes (Eugene, USA)

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

2.7 Viren

Adenovirus Typ 5 (Ad5)	Prof. Dr. M. Dobbstein (Zentrum für Molekulare Biowissenschaften, Universität Göttingen)
Ebolavirus Zaire (ZEBOV, Stamm Mayinga)	Center for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA)
Sendavirus (SeV, Stamm Cantell)	Dr. C. Basler (Mount Sinai School, New York, USA)
vesikuläres Stomatitis-Virus (VSV, Stamm Indiana)	Dr. Wagner, Institut für Virologie (Marburg)

2.8 DNA-Oligonukleotide/ Primer

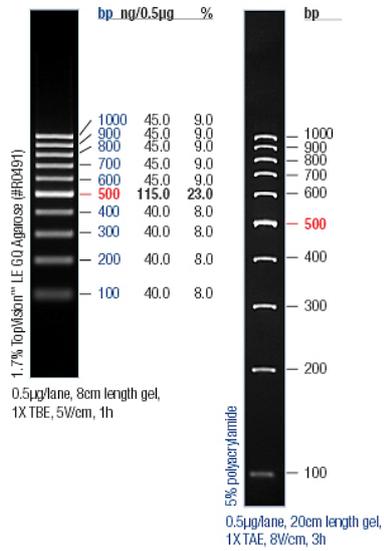
Die verwendeten Primer wurden von Operon Biotechnologies GmbH (Köln, Primer für TRAIL) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen, alle übrigen Primer) synthetisiert und erworben.

Primer	Sequenz (5' → 3')
1735-Bcl-2-fwd	TGCACCTGACGCCCT TCAC
1736-Bcl-2-rev	AGACAGCCAGGAGAAATCAAA
1768-Bax-fwd	ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTC
1769-Bax-rev	ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC
1771-GAPDH-fwd	TGAAGGTCGGAGTCAACGGA
1772-GAPDH-rev	CATGTGGGCCATGAGGTCCA
2064-TRAIL-fwd	CAATGACGAAGAGAGTATGA
2065-TRAIL-rev	CAAGTCTCTCTCCCAGCGTCTC

Tabelle 2: Verwendete Primer

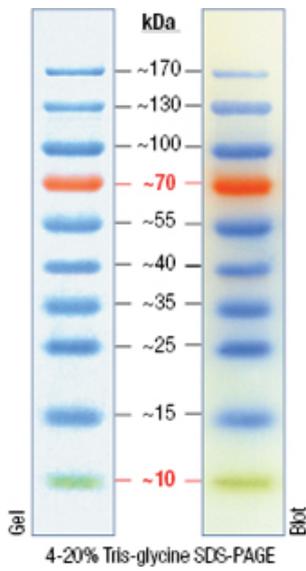
2.9 DNA-/ Proteinmarker

Gene Ruler 100 bp-Ladder



MBI Fermentas (St.-Leon-Rot)

Prestained Protein Ladder 10-200 kDa



MBI Fermentas (St.-Leon-Rot)

2.10 Verbrauchsmaterial

Cryoröhrchen	Corning (New York, USA)
Falconröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner (Nürtingen) / Sarstedt (Nümbrecht)
Glaswaren (verschiedene)	Schott (Mainz) / Hirschmann (Eberstadt)
Handschuhe Nobaglove-Latex	NOBA Verbandsmittel Danz GmbH (Wetter)
Papiertücher	Kimberly Clark (Roswell, USA)
Parafilm	Pechiney (Chicago, USA)
PVDF-Membranen (Immobilon)	Millipore (Bedford, USA)
Pipettenspitzen	StarLab (Ahrensburg)
Plastikpipetten (serologisch 1 – 25 ml)	Greiner (Nürtingen)/ Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (1,5 + 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)/ Sarstedt (Nümbrecht)
Röntgenfilme Hyperfilm™	Amersham Biosciences (Freiburg)
Röntgenfilme CEA RP New	CEA (Strangnäs, Schweden)
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann Coulter (Krefeld)
Whatman-Papier 3MM	Schleicher&Schuell (Dassel)
Zellkulturflaschen (25,75 und 160 cm ²)	Greiner (Nürtingen)
Zellkulturplatten (6-, 24-, und 96-Loch-Platten)	Greiner (Nürtingen)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)

2.11 Geräte

Brutschränke	Hereaus Instruments (Hanau)
Entwicklermaschine Optimax 2010	Protec processor Technology (Langen)
Fastblot Whatman	Biometra (Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Carl Zeiss (Jena)
Inverses Fluoreszenzmikroskop Axiovert	Carl Zeiss (Jena)

Material

Gel Doc 2000	BIO RAD (München)
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf AG (Hamburg)
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf AG (Hamburg)
Horizontalschüttler 3018	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwede)
Hybridisierungsöfen	Hybaid (Heidelberg)
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf AG (Hamburg)
Inverses Lichtmikroskop WILVERT Standard	hund (Wetzlar)
Magnetrührer MR 2002	Heidolph (Heidelberg)
Mikrowelle	Siemens (Berlin)
Miniprotean 3 Western Blot Gelkammern	BIO RAD (München)
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
Odyssey-Scanner	Licor (Lincoln, USA)
ph-Meter C6832	Schott Laborgeräte
Pipettboy comfort	Intergra Bioscience (Fernwald)
Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg)
Primus Thermocycler	MWG.Biotech (Ebersberg)
Sicherheitswerkbank	Hereaus Instruments (Hanau)
Spot Kamera	Diagnostic Instruments (USA)
Stromquelle Consort E425	von Keutz (Reiskirchen)
Taumler	Heidolph (Heidelberg)
Tischzentrifuge	Kobe (Marburg)
Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter (Krefeld)
Vakupack Tischschweißgerät	Krupps (Essen)
Vortexer Reax 2000	Heidolph (Schwabach)
Wasserbad Thermomix 1420	B. Braun (Melsungen)
Megafuge 1.0R	Hereaus Instruments (Hanau)

3. Methoden

3.1 Arbeiten mit Zellen

3.1.1 Kultivierung und Passagierung von eukaryotischen Zellen

Die eukaryotischen Zelllinien wurden in Dulbecco`s Modified Eagle Medium, versetzt mit L-Glutamin und Penicillin/ Streptomycin (im Folgenden als DMEM bezeichnet, siehe auch 2.4) und verschiedenen Mengen fötales Kälberserum (FCS) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank zum Wachstum inkubiert. Für die verwendeten MDCK-Zellen wurde Minimum Essential Medium mit 5% FCS zur Kultivierung verwendet (im Folgenden als MEM bezeichnet, siehe auch 2.4). Die Zellen wurden regelmäßig alle 3 bis 4 Tage passagiert. Zur Erhaltung der stabilen Expression des Glykoproteins von ZEBOV, welches an das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) gekoppelt in MDCK-ZEBOV-GP-GFP-Zellen stabil exprimiert wird, wurden bei jeder zweiten Zellpassage die Antibiotika Zeocin (0,5 mg/ml) und Hygromycin B (0,25 mg/ml) hinzugegeben (nach dem Protokoll von Dr. G. Zimmer, Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover). Zur Durchführung der Experimente wurden die Zellen aus Zellkulturflaschen (75 cm²) in Zellkulturplatten in gewünschter Dichte umgesetzt. Von den konfluent gewachsenen Zellen wurde das Zellkulturmedium abgenommen und der Zellrasen zweimal mit vorgewärmten (37°C) PBS_{def} vorsichtig gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (auf RT) zugegeben und die Ablösung am Mikroskop beobachtet. Sobald die Zellen sich abrundeten und abzuschwimmen begannen, wurden die Zellen durch „Abschlagen“ komplett gelöst und 8,5 ml DMEM + 10% FCS zugegeben. Die Zellen wurden durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren gut durchmischt. Zum Umsetzen in Zellkulturplatten wurden die abgelösten Zellen ausgezählt (3.1.3), um eine definierte Zellzahl zu erhalten. Die erhaltene Zellsuspension wurde dann in die Zellkulturplatten ausgesät und die Platten im Brutschrank bis zum nächsten Tag inkubiert. Dann wurden die Zellen für die gewünschten Experimente eingesetzt. Wurde keine exakte Zellzahl benötigt, wurde mit einem bestimmten Verdünnungsfaktor aus 75cm²-Zellkulturflaschen in z.B. 6-Loch-Platten (54 cm²) umgesetzt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel (Beispiel für Umsetzen 1:7):

$$\text{Berechnung für 6-Loch-Zellkulturplatten : } \frac{75 \text{ cm}^2}{10 \text{ ml} / 7} = \frac{54 \text{ cm}^2}{x}$$

$$\Rightarrow \quad x = 1,03 \text{ ml}$$

Pro 6-Loch-Platte wurden also 1,03 ml der abgelösten Zellen mit 18 ml DMEM + 10 % FCS gemischt und dann je 3 ml der Zelllösung in jede Vertiefung pipettiert. Für 24-Loch-Platten (42 cm², 1ml pro Vertiefung) und 96-Loch-Platten (27cm², 270 µl pro Vertiefung) erfolgte die Berechnung analog mit derselben Formel.

3.1.2 Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen

Die Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C in DMEM + 20% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO). Durch die Zugabe von DMSO findet ein Schutz vor Kristallisation und Dehydratation der Zellen statt. Durch die Lagerung wird Veränderung der Zellen durch weiteres Passagieren verhindert und die Zellen sind vor Kontamination geschützt. Hierzu wurden 175 cm² Zellkulturflaschen (ca. 80% konfluent) zunächst zweimal mit PBS_{def} gewaschen und dann durch Zugabe von 2ml Trypsin-EDTA (siehe auch 3.1.1) vom Untergrund abgelöst. Nach Zugabe von 3 ml DMEM + 10% FCS wurden die Zellen gründlich resuspendiert und je 1,5 ml in sterile Schraubgefäße überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 1200 rpm (Kühlzentrifuge 5417 R). Das Medium wurde abgenommen und das Zellpellet in 900 µl DMEM + 20% FCS + 10% DMSO wieder aufgenommen und anschließend in Cyroröhrchen, in die bereits 900 µl DMEM + 20% FCS + 10% DMSO vorgelegt wurden überführt. Die Zellen wurden dann in ein Cryoeinfriergefäß (mit Isopropanol befüllt) gegeben und bei -80°C langsam eingefroren. Am nächsten Tag wurden die eingefrorenen Zellen dann zur weiteren Lagerung in einen Stickstofftank (-196°C) umgelagert. Zum Auftauen der Zellen wurde das entsprechende Röhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und bei RT oder 37°C kurz angetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 25cm² Zellkulturflasche, in die auf 37°C vorgewärmte 5ml DMEM + 10% FCS vorgelegt wurden, überführt. Anschließend wurden die Zellen bis zur Konfluenz wachsen gelassen und dann zur weiteren Passagierung in 75cm² Zellkulturflaschen umgesetzt.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Vor und nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zählkammer und das Deckglas mit 70%igem Ethanol gereinigt. Durch leichtes Andrücken des angehauchten Deckglases (Bildung Newtonscher Ringe) entsteht unter dem Deckglas der definierte Freiraum der Zählkammer. In diesen kann die zugegebene Zellsuspension aufgrund von Adhäsionskräften eindringen. Die Zellzahl wurde durch Auszählen von 2 bis 4 Großquadraten (1 Großquadrat = 16 Kleinquadrate) und Bildung des Mittelwertes berechnet. Die errechnete Zellzahl entspricht den Zellen in 0,1 µl (gegeben durch den definierten Raum in der Zählkammer). Die gewünschte Zellmenge (z.B. 10^5 Zellen pro Vertiefung der Zellkulturplatte) wurde auf Zellen pro ml umgerechnet und die Zellsuspension dementsprechend mit DMEM + 10% FCS verdünnt und in Zellkulturplatten ausgesät.

3.1.4 Behandlung von Zellen mit Apoptose-induzierenden Reagenzien

Für die Induktion der Apoptose wurden Zellen mit Apoptose auslösenden Viren infiziert (siehe 4.2.1) oder mit Reagenzien behandelt. Verwendet wurde der humane Tumor Necrosis Factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in Konzentrationen von 100 ng/ml bis 500 ng/ml. Die Inkubation mit TRAIL in 1,5ml DMEM + 2% FCS pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte auf den Zellen für die gewünschte Zeit. Außerdem wurde Camptotecin (CAM, 10 µM) zur Induktion von Apoptose verwendet. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie für TRAIL beschrieben. Da als Lösungsmittel für CAM DMSO verwendet wurde, fand als Kontrolle die Behandlung von Zellen mit der entsprechenden Menge DMSO statt. Zur Induktion der GP-Expression in MDCK-EBO-GP-GFP-Zellen wurden die Zellen mit Mifepriston (MP) behandelt. Durch die Überexpression von GP in den Zellen kommt es zur Auslösung von Apoptose (gezeigt von Dr. G. Zimmer, Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover). Die Zellen wurden in 2 ml MEM + 5% FCS mit einer Endkonzentration von 10^{-7} M MP für mindestens 48h behandelt.

3.1.5 Transfektion von poly-IC mittels LipofectamineLTX

Zur spezifischen Aktivierung der **Proteinkinase R** (PKR) wurde die Transfektion von künstlicher doppelsträngiger RNA, **poly-IC** (pIC) genutzt. Transfiziert wurden HeLa-Zellen unter Verwendung des Transfektionsreagenz LipofectamineLTX. Zur Transfektion wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte 500 µl OptiMEM mit 1 µg pIC in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Anschließend wurden 2 µl LipofectamineLTX (Verhältnis DNA:Transfektionsreagenz = 1:2) zum Gemisch hinzugegeben und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation können sich DNA-Liposomen-Komplexe bilden, die von der Zelle aufgenommen werden. Während der Inkubationszeit wurde von den Zellen das Zellkulturmedium abgenommen und pro well einer 6-Loch-Platte 1ml DMEM + L-Glu auf die Zellen gegeben. Zu diesem Medium wurde dann der Transfektionsmix pipettiert und die Zellen im Brutschrank inkubiert. Die Zellernte erfolgte 5 bis 6 Stunden nach der Transfektion von pIC.

3.2 Arbeiten mit Viren

3.2.1 Infektion von Zellen

Die Infektion der Zellen mit ZEBOV erfolgte unter BSL-4-Bedingungen im Hochsicherheitslabor des Institutes für Virologie, Marburg. Als Kontrollen für den Apoptosenachweis wurden Zellen außerdem mit **Sendaivirus** (SeV), dem **vesikulären Stomatitis-Virus** (VSV) oder **Adenovirus Typ 5** (Ad5) infiziert. Bei der Infektion der Zellen mit ZEBOV sollte eine möglichst vollständige Infektion der Zellen erfolgen. Dazu wurden Vero-Zellen mit einer multiplicity of infection (moi) von 5, HeLa-Zellen und MDCK-Zellen mit einer moi von 10 infiziert. Die Infektion mit SeV erfolgte mit einer Verdünnung von 1:50 oder 1:100 (entspricht 40 bzw. 20 hämagglutinierenden (HA) Einheiten/ml), für die Infektion mit VSV wurde eine Verdünnungen von 1:3000 eingesetzt (entspricht $1,5 \times 10^4$ plaque forming units (pfu)/ml). Zur Infektion mit Ad5 wurde das Virus 1:500 verdünnt (entspricht 2×10^5 focus forming units (ffu)/ml). Zur Infektion wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen. Dann wurden 500 µl des Inokulums pro Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte in Medium ohne FCS zugegeben. Für die Mock-Kontrolle wurde Medium ohne Virus auf die Zellen

gegeben. Die Infektion erfolgte für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank mit regelmäßigem Schwenken der Platten zur gleichmäßigen Virusverteilung. Nach der einstündigen Inkubation wurde das Inokulum bei ZEBOV und VSV abgenommen und Medium mit 2% oder 5% FCS auf die Zellen gegeben (1,5 ml pro Vertiefung in 6-Loch-Platte). Alternativ wurde bei der Infektion mit SeV, Ad5 und z.T. ZEBOV das Inokulum auf den Zellen belassen und nach Infektion zusätzlich Medium mit 2% oder 5% FCS hinzugegeben (1ml pro Vertiefung in 6-Loch-Platte). Die Zellen wurden dann für die gewünschte Zeit im Brutschrank inkubiert.

3.2.2 Anzucht und Isolierung von Ebolavirus und Vesicular-Stomatitis-Virus

Zur Herstellung eines neuen Virusstocks wurden ZEBOV und VSV in VeroC1008-Zellen vermehrt und aus dem Überstand isoliert. Für ZEBOV wurden diese Arbeiten unter BSL-4-Bedingungen im Hochsicherheitslabor des Institutes für Virologie, Marburg durchgeführt. Zellen mit einer Dichte von etwa 30 - 50% wurden in großen Zellkulturflasche (175 cm²) mit 10 ml einer 1:2 bis 1:10 Verdünnung des bestehenden ZEBOV-Stocks in DMEM infiziert (siehe 3.2.1). Nach einstündiger Adsorption wurden 35 ml DMEM + 2% FCS pro Flasche zugegeben. Für VSV wurden Zellen mit einer Dichte von etwa 70% mit einer 1:1000 Verdünnung des vorhandenen VSV-Stocks infiziert und das Inokulum nach der einstündigen Adsorption entfernt. Dann wurden 40 ml DMEM + 2% FCS pro Flasche zugegeben. Als Mock-Kontrolle wurde eine Flasche nicht infizierter Zellen verwendet. Die infizierten Zellen wurden solange im Brutschrank inkubiert, bis ein deutlicher cytopathischer Effekt (CPE) sichtbar war (ca. 3-6 Tage nach Infektion mit ZEBOV und 2 Tage nach Infektion mit VSV). Dann wurde der Überstand in 50ml-Falconröhrchen überführt und 10 Minuten bei 5000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Megafuge 1.0R), um die Zelltrümmer zu entfernen. Der erhaltene Überstand von ZEBOV-infizierten Zellen wurde bei 4°C zur weiteren Verwendung gelagert oder durch Ultrazentrifugation ankonzentriert (siehe 3.2.4). Der Überstand der VSV-infizierten Zellen wurde aliquotiert und bei -20°C zur weiteren Verwendung gelagert. Der Virustiter wurde mithilfe von TCID₅₀ (für ZEBOV, siehe 3.2.5) oder Plaquetest (für VSV, siehe 3.2.6) bestimmt.

3.2.3 Anzüchten und Isolierung von Sendaivirus

Zur Herstellung eines neuen Virusstocks wurde **Sendaivirus** (SeV) in Hühnereiern angezüchtet. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen (10^{-2} – 10^{-4}) des vorhandenen SeV-Stocks (Isolierung 29.7.2000, HA 2⁸) in PBS_{def} angesetzt. Pro Virusverdünnung wurden 5 befruchtete, 11 Tage alte Hühnereier infiziert. Hierzu wurden pro Ei 200 µl der Virusverdünnung mit einer Spritze injiziert. Als Mock-Kontrolle wurde ein Ei in das PBS_{def} infiziert wurde verwendet. Die Löcher wurden mit Kleber versiegelt und die infizierten Eier für 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂ zur Virusvermehrung inkubiert. Zum Abtöten der Hühnerembryonen wurden die Eier dann über Nacht auf 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Eier mit Hilfe eines Spatels geöffnet und die Allantoisflüssigkeit mit einer Spritze entnommen (ca. 8 – 10 ml pro Ei). Die entnommene Flüssigkeit wurde sofort auf Eis gelagert und dann in Cryoröhrchen aliquotiert. Die Langzeitlagerung des Virusstocks erfolgte bei – 80°C. Der Titer des isolierten Virus wurde mit dem Hämagglutinationstests (siehe 3.2.7) bestimmt.

3.2.4 Ultrazentrifugation zur Konzentrierung von Ebolavirus

Um eine Konzentrierung von Ebolavirus durchzuführen, wurde unter BSL-4-Bedingungen eine Ultrazentrifugation durchgeführt. SW32-Ultrazentrifugenröhrchen wurden bis ca. 1cm unter den Rand mit isoliertem Virus aus Zellkulturüberstand (siehe 3.2.2) befüllt (ca. 36 ml pro Röhrchen) und durch Wiegen austariert. Die Zentrifugenröhrchen wurden in die entsprechenden Ultrazentrifugenbecher gegeben und aerosoldicht mit dem passenden Deckel verschlossen. Nach Beladen des Rotors wurde eine Zentrifugation für 2 Stunden bei 4°C und 20.000 rpm (Beckmann Ultrazentrifuge) durchgeführt. Nach Entladen des Rotors wurde das Medium abgenommen und verworfen. Die Pellets aus je drei Ultrazentrifugenröhrchen wurden in insgesamt 500 µl PBS_{def} resuspendiert und alle verwendeten Ultrazentrifugenröhrchen mit insgesamt 500 µl PBS_{def} nachgespült. Die erhaltene Viruslösung wurde anschließend in Cryoröhrchen aliquotiert (100 – 500 µl) und bei -80°C gelagert. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte über TCID₅₀-Analyse.

3.2.5 Bestimmung von Virustitern mittels TCID₅₀-Analyse

Zur Bestimmung des Titers von Ebolaviren wurde der TCID₅₀-Test (Tissue Culture Infectious Dose₅₀) eingesetzt. Hierzu wurden VeroC1008-Zellen in 96-Loch-Platten umgesetzt (270 µl Zellsuspension pro Vertiefung), so dass die Zelldichte am nächsten Tag etwa 30-50% betrug. Im Hochsicherheitslabor wurde von der ersten Reihe der Platte das Medium abgenommen und mit je 200 µl des zu testenden Ebolavirus-Stocks pro Vertiefung infiziert (unverdünnt bis 1:1000 Verdünnung). Dabei wurden mindestens vier Parallelansätze durchgeführt. Als Kontrolle wurden Zellen mit Medium ohne Virus versetzt. Nun wurden mithilfe einer Mehrkanalpipette schrittweise 1:10 Verdünnungen erstellt. Dazu wurden aus der infizierten Reihe der 96-Loch-Platte je Vertiefung 30 µl in die nächste Reihe überführt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Bei den ersten 9 Reihen wurden jeweils pro Verdünnung frische Pipettenspitzen verwendet. Die Platte wurde dann bis zur Ausbildung eines deutlichen CPE, der sich nicht mehr ändern sollte (mindestens 7 Tage für ZEBOV), im Brutschrank inkubiert. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen nach Vorhandensein von CPE durch die Virusinfektion ausgewertet. Die Errechnung des Virustiters erfolgte über die Spermann-Kärber-Methode [139].

3.2.6 Bestimmung von Virustitern mittels Plaquetest

Zur Bestimmung des Titers von VSV wurde ein Plaquetest durchgeführt. Um die Viruskonzentration zu bestimmen, wurden zunächst Verdünnungen des zu testenden Virus von 10^{-1} – 10^{-10} in DMEM ohne FCS angesetzt. Je eine Vertiefung von konfluent gewachsenen Vero-Zellen in 6-Loch-Platten wurde mit je 500 µl der verschiedenen Virusverdünnung infiziert (siehe 3.2.1). Während der Infektion wurde 2,5%ige Seaplaque-Agarose aufgekocht und dann auf 42°C warmgehalten. 2x DMEM mit 4% FCS wurde ebenfalls auf 42°C erwärmt. Nach der Infektion wurde das Inokulum abgenommen und pro Vertiefung 3 ml einer 1:1 Mischung der Seaplaque-Agarose und des 2x DMEM + 4% FCS zugegeben. Nach Aushärtung der Agarose wurden die Platten weiter im Brutschrank inkubiert. Durch die Virusreplikation von VSV erfolgt eine Lyse der Zellen. Aufgrund der Überschichtung mit dem Agarose-Medium-Gemisch können sich die freigesetzten Viren nur auf die direkt angrenzenden Zellen ausbreiten, wodurch sich spezifische Plaques (Löcher) im

Zellrasen ausbilden. Ein Plaque entspricht einem infektiösen Viruspartikel. Sobald Plaques deutlich im Zellrasen erkennbar waren (nach 1 – 2 Tagen), wurden pro Vertiefung 3 ml Kristallviolett-Lösung zugegeben und die Platten über Nacht bei 4°C inkubiert. Kristallviolett färbt nur lebende Zellen an, die lysierten/ zerstörten Zellen der Plaques werden also nicht angefärbt. Am nächsten Tag wurde die überschüssige Kristallviolettlösung abgegossen und die Agarose mit einem Spatel vorsichtig abgelöst. Die gefärbten Zellen wurden zweimal mit PBS_{def} gewaschen und dann bei Raumtemperatur getrocknet. Da jeder gebildete Plaque einem infektiösen Viruspartikel entspricht, kann man durch Auszählen der Plaques unter Berücksichtigung der Virusverdünnung die Anzahl der infektiösen Partikel = plaque forming units pro ml (pfu/ml) errechnen.

Beispielrechnung :

Bei der Verdünnung 10^{-6} sind 8 Plaques im Zellrasen entstanden. Da für die Infektion 500 µl verwendet wurden, gilt : $8 \times 2 \times 1/10^{-6}$ pfu /ml

$$\Rightarrow 1,6 \times 10^7 \text{ pfu / ml}$$

Das zu testende Virus hat also einen Titer von $1,6 \times 10^7$ pfu / ml.

3.2.7 Bestimmung von Virustitern mittels Hämagglutinationstest

Bestimmte Viren besitzen die Fähigkeit Erythrozyten zu vernetzen (= Hämagglutination). Zu diesen Viren gehört auch das SeV. Die Hämagglutination kann nur bei ausreichenden Virusmengen erfolgen, was man zur Bestimmung der Viruskonzentration (Hämagglutinationstiter = HA-Titer) einsetzen kann. Es wird ermittelt, welche Virusverdünnung noch in der Lage ist, eine Hämagglutination hervorzurufen. Der Test wurde in einer 96-Loch-Zellkulturplatte mit spitz zulaufenden Vertiefungen durchgeführt. Je 50 µl des zu testenden Virus wurden in Verdünnungsstufen von 2^1 bis 2^{16} (in PBS_{def}) in die Vertiefungen gegeben und jeweils 50 µl 1%ige Hühnererythrozytensuspension (zur Verfügung gestellt von AG Klenk, Institut für Virologie, Universität Marburg) zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 1-2 Stunden. Ist noch ausreichend Virus in der Verdünnung enthalten, werden die Erythrozyten vernetzt und man sieht eine gleichmäßige Verteilung (rötlich trüb) in der Vertiefung. Bei nicht ausreichender Virusmenge erfolgt keine Hämagglutination mehr und die Erythrozyten fallen als

„Erythrozytenknopf“ am Boden der Vertiefung aus. Aus der letzten Virusverdünnung, die noch eine Hämagglutination auslösen kann, ergibt sich der Hämagglutinationstiter. Ist z.B. eine Hämagglutination noch bei einer Verdünnung von 2^{12} möglich, jedoch bei einer Verdünnung von 2^{13} nicht mehr, entspricht dies einem Titer von HA 2^{12} .

3.3 Arbeiten mit Proteinen

3.3.1 Zellernte für Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Chaps-Puffer

Nach Infektion oder Behandlung der Zellen über den gewünschten Zeitraum wurden die Zellen geerntet, um anschließend Proteine im Western Blot nachzuweisen (siehe 3.3.3 und 3.3.4). Zum Nachweis von aktiven Caspasen wurde der empfohlene Chaps-Puffer (speziell für cytoplasmatische Proteine, Cell Signalling Technologies) verwendet. Dazu wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS_{def} gewaschen. Dann wurden 50 µl Chaps-Puffer (Chaps-Puffer + Proteaseinhibitormix + DTT) pro Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte zugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber vom Untergrund abgekratzt. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Waren aufgrund des durch die Virusinfektion verursachten CPE oder der Induktion von Apoptose viele Zellen abgelöst, wurde folgende Lysemethode angewandt: Die Zellen wurden im Medium mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 4°C, 14000 rpm (Kühlzentrifuge 5417 R) für 3 Minuten zentrifugiert und das Pellet wurde in 1 ml PBS_{def} resuspendiert und einer erneuten Zentrifugation (4 °C, 14000 rpm, 2 Minuten, Kühlzentrifuge 5417 R) unterzogen. Das Waschen des Pellets in PBS_{def} und die Zentrifugation wurden ein zweites Mal durchgeführt, danach wurde das Pellet in 50 µl Chaps-Puffer resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch dreimaliges Frieren und Tauen. Dazu wurde flüssiger Stickstoff bzw. -20°C-Kühlakkus zum Einfrieren der Proben verwendet, anschließend wurden diese bei Raumtemperatur oder im Brutschrank bei 37°C wieder aufgetaut. Die Zellysate wurden dann bei 4°C, 14000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert (Kühlzentrifuge 5417 R). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Bei einer Infektion im Hochsicherheitslabor wurden die Zellysate

in ein Eppendorfgefäß mit 50 µl 2 x SDS-Probenpuffer überführt und 10 Minuten gekocht, um die Viren zu inaktivieren. Danach wurden die Proben ausgeschleust und der weitere Versuch außerhalb des Sicherheitslabors unter BSL-2-Bedingungen durchgeführt. Bis zur Verwendung wurden die Zellysate bei – 20°C gelagert.

3.3.2 Zellernte für Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Cell Extraction Buffer

Zum Nachweis von membrangebundenen Proteinen oder phosphorylierten Proteinen wurde der Cell Extraction Buffer (Biosource, im folgenden als CLB bezeichnet) verwendet. Die Zellernte wurde wie unter 3.3.1 beschrieben durchgeführt, jedoch wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte 50 µl CLB (CLB + Proteaseinhibitormix) zur Zellyse verwendet. Beim Nachweis von phosphorylierten Proteinen wurde zusätzlich Caliculin A (Phosphataseinhibitor) zum Puffer zugesetzt. Die Proben wurden anschließend mindestens 20 Minuten bei 4°C inkubiert und mit gelegentlichem „Vortexen“ gemischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C, 14000 rpm für 10 Minuten (Kühlzentrifuge 5417 R), und der Überstand wurde in frische Eppendorfgefäße überführt. Bei Ernte im Sicherheitslabor wurde wie unter 3.3.1 beschreiben vorgegangen, um die Viren zu inaktivieren.

3.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Durch die Bindung von Sodiumdodecylsulfat (SDS) an Proteine entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs-/Masseverhältnis. Auch wirkt SDS denaturierend und verhindert so Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die entstandenen negativ geladenen Proteinkomplexe können über die **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese** (SDS-PAGE) durch ein elektrisches Feld nach Molekulargewicht aufgetrennt werden. Das verwendete Gelsystem besteht aus einem 4%igen Sammelgel und je nach gewünschter Auftrennung einem 10 - 15%igen Trenngel (Zusammensetzung siehe Tabelle 3, Menge ausreichend für 2 Gele). Die aufzutrennenden Proteingemische (Zellernte siehe 3.3.1 und 3.3.2) wurden 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt (bei Infektionen im Hochsicherheitslabor bereits bei Zellernte zur Inaktivierung durchgeführt).

Unmittelbar vor dem Auftragen auf die SDS-PAGE wurden die Proben 3-5 Minuten bei 95°C erhitzt. Es wurden je Probe 5 bis 20 µl aufgetragen. Um die Größe der aufgetrennten Proteine zu bestimmen, wurde ein Proteinmarker (1-3 µl, Laufmuster siehe 2.9) mit auf das Gel aufgetragen. Zum Einlaufen wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Der Gellauf erfolgte in 1x Proteingellaufpuffer bei 140 – 180 V. Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde ein Western Blot (siehe 3.3.4) durchgeführt.

	Sammelgel		Trenngel		
	4 %		10 %	12 %	15 %
1,5 M Tris pH 8,8	-		2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
1,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml		-	-	-
H ₂ O	2,9 ml		4,0 ml	3,3 ml	2,3 ml
Rotiphorese Gel 30 (Polyacrylamid)	750 µl		3,3 ml	4 ml	5 ml
10 % APS	50 µl		100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl		5 µl	5 µl	5 µl

Tabelle 3: Zusammensetzung SDS-Gele

3.3.4 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)

Durch den Western Blot werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine (SDS-PAGE, 3.3.3) auf eine Membran übertragen. Die Membran ist leichter zu handhaben und erlaubt eine direkte Interaktion zwischen den aufgetrennten Proteinen und z.B. Antikörpern oder Enzymen. Es wurde eine Fast-Blot-Apparatur verwendet, bei der Proteine durch elektrischen Strom transferiert werden. Die eingesetzte PVDF-Membran (9 x 6 cm) wurde für 15 Sekunden bis 5 Minuten in 100%igem MeOH aktiviert und dann in Anodenpuffer II inkubiert. Pro Gel wurden je 3 Whatman-Papiere (9 x 6 cm) in Anodenpuffer I, Anodenpuffer II und Kathodenpuffer getränkt. Der Blot wurde wie in Abbildung 7 dargestellt aufgebaut. Für die spätere Detektion von Proteinen im Odyssey-System wurde eine für Fluoreszenzen optimierte Membran (PVDF-FL) verwendet. Der Elektrotransfer erfolgte für 90 Minuten bei 0,8 mA/cm² (entspricht 43 mA pro Gel bei den oben angegebenen Größen) oder im

Fast-Blot-Verfahren bei 30 V für 30 Minuten je Blotkammer. Anschließend erfolgte ein Nachweis spezifischer Proteine über Antikörperbindung (3.3.5).

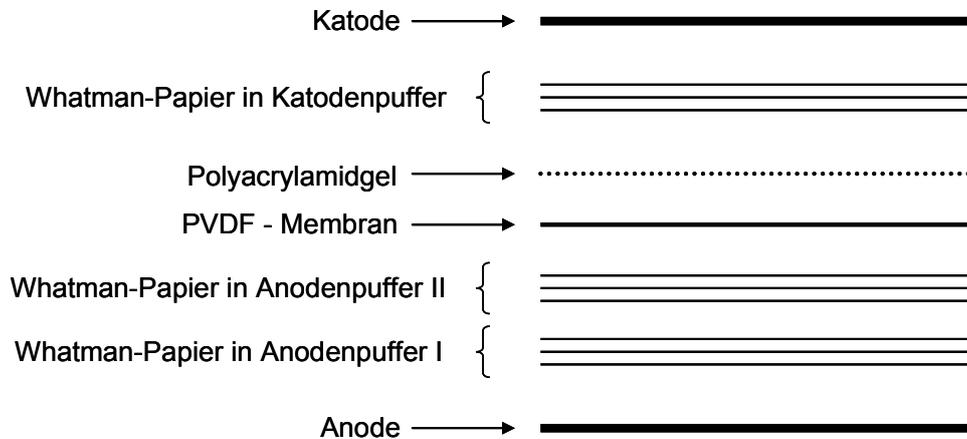


Abbildung 7: Aufbau eines Western Blots

3.3.5 Detektion von Proteinen über Antikörperbindung

Um nach dem Western Blot (siehe 3.3.4) auf der PVDF-Membran befindliche Proteine nachzuweisen, wird die Bindung von spezifischen Antikörpern an die gewünschten Proteinen genutzt. Der eingesetzte Erst-Antikörper ist spezifisch gegen das nachzuweisende Protein gerichtet, der Nachweis erfolgt dann über einen gegen den Erst-Antikörper gerichteten Peroxidase-gekoppelten Zweit-Antikörper. Die Peroxidase spaltet ihr Substrat, welches zur Detektion nach der Antikörperinkubation auf die Membran gegeben wird. Bei dieser Reaktion wird Licht freigesetzt, welches über einen Röntgenfilm nachweisbar ist. Alternativ wurde zur Detektion das Licor-Odyssey-System eingesetzt, wobei der Zweitantikörper an ein Fluorochrom gekoppelt ist, dessen Fluoreszenz vom Odyssey-Gerät detektiert wird. Die Membran aus dem Western Blot wurde schüttelnd in 5% Milchpulver in TBS + 0,1% Tween oder PBS_{def} + 0,1% Tween inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Bei Inkubation des Erst-Antikörpers über Nacht erfolgte das Absättigen für 1 Stunde bei Raumtemperatur, ansonsten wurde das Absättigen über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper erfolgte wie in Tabelle 4 beschrieben. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBS/PBS_{def} + 0,1% Tween bei Raumtemperatur gewaschen. Danach erfolgte die

Inkubation mit dem Zweit-Antikörper (siehe Tabelle 4) für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 10 ml 5% Milchpulver in TBS/PBS_{def} + 0,1% Tween. Dann wurde die Membran zweimal für 10 Minuten in TBS/PBS_{def} + 0,1% Tween und zweimal 20 Minuten in TBS/PBS_{def} gewaschen. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte entweder über einen Chemilumineszenznachweis oder durch Detektion mit dem Licor-Odyssey-System. Bei Verwendung von fluoreszenzmarkierten Zweit-Antikörpern wurde die Membran nach dem Waschen direkt mit dem Odyssey-Scanner eingelesen, wodurch man ein digitales Bild zur Quantifizierung mithilfe des Odyssey-Programmes erhält. Zum Chemilumineszenznachweis wurde das Super Signal™ West Dura Extended Duration Substrate oder Super Signal™ West Femto Maximun Sensivity Substrate verwendet. Die gewaschene Membran wurde in eine Folientasche gelegt und 5 Minuten mit 1 ml der Detektionslösung (500 µl Peroxidase-Puffer + 500 µl Peroxidase-Substrat) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Detektionslösung mit einem Papiertuch aus der Folientasche herausgedrückt und die Folie an allen Seiten zugeschweißt. Die eingeschweißte Membran wurde in einer Filmkammer fixiert und ein Röntgenfilm auf der Membran exponiert. Die Expositionszeit richtete sich nach dem eingesetzten Detektionssubstrat, der Bindungseffizienz der Antikörper und der eingesetzten Zelllysatzmenge für die SDS-PAGE. Die belichteten Filme wurden mittels Einscannen (300 dpi, Graustufen) digitalisiert. Bei der Quantifizierung wurde der mitgeführte Aktin-Nachweis zum Vergleich der Proteinmengen in den verschiedenen Proben genutzt.

Antikörper	Verdünnung	Antikörperinkubation
Kaninchen-anti-Caspase 3 / 7 / 9	1:1000 – 1:5000	5% Milchpulver in TBS + 0,1% Tween, über Nacht
Maus-anti-Caspase 8	1:1000 – 1:2000	5% BSA in TBS + 0,1% Tween, über Nacht
Kaninchen-anti-PARP	1:1000 – 1:5000	5% Milchpulver in TBS + 0,1% Tween, über Nacht
Kaninchen-anti-Akt (Ser 473)	1:1000 – 1:5000	5% BSA in TBS + 0,1% Tween, über Nacht
Kaninchen-anti-Akt-phospho	1:1000	5% BSA in TBS + 0,1% Tween, über Nacht

Methoden

Antikörper	Verdünnung	Antikörperinkubation
Maus-anti-PKR (Thr 446)	1:30.000	5% Milchpulver in TBS + 0,1% Tween, über Nacht
Kaninchen-anti-PKR-phospho	1:1000	5% Milchpulver in TBS + 0,1% Tween, über Nacht
Maus-anti-eIF2 α	1:500 – 1:1000	5% Milchpulver in TBS + 0,1% Tween, über Nacht
Maus-anti-eIF2 α -phospho (Ser 52)	1:30.000	5% Milchpulver in TBS + 0,1% Tween, über Nacht
Maus-anti-Bcl2	1:2000	5% Milchpulver in PBS _{def} + 0,1% Tween , 1h
Kaninchen-anti-Bax	1:1000	5% Milchpulver in PBS _{def} + 0,1% Tween , 1h
Maus-anti- β -Aktin	1:5000 – 1:40.000	Wie Inkubation mit parallel verwendetem Erstantikörper
Ziege-anti-ZEBOV	1:10.000	5% Milchpulver in TBS + 0,1% Tween, über Nacht
Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase	1:40:000	5% Milchpulver in TBS + 0,1% Tween , 1h
Ziege-anti-Maus-Peroxidase	1:40:000	5% Milchpulver in TBS + 0,1% Tween , 1h
Esel-anti-Ziege-Peroxidase	1:40.000	5% Milchpulver in TBS + 0,1% Tween , 1h
Esel-anti-Maus-IRDye800	1:5000	5% Milchpulver in PBS _{def} + 0,1% Tween , 1h
Ziege-anti-Kaninchen-AlexaFluor680	1:5000	5% Milchpulver in PBS _{def} + 0,1% Tween , 1h

Tabelle 4: Antikörper für Western Blot

3.3.6 Entfernung gebundener Antikörper von der Membran (Strippen)

Um eine bereits mit Antikörpern behandelte Membran erneut zu verwenden, müssen die gebundenen Antikörper entfernt werden. Hierzu wurde die Membran nach der Detektion der Proteine zunächst in TBS/PBS_{def} gewaschen. Die Entfernung der

gebundenen Antikörper erfolgte für 15 bis 20 Minuten in Stripping Puffer bei 60 – 65°C (Wasserbad oder Inkubationsofen). Hierbei werden die an die Membran gebundenen Antikörper durch das im Stripping Puffer enthaltene SDS und β -Mercaptoethanol abgelöst. Anschließend wurde die Membran zweimal für je 20 Minuten in TBS/PBS_{def}, dann zweimal je 20 Minuten in TBS/ PBS_{def} + 0,1% Tween gewaschen. Anschließend wurden die Membran zunächst in 5% Milchpulver in TBS/ PBS_{def} + 0,1% Tween inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen und die Membran erneuten zur Detektion von Proteinen eingesetzt (siehe 3.3.5).

3.4 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.4.1 Isolierung und Aufreinigung von RNA

Um mögliche Auswirkungen einer Infektion oder einer Behandlung mit Apoptose-auslösenden Reagenzien auf die Transkription von zellulären RNAs zu untersuchen, wurde die Gesamt-RNA der Zellen mithilfe des RNeasy Kits (Qiagen) isoliert. Hierzu wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS_{def} gewaschen. Dann wurden 600 μ l RLT-Puffer (+1% β -Mercaptoethanol) pro Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte zugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber vom Untergrund abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Waren aufgrund des durch die Virusinfektion verursachten CPE oder durch die Induktion von Apoptose viele Zellen abgelöst, wurde folgende Lysemethode angewandt: Die Zellen wurden im Medium mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 4°C, 8000 rpm für 3 Minuten pelletiert und das Pellet wurde in 1 ml PBS_{def} resuspendiert und einer erneuten Zentrifugation (4 °C, 8000 rpm, 2 Minuten, Kühlzentrifuge 5417 R) unterzogen. Das Waschen des Pellets in PBS_{def} wurde ein zweites Mal durchgeführt, dann wurde das Pellet in 600 μ l RLT-Puffer (+1% β -Mercaptoethanol) resuspendiert. Anschließend wurden 600 μ l 70%iger Ethanol zugegeben und die Proben gut durch „Vortexen“ gemischt. Bei Infektion mit Ebolavirus wurden die beschriebenen Schritte im Hochsicherheitslabor durchgeführt. Durch das im RLT-Puffer enthaltene Guanidinium-Isothiocyanat und β -Mercaptoethanol findet eine Inaktivierung der Viren statt und die Proben konnten so aus dem BSL-4-Labor ausgeschleust werden. Die Isolierung der RNA wurde

anschließend nach Protokoll des Kits durchgeführt. Die RNA wurde in 40µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -20°C gelagert oder direkt in einer RT-PCR (s. 3.4.2) eingesetzt.

3.4.2 Detektion spezifischer RNA mittels RT-PCR

Zum Nachweis spezifischer zellulärer mRNA wurde die aus Zellen isolierte RNA (siehe 3.4.1) in einer Reversen-Transkriptions-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) eingesetzt. Verwendet wurden Primer, die gegen die mRNA gerichtet waren, um Regulation auf Transkriptionsebene zu detektieren. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 (siehe 2.8) aufgelistet. Die RT-PCR wurde mit dem Qiagen OneStep RT-PCR-Kit durchgeführt. Vor Einsatz der isolierten RNA muss diese denaturiert werden. Dazu wurde die entsprechende Menge RNA für 10 Minuten bei 65°C (Heizblock oder PCR-Block) und anschließend 3 Minuten auf Eis inkubiert. Die denaturierte RNA wurde dann zum RT-PCR-Ansatz gegeben. Verwendet wurde folgender Ansatz nach Angaben des Herstellers:

5 µl denaturierte Gesamt-RNA
10 µl 10x Puffer
2 µl dNTPs (je 10 mM)
3 µl Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
3µl Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl RNase Inhibitor (40 U/µl)
2 µl Enzymmix
24,5 µl RNase freies H₂O
50 µl

Bei Nachweis von verschiedenen RNAs in einer Reaktion wurden alle entsprechenden Primer eingesetzt und entsprechend weniger Wasser verwendet.

Als Letztes wurde der Enzymmix zum Ansatz zugesetzt und die PCR-Gefäße dann sofort in den PCR-Block gestellt und das PCR-Programm gestartet. Dabei wurde das unten dargestellte Programm verwendet. Hierbei dient der erste Schritt (50°C) zur Reversen Transkription der RNA in cDNA. Diese wird dann in der anschließenden PCR-Reaktion amplifiziert. Zum Abgleich der unterschiedlichen RNA-Mengen wurde ein Fragment der zellulären **Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase** (GAPDH)

amplifiziert. Bei Nachweis von Bcl-2 und Bax wurde wie unten beschrieben 60°C zur Bindung der Primer verwendet, bei Nachweis von TRAIL eine Temperatur von 50°C. Für den GAPDH-Nachweis wurde parallel dieselbe Annealing-Temperatur verwendet.

Eingesetztes RT-PCR-Programm:

50°C	30'	
95°C	15'	
94°C	1'	} 35 Zyklen
60°C	1'	
72°C	2'	
72°C	10'	
8°C	∞	

3.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA mittels Agarosegel

Um die mittels RT-PCR (siehe 3.4.2) generierten DNA-Fragmente zu detektieren, wurden die PCR-Proben auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. Verwendet wurden 1,5 – 2%ige Agarosegele. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose abgewogen und pro Gel in 40 ml 1xTAE aufgekocht (Mikrowelle, gelegentlich schwenken). Vor dem Aufkochen wurde das Gewicht bestimmt und nach dem Kochen die fehlende Differenz mit Wasser wieder aufgefüllt. Die fertige Agarose-TAE-Lösung wurde in einen vorbereiteten Gelschlitten gegeben. Nach Aushärten der Agarose wurden 1 bis 5 µl der PCR-Proben mit 6x Loading Dye und zur Größenbestimmung ein DNA-Marker (Laufmuster siehe 2.9) auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 50 mA, zum Einlaufen der Proben aus den Taschen wurden 30 mA genutzt. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Agarosegel für 10 bis 20 Minuten in Ethidiumbromid (1:10.000 in Wasser gelöst, entspricht 10⁻³ mg/ml) inkubiert, um die DNA im Gel anzufärben. Die angefärbten DNA-Banden wurden mittels QuantityOne fotografiert und gegebenenfalls mittels der TINA 2.0-Software (RayTest, Freiburg) quantifiziert.

3.5 Immunfluoreszenzanalyse

3.5.1 Infektionsnachweis mittels Immunfluoreszenz

Die auf Deckgläsern kultivierten Zellen wurden infiziert (siehe 3.2.1), der Erfolg der Infektion wurde in der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Bei Infektionen im Hochsicherheitslabor wurden die Deckgläser zweimal mit PBS_{def} gewaschen und über Nacht in DMEM + 4% Paraformaldehyd (PFA) bei 4°C zur Inaktivierung des Virus inkubiert. Dabei findet eine Fixierung der Zellen auf dem Deckglas statt. Am nächsten Tag wurden die Deckgläser in frisches PFA-haltiges Medium transferiert und die Immunfluoreszenz außerhalb des Sicherheitslabors durchgeführt. Bei Infektionen, die unter BSL-2-Bedingungen durchgeführt wurden, wurde die PFA-Fixierung nur für 20 Minuten bei RT durchgeführt. Zum Nachweis der Infektion wurden die Deckgläser zunächst dreimal mit kaltem PBS_{def} vorsichtig gewaschen. Dann wurden die Zellen mit TritonX-100 permeabilisiert. Hierzu wurden die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer 0,1%igen Triton-X-100-Lösung inkubiert und dann erneut dreimal mit PBS_{def} gewaschen. Bei MDCK-Zellen wurde eine Fixierung mit Aceton-Methanol (Verhältnis 1:1) für 5 Minuten bei -20°C durchgeführt mit anschließendem dreimaligen Waschen mit PBS_{def}. Anschließend wurden die Deckgläser bei Raumtemperatur 5 Minuten in 0,1 M Glycin-Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (PBS_{def}) erfolgte eine 10minütige Inkubation in Blocking-Reagenz bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben mit dem ersten Antikörper inkubiert. Die Antikörperinkubation erfolgte in einer „feuchten Kammer“. Dazu wurde ein in H₂O getränktes Tuch in eine Boehringer Box gelegt und ein mit Parafilm überzogener Zellkulturplattendeckel als Auflage für die Deckgläser verwendet. Pro Deckglas wurden 25 µl der entsprechenden Antikörperverdünnung (siehe Tabelle 5) in Blocking-Reagenz auf die Platte getropft und das Deckglas mit der Zellseite nach unten daraufgelegt. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Deckgläser viermal für 5 Minuten in PBS_{def} gewaschen, bevor die Inkubation wie oben beschrieben mit dem zweiten Antikörper erfolgte. Parallel wurde der Zweitantikörperverdünnung zur Anfärbung der Zellkerne DAPI zugesetzt. Anschließend wurden die Deckgläser kurz in H₂O geschwenkt, das überschüssige Wasser abgetupft und die Deckgläser mit Fluoroprep/FluorSave auf einem Objektträger fixiert. Nach Aushärten des Eindeckelmittels (bei 4°C) wurden die Präparate am Fluoreszenzmikroskop

analysiert. Die Lagerung der Präparate erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

Antikörper	Eingesetzte Verdünnung
Maus-anti-ZEBO-NP	1:50 – 1:100
Ziege-anti-ZEBOV	1:500
Kaninchen-anti-Sendaivirus	1:500
Ziege-anti-Kaninchen-Rhodamin	1:200
Ziege-anti-Maus-Rhodamin	1:200
Esel-anti-Ziege-AlexaFluor495	1:500
DAPI	1:2000 – 1:10.000

Tabelle 5: Antikörper für Immunfluoreszenz

3.5.2 Nachweis von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche

Auf die Zelloberfläche verlagertes Phosphatidylserin kann durch Bindung von fluoreszenzmarkiertem AnnexinV nachgewiesen werden. Die zu färbenden Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und Apoptose über Infektion oder entsprechende Reagenzien ausgelöst. Vor der Färbung wurden die Deckgläser zweimal mit PBS_{def} vorsichtig gewaschen. Zur Färbung mit AnnexinV-FITC wurden pro Deckglas 25 µl der Annexin-V-Staining Solution (Roche Annexin-V-FLUOS-Staining Kit) verwendet. Die Inkubation erfolgte auf einem mit Parafilm umwickelten Zellkulturplattendeckel in einer Boehringer Box (feuchte Kammer, siehe auch 3.5.1) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Deckgläser über Nacht in DMEM + 4% PFA bei 4°C inkubiert. Dieser Schritt diente im Sicherheitslabor zur Inaktivierung des Virus, wobei die Zellen auch fixiert werden. Am nächsten Tag wurde mit den behandelten Proben zusätzlich ein Infektionsnachweis mittels Immunfluoreszenz durchgeführt oder nur die Zellkerne mittels DAPI-Färbung angefärbt (siehe 3.5.1).

4. Ergebnisse

In Studien mit ZEBOV-infizierten Affen konnte in Zellen mit Virusreplikation keine Apoptose beobachtet werden, jedoch untergehen nicht-infizierte Lymphozyten Apoptose [105, 106]. Daher wurde in der dieser Arbeit zugrundeliegenden Diplomarbeit Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen untersucht. Hier konnte in Vero-Zellen ebenfalls keine Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen nachgewiesen werden, was die obengenannten Daten bestätigte. Es konnte mittels AnnexinV-Färbung keine frühe Apoptose nachgewiesen werden, die Analyse von Caspasespaltung mittels Western Blot und Einsatz eines fluoreszierenden Inhibitors in der Immunfluoreszenz ergab, dass keine Caspasen aktiviert werden. Auch Spaltung der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) und Chromatinkondensation, charakteristische späte Stadien der Apoptose, konnten in ZEBOV-infizierten Zellen nicht beobachtet werden [134]. Daher wurde in dieser Arbeit Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen detaillierter untersucht, um zu klären wie ZEBOV regulativ in die Apoptosesignalwege eingreift.

4.1 Untersuchung von Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induzierter Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese von ZEBOV scheint der Verlust von Lymphozyten durch Apoptose zu spielen, da hierdurch die Immunantwort stark geschwächt wird. Vermutet wird, dass die Sekretion von Apoptose-auslösenden Molekülen aus den ZEBOV-infizierten Zellen, wie Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), zur Induktion von Apoptose in den nicht-infizierten Lymphozyten führt (siehe 1.2.3). Daher sollte untersucht werden, ob ZEBOV-infizierte Zellen vor TRAIL-induzierter Apoptose geschützt sind. Für die Versuche wurden Vero-Zellen verwendet, da dort effizient mit TRAIL Apoptose induziert werden konnte und sie sich gut mit ZEBOV infizieren lassen. Ein frühes Stadium der Apoptose ist die Translokation von Phosphatidylserin auf die Zelloberfläche (siehe 1.1.2), welche über AnnexinV-Färbung, wie unter 3.5.2 beschrieben, nachgewiesen wurde. Da für eine Analyse der Regulation von Apoptose möglichst alle Zellen infiziert sein sollten, wurde parallel die Infektion mit ZEBOV über Immunfluoreszenz (siehe 3.5.1) nachgewiesen, um sicherzustellen, dass eine ausreichende Infektion vorlag. Durch die Infektion mit einer moi

(multiplicity of infection) von 5 konnte eine nahezu 100%ige Infektion erreicht werden (Abbildung 8, ZEBOV). Wie bereits in der dieser Arbeit zugrundeliegenden Diplomarbeit beschrieben [134], konnte in ZEBOV-infizierten Zellen keine Translokation von Phosphatidylserin beobachtet werden. Im Verlauf dieser Arbeit stellte sich aber die Ablösung der apoptotischen Zellen als Problem für den AnnexinV-Nachweis dar. Wie in Abbildung 8 dargestellt, waren nach TRAIL-Behandlung weniger Zellen auf den Deckgläsern vorhanden, die angefärbt und somit analysiert werden konnten. Ebenso war die beobachtete AnnexinV-Färbung z.T. nicht eindeutig bestimmten Zellen zuzuordnen, da auch durch eventuelle Nekrose entstandene Zelltrümmer durch AnnexinV angefärbt werden. Daher konnte keine eindeutige Aussage über stattfindende Apoptose in den ZEBOV-infizierten Zellen getroffen werden. Um eine genauere Analyse von TRAIL-induzierter Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen durchzuführen, wurde daher die Aktivität von Caspasen im Western Blot untersucht. Durch die Ernte aller Zellen, der abgelösten apoptotischen Zellen miteingeschlossen (siehe 3.3.1), konnten so reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Ebenso stellte sich im Verlauf der Experimente heraus, dass die verwendeten Zellen in unterschiedlichen Passagen verschieden stark auf TRAIL reagierten. Daher wurden unterschiedliche Konzentrationen an TRAIL verwendet.

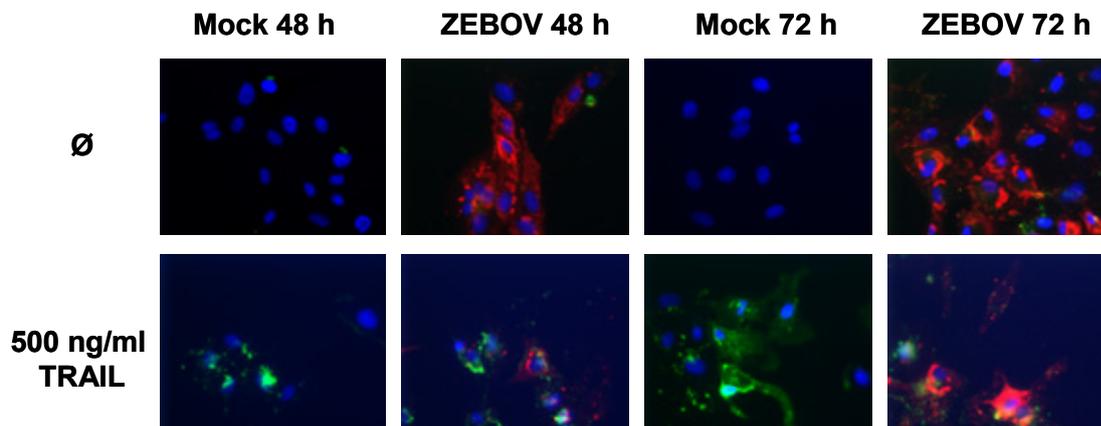


Abbildung 8: AnnexinV-Nachweis in ZEBOV-infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels TRAIL

4×10^4 Vero-Zellen auf Deckgläsern wurden mit ZEBOV (moi = 5) infiziert. 24h nach der Infektion wurde Apoptose durch die Zugabe von TRAIL ausgelöst. 48h und 72h nach Infektion wurde eine AnnexinV-FITC-Färbung (grüne Fluoreszenz) durchgeführt. Anschließend wurde die ZEBOV-Infektion mit Maus-anti-ZEBOV-NP (1:100) und Ziege-anti-Maus-Rhodamin (1:200, rote Fluoreszenz) nachgewiesen. Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI (1:10.000, blaue Fluoreszenz) angefärbt.

Um eine ausreichende Infektionsrate zu gewährleisten, wurde parallel zum Apoptosenachweis die Infektion in der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Zellen wurden für alle Versuche mit einer moi von 5 infiziert, wodurch 48h nach der Infektion alle Zellen infiziert waren (Abbildung 9, ZEBOV). Die Behandlung mit TRAIL hatte keinen Effekt auf die Infektion mit ZEBOV, auch in TRAIL-behandelten Zellen lag die Infektionsrate bei 100% nach 48h (Abbildung 9, ZEBOV + TRAIL). Zusätzlich zum Nachweis der Infektion in der Immunfluoreszenz wurde ein Nachweis der ZEBOV-Proteine mittels Western Blot-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden dieselben Zelllysate, die für den Nachweis von Apoptose eingesetzt wurden, verwendet. Zum Nachweis wurde ein anti-ZEBOV-Serum (Ziege-anti-ZEBOV) verwendet, welches verschiedene ZEBOV-Proteine erkennt, jedoch nicht das GP. In Abbildung 10 ist der Nachweis von ZEBOV im Western Blot nach Induktion von Apoptose durch TRAIL in ZEBOV-infizierten dargestellt. Es konnte ein eindeutiger Nachweis von Virusproteinen in den ZEBOV-infizierten Zellen durchgeführt werden. Zwischen der ZEBOV-Infektion alleine (Abbildung 10, ZEBOV) und den Zellen, die infiziert und mit TRAIL behandelt wurden (Abbildung 10, ZEBOV + TRAIL), ist jedoch kein Unterschied in der Menge der viralen Proteine festzustellen. In allen ZEBOV-infizierten Proben sind in etwa dieselben Mengen an Virusprotein nachweisbar, nach Induktion von Apoptose ist keine deutliche Zu- oder Abnahme zu beobachten. Da die

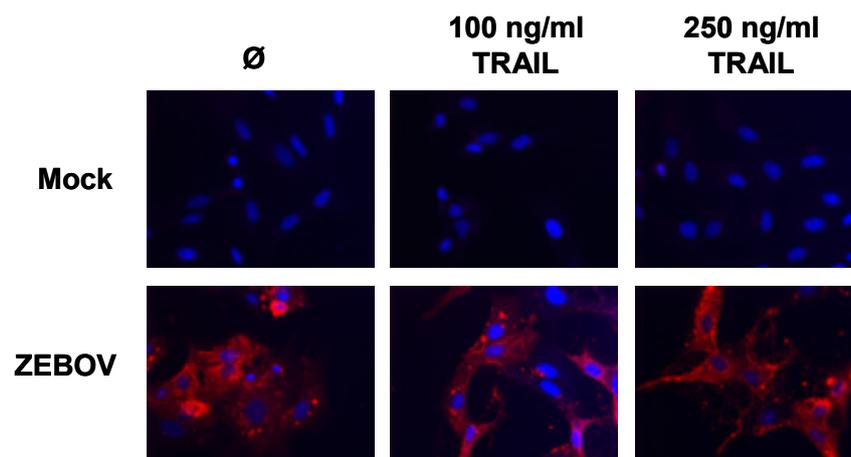


Abbildung 9: Nachweis der ZEBOV-Infektion in Vero-Zellen nach TRAIL-Behandlung

5×10^4 Vero-Zellen auf Deckgläsern wurden mit ZEBOV infiziert ($moi = 5$). 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit TRAIL behandelt, um Apoptose zu induzieren. 48h nach der Infektion wurden die Deckgläser mit 4%PFA in DMEM inaktiviert und fixiert. Der Nachweis der Infektion erfolgte mit Ziege-anti-ZEBOV (1:500) und Esel-anti-Ziege-AlexaFluor495 (1:500, rote Fluoreszenz). Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI (1:10.000, blaue Fluoreszenz) angefärbt.

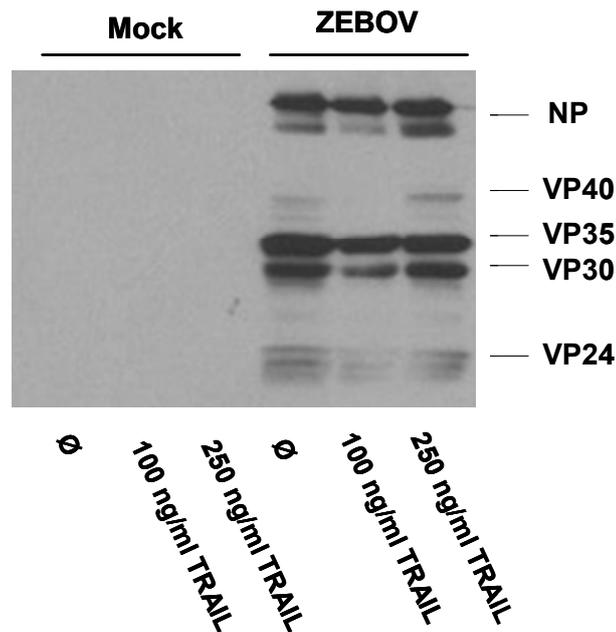


Abbildung 10: Nachweis von ZEBOV-Proteinen in infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels TRAIL

5×10^4 Vero-Zellen wurden mit ZEBOV infiziert (moi = 5). 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit TRAIL behandelt um Apoptose zu induzieren, 48h nach der Infektion wurden die Zellen in Chaps-Puffer lysiert und nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer je 15 μ l pro Probe auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteindetektion wurde im Western Blot-Verfahren mittels Ziege-anti-ZEBOV (1:10.000) und Esel-anti-Ziege-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

Zellen in Chaps-Puffer (speziell für cytoplasmatische Proteine) lysiert wurden, sind die membranassoziierten viralen Proteine VP24 und VP40 nur in geringer Menge nachzuweisen, da die Membranen durch den Puffer nicht lysiert wurden.

Nach Bindung von TRAIL an seinen Rezeptor wird als erste Caspase die Initiatorcaspase 8 aktiviert. Die Spaltung von Caspase 8 wurde mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen (Abbildung 11). In nicht-infizierten Zellen kam es nicht zur Aktivierung von Caspase 8. Wurden die nicht-infizierten Zellen mit TRAIL behandelt, führte dies zur Spaltung von Caspase 8 (Abbildung 11, TRAIL). In ZEBOV-infizierten unbehandelten Zellen wurde Caspase 8 nicht gespalten. Um zu klären, ob die ZEBOV-infizierten Zellen vor TRAIL-induzierter Apoptose geschützt waren, wurden infizierte Zellen mit TRAIL behandelt. Wie in Abbildung 11 dargestellt, wurde trotz ZEBOV-Infektion Caspase 8 nach Behandlung mit TRAIL gespalten und damit aktiviert. Dies konnte für verschiedene Mengen TRAIL (Abbildung 11, ZEBOV + TRAIL) gezeigt werden. Aktivierte Caspase 8 ist in der Lage, die Effektorcaspase 3

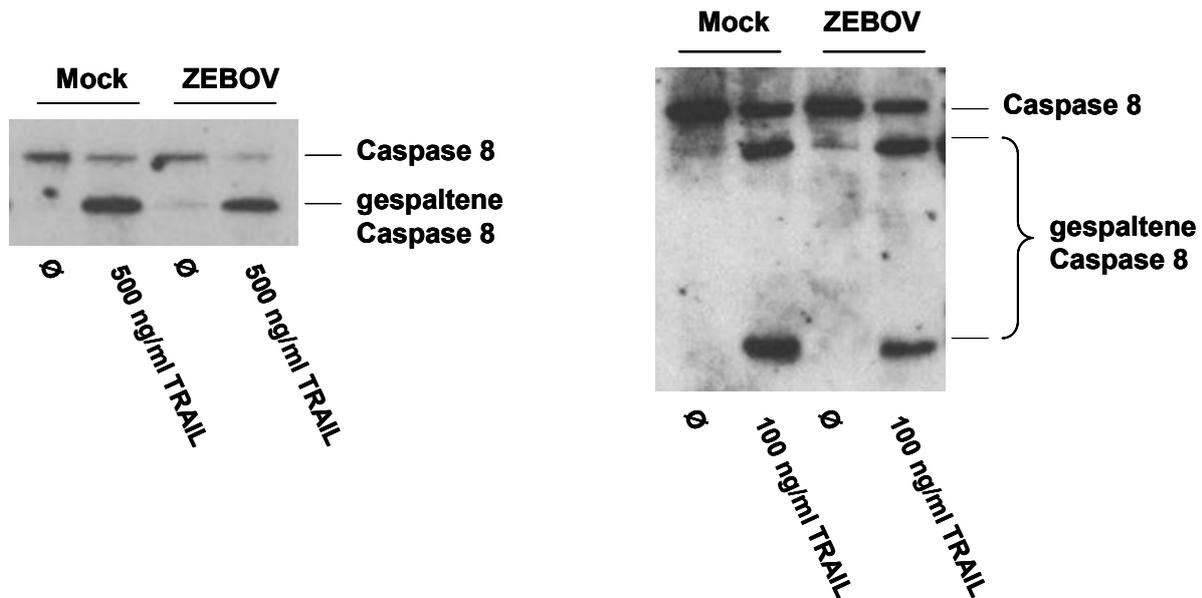


Abbildung 11: Nachweis von Caspase 8 im Western Blot nach ZEBOV-Infektion von Vero-Zellen und TRAIL-Behandlung

5×10^4 Vero-Zellen wurden mit ZEBOV infiziert (moi = 5). 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit TRAIL behandelt um Apoptose zu induzieren, 48h nach der Infektion wurden die Zellen in Chaps-Puffer lysiert und nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer je 15 μ l pro Probe auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Caspase 8 wurde im Western Blot-Verfahren mittels Maus-anti-Caspase 8 (1:1000) und Ziege-anti-Maus-Peroxidase (1:40.000) und anschließend Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

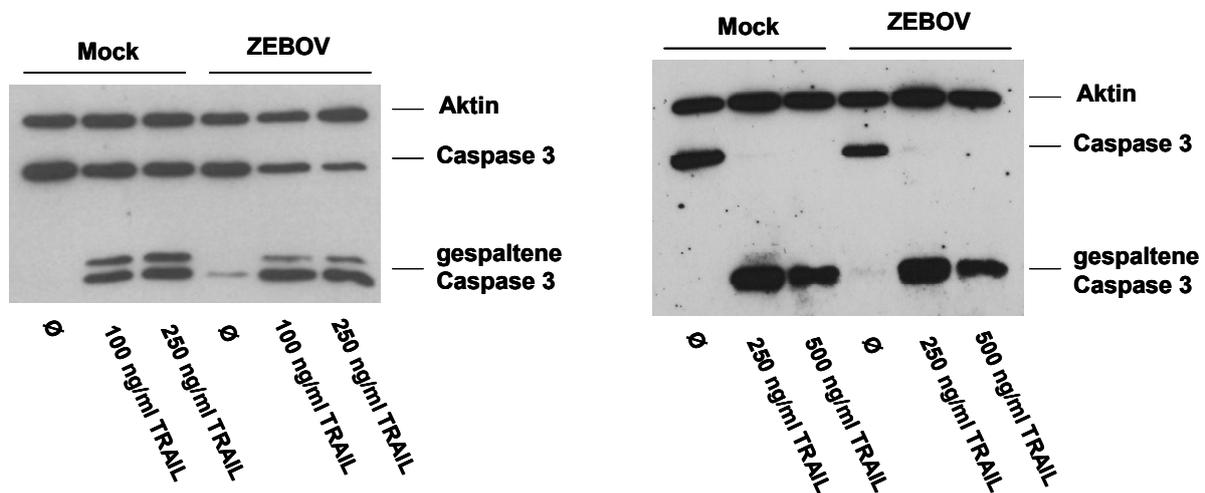


Abbildung 12: Nachweis von Caspase 3 im Western Blot nach ZEBOV-Infektion und TRAIL-Behandlung

5×10^4 Vero-Zellen wurden mit ZEBOV infiziert (moi = 5). 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit TRAIL behandelt, um Apoptose zu induzieren, 48h nach der Infektion wurden die Zellen in Chaps-Puffer lysiert und nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer je 15 μ l pro Probe auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Caspase 3 wurde im Western Blot-Verfahren mittels Kaninchen-anti-Caspase 3 (1:2000) und Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase (1:40.000) und anschließend Chemilumineszenznachweis nachgewiesen. Zum Vergleich der Proteinmengen wurde Aktin mittels Maus-anti- β -Aktin (1:40.000) und Ziege-anti-Maus-Peroxidase (1:40.000) parallel nachgewiesen.

zu spalten. Deswegen wurden die Zelllysate auch auf Caspase 3-Spaltung hin untersucht. In Abbildung 12 ist dargestellt, dass nach der Induktion von Apoptose durch TRAIL in den Vero-Zellen auch Caspase 3 aktiviert wurde. Verschiedene Konzentrationen von TRAIL führten zur Aktivierung von Caspase 3, das Ausmaß der Spaltung variierte zwischen den einzelnen Versuchen (Abbildung 12, Vergleich Spaltung Caspase 3 bei 250 ng/ml TRAIL). In ZEBOV-infizierten Zellen konnte keine oder nur eine sehr schwache, Aktivierung von Caspase 3 detektiert werden (Abbildung 12). In Zellen, die mit ZEBOV infiziert und dann zusätzlich mit TRAIL behandelt wurden, konnte eine Spaltung von Caspase 3 gezeigt werden. Im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen konnte dieselbe Menge an gespaltener Caspase 3 nachgewiesen werden (Abbildung 12, Vergleich Mock + TRAIL und ZEBOV + TRAIL). Um sicherzustellen, dass gleiche Proteinmengen im Western Blot aufgetragen wurden, erfolgte zusätzlich der Nachweis von Aktin als zellulärem Markerprotein. Eine Infektion mit ZEBOV führt also nicht zu einer aktiven Hemmung des TRAIL-vermittelten Apoptosesignalweges und die infizierten Zellen sind nicht vor TRAIL-induzierter Apoptose geschützt.

Da verschiedene, z.T. widersprüchliche Daten zur Expression von TRAIL in ZEBOV-infizierten Zellen bekannt waren (siehe 1.2.3), sollte überprüft werden, ob die TRAIL-Expression in ZEBOV-infizierten Zellen verstärkt wird. Hierzu wurde aus den infizierten Zellen Gesamt-RNA isoliert und mit spezifischen Primern, die gegen die m-RNA gerichtet waren (siehe 2.8, Tabelle 2), die TRAIL-mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen. Parallel wurde die Infektion mit ZEBOV in der Immunfluoreszenz detektiert. In den für die oben dargestellten Versuche verwendeten Vero-Zellen konnte mit den verwendeten Primern gegen humanes TRAIL keine RNA detektiert werden. Daher wurden HeLa-Zellen (Zellen des humanen Cervixkarzinoms) mit ZEBOV zur Analyse der TRAIL-mRNA-Level mittels RT-PCR infiziert. Der Nachweis der ZEBOV-Infektion mittels Immunfluoreszenz ist in Abbildung 13 dargestellt. Nach 48h waren 100% der Zellen mit EBOV infiziert (Abbildung 13, ZEBOV). Die RNA wurde, wie unter 3.4.1 beschrieben, isoliert und anschließend in einer RT-PCR (siehe 3.4.2) eingesetzt, um die TRAIL-mRNA zu detektieren. Um die einzelnen Proben in ihrem RNA-Gehalt vergleichen zu können, wurde parallel eine RT-PCR gegen die **Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)** als zellulärem Marker durchgeführt. Wie in Abbildung 14 dargestellt, konnte in allen Proben vergleichbare Menge an GAPDH detektiert werden. Beim Nachweis der TRAIL-

mRNA konnten jedoch deutliche Unterschiede festgestellt werden. In der Mock-Kontrolle konnte zu allen untersuchten Zeitpunkten TRAIL-mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 14, Mock). In ZEBOV-infizierten Zellen wurde im Vergleich zur Mock-Kontrolle eine deutliche Reduktion der TRAIL-mRNA-Menge beobachtet, welche im Verlaufe der Infektion zunahm. So war 72h nach ZEBOV-Infektion fast keine TRAIL-mRNA mehr nachweisbar (Abbildung 14, ZEBOV).

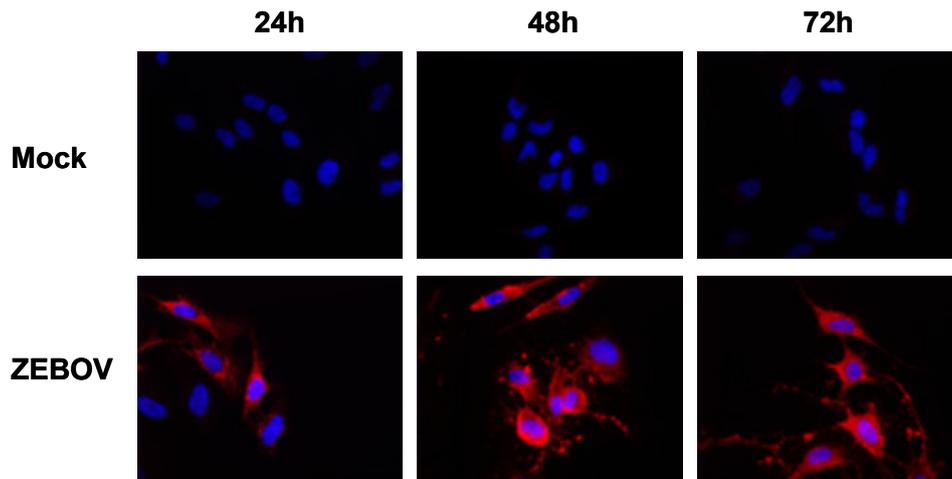


Abbildung 13: Nachweis der ZEBOV-Infektion in HeLa-Zellen nach TRAIL-Behandlung

10^5 HeLa-Zellen auf Deckgläsern wurden mit ZEBOV (moi = 10) infiziert und nach den angegebenen Zeitwerten mit 4% PFA in DMEM fixiert/inaktiviert. Anschließend wurde die Infektion mit Ziege-anti-ZEBOV (1:500) und Esel-anti-Ziege-AlexaFluor495 (1:500, rote Fluoreszenz) nachgewiesen. Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI (1:5000, blaue Fluoreszenz) angefärbt.

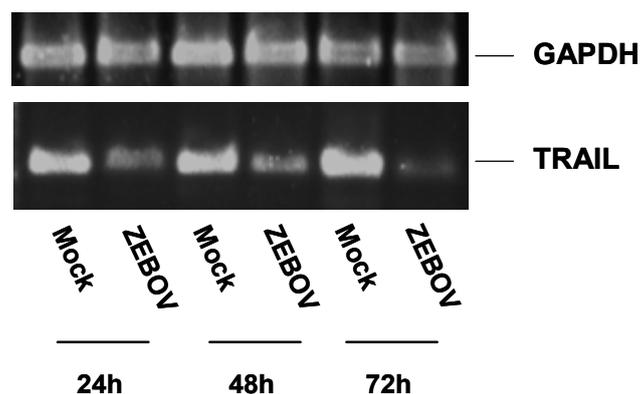


Abbildung 14: RT-PCR zur Analyse der TRAIL-mRNA-Level

10^5 HeLa-Zellen wurden mit ZEBOV infiziert (moi = 10), nach den angegebenen Zeitwerten in 700 μ l RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. 5 μ l der RNA wurden in einer RT-PCR eingesetzt und je 2 μ l der PCR-Produkte auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Um die DNA anzufärben, wurde das Gel nach Auftrennung der Fragmente mit Ethidiumbromid gefärbt.

4.2 Analyse der mitochondrial induzierten Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen

4.2.1 Induktion von Apoptose mittels Camptothecin

4.2.1.1 Untersuchung der Bax- und Bcl-2-Level

Wie in 1.1.2.2 beschrieben, ist die Entscheidung zur Einleitung von Apoptose an den Mitochondrien über das Verhältnis der verschiedenen pro- und antiapoptotischen Bcl-2 Proteine reguliert. Als charakteristische Vertreter wurden hier die Level von Bax (apoptosefördernd) und Bcl-2 (apoptosehemmend) in ZEBOV-infizierten Zellen untersucht. Hierzu wurden Vero-Zellen mit ZEBOV infiziert, der Nachweis der Infektion in der Immunfluoreszenz ist in Abbildung 15 dargestellt. Durchschnittlich waren 48h nach der Infektion 80 bis 90% der Zellen mit ZEBOV infiziert. Um den internen Apoptosesignalweg zu induzieren, wurden die Zellen mit dem Topoisomerase-I-Inhibitor Camptothecin (CAM) behandelt. Dies führt zu DNA-Schäden in den Zellen, wodurch Apoptose über die Mitochondrien eingeleitet wird [52]. Um den Einfluss von ZEBOV auf die Transkription von Bax und Bcl-2 zu untersuchen, wurde zelluläre Gesamt-RNA 24 und 48h nach CAM-Behandlung oder EBOV-Infektion isoliert (siehe 3.4.1). Die gereinigte RNA wurde dann mit Bax- und Bcl-2-spezifischen Primern (siehe 2.8, Tabelle 2) in einer RT-PCR eingesetzt. Als

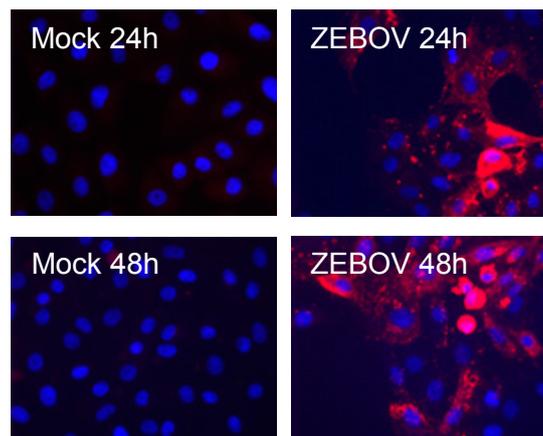


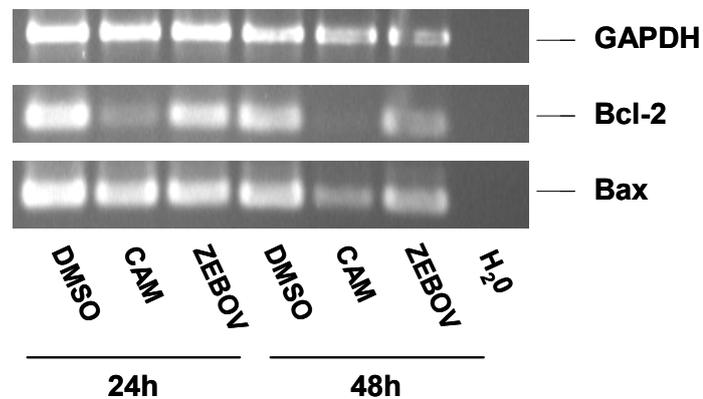
Abbildung 15: Nachweis der ZEBOV-Infektion in Vero-Zellen mittels Immunfluoreszenz

10^5 Vero-Zellen auf Deckgläsern wurden mit ZEBOV infiziert ($moi = 5$) und nach 24h bzw. 48h mit 4%PFA in DMEM inaktiviert und fixiert. Der Nachweis der Infektion erfolgte mit Ziege-anti-ZEBOV (1:500) und Esel-anti-Ziege-AlexaFluor495 (1:500, rote Fluoreszenz). Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI (1:10.000, blaue Fluoreszenz) angefärbt.

Kontrolle wurden Zellen mit DMSO behandelt, das als Lösungsmittel für CAM verwendet wurde. Um eine Semiquantifizierung der RNA-Mengen durchführen zu können, wurden gleichzeitig Primer gegen GAPDH als zellulärem Marker eingesetzt. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis der RT-PCR. Nach CAM-Behandlung der Zellen ist eine eindeutige Abnahme der Bcl-2-mRNA schon nach 24h zu beobachten. Nach 48h ist in CAM-behandelten Zellen keine Bcl-2mRNA mehr nachweisbar, jedoch sieht man auch einen Rückgang in der Bax-RNA-Menge, wahrscheinlich aufgrund des Abbaus der Zelle durch die stattfindende Apoptose. Die Reduktion der Bcl-2-mRNA Level nach Behandlung mit CAM sind deutlich in der Quantifizierung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu sehen (Abbildung 16 B). In ZEBOV-infizierten Zellen konnte kein Unterschied in den Bax- oder Bcl-2-RNA-Level festgestellt werden (Abbildung 16 A und B). Eine Infektion mit ZEBOV hat also keinen Einfluss auf die Transkription von Bax oder Bcl-2, um Apoptose zu verhindern. Die RNA-Mengen entsprechen denen in nicht-infizierten Kontrollzellen (DMSO), es findet keine Hemmung der Apoptose durch z.B. Hochregulation der Transkription des antiapoptotischen Bcl-2 statt.

Da auch eine posttranskriptionelle Regulation möglich sein könnte, wurden zusätzlich die Level von Bax und Bcl-2 auf Proteinebene analysiert. Dazu wurden die Zellen wie oben behandelt und anschließend in Cell Extraction Buffer lysiert (siehe 3.3.2). Die erhaltenen Lysate wurden in der Western Blot-Analyse eingesetzt und der Nachweis über spezifische Antikörper gegen Bcl-2 und Bax durchgeführt (Abbildung 17). Zur Quantifizierung wurde der Nachweis mittels des Licor-Odysseygerätes durchgeführt, da hier die Signale direkt (ohne Chemilumineszenznachweis) durch Einsatz von fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern detektiert werden. Um die einzelnen Proben vergleichen zu können, wurde parallel ein Antikörper gegen β -Aktin verwendet, um gleiche Proteinmengen zu gewährleisten. Wie schon auf RNA-Ebene zu beobachten (Abbildung 16), führte die Behandlung der Zellen mit CAM zu einer Reduktion der Bcl-2 Menge auch auf Proteinebene. Wie bei den RNA-Proben war hier der Effekt nach 48h CAM-Behandlung im Vergleich zu 24h noch verstärkt, es war fast kein Bcl-2 Protein mehr detektierbar (Abbildung 17 A, CAM). In der Quantifizierung sieht man deutlich, dass nach 48h im Verhältnis mehr Bax als Bcl-2 vorhanden war, wodurch Apoptose in den Zellen ausgelöst wurde (Abbildung 17 B). Die Induktion von Apoptose wurde anhand des durch CAM-Behandlung verursachten CPE kontrolliert, ebenso wurde die Aktivierung von Caspase 3 und PARP-Spaltung beobachtet

(A)



(B)

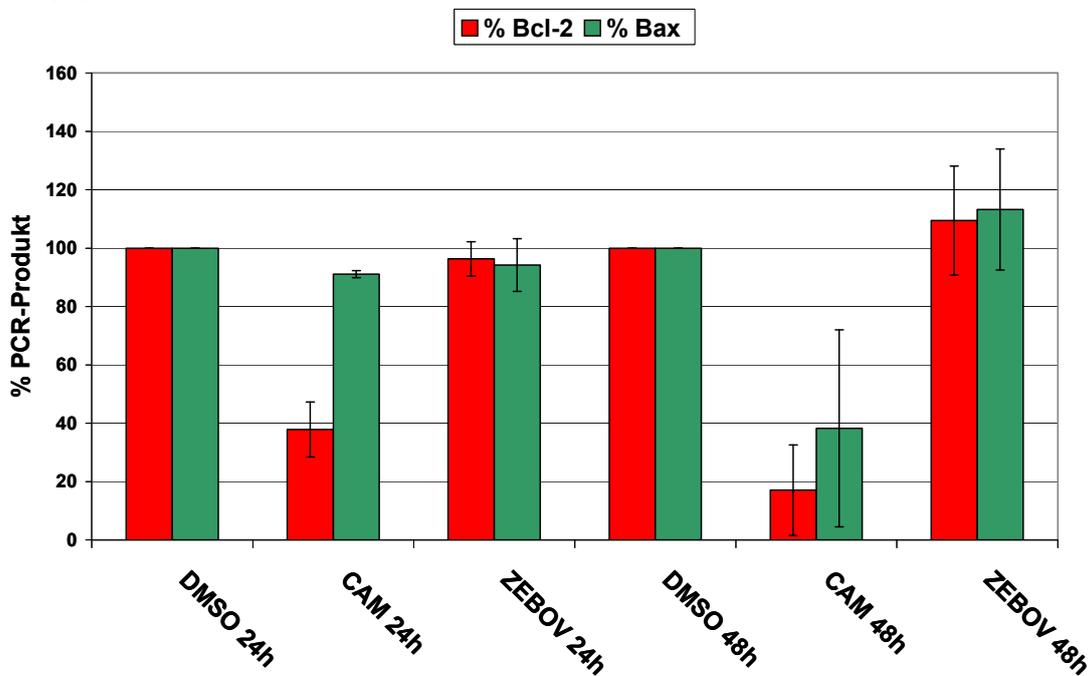


Abbildung 16: Analyse der Bax- und Bcl-2-mRNA-Level mittels RT-PCR

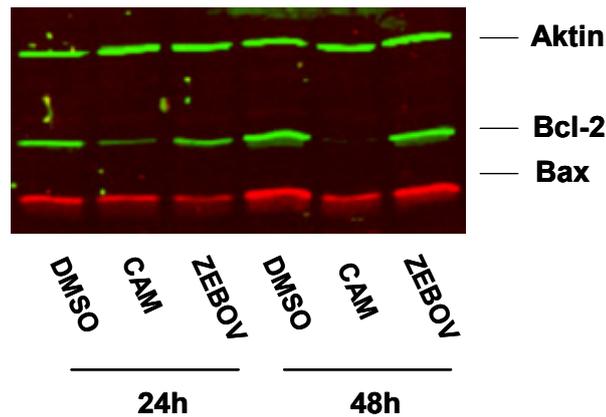
(A) RT-PCR zur Detektion der RNA-Level

10^5 Vero-Zellen wurden mit $10 \mu\text{M}$ CAM behandelt oder mit ZEBOV infiziert ($\text{moi} = 5$). Als Kontrolle wurden Zellen mit der entsprechenden Menge DMSO behandelt. Nach 24h und 48h wurden die Zellen in $700 \mu\text{l}$ RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. $5 \mu\text{l}$ der RNA wurden in einer RT-PCR eingesetzt und je $2 \mu\text{l}$ der PCR-Produkte auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Um die DNA anzufärben, wurde das Gel nach Auftrennung der Fragmente mit Ethidiumbromid gefärbt.

(B) Quantifizierung der RT-PCR

Anhand von GAPDH wurden die RNA-Mengen der einzelnen Proben quantifiziert, die DMSO-Kontrollen wurden je Zeitwert als 100% definiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

(A)



(B)

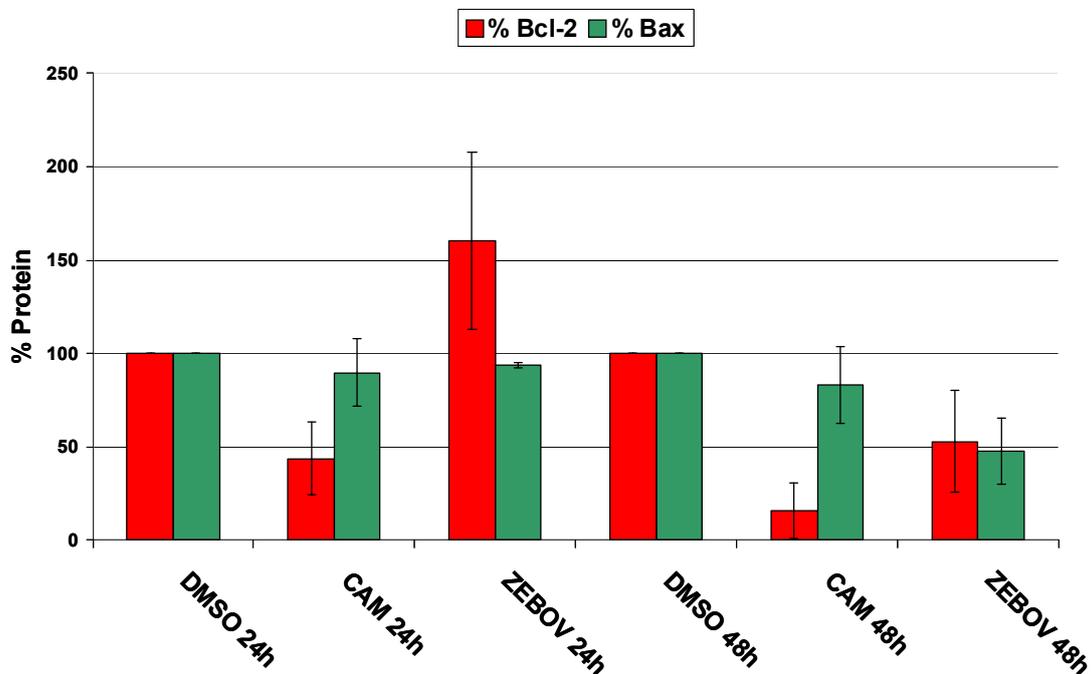


Abbildung 17: Analyse der Bax- und Bcl-2-Protein-Level mittels Western Blot

(A) Western Blot zum Nachweis der Proteine

10^5 Vero-Zellen wurden mit $10 \mu\text{M}$ CAM behandelt oder mit ZEBOV infiziert ($\text{moi} = 5$). Als Kontrolle wurden Zellen mit der entsprechenden Menge DMSO behandelt. Nach 24h und 48h wurden die Zellen in $50 \mu\text{l}$ Cell Extraction Buffer lysiert. Nach Zugabe von $2\times$ SDS-Probenpuffer wurden $15 \mu\text{l}$ der Lysate auf ein 15% iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Maus-anti-Bcl2 (1:2000), Kaninchen-anti-Bax (1:1000) und Maus-anti- β -Aktin (1:5000), sowie Esel-anti-Maus-IRDye800 (1:5000, grüne Fluoreszenz) und Ziege-anti-Kaninchen-AlexaFluor680 (1:5000, rote Fluoreszenz) nachgewiesen und mittels Licor-Odyssey nachgewiesen.

(B) Quantifizierung des Western Blots

Anhand der β -Aktin-Bande wurden die Protein-Mengen der einzelnen Proben quantifiziert, die DMSO-Kontrollen wurden je Zeitwert als 100% definiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

(siehe 4.2.1.2). In der DMSO-Kontrolle waren beide Proteine im gleichen Verhältnis vorhanden, sodass keine Apoptose ausgelöst wurde. In Zellen, die mit ZEBOV infiziert wurden, konnten im Vergleich zur DMSO-Kontrolle keine Änderungen in den Proteinlevel detektiert werden (Abbildung 17). In der Quantifizierung ist eine leichte Erhöhung der Bcl-2 Menge nach 24h nach ZEBOV-Infektion zu beobachten, diese lässt sich doch durch die großen Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten erklären (Abbildung 17 B, ZEBOV 24h, hohe Standardabweichung). Aufgrund der im Vergleich zur ZEBOV-Probe starken Signale in der DMSO-Kontrolle der 48h-Werte, welche zur Quantifizierung als 100% definiert wurde, lässt sich auch der in Abbildung 17 B sichtbare Rückgang von Bcl-2 und Bax in ZEBOV-infizierten Zellen erklären, wobei auch hier starke Schwankungen in der Proteinmenge beobachtet werden konnten (Abbildung 17 B, ZEBOV 48h, Standardabweichung). Jedoch sind die beiden Proteine auch hier im selben Verhältnis, wie in der Mock-Kontrolle vorhanden. Dies bedeutet, dass keine Regulation von Bax und Bcl-2 auf Proteinebene durch ZEBOV stattfindet.

Eine weitere Möglichkeit der Apoptoseregulation wäre die Aufrechterhaltung der Bax-Bcl-2-Balance durch ZEBOV, um Apoptose zu verhindern. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde das oben beschriebene Experiment wiederholt, jedoch zusätzlich nach ZEBOV-Infektion eine CAM-Behandlung durchgeführt. Um eine ausreichende Menge an Virus in den Zellen zu gewährleisten, wurden die Zellen zuerst infiziert und 24h nach der Infektion mit CAM bzw. DMSO behandelt. Parallel wurden Zellen auf Deckgläsern ausgesät, um die Infektionsrate mittels Immunfluoreszenz zu bestimmen. Diese wurden vor dem Infektionsnachweis mit AnnexinV gefärbt, um die früh in der Apoptose stattfindende Translokation von Phosphatidylserin nachzuweisen (siehe 1.1.2 und 3.5.2). 72h nach der Infektion waren nahezu 100% der Zellen mit ZEBOV infiziert (Abbildung 18, EBOV + DMSO). Die CAM-Behandlung führte zur starken Induktion von Apoptose, wodurch sich viele Zellen bereits vom Deckglas abgelöst hatten und nicht analysiert werden konnten (Abbildung 18, verminderte Zellzahl bei CAM-behandelten Zellen). Daher konnte kein eindeutiger Nachweis von Apoptose über AnnexinV-Bindung an Phosphatidylserin durchgeführt werden. Daher wurde auch ein Nachweis der ZEBOV-Infektion mittels Western Blot Analyse durchgeführt, in dem alle Zellen (auch die durch Apoptose abgelösten Zellen) analysiert wurden. Hierzu wurden die für den Apoptosenachweis

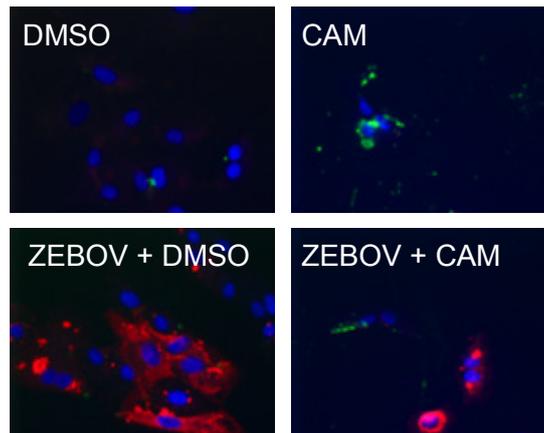


Abbildung 18: AnnexinV-Nachweis in ZEBOV-infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels CAM

4×10^4 Vero-Zellen auf Deckgläsern wurden mit ZEBOV (moi = 5) infiziert, 24h nach der Infektion wurde Apoptose durch die Zugabe von $10 \mu\text{M}$ CAM ausgelöst. Als Kontrolle wurden Zellen mit der entsprechende Menge DMSO behandelt. 72h nach Infektion wurde eine AnnexinV-FITC-Färbung (grüne Fluoreszenz) durchgeführt und die Zellen mit 4% PFA in DMEM fixiert/inaktiviert. Anschließend wurde die ZEBOV-Infektion mit Ziege-anti-ZEBOV (1:500) und Esel-anti-Ziege-AlexaFluor495 (1:500, rote Fluoreszenz) nachgewiesen. Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI (1:10.000, blaue Fluoreszenz) angefärbt.

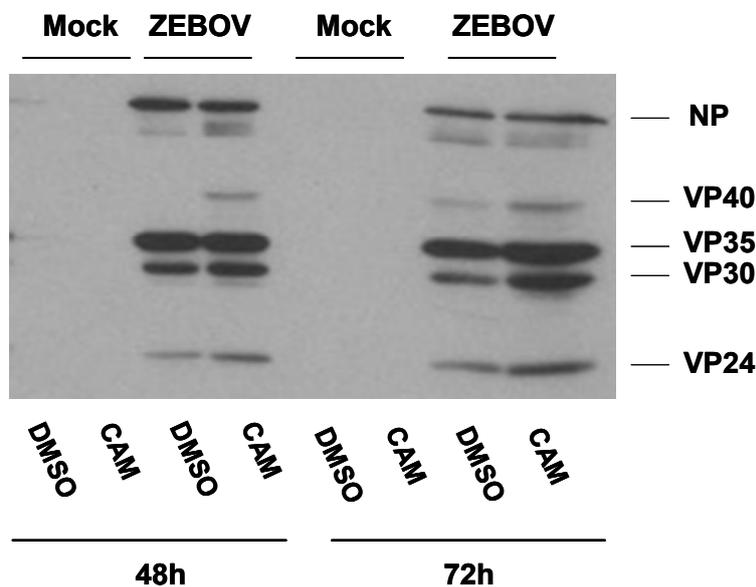


Abbildung 19: Nachweis von ZEBOV-Proteinen in infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels CAM

4×10^4 Vero-Zellen wurden mit ZEBOV infiziert (moi = 5) und 24 h nach Infektion mit $10 \mu\text{M}$ CAM bzw. $1,5 \mu\text{l}$ DMSO behandelt. 48h und 72h nach der Infektion wurden die Zellen in $50 \mu\text{l}$ Chaps-Puffer lysiert. Nach Zugabe von $2 \times$ SDS-Probenpuffer wurden $15 \mu\text{l}$ der Lysate auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteindetektion wurde im Western Blot-Verfahren mittels Ziege-anti-ZEBOV (1:10.000) und Esel-anti-Ziege-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

eingesetzten Zelllysate verwendet und ein Nachweis von ZEBOV-Proteinen mit einem anti-ZEBOV-Serum (Ziege-anti-ZEBOV, siehe auch 4.1) durchgeführt (Abbildung 19). Da die Zellen in Chaps-Puffer (speziell für cytoplasmatische Proteine) lysiert wurden, sind die membranassoziierten viralen Proteine VP24 und VP40 nur in geringer Menge nachzuweisen, da die Membranen durch den Puffer nicht lysiert wurden. Die Behandlung mit CAM führte nicht zu einer Änderung der ZEBOV-Proteinmenge. In ZEBOV-infizierten Zellen, die mit CAM behandelt wurden, konnte dieselbe Menge an ZEBOV-Proteinen wie nur nach DMSO-Behandlung nachgewiesen werden (Abbildung 19, Vergleich ZEBOV + DMSO und ZEBOV + CAM). Mit denselben Zelllysaten wurde auch der Nachweis der Bax- und Bcl-2-Level mittels Western Blot durchgeführt (Abbildung 20). Hier wurde auch ein Nachweis von β -Aktin, als zellulärem Markerprotein durchgeführt, um die aufgetragenen Proteinmengen vergleichen zu können. Wie bereits oben beschrieben, führte eine Behandlung mit CAM zu einer Abnahme der Bcl-2-Menge, während die Menge an Bax nicht beeinflusst wurde (Abbildung 20, CAM). In ZEBOV-infizierten Zellen konnte dagegen keine Veränderung des Bax- und Bcl-2- Proteinlevels beobachtet werden (Abbildung

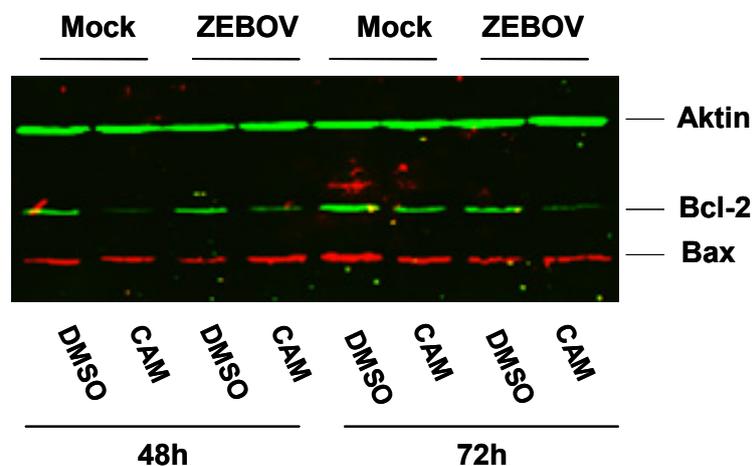


Abbildung 20: Nachweis der Bax- und Bcl-2-Level im Western Blot in ZEBOV-infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels CAM

4×10^4 Vero-Zellen wurden mit ZEBOV infiziert ($\text{moi} = 5$) und 24 h nach Infektion mit $10 \mu\text{M}$ CAM bzw. DMSO behandelt. 48h und 72h nach der Infektion wurden die Zellen in $50 \mu\text{l}$ Cell Extraction Buffer lysiert. Nach Zugabe von $2 \times$ SDS-Probenpuffer wurden $15 \mu\text{l}$ der Lysate auf ein 15% iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Maus-anti-Bcl2 (1:2000), Kaninchen-anti-Bax (1:1000) und Maus-anti- β -Aktin (1:5000), sowie Esel-anti-Maus-IRDye800 (1:5000, grüne Fluoreszenz) und Ziege-anti-Kaninchen-AlexaFluor680 (1:5000, rote Fluoreszenz) nachgewiesen und mittels Licor-Odyssey nachgewiesen.

17 und 20). Wurden die Zellen zunächst mit ZEBOV infiziert und anschließend Apoptose durch die Zugabe von CAM induziert, wurde eine Reduktion der Bcl-2-Menge im Vergleich zu Bax detektiert (Abbildung 20, ZEBOV + CAM). Dies bedeutet, dass ZEBOV nicht in der Lage ist, die durch CAM-induzierte Reduktion des Bcl-2-Levels zu hemmen. Um neben der Analyse der Bax- und Bcl-2-Level weiterführende Analysen von CAM-induzierter Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen durchzuführen, wurde zusätzlich Caspase- und PARP-Spaltung untersucht (siehe 4.2.1.2).

4.2.1.2 Analyse von Caspase- und PARP-Spaltung

Wie unter 4.2.1.1 beschrieben, konnte keine aktive Regulation von Bax oder Bcl-2 durch ZEBOV festgestellt werden. Eine Regulation der Apoptose auf mitochondrialem Level findet also nicht statt. Durch den Ausstrom von Cytochrom C aus den Mitochondrien kommt es zur Aktivierung von Caspasen (siehe 1.1.2.2). Um zu untersuchen, ob ZEBOV hier regulativ in den Signalweg eingreifen kann, wurden Zellen 24h nach der ZEBOV-Infektion mit CAM behandelt um Apoptose zu induzieren. Als Kontrolle wurden Zellen mit DMSO (Lösungsmittel für CAM) behandelt. Die Zellen wurden in Chaps-Puffer lysiert, um die Spaltung von Caspasen im Western Blot zu analysieren. Ein zentraler Punkt in der Apoptose ist die Aktivierung der Effektorcaspase 3, deren Spaltung in ZEBOV-infizierten und CAM-behandelten Zellen in Abbildung 21 dargestellt ist. Zum Vergleich der Proteinmengen in den einzelnen Proben wurde zusätzlich β -Aktin nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt. Die Zugabe von DMSO führte nicht zur Apoptose, es wurde nur das inaktive Vorläuferprotein der Caspase 3 (Abbildung 21, DMSO) detektiert. Ebenso fand auch in ZEBOV-infizierten Zellen keine Aktivierung von Caspase 3 statt (Abbildung 21, ZEBOV + DMSO). Nach Induktion von Apoptose durch Behandlung mit CAM konnte das Spaltprodukt im Western Blot sowohl in nicht-infizierten als auch in ZEBOV-infizierten Zellen nachgewiesen werden, d. h. es fand eine Aktivierung von Caspase 3 statt. Die Infektion mit ZEBOV führte also nicht zu einer Hemmung der Caspase 3-Spaltung (Abbildung 21, Vergleich CAM und ZEBOV+ CAM), was bedeutet, dass die CAM-induzierte Caspase 3-Aktivierung durch eine Infektion mit ZEBOV- nicht unterdrückt werden kann. Im späten Stadium

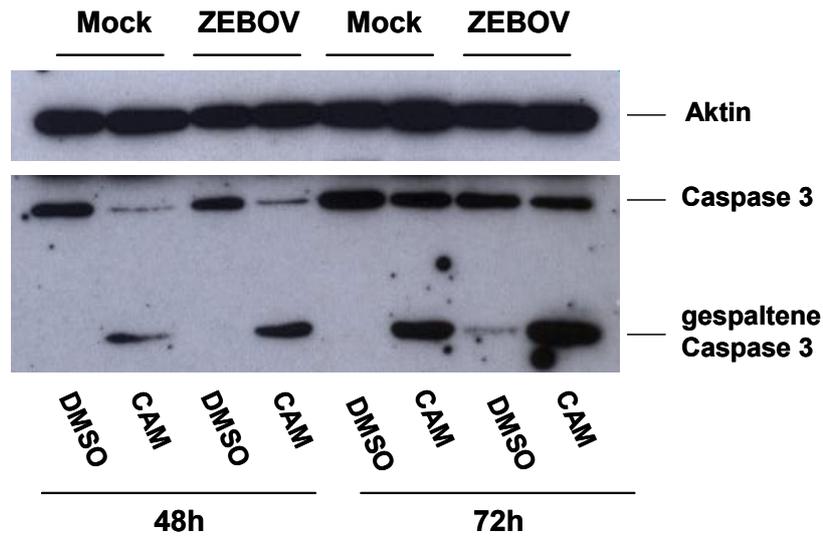


Abbildung 21: Nachweis von Caspase 3 in ZEBOV-infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels CAM

4×10^4 Vero-Zellen wurden mit ZEBOV infiziert ($\text{moi} = 5$) und 24 h nach Infektion mit $10 \mu\text{M}$ CAM bzw. DMSO behandelt. 48h und 72h nach der Infektion wurden die Zellen in $50 \mu\text{l}$ Chaps-Puffer lysiert. Nach Zugabe von $2 \times$ SDS-Probenpuffer wurden $15 \mu\text{l}$ der Lysate auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Kaninchen-anti-Caspase 3 (1:2000), Maus-anti- β -Aktin (1:40.000) und Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase (1:40.000), sowie Ziege-anti-Maus-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

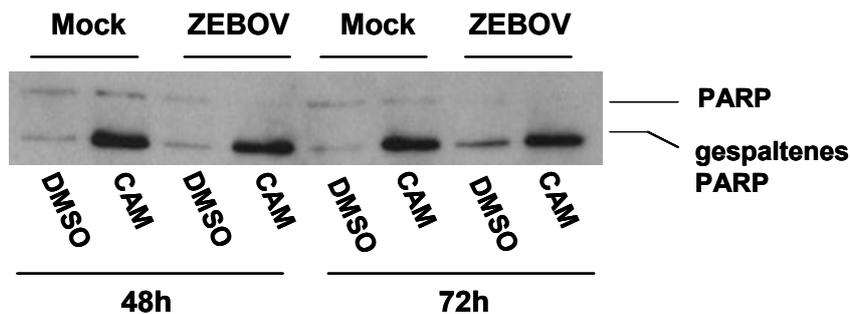


Abbildung 22: Nachweis von PARP-Spaltung im Western Blot in ZEBOV-infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels CAM

4×10^4 Vero-Zellen wurden mit ZEBOV infiziert ($\text{moi} = 5$) und 24 h nach Infektion mit $10 \mu\text{M}$ CAM bzw. DMSO behandelt. 48h und 72h nach der Infektion wurden die Zellen in $50 \mu\text{l}$ Chaps-Puffer lysiert. Nach Zugabe von $2 \times$ SDS-Probenpuffer wurden $15 \mu\text{l}$ der Lysate auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Kaninchen-anti-PARP (1:1000) und Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

der Apoptose wird die **Poly-ADP-Ribose-Polymersase (PARP)**, ein zelluläres DNA-Reparaturenzym, durch Caspasen gespalten, wodurch es zur Fragmentierung der DNA kommt. Während der Apoptose wird PARP in ein charakteristisches 89 kDa-großes Fragment gespalten, welches im Western Blot nachgewiesen werden kann. In Abbildung 22 ist der Nachweis von PARP in ZEBOV-infizierten und CAM-behandelten Zellen dargestellt. Nach CAM-Behandlung konnte eindeutig das apoptotische Spaltfragment sowohl in nicht-infizierten als auch in ZEBOV-infizierten Zellen detektiert werden (Abbildung 22, CAM). Das Vorläufer-PARP-Protein ist nur schwach erkennbar, eventuell wurde das Spaltfragment vom Antikörper besser erkannt (Experiment wurde nur einmal durchgeführt). Es ist jedoch deutlich die Zunahme des 89 kDa-Spaltfragmentes nach CAM-Behandlung zu beobachten (Abbildung 22, Vergleich DMSO und CAM). Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass ZEBOV nicht in der Lage ist, CAM-induzierte Apoptose zu unterdrücken. CAM-induzierte Reduktion von Bcl-2 und Spaltung von Caspase 3 und PARP kann durch ZEBOV-Infektion nicht gehemmt werden. ZEBOV greift demnach nicht aktiv in die Regulation des internen Apoptosesignalwegs ein.

4.2.2 Induktion von Apoptose durch Infektion mit dem vesikulären Stomatitis-Virus

Bei Induktion von Apoptose über den internen Signalweg/ die Mitochondrien wird als erste Caspase die Initiatorcaspase 9 aktiviert (siehe 1.1.2.2). Durch den Ausstrom von Cytochrom C aus den Mitochondrien kommt es zur Bildung des Apoptosom, in dem Caspase 9 in aktiver Form vorliegt. Auch wenn die Spaltung von Caspase 9 nur eine geringe Erhöhung der proteolytischen Aktivität zur Folge hat [18-20, 23, 25, 54], ist sie ein spezifischer Marker für Apoptose, da nur während der Apoptose eine Spaltung des Vorläuferproteins stattfindet. In den für die oben dargestellten Experimente verwendeten Vero-Zellen konnte mit den Antikörpern gegen humane Caspase 9 kein erfolgreicher Nachweis im Western Blot durchgeführt werden. Zur Analyse der Caspase 9-Aktivität wurden daher HeLa-Zellen verwendet und zur Induktion von Apoptose wurden die Zellen mit VSV infiziert, da dieses früh in der Infektion zur Aktivierung des internen Apoptosesignalweges führt [140]. Da die VSV-Infektion sehr schnell verläuft und schon früh Apoptose ausgelöst wird, wurden die

Zellen zuerst mit ZEBOV infiziert und 24h nach der ZEBOV-Infektion mit VSV überinfiziert. Die Zellen wurden mit einer hohen ZEBOV-moi infiziert (moi = 10), um schon bei Überinfektion mit VSV eine möglichst hohe Infektionsrate zu erreichen. Der Erfolg der Infektion wurde in der Immunfluoreszenz nachgewiesen. 48h nach der Infektion waren 100% der Zellen mit ZEBOV infiziert (Abbildung 23, ZEBOV). Durch die Infektion mit VSV und die stattfindende Apoptose hatten sich schon viele Zellen abgelöst, weshalb auf den Deckgläsern deutlich weniger Zellen zu beobachten waren (Abbildung 23, VSV). Durch die Überinfektion mit VSV wurde die ZEBOV-Infektion nicht beeinflusst, auch hier waren alle Zellen infiziert, jedoch war auch hier der Ablösungseffekt der apoptotischen Zellen zu beobachten (Abbildung 23, Vergleich ZEBOV und ZEBOV + VSV). Parallel wurden Zellen in Chaps-Puffer lysiert, um einen Nachweis von Caspasen im Western Blot durchzuführen. Diese Zelllysate wurden ebenfalls für einen Nachweis der ZEBOV-Infektion mittels Western Blot eingesetzt (Abbildung 24). In beiden ZEBOV-infizierten Proben konnte dieselbe Menge an viralen Proteinen nachgewiesen werden, die Überinfektion mit VSV hatte keinen Effekt auf die ZEBOV-Proteinmenge (Abbildung 24, Vergleich ZEBOV und ZEBOV + VSV). Die Zellen wurden für den Caspasenachweis in Chaps-Puffer, der speziell für cytoplasmatische Proteine empfohlen ist und Membranen nicht lysiert, konnten die membranassoziierten Proteine VP24 und VP40 nur schwach detektiert

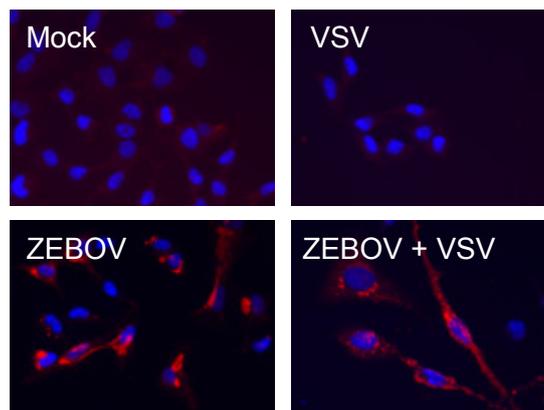


Abbildung 23: Nachweis der ZEBOV-Infektion in HeLa-Zellen nach Induktion von Apoptose durch VSV-Infektion

4×10^4 HeLa-Zellen auf Deckgläsern wurden mit ZEBOV (moi = 10) infiziert, 24h nach der Infektion wurde Apoptose durch Überinfektion mit VSV ($7,5 \times 10^3$ pfu) induziert. 48h nach ZEBOV-Infektion wurden die Deckgläser mit 4% PFA in DMEM fixiert/inaktiviert und anschließend die Infektion mit Ziege-anti-ZEBOV (1:500) und Esel-anti-Ziege-AlexaFluor495 (1:500, rote Fluoreszenz) nachgewiesen. Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI (1:5000, blaue Fluoreszenz) angefärbt.

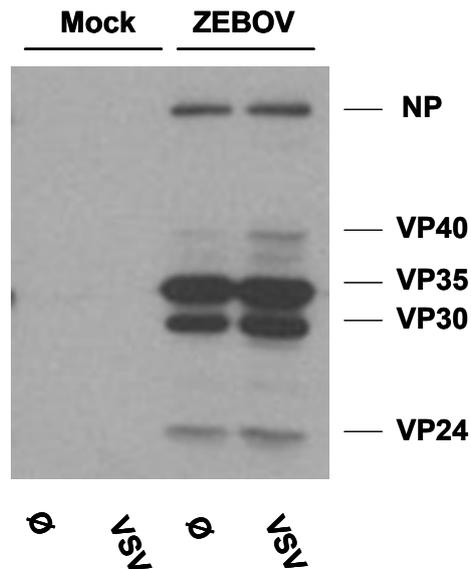


Abbildung 24: Nachweis von ZEBOV-Proteinen in infizierten HeLa-Zellen nach Induktion von Apoptose durch VSV-Infektion

4×10^4 HeLa-Zellen wurden mit ZEBOV ($\text{moi} = 10$) infiziert, 24h nach der Infektion wurde Apoptose durch Überinfektion mit VSV ($7,5 \times 10^3$ pfu) induziert. 48h nach ZEBOV-Infektion wurden die Zellen in 50 μl Chaps-Puffer lysiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden 15 μl der Lysate auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot Verfahren mittels Ziege-anti-ZEBOV (1:10.000) und Esel-anti-Ziege-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

werden (Abbildung 24, ZEBOV, VP24 schwach und VP40 fast nicht vorhanden).

Nach Infektion mit VSV konnte eine eindeutige Aktivierung der Initiatorcaspase 9 festgestellt werden, wie in Abbildung 24 A dargestellt. Neben dem Vorläuferprotein konnten auch die Spaltfragmente von Caspase 9 in den VSV-infizierten Zellen detektiert werden. In ZEBOV-infizierten Zellen kam es nicht zur Spaltung von Caspase 9 (Abbildung 25 A, ZEBOV). Hier konnte ebenso wie in der Mock-Kontrolle nur das Vorläuferprotein nachgewiesen werden. Das heißt, dass Caspase 9 durch ZEBOV-Infektion nicht aktiviert wird. In Zellen, die mit beiden Viren infiziert wurden, konnten dieselben Mengen an gespaltener Caspase 9 detektiert werden wie in Zellen, die nur mit VSV infiziert wurden (Abbildung 25 A, Vergleich VSV und ZEBOV + VSV). ZEBOV ist also nicht in der Lage, die VSV-vermittelte Aktivierung von Caspase 9 zu hemmen, es findet keine aktive Regulation der Caspase 9 Aktivität statt. Aktive Caspase 9 führt zur Spaltung und Aktivierung der Effektorcaspase 3, was auch nach VSV-Infektion zu beobachten ist (Abbildung 25 B, VSV). Wie schon für Vero-Zellen gezeigt werden konnte, kam es nach ZEBOV-Infektion es in den

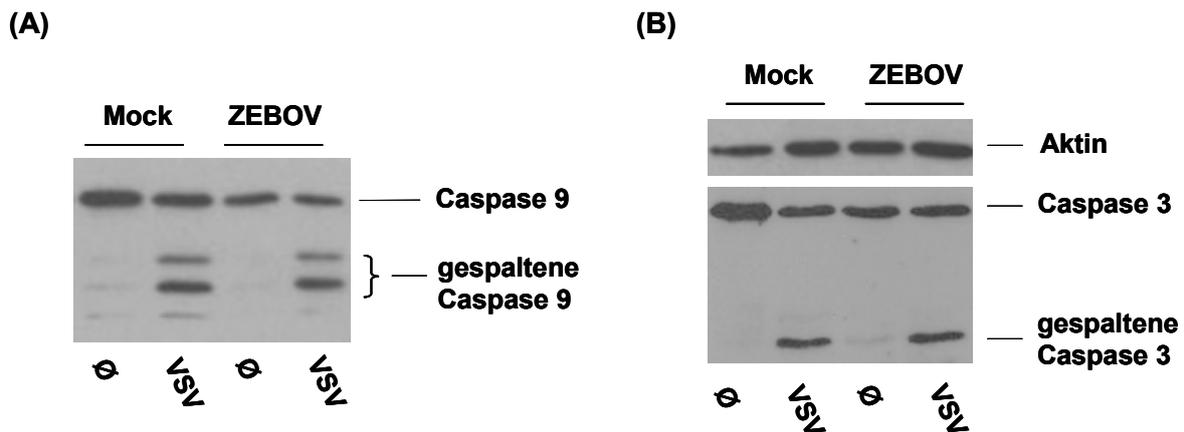


Abbildung 25: Nachweis von Caspase 9 und Caspase 3 in ZEBOV-infizierten HeLa-Zellen nach Induktion von Apoptose durch VSV-Infektion

4×10^4 HeLa-Zellen wurden mit ZEBOV ($\text{moi} = 10$) infiziert, 24h nach der Infektion wurde Apoptose durch Überinfektion mit VSV ($7,5 \times 10^3$ pfu) induziert. 48h nach ZEBOV-Infektion wurden die Zellen in 50 μl Chaps-Puffer lysiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden 15 μl der Lysate auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach Western Blot wurden die Proteine mittels Kaninchen-anti-Caspase 9 (1:1000), Kaninchen-anti-Caspase 3 (1:1000), Maus-anti- β -Aktin (1:40.000) und Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase (1:40.000), sowie Ziege-anti-Maus-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

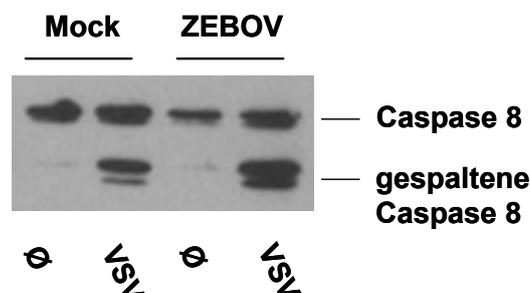


Abbildung 26: Nachweis von Caspase 8 in ZEBOV-infizierten HeLa-Zellen nach Induktion von Apoptose durch VSV-Infektion

4×10^4 HeLa-Zellen wurden mit ZEBOV ($\text{moi} = 10$) infiziert. 24h nach der Infektion wurde Apoptose durch Überinfektion mit VSV ($7,5 \times 10^3$ pfu) induziert. 48h nach ZEBOV-Infektion wurden die Zellen in 50 μl Chaps-Puffer lysiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden 15 μl der Lysate auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Maus-anti-Caspase 8 (1:1000), Ziege-anti-Maus-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

verwendeten HeLa-Zellen nicht zur Aktivierung von Caspase 3 (Abbildung 25 B, ZEBOV). In ZEBOV-infizierten Zellen konnte nach Überinfektion mit VSV eine Aktivierung von Caspase 3 nachgewiesen werden (Abbildung 25 B, ZEBOV + VSV), wobei dieselbe Menge an gespaltener Caspase 3 wie in Zellen, die nur mit VSV infiziert wurden, vorhanden war. Dies bedeutet, dass ZEBOV auch zwischen Caspase 9-Aktivierung und der Spaltung von Caspase 3 nicht hemmend in den internen Apoptosesignalweg eingreift.

In den durchgeführten Experimenten konnte nach Infektion mit VSV auch eine Aktivierung von Caspase 8 beobachtet werden, wie in Abbildung 26 dargestellt. Caspase 8 wird über den Rezeptorvermittelten Apoptosesignalweg aktiviert (siehe 1.1.2.1). Eine Infektion mit ZEBOV führte, wie bereits unter 4.1 gezeigt, nicht zur Spaltung von Caspase 8. In Zellen, die mit ZEBOV und VSV infiziert wurden, konnte jedoch aktive/gespaltene Caspase 8 detektiert werden (Abbildung 26 ZEBOV + VSV). ZEBOV ist demnach nicht in der Lage, die durch VSV-induzierte Caspase 8 Aktivierung zu unterdrücken.

4.3 Untersuchung der Rolle der dsRNA-abhängigen Proteinkinase R in der Apoptoseregulation durch ZEBOV

Die von doppelsträngiger RNA (dsRNA)-abhängige **Proteinkinase R** (PKR) spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Abwehr von Virusinfektionen. Ein Weg zur Verhinderung von effizienter Virusreplikation und Ausbreitung ist die Induktion von Apoptose durch aktivierte PKR (siehe 1.1.2.3). Das VP35-Protein des ZEBOV ist in der Lage, die Aktivierung der PKR zu hemmen sowie die Phosphorylierung ihres Substrates eIF2 α [123, 125]. Ziel war es hier, zu untersuchen, ob die Hemmung der PKR-Aktivität durch ZEBOV einen Einfluss auf Apoptose hat.

4.3.1 Aktivierung der dsRNA-abhängigen Proteinkinase R über Sendaivirus-Infektion

4.3.1.1 Untersuchungen in Vero-Zellen

SeV (Stamm Cantell) löst bei der Infektion eine starke Induktion des Interferonsystemes aus, dazu gehört auch die Aktivierung der PKR. Ebenso löst die Infektion mit SeV auch Apoptose in den infizierten Zellen aus. Um sicherzustellen, dass in den durchgeführten Experimenten die bereits beschriebene Hemmung der PKR durch ZEBOV stattfindet, wurde parallel zum Nachweis von Apoptose auch die Aktivität der PKR analysiert. Zunächst wurden Vero-Zellen mit ZEBOV infiziert und nach 24h eine Überinfektion mit SeV durchgeführt, um die PKR zu aktivieren und Apoptose zu induzieren. Für aussagekräftige Ergebnisse war eine ausreichende Infektion der Zellen mit beiden Viren (ZEBOV + SeV) essentiell, daher wurde die Infektion mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abbildung 27). Bei der Infektion mit ZEBOV ($moi = 5$) wurde eine fast 100%ige Infektionsrate erreicht, die Überinfektion mit SeV hatte keinen Einfluss auf die ZEBOV-Infektion (Abbildung 27, ZEBOV und ZEBOV + SeV). Die Infektion mit SeV konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden und es waren fast 100% der Zellen infiziert. Die vorangegangene ZEBOV-Infektion hatte keinen Einfluss auf die SeV-Infektion (Abbildung 27, Vergleich SeV und ZEBOV + SeV). Dies bedeutet, dass in den untersuchten Proben, die mit beiden Viren infiziert waren, nahezu alle Zellen mit ZEBOV und SeV infiziert waren. Parallel zur Immunfluoreszenzanalyse wurden die Zellen entweder in Cell Extraction Buffer lysiert, um im Western Blot-Verfahren PKR nachzuweisen, oder in Chaps-Puffer zum Nachweis von Caspasen. Zusätzlich wurde

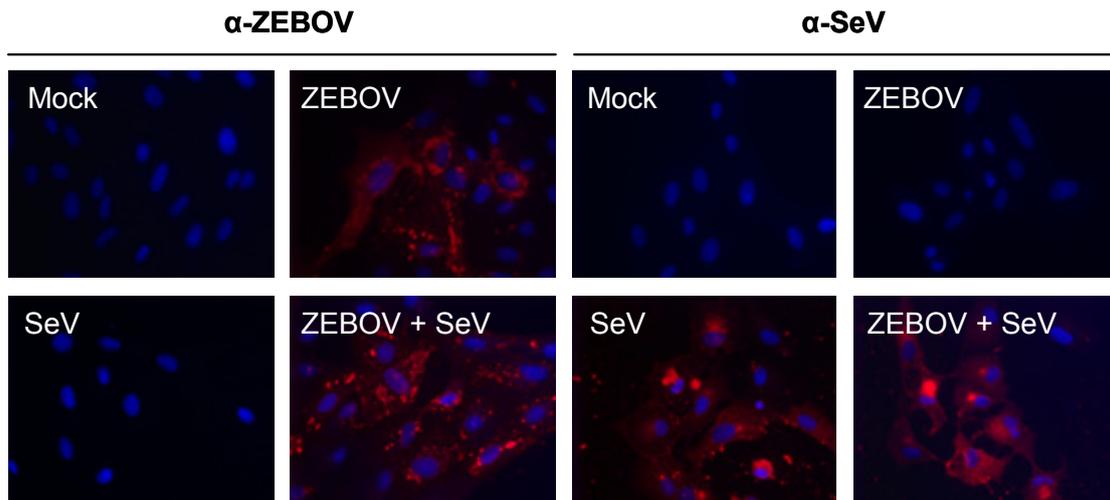


Abbildung 27: Nachweis der ZEBOV- und SeV-Infektion in Vero-Zellen

4×10^4 Vero-Zellen auf Deckgläsern wurden mit ZEBOV (moi = 5) infiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit SeV (20 HA-Einheiten) überinfiziert. 72h nach ZEBOV-Infektion wurden die Deckgläser mit 4% PFA in DMEM fixiert/inaktiviert. Anschließend wurde die ZEBOV-Infektion mit Ziege-anti-ZEBOV (1:500) und Esel-anti-Ziege-AlexaFluor495 (1:500, rote Fluoreszenz) nachgewiesen. Die Detektion der SeV-Infektion erfolgte mittels Kaninchen-anti-Sendaivirus (1:500) und Ziege-anti-Kaninchen-Rhodamin (1:200, rote Fluoreszenz). Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI (1:5000, blaue Fluoreszenz) angefärbt.

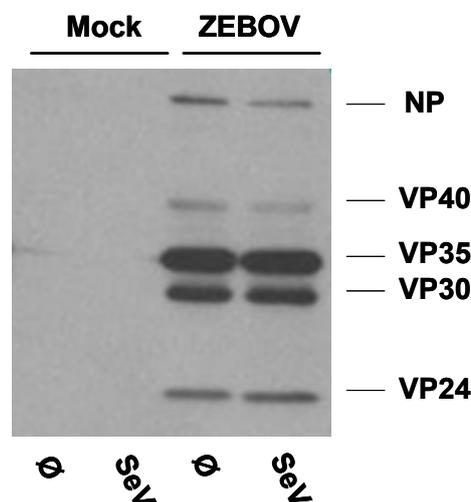


Abbildung 28: Nachweis von ZEBOV-Proteinen in infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose durch SeV-Infektion

4×10^4 Vero-Zellen wurden mit ZEBOV (moi = 5) infiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit SeV (20 HA-Einheiten) überinfiziert. 72h nach ZEBOV-Infektion wurden die Zellen in 50 μ l Chaps-Puffer lysiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden 15 μ l der Lysate auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Ziege-anti-ZEBOV (1:10.000) und Esel-anti-Ziege-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

ein Nachweis der ZEBOV-Infektion mittels Western Blot mit denselben Zelllysaten durchgeführt, um mögliche Unterschiede in den Virusproteinmengen zu detektieren. Wie in Abbildung 28 dargestellt, kann nach SeV-Überinfektion keine Veränderung der ZEBOV-Proteinmenge, im Vergleich zur ZEBOV-Infektion alleine, nachgewiesen werden (Abbildung 28, Vergleich ZEBOV und ZEBOV + SeV).

Die Analyse der PKR-Phosphorylierung ist in Abbildung 29 dargestellt. Aktive PKR wurde mit einem phospho-spezifischen Antikörper nachgewiesen und konnte nach SeV-Infektion detektiert werden (Abbildung 29, SeV). In ZEBOV-infizierten Zellen kam es nicht zur Phosphorylierung der PKR und ZEBOV war auch in der Lage, die SeV-induzierte PKR-Aktivierung signifikant zu reduzieren (Abbildung 29, Vergleich phospho-PKR bei SeV und ZEBOV + SeV). Der bereits beschriebene Effekt der PKR-Hemmung durch VP35 [123, 125] konnte also auch nach der Infektion mit ZEBOV bestätigt werden (auch schon beobachtet in [124]).

Um zu untersuchen, ob die Hemmung der PKR durch ZEBOV einen regulativen Einfluss auf die Induktion von Apoptose hat, wurde parallel die Aktivität von Caspase 8 und 3 untersucht. Wie in Abbildung 30 dargestellt, induziert die SeV-Infektion neben der PKR-Phosphorylierung auch eine Spaltung von Caspase 8 und Caspase 3 (Abbildung 30 A und B, SeV). Wie bereits oben beschrieben, wurde in ZEBOV-

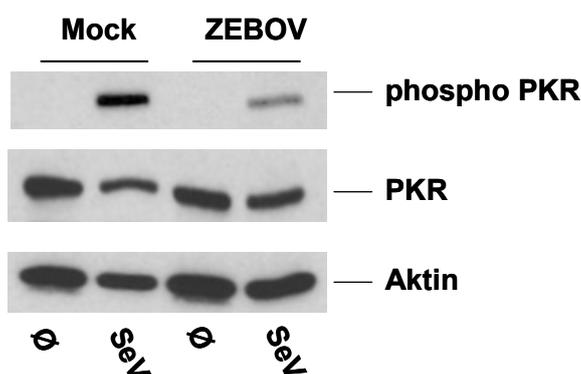


Abbildung 29: Nachweis der PKR in ZEBOV-infizierten Vero-Zellen nach Aktivierung durch SeV-Infektion

4×10^4 Vero-Zellen wurden mit ZEBOV ($\text{moi} = 5$) infiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit SeV (20 HA-Einheiten) überinfiziert. 72h nach ZEBOV-Infektion wurden die Zellen in 50 μl Cell Extraction Buffer lysiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden 15 μl der Lysate auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Kaninchen-anti-PKR-phospho (1:1000), Maus-anti-PKR (1:30.000), Maus-anti- β -Aktin (1:40.000) sowie Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase (1:40.000), Ziege-anti-Maus-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

infizierten Zellen keine Aktivierung von Caspase 8 oder Caspase 3 beobachtet. Nach Infektion mit ZEBOV und SeV kam es jedoch sowohl zur Aktivierung von Caspase 8 als auch von Caspase 3 (Abbildung 30, ZEBOV + SeV). Obwohl ZEBOV also in der Lage ist, die SeV-vermittelte PKR-Aktivierung zu hemmen, kann es nicht die durch SeV induzierte Apoptose inhibieren.

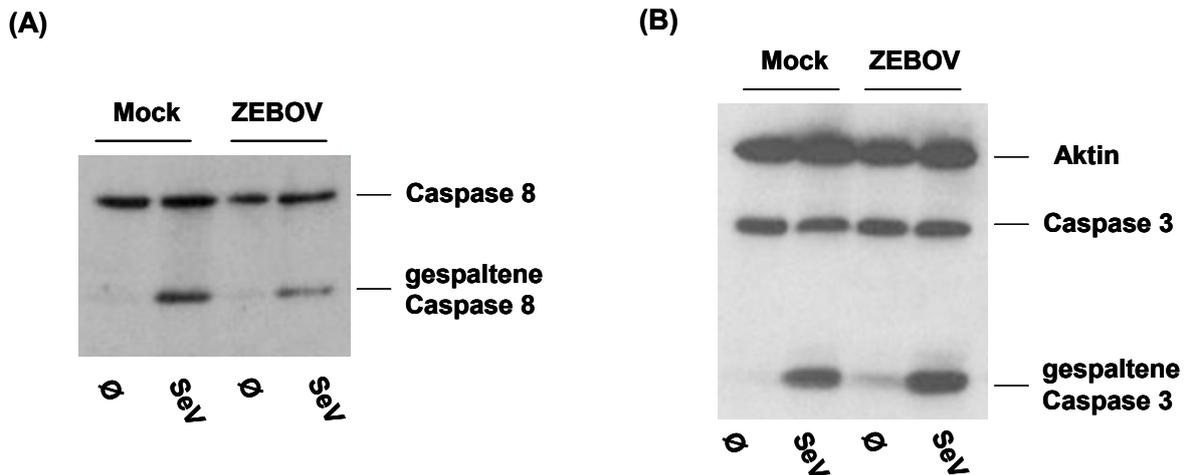


Abbildung 30: Nachweis von Caspase 8 und Caspase 3 in ZEBOV-infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose durch SeV-Infektion

4×10^4 Vero-Zellen wurden mit ZEBOV (moi = 5) infiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit SeV (20 HA-Einheiten) überinfiziert. 72h nach ZEBOV-Infektion wurden die Zellen in 50 μ l Chaps-Puffer lysiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden 15 μ l der Lysate auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Maus-anti-Caspase 8 (1:1000), Kaninchen-anti-Caspase 3 (1:1000), Maus-anti- β -Aktin (1:40.000), sowie Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase (1:40.000), Ziege-anti-Maus-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

4.3.1.2 Untersuchungen in HeLa-Zellen

Die unter 4.3.1.1 beschriebenen Analysen wurden in Vero-Zellen durchgeführt, da hier eine effiziente ZEBOV-Infektion möglich ist und in diesen Zellen Apoptose durch verschiedene Methoden ausgelöst werden konnte. Jedoch ist bekannt, dass Vero-Zellen einen Defekt in der Interferonsynthese besitzen, da ihnen die IFN-Gene fehlen [141]. Um auszuschließen, dass die Sekretion von IFN, welche durch ZEBOV ebenfalls gehemmt wird (siehe 1.2.2), einen Einfluss auf die untersuchte Apoptoseregulation hat, wurden die Analysen zur Rolle der PKR auch in HeLa-Zellen

durchgeführt, welche ein intaktes Interferonsystem besitzen (siehe 4.3.1.2 und 4.3.2). Um in HeLa-Zellen eine möglichst hohe Infektionsrate mit ZEBOV zu erreichen, wurden die Zellen mit einer moi von 10 infiziert und nach 24h die Überinfektion mit SeV durchgeführt. In Abbildung 31 ist der Nachweis der Infektion mit ZEBOV und SeV dargestellt. Es konnte eine komplette Infektion der Zellen mit ZEBOV erreicht werden, und die anschließende SeV-Infektion führte nicht zur Beeinträchtigung der ZEBOV-Infektion (Abbildung 31, Vergleich ZEBOV und ZEBOV + SeV). Der Nachweis von SeV zeigt ebenfalls eine 100%ige Infektion der Zellen, so dass in den Proben, die mit beiden Viren infiziert wurden, alle Zellen doppelt infiziert gewesen sein sollten. Zusätzlich wurde ein Nachweis der ZEBOV-Infektion mittels Western Blot-Analyse durchgeführt. Wie in Abbildung 32 dargestellt, konnte kein Unterschied in der viralen Proteinmenge zwischen der ZEBOV-Infektion alleine und ZEBOV- und SeV-Infektion gleichzeitig detektiert werden. Da Zellysate mit Chaps-Puffer (für cytoplasmatische Proteine, lysiert keine Membranen) genutzt wurden, konnte das membranassoziierte VP40 nicht nachgewiesen werden und auch VP24 ist nur in geringem Level nachweisbar (Abbildung 32).

Zum Nachweis der PKR wurden die infizierten Zellen parallel zur Immunfluoreszenzanalyse in Cell Extraction Buffer lysiert und ein Western Blot

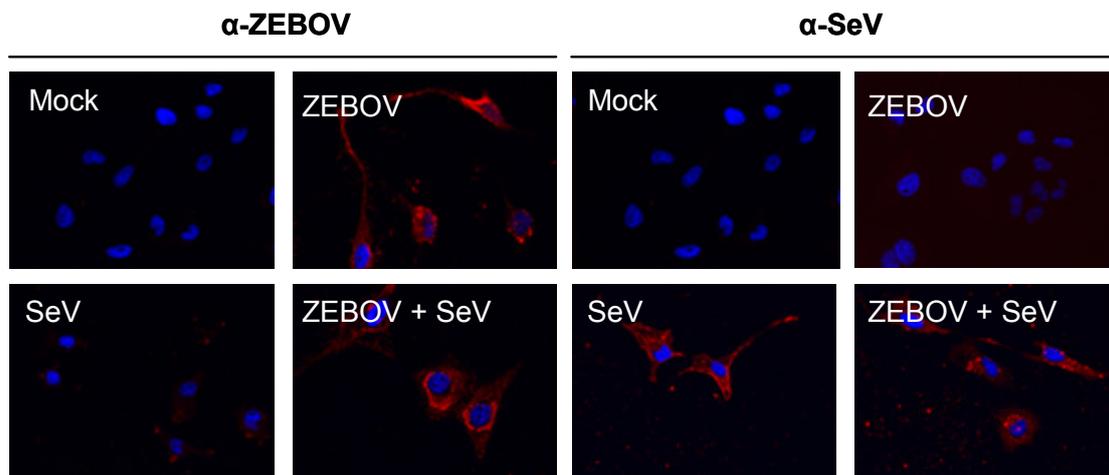


Abbildung 31: Nachweis der ZEBOV- und SeV-Infektion in HeLa-Zellen

4×10^4 HeLa-Zellen auf Deckgläsern wurden mit ZEBOV (moi = 10) infiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit SeV (10 HA-Einheiten) überinfiziert. 72h nach ZEBOV-Infektion wurden die Deckgläser mit 4% PFA in DMEM fixiert/inaktiviert. Anschließend wurde die ZEBOV-Infektion mit Ziege-anti-ZEBOV (1:500) und Esel-anti-Ziege-AlexaFluor495 (1:500, rote Fluoreszenz) nachgewiesen. Die Detektion der SeV-Infektion erfolgte mittels Kaninchen-anti-Sendavirus (1:500) und Ziege-anti-Kaninchen-Rhodamin (1:200, rote Fluoreszenz). Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI (1:5000, blaue Fluoreszenz) angefärbt.

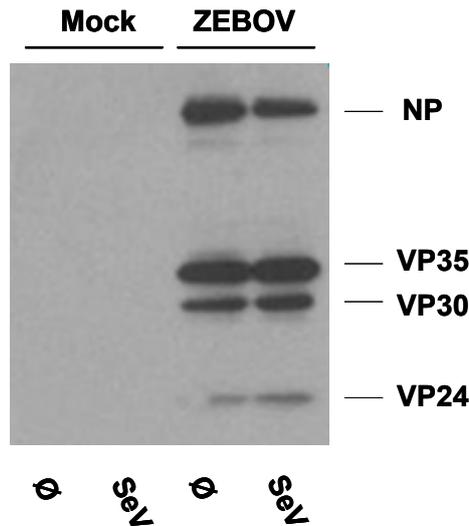


Abbildung 32: Nachweis von ZEBOV-Proteinen in infizierten HeLa-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels SeV-Infektion

4×10^4 HeLa-Zellen wurden mit ZEBOV (moi = 10) infiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit SeV (10 HA-Einheiten) überinfiziert. 72h nach ZEBOV-Infektion wurden die Zellen in 50 μ l Cell Extraction Buffer lysiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden 15 μ l der Lysate auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Ziege-anti-ZEBOV (1:10.000) und Esel-anti-Ziege-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

durchgeführt. Außerdem konnte in HeLa-Zellen auch erfolgreich ein Nachweis von eIF2 α , dem Substrat der PKR (siehe 1.1.2.3), durchgeführt werden. Die Ergebnisse des PKR- und eIF2 α -Nachweises sind in Abbildung 33 dargestellt. Nach Infektion mit SeV konnte sowohl die aktive, d.h. phosphorylierte Form der PKR als auch phosphoryliertes eIF2 α nachgewiesen werden (Abbildung 33 A und B, SeV). Die Infektion mit ZEBOV führte weder zur Aktivierung der PKR noch zur Phosphorylierung von eIF2 α , es konnte in beiden Fällen keine phosphorylierte Form der Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 33, ZEBOV). In Zellen, die mit beiden Viren infiziert wurden, konnte erneut eine verminderte SeV-induzierte PKR-Aktivität beobachtet werden (Abbildung 33 A, ZEBOV + SeV), wobei hier die Hemmung nicht so deutlich ausgeprägt war wie in Vero-Zellen (Abbildung 29). Die SeV-induzierte Phosphorylierung von eIF2 α wurde durch die ZEBOV-Infektion jedoch stark reduziert (Abbildung 33 B, Vergleich SeV und ZEBOV + SeV). ZEBOV ist also in der Lage die PKR-Aktivität auch in IFN-kompetenten HeLa-Zellen zu hemmen. Ob dies einen Einfluss auf stattfindende Apoptose hat, wurde durch den Nachweis von Caspasespaltung im Western Blot untersucht (Abbildung 34). Beim Nachweis von

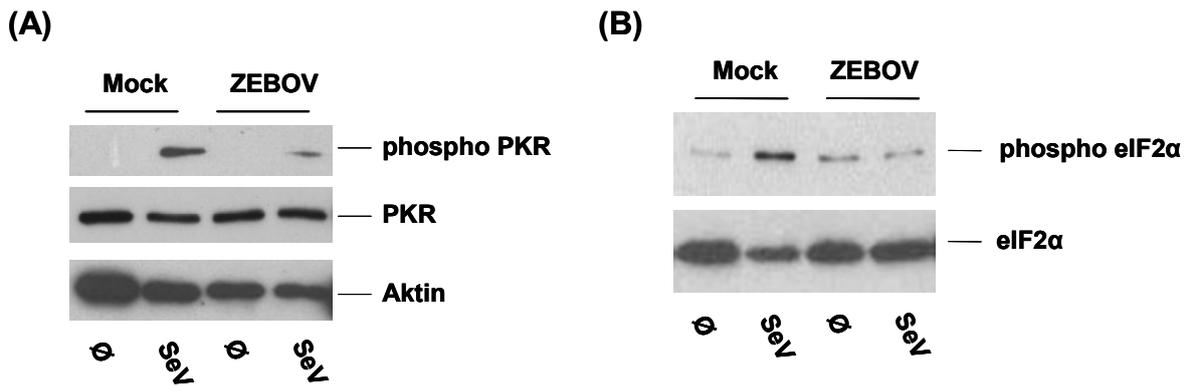


Abbildung 33: Nachweis von PKR und eIF2α in ZEBOV-infizierten HeLa-Zellen nach SeV-Infektion

4x 10⁴ HeLa-Zellen wurden mit ZEBOV (moi = 10) infiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit SeV (10 HA-Einheiten) überinfiziert. 72h nach ZEBOV-Infektion wurden die Zellen in 50 µl Cell Extraction Buffer lysiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden 10 µl der Lysate auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Kaninchen-anti-PKR-phospho (1:1000), Maus-anti-PKR (1:30.000), Maus-anti-β-Aktin (1:40.000), Maus-anti-eIF2α-phospho (1:30.000), Maus-anti-eIF2α (1:500) sowie Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase (1:40.000), Ziege-anti-Maus-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

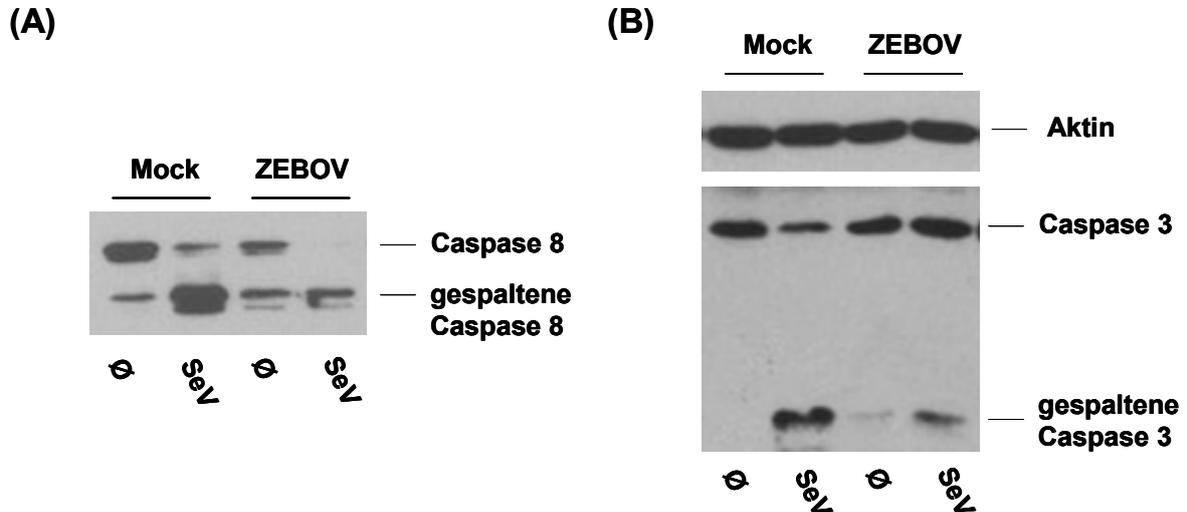


Abbildung 34: Nachweis von Caspase 8 und Caspase 3 in ZEBOV-infizierten HeLa-Zellen nach Induktion von Apoptose durch SeV-Infektion

4x 10⁴ HeLa-Zellen wurden mit ZEBOV (moi = 10) infiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit SeV (10 HA-Einheiten) überinfiziert. 72h nach ZEBOV-Infektion wurden die Zellen in 50 µl Chaps-Puffer lysiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden 15 µl der Lysate auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Maus-anti-Caspase 8 (1:1000), Kaninchen-anti-Caspase 3 (1:1000), Maus-anti-β-Aktin (1:40.000), sowie Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase (1:40.000) Ziege-anti-Maus-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

Caspase 8 konnte bereits eine Aktivierung in der Mock-Kontrolle festgestellt werden (siehe Abbildung 34 A, Mock). Der Grund für diese Spaltung ist unklar, bei Untersuchung der später im Signalweg liegenden Caspase 3 konnte nur das inaktive Vorläuferprotein von Caspase 3 detektiert werden (Abbildung 34 B, Mock). Die in ZEBOV-infizierten Zellen beobachtete Spaltung von Caspase 8 (Abbildung 34 A, ZEBOV) hat dasselbe Ausmaß wie in der Mock-Kontrolle und ist daher vermutlich unspezifisch. Im Verlaufe der Arbeit stellt sich heraus, dass eine zu hohe Zelldichte auch schon in Mock-Zellen zur Aktivierung von Caspase 8 führte, eventuell lässt sich so die hier beobachtete Hintergrundspaltung erklären. In ZEBOV-infizierten Zellen ist jedoch kein Anstieg des Caspase 8 Spaltfragmentes im Vergleich zur Mock-Kontrolle zu beobachten (Abbildung 34 A, Vergleich Mock und ZEBOV). Für Caspase 3 war erneut keine Aktivierung nach ZEBOV-Infektion zu beobachten (Abbildung 34 B, ZEBOV). Nach Infektion mit beiden Viren konnte sowohl eine Spaltung von Caspase 8 als auch Caspase 3 beobachtet werden (Abbildung 34 A und B, ZEBOV + SeV). ZEBOV ist demnach nicht in der Lage die SeV-induzierte Apoptose zu unterdrücken, obwohl eine Reduktion der PKR- und eIF2 α -Phosphorylierung zu beobachten ist. Somit konnten die in Vero-Zellen erzielten Ergebnisse (siehe 4.3.1.1) in HeLa-Zellen bestätigt und damit ein möglicher Einfluss von Typ I IFN ausgeschlossen werden. Da jedoch noch unklar ist, welche Signalwege der Apoptose durch SeV aktiviert werden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben der Aktivierung der PKR noch weitere proapoptotische Signale durch eine Infektion mit SeV aktiviert werden. Um gezielt die PKR zu aktivieren und so Apoptose zu induzieren, wurde daher eine Transfektion von poly-IC, künstlicher dsRNA, durchgeführt und anschließend die Induktion von Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen untersucht (siehe 4.3.2).

4.3.2 Aktivierung der dsRNA-abhängigen Proteinkinase R durch poly-IC

Wie unter 4.3.1 gezeigt, ist ZEBOV in der Lage die SeV-induzierte PKR-Aktivierung zu hemmen, die ausgelöste Apoptose kann allerdings nicht unterdrückt werden. Da durch die SeV-Infektion jedoch verschiedene Signalwege aktiviert werden, über die in der Zelle Apoptose induziert wird [142, 143], war das Ziel dieses Versuchs, die PKR spezifisch zu aktivieren, um eine mögliche Regulation der PKR-abhängigen Apoptoseinduktion durch ZEBOV untersuchen zu können. Um gezielt die PKR zu

aktivieren und so Apoptose zu induzieren, wurde daher eine Transfektion von poly-IC (pIC), einer künstlichen dsRNA, durchgeführt und anschließend die Induktion von Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen untersucht. pIC wird von der PKR erkannt und führt so zu ihrer Aktivierung. HeLa-Zellen wurden zunächst mit ZEBOV für 48h infiziert, um eine hohe Infektionsrate zu erreichen. In Abbildung 35 ist der Nachweis der ZEBOV-Infektion dargestellt, es waren nahezu 100% der Zellen infiziert (Abbildung 35, ZEBOV). 48h nach der ZEBOV-Infektion wurden die Zellen mit pIC transfiziert, um die PKR zu aktivieren und Apoptose auszulösen. Um eine spezifische Aktivierung der PKR durch pIC und nicht durch die Transfektion zu gewährleisten, wurde als Kontrolle die gleiche Menge an Plasmid-DNA transfiziert. 5h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Aktivierung der PKR und Spaltung von Caspasen im Western Blot untersucht. Zum Vergleich der verschiedenen Proteinmengen wurde β -Aktin als zellulärer Marker parallel nachgewiesen. Phosphorylierte und damit aktivierte PKR konnte nur nach der Transfektion von pIC, nicht nach Transfektion von unspezifischer Plasmid-DNA (pCAGGS) detektiert werden, wie in Abbildung 36 dargestellt (Mock + pCAGGS und Mock + pIC). Während nach ZEBOV-Infektion wie erwartet keine Aktivierung der PKR festgestellt werden konnte, wurde in ZEBOV- infizierten und anschließend mit pIC transfizierten

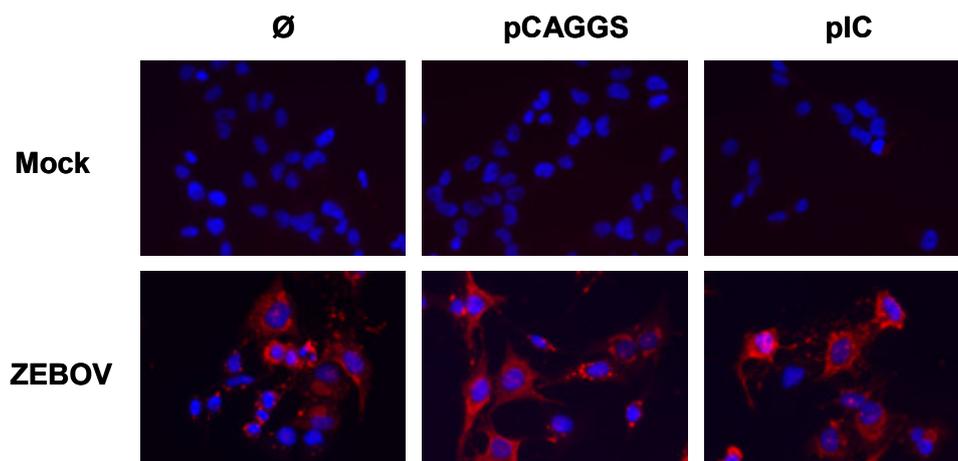


Abbildung 35: Nachweis der ZEBOV-Infektion in HeLa-Zellen nach Transfektion von pIC

4×10^4 HeLa-Zellen auf Deckgläsern wurden mit ZEBOV (moi = 10) infiziert. 48h nach der Infektion wurden die Zellen mit $1 \mu\text{g}$ pIC mittels LipofectamineLTX transfiziert. Als Kontrolle wurde $1 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA (pCAGGS) transfiziert. 5h nach Transfektion wurden die Deckgläser mit 4% PFA in DMEM fixiert/inaktiviert. Anschließend wurde die ZEBOV-Infektion mit Ziege-anti-ZEBOV (1:500) und Esel-anti-Ziege-AlexaFluor495 (1:500, rote Fluoreszenz) nachgewiesen. Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI (1:5000, blaue Fluoreszenz) angefärbt.

Zellen eine starke Abnahme an phosphorylierter PKR beobachtet (Abbildung 36, Vergleich pIC und ZEBOV + pIC). ZEBOV ist also in der Lage, die durch pIC-induzierte PKR-Aktivierung in den infizierten Zellen aktiv zu hemmen.

Die Transfektion von pIC führte auch zur Phosphorylierung des Substrates der PKR, dem eukaryotischen Initiationsfaktor eIF2 α , während in pCAGGS-transfizierten sowie in ZEBOV-infizierten Zellen eIF2 α nicht bzw. nur sehr schwach phosphoryliert wurde (Abbildung 37). Die beobachtete eIF2 α -Phosphorylierung wurde demnach spezifisch durch pIC induziert. In Zellen, die nach ZEBOV-Infektion mit pIC transfiziert wurden, war nur eine sehr geringe Menge an phospho-eIF2 α nachweisbar (Abbildung 37, ZEBOV und ZEBOV + pIC). Dies bedeutet, dass die durch pIC ausgelöste eIF2 α -Phosphorylierung durch ZEBOV gehemmt werden kann.

Zur Analyse der Apoptose wurden die Zellen, wie oben beschrieben mit ZEBOV infiziert und pIC transfiziert. Die Zelllyse erfolgte in Chaps-Puffer, um einen Nachweis von Caspasen durchzuführen. Die Transfektion von pIC führte zur Induktion von Apoptose, was anhand der Spaltung von Caspase 8 und 3 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 38 A und B, Mock + pIC). Die Aktivierung der Caspasen war nur nach Aktivierung der PKR über pIC zu beobachten, nach Transfektion von Plasmid-DNA konnte keine Caspasenspaltung gezeigt werden. Obwohl ZEBOV in der Lage ist, die pIC-induzierte PKR-Aktivierung zu hemmen, konnte in ZEBOV-infizierten Zellen, die mit pIC transfiziert wurden, trotzdem die Aktivierung von Caspase 8 und 3 detektiert werden (Abbildung 38 A und B, ZEBOV + pIC). Weiterhin wurde die Spaltung von Caspase 9 nach pIC-Transfektion untersucht, um auch eine mögliche Regulation des internen Apoptosesignalweges zu analysieren. Gespaltene Caspase 9 wurde nach Transfektion von pIC detektiert (Abbildung 38 C, Mock + pIC), während in ZEBOV-infizierten Zellen, wie schon unter 4.2.2 gezeigt, keine Aktivierung von Caspase 9 festgestellt werden konnte (Abbildung 38 C, ZEBOV). Nach Transfektion von pIC in ZEBOV-infizierte Zellen konnte jedoch eine deutliche Spaltung von Caspase 9 nachgewiesen werden (Abbildung 38 C, ZEBOV + pIC). Paralell wurde auch β -Aktin als zelluläres Markerprotein detektiert. Da in allen Proben etwa dieselben Level an Aktin nachzuweisen sind, lässt sich die nur schwache Bande für aktive Caspase 3/8 in ZEBOV-infizierten Zellen nach pIC-Behandlung nicht durch ein geringeres Proteinlevel erklären (Abbildung 38, Vergleich Aktin in allen Proben). Eventuell lag eine ungleichmäßige Färbung der Membran vor, bei Nachweis von Caspase 9 konnte in ZEBOV-infizierten nach pIC-Behandlung dasselbe Level an

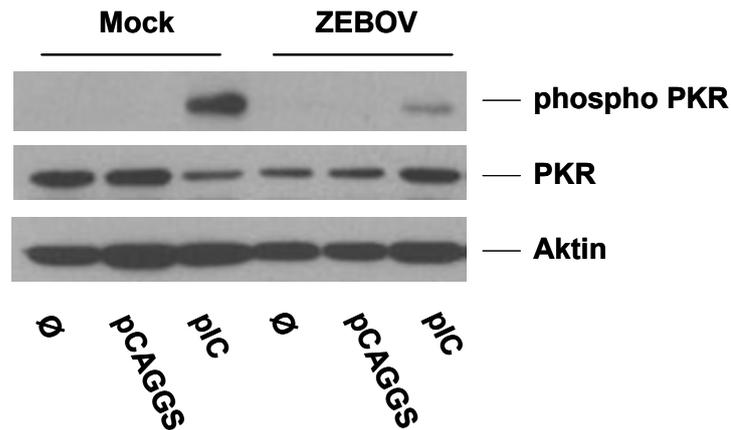


Abbildung 36: Nachweis von PKR in ZEBOV-infizierten HeLa-Zellen nach Aktivierung durch pIC

4×10^4 HeLa-Zellen wurden mit ZEBOV (moi = 10) infiziert. 48h nach der Infektion wurden die Zellen mit $1 \mu\text{g}$ pIC mittels LipofectamineLTX transfiziert. Als Kontrolle wurde $1 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA (pCAGGS) transfiziert. 5h nach Transfektion wurden die Zellen in $50 \mu\text{l}$ Cell Extraction Buffer lysiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden $15 \mu\text{l}$ der Lysate auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Kaninchen-anti-PKR-phospho (1:1000), Maus-anti-PKR (1:30.000), Maus-anti- β -Aktin (1:40.000), sowie Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase (1:40.000), Ziege-anti-Maus-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

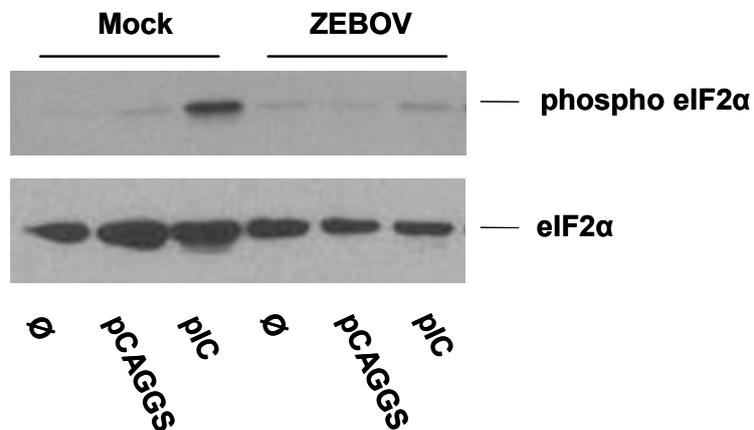


Abbildung 37: Nachweis von eIF2α in ZEBOV-infizierten HeLa-Zellen nach Transfektion von pIC

4×10^4 HeLa-Zellen wurden mit ZEBOV (moi = 10) infiziert. 48h nach der Infektion wurden die Zellen mit $1 \mu\text{g}$ pIC mittels LipofectamineLTX transfiziert. Als Kontrolle wurde $1 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA (pCAGGS) transfiziert. 5h nach Transfektion wurden die Zellen in $50 \mu\text{l}$ Cell Extraction Buffer lysiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden $10 \mu\text{l}$ der Lysate auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Maus-anti-eIF2α-phospho (1:30.000), Maus-anti-eIF2α (1:1000), sowie Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase (1:40.000), Ziege-anti-Maus-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

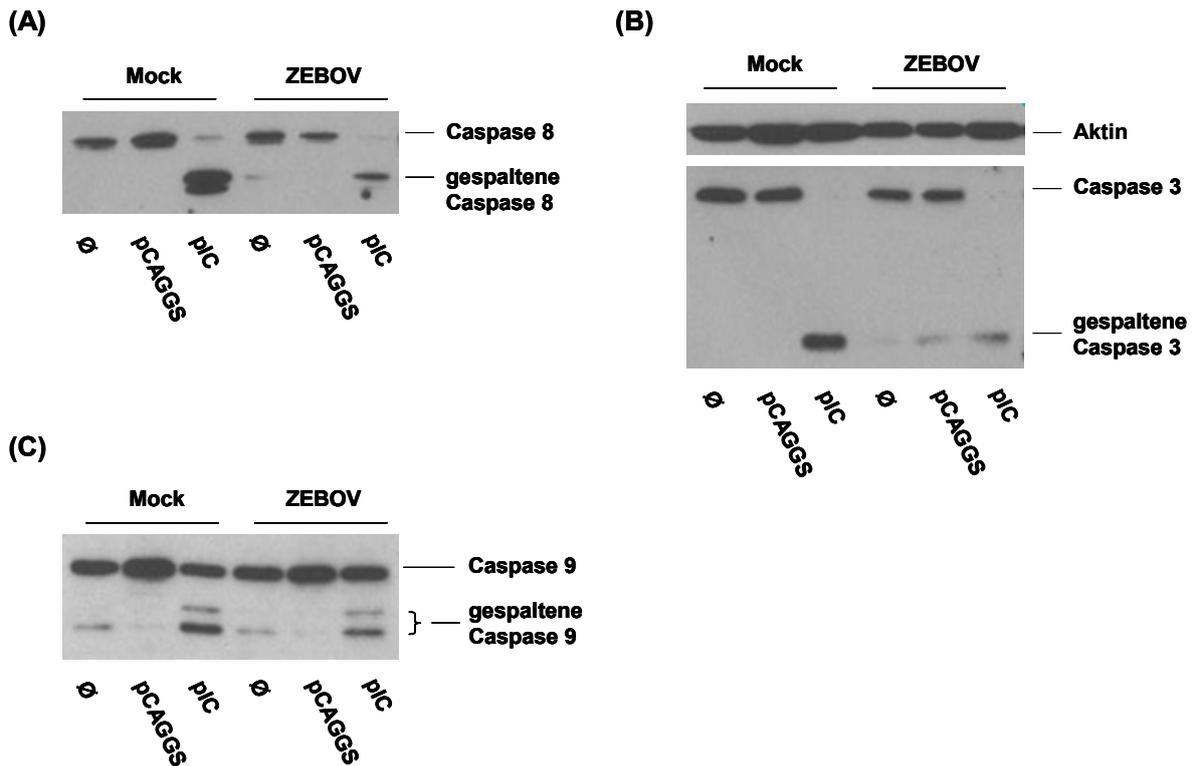


Abbildung 38: Nachweis von Caspasenspaltung in ZEBOV-infizierten HeLa-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels pIC

4×10^4 HeLa-Zellen wurden mit ZEBOV ($\text{moi} = 10$) infiziert. 48h nach der Infektion wurden die Zellen mit $1 \mu\text{g}$ pIC mittels LipofectamineLTX transfiziert. Als Kontrolle wurde $1 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA (pCAGGS) transfiziert. 5h nach Transfektion wurden die Zellen in $50 \mu\text{l}$ Chaps-Puffer lysiert. Nach Zugabe von $2 \times$ SDS-Probenpuffer wurden $15 \mu\text{l}$ der Lysate auf ein 15% iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Maus-anti-Caspase 8 (1:1000), Kaninchen-anti-Caspase 3 (1:1000), Kaninchen-anti-Caspase 9 (1:1000) sowie Ziege-anti-Maus-Peroxidase (1:40.000), Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase (1:40.000) und anschließend Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

Caspasen wie in nicht-infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 38 C). Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass ZEBOV die Aktivierung der PKR durch pIC hemmt, jedoch scheint dies keinen Einfluss auf die Induktion der Apoptose zu haben, da alle untersuchten Caspasen (Caspase 3, 8 und 9) in ZEBOV-infizierten Zellen nach Transfektion von pIC gespalten wurden.

4.4 Induktion von Apoptose durch Überexpression des ZEBOV-GP

In Kooperation mit Dr. Gert Zimmer (Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover) wurden Untersuchungen mit MDCK-Zellen durchgeführt, welche stabil das ZEBOV-GP exprimieren (MDCK-ZEBOV-GP-GFP). Die Expression kann gezielt durch die Zugabe von Mifepriston (MP) induziert werden. An das GP wurde das grün fluoreszierende Protein (GFP) fusioniert, wodurch die Expression des GP anhand der grünen Fluoreszenz überprüft werden konnte. Die Zellen wurden im Labor von Dr. Gert Zimmer erstellt und dort wurde ebenfalls die Induktion von Apoptose in diesen Zellen durch die Überexpression des ZEBOV-GP beobachtet (persönliche Kommunikation). Um zu analysieren, ob eine ZEBOV-Infektion der GP-exprimierenden Zellen die ausgelöste Apoptose hemmen kann, wurden uns die Zellen zur Verfügung gestellt, um Infektionen im BSL4-Labor durchzuführen und Apoptose nachzuweisen. Zunächst wurde die Expression des ZEBOV-GP-GFP überprüft. Die Zellen wurden mit MP bzw. mit EtOH, dem Lösungsmittel für MP, behandelt und die GFP-Fluoreszenz analysiert. Wie in Abbildung 39 dargestellt, konnte nach MP-Behandlung der MDCK-ZEBOV-GP-GFP-Zellen eine deutliche GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Diese ist am stärksten auf der Zelloberfläche zu beobachten, bedingt durch die Kopplung an das ZEBOV-GP, welches an der Oberfläche der Zellen lokalisiert ist. Ohne Zugabe von Mifepristone konnte keine GFP-Fluoreszenz detektiert werden. Parallel zur Immunfluoreszenz wurde der Nachweis von Apoptose getestet. Es konnte nur ein Nachweis von

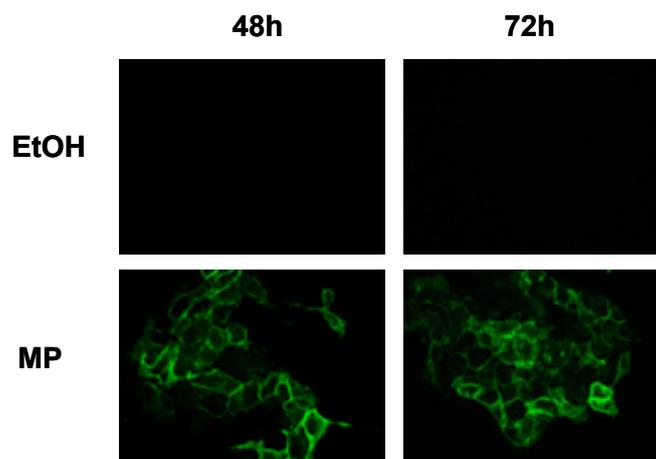


Abbildung 39: Nachweis der ZEBOV-GP-GFP-Expression

10^4 MDCK-ZEBOV-GP-GFP-Zellen auf Deckgläsern wurden mit 10^{-8} M MP oder der entsprechenden Menge EtOH behandelt und 48h bzw. 72h nach Behandlung mit 4% PFA in DMEM fixiert.

Caspase 3 erfolgreich durchgeführt werden, bei Caspase 9 traten unspezifische Banden auf und bei Caspase 8 konnte kein Protein detektiert werden. Dies lässt sich durch Verwendung von human-spezifischen Antikörpern erklären, die vermutlich nicht alle Caspasen in MDCK-Zellen (Hundenierenzellen) detektieren können. Auch konnte eine effiziente Caspase 3-Spaltung erst bei Verwendung höherer Konzentrationen von MP (10^{-7} M) nachgewiesen werden. Für die Infektion mit ZEBOV mit anschließendem Nachweis von Apoptose wurden die Zellen, wie von Dr. Zimmer empfohlen, dicht ausgesät, um möglichst viel Zelllysat zur Verfügung zu haben. Die Zellen wurden zuerst mit MP behandelt, da eine effiziente Spaltung von Caspasen in diesen Zellen erst 48h bis 72h nach Behandlung beobachtet werden konnte (Dr. Gert Zimmer, persönliche Mitteilung). Erst am nächsten Tag (ca. 17h nach MP-Zugabe) erfolgte die Infektion mit ZEBOV. Die durch MP-induzierte GP-Expression der Zellen führte zu einem deutlich sichtbaren **cytopathischen Effekt** (CPE), viele Zellen rundeten sich ab und begannen zu schwimmen (Abbildung 40). Dieser ausgeprägte CPE ließ sich nur nach MP-Behandlung der MDCK-ZEBOV-GP-GFP-Zellen beobachten, die als Kontrolle mitgeführten MDCKII-Zellen (ohne stabile Expression von ZEBOV-GP) zeigten keinen CPE (Abbildung 40, MDCKII + MP). 48h nach ZEBOV-Infektion und MP-Behandlung kann ein CPE der MDCKII-Zellen beobachtet werden, ob dieser durch MP oder die Infektion verursacht wurde ist unklar. Bei den MDCK-ZEBOV-GP-GFP-Zellen hingegen waren bereits 48h nach der MP-Behandlung (Abbildung 40, 24h nach ZEBOV-Infektion) die Mehrheit der Zellen abgelöst. Hier konnte kein deutlicher Unterschied zwischen Zellen mit und ohne ZEBOV-Infektion festgestellt werden, in beiden Fällen kam es nur nach MP-Behandlung zur Ablösung von Zellen im gleichen Maße (Abbildung 40, Vergleich Mock + MP und ZEBOV + MP). Um sicherzustellen, dass die Zellen mit ZEBOV infiziert waren, wurde ein Nachweis von ZEBOV in der Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierbei wurde ein Serum (Ziege-anti-ZEBOV) verwendet, welches das GP von ZEBOV nicht detektiert, um eine Kreuzreaktivität mit dem stabil exprimierten GP-GFP zu vermeiden. Der Nachweis der Infektion ist in Abbildung 41 dargestellt. Beide Zelllinien konnten erfolgreich mit ZEBOV infiziert werden, die Infektion in MDCK-ZEBOV-GP-GFP Zellen war nach 24h effizienter als in MDCKII-Zellen (Abbildung 41, Vergleich 24h ZEBOV). 48h nach der Infektion waren über 90% der Zellen bei beiden Zelllinien mit ZEBOV infiziert. Auffällig war die höhere Zelldichte der MDCKII Zellen 48h nach der Infektion, es lag ein komplett dichter Zellrasen vor

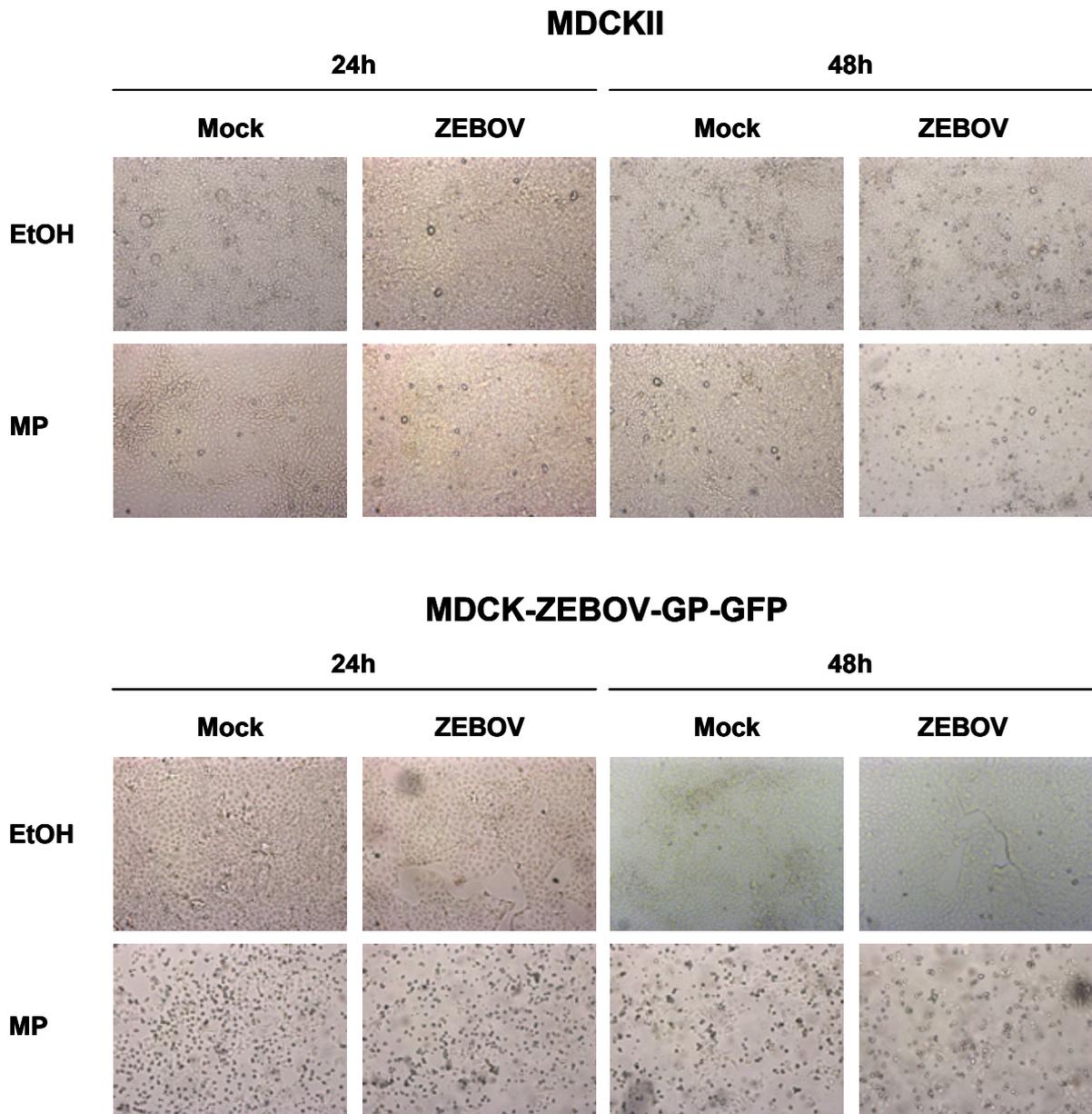


Abbildung 40: CPE von MDCK-ZEBOV-GP-GFP und MDCKII-Zellen nach MP-Behandlung und ZEBOV-Infektion

5×10^5 Zellen wurden auf Deckgläsern mit 10^{-7} M MP oder EtOH behandelt. 17h nach MP-Behandlung wurden die Zellen mit ZEBOV infiziert ($moi = 1$, Inokulum auf den Zellen belassen) und 3h nach der Infektion erneut MP/EtOH zugegeben. 24h bzw. 48h nach ZEBOV-Infektion wurde der CPE im Mikroskop begutachtet.

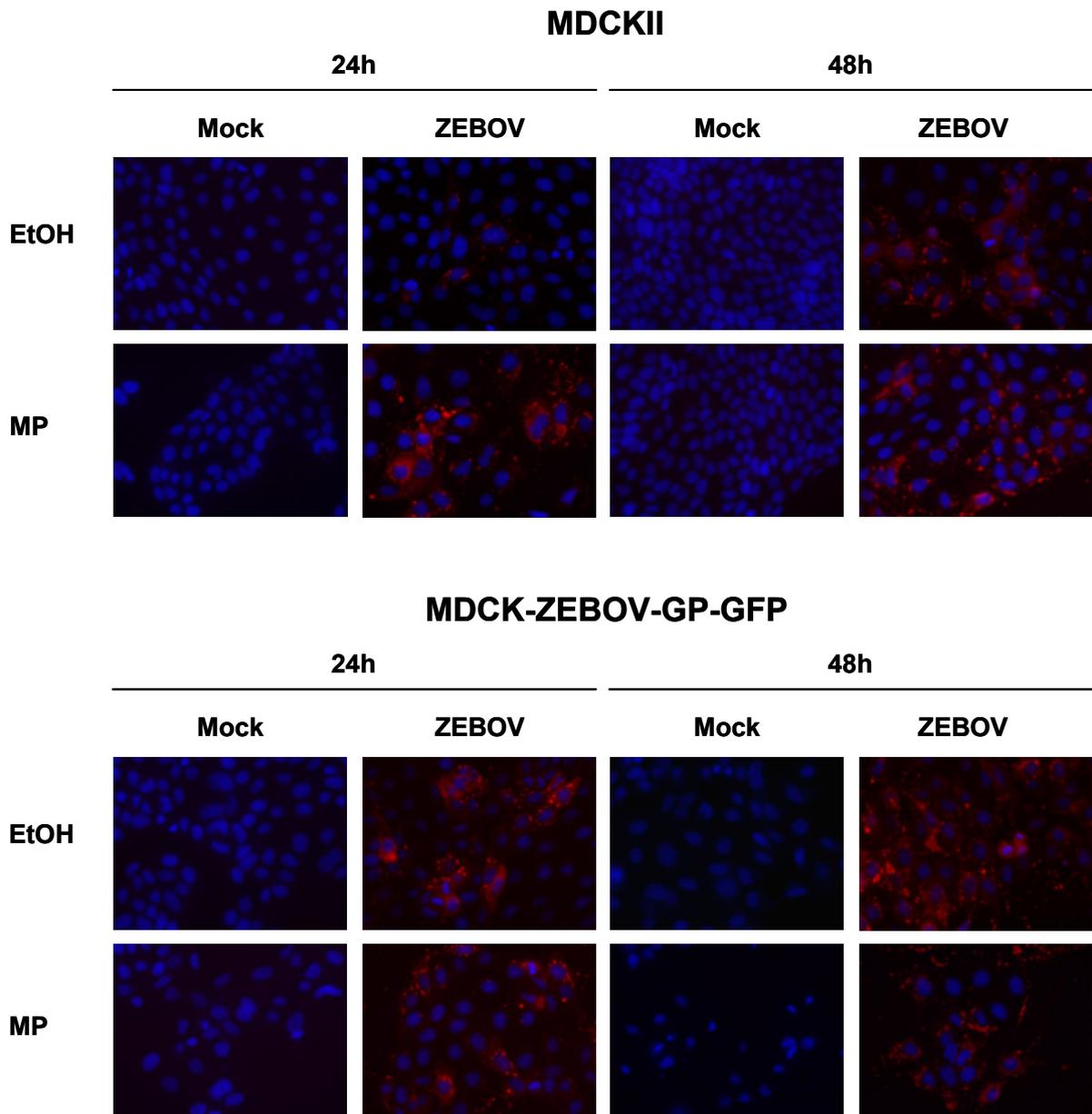


Abbildung 41: Nachweis der ZEBOV-Infektion in MDCK-ZEBOV-GP-GFP und MDCKII-Zellen nach MP-Behandlung

5×10^5 Zellen wurden auf Deckgläsern mit 10^{-7} M MP oder EtOH behandelt. 17h nach MP-Behandlung wurden die Zellen mit ZEBOV infiziert ($moi = 1$, Inokulum auf den Zellen belassen) und 3h nach der Infektion erneut MP/EtOH zugegeben. 24h bzw. 48h nach ZEBOV-Infektion wurden die Deckgläser mit 4% PFA in DMEM fixiert/inaktiviert. Anschließend wurde die ZEBOV-Infektion mit Ziege-anti-ZEBOV (1:500) und Esel-anti-Ziege-AlexaFluor495 (1:500, rote Fluoreszenz) nachgewiesen. Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI (1:2000, blaue Fluoreszenz) angefärbt.

(Abbildung 41). Durch die Behandlung mit MP wurde die ZEBOV-Infektion nicht beeinflusst, die Infektionsrate der Zellen war in beiden Fällen gleich (Abbildung 41, Vergleich ZEBOV + EtOH und ZEBOV + MP). Zur Analyse der Apoptose wurden die Zellen wie oben beschrieben mit MP behandelt, anschließend mit ZEBOV infiziert und 24h bzw. 48h nach der Infektion in Chaps-Puffer lysiert. Paralell wurde mit denselben Zelllysaten ein Nachweis von ZEBOV im Western Blot durchgeführt, um die Infektion zusätzlich zu überprüfen. Da ein ZEBOV-Serum eingesetzt wurde, welches GP nicht erkennt, konnte auch in MDCK-GP-GFP-Zellen ein Vergleich der ZEBOV-Proteinmenge vorgenommen werden. 24h nach Infektion kann in MDCKII Zellen kein Unterschied in der ZEBOV-Proteinmenge nach MP-Behandlung detektiert werden (Abbildung 42). 48h nach der Infektion scheint nach MP-Behandlung weniger ZEBOV-Protein vorzuliegen, jedoch ist dies vielleicht auf eine unregelmäßige Färbung der Membran zurückzuführen. In MDCK-ZEBOV-GP-GFP-Zellen kann auch keine Änderung der ZEBOV-Proteinmenge nach MP-Behandlung detektiert werden, 48h nach der Infektion könnte sogar eine verstärkte Expression von ZEBOV-Proteinen in MP-behandelten Zellen vorliegen, eine genaue Quantifizierung der Mengen ist aufgrund des verstärkenden Effektes des Chemilumineszenznachweises jedoch nicht möglich (Abbildung 42).

Zum Nachweis von Apoptose wurde die Spaltung von Caspase 3 im Western Blot untersucht, das Ergebnis ist in Abbildung 43 dargestellt. In MDCKII-Zellen konnte das inaktive Vorläuferprotein als Doppelbande detektiert werden (Abbildung 43). Um die einzelnen Proben vergleichen zu können, wurde zusätzlich ein Nachweis von β -Aktin durchgeführt. Aufgrund der höheren Dichte der MDCKII-Zellen (siehe auch Abbildung 40 und 41) war hier deutlich mehr Protein nachweisbar. Während 24h nach ZEBOV-Infektion in keinem der MDCKII-Ansätze eine Spaltung von Caspase 3 auftrat, wurde 48h nach ZEBOV-Infektion in allen MDCKII-Ansätzen das Spaltfragment von Caspase 3 detektiert (Abbildung 43), was sich vermutlich auf eine Induktion der Apoptose durch die sehr hohe Zelldichte zurückführen lässt. Jedoch sind keine Unterschiede in der Menge an aktivierter Caspase 3 feststellbar, was darauf hinweist, dass weder die MP-Behandlung noch die ZEBOV-Infektion zu einer verstärkten Induktion von Apoptose in den MDCKII Zellen führten. Bei geringerer Zelldichte führt weder die MP-Behandlung, noch die ZEBOV-Infektion zu einer Aktivierung von Caspase 3 in MDCKII-Zellen, es kann lediglich eine sehr schwache Bande für das Spaltfragment nach 48h ZEBOV-Infektion detektiert werden wie in

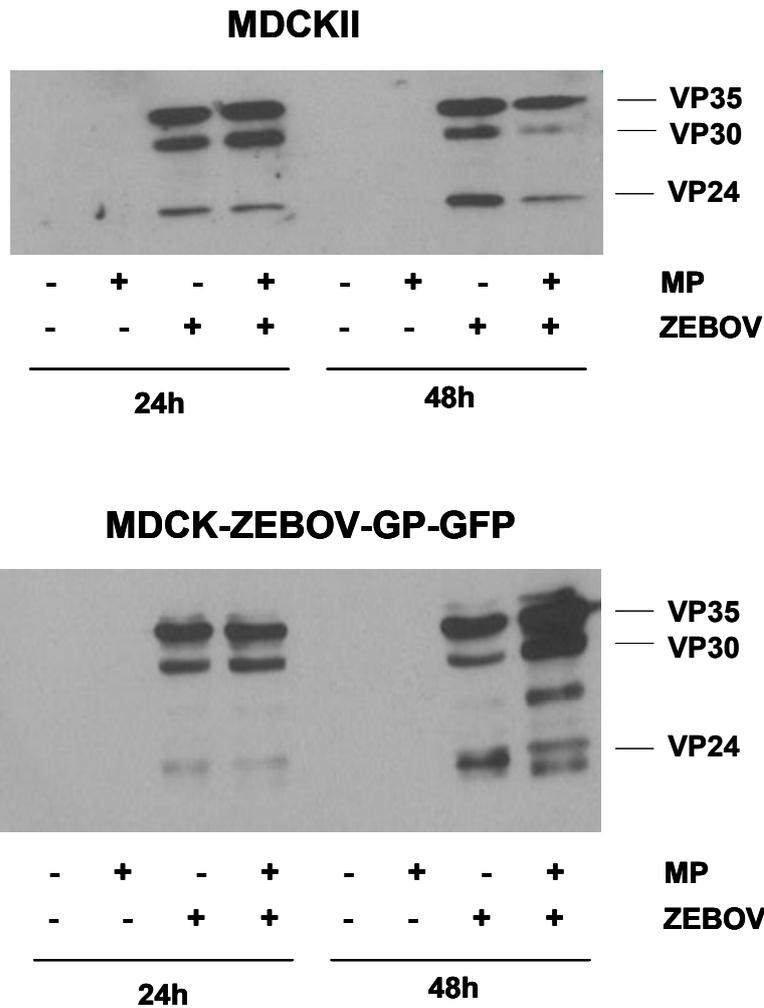


Abbildung 42: Nachweis von ZEBOV-Proteinen in infizierten MDCK-ZEBOV-GP-GFP und MDCKII-Zellen nach MP-Behandlung

5×10^5 Zellen wurden mit 10^{-7} M MP oder EtOH behandelt. Etwa 17h nach MP-Behandlung wurden die Zellen mit ZEBOV infiziert (moi = 1, Inokulum auf den Zellen belassen) und 3h nach der Infektion erneut MP/EtOH zugegeben. 24h bzw. 48h nach ZEBOV-Infektion wurden die Zellen in 50 μ l Chaps-Puffer lysiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden 15 μ l der Lysate auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Ziege-anti-ZEBOV (1:10.000) und Esel-anti-Ziege-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

Abbildung 44 gezeigt. In MDCK-ZEBOV-GP-GFP-Zellen führte die MP-Behandlung, wie in Abbildung 39 gezeigt, zur Expression des ZEBOV-GP. Die hierdurch bereits von Dr. Gert Zimmer beobachtete Apoptose konnte hier bestätigt werden. Nach MP-Behandlung der MDCK-ZEBOV-GP-GFP Zellen kam es bereits 24h nach Infektion zu einer kompletten Spaltung von Caspase 3, (Abbildung 43, MDCK-ZEBOV-GP-GFP,

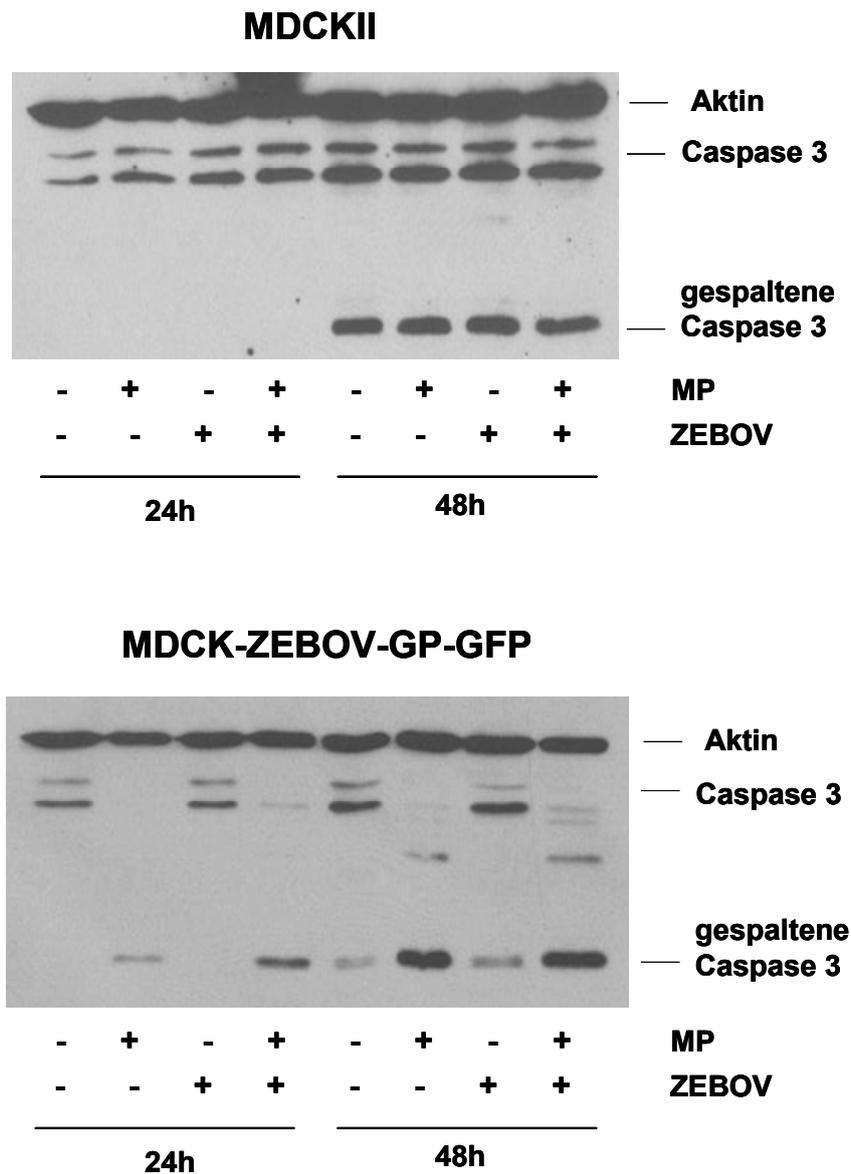


Abbildung 43: Nachweis von Caspase 3 in ZEBOV-infizierten MDCK-ZEBOV-GP-GFP und MDCKII-Zellen nach MP-Behandlung

5×10^5 Zellen wurden mit 10^{-7} M MP oder EtOH behandelt. Etwa 17h nach MP-Behandlung wurden die Zellen mit ZEBOV infiziert (moi = 1, Inokulum auf den Zellen belassen) und 3h nach der Infektion erneut MP/EtOH zugegeben. 24h bzw. 48h nach ZEBOV-Infektion wurden die Zellen in 50 μ l Chaps-Puffer lysiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden 15 μ l der Lysate auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Kaninchen-anti-Caspase 3 (1:1000), Maus-anti- β -Aktin (1:40.000), sowie Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase (1:40.000), Ziege-anti-Maus-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

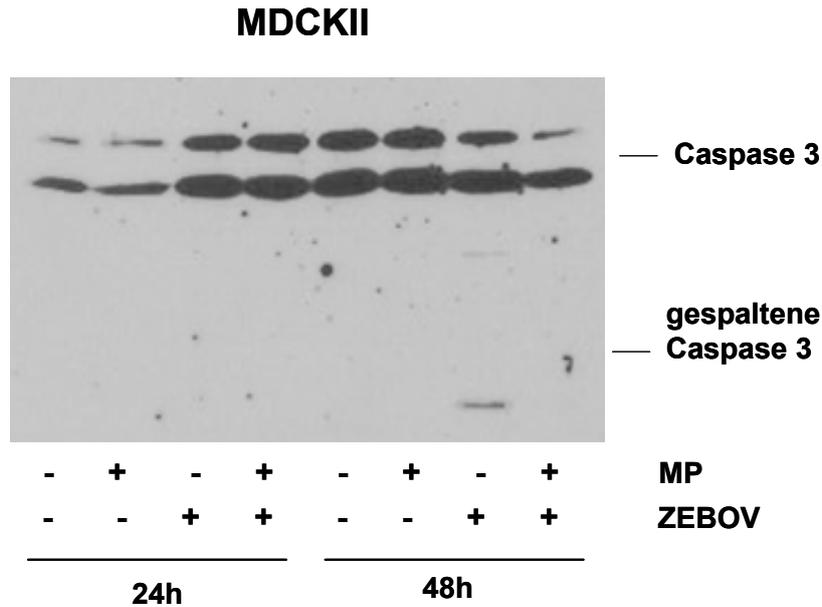


Abbildung 44: Nachweis von Caspase 3 in ZEBOV-infizierten MDCKII-Zellen nach MP-Behandlung

5×10^5 Zellen wurden mit 10^{-7} M MP oder EtOH behandelt. Etwa 17h nach MP-Behandlung wurden die Zellen mit ZEBOV infiziert (moi = 1, Inokulum auf den Zellen belassen) und 3h nach der Infektion erneut MP/EtOH zugegeben. 24h bzw. 48h nach ZEBOV-Infektion wurden die Zellen in 50 μ l Chaps-Puffer lysiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden 15 μ l der Lysate auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden im Western Blot-Verfahren mittels Kaninchen-anti-Caspase 3 (1:1000), Maus-anti- β -Aktin (1:40.000), sowie Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase (1:40.000), Ziege-anti-Maus-Peroxidase (1:40.000) und anschließendem Chemilumineszenznachweis nachgewiesen.

+ MP). Dabei konnte die vollständige Spaltung auch in ZEBOV-infizierten Zellen nach Behandlung mit MP nachgewiesen werden, es war kein hemmender Effekt durch die ZEBOV-Infektion sichtbar (Abbildung 43, MDCK-ZEBOV-GP-GFP, ZEBOV + MP). Die ZEBOV-Infektion alleine führte nicht zur Aktivierung von Caspase 3, die nach 48h vorhandene schwache Bande für das Spaltfragment kann auch in Mock detektiert werden (Abbildung 43, Vergleich 48h, EtOH und ZEBOV + ETOH, MDCK-ZEBOV-GP-GFP). Dieses Ergebnis zeigt, dass die durch Überexpression des ZEBOV-GP induzierte Apoptose durch Infektion mit ZEBOV nicht gehemmt werden kann.

4.5 Analyse der Akt-Kinase Aktivität in ZEBOV-infizierten Zellen

Eine Regulation von Apoptose kann auch durch Induktion von zellulären Überlebenssignalen erfolgen. Ein wichtiger Signalweg, der auch bekanntermaßen durch Viren beeinflusst wird, ist der PI3K-Akt-Signalweg. Das zentrale Element zur Apoptoseregulation ist die Kinase Akt, welche über Phosphorylierung aktiviert wird. Aktives Akt führt zur Induktion von Überlebenssignalen und gleichzeitig wird der interne Apoptosesignalweg gehemmt (siehe 1.1.2.4). Da in ZEBOV-infizierten Zellen keine Apoptose beobachtet werden kann, sollte geklärt werden, ob ZEBOV zu einer Aktivierung von Akt führt und dadurch die Apoptose unterdrückt wird. Da Akt-Phosphorylierung z.T. sehr früh in Virus-infizierten Zellen stattfindet, um einen frühzeitigen Zelltod zu verhindern [81, 144, 145], wurden ZEBOV-infizierte Zellen über einen Zeitraum von 3 – 72h nach der Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten auf eine Aktivierung von Akt untersucht. Verwendet wurden H1299-Zellen, da sich hier der Nachweis von Akt in Vorversuchen am besten durchführen ließ (eindeutige Induktion von phospho-Akt möglich) und die Zellen bereits auf Infizierbarkeit mit ZEBOV getestet waren. Die Infektion wurde in der Immunfluoreszenz kontrolliert, wie in Abbildung 45 dargestellt. 3 bis 12h nach der Infektion konnten nur kleine Virusaggregate detektiert werden, die eventuell das Inokulum repräsentieren, nach 24h konnten schon eindeutige charakteristische Viruseinschlüsse (inclusion bodies) nachgewiesen werden. 48h und 72h nach ZEBOV-Infektion waren eindeutig alle Zellen infiziert (Abbildung 45). Parallel wurden H1299-Zellen zur Analyse im Western Blot lysiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Adenovirus (Ad5) infiziert, da hier bereits eine Aktivierung von Akt in H1299-Zellen bekannt war [146]. Die Untersuchung der Akt-Aktivierung mittels Western Blot-Analyse ist in Abbildung 46 dargestellt. Zum Nachweis von aktiviertem Akt wurde ein phospho-spezifischer Antikörper verwendet. Bereits 3h nach der Infektion mit Ad5 konnte phosphoryliertes Akt nachgewiesen werden, eine sehr starke Induktion fand 24h nach der Ad5-Infektion statt (Abbildung 46). Über den kompletten Zeitverlauf blieb die Phosphorylierung von Akt in Ad5-infizierten Zellen erhalten, auch nach 72h konnte aktives Akt nachgewiesen werden (Abbildung 46). Nach Infektion mit ZEBOV konnte, im Gegensatz zur Ad5-Infektion, früh in der Infektion keine Induktion der Akt-Phosphorylierung beobachtet werden. Auch 72h nach der Infektion mit ZEBOV kam es nicht zur Aktivierung von Akt. 48h nach der Infektion ist phosphoryliertes Akt in ZEBOV-infizierten Zellen nachweisbar, jedoch konnte dies auch in der Mock-Kontrolle beobachtet werden und wurde somit

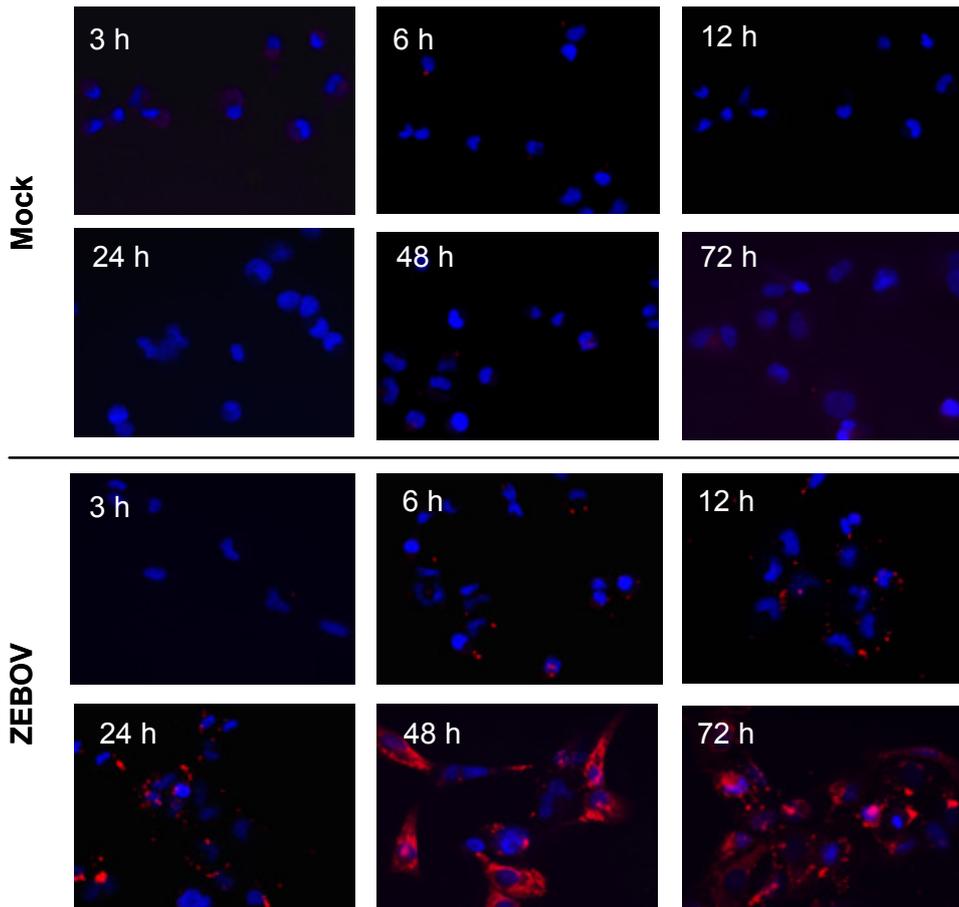


Abbildung 45: Nachweis der ZEBOV-Infektion in H1299-Zellen

4×10^4 H1299-Zellen auf Deckgläsern wurden mit ZEBOV (moi = 5) infiziert. Nach den oben angegebenen Zeitwerten wurden die Deckgläser mit 4% PFA in DMEM fixiert/inaktiviert. Anschließend wurde die ZEBOV-Infektion mit Ziege-anti-ZEBOV (1:500) und Esel-anti-Ziege-AlexaFluor495 (1:500, rote Fluoreszenz) nachgewiesen. Die Zellkerne wurden parallel mit DAPI (1:5000, blaue Fluoreszenz) angefärbt.

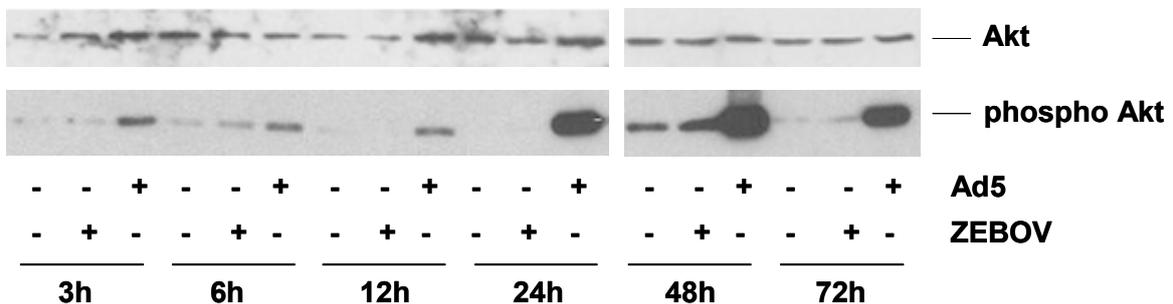


Abbildung 46: Nachweis von Akt in ZEBOV-infizierten H1299-Zellen

4×10^4 H1299-Zellen wurden mit ZEBOV (moi = 5) oder Ad5 (10^5 ffu) infiziert. Nach den oben angegebenen Zeitwerten wurden die Zellen in 50 μ l Cell Extraction Buffer lysiert. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden 10 μ l der Lysate auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach Western Blot wurden die Proteine mittels Kaninchen-anti-phospho-Akt (1:1000), Kaninchen-anti-Akt (1:5000), sowie Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase (1:40.000), und anschließend Chemilumineszenznachweis detektiert.

nicht durch die ZEBOV-Infektion ausgelöst. Dieses Phänomen war auch bei Wiederholung des Experiments nach 48h zu beobachten. Wahrscheinlich ist zu diesem Zeitpunkt aus unbekanntem Gründen die Menge an aktiviertem Akt temporär in den Zellen erhöht. Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass eine Infektion mit ZEBOV nicht zu einer Aktivierung der Akt-Kinase führt, um aktiv das Überleben der Zelle zu sichern, da zu keinem Zeitpunkt der Infektion phosphoryliertes Akt nachweisbar war.

5. Diskussion

5.1 Die Infektion mit ZEBOV führt nicht zur Induktion von Apoptose in infizierten Zellen

Die Induktion von Apoptose kann im Rahmen der Immunabwehr genutzt werden, um Virus-infizierte Zellen zu eliminieren (siehe auch 1.1.3). Daher haben viele Viren Mechanismen entwickelt, das zelluläre Apoptosesignalnetzwerk zu regulieren und Apoptose zu verhindern.

In der dieser Arbeit zugrunde liegenden Diplomarbeit konnte bereits eine fehlende Induktion von Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen gezeigt werden. Dabei wurde aber nur eine Analyse der sehr frühen Schritte in der Apoptose und der Spaltung von Effektorcaspasen durchgeführt [134]. In dieser Arbeit wurden nun verschiedene Signalwege der Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen näher untersucht, um eine mögliche Regulation durch ZEBOV zu analysieren. Es konnte bestätigt werden, dass die Infektion mit ZEBOV nicht zur Induktion von Apoptose führt. Die Analyse von verschiedenen Caspasen zeigte, dass weder die Initiatorcaspasen 8 und 9 noch die Effektorcaspase 3 in ZEBOV-infizierten Zellen gespalten werden (siehe 4.1 bis 4.4). Auch konnte keine apoptotische Spaltung von PARP beobachtet werden (siehe 4.2). Weiterhin konnte keine Veränderung in der relativen Menge von Bax und Bcl-2 detektiert werden, über die die Regulation von Apoptose an den Mitochondrien stattfindet (siehe 4.2). Da in allen Versuchen ein Nachweis der Infektion mittels Immunfluoreszenz und Western Blot erfolgte, kann ausgeschlossen werden, dass die fehlende Apoptose in einer geringen Infektionsrate begründet ist. In fast allen Experimenten konnte eine nahezu 100%ige Infektion der Zellen mit ZEBOV nachgewiesen werden (siehe 4.1 bis 4.4), woraus geschlossen werden kann, dass die Infektion eindeutig nicht zur Induktion von Apoptose führt. Da immortalisierte Zellkulturen vielfach Defekte in den zellulären Apoptosesignalwegen oder der Zellzyklusregulation besitzen, können sie unterschiedlich auf Apoptosestimuli reagieren [147]. Daher wurde Apoptose nach ZEBOV-Infektion in verschiedenen Zelllinien untersucht. In allen verwendeten Zellen (Vero, HeLa und MDCK) führte die ZEBOV-Infektion nicht zur Induktion von Apoptose.

Diese Daten bestätigen Beobachtungen aus Untersuchungen mit ZEBOV-infizierten Affen. Hier konnte in Zellen mit Virusreplikation keine Apoptose nachgewiesen werden [105, 106]. Im Gegensatz dazu wurde bei einer Studie mit ZEBOV-infizierten

humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) verstärkte Apoptose von Makrophagen beobachtet. Allerdings wurde nicht eindeutig nachgewiesen, dass die apoptotischen Makrophagen mit ZEBOV infiziert waren [129].

Eine kontrollierte Replikation von ZEBOV scheint für das Verhindern der zellulären Apoptose essentiell zu sein. Obwohl die ZEBOV-Infektion nicht zur Induktion von Apoptose führt, kann nach Überexpression des Glykoproteins (GP) durch rekombinante Adenoviren Apoptose beobachtet werden. Beobachtet wurden sowohl frühe (Translokation von Phosphatidylserin auf die Zelloberfläche) als auch späte Stadien der Apoptose (DNA-Fragmentierung). Eine Aktivierung von Caspasen konnte jedoch nicht gezeigt werden und die Behandlung der Zellen mit einem Caspaseinhibitor (gegen Effektorcaspasen) konnte die Apoptose nicht unterdrücken [136]. Von Dr. Gert Zimmer (Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover) wurden uns Zellen zur Verfügung gestellt, die das GP von ZEBOV stabil exprimieren (MDCK-ZEBOV-GP-GFP). Auch hier kommt es nach Induktion der GP-Expression zur Auslösung von Apoptose, es kann jedoch eindeutig Caspaseaktivität nachgewiesen werden (Dr. Gert Zimmer, unveröffentlichte Daten). In den hier durchgeführten Experimenten konnte auch die Aktivierung der Effektorcaspase 3 nach GP-Expression nachgewiesen werden. Wurden diese Zellen zusätzlich mit ZEBOV infiziert, konnte die durch verstärkte GP-Expression ausgelöste Spaltung von Caspase 3 nicht verhindert werden (siehe 4.4). Da in den verwendeten Zellen (Hundenierenzellen) mit Antikörpern gegen humane Caspasen kein erfolgreicher Nachweis der Initiatorcaspasen 8 und 9 durchgeführt werden konnte, ist unklar, über welchen Weg die Expression des GP zur Einleitung von Apoptose führt. Jedoch kann der proapoptische Effekt von GP nicht durch ein anderes ZEBOV-Protein kompensiert werden, da keine Apoptosehemmung beobachtet werden konnte (siehe 4.4). Dies lässt vermuten, dass unter physiologischen Bedingungen in infizierten Zellen die verschiedenen ZEBOV-Proteine in einer gut kontrollierten Balance vorliegen und nur so die Auslösung von Apoptose verhindert werden kann.

Viele RNA-Viren vermehren sich schnell und produzieren eine hohe Anzahl an Nachkommenviren, bevor die Immunantwort reagiert und Apoptose in den infizierten Zellen ausgelöst wird (z.B. VSV) [77]. Im Vergleich dazu verläuft die Replikation von ZEBOV jedoch deutlich langsamer und es kommt auch spät in der Infektion nicht zur Induktion von Apoptose (siehe 4.1 bis 4.4). Viren, bei denen nach Infektion keine

Apoptose in der Wirtszelle induziert wird, verhindern oder verzögern aktiv die Auslösung von Apoptose [73, 74, 77]. Daher wurde eine mögliche Hemmung von Apoptose durch ZEBOV in dieser Arbeit untersucht, jedoch konnte in keinem der durchgeführten Experimente (siehe 4.1 bis 4.4) eine aktive Hemmung von Apoptose durch ZEBOV beobachtet werden (Näheres siehe 5.2 und 5.3). Die Infektion mit ZEBOV führt also nicht zur Induktion von Apoptose in den infizierten Zellen, dies wird jedoch nicht durch die Aktivierung von Überlebenssignalen über Akt vermittelt (siehe 4.5 und 5.4). Da in den durchgeführten Experimenten keine aktive Hemmung von Apoptose beobachtet werden konnte, scheint die Infektion mit ZEBOV nicht vom zellulären Apoptosesignalnetzwerk erkannt zu werden, so dass es nicht zur Einleitung von Apoptose kommt.

5.2 ZEBOV ist nicht in der Lage Apoptose aktiv zu regulieren

Viele Viren haben Mechanismen entwickelt, die Apoptose der Wirtszelle zu unterdrücken, damit eine effiziente Virusreplikation stattfinden kann. Hierbei werden verschiedene Wege genutzt, um zelluläre Apoptose zu verhindern oder zu verzögern (siehe auch 1.1.3). Ein zentraler Punkt der Apoptose ist die Aktivierung von Caspasen (siehe auch 1.1.2), welche von viralen Proteinen gehemmt werden kann. Viren (z.B. Baculoviren) besitzen Homologe zu zellulären inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), welche die enzymatische Aktivität von Caspasen hemmen können. Ebenso können IAPs den Abbau von Caspasen durch Ubiquitylierung einleiten, was ebenfalls zur Unterdrückung von Apoptose in der Zelle führt. Dabei können durch IAPs die Effektorcaspasen sowie die Initiatorcaspase 9 gehemmt werden [21, 40, 73, 76, 148]. Virale Homologe von FLIP (vFLIP) sind dagegen in der Lage, die Bildung eines funktionellen DISC zu verhindern, und somit die Aktivierung der Initiatorcaspasen 8/10 über den Rezeptorvermittelten Apoptosesignalweg zu verhindern (siehe auch 1.1.2.1) [26, 73, 149, 150]. Weiterhin besitzen Viren Proteine, die hohe Homologie zu den death receptors haben und so durch Expression auf der Zelloberfläche die Weiterleitung des externen apoptotischen Signals blockieren (z.B. CrmB der Poxviren) oder die Internalisierung des death receptors und damit die Bildung eines funktionellen DISC verhindern (z.B. 14.7K der Adenoviren) [73, 77, 151, 152]. Ebenso wird die Expression der death receptors von verschiedenen Viren

(z.B. dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV)) während der Infektion herunterreguliert, so dass weniger funktionelle Rezeptoren auf der Zelloberfläche vorhanden sind und eine Apoptoseinduktion verzögert wird [77, 153]. Eine vielfältige Regulation von Apoptose durch Viren findet auch über den internen Signalweg, der über die Mitochondrien kontrolliert wird, statt (siehe auch 1.1.2.2 und 1.1.3). Weit verbreitet ist die Expression von viralen Homologen des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins (z.B. Adenoviren, Herpesviren), welches mit zellulären proapoptotischen Bcl-2-Proteinen interagiert und darüber eine Hemmung des internen Apoptosesignalweges vermittelt [73, 77, 79, 154]. Auch wurde eine Hemmung des internen Apoptosesignalweges durch Regulation des Transkriptionsfaktors p53 beschrieben. Dabei binden virale Proteine (z.B. E1B-55K von Adenoviren) das zelluläre p53 und verhindern so die p53-kontrollierte Transkription von proapoptotischen Genen (z.B. Bax, siehe auch 1.1.2.2). Alternativ kann aber auch durch Ubiquitylierung der Abbau von p53 induziert werden, um Apoptose zu hemmen [73, 77, 152, 155]. Es ist ebenfalls möglich, dass eine Regulation der Transkription von Bcl-2-Proteinen direkt durch Virusproteine erfolgt (z.B. tat von HIV), wobei zur Hemmung von Apoptose die Expression von antiapoptotischen Proteinen verstärkt wird [73, 77, 80, 156]. Bei der Hemmung von Apoptose durch Viren kann jedoch immer eine aktive Regulation von Apoptose beobachtet werden. Dabei werden z.T. nur bestimmte Teile des komplexen Signalnetzwerkes inhibiert oder aber auch mehrere Apoptosemechanismen durch das Virus beeinflusst. So kann beispielsweise Herpes simplex Virus 1 die Aktivierung von Caspasen in infizierten Zellen nicht hemmen, jedoch kommt es zur aktiven Stabilisierung von Bcl-2, wodurch Apoptose unterdrückt wird [157]. Im Gegensatz dazu besitzen z.B. Adenoviren verschiedene Proteine, welche an unterschiedlichen Stellen in die apoptotischen Signalwege eingreifen. So konnte ein Bcl-2-Homolog bei Adenoviren identifiziert werden, zusätzlich wird aber auch spezifisch der Rezeptorvermittelte Apoptosesignalweg früh gehemmt [73, 77, 152, 155]. Eine weitere Möglichkeit der Apoptoseregulation ist die Aktivierung von zellulären Überlebenssignalen, wie unter 5.4 diskutiert.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde Apoptose auf verschiedenen Wegen in ZEBOV-infizierten Zellen induziert, um zu klären, ob und wo ZEBOV regulatorisch in die Signalwege eingreift, um Apoptose zu verhindern. Es konnte jedoch in keinem der Experimente eine aktive Hemmung von Apoptose beobachtet werden (siehe 4.1 bis 4.4). Bindung von TRAIL an seine Rezeptoren führt zur Induktion von Apoptose in

der Zelle, wodurch es zur Aktivierung der Initiatorcaspase 8 kommt (siehe 1.2.1) [31-34]. Nach Behandlung von Vero-Zellen mit TRAIL konnte in den hier durchgeführten Experimenten eine Spaltung von Initiatorcaspase 8 sowie Effektorcaspase 3 nachgewiesen werden, was bedeutet, dass der Rezeptorvermittelte Apoptosesignalweg in diesen Zellen funktionell ist (siehe 4.1). Die Aktivierung der Caspasen nach TRAIL-Behandlung konnte auch in ZEBOV-infizierten Zellen beobachtet werden (siehe 4.1). Eine Infektion mit ZEBOV kann also die Rezeptorvermittelte Apoptoseinduktion durch TRAIL nicht unterdrücken. Da bereits die Spaltung der Initiatorcaspase 8 beobachtet werden konnte, kann auch eine Hemmung sehr früh im Signalweg über z.B. vFLIPs oder Regulation der Rezeptoren (s.o.) ausgeschlossen werden. In den für die Experimente verwendeten Vero-Zellen konnte ein Nachweis von Caspase 9 nicht erfolgreich durchgeführt werden (siehe 4.2, Affenzellen und humaner Antikörper). Ob es nach TRAIL-Behandlung über Bid auch zur Aktivierung von Caspase 9 in diesen Zellen kommt, konnte daher nicht untersucht werden. Es wird vermutet, dass TRAIL eine Rolle in der Pathogenese von ZEBOV spielen könnte, indem es von den infizierten Zellen sekretiert wird und so zur Apoptose nicht-infizierter Lymphozyten führt [107]. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit auch die mRNA-Level von TRAIL in infizierten Zellen untersucht (Näheres dazu siehe 5.5).

Auch die Induktion des internen Apoptosesignalweges wurde in ZEBOV-infizierten Zellen nicht aktiv gehemmt. Sowohl die Behandlung mit einem Topoisomerase-Inhibitor (CAM), als auch die Infektion mit VSV löste sowohl in nicht-infizierten Kontrollzellen als auch in ZEBOV-infizierten Zellen Apoptose aus (siehe 4.2). Einzelsträngige DNA-Brüche werden in der Zelle von Topoisomerasen erkannt und repariert, wobei Topoisomerase I als Monomer an den DNA-Bruch bindet und es zu einer Religation des DNA-Stranges kommt. CAM bindet an den DNA-Topoisomerase-I-Komplex und verhindert die für die Reparatur der DNA nötige Religation. Bei der Replikation der DNA kommt es dann zu einem Bruch in beiden DNA-Strängen, wodurch Apoptose induziert wird, dabei kommt es zu einer Herunterregulation des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins [52, 158, 159]. Dieser Effekt konnte auch in den durchgeführten Experimenten beobachtet werden. Nach CAM-Behandlung konnte ein Rückgang der Bcl-2 mRNA- und Proteinlevel beobachtet werden und Apoptose wurde in den Zellen ausgelöst (siehe 4.2.1). Die Induktion von Apoptose durch Herunterregulation von Bcl-2 konnte durch die Infektion mit ZEBOV-

nicht unterdrückt werden. In ZEBOV-infizierten Zellen, die mit CAM behandelt wurden, kam es ebenfalls zur Reduktion von Bcl-2 (siehe 4.2.1). CAM-induzierte Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen wurde parallel zu dieser Arbeit im Rahmen einer Diplomarbeit näher untersucht (Monika Strengert, Institut für Virologie, Universität Marburg). Hier konnte auch keine Hemmung der CAM-induzierten Apoptose durch ZEBOV beobachtet werden. Es wurde sogar eine schnellere Apoptose bei ZEBOV-Infektion durch CAM festgestellt. Acht Stunden nach CAM-Behandlung wurde noch keine Caspase 3 Spaltung in nicht-infizierten Kontrollzellen beobachtet, während in Zellen, die mit ZEBOV infiziert und CAM behandelt waren, eindeutig Spaltung von Caspase 3 detektiert werden konnte. Nach 24h CAM-Behandlung konnte kein Unterschied in der Caspase 3-Spaltung mehr beobachtet werden, was auch in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Diese Daten weisen demnach darauf hin, dass die Infektion mit ZEBOV die Zellen gegen CAM-induzierte Apoptose sensibilisiert. Wodurch diese Sensibilisierung zustande kommt, ist jedoch noch unklar.

Zur weiteren Analyse des internen Apoptosesignalwegs wurden ZEBOV-infizierte Zellen mit VSV infiziert (siehe 4.2.2). VSV-Infektion löst schnell Apoptose in der Wirtszelle aus, wobei die Virusreplikation parallel verläuft [160]. Hauptsächlich wird der interne Apoptosesignalweg über die Mitochondrien durch das Matrixprotein von VSV aktiviert, es kommt schnell zur Aktivierung der Initiatorcaspase 9 sowie der Effektorcaspase 3. [140, 161, 162]. Dies konnte auch in den hier durchgeführten Experimenten beobachtet werden (siehe 4.2.2). Die Aktivierung von Caspase 9 erfolgt nach dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) und Ausstrom von Cytochrom C in das Cytoplasma [140]. Ob ZEBOV in der Lage ist den Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$ zu verhindern, konnte aufgrund der für BSL-4-Proben vorgeschriebenen Inaktivierungsmethode nicht geklärt werden (4% PFA-Inaktivierung führte zur Schädigung von $\Delta\psi_m$). Die VSV-induzierte Aktivierung der Caspasen 9 und 3 konnte jedoch durch ZEBOV nicht gehemmt werden (siehe 4.2.2). ZEBOV ist also nicht in der Lage, regulativ in den mitochondrial-vermittelten Apoptosesignalweg einzugreifen, da sowohl CAM- als auch VSV-induzierte Apoptose durch ZEBOV-Infektion nicht gehemmt werden können.

Nach Infektion mit VSV konnte auch eine Aktivierung von Caspase 8 beobachtet werden (siehe 4.2.2). Dieser Weg der Apoptoseinduktion durch VSV wurde bei Mutanten des Matrixproteins beschrieben, eine Infektion mit dem Wildtyp-Virus

(Stamm Indiana, auch in dieser Arbeit verwendet) führte nur zu einer leichten Aktivierung von Caspase 8, welche nicht in allen Studien zur Apoptose in VSV-infizierten Zellen beobachtet werden konnte [140, 162]. Die durch den VSV-Wildtyp verursachte Apoptose kann durch Überexpression von Bcl-2, jedoch nicht durch Caspase 8-Inhibitoren gehemmt werden, was darauf hinweist, dass der mitochondrial-vermittelte Signalweg der Hauptweg der VSV-induzierten Apoptoseinduktion ist [147, 162]. Wie es zur Aktivierung von Caspase 8 durch Wildtyp-VSV kommt, ist noch ungeklärt. Für die Matrixproteinmutante konnte eine Beteiligung der PKR gezeigt werden [163]. Eine Infektion mit ZEBOV konnte die VSV-vermittelte Spaltung von Caspase 8 nicht verhindern (siehe 4.2.2).

Die Infektion mit ZEBOV wurde bei allen durchgeführten Experimenten mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dabei konnte kein Unterschied in der Infektionsrate zwischen Zellen, die nur mit ZEBOV infiziert wurden, und Zellen, in denen zusätzlich zur ZEBOV-Infektion Apoptose ausgelöst wurde, festgestellt werden (siehe 4.1 bis 4.4). Des Weiteren wurde die Infektion auch im Western Blot-Verfahren untersucht. Auch hier konnten keine Unterschiede in der Menge an viralen Proteinen detektiert werden (siehe 4.1 bis 4.4). Dies lässt vermuten, dass die ZEBOV-Replikation unabhängig von zellulärer Apoptose stattfindet. Um dies genauer zu untersuchen, müsste jedoch ein *pulse chase* Experiment durchgeführt werden, um zu analysieren, ob auch nach Induktion von Apoptose die Synthese viraler Proteine unterstützt wird. Ebenso könnte eine Analyse der Virustiter durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob die Induktion von Apoptose einen Effekt auf die virale Replikation und auf die Freisetzung viraler Partikel hat.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass weder interne noch externe Apoptosesignalwege in ZEBOV-infizierten Zellen induziert werden. Wie hier diskutiert, kann auch keine aktive Hemmung der verschiedenen Signalwege durch ZEBOV beobachtet werden und es kommt auch nicht zur Aktivierung von Überlebenssignalen in den Zellen.

5.3 Die Rolle der PKR-Hemmung durch ZEBOV in der Apoptoseregulation

Die Apoptosesignalwege sind eng mit der Interferonantwort, die einen weiteren wichtigen Abwehrmechanismus bei Virusinfektionen darstellt, verknüpft, wobei eine

zentrale Rolle der PKR zukommt. Als Replikationsintermediat tritt bei einigen Virusfamilien dsRNA auf, was zur Aktivierung von PKR und damit zur Einleitung eines Translationsstopps über die Phosphorylierung von eIF2 α und unter Umständen zur Induktion von Apoptose führt (siehe auch 1.1.2.3) [55, 56, 58-60]. dsRNA kann nach Infektion mit DNA-, dsRNA- und Positivstrang-RNA-Viren in den infizierten Zellen detektiert werden, jedoch nicht bei Negativstrang-RNA-Viren. Vermutet wird, dass durch die enge Verpackung der Genome und Antigenome bei der Replikation mit dem Nukleoprotein keine freie dsRNA in den infizierten Zellen vorliegt [164]. Auch in ZEBOV-infizierten Zellen konnte keine dsRNA nachgewiesen werden (M. Grosch, Institut für Virologie, Universität Marburg, mündliche Mitteilung). Obwohl keine dsRNA in mit Negativstrang-RNA-Viren infizierten Zellen nachzuweisen ist, kommt es bei einigen dieser Viren trotzdem zur Aktivierung des Interferonsystems und der PKR. So löst die Infektion mit SeV eine starke Interferonantwort aus und PKR wird aktiviert (siehe 4.3). Viele Viren haben Mechanismen entwickelt, um die Aktivierung der PKR zu regulieren. Auch ZEBOV ist in der Lage, die Interferonantwort zu hemmen, und die Aktivierung der PKR wird gezielt unterdrückt (siehe auch 1.2.2). Die hauptsächliche Regulation findet hier über VP35 statt, welches für die Hemmung der PKR verantwortlich ist und dsRNA binden kann [123-125]. Der genaue Mechanismus der PKR-Hemmung durch VP35 ist aber noch nicht geklärt, jedoch wird die Phosphorylierung des Substrates eIF2 α unterdrückt [124, 125]. Für einige Viren ist beschrieben, dass die Hemmung der PKR die Apoptose der infizierten Wirtszelle unterdrückt. Dieser Mechanismus der Apoptosehemmung konnte z.B. für Hepatitis C-Virus und Vaccinia-Virus gezeigt werden [165-167]. Da auch ZEBOV in der Lage ist, die Aktivierung der PKR zu hemmen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob dies auch zur Hemmung der Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen führt. Zur Aktivierung der PKR wurden dabei Zellen mit SeV infiziert oder mit pIC behandelt. In beiden Fällen konnte eine aktive Hemmung der PKR-Aktivierung durch eine gleichzeitige mit ZEBOV festgestellt werden. ZEBOV war in der Lage, sowohl die Phosphorylierung der PKR nach SeV-Infektion als auch nach Behandlung mit pIC zu vermindern oder komplett zu hemmen. Die aktive Hemmung der PKR durch ZEBOV hatte jedoch keinen Einfluss auf die SeV- bzw. pIC-induzierte Apoptose. So wurde die Aktivierung der Caspasen 3, 8 und 9 durch ZEBOV nach SeV-Infektion bzw. pIC-Behandlung nicht verhindert oder vermindert (siehe 4.3). Dies konnte sowohl in Vero Zellen, die keine

IFN-Gene besitzen [141], als auch in HeLa Zellen mit funktionellem IFN-System gezeigt werden. Im Rahmen dieser Versuche konnte auch eine Hemmung der Phosphorylierung von eIF2 α , dem Substrat der PKR, durch ZEBOV nachgewiesen werden. Die Hemmung der Phosphorylierung von eIF2 α wird in ZEBOV-infizierten Zellen aktiv gehemmt, verantwortlich dafür ist VP35 (siehe 4.3) [124, 125]. Da durch Infektion mit SeV und pIC-Behandlung trotzdem Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen induziert wurde, scheint der durch eIF2 α -Phosphorylierung induzierte Translationsblock nicht entscheidend für die ausgelöste Apoptose zu sein. Es wird vermutet, dass es durch dsRNA und aktive PKR zur Bildung von dsRNA-DISCs kommt und dadurch Apoptose über die Aktivierung von Caspase 8 eingeleitet wird (siehe 1.1.2.3) [63].

Für die durch SeV-ausgelöste Apoptose wurde ebenfalls eine Aktivierung von Caspase 8, unabhängig von TNF oder FasL gezeigt [168]. Ebenso konnte eine Beteiligung von IRF3 in der SeV-induzierten Apoptose nachgewiesen werden [169]. IRF3 ist ein essentieller Faktor in der Regulation der IFN β -Produktion, die Sekretion von IFN β wiederum führt zur Expression der PKR. Demnach lässt sich eine Beteiligung der PKR an der SeV-induzierten Apoptose vermuten, jedoch ist dies noch nicht eindeutig geklärt. Bekannt ist auch, dass IRF3 in der Lage ist, die Transkription von TRAIL zu kontrollieren und dass eine SeV-Infektion zu einer verstärkten Expression von TRAIL und seinem Rezeptor DR5 führt [170]. Daher könnte die Aktivierung von Caspase 8 in SeV-infizierten Zellen auch durch TRAIL und nicht über die PKR erfolgen. In Vorversuchen konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit keine verstärkte Expression von TRAIL nach SeV-Infektion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ob TRAIL also eine Rolle in der SeV-induzierten Apoptose in den hier durchgeführten Experimenten spielt, ist unklar. In neueren Studien konnte neben der Aktivierung von Caspase 8 und 3 auch eine Spaltung von Caspase 9 nach SeV-Infektion beobachtet werden. Diese erfolgt dabei auf einem Weg, der unabhängig vom Ausstrom von Cytochrom C aus den Mitochondrien ist und auch unabhängig von der Aktivierung der Caspasen 8 und 3 [142]. Da durch Überexpression von Bcl-2 PKR-vermittelte Apoptose unterdrückt werden kann, scheint auch der interne Apoptosesignalweg durch PKR reguliert zu werden [59, 65]. Eine Überexpression von Bcl-2 verhindert den Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$, so dass es nicht zum Ausstrom von Cytochrom C aus den Mitochondrien kommt, wodurch die Bildung des Apoptosoms verhindert wird. Da die SeV-induzierte Aktivierung von

Caspase 9 aber unabhängig von Cytochrom C erfolgt, scheint die PKR nicht an diesem Weg der Apoptoseinduktion beteiligt zu sein. SeV induziert also über verschiedene Wege Apoptose in den infizierten Zellen; ob die Aktivierung von Caspase 8 und 3 direkt über die PKR erfolgt, ist nicht eindeutig geklärt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass ZEBOV nicht in der Lage ist, SeV-induzierte Apoptose zu hemmen, da neben der Aktivierung von PKR noch andere Apoptosesignale, unabhängig von der PKR, ausgelöst werden.

In Experimenten mit HeLa Zellen konnte gezeigt werden, dass durch Behandlung mit pIC sehr schnell Apoptose in den Zellen stattfindet (2 – 4h) und die Hemmung der Translation hierbei nicht beteiligt ist. Zentraler Punkt ist auch hier die Aktivierung von Caspase 8. Ob diese jedoch zwangsläufig über aktivierte PKR induziert wird, ist noch unklar. Neben der Aktivierung von Caspase 8 wurde auch eine Aktivierung von Caspase 9 durch dsRNA beschrieben [171]. Die Aktivierung von Caspase 8 scheint das erste Ereignis in dsRNA-induzierter Apoptose zu sein, aktive Caspase 8 führt dann zur Aktivierung der Effektorcaspase 3 [63, 171]. Die Aktivierung von Caspase 9 erfolgt dann über Bid und den mitochondrial-vermittelten Apoptosesignalweg, daneben wurde aber auch eine direkte Aktivierung durch Caspase 3 in dsRNA-induzierter Apoptose beschrieben [171]. Diese schnelle Apoptose konnte auch in den hier durchgeführten Experimenten in HeLa Zellen nach pIC-Behandlung beobachtet werden. Eine Spaltung der Caspasen 3, 8 und 9 konnte sowohl in nicht-infizierten Kontrollzellen als auch ZEBOV-infizierten Zellen nach pIC-Behandlung nachgewiesen werden. Dabei wurde parallel eine Hemmung der PKR- und eIF2 α -Phosphorylierung durch ZEBOV in den infizierten Zellen gezeigt (siehe 4.3). Die Aktivierung von Caspasen durch dsRNA scheint also hier auch unabhängig von einer Hemmung der Proteinbiosynthese zu sein und kann durch ZEBOV nicht gehemmt werden.

dsRNA führt neben der Induktion von Apoptose auch zur Stimulation der IFN-Antwort. So induziert dsRNA die Expression von IFN β über den Toll-like receptor 3 (TLR3)-vermittelten Signalweg [172-174]. Ob die TLR3-vermittelte IFN-Produktion durch ZEBOV reguliert wird, ist bisher nicht näher untersucht. Entsprechende Experimente werden aber zurzeit durchgeführt und erste Daten lassen eine Hemmung von TLR3-vermittelter IFN β -Produktion und NF κ B-Aktivierung durch ZEBOV vermuten (Dr. Michael Schümann, Institut für Virologie, Universität Marburg, unveröffentlichte Daten). Inwieweit also andere zelluläre Signalwege durch dsRNA

induziert werden und hier eine Regulation durch ZEBOV stattfindet, ist nicht endgültig geklärt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ZEBOV nicht in der Lage ist, dsRNA-induzierte Apoptose zu hemmen, obwohl eine Aktivierung der PKR verhindert wird. Es kann jedoch anhand der durchgeführten Experimente nicht ausgeschlossen werden, dass die induzierte Apoptose auch unabhängig von der PKR stattfindet. Dazu müsste ein Stimulus verwendet werden, der zur Aktivierung der PKR und so zur Einleitung von Apoptose führt, ohne andere zelluläre Signalwege zu aktivieren. Ob ZEBOV durch eine Hemmung der PKR in der Lage ist Apoptose zu regulieren, konnte damit nicht abschließend geklärt werden.

5.4 ZEBOV-Infektion induziert keine Überlebenssignale über Akt

Eine zentrale Rolle in der Regulation von Apoptose und zellulärem Überleben spielt der PI3K-Akt-Signalweg. Aktives Akt führt zur Induktion von Überlebenssignalen und hemmt über die Phosphorylierung von Proteinen des internen Apoptosesignalweges die Induktion der Apoptose (siehe auch 1.1.2.4) [66-69]. Die Regulation dieses Signalweges wird auch von Viren zur Unterdrückung von Apoptose in verschiedenen Stadien der Infektion ausgenutzt [69]. Häufig findet eine Aktivierung von Akt bei tumorauslösenden Viren während der latenten Infektion statt. Während der Latenzzeit werden nur wenige oder keine Virusproteine synthetisiert und es findet keine Produktion von neuen Nachkommenviren statt, jedoch kann es zur Reaktivierung und dann zur Produktion neuer Viren kommen, wobei es oft zur Transformation der Zellen kommt. Für beide Prozesse konnte eine Regulation der Akt-Kinase durch Viren gezeigt werden. Hierbei wird PI3K oder Akt durch virale Proteine aktiviert, wodurch die Apoptose der Wirtszelle verhindert wird [69, 175-178]. Auch bei chronischer Infektion, z.B. bei Hepatitis-Viren, kommt es zur Regulation des PI3K-Akt-Signalweges, um zelluläre Apoptose zu verhindern [69, 179]. Für ZEBOV ist weder eine latente Infektion noch ein chronischer Verlauf der Infektion bekannt, doch konnte eine Regulation von Akt auch für akute Virusinfektionen gezeigt werden, was auch für ZEBOV eine Möglichkeit der Apoptoseregulation darstellen könnte. Viele RNA-Viren führen letztendlich zur Induktion von Apoptose der infizierten Zellen, jedoch wird ein zu früher Zelltod durch Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges

oftmals aktiv verhindert [69, 81, 144, 145, 180-185]. Dabei kommt es sehr früh in der Infektion schon zur Aktivierung von Überlebenssignalen. Beim HIV und dem **Respiratorischen Syncytial Virus (RSV)** kann die aktivierte phosphorylierte Form von Akt schon 10 - 15 Minuten nach der Infektion nachgewiesen werden [144, 183]. Diese sehr frühe Aktivierung von Überlebenssignalen ist unabhängig von der de novo Synthese viraler Proteine, welche erst später in der Zelle detektiert werden kann (bei RSV ab 2h nach der Infektion) [144]. Für Poliovirus konnte gezeigt werden, dass bereits die Bindung des Virus an seinen Rezeptor ausreicht, um die frühe Aktivierung von Akt einzuleiten [180, 184]. Für eine Regulation von Akt in mittleren und späten Phasen der Infektion ist die Virusreplikation jedoch essentiell [145, 186]. Bei HIV findet bereits 15 Minuten nach Infektion eine Phosphorylierung von Akt über das tat-Protein statt, danach sinkt das Aktivitätslevel wieder ab, eine zweite Phase der Aktivierung kann jedoch nach 24h beobachtet werden [183]. Ein ähnlicher Verlauf der Akt-Phosphorylierung wurde auch nach Infektion mit Influenza-Virus beobachtet, die zweite Phase der Akt-Phosphorylierung setzte jedoch schon nach 4h ein [184]. Es gibt jedoch auch Beobachtungen, dass es zu einer konstanten Aktivierung von Akt in der frühen und mittleren Phase der Influenza-Virus-Infektion kommt [145, 186]. Eine konstante Aktivierung von Akt kann auch bei RSV bis zu 6h nach der Infektion beobachtet werden. 24h nach der Infektion ist jedoch kein phosphoryliertes Akt mehr vorhanden, es findet keine aktive Regulation des Zellüberlebens mehr statt [144]. RSV gehört, wie ZEBOV, zur Familie der *Mononegavirales* und wie bei ZEBOV kann auch nach RSV-Infektion bis 48h nach Infektion kein cytotoxischer Effekt in den infizierten Zellen beobachtet werden. Danach kommt es allerdings zur Induktion von Apoptose in RSV-infizierten Zellen. Daher wird vermutet, dass die frühe Aktivierung von Akt in den infizierten Zellen zur Unterdrückung von Apoptose führt, während spät in der Infektion die Induktion der Apoptose nicht mehr über Akt gehemmt wird, so dass Apoptose in den Zellen ausgelöst wird. Diese Vermutung ließ sich durch Experimente mit Inhibitoren bestätigen. So führte eine Hemmung von PI3K zu einer früheren Induktion der Apoptose im Verlauf einer RSV-Infektion. [144]. Da bei ZEBOV auch spät in der Infektion (72h) keine Apoptose zu beobachten ist, stellte sich die Frage, ob eine Infektion mit ZEBOV vielleicht zu einer dauerhaften Aktivierung von Akt in den infizierten Zellen führt. Da bei RSV eine sehr frühe Phosphorylierung von Akt beobachtet wurde, wurden Zeitwerte von 3 bis 72h nach ZEBOV-Infektion

untersucht, um eine Aktivierung von Akt zu analysieren. Als Kontrolle wurde die Infektion mit Adenovirus (Ad5) verwendet, hier konnte eine konstante Phosphorylierung von Akt in den Zellen nachgewiesen werden. Die Infektion mit ZEBOV führte allerdings zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer Phosphorylierung von Akt (siehe 4.5). Auch früh in der Infektion (noch keine neuen Virusproteine in der Immunfluoreszenz nachweisbar, bis 24h) konnte keine Aktivierung von Akt festgestellt werden. Es findet also keine replikationsunabhängige Induktion von Überlebenssignalen durch ZEBOV statt. 48h und 72h nach der Infektion waren die Zellen eindeutig infiziert, Virusproteine konnten in großer Menge in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Jedoch kam es auch dann nicht zur Induktion von Überlebenssignalen über Akt-Phosphorylierung durch ZEBOV (siehe 4.5). Obwohl sich die Infektionsverläufe von RSV und ZEBOV früh in der Infektion ähneln (kein cytotoxischer Effekt oder Apoptose nachweisbar bis 48h nach der Infektion), wird durch eine ZEBOV-Infektion zu keinem Zeitpunkt der Infektion die Phosphorylierung von Akt induziert, um zelluläres Überleben zu sichern. Das heißt, die fehlende Apoptose ist nicht durch die Aktivierung von Akt zu erklären.

In einer neueren Studie wurde ein Einfluss von Akt auf die Replikation von Viren der Ordnung *Mononegavirales*, zu denen auch ZEBOV zählt, nachgewiesen. Durch Einsatz von siRNA wurde die Expression von Akt herunterreguliert und über Einsatz von Akt-Inhibitoren die physiologische Funktion von Akt blockiert. In beiden Fällen konnte eine verminderte Replikation von Parainfluenzavirus 5 (PIV5) nachgewiesen werden. Ebenso wurde die Replikation von weiteren Mitgliedern der Familie der *Paramyxoviridae* (darunter auch SeV und RSV) und *Rhabdoviridae* (VSV) durch Einsatz von Akt-Inhibitoren gehemmt [187]. Für die Replikation benötigen Mitglieder der *Mononegavirales* als essentiellen Faktor das Phosphoprotein als Teil des Replikationskomplexes, welches zur Unterstützung der viralen Replikation phosphoryliert vorliegen muss [188]. Es konnte gezeigt werden, dass Akt in der Lage ist, das Phosphoprotein von PIV5 in vitro zu phosphorylieren. Ebenso konnte nach Hemmung von Akt durch Inhibitoren eine verminderte Phosphorylierung des viralen Phosphoproteins beobachtet werden. Da die eingesetzten Inhibitoren eine Phosphorylierung von Akt verhindern, scheint phosphoryliertes Akt eine entscheidende Rolle in der Replikation der *Mononegavirales* zu spielen [187]. In ZEBOV-infizierten Zellen kommt es jedoch, wie in dieser Arbeit gezeigt, nicht zur Phosphorylierung von Akt (siehe 4.5). Die Infektion der Zellen wurde mittels

Immunfluoreszenz überprüft und es konnte eine Zunahme der infizierten Zellen im Verlaufe des Experimentes beobachtet werden, was bedeutet, dass Virusreplikation stattfindet. Dies weist darauf hin, dass phosphoryliertes Akt nicht essentiell für die ZEBOV-Replikation ist.

5.5 Die Rolle von Apoptose und TRAIL in der Pathogenese von ZEBOV

Im Verlauf der ZEBOV-Infektion kommt es zu einer massiven Abnahme der Lymphozytenzahl (Lymphopenie), wodurch die Immunantwort stark geschwächt wird. Die Abnahme der Lymphozyten kann sowohl bei der Infektion von Affen als auch im Menschen sowie im ZEBOV-Maus-Modell beobachtet werden [105, 106, 129-131, 133, 189]. Dabei kann Apoptose von Lymphozyten nur in fatal verlaufender ZEBOV-Infektion beim Menschen detektiert werden, bei Überlebenden der ZEBOV-Infektion kommt es nicht zur Abnahme der Lymphozyten durch Apoptose [130, 131]. Auch für alle anderen Viren, die ein hämorrhagisches Fieber auslösen, kann keine Virusreplikation in Lymphozyten gezeigt werden. Daten bezüglich der Abnahme der Lymphozytenzahl im Verlaufe der Infektion liegen bisher nicht vor [190], Lymphopenie ist jedoch für andere Virusinfektionen beschrieben. So kommt es bei Infektion mit HIV, RSV, dem **Simianen Immundefizienz-Virus (SIV)** und Masernvirus zu einer Lymphopenie durch Apoptose. Auch bei septischem Schock ist Apoptose von Lymphozyten ein wichtiger Pathogenesefaktor [191-195]. Der genaue Mechanismus der Apoptoseinduktion in Lymphozyten ist oftmals noch unklar. Die meisten Untersuchungen auf diesem Gebiet wurden für HIV durchgeführt. Hier sind verschiedene Mechanismen beschrieben, über welche Apoptose in den Lymphozyten induziert wird. So werden von den infizierten Zellen bestimmte virale Proteine sekretiert, welche apoptoseauslösend auf Lymphozyten wirken. Dies konnte für verschiedene Proteine von HIV gezeigt werden, wobei unterschiedliche Apoptosesignalwege in den nicht-infizierten Zellen induziert werden [193, 196, 197]. Für ZEBOV ist bekannt, dass verschiedene Formen von GP aus ZEBOV-infizierten Zellen freigesetzt werden. Im Viruspartikel ist GP in die Hüllmembran eingelagert und wird nach der Proteinbiosynthese durch Furin in zwei über Disulfid-Brücken verbundene Untereinheiten (GP1 und GP2) gespalten. GP1 wird auch von den infizierten Zellen freigesetzt [86, 137, 198]. Nach Überexpression von GP konnte

eine verstärkte Cytotoxizität beobachtet werden [199] und es kommt zur Induktion von Apoptose (siehe 4.4) [136]. Daher könnte eine Sekretion von GP eine Erklärung für die Apoptose in Lymphozyten liefern. Ob jedoch die sekretierten Formen von GP in der Lage sind, Apoptose zu induzieren, wurde bisher nicht untersucht.

Diskutiert wird auch die Sekretion von apoptoseauslösenden Cytokinen (TRAIL und FasL) aus ZEBOV-infizierten Zellen, wodurch es zur Induktion von Apoptose in nicht-infizierten Lymphozyten kommen könnte. Dieser Mechanismus der Apoptoseinduktion wurde auch bei Infektion mit HIV beschrieben. Hier konnte sowohl eine Beteiligung von TRAIL als auch Fas an der Apoptoseinduktion in Lymphozyten nachgewiesen werden [200, 201]. Bei ZEBOV gibt es bisher nur wenige Untersuchungen zur Apoptose der nicht-infizierten Lymphozyten und es liegen widersprüchliche Daten zur Beteiligung von Fas und auch TRAIL vor. In Experimenten mit humanen Monozyten/Makrophagen wurde nachgewiesen, dass über 95% der ZEBOV-infizierten Zellen eine verstärkte Expression von TRAIL zeigen. Hierbei scheint die verstärkte Expression von TRAIL nicht von viraler Replikation abzuhängen, da sie auch bei Einsatz von UV-inaktiviertem Virus gezeigt werden konnte [107]. Im Gegensatz dazu konnte in einer neueren Studie eine verstärkte Expression der TRAIL-mRNA nur in CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten, jedoch nicht in ZEBOV-infizierten Makrophagen gezeigt werden. Problematisch ist jedoch in dieser Studie, dass auch Apoptose von Makrophagen gezeigt wurde, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese nicht mit ZEBOV infiziert waren [129]. Weiterhin konnte eine verstärkte Expression von TRAIL und Fas in ZEBOV-infizierten Affen beobachtet werden. Untersucht wurden hier jedoch alle mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), welche sowohl Monozyten als auch Lymphozyten enthalten. Welche Zellen verstärkt TRAIL und Fas exprimieren (infizierte Makrophagen oder nicht-infizierte Lymphozyten), ist daher unklar [106]. Daher wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine Analyse der TRAIL-mRNA-Level vorgenommen, um zu untersuchen, ob eine Regulation der TRAIL-Expression in ZEBOV-infizierten Zellen vorliegt. Wie in 4.1 beschrieben, wurden für den Nachweis HeLa-Zellen verwendet, welche 48h nach der Infektion zu 100% infiziert waren. Im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollzellen konnte ein eindeutiger Rückgang der TRAIL-mRNA in ZEBOV-infizierten Zellen nachgewiesen werden, wobei eine stärkere Reduktion mit zunehmender Infektionsdauer beobachtet wurde. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion der TRAIL-mRNA-Level steht

im Widerspruch zu den veröffentlichten Daten [106, 107, 129]. Die Transkription von TRAIL kann über Typ-I-IFN reguliert werden, sowohl IFN α als auch IFN β führen zu einer verstärkten Expression von TRAIL [202, 203]. Durch diesen Mechanismus kann nach Virusinfektion über Induktion des Interferonsystems Apoptose induziert werden, was auch für die TRAIL-induzierte Apoptose bei HIV gezeigt werden konnte [170, 204]. Während der Infektion mit ZEBOV kann sowohl in Affen als auch Menschen eine Expression von IFN α festgestellt werden. Jedoch besitzt ZEBOV verschiedene Proteine, um das IFN-System zu antagonisieren und so die Expression IFN-stimulierter Gene zu hemmen (siehe auch 1.2.2 und 5.3) [120]. Die Reduktion der TRAIL-mRNA könnte also eine Folge der Hemmung der IFN-Antwort durch ZEBOV sein. Allerdings könnte auch eine direkte Regulation der TRAIL-Expression durch ZEBOV vorliegen. Um den vorliegenden Mechanismus zu klären, müssten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. Eine gezielte Reduktion der TRAIL-Expression zur Hemmung von Apoptose wurde bisher nur für die Infektion mit *Helicobacter pylori* nachgewiesen [205].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ZEBOV-infizierte Zellen nicht vor TRAIL-induzierter Apoptose geschützt sind (siehe 4.1 und 5.2). Dieses Ergebnis passt zu der parallel beobachteten Reduktion der TRAIL-mRNA-Level in ZEBOV-infizierten Zellen. Wenn ZEBOV-Infektion zu einer Reduktion der TRAIL-Expression führt, ist eine Regulation dieses Apoptosesignalweges nicht zwingend notwendig. Diese Experimente geben jedoch keinen Aufschluss über eine mögliche Sekretion von TRAIL aus den infizierten Zellen, welche auch bei den veröffentlichten Daten zur Expression von TRAIL nicht näher untersucht wurde. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden in immortalisierten Zellkulturen durchgeführt, während die publizierten Daten zur Regulation von TRAIL durch ZEBOV mit primären humanen Monozyten/Makrophagen gewonnen wurden. Da immortalisierte Zellkulturen vielfach Defekte vor allem in der Apoptose- und Zellzyklusregulation besitzen, müssten die Versuche in primären Zellen wiederholt werden, zum besseren Vergleich der Daten bevorzugt in primären menschlichen Makrophagen. Dies konnte jedoch aus Zeitgründen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Die beobachtete Apoptose in den nicht-infizierten Lymphozyten während der ZEBOV-Infektion könnte auch durch das Fas-System induziert werden. Sowohl in Blutproben von ZEBOV-infizierten Menschen als auch in aus infizierten Affen

isolierten PBMCs kann eine verstärkte Expression von Fas/CD95 beobachtet werden [131, 133]. In einer *in vitro* Studie konnte jedoch keine Veränderung der Fas oder FasL-Level in humanen PBMCs nachgewiesen werden [129].

Wodurch es zur Induktion von Apoptose in Lymphozyten im Verlaufe einer ZEBOV-Infektion kommt, ist weiterhin unklar. Sowohl die Sekretion von ZEBOV-GP als auch die Sekretion von TRAIL oder FasL könnten zur Induktion der Apoptose führen, doch liegen keine gesicherten Daten hierzu vor, die eine Aufklärung des genauen Mechanismus der Apoptoseinduktion erlauben. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass mehrere Faktoren zur Induktion von Apoptose in nicht-infizierten Lymphozyten bei einer ZEBOV-Infektion führen, wie es für HIV der Fall zu sein scheint.

5.6 Resumé

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation von Apoptose in ZEBOV-infizierten Zellen untersucht. Es konnte keine Induktion von Apoptose in infizierten Zellen festgestellt werden (siehe 4.1 bis 4.4 und 5.1), jedoch ist ZEBOV auch nicht in der Lage Apoptose zu hemmen (siehe 4.1 bis 4.4 und 5.2). Die fehlende Apoptose lässt sich auch nicht durch die Induktion von zellulären Überlebenssignalen erklären (siehe 4.5 und 5.4). Bei einer Virusinfektion wird das Virus (virale Proteine oder Nukleinsäure) von der Zelle über Pathogen-assoziierte molekulare Muster (**pathogen-associated molecular patterns** = PAMPs) erkannt, wodurch es zur Einleitung von Abwehrmechanismen kommt. Dabei werden als wichtigste Elemente das Interferonsystem und Apoptose in der infizierten Zelle induziert (siehe auch 1.1.2.3). Zur Erkennung von PAMPs besitzt die Zelle verschiedene Rezeptoren (**pattern-recognition receptors** = PRR), darunter fallen die TLRs, die RNA-Helikase RIG-I, sowie die PKR [206, 207]. Wie bereits unter 5.3 diskutiert, ist ZEBOV über VP35 in der Lage, die Aktivierung der PKR zu hemmen, und auch dsRNA, welche zur Aktivierung von PKR führt, kann in ZEBOV-infizierten Zellen nicht detektiert werden, wie auch für andere Negativstrang-RNA-Viren beschrieben (Versuche M. Grosch, Institut für Virologie, persönliche Mitteilung) [164]. In Zellen, die mit gereinigter genomischer ZEBOV-RNA transfiziert wurden, wurde über die 5'-Triphosphat-Enden die RIG-I-vermittelte IFN-Produktion induziert [208], doch wird

dieser Signalweg in ZEBOV-infizierten Zellen durch das virale Protein VP35 gehemmt [123]. Ob ZEBOV die durch TLRs induzierten Signalwege hemmt, wird zur Zeit untersucht, vorläufige Daten lassen aber eine Hemmung von TLR-vermittelter IFN-Produktion durch VP35 vermuten (Dr. Michael Schümann, Institut für Virologie, Universität Marburg, unveröffentlichte Daten). Neuere Studien lassen eine Rolle für RNA-Interferenz in der antiviralen Antwort auch in Säugern vermuten, wie bereits für Pflanzen, Insekten und Nematoden beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass VP35 in der Lage ist als **RNA Silencing Suppressor** (RSS) zu fungieren, wobei die dsRNA-Bindung von VP35 essentiell ist [209]. ZEBOV verhindert also in infizierten Zellen die Erkennung von PAMPs auf verschiedenen Wegen über VP35. Findet keine Erkennung des Virus durch zelluläre Sensoren statt kommt es auch nicht zur Einleitung zellulärer Abwehrmechanismen, wie Apoptose. In der vorliegenden Arbeit konnte keine aktive Hemmung von Apoptose festgestellt werden und eine ausbalancierte virale Replikation scheint für die fehlende Induktion von Apoptose wichtig zu sein. Dies lässt vermuten, dass ZEBOV nicht von der Zelle als fremd erkannt wird und es daher auch nicht zur Induktion von Apoptose kommt.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation von Apoptose in Ebolavirus Zaire (ZEBOV)-infizierten Zellen untersucht. Studien an infizierten Affen ergaben, dass mit ZEBOV infizierte Zellen nicht in Apoptose gehen, während die Zahl der Lymphozyten, die nicht durch ZEBOV infiziert werden, im Verlauf der Infektion durch Apoptose stark abnimmt, wodurch die Immunantwort geschwächt wird. Als entscheidender Faktor wird hier die Sekretion des Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) aus infizierten Zellen diskutiert, in der vorliegenden Arbeit konnte jedoch eine Reduktion der TRAIL-mRNA-Level in ZEBOV-infizierten Zellen festgestellt werden.

Ziel dieser Arbeit war zu klären, ob ZEBOV die Induktion der Apoptose in infizierten Zellen hemmt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit ZEBOV nicht zur Induktion von Apoptose in kultivierten Zellen führt. Es wurden weder die Initiatorcaspasen 8 und 9 noch die Effektorcaspase 3 aktiviert. Auch führte die Infektion mit ZEBOV nicht zu Veränderungen der mRNA- und Proteinlevel des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und des proapoptotischen Proteins Bax, über die eine Regulation von Apoptose an den Mitochondrien erfolgt.

Anschließend wurden ZEBOV-infizierte Zellen verschiedenen Apoptosestimuli ausgesetzt, um die unterschiedlichen Apoptosesignalwege zu aktivieren und einen möglichen inhibierenden Einfluss von ZEBOV zu analysieren. Es konnte jedoch bei keinem der durchgeführten Experimente eine Hemmung der Apoptose durch ZEBOV beobachtet werden. Weder eine Aktivierung des externen Apoptosesignalweges mittels TRAIL, noch die Induktion der mitochondrial-vermittelten Apoptose durch Camptothecin oder eine Infektion mit dem vesikulären Stomatitis-Virus wurden durch eine Infektion mit ZEBOV gehemmt oder vermindert.

Da eine Hemmung der dsRNA-abhängigen Proteinkinase R (PKR) durch ZEBOV bereits bekannt war, wurde untersucht, ob dies zur Hemmung der Apoptoseinduktion führt. Obwohl ZEBOV die Aktivierung von PKR sowohl in Sendai Virus (SeV)-infizierten als auch in poly-IC (pIC)-behandelten Zellen inhibierte, wurde die Induktion der Apoptose in diesen Zellen nicht unterdrückt. Die Rolle der PKR-Hemmung durch ZEBOV in der Apoptoseregulation konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, da die verwendeten Stimuli möglicherweise auch andere, von der PKR unabhängige Apoptosesignalwege aktivieren.

Viele Viren aktivieren zelluläre Überlebenssignalwege wie den PI3K/Akt-Signalweg,

um die Induktion der Apoptose zu unterbinden. In ZEBOV-infizierten Zellen konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt der Infektion eine Aktivierung von Akt nachgewiesen werden. Die fehlende Induktion von Apoptose ist demnach auch nicht durch eine Aktivierung von Überlebenssignalwegen zu erklären.

Die Überexpression des viralen Oberflächenproteins GP führte in stabil exprimierenden Zellen zur Induktion von Apoptose, welche durch eine Infektion mit ZEBOV nicht gehemmt werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass eine ausbalancierte virale Proteinexpression für die fehlende Apoptoseinduktion von Bedeutung ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Infektion mit ZEBOV nicht zur Induktion von Apoptose führt, aber auch keine Hemmung von Apoptose vorliegt. Vielmehr scheint ZEBOV die Erkennung pathogener Muster in den infizierten Zellen zu verhindern, sodass Signalwege, die der Virusabwehr dienen, nicht aktiviert werden.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der TRAIL-induzierten Apoptose	5
Abbildung 2: Mitochondrial-vermittelte Apoptose	7
Abbildung 3: Rolle der PKR in der Apoptoseregulation	9
Abbildung 4: Einfluss von Akt auf die Apoptose	11
Abbildung 5: Aufbau des EBOV-Partikel	15
Abbildung 6: Darstellung der Filovirusausbrüche	16
Abbildung 7: Aufbau eines Western Blots	44
Abbildung 8: AnnexinV-Nachweis in ZEBOV-infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels TRAIL	53
Abbildung 9: Nachweis der ZEBOV-Infektion in Vero-Zellen nach TRAIL-Behandlung ..	54
Abbildung 10: Nachweis von ZEBOV-Proteinen in infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels TRAIL	55
Abbildung 11: Nachweis von Caspase 8 im Western Blot nach ZEBOV-Infektion von Vero-Zellen und TRAIL-Behandlung	56
Abbildung 12: Nachweis von Caspase 3 im Western Blot nach ZEBOV-Infektion und TRAIL-Behandlung	56
Abbildung 13: Nachweis der ZEBOV-Infektion in HeLa-Zellen nach TRAIL-Behandlung	58
Abbildung 14: RT-PCR zur Analyse der TRAIL-mRNA-Level	58
Abbildung 15: Nachweis der ZEBOV-Infektion in Vero-Zellen mittels Immunfluoreszenz	59
Abbildung 16: Analyse der Bax- und Bcl-2-mRNA-Level mittels RT-PCR	61
Abbildung 17: Analyse der Bax- und Bcl-2-Protein-Level mittels Western Blot	62
Abbildung 18: AnnexinV-Nachweis in ZEBOV-infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels CAM	64
Abbildung 19: Nachweis von ZEBOV-Proteinen in infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels CAM	64
Abbildung 20: Nachweis der Bax- und Bcl-2-Level im Western Blot in ZEBOV-infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels CAM	65
Abbildung 21: Nachweis von Caspase 3 in ZEBOV-infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels CAM	67
Abbildung 22: Nachweis von PARP-Spaltung im Western Blot in ZEBOV-infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels CAM	67
Abbildung 23: Nachweis der ZEBOV-Infektion in HeLa-Zellen nach Induktion von Apoptose durch VSV-Infektion	69
Abbildung 24: Nachweis von ZEBOV-Proteinen in infizierten HeLa-Zellen nach Induktion von Apoptose durch VSV-Infektion	70
Abbildung 25: Nachweis von Caspase 9 und Caspase 3 in ZEBOV-infizierten HeLa-Zellen nach Induktion von Apoptose durch VSV-Infektion	71
Abbildung 26: Nachweis von Caspase 8 in ZEBOV-infizierten HeLa-Zellen nach Induktion von Apoptose durch VSV-Infektion	71
Abbildung 27: Nachweis der ZEBOV- und SeV-Infektion in Vero-Zellen	74
Abbildung 28: Nachweis von ZEBOV-Proteinen in infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose durch SeV-Infektion	74
Abbildung 29: Nachweis der PKR in ZEBOV-infizierten Vero-Zellen nach Aktivierung durch SeV-Infektion	75
Abbildung 30: Nachweis von Caspase 8 und Caspase 3 in ZEBOV-infizierten Vero-Zellen nach Induktion von Apoptose durch SeV-Infektion	76

Abbildung 31: Nachweis der ZEBOV- und SeV-Infektion in HeLa-Zellen	77
Abbildung 32: Nachweis von ZEBOV-Proteinen in infizierten HeLa-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels SeV-Infektion	78
Abbildung 33: Nachweis von PKR und eIF2α in ZEBOV-infizierten HeLa-Zellen nach SeV-Infektion	79
Abbildung 34: Nachweis von Caspase 8 und Caspase 3 in ZEBOV-infizierten HeLa-Zellen nach Induktion von Apoptose durch SeV-Infektion	79
Abbildung 35: Nachweis der ZEBOV-Infektion in HeLa-Zellen nach Transfektion von pIC	81
Abbildung 36: Nachweis von PKR in ZEBOV-infizierten HeLa-Zellen nach Aktivierung durch pIC	83
Abbildung 37: Nachweis von eIF2α in ZEBOV-infizierten HeLa-Zellen nach Transfektion von pIC	83
Abbildung 38: Nachweis von Caspasenspaltung in ZEBOV-infizierten HeLa-Zellen nach Induktion von Apoptose mittels pIC	84
Abbildung 39: Nachweis der ZEBOV-GP-GFP-Expression	85
Abbildung 40: CPE von MDCK-ZEBOV-GP-GFP und MDCKII-Zellen nach MP-Behandlung und ZEBOV-Infektion	87
Abbildung 41: Nachweis der ZEBOV-Infektion in MDCK-ZEBOV-GP-GFP und MDCKII-Zellen nach MP-Behandlung	88
Abbildung 42: Nachweis von ZEBOV-Proteinen in infizierten MDCK-ZEBOV-GP-GFP und MDCKII-Zellen nach MP-Behandlung	90
Abbildung 43: Nachweis von Caspase 3 in ZEBOV-infizierten MDCK-ZEBOV-GP-GFP und MDCKII-Zellen nach MP-Behandlung	91
Abbildung 44: Nachweis von Caspase 3 in ZEBOV-infizierten MDCKII-Zellen nach MP-Behandlung	92
Abbildung 45: Nachweis der ZEBOV-Infektion in H1299-Zellen	94
Abbildung 46: Nachweis von Akt in ZEBOV-infizierten H1299-Zellen	94

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper	28
Tabelle 2: Verwendete Primer	29
Tabelle 3: Zusammensetzung SDS-Gele	43
Tabelle 4: Antikörper für Western Blot	46
Tabelle 5: Antikörper für Immunfluoreszenz	51

7.3 Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
α	alpha
β	beta
Ad5	Adenovirus
AIF	Apoptosis inducing factor
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1 Protein
APS	Ammoniumpersulfat
Bcl-2	B cell lymphoma protein 2
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAM	Camthotecin
CARD	Caspase activation and recruitment Domain
Caspasen	Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen
cFLIP	Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme- inhibitory protein
CIEBOV	Ebolavirus Côte d'Ivoire
CPE	cytophatischer Effekt
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DISC	Death-inducing signalling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Death receptor
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EBOV	Ebolavirus
EBV	Ebstein-Barr-Virus

eIF2 α	eukaryotischer Initiationsfaktor 2 α
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EtBr	Ethidiumbromid
FADD	Fas-associated death domain protein
FCS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GP	Glycoprotein
HA	Hämagglutination
HCl	Salzsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IAPs	inhibitor of apoptosis proteins
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon α/β -Rezeptor
IRF	Interferon regulatory factor
ISGs	Interferon-stimulierte Gene
ISRE	Interferon-stimuliertes-responsives-Elementes
kb	Kilobasen
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
L	Liter
M	Molar
MARV	Marburg Virus
MeOH	Methanol
ml	Milliliter
moi	multiplicity of infection
MP	Mifepriston
NaN ₃	Natriumazid
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NF κ B	Nuclear factor κ B
nm	nanometer
NP	Nucleoprotein

PACT	PKR activating protein
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBMCs	Periphere Mononucleäre Zellen des Blutes
PDK1	PIP ₃ dependant kinase
PFA	Paraformaldehyd
PH-Domänen	Pleckstrin homology (PH) Domänen
pIC	Poly-IC
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₃	Phosphatidylinositide 3,4,5-Triphosphaten
PIV5	Parainfluenzavirus 5
PKB	protein kinase B
PKR	dsRNA-abhängige Proteinkinase R
REBOV	Ebolavirus Reston
RSS	RNA Silencing Suppressor
RSV	Respiratorisches-Syncytial-Virus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEBOV	Ebolavirus Sudan
SeV	Sendai Virus
siRNA	small interfering RNA
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	Tumor-Nekrose-Factor-related-apoptosis-inducing-ligand
TRADD	TNF-Receptor-associated Death

	Domain
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
vIAPS	viral inhibitors of apoptosis proteins
vFLIP	Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme- inhibitory protein
VP	Virales Protein
VSV	Vesiculäres-Stomatitis-Virus
ZEBOV	Ebolavirus Zaire

7.4 Literaturverzeichnis

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *Br J Cancer* 1972, **26**:239-257.
2. Assuncao Guimaraes C, Linden R: **Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles.** *Eur J Biochem* 2004, **271**:1638-1650.
3. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL: **Necrosis: a specific form of programmed cell death?** *Exp Cell Res* 2003, **283**:1-16.
4. Saini KS, Walker NI: **Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis.** *Mol Cell Biochem* 1998, **178**:9-25.
5. Raff M: **Cell suicide for beginners.** *Nature* 1998, **396**:119-122.
6. Leist M, Jaattela M: **Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**:589-598.
7. Ameisen JC: **The origin of programmed cell death.** *Science* 1996, **272**:1278-1279.
8. Kumar S: **Caspase function in programmed cell death.** *Cell Death Differ* 2007, **14**:32-43.
9. Milligan CE, Schwartz LM: **Programmed cell death during animal development.** *Br Med Bull* 1997, **53**:570-590.
10. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD: **Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system.** *Science* 1993, **262**:695-700.
11. Opferman JT: **Apoptosis in the development of the immune system.** *Cell Death Differ* 2008, **15**:234-242.
12. Feig C, Peter ME: **How apoptosis got the immune system in shape.** *Eur J Immunol* 2007, **37 Suppl 1**:S61-70.
13. Berke G: **The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects.** *Annu Rev Immunol* 1994, **12**:735-773.
14. Patel T, Gores GJ: **Apoptosis and hepatobiliary disease.** *Hepatology* 1995, **21**:1725-1741.
15. Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF: **Patterns of cell death.** *Methods Achiev Exp Pathol* 1988, **13**:18-54.
16. Horvitz HR: **Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*.** *Cancer Res* 1999, **59**:1701s-1706s.
17. Degterev A, Yuan J: **Expansion and evolution of cell death programmes.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**:378-390.
18. Degterev A, Boyce M, Yuan J: **A decade of caspases.** *Oncogene* 2003, **22**:8543-8567.
19. Green D, Kroemer G: **The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?** *Trends Cell Biol* 1998, **8**:267-271.
20. Hengartner MO: **The biochemistry of apoptosis.** *Nature* 2000, **407**:770-776.
21. Rupinder SK, Gurpreet AK, Manjeet S: **Cell suicide and caspases.** *Vascul Pharmacol* 2007, **46**:383-393.
22. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH: **Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.** *Annu Rev Biochem* 1999, **68**:383-424.
23. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR: **The machinery of programmed cell death.** *Pharmacol Ther* 2001, **92**:57-70.

24. Chen M, Orozco A, Spencer DM, Wang J: **Activation of initiator caspases through a stable dimeric intermediate.** *J Biol Chem* 2002, **277**:50761-50767.
25. Sprick MR, Walczak H: **The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1644**:125-132.
26. Siegel RM: **Caspases at the crossroads of immune-cell life and death.** *Nat Rev Immunol* 2006, **6**:308-317.
27. Mariathasan S, Monack DM: **Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation.** *Nat Rev Immunol* 2007, **7**:31-40.
28. Borner C, Monney L: **Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine?** *Cell Death Differ* 1999, **6**:497-507.
29. Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G: **Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis.** *FEBS Lett* 2000, **476**:118-123.
30. Henson PM, Bratton DL, Fadok VA: **Apoptotic cell removal.** *Curr Biol* 2001, **11**:R795-805.
31. Kimberley FC, Screaton GR: **Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors.** *Cell Res* 2004, **14**:359-372.
32. Wang S, El-Deiry WS: **TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors.** *Oncogene* 2003, **22**:8628-8633.
33. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A: **Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family.** *J Biol Chem* 1996, **271**:12687-12690.
34. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, et al.: **Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.** *Immunity* 1995, **3**:673-682.
35. Ashkenazi A, Dixit VM: **Death receptors: signaling and modulation.** *Science* 1998, **281**:1305-1308.
36. Gaur U, Aggarwal BB: **Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily.** *Biochem Pharmacol* 2003, **66**:1403-1408.
37. Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, Zeng Q, Mookerjee B, Gelinas C, Fuchs EJ, Bedi A: **Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**:409-416.
38. Safa AR, Day TW, Wu CH: **Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy.** *Curr Cancer Drug Targets* 2008, **8**:37-46.
39. Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ: **Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death.** *J Biol Chem* 1999, **274**:1156-1163.
40. Riedl SJ, Shi Y: **Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**:897-907.
41. Yin XM: **Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways.** *Cell Res* 2000, **10**:161-167.
42. Jeong SY, Seol DW: **The role of mitochondria in apoptosis.** *BMB Rep* 2008, **41**:11-22.

43. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM: **Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma.** *Science* 1985, **228**:1440-1443.
44. Burlacu A: **Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins.** *J Cell Mol Med* 2003, **7**:249-257.
45. Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Bertrand R: **DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis.** *J Zhejiang Univ Sci B* 2007, **8**:377-397.
46. Leber B, Lin J, Andrews DW: **Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes.** *Apoptosis* 2007, **12**:897-911.
47. Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ: **Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1644**:107-113.
48. Krajewski S, Bodrug S, Gascoyne R, Berean K, Krajewska M, Reed JC: **Immunohistochemical analysis of Mcl-1 and Bcl-2 proteins in normal and neoplastic lymph nodes.** *Am J Pathol* 1994, **145**:515-525.
49. Appel E, Katzoff A, Ben-Moshe T, Kazimirsky G, Kobilier D, Lustig S, Brodie C: **Differential regulation of Bcl-2 and Bax expression in cells infected with virulent and nonvirulent strains of sindbis virus.** *Virology* 2000, **276**:238-242.
50. Liebermann DA, Hoffman B, Vesely D: **p53 induced growth arrest versus apoptosis and its modulation by survival cytokines.** *Cell Cycle* 2007, **6**:166-170.
51. Puthalakath H, Strasser A: **Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins.** *Cell Death Differ* 2002, **9**:505-512.
52. Sordet O, Khan QA, Kohn KW, Pommier Y: **Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors.** *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003, **3**:271-290.
53. Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA: **Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL.** *J Exp Med* 1999, **189**:1343-1354.
54. Rodriguez J, Lazebnik Y: **Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme.** *Genes Dev* 1999, **13**:3179-3184.
55. Randall RE, Goodbourn S: **Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures.** *J Gen Virol* 2008, **89**:1-47.
56. Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, Borden EC: **Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis.** *Apoptosis* 2003, **8**:237-249.
57. Haller O, Kochs G, Weber F: **The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses.** *Virology* 2006, **344**:119-130.
58. Gil J, Esteban M: **Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action.** *Apoptosis* 2000, **5**:107-114.
59. Garcia MA, Meurs EF, Esteban M: **The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control.** *Biochimie* 2007, **89**:799-811.
60. Zhang P, Samuel CE: **Protein kinase PKR plays a stimulus- and virus-dependent role in apoptotic death and virus multiplication in human cells.** *J Virol* 2007, **81**:8192-8200.
61. Saelens X, Kalai M, Vandenabeele P: **Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2-alpha phosphorylation.** *J Biol Chem* 2001, **276**:41620-41628.

-
62. Lee ES, Yoon CH, Kim YS, Bae YS: **The double-strand RNA-dependent protein kinase PKR plays a significant role in a sustained ER stress-induced apoptosis.** *FEBS Lett* 2007, **581**:4325-4332.
 63. Iordanov MS, Kirsch JD, Ryabinina OP, Wong J, Spitz PN, Korcheva VB, Thorburn A, Magun BE: **Recruitment of TRADD, FADD, and caspase 8 to double-stranded RNA-triggered death inducing signaling complexes (dsRNA-DISCs).** *Apoptosis* 2005, **10**:167-176.
 64. Balachandran S, Kim CN, Yeh WC, Mak TW, Bhalla K, Barber GN: **Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling.** *Embo J* 1998, **17**:6888-6902.
 65. Gil J, Garcia MA, Esteban M: **Caspase 9 activation by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR: molecular mechanism and relevance.** *FEBS Lett* 2002, **529**:249-255.
 66. Amaravadi R, Thompson CB: **The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets.** *J Clin Invest* 2005, **115**:2618-2624.
 67. Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR: **Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation.** *Biochem J* 1998, **335 (Pt 1)**:1-13.
 68. Vanhaesebroeck B, Alessi DR: **The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB.** *Biochem J* 2000, **346 Pt 3**:561-576.
 69. Cooray S: **The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival.** *J Gen Virol* 2004, **85**:1065-1076.
 70. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC: **Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation.** *Science* 1998, **282**:1318-1321.
 71. Fujita E, Jinbo A, Matuzaki H, Konishi H, Kikkawa U, Momoi T: **Akt phosphorylation site found in human caspase-9 is absent in mouse caspase-9.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **264**:550-555.
 72. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME: **Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.** *Cell* 1999, **96**:857-868.
 73. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE: **Viruses and apoptosis.** *Annu Rev Microbiol* 1999, **53**:577-628.
 74. Barber GN: **Host defense, viruses and apoptosis.** *Cell Death Differ* 2001, **8**:113-126.
 75. Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Berberich-Siebelt F, Wolff T, Walczak H, Planz O, Ludwig S: **NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation.** *J Biol Chem* 2004, **279**:30931-30937.
 76. Wang HW, Sharp TV, Koumi A, Koentges G, Boshoff C: **Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus which resembles a spliced variant of human survivin.** *Embo J* 2002, **21**:2602-2615.
 77. Hay S, Kannourakis G: **A time to kill: viral manipulation of the cell death program.** *J Gen Virol* 2002, **83**:1547-1564.
 78. Cunnion KM: **Tumor necrosis factor receptors encoded by poxviruses.** *Mol Genet Metab* 1999, **67**:278-282.
 79. Hardwick JM, Bellows DS: **Viral versus cellular BCL-2 proteins.** *Cell Death Differ* 2003, **10 Suppl 1**:S68-76.

80. Zhang M, Li X, Pang X, Ding L, Wood O, Clouse KA, Hewlett I, Dayton AI: **Bcl-2 upregulation by HIV-1 Tat during infection of primary human macrophages in culture.** *J Biomed Sci* 2002, **9**:133-139.
81. Ehrhardt C, Wolff T, Pleschka S, Planz O, Beermann W, Bode JG, Schmolke M, Ludwig S: **Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses.** *J Virol* 2007, **81**:3058-3067.
82. Groskreutz DJ, Monick MM, Yarovinsky TO, Powers LS, Quelle DE, Varga SM, Look DC, Hunninghake GW: **Respiratory syncytial virus decreases p53 protein to prolong survival of airway epithelial cells.** *J Immunol* 2007, **179**:2741-2747.
83. Lee CJ, Liao CL, Lin YL: **Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection.** *J Virol* 2005, **79**:8388-8399.
84. Garnett TO, Duerksen-Hughes PJ: **Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins.** *Arch Virol* 2006, **151**:2321-2335.
85. Khan AS, Sanchez A, Pflieger AK: **Filoviral haemorrhagic fevers.** *Br Med Bull* 1998, **54**:675-692.
86. Feldmann H, Klenk HD, Sanchez A: **Molecular biology and evolution of filoviruses.** *Arch Virol Suppl* 1993, **7**:81-100.
87. Feldmann H, Jones S, Klenk HD, Schnittler HJ: **Ebola virus: from discovery to vaccine.** *Nat Rev Immunol* 2003, **3**:677-685.
88. Sullivan N, Yang ZY, Nabel GJ: **Ebola virus pathogenesis: implications for vaccines and therapies.** *J Virol* 2003, **77**:9733-9737.
89. Groseth A, Feldmann H, Strong JE: **The ecology of Ebola virus.** *Trends Microbiol* 2007, **15**:408-416.
90. Hartlieb B, Weissenhorn W: **Filovirus assembly and budding.** *Virology* 2006, **344**:64-70.
91. Hoenen T, Groseth A, Falzarano D, Feldmann H: **Ebola virus: unravelling pathogenesis to combat a deadly disease.** *Trends Mol Med* 2006, **12**:206-215.
92. Muhlberger E, Weik M, Volchkov VE, Klenk HD, Becker S: **Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems.** *J Virol* 1999, **73**:2333-2342.
93. Weik M, Modrof J, Klenk HD, Becker S, Muhlberger E: **Ebola virus VP30-mediated transcription is regulated by RNA secondary structure formation.** *J Virol* 2002, **76**:8532-8539.
94. Hartlieb B, Modrof J, Muhlberger E, Klenk HD, Becker S: **Oligomerization of Ebola virus VP30 is essential for viral transcription and can be inhibited by a synthetic peptide.** *J Biol Chem* 2003, **278**:41830-41836.
95. John SP, Wang T, Steffen S, Longhi S, Schmaljohn CS, Jonsson CB: **Ebola virus VP30 is an RNA binding protein.** *J Virol* 2007, **81**:8967-8976.
96. Marzi A, Moller P, Hanna SL, Harrer T, Eisemann J, Steinkasserer A, Becker S, Baribaud F, Pohlmann S: **Analysis of the interaction of Ebola virus glycoprotein with DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) and its homologue DC-SIGNR.** *J Infect Dis* 2007, **196 Suppl 2**:S237-246.
97. Takada A, Fujioka K, Tsuiji M, Morikawa A, Higashi N, Ebihara H, Kobasa D, Feldmann H, Irimura T, Kawaoka Y: **Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry.** *J Virol* 2004, **78**:2943-2947.

98. Simmons G, Reeves JD, Grogan CC, Vandenberghe LH, Baribaud F, Whitbeck JC, Burke E, Buchmeier MJ, Soilleux EJ, Riley JL, et al: **DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells.** *Virology* 2003, **305**:115-123.
99. Mohamadzadeh M, Chen L, Schmaljohn AL: **How Ebola and Marburg viruses battle the immune system.** *Nat Rev Immunol* 2007, **7**:556-567.
100. Shimojima M, Ikeda Y, Kawaoka Y: **The mechanism of Axl-mediated Ebola virus infection.** *J Infect Dis* 2007, **196 Suppl 2**:S259-263.
101. Shimojima M, Takada A, Ebihara H, Neumann G, Fujioka K, Irimura T, Jones S, Feldmann H, Kawaoka Y: **Tyrosinase-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses.** *J Virol* 2006, **80**:10109-10116.
102. Morikawa S, Saijo M, Kurane I: **Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus (in French: Connaissances actuelles sur la moindre virulence du virus Ebola Reston).** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2007, **30**:391-398.
103. Mahanty S, Bray M: **Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers.** *Lancet Infect Dis* 2004, **4**:487-498.
104. Schlenz K: **Untersuchungen zur Struktur des Replikationspromotors des Ebola Virus.** *Diplomarbeit.* Philipps-Universität Marburg, 2002.
105. Geisbert TW, Hensley LE, Gibb TR, Steele KE, Jaax NK, Jahrling PB: **Apoptosis induced in vitro and in vivo during infection by Ebola and Marburg viruses.** *Lab Invest* 2000, **80**:171-186.
106. Geisbert TW, Hensley LE, Larsen T, Young HA, Reed DS, Geisbert JB, Scott DP, Kagan E, Jahrling PB, Davis KJ: **Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection.** *Am J Pathol* 2003, **163**:2347-2370.
107. Hensley LE, Young HA, Jahrling PB, Geisbert TW: **Proinflammatory response during Ebola virus infection of primate models: possible involvement of the tumor necrosis factor receptor superfamily.** *Immunol Lett* 2002, **80**:169-179.
108. Bermejo M, Rodriguez-Teijeiro JD, Illera G, Barroso A, Vila C, Walsh PD: **Ebola outbreak killed 5000 gorillas.** *Science* 2006, **314**:1564.
109. Walsh PD, Biek R, Real LA: **Wave-like spread of Ebola Zaire.** *PLoS Biol* 2005, **3**:e371.
110. Kerstiens B, Matthys F: **Interventions to control virus transmission during an outbreak of Ebola hemorrhagic fever: experience from Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995.** *J Infect Dis* 1999, **179 Suppl 1**:S263-267.
111. Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, Delicat A, Paweska JT, Gonzalez JP, Swanepoel R: **Fruit bats as reservoirs of Ebola virus.** *Nature* 2005, **438**:575-576.
112. Gonzalez JP, Pourrut X, Leroy E: **Ebolavirus and other filoviruses.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2007, **315**:363-387.
113. Wong S, Lau S, Woo P, Yuen KY: **Bats as a continuing source of emerging infections in humans.** *Rev Med Virol* 2007, **17**:67-91.
114. Reed DS, Mohamadzadeh M: **Status and challenges of filovirus vaccines.** *Vaccine* 2007, **25**:1923-1934.
115. Sullivan NJ, Sanchez A, Rollin PE, Yang ZY, Nabel GJ: **Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates.** *Nature* 2000, **408**:605-609.

116. Sullivan NJ, Geisbert TW, Geisbert JB, Xu L, Yang ZY, Roederer M, Koup RA, Jahrling PB, Nabel GJ: **Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates.** *Nature* 2003, **424**:681-684.
117. Jones SM, Feldmann H, Stroher U, Geisbert JB, Fernando L, Grolla A, Klenk HD, Sullivan NJ, Volchkov VE, Fritz EA, et al: **Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses.** *Nat Med* 2005, **11**:786-790.
118. Harcourt BH, Sanchez A, Offermann MK: **Ebola virus selectively inhibits responses to interferons, but not to interleukin-1beta, in endothelial cells.** *J Virol* 1999, **73**:3491-3496.
119. Harcourt BH, Sanchez A, Offermann MK: **Ebola virus inhibits induction of genes by double-stranded RNA in endothelial cells.** *Virology* 1998, **252**:179-188.
120. Kash JC, Muhlberger E, Carter V, Grosch M, Perwitasari O, Proll SC, Thomas MJ, Weber F, Klenk HD, Katze MG: **Global suppression of the host antiviral response by Ebola- and Marburgviruses: increased antagonism of the type I interferon response is associated with enhanced virulence.** *J Virol* 2006, **80**:3009-3020.
121. Basler CF, Wang X, Muhlberger E, Volchkov V, Paragas J, Klenk HD, Garcia-Sastre A, Palese P: **The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:12289-12294.
122. Basler CF, Mikulasova A, Martinez-Sobrido L, Paragas J, Muhlberger E, Bray M, Klenk HD, Palese P, Garcia-Sastre A: **The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3.** *J Virol* 2003, **77**:7945-7956.
123. Cardenas WB, Loo YM, Gale M, Jr., Hartman AL, Kimberlin CR, Martinez-Sobrido L, Saphire EO, Basler CF: **Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling.** *J Virol* 2006, **80**:5168-5178.
124. Krähling V: **Wechselwirkungen des Typ1-Interferon-Systems mit SARS-Coronavirus.** Philipps-Universität Marburg, Institut für Virologie; 2004.
125. Feng Z, Cervený M, Yan Z, He B: **The VP35 protein of Ebola virus inhibits the antiviral effect mediated by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR.** *J Virol* 2007, **81**:182-192.
126. Reid SP, Leung LW, Hartman AL, Martinez O, Shaw ML, Carbonnelle C, Volchkov VE, Nichol ST, Basler CF: **Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation.** *J Virol* 2006, **80**:5156-5167.
127. Reid SP, Valmas C, Martinez O, Sanchez FM, Basler CF: **Ebola virus VP24 proteins inhibit the interaction of NPI-1 subfamily karyopherin alpha proteins with activated STAT1.** *J Virol* 2007, **81**:13469-13477.
128. Bradfute SB, Warfield KL, Bavari S: **Functional CD8+ T cell responses in lethal Ebola virus infection.** *J Immunol* 2008, **180**:4058-4066.
129. Gupta M, Spiropoulou C, Rollin PE: **Ebola virus infection of human PBMCs causes massive death of macrophages, CD4 and CD8 T cell subpopulations in vitro.** *Virology* 2007, **364**:45-54.
130. Baize S, Leroy EM, Mavoungou E, Fisher-Hoch SP: **Apoptosis in fatal Ebola infection. Does the virus toll the bell for immune system?** *Apoptosis* 2000, **5**:5-7.
131. Baize S, Leroy EM, Georges-Courbot MC, Capron M, Lansoud-Soukate J, Debre P, Fisher-Hoch SP, McCormick JB, Georges AJ: **Defective humoral**

-
- responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nat Med* 1999, **5**:423-426.
132. Bray M, Geisbert TW: **Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever.** *Int J Biochem Cell Biol* 2005, **37**:1560-1566.
133. Reed DS, Hensley LE, Geisbert JB, Jahrling PB, Geisbert TW: **Depletion of peripheral blood T lymphocytes and NK cells during the course of ebola hemorrhagic Fever in cynomolgus macaques.** *Viral Immunol* 2004, **17**:390-400.
134. Küsters J: **Untersuchungen zur Apoptose in mit Ebola- und SARS-Coronavirus-infizierten Zellen.** *Diplomarbeit.* Philipps-Universität Marburg, Institut für Virologie 2004.
135. Geisbert TW, Hensley LE: **Ebola virus: new insights into disease aetiopathology and possible therapeutic interventions.** *Expert Rev Mol Med* 2004, **6**:1-24.
136. Ray RB, Basu A, Steele R, Beyene A, McHowat J, Meyer K, Ghosh AK, Ray R: **Ebola virus glycoprotein-mediated anoikis of primary human cardiac microvascular endothelial cells.** *Virology* 2004, **321**:181-188.
137. Feldmann H, Volchkov VE, Volchkova VA, Klenk HD: **The glycoproteins of Marburg and Ebola virus and their potential roles in pathogenesis.** *Arch Virol Suppl* 1999, **15**:159-169.
138. Simmons G, Wool-Lewis RJ, Baribaud F, Netter RC, Bates P: **Ebola virus glycoproteins induce global surface protein down-modulation and loss of cell adherence.** *J Virol* 2002, **76**:2518-2528.
139. Hierholzer JC, and R. A. Killington.: **Virus isolation and quantitation.** In *Virology methods manual.* Edited by Kangro BWMaHO. London, United Kingdom: Academic Press Limited; 1996: 36–38
140. Gadaleta P, Vacotto M, Coulombie F: **Vesicular stomatitis virus induces apoptosis at early stages in the viral cycle and does not depend on virus replication.** *Virus Res* 2002, **86**:87-92.
141. Emeny JM, Morgan MJ: **Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production.** *J Gen Virol* 1979, **43**:247-252.
142. Bitzer M, Armeanu S, Prinz F, Ungerechts G, Wybranietz W, Spiegel M, Bernlohr C, Cecconi F, Gregor M, Neubert WJ, et al: **Caspase-8 and Apaf-1-independent caspase-9 activation in Sendai virus-infected cells.** *J Biol Chem* 2002, **277**:29817-29824.
143. Peters K, Chattopadhyay S, Sen GC: **IRF-3 activation by Sendai virus infection is required for cellular apoptosis and avoidance of persistence.** *J Virol* 2008, **82**:3500-3508.
144. Thomas KW, Monick MM, Staber JM, Yarovinsky T, Carter AB, Hunninghake GW: **Respiratory syncytial virus inhibits apoptosis and induces NF-kappa B activity through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway.** *J Biol Chem* 2002, **277**:492-501.
145. Zhirnov OP, Klenk HD: **Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling.** *Apoptosis* 2007, **12**:1419-1432.
146. Schumann M, Dobbelsstein M: **Adenovirus-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylation during the late phase of infection enhances viral protein levels and virus progeny.** *Cancer Res* 2006, **66**:1282-1288.
-

147. Kopecky SA, Lyles DS: **Contrasting effects of matrix protein on apoptosis in HeLa and BHK cells infected with vesicular stomatitis virus are due to inhibition of host gene expression.** *J Virol* 2003, **77**:4658-4669.
148. Huang H, Joazeiro CA, Bonfoco E, Kamada S, Levenson JD, Hunter T: **The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7.** *J Biol Chem* 2000, **275**:26661-26664.
149. Li FY, Jeffrey PD, Yu JW, Shi Y: **Crystal structure of a viral FLIP: insights into FLIP-mediated inhibition of death receptor signaling.** *J Biol Chem* 2006, **281**:2960-2968.
150. Glykofrydes D, Niphuis H, Kuhn EM, Rosenwirth B, Heeney JL, Bruder J, Niedobitek G, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Ensser A: **Herpesvirus saimiri vFLIP provides an antiapoptotic function but is not essential for viral replication, transformation, or pathogenicity.** *J Virol* 2000, **74**:11919-11927.
151. Schneider-Brachert W, Tchikov V, Merkel O, Jakob M, Hallas C, Kruse ML, Groitl P, Lehn A, Hildt E, Held-Feindt J, et al: **Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism.** *J Clin Invest* 2006, **116**:2901-2913.
152. Lagunoff M, Carroll PA: **Inhibition of apoptosis by the gamma-herpesviruses.** *Int Rev Immunol* 2003, **22**:373-399.
153. Swingler S, Mann AM, Zhou J, Swingler C, Stevenson M: **Apoptotic killing of HIV-1-infected macrophages is subverted by the viral envelope glycoprotein.** *PLoS Pathog* 2007, **3**:1281-1290.
154. White E: **Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection and tumorigenesis.** *Cell Death Differ* 2006, **13**:1371-1377.
155. Berk AJ: **Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus.** *Oncogene* 2005, **24**:7673-7685.
156. Wang Z, Morris GF, Reed JC, Kelly GD, Morris CB: **Activation of Bcl-2 promoter-directed gene expression by the human immunodeficiency virus type-1 Tat protein.** *Virology* 1999, **257**:502-510.
157. Zachos G, Koffa M, Preston CM, Clements JB, Conner J: **Herpes simplex virus type 1 blocks the apoptotic host cell defense mechanisms that target Bcl-2 and manipulates activation of p38 mitogen-activated protein kinase to improve viral replication.** *J Virol* 2001, **75**:2710-2728.
158. Wadkins RM, Bearss D, Manikumar G, Wani MC, Wall ME, Von Hoff DD: **Topoisomerase I-DNA complex stability induced by camptothecins and its role in drug activity.** *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2004, **4**:327-334.
159. Oizumi S, Isobe H, Ogura S, Ishida T, Yamazaki K, Nishimura M, Kawakami Y, Dosaka-Akita H: **Topoisomerase inhibitor-induced apoptosis accompanied by down-regulation of Bcl-2 in human lung cancer cells.** *Anticancer Res* 2002, **22**:4029-4037.
160. Koyama AH: **Induction of apoptotic DNA fragmentation by the infection of vesicular stomatitis virus.** *Virus Res* 1995, **37**:285-290.
161. Kopecky SA, Willingham MC, Lyles DS: **Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus.** *J Virol* 2001, **75**:12169-12181.
162. Gaddy DF, Lyles DS: **Vesicular stomatitis viruses expressing wild-type or mutant M proteins activate apoptosis through distinct pathways.** *J Virol* 2005, **79**:4170-4179.

-
163. Gaddy DF, Lyles DS: **Oncolytic vesicular stomatitis virus induces apoptosis via signaling through PKR, Fas, and Daxx.** *J Virol* 2007, **81**:2792-2804.
 164. Weber F, Wagner V, Rasmussen SB, Hartmann R, Paludan SR: **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* 2006, **80**:5059-5064.
 165. Gale M, Jr., Kwieciszewski B, Dossett M, Nakao H, Katze MG: **Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase.** *J Virol* 1999, **73**:6506-6516.
 166. Garcia MA, Guerra S, Gil J, Jimenez V, Esteban M: **Anti-apoptotic and oncogenic properties of the dsRNA-binding protein of vaccinia virus, E3L.** *Oncogene* 2002, **21**:8379-8387.
 167. Zhang P, Jacobs BL, Samuel CE: **Loss of protein kinase PKR expression in human HeLa cells complements the vaccinia virus E3L deletion mutant phenotype by restoration of viral protein synthesis.** *J Virol* 2008, **82**:840-848.
 168. Bitzer M, Prinz F, Bauer M, Spiegel M, Neubert WJ, Gregor M, Schulze-Osthoff K, Lauer U: **Sendai virus infection induces apoptosis through activation of caspase-8 (FLICE) and caspase-3 (CPP32).** *J Virol* 1999, **73**:702-708.
 169. Heylbroeck C, Balachandran S, Servant MJ, DeLuca C, Barber GN, Lin R, Hiscott J: **The IRF-3 transcription factor mediates Sendai virus-induced apoptosis.** *J Virol* 2000, **74**:3781-3792.
 170. Kirshner JR, Karpova AY, Kops M, Howley PM: **Identification of TRAIL as an interferon regulatory factor 3 transcriptional target.** *J Virol* 2005, **79**:9320-9324.
 171. Iordanov MS, Ryabinina OP, Schneider P, Magun BE: **Two mechanisms of caspase 9 processing in double-stranded RNA- and virus-triggered apoptosis.** *Apoptosis* 2005, **10**:153-166.
 172. Mori K, Yoshida K, Tani J, Nakagawa Y, Hoshikawa S, Ito S: **Double-stranded RNA-induced interferon regulatory factor-1 gene expression in FRTL-5 rat thyroid cells.** *Mol Cell Endocrinol* 2001, **184**:77-86.
 173. Rasschaert J, Ladriere L, Urbain M, Dogusan Z, Katabua B, Sato S, Akira S, Gysemans C, Mathieu C, Eizirik DL: **Toll-like receptor 3 and STAT-1 contribute to double-stranded RNA+ interferon-gamma-induced apoptosis in primary pancreatic beta-cells.** *J Biol Chem* 2005, **280**:33984-33991.
 174. Schmitz F, Heit A, Guggemoos S, Krug A, Mages J, Schiemann M, Adler H, Drexler I, Haas T, Lang R, Wagner H: **Interferon-regulatory-factor 1 controls Toll-like receptor 9-mediated IFN-beta production in myeloid dendritic cells.** *Eur J Immunol* 2007, **37**:315-327.
 175. Tomlinson CC, Damania B: **The K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus activates the Akt signaling pathway.** *J Virol* 2004, **78**:1918-1927.
 176. Jeong SJ, Dasgupta A, Jung KJ, Um JH, Burke A, Park HU, Brady JN: **PI3K/AKT inhibition induces caspase-dependent apoptosis in HTLV-1-transformed cells.** *Virology* 2008, **370**:264-272.

-
177. Zhang B, Spandau DF, Roman A: **E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis.** *J Virol* 2002, **76**:220-231.
 178. Dawson CW, Tramountanis G, Eliopoulos AG, Young LS: **Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling.** *J Biol Chem* 2003, **278**:3694-3704.
 179. Guo H, Zhou T, Jiang D, Cuconati A, Xiao GH, Block TM, Guo JT: **Regulation of hepatitis B virus replication by the phosphatidylinositol 3-kinase-akt signal transduction pathway.** *J Virol* 2007, **81**:10072-10080.
 180. Autret A, Martin-Latil S, Brisac C, Mousson L, Colbere-Garapin F, Blondel B: **Early phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway activation limits poliovirus-induced JNK-mediated cell death.** *J Virol* 2008, **82**:3796-3802.
 181. Cooray S, Jin L, Best JM: **The involvement of survival signaling pathways in rubella-virus induced apoptosis.** *Virol J* 2005, **2**:1.
 182. Rahaus M, Desloges N, Wolff MH: **Varicella-zoster virus requires a functional PI3K/Akt/GSK-3alpha/beta signaling cascade for efficient replication.** *Cell Signal* 2007, **19**:312-320.
 183. Deregibus MC, Cantaluppi V, Doublier S, Brizzi MF, Deambrosis I, Albin A, Camussi G: **HIV-1-Tat protein activates phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent survival pathways in Kaposi's sarcoma cells.** *J Biol Chem* 2002, **277**:25195-25202.
 184. Ehrhardt C, Marjuki H, Wolff T, Nurnberg B, Planz O, Pleschka S, Ludwig S: **Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence.** *Cell Microbiol* 2006, **8**:1336-1348.
 185. Zhang HM, Yuan J, Cheung P, Luo H, Yanagawa B, Chau D, Stephan-Tozy N, Wong BW, Zhang J, Wilson JE, et al: **Overexpression of interferon-gamma-inducible GTPase inhibits coxsackievirus B3-induced apoptosis through the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and inhibition of viral replication.** *J Biol Chem* 2003, **278**:33011-33019.
 186. Shin YK, Liu Q, Tikoo SK, Babiuk LA, Zhou Y: **Effect of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on influenza A virus propagation.** *J Gen Virol* 2007, **88**:942-950.
 187. Sun M, Fuentes SM, Timani K, Sun D, Murphy C, Lin Y, August A, Teng MN, He B: **Akt plays a critical role in replication of nonsegmented negative-stranded RNA viruses.** *J Virol* 2008, **82**:105-114.
 188. Das SC, Pattnaik AK: **Phosphorylation of vesicular stomatitis virus phosphoprotein P is indispensable for virus growth.** *J Virol* 2004, **78**:6420-6430.
 189. Bradfute SB, Braun DR, Shamblin JD, Geisbert JB, Paragas J, Garrison A, Hensley LE, Geisbert TW: **Lymphocyte death in a mouse model of Ebola virus infection.** *J Infect Dis* 2007, **196 Suppl 2**:S296-304.
 190. Bray M: **Pathogenesis of viral hemorrhagic fever.** *Curr Opin Immunol* 2005, **17**:399-403.
 191. Roe MF, Bloxham DM, White DK, Ross-Russell RI, Tasker RT, O'Donnell DR: **Lymphocyte apoptosis in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis.** *Clin Exp Immunol* 2004, **137**:139-145.
 192. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Karl IE: **Role of apoptotic cell death in sepsis.** *Scand J Infect Dis* 2003, **35**:585-592.

-
193. Alimonti JB, Ball TB, Fowke KR: **Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS.** *J Gen Virol* 2003, **84**:1649-1661.
 194. Hurtrel B, Petit F, Arnoult D, Muller-Trutwin M, Silvestri G, Estaquier J: **Apoptosis in SIV infection.** *Cell Death Differ* 2005, **12 Suppl 1**:979-990.
 195. Okada H, Kobune F, Sato TA, Kohama T, Takeuchi Y, Abe T, Takayama N, Tsuchiya T, Tashiro M: **Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients.** *Arch Virol* 2000, **145**:905-920.
 196. Muthumani K, Choo AY, Premkumar A, Hwang DS, Thieu KP, Desai BM, Weiner DB: **Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr-regulated cell death: insights into mechanism.** *Cell Death Differ* 2005, **12 Suppl 1**:962-970.
 197. Ahr B, Robert-Hebmann V, Devaux C, Biard-Piechaczyk M: **Apoptosis of uninfected cells induced by HIV envelope glycoproteins.** *Retrovirology* 2004, **1**:12.
 198. Volchkov VE, Volchkova VA, Slenczka W, Klenk HD, Feldmann H: **Release of viral glycoproteins during Ebola virus infection.** *Virology* 1998, **245**:110-119.
 199. Volchkov VE, Volchkova VA, Muhlberger E, Kolesnikova LV, Weik M, Dolnik O, Klenk HD: **Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity.** *Science* 2001, **291**:1965-1969.
 200. Miura Y, Koyanagi Y: **Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection.** *Rev Med Virol* 2005, **15**:169-178.
 201. Badley AD, Dockrell DH, Algeciras A, Ziesmer S, Landay A, Lederman MM, Connick E, Kessler H, Kuritzkes D, Lynch DH, et al: **In vivo analysis of Fas/FasL interactions in HIV-infected patients.** *J Clin Invest* 1998, **102**:79-87.
 202. Gong B, Almasan A: **Genomic organization and transcriptional regulation of human Apo2/TRAIL gene.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **278**:747-752.
 203. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Eto H, Okumura K, Yagita H: **Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs.** *J Exp Med* 1999, **189**:1451-1460.
 204. Herbeuval JP, Boasso A, Grivel JC, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Chougnnet C, Lifson JD, Shearer GM: **TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells.** *Blood* 2005, **105**:2458-2464.
 205. Neu B, Rad R, Reindl W, Neuhofer M, Gerhard M, Schepp W, Prinz C: **Expression of tumor necrosis factor- alpha -related apoptosis-inducing ligand and its proapoptotic receptors is down-regulated during gastric infection with virulent cagA+/vacAs1+ Helicobacter pylori strains.** *J Infect Dis* 2005, **191**:571-578.
 206. Unterholzner L, Bowie AG: **The interplay between viruses and innate immune signaling: recent insights and therapeutic opportunities.** *Biochem Pharmacol* 2008, **75**:589-602.
 207. Saito T, Gale M, Jr.: **Principles of intracellular viral recognition.** *Curr Opin Immunol* 2007, **19**:17-23.
-

208. Habjan M, Andersson I, Klingstrom J, Schumann M, Martin A, Zimmermann P, Wagner V, Pichlmair A, Schneider U, Muhlberger E, et al: **Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction.** *PLoS ONE* 2008, **3**:e2032.
209. Haasnoot J, de Vries W, Geutjes EJ, Prins M, de Haan P, Berkhout B: **The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing.** *PLoS Pathog* 2007, **3**:e86.

7.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Judith Olejnik (geb. Küsters)
Anschrift: Alter Kirchhainer Weg 5
35039 Marburg
Geburtsdatum: 04.03.1980
Geburtsort: Moers
Familienstand: verheiratet

Schulische Ausbildung

1986 – 1990 Adolf-Reichwein-Grundschule, Moers
1990 – 1999 Gymnasium in den Filder Benden, Moers
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 2,1)

Wissenschaftliche Ausbildung

Oktober 1999 – September 2001 Grundstudium Studiengang Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Abschluss: Vordiplom (Note 2,8)
Oktober 2001 – August 2004 Hauptstudium Studiengang Biologie, Philipps-Universität Marburg, Abschluss: Diplom (Note 1,2)
Prüfungsfächer: Virologie, Genetik, Entwicklungsbiologie
November 2003 – August 2004 Diplomarbeit : Untersuchungen zur Apoptose in mit Ebola- und SARS-Coronavirus-infizierten Zellen
Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg,
Betreuer: PD Dr. Elke Mühlberger
Seit November 2004 Doktorarbeit: Regulation von Apoptose in Ebolavirus-infizierten Zellen, Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg, Betreuer: PD Dr. Elke Mühlberger und Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Wissenschaftliche Weiterbildung

August 2002 – Oktober 2002 Studentische Hilfskraft, Institut für Entwicklungsbiologie,
Philipps-Universität Marburg, Betreuer: Prof. Dr. Renate
Renkawitz-Pohl

Mai 2003 – Juli 2003 Studentische Hilfskraft, Institut für Virologie, Philipps-
Universität Marburg, Betreuer: PD Dr. Elke Mühlberger

Seit Oktober 2005 Training und praktische Erfahrung im BSL-4-Labor,
Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg

Stipendien

Seit 2005 Doktorandenstipendium der Jürgen-Manchot-Stiftung

Juni 2006 Reisekostenstipendium der Glaxo-Smith-Kline-Stiftung
für die „XIIIth International Conference on Negative
Strand Viruses“, Juni 2006, Salamanca (Spanien)

7.6 Veröffentlichungen und Präsentationen

Vorträge

- **Regulation of apoptosis in Ebolavirus-infected cells**, Küsters, J. and Mühlberger E., Workshop des Arbeitskreises "Immunbiologie von Virusinfektionen" der Gesellschaft für Virologie 2005, September 2005, Zeilitzheim, Deutschland
- **Activation of dsRNA-dependent protein kinase and induction of apoptosis in SARS-Coronavirus-infected cells**, Krähling, V., Küsters, J., Mühlberger E., Third European Congress of Virology, September 2007, Nürnberg, Deutschland
- **Regulation von Apoptose durch Ebolavirus**, Küsters, J. und Mühlberger E., Projektvorstellung bei der „Jürgen-Manchot-Stiftung“, Januar 2008, Düsseldorf, Deutschland
- **Absence of apoptosis in Ebolavirus-infected cells is not based on activation of cellular survival signalling**, Küsters, J., Grosch, M., Mühlberger E., Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2008, März 2008, Heidelberg, Deutschland
- **Regulation of apoptosis in Ebolavirus-infected cells**, Küsters, J. and Mühlberger E., Interne Seminarreihe des SFB 535, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Mai 2008, Gießen, Deutschland

Posterpräsentationen

- **Analysis of apoptosis in Ebolavirus- and SARS-Coronavirus infected cells**, Küsters, J. and Mühlberger E., Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2005, März 2005, Hannover, Deutschland
- **Inhibition of TRAIL-mediated apoptosis in Ebolavirus-infected cells**, Küsters, J. and Mühlberger E., Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2006, März 2006, München, Deutschland

- **Inhibition of TRAIL-mediated apoptosis in Ebolavirus-infected cells**, Küsters, J. and Mühlberger E., XIIIth International Conference on Negative Strand Viruses, Juni 2006, Salamanca, Spanien

Veröffentlichungen

- **Absence of apoptosis in Ebolavirus-infected cells is not based on induction of anti-apoptotic signalling pathways**, Olejnik J. and Mühlberger E. (in Vorbereitung)
- **Characterization of the Marburg virus NP transcription start signal and the genomic replication promoter**, Enterlein S., Schmidt K., Schümann M., Conrad D., Krähling V., Olejnik J., Volchkov V. and Mühlberger E. (in Vorbereitung)

7.7 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst **PD Dr. Elke Mühlberger** für die hervorragende Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Vielen Dank für die immer hilfreichen Ratschläge und Ideen, die Hilfe bei Anträgen für ein Stipendium, das Korrekturlesen und die offene, lockere Atmosphäre (auch außerhalb des Labors).

Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl möchte ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit am Fachbereich Biologie danken, sowie **Prof. Dr. Wolfgang Buckel** und **Prof. Dr. Regine Kahmann** für die Bereitschaft als weitere Mitglieder der Prüfungskommission zu fungieren.

Desweiteren möchte ich mich auch bei unserem „alten“ Institutsleiter **Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk**, sowie seinem Nachfolger **Prof. Dr. Stephan Becker** für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit im Institut für Virologie bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung, in Form eines Doktorandenstipendiums, möchte ich mich bei der **Jürgen-Manchot-Stiftung** bedanken.

Die meiste Zeit dieser Arbeit wurde natürlich im Labor verbracht, daher einen besonderen Dank für das tolle Arbeitsklima, aber auch die vielen „Kaffeepausen“ mit tollen Kuchen usw. an die gesamte Arbeitsgruppe. Den aktuellen Mitgliedern **Verena Krähling, Tini Brauburger, Melanie Grosch, Kristina Schmidt, Monika Strengert, Dominik Conrad, Thorsten Gantke** und **Dr. Michael Schümann**, aber auch den „Ehemaligen“ **Steffi Altenkämper, Sven Enterlein** und **Martina Trunschke**, sowie allen Praktikantinnen und Praktikanten danke ich für die lustige Zeit, das Arbeiten hat in dieser Atmosphäre Spaß gemacht!

Allen anderen **Mitgliedern des Institutes für Virologie** möchte ich für die Bereitschaft auch Arbeitsgruppen-übergreifend mit Rat und Tat, wenn nötig zur Seite zu stehen danken.

Einen Großteil meiner Zeit verbrachte ich durch meine Versuche auch im Hochsicherheitslabor, für das gute Arbeitsklima und die oftmals auch langen Stunden des Wartens am alten Labor möchte ich mich neben den Mitstreitern unserer Arbeitsgruppe auch vor allem bei **Dr. Sandra Diederich, Dr. Thomas Strecker** und **Dr. Peggy Möller** bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt aber nochmals **Verena Krähling**, für den lustigen Laboralltag, die vielen zusammen verbrachten Stunden im Hochsicherheitslabor aber auch viele unvergessliche Abende außerhalb des Labors. Gemeinsam haben wir den

langen Weg zur fertigen Doktorarbeit erlebt und erfolgreich gemeistert, daher nochmal einen Extradank!

Ohne Unterstützung von **Freunden** wäre diese Arbeit jedoch nicht erfolgreich beendet worden, da ich aber beim Aufzählen eh jemanden vergessen würde vielen Dank an alle für die vielen „nicht-wissenschaftlichen Aktivitäten“ im Laufe dieser Zeit.

Viel Unterstützung und auch Interesse an meiner Arbeit bekam ich durch meine **Familie**, wofür ich mich hier auch bedanken möchte, besonders bei meinen Eltern **Hildegard und Gerhard-Walter Küsters**.

Der allergrößte Dank gilt jedoch meinem Mann **Karsten Olejnik**, der mich durch diese Arbeit begleitet hat ... in „guten, wie in schlechten Zeiten“... Vielen Dank für die Unterstützung jeglicher Art, seine Liebe und Geduld mich in allen Gefühlslagen ausgehalten zu haben und mich immer wieder aufzubauen!

7.8 Eidestattliche Erklärung

Erklärung

ich versichere, daß ich meine Dissertation

Regulation von Apoptose in Ebolavirus-infizierten Zellen

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Marburg/Datum)

(Judith Olejnik)